Studien zur Synthese neuer Derivate gegen Sarkopenie und Kachexie

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Stefan Lukas Peters

aus Mechernich

Frankfurt am Main 2023

Berichterstatter:	Prof. Dr. Hans-Günther Schmalz
	Prof. Dr. Peter Huy
	Prof. Dr. Sherif El Sheikh
	Prof. Dr. Julia Stingl
Tag der letzten mündlichen Prüfung:	19.04.2023

„*Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an, interessant zu werden, wo sie aufhört.*“

~ Justus Freiherr von Liebig ~

DANKSAGUNG

An dieser Stelle gilt es den Menschen zu danken, die dieses Projekt unterstützt oder sogar erst möglich gemacht haben:

Ein erster Dank gilt *Prof. Dr. Hans-Günther Schmalz* für die zu jeder Zeit freundliche Unterstützung und bereitwillige Übernahme der Betreuung dieser Arbeit. Daneben gilt *Prof. Dr. Peter Huy* ein Dank für die Übernahme des Zweitgutachtens. Zudem möchte ich mich bei allen Mitgliedern des AK Schmalz' sehr herzlich für die freundschaftliche Aufnahme in euren Kreis und den stets kompetenten Austausch bei Seminaren oder anderen Veranstaltungen bedanken. Der MS-Abteilung um *Dr. Schäfer* und *Michael Neihs* Danke ich für die Vermessung der Substanzen.

Einen eigenen Abschnitt an dieser Stelle verdient *Prof. Dr. Sherif El Sheikh*. Deine Unterstützung ging weit über die Betreuung dieses Projekts hinaus und startete tatsächlich schon vor 10 Jahren im Rahmen meines Bachelor Studiums. Ich danke dir nicht nur für die vielen fachlichen, sondern auch für die persönlichen Gespräche, das Mentoring, die Betreuung, dein Vertrauen und für die Vermittlung der Bachelor- und Masterprojekte und auch des Auslandsaufenthalts während der Promotion. Für dies und alles, was ich noch nicht aufgezählt habe: Ein großes Dankeschön!

Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen Mitarbeitenden der F11 an der TH Köln. Die meisten kennen mich ja schon was länger. Besonders hervorheben möchte dabei die Kollegen und Kolleginnen vom „Ex-4.OG": *Dr. Alex Kempa, Dr. Iman Atik, Dr. Karen Berg, Dr. Henrik Weber, Yulyia Richert, Nils Drouvé, Mi Steinbach, Natalie Tschorn, Stefanie Schatz, Yasemin van Heuvel* und *Jamila Rosengarten* und natürlich mein „Team" *Dr.Viktoria Marquardt, Roman Pacher, Janine Hein, Pauli Baae* und *Hanan Seghaoui*. Ohne eure super Arbeit und unermüdliche Unterstützung wäre dieses Projekt nicht möglich gewesen. Mit allen von euch war die Arbeit im Labor sowie die täglichen gemeinsamen Mittagessen immer eine Freude, und der Radio-Bollerwagen-Freitag auch!

Weiterhin bedanke ich mich bei Team *MINDGravity, Teamleader Johannis Striebel, Laura Kalinski, Max Sturm, Yannik Lichterfeld* und nochmal *Nils Drouvé,* sowie dem Team vom DLR, vor allem *Dr. Christian Liemersdorf* und der ESA Academy für die Projekterfahrung, „abgefahrene Weltraumwissenschaft" und den tollen fachlichen Austausch.

Dank gilt auch *Prof. Dr. Antonio Mouriño* und *Prof. Dr. Miguel Maestro* für die Ermöglichung der Arbeiten in ihrem Labor und die prägende und sehr erfolgreiche Zeit in Santiago de Compostela. Zudem danke ich *Gonzalo Lasante* und *Tamara* für die wirklich tolle Zeit im Labor und den fantastischen La Rioja Gran Reserva und *Carlos* für die tollen Abende und Kletterausflüge.

Zusätzlicher Dank an *Henrik, Nils, Pauli, Janine, Laura* und *Kerstin* fürs tatkräftige Korrekturlesen.

Bedanken muss ich mich weiterhin bei de *Männ us d'r Eifel* für die Unterstützung abseits vom Labor.

Zu guter Letzt gilt ein großer Dank meiner Familie: meinen Eltern, *Andrea & Norbert*, für einfach Alles, meiner Schwester *Kerstin*, ohne die ich, glaub ich, nie Wissenschaftler geworden wäre und *Lucia* für die bedingungslose Unterstützung zu jeder Zeit.

Leeven Dank üch all!

KURZZUSAMMENFASSUNG

Muskeldegeneration im Alter oder als Komplikation anderer Erkrankungen (Sarkopenie und Kachexie) sind schwerwiegende Syndrome, die die Lebensqualität und die Prognose für Krankheiten deutlich reduzieren. Verschiedenste Therapieansätze zur Behandlung dieses Syndroms wurden bisher ohne durchschlagenden Erfolg entwickelt. Ein mögliches therapeutisches Target ist das Signalpeptid Myostatin (MSTN), welches eine Schlüsselrolle in der Regulation des Muskelwachstums ausübt.

In diesem Projekt wurden aufbauend auf zwei Referenzverbindungen, einem Benzimidazol-Derivat (Referenz **7**) und einem 1*H*-[3,4-d]-Pyrazolopyrimidin-Derivat (Referenz **8**), neue „Small Molecules“ mittels computergestütztem Docking designed und synthetisiert. Dazu wurden modulare Syntheserouten zu den beiden Referenzverbindungen entworfen, wobei mitunter literaturbekannte Methoden auf neue Substrate erweitert wurden. Über diese Sequenzen konnten insgesamt 69 Verbindungen (Referenz **7** + 31 Derivate und Referenz **8** + 36 Derivate) erfolgreich hergestellt werden.

Die Ergebnisse der biologischen Charakterisierung der Verbindungen in einem zellbasierten Reportergen-Assay floss in das Design der jeweils nächsten Generation von Derivaten ein. So konnten mehrere hochpotente Verbindungen (IC_{50}-Werte <10 nM) entwickelt werden, wobei die meisten Derivate von **8** abgeleitet wurden und nur ein potentes Derivat von **7** synthetisiert wurde. In Folgeprojekten sollen die aktivsten Verbindungen weitergehend charakterisiert und der genau Wirkmechanismus entschlüsselt werden.

ABSTRACT

Muscle degeneration in old age or as a complication of other diseases (sarcopenia and cachexia) are serious syndromes that significantly reduce the quality of life and prognosis for disease. Various therapeutic approaches to treat this syndrome have been developed so far without resounding success. One potential therapeutic target is the signal peptide myostatin (MSTN), which plays a key role in the regulation of muscle growth.

In this project, building on two reference compounds, a benzimidazole derivative (reference **7**) and a 1*H*-[3,4-d]-pyrazolopyrimidine derivative (reference **8**), new "small molecules" were designed and synthesized using computer-assisted docking. For this purpose, modular synthetic routes towards the two reference compounds were designed, combining literature-known methods and extending them to new substrates. A total of 69 compounds (reference **7** + 31 derivatives and reference **8** + 36 derivatives) were successfully synthesized *via* these sequences.

The results of the biological characterization of the compounds in a cell-based reporter gene assay were incorporated into the design of the next generation of derivatives. Thus, several highly potent compounds (IC_{50} values <10 nM) were synthesized, with most derivatives derived from **8** and only one potent derivative synthesized from **7**. In follow-up projects, the most active compounds will be further characterized and the exact mechanism of action will be deciphered.

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 1

1.1 Myostatin (GDF-8) - Modulator des Muskelwachstums 2

1.2 Die TGF-β Superfamilie 2

1.3 Rezeptoren der TGF-β Signalproteine 7

1.4 Myostatin-Signalwege 9

1.4.1 Kanonischer Signalweg 12

1.4.2 Nicht-kanonische Signalwege 14

1.5 Expression und Aktivierung von Myostatin 16

1.6 Endogene Antagonisten des Myostatin-Signalwegs 19

1.7 Myostatin und Sarkopenie 21

1.8 Myostatin und Kachexie 24

1.9 Myostatin als Drug Target 27

1.9.1 Strategien zur Inhibition der Signalaktivität von Myostatin 29

1.9.2 Referenzverbindungen als Basis für neue Small Molecule MSTN-Inhibitoren. 34

2 AUFGABENSTELLUNG 37

3 DURCHFÜHRUNG / ERGEBNISTEIL 39

3.1 Docking von Derivaten mittels AutoDock VINA an MSTN 39

3.2 Synthese von 1*H*-[3,4-d]-Pyrazolopyrimidinverbindungen 46

3.2.1 Resynthese von IMB0901 50

3.2.2 Design und Synthese von IMB0901 Derivaten der 1. Generation 56

3.2.3 Biologische Evaluation von IMB0901 und den Derivaten der 1.Generation 59

3.2.3.1 MST-Assay mit MSTN 59

3.2.3.2 HEK293-Reportergen-Assay 65

3.2.4 Design und Synthese von IMB0901 Derivaten der 2. Generation 70

3.2.4.1 Derivate mit einer Modifikation von R^1 70

3.2.4.2 Derivate mit einer Modifikation von R^2 75

3.2.4.3 Reportergen-Assay der Derivate der 2. Generation 79

3.2.5 Design und Synthese von IMB0901 Derivaten der 3. Generation 84
3.2.5.1 Weitere Methoden zur Synthese neuer IMB0901-Derivate 85
3.2.5.2 Design und Synthese dreifachsubstituierter Derivate 92
3.2.5.3 Design und Synthese von IMB0901 mit verändertem Grundgerüst 99
3.2.5.4 Reportergen-Assay der Derivate der 3. Generation 106
3.2.6 Übersicht über die synthetisierten IMB0901 Derivate 110
3.3 Synthese von Benzimidazolverbindungen 112
3.3.1 Resynthese von NUCC-555 114
3.3.2 Design und Synthese von NUCC-555 Derivaten der 1. Generation 126
3.3.2.1 Derivate mit einer Modifikation von R^3 126
3.3.2.2 Derivate mit einer Modifikation von R^2 133
3.3.2.3 Derivate mit einer Modifikation von R^1 135
3.3.2.4 Derivate mit mehreren Modifikationen 138
3.3.2.4.1 Derivate ohne „nördliches“ Amid 138
3.3.2.4.2 Derivate mit 2-Aminobutanolrest 141
3.3.2.5 Reportergen-Assay der NUCC-555 Derivate der 1. Generation 144
3.3.3 Design und Synthese von NUCC-555 Derivaten der 2. Generation 148
3.3.3.1 Derivate mit Morpholinamid 148
3.3.3.2 Design und Synthese von trizyklischen NUCC-555 Derivaten 150
3.3.3.3 Reportergen-Assay der NUCC-555 Derivate der 2. Generation 157
3.3.4 Übersicht über die synthetisierten NUCC-555 Derivate 159
3.4 Sekundäre biologische Evaluation 161
3.4.1 Kinase-Inhibitions-Experimente 161
3.4.2 Ausblick: Wirkung auf C2C12-Zellen 164
4 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK 165
4.1 IMB0901-Projekt 166
4.2 NUCC-555-Projekt 173
4.3 Ausblick: weitere biologische Testung 179

5 AUSLANDSAUFENTHALT – AG MOURIÑO 181
5.1 Vitamin D_3: eine kurze Übersicht 181
5.2 Dockingstudien neuer potenzieller VD_3-Rezeptor Antagonisten 189
5.3 Synthese neuer Carboran-haltiger VD_3-Rezeptor Antagonisten 193
5.3.1 Synthese des Grundgerüsts 196
5.3.2 Synthese der Carboran-Bausteine 200
5.3.3 Synthese der Vitamin D_3-Analoga 205
5.4 Weitere Dockingstudien zu 1α,25-Dihydroxyvitamin D_3-Analoga 212
5.5 Zusammenfassung und Ausblick – Auslandsaufenthalt 214
6 EXPERIMENTELLER TEIL I 218
6.1 Allgemeine experimentelle Bedingungen 218
6.2 Docking-Workflow für IMB0901 und NUCC555 Derivate 222
6.3 Synthese von Derivaten basierend auf IMB0901 223
6.3.1 Allgemeine Synthesevorschriften 223
6.3.1 Derivate der 1. Generation 224
6.3.2 Derivate der 2. Generation 237
6.3.3 Derivate der 3. Generation 267
6.4 Synthese von Derivaten basierend auf NUCC555 287
6.4.1 Allgemeine Synthesevorschriften 287
6.4.2 Derivate der 1. Generation 290
6.4.3 Derivate der 2. Generation 342
7 EXPERIMENTELLER TEIL II 361
7.1 Allgemeine experimentelle Bedingungen 361
7.2 Docking-Workflow für Carboran-haltige Vitamin D_3 Analoga 364
7.2.1 Docking mit GOLD 364
7.2.2 Molecular Dynamics mit YASARA 365
7.3 Synthese Carboran-haltiger Vitamin D_3 Analoga 366
7.3.1 Synthese des Diin-Grundgerüsts 366
7.3.2 Synthese der Carboran-Bausteine 377

7.3.3 Synthese der Carboran-haltigen Derivate 381

8 ANHANG 387

8.1 ^{1}H und ^{13}C NMR-Spektren „Myostatin-Projekt“ 387

8.1.1 IMB0901-Projekt 387

8.1.2 NUCC-555-Projekt 452

8.2 ^{1}H und ^{13}C NMR-Spektren „AG Mouriño“ 509

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS i

LITERATURVERZEICHNIS v

ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION xx

1 EINLEITUNG

Sarkopenie und Kachexie sind vielschichtige Krankheitssyndrome, die klassischerweise durch Muskeldegeneration (Abbau und Funktionsverlust) charakterisiert sind. In deren Verlauf wird ein Gewichtsverlust und ein Muskelmassenverlust ausgelöst, was sich negativ auf die Patienten auswirkt.[1,2] Dieser Muskeldegeneration entgegenzuwirken, ist Bestandteil der aktuellen Forschung. Die Frage nach einem geeigneten biologischen Ziel (Drugtarget) zur Entwicklung neuer Therapien ist von essenzieller Bedeutung. Von Interesse sind bei dieser Frage verschiedene biologische Mechanismen; Fett- und Zuckerstoffwechselprozesse, der (Wachstums-)Hormonhaushalt, oder muskuläre Signalfaktoren. Zusammen bieten diese Mechanismen eine Vielzahl von möglichen therapeutischen Angriffspunkten. Ein Wachstumsfaktor sticht jedoch durch seine herausragende Wirkung auf die Muskulatur hervor: Myostatin.

Im Jahr 1997 endeckten Lee und McPherron *et al.* eine Genmutation, die zu einem extrem muskulären Phänotyp in Mäusen führte. Durch diese homozygote Mutation konnte das Genprodukt nicht funktional exprimiert werden und die Tiere wiesen die doppelte Muskelmasse im Vergleich zu den Kontrolltieren auf (siehe Abbildung 1). Dieses neuentdeckte, und durch die Mutation nicht funktional exprimierte, Protein musste somit ein Inhibitor (oder genauer gesagt: ein negativer Modulator) des Muskelwachstums sein. Lee und McPherron ordneten den Wachstumsfaktor der Transforming Growth Factor β (TGF-β) Superfamilie zu und bezeichneten es als Growth Differentiation Factor 8 (GDF-8) oder Myostatin (MSTN).[3,4]

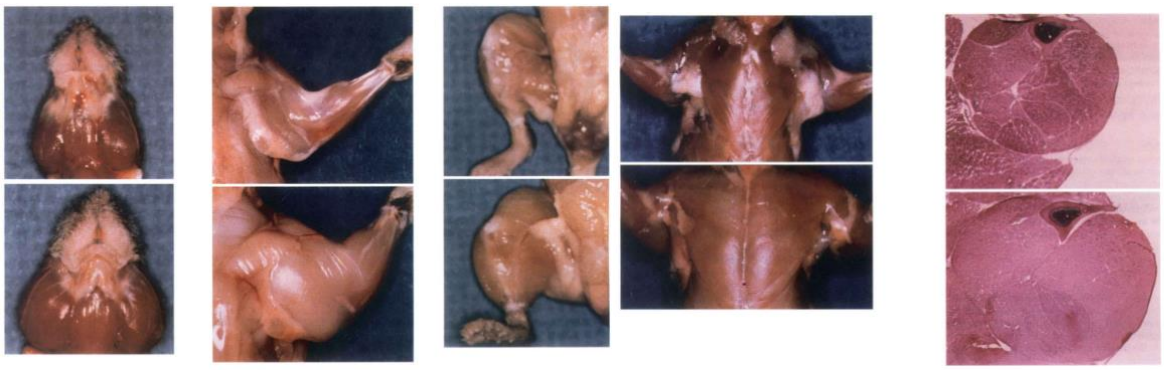


Abbildung 1:Vergleich der Muskulatur von Wildtypmäusen (Obere Reihe) und MSTN(GDF-8) Knockout Mäusen: Muskelgruppen von links nach rechts: Kopf/vorderer Rumpf, Vordere Extremität, Hintere Extremität, Brust, Querschnitt durch Oberschenkel.[3] (modifiziert)

1.1 Myostatin (GDF-8) - Modulator des Muskelwachstums

MSTN ist genetisch stark konserviert und tritt in vielen Wirbeltieren auf. Eine natürliche Mutation des MSTN-Gens und der daraus resultierende muskuläre Phänotyp wurde anschließend in verschiedenen Spezies, unter anderem in Kühen, Schafen, Hunden, Pferden, verschiedenen Fischarten und auch beim Menschen nachgewiesen.[5–12] Neben der negativen Modulation des Muskelwachstums wirkt es ebenfalls auf die Bildung von Fettgewebe. Dort führt eine Reduktion von MSTN zu einer Verminderung der Fettgewebsbildung und zu einer Unterdrückung der Fettakkumulation.[13] Das Expressionslevel von MSTN variiert im Laufe des Lebens, wobei es generell bei verminderter Bewegung zunimmt.[14,15] Durch seine modulierende Wirkung auf die Muskulatur wird es für die verschiedensten muskulären Erkrankungen als Biomarker und/oder als Target für einen Therapieansatz in Betracht gezogen.[16,17]

Zunächst soll eine Einordnung von Myostatin in die TGF-β Signalprotein-Superfamilie erfolgen. Eine Übersicht über die Signalwege und die Expression gibt Aufschluss über mögliche Interventionsmöglichkeiten für neue Wirkstoffe. Anschließend soll die Rolle von MSTN in verschiedenen Indikationen insbesondere in Bezug auf Sarkopenie und Kachexie erörtert und bisherige Ansätze zur Entwicklung von Wirkstoffen betrachtet werden.

1.2 Die TGF-β Superfamilie

In Säugetieren wurden 33 Gene, welche für TGF-β Proteine codieren, identifiziert. Jedes Gen wird als Polypeptid exprimiert, das aus einer ~ 250-Aminosäuren (AS) langen Prodomäne und einem ~110-AS langen Signalpeptid besteht. Diese C-terminalen Signalpeptide formen Homo- oder Heterodimere, welche die aktiven Cytokine darstellen. Bemerkenswert ist dabei, dass diese Wachstumsfaktoren zwischen den verschiedenen Spezies eine große Sequenzhomologie aufweisen; sie sind also evolutionär stark konserviert. Die Superfamilie gliedert sich weiter in verschiedene Untergruppen, wobei die Homologie der Aminosäuresequenz, die evolutionäre Verwandtschaft aber auch die Rezeptornutzung und der Signalweg den Ausschlag zur Einordnung geben.[18]

Die Untergruppen setzen sich aus den Bone Morphogenic Factors (BMPs), den Growth and Differentiation Factors (GDFs), den Activinen/Inhibinen und den TGF-β Growth Factors

(TGF-β GFs) zusammen. Daneben gibt es einige Vertreter, die sich nicht in diese Untergruppen eingliedern lassen (siehe Abbildung 2).[19]

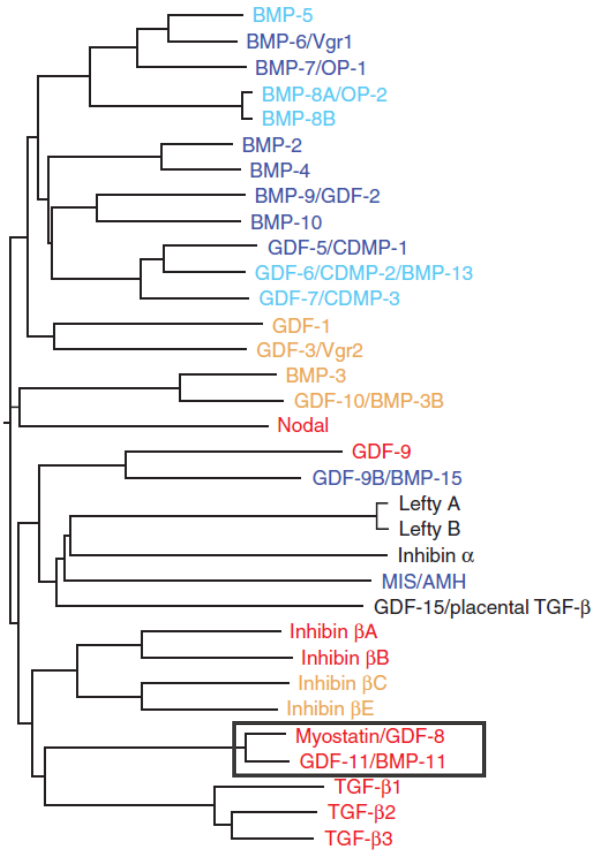


Abbildung 2:Phylogenetischer Stammbaum der 33 TGF-β Superfamilien Signalproteine. Stammbaum erstellt auf Basis der Sequenzhomologie der C-terminalen aktiven Signalproteine. Die GDFs und BMPs bilden zusammen eine große Untergruppe (oben in der Abbildung), daneben steht die Gruppe der Aktivine/Inhibine und der TGF-β GFs (unten). Dazwischen befinden sich die Vertreter, die nicht in diese Gruppen fallen. Myostatin (auch als GDF-8 bezeichnet) und GDF-11 (auch als BMP-11 bezeichnet) im Kasten.[20] (modifiziert)

Nachfolgend werden kurz die physiologischen Eigenschaften der wichtigen Vertreter der TGF-β Superfamilie aufgeführt.

Transforming Growth Factors-β Subfamilie (TGF-β):

Die drei humanen TGF-β Proteine (TGF-β1, TGF-β2 und TGF-β3) kommen als Homodimere vor, wirken auf den gesamten Organismus und stimulieren oder regulieren Zellwachstum und das Immunsystem.[21] Es konnte gezeigt werden, dass ein genetischer Knock-Out von bestimmten Proteinen dieser Subgruppe zu schweren Entwicklungsstörungen des Embryos führt.[22] Sie sind bei der embryonalen Entwicklung von Herz, Lunge, Urogenitaltrakt und Knochen und an der Wundheilung und Narbenbildung beteiligt.[22,23] Weiterhin wird die Rolle

von TGF-β GFs bei der Bildung der Tumor-Mikro-Umgebung und der Unterdrückung der Anti-Tumor-Immunantwort diskutiert.[24]

Activine (ACV) und Inhibine:

Die Activine und Inhibine unterscheiden sich von den anderen Proteinen dadurch, dass diese sich als Homo- oder Hetereodimer aus verschiedenen Varianten ihres Monomers Inhibin (Inhibin α und Inhibin β und von diesen jeweils Isoformen) zusammensetzen. Die verschiedenen Activine wirken sehr heterogen auf den Organismus. Beispielsweise wirkt Activin A (ACVA auch benannt als Inhibin βA) unter anderem auf die Follikelreifung und die Spermatogenese und somit auf den Reproduktionsmechanismus.[25,26] Der Signalweg und die Rezeptornutzung von ACVA und MSTN sind stark überlappend und eine gleichzeitige Inhibition dieser Signalproteine könnte einen erhöhten therapeutischen Nutzen bei Muskeldegeneration aufweisen.[27] Gleichzeitig wären bei einer unselektiven Inhibition auch unerwünschte Effekte denkbar und Langzeitstudien mit dualen Inhibitoren wurden noch nicht durchgeführt.

Bone Morphogenic Proteins (BMP) und Growth Differentiation Factors (GDF):

Die BMPs und die GDFs bilden die größte Subgruppe, wobei sich diese wiederum durch einen Vergleich der Aminosäuresequenzen in kleinere Untergruppen aufteilen lässt. Die BMPs wirken dabei hauptsächlich, aber nicht ausschließlich auf die Osteogenese und Homöostase der Knochen.[28] Einige Vertreter der GDFs spielen unter anderem in der Bildung des Skeletts eine wichtige Rolle.[29]

Myostatin und GDF-11

MSTN gehört gemäß Nomenklatur zu den GDFs, was durch seine Bezeichnung als GDF-8 deutlich wird. Es ähnelt jedoch evolutionär und auf Basis der Aminosäuresequenz stärker den Aktivinen/Inhibinen und TGF-β GFs (siehe Abbildung 2). Dort bildet es zusammen mit dem bis auf zehn Aminosäuren homologen GDF-11 einen eigenen Zweig auf dem phylogenetischen Stammbaum.[20] Die beiden Signalproteine zeichnen sich durch ihre Wirkung auf die Muskulatur aus.[30,31]

Bemerkenswert ist, dass MSTN und GDF-11 über die gleichen Rezeptortypen ihr Signal transduzieren, sie sich aber trotzdem in ihrer genauen Wirkung unterscheiden. Ein Organismus, welcher kein funktionelles GDF-11 produzieren kann, wird das Embryonenstadium nicht überleben, wohingegen, wie zuvor beschrieben, bei einem Gen-Knock-Out von MSTN der typische Muskelphänotyp auftritt. Weiterhin ist MSTN einzigartig im Vergleich zu den anderen

Vertretern der TGF-β Superfamilie einschließlich GDF-11, da sich ein Gen-Knock-Out nicht auf die Skelettbildung und das Skelettwachstum auswirkt.[32]

MSTN wirkt auf die Proliferation und Ausdifferenzierung von Myoblasten, welche zu Myotuben ausdifferenzieren, wodurch es die Anzahl Muskelfasern beeinflusst. Darüber hinaus hat MSTN einen Einfluss auf die Größe der Fasern. Diese wird durch die Proliferation und Ausdifferenzierung von Satellitenzellen bestimmt. Die Zellen befinden sich während des Muskelwachstums in einem Ruhezustand, können aber reaktiviert werden, wodurch sie wieder in den Zellzyklus eintreten und mit bestehenden Muskelfasern verschmelzen. Durch die Wirkung von MSTN werden die Satellitenzellen jedoch im Ruhezustand gehalten.[33,34] Aufgrund dieser Effekte auf die Skelettmuskulatur wird MSTN zu einem Schlüsselprotein als negativer Modulator des Muskelwachstums.[31]

Myostatin besteht, wie die anderen Signalproteine der TGF-β Familie, aus zwei Monomeren, die über inter- und intramolekulare Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und dabei eine charakteristische dreidimensionale Struktur bilden (siehe Abbildung 3).

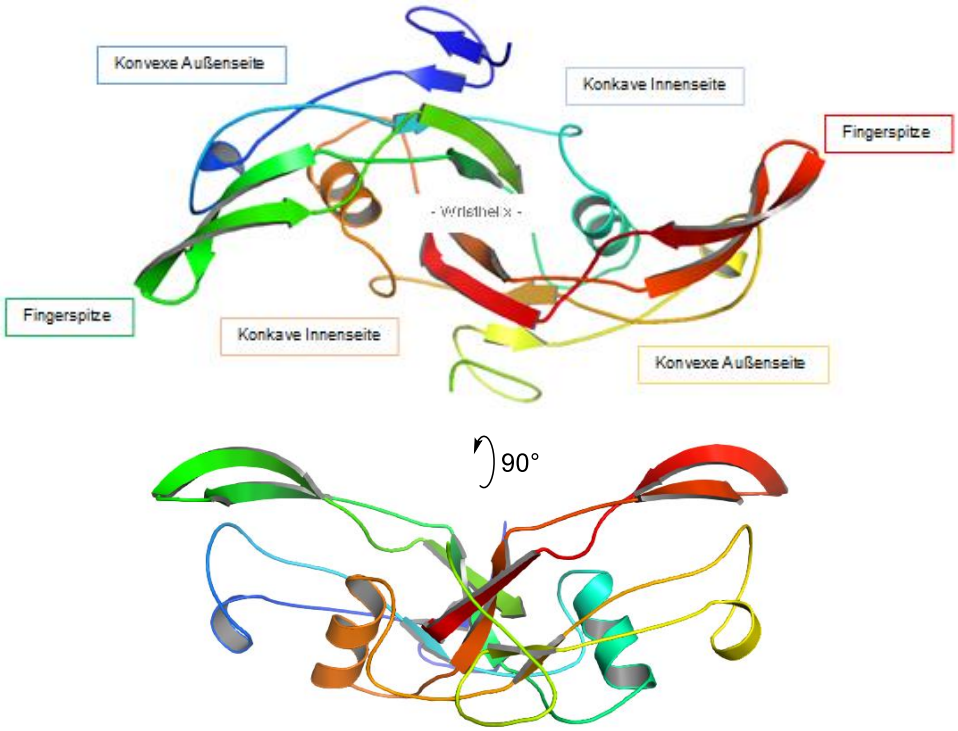


Abbildung 3: Röntgen-Kristall-Struktur (Cartoon, 3HH2.pdb) von MSTN. Die beiden Monomere bilden zusammen eine konkave Innenseite und eine konvexe Außenseite. Die antiparallelen β-Faltblatt-Strukturen (grün/blau und Rot/gelb) bilden die „Finger". In der Mitte befinden sich die inter- und intramolekularen Disulfidbrücken (Cystein-Knoten) und die beiden „Wristhelices"(orange und türkis). Unten: Struktur um 90° gedreht. Der Winkel zwischen den „Fingerspitzen" wird deutlich. Dieser ist jedoch von einer gewissen Plastizität gekennzeichnet. [35]

Die Polypeptidkette bildet einen Ring, der von zwei Disulfidbrücken umgeben wird. Eine dritte Disulfidbrücke führt zusätzlich durch diesen Ring. Diese Struktur wird als Cystein-Knoten bezeichnet und ist charakteristisch für die Gruppe der Cystein Knot Growth Factors (CKGFs) zu denen die TGF-β Superfamilie gehört.[36] Die Anzahl der Disulfidbrücken unterscheidet sich dabei jedoch zwischen den verschiedenen Vertretern. Im Fall von MSTN treten vier intramolekulare Disulfidbrücken pro Monomer und eine intermolekulare Disulfidbrücke zwischen den beiden Monomeren auf.[20,37] Die Dimere besitzen eine konvexe Außenseite, die „Rückhand" sowie eine konkave Innenseite, die „Handfläche" und die „Fingerspitzen" am Ende der „Hand". Die „Finger" setzen sich aus antiparallelen β-Faltblatt-Strukturen zusammen. Des Weiteren wird die Helix in der Nähe des Cystein-Knoten als „Wristhelix", also als Handgelenk bezeichnet.[38] Darüber hinaus werden die beiden Enden ausgehend vom Cystein-Knoten auch als „Propeller" bezeichnet (siehe Abbildung 3).[18]

Die Aminosäuresequenz und die genaue 3-dimensionale Form der Tertiärstruktur sind entscheidend für die jeweilige Rezeptornutzung und –affinität. Einige Vertreter, so auch Myostatin, weisen allerdings eine gewisse Flexibilität in ihrer Struktur auf. So variiert der Winkel zwischen den beiden „Propellern" (oder „Fingerspitzen", also den gegenüberliegenden Seiten) erheblich.[18] Die unterschiedlchen Formen hängen von der Interaktion mit verschiedenen endogenen Bindern von MSTN zusammen und beeinflussen die Aktivität von MSTN (siehe Kapitel 1.3 und 1.4). Es wird dabei zwischen einer offenen Form mit großem Winkel (~110 °) und der geschlossenen Form mit kleinerem Winkel (~52 °) unterschieden (siehe Abbildung 4).[39]

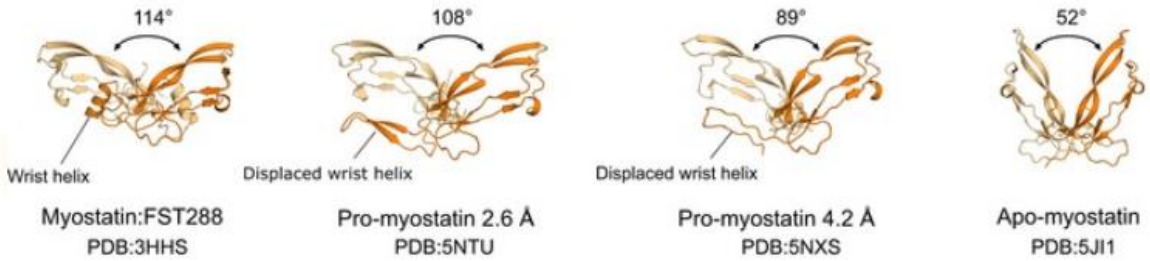


Abbildung 4: Vergleich der Winkel zwischen den zwei Monomeren von MSTN in unterschiedlichen Röntgen-Kristall-Strukturen mit jeweiliger Auflösung. MSTN gebunden an Follistatin (3HH2), MSTN gebunden an Prodomäne (5NTU, 5NXS) MSTN ungebunden kristallisiert (Apo-Form 5JI1). Gebunden an die Prodomäne ist die „Wrist-Helix" verformt (vgl. Kapitel 1.4).[39]

Die verschiedenen Mitglieder der TGF-β Familie wirken zellspezifisch und im Mechanismus unterschiedlich auf das Gewebe und den Körper, wobei sie jedoch eine relativ kleine Anzahl an membranständigen Rezeptoren nutzen.[18,40,41]

1.3 Rezeptoren der TGF-β Signalproteine

Zur Signaltransduktion binden MSTN und die anderen Peptide der TGF-β Superfamilie an membranständige Rezeptor-Serin-Threonin-Kinasen.[42,43] Dabei binden sie an zwei verschiedene Arten von Rezeptoren, die sogenannten Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren, welche nach erfolgter Bindung auf der Zelloberfläche einen Rezeptor-Ligand-Komplex bilden. Die Affinität und die Abfolge der Bindung an die verschiedenen Typ-I und II-Rezeptoren unterscheiden sich zwischen den Signalproteinen der TGF-β Familie.[18] Durch das Wechselspiel aus zellspezifischer Expression der jeweiligen Rezeptoren und Rezeptornutzung der Signalproteine ergeben sich die beobachteten Unterschiede in ihrer Wirkung.[18,44]

Die ~500 AS langen membranständigen Rezeptoren der TGF-β Signalproteine bestehen aus einer N-terminalen extrazellulären Liganden-Bindungs-Stelle einer einzelnen Transmembranregion und einer C-terminalen intrazellulären Serine/Threonin Kinase-Domäne. Dies gilt sowohl für die Typ-I- als auch für die Typ-II-Rezeptoren, wobei nur die Typ-I-Rezeptoren eine Serin-Glycin reiche Sequenz oberhalb der Kinasedomäne aufweisen.[18] Grundsätzlich sind sieben Typ-I-Rezeptoren und fünf Typ-II-Rezeptoren beim Menschen bekannt. Zusätzlich wurden von einigen Rezeptoren Isoformen entdeckt (siehe Tabelle 1).[18,45,46]

Tabelle 1: Übersicht über die verschiedenen bekannten humanen Rezeptoren der TGF-β Superfamilien-Proteine. Die meisten Rezeptoren besitzen mehrere Bezeichnungen und mehrere Abkürzungen.

Typ I:	Typ II:
Activin Receptor-like Kinase 1 (ALK-1 oder ACVRL1)	Activin Receptor IIA (ActRIIA)
ALK-2, ebenfalls benannt als Activin Receptor I (ActRI)	Activin Receptor IIB (ActRIIB)
ALK-3, ebenfalls benannt als BMP Receptor IA (BMPRIa)	BMP Receptor II (BMPRII)
ALK-4, ebenfalls benannt als ActRIb	TGF-β Receptor II(TβRII)
ALK-5, ebenfalls benannt als TGF-β Receptor I (TβRI)	AMH Receptor II (AMHRII)
ALK-6, ebenfalls benannt als BMPRIb	
ALK-7, ebenfalls benannt als ActRIc	

Die meisten Rezeptoren sind entsprechend ihrer Liganden benannt, wobei einige über mehrere Bezeichnungen verfügen. Viele der Rezeptoren werden von mehreren Liganden genutzt, auch wenn es teilweise deutliche Präferenzen für Einzelne gibt und die präferierten Liganden können andere Signalproteine von dem jeweiligen Rezeptor verdrängen.[44] MSTN nutzt zur Signaltransduktion, genau wie GDF-11, einerseits ALK-4 (ActRIb) und ALK-5 (TβRI) als Typ-I-Rezeptor und ActRIIA und ActRIIB als Typ-II-Rezeptor (siehe Tabelle 1 und Tabelle 2).[18]

Tabelle 2: Übersicht über verschiedene Vertreter der TGF-β Superfamilie (unvollständig), deren jeweilige Rezeptornutzung und den R-SMAD Signalweg (MSTN und GDF-11 im Kasten) [18] (modifiziert und übersetzt)

	Ligand	Typ-I-Rezeptor	Typ-II-Rezeptor	R-SMAD
BMPs/GDFs	BMP-2/4	BMPRIa BMPRIb	BMPRII ActRIIA ActRIIB	SMAD 1/5/8
	BMP-5/6/7/8	ActRI BMPRIa BMPRIb	ActRIIA ActRIIB BMPRII	SMAD 1/5/8
	GDF-5/6/7	BMPRIa BMPRIb	BMPRII ActRIIA ActRIIB	SMAD 1/5/8
	BMP-9/10	ALK-1	BMPRII ActRIIA ActRIIB	SMAD 1/5/8
	GDF-1/3	ActRIb	ActRIIA ActRIIB	SMAD 2/3
	BMP-3/GDF-10	ActRIb	ActRIIA ActRIIB	SMAD 2/3
	MSTN(GDF-8)/GDF-11	ActRIb (ALK-4) TβRI (ALK-5)	ActRIIA ActRIIB	SMAD 2/3
	BMP-15/GDF-9	BMPRIb ActRIb TβRI	BMPRII	SMAD 1/5/8 SMAD 2/3
TGFs	TGF-β1/2/3	TβRI ALK-1	TβRII	SMAD 2/3 SMAD 1/5/8
Activine/Inhibine	ACVA	ActRIb	ActRIIA ActRIIB	SMAD 2/3
	ACVB	ActRIb ActRIc	ActRIIA ActRIIB	SMAD 2/3
	Nodal	ActRIb ActRIc	ActRIIB	SMAD 2/3

Neben der Rezeptornutzung unterscheiden sich die Vertreter der TGF-β Superfamilie ebenfalls darin, dass entweder zunächst der Typ-I-Rezeptor und anschließend der Typ-II-Rezeptor gebunden wird, oder andersherum. Der Typ-I-Rezeptor wird hauptsächlich in der konkaven Tasche gebunden, während die Position des Typ-II-Rezeptors und die Interaktionsfläche des Signalproteins bei den verschiedenen Vertretern variiert. Bei den TGF-β Signalproteinen ist eine Bindung an den „Fingerspitzen" der Hand zu beobachten, wodurch zusätzlich eine direkte extrazelluläre Interaktion der Typ-I und Typ-II-Rezeptoren untereinander möglich ist. Die BMPs, Activine/Inhibine und GDFs binden dagegen die Typ-I und Typ-II-Rezeptoren jeweils auf den gegenüberliegenden Seiten der „Hand/Propeller". [47–50]

1.4 Myostatin-Signalwege

Die Selektivität der strukturell sehr ähnlichen Signalproteine ergibt sich aus verschiedenen Faktoren. Zur Bindung der Rezeptoren ist neben der Aminosäuresequenz die genaue 3-dimensionale Form der konvexen und der konkaven Tasche entscheidend.[38,51] Einige der Liganden benötigen zusätzlich einen Co-Faktor zur initialen Bindung des Typ-II-Rezeptors. Zum Beispiel bindet ACVA nur in der Gegenwart von Betaglycan an ActRIIA/B.[52] Für MSTN ist bisher kein Co-Rezeptor bekannt.[33] Eine weitere Selektivität ergibt sich aus unterschiedlichen Affinitäten zu den Rezeptoren und dem Expressionsmuster der Rezeptoren auf den verschiedenen Zielzelltypen.[44]

Myostatin bindet zunächst seine Typ-II-Rezeptoren ActRIIA und B, anschließend rekrutiert dieser Ligand-Rezeptor-Komplex die Typ-I-Rezeptoren ALK-4/5.[31,53] Die Affinität von MSTN zu ActRIIA und B ist dabei sehr hoch, was durch Bindungsexperimente mit der extrazellulären Rezeptordomäne bestätigt wurde.[54] Dabei gibt es eine leichte Präferenz zur Bindung an ActRIIB gegenüber ActRIIA.[46] Die Rezeptor-Bindungs-Fläche ist, wie bei anderen Vertretern der GDFs, die Rückseite der „Hand" (siehe Abbildung 5). Bemerkenswert ist dabei, dass die für die Interaktion verantwortlichen Aminosäuren für die Bindung an ActRIIA und B bei MSTN und GDF-11 identisch sind, und ebenfalls eine große Homologie zu ACVA und ACVB aufweisen, was sich in der gemeinsamen Nutzung dieser Rezeptoren wiederspiegelt.[55]

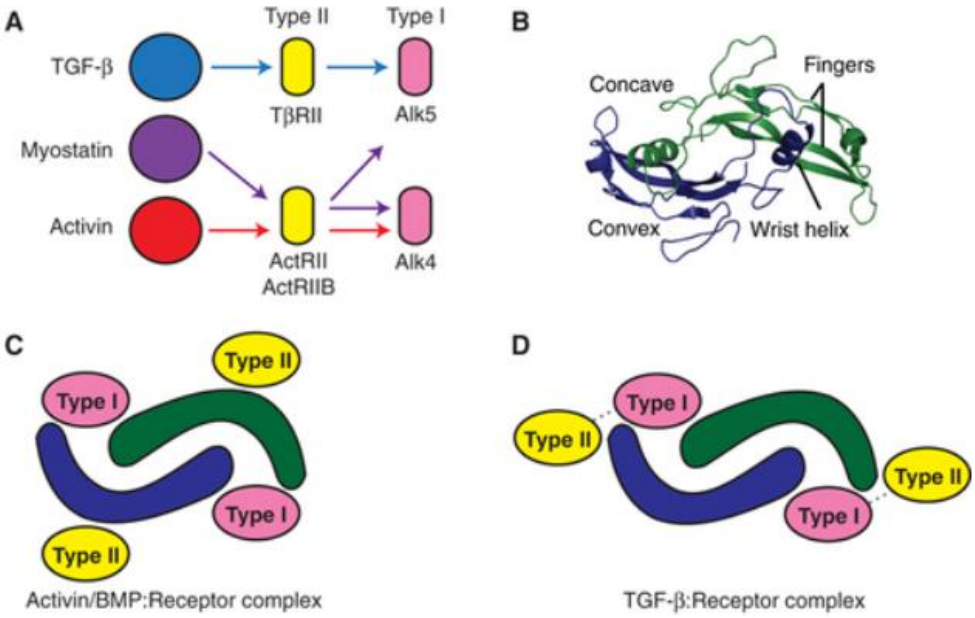


Abbildung 5:A: Rezeptornutzung der TGF-β GFs, von MSTN und Activin. MSTN nutzt die Typ-II-Activin-Rezeptoren, jedoch sowohl Typ-I-Activin als auch Typ-I-TGF-β-GF-Rezeptoren. B: Röntgenkristallstruktur von MSTN (3HH2). C: Rezeptorbindungsdomänen der Activine und BMPs. D: Rezeptorbindungsdomänen der TGF-β-GFs. MSTN bildet ähnliche Rezeptor-Komplexe wie die Activine/BMPs.[38] (modifiziert)

Die Bindung an die Typ-I-Rezeptoren ist erst nach der erfolgten Typ-II-Ligand-Komplexbildung möglich.[53] Dabei ist die Bindung zu ALK-4 oder 5 deutlich schwächer als zu den Typ-II-Rezeptoren und erfolgt in der konkaven Tasche des Proteins. Interessanterweise können GDF-11 und MSTN über ALK-4 und den TFG-β Typ-I-Rezeptor ALK-5 ihr Signal transduzieren, das in seiner 3-dimensionalen Struktur sehr ähnliche ACVA jedoch nur über ALK-4, obwohl ACVA und MSTN an die gleichen Typ-II-Rezeptoren binden. Der entscheidende Bereich für diesen Unterschied ist der sogenannte „Pre-helix loop“ (AS 49-55 in der Sequenz), in dem die ansonsten ähnliche Aminosäuresequenz zwischen ACVA und MSTN deutliche Unterschiede aufweist. Dieser Abschnitt ist bei MSTN durch größere unpolare und rigidere Aminosäuren gekennzeichnet und ähnelt am ehesten den TGF-β GFs, was die gemeinsame Nutzung von ALK-5 erklärt. Wurde diese „Pre-helix loop“ Region in ACVA eingebaut, konnte dieses künstliche Protein das Signal ebenfalls über ALK-5 weiterleiten.[38] In der Typ-I-Rezeptor-Bindungs-Domäne befinden sich zudem Unterschiede in der Sequenz von MSTN und GDF-11, vor allem in der Region der „Wristhelix“, was Selektivitäts- und Potenzunterschiede zwischen diesen beiden sehr homologen Signalproteinen zur Folge hat.[44] GDF-11 weist dabei eine höhere Affinität zu den Typ-I-Rezeptoren auf. Es zeigte sich jedoch, dass der Austausch von zwei Aminosäuren, von Histidin 62 (His62) und

Alanin 100 (Ala100) in MSTN zu Glutamin 62 (Gln62) und Glycin 100 (Gly100), wie in GDF-11, die Bindungsaffinität an die Typ-I-Rezeptoren erhöht (siehe Abbildung 6).[44]

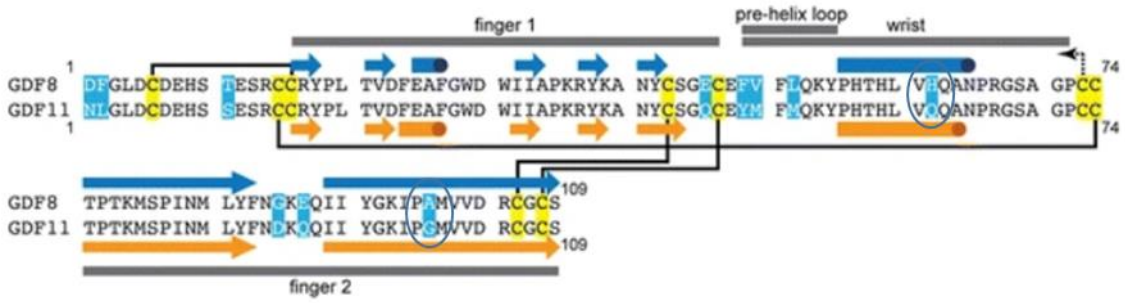


Abbildung 6: Darstellung der Sekundärstruktur von MSTN (GDF-8, blau) und GDF-11 (orange). Pfeile zeigen β-Faltblattstrukturen an, Balken α-Helixstrukturen. Wichtige Abschnitte der Tertiärstruktur sind in grau markiert. Cysteine (gelb markiert) bilden Disulfidbrücken aus (schwarze Verbindungen). Unterschiede in der Aminosäuresequenz (blau markiert). Die Unterschiede bei His62 und Ala100 in MSTN sind durch die Ovalen markiert.[44] (modifiziert)

Die Bildung des tetrameren Ligand-Rezeptor-Komplexes mit jeweils zwei Typ-II- und Typ-I-Rezeptoren startet anschließend eine Transphosphorylierungs-Kaskade, wobei ActRIIA und B die Typ-I-Rezeptoren ALK-4/5 transphosphorylieren und diese dadurch aktivieren.[25] Die Phosphorylierung findet dabei an Serin- und Threonin-Resten in der regulatorischen GS-Sequenz der Typ I-Rezeptoren statt.[56]

Die Weiterleitung des Signals durch die aktivierten Typ-I-Rezeptoren kann anschließend über den sogenannten (in Kapitel 1.4.1 beschriebenen) Kanonischen Signalweg mittels SMAD-Proteinen oder den sogenannten Nicht-Kanonischen Signalweg (Kapitel 1.4.2) erfolgen.

1.4.1 Kanonischer Signalweg

Die aktivierten Typ-I-Rezeptoren phosphorylieren anschließend intrazelluläre SMAD Proteine. Die Bindung und Phsophorylierung der SMADs erfolgt dabei ebenfalls in der GS-Domäne der Typ-I-Rezeptoren.[56] Der Name dieser Proteine ist zusammengesetzt aus dem Namen des SMA Gens des Fadenwurms Caenorhabditis elegans und des Mothers against Decapentaplegic (MAD) Gens der Drosophila Fliegen.[57] Diese SMAD-Proteine sind ubiquitär und an vielen physiologischen Prozessen beteiligt. Die verschiedenen Proteine teilen sich nach ihrer Funktion in drei Gruppen auf: die Rezeptor-aktivierten SMADs (R-SMAD; SMAD 1/2/3/5/8), die Co-Faktor SMADs (Co-SMAD; SMAD 4) und die inhibitorischen SMADs (I-SMAD; SMAD 6/7).[58] MSTN nutzt für die Signaltransduktion R-SMAD 2 und 3, welche nach der Phosphorylierung durch ALK-4/5 das Co-SMAD 4 Protein rekrutieren, um ein Heteromer aus R-SMADs und einem Co-SMAD zu bilden. Diese Komplexe bestehen meistens aus einem oder zwei R-SMADs und einem Co-SMAD (siehe Abbildung 7).

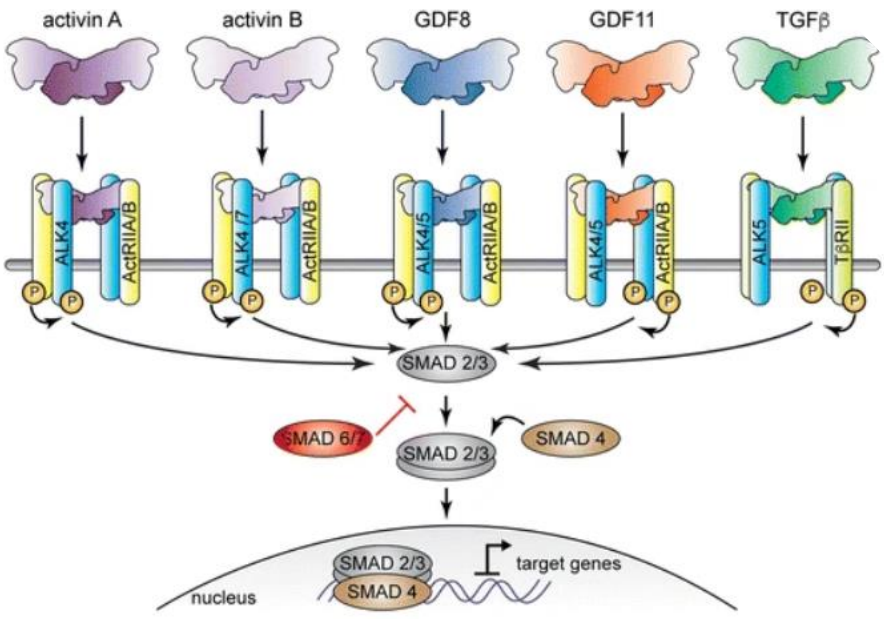


Abbildung 7: Übersicht über die Rezeptornutzung und SMAD-Signalkaskade einiger Vertreter der TGF-β Familie. MSTN (GDF-8) bindet an ActRIIA/B (gelb) mit hoher Affinität und anschließend ALK-4/5 (blau) mit niedriger Affinität. Der Typ-II-Rezeptor phosphoryliert den Typ-I-Rezeptor nach erfolgter Ligand-Rezeptor-Komplex Bildung. Der Typ-I-Rezeptor aktiviert SMAD 2/3 durch Phosphorylierung, welche anschließend Co-SMAD 4 rekrutieren und in den Zellkern migrieren. Dort treibt dieser Second-Messenger-Komplex die Transkription der Zielgene (Kanonischer Signalweg).[44] (modifiziert)

Das Heteromer migriert anschließend in den Zellkern, wo es an SMAD-binding-Elements (SBE) auf der DNA bindet und als Transkriptionsfaktor dient.[59–61] Die entdeckten

Bindungstellen auf der DNA bestehen aus sich wiederholenden kurzen DNA-Abschnitten. Die erste beschriebene Sequenz besteht aus der inversen sieben Basenpaare (bp) langen Wiederholung der Nucleotide CAGACAG, wobei die Gesamtbindesequenz aus 5‘-CAGACAGtCTGTCTG-3‘ besteht (A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin). Das Thymin in der Mitte der inversen Wiederholung ist dabei eine Art Spacer.[60] Spätere Ergebnisse präzisierten die Sequenz auf das acht bp-lange Palindrom 5‘-GTCTAGAC-3‘. Nachfolgend wurde festgestellt, dass nur der vier bp-lange Abschnitt 5’GTCT-3‘ oder komplementär 5‘-AGAC-3‘ zur Bindung des SMAD-Komplexes notwendig sind. Diese Sequenz, genannt CAGA-Box, liegt häufig als Tandemwiederholung im Abstand von einigen Basenpaaren vor, wobei oftmals ein weiteres Cytosin die Sequenz zu 5‘-CAGAC-3‘ ergänzt.[58] Die Anzahl der Wiederholungen ist entscheidend für die Selektivität gegenüber verschiedenen SMAD-Protein-Komplexen.[62]

Befindet sich eine Promotor-Region auf der DNA hinter den SBEs, wird diese aktiviert und reguliert damit die Expression des folgenden Genabschnitts.[62] Da diese CAGA-Box-Abschnitte sehr kurz und damit sehr unspezifisch sind, sind weitere Co-Faktoren zur Regulierung der Zielgene notwendig. Die Anzahl der verschiedenen Co-Faktoren, welche durch die SMAD-Proteine genutzt werden ist sehr variabel und die Anzahl an regulierten Zielgenen liegt bei über 500.[58] Das genaue Zusammenspiel der verschiedenen Signalwege und Transkriptionsfaktoren ist daher komplex und scheint weiterhin vom betrachteten Zelltyp abzuhängen. Es findet eine Zellkontext-abhängige Expression von Zielgenen statt, je nachdem welche Co-Faktoren vorhanden sind (siehe Abbildung 8). Dabei kann sowohl ein Gen durch die Bindung des SMAD-Co-Faktor-Komplexes exprimiert werden, als auch seine Expression unterdrückt werden.[63]

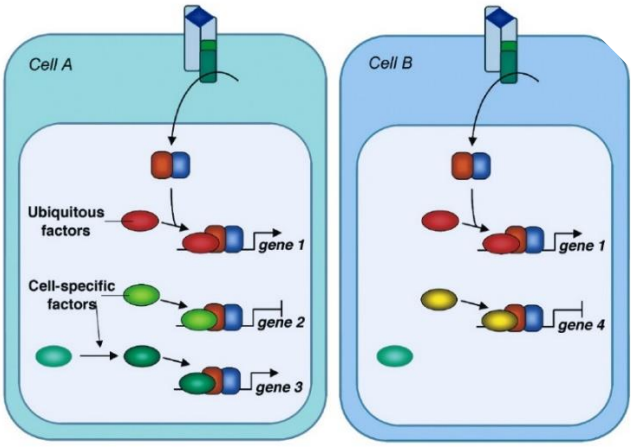


Abbildung 8: Zellkontext abhängige Genexpression nach Aktivierung der SMAD-Proteine. Ubiquitäre Co-Faktoren führen zu einer Zelltyp unabhängigen Regulierung der Expression, wohingegen Zellspezifische Faktoren zu differenzierteren Expressionsmustern führen.[63] (modifiziert)

Im Fall von MSTN konnten mittlerweile einige Co-Faktoren und Signalwege bestimmt werden. Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Forkhead-Box-Protein O (FoxO) Transkriptionsfaktoren mit den SMAD-Proteinen interagieren.[64] In *in vitro* Experimenten steigerte MSTN die Expression der kritischen Atrophy-related Ubiquitin Ligase, die an der Proteolyse beteiligt ist, *via* FoxO1.[65] In Muskeln sind diese E3 Ligasen hauptsächlich MuRF-1 und Atrogin-1, welche durch Myostatin hochreguliert werden.[66] Die Aktivierung von SMAD 3 durch MSTN inhibiert ebenfalls den Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1)/ Phosphoinositid-3-Kinasen(PI3K)/Akt/mTOR Signalweg, was in Myoblasten zur Atrophie führt.[67] Eine weitere Studie konnte zusätzlich den Cross-Talk zwischen dem SMAD-Signalweg und dem Akt-Signalweg feststellen.[68] An C2C12 Mausmuskelstammzellen wurde gezeigt, dass die MSTN-induzierte Aktivierung von SMAD 3 die Expression der Myogenic Regulatory Factors (MRFs) MyoD und Myf5 reduziert. Dies unterdrückt wiederum die Expression von Myogenin was eine Ausdifferenzierung der Muskelstammzellen zu Myotuben verhindert.[69]

Unter anderem durch diese SMAD-modulierten Regulierungen der Ubiquitin-abhängigen Proteolyse, der Inhibition des IGF-1/PI3K/Akt Signalwegs und die Inhibition der Expression verschiedener Differenzierungsfaktoren in Myoblasten und Satellitenzellen wird die atrophierende Wirkung von MSTN auf die Skelettmuskulatur ausgelöst (Details im nächsten Kapitel Abbildung 9).[70]

1.4.2 Nicht-kanonische Signalwege

Neben der Aktivierung der SMAD-Proteine 2/3 und der damit verbundenen Signalkaskade kann MSTN zusätzlich durch seine Typ-I und Typ-II-Rezeptoren die Aktivität weiterer Signalwege regulieren. In C2C12 Zellen konnte gezeigt werden, dass eine von den SMAD-Proteinen unabhängige Aktivierung der TGF-β-activated Kinase 1 (TAK1) durch MSTN erfolgt. Diese aktiviert nachfolgend die Mitogen-activated Protein Kinase Kinasen (MAPKK) MKK3 und MKK6, welche wiederum die p38 MAPK durch Phosphorylierung aktivieren. Die aktiven MAPKs migrieren anschließend in den Zellkern und können dort Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung aktivieren. Die Aktivierung von p38 erhöhte unter anderem die Expression des Cylcin-dependent Kinase (CDK) Inhibitors p21, welcher als ein Suppressor des Zellwachstums fungiert.[71] Eine Aktivierung der c-Jun N-terminal Kinase (JNK) durch TAK1 und MKK4, welche wie p38 in der Stressantwort der Zellen eine Rolle

spielt, konnte ebenfalls nach einer Stimulation mit MSTN in Zellen festgestellt werden.[72] Über dieses MAPK-abhängige Signal können unter anderem Caspasen aktiviert werden, die anschließend die Apoptose einleiten.[72] Weiterhin wurde in C2C12 Zellen eine MSTN-induzierte Aktivierung des extracellular signal–regulated kinase 1/2 (ERK 1/2) Signalwegs durch das kleine G-Protein Ras beobachtet. Dieser sogenannte Ras/MEK/ERK1/2 Signalweg gehört ebenfalls zu den MAPK Signalwegen und dient zur Regulation und Inhibition der Differenzierung und Proliferation (siehe Abbildung 9).[72,73]

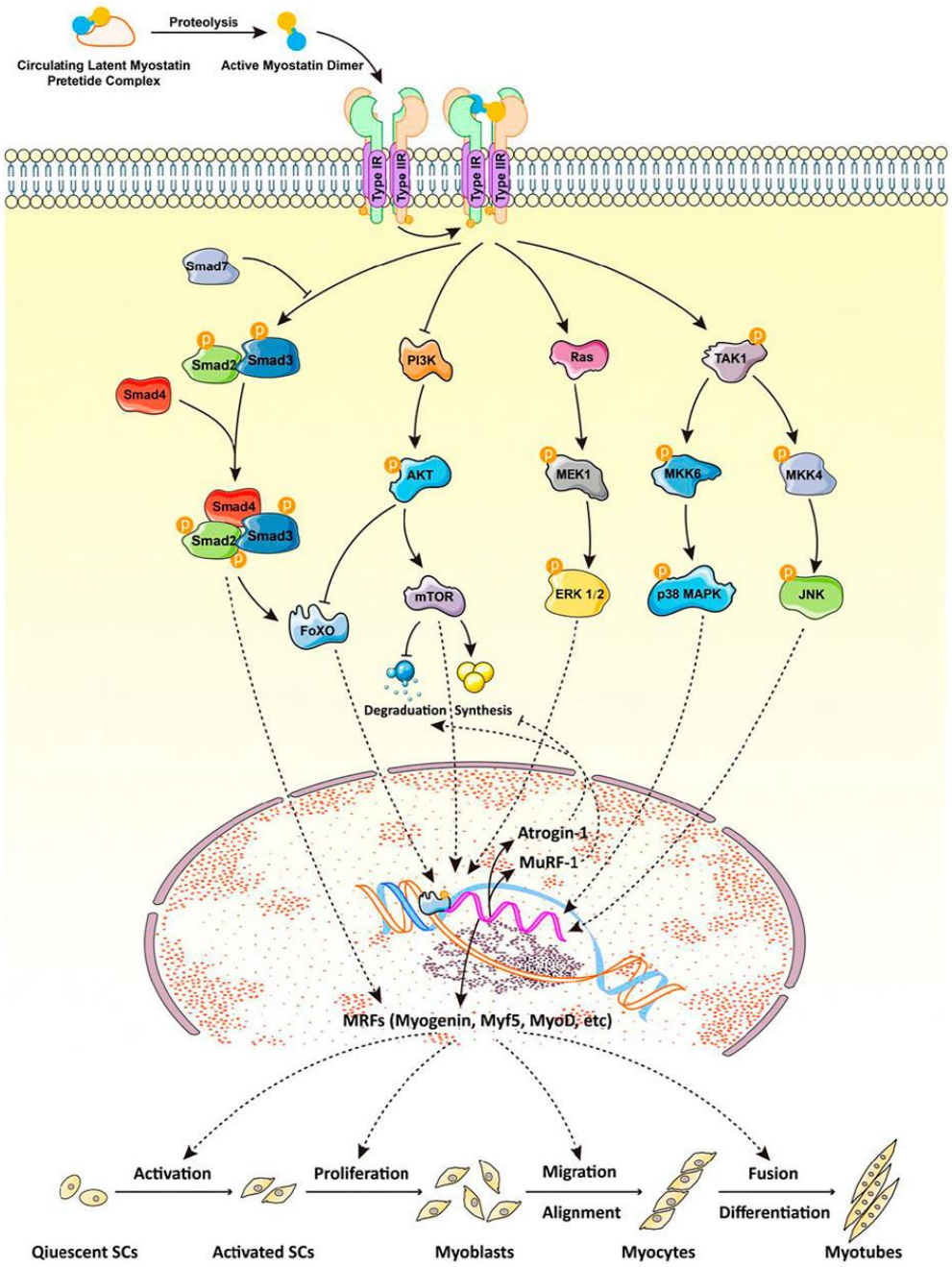


Abbildung 9: Übersicht über den Kanonischen (links) und den Nicht-Kanonischen Signalweg (rechts) von MSTN. Der Kanonische Signalweg verläuft über SMAD2/3. Der Nicht-Kanonische Signalweg verläuft unter anderem über die Aktivierung der MAPK: ERK, JNK, p38. MSTN führt zur Reduktion der MRFs und zur Erhöhung der Proteolyse durch die Ligasen MuRF-1 und Atrogin-1. Dies wirkt sich auf die Proliferation und Differnzierung von Satellitenzellen und Myoblasten aus.[66](modifiziert)

Die komplexen Signalkaskaden ermöglichen MSTN durch die Rezeptoren ALK-4/5 und ActRIIA/B über einen SMAD2/3 abhängigen Signalweg mit vielen verschiedenen zelltypspezifischen und –unspezifischen Co-Faktoren und über einen MAPK-abhängigen Signalweg (TAK1/MKK6/p38 – TAK1/MKK4/JNK – Ras/MEK/ERK1/2) die Proliferation, das Zellwachstum und die Differenzierung zu inhibieren und auf die Einleitung der Apoptose und der Proteolyse einzuwirken (Detaillierter Übersichtsartikel unter [66]).

1.5 Expression und Aktivierung von Myostatin

Das MSTN-Gen besteht aus drei Exons und zwei Introns und ist sehr konserviert in verschiedenen Spezies.[5,8] Es wird hauptsächlich von Skelettmuskelzellen exprimiert und sekretiert, zudem aber auch in geringerem Maße von Fettgewebe und Herzmuskelzellen.[3,74,75] Das aktive Signalprotein kann im Blutkreislauf zirkulieren, MSTN wirkt also nicht ausschließlich auf das Gewebe, in dem es ursprünglich exprimiert wird.[76] Durch die Translation und Transkription wird ein inaktives Propeptid (376 AS) gebildet. Dieses Propeptid enthält das C-terminale Monomer, welches bei MSTN 109 Aminosäuren (12,5 kDa) lang ist (siehe Abbildung 6, Kapitel 1.3 und Abbildung 10,11).[32] Wie bei anderen TGF-β Signalproteinen unterstützt die Prodomäne die korrekte Faltung des reifen Wachstumsfaktors. Dabei werden die intra- und intermolekularen Disulfidbrücken gebildet.[77] Dieser nicht-prozessierte Prodomänen-Komplex wird anschließend durch Furin-Metalloproteasen gespalten. Die Furin-Erkennungssequenz ist Arg-Ser-Arg-Arg (AS 263-266). Die Wachstumsfaktoren MSTN, GDF-11, BMP-10 und TGF-β unterscheiden sich von den restlichen Mitgliedern der Superfamilie dadurch, dass die Prodomäne nach der Spaltung an das reife Signalpeptid assoziiert bleibt, wodurch es die Aktivität unterdrückt. Dies wird als latenter Prodomäne-Ligand-Komplex bezeichnet.[77,78] Im Fall von MSTN ist dabei nur ein kurzer 23 AS langer N-terminaler Abschnitt der Prodomäne notwendig, welcher eine α-Helix bildet. Zusätzlich gibt es ein sogenanntes „Latency Lasso“, also eine Schlaufe und eine Helix, welche die Prodomäne an den Wachstumsfaktor nach der Proteolyse durch Furin an das reife MSTN assoziieren.[39] In diesem Abschnitt befindet sich ebenfalls die Tolloid-like (TLD) Metalloprotease Identifikationssequenz (Asp76).[79,80] Erst durch Spaltung an dieser Stelle durch eine TLD-Metalloprotease wird das reife C-terminale Signalpeptid freigesetzt und kann seine biologische Wirkung entfalten (siehe Abbildung 10 und Abbildung 11).[81]

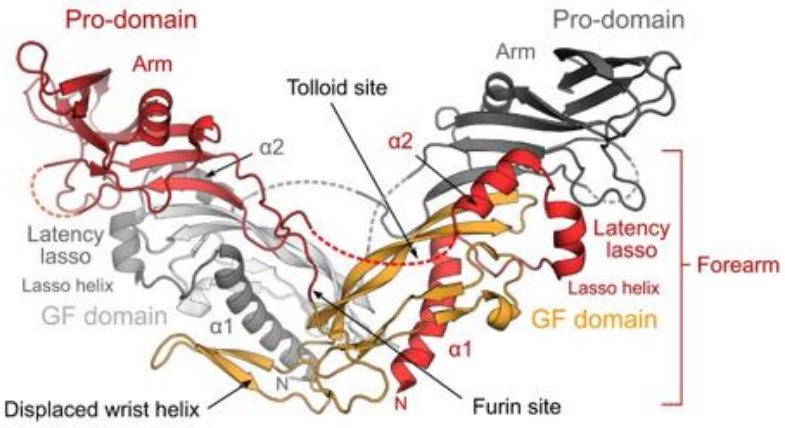


Abbildung 10:Röntgen-Kristall-Struktur (5NTU). MSTN-Prodomäne-Komplex mit α1-Helix, „Latency Lasso" und der Furin und TLD Spaltstelle. Prodomäne in rot/dunkelgrau, Wachstumsfaktor in orange/hellgrau.[39] *(modifiziert)*

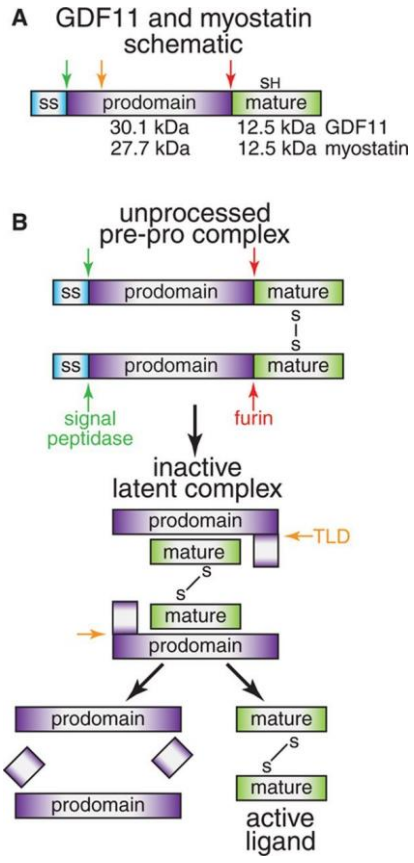


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Expression und Aktivierung von MSTN und GDF-11. A: Abschnitte der initial exprimierten Primärstruktur von MSTN und GDF-11. B: Die Signalproteine werden zunächst als unprozessiertes Monomer mit einer N-terminalen Signalsequenz (ss), der Prodomäne und dem C-terminalen Liganden exprimiert. Die Prodomäne bleibt nach der Spaltung durch Furin-Metalloproteasen an das reife Signalpeptid assoziiert und wird erst durch eine Tolloid-like-Metalloprotease (TLD) von dem aktiven Dimer getrennt.[32]

Der latente TGF-β-GF-Prodomäne Komplex bleibt vor der proteolytischen Aktivierung an extrazelluläre Matrixproteine gebunden. Für GDF-11 und MSTN konnte diese Bindung noch

nicht festgestellt werden, jedoch konnten Interaktionen mit Matrixproteinen beobachtet werden. Diese Assoziation könnte zu einer präziseren Regulation der Freisetzung des reifen Liganden beitragen.[32] Trotz der großen Sequenzhomologie zwischen dem C-terminalen Monomer von GDF-11 und MSTN beträgt die Homologie der Prodomänen nur 52 %. Der Unterschied in der Sequenz könnte mit einer speziellen Regulierung dieser ähnlichen Signalproteine zusammenhängen, vor allem in Bezug auf die Interaktion des inaktiven latenten Komplexes mit verschiedenen Matrixproteinen. Daneben besteht ein Unterschied in der Effektivität, mit der Furin die erste Spaltung des Propeptids durchführt, wobei GDF-11 deutlich effektiver gespalten wird als MSTN. Dadurch ergibt sich für MSTN, dass eine hohe Expression des Myostatingens alleine nicht zu einer Erhöhung des Serumlevels von aktivem MSTN führt.[82] Durch eine einzelne Änderung in der Sequenz der Furin-Spaltungs-Stelle (K153R, Lysin zu Arginin) wird das Prozessieren durch Furin signifikant verbessert.[83] Die TLD Spaltung ist von dieser Mutation nicht beeinträchtigt. Was dieser Polymorphismus in Bezug auf Lebenserwartung und Entwicklung von Muskelmasse bedeutet ist noch nicht abschließend geklärt.[32] Zusätzlich wurde ein negativer Rückkopplungsmechanismus identifiziert, wobei MSTN dämpfend auf die Expression von Furin-Metalloproteasen wirkt. Dadurch wird ein hohes Serumlevel von MSTN durch eine niedrigere Prozessierungsrate des Propeptides herunterreguliert.[84]

Die Expression des Myostatingens selbst wird ebenfalls durch viele Faktoren beeinflusst. Der Transkriptionsfaktor FoxO1, welcher wie in Kapitel 1.3.1 beschrieben, mit dem SMAD Signalweg interagiert, treibt die Expression des Myostatingens.[85] Dies deutet auf eine mögliche autoregulierte Verstärkung der Myostatinexpression hin, da der SMAD Signalweg und die FoxO Transkirptionsfaktoren wiederum durch MSTN stimuliert werden. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die TGF-β GFs die Expression von MSTN vermutlich ebenfalls über den SMAD Signalweg in Muskelzellen steigern und somit eine Atrophie verstärken können.[86] Insgesamt variiert das Expressionslevel von MSTN jedoch relativ stark, abhängig vom Alter, Geschlecht und eventuellen Vorerkrankungen (siehe dazu Kapitel 1.7 und Kapitel 1.8 Kapitel). Zur weiteren Regulation der Aktivität von MSTN tragen neben der Expression und Latenz zusätzliche endogene Antagonisten bei.

1.6 Endogene Antagonisten des Myostatin-Signalwegs

Neben der Prodomäne von MSTN, die nach der Spaltung durch Furin an das Signalpeptid als latenter Komplex assoziiert bleibt, gibt es weitere endogene, extrazelluläre Inhibitoren, die die Wirkung von MSTN regulieren. Die wichtigsten inhibitorischen Proteine sind Moleküle vom vom Follistatin (Fst) Typ (die Follistatin Isoformen Fst288 und Fst315 und die Follistatin-like proteins, FSTL, oder Follistatin-related Proteins FLRG), die Growth and Differentiation Factor-associated Serum Proteins (GASP) 1 und 2 und Decorin.[30,31,51,87,88] Diese Bindeproteine sind nicht zwangsläufig selektiv für MSTN, sondern binden oftmals mehrere TGF-β Familienproteine.

Die zirkulierenden Follistatine inhibieren neben MSTN auch das nahverwandte ACVA sehr stark.[89,90] Weiterhin binden sie einige Vertreter der BMPs, jedoch deutlich schwächer.[91] Die Signalproteine werden von zwei Fst-Molekülen umschlossen, wodurch alle vier Rezeptor-Binde-Domänen, zwei für Typ-I und zwei für Typ-II, blockiert werden (siehe Abbildung 12). Die Bindungsaffinität für Activin A liegt bei 1,7 nM und für MSTN etwas niedriger bei 12,3 nM.[92] Aufgebaut sind diese Fst-Proteine aus drei aufeinanderfolgenden Fst-Domänen (FSD1-3) und einer N-terminalen Domäne (ND). Durch eine Heparin-Bindungs-Domäne können einige Vertreter der Fst-Proteine an Heparin binden, welches auf der Zelloberfläche lokalisiert ist. Dadurch wird der Fst-MSTN-Komplex aus dem Blutstrom entnommen und das MSTN wird schneller abgebaut.[93,94] Transgene Mäuse, die sowohl FLRG-1 überexprimieren und eine homozygote *MSTN*$^{-/-}$ Mutation aufwiesen, zeigten sogar eine annähernde Vervierfachung der Muskelmasse gegenüber den Kontrollmäusen (sogenannter quadruple muscle phenotype).[30]

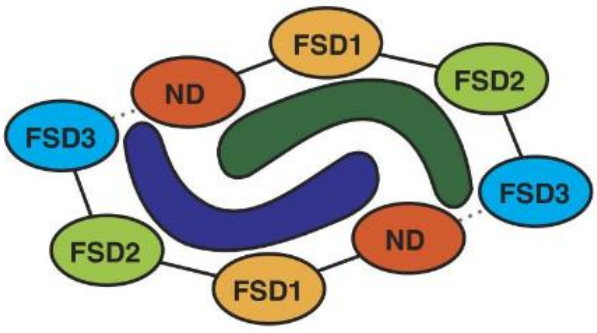


Abbildung 12:Schematische Struktur des Wachstumsfaktor.Follistatin-Komplex. Zwei Moleküle umschließen dabei das Signalprotein und inhibieren so die Interaktion mit den Rezeptoren. Zusätzlich interagiert eine ND mit der FSD3 des jeweils anderen Fst-Moleküls.[38] (modifiziert)

Neben den Follistatin-artigen Antagonisten wurden die sogenannten WFIKKN Proteine (ein Protein bestehend aus einer WAP-, einer Follistatin-, einer Immunoglobulin-, zwei Kunitz Proteaseinhibitor- und einer NTR-Domäne) als endogene Inhibitoren von MSTN und GDF-11 entdeckt. Es konnten zwei Typen dieser ebenfalls im Blutstrom zirkulierenden Proteine nachgewiesen werden, die später in Growth and Differentiation Factor-associated Serum Protein (GASP) 1 und 2 umbenannt wurden.[95,96]

GASP-1/2 binden, anders als die Follistatine, neben MSTN auch GDF-11 mit einer sehr hohen Affinität, wobei GASP-1 100x potenter MSTN bindet als GASP-2. Das reife MSTN interagiert hauptsächlich über die Follistatin-Domäne mit den GASPs.[96] Die beiden GASP-Proteine weisen dabei jedoch unterschiedliche Bindungsmodi und stöchiometrische Verhältnisse auf. GASP-2 zeigt dabei ein ähnliches Verhalten, wie die anderen bekannten Antagonisten, wobei zwei GASP-Proteine das MSTN umschließen. Im Fall von GASP-1 scheint jedoch nur ein antagonisierendes Molekül zur Inhibition von MSTN notwendig zu sein. Wurde jedoch in Experimenten der C-terminale Teil von GASP-1 entfernt, konnte eine 2:1 Stöchiometrie entsprechend GASP-2 und Fst beobachtet werden, einhergehend mit einer Verminderung der Affinität zu MSTN.[97]

Als weiterer endogener Antagonist ist Decorin bekannt. Dieses Protein ist ein 197 AS-langes Leucin-reiches Proteoglykan, welches neben MSTN auch TGF-β GFs binden kann. Als stark glykolisiertes Protein ist es auf der extrazellulären Matrix lokalisiert. Es wurde gezeigt, dass das immobilisierte Protein mit einer 1:1 Stöchiometrie MSTN mit hoher Affinität binden kann, sowohl in der glykolisierten Form (k_d: 20,2 nM) als auch das deglykolisierte Core-Protein (k_d: 9,36 nM).[88]

Insgesamt wird MSTN also durch viele komplexe Mechanismen reguliert: von der Steuerung und Autoregulation der Expression, der Bildung des latenten Prodomäne-Liganden-Komplexes, den endogenen Antagonisten bis zu den verschiedenen und hochkomplexen Signalwegen. Durch dieses Zusammenspiel kann MSTN sehr genau die Homöostase der Muskulatur steuern.

Nachfolgend soll die Rolle von MSTN in verschiedenen Muskeldegenerationskrankheiten, allem voran der Sarkopenie und der Kachexie dargestellt werden. Anschließend erfolgt eine Betrachtung von MSTN als Drugtarget und der möglichen Effekte einer Inhibition des Myostatin-Signalwegs.

1.7 Myostatin und Sarkopenie

Altersgebrechlichkeit ist unter anderem geprägt durch Sarkopenie; dem Verlust von Muskelmasse, -stärke und –leistungsfähigkeit.[17,98] Der Begriff Sarkopenie ist von den griechischen Begriffen *sarx* für Fleisch und *penia* für Mangel abgeleitet. Verschiedene Institutionen ziehen unterschiedliche Maßstäbe zur Diagnose von Sarkopenie heran, wodurch sich große Unterschiede in der Prävalenz von 9,9 % bis zu 40,4 % unter den über 60 Jährigen in Industriestaaten ergeben.[99] Die European Working Group on Sarcopenia gibt eine Prävalenz von 12,5 % (95 % Konfidenzintervall: 9,9 % - 15,9 %) an. Sie definiert Sarkopenie als fortschreitende und generelle Muskelerkrankung mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für Folgeerkrankungen wie Knochenbrüche durch Stürze, physische Behinderung und erhöhte Sterblichkeit. Die Muskelstärke dient als primärer Parameter, um Sarkopenie festzustellen, wobei eine Diagnose als bestätigt gilt, wenn eine niedrige Muskelkraft und eine niedrige Muskelmasse detektiert werden. Liegt zusätzlich eine niedrige physische Gesamtperformance vor, gilt die Sarkopenie als schwerwiegend.[98] Für eine erste Bestimmung dieser Parameter wird der sogenannte SARC-F Fragebogen standardmäßig verwendet (siehe Tabelle 3).[100]

Tabelle 3: Der SARC-F Fragebogen: bei einem Wert ≥4 gilt eine Sarkopenie als wahrscheinlich [100] (übersetzt)

Kategorie	Frage	Bewertung
Stärke	Wie schwer fällt es Ihnen ein Gewicht von ~ 5 kg zu heben und zu tragen?	Nicht schwer = 0 Ein wenig = 1 Sehr schwer oder unmöglich = 2
Selbstständiges Gehen	Wie schwer fällt es Ihnen im Zimmer umherzugehen?	Nicht schwer = 0 Ein wenig = 1 Sehr schwer, nur mit Hilfe oder unmöglich = 2
Aufstehen	Wie schwer fällt es Ihnen von einem Bett oder einem Stuhl aufzustehen?	Nicht schwer = 0 Ein wenig = 1 Sehr schwer, nur mit Hilfe = 2
Treppensteigen	Wie schwer fällt es Ihnen 10 Stufen einer Treppe hinaufzusteigen?	Nicht schwer = 0 Ein wenig = 1 Sehr schwer oder unmöglich = 2
Anzahl an Stürzen	Wie oft sind Sie letztes Jahr gestürzt?	Keine Stürze = 0 1-3 Stürze = 1 4 oder mehr Stürze = 2

Dieser Fragebogen umfasst fünf Kategorien: Stärke, Selbstständiges Gehen, Aufstehen aus dem Sitzen, Treppensteigen und Anzahl der Stürze im vergangenen Jahr. Dabei werden in jeder

Kategorie Punkte von 0 bis 2 vergeben, wobei 0 keine Beeinträchtigung und 2 eine starke Beeinträchtigung widerspiegelt. Ab einem addierten Punktwert von 4 sollte eine weiterführende Diagnostik erfolgen.[100] Diese besteht aus Tests zur Muskelkraft, wobei zunächst die Handkraft und das wiederholte Aufstehen von einem Stuhl bewertet werden: Die Handkraft sollte bei Männern >27 kg und bei Frauen >16 kg entsprechen und fünfmaliges Aufstehen sollte in <15 sec erfolgen. Wurden die angesetzten Kriterien in diesen Tests ebenfalls unterschritten folgt eine genaue Untersuchung der Skelettmuskulatur mittels der Dualen Röntgen-Absorptiometrie (DXA) und zusätzlich per Computertomografie (CT) und Magnetresonanzspektroskopie (MRT). Der absolute Grenzwert der appendikulären Muskelmasse (d.h. der oberen und unteren Extremitäten) liegt bei 20 kg für Männer und 16 kg für Frauen und der relative Grenzwert bei 7,0 kg/m^2 bzw. 6,0 kg/m^2 in Bezug auf die Körperoberfläche. Zur Bestimmung des Schweregrades folgen anschließend weitere Tests zur Gehgeschwindigkeit und zum Aufstehen. Dabei gelten 6 min für eine Gehstrecke von 400 Metern, eine Gehgeschwindigkeit von 0,8 m/s oder 20 Sekunden beim Timed-up-and-go-Test (TUG) als untere Grenze (siehe Abbildung 13).[98]

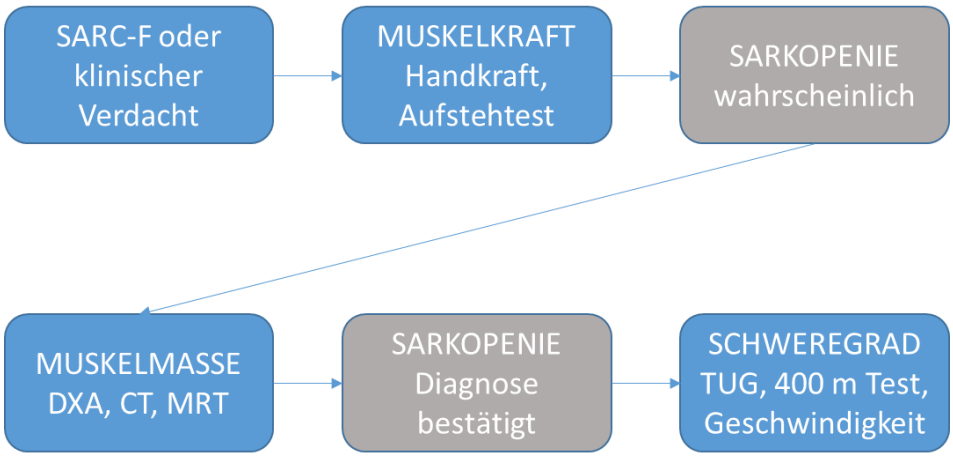


Abbildung 13: Übersicht zur Diagnose einer Sarkopenie: Bei einem klinischen Verdacht oder einem Wert von ≥ 4 im SARC-F Fragebogen und einem Unterschreiten der Grenzwerte bei der Evaluierung der Muskelkraft ist eine Sarkopenie wahrscheinlich. Die Muskelmasse wird dann mit bildgebenden Verfahren bestätigt. Der Schweregrade kann anschließend mit weiteren Tests ermittelt werden.[101] (modifiziert)

Die zugrundeliegenden Effekte für das Eintreten von Sarkopenie setzen sich aus einigen Faktoren und Mechanismen zusammen. Dabei spielen genetische Prädisposition, das Serumlevel von Vitamin D, verschiedener Cytokine, Testosteron (und weiterer anderer Wachstumshormone), die Ernährung und sportliche Aktivität/Bewegung eine Rolle.[102–110] Weiterhin kann unterschieden werden zwischen einer primären Sarkopenie, die durch den

Alterungsprozess des Menschen auftritt und einer sekundären Sarkopenie, die durch andere bestehende Krankheiten ausgelöst wird, wie chronische Entzündungsreaktionen, hormonale Veränderungen, Immobilisierung, Diabetes oder vorangegangenes Nieren-, Lungen- oder Herzversagen.[111,112] Der Verlust der Muskelmasse relativ zum Körpergewicht nimmt mit steigendem Alter zu und beträgt je nach Alter zwischen etwa 0,8 % bis zu 3 %.[113] Zudem zeigen Studien einen Zusammenhang zwischen durch Sarkopenie ausgelöster Immobilität / Bettlägerigkeit und mentalen Erkrankungen wie Depression und Demenz.[114–116]

Myostatin als negativer Modulator des Muskelwachstums spielt bei der Regulierung und dem Verlust von Muskelmasse und -kraft eine wichtige Rolle. Es ist anzumerken, dass das Serum-Level von MSTN starken Schwankungen unterliegt, vor allem ausgelöst durch Training und Bewegung. Dabei steigt das Level von MSTN unmittelbar nach hochintensiven Trainings an und verringert sich bei wiederholtem ausdauernden Training.[117,118] Unterschiedliche Studien zeigten zudem teils widersprüchliche Ergebnisse des MSTN-Levels mit Bezug auf Geschlecht und Alter, wobei es generell den Trend gibt, dass das Serumlevel bei jungen Männern und älteren Frauen am höchsten ist.[119,120] Eine Schwierigkeit bei der Bestimmung des Serumlevels besteht darin, dass MSTN nach der Expression als inaktiver Komplex im Blut zirkuliert, welcher erst aktiviert werden muss, bevor MSTN an seine Rezeptoren binden kann (siehe Kapitel 1.4 und Kapitel 1.5). Es muss also zwischen aktivem und inaktivem MSTN unterschieden werden, was je nach Messmethode und Probenvorbereitung nicht ohne weiteres möglich ist.[121]

In anderen Fällen ist ein Zusammenhang deutlicher erkennbar, vor allem wenn weitere Risikofaktoren zur Entwicklung von Sarkopenie betrachtet werden. In Bezug auf starkes Übergewicht weisen einige Ergebnisse auf eine Korrelation zwischen Fettleibigkeit und einer verminderten Muskelgesundheit hin. Das Übergewicht führt an sich zu einer Beeinträchtigung der Bewegungsfähigkeit und stellt weiterhin ein erhöhtes Risiko für Typ 2 Diabetes, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und weitere chronische Krankheiten dar. Es wurde jedoch zusätzlich ein Zusammenhang zwischen starkem Übergewicht und einer erhöhten Expression von MSTN nachgewiesen.[122,123] Entsprechend konnte gezeigt werden, dass die Expression in der Skelettmuskulatur signifikant bei Patienten abnahm, die einen Magen-Bypass erhalten hatten.[124]

Erstaunlicherweise konnte auch ein umgekehrter Zusammenhang zwischen Adiopogenese und den Effekten von MSTN hergestellt werden. Dabei hatte eine Inhibition des MSTN Signalwegs oder der Expression einen starken Effekt auf die Entwicklung von Fettleibigkeit in Mäusen.[13]

Die Mäuse, bei denen die Wirkung von MSTN auf das Muskelgewebe gestört wurde, wiesen eine höhere Muskelmasse und geringes adipöses (braunes) Fettgewebe auf. Zusätzlich zeigten sie nach einer 10-wöchigen stark fetthaltigen Diät eine deutlich verminderte Gewichtszunahme, einen niedrigeren Blutzuckerwert, Insulinwert und Triglyceridwert als die Kontrollgruppe.[125] Eine Verminderung der MSTN-Aktivität bei übergewichtigen Sarkopeniepatienten könnte somit sowohl dem Verlust der Muskelkraft, als auch der Fettakkumulation und den negativen Effekten auf den Zuckerhaushalt durch das Übergewicht entgegenwirken.[126] Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Anti-Myostatin-Antikörper zu einer Erhöhung der Muskelmasse und in älteren Patienten zu einer Verbesserung der Muskelmasse und Kraft in Bezug auf die standardisierten Aufsteh- und Treppentests führten.[127]

Da Sarkopenie im Alter eine so vielschichtige Erkrankung ist, sollten Therapieansätze ebenfalls mehrere Angriffspunkte aufweisen. Neben Bewegungstraining, Ernährungsumstellungen und Maßnahmen gegen Übergewicht könnte allerdings eine medikamentöse Behandlung mit Myostatininhibitoren eine vielversprechende Säule der Behandlung von Sarkopenie werden.[128,129]

1.8 Myostatin und Kachexie

Kachexie ist ein multifaktorielles Syndrom, welches durch fortschreitenden Gewichtsverlust gekennzeichnet ist und häufig von Magersucht und Appetitverlust begleitet und verstärkt wird.[130] Das Wort Kachexie setzt sich aus den griechischen Begriffen *kakos* und *hexus* zusammen was als „Schlechter Zustand“ übersetzt werden kann. Dieses Syndrom wird z.B. durch eine Tumorerkrankung, aber auch durch AIDS, Nierenversagen, Diabetes oder schwere Verbrennungen ausgelöst.[131] Nachfolgend wird hauptsächlich die „Cancer Cachexia“ also die Tumor-bedingte Kachexie betrachtet. Zu unterscheiden ist dabei zwischen dem Gewichts- und Appetitverlust bedingt durch die Krebserkrankung und durch die Behandlung der Erkrankung mit Chemotherapeutika. Beides kann zu einem Gewichtsverlust führen, die biologisch-mechanistischen Gründe unterscheiden sich jedoch.[70,130]

Es gibt verschiedene Ansätze Kachexie zu definieren, wobei diese Definitionen meistens zwei Faktoren in den Mittelpunkt stellen: Entzündungsreaktionen und Gewichtsverlust (hauptsächlich verursacht durch den Verlust von Muskelmasse und Körperfett).[2] Der Grad der Skelettmuskeldegeneration eignet sich dabei zur Prognose und Kategorisierung einer Kachexie unabhängig vom Körpergewicht oder dem generellen Gewichtsverlust.[132] In den meisten

Patienten manifestieren sich zusätzlich Symptome wie Anämien, Fatigue oder Anorexie. Es wurde festgestellt, dass mindestens 20 % aller Krebspatienten an den Folgen der Kachexie bei einer Tumorerkrankung versterben.[133] Die Prävalenz bei einer Krebserkrankung ist zudem hoch und liegt abhängig vom jeweiligen Tumortyp bei 30 % bis 80 %; bei 15 % gilt sie als schwerwiegend (>10 % Gewichtsverlust des ursprünglichen Körpergewichts).[130]

Eine allgemeine Kategorisierung ist aufgrund der vielen verschiedenen Faktoren und unterschiedlichen Tumortypen schwierig und universelle Biomarker konnten noch nicht identifiziert werden. Generell gilt, dass durch die Tumorerkrankung und die Behandlung mit Chemo- oder Strahlentherapie einige Anpassungen des Körpers in Bezug auf die Homöostase und die metabolischen Aktivitäten auftreten. Die Tumorzellen verbrauchen eine große Menge an Glucose und Aminosäuren, wodurch unter anderem erhöhte Glucagonwerte und eine Insulinresistenz auftreten können.[134] Diese metabolischen Veränderungen im Hormon und Glucocorticoidhaushalt treten als Reaktion des Körpers auf, um eine gewisse Homöostase des Energieverbrauchs zu erhalten, können den Organismus aber durch die auftretende metabolische Ineffizienz schaden.[70] Die Kachexie kann deshalb generell als eine Art Energie-Verbrauchs-Syndrom betrachtet werden.[70]

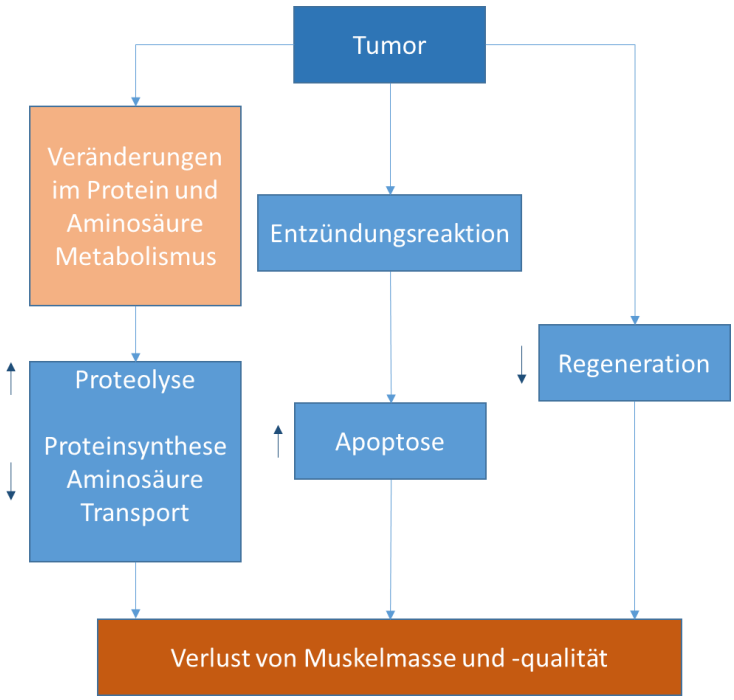


Abbildung 14: Skelettmuskelschwund durch Kachexie; Veränderungen im Metabolismus und Entzündungsreaktionen und eine verminderte Regenerationsfähigkeit führen zu Verlust von Muskelmasse [70] (übersetzt und modifiziert)

Die Gründe für den Schwund der Muskulatur sind dabei genauso mannigfaltig und geprägt durch die Veränderungen im Protein- und Aminosäuremetabolismus und den Tumor-bedingten Entzündungsreaktionen (siehe Abbildung 14).[70,135] Der Tumor verbraucht einerseits sehr viele Ressourcen und bildet andererseits durch die Expression verschiedener Faktoren ein Kachexie-induzierendes Medium, welches dem Körper zusätzlich schadet. Die verschiedenen sezernierten Faktoren können sich je nach Tumor unterscheiden, wobei generell eine Vielzahl von intra- und interzellulären Signalwegen bei diesen Prozessen beteiligt sind.[70] Ein Hauptmechanismus der Muskeldegeneration ist der verstärkte Proteinabbau (Proteolyse), welcher durch Ubiquitin-abhängige Proteasom-Aktivierung reguliert wird. Dieser Prozess führt dann zur Autophagie der Zellproteine.[136] Zusätzlich sezernieren die Tumorzellen oder Immunzellen des Mikromilieus Cytokine, Chemokine und Entzündungsmediatoren, welche zur Apoptose der Muskelzellen führen.[137] Das Fettgewebe wird durch den Abbau von weißem Fettgewebe und stark erhöhter Lipolyse ebenfalls belastet und degeneriert.[138]

Myostatin spielt in diesem Zusammenhang als ein tumoraler Faktor eine wichtige Rolle, da es ebenfalls auf die Autophagie und den Proteinabbau der Zelle wirkt (siehe dazu Kapitel 1.4).[69,139] Dabei wird MSTN nicht ausschließlich von den Muskelzellen oder dem Fettgewebe exprimiert und sekretiert, sondern ebenfalls von einigen Kachexie-induzierenden Tumoren.[140] Die Aktivität des Myostatin-Signalwegs ist in einem Zustand der Kachexie zusätzlich erhöht.[141] Entsprechend wurde in Zellkulturen gezeigt, dass das Medium einer C26 Darmkrebszelllinie die Differenzierung und Ausreifung von C2C12 Mausmuskelstammzellen zu Myotuben hemmt und dass diese Hemmung mit der Sekretion von hohen Mengen MSTN durch die C26 Zellen zusammenhängt. Eine Inhibition des Signalwegs von MSTN führte in diesem Experiment zu einer Ausdifferenzierung der C2C12 Muskelstammzellen.[139] Mäuse, in denen MSTN systemisch überexprimiert war, wiesen einen vergleichbaren Muskel- und Fettgewebsschwund auf wie Kachexiepatienten.[76] Weiterhin konnte in Maustumormodellen durch eine Inhibition des Myostatin-Signalwegs der Tumor-bedingten Kachexie entgegengewirkt werden.[54,142,143] Die Lebenserwartung von Tumormodellmäusen konnte ebenfalls durch eine Inhibition des Myostatin-Signalwegs erhöht werden.[144]

Diese Ergebnisse bestärken den Einfluss von MSTN als Auslöser und Treiber der krankheitsbedingten Kachexie und stellen es als mögliches Ziel einer pharmazeutischen Intervention heraus.

1.9 Myostatin als Drug Target

Wie aus den vorherigen Kapiteln ersichtlich wurde, ist Myostatin ein wichtiger Faktor zur Entstehung und zum Fortschreiten von Sarkopenie (vor allem bei übergewichtigen Menschen) und Kachexie (ausgelöst durch verschiedene Krankheiten). Erhöhte MSTN-Serumlevel wurden nicht nur im Tumormilieu, sondern auch bei weiteren mit Kachexie und Muskelschwund assoziierten Krankheiten wie chronisch-obstruktiver Lungenkrankheit (COPD), chronischem Herzversagen, AIDS oder Leberzirrhose festgestellt.[145–148] Dadurch stellt dieses Signalprotein durch seine herausragende Rolle als negativer Modulator des Muskelwachstums und seiner Wirkung auf braunes Fettgewebe ein potentielles Zielprotein (Drug Target) zur pharmakologischen Intervention dar.

Hilfreiche Faktoren zur erfolgreichen Identifikation eines neuen Drug Targets sind *in vivo* Daten über Sterblichkeit, phänotypische Entwicklung und potenziell negative Auswirkungen. Im Fall von MSTN konnte in vielen verschiedenen Spezies gezeigt werden, dass ein Gen-Knock-Out zu überlebensfähigen Individuen führt, die alle einen sehr muskulären Phänotyp aufweisen. Dies trifft sogar auf ein menschliches Individuum zu.[6] Eine zielgerichtete Inhibition dieses Targets scheint also keine lebensbedrohlichen Nebeneffekte auszulösen, weder im Embryonenstadium noch im Erwachsenenalter. In homozygoten *MSTN*$^{-/-}$ Mäusen trat jedoch eine Veränderung der Muskelstruktur auf: Es wurde ein höherer Anteil von schnellen Typ-II Fasern und ein niedrigerer Anteil von langsameren Typ-I Fasern beobachtet. Weiterhin wurden vermehrt schnelle Typen der Myosin Heavy Chain und mehr glykolytische Fasern beobachtet. Diese Verschiebung hin zu schnelleren Muskelfasern konnte jedoch nur bei den Knock-Out Mäusen beobachtet werden und nicht bei Mäusen, bei denen postnatal MSTN inhibiert wurde.[149]

Interessanterweise zeigte eine weitere Studie, dass Rennhunde, die einen heterozygoten *MSTN*$^{+/-}$ Genotyp aufwiesen, deutlich muskulöser und schneller in kompetitiven Rennen sind als Wildtyprennhunde. Demgegenüber wiesen homozygote *MSTN*$^{-/-}$ Rennhunde zwar den Doppelmuskelphänotyp auf, waren jedoch nicht schneller.[9] Eine teilweise Reduktion der Myostatinaktivität könnte deshalb von Vorteil sein.

In Bezug auf Diabetes Typ II beim Menschen berichtet eine Studie von einer Korrelation zwischen einem erhöhten MSTN-Level und dem Auftreten einer Diabetischen Retinopathie.[150] Weitere Daten von MSTN-Knock-Out Mäusen zeigten wiederum eine Resistenz gegen Übergewichtigkeit und Diabetes trotz stark fett- und kalorienreicher Nahrung

(siehe Kapitel 1.5).[125] Eine Inhibition von MSTN erscheint daher bei bestimmten Diabetes- oder stark übergewichtigen Sarkopeniepatienten sinnvoll.

Weiterhin wurde gezeigt, dass eine Inhibition von MSTN und ACVA, nach Verletzungen und muskulären Erkrankungen die Regeneration der Muskulatur fördert.[151]

Ein anderer Bereich, in dem eine Inhibition von MSTN sinnvoll erscheint, ist die Raumfahrt. Ein verlängerter Aufenthalt bei verminderter Schwerkraft hat ebenfalls starke degenerative Auswirkungen auf die Skelettmuskulatur. Experimente auf der Internationalen Raumstation (ISS) mit homozygoten *MSTN*$^{-/-}$ Mäusen und Mäusen, die eine lösliche Form des ActRII-Rezeptors verabreicht bekamen, zeigten, dass durch diese Behandlung der Verlust der Muskelmasse und der Knochenmasse aufgehalten werden konnte. Durch den löslichen Rezeptor wurden dabei MSTN und ACVA gleichzeitig inhibiert, was einen zusätzlichen positiven Effekt auf die Knochen- und Muskelmasse hatte.[152] Weitere Experimente bei simulierter verminderter Schwerkraft mit humanen primären Muskelzellen von Gesunden und Patienten mit Osteoarthritis oder Osteoporose zeigten bei allen Proben einen positiven Effekt auf das Zellwachstum und die Apoptoserate durch einen Anti-MSTN-Antikörper.[153] Diese Ergebnisse deuten nicht nur auf einen möglichen Einsatz von Anti-MSTN-Therapien in der Raumfahrt, sondern ebenfalls bei Knochen- oder Muskelerkrankungen hin.

Für eine erfolgreiche Therapie mit einem potenziellen Inhibitor des MSTN-Signalwegs scheint es darüber hinaus wichtig zu sein, das MSTN-Serumlevel in den verschiedenen Syndromen oder Krankheiten zu beachten. So verliefen Mausmodelle zur sogenannten Duchenne Muskeldystrophie (DMD, eine genetisch-bedingte Muskeldegenerationskrankheit) mit Anti-MSTN-Antikörpern sehr vielversprechend, in humanen klinischen Studien konnte der primäre Endpunkt einer Verbesserung der Muskelperformance jedoch nicht erreicht werden.[154,155] Es wurde in diesem Zusammenhang festgestellt, dass bei einigen neuromuskulären Degenerationskrankheiten wie DMD das MSTN-Serumlevel sogar vermindert ist, was auf eine bereits stattfindene Anpassung des Körpers auf die Muskeldegeneration hindeutet.[156] In einem solchen Fall scheint eine Inhibition des Signalwegs keine positiven Effekte zu zeigen.[155] Darüberhinaus ist das MSTN-Serumlevel bei Mäusen generell im Vergleich zum Menschen deutlich höher, was dazu führt, dass Mäuse stärker auf eine Anti-MSTN-Therapie reagieren.[156]

Anhand dieser überaus komplexen Zusammenhänge der Muskelregulation und -degeneration wird ersichtlich, dass eine Anti-MSTN-Therapie kein Allheilmittel für muskuläre Erkrankungen sein kann. Trotzdem könnte sie unter anderem bei Sarkopenie (vor allem bei übergewichtigen Patienten), Kachexie, Diabetes oder in der Raumfahrt erfolgreich angewendet werden und das Leben von vielen Patienten verbessern. Nachfolgend werden die bisherigen Strategien zur Inhibition des MSTN-Signalwegs vorgestellt.

1.9.1 Strategien zur Inhibition der Signalaktivität von Myostatin

Bisher wurden verschiedene Strategien zur Inhibition des Myostatin-Signalwegs verfolgt. Die unterschiedlichen Ansätze, lassen sich dabei gliedern in: Antikörper/Peptibodies, lösliche Decoy-Rezeptoren oder Proteine/Polypeptide zur Bindung von aktivem MSTN. Daneben gibt es Ansätze zum Knock-Out (z.B. durch CRISPR/Cas9) oder zum Knock-Down (z.B. siRNA, Antisense-RNA) der MSTN-Expression. Zudem unterscheiden sich einige der Strategien darin, ob der Wirkstoff direkt verabreicht, oder der Körper mittels Gentherapie zur selbstständigen Bildung angeregt wird (siehe Abbildung 15).[155]

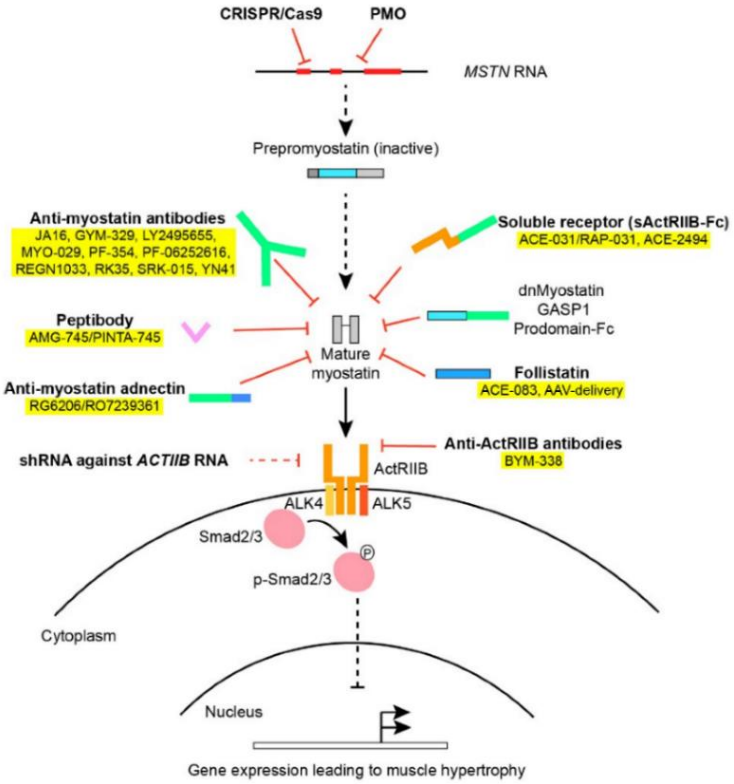


Abbildung 15: Übersicht über die verschiedenen therapeutischen Interventionsmöglichkeiten: Antikörper, antagonisierende Proteine, Gentherapien, lösliche Rezeptoren, Methoden zum Knock-Out oder Knock-Down der Expression von MSTN. Wirkstoffe die in humanen klinischen Studien getestet wurden sind gelb markiert.[155] Darüber hinaus gibt es noch weitere Ansätze, die in dieser Grafik nicht aufgelistet sind.

Die bisher entwickelten Antikörper sind entweder gegen das aktive MSTN oder ActRIIB gerichtet.[157,158] Vor allem die Anti-Rezeptor-Antikörper wirken somit neben MSTN auch auf die Activine und die anderen Wachstumsfaktoren, die über diesen Rezeptor ihr Signal weitergeben (siehe Kapitel 1.2). Bei den löslichen Decoy-Rezeptoren handelt es sich meistens um einen chimären ActRIIB-Rezeptor, der mit einer Fc-Antikörper-Kette fusioniert ist, um die gewünschten pharmakokinetischen und keine ungewünschten immunologischen Eigenschaften zu erhalten. Die löslichen Decoy-Rezeptoren binden ebenfalls nicht ausschließlich MSTN, sondern zusätzlich die anderen Wachstumsfaktoren, die ActRIIB nutzen.[159,160] Bei den Polypeptid-basierten Inhibitoren zur Bindung von Myostatin gibt es bisher verschiedene Ansätze. So wurden Gentherapien entwickelt, mit denen eine Überexpression von Follistatin, FLRG oder GASP-1 (oder alle drei zusammen) erreicht werden sollte. Dazu wurden unter anderem Virus-Vektor-Strategien mit Adeno-assoziierten Viren (AAV) zur Transfektion genutzt.[161–163] Weiterhin konnte in Bindungsexperimenten eine minimal notwendige Sequenz der Prodomäne zur Bindung von MSTN bestimmt werden, die lediglich aus 23 Aminosäuren besteht (vgl. Kapitel 1.5).[164] Diese Sequenz wurde dann so optimiert, dass daraus ein kleines Peptid (verschiedene Derivate zwischen 16-29 AS) zur hochaffinen Bindung an MSTN resultiert.[165] Daneben wurden chimäre Proteine entwickelt, die z.B. aus dem ActRIIB-Rezeptor und einer nLG-3 Domäne bestehen. Die nLG-3 Domäne bildet das C-terminale Ende von Agrin, was in der Entwicklung und dem Erhalt neuromuskulärer Verknüpfungen wichtig ist. Gekoppelt wurden diese Abschnitte über die konstante Region eines IgG Antikörpers, um die gewünschten pharmakokinetischen Eigenschaften zu erhalten.[166] Zudem gibt es Ansätze die Expression von Myostatin zu reduzieren (Gen Knock-Down oder Silencing), entweder durch den Einsatz von siRNA, Antisense-RNA, Exon-skipping Phosphoramidat-Morpholino-Oligomers (PMO) oder Knock-Out durch den Einsatz von CRISPR-Cas9 Genomediting, was mit Hilfe viraler Vektoren in die Hostzellen gelangen soll.[167–170] Weiterhin konnte durch Gentherapie eine Überexpression der Prodomäne, oder einer dominant-negativen Form von MSTN ausgelöst werden.[171]

Diese verschiedenen Wirkstoffe wurden sowohl von pharmazeutischen Unternehmen als auch von akademischen Gruppen entwickelt und zum Teil bereits in Mausmodellen, teilweise auch in präklinischen oder klinischen Studien getestet. Vor allem die entwickelten Antikörper wurden intensiv in Humanstudien untersucht. Die betrachteten Indikationsgebiete reichten dabei von neuromuskulären Muskeldystrophien (wie DMD), über Kachexie bis zur Sarkopenie.[155] Bisher zeigten die in klinischen Studien eingesetzten Substanzen in Phase I Studien generell eine gute Verträglichkeit und keine besorgniserregenden Warnsignale.[155] Wie

in Kapitel 1.7 ausgeführt, erreichten jedoch die meisten Substanzen in klinischen Phase II Studien zu neuromuskulären Erkrankungen nicht die primären Endpunkte. Sie zeigten zwar häufig eine signifikante Erhöhung der Muskelmasse, aber keinerlei funktionelle Verbesserung.[172–174] Dies könnte mit dem reduzierten Serumlevel von MSTN beim Fortschreiten dieser Erkrankungen zusammenhängen, sodass die Therapie keinen großen Effekt zeigte.[156]

In anderen Bereichen verliefen die Studien erfolgreicher. So konnten in Sarkopeniestudien mit dem Antikörper LY2495655 (Landogrozumab, Anti-MSTN-mAB) die primären Endpunkte in Bezug auf funktionelle Verbesserungen der Muskulatur (angelehnt an die Diagnosetests zur Sarkopenie, siehe Kapitel 1.5) zum Teil erreicht werden.[127] In gesunden jungen Probanden führte der Antikörper BYM-338 (Bimagrumab, Anti-ActRII-mAB) zu einer signifikant schnelleren Erholung der Muskelmasse nach einer Muskelatrophie, ausgelöst durch Gips und Unbeweglichkeit in Folge einer Operation.[175] In vielen weiteren klinischen Studien der Phase I und II zeigten die eingesetzten Therapeutika vielversprechende erste Ergebnisse, aber selten einen durchbrechenden Erfolg. Dies könnte mit den bereits zuvor aufgezeigten Problemen der schlechten Übertragbarkeit der Mausmodelle auf den menschlichen Organismus und ein niedriges MSTN-Serumlevel in einigen der untersuchten Krankheiten liegen.[155] Eine genauere Betrachtung des jeweiligen MSTN-Levels könnte eine maßgeschneiderte Intervention erlauben.

All diesen Molekülen ist zudem gemein, dass sie Biologika oder kurze Polypeptide sind, welche immer ein Risiko eventueller immunologischer Reaktion und zusätzlich Probleme mit der Stabilität und der Pharmakokinetik aufweisen könnten. Vor allem eine wiederholte Behandlung von Patienten, die nicht immungeschwächt sind, könnte zu immunologischen Nebenwirkungen führen.[176] Beispiele von derartigen Effekten sind von anderen therapeutischen Antikörpern bekannt. Im Fall von Rituximab wurde z.B. die Bildung von Anti-Rituximab-Antikörpern beobachtet.[177] Darüber hinaus wurden Immunantworten auf die bakteriellen Proteine des CRISPR/Cas9- oder vergleichbarer Systeme beobachtet, welche die Enzyme neutralisierten.[178] Zusätzlich sind diese Therapeutika nicht oral bioverfügbar und müssen immer *intravenös* oder *intramuskulär* appliziert werden, was sich auch auf die Compliance der Patienten auswirken kann.[179]

Bisherige Versuche Small Molecules zu entwickeln, die mit den Signalwegen der TGF-β-Superfamilie interagieren, zielten auf die Typ-I-Rezeptor-Serin-Threonin-Kinasen ab. In Bezug auf MSTN relevant sind die Inhibitoren der sehr homologen TGF-β-Typ-I-Rezeptoren

ALK-4/5 und 7 (siehe Abbildung 16 und Abbildung 17). Mittlerweile wurde eine ganze Reihe dieser Verbindungen entwickelt, die in präklinischen oder klinischen Studien getestet wurden.[180] Die meisten Verbindungen sind zwar sehr selektiv für die jeweiligen TGF-β Superfamilien-Rezeptoren im Vergleich zu den anderen Rezeptoren dieser Klasse, inhibieren jedoch zusätzlich nicht direkt verwandte Kinasen.[181]

Vactosertib (**1**) (ebenfalls benannt als EW-7197, entwickelt von GlaxoSmithKline) und Galunisertib (**2**) (ebenfalls benannt als LY2157299, entwickelt von Eli Lilly) sind bereits in humanen klinischen Studien zu verschiedenen Krebsarten getestet worden (siehe Abbildung 16).[180] Galunisertib (**2**) ist in von diesen Verbindungen wahrscheinlich die am weitesten entwickelte und wurde in verschiedenen Phase II Studien zu Leberzellkarzinomen oder Myelodysplastischen Syndromen getestet.[182,183]

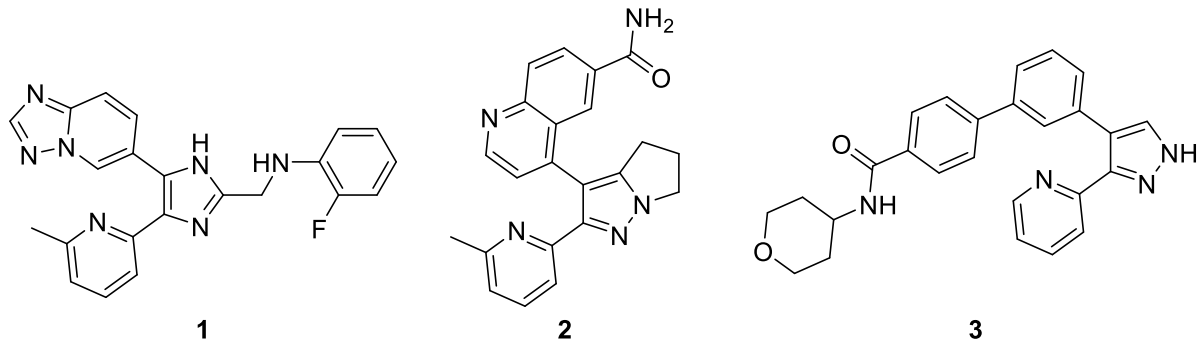


*Abbildung 16:Die ALK-4/5 Inhibitoren Vactosertib **1** (links), Galunisertib **2** (mitte), GW788388 **3** (rechts). Alle Verbindungen weisen einen zentralen fünf-gliedrigen Heterozyklus auf.*

Daneben sind einige ALK-4/5 und 7 Kinaseinhibitoren bekannt, welche als Tool-Verbindungen in biologischen Assays genutzt werden, oder gezielt dafür entwickelt wurden, wie TP-008 (**6**).[181] Die Verbindungen SB431542 (**4**) und SB525334 (**5**) (beide entwickelt von GlaxoSmithKline) sind eher unselektiv gegenüber anderen Kinasen außerhalb der TGF-β Superfamilien-Rezeptoren, werden aber sehr häufig in biologischen Experiment genutzt und sind deshalb auch in vielen Publikationen als Positivkontrolle zu finden.[180] Vor allem SB431542 (**4**), was 2002 von Callahan *et al.* publiziert wurde, wird auf Sci-Finder^n in 1231 Publikationen mit biologischen Experimenten zitiert (Sci-Finder^n Suche nach SB431542, References, Biological Studies, Stand: 12.09.2022).[184,185]

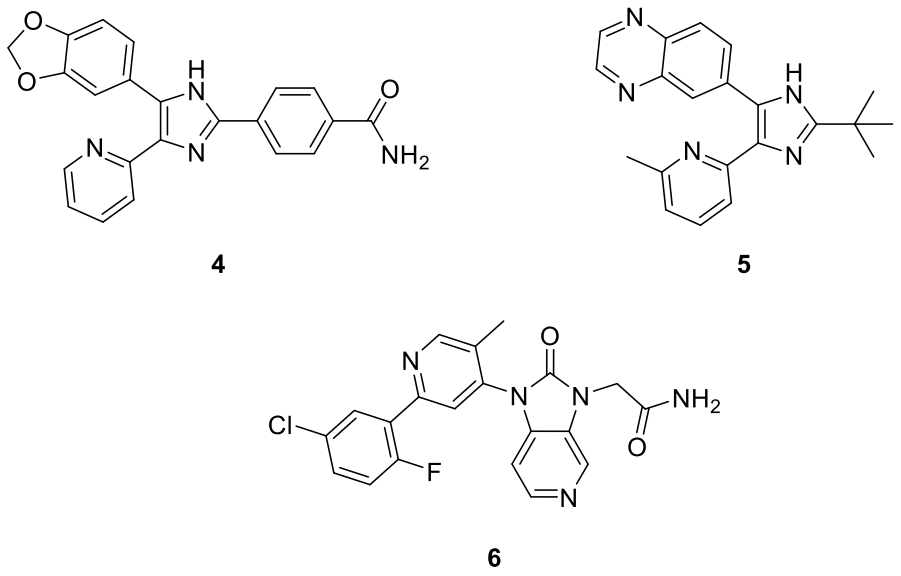


*Abbildung 17: ALK-4/5 Inhibitoren als Tool-Verbindungen: SB431542 **4** (oben links), SB525334 **5** (oben rechts), TP-008 **6** (unten). Diese Verbindungen weisen ebenfalls den zentralen fünf-gliedrigen Heterocylcus auf.*

Alle hier beschriebenen Moleküle sind sehr potent und weisen IC_{50}-Werte im nanomolaren Bereich auf (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4:Übersicht über einige TGF-β-Typ-I-Rezeptor Kinaseinhibitoren und ihrer Aktivität auf ALK-4/5 und 7 (sofern bekannt)

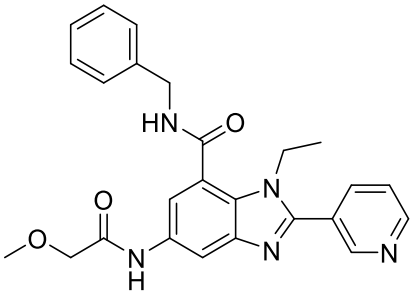
Verbindung	IC_{50} ALK-4 [nM]	IC_{50} ALK-5 [nM]	IC_{50} ALK-7 [nM]
Vactosertib [186]	13	11	n.b.
Galunisertib [187]	80	170	n.b.
GW788388 [188]	n.b.	18	n.b.
SB431452 [184,185]	75 - 94	50	100 -200
SB525334 [189]	58,5	14,3	n.b.
TP-008 [181]	113	343	n.b.

Generell können Kinaseinhibitoren, wie bereits beschrieben, ein Problem der Selektivität aufweisen, trotzdem sind bestimmte Vertreter in einigen Indikationsgebieten sehr wirkungsvolle Therapeutika.[181] Oftmals ist eine gewisse Selektivität ausreichend, vor allem wenn die Substanzen hochaktiv und damit die Dosis sehr niedrig ist. Im Fall der TGF-β Superfamilienproteine können sie allerdings aus einem anderen Grund gar nicht selektiv wirken, da die inhibierten Typ-I-Rezeptoren von mehreren Wachstumsfaktoren genutzt werden (siehe Kapitel 1.2). Aus diesem Grund sollten andere Strategien zur selektiven Inhibition des MSTN-Signalwegs in Betracht gezogen werden.

1.9.2 Referenzverbindungen als Basis für neue Small Molecule MSTN-Inhibitoren

Einen neuen Ansatz zur Inhibition von ACVA verfolgten Woodruff *et al.*.[190] Aus Mutationsstudien war bekannt, dass die Aminosäuren Met91, Ser60, Ile63, und Met108 von ACVA kritisch für die Bindung des Typ-I-Rezeptors ALK-4 sind. Sind diese AS-Reste nicht vorhanden, oder ausgetauscht, so erfolgt keine Bindung von ACVA an ALK-4 und somit keine Signalweiterleitung.[191] Die Aminosäuren befinden sich unter anderem in der sogenannten „Pre-helix-loop“ Region, in der sich MSTN und ACVA deutlich in ihrer Sequenz und auch in der Hydrophilie der Proteinoberfläche unterscheiden (siehe Kapitel 1.4). Diese Region wurde von bereits Cash *et al.* als mögliche Interaktionsfläche zur Störung der Protein-Protein-Interaktion (PPI) zwischen dem Wachstumsfaktor-Typ-II-Rezeptor-Komplex und den Typ-I-Rezeptoren vorgeschlagen.[192]

Mithilfe einer Bindungstaschen-Identifikations-Software, der Schrödinger Suite®, erstellte das Team um Woodruff ein Raster für molekulares Docking, welches sich für ein virtuelles Screening von Substanzen aus der 15 Millionen Moleküle fassenden Zink-Database eignete. Sie identifizierten 69 Verbindungen, die einen hohen Score im Docking und eine sinnvolle Dockingpose aufwiesen. Von diesen Verbindungen waren 39 kommerziell verfügbar, welche nachfolgend auf ihre Löslichkeit in Wasser (min. 200 µM) und auf Zytotoxizität bei einer Konzentration von 100 µM getestet wurden, wobei elf Substanzen die Kriterien erfüllten. In einem anschließenden primären *in vitro* Reporter-Assay zeigten fünf von den zuvor ausgewählten elf Verbindungen eine Dosis-abhängige Wirkung. Diese Kandidaten wurden anschließend in einem sekundären Zellassay weiter eingegrenzt, in dem nur noch zwei Verbindungen eine hohe Potenz aufwiesen. In einem weiteren *ex vivo* Experiment mit Eierstockzellen zeigte NUCC-555 (**7**) die höhere Wirkung (siehe Abbildung 18).



7

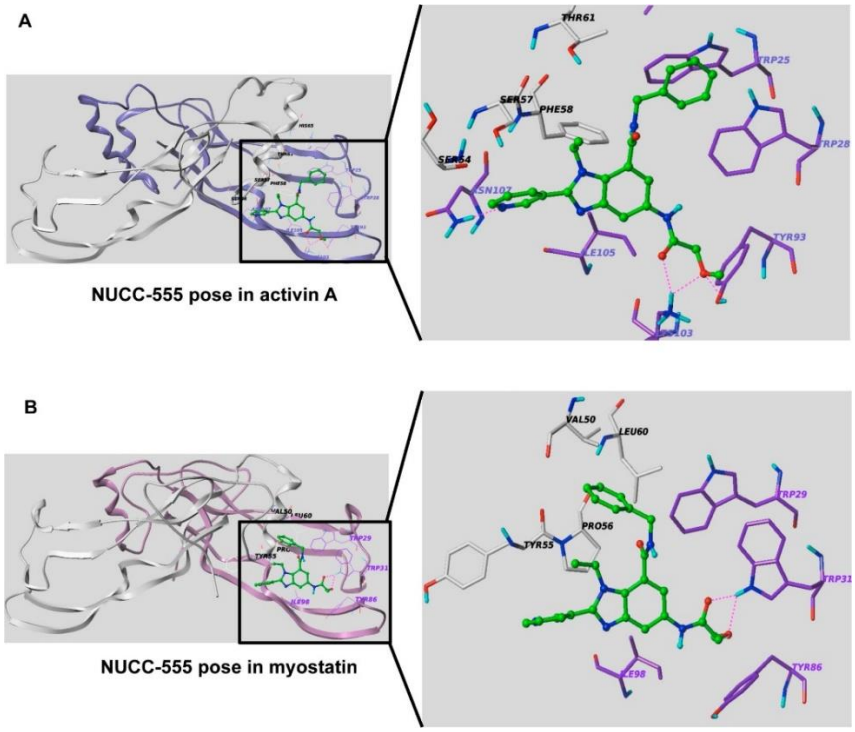
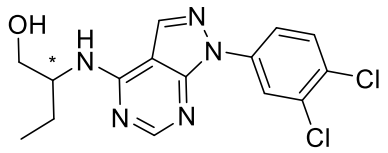


*Abbildung 18:Oben: Referenzverbindung NUCC-555 (**7**). Unten: A: NUCC-555 Dockingpose in der Bindungstasche von ACVA, B: NUCC-555 Dockingpose in der Bindungstasche von MSTN. Im Docking wurde ein ebenfalls eine sinnvolle Pose für MSTN erzielt. In den Reportezellassays wurde jedoch eine Selektivität für ACVA festgestellt.*[190]

Das Team bestätigte die Inhibition der PPI zwischen dem ACVA-ActRII-Komplex und ALK-4 in einem Bindungsexperiment mittels Surface-Plasmon-Resonance (SPR)-Assay. Darüber hinaus konnten sie anhand ihres *in vitro* Reporterzellassays eine Selektivität für ACVA gegenüber MSTN zeigen (IC_{50} [ACVA] ~5 µM; [MSTN] ~50 µM). In *in vivo* Mausmodellen bestätigten sie anschließend die inhibierende Wirkung von **7** auf ACVA.

Dieses Benzimidazol-Derivat scheint somit ein geeigneter Ausgangspunkt zur Entwicklung neuer Derivate zur Inhibition der Signalaktivität von ACVA oder MSTN zu sein.

Einen klassischen High-troughput Ansatz zur Identifikation von Verbindungen gegen Cancer-Cachexia verfolgten Liu *et al.*.[193] Dabei waren sie zum einen an der Reduktion der MSTN-induzierten Atrophie und Proteolyse und gleichzeitig an der Reduktion der positiven Rückkopplung von MSTN auf seine eigene Expression interessiert. Dafür nutzten sie zwei Luciferase-Reportergen-Assays: eins zur Bestimmung der MSTN-Signalaktivität und eines zur Bestimmung des positiven Rückkopplungsmechanismus. Von 26.000 getesteten Verbindungen war IMB0901 (***rac*-8**) die Potenteste, welche sowohl den Signalweg als auch den Feedbackmechanismus inhibierte (siehe Abbildung 19). Das Team testete das Molekül allerdings nur als Racemat.



***rac*-8**

Abbildung 19: Referenzverbindung IMB0901 ***(rac-8)***

In weiteren Assays mit C2C12 Mausmyotuben konnte eine positive Wirkung auf das Ausdifferenzieren der Zellen unter C26 Tumormedium betrachtet werden, wobei die Myotuben ohne die Verbindung ***rac*-8** nicht ausdifferenzierten, solange das Tumormedium vorhanden war. Weiterhin verminderte es die Expression von MSTN, welche ebenfalls durch das C26 Tumormedium in den C2C12 Zellen induziert wurde. Eine Erhöhung der MRFs MyoD und Myogenin durch ***rac*-8** konnte ebenso festgestellt werden. In einem *in vivo* C26 Maustumormodell konnte ***rac*-8** den Gewichtsverlust abschwächen und die Expression der Ligasen MuRF-1 und Atrogin reduzieren. Weiterhin zeigte es keine Auswirkungen auf die Zytotoxizität der Chemotherapeutika Cisplatin, Doxorubicin, und Gemcitabin.

Somit kann dieses 1*H*-Pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-Derivat ebenfalls als exzellenter Ausgangspunkt zur Entwicklung neuer Derivate gegen Kachexie und Sarkopenie betrachtet werden.

2 AUFGABENSTELLUNG

Die Hauptaufgabe dieses Projektes bestand, darin basierend auf den in Kapitel 1.9.2 genannten Referenzverbindungen **NUCC555 (7)** und **IMB0901 (8)** durch gezieltes Design neue Derivate zu entwickeln und zu synthetisieren, gestützt auf Dockingstudien und anhand von medizinalchemischen Methoden (siehe Abbildung 20). Dazu musste zunächst ein synthetischer Zugang zu den genannten Derivaten eröffnet werden, welcher gleichzeitig einer möglichst modularen Route folgen sollte, um ausgehend von gemeinsamen Intermediaten eine größere strukturelle Vielfalt zu erhalten.

Die Verbindungen sollten nach den medizinalchemischen Methoden „druglike“ sein, also sollten sie beispielsweise Lipinskis „Rule of five“ folgen, um potentiell oral bioverfügbar zu sein.[194] Darüber hinaus sollten die Derivate Aufschluss über mögliche Struktur-Wirkungsbeziehungen (engl. Structure-Activity-Relationships, SAR) bringen.

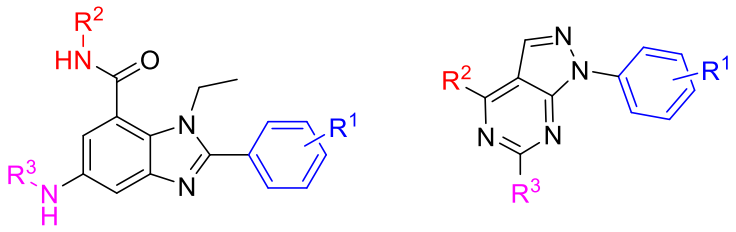


*Abbildung 20: Mögliche Variationspunkte von NUCC-555 (**7**) und IMB0901 (**8**)*

Verbindung	R^1	R^2	R^3
NUC-555	Variationen des aromatischen Systems in Bezug auf sterische und elektronische Aspekte	Variationen des aromatischen Systems, variierende Kettenlänge	Polare Seitenketten, Amine oder Amide
IMB0901	Variationen des aromatischen Systems in Bezug auf sterische und elektronische Aspekte	Zyklische oder offene Seitenketten	H, oder kleine Substituenten

Dazu sollten die 1*H*-Pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-Derivate prinzipiell das Substitutionsmuster der Kernstruktur beibehalten. Zusätzlich sollte durch eine geeignete Syntheseroute R^3 variiert werden. Der Einfluss des *N*-Phenylrings auf die Aktivität sollte durch gezielte und methodische

Modifikation untersucht werden. Die polare Seitenkette sollte entsprechend gängiger explorativer Methoden verändert werden. Darüber hinaus sollten mittels Dockingstudien gezielte Modifikationen designt und synthetisiert werden.

Für die NUCC-555 Derivate sollte grundsätzlich der Benzimidazolkern mit seinem Substitutionsmuster erhalten bleiben. Die Derivate sollten neben klassischen Veränderungen, wie dem Verlängern der Seitenkette oder dem Entfernen von Heteroatomen, gezielte durch Docking gestützte Modifikationen enthalten. Daneben könnte die Struktur durch Modifikation der *N*-Ethylseitenkette rigidisiert werden, was ebenfalls ein gängiges Verfahren der medizinischen Chemie ist. Die Derivate von NUCC-555 (**7**) könnten zudem nach Möglichkeit in ihrer Selektivität für ACVA umgekehrt werden, sodass sie mit höherer Affinität an MSTN binden.

Die Substanzen sollten anschließend in Bezug auf ihre biologische Aktivität evaluiert werden, wobei die dadurch erhaltenen Resultate in die Entwicklung der nächsten Generation von Verbindungen einfließen sollte.

Anschließend sollte basierend auf den primären biologischen Daten eine Auswahl von Verbindungen getroffen werden, welche in weiteren sekundären und phänotypischen biologischen Experimenten charakterisiert werden sollten.

3 DURCHFÜHRUNG / ERGEBNISTEIL

Im Folgenden werden die molekularen Docking-Simulationen, das Design neuer Verbindungen und die durchgeführten Synthesen beschrieben und diskutiert. Zusätzlich werden die Ergebnisse der biologischen Testung präsentiert.

3.1 Docking von Derivaten mittels AutoDock VINA an MSTN

Molekulares Docking ist in der modernen Forschung eine gängige Methode zur ersten Evaluation möglicher Wirkstoffkandidaten und zur Entwicklung potenziell selektiverer oder potenterer Analoga. Dabei ist zu beachten, dass es sich um vereinfachende Modelle handelt, welche je nachdem besser oder schlechter die sehr komplexen biologischen und physiko-chemischen Effekte vorhersagen können. Eine Simulation kann immer nur ein Baustein in der Entwicklung sein und ersetzt auf keinen Fall die biologische Evaluation der Verbindungen.

Die Docking-Kalkulationen in diesem Projekt wurden mit dem Programm AutoDock VINA durchgeführt.[195] Dieses Programm stellt eine eigenständige Weiterentwicklung von AutoDock 4 dar.[196] Molekulares Docking mit VINA kann am besten als maschinelles Minimieren von chemischen Potenzialen betrachtet werden. Dazu werden sogenannte Scoring-Funktionen eingesetzt, die die verschiedenen inter- und intramolekularen Effekte, Van-der-Waals- und Coloumb-Wechselwirkungen gewichten (siehe Abbildung 21).

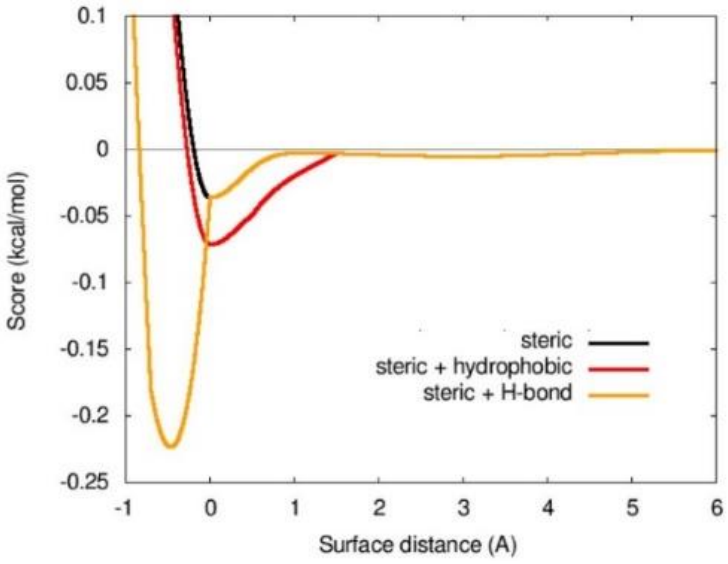


Abbildung 21:Übersicht über die Gewichtung der verschiedenen Wechselwirkungen. Den sterischen, hydrophoben und Wasserstoffbrückenwechselwirkungen werden Funktionen zugeordnet, die abhängig vom Abstand zur Proteinoberfläche einen Wert zum Scoring beitragen.[195]

Vereinfacht läuft der Dockingprozess wie folgt ab: Zunächst wird vom Benutzer der sogenannte „Searchspace“, also der Bereich des Proteins, in dem das Docking stattfinden soll, definiert. Die in diesem Quader befindliche Oberfläche des Zielproteins wird in ein Energieniveauraster eingeteilt, das die jeweiligen physikochemischen Eigenschaften widerspiegelt. Die Liganden werden in ihrer Position im 3D-Raster und ihren rotierbaren Bindungen randomisiert. Der Algorithmus erstellt daraufhin Varianten des Zielmoleküls (durch Rotation der drehbaren Bindungen), welche an die Oberfläche des Proteins angelagert und anhand der Scoring-Funktion bewertet werden. Dieser Prozess wird so lange wiederholt, bis das Programm ein lokales Energieminimun für eine bestimmte Konformation des Moleküls an der Oberfläche des Zielproteins findet. Meistens werden mehrere minimalisierte Dockingposen ausgegeben, die dann anhand ihres jeweiligen Scores in eine Reihenfolge gebracht werden können. Anschließend können die generierten Posen des Moleküls in 3D-Visualisierungsprogrammen wie PyMOL betrachtet und auf Plausibilität der berechneten Interaktionen geprüft werden.

Die errechneten Scoring-Werte werden in der Einheit kcal/mol angegeben, sie beziehen sich also auf die Energie (ΔG) die durch die Bindung frei wird. Mit Hilfe von Formel 1 kann dieser Wert theoretisch in einen K_D-Wert (also eine Bindungskonstante) umgerechnet werden. Dieser K_D-Wert hat allerdings nur eine sehr beschränkte Aussagekraft, da in den vereinfachten Dockingsimulationen viele Parameter, wie z.B. weitreichende elektrostatische Effekte, entropische Kräfte durch Wasserverdrängung oder Wasserstoffbrückenbindungen zum Medium, nicht berücksichtigt werden und das Protein nur eine rigide Struktur aufweist.

*Formel 1: Formel zur Umrechnung der freiwerdenden Bindungsenergie ΔG [kcal/mol] in eine Inhibitionskonstante K_D [mol/l], R = Gaskonstante [cal/(mol*K)], T in [K].*

$$K_D = e^{(\frac{\Delta G}{R*T})}$$

Die Röntgen-Kristall-Struktur, die zum Docking in diesem Projekt verwendet wurde, ist der MSTN-Fst288-Komplex (3HH2.pdb).[35] Diese Struktur besitzt eine Auflösung von 2,15 Å, wobei die entscheidenden Aminosäuren von MSTN in der Ligand-Bindungs-Domäne vollständig aufgelöst sind. Zum Docking an ACVA wurde die Röntgen-Kristall-Struktur 2B0U.PDB [89] verwendet (Woodruff *et al.* verwendeten in der Publikation zu NUCC-555 (**7**) dieselben Strukturen für MSTN und ACVA).[190] Die Simulation wurden zunächst für NUCC-555 (**7**) durchgeführt, da für dieses Molekül Dockingergebnisse an MSTN und ACVA publiziert waren und diese Ergebnisse als „Benchmark“ für die durchgeführten Simulationen

betrachtet wurden. Anschließend wurde ebenfalls eine Simulation für IMB0901 (**8**) durchgeführt. Dies war von besonderem Interesse, da von Liu *et al.* kein Zielprotein und kein Mechanism-of-Action (MoA) beschrieben wurde.[193] Durch die gleichzeitige Inhibition des MSTN-Signalwegs und der selbstinduzierten Expression von MSTN scheint jedoch ein vergleichbarer Mechanismus wie bei NUCC-555 (7) plausibel.

Die Scoring-Werte waren zunächst zweitrangig, da keine Referenzwerte für das Docking an MSTN oder ACVA mit VINA vorlagen. Darüber hinaus müssen höhere Werte nicht unbedingt einer höheren Aktivität entsprechen. Die Dockingpose und die genaue Position der Interaktionen waren in diesem Projekt entscheidender. Dennoch sind die Scoring-Werte im Folgenden angegeben.

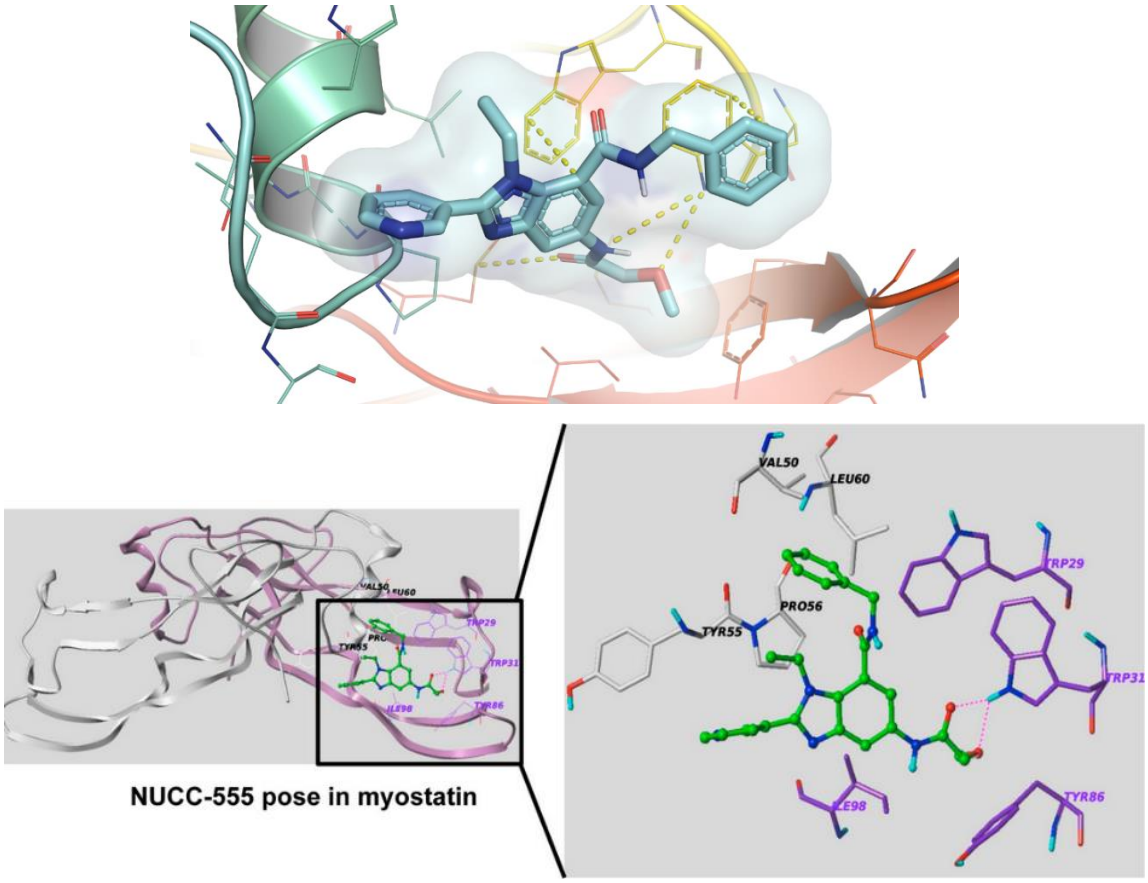


*Abbildung 22: Oben: Dockingpose von NUCC-555 (**7**) an MSTN (3HH2.PDB) berechnet mit AutoDock VINA. Einzelne Interaktionen sind durch gestrichelte Linien angedeutet. Unten: Publizierte Pose aus.[190] (modifiziert)*

Für NUCC-555 konnte mit VINA die für MSTN publizierte Dockingpose in ihrer generellen Ausrichtung reproduziert werden. Die Interaktionen der Methoxyessigsäureamid-Seitenkette waren ebenfalls vorhanden, zusätzlich konnte ein polarer Kontakt der Carbonylgruppe mit

Met101 detektiert werden. Der Pyridinring lag in einer Tasche die von Gln53, His59 und Pro56 begrenzt wurde. Die mit VINA gedockte Pose war stärker in Richtung der Tryptophane orientiert und die Position des „nördlichen“ Benzylrests unterschied sich von den Vergleichsdaten, da die Pose ein planares π-π-Stacking mit Trp31 zeigte. Darüber hinaus interagierte der Benzimidazolkern ebenfalls über ein π-π-Stacking mit Trp29. Dies hing vermutlich mit einer unterschiedlichen Gewichtung der verschiedenen Scoring-Algorithmen der verwendeten Programme zusammen. Der Wert der am höchsten gewerteten Pose betrug –7,7 kcal/mol (siehe Abbildung 22).

Im Fall von IMB0901 wurde der Searchspace auf das gesamte Protein erweitert, um eine ungewünschte Beeinflussung durch eine Eingrenzung zu vermeiden. Es wurden sowohl das *S*- als auch das *R*-Enantiomer gedockt. In beiden Fällen zeigte die beste Dockingpose eine Bindung in der für NUCC-555 berichteten Bindungsstelle.

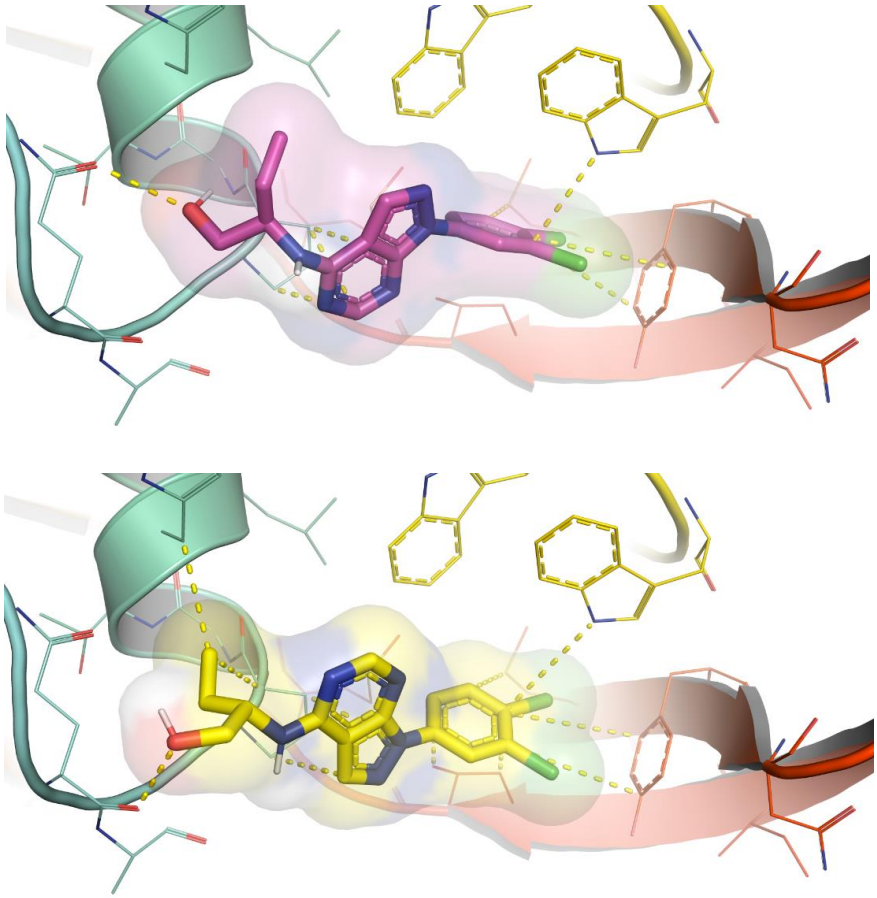


Abbildung 23: Dockingposen von IMB0901R (oben) und IMB0901S (unten) an MSTN (3HH2.PDB). Einzelne Interaktionen sind durch gestrichelte Linien angedeutet.

Der 3,4-Dichloraromat lag bei beiden Enantiomeren in einer kleinen hydrophoben Tasche, die durch Trp29, Trp31, Tyr86, Ile98 und Met84 gebildet wird. Der 1*H*-[3,4-d]-Pyrazolopyrimidinkern schien weniger mit den Tryptophanen zu interagieren und stattdessen eine π-CH_2-Interaktion mit Pro56 zu bilden. Die beobachteten Interaktionen waren in beiden Fällen ähnlich, jedoch war die Position der Seitenkette und die Ausrichtung des Kerns jeweils gespiegelt, wobei das *S*-Enantiomer durch die Ausrichtung der Ethylgruppe zur Pre-Wrist-Helix eine vorteilhaftere Position einnahm (siehe Abbildung 23). Die Scoring-Werte (*R*-Enantiomer: –6,8 kcal/mol und *S*-Enantiomer –7,1 kcal/mol) stützten diese Beobachtung.

Der Wert beider Enantiomere lag damit unter dem berechneten Wert für NUCC-555, jedoch muss dies sich nicht zwingend in einer höheren Aktivität widerspiegeln. Die genaue Position des Moleküls und die Art der Interaktionen spielen ebenfalls eine Rolle. Es wäre denkbar, dass das anilinische Amin in dieser Position mit dem umgebenden wässrigen Medium interagierte, wodurch sich das Molekül besser anlagern könnte; auf der einen Seite polare Interaktion zum Medium auf der anderen Seite Interaktionen zur Oberfläche und kleinen hydrophoben Taschen.

Docking an ACVA mit Autodock VINA

Zusätzlich wurde eine Simulation mit ACVA (PDB: 2B0U.PDB) durchgeführt. In diesem Docking konnte ebenfalls eine Interaktion von sowohl NUCC-555 (**7**) als auch IMB0901 (**8**) festgestellt werden. Im Vergleich zu der von Woodruff *et al.* publizierten Dockingpose für NUCC555 (7) bestanden jedoch große Unterschiede in Bezug auf Interaktionen und Ausrichtung des Moleküls (siehe Abbildung 24).[190]

Die Hauptinteraktionen der Dockingpose schien die π-π-Wechselwirkung zwischen dem Benzimidazolkern und Trp28 zu sein. Die „nördliche“ Benzylgruppe interagierte ebenfalls über ein π-Stacking mit Trp25, zudem über eine π-CH_2-Wechselwirkung mit Thr61 und über ein T-shaped π-Stacking mit Phe58. Eine weitere Interaktion bestand zwischen dem Benzylamid-Stickstoff und dem Indolstickstoff von Trp28. Die polare Methoxyessigsäure-Seitenkette wies dahingegen keine Interaktion auf. Der höchste Scoring-Wert lag bei dieser Simulation bei –7,1 kcal/mol.

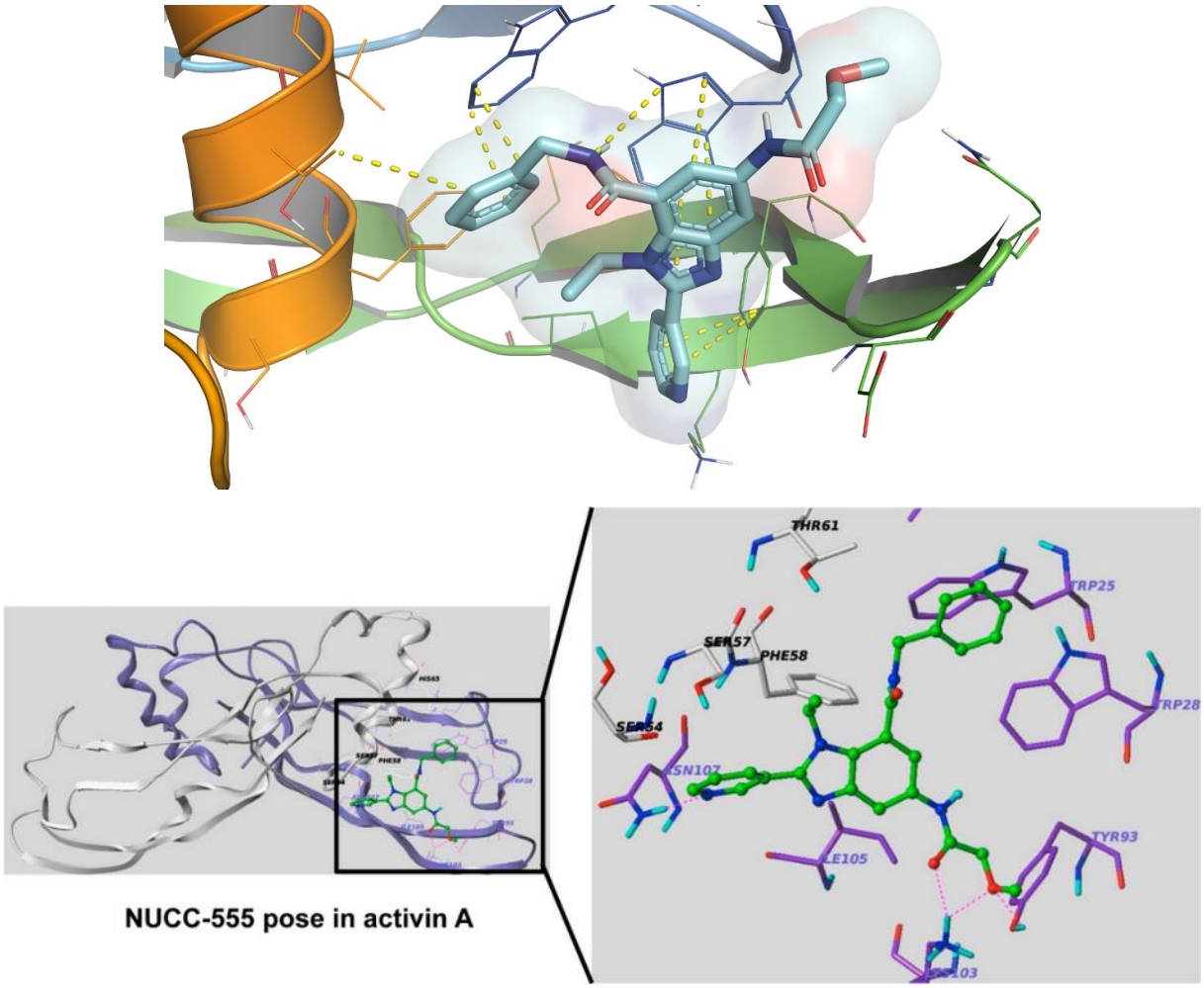


*Abbildung 24: Oben: Dockingpose von NUCC-555 (**7**) an ACVA (2B0U.PDB) berechnet mit AutoDock VINA. Einzelne Interaktionen sind durch gestrichelte Linien angedeutet. Unten: Publizierte Pose aus.[190] (modifiziert)*

Die Dockingposen von IMB0901 (**8**) waren sowohl für das *R*- als auch das *S*-Enantiomer stärker in Richtung der Pre-Wrist-Helix orientiert. Im Fall des *R*-Enantiomers wurde eine π-π-Interaktion des 3,4-Dichloraromaten mit Trp25 und Trp28 berechnet. Der Pyrazolopyrimidinkern interagierte mit dem Helix-ständigen Phe58 über eine π-π-Interaktion. Darüber hinaus bildete die Hydroxygruppe der Seitenkette eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Hydroxygruppe von Ser57 und dem Amidstickstoff von Phe58. Die berechnete Pose des *S*-Enantiomers lag deutlich weiter entfernt von den beiden Tryptophanen und interagierte folglich auch nicht mit diesen. Der 3,4-Dichloraromat bildete eine T-shaped π-Wechselwirkung mit Phe58 aus. Zudem schien in diesem Fall der Pyrazolopyrimidinkern keine π-Interaktion auszubilden, sondern interagierte über die beiden Pyrimidinstickstoff mit dem Amidstickstoff von Phe58 auf der einen und Asn107 auf der anderen Seite. Der Aminstickstoff und die Hydroxygruppe der polaren Seitenkette bildeten eine Wasserstoffbrückenbindung mit Gly53 aus (siehe Abbildung 25). Insgesamt erschienen beide Dockingposen als plausibel, um eine

Bindung an ACVA zu ermöglichen und die Protein-Protein-Interaktion (PPI) zu inhibieren. Die berechneten Scoring-Werte betrugen –6,2 kcal/mol (**(*R*)-8**) und –5,8 kcal/mol (**(*S*)-8**).

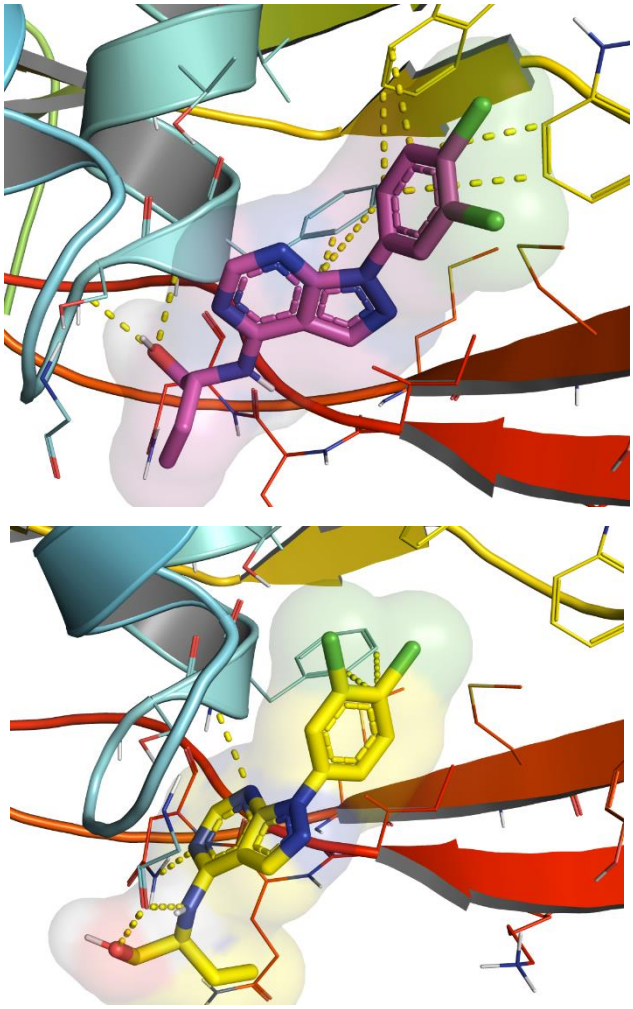
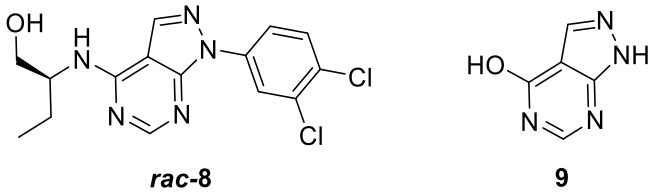


Abbildung 25: Dockingposen von IMB0901R (oben) und IMB0901S (unten) an ACVA (2B0U.PDB). Einzelne Interaktionen sind durch gestrichelte Linien angedeutet.

Die ersten Simulationen verliefen somit insgesamt erfolgreich. Um nun die *in silico* Ergebnisse einer Interaktion und einer möglichen Inhibition zu bestätigen, mussten diese Verbindungen im folgenden Schritt synthetisiert werden.

3.2 Synthese von 1*H*-[3,4-d]-Pyrazolopyrimidinverbindungen[1]

Für IMB0901 (**8**) wurde von Liu *et al.* keine Synthese publiziert.[193] Weiterhin ist in SciFinder® ebenfalls keine Synthese für diese Verbindung angegeben. 1*H*-Pyrazolo[3,4-d]pyrimidine, nachfolgend als [3,4]-Pyrazolopyrimidine bezeichnet, sind jedoch ein häufiges Strukutrmotiv in der Medizinalchemie (Beispiele unter [197–200], Allopurinol (**9**) als ein zugelassenes [3,4]-Pyrazolopyrimidin gegen Gicht,[201] siehe Abbildung 26). Deshalb sind verschiedene Methoden zur Synthese bekannt.



***rac*-8** **9**

*Abbildung 26: Links: Struktur von IMB0901 (**rac**-**8**), rechts: Struktur von Allopurinol (**9**)*

Um eine möglichst modulare Syntheseroute zu erhalten, sollte der Substituent R^2 am Pyrimidinring zum Abschluss der Sequenz eingefügt werden. Zur Synthese des anellierten Ringsystems stellte sich die Frage, ob das Pyrazol oder das Pyrimidin zuerst gebildet werden sollte (siehe Abbildung 27).

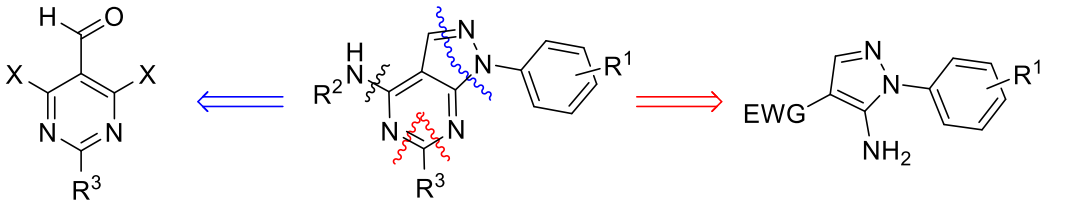
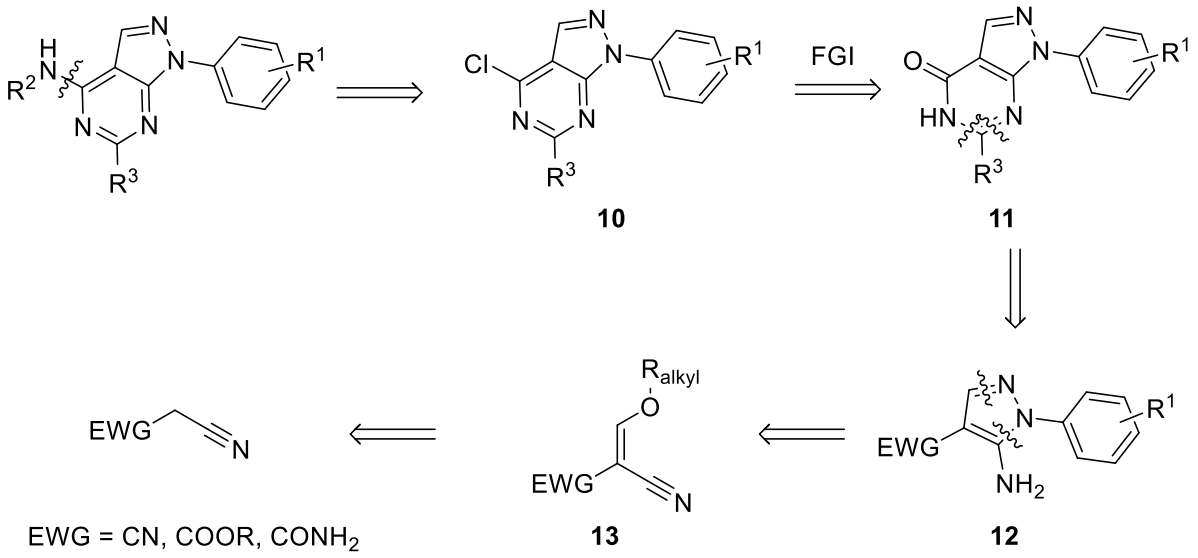


Abbildung 27: Retrosynthetische Analyse von IMB0901-Derivaten: Das Amin mit R^2 sollte als letzter Schritt eingeführt werden (schwarze Markierung). Zum Erhalt eines geeigneten Schlüsselintermediats für diese Route könnte entweder das Pyrazol oder das Pyrimidin zuerst aufgebaut werden.

[1] Zeitlich betrachtet startete das IMB0901 Projekt später als das NUCC-555 Projekt, beide Projekte liefen danach aber parallel (IMB0901 wurde erst nach dem Start dieser Arbeit publiziert). Die [3,4]-Pyrazolopyrimidine wurden in den Fokus gestellt, da diese als Inhibitoren von MSTN und nicht ACVA publiziert wurden.

Das zur einfachen Modifikation geeignete Schlüsselintermediat (**10**) könnte durch Sauerstoff-Halogen-Austausch am Pyridinring mit dem oxophilen Reagenz $POCl_3$ aus einem [3,4]-Pyrazolopyrimidinon (**11**) synthetisiert werden.[202]

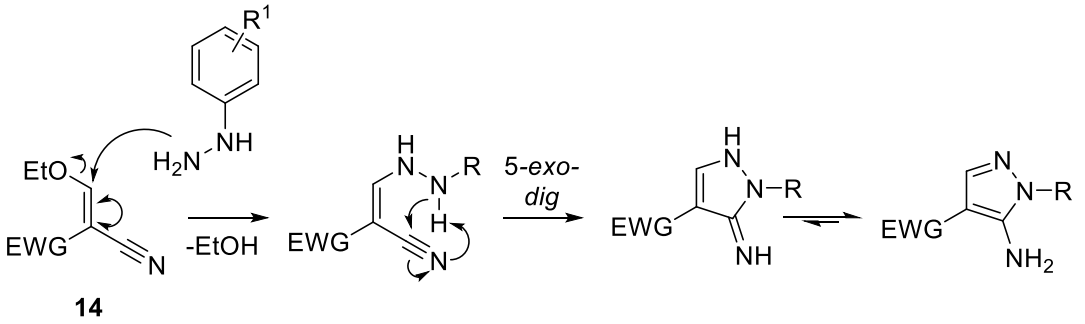
Intermediat **11** könnte durch Zyklisierung eines substituierten Pyrazolderivats **12** synthetisiert werden. Durch die Wahl des Reagenzes für diese Reaktion wäre es möglich, einen Substituenten an der R^3-Position einzuführen. Pyrazol (**12**) könnte wiederum durch Zyklisierung eines Malonsäurenitrilderivats (**13**) mit einem beliebigen Hydrazinderivat synthetisiert werden, was aufgrund der kommerziellen Verfügbarkeit einiger Hydrazinderivate eine große Vielfalt ermöglichen würde. Malonsäurenitrilderivat **13** könnte schließlich durch eine Kondensationsreaktion mit Orthoformiat ausgehend von einem kommerziell erhältlichen Nitril erhalten werden (siehe Schema 1).



Schema 1: Retrosynthetische Analyse: das Pyrazol wird als erstes gebildet

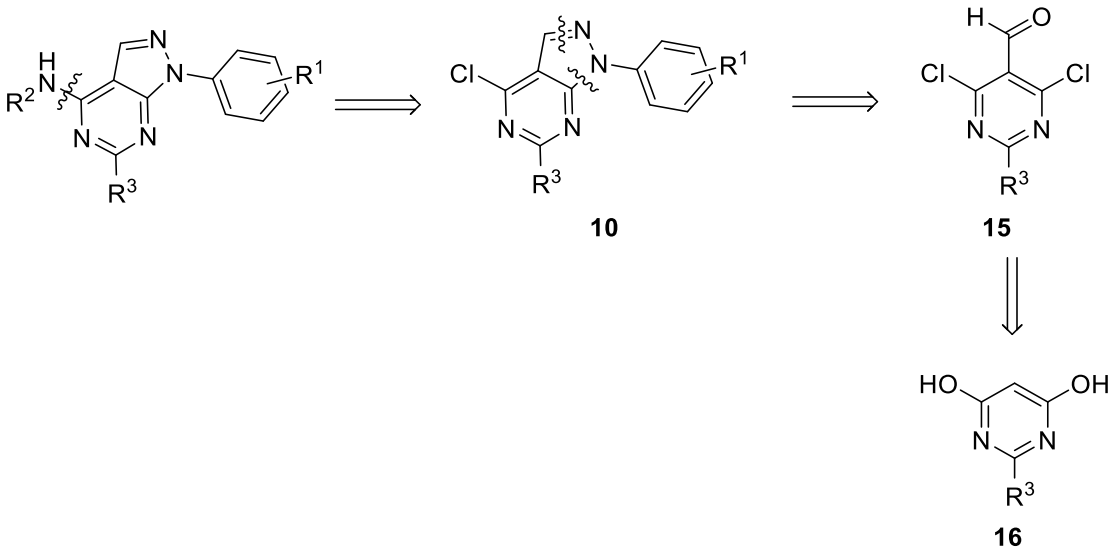
Die Triebkraft hinter den beschriebenen Zyklsierungsreaktionen ist jeweils die Bildung eines aromatischen Systems. Bei der oben genannten Zyklisierung zum Pyrazol ist zusätzlich die Addition des Hydrazins durch die hohe Elektrophilie des Kohlenstoffs (Michael-Akzeptor mit zwei elektronenziehenden Gruppen und ein maskierter Aldehyd) stark begünstigt. Die intramolekulare *5-exo-dig*-Ringschließung des zweiten Stickstoffs mit dem weniger elektrophilen Nitril ist laut Baldwin-Regeln erlaubt und wird durch die Bildung des aromatischen Systems begünstigt (siehe Schema 2).[203] Durch die höhere Reaktivität des primären Hydrazin-Stickstoffs sollte die gewünschte Regioselektivität favorisiert sein. Die

reversible Kondensation des Formamids mit dem Pyrazolamin wird ebenfalls durch die anschließende schnelle, intramolekulare Zyklisierung zum aromatischen Pyrimidin begünstigt.



*Schema 2: Plausibler Mechanismus der Pyrazolbildung aus einem Phenylhydrazin und Enolether **14**. Andere Reihenfolgen der Elimierungsreaktionen sind ebenfalls möglich.*

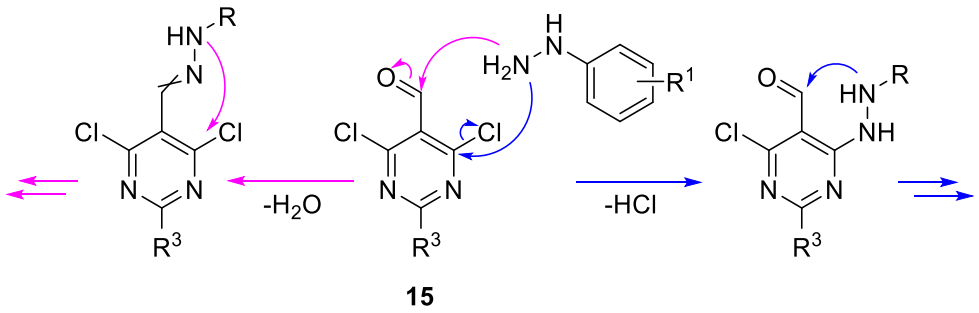
Bei der zweiten Möglichkeit würde der Sechsring zuerst gebildet, um direkt das Schlüsselintermediat **10** zu erhalten. Dazu könnte Dichlorpyrimidin-Carbaldehyd **15** mit einem beliebigen Hydrazinderivat zyklisiert werden. Die Verbindung **15** wäre über eine Vilsmeier-Haack-Formylierung und einen zweifachen Sauerstoff-Halogen-Austausch von Di-Hydroxy-Pyrimidin (**16**) zugänglich (siehe Schema 3).



*Schema 3: Retrosynthetische Analyse: Das Pyrazol wird an das Pyrimidin durch einen Hydrazonbildung/SN_{Ar}-Kaskade anneliert. Verbindung **15** kann über eine Formylierung/O-Cl-Austauschreaktion aus **16** erhalten werden.*

Genau wie in der zuerst genannten Variante ist die Bildung eines aromatischen Systems die ausschlaggebende Kraft hinter diesen Reaktionen. Im Gegensatz zu dieser stellt sich vor allem bei der Zyklisierung des Pyrimidin-Carbaldehyds mit dem Phenylhydrazin die Frage der Regioselektivität. Um das gewünschte Produkt zu erhalten, muss der reaktivere Hydrazin-Stickstoff zuerst mit dem Aldehyd zum Hydrazon kondensieren. Durch die Benzylposition des Aldehyds würde diese Kondensation ein stabiles Intermediat ergeben. Jedoch eignen sich 4-Chlor-Pyrimidine besonders für S_NAr-Reaktionen, da die negative Ladung des Additionsprodukts durch die Stickstoffe resonanzstabilisiert ist. Zusätzlich können die freien Elektronenpaare der Pyrimidin-Stickstoffe nicht in das π-System des Aromaten delokalisieren, wodurch der –I-Effekt der elektronegativen Stickstoffe dominiert, was den Aromaten stark deaktiviert. Durch die Carbaldehyd-Gruppe ist der Ring zusätzlich deaktiviert.

Entscheidend für die Regioselektivität ist, welche der Reaktionen zuerst abläuft. Dabei spielen die Reaktionsbedingungen eine entscheidende Rolle, vor allem der pH-Wert des Mediums; die Kondensationsreaktion läuft am schnellsten bei einem leicht sauren pH-Wert ab, für die S_NAr-Reaktion muss eine Base zur Deprotonierung zur Verfügung stehen.



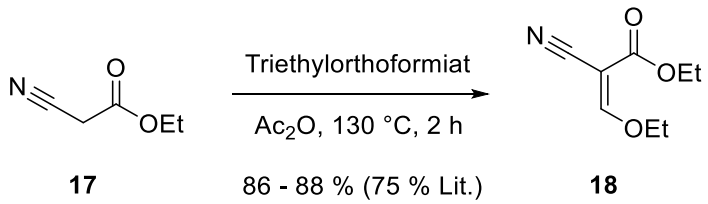
*Schema 4: Mögliche Reaktionen eines Phenylhydrazins mit **15**. Ob die S_NAr-Reaktion (blaue Pfeile) oder die Hydrazon-Bildung (pinke Pfeile) zuerst abläuft, hängt von den genauen Reaktionsbedingungen ab.*

Beide Syntheserouten würden generell den Zugang zu einer Vielzahl an Derivaten ermöglichen. Im Folgenden soll nun zunächst die Resynthese von IMB0901 erläutert werden.

3.2.1 Resynthese von IMB0901

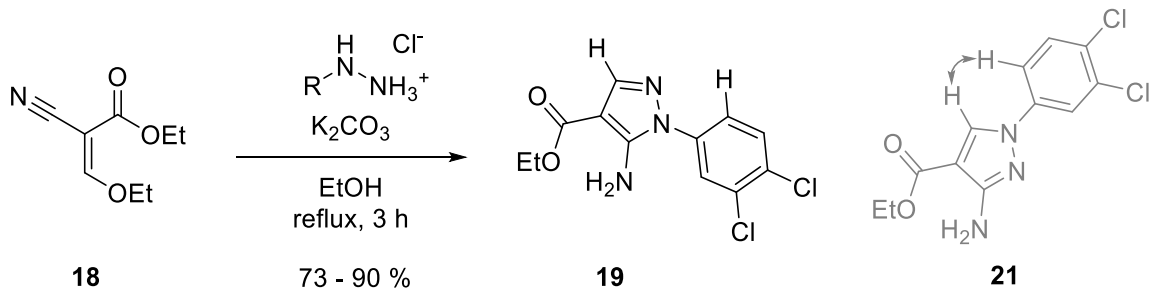
Zunächst sollte IMB0901 (**8**), der erstgenannten Variante folgend, ausgehend von Cyanoethylacetat (**17**) synthetisiert werden. Dies wurde aufgrund der höheren zu erwartenden Regioselekivität entschieden.

Verbindung **17** wurde dazu als erstes in einer Kondensationsreaktion mit Triethylorthoformiat in Ac_2O refluxiert, um entsprechend der Literatur von Borisova *et al.* den Enolether **18** zu erhalten.[204] Nachdem Waschen des Rohprodukts mit CyH wurde **18** in ausreichend hoher Reinheit mit einer Ausbeute von 86 % (75 % Lit.) isoliert. Die Wiederholung der Reaktion in einem größeren Maßstab verlief analog mit einer Ausbeute von 88 % (siehe Schema 5).



*Schema 5: Kondensationsreaktion von **17** mit Triethylorthoformiat zu **18** [204]*

Der nächste Syntheseschritt bestand aus der Zyklisierung von Enolether **18** zum Pyrazol **19**. In Anlehnung an die Literaturmethodik wurde Verbindung **18** mit K_2CO_3 und 3,4-Dichlorphenylhydrazin-Hydrochlorid (**20**) in Ethanol erhitzt.[198] Nach Fällung mit Eiswasser konnte das Pyrazol **19** in ausreichend hoher Reinheit mit einer Ausbeute von 73 % nach Fällung isoliert werden, welche in einer zweiten Reaktion im größeren Maßstab auf 90 % erhöht werden konnte (siehe Schema 6).



*Schema 6: Zykliserung von **18** zum Pyrazol **19**. Verbindung **21** wurde nicht gebildet. Dies wurde unter anderem durch die nicht vorhandene NOESY-Kupplung der angedeuteten H-Atome bestätigt.*

Durch die Analyse der NMR-Spektren (Verschiebung der Protonen- und Kohlenstoffsignale im Vergleich zu ähnlichen Verbindungen und 2D-Spektren) konnte die Regioselektivität bestätigt werden, was aufgrund der höheren Reaktivität des primären Stickstoffs und des Enolether-Kohlenstoffs auch erwartet wurde (vgl. Kapitel 3.2, siehe Schema 6 und Abbildung 28).

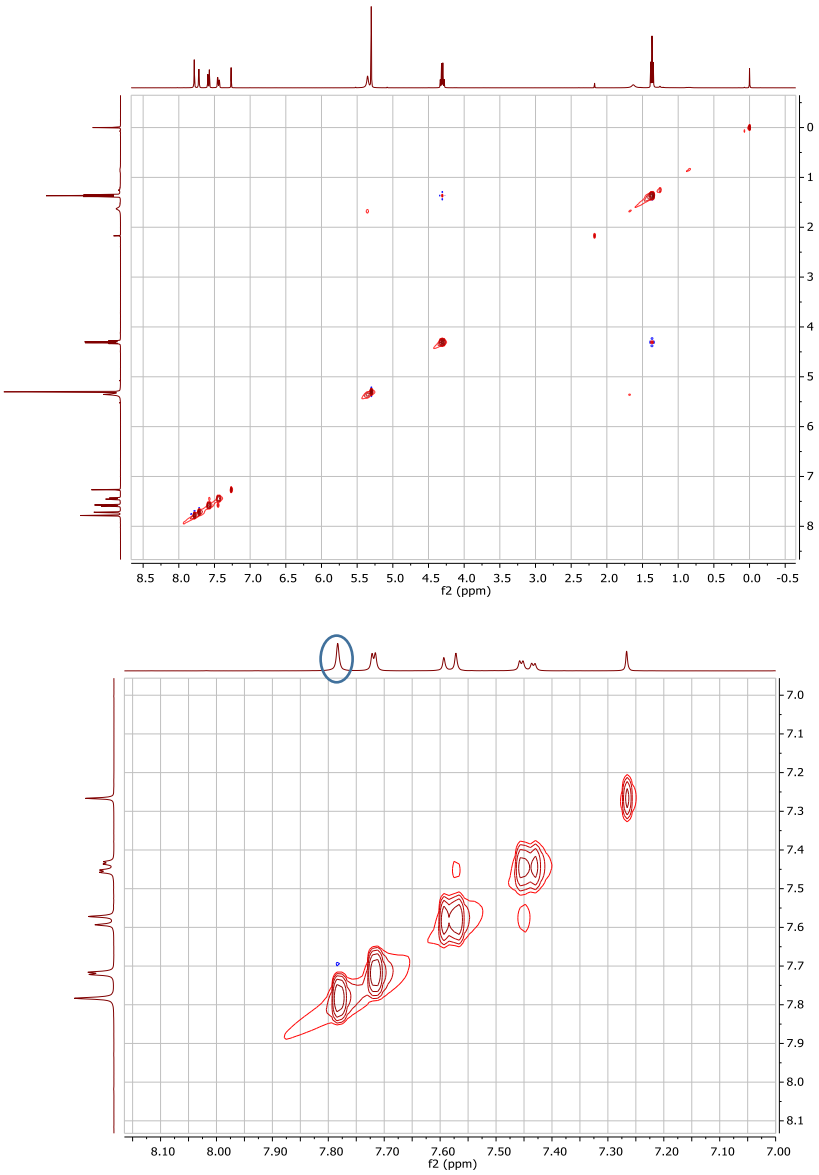
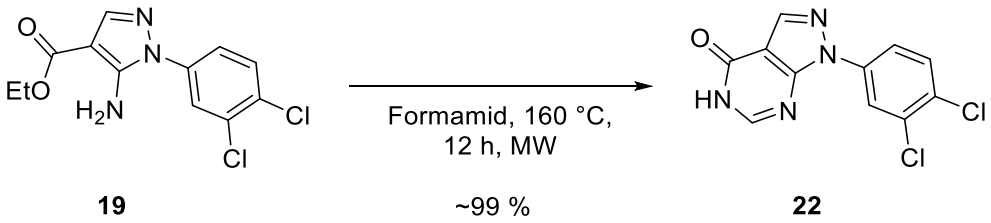


*Abbildung 28: NOESY-Spektrum von **19**, unten gesamtes Spektrum, oben vergrößerter Auszug. Das Pyrazolproton ist im markiert.*

Für die zweite Zyklisierung zum [3,4]-Pyrazolopyrimidinon (**22**) sahen Literaturbedingungen von Bagley *et al.* das Erhitzen von **19** in Formamid vor.[205] Eine erste Testreaktion wurde bei 180 °C in der Reaktionsmikrowelle durchgeführt. Neben dem gewünschten Produkt **22** bildeten sich neben dem Produkt jedoch schwarze Feststoffe, die vermutlich Zersetzungs- oder

Polymerisationsprodukte des Formamids oder des Pyrazols **20** waren. Durch Testreaktionen bei verschiedenen Temperaturen in der Mikrowelle konnte die Ausbeute auf annähernd ~99 % erhöht werden, wobei das Produkt durch Fällung und Filtration in hoher Reinheit erhalten wurde (siehe Schema 7).

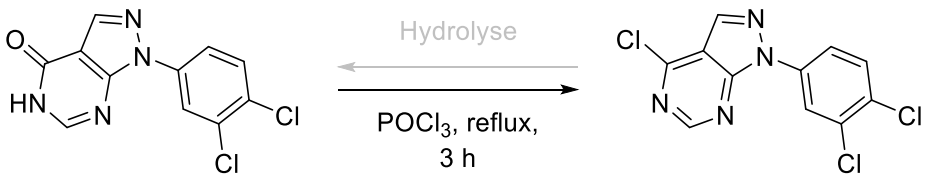


19 ~99 % **22**

*Schema 7: Zyklisierung von **19** zu **22***

Die folgende Substitution des Sauerstoffs durch Chlor wurde angelehnt an die Literaturmethodik von Feitosa *et al.* mit $POCl_3$ durchgeführt.[199] Das nach der Neutralisation mit $NaHCO_3$-Lösung erhaltene Präzipitat konnte mit MTBE extrahiert werden, wobei das in Spuren vorhandene und in Ether schwerlösliche Pyrimidinon **22** durch Filtration aus der organischen Phase entfernt werden konnte.

Verbindung **23** stellte sich allerdings als relativ hydrolyseempfindlich heraus, wodurch sie zu **22** zurück reagierte. Aus diesem Grund wurde nur halb-gesättigte Carbonat-Lösung zur Fällung verwendet, damit der pH-Wert neutral blieb. Die Ausbeute dieser Reaktion war mit 95 % ebenfalls sehr hoch und das Rohprodukt konnte bereits in hoher Reinheit isoliert werden (siehe Schema 8).



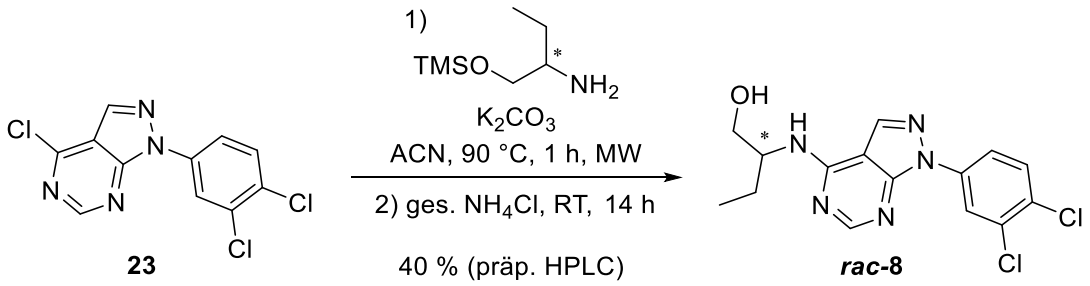
22 95 % **23**

*Schema 8: O-Cl-Austausch von **22**. Rückreaktion von **23** zu **22** über Hydrolyse angedeutet.*

Mit dem Chlorpyrimidin **23** konnte anschließend die finale S_NAr-Reaktion durchgeführt werden. In Testreaktionen wurden zwei Bedingungen angelehnt an Literaturbeispiele in

geprüft: eine Reaktion in ACN mit K_2CO_3 [206] und eine Reaktion in Toluol mit NEt_3.[207] Beide Reaktionen wurden mit *rac*-*O*-TMS-2-Aminobutanol durchgeführt, welches entsprechend den Literaturangaben synthetisiert wurde.[208]

Die Reaktion in ACN zeigte nach 24 h und die Reaktion in Toluol nach 48 h Reaktionszeit einen vollständigen Umsatz. Die erstgenannte Methode erwies sich als vorteilhafter, da das entschützte Produkt ***rac*-8** durch einfache Filtration erhalten werden konnte, nachdem die TMS-Schutzgruppe durch Zugabe von ges. NH_4Cl-Lösung und anschließendem Rühren über Nacht entfernt wurde. In dem Zwei-Phasen-System Toluol/wäss. NH_4Cl wurde keine vollständige Entschützung beobachtet. Durch den Einsatz der Reaktionsmikrowelle und Erhöhung der Temperatur auf 90 °C konnte in einem weiteren Testansatz die Reaktionszeit auf 1 h reduziert werden. Die Isolierung von ***rac*-8** erfolgte mit einer Ausbeute von 40 % mittels präparativer HPLC isoliert (siehe Schema 9).



*Schema 9: Finale S_NAr-Reaktion zum Erhalt von **rac*-8***

Anschließend sollten die beiden Enantiomere von **8** synthetisiert werden, um die Verbindung auf einen möglichen eutomeren Effekt zu prüfen. Dieser Effekt bezieht sich auf die potentiell unterschiedlichen pharmakologischen und pharmakokinetischen Eigenschaften von Enantiomeren, wobei ein Enatiomer das andere in der Aktivität übertrifft, teilweise mit erheblichen Potenzunterschieden. Der Effekt kann ebenso im Falle von Nebenwirkungen oder der Pharmakokinetik auftreten, sodass ein Enantiomer ein besseres Nutzen/Risiko- oder Pharmakokinetik-Profil aufweist. Dieses Enatiomer ist dann das Eutomer, das weniger aktive/"schlechtere" wird als Distomer bezeichnet. Die Begriffe wurden von Everhardus Ariens vorgeschlagen.[209]

Da die beiden enantiomerenreinen 2-Aminobutan-1-ole kommerziell erhältlich sind, konnten die Reaktion nach den gleichen Bedingungen wie zuvor durchgeführt werden. In der ersten Testreaktion zeigte sich, dass die TMS-Schutzgruppe nicht notwendig für eine selektive Bildung des gewünschten Strukturisomers ist, da der Stickstoff für die Selektivität ausreichend nukleophil war. Somit konnten beide Enantiomere von **8** mit einer Ausbeute von 34 % (**(*R*)-8**) und 65 % (**(*S*)-8)** direkt aus dem freien Aminobutanolen und **23** erfolgreich hergestellt und isoliert werden.

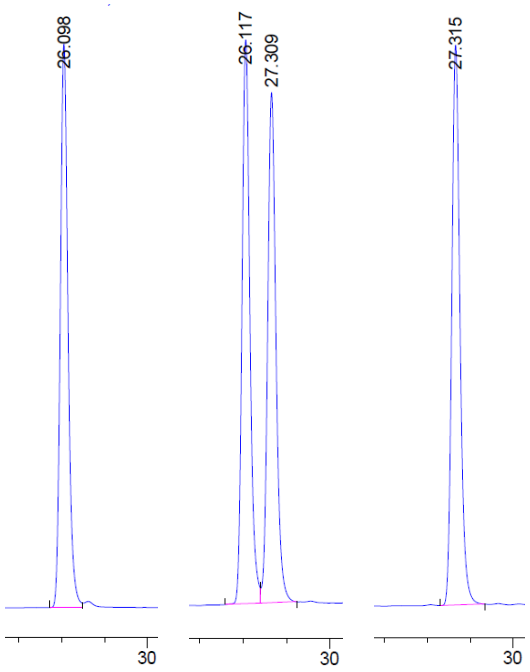
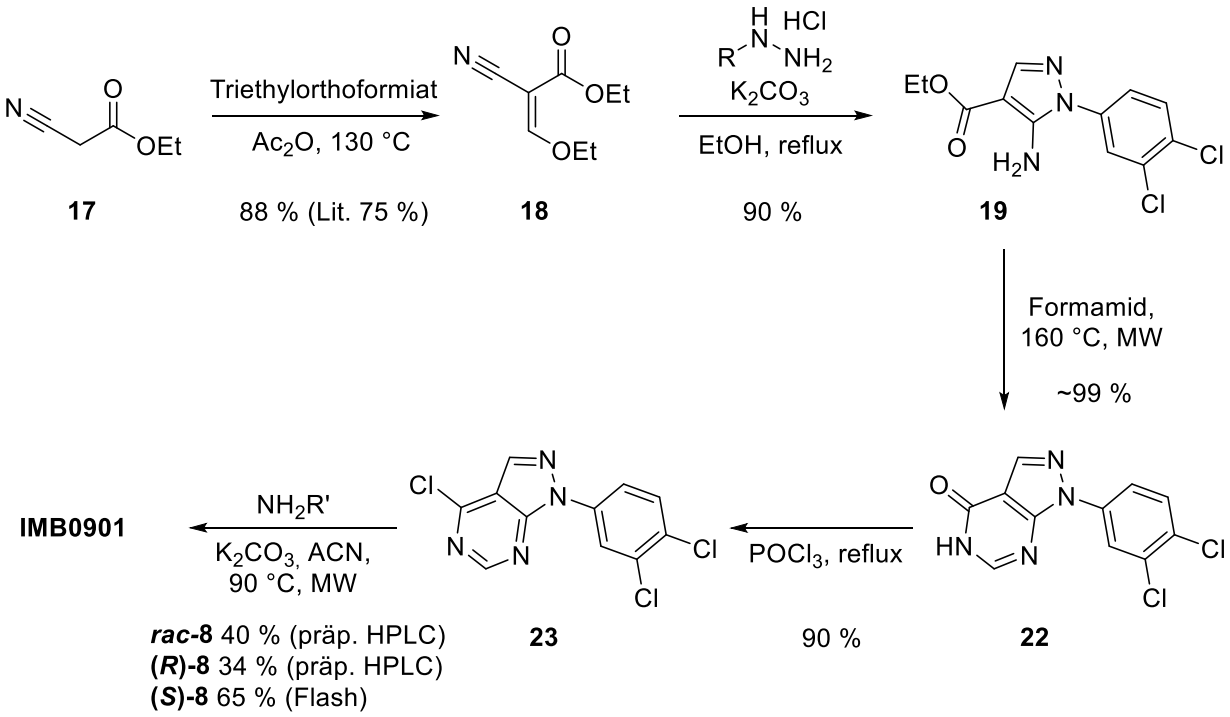


*Abbildung 29: UV-Spektren (λ = 254 nm) von **(S)-8** (links), **rac-8** (mitte) und **(R)-8** (rechts), im Fall des Racemats ergeben die Integrale der Peakfläche ein Verhältnis von 50:50.*

Der Enantiomerenüberschuss wurde anschließend mittels chiraler HPLC bestimmt, wobei ein *ee* von ~99 % festgestellt wurde (siehe Abbildung 29).

Über diese optimierte Syntheseroute konnte IMB0901 (***rac*-8**) mit einer Gesamtausbeute von 29 % (respektive 25 % für **(*R*)-8** und 47 % für **(*S*)-8**) über fünf Stufen erhalten werden (siehe Schema 10). Dabei konnten die Intermediate oftmals durch Präzipitation und Filtration in ausreichend hoher Reinheit erhalten werden, sodass lediglich die finale Stufe chromatographisch gereinigt werden musste. Dabei führte das lipophile und gleichzeitig hydrophile Substitutionsmuster sowohl auf einer Kieselgel-Normalphase, als auch auf einer

C18-Umkehrphase zu einer hohen Retention, was anscheinend zu Produktverlusten führte. Die Normalphasen-Chromatographie schien für diese Verbindung besser geeignet zu sein.



*Schema 10: Reaktionssequenz zur Synthese von **rac**-**8**, **(R)-8**, und **(S)-8**.*

Nachfolgend sollen das Design und die jeweiligen Synthesen der Derivate basierend auf IMB0901 (**8**) betrachtet werden.

3.2.2 Design und Synthese von IMB0901 Derivaten der 1. Generation

Neben den Enantiomeren von IMB0901 (**8**) sollte für eine erste Übersicht über die SAR eine Serie von Verbindungen mit Modifikationen an R^2 synthetisiert werden. Um den sterischen Einfluss der Seitenkette zu betrachten, sollten Kohlenstoffe hinzugefügt oder entfernt werden (Derivate **24**, ***rac*-25** und ***rac*-26**, siehe Abbildung 30). Der 3,4-Dichlophenylrest von **8** sollte für einen direkten Vergleich beibehalten werden.

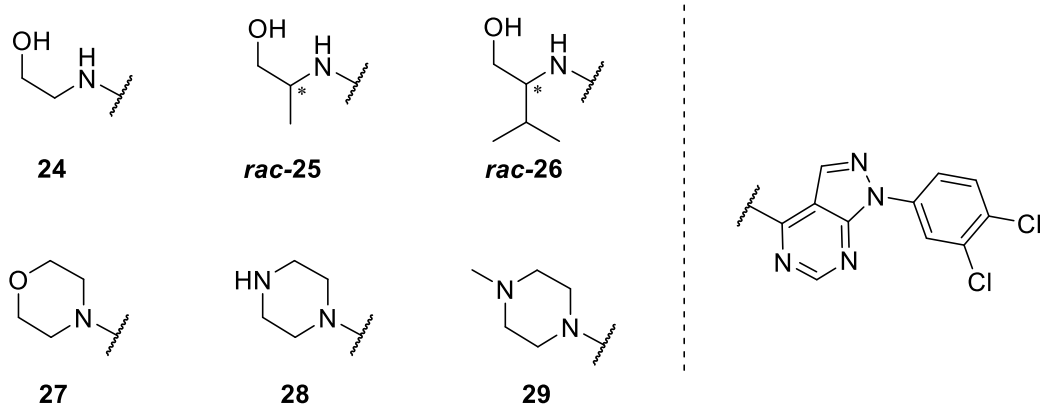


Abbildung 30: Basierend auf medizinal-chemischen Überlegungen und Dockingstudien designte Derivate von IMB0901

Daneben zeigte sich in Dockingstudien, dass Derivate mit einem aliphatischen Sechsring eine vorteilhafte Dockingpose aufweisen (siehe Abbildung 31). Die Wahl fiel dabei auf Morpholin und Piparazin (Derivate **27** und **28**), da diese beiden Heterozyklen zusätzlich einen hydrophilen Charakter in das Molekül bringen, wodurch polare Interaktionen mit dem Protein oder dem wässrigen Medium ermöglicht werden könnten. Zur Vervollständigung der Serie sollte zudem das *N*-Methyl-Piperazin-Derivat **29** synthetisiert werden, um den Einfluss der H-Akzeptor/Donor-Aktivität der Heterozyklen zu beobachten.

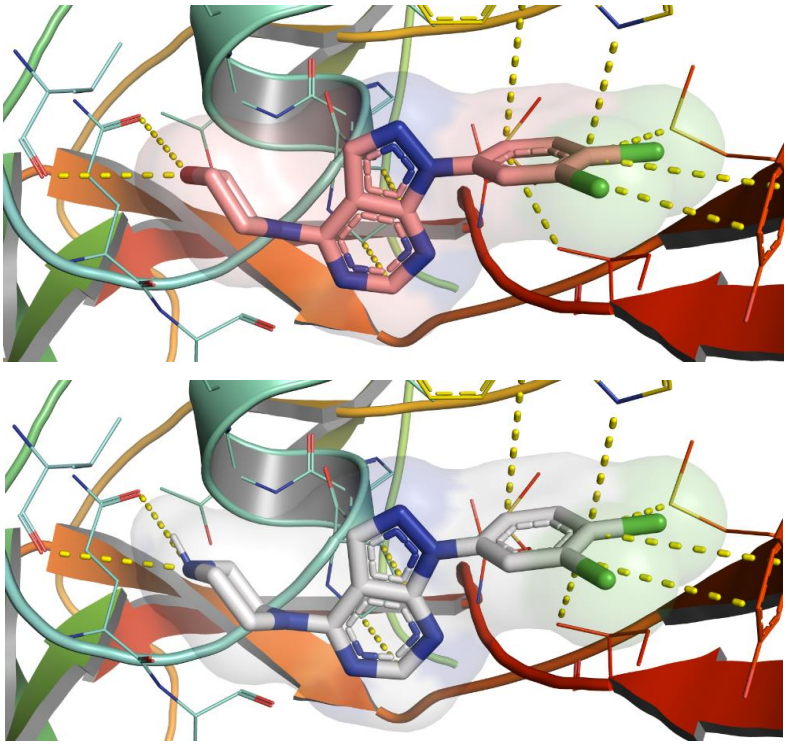


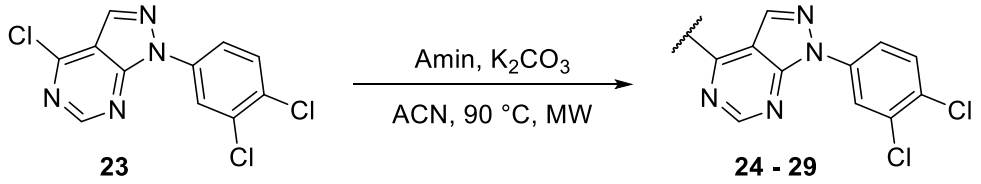
*Abbildung 31: Dockingpose von **27** und **28**. Beide Posen sind annähernd identisch. Der 3,4-Dichloraromat orientiert sich in einer hydrophoben Tasche aus Met84, Tyr86, Ile98, Met101 und Trp31. Der aromatische Kern interagiert mit Pro56. Der 6-Ring orientiert sich ebenfalls in eine kleine Tasche aus Val50, Gln53 und Lys54. Die Scoring-Werte betrugen für **27** –7.1 kcal/mol und für **28** –6,9 kcal/mol (IMB0901 –6,8 kcal/mol (R) bzw. –7,1 kcal/mol (S)).*

Da alle geplanten Derivate den 3,4-Dichlorphenylrest enthielten, konnte zur Synthese direkt vom zuvor in größerer Menge synthetisierten Chlorpyrimidin **23** und der etablierten Methodik ausgegangen werden. Um im Fall von Piperazin die Bildung eines Dimers, bei dem ein Piperazin-Ring zwei Pyrazolopyrimidine verbindet, zu unterdrücken, wurde ein großer Überschuss von 40 Äq. Piperazin verwendet.

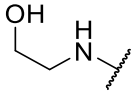
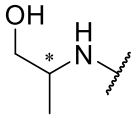
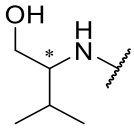
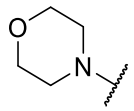
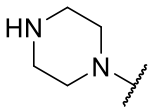
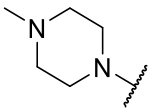
Alle Reaktionen zeigten nach 1 h Reaktionszeit bei 90 °C in der Mikrowelle einen vollständigen Umsatz und konnten nach chromatographischer Reinigung mit Ausbeuten von 54 % (**24**), 59 % (***rac*-25**) und 7 % (***rac*-26**) für die offenkettigen Derivate und 64 % (**27**), 33 % (**28**) und 35 % (**29**) für die zyklischen Derivate isoliert werden (siehe Tabelle 5).

Die basischeren Eigenschaften von **28** und **29** führten zu einer deutlichen Peakverbreiterung und hohen Retention auf der Normalphase, wodurch Produkt zum Teil verloren ging. Durch die Zugabe eines basischen Modifiers könnte das chromatographische Verhalten verbessert werden, für die erste Evaluation war die isolierte Menge jedoch ausreichend. Die sehr niedrige Ausbeute von ***rac*-26** hing mit einem Systemfehler der automatisierten Flash-Chromatographie-Anlage zusammen. Es wurde jedoch ebenfalls ausreichend Material isoliert, sodass die Verbindung nicht erneut synthetisiert wurde.

*Tabelle 5: Übersicht über die S_NAr-Reaktion von **23** mit verschiedenen Aminen.*



23 **24 - 29**

Verbindung	R^2	Zeit [h]	Ausbeute [a]
24		1	54 %
***rac*-25**		1	59 %
***rac*-26**		1	7 % [b]
27		1	64 %
28		1	33 %
29		1	35 %

Reaktionsbedingungen: 1 Äq. **23**, 2 Äq. Amin, 1,5 – 2 Äq. K_2CO_3, [a] Ausbeute nach Flash-Chromatographie. [b] Die sehr niedrige Ausbeute von ***rac*-26** hing mit einem Systemfehler der Flash-Chromatographie-Anlage zusammen.

3.2.3 Biologische Evaluation von IMB0901 und den Derivaten der 1.Generation

Die Messung der biologischen Aktivität der Verbindungen sollte anhand von biochemischen und/oder zellbasierten Experimenten erfolgen. Die Assays sollten dabei einen möglichst einfachen Aufbau und Readout haben, um einen hohen Durchsatz zu erlauben. Die Ergebnisse sollten dann als Primäranalyse dienen, auf Basis derer weitere Derivate designt und anschließend die vielversprechendsten Verbindungen für sekundäre Experimente ausgewählt werden sollten.

3.2.3.1 MST-Assay mit MSTN

Zur Bestimmung der Bindungsaffinität zwischen zwei (Makro-)Molekülen sind verschiedene Methoden bekannt. Viele basieren auf biochemischen Experimenten, betrachten also die beteiligten Proteine in einem zellfreien Versuchsaufbau. Woodruff *et al.* verwendeten beispielsweise Surface-Plasmon-Resonance (SPR) Spektroskopie, um die Inhibition der Protein-Protein-Interaktion durch NUCC-555 zu bestimmen.[190] Dieses Verfahren misst die Adsorption von Materialien auf einer planaren Metallplatte (typischerweise Au oder Ag) durch eine Änderung der Surface plasmon polaritons (SPP), einer oszillierenden Welle an der Grenzfläche zwischen Metall und Umgebung. Ein Bindungsevent kann durch eine Änderung der SPP beobachtet werden.[210] Etabliert ist weiterhin die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC). Dabei wird der Unterschied der benötigten Energie zum Erhitzen einer Referenzzelle und einer Probenzelle mit Protein und Ligand gemessen, welche ebenfalls von einem Bindungsevent beeinflusst werden kann.[211]

Ein anderes biochemisches Verfahren zur Bestimmung der Bindungsaffinität basiert auf Thermophorese (oder Thermodiffusion, auch Ludwig-Soret-Effekt nach den Entdeckern Carl Ludwig und Charles Soret benannt). Diese Technik beruht auf der Diffusion der Moleküle weg vom Punkt der Erwärmung eines Fluids.[212,213] Das als Micro-Scale-Thermophorese (MST) bezeichnete Verfahren nutzt zur Detektion von Molekülen ein Fluoreszenzsignal. Dabei kann entweder die Eigenfluoreszenz von Proteinen (hauptsächlich der Trp-Reste) betrachtet werden, oder die Proteine werden über verschiedene Methoden mit einem geeigneten Fluorophor gekoppelt. Die Geschwindigkeit der Diffusion ist bei einer identischen Zusammensetzung des Mediums abhängig vom Grad der Komplexierung eines Proteins, was mit einer Änderung der

Größe und der Solvatisierung zusammenhängt. Beobachtet wird diese Diffusion z.B. über die Änderung eines Fluoreszenzsignals. Als Wärmequelle dient ein Laser, welcher die dünne Probenkapillare punktgenau erwärmt. Unmittelbar mit der Aktivierung des Lasers findet eine initiale sprunghafte Reduktion der Fluoreszenzintensität statt. Die Ausprägung des temperature related intensity change (TRIC) genannten Effekts wird durch die physikochemischen Eigenschaften der lokalen Umgebung des Fluorophors beeinflusst. In der anschließenden zweiten Phase der Erwärmung wird die Änderung des Fluoreszenzsignals hauptsächlich durch die Thermodiffusion geprägt. Diese kann während der Bestrahlung ein Gleichgewicht (Steady-State) erreichen, sodass das Signal nicht mehr variiert. Mit dem Abschalten des Lasers findet ein inverser Fluoreszenzsprung basierend auf den oben genannten Prinzipien statt und die Moleküle diffundieren zurück (siehe Abbildung 32).[214,215]

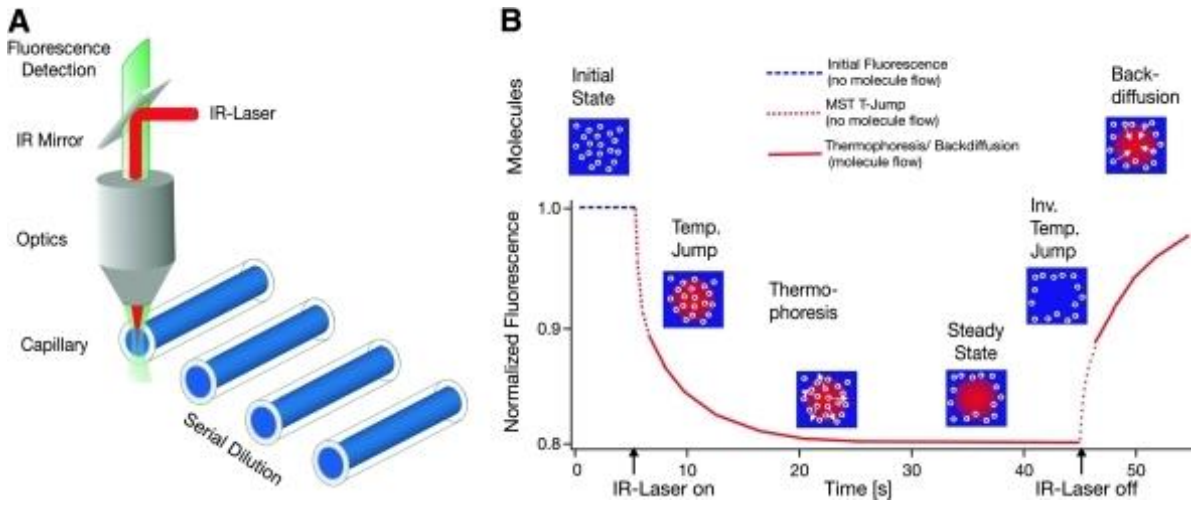


Abbildung 32: A: Aufbau eines MST-Geräts mit Fluoreszenzquelle und –detektor und IR-Laser zum Erhitzen der Probe. B: Darstellung einer MST-Spur (Trace) mit den verschiedenen Phasen: Initiales Signal, Temperatursprung, Thermophorese, Gleichgewicht (Stady state), inverser Temperatursprung und Rückdiffusion.

Die Fluoreszenzsignale aus der initialen Phase werden mit den gemessenen Signalen während eines Zeitpunkts der Erwärmung in Relation gesetzt. Die Bindung eines Liganden kann nun qualitativ daraus bestimmt werden, ob der sogenannte Fluoreszenz-Trace bei Zugabe eines möglichen Liganden im Vergleich zum ungebundenen Protein Unterschiede aufweist. Für eine erste qualitative Analyse wird dazu eine hohe Konzentration (1-2 mM) des Liganden verwendet. Falls bei diesen hohen Konzentrationen ein Unterschied zwischen den Traces des ungebundenen Proteins und nach Zugabe der Liganden gemessen werden kann, ist eine Interaktion zwischen Protein und Ligand wahrscheinlich. Zur Quantifizierung der Interaktion werden anschließend die Signale einer Verdünnungsreihe des Liganden mit gleichbleibender

Proteinkonzentration vermessen. Wichtig ist dabei, dass eine Sättigung zu beobachten ist, das heißt, dass die Traces sowohl bei hoher Konzentration des Liganden als auch bei niedriger Konzentration überlappen. Die erhaltenen Fluoreszenzsignale können nun geplottet werden und ergeben im Idealfall eine annähernd sigmoidale Kurve, mit dem K_D-Wert am Scheitelpunkt. Bei diesem Assay ist zu beachten, dass die Bindung nicht spezifisch gemessen wird, sondern jede Art von Bindung eines Liganden an das Fluoreszenz-markierte Ziel.

In diesem Projekt wurde das Monolith® MST-Gerät der Firma NanoTemper verwendet. Zum Färben des Proteins standen verschiedene Reagenzien zur Verfügung, die entweder kovalent an das Protein binden (*N*-Hydroxysuccinimid an NH_2 und Maleimid an SH) oder über Ni^{2+}-Ionen an einen His-Tag binden (siehe Abbildung 33).

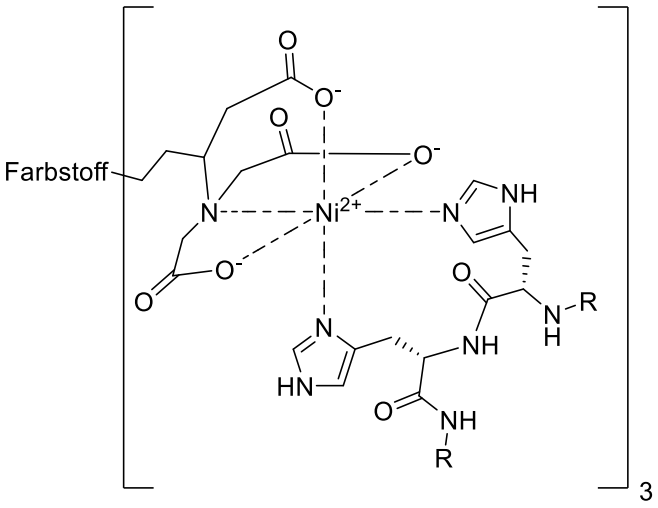


Abbildung 33: Darstellung des Ni^{2+}-NTA-His_6-Komplex. 3 Ni^{2+}-NTA-Einheiten sind jeweils an zwei His-Reste komplexiert. Die 3 Einheiten sind zusammen an ein Farbstoffmolekül gebunden.

Die erstgenannte Methode war für dieses Projekt ungeeignet, da eine Ligandeninteraktion an der Proteinoberfläche betrachtet werden sollte und nicht ausgeschlossen werden konnte, dass der Farbstoff in der Interaktionsfläche bindet. Das zweitgenannte Verfahren bot die Vorteile, dass eine definierte Menge an Farbstoff kontrolliert an das Protein gebunden werden konnte, und dass die Färbung sehr einfach durchzuführen war. Aktives MSTN und ACVA mit einem *N*-terminalen His_6-Tag sind kommerziell erhältlich. Die Proteine wurden entsprechend dem Protokoll von NanoTemper gefärbt und in einer Arbeitskonzentration von 30 nM vermessen.[216]

IMB0901 (***rac*-8**) wurde in einem qualitativen Bindungsassay in einer Konzentration von 0,5 mM zur Bestimmung einer Interaktion mit MSTN vermessen. Dabei konnte ein signifikanter Unterschied der Fluoreszenztraces von ungebundenem Protein und Protein mit Zugabe von ***rac*-8** beobachtet werden, was auf eine Interaktion hindeutet. Auf Basis dieses positiven Ergebnisses wurde eine Messserie (16-fache 1:1 Verdünnungen ausgehend von den Konzentrationen 0,5 mM und 0,75 mM) zur Quantifizierung angesetzt, aus deren Daten sich ein K_d-Wert von 78,9±3,9 µM ergab (siehe Abbildung 34).

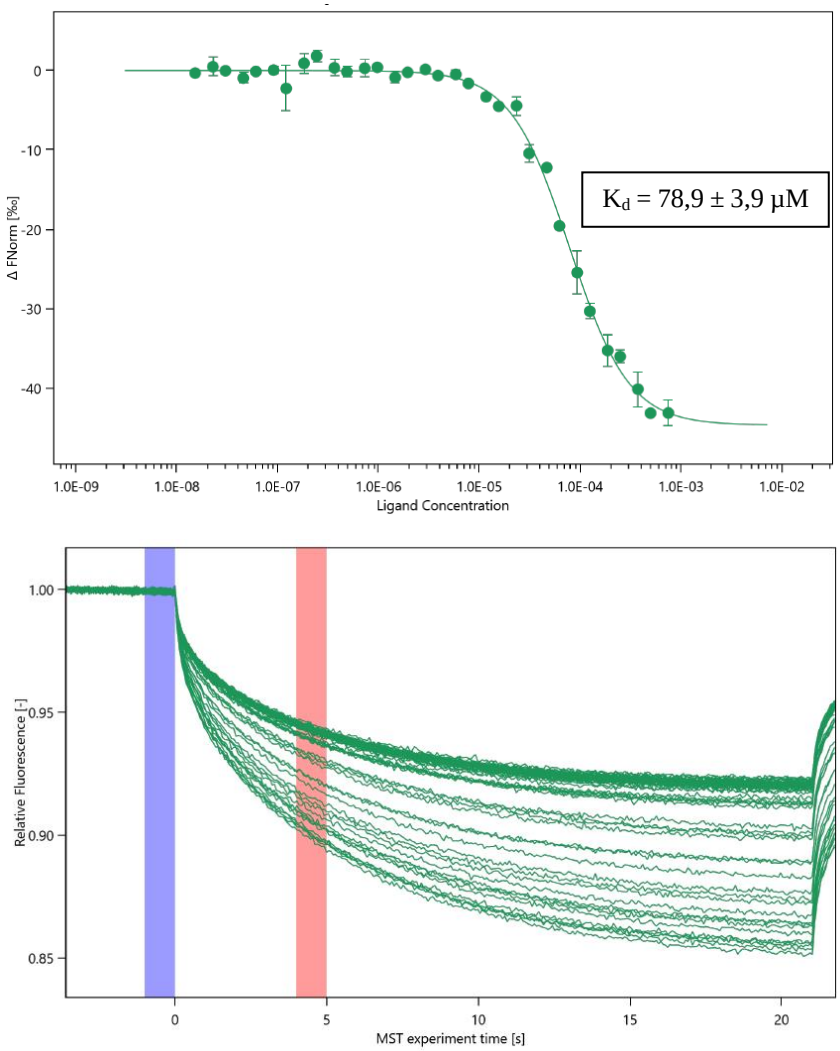


*Abbildung 34: Oben: MST-Daten von IMB0901 (**rac**-8), unten: MST-Traces von IMB0901 (**rac**-8) mit MSTN (angefärbt), geplottet (Abnahme des Signals gegen Konzentration von **rac**-8) und gefittet. Aus dem Wendepunkt der Kurve ergab sich ein K_d-Wert von 78,9 ± 3,9 µM, unten: MST-Traces, Abnahme der Fluoreszenz gegen die Zeit, in blau und rot waren die Zeitpunkte markiert, an denen die oben aufgeführten Daten erhalten wurden.*

Dieser Wert ist vergleichsweise hoch, es ist jedoch zu beachten, dass basierend auf der in Kapitel 3.1 aufgestellten Hypothese die Bindung von zwei Molekülen von IMB0901 an MSTN

möglich ist (das symmetrische Homodimer weist zwei Bindungstaschen auf). Es wäre daher möglich, dass beide Bindungsevents überlagerten oder sich gegenseitig beeinflussten, wodurch der K_d-Wert erhöht werden könnte.

Darüber hinaus ist es jedoch ebenfalls möglich, dass der Ligand direkt mit dem Farbstoff oder der Farbstoff-Protein-Bindung interagierte. Da in diesem Assay nur das Fluoreszenzsignal betrachtet werden kann, würde eine solche Interaktion zu Verfälschungen führen. Um dies zu testen, stand ein His_6-Polypeptid zur Verfügung, welches entsprechend dem Protokoll angefärbt wurde und eine qualitative Messung von IMB0901 (***rac*-8**) mit diesem Testprotein ergab eine signifikante Änderung des Fluoreszenzsignals. Darüber hinaus ergab die Messung des reinen NTA-Farbstoffs mit IMB0901 (***rac*-8**) ebenfalls eine schwache, aber signifikante Bindung (siehe Abbildung 35).

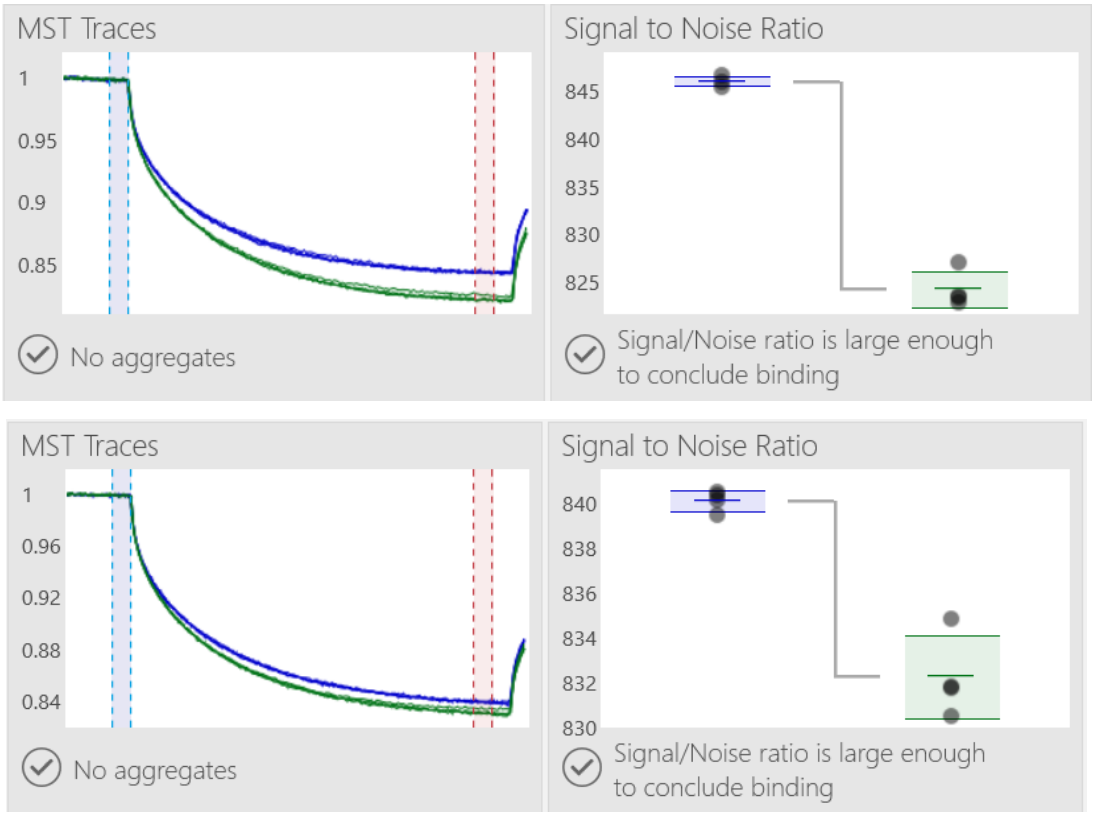


*Abbildung 35: Oben: MST-Messung von IMB0901 (**rac**-8) mit His-Kontroll-Peptid (angefärbt) und Signal/Rausch-Verhältnis, unten: MST-Messung von IMB0901 (**rac**-8) mit Red-His-NTA-Farbstoff und Signal/Rausch-Verhältnis. Die Verschiebung der Traces war im Vergleich zur Messung mit MSTN zwar niedriger, trotzdem verfälscht er in unbekanntem Ausmaß das Ergebnis, sodass dieses Assay ungeeignet ist.*

Somit ist von einer unerwünschten Interaktion zwischen Ligand und Fluorophor auszugehen, welche die Testergebnisse verfälschen konnte. Mechanistisch könnte diese Interaktion auf der

Komplexierung des Ni^{2+}-Ions des Farbstoffs durch die Aminobutanol-Seitenkette oder den Heteroaromaten beruhen (siehe Abbildung 36). Derartige Komplexe sind in der Literatur beschrieben.[217–219]

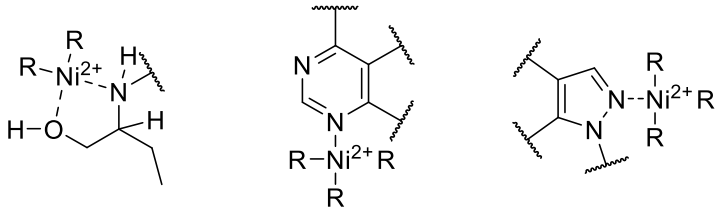


Abbildung 36: Beispiele für mögliche Ni^{2+}-Komplexe mit der Aminoalkohol-Seitenkette, dem Pyrimidin oder dem Pyrazol. Denkbar wäre auch eine Kombination oder weitere Komplexe. Die Interaktion zwischen dem Ni^{2+} und ***rac*-8** *führte zu einer Verfälschung des MST-Assays.*

Da das Ausmaß der Verschiebung der Daten im realen System unmöglich zu bestimmen war und darüber hinaus vermutlich von Derivat zu Derivat unterschiedlich ausfallen könnte, erwies sich die diese MST-Methode generell als ungeeignet zur biochemischen Charakterisierung der Interaktion zwischen MSTN und den synthetisierten Derivaten.[2]

Um trotzdem Aussagen über die biologische Aktivität der Verbindungen zu erhalten, wurde auf ein zellbasiertes biologisches Assay zurückgegriffen.

[2] Die anderen Färbeoptionen waren für dieses Projekt aus den zuvor genannten Gründen ungeeignet und ein NanoTemper Labelfree, welcher ohne Färbung funktioniert, stand nicht zur Verfügung.

3.2.3.2 HEK293-Reportergen-Assay

Dieses Assay basierte auf den Entwicklungen von Cash *et al.*.[192] [3] Zum Erhalt einer stabilen Reporterzelllinie wurden HEK293-Zellen mit dem SBE4-Luc-Plasmid und einem Neomycin-Resistenz-Plasmid zur Selektion transfiziert. Das SBE-4-Luc-Plasmid enthält ein SMAD-Bindungselement und ein Firefly Luciferase Gen, welches durch die SMAD Bindung aktiviert wird (siehe Abbildung 37 und in Kapitel 1.4.1). Dadurch wird die Expression der Luciferase getrieben, sobald der SMAD-Signalweg stimuliert wird. Beide Plasmide wurden über AddGene bezogen, wo sie freundlicherweise von Bert Vogelstein zur Verfügung gestellt wurden (SBE4-Luc; Addgene plasmid #16495, pCMV-Neo-Bam, Addgene plasmid #16440).[62,221]

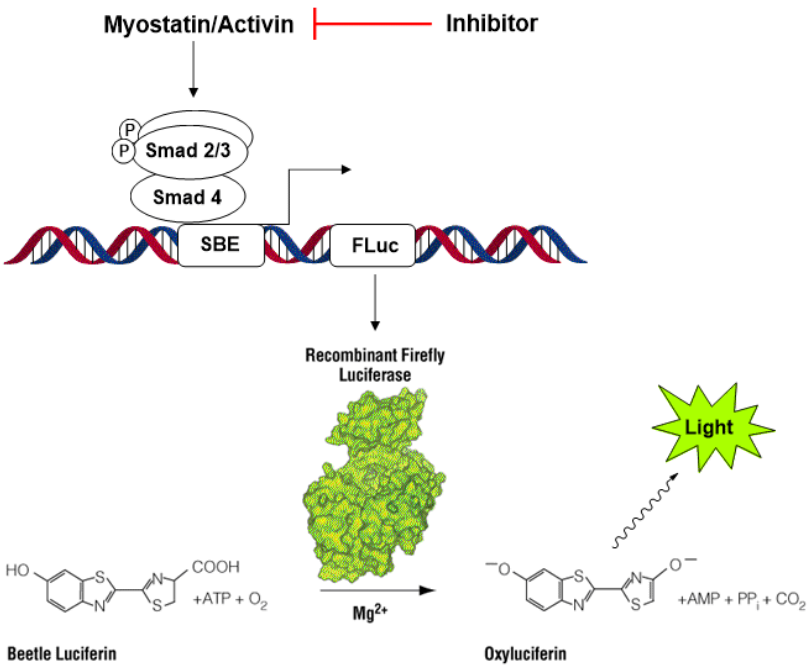


Abbildung 37:Funktionsprinzip der Reporterzelllinie: MSTN aktiviert die SMAD-Proteine, welche über das SBE die Expression der Firefly Luciferase treiben. Der Inhibitor unterdrückt die Aktivierung der Signalkaskade. Das Expressionslevel der Luciferase kann über die Luminszenz quantifiziert werden, welche durch die katalysierte Reaktion von Luciferin zu Oxyluciferin entsteht.[220] (modifiziert, übernommen von Dr. Viktoria Marquardt, unveröffentlicht)

Die HEK293-Zellen wurden nach der Transfektion unter Selektionsdruck selektiert und die Klone mit der höchsten Luciferaseaktivität (nach Stimulation mit 30 ng/ml MSTN und ACVA) wurden ausgewählt, um eine stabile Reporterzelllinie zu erhalten.

[3] Die biologischen Evaluationen mittels zellbasiertem Assay wurden in Zusammenarbeit mit und hauptsächlich von Dr. Viktoria Marquardt durchgeführt. Die stabile Reporterzelllinie wurde von Dr. Viktoria Marquardt etabliert. Ein vergleichbares Experiment wurde ebenfalls von Liu *et al.* in der Publikation zu IMB0901 verwendet.

Zur Bestimmung der Aktivität der Derivate wurden zunächst die Reportergen-Zellen nach 24 h Adaption mit 30 ng/well MSTN (oder 30 ng/well ACVA) behandelt und anschließend wurden die Verbindungen zur initialen Analyse in einer Konzentration von 10 µM hinzugegeben. Für potente Verbindungen wurde zudem ein IC_{50}-Wert bestimmt, indem die Inhibitoren in neun Konzentrationen von 0,0003 µM bis 10 µM vermessen wurden. Ausgewählte Verbindungen wurden zusätzlich auf ihre inhibitorische Aktivität gegen GDF-11 und TGF-β getestet. Neben der Aktivität des Signalwegs konnte mittels Fluoreszenzmessung (Exzitation von 560 nm, Emission von 590 nm) nach Zugabe von 20 µg/mL Resazurin ebenfalls die Viabilität der Zellen gemessen werden, um Rückschlüsse auf potentielle Zytotoxizität zu erhalten.

Die eigentliche Messung der Aktivität erfolgte nach dem Quenchen des Fluoreszenzsignals anhand der Lumineszenz. Dazu wurde das Signal normalisiert auf die Signalwegaktivierung durch den Wachstumsfaktor ohne Zugabe von Inhibitor (=100 % Lumineszenzsignal) und die Basislinie durch Zugabe von 0,1 % DMSO ohne Zugabe von Wachstumsfaktor (= 0 % Lumineszenzsignal). Anahnd dieser Daten konnte für alle Verbindungen die inhibitorische Aktivität und die Zytotoxizität bei einer Konzentration von 10 µM bestimmt werden (je niedriger das relative Signal, desto potenter die Verbindung, vgl. Abbildung 38 für eine generelle Übersicht). Als Positivkontrolle diente SB43152 (Inhibitor von ALK-4/5, siehe Kapitel 1.9.1).

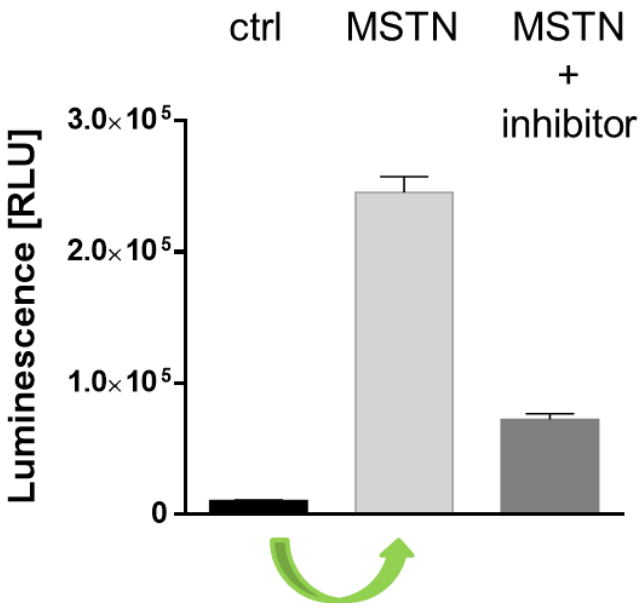


Abbildung 38: Darstellung der geplotteten Lumineszenzdaten. Unbehandelte Zellen als Kontrolle (cntrl) mit basaler Luciferaseaktivität, hohe Expression der Luciferase durch Stimulation mit MSTN, Luciferase-Expression inhibiert durch gleichzeitige Gabe von MSTN und Inhibitor (modifiziert, übernommen von Dr. Viktoria Marquardt, unveröffentlicht).

Zur primären Evaluation wurden IMB0901 (sowohl racemisch als auch das *S*- und das *R*-Enatiomer) und die Verbindungen der 1. Generation in einer Konzentration von 10 µM vermessen. Hierbei zeigte sich unmittelbar ein eudismischer Effekt von IMB0901: Das ***S***-Enantiomer war sowohl aktiver (22 % relative Lumineszenz) als auch weniger zytotoxisch als das ***R***-Enantiomer (36 %). Die Aktivität des Racemats lag entsprechend zwischen den beiden Enantiomeren. Weiterhin zeigte sich, dass neben MSTN auch die Aktivität von ACVA von **8** (33 % MSTN, 33 % ACVA) inhibiert wurde (siehe Abbildung 39), was von Liu *et al.* nicht beschrieben wurde.[193]

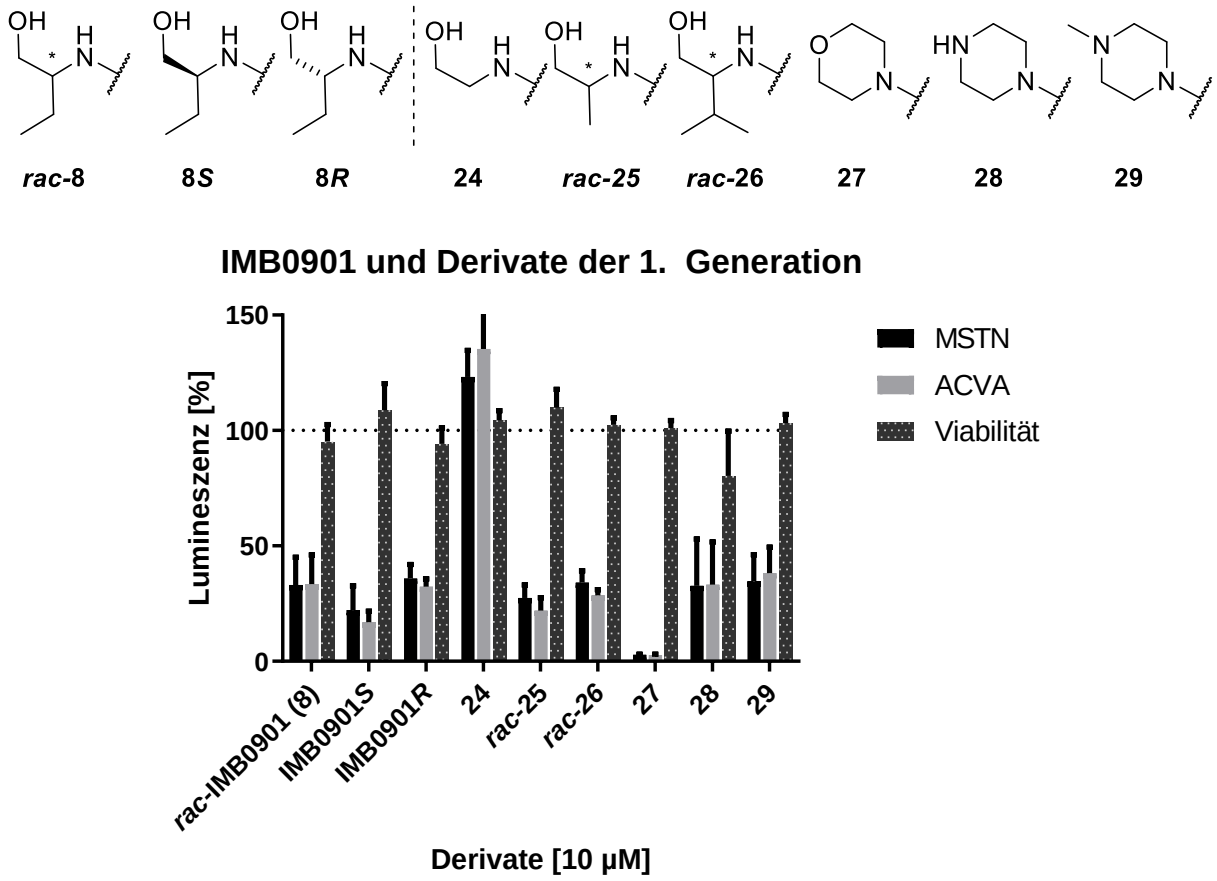


Abbildung 39: Inhibitions- und Viabilitätsdaten von IMB0901 (rac und beide Enantiomere) und den Derivaten der 1. Generation. Alle Verbindungen wurden in einer Konzentration von 10 µM vermessen. Keine der Verbindungen wies einen signifikanten Unterschied in der Aktivität zwischen MSTN und ACVA auf.

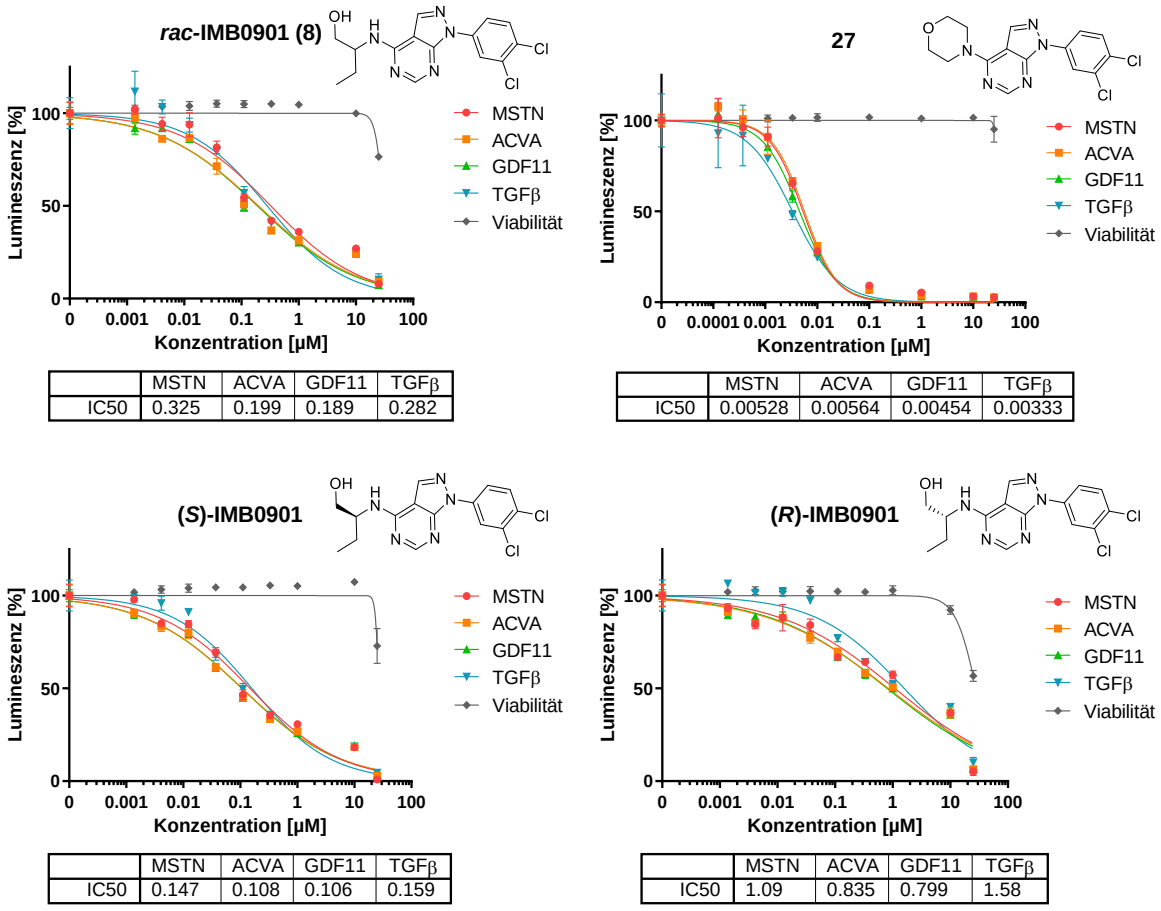
Für die Derivate mit einer Modifikation von R^2 konnte ein relativ klarer Einfluss der Seitenkette auf die Aktivität beobachtet werden. Das Derivat **24** mit der Aminoethanol-Seitenkette zeigte keine inhibitorische Aktivität, tatsächlich lag die Lumineszenz über 100 %.[4]

[4] Ob dieser Effekt tatsächlich von einer Aktivierung des Signalwegs ausgeht oder nur ein Artefakt des Assays war, müsste durch weitere Experimente aufgeklärt werden. Dies konnte jedoch nicht mehr im zeitlichen Rahmen dieses Projekts untersucht werden.

Das verzweigte Derivat ***rac*-26** wies eine leicht niedrigere Aktivität (34 %) als das Racemat von **8** auf, allerdings eine höhere als **(*R*)-8**. Das 2-Aminopropanol-Derivat ***rac*-25** (26 %) war demgegenüber potenter als ***rac*-8**, jedoch weniger aktiv als **(*S*)-8**. Zudem zeigte keine der Verbindungen eine signifikante Selektivität gegenüber ACVA, dadie Signalaktivität beider Faktoren in etwa gleichstark mit jeweils nur geringen, nicht signifikanten Unterschieden in der Potenz verringert wurde. Darüber hinaus waren beide Verbindung nicht zytotoxisch.

Die beiden Piperazin-Derivate **28** (33 %) und **29** (35 %) wiesen eine vergleichbare Aktivität wie ***rac*-8** auf, wobei **28** deutlich zytotoxischer war. Eine deutlich höhere Potenz (3 %) wies dahingegen das Morpholin-Derivat **27** auf, allerdings war erneut keine der Verbindungen selektiv für einen Wachstumsfaktor.

Von ***rac*-8**, den beiden Enantiomeren und von **27** wurde anschließend der IC_{50}-Wert für den MSTN-, den ACVA, den GDF-11 und den TGF-β-Signalweg bestimmt (siehe Abbildung 40).



	MSTN	ACVA	GDF11	TGFβ
IC50	0.325	0.199	0.189	0.282

	MSTN	ACVA	GDF11	TGFβ
IC50	0.00528	0.00564	0.00454	0.00333

	MSTN	ACVA	GDF11	TGFβ
IC50	0.147	0.108	0.106	0.159

	MSTN	ACVA	GDF11	TGFβ
IC50	1.09	0.835	0.799	1.58

*Abbildung 40: IC_{50}-Werte von IMB0901 (rac und beide Enantiomere) und Verbindung **27** für den MSTN-, den ACVA, den GDF-11 und den TGF-β-Signalweg. In der Tabelle sind die Werte in µM angegeben. Es konnte kein signifikanter Unterschied für eines der Derivate in Bezug auf einen Wachstumsfaktor beobachtet werden.*

Es zeigte sich, dass keine der Verbindungen signifikant selektiv für einen der Wachstumsfaktoren war und alle Signalwege inhibiert wurden. Jedoch wurde der eudismische Effekt anhand der IC_{50}-Werte noch einmal verdeutlicht, da die Werte für ***rac*-8** (zwischen 190 und 330 µM) im Falle aller getesteten Signalproteine zwischen **(*S*)-8** (zwischen 100 und 200 µM) und **(*R*)-8** (zwischen 800 und 1100 µM) lagen.[5] Die höhere Zytotoxizität des *R*-Enantiomers zeigte sich an der Abnahme der Viabilität bei einer Konzentration von 10 µM.

Das Morpholinderivat **27** war demgegenüber mit IC_{50}-Werten im einstelligen nM-Bereich (~3-6 nM) um einen Faktor ~20-30 deutlich potenter und wies zudem bei 30 µM nur eine sehr geringe Zytotoxizität auf. Es konnte jedoch ebenfalls keine signifikante Selektivität beobachtet werden.

[5] Ein IC_{50}-Wert wurde ebenfalls nicht von Liu *et al.* angegeben.

3.2.4 Design und Synthese von IMB0901 Derivaten der 2. Generation

Basierend auf den Ergebnissen der 1. Generation an Derivaten wurden anschließend weitere Verbindungen entworfen.

3.2.4.1 Derivate mit einer Modifikation von R^1

Mit dieser Serie sollte der Einfluss des *N*-Arylsubstituenten untersucht werden. Zunächst sollten Derivate mit vier verschiedenen Aromaten synthetisiert werden: Phenyl (**30** und **31**), 4-Methylphenyl (**32** und **33**), 4-Chlorphenyl (**34** und **35**) und 4-Methoxyphenyl (**36** und **37**). Kombiniert werden sollten die Arylreste (R^1) jeweils mit dem *rac*-2-Aminobutanol-Rest und dem potenten Morpholin-Rest an R^2, was den Vergleich von Derivaten mit unterschiedlichen sterischen und elektronischen Eigenschaften ermöglichte (siehe Abbildung 41).[6]

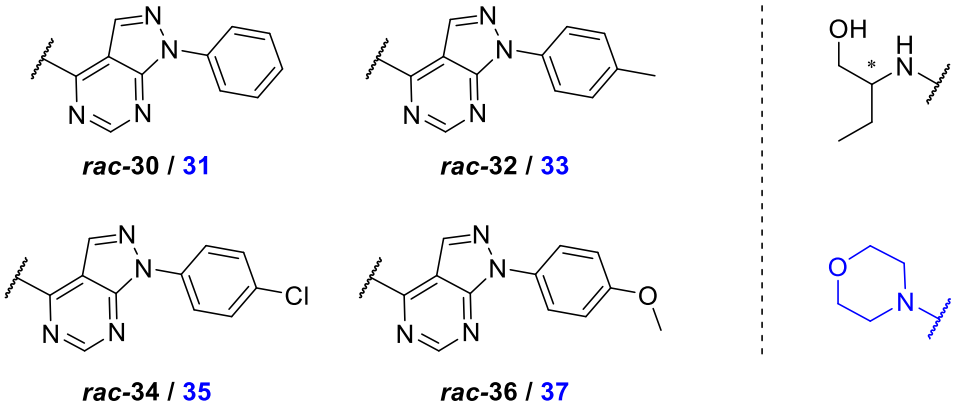


Abbildung 41: Geplante Derivate. Die Auswahl der Substituenten ermöglicht einen Einblick in den Einfluss des sterischen Anspruchs und der elektronischen Eigenschaften des Aromaten. Die Derivate sollten entweder rac-2-Aminobutanol (schwarz markiert) oder Morpholin (blau markiert) enthalten.

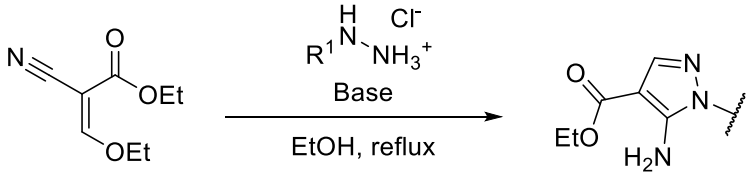
Der Phenylring diente als „neutrale“ Basis, durch den +I-Effekt und den höheren sterischen Anspruch diente der 4-Methylphenylring als elektronenreicherer Substituent. Der 4-Chloraromat ist demgenüber elektronenärmer und weist einen leicht höheren sterischen Anspruch als der 4-Methylaromat auf. Der 4-Methoxyaromat ist deutlich elektronenreicher und

[6] Verbindung **31** war bereits Literaturbekannt und wurde erfolglos auf Antitumor- und antibakterielle Eigenschaften getestet.[207].

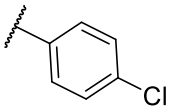
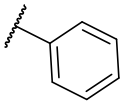
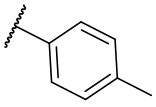
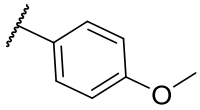
hat ebenfalls einen höheren sterischen Anspruch, wodurch insgesamt ein großer Bereich verschiedener Eigenschaften abgedeckt wird.

Die Synthese dieser Derivate sollte der etablierten Route folgend vom Enolether **18** ausgehen. In einer ersten Reaktion sollte das *N*-4-Chlorphenyl-Pyrazol **38** entsprechend Kim *et al.* [222] und der in diesem Projekt etablierten Synthese hergestellt werden. Die Reaktion zwischen **18** und dem HCl-Salz des 4-Chlorphenylhydrazins mit K_2CO_3 als Hilfsbase zeigte jedoch nach 3 h keinen vollständigen Umsatz, wie es beim 3,4-Dichlorphenyl-Derivat (**19**) der Fall war. Erst nach insgesamt 35 h Refluxieren konnte vollständiger Umsatz des Startmaterials beobachtet und **38** durch Ausfällen und Filtration mit anschließendem Waschen des Filterkuchens in ausreichend hoher Reinheit mit einer Ausbeute von 84 % (Lit. 92 %)[222] erhalten werden (siehe Tabelle 6).

*Tabelle 6: Durchgeführte Zyklisierungsreaktionen von Enolether **18** mit verschiedenen Phenylhydrazin Hydrochloriden.*



18 **38 - 41**

Verbindung	R^1	Base	Zeit [h]	Ausbeute [a]
38		K_2CO_3	35	84 % (Lit. 92 %) [222]
39		NEt_3	2	86 % (Lit. 90 %) [223]
40		NEt_3	2	77 % (Lit. 85 %) [223]
41		NEt_3	2	78 % (Lit. 78 %) [223]

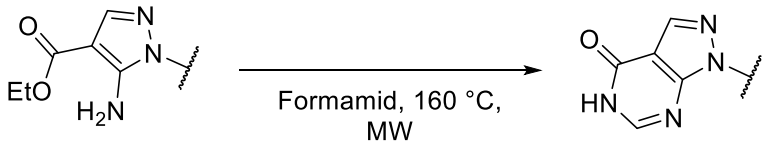
Reaktionsbedingungen: 1 Äq. **18**, 1.05 – 1.5 Äq. Hydrazin Hydrochlorid, 1 – 1,5 Äq. Base, [a] Ausbeute nach Präzipitation und Filtration des Produkts. Nach dem Waschen wiesen die isolierten Produkte eine ausreichend hohe Reinheit auf.

Der Grund dafür könnte in einer verminderten Freisetzung des freien Hydrazins aus dem Hydrochlorid durch die heterogene Hilfsbase liegen. Um die Reaktionszeit zu verringern,

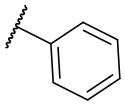
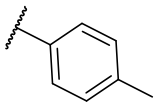
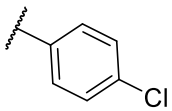
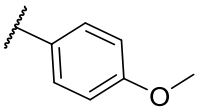
wurde zur Synthese der anderen Derivate den Bedingungen von Heo *et al.* [223] folgend NEt_3 als Base eingesetzt, was die Reaktionszeit tatsächlich auf 2 h verkürzte. Die Verbindungen wurden anschließend mit guten Ausbeuten von 86 % (**39**, Lit. 90 %)[223], 77 % (**40**, Lit. 85 %)[223] und 78 % (**41**, Lit. 78 %)[223] isoliert.

Über die Mikrowellen-gestützte Methode in Formamid konnten die synthetisierten Pyrazole anschließend direkt in der zweiten Zyklisierungreaktion zu den entsprechenden [3,4]-Pyrazolopyrimidinonen umgesetzt werden. Nach 12 h bei 160 °C konnten drei Produkte durch Ausfällen und Filtration in sehr guten Ausbeuten von 86 % (**42**), 94 % (**43**) und 87 % (**45**, Lit. 85 %)[224] erhalten werden.[7]

Tabelle 7:Zyklisierung zum [3,4]-Pyrazolopyrimidingrundgerüst.



38 - 41 **42 - 45**

Verbindung	R^1	Zeit [h]	Ausbeute [a]
42		12	86 %
43		12	94 %
44		12	>100 % [b]
45		12	87 % (Lit. 85 %) [224]

Reaktionsbedingungen: 1 Äq. Pyrazol, 2 Äq. Formamid (0,17 – 0,19 M), [a] Ausbeute nach Präzipitation und Filtration des Produkts. Nach dem Waschen wiesen die isolierten Produkte eine ausreichend hohe Reinheit auf. [b] Ausbeute betrug 101 %, wobei in den LC/MS-Spektren und NMR-Spektren keine Verunreinigung identifiziert werden konnte.

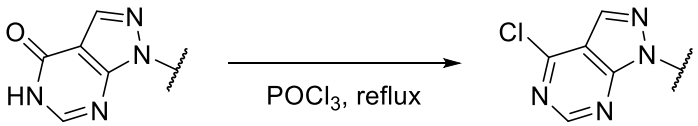
Im Fall von **44** wurde allerdings nach mehrmaligen Waschen mit Wasser und kaltem MeOH eine Ausbeute von über 100 % erhalten, wobei anhand der NMR- und LC/MS-Spektren keine

[7] Für **42**, **43** und **44** ist keine Literaturausbeute angegeben, da sie über andere Routen synthetisiert wurden.

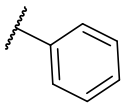
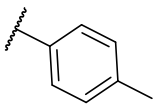
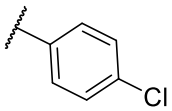
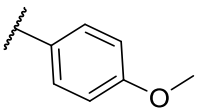
Verunreinigung identifiziert werden konnte (vor allem kein verbliebenes Formamid). Das Intermediat wurde deshalb trotzdem in der nächsten Reaktion eingesetzt (siehe Tabelle 7).

Der folgende Schritt bestand aus O-Cl-Austausch mittels der etablierten Methode mit $POCl_3$. Das Chlorpyrimidin **48** wurde dabei in einer Ausbeute von 57 % (Lit. 97 %)[199] erhalten, was deutlich unter den Ausbeuten der anderen Derivate lag (zwischen 89 % und 91 %, siehe Tabelle 8) und mit den nicht identifizierbaren Verunreinigungen aus der vorherigen Reaktion zusammenhängen könnte. Geringe Rückstände der jeweiligen [3,4]-Pyrazolopyrimidinone wurden erneut beobachtet, welche durch Filtration aus einer MTBE-Lösung der Produkte entfernt werden konnten. Wie bereits beschrieben, schienen diese kleinen Mengen aus der Hydrolyse des Chlorpyrimidins in basischer Lösung zu stammen.

Tabelle 8: O-Cl-Austauschreaktion zum Erhalt der 4-Chlor-[3,4]-Pyrazolopyrimidine.



42 - 45 **46 - 49**

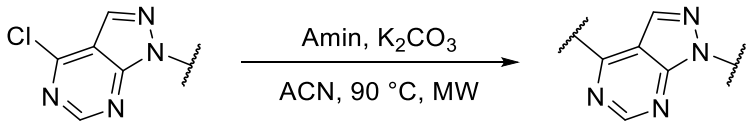
Verbindung	R^1	Zeit [h]	Ausbeute [a]
46		3	90 % (Lit. 94 %) [199]
47		3	89 % (Lit. 78 %) [199]
48		3	57 % [b] (Lit. 97 %) [199]
49		3	91 % (Lit. 93 %) [224]

Reaktionsbedingungen: 1 Äq. Pyrazolopyrimidinon, $POCl_3$ (0,1 – 0,2 M), [a] Ausbeute nach Präzipitation und Filtration des Produkts. Nach dem Waschen wiesen die isolierten Produkte eine ausreichend hohe Reinheit auf. [b] Die niedrige Ausbeute könnte mit Rückständen aus den vorangegangenen Reaktionen zusammenhängen.

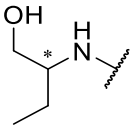
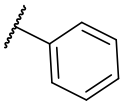
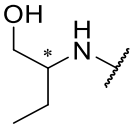
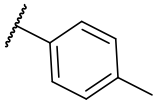
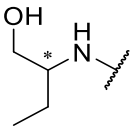
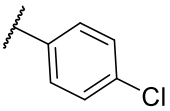
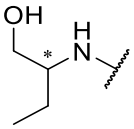
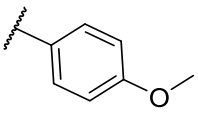
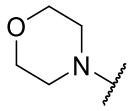
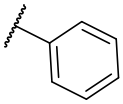
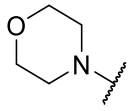
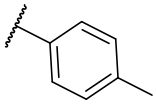
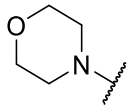
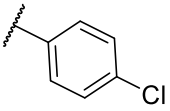
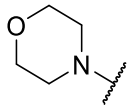
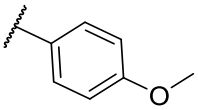
Anschließend wurden die Chlorpyrimidine über die etablierte Methode zu den geplanten Aminobutanol- und Morpholin-Derivaten umgesetzt. Die vier *rac*-2-Aminobutanol-Derivate (**30**, **32**, **34** und **36**) wurden nach der chromatographischen Reinigung in mäßigen bis guten

Ausbeuten (15 % bis 66 %) erhalten (siehe Tabelle 9). Die vier Morpholin-Derivate (**31**, **33**, **35** und **37**) kristallisierten dahingegen nach Zugabe von ges. NH_4Cl-Lösung und dem Entfernen von ACN aus. Die Verbindungen konnten anschließend durch Filtration in einer sehr hohen Reinheit mit hohen Ausbeuten (77 % bis ~99 %) isoliert werden, sodass auf eine weitere Reinigung verzichtet werden konnte (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: S_NAr-Reaktion der 4-Chlor-[3,4]-Pyrazolopyrimidine.



46 - 49 **rac-30 - 37**

Verbindung	R^2	R^1	Zeit [h]	Ausbeute
***rac*-30**			1	15 % [a]
***rac*-32**			1	65 % [a]
***rac*-34**			1	48 % [a]
***rac*-36**			1	66 % [a]
31			1	93 % (Lit. 51 %) [207]
33			1	86 % [b]
35			1	77 % [b]
37			1	~99 % [b]

Reaktionsbedingungen: 1 Äq. Chlorpyrazolopyrimidin, 2 Äq. Amin, 1,5 – 2 Äq. K_2CO_3, [a] Reinigung erfolgte mittels Flash-Chromatographie, [b] Die Verbindungen konnten in sehr hoher Reinheit durch Präzipitation und Filtration isoliert werden.

3.2.4.2 Derivate mit einer Modifikation von R^2

Neben der Serie zur Exploration des Arylsubstituenten sollte eine Reihe von Verbindungen mit weiteren Modifikationen von R^2 synthetisiert werden. Um leichter Rückschlüsse auf mögliche SAR zuzulassen, sollten alle Derivate den 3,4-Dichlorphenylrest von IMB0901 (**8**) enthalten. Anhand dieser Kriterin wurden zwei Serien geplant: „offenkettige“ Verbindungen, die den Einfluss der H-Donor- und H-Akzeptor-Gruppen von IMB0901 beleuchten sollten, und „zyklische“ Verbindungen, die sich an dem sehr potenten Morpholin-Substituenten orientierten.

„Offenkettige“ Derivate:

Um den Einfluss der Hydroxy-Gruppe zu untersuchen, sollten das *rac*-*O*-Methyl-Derivat **50** von ***rac*-8**, das 2-Aminopropan-Derivat **51**, das 3-Aminopentan-Derivat **52**, das Aminoethan-Derivat **53** und das 1-Methoxy-2-Aminoethan-Derivat **54** synthetisiert werden. Durch diese Serie wurde neben dem sterischen auch der Einfluss der H-Donor-Funktion und mit den aliphatischen Derivaten sowohl der H-Donor- als auch der H-Akzeptor-Funktion untersucht (siehe Abbildung 42).

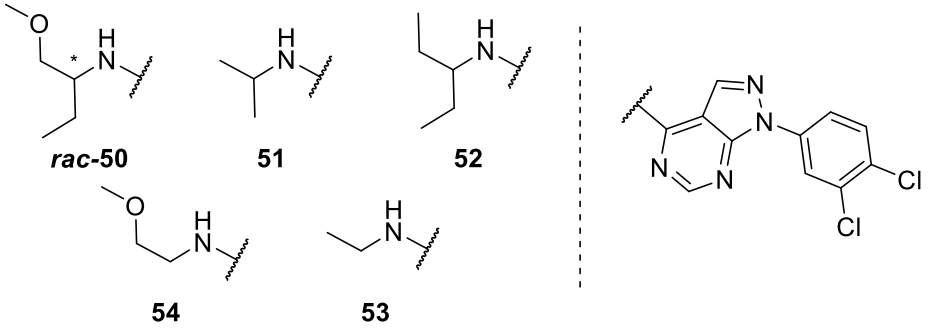
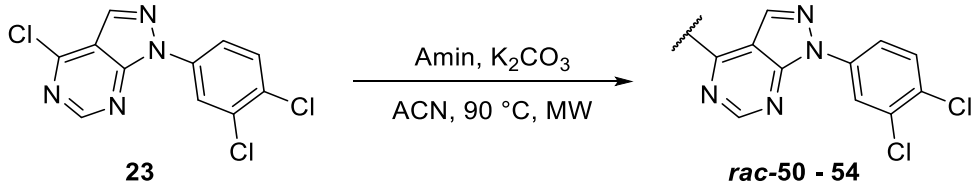


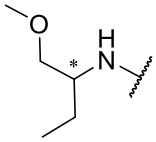
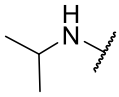
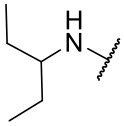
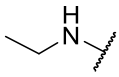
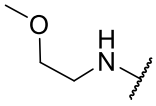
*Abbildung 42: Geplante Derivate von **8** mit 3,4-Dichloraromat und offenkettigem Substituenten*

Die etablierte Methode der SN_{Ar}-Reaktion lieferte ohne Probleme alle Produkte, die jeweils durch Fällung und Filtration isoliert und anschließend chromatographisch gereinigt wurden. Die Ausbeuten der Reaktionen lagen dabei zwischen 19 % und 41 % (siehe Tabelle 10).

*Tabelle 10: S_NAr-Reaktion von 4-Chlor-[3,4]-Pyrazolopyrimidin (**23**).*



23 **rac-50 - 54**

Verbindung	R^2	Zeit [h]	Ausbeute [a]
***rac*-50**		1	19 %
51		1	41 % [b]
52		1	33 %
53		1	22 %
54		1	22 %

Reaktionsbedingungen: 1 Äq. Chlorpyrazolopyrimidin, 2 Äq. Amin, 1,5 – 2 Äq. K_2CO_3, [a] Reinigung erfolgte mittels präparativer HPLC. [b] Reinigung erfolgte mittels Flash-Chromatographie.

„Zyklische“ Derivate:

Die „zyklischen“ Derivate sollten der Untersuchung des sterischen Einflusses der Substituenten als auch der Position des Heteroatoms auf die Aktivität dienen. Da das Piperazin-Derivat **28** eine vergleichsweise hohe Zytotoxizität aufwies, sollten keine zusätzlichen basischen Amine in dem Ringsystem vorhanden sein.

Die Wahl der Substituenten fiel auf die *N*-Heterozyklen Pyrrolidin (**55**) und Piperidin (**56**) als unpolarere Version des Morpholins in verschiedenen Größen. Daneben sollten das Cyclohexylamino-Derivat **57** und das aromatische Pendant **58** mit einem Anilin-Rest synthetisiert werden. Diese Verbindungen wiesen durch den Amin-Linker eine höhere rotatorische Flexibilität auf, vergleichbar mit den offenkettigen Derivaten. Als letzte Verbindungen für diese Serie wurden das ***rac***-3-Hydroxy-Piperidin-Derivat **59**, welches die freie OH-Gruppe von **8** neben dem Ringsystem enthielt, und das *cis*-2,6-Dimethyl-Morpholino-Derivat **60** geplant, um den sterischen Anspruch des Substituenten zu erhöhen (siehe Abbildung 43).

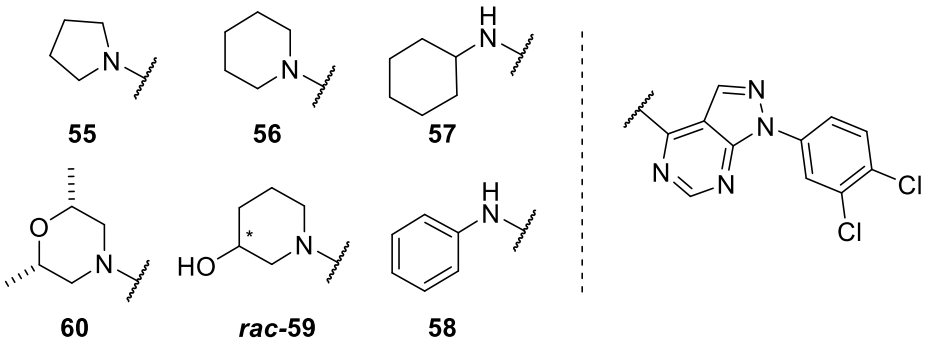
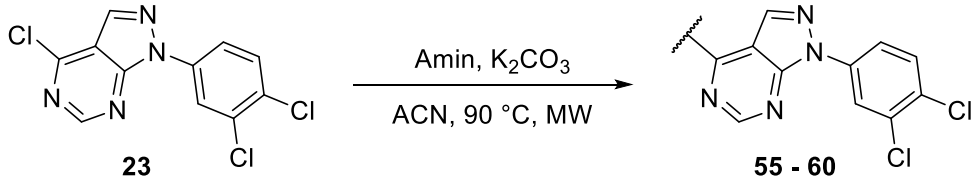


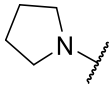
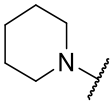
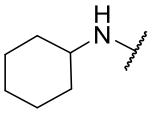
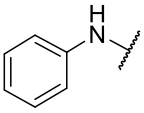
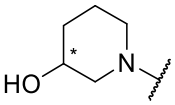
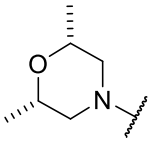
*Abbildung 43: Geplante Derivate von **8** mit 3,4-Dichloraromat und zyklischen Substituenten*

Zur Synthese konnte ebenfalls direkt auf **23** als Edukt zurückgegriffen werden, sodass alle Derivate direkt zugänglich waren. 3-Hydroxy-Piperidin wurde racemisch und ohne Schutzgruppe am Sauerstoff eingesetzt. Alle Verbindungen wurden anhand der etablierten Prozedur gefällt, filtriert und gereinigt und in mäßigen Ausbeuten zwischen 11 und 36 % isoliert (siehe Tabelle 11).

*Tabelle 11: S_NAr-Reaktion von 4-Chlor-[3,4]-Pyrazolopyrimidin (**23**).*



23 **55 - 60**

Verbindung	R^2	Zeit [h]	Ausbeute [a]
55		1	23 %
56		1	11 %
57		1	36 %
58		1	15 %
***rac*-59**		1	21 %
60		1	21 %

Reaktionsbedingungen: 1 Äq. Chlorpyrazolopyrimidin, 2 Äq. Amin, 1,5 – 2 Äq. K_2CO_3, [a] Reinigung erfolgte mittels präparativer HPLC

In allen obengenannten Reaktionen (sowohl der offenkettigen als auch der zyklischen Derivate) konnte in geringem Ausmaß die Bildung des Pyrimidinons **22** beobachtet werden. Die Abtrennung dieses Nebenprodukts erwies sich allerdings als anspruchsvoller im Vergleich zu den vorherigen Verbindungen (siehe Kapitel 3.2.4.1). Die teilweise sehr niedrigen Ausbeuten hingen mit einer genauen Prüfung und Auswahl der einzelnen Fraktionen zusammen, wobei der Reinheit Vorrang gewährt und Produktverluste in Kauf genommen wurden. Zusätzlich war zu beachten, dass die Reaktionen in einem kleinen Maßstab (0,13 mmol) durchgeführt wurden, sodass der Verlust von einigen Milligramm während der Filtration des Präzipitats oder während der Chromatographie prozentual zu einem hohen Verlust an Ausbeute führten.

Insgesamt konnten jedoch alle designten Verbindungen erfolgreich in ausreichender Menge und sehr hoher Reinheit synthetisiert werden.

3.2.4.3 Reportergen-Assay der Derivate der 2. Generation

Die Verbindungen wurden analog zu den IMB0901-Derivaten der 1. Generation in dem zellbasierten Assay getestet (siehe Kapitel 3.2.3.2 für Details). Erneut zeigte keines der Derivate der 2.Generation eine signifikante Selektivität für MSTN oder ACVA. Der Einfluss des Aromaten wurde allerdings durch diese Serie deutlich erkennbar, wobei die Morpholin-Derivate insgesamt deutlich potenter waren als ihre Pendants und die jeweiligen unsubstituierten Derivate die niedrigste Aktivität aufwiesen (siehe Abbildung 44).

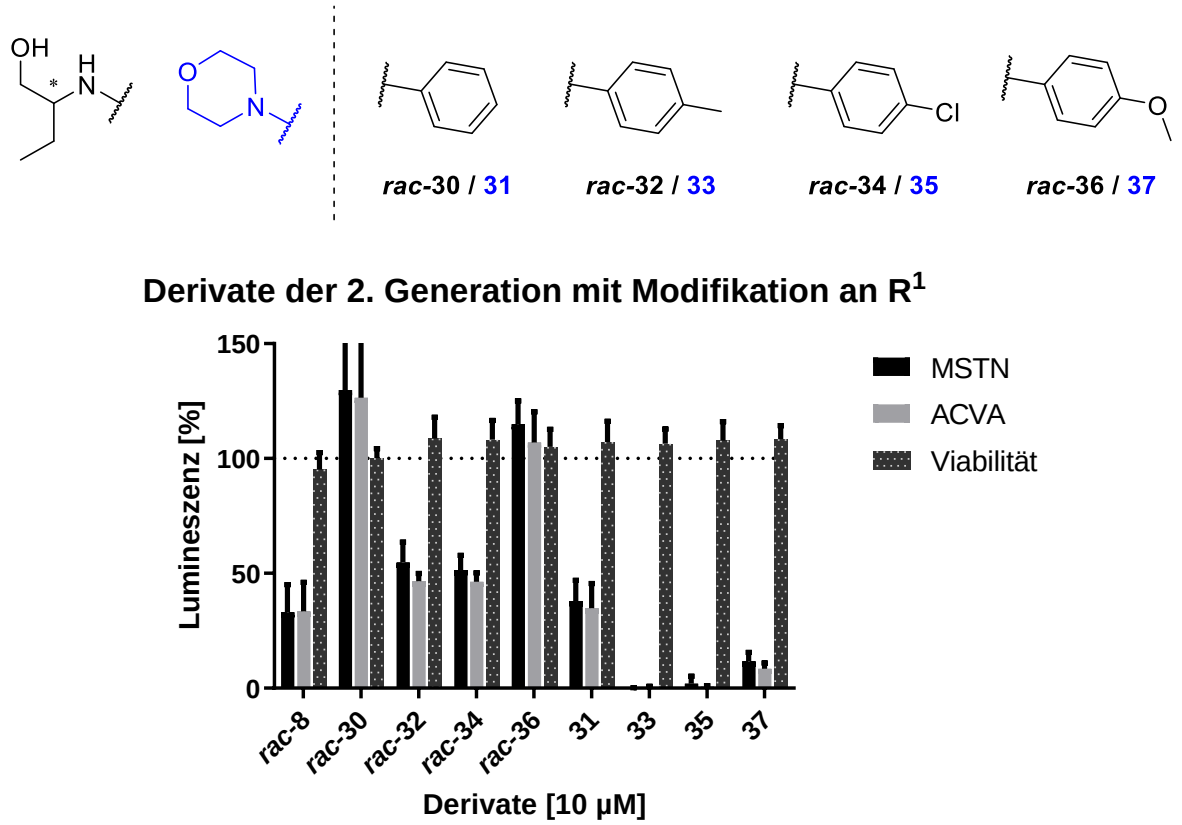


Abbildung 44: Inhibitions- und Viabilitätsdaten von IMB0901 und den Derivaten der 2. Generation mit einer Modifikation an R^1 (die erste Verbindung weist jeweils den rac-2-Aminobutanolrest auf, die zweite den Morpholinrest, blau markiert). Alle Verbindungen wurden in einer Konzentration von 10 µM vermessen. Keine der Verbindungen wies einen signifikanten Unterschied in der Aktivität zwischen MSTN und ACVA auf.

Das Morpholin-Derivat **31** (38 %) war nur noch so aktiv wie **(*R*)-8** (36 %). Der 4-Methoxyphenylaromat führte ebenfalls zu einer verminderten Aktivität der Derivate, wobei das Morpholin-Derivat **37** (12 %) aktiver war als **(*S*)-8** (22 %). Die beiden Morpholin-Derivate **33** und **35** (0 % und 2 %) wiesen eine ähnlich hohe Aktivität auf wie das 3,4-Dichlorphenyl-Derivat **27** (3 %).

Die *rac*-Aminobutanol-Derivate waren dahingegen alle weniger potent als die Referenzsubstanz IMB0901 ***rac*-8**. Verbindung **32** und **34** verminderten die Lumineszenz auf 55 % und 51 %, wohingegen das Phenyl- und das 4-Methoxyphenyl-Derivat (***rac*-30** und ***rac*-36**) keine Aktivität zeigten. Im Fall von ***rac*-30** lag die Lumineszenz erneut deutlich über 100 %.[8] Aus diesen Daten wurde ersichtlich, dass der 3,4-Dichloraromat die höchste Aktivität erreichte, gefolgt vom 4-Chlor- und 4-Methoxyphenylaromaten. Der 4-Methoxyphenylaromat und vor allem der Phenylring führten zu einer starken Reduktion der Potenz, die nur zum Teil durch einen Morpholin-Substituenten wiederhergestellt werden konnte. Weiterhin deutete die vergleichbare Aktivität der Methylgruppe und des Chloratoms daraufhin, dass der sterische Anspruch den Ausschlag für eine hohe Potenz gab.

Bei den Derivaten mit einer Modifikation von R^2 konnte ebenfalls ein eindeutiger Trend beobachtet werden (siehe Abbildung 45).

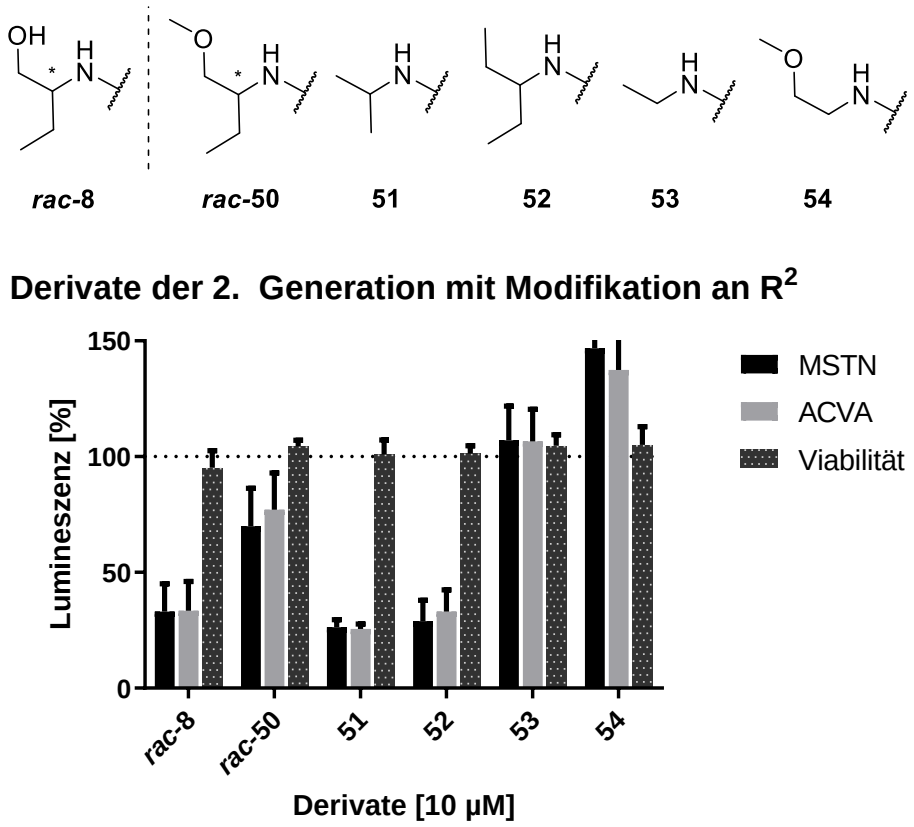


Abbildung 45: Inhibitions- und Viabilitätsdaten von IMB0901 und den Derivaten der 2.Generation mit einer Modifikation an R^2 mit offenkettigen Substituenten. Alle Verbindungen wurden in einer Konzentration von 10 µM vermessen. Keine der Verbindungen wies einen signifikanten Unterschied in der Aktivität zwischen MSTN und ACVA auf.

[8] Ob dieser Effekt tatsächlich von einer Aktivierung des Signalwegs ausgeht, oder nur ein Artefakt des Assays war, müsste durch weitere Experimente aufgeklärt werden. Dies konnte jedoch nicht mehr im zeitlichen Rahmen dieses Projekts untersucht werden.

Die Verbindungen **53** und **54** wiesen keine Aktivität auf, wobei bei **54** die Lumineszenz erneut über 100 % lag. Das Methoxy-Derivat **50** inhibierte nur in geringem Ausmaß die Bildung der Luciferase (70 %). Demgegenüber waren die Derivate ohne Sauerstoff in der Seitenkette **51** und **52** (26 % und 29 %) leicht aktiver als ***rac*-8** (33 %).

Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die reduzierte Aktivität von **50** nicht auf die fehlende H-Donor-Funktion, sondern auf die verlängerte Seitenkette zurückzuführen war. Außerdem war der Vergleich zwischen dem Ethylamino-Derivat **53** und dem *i*-Propylamino-Derivat **51** aufschlussreich. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Verzweigung neben dem Stickstoff für die Aktivität entscheidend ist und die Polarität der Seitenkette scheint demgegenüber von untergeordneter Rolle zu sein scheint.

Eine klare Tendenz zeigten zudem auch die Derivate mit zyklischem Substituenten (siehe Abbildung 46).

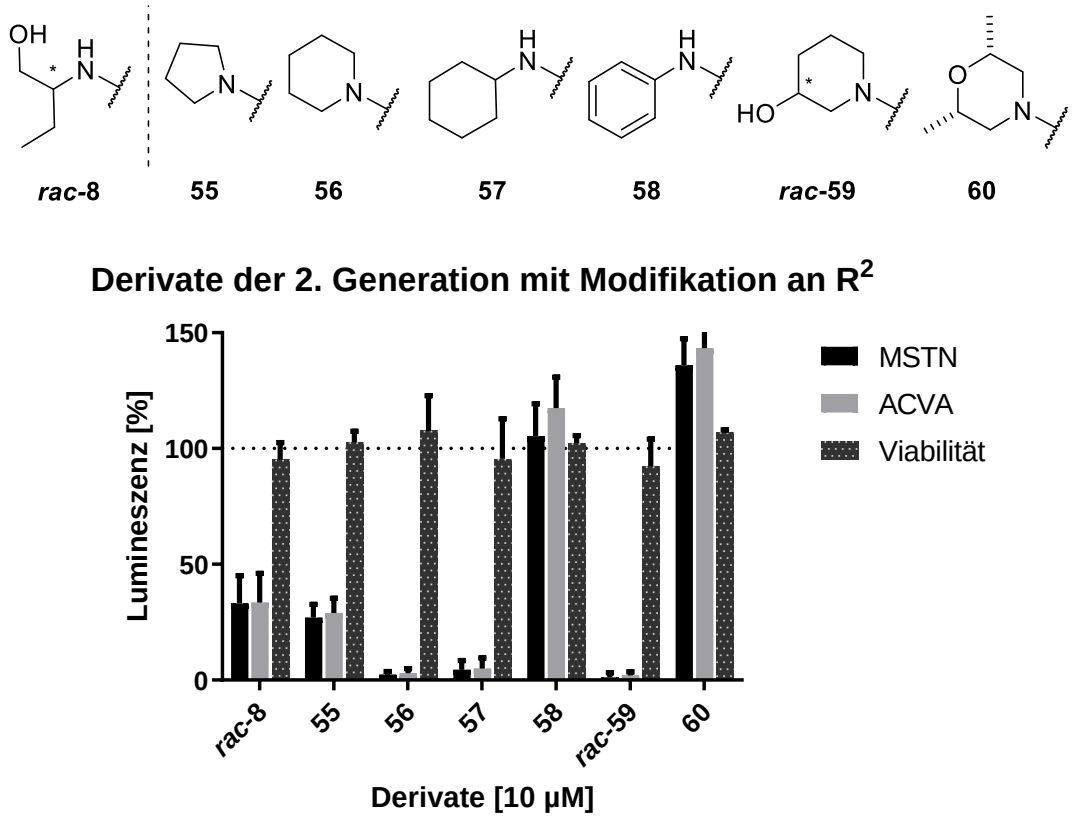


Abbildung 46: Inhibitions- und Viabilitätsdaten von IMB0901 und den Derivaten der 2.Generation mit einer Modifikation an R^2 mit zyklischen Substituenten. Alle Verbindungen wurden in einer Konzentration von 10 µM vermessen. Keine der Verbindungen wies einen signifikanten Unterschied in der Aktivität zwischen MSTN und ACVA auf.

Die Derivate mit einem sechsgliedrigen gesättigten Ring (Verbindung **56**, **57** und **59**) waren sehr potent (2 %, 4 % und 1 %) und in ihrer Aktivität vergleichbar mit den Morpholin-Derivaten **27**, **33**, **35**, wohingegen das Pyrrolidin-Derivat **55** nur eine mit ***rac*-8** vergleichbare Aktivität (27 %) aufwies. Darüber hinaus bildete das Dimethylmorpholino-Derivat **60** eine Ausnahme, da es ein Lumineszenzsignal von über 100 % induzierte. Ob dies mit dem größeren sterischen Anspruch oder einer durch die Methylgruppen erhöhten energetischen Rotationsbarriere zusammenhing, ließ sich nicht abschätzen.

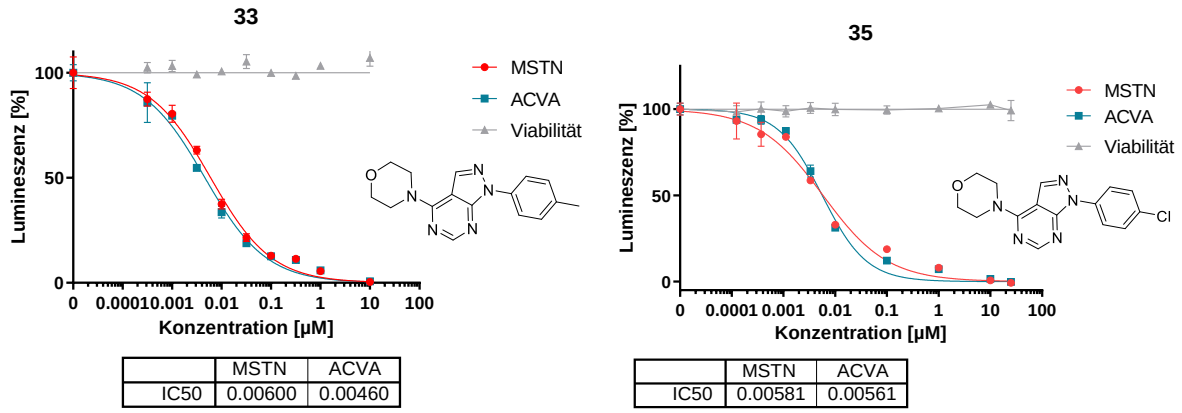
Die teilweise extremen Effekte von einzelnen Methylgruppen auf die Veränderung der Aktivität sind jedoch bekannt und konnten in einem gewissen Ausmaß auch in der unterschiedlichen Aktivität zwischen **51** und **53** beobachtet werden (von Schönherr *et al.* [225] diskutiert für die extreme Erhöhung der Potenz durch hinzufügen einer einzelnen Methylgruppe, auch bekannt als „Magic Methyl“).

Das Anilin-Derivat **58** wies ebenfalls keine Aktivität in diesem biologischen Assay auf. Diese Verbindung besaß vermutlich durch das konjugierte System eine planare Struktur, wodurch das Molekül trotz der theoretisch rotierbaren Bindungen am Anilin-Stickstoff sehr rigide sein könnte. Deshalb wäre eine Anpassung der Konformation an die Bindungstasche deutlich erschwert.

Für die hochpotenten Verbindungen **33**, **35**, **56** und **57** wurde anschließend entsprechend der etablierten Methode ein IC_{50}-Wert für die Inhibition von MSTN und ACVA bestimmt allerdings zeigte erneut keine Verbindung signifikante Unterschiede in der Aktivität zwischen den verschiedenen Wachstumsfaktoren(siehe Abbildung 47).[9]

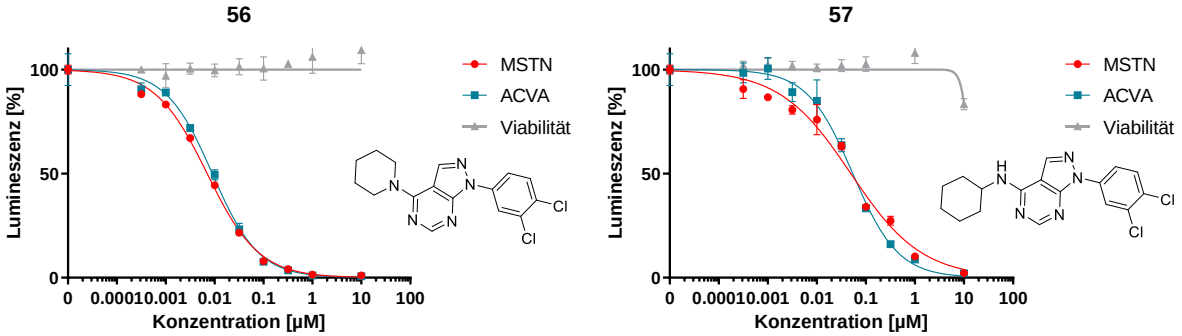
Die Derivate **33**, **35** und **56** wiesen sehr niedrige IC_{50}-Werte für MSTN und ACVA auf (alle Werte unter 10 nM), Verbindung **57** wies dahingegen einen um den Faktor ~10 höheren Wert sowohl für MSTN als auch für ACVA auf (~50 nM). Somit schien ein direkt an den Kern gebundener Sechsring an Position R^2 die höchere Aktivität zu induzieren. Zudem reduzierte Derivat **57** die Viabilität im Gegensatz zu den anderen Verbindungen bei einer Konzentration von 10 µM deutlich.

[9] Die IC_{50}-Werte der potenten Verbindung ***rac*-59** konnten nicht mehr vor dem Ausscheiden von Dr. Viktoria Marquardt aus diesem Projekt erhoben werden.



	MSTN	ACVA
IC50	0.00600	0.00460

	MSTN	ACVA
IC50	0.00581	0.00561



	MSTN	ACVA
IC50	0.00702	0.00895

	MSTN	ACVA
IC50	0.0492	0.0539

*Abbildung 47: IC_{50}-Werte von Verbindung **33**, **35**, **56** und **57** für den MSTN-, den ACVA -Signalweg. In der Tabelle sind die Werte in µM angegeben. Es konnte kein signifikanter Unterschied für eines der Derivate in Bezug auf einen Wachstumsfaktor beobachtet werden.*

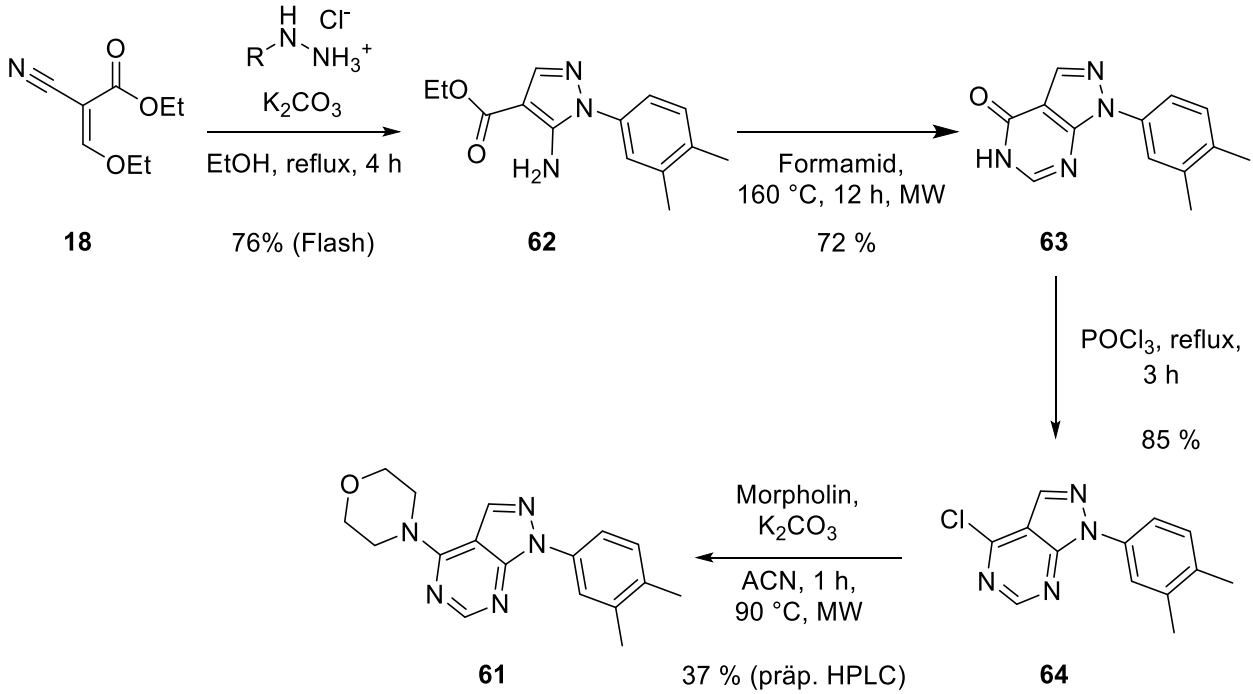
Insgesamt konnte durch diese Serie der Einblick in die SAR deutlich vertieft werden. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde nun eine weitere Serie geplant, anhand der zusätzliche Details erforscht werden sollten.

3.2.5 Design und Synthese von IMB0901 Derivaten der 3. Generation

Die 3. Generation sollte sich aufgrund der hohen Aktivität auf Morpholin-Derivate mit einer Modifikation des *N*-Arylrests, des R^3-Rests und der Kernstruktur fokussieren.

Da das 4-Methylphenyl-Derivat **33** und das 4-Chlorphenyl-Derivat **35** eine vergleichbare Aktivität aufwiesen, sollte das 3,4-Dimethylphenyl-Derivat **61** als Vergleich zum 3,4-Dichlorphenyl-Derivat **27** synthetisiert werden.

Diese Verbindung wurde über die bisherige Syntheseroute ausgehend von Enolether **18** unter Verwendung eines Phenylhydrazins hergestellt. Die Zyklisierung zum Pyrazol **62** erfolgte mit einer guten Ausbeute von 76 %. Das Intermediat musste allerdings chromatographisch isoliert werden, da das Ausfällen und Abfiltrieren aufgrund der relativ hohen Wasserlöslichkeit nicht erfolgreich war. Pyrazol **62** wurde mit Formamid zum Pyrimidinon **63** umgesetzt, welches anschließend mit $POCl_3$ zum Chlorpyrimidin-Intermediat **64** umgewandelt wurde. Die finale S_NAr-Reaktion mit Morpholin lieferte anschließend das erste Derivat der 3.Generation (**61**, siehe Schema 11).



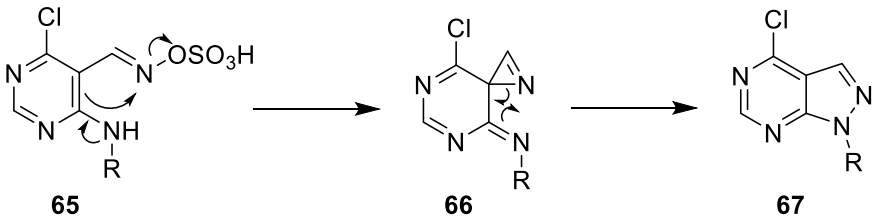
*Schema 11: Übersicht über die Synthese von **61**. Das Pyrazol-Intermediat **62** musste in dieser Sequenz erstmals chromatographisch gereinigt werden, da die Fällung aufgrund einer relativ hohen Wasserlöslichkeit fehlschlug. Der gleiche Grund führte bei der Isolierung von **63** ebenfalls zu einem Verlust an Ausbeute.*

3.2.5.1 Weitere Methoden zur Synthese neuer IMB0901-Derivate

Um weitere Derivate mit variierenden *N*-Arylsubstituenten herzustellen, sollten andere Methoden zur Synthese von [3,4]-Pyrazolopyrimidinen getestet werden. Dies hatte mehrere Gründe: Zum einen sind Phenylhydrazin-Derivate im Gegensatz zu z.B. Anilinderivaten oder Arylhalogeniden in geringerem Umfang kommerziell erhältlich, weiterhin gehen von ihnen hohe gesundheitliche Gefahren in Bezug auf Toxizität und Karzinogenität aus.

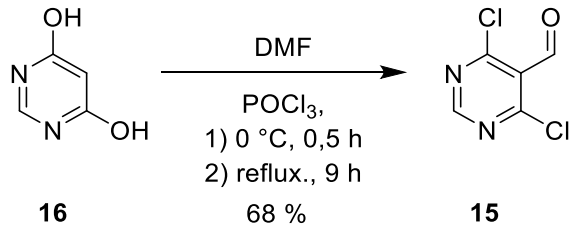
In der Literatur sind zur Vermeidung des Einsatzes von Phenylhydrazinen alternative Methode beschrieben: Anstatt den Dichlorpyrimidincarbaldehyd **15** mit einem Phenylhydrazin zu zyklisieren, sollte der Aldehyd mit einem Anilin und Hydroxylamin-*O*-sulfonsäure (HOSA) zum [3,4]-Pyrazolopyrimidin **23** zyklisiert werden.[226]

Der Mechanismus der Reaktion ist nicht vollständig aufgeklärt, die Autoren Taber *et al.* diskutieren jedoch mehrere Mechanismen, wie das nachgewiesene Oximintermediat **65** zum Pyrazol umlagern könnte. Am plausibelsten halten sie die Bildung eines instabilen Azirins **66** und darauf folgend die Bildung der neuen N-N-Bindung, was an den Mechanismus der Neber-Indolsynthese angelehnt ist (siehe Schema 12).[227]



*Schema 12: Plausibler Reaktionsmechanismus der N-N-Zyklisierung. Das Oximintermediat **65** bildet sich durch S_NAr-Reaktion und Kondensation. Durch nukleophilen Angriff des Aromaten am Oxim-Stickstoff bildet sich das Azirinintermediat **66**, welches wiederum zum [3,4]-Pyrazolopyrimidin **67** umlagert.[226]*

Um diese Zyklisierungsreaktion zu testen, wurde zunächst der Dichlorpyridincarbaldehyd **15** ausgehend von kommerziell erhältlichem Di-Hydroxypyrimidin **16** der Literatur folgend über eine One-Pot-Reaktion (Vilsmeier-Haack-Formylierung/O-Cl-Austausch mit DMF in $POCl_3$) hergestellt (siehe Schema 13).[228]

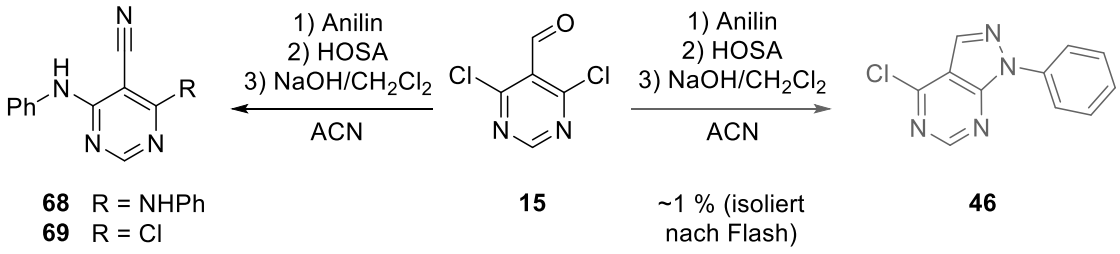


16 **15**

*Schema 13: One-Pot-Reaktion von **16** zu **15**.*

Zur Synthese des Chlor-*N*-Phenyl-[3,4]-Pyrazolopyrimidins **46** wurde, entsprechend der Literatur, **15** mit Anilin und NEt_3 versetzt.[226] Um das für die Zyklisierung (laut Literatur) wichtige Zwei-Phasen-Gemisch zu erhalten, wurde nach vollständiger S_NAr-Reaktion zur Bildung des Oximintermediats **65** HOSA und anschließend wäss. NaOH-Lösung und CH_2Cl_2 hinzugegeben.

Die Bildung von **46** konnte allerdings nur in sehr geringem Ausmaß beobachtet werden (für diese Verbindung waren Referenzdaten aus der vorherigen Synthese vorhanden), was sich anhand der geringen Ausbeute von ~ 1 % nach der Reinigung bestätigte. Das Hauptprodukt der Reaktion stellte sich als das zweifach substituierte Pyrimidinnitril **68** heraus. Dies ist insofern erstaunlich, da die Literaturbedingungen bei dieser Reaktion exakt eingehalten wurden. Eine Wiederholung der Reaktion mit weniger Äquivalenten Anilin ergab ein vergleichbares Ergebnis, wobei nun eine Mischung von einfach- und doppelt-substituiertem Nitril erhalten wurde. Es war somit nicht möglich, die publizierten Ergebnisse zu reproduzieren.



68 R = NHPh
69 R = Cl

15

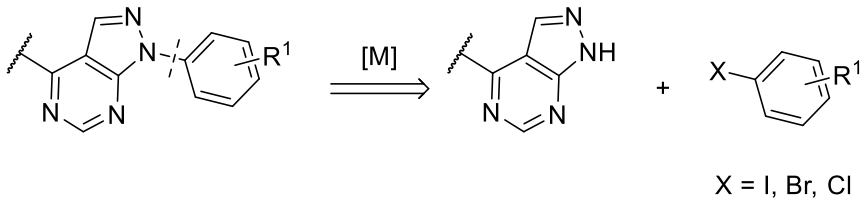
~1 % (isoliert nach Flash)

46

*Schema 14: Zyklisierungsreaktion von **15** entsprechend der Literaturbedingungen.[166,226] Das gewünschte Produkt **46** konnte nur mit einer Ausbeute von ~1 % isoliert werden, stattdessen bildete sich hauptsächlich das einfach oder zweifach substituierte Nitril (**69** oder **68**).*

Nachdem diese Route zur „Phenylhydrazin-freien“ Synthese nicht von Erfolg geprägt war, wurde nach weiteren Methoden gesucht. Eine naheliegende Idee war eine

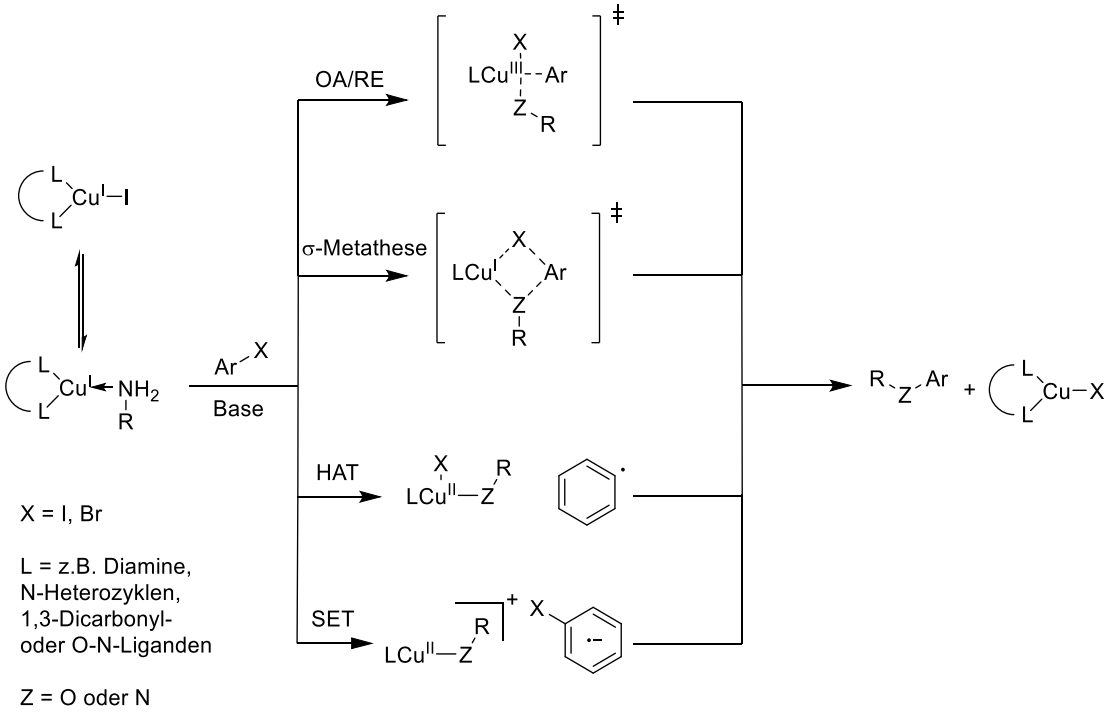
Übergangsmetall-katalysierte Kupplung eines „fertigen“ [3,4]-Pyrazolopyrimidins mit einem Arylhalogenid.



Schema 15: Retrosynthetische Überlegung für einen neuen synthetischen Zugang zu IMB0901-Derivaten: Übergangsmetall-katalysierte Reaktion zwischen dem Pyrazol-Stickstoff und einem Arylhalogenid.

Stephen L. Buchwald *et al.* publizierten eine derartige Methode basierend auf der Kupfer-Chemie von Fritz Ullmann und Emanuel Goldberg[229,230], in der CuI als Katalysator und (±)-*trans*-*N*,*N*‘-Dimethyl-1,2-Cyclohexyldiamin (***rac*-70**) als Ligand in einer Ullmann-artigen Reaktion zur Kupplung von *N*-Heteroaromaten mit Aryliodiden verwendet wurde.[231]

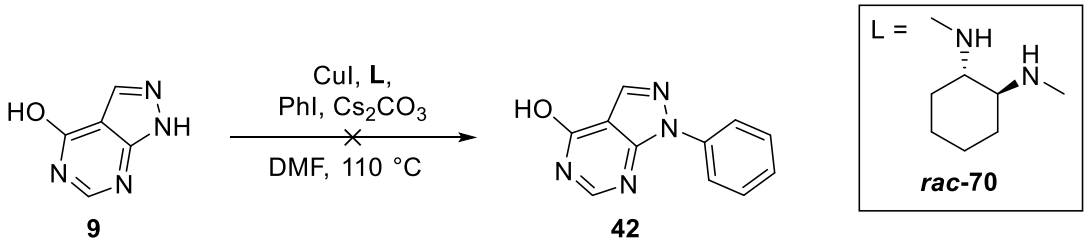
Durch die Entwicklung neuer Liganden (oftmals bidentate O- oder N-Liganden) konnten in den letzten Jahren die benötigten Temperaturen für diese Art von Reaktionen, bei denen oftmals ein Cu(I)-Salz oder Cu(II)-Salz als Cu-Quelle dient, gesenkt und das Spektrum an Substraten sehr stark erweitert werden (Beispiele unter [232]). Der genaue Mechanismus dieser modifizierten Ullmann-Kupplung ist allerdings nicht vollständig aufgeklärt. Dies hängt vor allem damit zusammen, dass das Kupfer während der Reaktion in verschiedenen Oxidationsstufen (I, II oder III) vorliegen könnte, wobei diese teilweise instabil sind, jedoch durch Lösemitteleinflüsse oder Liganden stabilisiert werden können. Einige Überlegungen gehen deshalb in die Richtung, dass verschiedene Cu-Spezies an einer solchen Reaktion beteiligt sind. Zudem scheint die Reaktion mit O- oder N-Nukleophilen über unterschiedliche Mechanismen abzulaufen. Die vorherrschende Meinung zum generellen Ablauf der Reaktion ist, dass der Cu-Nukleophil-Komplex zuerst gebildet wird, und erst anschließend die Reaktion mit dem Arylhalogenid stattfindet. Diese Reaktion könnte theoretisch über eine Oxidative Addition/Reduktive Eliminierung (OA/RE), eine σ-Bindungs-Metathese, über einen Halogen-Atom-Transfer (HAT) oder einen Einzel-Elektronen-Transfer (SET, single electron transfer) stattfinden. Zu den oben genannten Mechanismen oder Kombinationen werden noch weitere diskutiert. Darüber hinaus könnte der jeweilige Mechanismus vom Substrat, dem Nukleophil oder den Liganden abhängen, sodass verschiedene Mechanismen unter unterschiedlichen Bedingungen ablaufen (siehe Schema 16).[233]



Schema 16: Verschiedene mögliche Reaktionsmechanismen der Ullmann-Aminierung ausgehend von Cu(I). Beim OA/RE-Mechanismus wird das Cu auf die Oxidationsstufe (III) oxidiert. In einer Metathese-Reaktion ändert sich die Oxidationsstufe von Cu nicht. Die beiden radikalischen Mechanismen verlaufen beide über eine Cu(II)-Spezies. Dabei bildet sich entweder ein Arylradikal unter homolytischer Spaltung der Ar-X-Bindung (HAT) oder ein Aryl-Radikalanion durch SET.[233] (modifiziert)

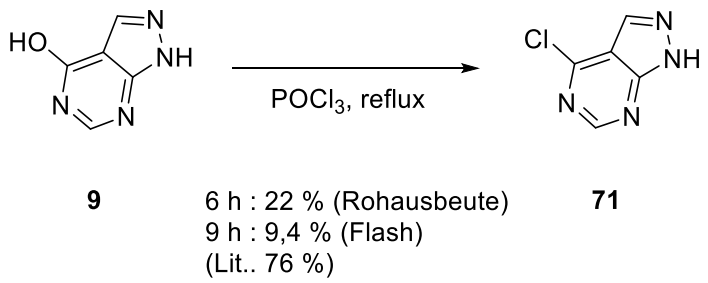
In der Publikation von Buchwald *et al.* wurden neben Pyrrolen auch Pyrazole, Imidazole, Benzimidazole, Triazole, Indazole und Purine, jedoch keine Pyrazolopyrimidine aufgeführt. Da in den Beispielen der Publikation zu Indazolen eine hohe Regioselektivität für das gewünschte Regioisomer angegeben war, wurde der Reaktion trotzdem eine gute Erfolgsaussicht zugesprochen. Zur zweifelsfreien Klärung der Regioselektivität sollte dennoch zunächst das bereits hergestellte Phenyl-Morpholinderivat **31** resynthetisiert werden.

Als Ausgangsverbindung für diese Synthese stand kommerziell erhältliches Allopurinol (**9**) zur Verfügung. Ein erster Versuch, **9** direkt entsprechend der Literaturmethodik (10 mol% CuI, 20 mol% **L**) mit Iodbenzol zu kuppeln, zeigte allerdings keinen Umsatz zum Produkt (siehe Schema 17). Vermutlich störte die freie OH-Gruppe, indem sie die Bildung eines aktiven Katalysators durch Komplexierung inhibierte.



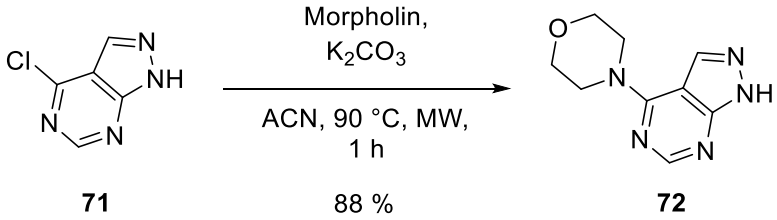
*Schema 17: Fehlgeschlagene Ullmann-artige Kupplung von **9** mit Iodbenzol.*

Deshalb sollte **9** zunächst über das Chlorintermediat **71** zum Morpholino-[3,4]-Pyrazolopyrimidin **72** umgewandelt werden. Der O-Cl-Austausch von **72** sollte entsprechend der Literatur von Radi *et al.* mit DMF in $POCl_3$ unter Rückfluss erfolgen.[234] In zwei Reaktionen konnten 22 % (Rohausbeute, ausreichende Reinheit) bzw. 9,4 % (nach Flash-Reinigung) isoliert werden, was jeweils deutlich unter der Literaturausbeute von 76 % lag (siehe Schema 18). Die durch diese Reaktionen erhaltene Menge war dennoch ausreichend für die Testung der folgenden Reaktionen, allerdings wäre eine Modifikation der Bedingungen zum Erzielen einer höheren Ausbeute in folgenden Projekten angebracht.



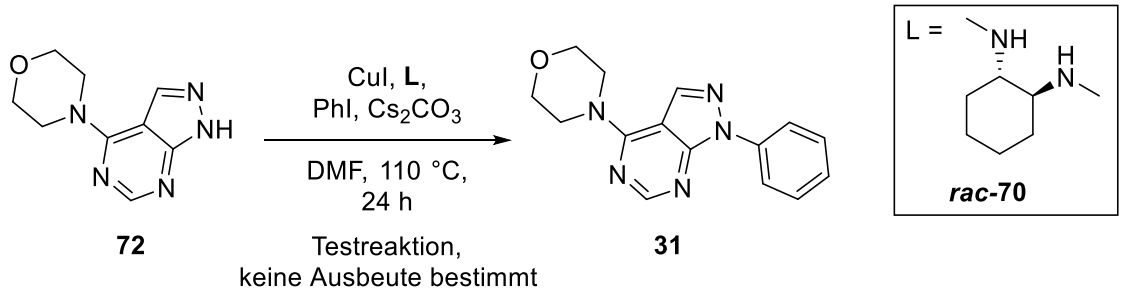
*Schema 18: O-Cl-Austauschreaktion von **9**. Durch Verlängerung der Reaktionszeit konnte die Rohausbeute auf 40 % gesteigert werden, jedoch war dieses stark verunreinigt und musste chromatographisch gereinigt werden.*

Die S_NAr-Reaktion wurde entsprechend der etablierten Methode durchgeführt und lieferte das Morpholin-Derivat **72** in einer Ausbeute von 88 %. Das Rohprodukt wies laut LC/MS-Spektrum und NMR-Spektren praktisch keine Verunreinigungen auf, weshalb dieses ohne Reinigung weiter eingesetzt wurde (siehe Schema 19).



*Schema 19: S_NAr-Reaktion von **71** mit Morpholin.*

Anschließend wurde **72** mit Iodbenzol entsprechend der Literaturmethodik umgesetzt und nach 24 h bei 110 °C ein vollständiger Umsatz des Startmaterials beobachtet.[231] Die Regioselektivität konnte durch den Vergleich der analytischen Daten des zuvor synthetisierten Derivats **31** bestätigt werden.



*Schema 20: Erfolgreiche Kupplung von **72** mit Iodbenzol. Es wurde nur das Lösemittel unter Vacuum entfernt und die LC/MS- und NMR-Spektren betrachtet.*

Aufgrund der positiven Ergebnisse sollten weitere Derivate über diese Syntheseroute hergestellt werden. Die Entscheidung fiel auf das 3-Cl-4-Me-Phenyl-Derivat **73**, welches als Vergleich zum 3,4-Dimethylphenyl-Derivat **61** und dem 3,4-Dichlorphenyl-Derivat **27** diente. Daneben sollte das 4-OCF_3-Phenyl-Derivat **74** synthetisiert werden, um den Aktivitätsunterschied zwischen dem 4-Methylphenyl-Derivat **33** und dem 4-OMe-Phenyl-Derivat **37** zu untersuchen. Die Frage war, ob dieser Unterschied hauptsächlich von den elektronischen Eigenschaften des Arylrings abhing, oder von dem sterischen Anspruch des Substituenten. Die OCF_3-Gruppe ist dabei vom sterischen Anspruch vergleichbar mit einem OMe-Substituenten, der elektronische Einfluss auf den Aromaten ist jedoch vergleichbar mit einer Me-Gruppe. Als letzte Verbindung dieser Reihe sollte das 3,4-Methylendioxyphenyl-Derivat **75** hergestellt werden (siehe Abbildung 48).

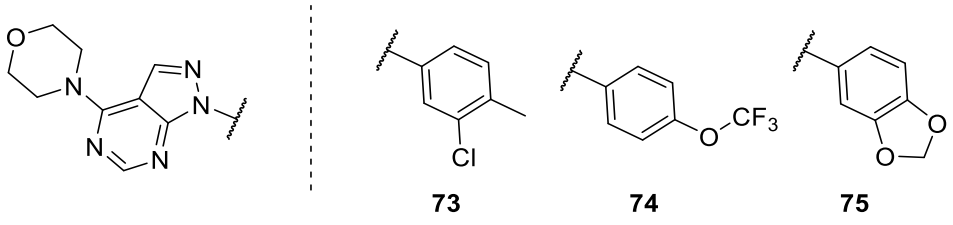


Abbildung 48: IMB0901-Derivate, die über die Cu-katalysierte Reaktion synthetisiert werden sollten

Dieses Substitutionsmuster war interessant, da es einen vergleichbaren sterischen Anspruch hat wie ein 3,4-Dichlormuster und zudem elektronisch wenig aktiviert ist, da die freien Elektronenpaare der Sauerstoffatome durch die bevorzugte, nicht-planare Geometrie des Fünfrings weniger stark mit dem π-System des Benzolrings konjugiert sind, wodurch ein weniger ausgeprägter +M-Effekt vorliegt.[235] Ein bekannter Wirkstoff, der diesen Aromaten aufweist, ist Methylendioxy-*N*-Methyl-Amphetamin (MDMA, **76**), darüber hinaus ist er in anderen aktiven Verbindungen vorhanden (z.B. dem ALK-4/5-Inhibitor SB431542, **4**).[184,236]

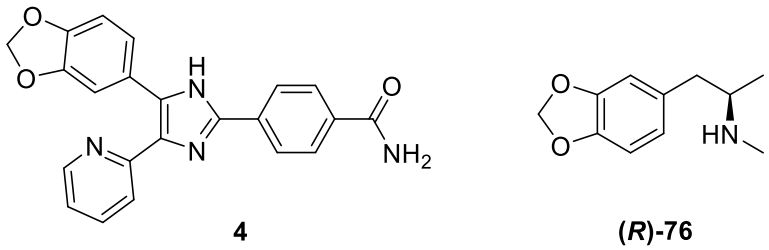
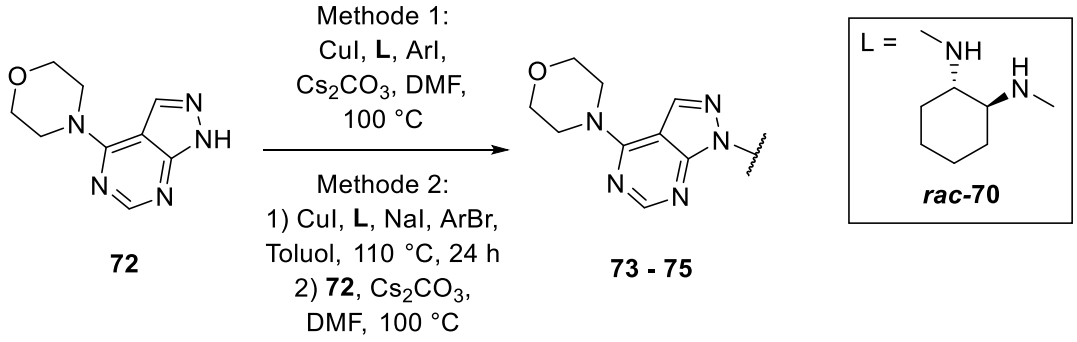
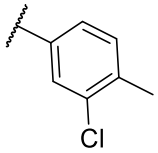
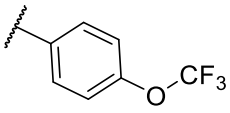
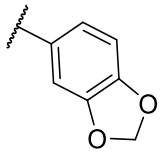


*Abbildung 49: Struktur von SB431542 (**4**) und* (R)*-MDMA (**R-76**). Beide weisen den Methylendioxyphenylring auf.*

Für alle obengenannten Zielstrukturen eignete sich die neue Cu-katalysierte Synthese besonders, da die entsprechenden Phenylhydrazine nicht kommerziell erhältlich waren, die Arylhalogenide dahingehen schon. Zur Synthese von **73** konnte auf 3-Chlor-4-Methylphenyliodid zurückgegriffen werden, zur Synthese von **74** und **75** standen 4-OCF_3-Phenylbromid und 3,4-Methylendioxyphenylbromid zur Verfügung. Diese Bromide wurden *in situ* vor der Kupplung mit dem [3,4]-Pyrazolopyrimidin in das entsprechende Iodid umgewandelt, was ebenfalls in der Publikation von Buchwald *et al.* beschrieben war.[231] Der Schritt war notwendig, da laut Publikation die Regioselektivität mit Arylbromiden deutlich niedriger war als mit Aryliodiden. Zur Umwandlung wurden 4-OF_3-Phenylbromid und 3,4-Methylendioxyphenylbromid mit CuI, NaI und dem Liganden in Toluol in einem geschlossenen Reaktionsvial erhitzt. Nach dem Umsatz zum Iodid wurde **72** in DMF und Cs_2CO_3 zur Reaktion gegeben und die Lösung wurde erneut erhitzt. Zur Synthese von **73** konnte direkt 3-Chlor-4-Methyliodid mit **72** in DMF entsprechend der Literaturangaben umgesetzt werden. Alle Verbindungen wurden anschließend gereinigt und mit Ausbeuten zwischen 17 % und 35 % isoliert (siehe Tabelle 12).

*Tabelle 12: Ullmann-artige Kupplungsreaktion von **72**. Zwei Methoden wurden angewendet, je nachdem ob das Arylbromid oder das Aryliodid zur Verfügung stand.*



Verbindung	R^1	Methode	Zeit [h]	Ausbeute [a]
73		1 [b]	36	30 %
74		2 [c]	24	35 %
75		2 [c]	24	17 %

Reaktionsbedingungen: Methode 1: 1 Äq. **72**, 10 mol% CuI, 20 mol% **L**, 1,2 Äq. Aryliodid, 2 Äq. Cs_2CO_3, Methode 2: 1) 10 mol% CuI, 20 mol% **L**, 2 Äq. NaI, 2) 1 Äq. **72**, 2 Äq. Cs_2CO_3, [a] Ausbeute nach präparativer HPLC, [b] das entsprechende Aryliodid wurde in der Reaktion eingesetzt, [c] das entsprechende Arylbromid wurde in der Reaktion eingesetzt.

Mit der Synthese dieser Verbindungen konnte gezeigt werden, dass die Cu-katalysierte Aminierung eine einfache Möglichkeit bietet, neue *N*-Aryl-[3,4]-Pyarzolopyrimidine ausgehend von einem Schlüsselintermediat zu synthetisieren. In nachfolgenden Projekten könnte jedoch die Synthese des Intermediats **71** optimiert werden.

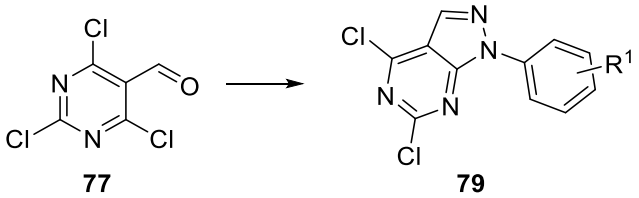
3.2.5.2 Design und Synthese dreifachsubstituierter Derivate

Da bereits eine breite Palette von IMB0901-Derivaten mit Modifikationen von R^1 und R^2 hergestellt wurde, sollte nachfolgend die Synthese von dreifachsubstituierten Derivaten in den Fokus des Projekts gerückt werden. Von besonderem Interesse dabei waren Verbindungen, die an R^2 einen Morpholin-Rest und an R^1 einen der aktiven Arylsubstituenten aufweisen.

In der ersten Serie sollten die Reste an Position R^3 kurze Seitenketten sein und optimalerweise ebenfalls Heteroatome aufweisen, um die Lipophile nicht zu stark zu erhöhen. Für eine

modulare Syntheseroute wäre zudem die Herstellung eines Schlüsselintermediats zur einfachen Derivatisierung von R^3 wünschenswert.

Eine Möglichkeit, ein solches Intermediat zu erhalten, bestand in der Zyklisierung von 2,4,6-Trichlor-Pyrimidin-5-Carbaldehyd **77** zu einem 4,6-Dichlor-[3,4]-Pyrazolopyrimidin **79** (vergleiche Kapitel 3.2, siehe Schema 21). Um mögliche Nebenreaktionen zu vermeiden, wurde statt des 3,4-Dichlorphenylhydrazins das 4-Methylphenylhydrazin verwendet, da beide Reste sich laut den biologischen Daten als gleichwertig in Bezug auf die Potenz erwiesen.

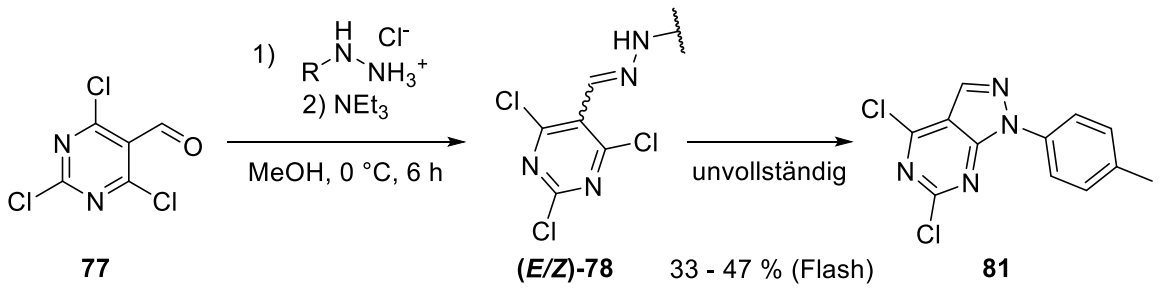


*Schema 21: Sequenz zur Synthese des Schlüsselintermediats **79** zur einfachen Derivatisierung von R^2 und R^3.*

Die Reaktion sollte entsprechend den Bedingungen von Verschueren *et al.* durchgeführt werden.[237] Dabei wurde zunächst **77** bei 0 °C in MeOH vorgelegt und das Phenylhydrazin-Hydrochlorid und NEt_3 sequenziell tropfenweise hinzugegeben. Nach 3 h konnte die Bildung des Hydrazons **78** und teilweise des gewünschten Produkts **81** beobachtet werden. Allerdings konnte kein Ansatz vollständig zyklisiert werden, allenfalls durch Verlängerung der Reaktionszeit, erneute Zugabe von NEt_3 und kurzes Erhitzen auf 50 °C konnte der Umsatz zum finalen zyklisierten Produkt **79** erhöht werden, wobei Ausbeuten zwischen 33 % und 47 % erzielt wurden (eine höhere Temperatur wurde vermieden um eine ungewünschte S_NAr-Reaktion mit MeOH zu vermeiden, siehe Schema 22). Darüber hinaus konnte das Hydrazonintermediat **78** in diesen Reaktionen nicht isoliert werden, um es anschließend in einem zweiten Schritt zu zyklisieren.

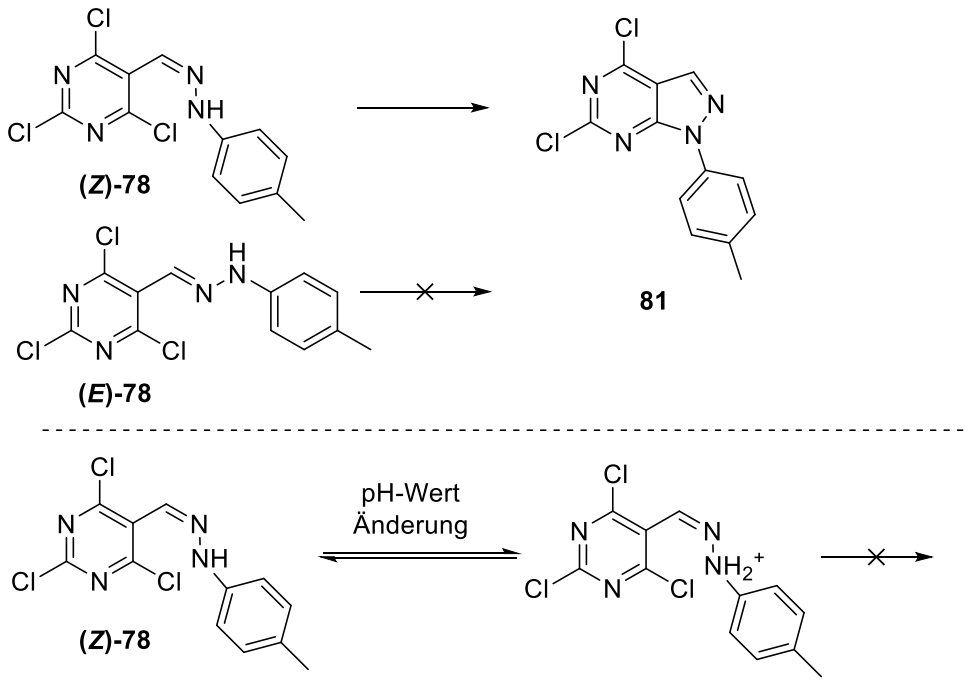
Es ist dabei anzumerken, dass in der LC/MS-Reaktionskontrolle sowohl das Hydrazon **78** (bei λ = 382 nm und m/z = 313, 315, 317) als auch das Produkt **81** (bei λ = 254 nm und m/z = 275, 277) gut beobachtbar waren, jedoch durch ihre unterschiedlichen Absorptionsmaxima und Ionisationsintensitäten schlecht in Relation gestellt werden konnten. In den NMR-Spektren der jeweiligen Rohprodukte konnte zwar das „Hydrazon-C-H“ identifiziert werden, dieses entsprach jedoch in der Ausprägung nicht dem laut LC/MS zu erwartenden Ausmaß. Daneben

wurde vermutlich aufgrund der hohen Reaktivität von **77** die Bildung einiger nicht identifizierbarer Nebenprodukte beobachtet.



*Schema 22: Zyklsierungsreaktion von **77**. Die Hydrazon-Bildung verlief vollständig, die anschließende Zyklisierung jedoch nicht, sodass eine Ausbeute von nur 47 % erhalten wurde.*

Der Grund für die unvollständige Reaktion könnte in der Bildung eines Gleichgewichts zwischen dem *E*- und dem *Z*-Hydrazon liegen, wobei nur das *Z*-Isomer zyklisieren könnte. Falls die Rückreaktion zum Hemi-Aminal nur sehr langsam verläuft, oder das *E*-Isomer bevorzugt gebildet wird, würde dies das Stehenbleiben der Reaktion erklären (siehe Schema 23).



Schema 23: Mögliche mechanistische Erklärungen der unvollständigen Zyklisierungsreaktion: Eine Möglichkeit bestand darin, dass sich eine Mischung des E- und des Z-Hydrazons bildete, von denen nur das Z-Hydrazon zyklisieren konnte. Möglicherweise führte auch eine Erhöhung des pH-Werts zur Protonierung des zweiten Hydrazin-Stickstoffs, wodurch dieser nicht mehr reagieren könnte.

Denkbar wäre zudem, dass sich durch die Bildung von $NEt_3 \cdot HCl$ der pH-Wert so weit absenkt, dass die irreversible Zyklisierungsreaktion stark verlangsamt wird. Darüber hinaus haben vermutlich Nebenreaktionen des sehr reaktiven Tri-Chlor-Pyrimidins **77** oder des Hydrazonintermediats **78** zu einem Verlust von Startmaterial geführt.

Insgesamt wurde jedoch ausreichend Material von **81** erhalten, um die zwei squenziellen S_NAr-Schritte zur Synthese der Derivate durchzuführen. Bei diesen Reaktionen stellte sich jedoch die Frage der Regioselektivität zwischen den beiden elektrophilen Kohlenstoffen an der 4- und an der 6-Position. Generell scheint die 4-Position reaktiver und reagiert deshalb schneller als die 6-Position in einer S_NAr-Reaktion, wobei es je nach Substrat und Reaktionsbedingungen trotzdem zu Selektivitätsproblemen kommen kann. Mechanistisch scheint die Frage nach der Selektivität nicht vollständig geklärt zu sein, könnte aber mit einer stärkeren Abschirmung der 6-Position durch die planaren freien Elektronenpaare der beiden Stickstoffe im Vergleich zur Abschirmung durch einen Stickstoff an der 4-Position zusammenhängen.[238–240] In einem Literaturbeispiel wurde für [3,4]-Pyrazolopyrimidine die praktisch ausschließliche Substitution des 4-Chloratoms durch NH_3 in Dioxan unter Rückfluss beschrieben.[237]

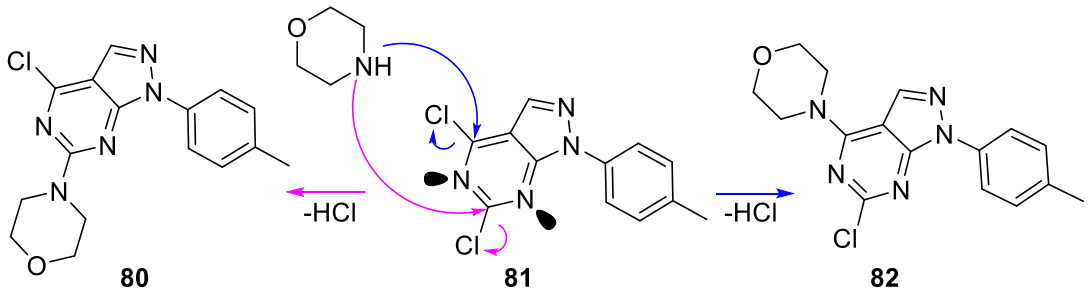
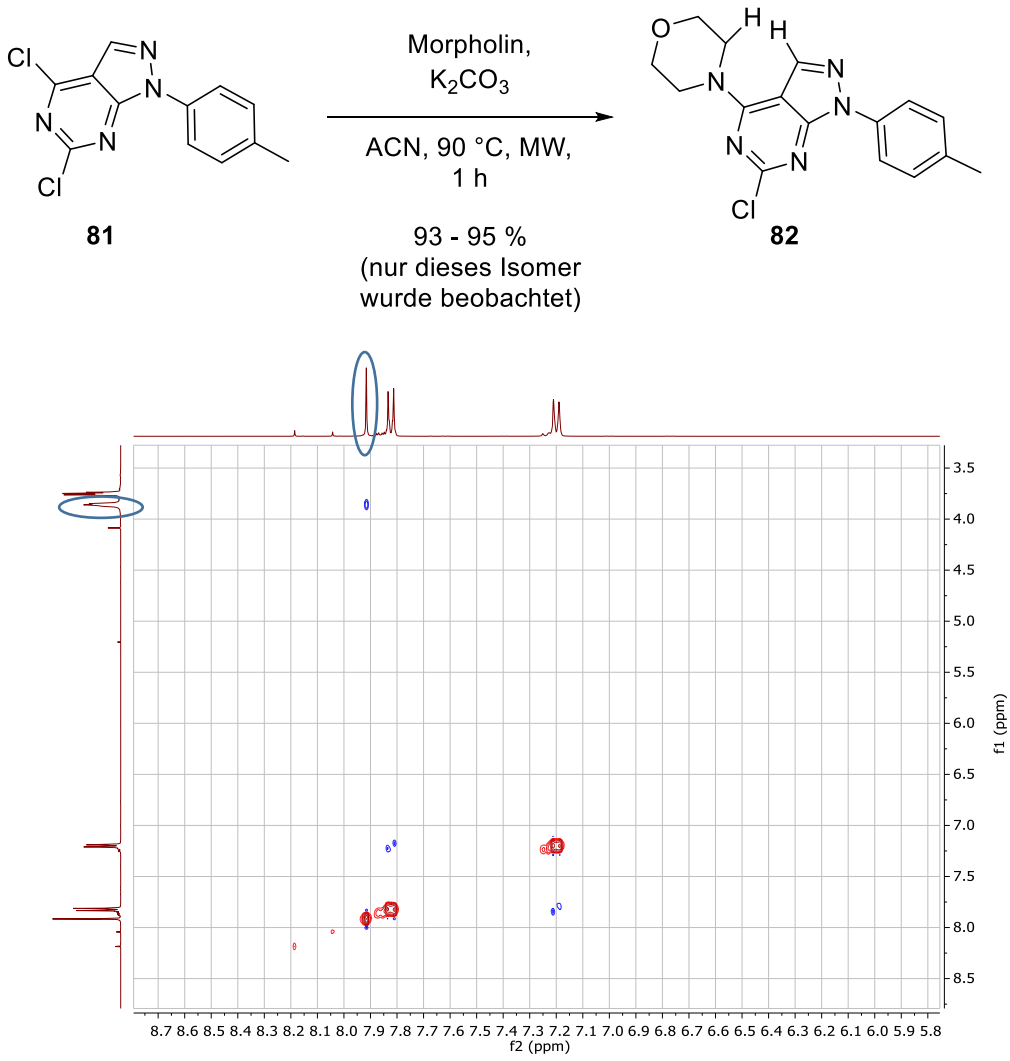


*Abbildung 50:Die beiden Regioisomere **80** und **82**, welche durch die S_NAr-Reaktion von **81** entstehen könnten. Generell ist die 4-Position reaktiver, was mit der geringeren Abschirmung durch die freien Elektronenpaare zusammenhängen könnte.*

Basierend auf dieser Literaturgrundlage wurde in einem Testansatz deshalb auf die etablierte Methode mit ACN und K_2CO_3 in der Mikrowelle zurückgegriffen, um die Regioselektivität in diesem Fall zu prüfen.



*Schema 24: S_NAr-Reaktion von **81** zu **82**. Die NOESY-Kupplung zwischen den gezeigten Protonen konnte beobachtet werden.*

Nach 1 h Reaktionszeit mit 1 Äq. Morpholin bei 90 °C wurde ein Hauptprodukt in hoher Reinheit mit m/z = 330 isoliert, was Verbindung **80** oder **82** entsprach. Im NOESY-Spektrum konnte anschließend die Kopplung zwischen dem Pyrazol-C-H und dem 3/5-C-H_2 des Morpholins beobachtet werden, wodurch die gewünschte Regioselektivität bestätigt wurde. Diese Testreaktion ergab eine Ausbeute von 93 %, in einer weiteren Reaktion konnte eine Ausbeute von 95 % erzielt werden (siehe Schema 24).

Mit dem Schlüsselintermediat in Händen konnten nun die nächsten Derivate designt werden. In einer ersten Serie sollten Derivate mit relativ kleinen Seitenketten synthetisiert werden, um die Auswirkungen auf die SAR besser nachvollziehen zu können. Zusätzlich sollten die Seitenketten relativ polar sein, um Interaktionen mit der Proteinoberfläche zu ermöglichen und um die Lipophile der Verbindungen zu senken. Gestützt durch Dockingstudien fiel die Wahl

auf das Methylamino-Derivat **84**, das Dimethylamino-Derivat **85** und das Nitril-Derivat **86** (siehe Abbildung 51).

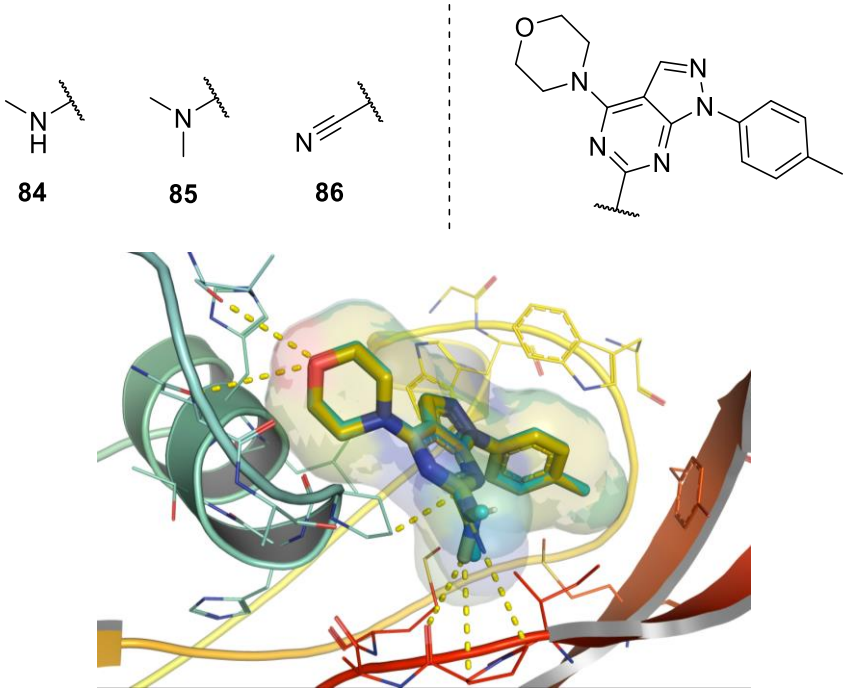
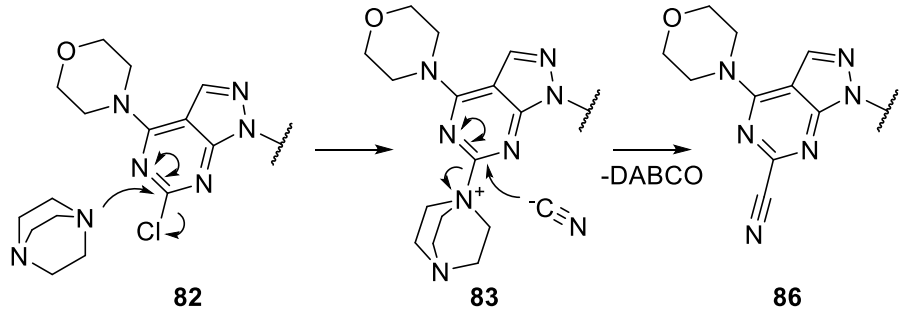


*Abbildung 51: Geplante Derivate **84**, **85** und **86** mit einer Modifikation an R^3. Alle drei Derivate nahmen in der Dockingsimulation praktisch die gleiche Pose ein wie **27**. Zusätzlich interagierten jeweils die kleinen polaren Reste mit Pro99. Durch die Polarität könnten diese Reste zusätzlich mit dem wässrigen Medium interagieren, was den Komplex weiter stabilisieren würde. Aus diesem Grund wurden die polaren Substituenten bevorzugt. Scoring-Werte: –7,0 kcal/mol (**84**), –7,1 kcal/mol (**85**), –7,2 kcal/mol (**86**) – Referenz –7,1 kcal/mol (**27**)*

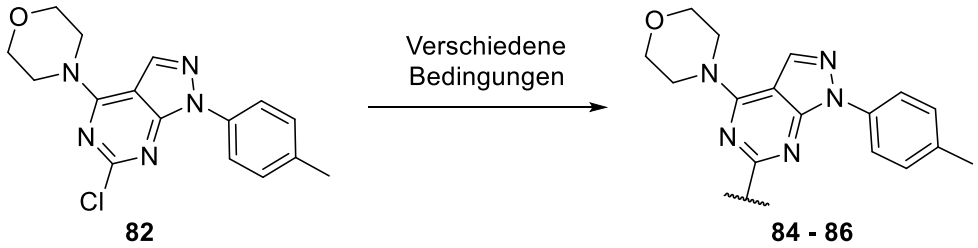
Für das erste Derivat stand Me_2NH als 2 M Lösung in THF zur Verfügung. Angelehnt an die Bedingungen von Verschueren *et al.* (die Autoren verwendeten das Amin als Lösemittel) wurde die Reaktion in dieser Lösung erhitzt.[237] Nach 18 h bei 75 °C in der Mikrowelle konnte ein vollständiger Umsatz beobachtet werden, was sich mit den Literaturangaben deckte und zudem die beobachtete Selektivität der ersten S_NAr-Reaktion bestätigte. Zur Synthese von **84** wurde **82** mit $MeNH_2{\cdot}HCl$, DIPEA und (aufgrund der guten Löslichkeit von Salzen und der hohen Polarität) in DMSO in der Mikrowelle erhitzt (siehe Tabelle 13). Für das letzte Derivat bestand eine einfache Methode angelehnt an Sturala *et al.* in der Verwendung des nukleophilen Organokatalysators 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO, siehe Schema 25).[241]



*Schema 25: Mechanismus der DABCO-katalysierten SN_{Ar}-Reaktion von **82** zu **86**. Der nukleophile Organokatalysator greift zunächst das elektrophile Chlorpyrimidin an, wodurch das reaktive Ammonium-Kation **83** entsteht. Das Cyanid-Anion reagiert anschließend mit **83**, wobei der Katalysator wieder freigesetzt wird.*

Die Reaktion mit KCN und DABCO in DMSO/H_2O (3:1) verlief bereits bei RT vollständig, sodass insgesamt alle designten Derivate erfolgreich synthetisiert und in Ausbeuten zwischen 27 % und 47 % isoliert werden konnten (siehe Tabelle 13).

*Tabelle 13: S_NAr-Reaktion von **82** mit verschiedenen Substraten.*



Verbindung	R^3	Lösemittel	Base	Temperatur	Zeit [h]	Ausbeute [a]
84		DMSO	DIPEA	90 °C [b]	18	27 %
85		THF	$HNMe_2$	75 °C [b]	18	47 %
86		DMSO/H_2O (3:1)	DABCO	RT	14	40 %

Reaktionsbedingungen: Methode 1: 1 Äq. **82**, 2 Äq. DIPEA, 5 Äq. $MeNH_2 \cdot HCl$, Methode 2: 1 Äq. **82**, 20 Äq. $HNMe_2$ (2 M Lösung in THF), Methode 3: 1 Äq. **82**, 2,5 Äq. KCN, 1,5 Äq. DABCO, [a] Ausbeute nach präparativer HPLC, [b] Reaktion wurde in der MW im geschlossenen Gefäß durchgeführt.

Die relativ niedrige Ausbeute der Derivate trotz des vollständigen Umsatzes könnte erneut mit der hohen Polarität der Verbindungen zusammenhängen. Vor allem die Reaktionen in DMSO mussten mehrfach während der Aufarbeitung mit Wasser gewaschen werden, um das DMSO

möglichst vollständig aus der organischen Phase zu entfernen, wobei möglicherweise kleinere Mengen des Produkts ebenfalls ausgewaschen wurden. In den kleinen Maßstäben der Reaktion (~0,1 mM) hatte dies einen großen Einfluss.

Nach der erfolgreichen Synthese von dreifach substituierten Derivaten sollte zum Abschluss der Einfluss des [3,4]-Pyrazolopyrimidin-Grundgerüsts auf die biologische Aktivität untersucht werden.

3.2.5.3 Design und Synthese von IMB0901 mit verändertem Grundgerüst

In dieser Serie ging es vor allem darum, die elektronischen und die H-Akzeptor-Eigenschaften zu verändern, um daraus Rückschlüsse auf die SAR zu ziehen. Da die Interaktion laut Hypothese an der Proteinoberfläche stattfand und laut Dockingergebnissen eine π-π Interaktion mit den Trp-Resten oder eine π-S Interaktion mit einem Cys möglich waren, sollte durch π-Tuning die Elektronendichte des Grundgerüsts erhöht werden. Die generelle Struktur (Geometrie, anellierter fünf- und sechsgliedriger Ring) sollte allerdings beibehalten werden.

Entsprechend dieser Kriterien sollten ein Indazol (**87**) und ein Benzimidazol (**88**) synthetisiert werden, welche das gleiche Substitutionsmuster wie die potente Verbindung **27** aufwiesen, um einen direkten Vergleich zu ermöglichen. In Dockingstudien nahmen die Verbindungen annähernd die gleiche Pose wie **27** ein, nur der Morpholin-Rest lag jeweils leicht verändert vor (siehe Abbildung 52).

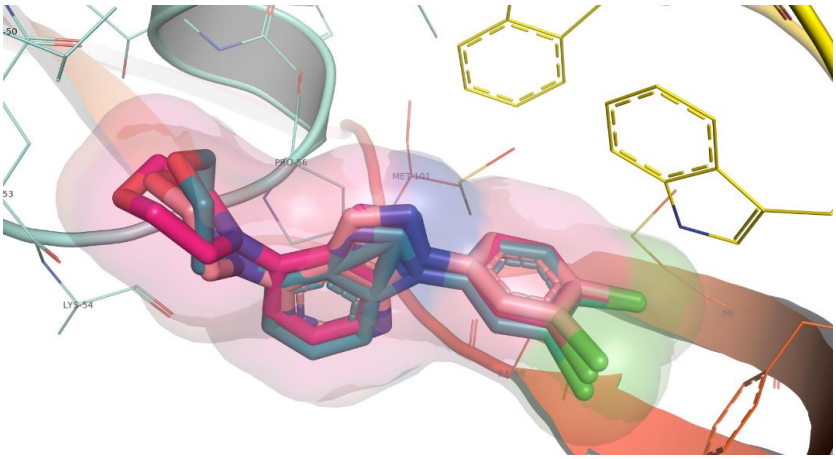
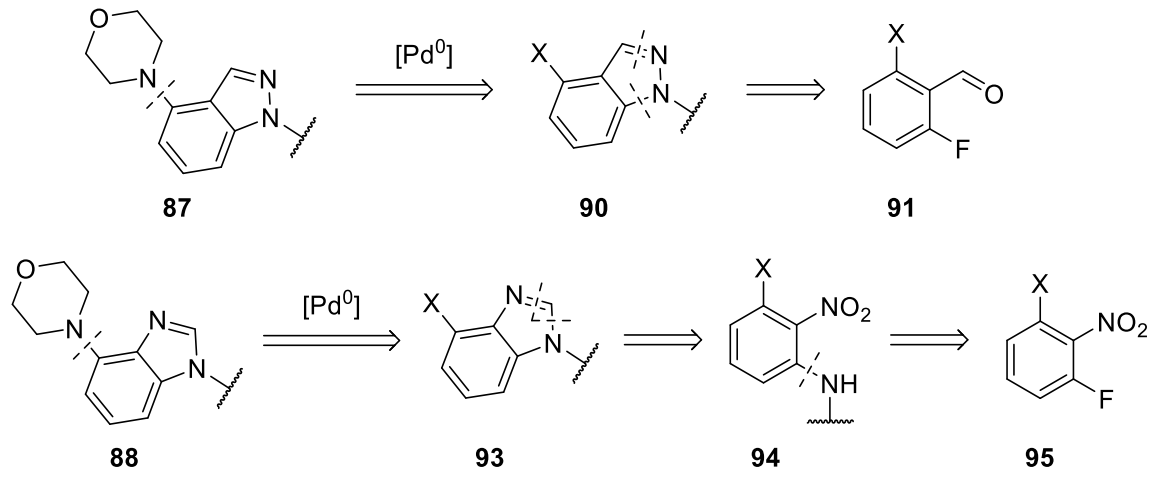


*Abbildung 52:Dockingstudien von **87** (rosa) und **88** (türkis) überlagert mit der Pose von **27** (magenta). Alle Verbindungen nehmen annähernd die gleiche Pose ein. Scoring-Werte: –7,2 kcal/mol (**87**), –7,1 kcal/mol (**88**).*

Retrosynthetisch betrachtet, könnte in beiden Fällen der Morpholin-Substituent über eine Übergangsmetall-katalysierte Reaktion eingeführt werden. Zudem wäre es in beiden Beispielen sinnvoll, von einem Benzol-Baustein auszugehen und den fünfgliedrigen Ring daran aufzubauen. Im Fall des Indazols (**90**) könnte dies über eine Kondensations-S_NAr-Kaskade von einem Phenylhydrazin und einem Fluor-Benzalydehyd (**91**) ermöglicht werden (vergleichbar mit der Sequenz aus Kapitel 3.2.5.2) und das Benzimidazol (**93**) könnte über eine reduktive Zyklisierung aus einem Nitro-Anilin (**94**) hergestellt werden (vgl. Kapitel 3.3.1[10]), welches wiederum durch eine S_NAr-Reaktion eines Halogen-Nitrobenzols (**95**) zugänglich wäre.

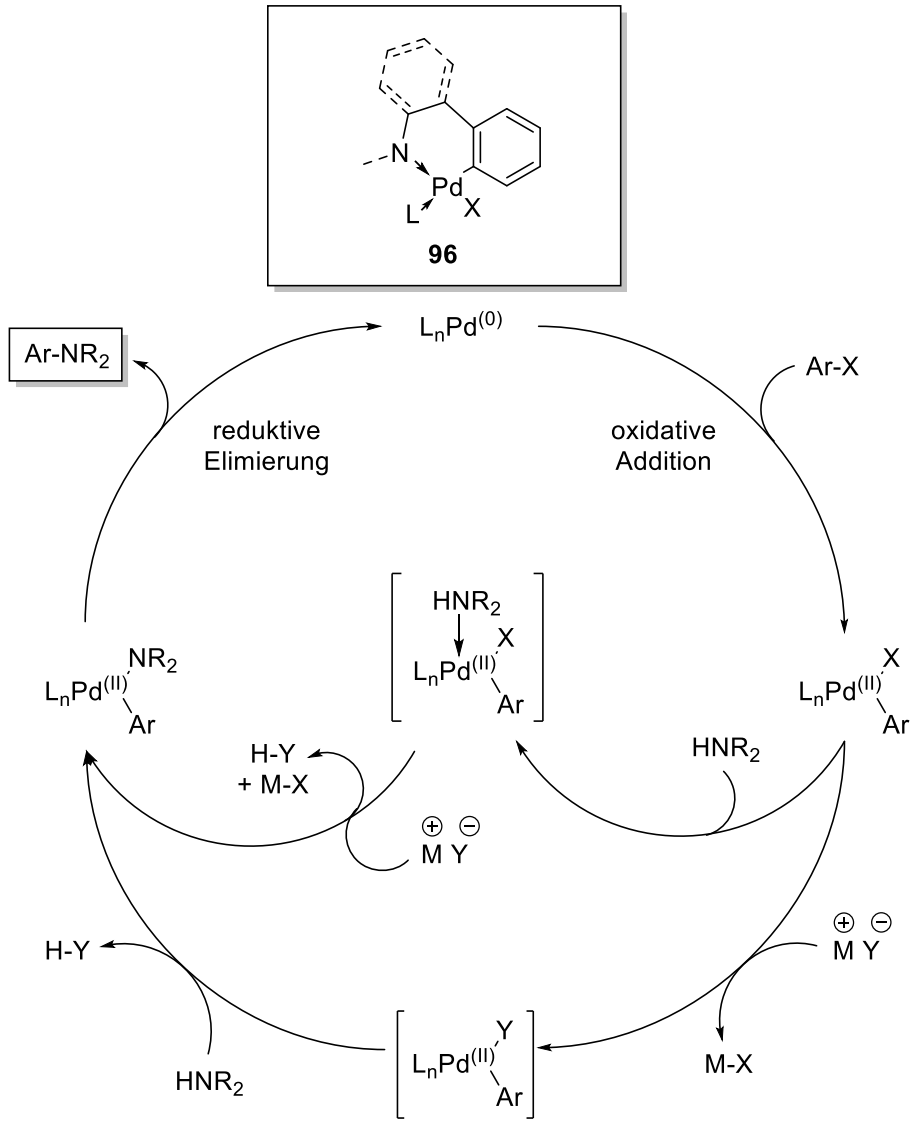


Schema 26: Retrosynthetische Überlegungen zur Darstellung von Indazolen und Benzimidazolen.

Die Schlüsselreaktion dieser beiden Sequenzen könnte somit aus einer Buchwald-Hartwig-Reaktion bestehen. Diese Pd-katalysierte Kupplung zwischen einem Arylhalogenid und einem Stickstoff- (oder einem Sauerstoff)-Nukleophil wurde von Stephen L. Buchwald und John F. Hartwig gleichzeitig systematisch untersucht und im Jahr 1994 beschrieben.[242,243] Als Pd-Quelle dient in den häufigsten Fällen eine Pd(0)-Verbindung oder ein Pd(II)-Salz (welches *in situ* zu Pd(0) reduziert wird). Um diese Reaktion bei milderen Bedingungen und mit einer Vielzahl an Substraten durchzuführen ist eine starke Base und ein Ligand notwendig. Oftmals handelt es sich bei diesen Liganden um ein- oder zweizahnige Phosphinliganden. Durch die gezielte Entwicklung neuer Liganden mit Rücksicht auf den sterischen Anspruch und die elektronischen Eigenschaften (vor allem des Phosphins) konnten immer anspruchsvollere Substrate erfolgreich zur Reaktion gebracht werden. Eine dieser

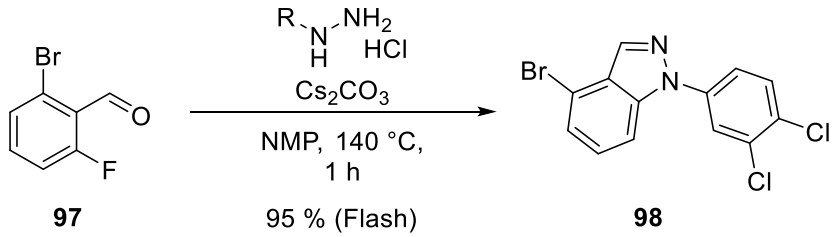
[10] Wie bereits erwähnt liefen das IMB0901- und das NUCC555-Projekt teilweise parallel. Die hier beschriebene Methode wurde bereits im NUCC555-Projekt erfolgreich angewendet und etabliert.

Entwicklungen waren die Precatalysts (allgemeine Struktur **96**) von Buchwald *et al.* [244], die *in situ* direkt den aktiven Ligand-Pd-Komplex durch reduktive Eliminierung freisetzen. Mechanistisch läuft die Buchwald-Hartwig-Reaktion über eine initiale Oxidative Addition des Pd in die C-X Bindung, gefolgt von einer Koordination des Nukleophils (welches durch eine geeignete Base deprotoniert wird) und der anschließenden Reduktiven Eliminierung des Produkts ab (siehe Schema 27, Übersichtsartikel unter [245]).



Schema 27: Mechanismus der Buchwald-Hartwig-Kupplung: Nach der oxidativen Addition des Pd(0) an das Arylhalogenid folgt entweder der direkte Austausch zwischen dem Amin und dem Halogen am Pd-Katalysator, oder zunächst komplexiert die Base (Y) das Pd und wird anschließend vom Amin verdrängt. Die reduktive Eliminierung setzt dann den Katalysator und das Produkt frei. [246] *(modifiziert) Im Kasten: Schematische Darstellung eines Precatalyst **96**, die verschiedenen Generationen unterscheiden sich durch das Halogen/Pseudohalogen X und durch die Substitution des Stickstoffs und des Arylsystems.*

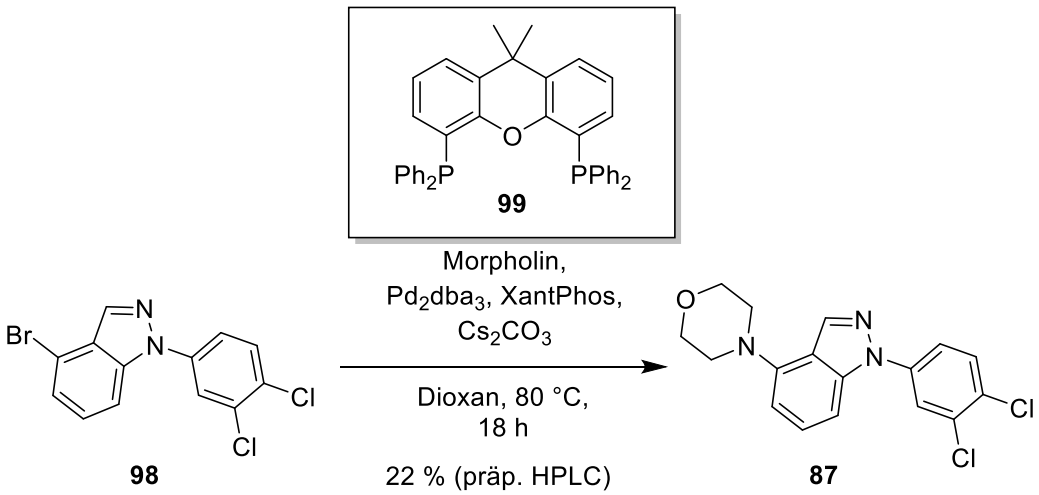
Zur Synthese des Indazols **87** stand 2-Brom-6-Fluorbenzaldehyd **97** als Startmaterial zur Verfügung. Die Zyklisierungskaskade wurde angelehnt an die Literatur von Hemmerling *et al.* mit 3,4-Dichlorphenylhydrazin und Cs_2CO_3 in NMP durchgeführt und konnte mit einer Ausbeute von 95 % durchgeführt werden.[247] Im Vergleich zu den [3,4]-Pyrazolopyrimidinen ließ sich das Indazol **98** deutlich einfacher chromatographisch reinigen, was vermutlich mit der niedrigeren Polarität und Basizität des Grundgerüsts zusammenhing (siehe Schema 28).



97 **98**

*Schema 28: Zyklisierung von Benzaldehyd **97** zu Indazol **98**. Die Regiochemie wurde durch den Vergleich mit sehr ähnlichen Verbindungen bestätigt.[247]*

Für den zweiten und finalen Schritt der Synthese wurden zunächst „klassische" Bedingungen für eine Buchwald-Hartwig-Kupplung getestet: angelehnt an die Methode von Lee *et al.* sollten 10 mol% Pd_2dba_3, 10 mol% XantPhos (**99**) und 2 Äq. Cs_2CO_3 in 1,4-Dioxan dienen. Tatsächlich konnte in dieser Reaktion bereits nach 2 h bei 90 °C ein vollständiger Umsatz beobachtet werden. (siehe Schema 29).[248]



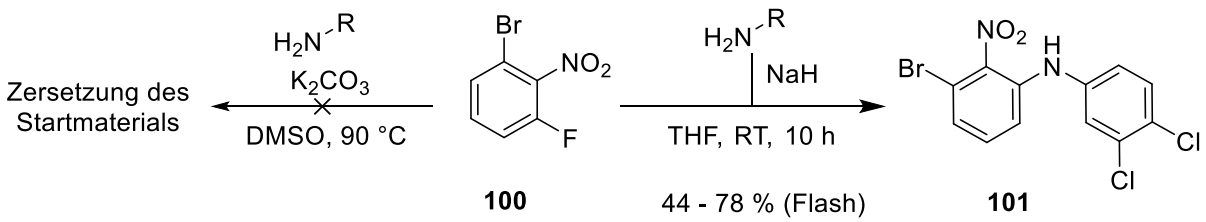
98 **87**

*Schema 29: Buchwald-Hartwig-Kupplung von **98** mit Morpholin. XantPhos **99** dargestellt im Kasten.*

Insgesamt verlief die Reaktion sehr „sauber“ ab, da jedoch sowohl Dibenzylidenaceton als auch XantPhos (**99**) eine sehr ähnliche Retentionszeit wie das Derivat **87** auf der C-18-Säule aufwiesen, wurde eine Ausbeute von nur 22 % erzielt.

Das Benzimidazol-Derivat **88** sollte ausgehend von kommerziell erhältlichem 1-Brom-3-Fluor-2-Nitrobenzol **100** synthetisiert werden. In einem Testansatz wurde entsprechend Bzeih *et al.* **66** mit 3,4-Dichloranilin und K_2CO_3 in DMSO umgesetzt, allerdings wurde die Bildung von **101** nicht beobachtet.[249] Vermutlich führte die Erhitzung auf 90 °C unter den basischen Bedingungen zur Zersetzung des Startmaterials.

Deshalb sollten in einem zweiten Ansatz Bedingungen bei RT getestet werden, weshalb, angelehnt an die Methodik von MacCannis *et al.*, die deutlich stärke Base NaH in THF verwendet wurde.[250] Um eine zweifache Substitution zu vermeiden, wurde 3,4-Dichloranilin zuerst mit NaH deprotoniert, und anschließend **100** hinzugefügt. In der Wiederholung der Reaktion konnte anschließend die Ausbeute von 44 % auf 78 % durch Optimierung der Bedingungen (30 min Deprotonierung statt 15 min, 2 Äq. NaH statt 1,5 Äq.) gesteigert werden (siehe Schema 30).



*Schema 30: SNAr-Reaktion von **100**: Die ersten getesteten Bedingungen führten zur Zersetzung des Startmaterials, die nachfolgend getesteten Bedingungen erwiesen sich als geeignet.*

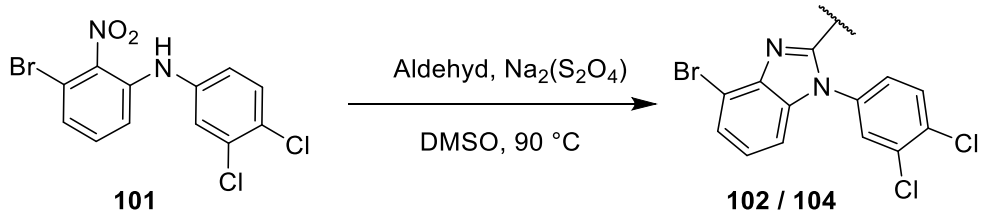
Die reduktive Zyklisierung des Nitroanilins **101** sollte mit $Na_2S_2O_4$ als mildem Reduktionsmittel in DMSO bei 90 °C entsprechend der etablierten Methode aus dem NUCC-555-Projekt durchgeführt werden (siehe Kapitel 3.3.1).[11] Für die Testreaktion wurde festes Paraformaldehyd, welches unter Erhitzen das Monomer freisetzt, anstelle einer Formaldehyd-Lösung eingesetzt. Nach 3 h betrug das Verhältnis von Benzimidazol **102** zu Edukt **101** ~2:1, was durch erneute Zugabe von 1,5 Äq. Paraformaldehyd auf ~3:1 erhöht werden konnte. Nach einer weiteren Stunde wurde die vermehrte Bildung verschiedener

[11] Das IMB-Projekt verlief zeitlich parallel zum NUCC-Projekt, weshalb die Methode bereits etabliert werden konnte.

Nebenprodukte beobachtet, weshalb die Reaktion durch Zugabe von ges. $NaHCO_3$-Lösung beendet und **102** mit einer Ausbeute von 40 % isoliert wurde (siehe Tabelle 14).

Daneben wurde die Reaktion mit Acetaldehyd getestet, wodurch ein weiteres Derivat (**103**) mit einer zusätzlichen Methylgruppe synthetisiert werden sollte. Nach einer Reaktionszeit von insgesamt 5 h und portionsweiser Zugabe von insgesamt 3 Äq. Acetaldehyd wurde neben der Bildung einiger Nebenprodukte ein Verhältnis von ~ 4:1 von Produkt zu Edukt detektiert. Die Reaktion wurde deswegen ebenfalls abgebrochen und das Methylbenzimidazol **104** mit einer Ausbeute von 53 % isoliert (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Reduktive Zyklisierung von 101 *mit p-Formaldehyd und Acetaldehyd.*



Verbindung	R	Reagenz	Zeit [h]	Ausbeute [a]
102		Paraformaldehyd	5	40 %
104		Acetaldehyd	5	53 %

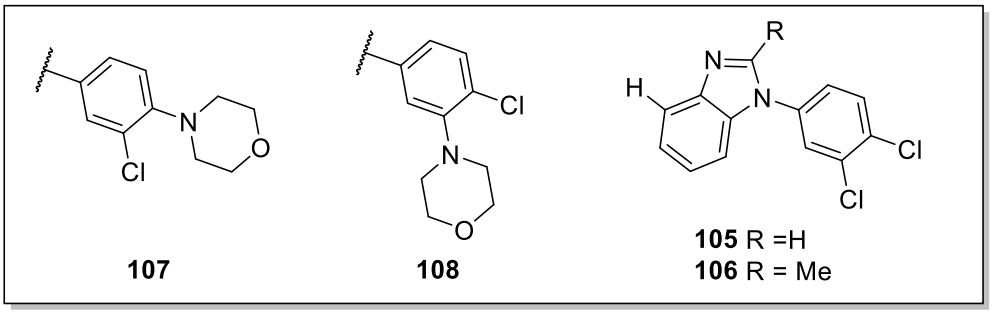
Reaktionsbedingungen: 1 Äq. **101**, 3 Äq. Aldehyd, 3 Äq. $Na_2(S_2O_4)$, [a] Ausbeute nach Flash-Chromatographie

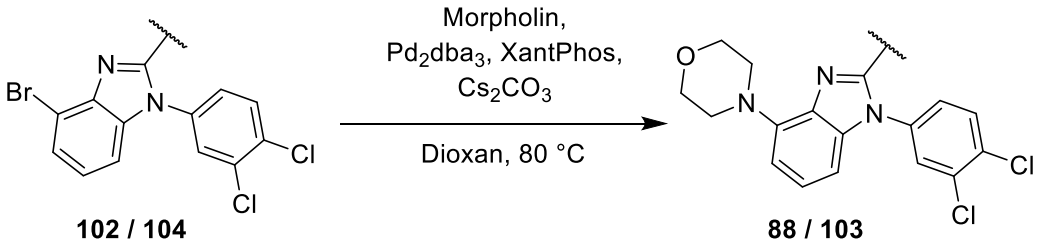
Die beiden Verbindungen **102** und **104** wurden anschließend in der Buchwald-Hartwig-Kupplung mit Morpholin eingesetzt. Dabei gestaltete sich die Reaktion in beiden Fällen als komplizierter im Vergleich zur Synthese des Indazols **87**. Die Kupplung von **102** zeigte nach 24 h bei 90 °C nur einen geringen Umsatz, sodass erneut 10 mol% Pd_2dba_3 und 10 mol% XantPhos hinzugegeben wurden. Nach weiteren 15 h konnte schließlich ein signifikanter Umsatz zum gewünschten Produkt **88** beobachtet werden.

Die Reaktion des Methylderivats **104** zeigte ebenfalls erst nach 36 h den Umsatz eines Großteils des Startmaterials. In beiden Reaktionen wurde zudem eine vermehrte Bildung der jeweiligen debromierten Nebenprodukt **105** und **106** detektiert (identifizierbar am Isotopenmuster in der LC/MS Reaktionskontrolle). Zusätzlich bildeten sich die beiden Regioisomere des Chlor-Kupplungs-Produkts **107** und **108**. Beide Reaktionen wurden deshalb abgebrochen (die

Reaktion von **102** nach 15 h nach erneuter Zugabe, Reaktion von **104** nach 36 h). Die Derivate **88** und **103** wurden mit niedriegen Ausbeuten von 20 % bzw. 14 % isoliert, was der Vielzahl an abzutrennenden Nebenprodukten geschuldet war (siehe Tabelle 15).

*Tabelle 15: Buchwald-Hartwig-Kupplung von **102** und **104** mit Morpholin. Zusätzlich beobachtete mehrfach substituierte Nebenprodukte im Kasten.*





Verbindung	R	Zeit [h]	Ausbeute [a]
88		39	20 % [b]
103		36	14 %

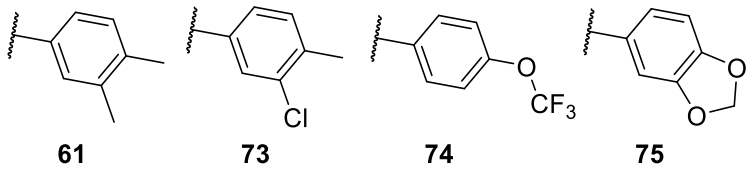
Reaktionsbedingungen: 1 Äq. Brombenzimidazol, 1,2 Äq. Morpholin, 10 mol% Pd_2dba_3, 10 mol% XantPhos, 2 Äq. Cs_2CO_3, [a] Ausbeute nach präparativer HPLC, [b] um einen hohen Umsatz zu erreichen, musste nach 24 h erneut 10 mol% Pd_2dba_3 und 10 mol% XantPhos hinzugegeben werden.

Der Unterschied zwischen den Benzimidazolen und dem Indazol in der Buchwald-Hartwig-Reaktion war bemerkenswert. Beide Grundgerüste sind aufgrund des fünfgliedrigen Heteroaromaten relativ elektronenreich. Ein Faktor könnte die Position des freien Elektronenpaares des zweiten Stickstoffs sein, der möglicherweise den Pd-Katalysator komplexieren und deaktivieren könnte. Mechanistische Studien könnten darüber Aufschluss liefern. Insgesamt verliefen die Reaktionssequenzen jedoch erfolgreich und es konnten drei weitere IMB0901-Derivate synthetisiert werden. In Folgeprojekten könnte allerdings die Buchwald-Hartwig-Kupplung der Benzimidazole optimiert werden.

3.2.5.4 Reportergen-Assay der Derivate der 3. Generation

Die insgesamt zehn Verbindungen der 3. Generation wurden ebenfalls in dem etablierten zellbasierten Assay vermessen (siehe Kapitel 3.2.3 für Details).

Für die Verbindungen mit einer Modifikation an R^1 zeichnete sich ein klares Bild: Die drei Derivate mit einer 3,4-Substitution am *N*-Aromaten wiesen alle eine sehr hohe Potenz (12 % **61**, 2 % **73** und 4 % **75**) auf, das 4-OCF_3-Phenyl-Derivat **74** war dahingegen gar nicht aktiv (siehe Abbildung 53).



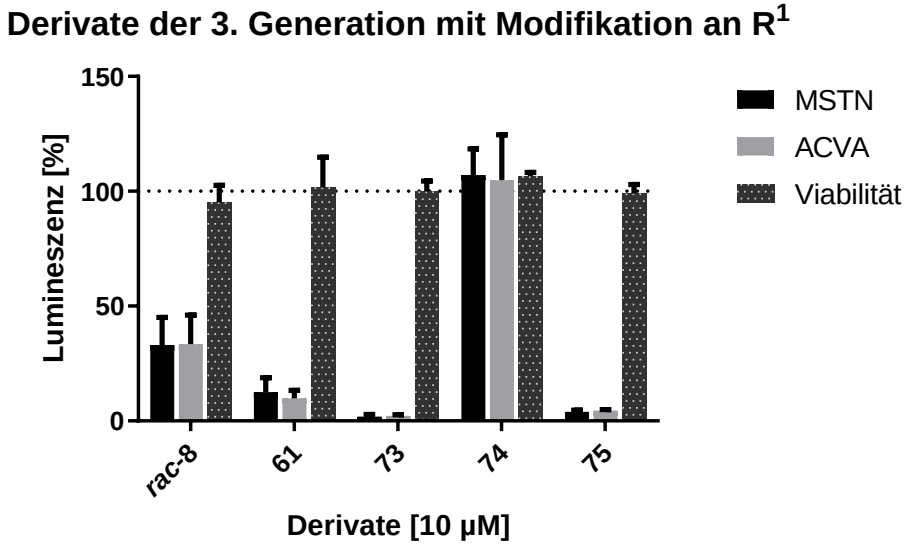


Abbildung 53: Inhibitions- und Viabilitätsdaten von IMB0901 und den Morpholinderivaten der 3.Generation mit einer Modifikation an R^1. Alle Verbindungen wurden in einer Konzentration von 10 µM vermessen, keine der Verbindungen wies einen signifikanten Unterschied in der Aktivität zwischen MSTN und ACVA auf.

Das 3,4-Dimethylphenyl-Derivat **61** war jedoch im direkten Vergleich weniger potent als **27** (3,4-Dichlorphenyl) und **73** (3-Chlor-4-Methylphenyl). Etwas überraschend war die sehr hohe Aktivität des Methylendioxy-Derivats **75**, vor allem im Vergleich mit der weniger potenten 4-Methoxyphenyl-Verbindung **37** und der nicht aktiven 4-OCF_3-Phenyl-Verbindung **74**.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der sterische Anspruch der Substituenten eine deutlich größere Rolle spielt, als die elektronische Situation, was vor allem zwischen **37** und **74** auffällt.

Vermutlich spielt die Länge und Rigidität des Substituenten ebenfalls eine Rolle, da das Methylendioxy-Derivat im Vergleich zu **37** eine rigidere Struktur und durch den Zyklus eine andere Geometrie besitzt. Generell scheint allerdings eine 3,4-Substitution mit einer 4-Substitution vergleichbar zu sein (siehe Abbildung 53).

Die dreifachsubstituierten Derivate scheinen auch einem klaren Trend in Bezug auf ihre Aktivität zu folgen. Verbindung **86** mit dem linearen Nitril-Substituenten war dabei am aktivsten (27 %) und zeigte eine vergleichbare Inhibition wie **(*S*)-8** (22 %), wobei es trotzdem deutlich weniger potent war als das nicht an R^3 substituierte Derivat **33** (~0 %). Das Methylamino-Derivat **84** war dahingegen deutlich weniger potent (47 %) und lag unterhalb der Aktivität von **(*R*)-8** (36 %) und das Dimethylamino-Derivat **85** zeigte keine Aktivität in diesem Assay.

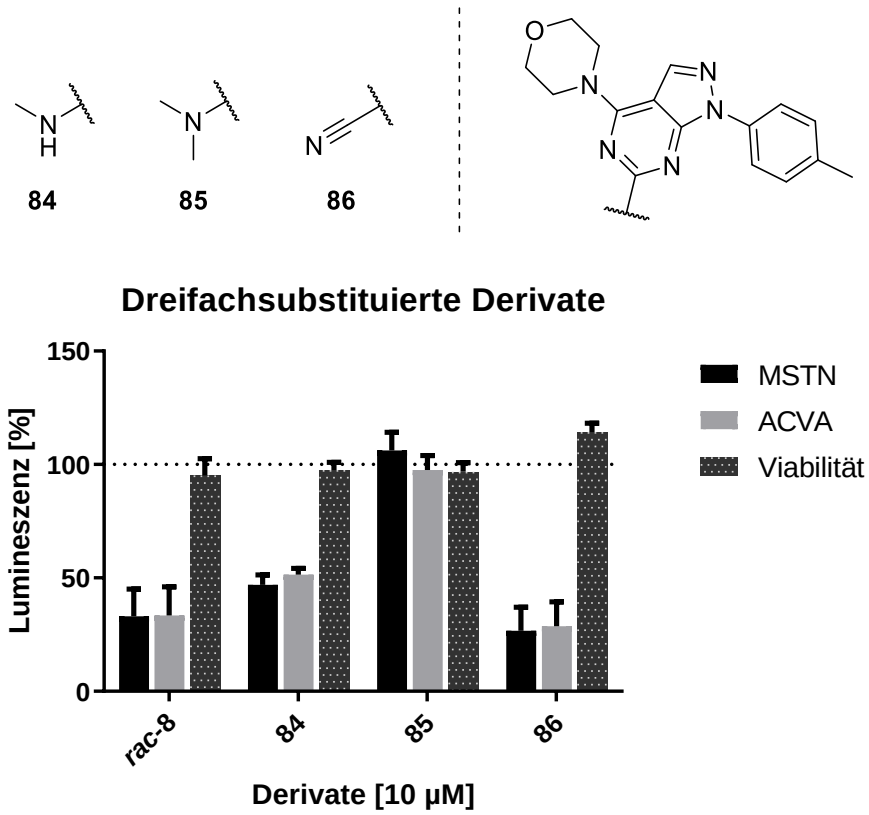
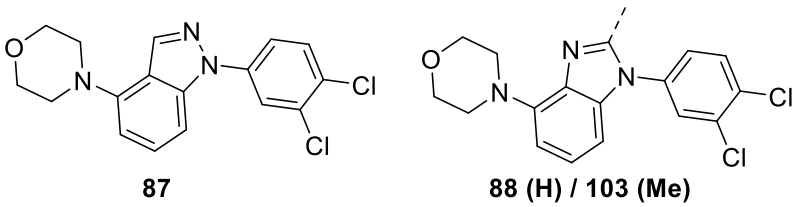


Abbildung 54: Inhibitions- und Viabilitätsdaten von IMB0901 und den dreifachsubstituierten Derivaten. Alle Verbindungen wurden in einer Konzentration von 10 µM vermessen. Keine der Verbindungen wies einen signifikanten Unterschied in der Aktivität zwischen MSTN und ACVA auf.

Alle Derivate büßten an Aktivität gegenüber **33** ein, Verbindung **86** mit dem linearen Nitril jedoch am wenigsten. Somit scheint an der R^3-Position ebenfalls der sterische Anspruch

ausschlaggebend zu sein. Die Methylamino-Gruppe scheint bereits zu groß zu sein, denkbar wäre jedoch, dass diese sich im gewissen Rahmen drehen könnte, um einen unvorteilhaften Kontakt zu reduzieren. Dies ist für die Dimethylamino-Gruppe nicht mehr möglich, wodurch die Aktivität vollständig verloren ging.

Die Benzimidazol-Derivate **88** und **103** zeigten keine, bzw. nur eine ganz niedrige inhibitorische Aktivität (**103** 86 %, **88** über 100 %). Das Indazol **87** war dahingegen deutlich aktiver (33 %) und war vergleichbar mit ***rac*-**IMB0901 (33 %). Diese Ergebnisse zeigten jedoch klar, dass das Pyrimidin wichtig für die Interaktion war, da die Verbindungen alle deutlich weniger potent waren wie das Vergleichsmolekül **27** (3 %). Zudem scheint die Position des zweiten Stickstoffs der Benzimidazole ungünstig zu sein, was aus dem Vergleich von **87** mit **88** ersichtlich wurde.



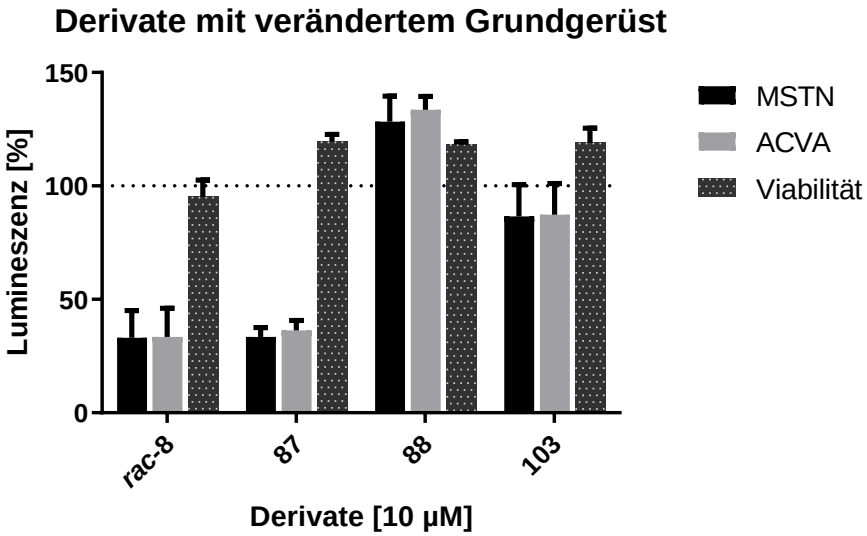
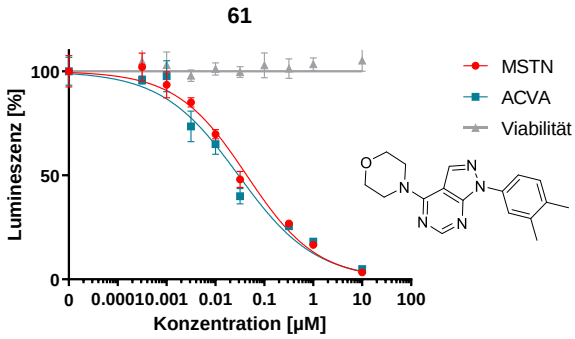


Abbildung 55: Inhibitions- und Viabilitätsdaten von IMB0901 und den Derivaten mit verändertem Grundgerüst. Alle Verbindungen wurden in einer Konzentration von 10 µM vermessen. Keine der Verbindungen wies einen signifikanten Unterschied in der Aktivität zwischen MSTN und ACVA auf.

Wie bei allen synthetisierten Verbindungen zeigte kein Derivat der 3. Generation eine Präferenz für MSTN oder ACVA. Zudem war keine der Substanzen zytotoxisch in diesem Assay. Nach

der primären Messung wurde für die potente Verbindung **61** der IC_{50}-Wert der Inhibition des MSTN- und ACVA-Signalwegs bestimmt (siehe Abbildung 53Abbildung 56).[12]



	MSTN	ACVA
IC50	0.0434	0.0295

*Abbildung 56: IC_{50}-Werte von Verbindung **61** für den MSTN-, den ACVA -Signalweg. In der Tabelle sind die Werte in µM angegeben. Es konnte kein signifikanter Unterschied für eines der Derivate in Bezug auf einen Wachstumsfaktor beobachtet werden.*

Mit IC_{50}-Werten im Bereich von ~30-44 nM war diese Verbindung um einen Faktor 8-10 mal weniger aktiv als das 3,4-Dichlorphenyl-, das 4-Methylphenyl- und das 4-Chlorphenyl-Derivat (**27**, **33** und **35**) und war vergleichbar mit dem Cyclohexylamin-Derivat **57**. Im Gegensatz zu **57** wies Verbindung **61** jedoch keine ausgeprägte Zytotoxizität bei 10 µM auf. Weiterhin zeigte sich anhand dieser Daten, dass das 3,4-Dichlorsubstitutionsmuster dem 3,4-Dimethylsubstitutionsmuster überlegen war und somit das Chloratom an der 3-Position spezifische Interaktionen ausbildet, welche eine Methylgruppe nicht ausbilden kann.

Mit der primären biologischen Evaluation dieser Serie wurde das IMB0901-Projekt vorerst abgeschlossen. Nachfolgend werden die synthetisierten Verbindungen dargestellt und die bisherigen Einblicke in die SAR kurz zusammengefasst.

[12] Die IC_{50}-Werte der potenten Verbindungen **73** und **75** konnten nicht mehr vor dem Ausscheiden von Dr. Viktoria Marquardt aus diesem Projekt erhoben werden.

3.2.6 Übersicht über die synthetisierten IMB0901 Derivate

Insgesamt wurden im IMB0901-Projekt 37 Verbindungen über verschiedene Routen synthetisiert. In den einzelnen Serien lag der Fokus dabei auf unterschiedlichen Substituenten und auf einem veränderten Grundgerüst mit Indazol- oder Benzimidazolkern (siehe Abbildung 57).

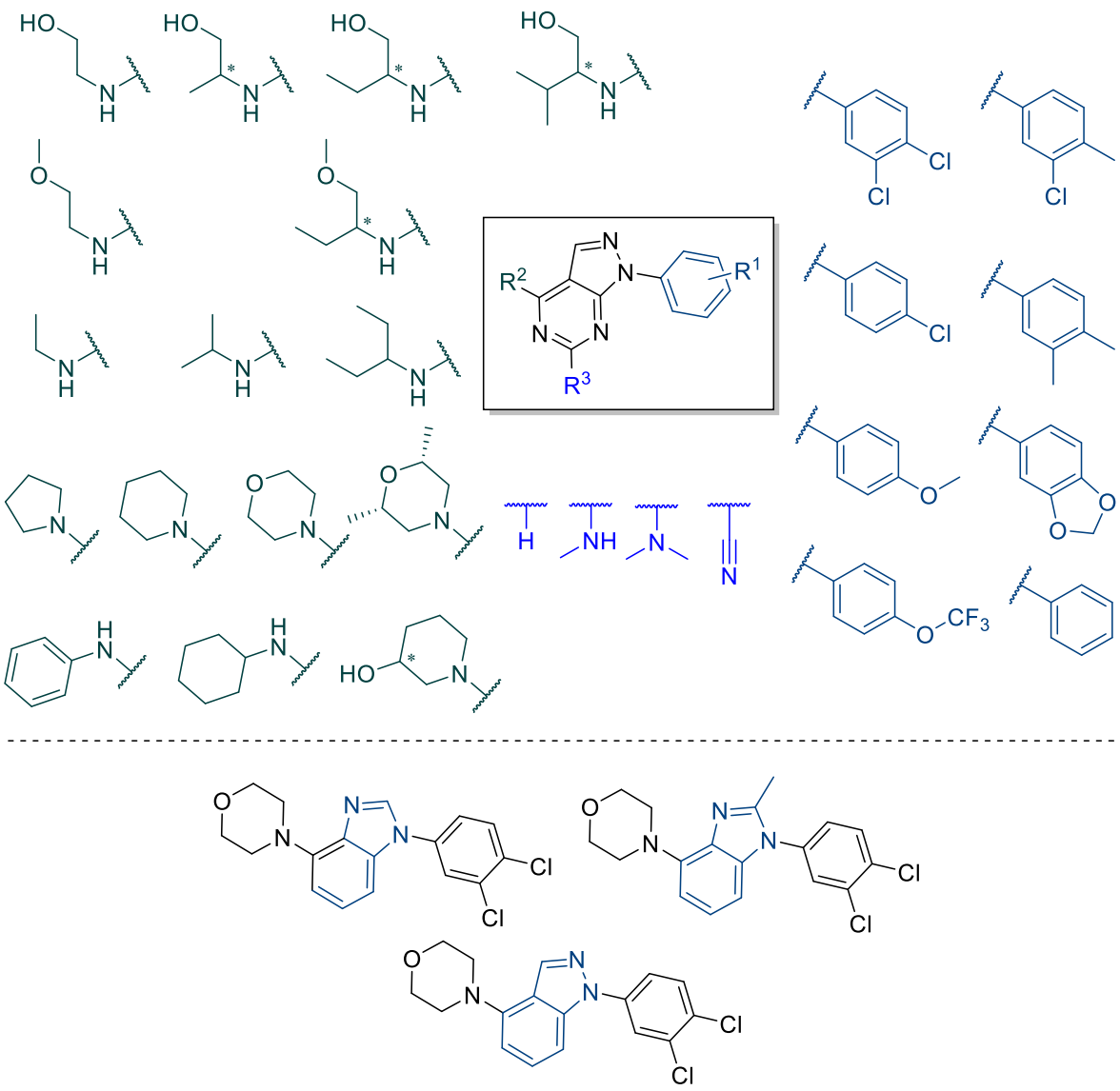


Abbildung 57: Oben: Übersicht über die verschiedenen Modifikationen am [3,4]-Pyrazolopyrimidinkern, die in diesem Projekt synthetisiert wurden. Die meisten Derivate wiesen an R^1 den 3,4-Dichlorphenylrest auf, an R^2 den Morpholinrest und an R^3 keine Substituenten. Insgesamt wurden 34 Kombinationen aus diesen Substituenten synthetisiert. Unten: Die drei synthetisierten Derivate mit verändertem Grundgerüst.

Die Daten des primären Reportergen-Assays deuteten auf eine relativ klare Struktur-Wirkungs-Beziehung hin: an R^1 waren 3- oder 3,4-disubstituierte Aromaten am aktivsten, wobei die Cl- oder Me-Substituenten von Vorteil waren, zusätzlich war das 3,4-Methylendioxyphenyl sehr aktiv; an R^2 waren sechsgliedrige Ringe favorisiert, wobei die Polarität eine nachgeordnete Rolle zu spielen schien; an R^3 wurde eindeutig, dass die Verbindungen mit einem Wasserstoff an dieser Position am aktivsten waren (siehe Abbildung 58).

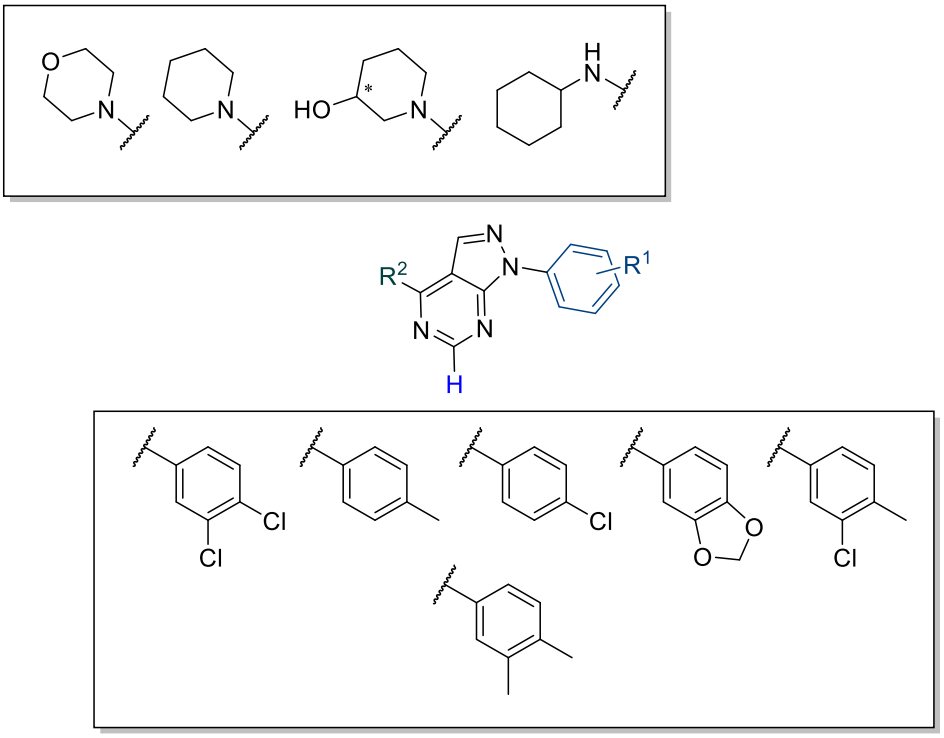


Abbildung 58: Übersicht über die möglichen SAR der [3,4]-Pyrazolopyrimidine, im Kasten sind die jeweiligen Substituenten R^1 und R^2, welche den Derivaten eine hohe Aktivität im primären Assay verliehen haben.

Die weitergehende Analyse der vielversprechendsten Verbindungen ist in Kapitel 3.4 beschrieben.

Im Anschluss soll nun das NUCC-555-Projekt betrachtet werden.

3.3 Synthese von Benzimidazolverbindungen[13]

Wie bereits in Kapitel 1.7 erläutert, diente NUCC-555 (**7**) als zweite Referenzverbindung für dieses Projekt. Woodruff *et al.* publizierten jedoch keine Synthese für diese Verbindung und genau wie bei IMB0901 (**8**) war keine Synthese in SciFinder® zu finden. Allerdings sind substituierte Benzimidazole, wie NUCC-555 (**7**), häufig auftretende Strukturmotive in der Medizinischen Chemie, weshalb viele synthetische Zugänge bekannt sind (Beispiele siehe Abbildung 59).

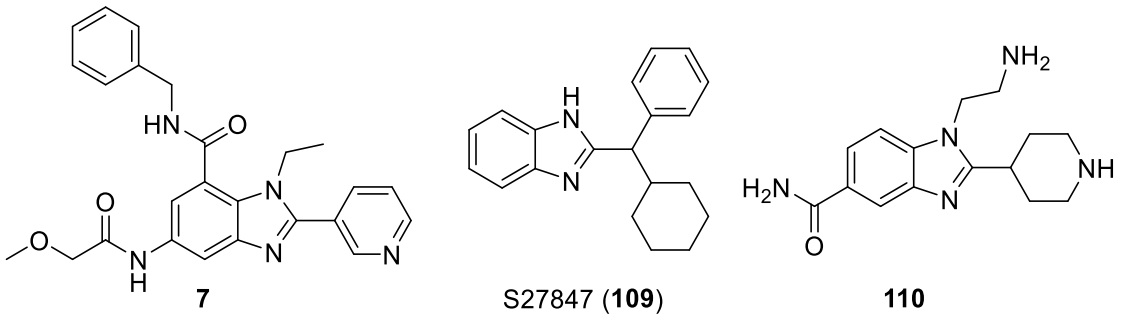
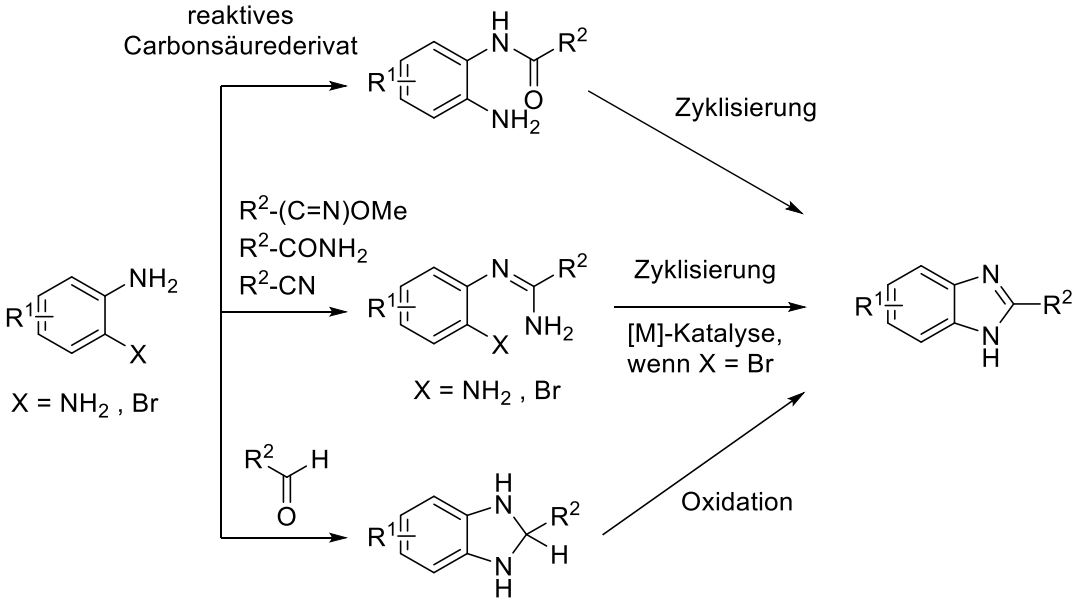


*Abbildung 59: Benzimidazole als Wirkstoffe: NUCC-555 (**7**), S27847 (**109**, ein AMP-Kinase-Aktivator)[251] und **110** (ein JAK1-Inhibitor)[252]*

Zur Synthese wird oftmals von einem Benzolring mit einer 1,2-Stickstoff-Substitution ausgegangen. Meistens erfolgt die Zyklisierung über zwei Schritte: zunächst die Bindung eines aktivierten Carbonsäurederivats (Anhydrid, Carbonsäurechlorid, reaktive Ester oder durch Kupplungsreagenz aktivierte Carbonsäure) an einen der Stickstoffe und darauffolgend die Zyklisierung unter Verlust von Wasser. Zudem können auch Nitrile oder Imidate für die Kupplung und Zyklisierung eingesetzt werden. Daneben ist auch die Reaktion eines 2-Brom-Anilins denkbar, welches über eine Übergangsmetall-katalysierte Reaktion zyklisiert werden könnte. Zusätzlich können Aldehyde zu einem Aminal kondensiert werden, woraufhin sich anschließend das aromatische System durch Oxidation bildet.

[13] Obwohl das NUCC-555 Projekt zeitlich vor dem IMB0901 Projekt startete (IMB0901 wurde erst nach dem Start dieser Arbeit publiziert) wurden die [3,4]-Pyrazolpyrimidine in den Fokus gestellt, da diese als Inhibitoren von MSTN und nicht ACVA publiziert wurden. Die Entwicklung und Etablierung der biologischen Assays fand parallel zu der Synthese der Derivate statt. Die IMB0901 Derivate wurden anschließend bevorzugt getestet, sodass erste Ergebnisse für diese bereits vorlagen, bevor die NUCC-555 Derivate getestet wurden.

Je nach Reaktionsbedingungen kann die Reaktion in einem One-Pot-Verfahren erfolgen oder die entstandenen Intermediate könnten vor der Zyklisierung isoliert werden, wobei generell erhöhte Temperaturen für die Zyklisierungsreaktionen notwendig sind (siehe Schema 31).[253]



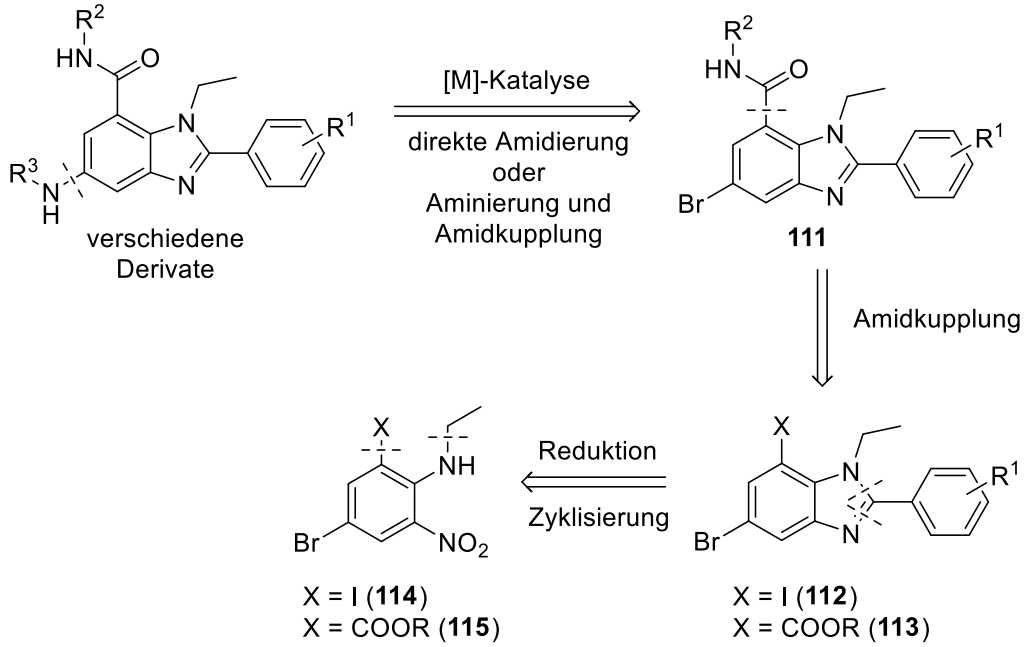
Schema 31: Synthetischer Zugang zu substituierten Benzimidazolen ausgehend von Anilinen. Die Zyklisierung kann entweder über zwei Stufen verlaufen (Erste Stufe: Addition eines Carbonsäurederivates o.ä., zweite Stufe: Zyklisierung) oder in einem One-Pot-Verfahren (oben und mitte). Darüber hinaus sind die Bildung eines Aminals und folgende Oxidation/Eliminierung denkbar (unten).[253] (modifiziert)

Um eine möglichst modulare Syntheseroute zu erhalten, könnte ein am Benzolring doppelt substituiertes Benzimidazolderivat als Schlüsselintermediat dienen, welches über eine der beschriebenen Methoden aufgebaut wird. Dadurch könnten der „nördliche" Rest R^2 und der „westliche" Substituent R^3 am Ende der Sequenz eingefügt werden, was eine große Vielfalt an Verbindungen ermöglicht.

Retrosynthetisch betrachtet könnte der „westliche" Substituent durch eine Kopplung mit einem entsprechenden Brombenzimidazol (**111**) synthetisiert werden. Das „nördliche" Amid von NUCC-555 (**7**) könnte entweder durch Addition eines Elektrophils an eine Aryl-Organometallverbindung oder durch eine Amidkupplung gebildet werden. Das Schlüsselintermediat könnte somit aus einem Brom-Iod-Benzimidazol (**112**) oder einem Brom-Carboxy-Benzimidazol (**113**) bestehen.

Damit die Etylierung selektiv ablaufen kann, sollte statt eines 1,2-Diaminobenzols ein Nitroanilin eingesetzt werden, welches zuerst an der richtigen Position alkyliert und

anschließend reduziert werden könnte. Als entsprechende Vorstufen könnten die Nitroaniline **114** und **115** dienen, die mit variierenden Carbonsäurederivaten zum Benzimidazol zyklisiert werden könnten (siehe Schema 32).

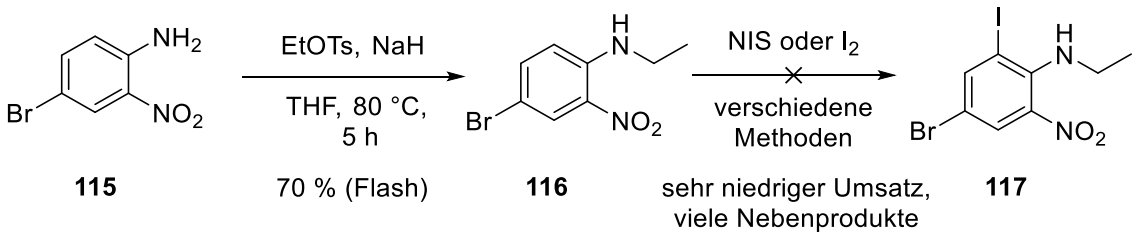


*Schema 32: Retrosynthetische Analyse von NUCC-555 Derivaten. Um eine möglichst modulare Syntheseroute zu erhalten, sollte die Synthese über ein einfach zu derivatisierendes Schlüsselintermediat verlaufen. Dieses könnte entweder **112** (X = I) oder **113** (X = COOH) sein. Die finale Reaktion könnte entweder aus einer direkten Übergangsmetall-katalysierten Amidierung oder einer zweistufigen Aminierung mit nachfolgender Amidkupplung bestehen.*

3.3.1 Resynthese von NUCC-555

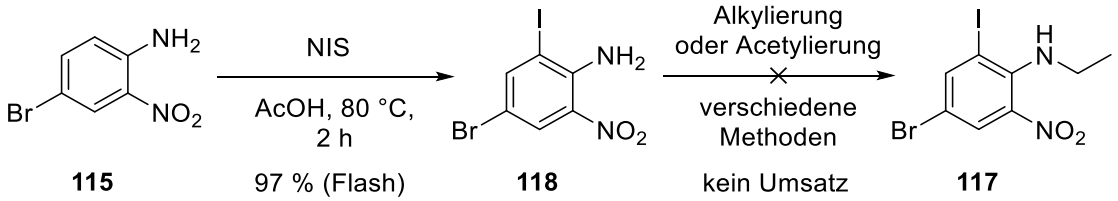
Da beide Schlüsselintermediate Vorteile in Bezug auf die Synthese möglicher Derivate boten, sollten beide Optionen getestet werden.

In einem ersten Versuch wurde von kommerziell erhältlichem 4-Bromo-2-Nitroanilin (**115**) ausgegangen, welches zunächst iodiert und dann *N*-alkyliert werden sollte. Dazu wurde **115** mit NaH deprotoniert und anschließend mit Ethyltosylat zu **116** alkyliert. Die anschließenden Versuche **116** zu iodieren (N-Iodsuccinimid (NIS) in AcOH, NIS/TFA in ACN, I_2/$AgSO_4$ in EtOH)[254–256] schlugen allerdings fehl und zeigten jeweils nur einen sehr geringen Umsatz zum Produkt **117**, welches jedoch nicht isoliert werden konnte (siehe Schema 33).



*Schema 33: Reaktionsequenz ausgehend von **115**. Die Alkylierung von **115** verlief erfolgreich, die anschließende Iodierung von **116** verlief hingegen nicht erfolgreich. Dazu wurden verschiedene Methoden getestet: N-Iodsuccinimid, AcOH, 80 °C; NIS/TFA, ACN, 80 °C; $I_2/AgSO_4$, in EtOH.*

Deshalb wurde die Sequenz anschließend in umgekehrter Reihenfolge getestet. Nach der erfolgreichen Iodierung von **115** mit NIS in AcOH bei 80 °C war es jedoch in der folgenden Reaktion wiederum nicht möglich **118** zu alkylieren. Weder eine reduktive Aminierung mit Acetaldehyd und $NaBH_4$ oder $NaCNBH_3$, eine Alkylierung mit EtOTs und NaH in DMF noch eine Acetylierung mit AcCl in CH_2Cl_2 mit DMAP und Et_3N waren erfolgreich und lieferten, wenn überhaupt, nur einen minimalen Umsatz (siehe Schema 34).[257–259] Anscheinend hatten die jeweiligen Substituenten einen zu hohen sterischen Anspruch, sodass die zweite Reaktion in *ortho*-Position nicht stattfinden konnte.



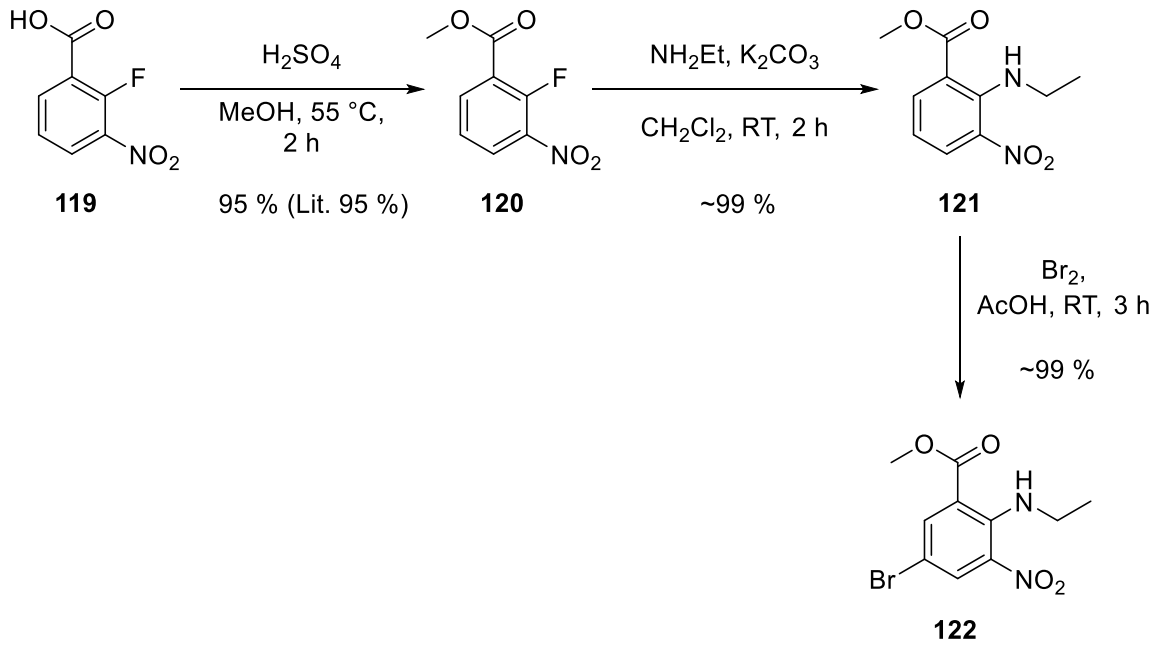
*Schema 34: Zweiter Versuch zur Synthese von **117**. Verbindung **118** konnte mit einer Ausbeute von 97 % isoliert werden. Zur Alkylierung wurden verschiedene Methoden erfolglos getestet: Acetaldehyd in THF und $NaBH_4$ oder $NaCNBH_3$, EtOTs und NaH in DMF, AcCl in CH_2Cl_2 mit DMAP und Et_3N.*

Entsprechend wurde diese Syntheseroute nicht mehr weiterverfolgt und stattdessen die Route zu Schlüsselintermediat **113** in den Fokus gerückt. Dazu wurde zunächst 2-Fluor-3-Nitro-Benzoesäure (**119**) in einer Fischer-Veresterung entsprechend Ren *et al.* mit Methanol und H_2SO_4 unter Reflux zu **120** verestert.[260]

Der nächste Schritt zu NUCC-555 (**7**) bestand aus einer S_NAr Reaktion von **120** mit $EtNH_2$. Diese Reaktion startete unverzüglich mit dem ersten Tropfen methanolischer $EtNH_2$-Lösung und ließ sich durch den Farbumschlag von blassgelb (**120**) zu kräftig orange (**121**) sehr gut

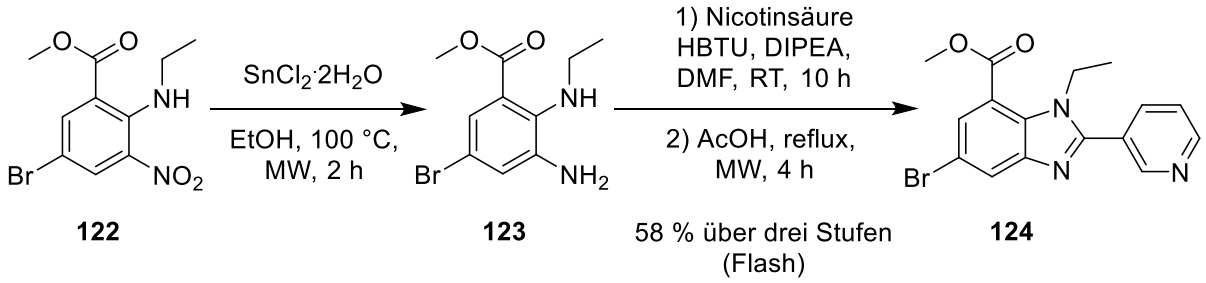
beobachten. Anschließend wurde **121** angelehnt an Aktoudianakis *et al*. in 5-Position mit elementarem Br_2 in AcOH bromiert (siehe Schema 35).[261]

Da das Intermediat **122** zur Synthese aller NUCC-555 Derivate mit einer Ethylseitenkette am Imidazol genutzt werden konnte, wurde es in einem größeren Maßstab (30 mmol) synthetisiert. Die Gesamtausbeute aus diesen drei Schritten lag dabei bei 95 %, wobei keine chromatographische Reinigung der Intermediate notwendig war, da alle Produkte nach der Aufarbeitung in hoher Reinheit erhalten wurden.



*Schema 35: Erfolgreiche Synthese von **122**. Diese Sequenz konnte ebenfalls auf einen 30 mmol Maßstab skaliert werden, wobei keine chromatographische Reinigung notwendig war und das Produkt mit einer exzellenten Ausbeute von 95 % über drei Stufen isoliert wurde.[260]*

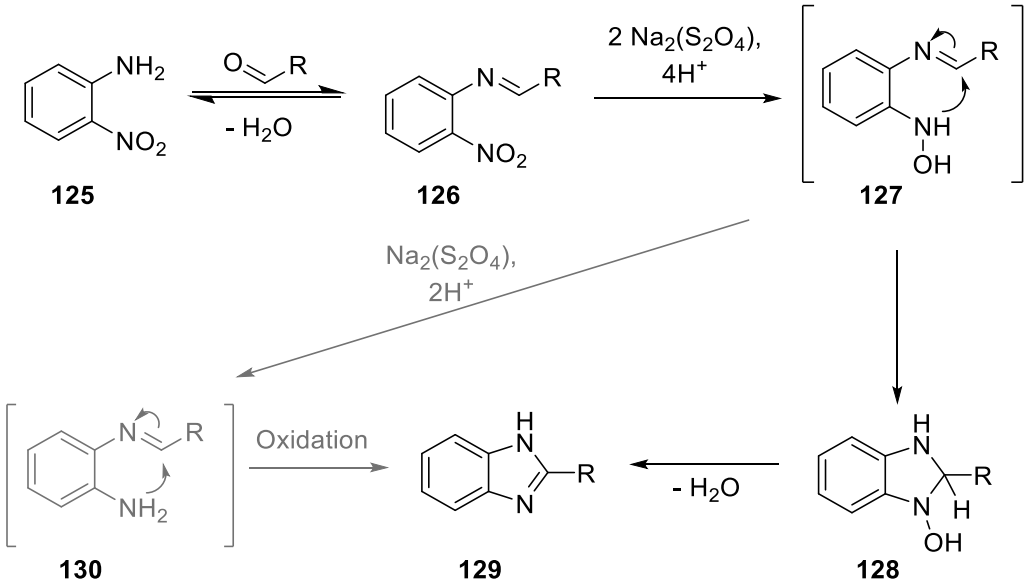
Vor der Zyklisierung zum Schlüsselintermediat **113** wurde zunächst der Literatur von Uslu *et al.* folgend die Nitrogruppe von **122** mit $SnCl_2 \cdot 2\ H_2O$ in EtOH reduziert.[262] Anschließend wurde aus **123** zunächst das intermediäre Nicotinsäureamid *via* Kupplung mit HBTU und DIPEA synthetisiert, welches, nach Entfernen von DMF *in vacuo*, in AcOH in der Mikrowelle zyklisierte. Benzimidazol **124** konnte mit einer Ausbeute von 58 % über drei Stufen (zwei davon One-Pot) chromatographisch isoliert werden (siehe Schema 36).



*Schema 36: Zyklisierung von **122** zu Benzimidazol **124**. Das Diamin **123** wurde nach der Reduktion mit einer Rohausbeute von 94 % isoliert und ohne Reinigung in der Zyklisierungsreaktion eingesetzt.*

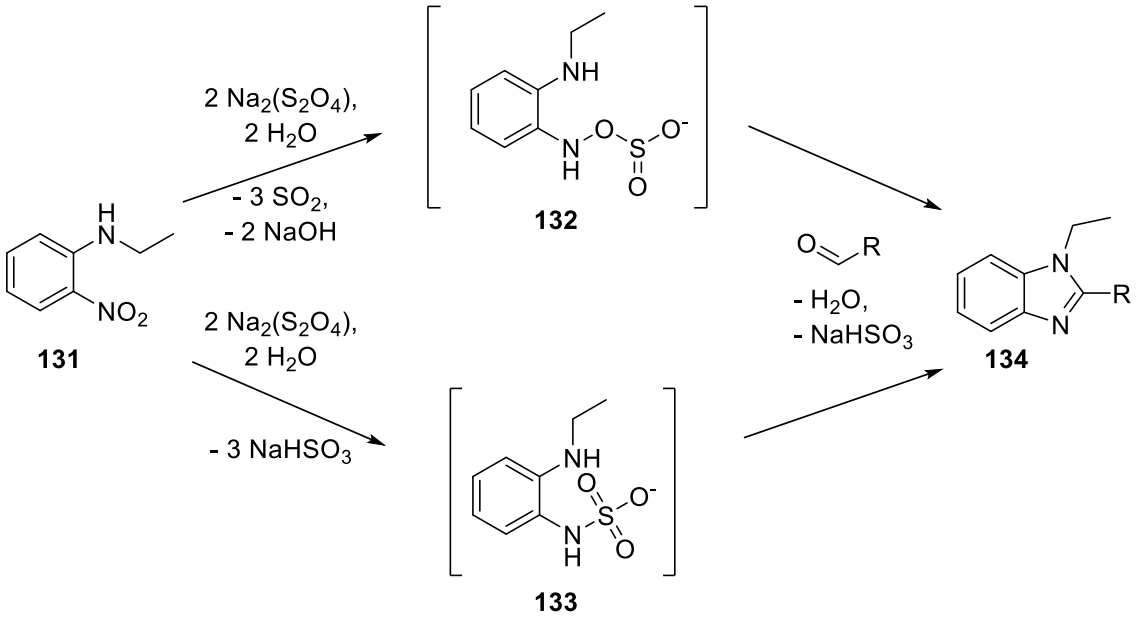
Obwohl die Synthese erfolgreich verlief, wurde aufgrund der drei sequenziellen Stufen nach einer alternativen Reaktion gesucht, um das Schlüsselintermediat **113** auf einem schnelleren Weg zu erhalten. Eine One-Pot-Reaktion zum Aufbau von substituierten Benzimidazolen direkt aus 2-Nitroanilinen schien als alternative Methode geeignet zu sein.[253,263–266] Vor allem Yang *et al.* erweiterten den Anwendungsbereich dieser Reaktion und führten ein rigoroses Screening zur Identifikation der besten Bedingungen durch.[253] Die Reduktion der Nitrogruppe findet dabei *in situ* unter sehr milden Bedingungen mit Natriumdithionit ($Na_2S_2O_4$) statt, sodass neben Carboxygruppen auch Halogensubstituenten toleriert werden. Der genaue Mechanismus ist nicht vollständig aufgeklärt und scheint vom Substituenten am Amin abzuhängen.

Yang *et al.* gehen für nicht *N*-alkylierte Verbindungen (**125**) von einer initialen Iminbildung aus, anschließend erfolgt eine Vier-Elektronen-Reduktion der Nitrogruppe zu einer Hydroxylaminogruppe. Als nächster Schritt erfolgt nun eine Zyklisierung zum *N*-Hydroxy-Benzimidazolin (**127**), welches nach Wasserabspaltung zum Benzimidazol (**128**) aromatisiert (siehe Schema 37). Daneben wäre es ebenfalls möglich, dass die Hydroxylamingruppe vor der Zyklisierung zur Aminogruppe weiter zu **129** reduziert wird und diese anschließend den Iminkohlenstoff angreift. Das daraus resultierende Imidazolin müsste anschließend oxidiert werden, was jedoch unter den reduktiven Bedingungen der Reaktion als unwahrscheinlicher erscheint.



Schema 37: Vorgeschlagener Mechanismus der reduktiven Zyklisierung von Nitroanilinen zu Benzimidazolen von Yang et al. Bei nicht alkylierten Anilinen bildet sich zunächst das Imin, welches nach Reduktion zum Hydroxylamin zyklisiert und unter Wasserabspaltung aromatisiert. In grau: Daneben wäre es möglich, dass die Hydroxylaminogruppe weiter reduziert wird und das entsprechende Dianilin zum Benzylimidazolin zyklisiert. Dieses würde anschließend zum Benzimidazol oxidieren, was unter den reduktiven Reaktionsbedingungen unwahrscheinlicher erscheint.[253] (modifiziert)

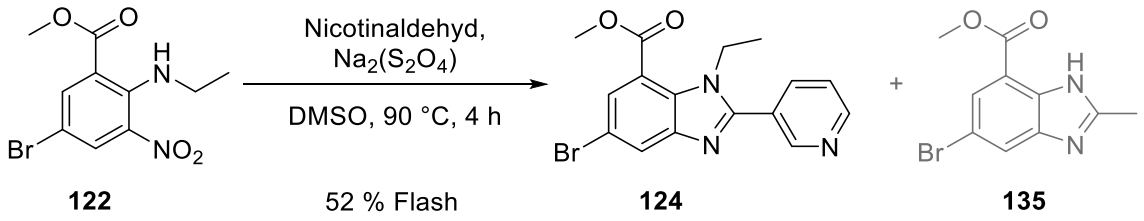
Für *N*-alkylierte 2-Nitroanilinverbindungen (**131**) gingen Kumar *et al.* und Oda *et al.* allerdings davon aus, dass zunächst die Nitrogruppe reduziert wird (siehe Schema 38).[263,265]



Schema 38: Für N-alkylierte Nitroaniline konnte bestätigt werden, dass zunächst die Reduktion und anschließend die Iminbildung stattfindet. Oberer Mechanismus nach Kumar et al.: Die Reaktion verläuft über ein O-Amino-Sulfit-Intermediat, welches mit dem Aldehyd zum Imin reagiert und anschließend unter Abspaltung von $NaHSO_3$ zyklisiert (oberer Weg).[263] (modifiziert) Unterer Mechanismus nach Oda et al.: Es bildet sich das Amidosulfonsäure-Derivat, das ebenfalls nach der Iminbildung unter Abspaltung von $NaHSO_3$ zyklisiert (unterer Weg).[265] (modifiziert)

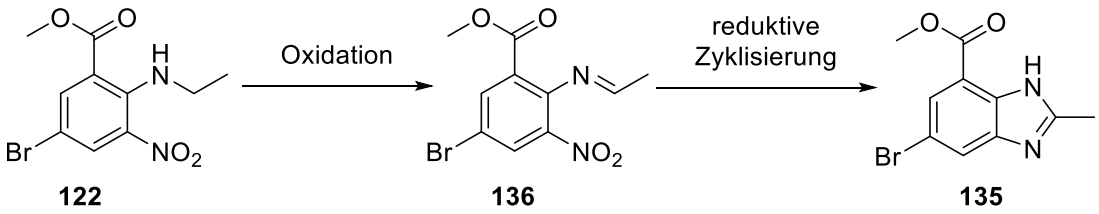
Das Stickstoffatom der reduzierten Gruppe ist dabei an ein Oxidationsprodukt des Dithionits gebunden. Kumar *et al.* gehen in ihrem empirisch entwickelten Mechanismus von einem *O*-Amino-Sulfit (**132**) aus, wobei die Oxidationsstufe des Schwefels bei IV lag, Oda *et al.* von einer Amidosulfonsäure (**133**) mit der S-Oxidationsstufe VI.[263,265] Erst im Anschluss bildet sich das Imin zwischen der Aminogruppe und dem Aldehyd, welches daraufhin zyklisiert und unter Abspaltung von $NaHSO_3$ zum Benzimidazol (**134**) aromatisiert.

Zur Synthese von Intermediat **113** wurden diese Bedingungen mit Nitroanilin **122** und Nicotinaldehyd getestet. Die Reaktion konnte sehr gut optisch verfolgt werden, da sich die Reaktionslösung von tieforange (Farbe des Nitroanilins **122**) mit fortlaufender Dauer entfärbte. Neben dem Produkt konnte eine Hauptverunreinigung mit m/z von 269 und 271 detektiert werden, welche sich weder durch Waschen mit NH_4Cl-Lösung, noch säulenchromatographisch vollständig abtrennen ließ. Das Nebenprodukt konnte allerding angereichert werden und anhand des NMR-Spektrums als 5-Bromo-2-Methyl-1*H*-Benzo[*d*]Imidazol-7-Methylester (**135**) identifiziert werden (siehe Schema 39). Die reinen Fraktionen von **124** ergaben eine Ausbeute von 52 %.



*Schema 39: Testansatz zur reduktiven Zyklisierung von **122** zu **124**, wobei sich ebenfalls Nebenprodukt **135** bildete. Die Separation mittels Flash-Chromatographie war nicht vollständig möglich, die vereinigten reinen Fraktionen ergaben eine Ausbeute von 52 % für **124**.*

Das Nebenprodukt könnte durch einen (radikalische) Oxidationsprozess entstanden sein, da sich durch die Oxidation des Stickstoffs ein Ethylimin bilden könnte, welches entsprechend des oben genannten Mechanismus zum Benzimidazol **135** zyklisiert (vgl. Schema 40). Radikalische Oxidationsprozesse wären dabei wahrscheinlich, da das Dithionit relativ leicht in zwei Schwefelradikale zerfallen kann. Zur Überprüfung wurde eine Testreaktion angesetzt, in welcher kein Aldehyd hinzugefügt wurde und in der nach 5 h bei 90 °C in DMSO in der Reaktionskontrolle mittels LC/MS die Bildung des Nebenprodukts beobachtet werden konnte.



*Schema 40: Vorgeschlagener Mechanismus zur Bildung von Nebenprodukt **135**. Durch Oxidationsprozesse könnte die C-N-Doppelbindung entstehen, welche über den zuvor genannten Mechanismus zyklisieren könnte.*

Durch weitere Optimierung der Reaktion in Bezug auf den Maßstab, die Konzentration und die eingesetzten Äquivalente des Aldheyds konnte die Bildung von **135** fast vollständig unterdrückt werden (Verhältnis in der Reaktionskontrolle zwischen **124** und **135** von 91:9 (254 nm) bzw. 96:4 (280 nm), siehe Tabelle 16). Zusätzlich konnte der Anteil des Nebenprodukts im Rohprodukt durch mehrmaliges Waschen mit NH_4Cl-Lösung noch weiter reduziert werden.

*Tabelle 16: Übersicht über die Optimierung der Reaktionsbedingungen der reduktiven Zyklisierung von **122** zu **124**.*

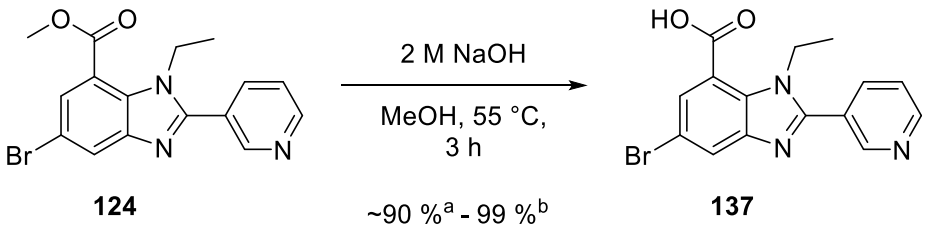
Maßstab [mmol]	Äq. Aldehyd	Konzentration [M]	Verhältnis [a] **124** : **135**	Rohausbeute [b]
0,1	1,1	0,1	69:31 (254 nm) 85:15 (280 nm)	83 % (52 % [c])
0,5	1,1	0,1	77:23 (254 nm) 88:12 (280 nm)	97 % (43 % [c])
0,66	1,5	0,2	91:9 (254 nm) 96:4 (280 nm)	96 %

[a] Verhältnis der Peak-Integrale im LC/MS-Spektrum, [b] Rohausbeute bezogen auf **124**, [c] Ausbeute nach Flash-Chromatographie. Das Nebenprodukt eluierte mit einem sehr breiten Peak und war somit in vielen Fraktionen vorhanden. Dadurch wurde die Reinigung erschwert und nur reine Fraktionen wurden zusammengeführt.

Da die Nebenreaktion unter diesen Bedingungen nur im begrenzten Maße stattfand und **135** in der folgenden Hydrolyse nicht stören sollte, wurde aufgrund der hohen Polarität der Verbindungen und der schwierigen chromatographischen Abtrennung des Nebenprodukts keine Chromatographie durchgeführt und **124** direkt weiter eingesetzt.

Die Hydrolyse von **124** mit 2 M NaOH in MeOH gestaltete sich als unkompliziert. Lediglich bei der Extraktion war darauf zu achten, dass der pH-Wert auf ~3 eingestellt wurde, da ansonsten das Produkt als Ion vorlag. Bei diesem pH-Wert war es zudem möglich, das Hydrolyseprodukt von **135** zum Großteil abzutrennen, wodurch die Carbonsäure **137** in hoher

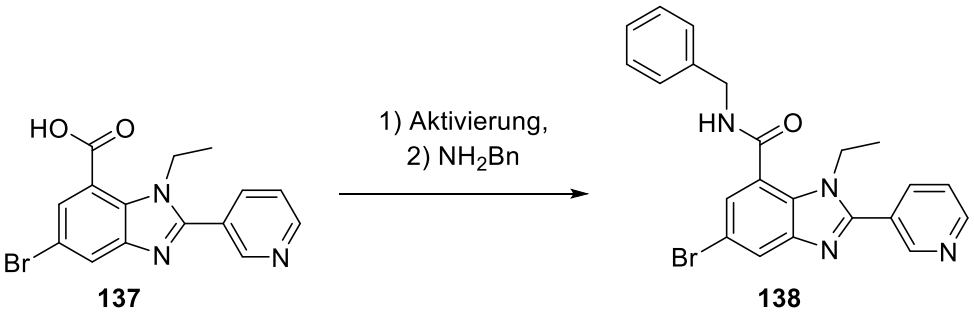
Reinheit isoliert werden konnte. Die Ausbeute betrug zwischen 90 und ~99 %, abhängig davon, ob gereinigtes Edukt oder Rohprodukt von **124** verwendet wurde (siehe Schema 41).



*Schema 41: Hydrolyse des Ester **124** zur freien Säure **137**. [a] Die Reaktion wurde mit Rohprodukt aus der vorherigen Reaktion durchgeführt. Durch die Extraktion bei pH = 3 konnte das Nebenprodukt aus der vorherigen Reaktion annähernd vollständig abgetrennt werden, [b] Die Reaktion wurde mit gereinigtem Edukt durchgeführt*

Zur Bildung des „nördlichen" Amids standen im Anschluss eine Reihe von Methoden zur Verfügung. Die Kupplung von **137** mit $BnNH_2$ nach Aktivierung mit 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-Tetramethyluronium-Hexafluorophosphat (HBTU) und DIPEA in DMF verlief zwar vollständig, nach der Reinigung wurde allerdings eine Ausbeute von nur 21 % isoliert, da die Abbauprodukte der Kupplungsreagenzien nur schwer abtrennbar waren. Durch den Einsatz von 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDCI·HCl) statt HBTU konnte die Ausbeute auf 64 % nach chromatographischer Reinigung gesteigert werden. Die erfolgreichste Reaktion war jedoch die Kupplung des Säurechlorids von **137** mit $BnNH_2$ (siehe Tabelle 17).

*Tabelle 17: Verschiedene Methoden zur Kupplung von **137** mit $BnNH_2$.*



Aktivierungsreagenz	Lösemittel	Base	Temperatur	Zeit [h]	Ausbeute
HBTU	DMF	DIPEA	0 °C – RT	18 h	21 % [a]
EDCI	DMF	DIPEA	0 °C – RT	18 h	64 % [a]
$(COCl)_2$/DMF	CH_2Cl_2	-	RT	18 h	83 - 95 % [b]

[a] Ausbeute nach Flash-Chromatographie, [b] Rohausbeute, das Produkt wies jedoch ebenfalls eine hohe Reinheit durch das Waschen mit ges. NH_4Cl- und ges. $NaHCO_3$-Lösung auf.

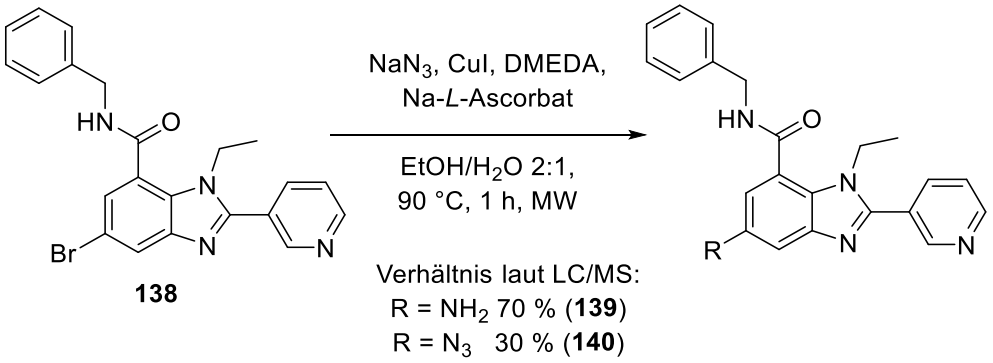
Die vollständige Umwandlung zum Säurechlorid konnte durch die Bildung des Methylesters **124** in der Reaktionskontrolle verfolgt werden. Da das $BnNH_2$ gleichzeitig als Base in dieser Reaktion eingesetzt wurde, bildeten sich praktisch keine Nebenprodukte, weshalb **138** nach dem sauren und basischen Waschen bereits in guter Reinheit und Ausbeuten zwischen 83 % und 95 % isoliert werden konnte.

Zum finalen Produkt fehlte nun noch die Bildung des „westlichen" Amids. Dazu sollte zuerst ein Amin an der 5-Position des Benzimidazols **138** eingeführt werden, welches anschließend mit Methoxyessigsäure zum Zielmolekül **7** umgesetzt werden sollte. Eine derartige Aminierung eines Heterozyklus´ könnte durch eine Pd- oder Cu-katalysierte Reaktion erfolgen, die z.B. Benzophenonimin (bei Pd-katalysierter Reaktion)[267,268] oder NH_4OH bzw. NaN_3 (bei Cu-katalysierter Reaktion)[269,270] als Stickstoffquelle verwendete. Benzimidazole als elektronenreiche Aromaten sind in diesem Kontext jedoch anspruchsvolle Substrate und reagieren häufig schlechter in Übergangsmetall-katalysierten Kupplungen, da eine oxidative Addition langsamer verläuft als bei elektronenarmen Aromaten.[271] Zudem kann das basische Stickstoffmolekül des Hetereoaromaten die eingesetzten Metallkatalysatoren komplexieren und dadurch inaktivieren. Darüber hinaus sollten aufgrund einer potentiellen Hydrolyseempfindlichkeit des „nördlichen" Amids stark basische Bedingungen nach Möglichkeit vermieden werden.

Deswegen wurde zunächst eine Reaktion angelehnt an die Bedingungen von White *et al.* und Claremon *et al.* durchgeführt.[269,272] Beide Patentschriften nutzen für diese Transformation CuI und NaN_3. Darüber hinaus wurden (1*R*,2*R*)-1,2-Diaminocyclohexan und EtOH/H_2O (3:1) [269] respektive Na_2CO_3, *N*,*N'*-1,2-Dimethylethylendiamin (DMEDA) und DMSO [272] eingesetzt.[14] Für den ersten Test wurden die Versuchsbedingungen hauptsächlich von White *et al.* abgeleitet, da dort keine Base, sondern lediglich eine katalytische Menge Natriumascorbat als Cokatalysator verwendet wurde.[269] Aufgrund des niedrigeren Preises und der deutlich besseren Verfügbarkeit wurden jedoch 30 mol% DMEDA als Ligand zusammen mit 10 mol% CuI und 10 mol% NaAscorbat verwendet.

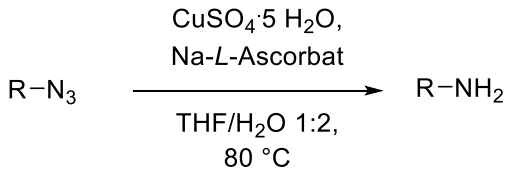
Diese Testreaktion führte erstaunlicherweise direkt nach 1 h bei 90 °C in der Mikrowelle zu einem vollständigen Umsatz des Edukts **138**. Das Rohprodukt bestand jedoch nur aus einer geringen Menge des Azids **139** (<30 %) und bereits zu einem großen Anteil aus dem reduzierten Produkt **140** (siehe Schema 42).

[14] Details zum Mechanismus einer Cu-katalysierten Ullmann-artigen Reaktion sind in Kapitel 3.2.5.1 beschrieben



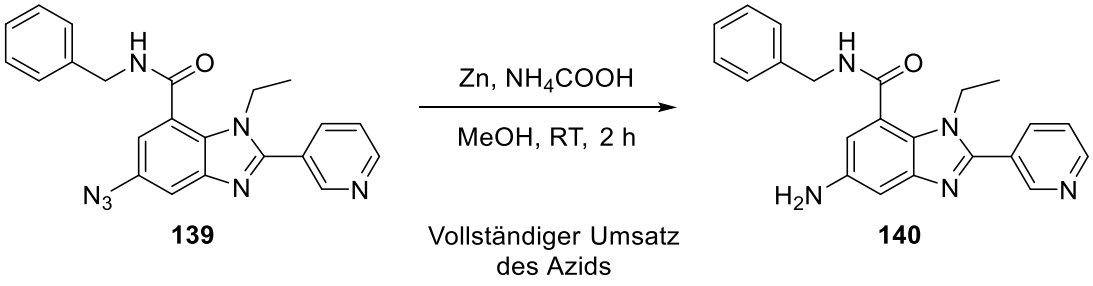
*Schema 42: Cu-katalyiserte Reaktion des Arylbromids **138**. In der ersten Testreaktion entstand eine Mischung aus dem Azid **139** und dem Amin **140**.*

In der Literatur wurde die Reduktion von Aziden zu Aminen mithilfe eines Cu(II)-Ascorbat-Katalysatorsystems unter anderem von Xia *et al.* beschrieben (siehe Schema 43).[273] Ob Cu(I) ebenfalls Azide reduzieren kann, scheint dahingegen von der relativen Elektrophilie des Azids abzuhängen.[274] Denkbar wäre zudem, dass in dem kommerziell erhältlichen Kupferiodid Spuren einer Cu(II)-Spezies vorlagen, da das Reagenz nicht umkristallisiert wurde.



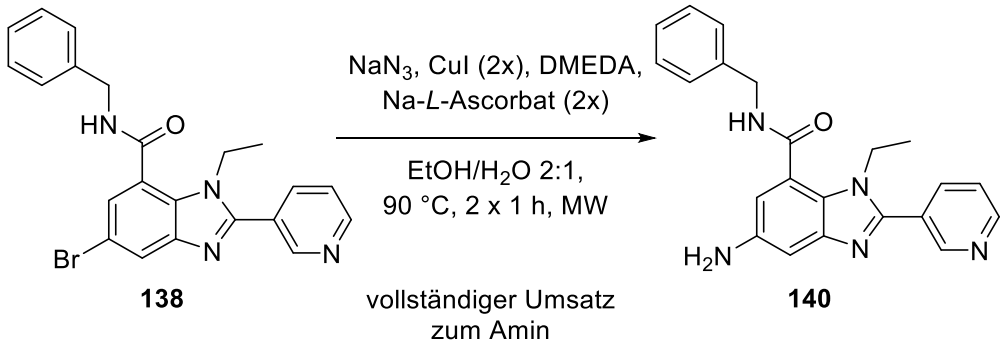
Schema 43: Xia et al. beschrieben eine vergleichbare Reduktion für verschiedene Arylazide mit Cu(II)SO4 und NaAscorbat bei erhöhten Temperaturen. [273]

Die in der Testreaktion erhaltene Mischung aus Azid **139** und Amin **140** wurde anschließend unter milden Bedingungen mit Zn/NH_4COOH in MeOH entsprechend Srinivasa *et al.* vollständig zum Amin **140** reduziert (siehe Schema 44).[275]



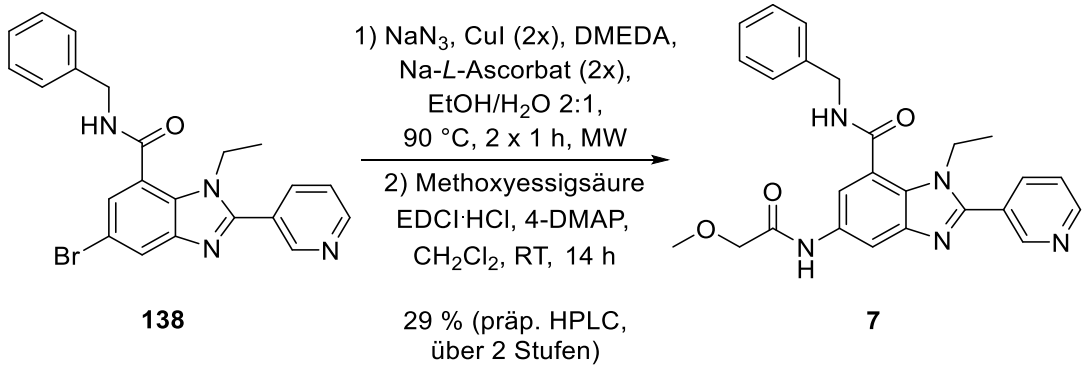
*Schema 44: Reduktion des verbliebenen Azids **139** zum Amin **140** mit Zn-Pulver und NH_4COOH.*

Die zusätzliche Reduktion konnte jedoch während der Wiederholungen der Kupplung durch erneute Zugabe von 10 mol% CuI und 10 mol% Natriumascorbat und einer weiteren Stunde bei 90 °C vermieden werden (siehe Schema 45). Die Isolierung von **140** mittels Normalphasenchromatographie war allerdings nicht möglich, da das Produkt nicht von der Säule eluierte. Aus diesem Grund wurde das erhaltene Rohprodukt (~65-75 % Reinheit) direkt in der Folgereaktion ohne weitere Reinigung eingesetzt.



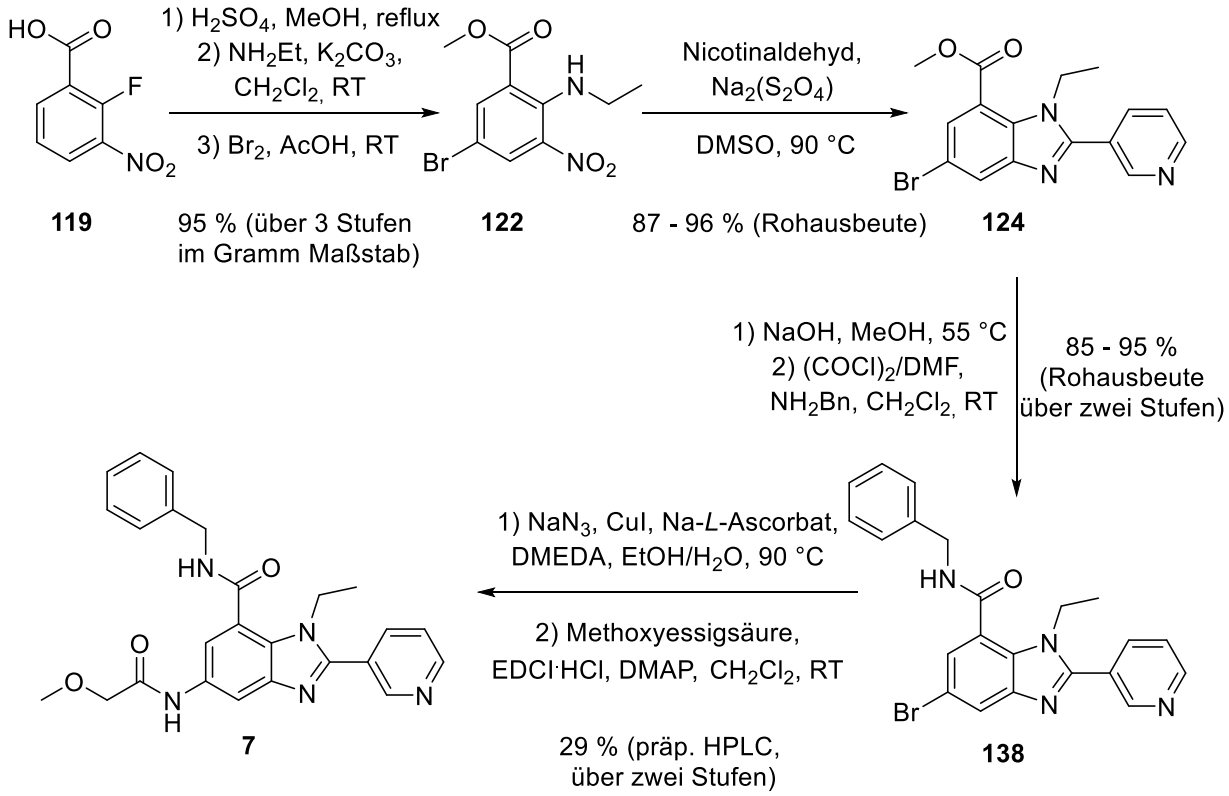
*Schema 45: Die nachträgliche Zugabe von 10 mol% CuI und 10 mol% NaAscorbat nach 1 h Reaktionszeit und anschließende Erhitzung für eine weitere Stunde führte zur vollständigen Bildung des Amins **140**.*

Der finale Schritt der Synthese von NUCC-555 (**7**) bestand angelehnt an White *et al.* aus der Amidkupplung von **140** mit Methoxyessigsäure, EDCI·HCl und 4-Dimethylaminopyridin (DMAP), bei dem NUCC-555 (**7)** *via* präparativer HPLC mit einer Ausbeute von 29 % über zwei Stufen isoliert werden konnte (siehe Schema 46).[269]



*Schema 46: Finale Kupplungsreaktion zum Erhalt von NUCC-555 (**7**)*

Insgesamt verlief somit die optimierte Synthese von NUCC-555 (**7**) über acht Stufen mit einer Gesamtausbeute von ~20 % (siehe Schema 47).

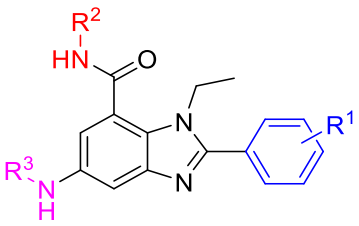


*Schema 47: Gesamte Reaktionssequenz zur Synthese von NUCC-555 (**7**). Die Vorstufen wurden mehrmals in unterschiedlichen Maßstäben synthetisiert. Die finale Reaktion wurde nur einmal durchgeführt.*

In der finalen Sequenz wurde lediglich eine säulenchromatographische Reinigung durchgeführt, was zum einen an den nebenproduktarmen Reaktionen (vor allem die ersten drei Stufen und die Hydrolyse/erste Amidbildung), zum anderen aber auch an der sehr hohen Polarität der Benzimidazolintermediate lag, wodurch eine chromatographische Reinigung zu signifikanten Produktverlusten führte. Um die Synthese neuer Derivate zu vereinfachen, wurden einige Intermidiate (**122**, **124**, **140**) in größeren Mengen hergestellt.

3.3.2 Design und Synthese von NUCC-555 Derivaten der 1. Generation

Auf Basis dieser Syntheseroute sollten nun verschiedene Derivate zur Aufklärung potentieller Struktur-Wirkungs-Beziehungen (SAR) synthetisiert werden. Dazu wurden zunächst Derivate entworfen, die an einer Position signifikante Unterschiede zu NUCC-555 (**7**) in Bezug auf sterischen Anspruch oder die elektronische Situation z.B. durch das Fehlen von Wasserstoffbrückendonoren oder –akzeptoren aufwiesen. Zusätzlich wurden anhand von Dockingstudien potentiell wirksamere Verbindungen designt, die sich zur besseren Interpretation der SAR ebenfalls nur an einer Position von NUCC-555 unterscheiden sollten. Als Modifikationspunkte wurden der Arylrest (R^1), das „nördliche“ Amid (R^2) und das „westliche“ Amid (R^3) ausgewählt (siehe Abbildung 60).



111

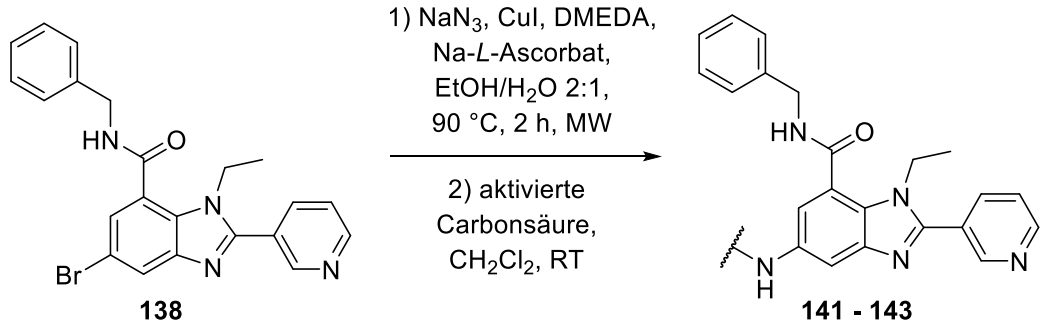
Abbildung 60: Mögliche Modifikationspunkte für neue Benzimidazolderivate.

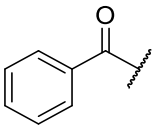
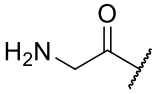
3.3.2.1 Derivate mit einer Modifikation von R^3

Ziel dieser Modifikation war es, den Einfluss der Methoxy-Seitenkette zu studieren. Dazu sollte die Wasserstoffbrückendonorfunktion entweder gegen ein Donor/Akzeptor/π-System ausgetauscht oder entfernt werden.

Ausgehend von Amid **138** wurde das Amin **140** nach erfolgter Azidierung/Reduktion zur Kupplung mit verschiedenen Carbonsäuren verwendet. So waren die Derivate **141** und **142** leicht zugänglich und konnten in akzeptablen Ausbeuten erhalten werden. Im Fall von **142** wurde Boc-Gylcin zur Kupplung verwendet, wobei die Schutzgruppe anschließend mit TFA in CH_2Cl_2 entfernt wurde. Verbindung **143** wurde durch Reaktion von **138** mit Acetylchlorid erhalten (siehe Tabelle 18). Alle Derivate wurden mittels präparativer HPLC gereinigt und in Ausbeuten zwischen 16 % und 28 % erhalten.

*Tabelle 18: Kupplungsreaktion von **138** zur Synthese neuer NUCC-555-Derivate.*



Verbindung	R^3	Aktivierungsreagenz	Zeit [h]	Ausbeute [a]
141		EDCI·HCl	14	23 %
142		EDCI·HCl	14	16 % [b]
143		- [c]	14	28 %

Reaktionsbedingungen: 1) 1 Äq. **138**, 3 Äq. NaN_3, 30 mol% CuI (2x), 10 mol% NaAscorbat (2x), 35 mol% DMEDA, 2) 1 Äq. **140**, 1,5 Äq. EDCI·HCl, 1,5 Äq. DMAP, 2 Äq Carbonsäure, [a] Ausbeute über zwei Stufen nach präparativer HPLC. [b] Ausbeute über drei Stufen, die Kupplung wurde mit Boc-Glycin durchgeführt, nachfolgend wurde die Schutzgruppe mit TFA in CH_2Cl_2 bei 0 °C entfernt. [c] Es wurde AcCl und NEt_3 zur Reaktion verwendet.

Darüber hinaus sollte die Amidfunktion gegen ein Amin ausgetauscht werden, da dieses in Bezug auf Flexibilität und elektronischen Einfluss stark von einem Amid abweicht. Für eine erste Verbindung (***rac*-144**) wurde entschieden, die *rac*-2-Aminobutanol-Seitenkette von IMB0901 (**8**) an dieser Position einzuführen. Gestützt wurde diese Idee durch einen hohen Score im Docking dieser Derivate, wo die 2-Aminobutanol-Gruppe eine hydrophobe Tasche besetzt und darüber hinaus polare Interaktionen über die Hydroxygruppe mit dem Protein eingehen konnte (siehe Abbildung 61).

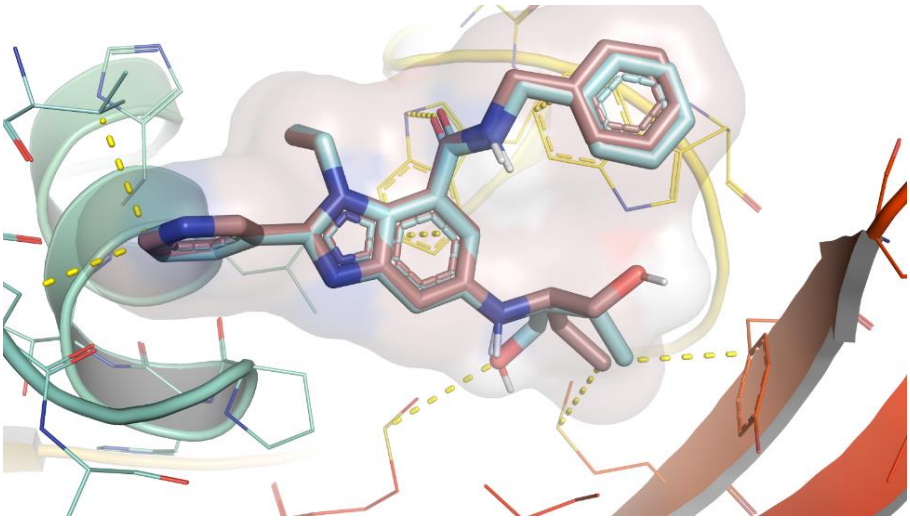
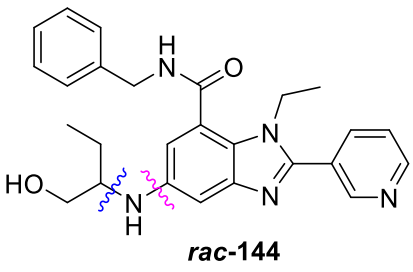


*Abbildung 61: Dockingpose von **144S** (braun) und **144R** (türkis) in der Tasche von MSTN übereinandergelegt. Die Positionen sind nahezu identisch. Lediglich die Seitenkette unterscheidet sich in durch die unterschiedliche Stereochemie. Der Benzimidazolkern und das „nördliche" Benzylamid bilden π-π-Interaktionen mit den Tryptophanen Tryp29 und Tryp31 aus, der Pyridinring liegt in einer kleinen Tasche vor der „Wrist-Helix". Im Fall von **144S** befindet sich die Hydroxylgruppe in der Tasche die von den Tryptophanen und den beiden Methioninresten gebildet wird und die Ethylgruppe weist Richtung umgebendes Medium. Für **144R** ist die Positionierung exakt andersrum, was eine günstigere Interaktion der Ethylgruppe mit der hydrophoben Tasche und der Hydroxygruppe mit dem wässrigen Medium ermöglicht. Dies spiegelt sich ebenfalls in den Scoring-Werten wieder: **144S**: –7,6 kcal/mol und **144R**: –7,7 kcal/mol (Referenz **7**: –7,7 kcal/mol).*

Retrosynthetisch betrachtet, könnte zur Synthese eines solchen Derivats die Bindung zwischen dem Arylring und dem Stickstoff (blau, Abbildung 62) oder zwischen der Seitenkette und dem Stickstoff getrennt werden (magenta, Abbildung 62).



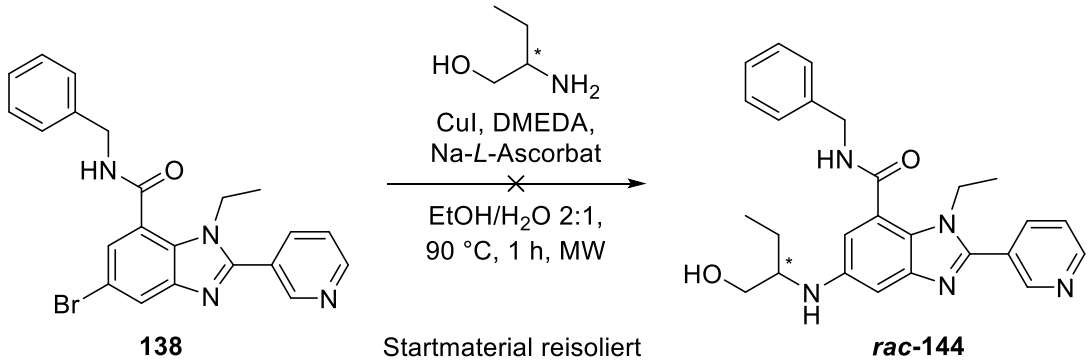
***rac*-144**

*Abbildung 62: Retrosynthetische Betrachtung der Synthese von **144**. Entweder könnte das Molekül an der Bindung zwischen dem Stickstoff und dem Ring zerlegt werden (magenta) oder zwischen Stickstoff und der Seitenkette (blau).*

Zur Vorwärtssynthese bestanden die Möglichkeiten also daraus, den Stickstoff von **140** zu alkylieren, oder das 2-Aminobutanol an Brombenzimidazol **138** zu kuppeln. Aus der erstgenannten Transformation ergibt sich ein Carbokation-Synthon, welches in Form von 1-Hydroxybutan-2-on, oder 2-Ethyloxiran verfügbar wäre. Allerdings könnte eine solche

Reaktion in Bezug auf die Regioselektivität (2-Ethyloxiran würde eher das lineare Produkt liefern) oder der generellen Reaktivität des anilinischen Stickstoffs schwer zu realisieren sein.

Die andere Methode würde über eine Buchwald-Hartwig- oder eine Ullmann-artige Kupplung verlaufen (kurze Erläuterung der Mechanismen in den Kapiteln 3.2.5.1 und 3.2.5.3). Eine Etablierung der Reaktionsbedingungen böte den Vorteil, eine große Vielzahl von Modifikationen an dieser Position des Moleküls zu erlauben. Dazu wurde zunächst eine Testreaktion mit den etablierten Bedingungen der Azidkupplung durchgeführt, welche allerdings keinenen Umsatz zeigte (siehe Schema 48).



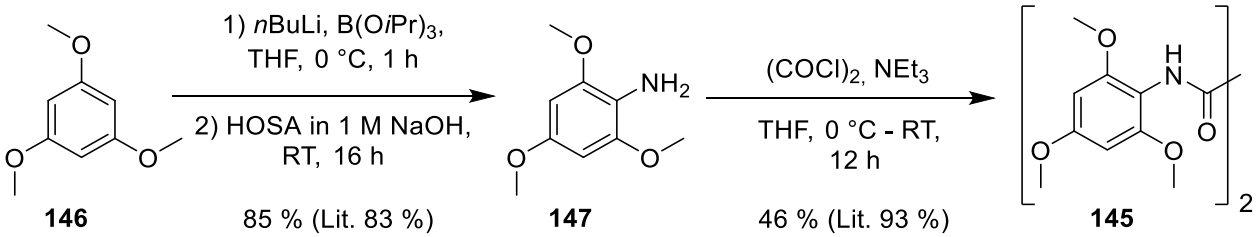
*Schema 48: Fehlgeschlagene Kupplungsreaktion von **138** mit rac-2-Aminobutanol. Die Reaktionsbedingungen wurden übernommen von der erfolgreichen Azidierung/Reduktion von **138** zu **140**. Das Edukt **138** konnte reisoliert werden.*

Denkbar wäre, dass die Reaktion durch das 2-Aminobutanol gestört wurde, da es aufgrund der 1,2-Beziehung der Hydroxy- und der Aminogruppe mit Metallen Chelat-Komplexe bilden kann und dadurch die Aktivität eines Katalysator-Ligand-Systems herabsetzt (vergleichbar mit der Interferenz von IMB0901 (**8**) mit dem Ni^{2+}-Ion im MST-Assay, siehe Kapitel 3.2.3.1).

Eine der wenigen Methoden zur Kupplung von Heteroaromaten mit 1,2-Aminoalkoholen wurde von Zhou *et al.* publiziert.[276] Das Team verwendete CuI mit K_3PO_4 und ein Oxaldiamid (Bis-Trimethoxyphenyloxaldiamid, BTMPO **145**) als Ligand in DMSO.[15] Um den Test dieser Reaktion zu ermöglichen, wurde zuerst der Ligand **145** über eine metallfreie One-Pot-Methode ausgehend von 1,3,5-Trimethoxyphenol (**146**) über eine *ortho*-Lithierung/Borierung/Umlagerungs-Sequenz von Voth *et al.* synthetisiert.[277]

[15] Details zum Mechanismus einer Cu-katalysierten Ullmann-artigen Reaktion sind in Kapitel 3.2.5.1 beschrieben.

Das erhaltene Anilin wurde anschließend mit $(COCl)_2$ zu BTMPO **145** umgesetzt.[278] Durch eine Extraktion mit 1 M HCl Lösung konnte verbliebenes Anilin **147** entfernt werden, und der Ligand war einsatzbereit für die Kupplung (siehe Schema 49).



*Schema 49: Reaktionssequenz der Synthese von BTMPO (**145**). Das Anilin wurde durch eine Übergangsmetall-freie Aminierungsreaktion erhalten und anschließend mit $(COCl)_2$ zum gewünschten Liganden umgesetzt (HOSA = Hydroxylamin-O-sulfonsäure).[277,278]*

Neben *rac*-2-Aminobutanol sollte $BnNH_2$ mit **138** umgesetzt werden, um die Reaktionsbedingungen unabhängig von dem problematischen 1,2-Aminoalkohol zu überprüfen (Zhou *et al.* verwendeten in ihrer Publikation ebenfalls $BnNH_2$ als Testsubstrat).[276] Trotz der stark variierenden Reaktionszeit (48 h und 12 h bei 110 °C) zwischen den Ansätzen zeigten beide Reaktionen den Umsatz zum gewünschten Produkt. Zusätzlich konnte in beiden Reaktionen die Bildung des debromierten Nebenprodukts **149** beobachtet werden. Nach der Reinigung wurden die Verbindungen mit Ausbeuten von 15 % (***rac*-144**) und 13 % (**148**) erhalten (siehe Tabelle 19).

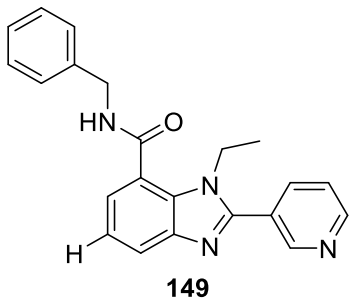
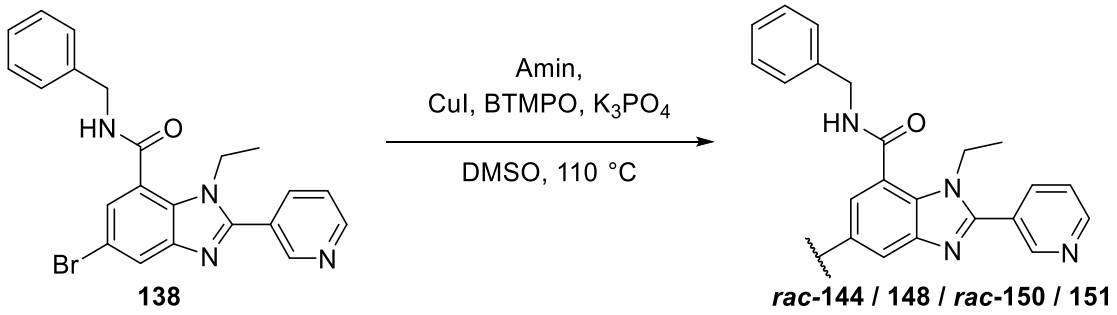


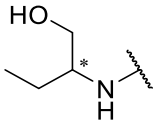
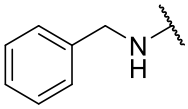
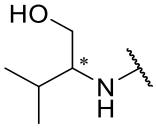
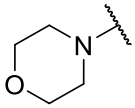
*Abbildung 63: Debromiertes Nebenprodukt **149***

Die Etablierung der Reaktionsbedingungen ermöglichte nun die Synthese vergleichbarer Derivate, um eine dadurch breitere Basis zur Identifikation von potentiellen SAR zu erhalten. Dazu wurde das homologe Derivat **150**, welches eine zusätzliche Methylgruppe in der

Seitenkette enthielt, und das Morpholinderivat **151** erfolgreich mit Ausbeuten von 1,7 % (**150**) und 18 % (**151**) synthetisiert (siehe Tabelle 19).

*Tabelle 19: CuI/BTMPO-katalysierte Reaktion von **138** mit verschiedenen Aminen.*



Verbindung	R^3	Zeit [h] [a]	Ausbeute [b]
***rac*-144**		48	15 %
148		12	13 %
***rac*-150**		45	1,7 % [c]
151		55	18 %

Reaktionsbedingungen: 1 Äq. **138**, 5 – 10 Mol% CuI, 10 mol% BTMPO, 2 Äq. K_3PO_4 2 Äq. Amin, [a] Reaktionszeit bei 110 °C, [b] Ausbeute nach präparativer HPLC, [c] Verlust an Produkt durch operativen Fehler bei der automatisierten Chromatographie

Das Morpholinderivat **151** wurde basierend auf den Ergebnissen des IMB0901-Projekts (vgl. Kapitel 3.2.2) designt und zeigte eine passende Pose mit einem hohen Score in den Dockingstudien (siehe Abbildung 64).

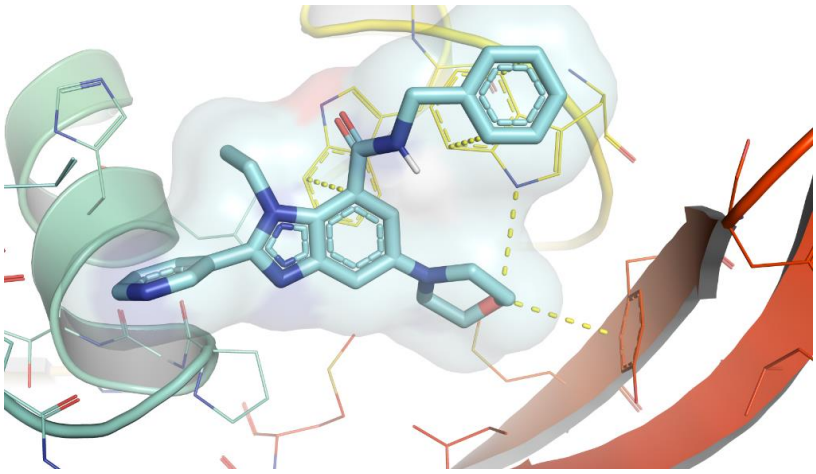


*Abbildung 64: Dockingpose von Morhpolinderivat **151**. Generell war die Position vergleichbar mit vorherigen Derivaten. Der Morpholinrest passte daraus optimal in eine hydrophobe Tasche. Scoring-Wert: –8,2 kcal/mol (Referenz **7**: –7,7 kcal/mol)*

Zusätzlich sollte das Oxetanderivat **152** synthetisiert werden, welches aufgrund des kleineren Rings eine andere Geometrie als das Morpholinderivat **151** aufwies. In Dockingstudien wurde für dieses Derivat ebenfalls ein guter Score und eine passende Dockingpose berechnet, welche der Pose des Morpholin-Derivats **151** sehr nahe kam (siehe Abbildung 65).

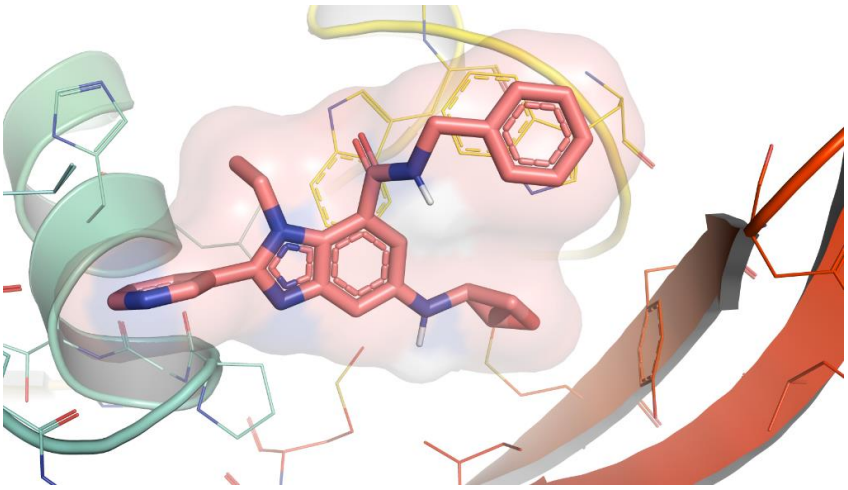
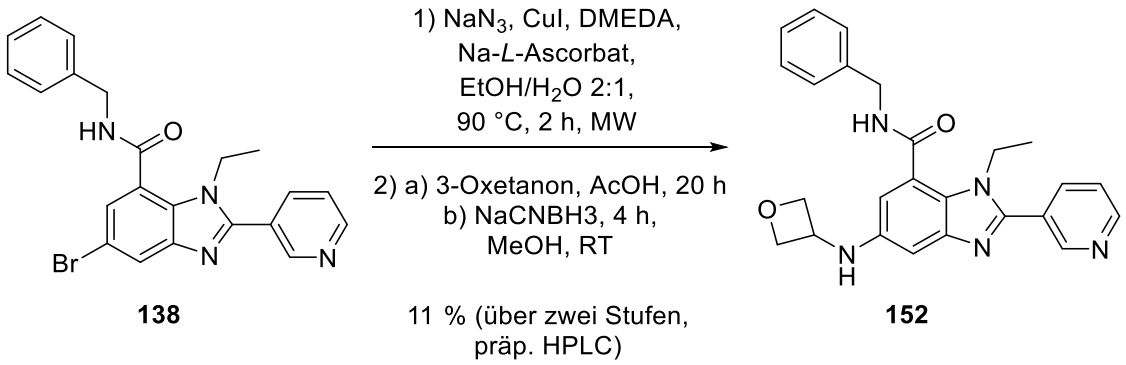


*Abbildung 65:Dockingpose von **152**. Das Molekül bildet vergleichbare Interaktionen wie das Morpholinderivat **151** aus. Der Oxetanrest liegt in der selben hydrophoben Tasche. Scoring-Wert: –7,5 kcal/mol (Referenz **7**: –7,7 kcal/mol).*

Zur Synthese dieses Derivats sollte aufgrund der hohen Reaktivität von 3-Oxetanon die Strategie der reduktiven Aminierung verfolgt werden, was durch Literaturbeispiele z.B. von Jaeseung *et al.* gestützt wurde.[279] Verbindung **138** wurde entsprechend zuerst zum Amin **140** umgewandelt, welches daraufhin mit 3-Oxetanon in Methanol unter Essigsäurekatalyse das

entsprechende Imin formte, das anschließend mit $NaCNBH_3$ reduziert wurde (siehe Schema 50).



*Schema 50: Azidierung/Reduktion von **138** und reduktive Aminierung von **140** mit 3-Oxetanon zur Synthese von **152**.*

Nach der chromatographischen Reinigung wurde **152** mit einer Ausbeute von 11 % über zwei Stufen erhalten, wodurch insgesamt fünf Derivate von NUCC-555 mit einer Modifikation an R^3 für die biologische Evaluation erhalten wurden.

3.3.2.2 Derivate mit einer Modifikation von R^2

Die Dockingstudien zu NUCC-555 (**7**) ergaben, dass der „nördliche“ Phenylrest potentiell ein π-Stacking mit den Tryptophan-Resten (Tyr29 und Tyr31) von MSTN ausbildet, und somit zur Proteinbindung beiträgt. Der Einfluss der Methylengruppe und der Elektronendichte sollte deshalb anhand der Derivate **153**, **154** und **155** untersucht werden (siehe Abbildung 66).

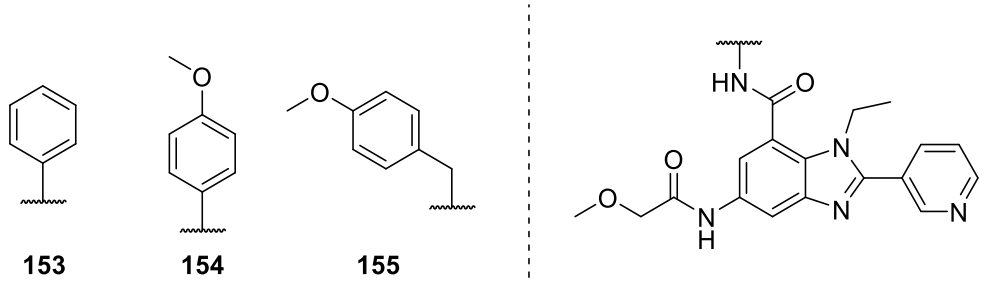
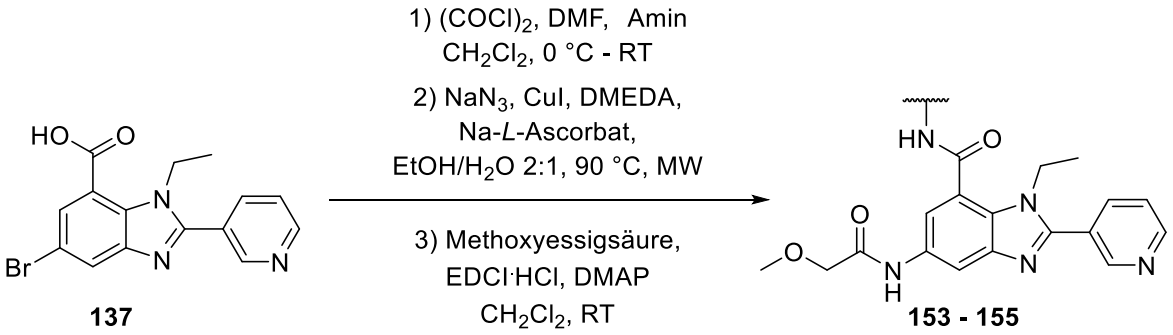
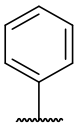
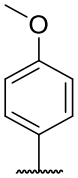
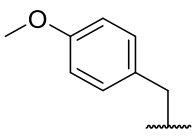


*Abbildung 66: Geplante NUCC-555-Derivate **153**, **154** und **155**. Durch das Fehlen der Methylengruppe war der Rest deutlich weniger flexibel und die Methoxygruppe führte durch den +M-Effekt zu einer starken Erhöhung der Elektronendichte des Aromaten, wodurch ein π-Stacking verstärkt werden könnte.*

Die Synthese erfolgte analog zu der von NUCC-555 (**7**), wobei das Säurechlorid von **137** mit Anilin, 4-Methoxyanilin oder 4-Methoxybenzylamin umgesetzt wurde (siehe Tabelle 20). Die intermediären Amide wurden anschließend nach wässriger Aufarbeitung in der Azidierung/Reduktion eingesetzt. In allen Fällen konnte durch die erneute Zugabe von CuI und NaAscorbat eine vollständige Reduktion der jeweiligen Azide erreicht werden. Die finale Kupplung mit Methoxyessigsäure nach Aktivierung mit EDCI·HCl verlief ebenfalls problemlos, sodass die Derivate **153**, **154** und **155** in ausreichender Menge für die biologische Evaluation erhalten wurden. Die Ausbeuten nach der Reinigung lagen zwischen 8,8 % und 31 % jeweils über drei Stufen (siehe Tabelle 20).

*Tabelle 20: Reaktionssequenz ausgehend von Carbonsäure **137** über drei Stufen.*



Verbindung	R^2	Zeit [h] [a]	Ausbeute [b]
153		18 / 2 / 14	8,8 %
154		18 / 2 / 14	18 %
155		18 / 2 / 14	31 %

Reaktionsbedingungen: 1) 1 Äq. **137**, 1,5 Äq. ($COCl_2$), kat. DMF, 2 Äq. Amin, 2) 1 Äq. Amid, 3 Äq. NaN_3, 30 mol% CuI (2x), 10 mol% NaAscorbat (2x), 35 mol% DMEDA, 3) 1 Äq. **140**, 1,5 Äq. EDCI·HCl, 1,5 Äq. DMAP, 2 Äq Carbonsäure, [a] Reaktionszeit Amidkupplung / Azidierung / Amidkupplung, [b] Ausbeute über drei Stufen.

3.3.2.3 Derivate mit einer Modifikation von R^1

Anhand der Dockingpose von NUCC-555 (**7**) in der Bindungstasche von MSTN wurde ersichtlich, dass der Aromat R^1 hauptsächlich hydrophobe π-Wechselwirkungen mit dem Protein einging. Zudem wäre durch die vermutete Bindung an die Proteinoberfläche eine möglichst große Interaktionsfläche von Vorteil. Zusätzlich durften die Verbindungen allerdings nicht zu hydrophob sein, da die Oberfläche in ständigem Kontakt zum physiologischen Medium steht. Zur Vergrößerung der Interaktionsfläche wurden darum Pyrrolidin und Morpholin als Substituenten (**156** und **157**) ausgewählt. Beide Substituenten erhöhen den sterischen Anspruch deutlich, daneben erhöhten sie durch den anilinischen Stickstoff die Elektronendichte des Aromaten. Einem klassischen medizinalchemischen Ansatz folgend sollten darüber hinaus das vereinfachte Phenylderivat **158** und das stärker basische Pyrimidinderivat **159** synthetisiert werden (siehe Abbildung 67).

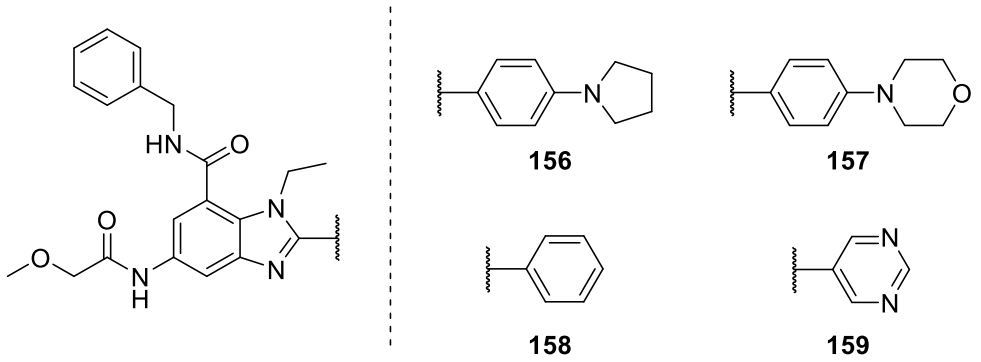
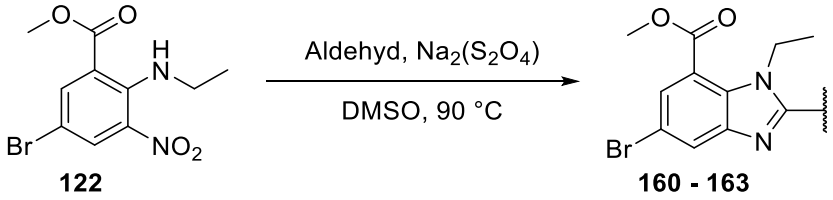
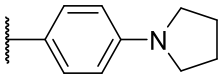
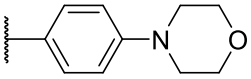
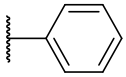
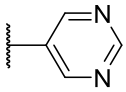


Abbildung 67: Geplante Derivate mit einer Modifikation an R^1.

Zur Synthese mussten zuerst 4-Pyrrolidin- und 4-Morpholinbenzaldehyd ausgehend von 4-Fluorbenzaldehyd entsprechend Ibrahim *et al.* synthetisiert werden.[280] Die anderen Benzaldehyde waren preiswert kommerziell erhältlich. Anschließend wurde der etablierten Route zu NUCC-555 folgend die reduktive Zyklisierung von Nitroanilin **122** zu den Benzimidazolen (**160**, **161**, **162** und **163**) durchgeführt, wobei die Bildung des Nebenprodukts **135** in allen Reaktionen im geringen Maße beobachtet wurde (siehe Tabelle 21).

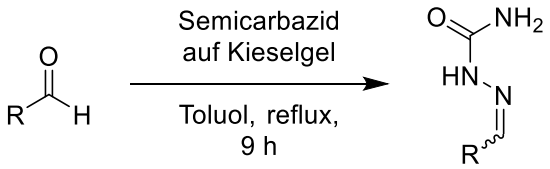
*Tabelle 21: Reduktive Zyklisierung von **122** mit verschiedenen Aldehyden.*



Verbindung	R^1	Zeit [h]	Rohausbeute [a]
160		4	84 % [b]
161		4	96 % [b]
162		2	96 %
163		3	85 %

Reaktionsbedingungen: 1 Äq. **122**, 1,5 Äq. Aldheyd, 3 Äq. $Na_2(S_2O_4)$, [a] Rohausbeute, die Produkte wiesen bereits eine hohe Reinheit und einen Verhältnis von >95:5 zu Nebenprodukt **135** auf, [b] der überschüssige Aldehyd wurde über die Semicarbazid-Methode[281] entfernt.

Im Fall von **160** und **161** war es allerdings nicht möglich, den überschüssigen Aldehyd nach der Reaktion durch saure Extraktion zu entfernen. Zur Abtrennung des Aldehyds konnte trotzdem auf eine chromatographische Reinigung durch den Einsatz einer Methode von Singh *et al.* verzichtet werden. Bei dieser Methode wird das Rohprodukt in Toluol gelöst, mit Semicarbazid auf Kieselgel versetzt und anschließend für 9 h refluxiert.[281] Dadurch bildet sich aus dem Aldehyd das entsprechende Semicarbazon, welches bei der folgenden Filtration auf dem Kieselgel verbleibt und somit abgetrennt werden kann (siehe Schema 51).

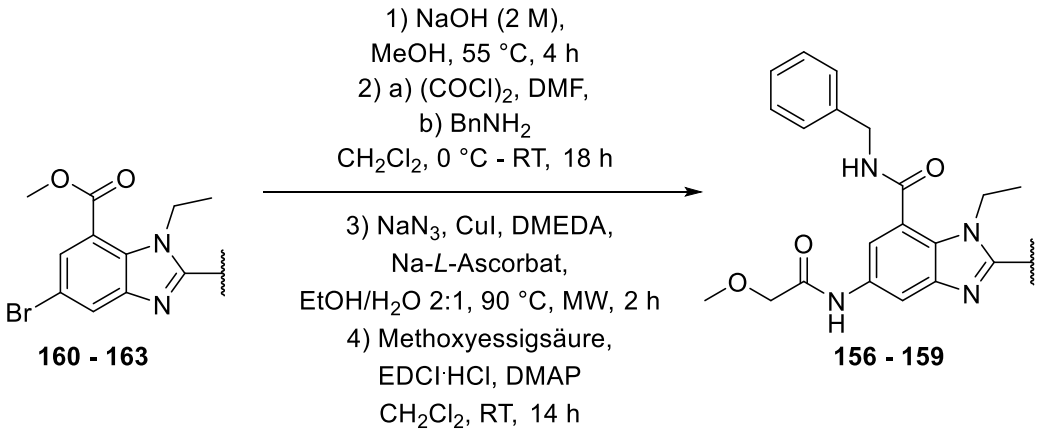


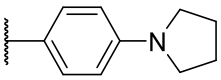
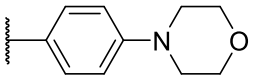
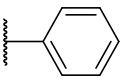
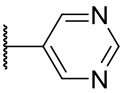
Schema 51: Selektive Entfernung eines Aldehyds durch Kondensation mit Semicarbazid. Das entstehende Hydrazon verbleibt beim Abfiltrieren an das Silica-Gel assoziiert.

Die anschließende Esterhydrolyse der Intermediate erfolgte entsprechend der etablierten Methode. Die Carbonsäure des Phenylderivats konnte problemlos nach vollständiger Verseifung und Einstellung der Reaktionslösung auf einen sauren pH-Wert extrahiert werden. Für die anderen Intermediate war dies aufgrund der amphoteren Eigenschaften nicht möglich,

weshalb nur das Lösemittel entfernt und die entsprechenden Natriumsalze der Carbonsäuren zusammen mit dem überschüssigen NaOH in der nächsten Reaktion eingesetzt wurden. Anschließend wurden die entsprechenden Säurechloride mit $BnNH_2$ umgesetzt. Da das überschüssige NaOH mit den Säurechloriden wieder zurück zur Carbonsäure reagierte, wurde in diesen Fällen die Reaktionszeit verlängert und nach 20 min erneut $(COCl)_2$ hinzugegeben, um eine vollständige Bildung der Säurechloride zu erreichen. Die Cu-katalysierte Azidierungs-/Reduktionsreaktion lieferte im Anschluss die intermediären Amine, welche ebenfalls ohne Probleme isoliert werden konnten. Im Fall des 4-Pyrrolidinphenyl-Intermediats war allerdings nach wässriger Aufarbeitung eine weitere Reaktion mit Zn und NH_4COOH in MeOH zur vollständigen Reduktion des Azids notwendig. Die Amine wurden anschließend mit EDCI·HCl und Methoxyessigsäure zu den finalen Derivaten umgesetzt, wobei kombinierte Ausbeuten über die insgesamt vier (bzw. fünf) Stufen nach der reduktiven Zyklisierung zwischen 8 % und 13 % erzielt wurden (siehe Tabelle 22).

Tabelle 22: Finale Reaktionssequenz zur Synthese neuer NUCC-555-Derivate mit einer Modifikation von R[1].



Verbindung	R^1	Zeit [h][a]	Ausbeute [b]
156		4 / 14[c] / 2 / 14	10 % [e]
157		4 / 14[c] / 2 / 14	8 %
158		2 / 14[d] / 5 / 14	13 %
159		3 / 14[c] / 2 / 14	10 %

Reaktionsbedingungen: 1) 1 Äq. Ester, 1,1 – 1,5 Äq. NaOH, 2) 1 Äq. Carbonsäure, 1,5 Äq. $(COCl_2)$, kat. DMF, 2 Äq. Amin, 3) 1 Äq. Amid, 3 Äq. NaN_3, 30 mol% CuI (2x), 10 mol% NaAscorbat (2x), 35 mol% DMEDA, 4) 1 Äq. Amin, 1,5 Äq. EDCI·HCl, 1,5 Äq. DMAP, 2 Äq Carbonsäure, [a] Reaktionszeit Hydrolyse / Amidkupplung / Azidierung / Amidkupplung, [b] Ausbeute über vier Stufen, nach Flash-Chromatographie, [c] Das Natriumsalz der Carbonsäure wurde in der Amidkupplung eingesetzt, [d] Die freie Carbonsäure wurde in der Amidkupplung eingesetzt, [e] Ausbeute über fünf Stufen, Reduktion des intermediären Azids mit Zn/NH_4COOH in MeOH notwendig.

3.3.2.4 Derivate mit mehreren Modifikationen

In einer weiteren Serie sollten Verbindungen synthetisiert werden, die mehrere Veränderungen gegenüber NUCC-555 in einem Molekül aufwiesen.

3.3.2.4.1 Derivate ohne „nördliches“ Amid

Neben den Modifikationen an R^1, R^2 und R^3 sollten vereinfachte Derivate ohne das „nördliche“ Amid von NUCC-555 (**7**) synthetisiert werden, die ebenfalls als linearere Version von IMB0901 (**8**) mit veränderter Kernstruktur betrachtet werden konnten. Aus diesem Grund sollte neben dem Pyridinrest an R^1 ebenfalls der 3,4-Dichlorphenylrest eingeführt werden und neben dem Amid an R^3 ebenfalls der 2-Aminoalkoholrest. Daraus ergaben sich folgende Zielmoleküle: **164** als vereinfachtes NUCC-555 Derivat und die Derivate **165**, ***rac*-166** (*rac*-2-Aminobutanol), ***rac*-167** (*rac*-2-Amino-3-Methylbutanol) und **168** (Morpholin), welche zusätzlich von IMB0901 abgeleitet wurden (siehe Abbildung 68).

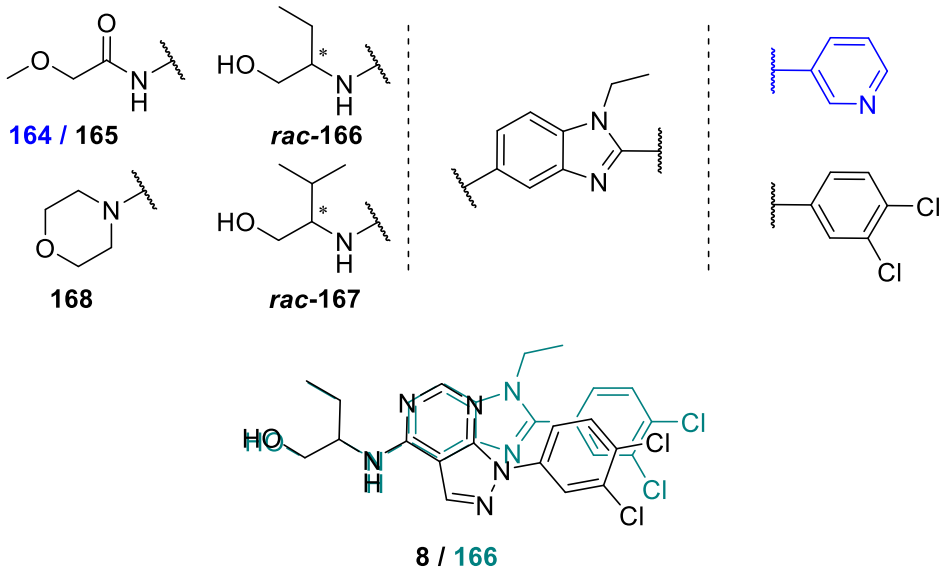
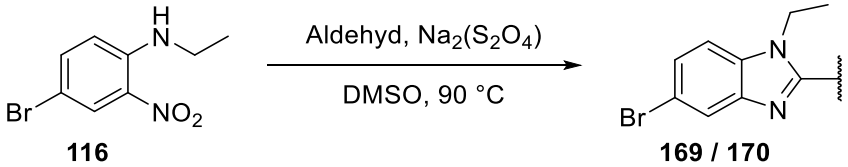


*Abbildung 68: Oben: geplante Derivate ohne „nördliches“ Amid mit verschiedenen Substituenten R^1 und R^2 (blaue Zahl mit 3,4-Dichloraromat, schwarze Zahl mit Pyridinrest), unten: Überlagerung von IMB0901 (**8**, schwarz) mit dem linearen Benzimidazolderivat **166** (grün).*

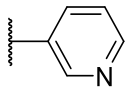
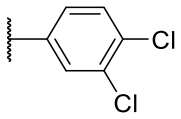
Die Synthese startete ausgehend vom alkylierten Nitroanilin **116** mit der etablierten reduktiven Zyklisierungsreaktion. Im Gegensatz zu den Derivaten mit der „nördlichen“ Estergruppe wurde in keiner Reaktion die Bildung eines „Autozyklisierungsprodukts“ beobachtet. Insgesamt

wurden die Benzimidazole in sehr guten Ausbeuten von 88 % (**169**) und 91 % (**170**) und hoher Reinheit erhalten. Beide Reaktionen wurden anschließend in einem größeren Maßstab wiederholt, wobei die Ausbeuten bei erneut 88 % und 79 % lagen (siehe Tabelle 23).

*Tabelle 23: Reduktive Zyklisierungsreaktion von **116** mit verschiedenen Aldehyden.*



116 **169 / 170**

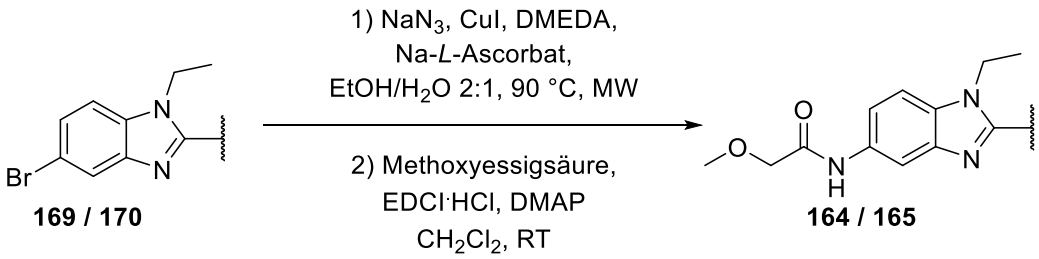
Verbindung	R^1	Zeit [h]	Ausbeute [a]
169		3	88 %
170		3	79 - 91 %

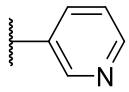
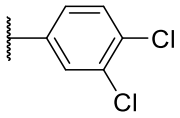
Reaktionsbedingungen: 1 Äq. **116**, 1,5 Äq. Aldehyd, 3 Äq. $Na_2(S_2O_4)$, [a] Die Produkte wiesen nach der Extraktion eine ausreichend hohe Reinheit auf und wurden ohne weitere Reinigung in der Folgereaktion eingesetzt.

In der folgenden Azidierung/Reduktion musste, statt bisher üblich, neben CuI und NaAscorbat ebenfalls NaN_3 zusätzlcih hinzugefügt werden, um eine vollständige Reaktion des Bromids zu erhalten. In der Reaktion des 2-(3,4-Dichorphenyl)-Benzimidazols lief darüber hinaus die *in situ* Reduktion des Azids nur in geringem Maß ab, weshalb eine zusätzliche Reduktion mit Zn/NH_4COOH durchgeführt werden musste. Die deutlichen Unterschiede in der Reaktivität könnten mit einer unterschiedlichen elektronischen Situation des Aromaten zusammenhängen.

Im Anschluss wurden die intermediären Amine mit EDCI·HCl und Methoxyessigsäure zu den finalen Derivaten **164** und **165** umgesetzt. Nach der chromatographischen Reinigung konnten die Produkte mit Ausbeuten von 36 % (**164**) und 40 % (**165**) über zwei bzw. drei Stufen isoliert werden. Dabei zeigte sich, dass diese Produkte aufgrund des fehlenden Amids eine niedrigere Polarität aufwiesen, was sich positiv auf die chromatographische Reinigung auswirkte (siehe Tabelle 24).

Tabelle 24: Finale Reaktionsschritte zur Synthese neuer NUCC-555-Derivate ausgehend von verschiedenen Benzimidazolen.



Verbindung	R^1	Zeit [h] [a]	Ausbeute
164		3 /18	36 % [b]
165		4 / 18	40 % [c]

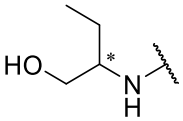
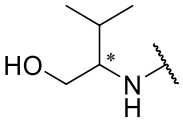
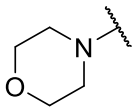
Reaktionsbedingungen: 1) 1 Äq. Amid, 3 Äq. NaN_3 (2x), 30 mol% CuI (2x), 10 mol% NaAscorbat (2x), 35 mol% DMEDA, 2) 1 Äq. Amin, 1,5 Äq. EDCI·HCl, 1,5 Äq. DMAP, 2 Äq Carbonsäure, [a] Reaktionszeit Azidierung / Amidkupplung, [b] Ausbeute über zwei Stufen nach Flash-Chromatographie, [c] Ausbeute über drei Stufen nach Flash-Chromatographie, Reduktion des intermediären Azids mit Zn/NH_4COOH in MeOH notwendig.

Die anderen Moleküle dieser Serie wurden ausgehend vom Brombenzimidazol **170** über die etablierte BTMPO/CuI-katalysierte Aminierungsreaktion synthetisiert. Bemerkenswerterweise konnte keine Bildung eines Cl-Kupplungsprodukts in der LC/MS detektiert werden. Dies spricht für einen Oxidative Additions-/Reduktive Eliminierungs-Mechanismus, da im Fall der Oxidativen Addition Brom schneller als Chlor reagiert (vgl. Kapitel 3.2.5.1, Schema 16).[233]

Aufgrund der deutlich höheren Polarität der Aminverbindungen **166**, **167** und **168** erwies sich wiederum die Isolierung der Derivate als deutlich problematischer und die Produkte konnten lediglich in sehr niedrigen Ausbeuten zwischen 4,5 % und 5,2 % isoliert werden (siehe Tabelle 25).

*Tabelle 25:Cu-katalysierte Kupplungsreaktion von **170** mit verschiedenen Aminen.*



Verbindung	R^2	Zeit [h] [a]	Ausbeute [b]
***rac*-166**		24	5,2 %
***rac*-167**		24	4,8 %
168		72	4,5 %

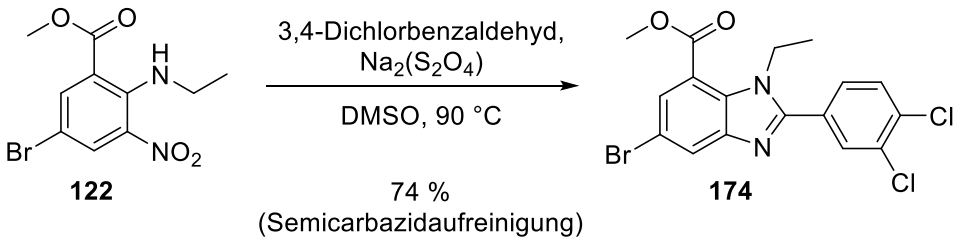
Reaktionsbedingungen: 1 Äq. **170**, 10 mol% CuI, 10 mol% BTMPO, 2 Äq. Amin, [a] Reaktionszeit bei 110 °C, [b] Ausbeute nach Flash-Chromatographie.

3.3.2.4.2 Derivate mit 2-Aminobutanolrest

Die weiteren Derivate der Serie mit mehreren Modifikationen sollten keine zu großen „Sprünge“ zwischen den einzelnen Modifikationen enthalten, damit etwaige synergistische oder destruktive Effekte auf die SAR überschaubar blieben. Deshalb wurden zunächst Derivate in Betracht gezogen, welche die π-Tuning-Komponente und das „westliche“ Amin an R^3 kombinierten.

Daraus resultierten Derivat **171** mit R^3 = *rac*-2-Aminobutanol und dem „nördlichen“ 4-Methoxybenzylamid, und die beiden Derivate **172** und **173**, ebenfalls mit R^3 = *rac*-2-Aminobutanol. Zur Betrachtung des sterischen und elektronischen Effekts des „westlichen“ Arylrests sollte der 3,4-Dichlorphenylrest und der 4-Pyrrolidinphenylrest eingefügt werden.

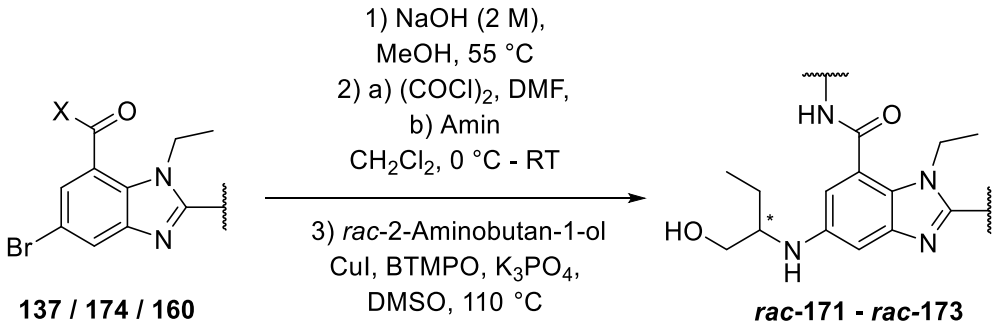
Die notwendigen Bromide wurden analog zu den vorherigen Synthesen aus den jeweiligen Vorstufen (Carbonsäure **137** und Ester **160**) hergestellt. Die Synthese des 3,4-Dichlorphenylderivats startete mit der reduktiven Zyklisierung von **122** (siehe Schema 52). Diese wurde entsprechend der etablierten Methodik durchgeführt und der überschüssige Aldehyd nach der Reaktion mit der Semicarbazidmethode entfernt, wodurch der Ester **174** mit einer Ausbeute von 74 % erhalten wurde.

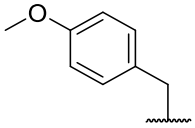
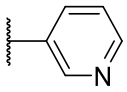
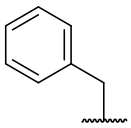
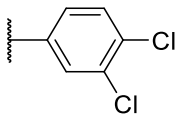
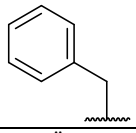
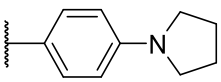


*Schema 52: Reduktive Zyklisierung von **122** zu **174**. Der überschüssige Aldehyd wurde mit der Semicarbazidaufreinigung entfernt.*

Im Anschluss konnten die geplanten Derivate nach der Hydrolyse und Amidbildung durch die BTMPO/CuI-katalysierte Aminierung synthetisiert und mit Ausbeuten zwischen 8,1 % und 28 % (**173**) isoliert werden (siehe Tabelle 26).

Tabelle 26: Cu-katalysierte Kupplungsreaktion von verschiedenen Brombenzimidazolen mit rac-2-Aminobutanol.



Verbindung	R^2	R^1	X	Zeit [h] [a]	Ausbeute [b]
***rac*-171**			OH	- / 18 / 48	9,0 %[c]
***rac*-172**			OMe	5 / 14[d] / 120	8,1 %
***rac*-173**			OMe	4 / 18 / 48	28 %

Reaktionsbedingungen: 1) 1 Äq. Ester, 1,5 Äq. NaOH, 2) 1 Äq. **137**, 1,5 Äq. ($COCl_2$), kat. DMF, 2 Äq. Amin, 3) 1 Äq. Amid, 10 mol% CuI, 10 mol% BTMPO, 2 Äq. K_2CO_3, 2 Äq. Amin, [a] Reaktionszeit Hydrolyse / Amidkupplung / Cu-Kupplung bei 110 °C, [b] Ausbeute über drei Stufen nach präparativer HPLC, [c] Ausbeute über zwei Stufen, die Reaktionssequenz startete mit der Amidkupplung, [d] Das Rohprodukt der Amidkupplung war stark verunreinigt und wurde mittels Flash-Chromatographie gereinigt. Die Ausbeute lag bei 63 % über zwei Stufen (Hydrolyse/Amidkupplung).

Mit diesen Verbindungen wurde die 1. Generation abgeschlossen. Insgesamt wurden NUCC-555 (**7**) und 22 Derivate erfolgreich über die modulare Syntheseroute hergestellt. Die

Verbindungen deckten dabei ein breites Spektrum an physikochemischen Eigenschaften ab, ohne dabei zu stark von der Referenzstruktur abzuweichen.

3.3.2.5 Reportergen-Assay der NUCC-555 Derivate der 1. Generation[16]

Die synthetisierten Verbindungen wurden analog zu den IMB0901-Derivaten in einem primären zellbasierten Assay getestet (siehe Kapitel 3.2.3).

Erstaunlicherweise zeigte die Referenzverbindung NUCC-555 (**7**) keine Aktivität bei der Reduktion des ACVA- oder MSTN-Signalwegs, wie eigentlich von Woodruff *et al.* berichtet wurde.[190] Dabei war anzumerken, dass ihr Team eine andere Zelllinie (Hep2G) mit einem anderen Reportergen verwendete, jedoch wurde trotzdem eine beobachtbare Aktivität erwartet.[17]

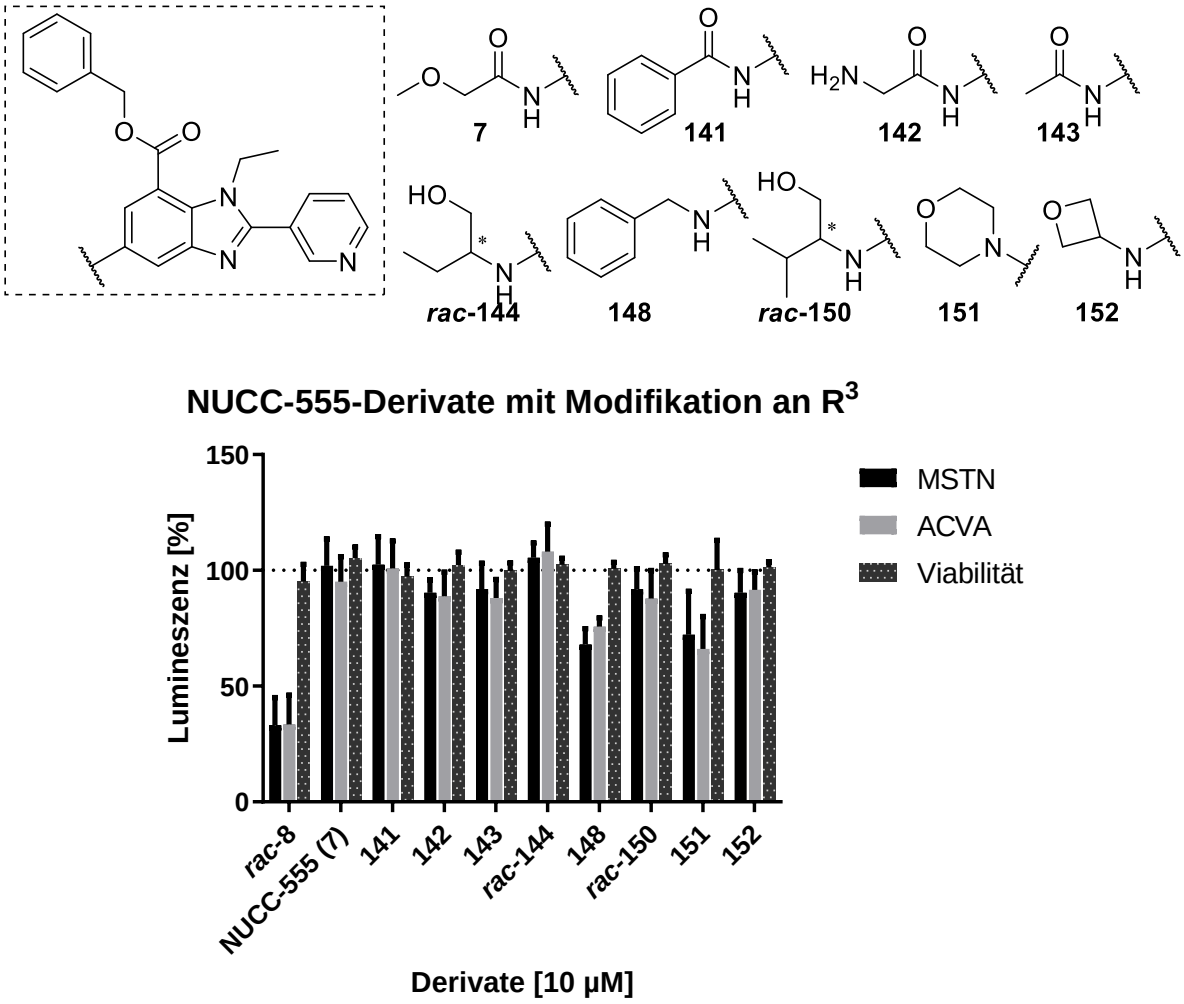


*Abbildung 69: Inhibitions- und Viabilitätsdaten von IMB0901 **(rac-8)**, NUCC-555 (7) und den NUCC-555-Derivaten mit einer Modifikation an R^3. Alle Verbindungen wurden in einer Konzentration von 10 µM vermessen. Keine der Verbindungen wies einen signifikanten Unterschied in der Aktivität zwischen MSTN und ACVA auf.*

[16] Diese Arbeiten wurden hauptsächlich von Dr. Viktoria Marquardt durchgeführt.
[17] Die überraschenden biologischen Ergebnisse für diese Verbindungen führten dazu, dass der Schwerpunkt des Projekts nachfolgend bei den [3,4]-Pyrazolopyrimidinen lag.

Von den Derivaten mit einer Modifikation an R^3 wiesen lediglich das Benzylderivat **148** (68 %) und das Morpholinderivat **151** (72 %) eine gewisse Reduktion der Lumineszenz auf, wobei die Standardabweichung durch Variabilität in den Wiederholungsversuchen recht hoch war (StdAb: ± 19 % für **151**). Die anderen Derivate wiesen nur eine sehr geringe Reduktion des Signals (<10 %) auf und galten somit als nicht aktiv bei einer Konzentration von 10 µM (siehe Abbildung 69).

Die Derivate mit einer Modifikation an R^1 oder an R^2 wiesen ebenfalls keine nennenswerte Aktivität auf. Die einzige Verbindung, welche die Lumineszenz stärker als 10 % reduzierte war **156** (86 %), was allerdings im Vergleich zu den [3,4]-Pyrazolopyrimidinen praktisch keiner Aktivität entsprach (siehe Abbildung 70).

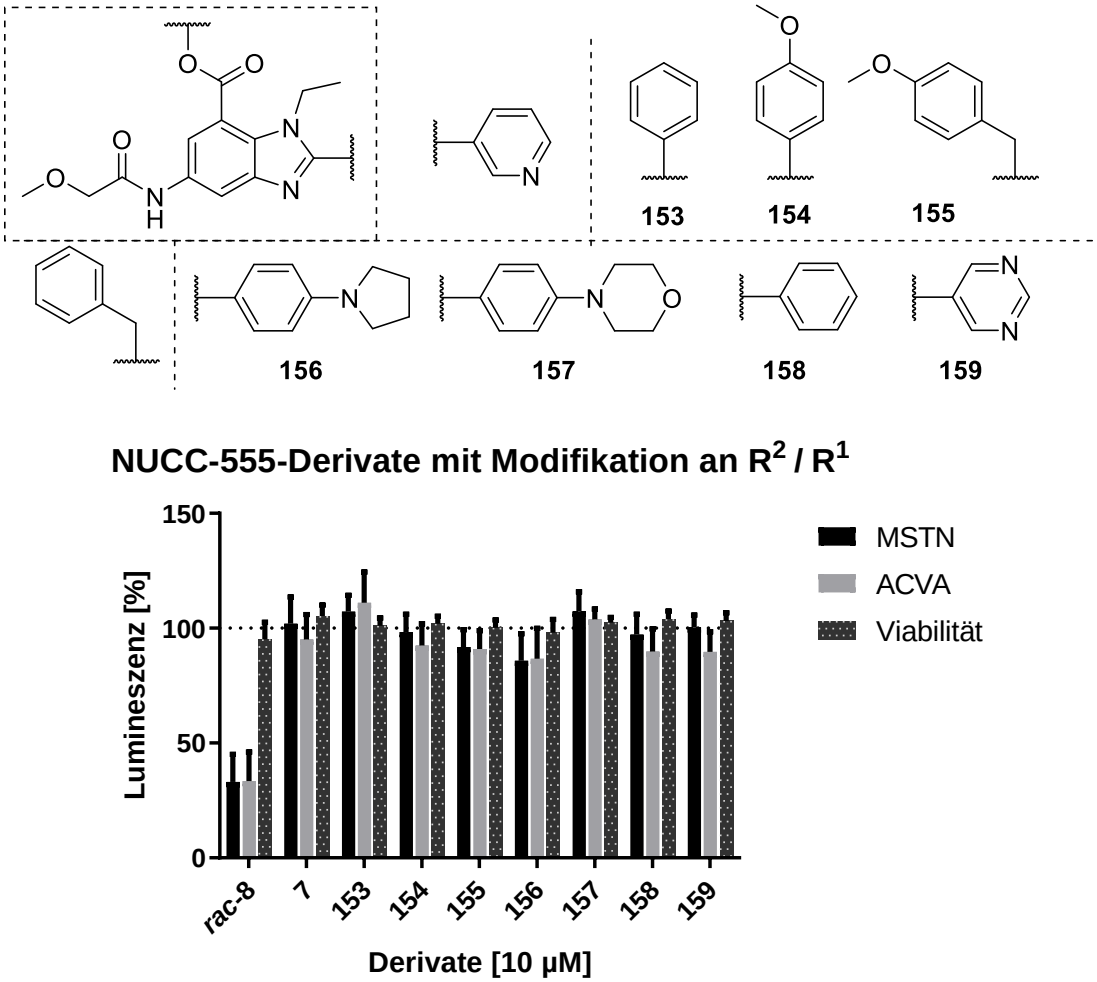
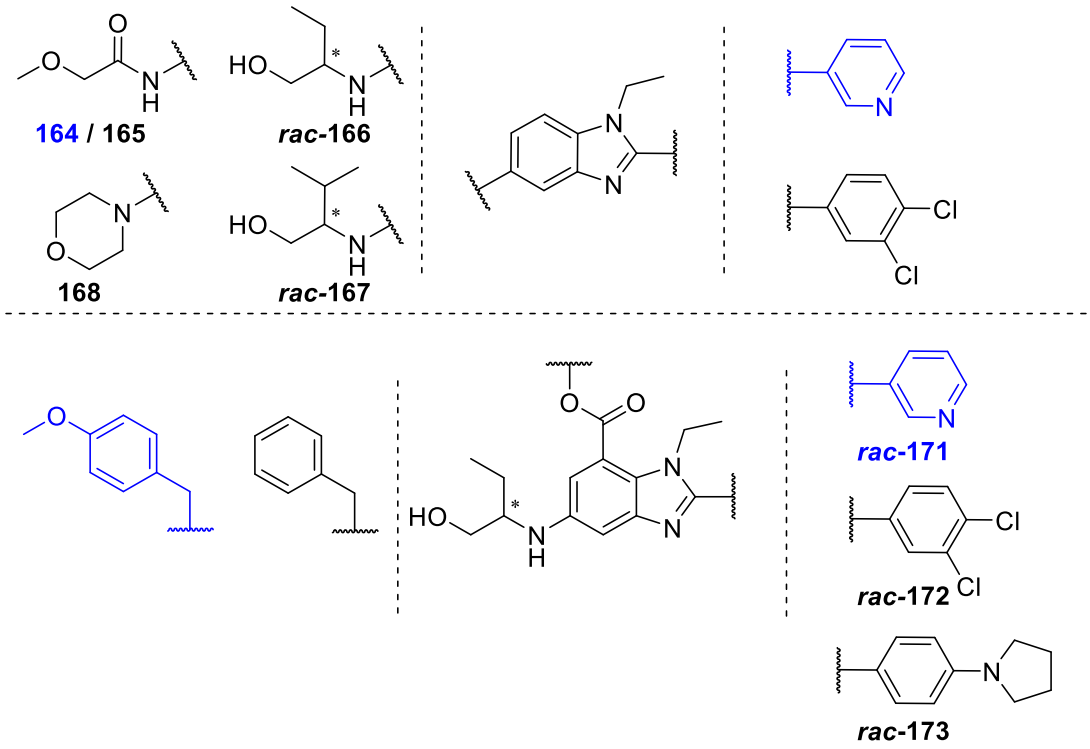


*Abbildung 70: Inhibitions- und Viabilitätsdaten von IMB0901 (**rac-8**), NUCC-555 (**7**) und den NUCC-555-Derivaten mit einer Modifikation an R^1 oder R^2. Alle Verbindungen wurden in einer Konzentration von 10 µM vermessen. Keine der Verbindungen wies einen signifikanten Unterschied in der Aktivität zwischen MSTN und ACVA auf.*

Die Derivate ohne „nördliches“ Amid waren ebenfalls inaktiv, Verbindung ***rac*-166** wies jedoch eine Lumineszenz von deutlich >100 % auf (siehe Abbildung 71). Dieser Effekt trat ebenfalls bei einzelnen IMB0901-Derivaten auf. Die Ursache konnte jedoch nicht im Rahmen dieses Projekts geklärt werden (vergleiche Kapitel 3.2.3.2).



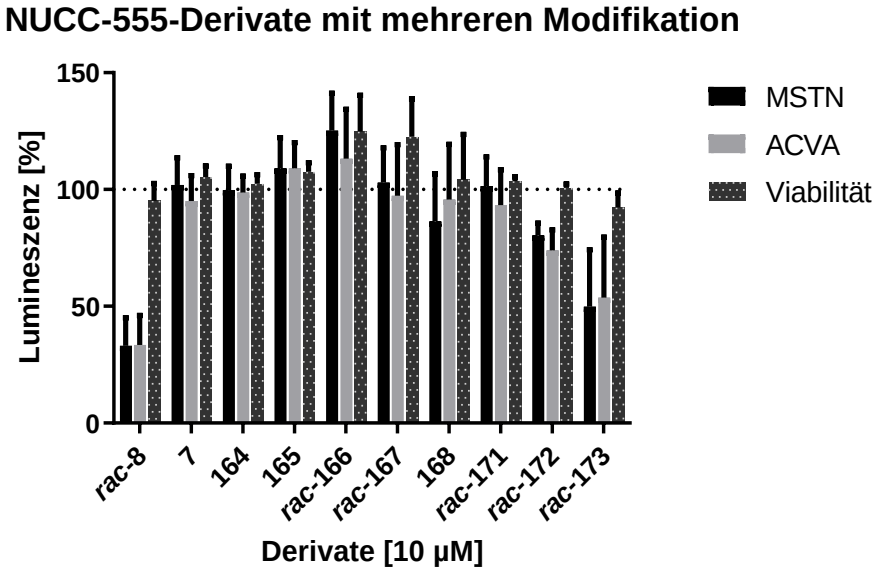


Abbildung 71: Inhibitions- und Viabilitätsdaten von IMB0901, NUCC-555 und den NUCC-555-Derivaten mit mehreren Modifikation. Alle Verbindungen wurden in einer Konzentration von 10 µM vermessen. Keine der Verbindungen wies einen signifikanten Unterschied in der Aktivität zwischen MSTN und ACVA auf.

Von den anderen Derivaten dieser Serie wiesen zwei Verbindungen (***rac*-172** und ***rac*-173**) eine gewisse Aktivität auf. Das 3,4-Dichlorphenylderivat **172** zeigte dabei die eindeutigeren Ergebnisse, obwohl es das Signal weniger stark reduzierte (80 %). Verbindung ***rac*-173** zeigte eine hohe Variabilität in den Wiederholungsexperimenten, sodass die Reduktion auf 50 % relativer Lumineszenz mit einer hohen Standardabweichung von ±24 % einherging. Zudem verminderte es die Zellviabilität auf 92 % (siehe Abbildung 71).

Insgesamt war somit weder NUCC-555 (**7**) noch eines der Derivate der 1.Generation in seiner Potenz vergleichbar mit IMB0901 oder dessen Derivaten. Bei der Betrachtung der wenigen aktiven Derivate fiel auf, dass keines den Methoxyessigsäurerest von NUCC-555 aufwies. Daneben besaß nur ein Derivat den Pyridinrest an R^1, der Benzylrest an R^2 war jedoch in allen Verbindungen vorhanden. Die Substituenten waren jedoch relativ heterogen, sodass sich anhand dieser Daten nur schwer Struktur-Wirkungsbeziehungen ableiten lassen. Außerdem war die Aktivität insgesamt sehr gering.

Generell ließen diese Ergebnisse Zweifel an der Hypothese der Inhibition der PPI zwischen MSTN/ACVA und ALK-4/5 und an den Ergebnissen von Woodruff *et al.* aufkommen. Genauere Untersuchungen zum Mechanism-of-Action erscheinen deshalb notwendig und sind für Folgeprojekte geplant.

3.3.3 Design und Synthese von NUCC-555 Derivaten der 2. Generation

Trotz der größtenteils negativen Ergebnisse der biologischen Evaluation von NUCC-555 und den Derivaten der 1. Generation wurde entschieden eine kleine Serie von weiteren Verbindungen zu synthetisieren.

3.3.3.1 Derivate mit Morpholinamid

Analog zu den Derivaten ohne „nördliches“ Amid, die an IMB0901 (**8**) angelehnt waren, wurden Verbindungen designt, die kein „westliches“ Amid oder Amin enthielten, wodurch sie weniger linear waren und sich stärker an der Geometrie der [3,4]-Pyrazolopyrimidine orientierten. Für die SAR-Exploration wurden die beiden Derivate **175** und **176** erdacht, die den Pyridinrest und den 3,4-Dichlorphenlyrest und ein Morpholinamid enthielten (siehe Abbildung 72).

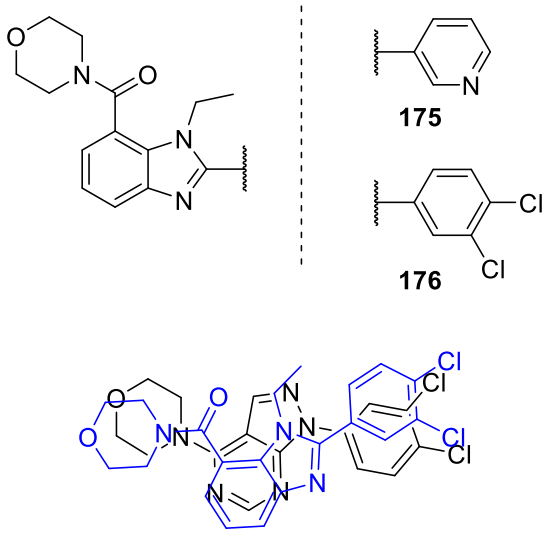
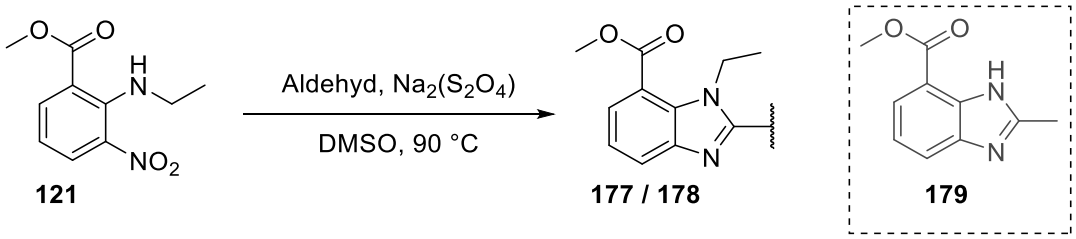
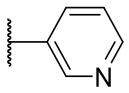
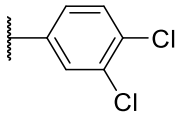


*Abbildung 72: Oben: geplante Derivate mit Morpholinamid, unten: Überlagerung von **176** (blau) und dem sehr potenten IMB0901-Derivat **27** (schwarz). Die generelle Lage der Substituenten stimmt grob überein, es ist jedoch zu beachten, dass das Morpholinamid flexibler ist und bedingt durch die N-Ethylgruppe vermutlich nicht in einer Ebene mit dem aromatischen Kern steht.*

Die Synthese der Verbindungen ging von 2-Nitroanilin **121** aus, welches mit Nicotinaldehyd und 3,4-Dichlorbenzaldehyd zu den Benzimidazolintermediaten **177** und **178** zyklisiert wurde. Die Verbindungen wurden mit Ausbeute von 58 % (**177**) und 56 % (**178**) nach chromatographischer Reinigung isoliert (siehe Tabelle 27).

*Tabelle 27: Reduktive Zyklisierungsreaktion von **121** mit verschiedenen Aldehyden.*

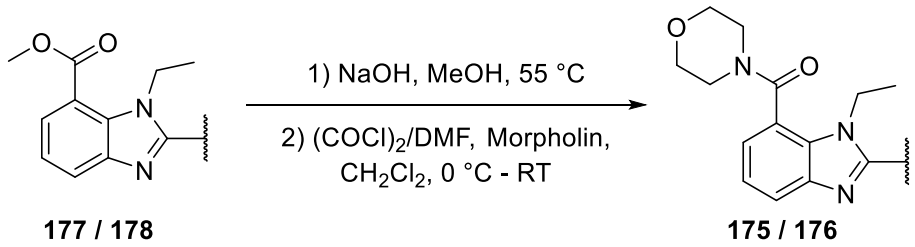


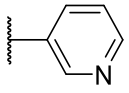
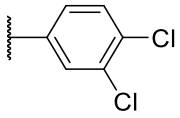
Verbindung	R^1	Zeit [h]	Ausbeute [a]
177		4	58 %
178		4	56 %

Reaktionsbedingungen: 1 Äq. **121**, 1,5 Äq. Aldehyd, 3 Äq. $Na_2(S_2O_4)$, [a] Ausbeute nach Flash-Chromatographie.

In diesem Fall war die Reinigung notwendig, da im Gegensatz zu den Derivaten ohne „nördliches“ Amid (siehe Kapitel 3.3.2.4.1) in signifikantem Maße das jeweilige „Autozyklisierungsprodukt (**179**)“ gebildet wurde. Somit schien diese Nebenreaktion mit dem Vorhandensein der Methylestergruppe zusammenzuhängen. Ob dies durch einen spezifischen Effekt der Carbonylgruppe oder mit der generellen elektronischen Situation des Aromaten zu tun hatte, ließ sich aus den beschriebenen Reaktionen nicht ableiten, könnte jedoch in weiteren Experimenten untersucht werden.

*Tabelle 28: Hydrolyse von Methylester **177** und **178** zu den jeweiligen Carbonsäuren und Amidkupplung mit Morpholin.*



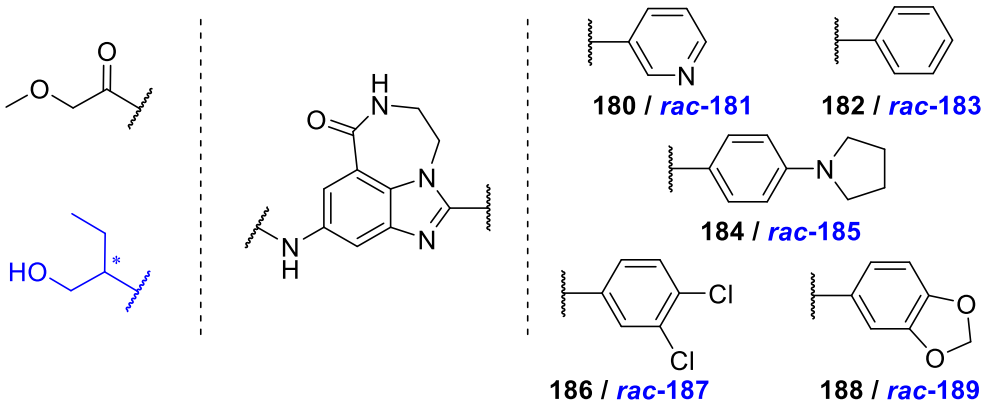
Verbindung	R^1	Zeit [h] [a]	Ausbeute [b]
175		3 / 18	48 %
176		3 / 18	23 %

Reaktionsbedingungen: 1) 1 Äq. Ester, 1,2 Äq. NaOH, 2) 1 Äq. Carbonsäure, 1,5 Äq. $(COCl_2)$, kat. DMF, 2 Äq. Amin, [a] Reaktionszeit Hydrolyse / Amidkupplung, [b] Ausbeute über zwei Stufen nach präparativer HPLC.

Die Natriumsalze der Carbonsäuren wurden nach Hydrolyse mit NaOH und Entfernung des Lösemittels in die entsprechenden Säurechloride überführt und mit Morpholin umgesetzt. Nach der Reinigung wurden bereits die ersten beiden Derivate der 2. Generation mit einer Ausbeute von 48 % (**175**) und 23 % (**176**) über zwei Stufen erhalten (siehe Tabelle 28).

3.3.3.2 Design und Synthese von trizyklischen NUCC-555 Derivaten

Für die weiteren Derivate der 2. Generation sollte das Grundgerüst durch die Bildung eines dritten Rings rigidisiert werden. Um dies zu erreichen, sollte die Ethylgruppe des Benzimidazols an den „nördlichen“ Amidstickstoff gebunden werden, wodurch der Kern eine größere polare Interaktionsfläche aufweist. Zunächst sollten nur Derivate ohne „nördliche“ Benzylgruppe synthetisiert werden, die lediglich den trizyklischen Kern und eine polare Seitenkette enthielten.



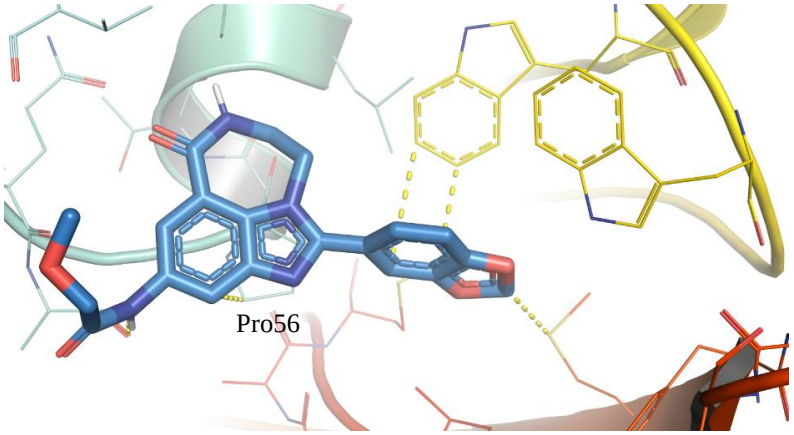
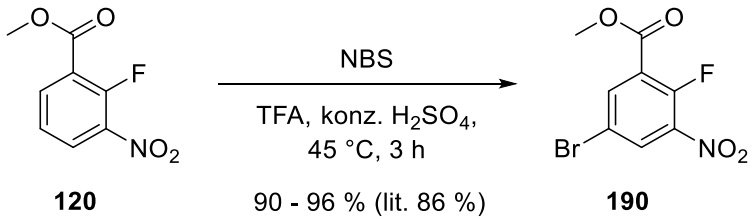


*Abbildung 73:Oben: Übersicht über die geplanten trizyklischen Derivate (blau mit Aminoalkoholrest, schwarz mit Methoxyessigsäurerest), unten: Dockingpose von **189**, der trizyklische Kern interagiert mit der „Wrist-Helix“, vor allem mit Pro56, die polare Seitenkette scheint weniger mit der Proteinoberfläche zu interagieren, könnte aber zur Interaktion mit dem wässrigen Medium beitragen, der Methylendioxyaromat bildet ein Pi-Staking mit Try29 aus und legt sich in eine hydrophobe Tasche, Scoring-Wert: –7,3 kcal/mol (Referenz **7**: –7,7 kcal/mol).*

Aus diesen Überlegungen resultierten insgesamt acht Verbindungen für ein erstes Screening, wobei jede Variante einmal mit der Methoxyessigsäureamidseitenkette von NUCC-555 (**7**) und mit der 2-Aminobutanolseitenkette von IMB0901 (**8**) synthetisiert werden sollte. Diese Serie bestand aus: Derivaten mit Pyridinrest (**180** und **181**), mit Phenylrest (**182** und **183**), mit 4-Pyrrolidinphenylrest (**184** und **185**), mit 3,4-Dichlorphenylrest (**186** und **187**) und, als zuvor noch nicht synthetisierte Variante, Derivaten mit 3,4-Methylendioxyphenylrest (**188** und **189**). Der 4-Pyrrolidinphenylrest und der 3,4-Dichlorphenylrest wurden aufgrund der positiven Ergebnisse der 1.Generation ausgewählt. In den Dockingstudien war zudem der 3,4-Methylendioxyphenylrest vergleichbar mit dem 3,4-Dichlorphenylrest (siehe Abbildung 73). [18]

Die Synthese ging von 2-Fluor-3-Benzoesäuremethylester (**120**) aus, welcher entsprechend Ren *et al.* in konz. H_2SO_4 und TFA mit N-Bromsuccinimid (NBS) bromiert wurde.[260] Das Produkt **190** konnte in hoher Reinheit mit einer Ausbeute zwischen 90 % und 96 % (Lit. 86 %)[260] isoliert werden (siehe Schema 53).

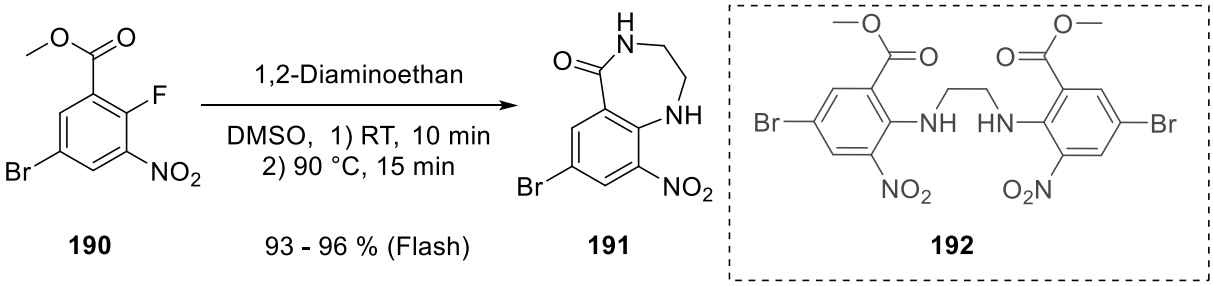


120 90 - 96 % (lit. 86 %) **190**

*Schema 53: Bromierung von Methylester **120** mit NBS unter sauren Bedingungen.*

Der nächste Syntheseschritt bestand aus der Herstellung des zweiten Zyklus´ in einer One-Pot-Reaktion mit 1,2-Diaminoethan, um das Intermediat **191** zu erhalten. In einem Testansatz wurde allerdings die hohe Reaktivität von **190** in der S_NAr-Reaktion unterschätzt, da sich nach der Zugabe von Diaminoethan zum Teil die verbrückte Verbindung **192** bildete. Nach der Zyklisierung bei 90 °C konnte **191** mit einer Ausbeute von 54 % isoliert werden. Um in folgenden Reaktionen die Bildung des Nebenprodukts zu vermeiden, wurde **190** zu einem Überschuss von Diaminoethan getropft und anschließend auf 90 °C erhitzt. Dadurch konnte die Bildung von **192** fast vollständig unterdrückt werden und das Produkt **191** wurde in Ausbeuten zwischen 93 % und 96 % erhalten (siehe Schema 54).

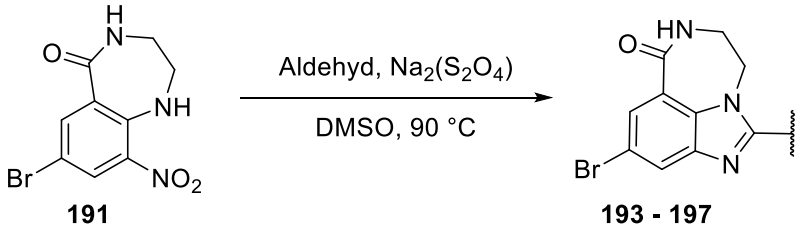
[18] Für diese Serie wurden die Dockingposen der einzelnen Verbindungen und die dazugehörigen Scores weniger stark berücksichtigt, da in der vorangegangenen Serie keine Korrelation zwischen Docking und den realen biologischen Ergebnissen festgestellt werden konnte.

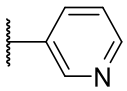
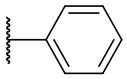
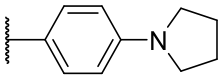
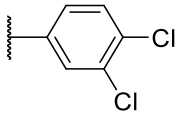
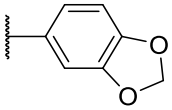


*Schema 54: One-Pot-S_NAr-Zyklisierungsreaktion von **190** zu **191**, die Bildung des Nebenprodukts **192** (grau im Kasten) konnte durch die Reaktionsführung fast vollständig unterbunden werden.*

Mit Intermediat **191** konnten im Anschluss die reduktiven Zyklisierungsreaktionen zu den fünf trizyklischen Benzimidazolen **193**, **194**, **195**, **196** und **197** durchgeführt werden (siehe Tabelle 29).

*Tabelle 29: Reduktive Zyklisierung von **191** mit verschiedenen Aldehyden.*



Verbindung	R^1	Zeit [h]	Ausbeute [a]
193		3	68 - 92 %
194		3	93 %
195		3	60 %
196		3	61 %
197		3	69 %

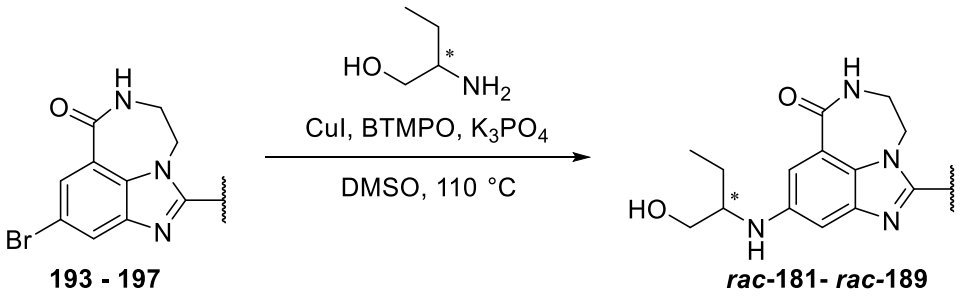
Reaktionsbedingungen: 1 Äq. **191**, 1,2 Äq. Aldehyd, 3 Äq. $Na_2(S_2O_4)$, [a] Die Produkte wiesen eine ausreichend hohe Reinheit auf und wurden direkt in den Folgereaktionen eingesetzt.

Die Synthese von **193** wurde mehrfach in einem kleinen Maßstab zu Testzwecken mit Ausbeuten zwischen 68 % und 92 % durchgeführt. Da in dieser Reaktion die intramolekulare Zyklisierung ausgeschlossen war, wurden die Äquivalente des Aldehyds auf 1,2 verringert.

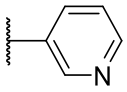
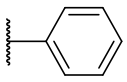
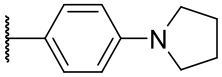
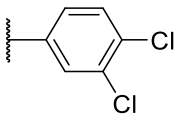
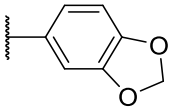
Die weiteren Reaktionen wurden im Anschluss mit denselben Bedingungen in größeren Maßstäben angesetzt und die Produkte mit Ausbeuten zwischen 60 % und 69 % isoliert. Alle Verbindungen waren sehr polar und mussten zum Teil bis zu siebenmal mit $CHCl_3$/*i*-PrOH (3:1) extrahiert werden. Einzig das Benzimidazol **194** war in keinem der zur Extraktion verwendeten Lösemittel löslich, sodass das abfiltrierte Rohprodukt in der nächsten Reaktion eingesetzt werden musste. In diesem Fall betrug die Ausbeute 93 %.

Anschließend wurde die BTMPO/CuI-katalysierte Aminierungsreaktion entsprechend den etablierten Bedingungen durchgeführt (siehe Tabelle 30).

Tabelle 30: Cu-katalyisierte Reaktion verschiedener Brombenzimidazole mit rac-2-Aminobutanol.



193 - 197 **rac-181- rac-189**

Verbindung	R^1	Zeit [h]	Ausbeute [a]
***rac*-181**		4	3,9 %
***rac*-183**		> 168	- [b]
***rac*-185**		> 168	- [b]
***rac*-187**		4	29 %
***rac*-189**		72	5,2 %

Reaktionsbedingungen: 1 Äq. Bromid, 10 mol% CuI, 10 mol% BTMPO, 2,5 Äq. K_2CO_3, 2 Äq. Amin, [a] Ausbeute nach präparativer HPLC, [b] die Reaktion zeigte keinen Umsatz zum gewünschten Produkt.

Nach einer Reaktionszeit von 4 h wiesen die Reaktionen von **193** und **196** bereits einen sehr hohen Umsatz des Startmaterials auf. Die Reaktion von **197** zum Amin **187** war nach 72 h vollständig. Bei der Bildung des Dichlorphenylderivats **187** konnte erneut nur das Br-Substitutionsprodukt beobachtet werden, was die zuvor erhaltenen Ergebnisse und die mechanistischen Überlegungen noch einmal bestärkte.

Die Derivate konnten im Anschluss mit Ausbeuten zwsichen 3,9 %, 5,2 % und 29 % isoliert werden, wobei die niedrigen Ausbeuten von **181** und **189** sich durch eine hohe Retention auf der Umkehrphase und einer Vielzahl von Nebenprodukten erklären (in allen Reaktionen konnte in größerem Ausmaß die Bildung des jeweiligen debromierten Nebenprodukts beobachtet werden, siehe Abbildung 74), was die chromatographische Reinigung erheblich erschwerte.

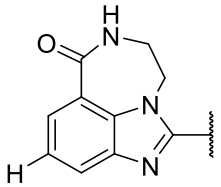


Abbildung 74: Dehalogenierte Nebenprodukte aus der Cu-katalysierten Kupplungsreaktion.

Die beiden anderen Reaktionen zeigten hingegen nach über 168 h keinen bzw. nur einen sehr geringen Umsatz (<5 % in der LC/MS Reaktionskontrolle), weshalb die Methode als ungeeignet für diese elektronenreicheren Substrate eingeschätzt wurde. Möglicherweise würde ein anderes Katalysatorsystem auf Cu- oder Pd-Basis zum Erfolg führen, jedoch wurden zunächst die biologische Charakterisierung der anderen Derivate abgewartet und schlussendlich die Synthese nicht mehr weiterverfolgt (siehe Kapitel 3.3.3.3).

Für die fünf Derivate mit dem Methoxyessigsäurerest wurden die Bromintermediate **193**, **194**, **195**, **196** und **197** in der etablierten Azidierungsreaktion mit NaN_3, CuI, DMEDA und Na-Ascorbat eingesetzt, die Reaktionszeit musste allerdings deutlich verlängert werden, was vermutlich mit der sehr elektronenreichen Kernstruktur zusammenhing. Wie bereits in der BTMPO/CuI-katalysierten Aminierung konnte zudem die Bildung der jeweiligen debromierten Verbindungen als Nebenprodukt beobachtet werden.

In der Reaktion der chlorierten Verbindung **196** wurden in großem Maße die doppelt bzw. dreifach azidierten (und teilweise reduzierten) Produkte beobachtet (siehe Abbildung 75). Anscheinend verlief die Azidierung mit Arylchloriden ebenfalls sehr schnell (im Gegensatz zur BTMPO/CuI-katalysierten Reaktion), sodass hier eine deutlich geringere Chemoselektivität beobachtet wurde. In einer Testreaktion mit nur 1,1 Äq. NaN_3 (zuvor wurden immer 3 Äq. verwendet) wurde ebenfalls eine Mischung aus einfach, zweifach und dreifach substituiertem Produkt erhalten, womit diese Methode ungeeignet zur selektiven Azidierung war.

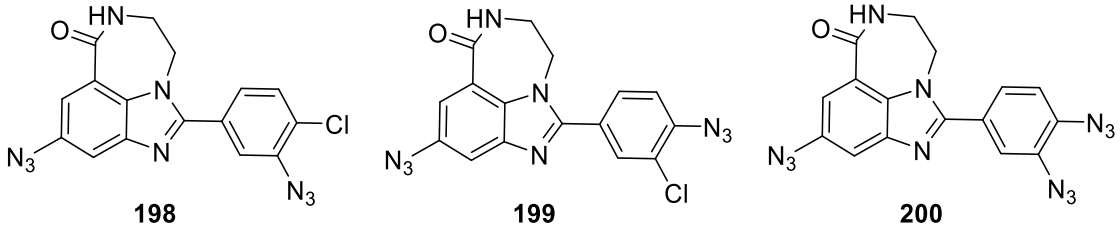
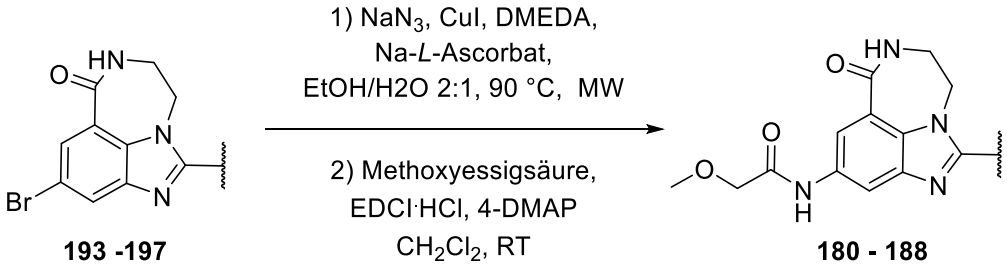


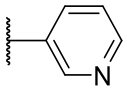
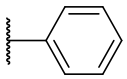
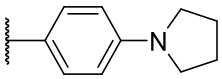
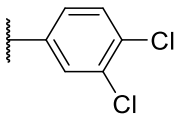
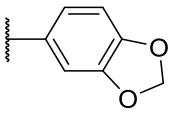
Abbildung 75: Mehrfach azidierte Nebenprodukte aus der Cu-katalysierten Kupplungsreaktion.

Darüber hinaus schien die elektronische Situation der Kernstruktur generell die *in situ* Reduktion zum Amin zu erschweren (vergleichbar zu den Derivaten ohne „nördliches“ Amid, siehe Kapitel 3.3.2.4.1). Im Fall des Phenylderivats konnte tatsächlich keine vollständige Reduktion durch erneute Zugabe von CuI und NaAscorbat erreicht werden. Das Azid musste deshalb im Anschluss mit $NaBH_4$ in DMA, angelehnt an Trigo-Lopez *et al.*, reduziert werden.[282]

Da eine chromatographische Reinigung der Amine aufgrund der sehr hohen Polarität nicht in Frage kam, wurden die Rohprodukte in der Amidkupplung eingesetzt. Diese Reaktion verlief mit den etablierten Bedingungen (EDCI·HCl, DMAP in CH_2Cl_2) für alle Verbindungen erfolgreich, sodass die Derivate mit niedrigen Ausbeuten zwischen 3,7 % und 7,0 % über zwei Stufen isoliert werden konnten. In allen Fällen war die erhaltene Menge allerdings ausreichend für die biologische Testung (siehe Tabelle 31).

Tabelle 31: Reaktionssequenz zur Herstellung von trizyklischen Dervaten.



Verbindung	R^1	Zeit [h] [a]	Ausbeute [b]
180		6 / 18	- [c]
182		5 / 18	3,7 % [d]
184		6 / 18	5,6 %
186		- / -	- [e]
188		6 / 18	7,0 %

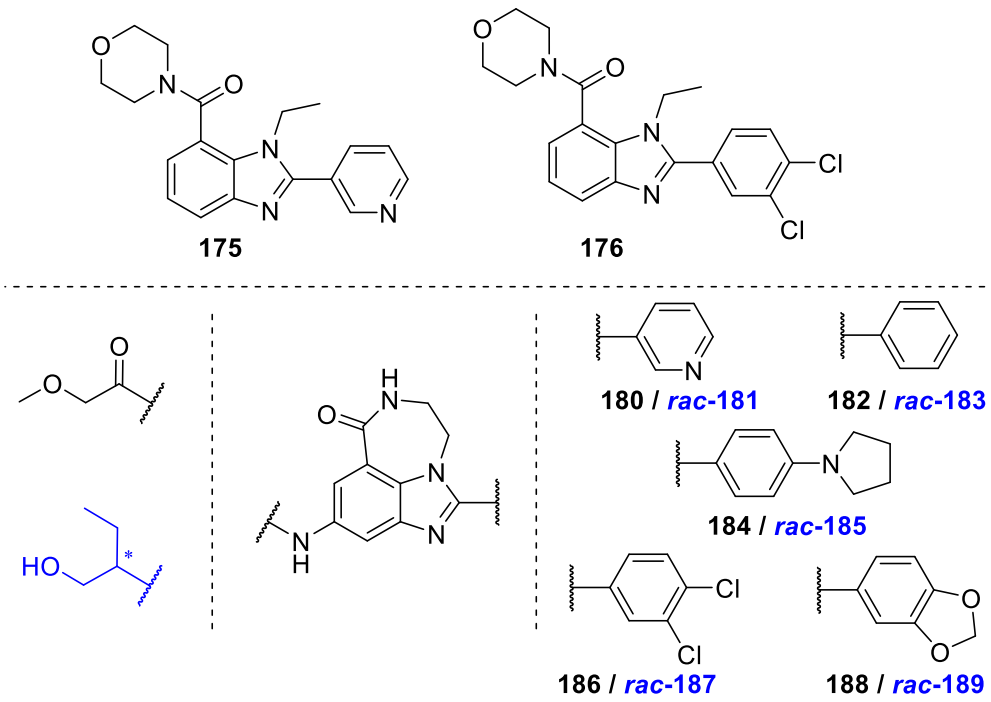
Reaktionsbedingungen: 1) 1 Äq. Bromid, 3 Äq. NaN_3, 30 mol% CuI (2x), 10 mol% NaAscorbat (2x), 35 mol% DMEDA, 2) 1 Äq. Amin, 1,5 Äq. EDCI·HCl, 1,5 Äq. DMAP, 2 Äq Carbonsäure, [a] Reaktionszeit Azidierung / Amidkupplung, [b] Ausbeute über zwei Stufen nach präparativer HPLC, [c] Produkt wurde nicht isoliert aufgrund eines operativen Fehlers während der Reinigung, [d] Ausbeute über drei Stufen, Das Azid musste mit $NaBH_4$ in DMA bei RT reduziert werden, [e] Azidierungsreaktion verlief nicht erfolgreich

Insgesamt konnten somit sechs der geplanten zehn trizyklischen Derivate über die etablierten Syntheserouten hergestellt und in dem primären Assay charakterisiert werden. [19] Die fehlenden vier Verbindungen könnten in Folgeprojekten über alternative Routen hergestellt werden.

[19] Die Verbindung **180** wurde zwar erfolgreich synthetisiert, aufgrund eines Systemfehlers ging das Produkt jedoch während der Reinigung mittels präparativer HPLC nicht isoliert. Die Resynthese wurde aufgrund der biologischen Ergebnisse zunächst verschoben, da der Fokus auf den [3,4]-Pyrazolopyrimidinen lag, und wurde schlussendlich nicht mehr vor dem Ende des Projekts abgeschlossen.

3.3.3.3 Reportergen-Assay der NUCC-555 Derivate der 2. Generation

Die insgesamt acht Derivate der 2. Generation wurden wie zuvor in dem etablierten Reporter-Assay auf ihre Aktivität geprüft (siehe Kapitel 3.2.3 für Details).



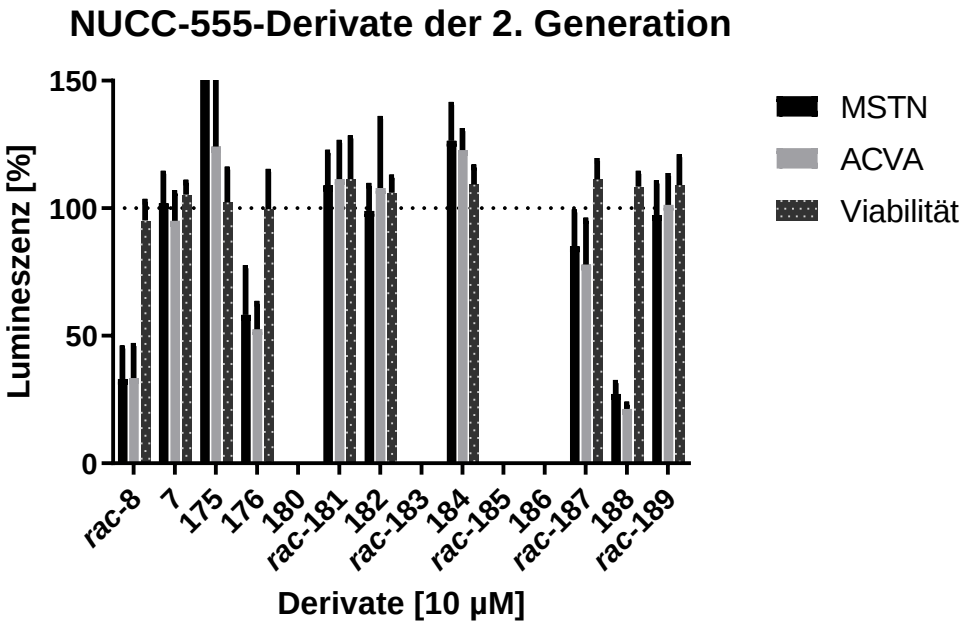
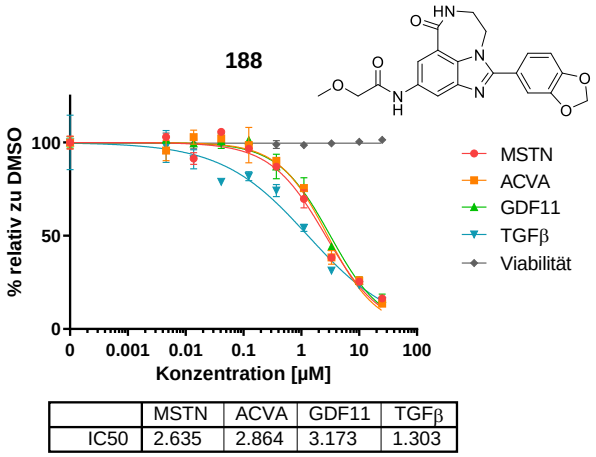


*Abbildung 76: Inhibitions- und Viabilitätsdaten von IMB0901, NUCC-555 und den NUCC-555-Derivaten der 2.Generation. Alle Verbindungen wurden in einer Konzentration von 10 µM vermessen. In der Aktivität zwischen MSTN und ACVA wies keine der Verbindungen wies einen signifikanten Unterschied auf. Die Lücken zeigen die fehlenden Verbindungen (**180**, **rac-183**, **rac-185** und **186**) an.*

Bei den Morpholinamid-Derivaten zeigte sich ein erheblicher Unterschied in der Aktivität. Das 3,4-Dichlorphenyl-Derivat **176** führte zu einer deutlichen Reduktion (58 %) des Signals, im Fall von **175** lag die Aktivität erneut deutlich über 100 %. Die MSTN- und ACVA-Signalwege wurden dabei gleichermaßen beeinflusst. Der Vergleich mit vorherigen Daten zeigt, dass der 3,4-Dichloraromat dem Pyridin überlegen zu sein scheint, und, dass diese Geometrie einer linearen Ausrichtung überlegen ist (vgl. Kapitel 3.3.2.5, Derivate **164 - 168**).

Im Fall der trizyklischen Derivate waren zwei der sechs Verbindungen aktiv, wobei **187** lediglich zu einer geringen Reduktion des Luciferasesignals führte (85 %), Derivat **188** war dahingegen aktiver als die Referenz IMB0901 (***rac*-8**) (27 % gegenüber 33 %). Bei der weiteren Charakterisierung von **188** zeigte sich, dass neben dem MSTN-Signalweg ebenfalls der ACVA-, der GDF-11- und der TGF-β-Signalweg dosisabhängig inhibiert wurde. Die IC_{50}-Werte lagen im unteren einstelligen µM-Bereich (~1-3 µM), was in dem (von Woodruff *et al.*) für NUCC-555 (**7**) publizierten Bereich lag. Dies stellte die höchste Aktivität aller NUCC-555-Derivate in diesem Projekt dar (siehe Abbildung 77).[190]



	MSTN	ACVA	GDF11	TGFβ
IC50	2.635	2.864	3.173	1.303

*Abbildung 77: Übersicht über die IC_{50}-Werte der Inhibition der MSTN-, ACVA-, GDF11- und TGF-β-Signalwege durch **188**. Die IC_{50}-Werte sind im Kasten in µM angegeben.*

Die rigidere und vergrößerte Kernstruktur führt somit im Vergleich zu den anderen Benzimidazolen zu einer höheren Aktivität. Zudem scheint der sterische Anspruch an R^1 entscheidend zu sein, was am Vergleich zwischen **182** und **188** erkennbar wird. Aufgrund der vorhandenen (geringen) Aktivität von **187** wäre darüber hinaus denkbar, dass das Methoxyessigsäure-Derivat **186** ebenfalls eine hohe Aktivität aufweist (Vergleichbar mit dem Paar aus **188** und **189**). Durch die geringe Anzahl an aktiven Derivaten basierten diese Überlegungen jedoch auf einer unzureichenden Datenbasis. Die fehlenden Derivate und neuentwickelte Verbindungen könnten in nachfolgenden Projekten synthetisiert werden.

3.3.4 Übersicht über die synthetisierten NUCC-555 Derivate

Insgesamt konnten NUCC-555 (**7**) und 31 Derivate erfolgreich synthetisiert werden. Die etablierte Syntheseroute erwies sich dabei als ausgesprochen modular, wodurch eine Vielfalt an Derivaten für die biologische Evaluation entsprechend der Zielsetzung dieses Projekts erhalten werden konnte. Die 1.Generation von Verbindungen zielte auf Modifikationen an R^1, R^2 und R^3 und kombinationen daraus, ab (siehe Abbildung 78).

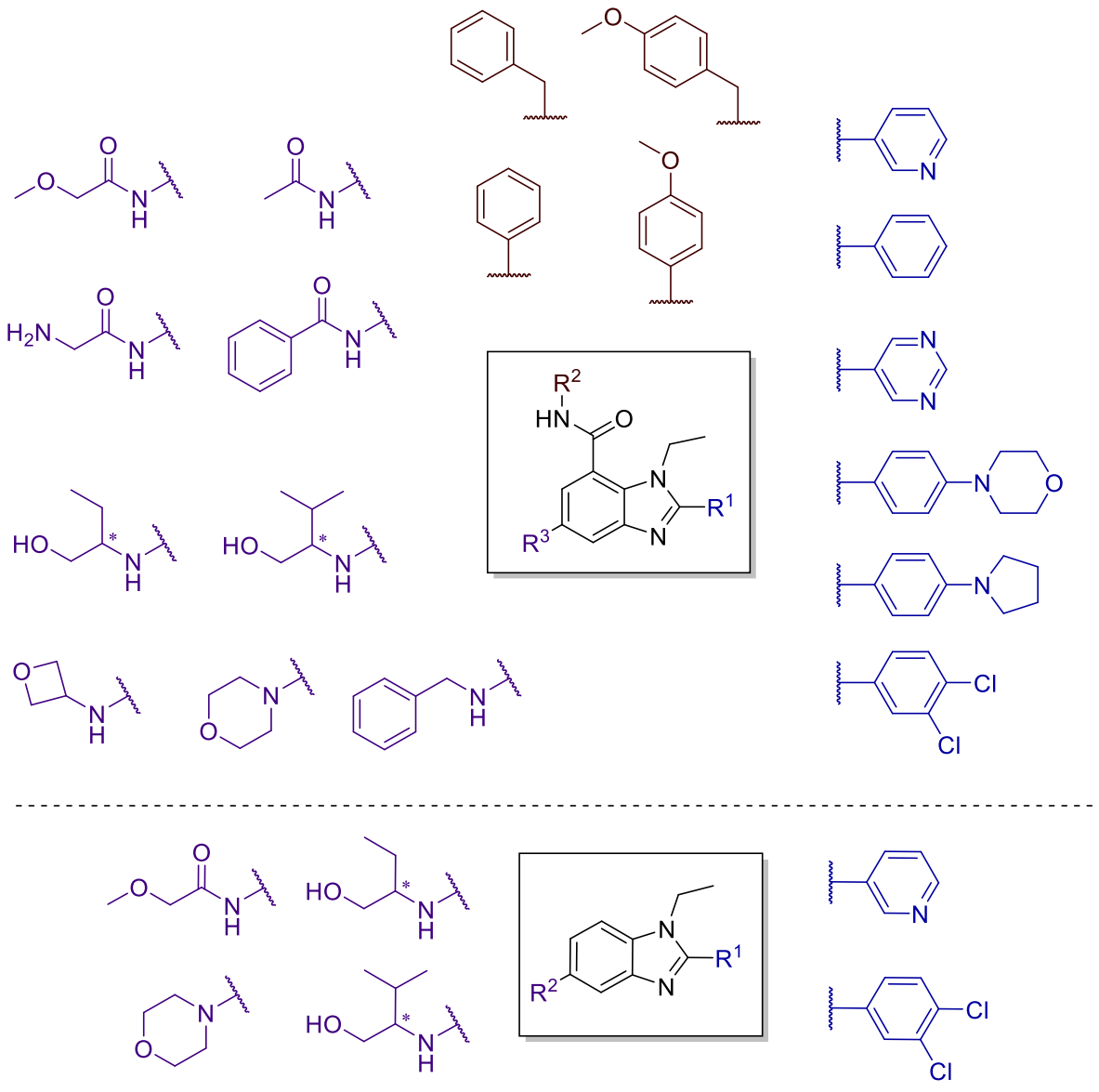


Abbildung 78: Oben: Übersicht über die verschiedenen Modifikationen am Benzimidazolkern, die in diesem Projekt synthetisiert wurden. Insgesamt wurden 20 Kombinationen aus diesen Substituenten synthetisiert, unten: Übersicht über die Derivate ohne „nördliches" Amid, die meisten Derivate enthielten den 3,4-Dichloraromaten an R^1, nur ein Derivat enthielt Pryidin R^1 (in Kombination mit Methoxyessigsäure an R^2).

Die 2. Generation von NUCC-555-Derivaten wies eine verändertes Grundgerüst und damit eine andere Geometrie auf (siehe Abbildung 79). Insgesamt konnten alle geplanten Derivate bis auf vier Vertreter der trizyklischen Verbindungen erfolgreich über die in diesem Projekt etablierte Syntheseroute hergestellt werden.

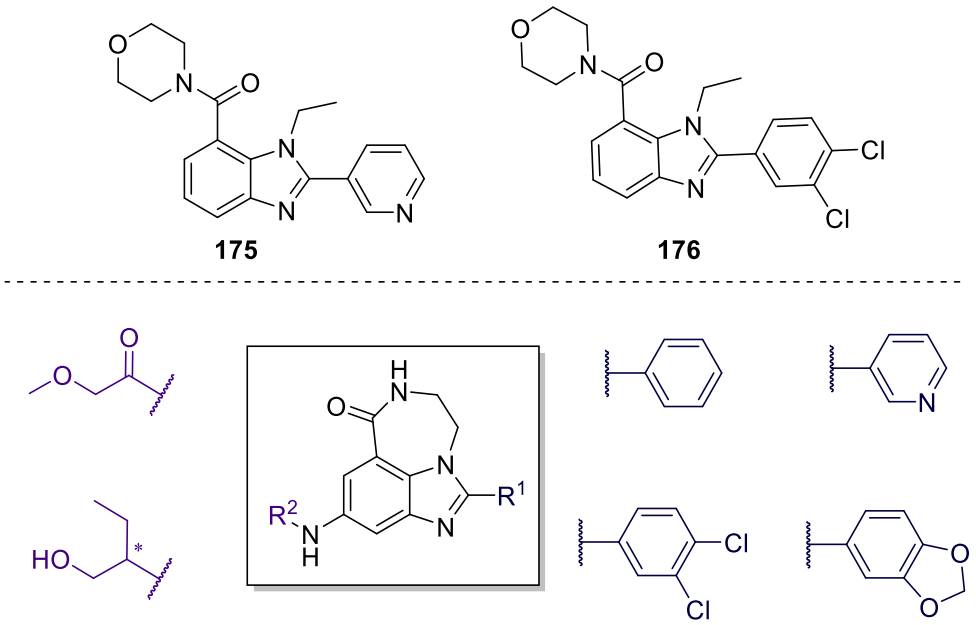


Abbildung 79: Übersicht über die Derivate der 2. Generation, oben: die beiden synthetisierten Morpholinamidverbindungen, unten: Übersicht über die verschiedenen Modifikationen am trizyklischen Benzimidazolkern, die in diesem Projekt synthetisiert wurden. Insgesamt wurden 6 Kombinationen aus diesen Substituenten synthetisiert.

Von diesen 32 Verbindungen wies lediglich das trizyklische Methylendioxyderivat **188** eine hohe Aktivität im primären Reporter-Assay auf (siehe Abbildung 80). Die Aktivität lag jedoch deutlich unterhalb der potentesten IMB0901-Derivate.

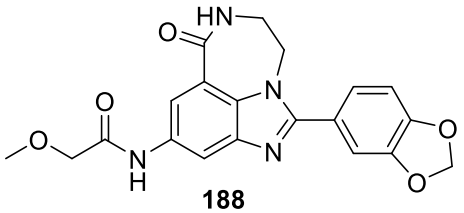


*Abbildung 80: Die aktivste Verbindung des NUCC-555-Projekts: **188**.*

Nachfolgend soll die weitere Charakterisierung der vielversprechendsten Derivate des IMB0901-Projekts und des NUCC-555-Projekts beschrieben werden.

3.4 Sekundäre biologische Evaluation

Anhand der primären biologischen Ergebnisse wurden anschließend einige Verbindungen zur weiteren Charakterisierung ausgewählt.

3.4.1 Kinase-Inhibitions-Experimente[20]

Die Hypothese der direkten Bindung eines Moleküls an MSTN und die Störung der PPI zwischen MSTN und den Typ-I-Rezeptoren wurde von Woodruff *et al.* abgeleitet.[190] Die Verbindung NUCC-555 (**7**) war jedoch in dem HEK293-SBE Assay nicht aktiv, woraus sich die Frage ergab, wie stichhaltig diese Hypothese war.

Die Dockingstudien zu IMB0901 (**8**) ergaben zwar plausible Dockingposen und die daraufhin designten Derivate zeigten zum Teil deutlich höhere Aktivitäten in der biologischen Evaluation. Da jedoch Liu *et al.* kein Target von IMB0901 (**8**) identifizierten und lediglich die Inaktivierung der SMAD-Proteine mittels WesternBlot nachwiesen, wäre eine Kinase-Inhibition der Typ-I-Rezeptoren ALK-4/5 ebenfalls als MoA für IMB0901 (**8**) und seiner Derivate denkbar. Wie in Kapitel 1.9 beschrieben, sind einige mehr oder weniger selektive Inhibitoren der Typ-I-Rezeptoren ALK-4/5 bekannt. Allerdings wiesen diese mit ihrem Imidazolkern eine andere Struktur und Geometrie als die synthetisierten [3,4]-Pyrazolopyrimidine auf. Es sind jedoch in anderen Bereichen einige [3,4]-Pyrazolopyrimidin-Kinase-Inhibitoren entwickelt worden, z.B. 3-IN-PP1 (siehe Abbildung 81).

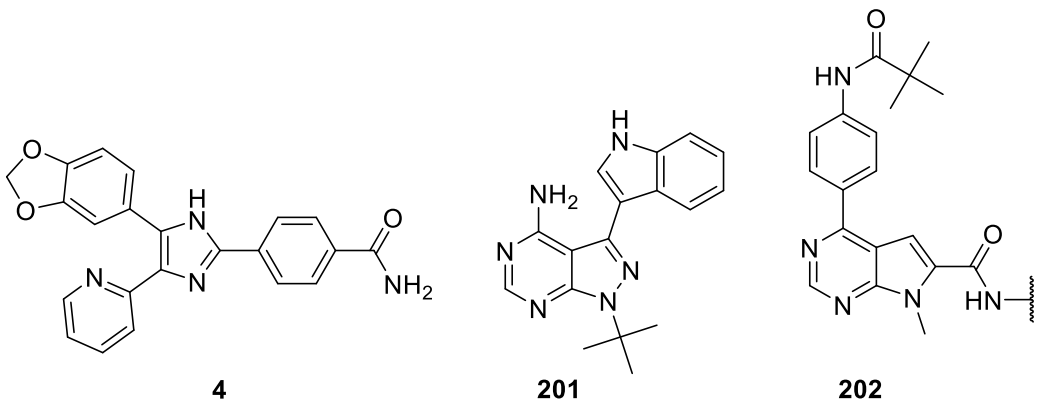


*Abbildung 81: Struktur von SB431542 **4** (ALK 4/5-Inhibitor, links), 3-IN-PP1 **201** (ein potenter Protein-Kinase-D-Inhibitor, mitte) und einem Pyrrolopyrimidin **202** (Serie von potenten Janus-Kinase-2-Inhibitoren, rechts)[237,283]*

[20] Diese Experimente wurde extern bei der Firma Eurofins in Auftrag gegeben und durchgeführt.

Um auszuschließen, dass die Derivate von **7** und **8** ebenfalls Inhibitoren der Rezeptor-Serin-Threonin-Kinasen des MSTN-Signalwegs sind, wurden sie extern von der Firma Eurofins in einem Kinase-Assay getestet. In diesem Assay wurde dazu ^{33}P-radioaktiv-markiertes ATP verwendet, wodurch die Markierung eines Substratpeptids durch Phosphorylierung möglich war. Durch die Inhibition der Kinase würde weniger ATP umgesetzt, sodass das radioaktive Signal am Substratpeptid verringert wird (siehe Abbildung 82).[284]

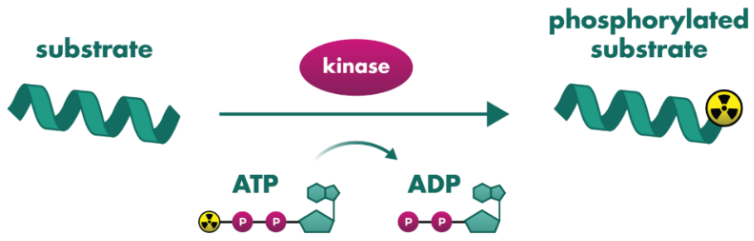


Abbildung 82: Darstellung des radiometrischen Kinase-Assays. Die Kinase überträgt das radioaktiv markierte Phosphat auf ein Substrat. Durch eine Inhibition der Kinase wird die Phosphorylierung gestört und das radioaktive Signal verringert.[285]

Getestet wurde die Inhibition der Typ-I-Kinasen ALK-4 und 5 und der Typ-II-Kinasen ActRIIA und TβRII. Die Kinasen ALK-4/5 und ActRIIA werden von MSTN, GDF11 und ACVA zur Signalweiterleitung genutzt, weiterhin nutzt TGF-β ALK-5. Der TβRII wird exklusiv von TGF-β verwendet. Dieses Panel an Kinasen war somit geeignet, um die Kinase-Inhibition als Hypothese für den MoA der Derivate zu bestätigen oder auszuschließen.

Die publizierten Werte für den bekannten ALK-4/5-Inhibitor SB431542 in einer Konzentration von 10 µM lagen in einem vergleichbaren Kinase-Assay bei jeweils 12 % Restaktivität für ALK-4/5[184] und normalerweise sind die Konzentrationen in einem isolierten Enzym-Assay niedriger als jene, die in einem zellulären Assay zu einem Effekt führen (Beschreibung/Darstellung des Effekts für TP-008 (**6**) unter [181], generelle Beschreibung des Assays unter [284]).

Neben NUCC-555 (**7**) und ***rac*-IMB0901** (**8**) wurden die Verbindung **188** als trizyklischer NUCC-555 Vertreter und **27** und **35** als morpholinhaltige Vertreter von IMB0901 in diesem Assay getestet (siehe Tabelle 32).

Tabelle 32: Ergebnisse des Kinase-Inhibitions-Assays: Angegeben ist die Kinaseaktivität, je niedriger die Kinaseaktivität desto potenter der Inhibitor: 100 % Aktivität entspricht 0 % Inhibition (die Verbindung ist kein Antagonist). Die Verbindungen wurden in einer Konzentration von 10 µM vermessen. [a] SB431542 reduzierte die Aktivität von ALK-4/5 in einem vergleichbaren Assay auf 12 %.[184]

Verbindung [10 µM]	ALK-4 [%][a]	ALK-5 [%][a]	ActRIIA [%]	TβRII [%]
NUCC-555	92	102	95	95
188	89	107	115	112
IMB0901	88	80	80	94
27	93	82	101	106
35	88	90	90	115

NUCC-555 (**7**) zeigte nur eine sehr geringe bis gar keine Veränderung der Kinaseaktivität bei einer Konzentration von 10 µM (≤ 8 % bei allen). Ähnlich verhielt es sich mit **188**, lediglich ALK-4 wurde um 11 % in seiner Aktivität veringert. Da der IC_{50}-Wert von **188** im zellulären Assay deutlich unter 10 µM lag, konnte davon ausgegangen werden, dass der inhibitorische Effekt nicht mit der Inhibition der Kinasen zusammenhing.

Die [3,4]-Pyrazolopyrimidine wiesen eine höhere Inhibition einzelner Kinasen auf.[21] Allen voran zeigte ***rac*-**IMB0901 (**8**) eine Reduktion der Kinaseaktivität von ActRIIA und ALK-5 um 20 %. Daneben wurde ALK-4 um 12 % und ActRIIB um 6 % inhibiert. Verbindung **37** wies ebenfalls eine Reduktion von ALK-4 und ALK-5 auf, wobei die beiden Typ-II-Rezeptorkinasen nicht inhibiert wurden. Für die ähnliche Verbindung **35** war eine vergleichbare Tendenz zu beobachten, allerdings inhibierte diese neben den Typ-I-Rezeptorkinasen auch ActRIIA um 10 %.

Diese teilweisen Reduktionen der Kinase-Aktivität müssen jedoch im Kontext der zellbasierten Assays betrachtet werden. Vor allem in Bezug auf die sehr niedrigen IC_{50}-Wert von ~5 nM von **35** und **27** in den primären Tests konnte ausgeschlossen werden, dass der beobachtete Effekt durch die Inhibition der Kinasen ausgelöst wurde.

[21] ANMERKUNG: Da keine Konfidenzintervalle von Eurofins angegeben wurden, konnten keine statistischen Methoden zur Bestimmung der Signifikanz herangezogen werden. Ein direkter Vergleich der Werte war nur bedingt möglich.

3.4.2 Ausblick: Wirkung auf C2C12-Zellen[22]

Zur weiteren Bestätigung der Ergebnisse aus dem primären Luciferase-Assay sollten die potenten Verbindungen einem sekundären phänotypischen Assay mit C2C12 Mausmyotuben unterzogen werden. Die ausgewählten Verbindungen waren die IMB0901-Derivate **27**, **33**, **35**, ***rac*-59**, **75** und NUCC-555-Derivat **188**.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lagen noch nicht vor der Vollendung dieses Berichts vor.

[22] Diese biologischen Experimente wurden von Dr. Viktoria Marquardt und der Arbeitsgruppe von Dr. Christian Liemersdorf am Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt (DLR) durchgeführt.

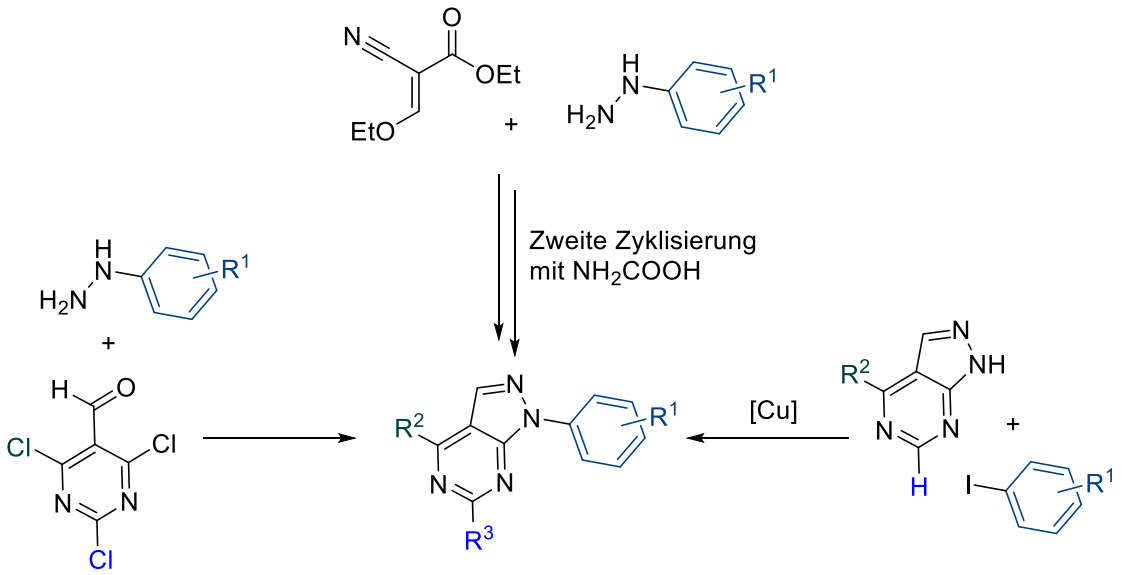
4 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Sarkopenie und Kachexie liegen eine Vielzahl an biologischen Mechanismen zugrunde. Neue Wirkstoffkandidaten zu entwickeln, die der durch Sarkopenie und Kachexie ausgelösten Muskeldegeneration entgegenwirken könnten, war die Aufgabe dieser Arbeit. Als geeignetes biologisches Ziel zur Entwicklung neuer Therapien wurde der Wachstumsfaktor MSTN identifiziert. Basierend auf den beiden Referenzverbindungen NUCC-555 (**7**), ein Benzimidazol, und IMB0901 (**8**), ein 1*H*-[3,4-d]-Pyrazolopyrimidin, sollten Small Molecules als Inhibitoren des MSTN-Signalwegs synthetisiert werden.

Dieses Projekt führte zu verschiedenen hochmodularen Syntheserouten, mit denen im Rahmen dieser Arbeit insgesamt 69 Derivate von **7** (Referenz + 31 Verbindungen) und **8** (Referenz + 36 Verbindungen) synthetisiert werden konnten. Darüber hinaus wurde ein primäres Reportergen-Assay etabliert, mit dem die Inhibition der MSTN- ACVA- GDF11- und TGF-β-Signalwege bestimmt werden konnte. In einer ersten Evaluation wurden die Verbindungen mit MSTN und ACVA in einer Konzentration von 10 µM getestet, für die potenten Verbindungen wurde anschließend ein IC_{50}-Wert bestimmt. Basierend auf diesen Ergebnissen konnten Rückschlüsse auf mögliche SAR der Inhibition der Wachstumsfaktor-Signalwege gezogen werden.

4.1 IMB0901-Projekt

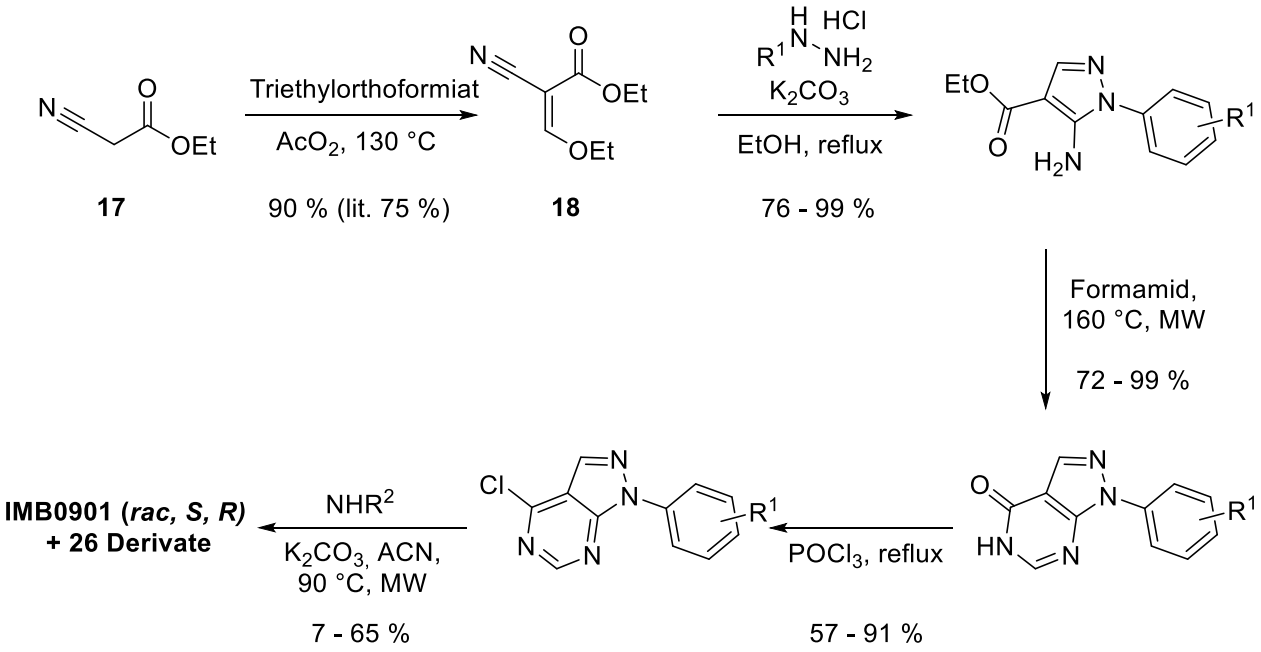
Im Rahmen des IMB0901-Projekts konnten drei verschiedene Zugänge zu substituierten [3,4]-Pyrazolopyrimidinen erfolgreich etabliert werden (siehe Schema 55). Anhand dieser wurden drei Generationen von Verbindungen synthetisiert, welche jeweils unterschiedliche Modifikationen in den Fokus rückten. Darüber hinaus wurden Verbindungen mit einem veränderten Grundgerüst hergestellt. Die Derivate wurden dabei durch klassische medizinal-chemische Methoden und durch gezieltes Docking-gestütztes Design entworfen.



Schema 55: Schematische Darstellung der verschiedenen, in diesem Projekt durchgeführten Synthesen zur Herstellung von IMB0901 und Derivaten.

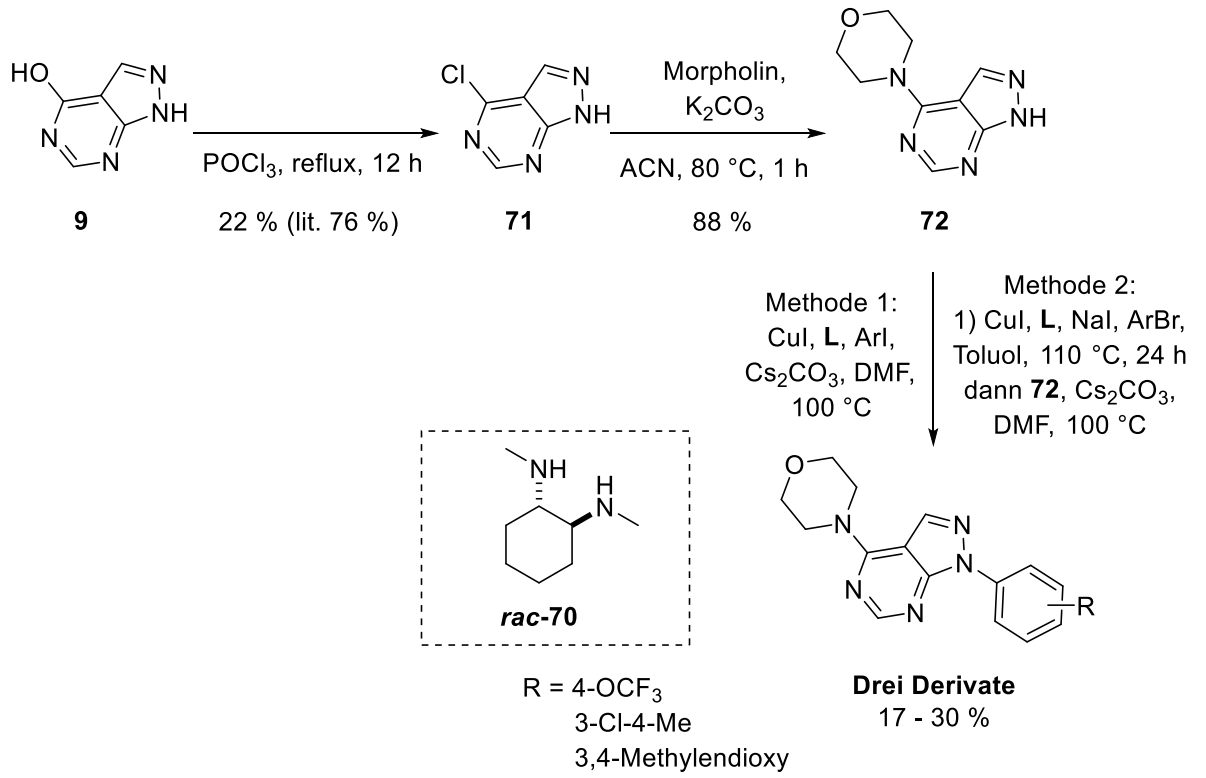
Die erste Syntheseroute führte ausgehend vom Enolether **18** über zwei Zyklisierungen (erst mit einem Phenylhydrazin, anschließend mit Formamid) zum [3,4]-Pyrazolopyrimidinon-Kern, welcher nach erfolgtem O-Cl-Austausch mit verschiedenen Nukleophilen substituiert werden konnte. Mit dieser linearen Syntheseroute war es möglich, eine Vielzahl an Derivaten mit einer Modifikation an R^1 und R^2 zu synthetisieren. Darüber hinaus bot diese Sequenz den Vorteil, dass drei Intermediate durch Ausfällung in hoher Reinheit und sehr guten Ausbeuten erhalten werden konnten. So wurde jedes Derivat nur nach der finalen Reaktion gereinigt, bevor es in dem primären biologischen Assay untersucht wurde.

Insgesamt konnten über diese Syntheseroute alle Verbindungen der 1. und 2. Generation (28 Moleküle: IMB0901*rac*, *S* und *R* + 25 Derivate) erfolgreich synthetisiert werden (siehe Schema 56).



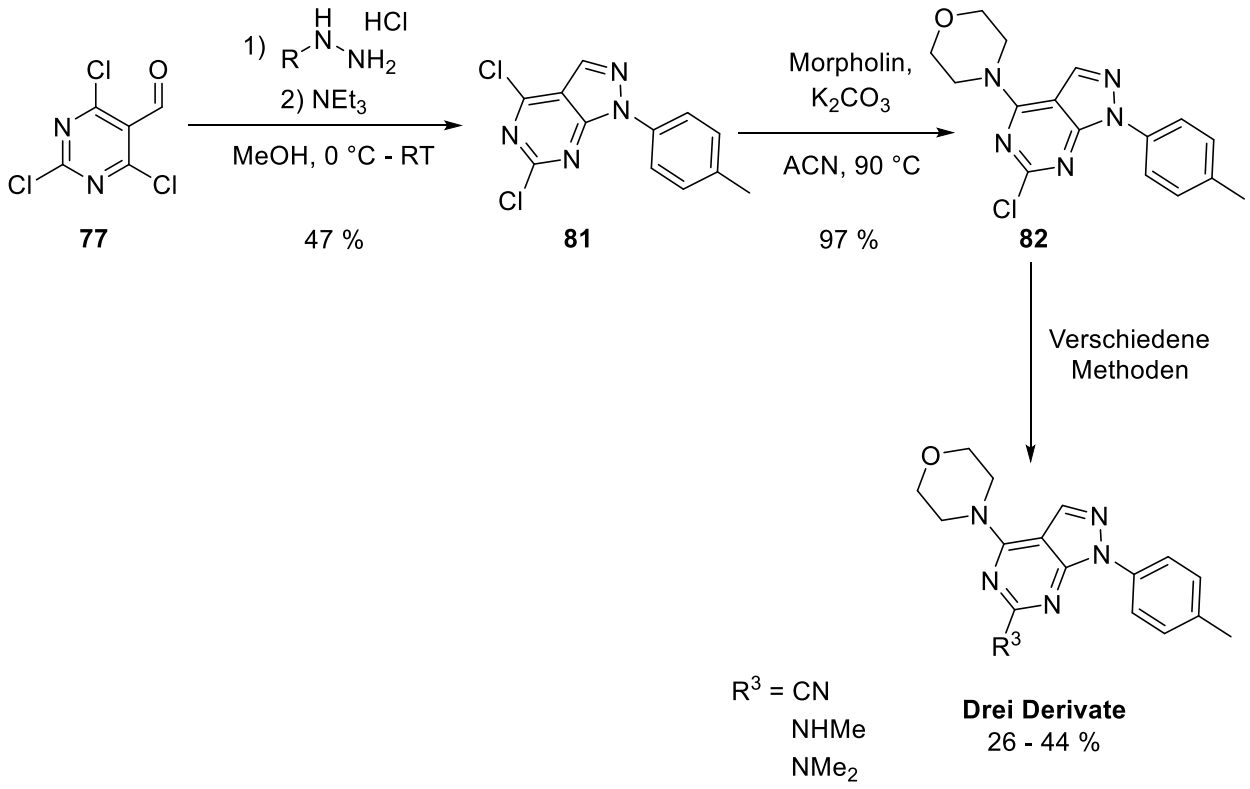
*Schema 56: Erste Syntheseroute zur Herstellung von IMB0901 und Derivaten. Diese Sequenz verlief über eine initiale Kondensationsreaktion zum Erhalt des Enolethers **18**. Dieser war Ausgangspunkt für alle weiteren Verbindungen und wurde in der ersten Zyklisierungsreaktion mit einem Hydrazin umgesetzt. Nach der zweiten Zyklisierung mit Formamid und anschließendem O-Cl-Austausch konnten die Derivate in einer finalen S_NAr-Reaktion synthetisiert werden. Nach dieser Reaktion wurden die Verbindungen mittels Flash-Chromatographie oder präp. HPLC gereinigt.*

Um den Einsatz der giftigen und krebserzeugenden Phenylhydrazine zu umgehen, wurde eine zweite Syntheseroute etabliert. Der Schlüsselschritt dieser Sequenz bestand aus der Cu-katalysierten Kupplung eines Aryliodids mit einem [3,4]-Pyrazolopyrimidin, welche an die Bedingungen von Stephan L. Buchwald *et al.* angelehnt war.[231] In diesem Projekt war es möglich, die Bedingungen erfolgreich in der Kupplung von Aryliodiden und Arylbromiden (welche *in situ* vor der Kupplung in Aryliodide umgewandelt wurden) mit dem Morpholin-Pyrazolopyrimidin **72** einzusetzen und dadurch den Substratbereich zu erweitern. Die Reaktion verlief mit einer sehr hohen Regioselektivität und es war möglich 3-Chlor-4-Methyl-1-Iodbenzol selektiv an der 1-Position zu kuppeln. Das Schlüsselintermediat für diese Reaktion wurde über zwei Stufen ausgehend von Allopurinol (**9**) über einen O-Cl-Austausch und eine S_NAr-Reaktion synthetisiert (siehe Schema 57). Insgesamt wurden drei Derivate über diese Syntheseroute hergestellt, deren jeweiliges Phenylhydrazin nicht kommerziell erhältlich war.



*Schema 57: Zweite Syntheseroute zur Herstellung von IMB0901-Derivaten. Das Schlüsselintermediat wurde ausgehend von Allopurinol **9** über zwei Stufen synthetisiert. Anschließend wurden die Derivate über eine Cu-katalysierte Kupplung hergestellt. Eine Verbindung wurde über Methode 1 hergestellt, zwei Verbindungen über Methode 2.*

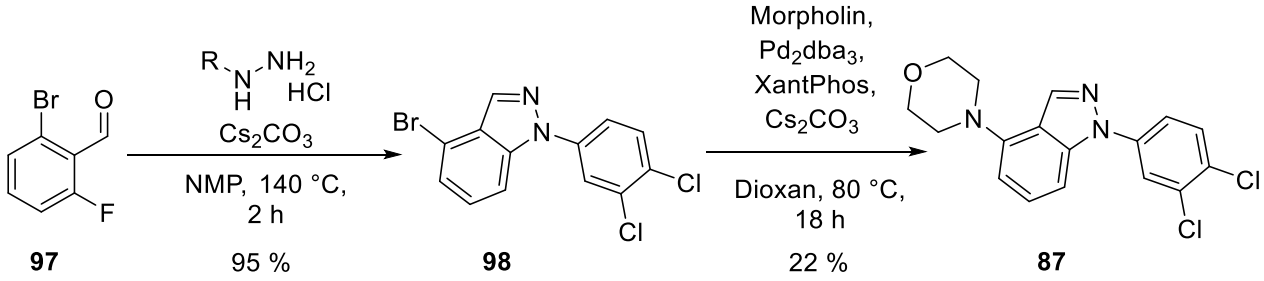
Zur Synthese dreifach substituierter Derivate wurde wiederum eine dritte Reaktionssequenz etabliert, welche von kommerziell erhältlichem Trichlorpyrimidincarbaldehyd **77** ausging. Dieses wurde in einer One-Pot-Kondensation-Zyklisierungsreaktion mit einem Phenylhydrazin zum Dichlor-[3,4]-Pyrazolopyrimidin umgesetzt. Nachfolgend wurden zwei S_NAr-Reaktionen durchgeführt, wobei die erste mit Morpholin eine sehr hohe Regioselektivität aufwies und nur ein Isomer beobachtet werden konnte. Für die zweite Reaktion wurden verschiedene Bedingungen je nach Substrat angewandt. Insgesamt konnten drei Derivate über diese Syntheseroute synthetisiert werden (siehe Schema 58).



77 81 82

*Schema 58: Dritte Syntheseroute zur Herstellung von IMB0901-Derivaten. Das Schlüsselintermediat wurde in einer One-Pot-Reaktion aus Trichlorpyrimidincarbaldehyd **77** hergestellt. Die erste S_NAr-Reaktion wurde entsprechend der etablierten Bedingungen durchgeführt. Für die zweite Reaktion wurden verschiedene Methoden verwendet: $NH_2Me \cdot HCl$, DIPEA, DMSO, 90 °C, MW, 18 h; $NHMe_2$ in THF (2 M), 75 °C, MW, 18 h; KCN, DABCO, DMSO/H_2O (3:1), RT, 14 h.*

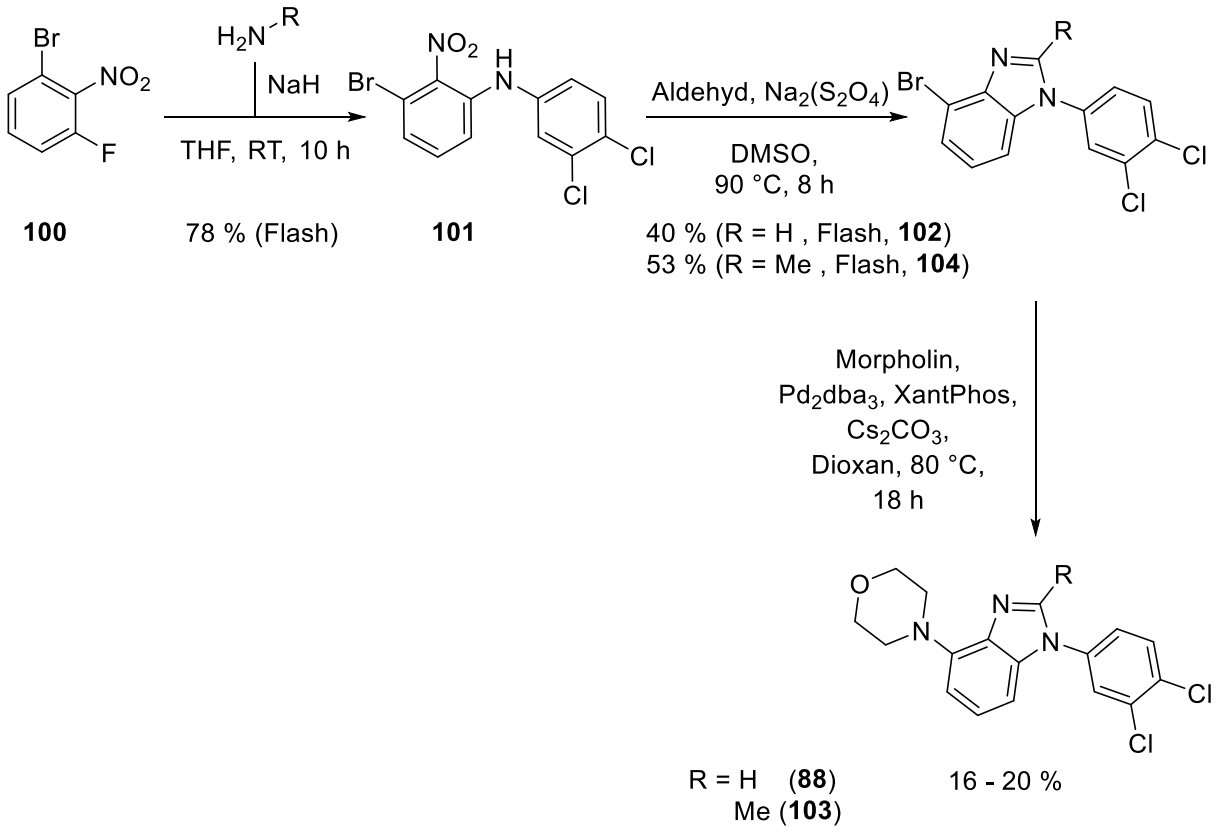
Daneben wurden für die Derivate mit verändertem Grundgerüst ebenfalls Syntheserouten etabliert. Zur Synthese des Indazols **87** wurde 2-Brom-6-Fluorbenzaldeyhd **97** mit 3,4-Dichlorphenylhydrazin zum Bromindazol **98** zyklisiert, welches anschließend in einer Buchwald-Hartwig-Kupplung mit Pd_2dba_3, XantPhos und Morpholin zum gewünschten Derivat umgesetzt wurde (siehe Schema 59).



97 98 87

*Schema 59: Synthese des Indazolderivats **87** über eine Kondensations-Zyklisierungsreaktion gefolgt von einer Buchwald-Hartwig-Kupplung.*

Die Benzimidazole **88** und **103** wurden über die reduktive Zyklisierungsreaktion aus dem NUCC-555-Projekt hergestellt. Das dazu notwendige 2-Nitroanilin (101) wurde über eine S_NAr-Reaktion synthetisiert. Die nach der Zyklisierung erhaltenen Benzimidazole wurden unter denselben Bedingungen wie das Indazol mit Morpholin gekuppelt (siehe Schema 60). Somit wurden insgesamt drei Derivate mit verändertem Grundgerüst synthetisiert.



100 78 % (Flash) **101** 40 % (R = H , Flash, **102**) 53 % (R = Me , Flash, **104**)

R = H (**88**) Me (**103**) 16 - 20 %

*Schema 60: Synthese der Benzimidazolderivate **88** und **103**. Nach einer S_NAr-Reaktion wurde das 2-Nitroanilin in einer reduktiven Zyklisierung zum Benzimidazol überführt, welches anschließend in einer Buchwald-Hartwig-Kupplung zu den finalen Derivaten umgesetzt wurde.*

Alle Verbindungen wurden anschließend in einem primären biologischen Assay getestet. Da nicht alle Kombinationsmöglichkeiten synthetisiert wurden, sollten primär die verschiedenen Serien miteinander verglichen werden (siehe Abbildung 83).

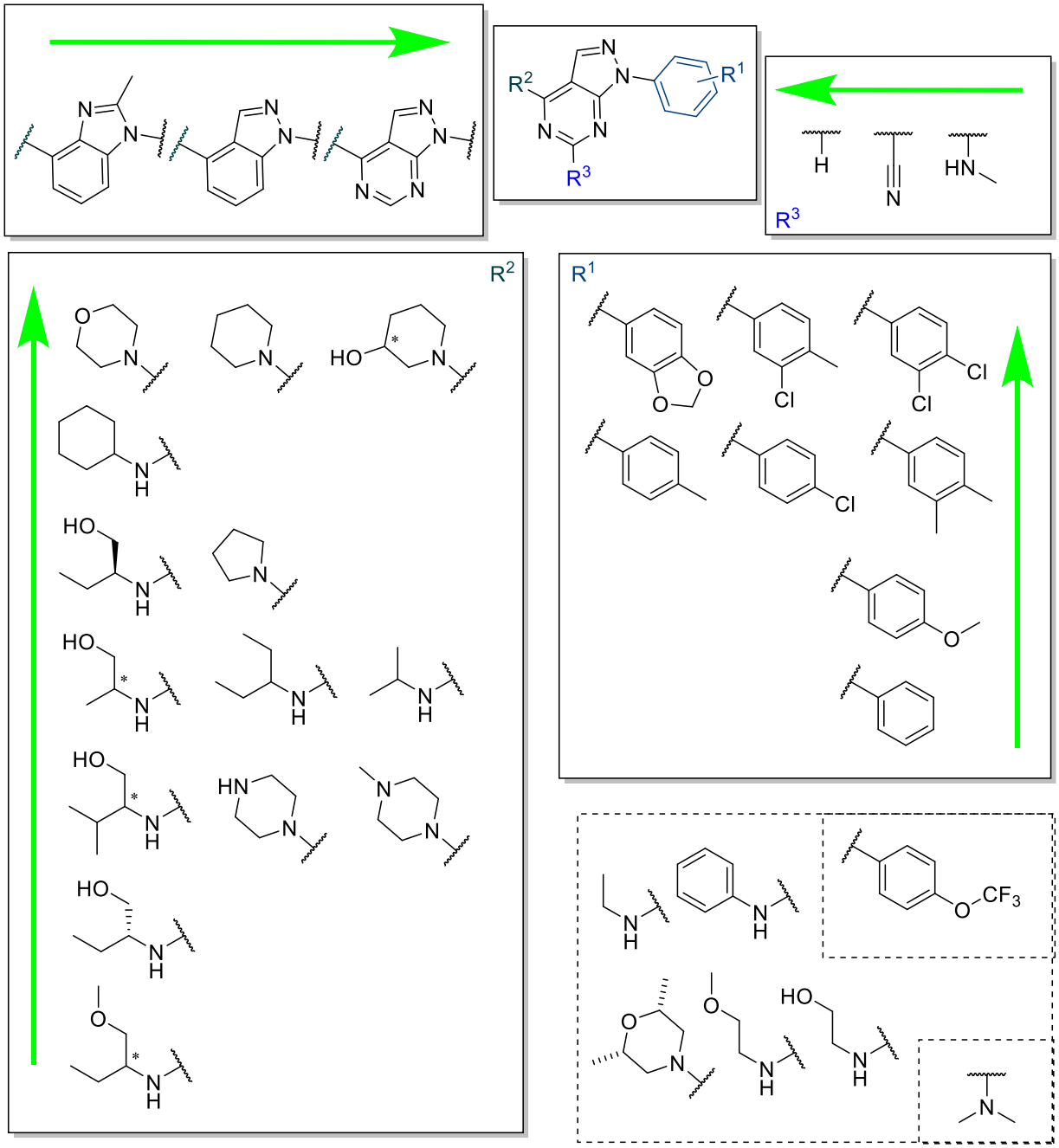


Abbildung 83: Übersicht über die Aktivität verschiedener Derivate. Nicht alle Substituenten wurden in Kombination mit allen anderen synthetisiert, weshalb ein direkter Vergleich aller Modifikationen nur bedingt möglich war. Die Substituenten innerhalb eines Kastens können jedoch direkt miteinander verglichen werden, sodass das gezeigte Ranking entstand. Die Verbindungen im gestrichelten Kasten zeigten in den jeweiligen Derivaten keine Aktivität, bzw. führten zu einem Signal von über 100 % in dem biologischen Assay.

Aus diesen Daten konnten anschließend Rückschlüsse auf die SAR gezogen werden:

- R^1: An dieser Position waren 3- oder 3,4-disubstituierte Aromaten am aktivsten, wobei die Substituenten aus Cl oder Me bestanden. Zusätzlich war der 3,4-Methylendioxyaromat aktiv. Insgesamt scheint bei den Substituenten der sterische Einfluss die entscheidende Rolle zu spielen (Aktivität Cl/Me > OMe >> OCF_3). An der

3-Position des Aromaten war jedoch ein Cl-Atom aktiver als eine Me-Gruppe, was auf eine spezifische Interaktion an dieser Position hindeutet.

- R^2: An dieser Position waren 6-gliedrige Ringe klar favorisiert, wobei die Polarität für eine hohe Aktivität nicht ausschlaggebend war. In Bezug auf die Zytotoxizität waren die unpolareren Substituenten jedoch unterlegen, sodass eine gewisse Hydrophilie Vorteile brachte. Darüber hinaus war es von Vorteil, wenn der Ring direkt an den Kern gebunden war.
- R^3: An dieser Position war eindeutig, dass die Verbindungen mit einem Wasserstoff am aktivsten waren. Darüber hinaus war das Derivat mit dem linearen Nitril vergleichsweise aktiv, büßte jedoch an Aktivität ein. Die nicht-linearen Substituenten waren dagegen kaum noch aktiv. Ob dies mit der Polarität des Amins oder mit dem sterischen Anspruch zusammenhing, ließ sich aus dieser Serie an Verbindungen nicht schließen.
- Grundgerüst: Insgesamt war das [3,4]-Pyrazolopyrimidin den anderen anellierten Systemen überlegen. Auffällig war dabei, dass sowohl die Position der Stickstoffe am Pyrazol als auch am Pyrimidin entscheidend waren. Das Indazol wies im Vergleich zum Benzimidazol eine höhere Aktivität auf, welches ohne Methylgruppe am Imidazol keine Inhibition zeigte. In einem Nachfolgeprojekt könnte ein entsprechend substituiertes [3,4]-Pyrroloyprimidin weitere Einsicht in die SAR gewähren.

Da keine der Verbindungen eine signifikante Selektivität für einen der Wachstumsfaktoren aufwies, galten diese Beobachtungen für die Inhibition aller getesteten Signalproteine. Um die SAR genauer zu verstehen und selektivere Verbindungen zu designen, wird es in Nachfolgeprojekten notwendig sein, dass genaue biologische Target der Verbindungen zu identifizieren (siehe dazu 4.3 Ausblick: weitere biologische Testung).

4.2 NUCC-555-Projekt

Im Rahmen des NUCC-555-Projekts konnte ebenfalls eine modulare Synthesroute etabliert werden. Die Schlüsselschritte zur Diversifizierung der Verbindungen bestanden aus einer reduktiven Zyklisierung zur Synthese verschiedener Benzimidazole und einer Cu-katalysierten Reaktion eines Brombenzimidazol-Intermediats (siehe Schema 61). Die Derivate wurden durch Docking-gestütztes Design und durch klassische medizinal-chemische Methoden entworfen. Es wurden zwei Generationen von Verbindungen synthetisiert, welche jeweils unterschiedliche Modifikationen in den Fokus rückten. Die zweite Generation unterschied sich strukturell stärker von den Ursprungsderivaten, als es im IMB0901-Projekt der Fall war.

Die Syntheseroute ging von 2-Fluor-3-Nitrobenzoesäure aus, welche verestert und anschließend mit $EtNH_2$ zum 2-Nitroanilin **121** umgesetzt wurde. Nach einer Bromierung wurde das Schlüsselintermediat **122** erhalten, welches im Multi-Gramm-Maßstab synthetisiert wurde. Diese ersten Reaktionen verliefen mit exzellenten Ausbeuten und die Produkte wurden in sehr hohen Reinheiten erhalten.

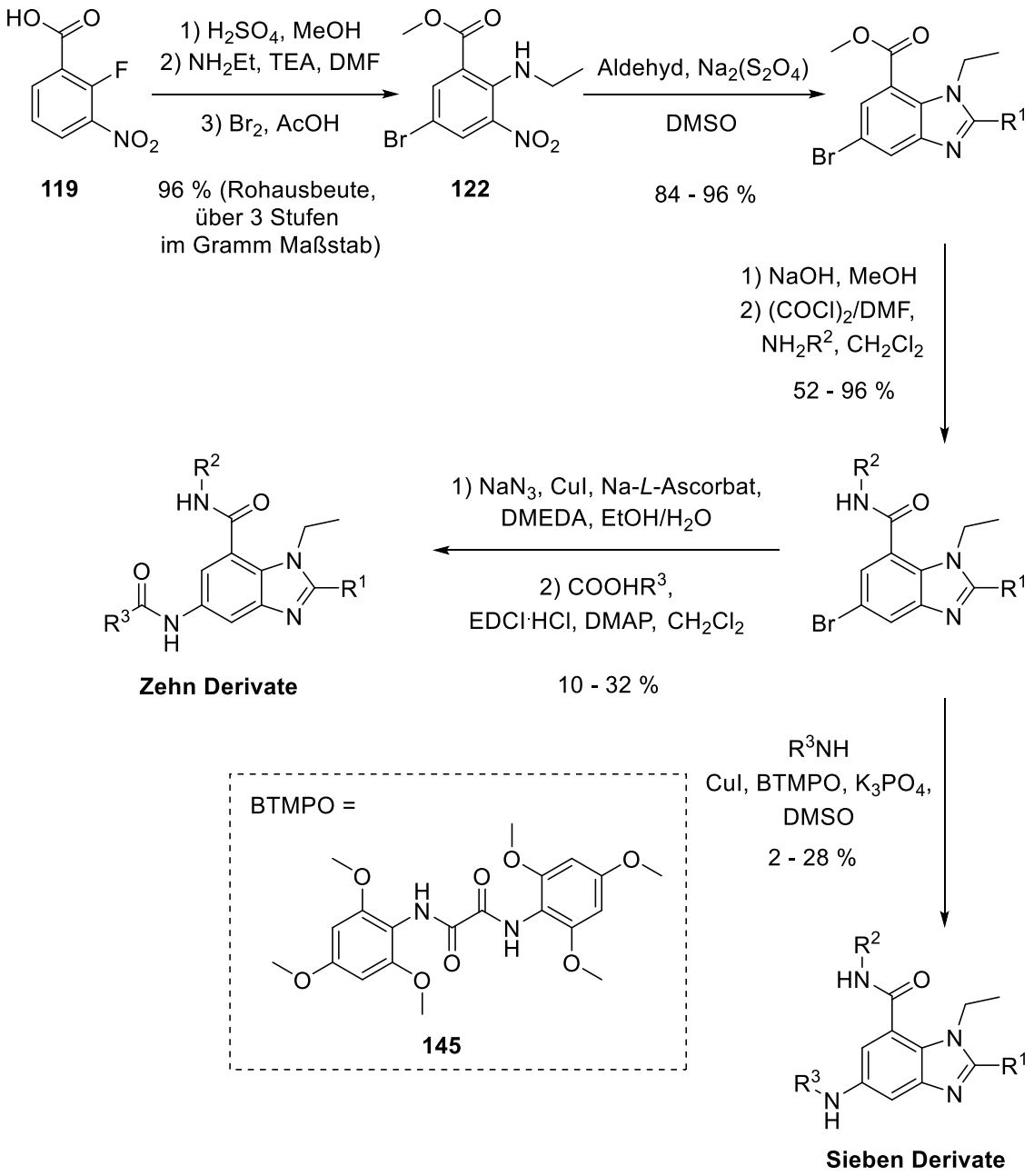
Die folgende, entsprechend den Bedingungen von Yang *et al.* durchgeführte, reduktive Zyklisierung des 2-Nitroanilins mit verschiedenen Benzaldehyden stellte den ersten Schlüsselschritt dar.[253] Durch Optimierung der Reaktionsbedingungen konnte die Bildung von Nebenprodukten oftmals auf ein Minimum reduziert werden, sodass keine chromatographische Reinigung notwendig war. Der überschüssige Aldehyd aus der reduktiven Zyklisierung konnte bei Bedarf durch eine Hydrazonbildung mit Semicarbazid auf Kieselgel entfernt werden. In diesem Projekt war es darüber hinaus möglich, den literaturbekannten Substratrahmen dieser Reaktion noch einmal zu erweitern (vor allem in Bezug auf die 2-Nitroaniline).

Zur Herstellung des „nördlichen“ Amids wurde zunächst der Methylester hydrolysiert, in das entsprechende Säurechlorid umgewandelt und mit einem Amin umgesetzt. Das aus dieser Sequenz entstandene Brombenzimidazol konnte über zwei Cu-katalysierte Reaktionen in die finalen Derivate überführt werden:

1) Um ein Amid an der R^3-Position zu erhalten wurde das Bromid mit NaN_3 in einer One-Pot-Azidierung/Reduktion umgesetzt. Als Katalysatorsystem diente dabei CuI, DMEDA und NaAscorbat. Das Amin wurde anschließend mit einer aktivierten Carbonsäure gekuppelt. Über diese Methode wurden NUCC-555 und zehn weitere Derivate synthetisiert.

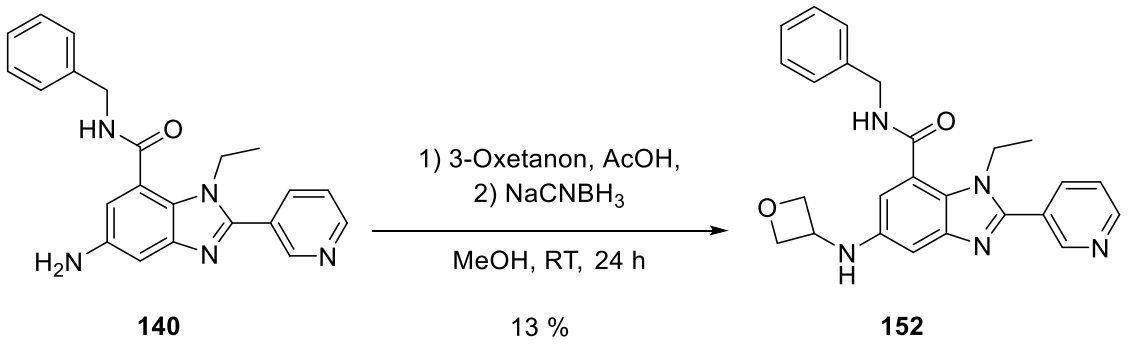
2) Um eine andere Seitenkette anzubringen wurde das Bromid in einer Ullmann-artigen Reaktion katalysiert durch CuI und BTMPO mit einem Amin gekuppelt. Über diese Route wurden sieben Derivate synthetisiert.

Die Etablierung dieser beiden Methoden stellte ebenfalls eine beträchtliche Erweiterung der jeweiligen Substratspektren dar. Vor allem konnte gezeigt werden, dass auch sehr fordernde Substrate, wie 2-Aminoalkohole und elektronenreiche Benzimidazole erfolgreich und mit einer hohen Chemoselektivität gekuppelt werden können.



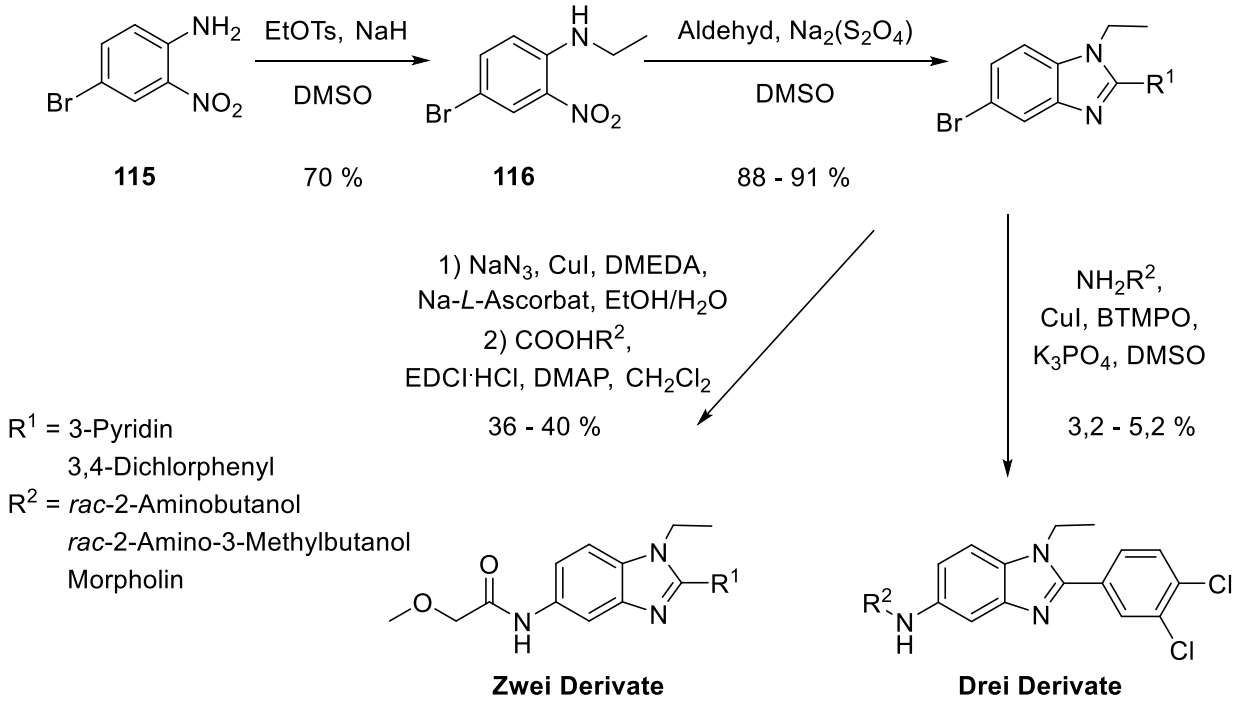
*Schema 61: Übersicht über die modulare Syntheseroute zur Herstellung von NUCC-555-Derivaten. Die Schlüsselschritte zur Diversifizierung bestanden aus der reduktiven Zyklisierung von **122** mit verschiedenen Intermediaten und den beiden Cu-katalysierten Kupplungsreaktionen.*

Ein weiteres Derivat wurde nach der Azidierung/Reduktion über eine reduktive Aminierung des intermediären Amins mit 3-Oxetanon synthetisiert (siehe Schema 62).



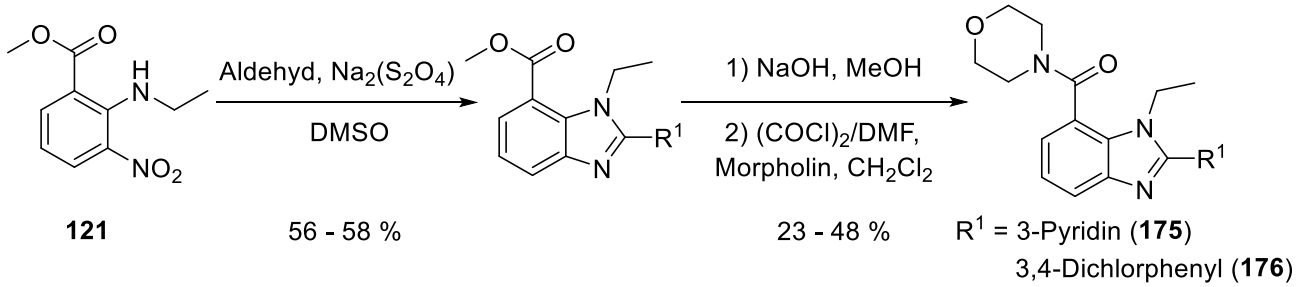
*Schema 62: Reduktive Aminierung von **140** mit 3-Oxetanon zur Synthese von **152**.*

Prinzipiell wurden die folgenden Derivate über die gleiche Route synthetisiert, wobei jeweils andere Substrate eingesetzt wurden (z.B. ohne „nördliche“ Carbonsäure, siehe Schema 63). Über diese Route wurden insgesamt fünf Derivate ohne „nördliches“ Amid synthetisiert.



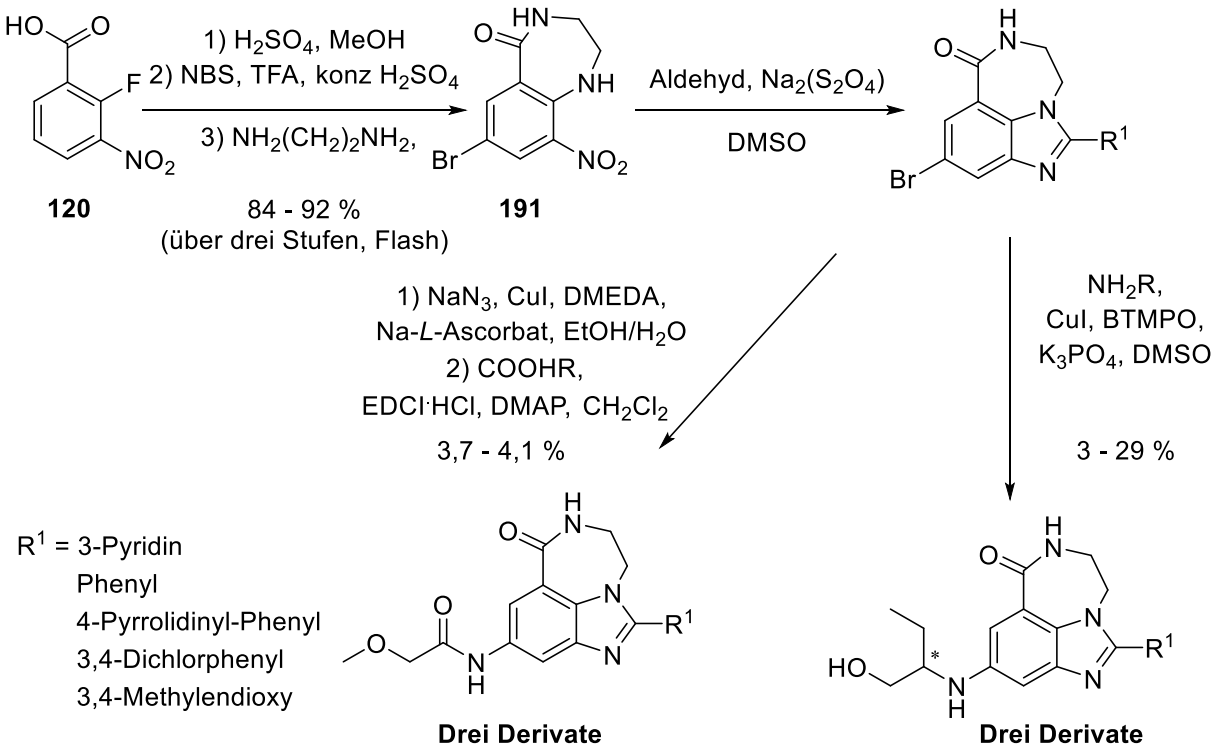
Schema 63: Übersicht über die Syntheseroute der Derivate ohne „nördliches“ Amid. Die Verbindungen wurden über dieselben Methoden wie zuvor synthetisiert.

Zur Synthese der Derivate mit einem Morpholinamid konnte von **121** ausgegangen werden. Die reduktive Zyklsierung ging in diesem Fall mit einer vermehrten Bildung von Nebenprodukten einher, sodass die Produkte nach dieser Reaktion gereinigt werden mussten. Anschließend wurde der Ester hydrolysiert und die entstandene Carbonsäure über das Säurechlorid mit Morpholin gekuppelt. Über diese Sequenz wurden insgesamt zwei weitere Derivate hergestellt (siehe Schema 64).



Schema 64: Reaktionssequenz zur Synthese der Derivate mit Morpholinamid. In dieser Sequenz mussten die Produkte nach der reduktiven Zyklisierung gereinigt werden, da eine vermehrte Bildung von Nebenprodukten stattfand.

Als Ausgangsmaterial für die trizyklischen Derivate wurde zunächst das bizyklische Intermediat **191** synthetisiert. Dazu wurde die Bromierung des Esters **120** vor der One-Pot-S_NAr/Zyklisierungsreaktion durchgeführt. Mit diesen trizyklischen Benzimidazolbromiden stießen die Cu-katalysierten Reaktionen zum ersten Mal in diesem Projekt an ihre Grenzen. Bei diesen Substraten war die Azidierungsreaktion nicht mehr chemoselektiv zwischen Br und Cl, sodass die Derivate mit 3,4-Dichloraromat ebenfalls an den Cl-Atomen substituiert wurden. Im Fall der CuI/BTMPO-katalysierten Kupplung reagierten zwei Arylbromide nach einer Reaktionszeit von einer Woche nur in einem sehr geringen Ausmaß. Im Endeffekt konnten deshalb nur sechs von zehn geplanten Derivaten erfolgreich hergestellt und isoliert werden (siehe Schema 65).



*Schema 65: Reaktionssequenz zur Herstellung der trizyklischen Derivate. Intermediat **191** diente als Ausgangsmaterial für alle Verbindungen.*

Alle Verbindungen wurden im primären Reportergen-Assay getestet. Erstaunlicherweise war die Referenzverbindung NUCC-555 (**7**) nicht aktiv. Darüber hinaus war keines der Derivate der 1. Generation in seiner Potenz vergleichbar mit IMB0901 oder dessen Derivaten. Bei der Betrachtung der vier Derivate, welche eine gewisse Aktivität zeigten, fiel auf, dass keines den Methoxyessigsäurerest von NUCC-555 aufwies. Daneben besaß nur ein Derivat den Pyridinrest an R^1, der Benzylrest an R^2 war jedoch in allen „aktiven" Derivaten vorhanden (siehe Abbildung 84). Die Substituenten dieser Verbindungen waren insgesamt relativ heterogen, sodass sich anhand dieser Daten nur schwer SAR ableiten ließen. Die Daten deuteten jedoch darauf hin, dass an R^1 eventuell der sterische Anspruch und die Lipophilie der Substituenten eine Rolle spielen könnten. An R^3 könnte ebenfalls die Größe ausschlaggebend sein, da die Polarität der „aktiven" Substituenten sehr unterschiedlich war. Diese ersten Einschätzungen müssten allerdings durch weitere Experimente bestätigt werden.

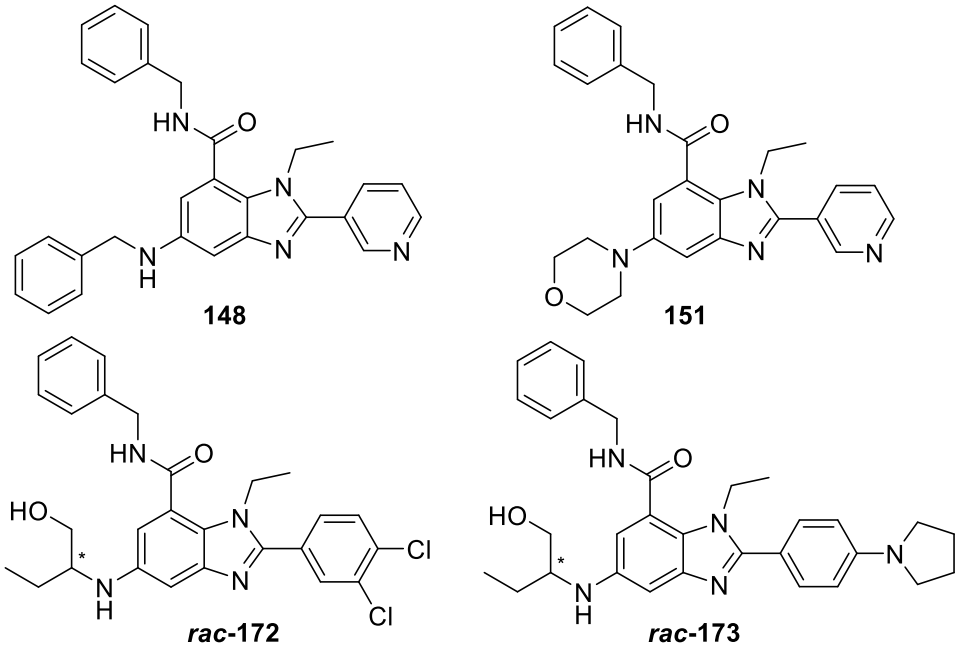


*Abbildung 84: Die Verbindungen der 1. Generation **148**, **151**, **rac-172** und **rac-173** waren im primären Assay aktiv, allerdings deutlich weniger als IMB0901. Alle anderen Verbindungen der 1. Generation zeigten keine Aktivität.*

Von der 2. Generation an Verbindungen waren drei der acht Derivate aktiv, wobei nur Derivat **188** potenter war als das [3,4]-Pyrazolopyrimidn IMB0901 (***rac*-8**). Dies war vor allem interessant, da keine der Verbindungen den Benzylaminrest an R^2 aufwies. Für **176** schien darüber hinaus die Geometrie entscheidend zu sein, da vergleichbare lineare Derivat der 1. Generation nicht aktiv waren. Insgesamt schien die große Interaktionsfläche im Kern des Moleküls von Bedeutung zu sein (siehe Abbildung 85). Wie im IMB0901-Projekt war keines der NUCC-555-Derivate selektiv für einen Wachstumsfaktor.

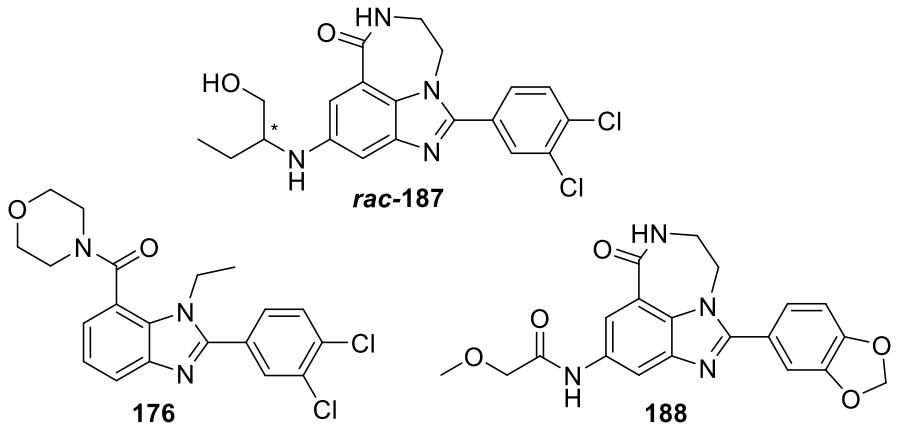


*Abbildung 85: Die aktiven Verbindungen **rac-187**, **176** und **188** aus der 2. Generation. Derivat **188** war die einzige Verbindung aus dem NUCC-555-Projekt, die eine höhere Aktivität als IMB0901 (**rac*-8**) aufwies.*

Da jedoch nur eine Verbindung in der Aktivität mit den [3,4]-Pyrazolopyrimidinen vergleichbar war, schien eine Verallgemeinerung auf Basis dieser Daten tendenziell schwierig.

Für die Entwicklung weiterer Derivate soll zunächst der genaue Wirkmechanismus geklärt werden. Anschließend könnten die trizyklischen Verbindungen einen Startpunkt zum Design neuer Derivate bilden.

4.3 Ausblick: weitere biologische Testung

Die Derivate sollen im Anschluss weitergehend biologisch und in Bezug auf ihre metabolische Stabilität untersucht werden. Die bisherigen Daten aus dem primären biologischen Assay sollten darüber hinaus in einem orhtogonalen Assay, welches z.B. die Renilla Luciferase statt der Firefly Luciferase nutzt, überprüft werden, um falsch positive Ergebnisse auszuschließen.

Zur Weiterführung dieses Projekts wäre es zudem sinnvoll, den genauen Mechanismus der Inhibition zu entschlüsseln. Um der Hypothese der Inhibition der PPI zwischen MSTN und den Typ-I-Rezeptoren nachzugehen, könnten Bindungs-Affinitäts-Assays wie Surface-Plasmon-Resonance-Assays durchgeführt werden. Daneben könnten zellbasierte Rezeptor-Dimerisierungs-Assays etabliert und durchgeführt werden, welche Aufschluss darüber geben könnten, ob der MSTN-Typ-I-Typ-II-Rezeptor-Komplex gebildet wird, oder ob die Bildung durch die Derivate gestört wird (siehe Abbildung 86).

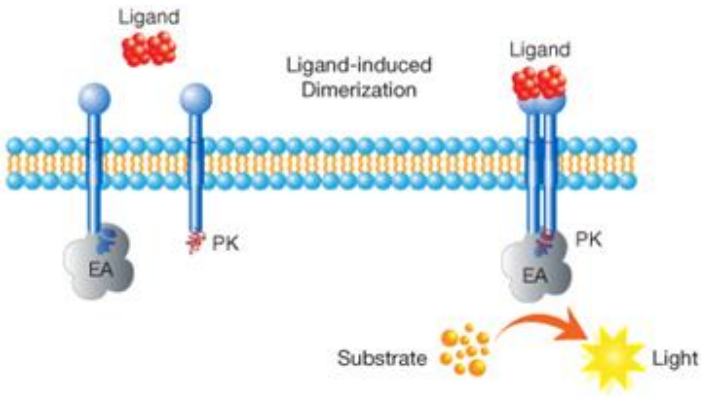


Abbildung 86: Rezeptor-Dimerisierungs-Assay. In diesem Assay werden durch die Dimerisierung der Rezeptoren zwei Teile einer Luciferase zusammengebracht, wodurch diese aktiv wird. Die Luciferase setzt anschließend ein Substrat um, wobei ein Lichtsignal frei wird. Die Dimerisierung wird durch die Zugabe eines Liganden ausgelöst. Über die Quantifizierung der Lumineszenz kann eine mögliche Inhibition der Dimerisierung bestimmt werden.[286]

Weiterhin wären Immunofluoreszenz-Assays zur genauen Lokalisierung der SMAD und Phospho-SMAD Proteine sinnvoll, um eine potentielle Inhibition der Translokation des aktivierten SMAD-Komplexes in den Zellkern nachzuvollziehen. All diese Assays könnten zur Identifikation des tatsächlichen Angriffspunkts der synthetisierten Derivate dienen.

Falls das Target identifiziert werden kann, wäre anhand der etablierten Dockingprotokolle mit AutoDock VINA das Design neuer Derivate möglich. Weiterhin wäre es sinnvoll, mit diesen *in silico* Methoden potenziell selektivere Derivate zu entwickeln. Vor allem die IMB0901-Derivate waren relativ klein und linear, was zu vermehrten Off-Target-Effekten durch Interaktion mit weiteren Biomolekülen führen könnte.

Generelle ermöglichen die in diesem Projekt etablierten Syntheserouten die Herstellung von an vielfältig modifizierten 1-*H*-[3,4-d]-Pyrazolopyrimidinen und Benzimidazolen. Der Grundstein zur Synthese neuer Wirkstoffe gegen Sarkopenie und Kachexie wurde somit gelegt.

5 AUSLANDSAUFENTHALT – AG MOURIÑO

Die folgenden Arbeiten wurden im Rahmen eines Forschungsstipendiums für Doktoranden, gefördert durch den Deutschen Akademischen Auslandsdienst (DAAD), im Labor von Prof. Dr. Antonio Mouriño an der Universidad de Santiago de Compostela in Spanien vom 06.09.2021 bis zum 20.12.2021 durchgeführt. Einzelne Arbeiten zur Vervollständigung der Daten wurden nach dem Aufenthalt in Spanien in den Laboren der Technischen Hochschule Köln abgeschlossen.

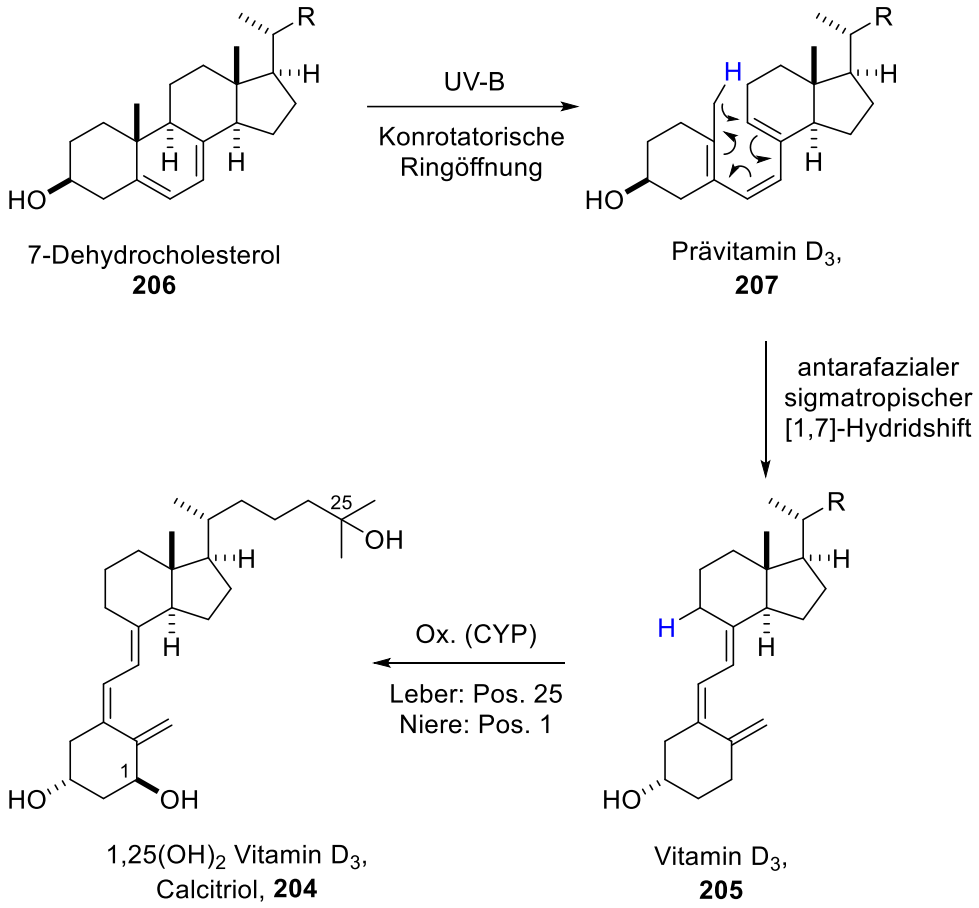
Prof. Dr. Mouriño beschäftigt sich mit der Synthese von Vitamin D_3 (VD_3, **203**), 1α,25-Dihydroxyvitamin D_3 ($1,25VD_3$, Calcitriol, **204**) und deren Derivaten. Durch die vielfältige Wirkung von VD_3 können solche Verbindungen in unterschieldichen Indikationsgebieten eingesetzt werden (z.B. Vigantol® zur Stärkung des Immunsystems, gegen Osteoporose oder Rachitis).[287] Neben der Wirkung auf die Calcium- und Phosphatspiegel hat VD_3 ebenfalls einen Effekt auf die Muskelhomöostase und spielt deshalb bei der Entwicklung von Sarkopenie eine Rolle.[288,289] Darüber hinaus konnte gezeigt werden, das VD_3 die Muskelregeneration und die mitochondriale Gesundheit stärkt.[290]

5.1 Vitamin D_3: eine kurze Übersicht

Vitamin D_3 (**203**) ist ein Vertreter der fettlöslichen Vitamine. Strukturell ist es ein Secosteroid, leitet sich daher vom Sterangrundgerüst ab.[291] Neben der Bezeichnung als Vitamin wird es ebenfalls Cholecalciferol oder Calciol genannt. Bei VD_3 handelt es sich jedoch um ein Prohormon. Die eigentlich aktive Form des Vitamins ist 1α,25-Dihydroxyvitamin D_3 ($1,25VD_3$, **204**), auch als Calcitriol bezeichnet.[292]

Calcitriol wird dabei über die Zwischenstufe Calcidiol (**205**) aus VD_3 gebildet. Dieses wird wiederum in der Haut durch UV-B-Strahlung aus 7-Dehydrocholesterol (**206**) gebildet. Durch die Bestrahlung wird der B-Ring über eine konrotatorische 6-Elektronen Reaktion geöffnet, wodurch Prävitamin D_3 (**207**) entsteht. Das Intermediat ist thermodynamisch instabil und lagert sich deshalb über eine antarafaziale sigmatropische [1,7]-Hydridverschiebung zu VD_3 um. Das Prohormon wird anschließend, an Vitamin-D-bindendes Protein gebunden, über das Blut in die Leber transportiert, wo es durch Cytochrom P450 (CYP) Enzyme oxidiert wird. Die Oxidation findet dabei an der 25-Postion der Seitenkette statt, wodurch Calcidiol (**205**) entsteht.

Anschließend wird Calcidiol (**205**) in der Niere durch die 1α-Hydroxylase am A-Ring oxidiert, wodurch Calcitriol (**204**) gebildet wird (siehe Schema 66).[291]



*Schema 66: Biosynthese von VD_3 (**203**) und 1,25VD_3 (**204**): 7-Dehydrocholesterol (**206**) lagert sich infolge einer UV-B Bestrahlung über eine konrotatorische Ringöffnung zu Prävitamin D_3 (**207**) um, welches wiederum über einen [1,7]Hydridshift zu VD_3 (**203**) isomerisiert. In der Leber wird VD_3 anschließend zu Calcidiol **205** oxidiert, welches in der Niere zu aktiven Vitamin 1,25VD_3 (**204**) oxidiert wird (nach [293,294]).*

Die Wirkung des Hormons erfolgt hauptsächlich über den Vitamin D_3 Rezeptor (VDR). Dieser ist ein intrazellulärer Steroidrezeptor, welcher nach der Aktivierung in den Zellkern migriert und dort als Transkriptionsfaktor für verschiedene Gene dient. Wie zuvor beschrieben besitzt 1,25VD_3 (**204**) die höchste Bindungsaffinität und ist der stärkste natürlich Agonist.[293] Nach der Bindung von 1,25VD_3 (**204**) und der dadurch stattfindenden Anpassung der Tertiärstruktur bildet der Rezeptor mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) ein Heterodimer. Daneben sind eine Vielzahl von weiteren Faktoren identifiziert worden, die mit diesem Komplex interagieren und dadurch die genaue Funktion und die Zielgene des Rezeptor-Komplexes steuern.[294,295]

Die wichtigsten Funktionen von 1,25VD_3 (**204**) liegen in der Regulation der Calciumhomöostase und dem Knochenauf- und abbau. [293,295] Der Calcium-Spiegel wird über die Aufnahme von Calcium im Dünndarm reguliert, da die Bildung von Calciumkanalproteinen durch den aktivierten VDR-Komplex angetrieben wird.[296] Zudem reguliert 1,25VD_3 (**204**) die Knochenmineralisierung durch seinen Einfluss auf den Calcium- und Phosphat-Spiegel.

Daneben hat 1,25VD_3 (**204**) parakrine Funktionen auf die Nebenschilddrüse durch die Reduktion der Expression des Parathormons, welches ebenfalls an der Regulierung des Calcium- und Phosphat-Spiegels beteiligt ist. Ebenfallsmit Parathormon hängt die autokrine Funktion von 1,25VD_3 (**204**) zusammen: Das Parathormon stimuliert die Expression der 1α-Hydroxylase in der Niere, wodurch vermehrt 1,25VD_3 (**204**) aus Calcidiol in der Niere gebildet werden kann und die Expression von Parathormon, wie zuvor beschrieben, sinkt.[297]

Darüber hinaus scheint 1,25VD_3 (**204**) das bösartige Zellwachstum zu unterdrücken, was zu einer geringeren Wahrscheinlichkeit an Krebs zu erkranken führt.[298] Über weitere Mechanismen moduliert es zudem das Immunsystem, spielt eine Rolle in der Blutdruckregulation und der Regulierung der Nerven- und Muskelfunktion.[288,295,299] So zeigte eine Studie, dass ein niedriger 1,25VD_3- und ein hoher Parathormon-Spiegel mit einem erhöhten Risiko von Sarkopenie einhergehen.[289]

Zur Quantifizierung eines Vitamin D_3-Mangels wird im Blut der Calcidiol-(**205**)-Spiegel (die Speicherform von VD_3) gemessen: Ab einem Wert <30 nmol/L liegt ein Mangel vor, ab einem Wert ≥125 nmol/L eine Überversorgung.[300] Beides geht mit einer Gesundheitsbelastung einher: Ein Mangel kann zu Rachitis oder vermehrter Osteoporose führen (ausgelöst durch die Unterversorgung mit Calcium und Phosphat), ein zu hoher Spiegel führt zu einer Hyperkalzämie (ein zu hoher Calcium-Spiegel, der zu akuten Symptomen aber auch einer chronischen Nierenschädigung führen kann).[291,301]

Synthetische Analoga von 1,25VD_3 (**204**) sind bereits länger im Fokus der medizinischen Forschung. Agonisten sind aufgrund der durch sie ausgelösten biologischen Effekte im Bereich der Knochengesundheit, Muskelschwächen und Autoimmunerkrankungen von großem Interesse und werden aktuell als potentielle Krebstherapeutika weiterentwickelt.[288,302,303] Durch die Co-Kristallisation und Röntgen-Kristall-Analyse des VDR mit einer Vielzahl an (natürlichen und synthetischen) Molekülen konnten die Liganden-Bindungstasche und die wichtigen Interaktionsflächen identifiziert werden. Die drei Hydroxylgruppen von 1,25VD_3 (**204**) bilden in der Bindungstasche Wasserstoffbrücken aus, wobei die 1α-Hydroxygruppe dabei die wichtigste Rolle spielt, die 3- und die 25-Hydroxylgruppen aber ebenfalls relevant

sind (siehe Abbildung 87). Darüber hinaus sind die Van-der-Waals-Wechselwirkungen des Steroidgrundgerüsts ebenfalls.[304,305]

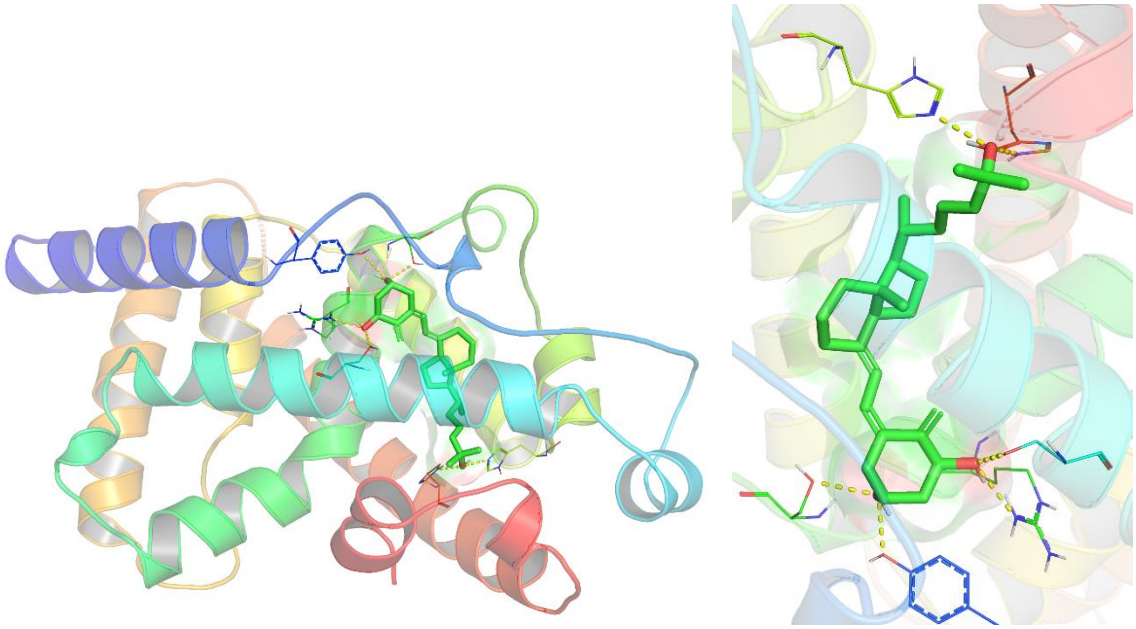


Abbildung 87: Röntgen-Kristall-Struktur des humanen VDR mit 1,25VD$_3$ in der Bindungstasche (1DB1.pdb): Links: vollständige Ansicht des Rezeptors (Cartoon) mit 1,25VD$_3$ (grün), H-Brückenbindungen sind markiert, rechts: Vergrößerter Ausschnitt der Bindungstasche mit gebundenem Liganden und den H-Brückenbindungen zwischen 1-OH und Ser237 und Arg274, zwischen 3-OH und Tyr143 und Ser278 und zwischen 25-OH und His305 und His397.[305]

Unter den synthetischen Derivaten machen Agonisten den Großteil aus. Strukturell sind diese Verbindungen oftmals von 1,25VD$_3$ (**204**) abgeleitet, wobei das Trien-System mit dem Steroidgrundgerüst beibehalten wird. Modifikationen befinden sich meistens in der Seitenkette an C-17, oder am A-Ring. Zum Beispiel ist Falecalcitriol (**208**) ein zugelassener VDR-Agonist, der zur Therapie von renaler Osteopathie und einer Störung des Ca^{2+}-Spiegels verwendet wird.[306] Durch die beiden CF_3-Gruppen erhöht sich die Azidität der OH-Gruppe deutlich, wodurch der H-Donor-Effekt zunimmt und eine stärkere Bindung an die beiden Histidinreste in der Bindungstasche stattfindet. Daneben ist Calcipotriol (**209**) aufgrund seiner immunmodulatorischen Eigenschaften zur Behandlung der Psoriasis (Schuppenflechte, siehe Abbildung 88) zugelassen.[307] Von den sogenannten Gemini-Verbindungen (Verbindungen mit zwei Seitenketten an C-20) sind ebenfalls mehrere potente Vertreter synthetisiert worden, z.B. Verbindung **210**. Andere Derivate weisen eine rigide Seitenkette auf, wie z.B. die 17-Me-Diin-Verbindung **211**. Darüber hinaus wurden nicht-steroidale Verbindungen hergestellt, welche einen aromatischen Kern statt der C- und D-Ringe enthalten (siehe Abbildung 88, Maestro *et al.* geben eine umfassende Übersicht über verschiedene Vitamin D Analoga).[304]

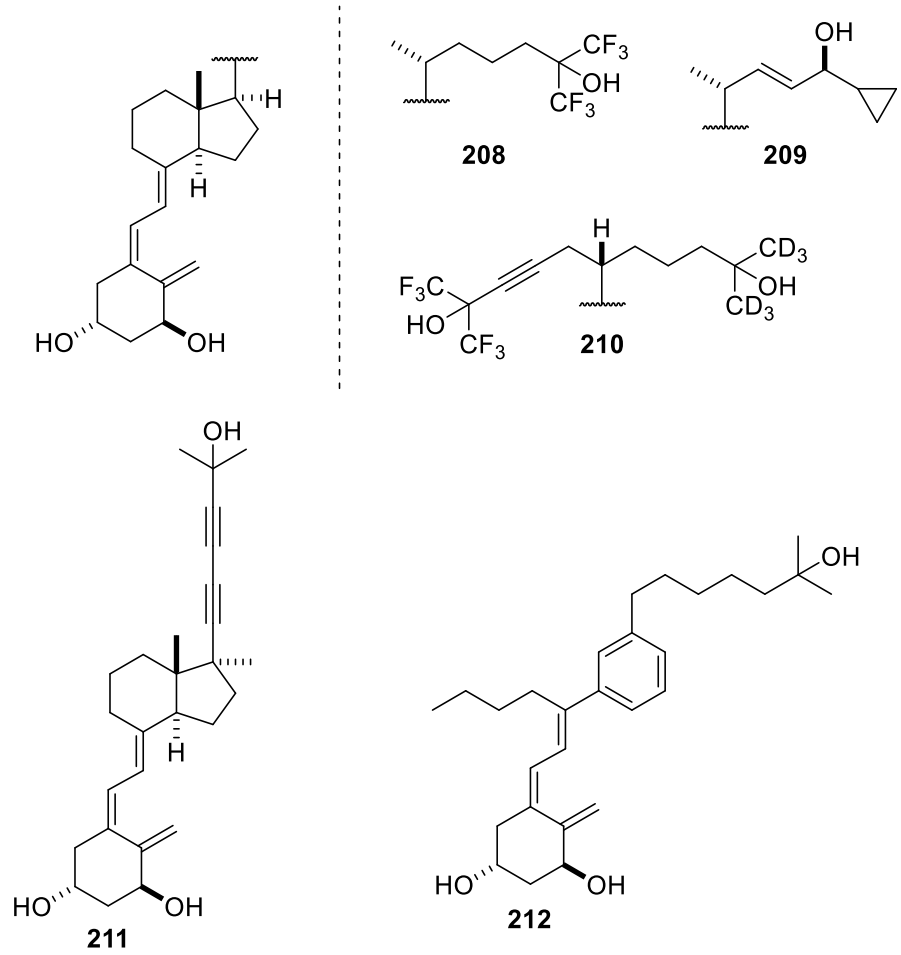


*Abbildung 88: Strukturen einiger Vertreter von potenten VDR-Agonisten: Falecalcitriol (**208**), Calcipotriol (**209**) eine Gemini-Verbindung mit einer deuterierten und einer rigiden, fluorierten Seitenkette (**210**), ein Diin-Derivat (**211**) und ein Derivat ohne Steroid-Kern (**212**). Detaillierter Übersichtsartikel über weitere VD_3 Analoga unter [304].*

Eine strukturelle Besonderheit weist der VDR-Agonist **213** von Otero *et al.* auf, der im Labor von Prof. Mouriño synthetisiert wurde.[308] Dieser VDR-Agonist besitzt eine 1,2-Dicarbadodecaborangruppe (kurz *ortho*-Carboran) an C-24 und erwies sich, trotz der fehlenden OH-Gruppe an C-25, als hoch aktiv (Vergleich der Bindungsaffinität zum VDR: 2,9 nM für **213** zu 6,8 nM für $1,25VD_3$).[308] In Röntgen-Kristallstruktur Aufnahmen zeigte sich, dass die *o*-Carborangruppe die Interaktion mit den beiden Histidinresten ausbildet, welche sonst durch die Hydroxylgruppe gebildet werden (siehe Abbildung 89). Die Position des Liganden und generell die Tertiärstruktur des Rezeptors waren annähernd identisch mit denen von $1,25VD_3$ (RMSD = 0,3 Å über 238 AS), was die hohe agonistische Potenz erklärte.

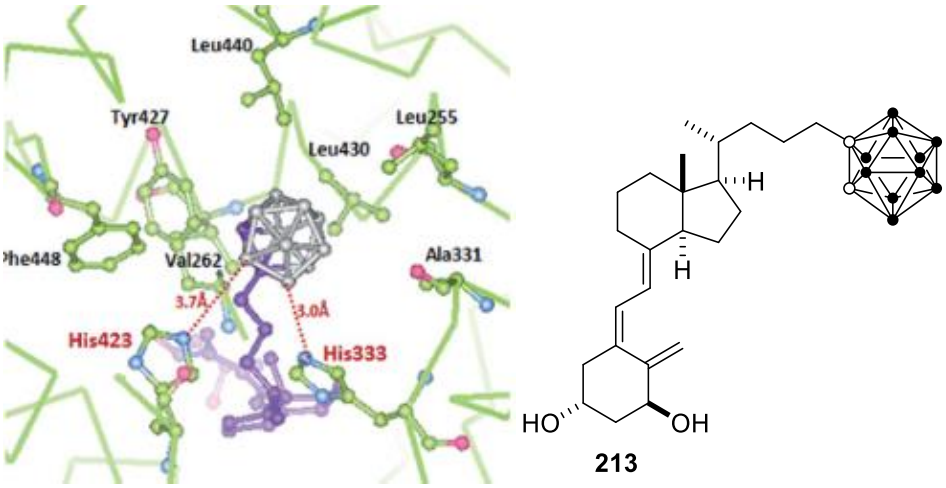
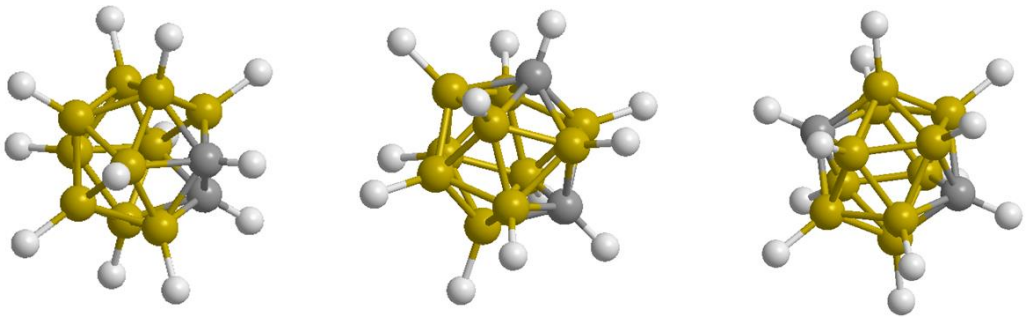


*Abbildung 89: Links: Röntgen-Kristall-Struktur von **213** in der Bindungstasche von zVDR. Wichtige AS sind angedeutet und beschriftet, die Interaktion mit den Histidinen His333 und His423 sind markiert (es handelt sich um den Zebrafisch VDR, wodurch sich die Nummerierung der AS von dem humanen Rezeptor unterscheidet. Beide sind jedoch in der aktiven Form homolog und können verglichen werden). Rechts: Struktur von **213** (schwarze Kreise = B-H, weißen Kreise = C(-H)).[308]*

Die in diesem Molekül vorhandene Kohlenstoff-Bor-Gruppe besitzt für Wirkstoffe nützliche Eigenschaften und zeichnet sich darüber hinaus durch eine sehr hohe Stabilität aus. Es gehört zu einer Gruppe von C_2B_{10}-Carboranen (sogenannte *closo*-Carborane), welche sich aus 1,2-*ortho*-Carboran (**214**), 1,7-*meta*-Carboran (**215**) und 1,12-*para*-Carboran (**216**) zusammensetzt (siehe Abbildung 90).



214 **215** **216**

*Abbildung 90: Links: Struktur von unsubstituierten ortho-Carboran (**214**), meta-Carboran (**215**) und para-Carboran (**216**), C-Atome in Grau, B-Atome in Gold, H-Atome in Weiß.*

Trotz des hydridischen Charakters der an Boratome gebundenen Wasserstoffe, sind diese Verbindung wenig reaktiv. Durch die Kohlenstoffe in der Matrix ergibt sich im *ortho*- und im *meta*-Carboran ein Dipol-Moment, welches im *para*-Carboran nicht vorhanden ist. Das *ortho*-Carboran, in dem das Dipol-Moment am stärksten ausgeprägt ist, ist dadurch der „polarste“

Vertreter, die Verbindungen sind generell jedoch hydrophob. Sie können am ehesten mit einem rotierenden Perfluorbenzol verglichen werden, wobei jedoch das Volumen der Carborane größer ist, und sogar das von Adamantan übertrifft. Im Vergleich zu Adamantan sind die *closo*-Carborane allerdings polarer (Detaillierte Übersichtsartikel über Carborane unter [309–311]).

Darüber hinaus sind diese Verbindungen durch die hohe Anzahl von Boratomen pro Molekül für die Bor-Neutronen-Einfang-Therapie (Boron neutron capture therapy, BNCT) interessant, bei der ^{10}B-Atome mit langsamen Neutronen beschossen werden. Durch den Beschuss setzen sie in einer Kernreaktion γ-Strahlen und schnelle ^{4}He- und ^{7}Li-Ionen frei, welche das umliegende Gewebe beschädigen. Durch Einschleusen von Bor-haltigen Molekülen in Tumorzellen können so durch gezielte, wenig schädliche Bestrahlung im Inneren der Tumorzelle hochenergetische Teilchen freigesetzt werden, wobei das restliche Gewebe prinzipiell verschont bleibt.[312,313]

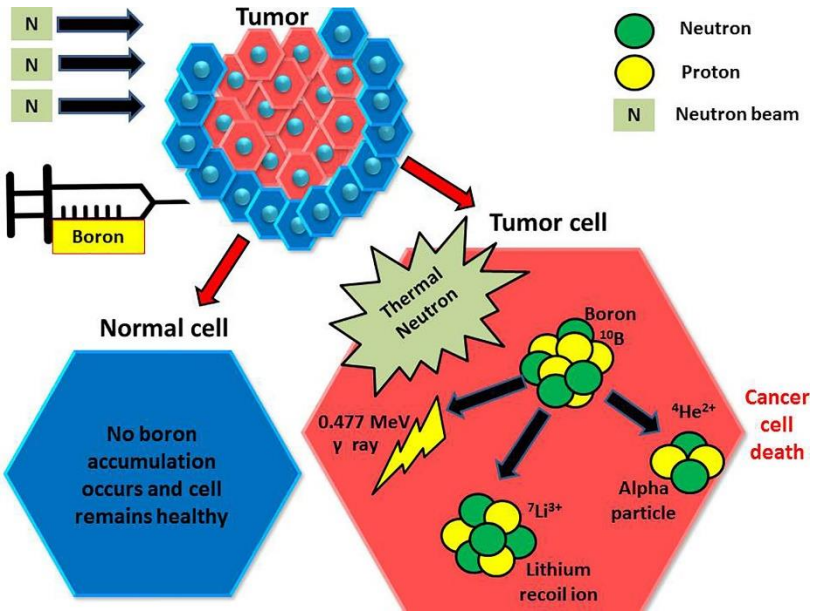


Abbildung 91: Funktion der BNCT: Die Bor-haltigen Verbindungen reichern sich in den Tumorzellen an, während der Bestrahlung mit langsamen Neutronen zerfällt das ^{10}Bor und die γ-Strahlen und die hochenergetischen ^{4}He- und ^{7}Li-Ionen schädigen selektiv die Tumorzellen.[314] (modifiziert)

Neben den agonistisch wirkenden Molekülen sind antagonistische Verbindung bekannt, die eine Signalweiterleitung unterdrücken. Das therapeutische Potenzial solcher Antagonisten besteht aus der Nutzung als Antidot zu einer Überdosis von VD_3 (**203**) (Gegenmittel zur Hyperkalzämie), in der Modulation von Allergien und immunologischen Überreaktionen.[315]

Darüber hinaus sind einige Tumorarten bekannt (unter anderem Tumoren in den Eierstöcken, im Pankreas und Neuroblastome) in denen Biopsien eine Überexpression der VDR mRNA aufwiesen, was mit einer schlechten Überlebensprognose einherging.[316–318] In diesem Zusammenhang wird die BNCT für die Antagonsiten somit ebenfalls interessant. Daneben scheint der VDR in Endometrieso-Polypen überexprimiert zu sein.[319]

Allerdings steht den vielen, strukturell sehr unterschiedlichen, Agonisten bisher eine deutlich geringere Anzahl an potenten Antagonisten des VDRs gegenüber: Eine Gruppe besteht aus Lacton-haltigen Verbindungen (z.B. TEI-9647 (**217**)),[320] daneben sind das Cyclopropyl-haltige Derivat ZK168281 (**218**)[321] und das Aminoanilid-Derivat ML 3-452 (**219**)[315] bekannt (siehe Abbildung 92). Vor allem die Gruppe der Lacton-Derivate umfasst weitere potente Moleküle, außerhalb der beschriebenen Vertreter findet sich jedoch wenige bekannte Verbindungen.

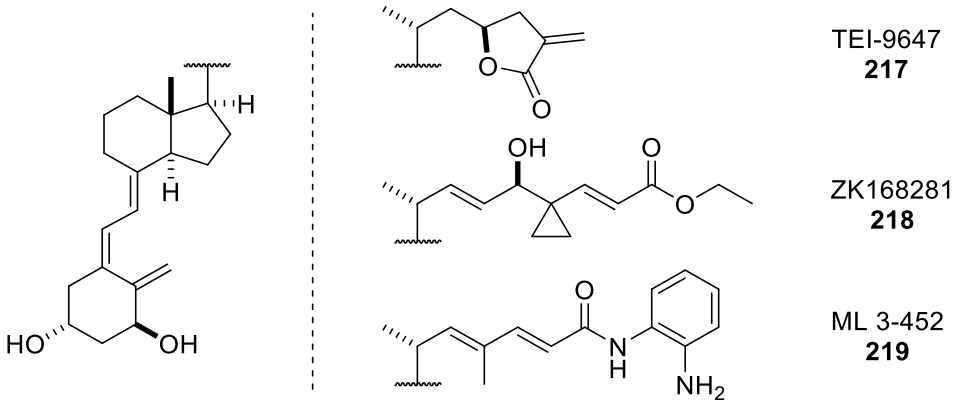


*Abbildung 92: Strukturen einiger VDR-Antagonisten: Ein Vertreter der Lacton-haltigen Antagonisten (TEI-9647, **217**), das Cyclopropan-haltige Derivat ZK168281 (**218**) und das Anilin-Derivat ML 3-452 (**219**).*

Aus diesem Grund ist die Entwicklung neuer VDR-Antagonisten Gegenstand aktueller Forschung. Um darüber hinaus die speziellen Eigenschaften der Carborane in ein antagonistisch wirkendes Derivat einfließen zu lassen, sollten in diesem Projekt neue Carboran-haltige Verbindungen gezielt als Antagonist designt und synthetisiert werden.

5.2 Dockingstudien neuer potenzieller VD_3-Rezeptor Antagonisten

Das Design der potentiellen neuen Antagonisten wurde mit Hilfe von Dockingstudien durchgeführt. Dazu wurde die GOLD® Software des Cambridge Crystallographic Data Centre verwendet (kurze generelle Einführung zum Thema Docking, siehe Kapitel 3.1).[322] Als Protein wurde die Kristall-Struktur des humanen VDRs in Komplex mit $1,25VD_3$ (**204**) verwendet (1DB1.pdb).[305]

Da in diesem Komplex der Agonist $1,25VD_3$ (**204**) gebunden war, befand sich das Protein in seiner aktiven Konformation. Diese zeichnet sich durch eine nach innen, in Richtung des Liganden geklappte, Helix-12 (H12) aus, wodruch die aktive Interaktionsfläche des VDRs mit den Co-Rezeptoren gebildet wird.

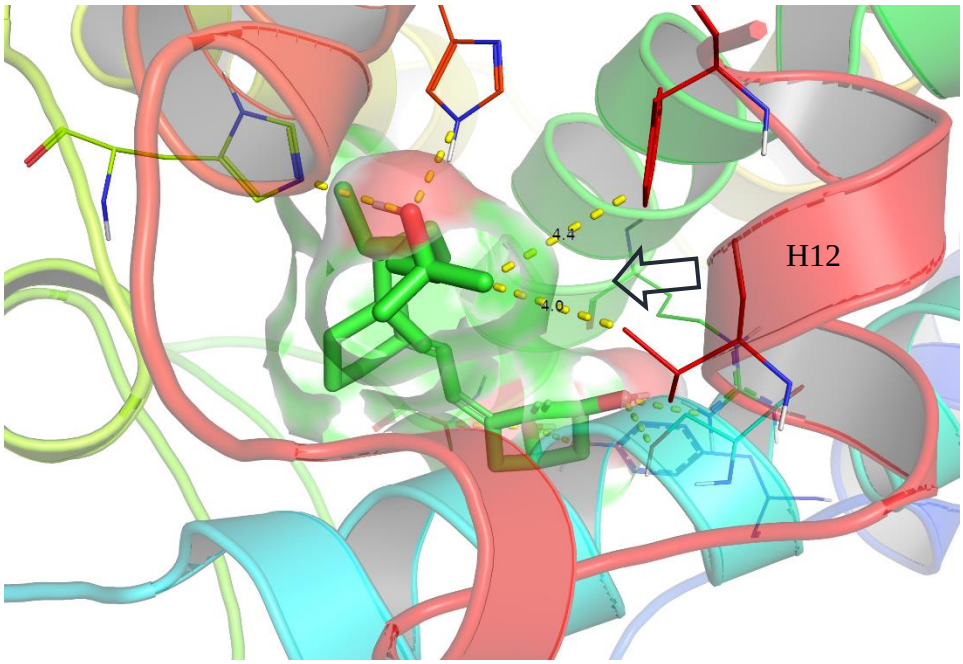


Abbildung 93: Röntgen-Kristall-Struktur von VDR mit gebundenem $1,25VD_3$, Helix-12 in Rot, die Distanz zwischen Phe422/Val418 (H12) und Ligand ist markiert, die Bewegung von H12 zur Aktivierung ist durch den Pfeil angedeutet.

Somit ist die rigide Proteinstruktur deutlich besser zum Design von Agonisten geeignet, als zum Design von Antagonisten. Denn ein möglicher Mechanismus der Antagonisierung besteht in der Blockade der Bewegung von Helix-12 (z.B. für den Antagonisten ML 3-452 (**219**) wurde dieser Mechanismus beschrieben [315]).

Dieser Mechanismus erfordert eine gewisse räumliche Ausdehnung des Liganden, wobei die Verbindung nicht zu groß sein darf, um die Affinität für die Bindungstasche an sich nicht zu

verlieren. Zur vollständigen Antagonisierung *in vivo* muss 1,25VD$_3$ (**204**) aus dem Rezeptor verdrängt werden, was eine zumindest annähernd vergleichbare Affinität für die Bindungstasche erfordert. Eine Möglichkeit für sinnvolle Dockingstudien bestand aus der Verwendung des hVDR (1DB1.pdb) und eines des-Helix-12 hVDR (1DB1.pdb mit manuell entfernter Helix-12, Lamblin *et al.* verwendeten dieses Setup für ihre Studien zu ML 3-452).[315] Der Vergleich der Scoring-Werte und der genauen Position des Liganden in den beiden Simulationen lässt Rückschlüsse darauf zu, wie gut der Ligand an den normalen Rezeptor bindet (und somit mit 1,25VD$_3$ konkurriert), und wie gut der Ligand den Raum Richtung Helix-12 besetzen (und somit Helix-12 blockieren) kann.

Dieser Ansatz wurde hier ebenfalls verfolgt. Insgesamt wurden über 60 verschiedene Carboran-haltige Moleküle entworfen und in den Dockingstudien untersucht (vergleiche Abbildung 94). Die meisten dieser Ideen entstammten der Erfahrung von Prof. Mouriño aus über 40 Jahren Forschung auf diesem Gebiet. Limitierend kam allerdings hinzu, dass die Synthese im Optimalfall innerhalb von ~3 Monaten erfolgen sollte, weshalb viele Verbindungen an bereits bekannte Konstrukte angelehnt wurden (inklusive der Synthese etwaiger Carboran-Bausteine).

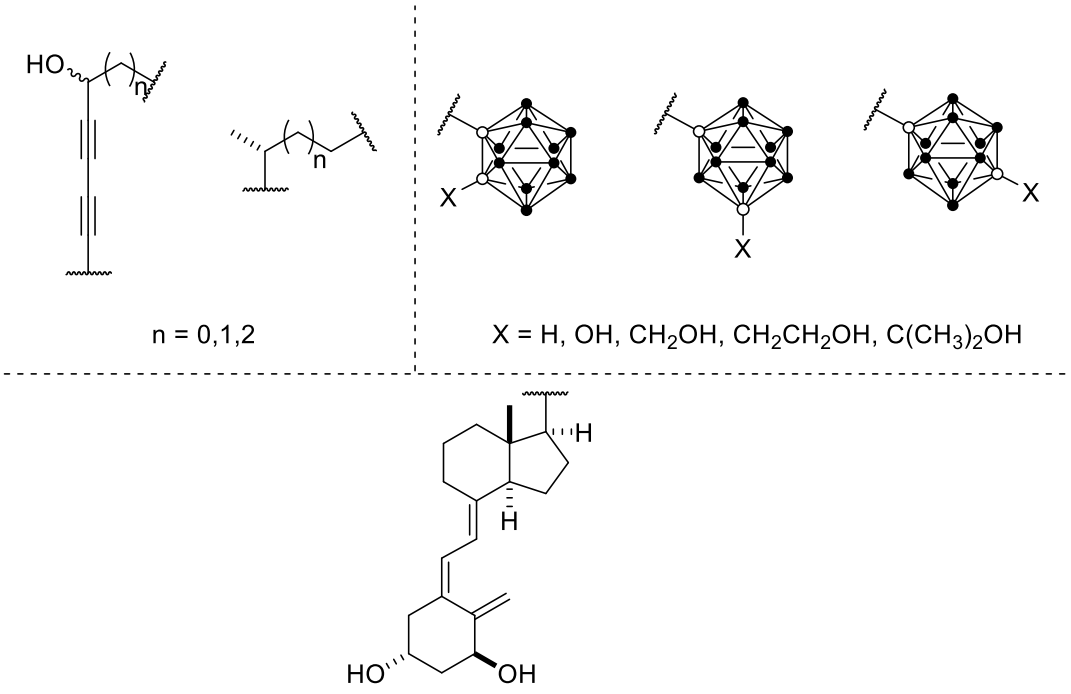


Abbildung 94: Auswahl von möglichen Modifikationspunkten. Eine Vielzahl von Kombinationen der gezeigten Möglichkeiten wurde in den Dockingstudien überprüft. Generell wurde beim Design der Verbindung auf einen guten synthetischen Zugang geachtet.

Aus diesen Studien ergab sich eine große Auswahl an potentiellen Kandidaten zur Synthese. Die Wahl fiel auf eine Serie von Derivaten mit rigidem Diin und einer C-24-Hydroxylgruppe, an dem eine Carboranseitenkette angebracht war. Die Seitenkette sollte in der Länge des Linkers von null zu zwei CH_2-Einheiten variieren. Darüber hinaus sollten jeweils die beiden C-24-Epimere synthetisiert werden (siehe Abbildung 95).

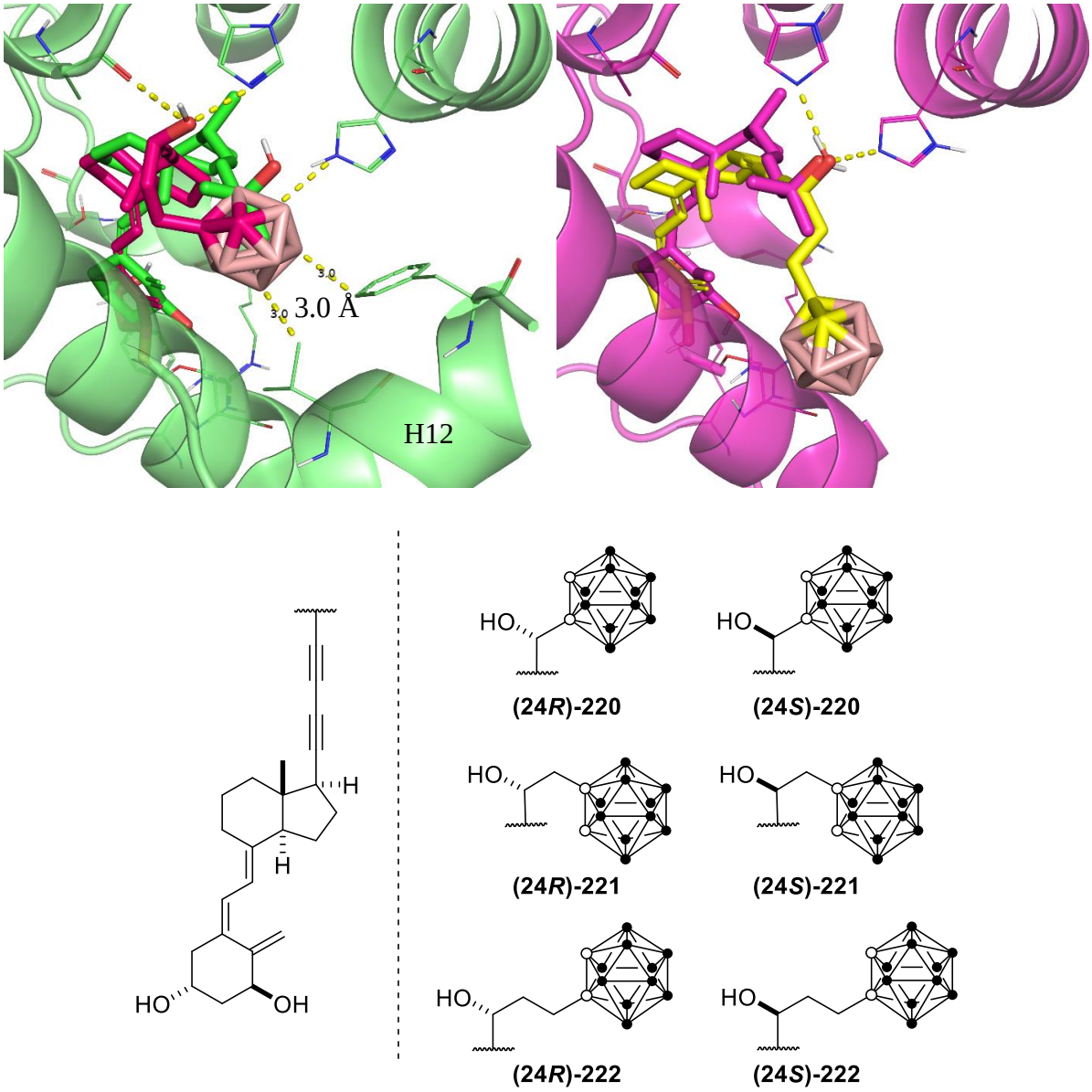


*Abbildung 95: Oben links: Dockingpose von **(24R)-222** (magenta) in der VDR-Bindugnstasche, überlagert mit 1,25VD₃ (grün), oben rechts: Dockingpose von **(24R)-222** (gelb) in der –H12-VDR-Bindungstasche, überlagert mit 1,25VD₃ (lila). Erkennbar ist das Ausfahren der Seitenkette, wichtige Interaktionen mit Ala303, His305/397 und Helix-12 wurden markiert. Unten: Strukturen der geplanten Derivate **220** (**24R** und **S**) **221** (**24R** und **S**) und **222** (**24R** und **S**).*

Durch die fixierte Position der Hydroxylgruppe am Ende des Diin-Systems wiesen die Derivate eine gute Interaktion mit den beiden Histidinen auf. In einigen Fällen bildete die 24-Hydroxygruppe zusätzlich eine H-Brückenbindung mit Ala303 aus. Durch die angebrachte Seitenkette hatte das *ortho*-Carboran genug Bewegungsfreiheit, um in den freien Raum und in Richtung von Helix-12 vorzustoßen. Das *ortho*-Carboran wurde gewählt, da dieses das größte Dipolmoment und somit die höchste Polarität aufwies, wodurch es eventuell zusätzlich mit dem Rezeptor interagieren könnte.

In den Dockingstudien „ohne“ Helix-12 zeigte sich der gewünschte Effekt, bei dem sich die Carboran-Seitenkette in den freigewordenen Raum entfaltete. Der Effekt war umso größer, je länger die Seitenkette war. Insgesamt wiesen die (24*R*)-Epimere ein höheres Scoring auf (Ausnahme **220**), der Zugewinn im Docking ohne H12 war jedoch jeweils vergleichbar (siehe Tabelle 33).

*Tabelle 33: Docking-Scoring-Werte der designten Verbindungen. Die Werte wurden auf 1,25VD$_3$(100 %) referenziert. Bis auf Verbindung **(24R)-221** wiesen alle Verbindungen einen höheren Scoring-Wert auf nachdem Helix-12 entfernt wurde. Dies deutet auf einen besseren Fit der Liganden hin, falls mehr Raum in Richtung der Helix-12 zur Verfügung stand.*

Verbindung	Score (nativer VDR)	Score (Des-Helix-12 VDR)	Differenz (D-H12 – nativ)
(24*R*)-220 (n = 0)	87 %	97,1 %	10,1 %
(24*S*)-220	88,2 %	98 %	9,8 %
(24*R*)-221 (n = 1)	98,4 %	95,5 %	-2,9 %
(24*S*)-221	95,4 %	96 %	0,6 %
(24*R*)-222 (n = 2)	90,2 %	106,6 %	16,4 %
(24*S*)-222	86 %	103 %	17 %
1,25VD$_3$ **(204)**	100 %	100 %	0 %

Um die Ergebnisse des Dockings zu bestätigen wurde mit den Derivaten eine Molecular Dynamics (MD) Simulation mit der YASARA Suite durchgeführt.[323] Die Bewegung der gedockten Komplexe wurde bei pH 7,4 in H_2O und 300 K für 10 ns simuliert. In diesen Simulationen zeigte sich, dass sich die Helix-12 weniger in Richtung Bindungstasche bewegte, als im Fall des natürlichen Hormons, was die Hypothese aus den Dockingstudien bestätigte. Die Interaktion der C-24 Hydroxylgruppe mit His305 blieb vorhanden, das zweite Histidin (His397) bildete in manchen Fällen zusätzlich eine Interaktion mit dem Carboran aus, was förderlich für einen möglichen Antagonismus sein könnte (Beispiele in Abbildung 96).

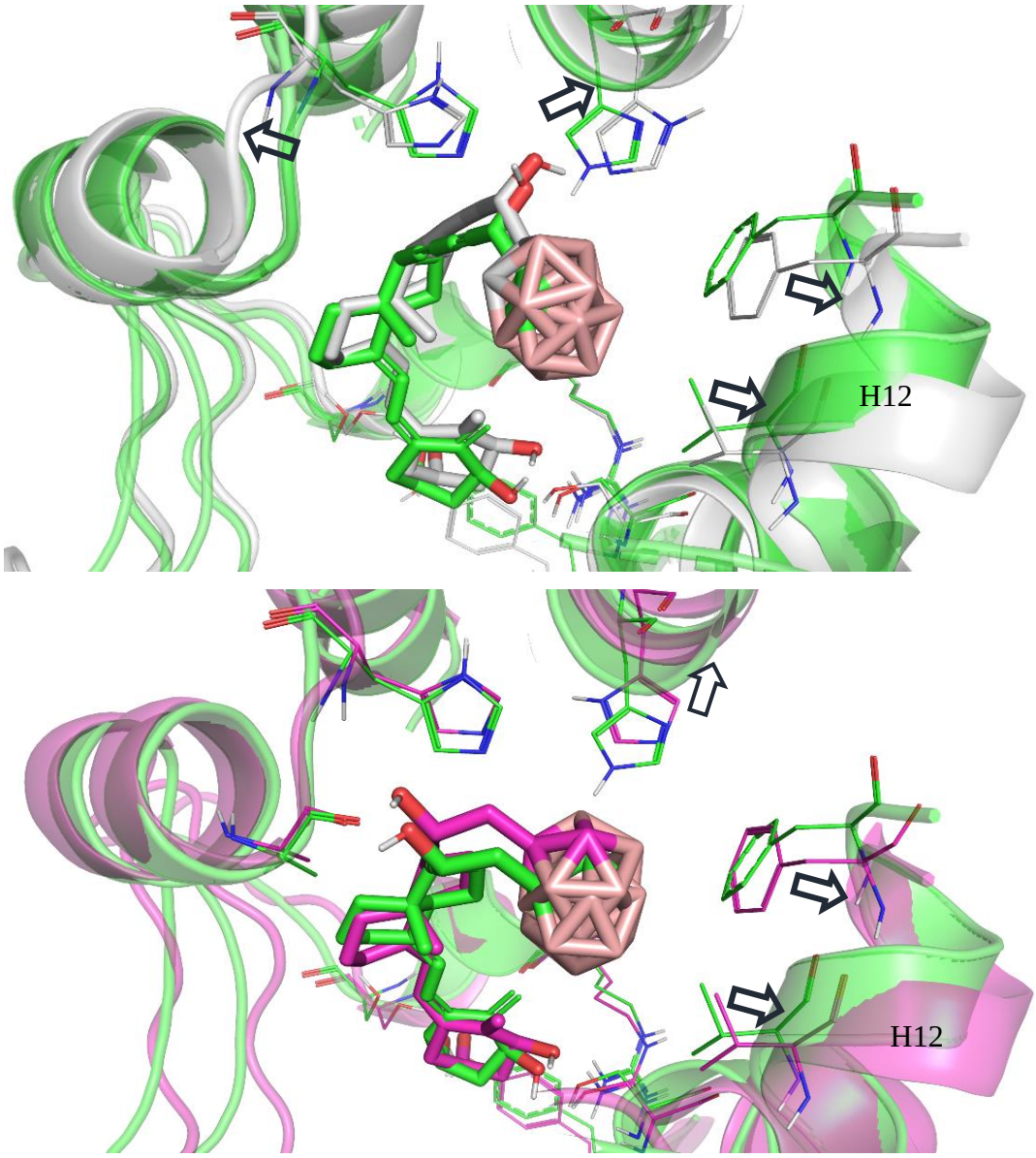
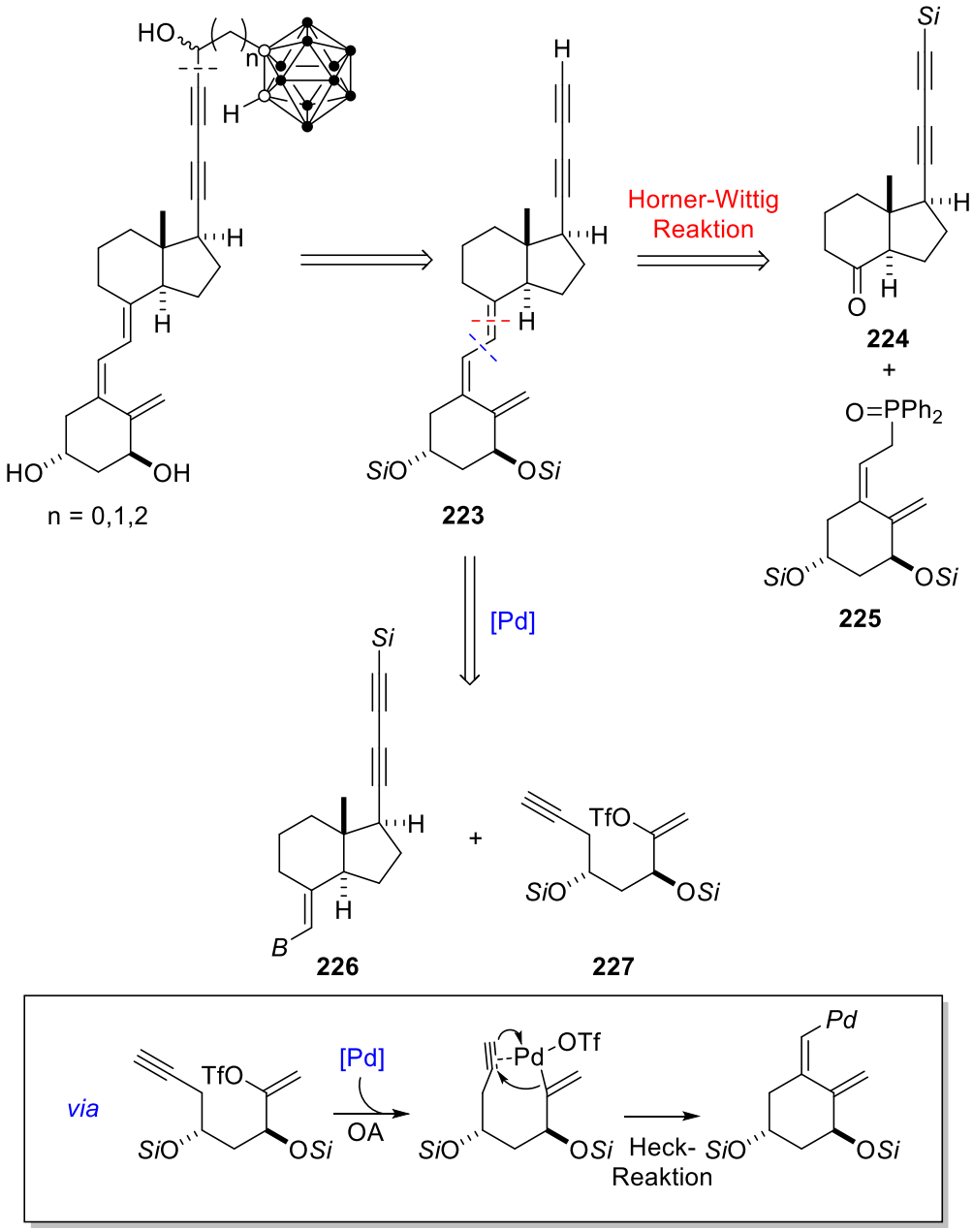


*Abbildung 96: Überlagerung des VDRs mit gebundenem Liganden nach dem Docking (rigider Rezeptor, grün) und nach der anschließenden MD Simulation: oben: **(24R)-220** (weiß), unten: **(24R)-222** (lila). Die relevanten Bewegungen der einzelnen Helices wurden mit Pfeilen markiert, Helix-12 wurde beschriftet. In beiden Beispielen war die Bewegung des Liganden gering, durch den räumlichen Anspruch wurde die Bindungstasche jedoch vergrößert und der gewünschte Effekt (Verschiebung von Helix-12) trat ein.*

5.3 Synthese neuer Carboran-haltiger VD_3-Rezeptor Antagonisten

Die Synthese der Derivate sollte von einem Diin-Schlüsselintermediat (**223**) ausgehen, welches zur Diversifizierung mit verschiedenen Carboran-Aldehyd-Bausteinen umgesetzt werden sollte. Zur Synthese von Analoga mit rigider Seitenkette sind mehrere Routen publiziert worden: Watarai *et al.* und Pérez-Garcia *et al.* nutzten eine Horner-Wittig-Reaktion um den A-Ring einzuführen, nachdem sie zunächst das Diin-System am C-D-Ring-System aufgebaut

hatten,[324,325] Sigüeiro *et al.* bauten den A-Ring über eine Pd-katalysierte Tandem-Reaktion auf.[23] [326]

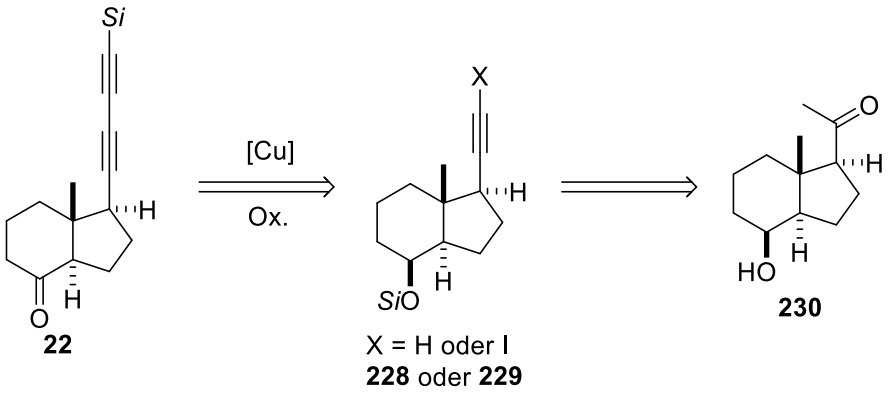


*Schema 67: Retrosynthetische Analyse der Carboran-haltigen VD_3 Analoga. Die Carboranseitenkette sollte an das Schlüsselintermediat **223** angebracht werden. Dieses könnte entweder durch eine Horner-Wittig-Reaktion aus **224** und **225** aufgebaut werden (rot markiert) oder durch eine Pd-katalysierte Tandem-Kupplung aus **226** und **227** (blau markiert). Die Tandem-Reaktion läuft über eine oxidative Addition des Paladiums in die C-OTf-Bindung gefolgt von einer Heck-6-exo-dig-Zyklisierung ab, an dessen Ende ein Dien entsteht, welches in einer weiteren Heck-Reaktion mit **226** zum Trien reagiert.*[326, 329]

[23] Watarai *et al.* und Pérez-Garcia *et al.* synthetisierten das gleiche Diin-Grundgerüst in ihrem Projekt, Sigüeiro *et al.* fügten zusätzlich an C-17 eine Methylgruppe ein, sodass sie nicht exakt das gleiche Molekül synthetisierten. Die Reaktionsbedingungen waren trotzdem in diesem Projekt anwendbar.

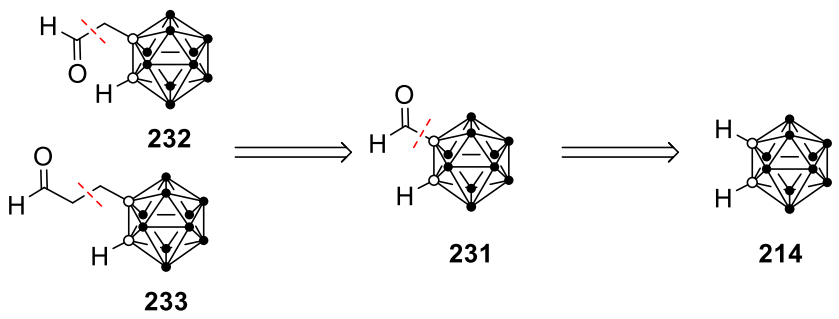
Die Horner-Wittig-Reaktion zur Synthese des Triensystems wurde ursprünglich von Basil Lythgoe 1978 etabliert [327], die Tandem-Pd-Kupplung wurde von Barry Trost 1992 entwickelt [328] und von Antonio Mouriño noch einmal optimiert.[329] In diesem Projekt wurde auf die Horner-Wittig-Methode nach Lythgoe zurückgegriffen. Der Grund lag in einer geringeren Anzahl von Reaktionsschritten und somit einer kürzeren zu erwartenden Dauer der Synthese.

Das Diin-System sollte aus einem Keton an C-20 über eine Eliminationsreaktion und anschließender Kupplung (entweder eine asymmetrische Glaser Kupplung [330] des Alkins oder eine Cadiot-Chodkiewicz-Kupplung [331] des Iodalkins) mit TMS-Acetylen hergestellt werden. Das Keton am C-Ring sollte durch Oxidation von einem Alkohol erhalten werden (siehe Schema 68).



*Schema 68: Retrosynthetische Analyse von **224**. Dieses könnte über eine Elimierungsreaktion und anschließender Cu-katalysierter Kupplung aus dem Keton **230** synthetisiert werden.*

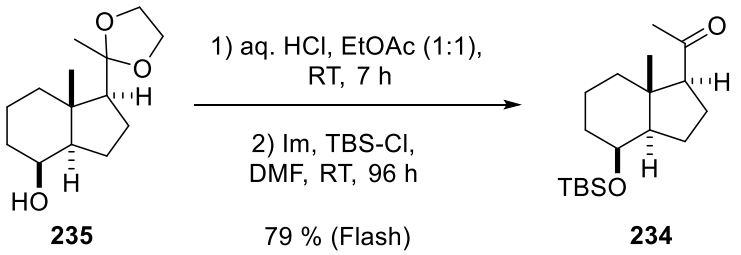
Die Carboran-Bausteine sollten ausgehend von unsubstituiertem *ortho*-Carboran (**214**) synthetisiert werden. Der Carboran-Carbaldehyd (**231**) kann dabei direkt durch Umsatz des lithiierten Carborans mit Ethylformiat erhalten werden. Die beiden anderen Bausteine sollten anschließend ausgehend von diesem Aldehyd synthetisiert werden, wozu sich die Wittig-Chemie zur Homologisierung der Seitenkette anbieten würde (siehe Schema 69).



*Schema 69: Retrosynthetische Betrachtung der Carboran-Bausteine **231**, **232** und **233**. Der Carbaldehyd **231** könnte aus ortho-Carboran (**214**) hergestellt werden und durch Homologisierung in die beiden anderen Bausteine **232** und **233** überführt werden.*

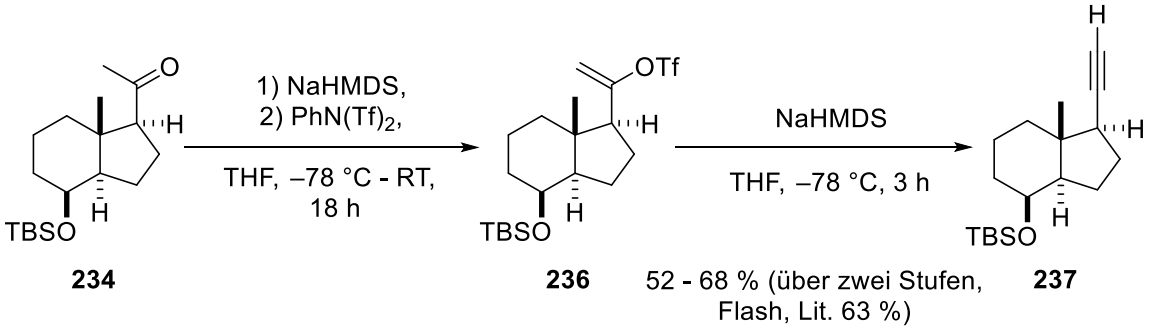
5.3.1 Synthese des Grundgerüsts

Als Ausgangsmaterialien für dieses Projekt stand zum einen das TBS-geschütze Keton **234** und das Ketal **235** zur Verfügung, welches aus einem Prozess zur Gewinnung von Vitamin D Bausteinen erhalten wurde. Um eine größere Menge von **234** zu erhalten, wurde **230** durch saure Hydrolyse des Ketals freigesetzt und anschließend in der TBS-Schützung verwendet. Nach 96 h bei RT war der Umsatz vollständig und das Keton **234** wurde mit einer Ausbeute von 79 % isoliert (siehe Schema 70).



*Schema 70: Entschützung des Ketals **235** und anschließende TBS-Schützung des freien Alkohols.*

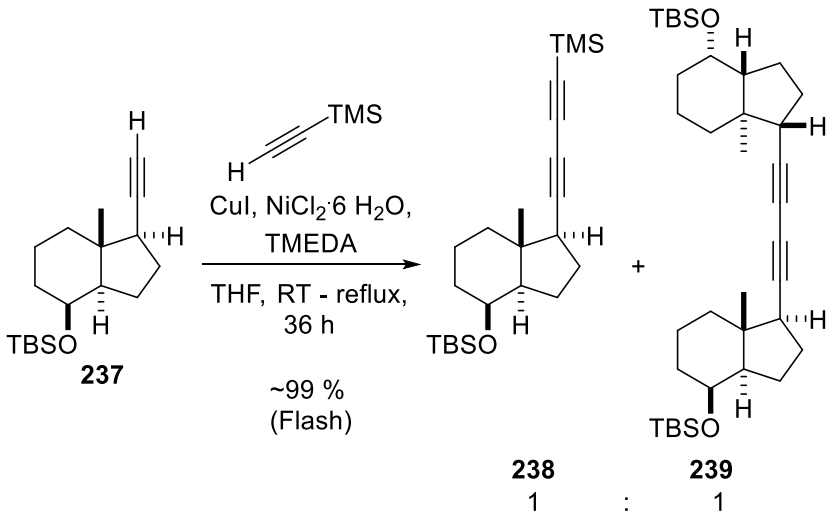
Keton **234** wurde anschließend genutzt, um das erste Alkin einzuführen. Dazu wurde den Bedingungen von Pérez-Garcia *et al.* und Sigüeiro *et al.* folgend zunächst aus dem Keton mit NaHMDS und Phenyl-Bistriflylimid bei –78 °C das terminale Enoltriflat **236** gebildet, welches anschließend mit NaHMDS zum Alkin eliminiert wurde (siehe Schema 71).[324,326] Eine Epimerisierung an C-17 wurde dabei nicht beobachtet. Diese Reaktionssequenz wurde insgesamt fünf Mal in unterschiedlichen Maßstäben (0,1 – 6 mmol) wiederholt, wobei die Ausbeute über zwei Stufen zwischen 52 und 68 % lag (Lit. 63 %).[324] Dabei zeigte sich, dass das vollständige Entfernen von überschüssigem Triflylimid nach der ersten Reaktion entscheidend für eine höhere Ausbeute war.



*Schema 71: Reaktionen von Keton **234** zu Alkin **237**. Das Keton wurde zunächst ins Enoltriflat **236** überführt, welches in einem zweiten Reaktionsschritt eliminiert wurde.[324]*

Zur Bildung des Diinsystems wurde zunächst eine modifizierte Glaser-Hay-Kupplung von **237** mit TMS-Acetylen getestet, um einen Reaktionsschritt (die Iodierung des Alkins) zu sparen. Derartige asymmetrische Cu-katalysierte Kupplungen mit zwei verschiedenen Alkinen sind herausfordernde Reaktionen, da sich das jeweilige Homodimer als Nebenprodukt bilden kann. Um dieses Problem zu lösen setzten Yin *et al.* ein Cu-Ni-Katalysatorsystem (5 mol% $NiCl_2$ und 5 mol% CuI) mit TMEDA (20 mol%) als Ligand und einem fünffachen Überschuss von TMS-Acetylen ein.[332] Diese Methode sollte mit Aklin **237** und TMS-Acetylen getestet werden.

Das verwendete CuI wurde vor der Reaktion in ges. NaI-Lösung refluxiert und anschließend auskristallisiert, um Reste von Cu(II)Salzen zu entfernen. Nach 8 h bei RT konnte jedoch keine Reaktion beobachtet werden, sodass die Reaktionslösung refluxiert wurde. Nach 36 h zeigte sich der vollständige Umsatz des Alkins **237** zu zwei Produkten, die nach chromatographischer Trennung anhand der NMR-Spektren als Diin **238** und Homodimer (**239**) identifiziert wurden. Beide Produkte lagen in einem Verhältnis von ~1:1 vor, die Gesamtausbeute (beide Produkte zusammengenommen) lag bei ~99 % (siehe Schema 72).

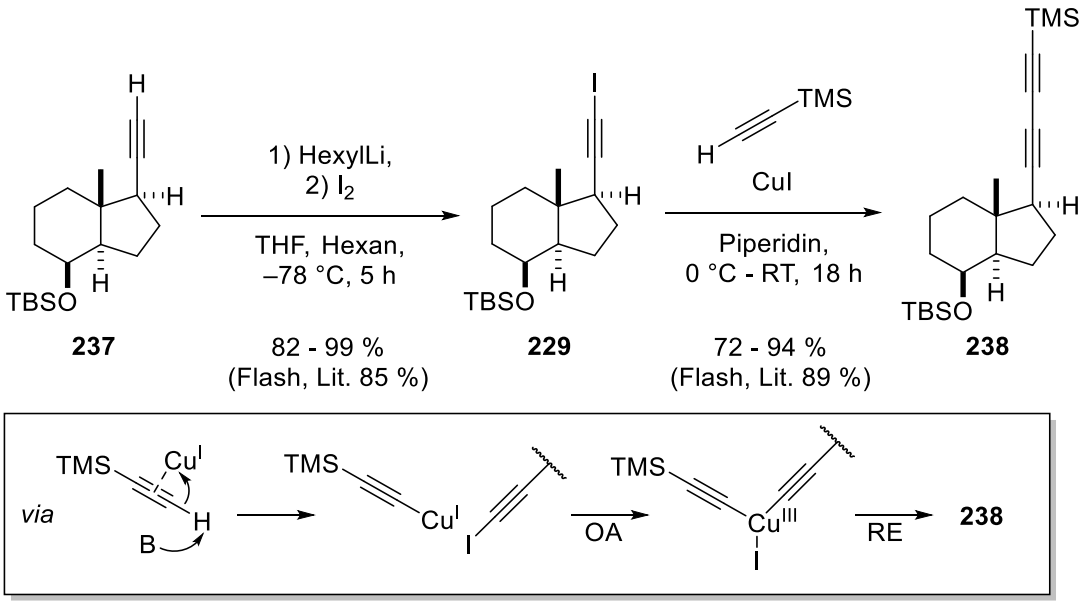


*Schema 72: Modifizierte Hetero-Glaser-Hay-Kupplung von **237** mit TMS-Acetylen und einem Ni/Cu-Katalysatorsystem. Nach 36 h bei Reflux war das Startmaterial vollständig umgesetzt. Es bildete sich ein 1:1 Gemisch aus dem gewünschten Produkt **238** und dem Homodimer **239**.*

Da die Reaktion in einem Rundkolben mit aufgesetztem Rückflusskühler durchgeführt wurde, entwich vermutlich ein Teil des flüchtigen TMS-Acetylens während des Erhitzens, wodurch sich im Verlauf der Reaktion verstärkt das Homodimer bildete. Eine mögliche Lösung in folgenden Reaktionen wäre das Verwenden eines geschlossenen Gefäßes oder einer Reaktionsmikrowelle. Generell wäre die Bildung des Homodimers dadurch allerdings nicht

ausgeschlossen, weshalb der Erfolg der Optimierung nicht garantiert ist. Deshalb wurde aufgrund der begrenzten Zeit des Projekts entschieden, diese Reaktion nicht zu optimieren und stattdessen das Alkin zunächst zu iodieren und anschließend zu kuppeln.

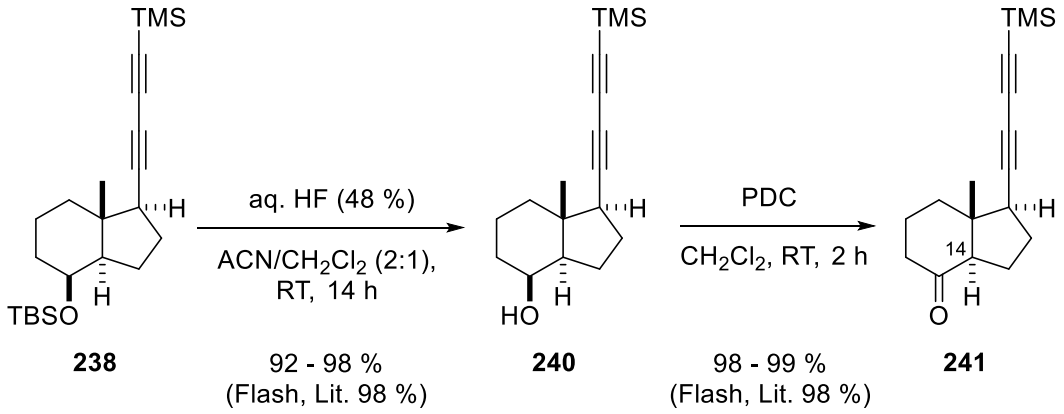
Die Iodierung und anschließende Kupplung wurde der Literatur von Pérez-Garcia *et al.* und Sigüeiro *et al.* folgend durchgeführt.[324,326] Dazu wurde das Alkin **237** mit *n*-Hexyllithium deprotoniert und mit I_2 versetzt, wobei das Iodalkin **229** mit Ausbeuten zwischen 82 % und ~99 % (Lit. 85 %)[324] isoliert wurde. Die folgende Kupplung verlief mit umkristallisiertem CuI in Piperidin ebenfalls vollständig und Diin **238** konnte mit Ausbeuten zwischen 72 % bis 94 % (Lit. 89 %)[326] isoliert werden (siehe Schema 73).



*Schema 73: Iodierung und anschließende Cadiot-Chodkiewicz-Kupplung von **237**.[324,326] Nach der Bildung des TMS-Acetylen-Cuprats findet eine oxidative Addition des Cu^{I} in die I-C-Bindung des zweiten Reaktionspartners statt. Das entstehende Cu^{III}-Intermediat ist sehr instabil und setzt nach reduktiver Eliminierung das gewünschte Hetero-Diin frei.*

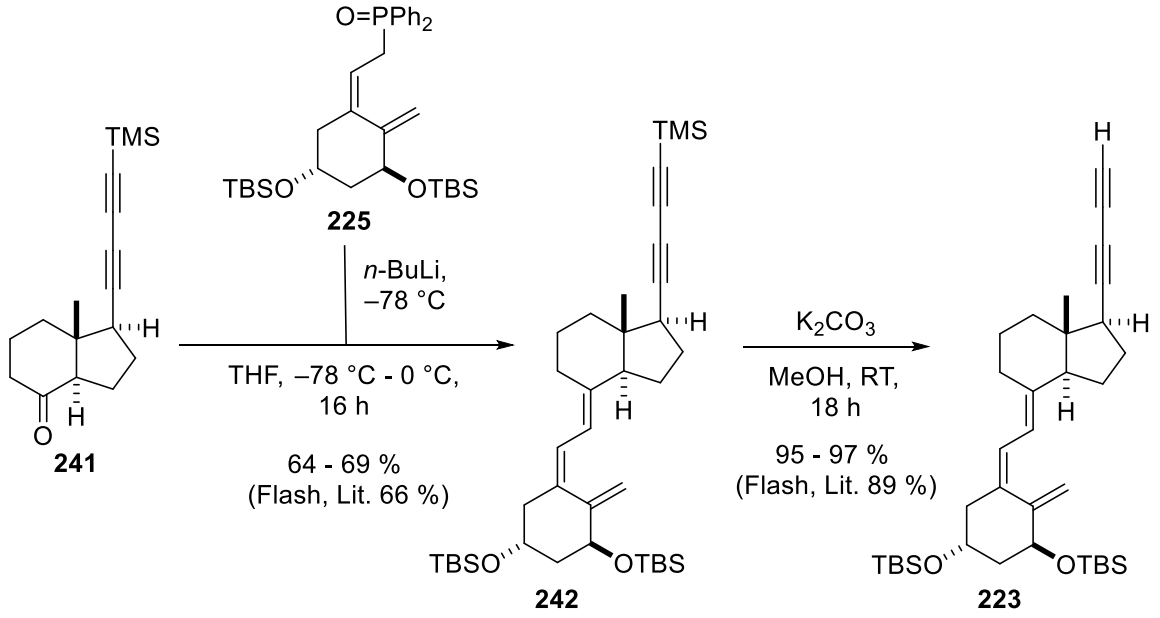
Nach der erfolgreichen Synthese des Diinsystems sollte der A-Ring angebracht werden. Dazu wurde zunächst **238** analog zu den Bedingungen von Sigüeiro *et al.* mit aq. HF (48 %) die TBS-Gruppe entfernt und anschließend mit frisch hergestelltem Pyrdinium-Dichromat (PDC) oxidiert (siehe Schema 74).[326] Der freie Alkohol **240** wurde vor der Oxidation mit Ausbeuten zwischen 92 % und 98 % isoliert (Lit. 98 %)[326], die folgende Oxidation zeigte nach 2 h vollständigen Umsatz und Keton **241** wurde mit Ausbeuten zwischen 98 % und ~99 % erhalten (Lit. 98 %)[326].

Insgesamt wurden in diesem Projekt ~550 mg des Ketons **241** synthetisiert, zusätzlich wurden 1,2 g des freien Alkohols **240** für weitere Projekte zurückgehalten. Die Lagerung des Intermediats fand auf dieser Stufe statt, da das Keton zur Epimerisierung an C-14 neigte und deshalb zügig in der nächsten Reaktion eingesetzt werden musste.



*Schema 74: Entschützung und Oxidation des Alkohols an C-8. Ein großer Teil des synthetisierten freien Alkohols **240** wurde gelagert und nicht weiter oxidiert, da das Keton **241** zur Epimerisierung an C-14 neigte und somit nicht zur Lagerung geeignet war.*[326]

Die folgende Horner-Wittig-Reaktion wurde analog den Bedingungen von Watarai *et al.* durchgeführt (siehe Schema 75).[325] Baustein **225** kann über insgesamt zehn Stufen aus *S*-Carvon synthetisiert werden [333], ist aber auch kommerziell erhältlich.



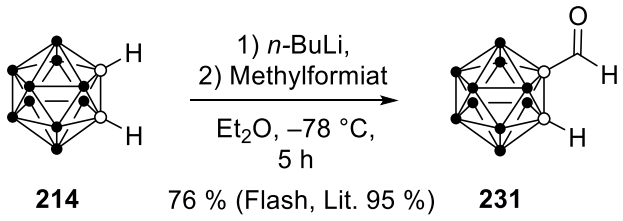
*Schema 75: Reaktionssequenz zur Synthese des Schlüsselintermediats **223** mittels Horner-Wittig-Reaktion des Keton **241** und anschließender Entschützung des Triens **242**.*[325,326]

Zunächst wurde das Phosphinoxid **225** bei –78 °C deprotoniert und **241** mittels Spritzenpumpe über einen Zeitraum von 45 min hinzugegeben. Bei dieser Reaktion und allen folgenden Reaktionen mit dem Triensystem musste unter strengem Lichtausschluss gearbeitet werden. Nach der Zugabe wurde die Reaktion langsam auf 0 °C erwärmt und anschließend gereinigt, wobei überschüssiges Phosphinoxid **225** reisoliert wurde. Dies war aufgrund des hohen Preises des Materials angebracht. Das geschützte Trien **242** konnte in zwei nacheinander durchgeführten Reaktionen mit Ausbeuten von 64 % und 69 % isoliert werden (Lit. 66 %).[325] Anschließend wurde der Literatur folgend die TMS-Gruppe am Diin mit K_2CO_3 in MeOH entfernt, wobei **223** mit Ausbeuten von 95 % bzw. 97 % erhalten werden konnte (Lit. 89 %, siehe Schema 75)[326].

Insgesamt wurden über diese Sequenz ~700 mg von Intermediat **223** synthetisiert, welches anschließend mit den Carboran-Bausteinen umgesetzt werden sollte.

5.3.2 Synthese der Carboran-Bausteine

Der erste Carboran-Baustein konnte den Literaturangaben von Dozzo *et al.* folgend synthetisiert werden.[334] Dazu wurde *ortho*-Carboran (**214**) mit *n*-BuLi (1,05 Äq., das Reagenz wurde im Vorfeld titriert) deprotoniert und mit Methylformiat versetzt. **231** konnte somit erfolgreich mit einer Ausbeute von 76 % (~1,8 g, Lit. 95 %)[334] synthetisiert werden (siehe Schema 76).[24]

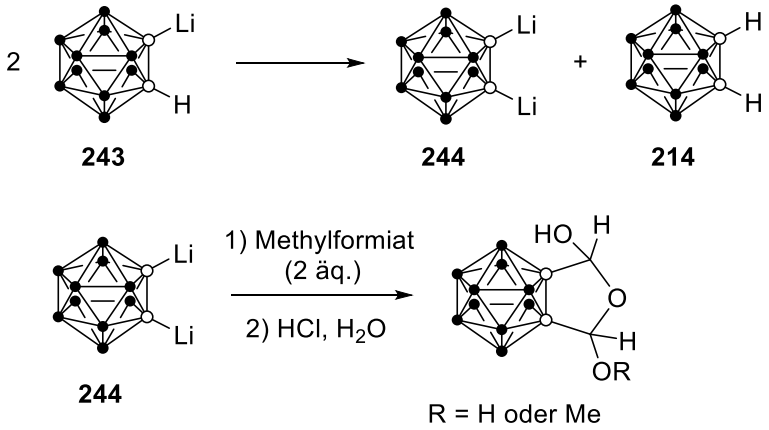


*Schema 76: Synthese von ortho-Carboran-Carbaldehyd (**231**).[334]*

Die exakte und langsame Zugabe von *n*-BuLi war wichtig für diese Reaktion, da das lithiierte *ortho*-Carboran (**243**) bei einem Überschuss von Base zur Disproportionierung zu zweifach-

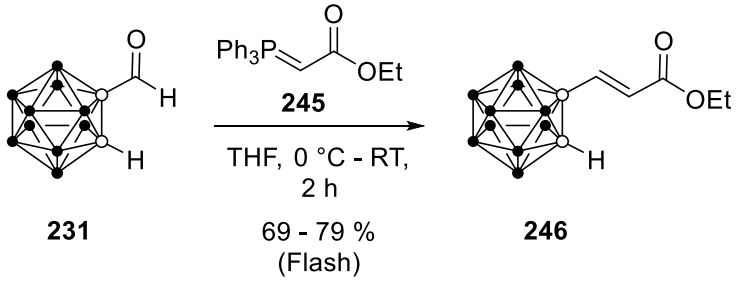
[24] Das Material wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Sousa-Pedrares hergesetllt und später von dieser bezogen. Die analytische Charakterisierung wurde von Prof. Sousa-Pedrares durchgeführt.

lithiiertem *ortho*-Carboran (**244**) und zurück zu **214** neigt (siehe Schema 77). Das zweifach-lithiierte Reagenz (**244**) kann in der Folge zweimal mit Methylformiat reagieren, woraus sich nach wässriger Aufarbeitung Acetale formen, die jedoch chromatographisch abgetrennt werden können (siehe Schema 77).[334] Die vermehrte Bildung dieses Nebenprodukts erklärte die im Vergleich zur Literatur geringere Ausbeute.



*Schema 77: Oben: Disproportionierungsreaktion von einfach-lithiiertem ortho-Carboran (**243**) zu zweifach-lithiiertem ortho-Carboran (**244**) und nicht-lithiiertem ortho Carboran (**214**), unten: Doppelte Formylierung von **244** zu einem Acetal.*[334]

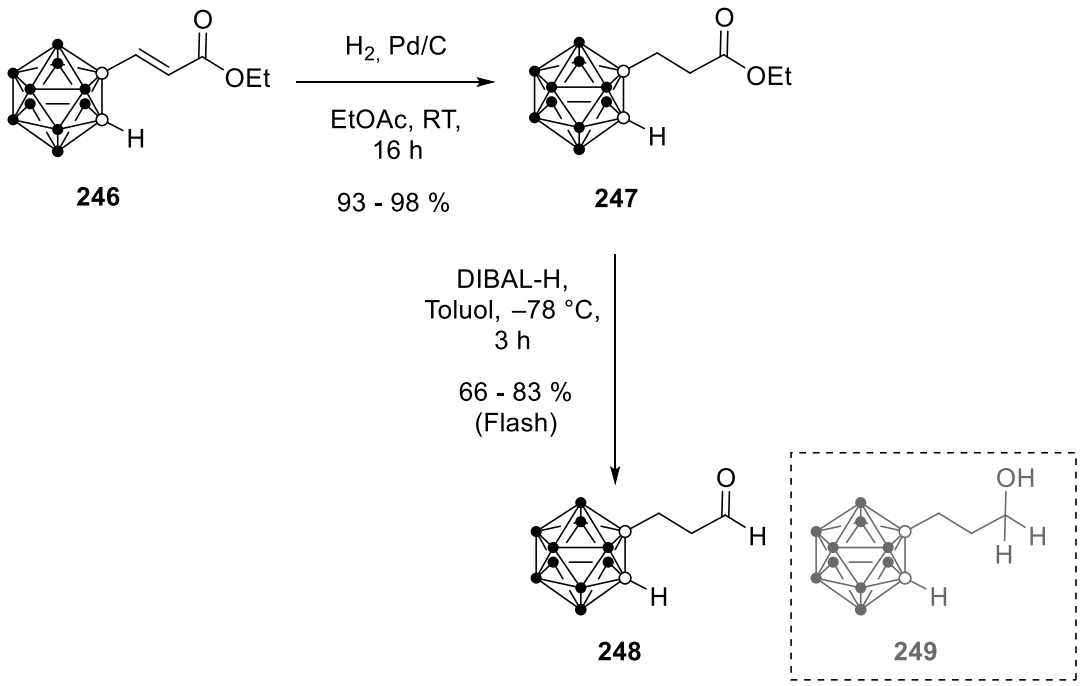
Die Idee, Wittig-Chemie zur Homologisierung der Seitenkette einzusetzen basierte auf der Arbeit von Prof. Antonio Sousa-Pedrares, der ebenfalls an der Universidad de Santiago de Compostela tätig ist.[335] Mit dem Carboran-Carbaldehyd (**231**) stand somit das Ausgangsmaterial für die weiteren Bausteine in ausreichender Menge zur Verfügung. Zu Testzwecken wurde Ylen **245** zu Aldehyd **231** bei 0 °C in THF hinzugefügt. Nach 2 h bei RT zeigte sich ein vollständiger Umsatz des Startmaterials. Die Struktur wurde anhand von NMR-Spektren nach der Reinigung bestätigt (siehe Schema 78).



*Schema 78: Wittig-Reaktion von Carbaldehyd **231** mit Ylen **245** zu Ester **246**.*

Im NMR-Spektrum des gereinigten Produkts konnte ausschließlich das *E*-Isomer beobachtet werden (Kupplungskonstante ^3J = 15.5 Hz[25]). Letztendlich war die *trans*-Selektivität in diesem Projekt nicht relevant, da die entstandene Doppelbindung nicht im finalen Produkt vorhanden war. Für andere Projekte, die dieses Intermediat nutzen, könnte diese Selektivität jedoch relevant sein.

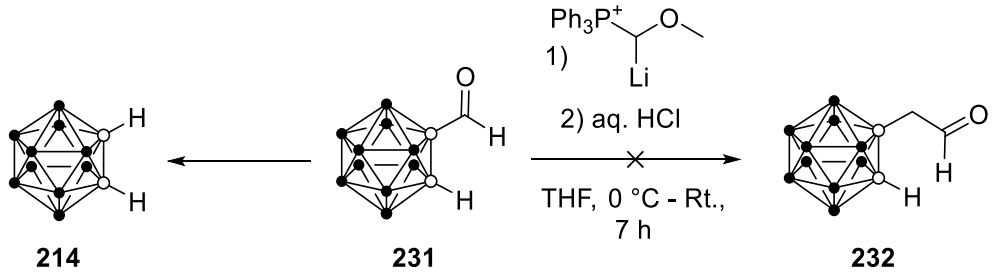
Im nächsten Syntheseschritt wurde eine Pd-katalysierte Hydrierung unter Wasserstoffatmosphäre zur Reduktion von ungesättigtem Ester **246** zum gesättigten Analog **247** durchgeführt. Verbindung **247** konnte durch einfaches Filtrieren der Reaktionslösung über Kieselgel in hoher Reinheit und exzellenter Ausbeute (93 % bzw. 98 %) isoliert werden. Die anschließende Reduktion mit DIBAL-H (1.05 Äq.) bei –78 °C, führte zu einem vollständigen Umsatz des Startmaterials zum Aldehyd **248** und in geringem Ausmaß zum Alkohol **249**. Da der Alkohol aufgrund der deutlich höheren Polarität leichter abzutrennen war, als das Startmaterial, wurde in weiteren Ansätzen ebenfalls mit einem Überschuss von DIBAL-H gearbeitet (siehe Schema 79). Über diese Sequenz konnte somit der zweite Carboran-Baustein erfolgreich synthetisiert werden.



*Schema 79: Hydrogenierung des Doppelbindung von **246** und Reduktion des Esters **247** zum Aldehyd **248** (und im geringen Maße zu Alkohol **249**, dieser wurde jedoch nicht isoliert).*

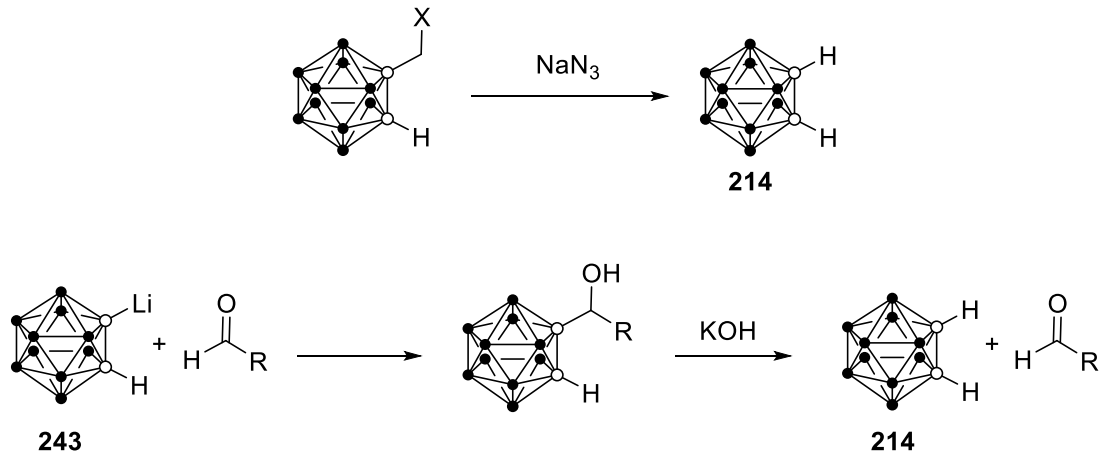
[25] Die hohe *E*-Selektivität wurde ebenfalls von Prof. Sousa-Pedrares beobachtet (nicht veröffentlicht).

Zur Homologisierung des Aldehyds **231** um eine CH_2-Einheit stand (Methoxymethyl)Triphenylphosphonium Chlorid (**250**) zur Verfügung, wodurch direkt der verbleibende Baustein zugänglich wäre. Die Reaktion von **231** mit deprotoniertem Reagenz **250** zeigte nach 3 h einen vollständigen Umsatz des Startmaterials, allerdings zu mehreren Produkten. Um den homologisierten Aldehyd aus dem intermediären Enolether freizusetzen, wurde anschließend verdünnte HCl hinzugegeben. Überraschenderweise stellte sich nach der Reinigung das unsubstituierte *ortho*-Carboran (**214**) als Hauptprodukt dieser Reaktion heraus (siehe Schema 80).



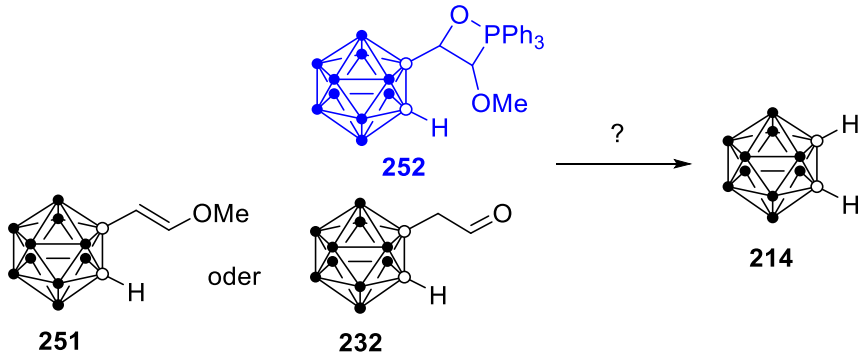
*Schema 80: Wittig-Reaktion von **231** mit dem deprotonierten Reagenz **250**. Die Reaktion führte nicht zum gewünschten homologen Aldehyd, stattdessen wurde das unsubstituierte ortho-Carboran als Hauptprodukt isoliert.*

Tatsächlich sind Reaktionen, in denen **214** als Abgangsgruppe fungiert (absichtlich oder unbeabsichtigt), in der Literatur bekannt.[336,337] Ol'shevskaya *et al.* beobachteten bei der Synthese von (*ortho*-Carboranyl)Methylazid, dass lediglich das Triflat in einer S_N2-Reaktion erfolgreich eingesetzt werden konnte, während die Halogenide, das Tosylat und das Mesylat nicht reagierten oder unter anderem das Carboran (**214**) freisetzten.[337] Nakamura *et al.* nutzten diese Eigenschaft, um *ortho*-Carboran (**214**) für Ketone und Aldehyde als Schutzgruppe einzusetzen, indem sie das lithiierte Carboran (**243**) mit der Carbonylgruppe zum Alkohol umsetzten, aus welchem die Carbonylgruppe wieder nach Behandlung mit KOH freigesetzt werden konnte (siehe Schema 81).[336]



Schema 81: Literaturbeispiele für ortho-Carboran als Abgangsgruppe.[336,337]

Aus welcher Zwischenstufe der Wittig-Reaktion das Carboran freigesetzt wurde, ließ sich in diesem Fall nicht klären. Möglich wäre eine Freisetzung sowohl während der eigentlichen Wittig-Reaktion (z.B. aus dem Oxaphosphetan-Ring) oder während der Hydrolyse des Enolethers (vgl. Schema 82).



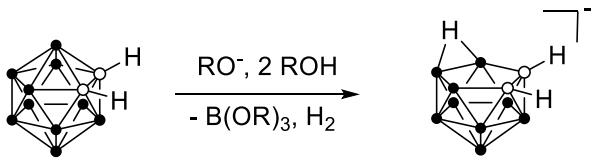
*Schema 82: Der Mechanismus der Bildung des freien Carborans aus der Wittig-Reaktion von Aldehyd **231** mit **250** konnte nicht geklärt werden. Möglich wäre eine Freisetzung während der Wittig-Reaktion (z.B. aus dem Oxaphosphetan-Intermediat **252**, blau markiert) oder während der Hydrolyse aus dem Enolether **251**, oder dem Aldeyhd **232** (schwarz markiert).*

Insgesamt erschien diese Methode jedoch nicht geeignet den fehlenden Baustein **232** zu synthetisieren. Aufgrund der eingeschränkten Zeit dieses Projekts konnten alternative Ansätze zunächst nicht mehr weiterverfolgt werden.[26]

[26] Im Anschluss wurden weitere Reaktionen von Prof. Miguel Maestro an der Universidad de Santiago de Compostela durchgeführt. Eine Übersicht über diese Folgereaktionen findet sich in Kapitel 5.5.

5.3.3 Synthese der Vitamin D_3-Analoga

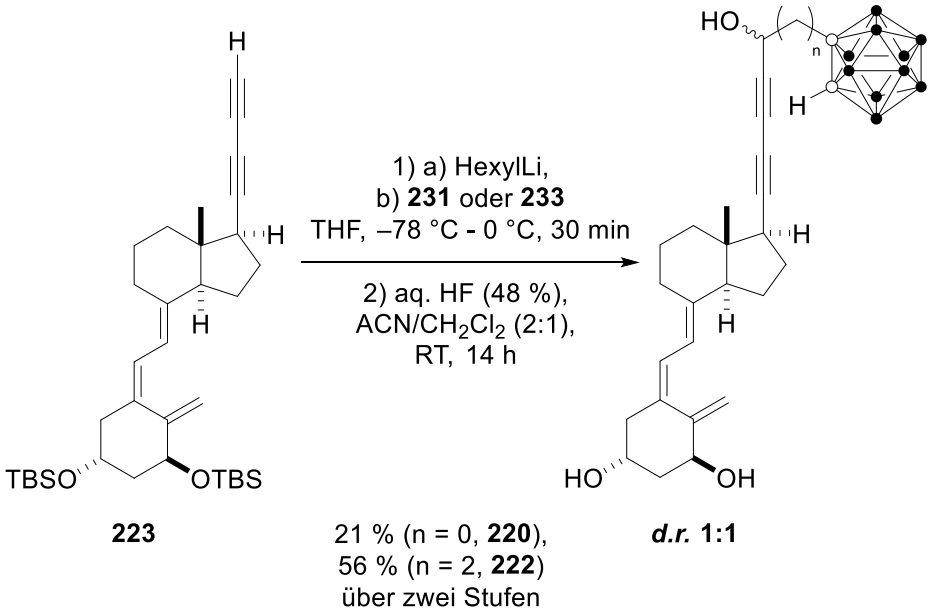
Mit zwei von drei Bausteinen wurde anschließend die Reaktionssequenz abgeschlossen. An die Literatur von Sigüerio *et al.* angelehnt sollte Schlüsselintermediat **223** mit Hexyllithium bei – 78 °C unter Lichtausschluss deprotoniert und anschließend jeweils mit den Aldehyden **231** und **233** versetzt werden, wobei die Reaktionszeit so kurz wie möglich gehalten werden sollte. Dies war entscheidend, denn obwohl Carborane generell sehr stabil sind, können sie mit basischen, nukleophilen Reagenzien (vor allem Aminen oder Alkoholaten) unter Käfig-Öffnung zu sogenannten Nido-Verbindungen reagieren (siehe Schema 83).[338,339]



214 **253**

*Schema 83: Reaktion von ortho-Carboran **214** mit Alkoholaten zum $B_9C_2H_{12}^-$ nido-Carboran **253**.*

Die Reaktion wurde aus diesem Grund engmaschig kontrolliert und bereits nach 30 min beendet, wobei ein Umsatz von ~50 – 70 % des Startmaterials beobachtet wurde. Die Carboran-haltigen geschützten VD_3 Analoga **254** und **255** konnten mittels Säulenchromatographie gereinigt und mit Ausbeuten von 30 % (**254**, beide Epimere zusammen) und 65 % (**255**, beide Epimere zusammen) isoliert werden, wobei ebenfalls 44 % bzw. 32 % des Startmaterials **223** wiedergewonnen werden konnten.



*Schema 84: Kupplung des Schlüsselintermediats **223** mit den Carboran-Bausteinen **231** und **233** und anschließende Entschützung der TBS-Gruppen. Die Verbindungen **220** und **222** lagen jeweils als 1:1 Mischung der C-24-Epimere vor.*

Während in der Reaktion zur Synthese von **255** somit annähernd das gesamte Material (Produkt 65 % + Edukt 32 %) isoliert werden konnte, war anhand einer sehr polaren und farbigen Verunreinigung in der Reaktion von **254** wahrscheinlich, dass sich eine erhebliche Menge einer Nido-Verbindung gebildet hatte (die Nido-Cluster sind oftmals farbig). Da trotzdem von beiden Verbindungen ausreichend Material isoliert werden konnte, wurde wegen der begrenzten Zeit auf eine Wiederholung der Reaktion verzichtet.

Die finale TBS-Entschützung wurde wie zuvor mit aq. HF (48 %) durchgeführt. Die chromatographische Reinigung lieferte **220** mit einer Ausbeute von 71 % (insgesamt 21 % über zwei Stufen) und **222** mit einer Ausbeute von 90 % (insgesamt 59 % über zwei Stufen), jeweils als 1:1 Mischung der C-24-Epimere.

Die Trennung der Epimere erfolgte im Anschluss in den Laboren der TH Köln in Leverkusen. Dazu wurden Methoden mit chiralen Säulen an analytischen und präparativen HPLC-Anlagen etabliert. Zur Trennung der Epimere von **220** wurde eine IA-5 Säule der Firma Daicel als Normalphase (Laufmittel: Hexan/*i*-PrOH) und zur Trennung der Epimere von **222** eine IJ-5 Säule als Umkehrphase (Laufmittel: Wasser/ACN) verwendet.

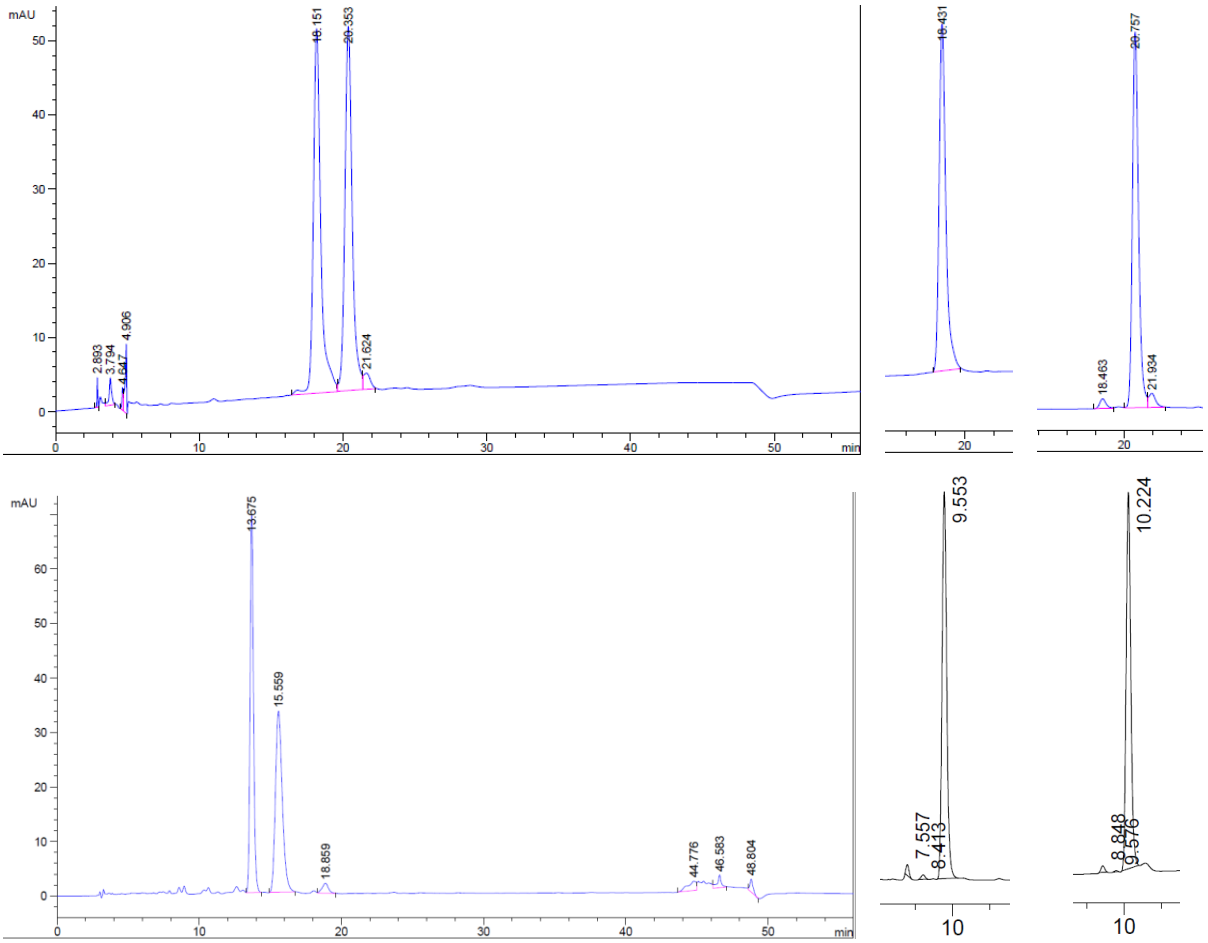


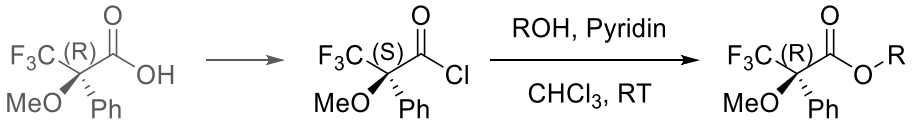
*Abbildung 97: Oben: Trennung der Epimere von **220**, Chromatogramm des Diastereomerengemischs nach Reinigung mittels Normalphasen-Chromatographie, d.r.: 1:1, daneben Chromatogramm von Fraktion 1 nach Reinigung (99 % Peak-Reinheit, d.r. >1:99) und von Fraktion 2 (93,5 % Peak-Reinheit, d.r.: 3:97), Unten: Trennung der Epimere von **222**, Chromatogramm des Diastereomerengemischs nach Reinigung mittels Normalphasen-Chromatographie, das Verhältnis der Epimere betrug (1:1), daneben Chromatogramm von Fraktion 1 nach Reinigung (97,4 % Peak-Reinheit, d.r. >1:99) und von Fraktion 2 (98,5 % Peak-Reinheit, d.r. >1:99).*[27]

Die Methodenentwicklung im kleinen Maßstab konnte ohne Probleme auf den größeren Maßstab übertragen werden, sodass alle vier Verbindungen über diese Methode erfolgreich getrennt und in hoher Reinheit isoliert werden konnten (siehe Abbildung 97). Insgesamt wurden jeweils ~11 mg der beiden Epimere von **220** und ~17 mg der beiden Epimere von **222** erhalten.

Zur Aufklärung der absoluten Konfiguration an C-24 wurde eine Methode, entwickelt von Harry S. Mosher, genutzt.[340] Diese verwendet enantiomerenreine Säuren, sogennante Mosher-Säuren, mit denen Alkohole verester werden. Die absolute Konfiguration kann anschließend anhand der Verschiebung im ^{1}H-NMR-Spektrum zugeordnet werden.

[27] Alle Messungen von **220** und dem Diastereomerengemisch von **222** wurden an einer Agilent Anlage vermessen, die beiden getrennten Fraktionen von **222** wurden unter Verwendung derselben Methode und derselben Säule an einer Shimadzu Anlage vermessen. Daraus resultierten die unterschiedlichen Retentionszeiten.

In diesem Projekt wurde der Prozedur von Hoye *et al.* folgend eine kleine Menge (~0,5 mg) eines Epimers jeweils mit dem *S*- und dem *R*-Mosher-Säurechlorid in $CHCl_3$ und Pyridin als Base umgesetzt (Gemäß der Cahn-Ingold-Prelog-Konvention[341] ändert sich der Deskriptor vom Mosher-Säurechlorid zum Mosher-Ester durch die höhere Priorisierung des Cl-Atoms gegenüber des F-Atoms. Somit bildet z.B. das *S*-Mosher-Säurechlorid den *R*-Mosher-Ester, vergleiche Schema 85).[342]



Schema 85: Änderung des Deskriptors von der Mosher-Säure zum Säurechlorid und Bildung eines Mosher-Esters in $CHCl_3$ mit Pyridin.

Zu beachten war, dass sich pro Molekül insgesamt drei Mosher-Ester bildeten, wobei zwei Stereozentren (an C-1 und C-3 des A-Rings) bekannt waren. Erstaunlicherweise konnte von beiden Verbindungen nur jeweils eine Fraktion (also ein Epimer) vollständig umgesetzt werden, die jeweils anderen Epimere reagierten nach mehrfacher Zugabe von Reagenz und Pyridin nicht vollständig. Da jedoch die Bestimmung eines Epimers pro Verbindung ausreichte, wurde die Reaktion auch mit Blick auf die geringe insgesamt verfügbare Menge des Materials nicht wiederholt. Da das Produkt nicht mit verschiedenen Laufmitteln (EtOAc, CH_2Cl_2, MeOH) von einer kleinen Kieselgelsäule eluiert werden konnte, musste das Rohprodukt analysiert werden.

Die Zuordnung der absoluten Konfiguration beruht auf der anisotropen, magnetischen Abschirmung durch die Phenylgruppe. Voraussetzung dafür ist, dass der Ester eine *trans*-Konformation animmt, bei der die CF_3-Gruppe der Mosher-Säure und das α-H-Atom am Stereozentrum in einer syn-koplanaren Konformation vorliegen. Dadurch schirmt die Phenylgruppe jeweils einen Rest am Stereozentrum magnetisch ab (siehe Abbildung 98). Aus dem Vergleich der Verschiebung zwischen dem *S*-Mosher-Diastereomer und dem *R*-Mosher-Diastereomer kann dann ein Rückschluss auf die Konfiguration am Alkohol gezogen werden. Laut Konvention soll dazu die Verschiebung des *R*-Mosher-Diastereomers von den Werten des *S*-Mosher-Diastereomers abgezogen werden (δ *S*-*R*, Werte in ppm oder Hz).[342]

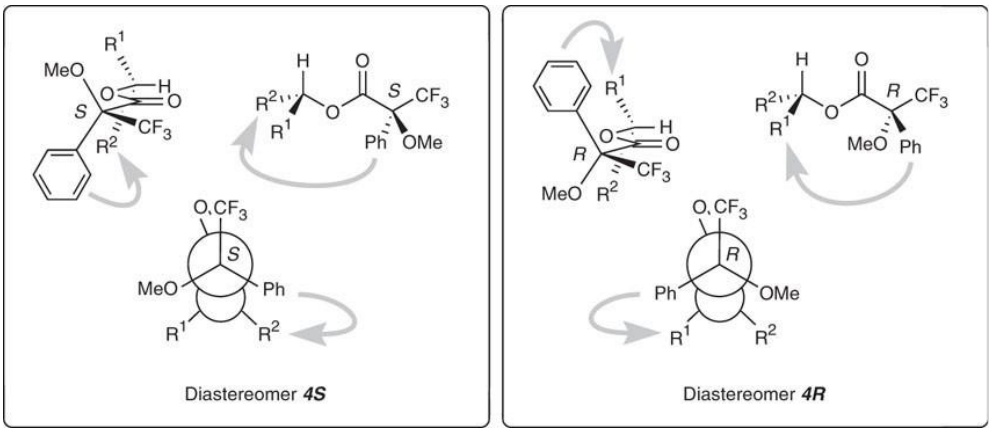


Abbildung 98: Die Abschirmungseffekte der Phenylgruppe. [342] (modfiziert)

Zur Identifikation mussten im NMR-Spektrum der Ester möglichst viele Signale zugeordnet werden. Aufgrund der Überlagerung der Carboran-Protonen und der CH_2-Protonen der Ringsysteme konnten in diesem Feld keine Protonen zugeordnet werden. Einzig die 18-Me-Gruppe war eindeutig identifizierbar. Darüber hinaus konnten die Olefin-Protonen an C-6/7 und 19 zugeordnet werden. Dies erlaubte einen internen Vergleich und eine Möglichkeit der Validierung, da die Stereozentren an C-1 und C-3 bekannt waren. Die Auswertung der Daten ergab einen positiven δ-Wert in der Verschiebung für alle betrachteten Protonen (siehe Tabelle 34). Somit konnte in allen Fällen der *R*-Mosher-Ester die Protonen besser abschirmen als der *S*-Mosher-Ester.

Tabelle 34: ^{1}H-NMR-Daten der Mosher-Ester-Diastereomere. Angegeben wurden die chemischen Verschiebungen der Protonen. Die Konfigurationsangaben beziehen sich auf das Stereozentrum der Mosher-Ester. Laut Konvention sollen die Daten der R-Diastereomere von denen der S-Diastereomere abgezogen werden.

Verbindung	Protonen	*S* [ppm]	*S* [Hz]	*R* [ppm]	*R* [Hz]	δ *S*-*R* [ppm]	δ *S*-*R* [Hz]
220 Fr.2	CH_3 (C-18)	0,58	232,02	0,57	227,38	+0,01	+4,64
	CH (C-7)	6,41	2570	6,32	2530	+0,09	+40
	CH (C-6)	5,93	2380	5,85	2345	+0,08	+35
	CCH_2 (C-19)	5,5	2200	5,4	2160	+0,1	+40
	CCH_2 (C-19)	5,17	2070	5,09	2035	+0,08	+35
222 Fr.2	CH_3 (C-18)	0,57	228,41	0,56	224,38	+0,01	+4,03
	CH (C-7)	6,40	2570	6,32	2535	+0,08	+35
	CH (C-6)	5,92	2375	5,84	2340	+0,08	+35
	CCH_2 (C-19)	5,5	2200	5,4	2160	+0,1	+40
	CCH_2 (C-19)	5,17	2070	5,09	2035	+0,08	+35

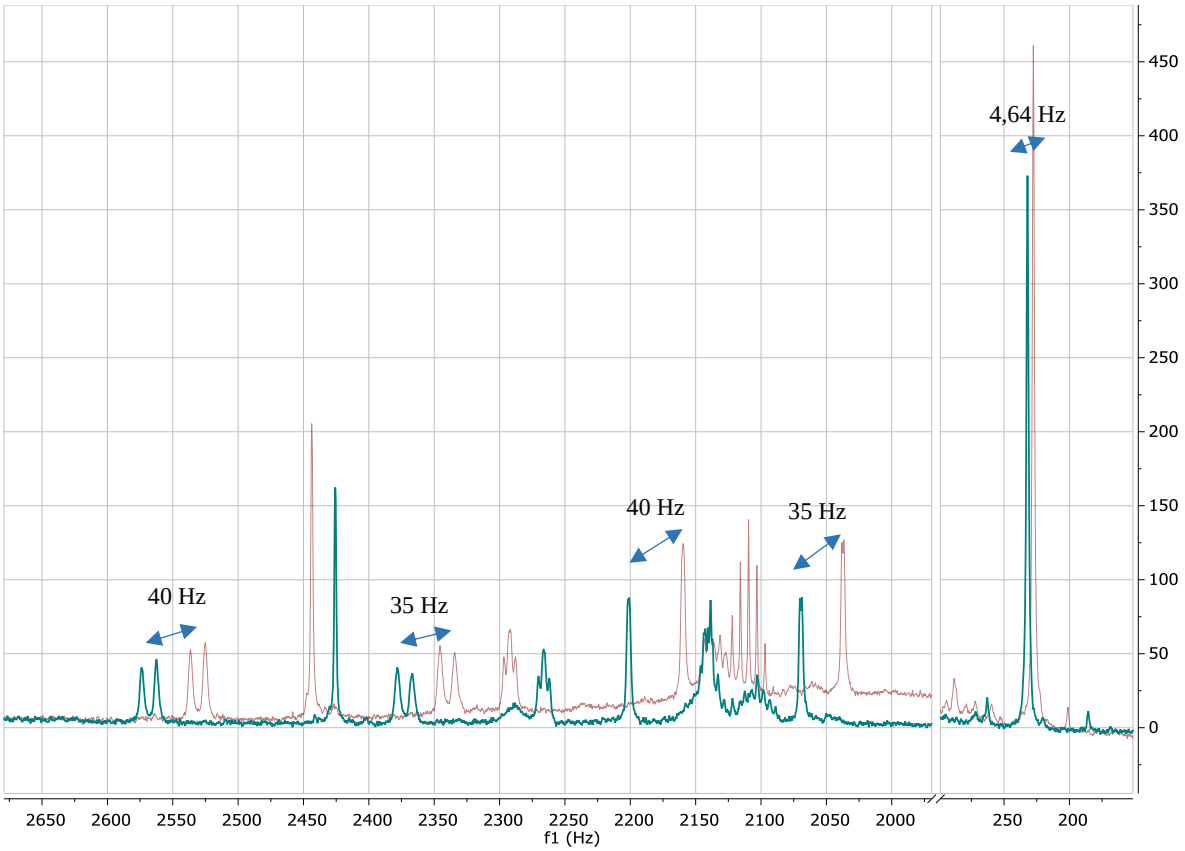


*Abbildung 99: Überlagerung der ^{1}H-NMR-Spektren der Mosher-Ester von **220** Epimer 2, S Mosher-Ester in türkis, R-Mosher-Ester in rot. Die relevanten Verschiebungen sind markiert.*

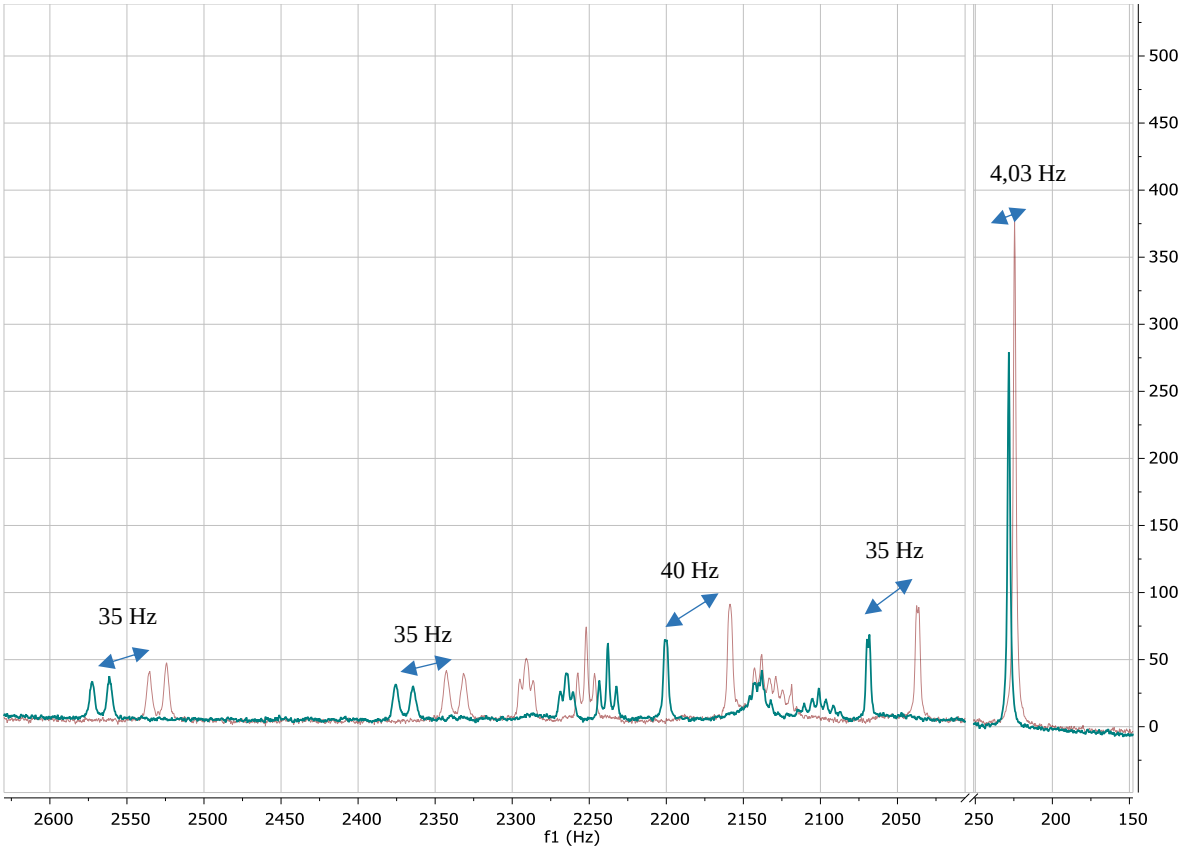
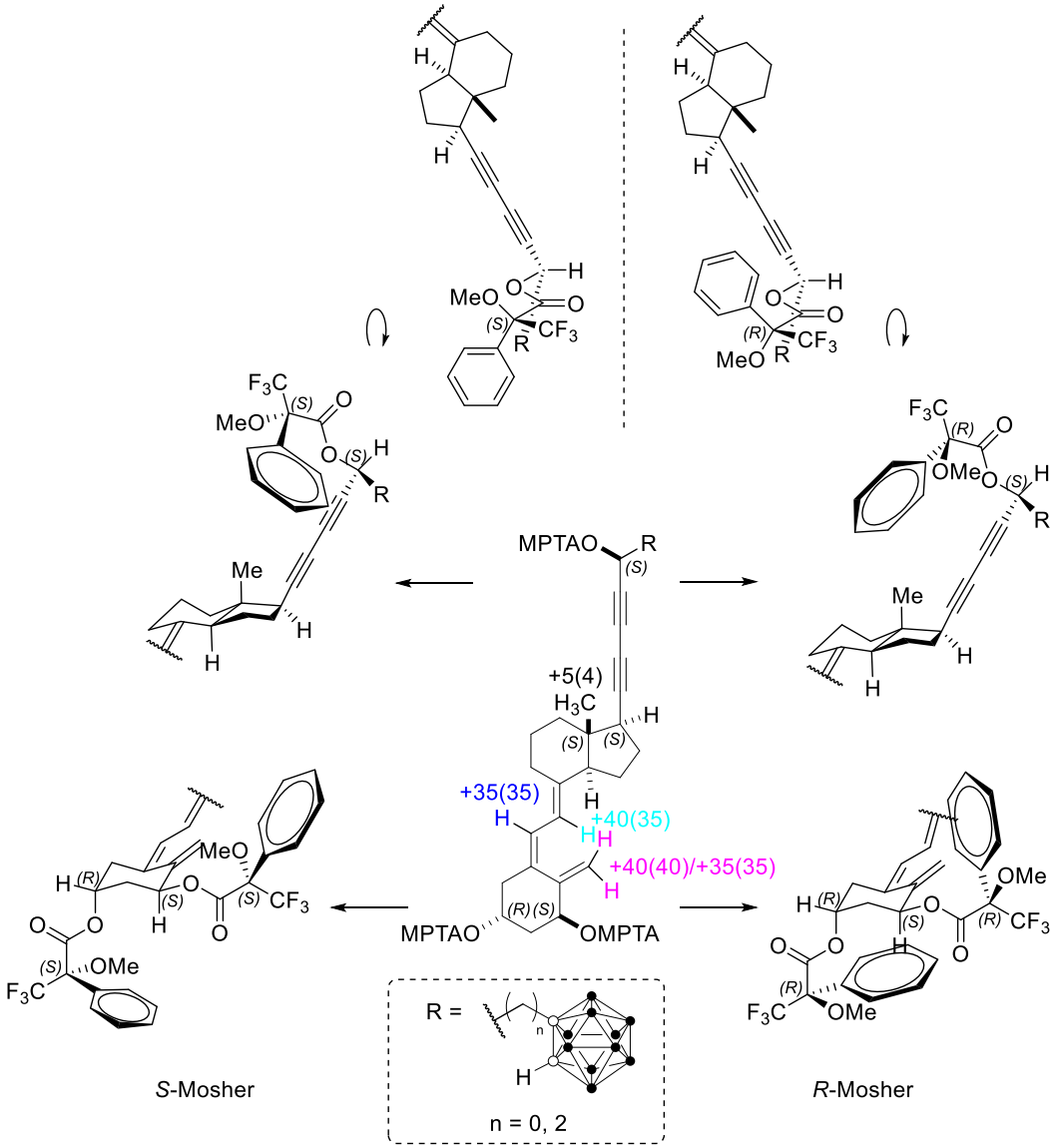


*Abbildung 100: Überlagerung der ^{1}H-NMR-Spektren der Mosher-Ester von **222** Epimer 2, S Mosher-Ester in türkis, R-Mosher-Ester in rot. Die relevanten Verschiebungen sind markiert.*

Anhand dieser Daten wurde anschließend die Struktur des VD_3-Analogons so gezeichnet, dass die Abschirmung durch die Phenylgruppe der *R*-Mosher-Diastereomere möglichst gegeben war. Anhand der grafischen Darstellung ergaben sich für C-1 und C-3 die erwarteten Konfigurationen (siehe Schema 86). Für das Stereozentrum an C-24 ergab sich für beide Verbindungen (**220** und **222**), dass das jeweils betrachtete Epimer in der *S*-Konfiguration vorlag.



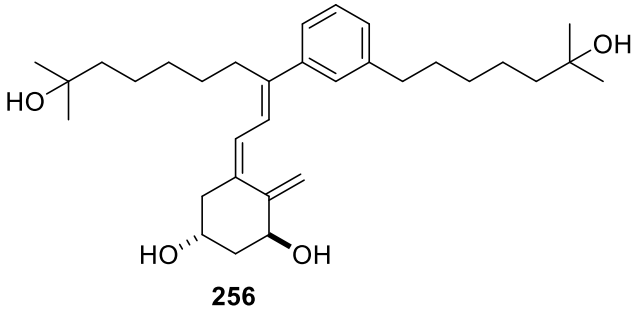
*Schema 86: Grafische Darstellung zur Bestimmung der absoluten Konfiguration. Angegeben sind die jeweiligen δ S-R Verschiebungen (Wert für **220** und Wert für **222** in Klammern).*

Es ist jedoch zu beachten, dass aufgrund der Überlagerungen der Protonen-Signale nur eine einzige relevante Verschiebung betrachtet werden kann, die zudem relativ weit entfernt vom Stereozentrum liegt. Somit ist diese Bestimmung nur unter Vorbehalt gültig und sollte auf jeden Fall durch weitere Experimente (z.B. Co-Kristallisation mit dem Rezeptor) bestätigt werden.

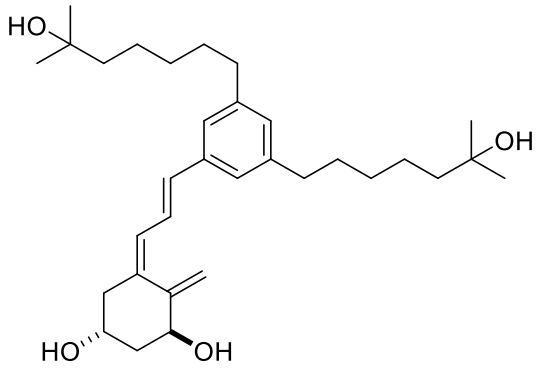
5.4 Weitere Dockingstudien zu 1α,25-Dihydroxyvitamin D_3-Analoga

Neben dem Design und der Synthese der Carboran-haltigen Analoga wurden im Rahmen dieses Projekts weitere Dockingstudien für laufende und zukünftige Projekte durchgeführt.

Eine dieser Dockingstudien bezog sich auf Des-C-Ring/Aryl-D-Ring-Analoga von 1,25-VD_3 (siehe Abbildung 101). Diese Verbindungen wurden im Labor von Prof. Mouriño synthetisiert und anschließend weitergehend charakterisiert. Die Ergebnisse dieses Projekts wurden im Journal of Medicinal Chemistry veröffentlicht.[343]



256



257

*Abbildung 101: Strukturen der synthetisierten, gedockten und getesteten Verbindungen **256** und **257**.*

Sowohl die Dockingstudien als auch die Molecular Dynamics Simulationen wurden als Teil dieser Arbeit durchgeführt (siehe Abbildung 102).

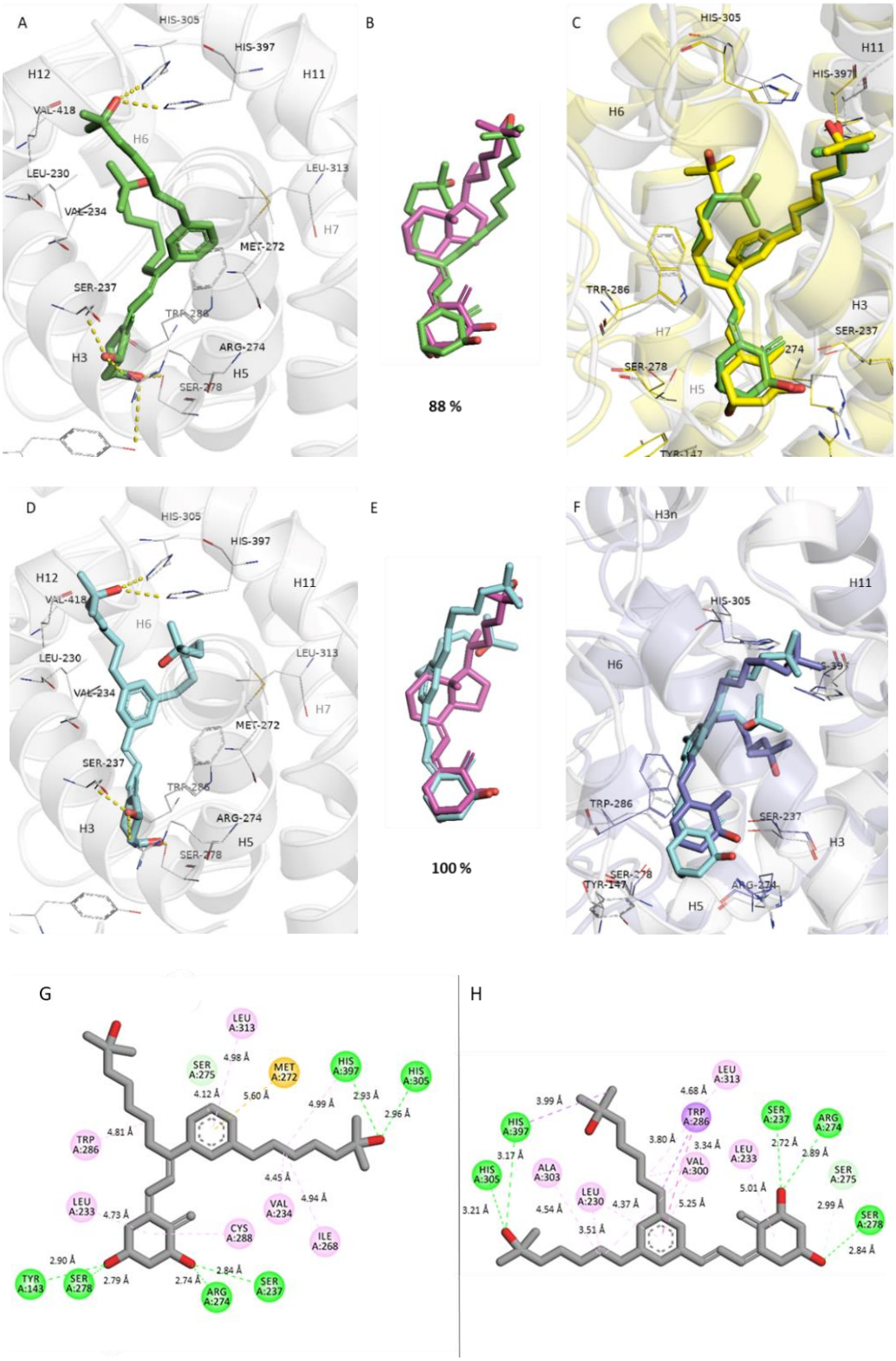
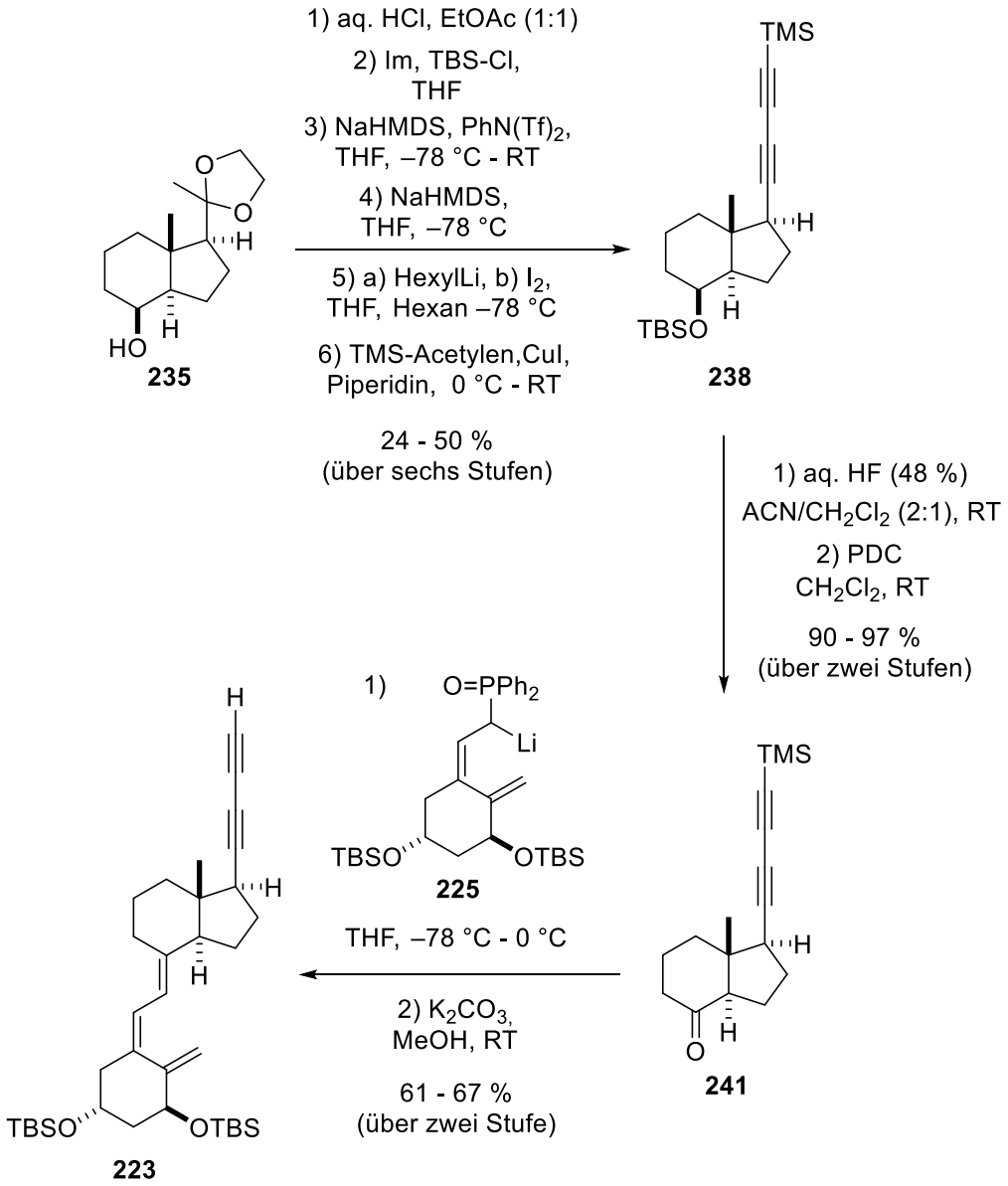


*Abbildung 102: A: Dockingpose von **256** (grün) im humanen VDR (1DB1.pdb) mit angedeuteten H-Brückenbindungen, B: Überlagerung der Pose von **256** mit der Röntgen-Kristall-Struktur von 1,25-VD$_3$ (lila), C: Überlagerung der Dockingpose mit der Struktur nach Molecular Dynamics (MD) Kalkulation (gelb). C: Dockingpose von **256** (türkis) im humanen VDR (1DB1.pdb) mit angedeuteten H-Brückenbindungen, B: Überlagerung der Pose von **257** mit der Röntgen-Kristall-Struktur von 1,25-VD$_3$ (lila), C: Überlagerung der Dockingpose mit der Struktur nach Molecular Dynamics (MD) Kalkulation (hellblau). G: Interaktion von **256** mit den AS des Rezeptors, H: Interaktion von **257** mit den AS des Rezeptors (H-Brückenbindungen in grün, S-Pi-Interaktion in oragne, Van-der-Waals-Interaktion in lila).[343]*

5.5 Zusammenfassung und Ausblick – Auslandsaufenthalt

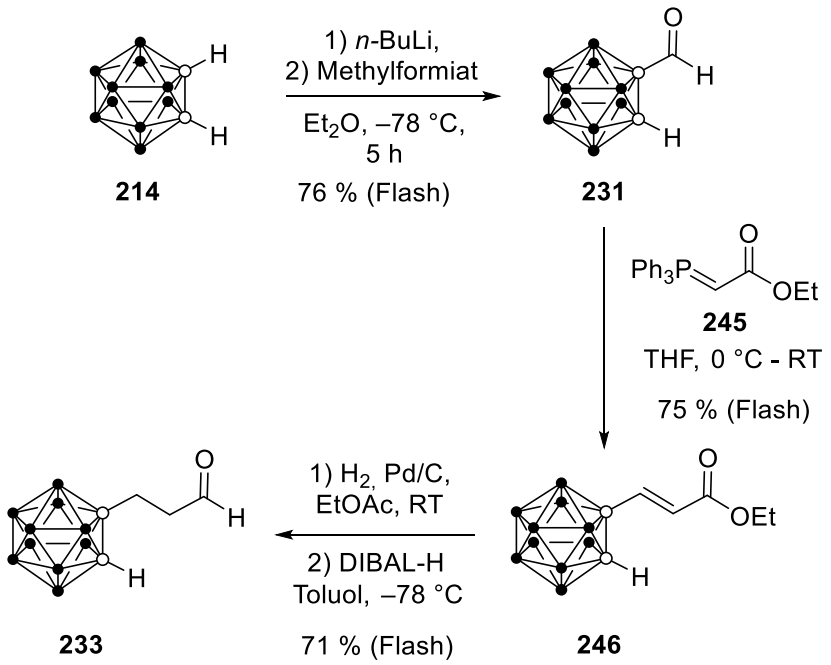
Im Fokus der Arbeit stand das computergestützte Design und die Synthese neuer Carboran-haltiger Vitamin D_3 Antagonisten. Die Dockingstudien wurden mit der GOLD Software Suite durchgeführt, daran anschließend erfolgten Molecular Dynamics Simulationen mit der YASARA Suite. Basierend auf den Simulationen von über 60 Molekülen wurde eine Serie von sechs Verbindungen (drei Moleküle, jeweils zwei Epimere) ausgewählt, wobei die Auswahl aufgrund der Daten aus den *in silico* Studien erfolgte. Zusätzlich wurde für diese Verbindungen ein einfacher synthetischer Zugang erwartet.



*Schema 87: Synthese des Schlüsselintermediats **223**. Die meisten der Reaktionen wurden mehrfach durchgeführt, angegeben ist eine Durchschnittsausbeute der beschriebenen Reaktionen. Die Gesamtausbeute nach 10 Stufen betrug 23 %.*

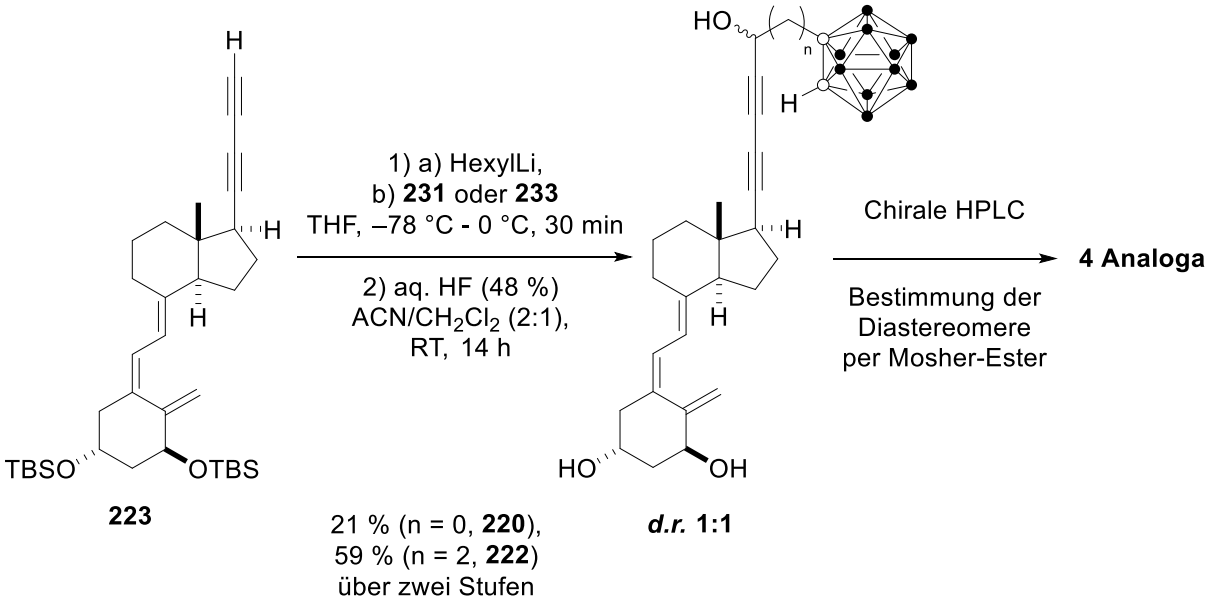
Insgesamt konnten in diesem Projekt vier Derivate (jeweils zwei Epimere der gleichen Verbindung) synthetisiert und isoliert werden. Die Syntheseroute folgte den Literaturbedingungen von Watarai *et al.*[325] und Sigüeiro *et al.*[326]. Verbindung **223** wurde durch eine Horner-Wittig-Reaktion aus einem A-Ring-Phosphinoxid-Baustein und einem C,D-Ring-Keton, welches das Diin enthielt, zusammengesetzt. Für dieses Projekt wurden ~700 mg des Schlüsselintermediats über insgesamt zehn Stufen mit einer Gesamtausbeute von ~23 % synthetisiert (siehe Schema 87).

Die Carboran-Bausteine konnten ausgehend von *ortho*-Carboran (**214**) synthetisiert werden, wobei der Carbaldehyd **231** über literaturbekannte Methoden und der homologe Aldehyd **233** über neuartige Wittig-Chemie aus **231** hergestellt wurden (siehe Schema 88).



*Schema 88: Synthese der Carboran-Bausteine **231** und **233**. Der erste Reaktionsschritt war literaturbekannt, die weiteren Reaktionsschritte wurden in diesem Projekt entwickelt.*

Der Schlüsselschritt der Sequenz bestand aus der Kupplung des Diin-Intermediats **223** mit den beiden Carboran-Bausteinen. Die Verbindungen wurden in einem 1:1 Verhältnis der C-24-Epimere synthetisiert, welche im Anschluss mittels präparativer chiraler HPLC getrennt und isoliert werden konnten.

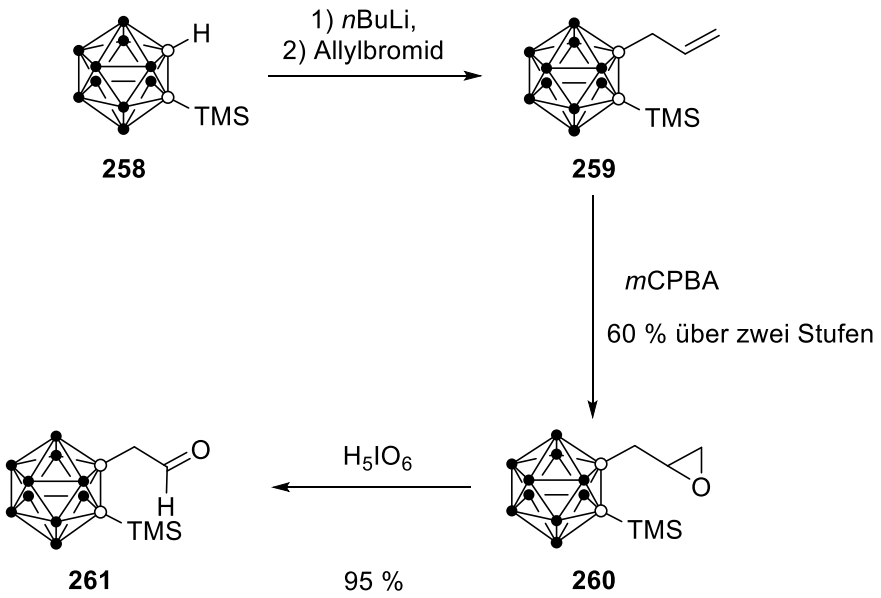


Schema 89: Finale Reaktionsschritte zur Synthese neuer Carboran-haltiger VD_3 Analoga. Die Derivate wurden als C-24-Epimere (d.r. 1:1) erhalten, anschließend mittels chiraler HPLC getrennt und die absolute Konfiguration mittels Mosher-Ester-Bildung anhand der NMR-Daten bestimmt.

Die Bestimmung der absoluten Konfiguration erfolgte durch die Bildung der jeweiligen Mosher-Ester, allerdings sollen die Ergebnisse in weiteren Experiment verifiziert werden.

In einer Fortführung des Projekts sollte der fehlende Carboran-Baustein und anschließend die fehlenden Verbindungen synthetisiert werden. Dazu wurde TMS-geschütztes *ortho*-Carboran (**258**) nach Deprotonierung mit Allylbromid umgesetzt, welches mit *m*CPBA zum entsprechenden Epoxid **260** umgewandelt wurde. Die oxidative Spaltung mit Periodsäure ergab anschließend den TMS-geschützten Baustein **261**, welcher mit Schlüsselintermediat **223** gekuppelt werden sollte (siehe Schema 90).[28]

[28] Diese Arbeiten wurden von Prof. Maestro und Prof. Mouriño durchgeführt. Das TMS-Carboran (**258**) wurde von Prof. Sousa-Pedrares zur Verfügung gestellt.



*Schema 90: Synthese des fehlenden Bausteins **261** durch Epoxidierung und oxidative Spaltung eines Olefins.*

Nach der Synthese, der Trennung der Epimere und der Bestimmung der absoluten Konfiguration analog zu den bereits synthetisierten Verbindungen sollen die Moleküle bei verschiedenen Kooperatinspartnern auf die biologische Aktivität untersucht werden. Die Untersuchungen sollen an frühere Projekte angelegt sein und aus kompetitiven Bindungsstudien am VDR und Untersuchungen des Kalziuminflux und der Proliferationsraten von Zellen als Indikatoren für die antagonistische Aktivität bestehen.[304] Darüber hinaus sollen die Derivate mit dem VDR cokristallisiert werden, um Röntgen-Kristall-Strukturdaten zu erhalten. In diesem Verfahren könnte dann zusätzlich die absolute Konfiguration bestätigt werden.

Insgesamt wurden in diesem Projekt erfolgreich neue potentielle Carboran-haltige VDR-Analoga designt und synthetisiert. Darüber hinaus wurden neuartige Methoden zur Homologisierung von Carboranaldeyhden etabliert und erfolgreiche Dockingsimulationen durchgeführt, die im Anschluss publiziert wurden.

6 EXPERIMENTELLER TEIL I

6.1 Allgemeine experimentelle Bedingungen

Reagenzien und Lösemittel

Die verwendeten Reagenzien und Lösemittel wurden von *TCI, Acros, Sigma Aldrich, ABCR, FischerScientific, Honeywell* und *Carl Roth* mit einer Reinheit von >95 % bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet. Lösemittel wurden als Analytical Grade oder HPLC Grade, trockene Lösemittel wurden als ExtraDry von *AcroSeal* bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet.

Entfernen der Lösemittel

Lösemittel wurden mittels eines Rotationsverdampfers der Firma *Heidolph* mit einer Membranpumpe der Firma *Vacuubrand* unter vermindertem Druck bei einer Wasserbadtemperatur von 50 °C entfernt. Eine zusätzliche Trocknung der Substanzen erfolgte an einer Gefriertrocknungsanlage der Firma *Christ* mit einer angeschlossenen Drehschieberpumpe der Firma *Vacuubrand* bei Raumtemperatur und einem Druck von <1 mbar.

Arbeiten unter Schutzatmosphäre

Einige Reaktionen wurden unter einer Schutzatmosphäre durchgeführt. Dazu wurden die Glasgeräte vor der Verwendung entweder über Nacht in einem Trockenschrank bei 100 °C gelagert, oder mit einem Heißluftgebläse bei ~500 °C unter Vakuum ausgeheizt. Zur Erzeugung des Vakuums wurde eine Drehschieberpumpe der Firma *Ilmvac* verwendet, welche über eine Schlenk-Apparatur mit den Reaktionsgefäßen verbunden war. Die getrockneten Gefäße wurden anschließend mit Argon 4.6 (99,996 %) geflutet, wobei das Evakuieren und Zurückfluten mit Argon insgesamt dreimal wiederholt wurde.

Mikrowellensynthese

Reaktionen in der Mikrowelle wurden in einem *Discover AP Mikrowellen-Synthesizer* der Firma *CEM* durchgeführt. Die Strahlungsleistung betrug zwischen 20 und 300 W.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Reaktionskontrollen und R_f-Wertbestimmungen mittels Dünnschichtchromatographie wurden auf Kieselgelplatten (Aluminiumfolie, Kieselgel 60 F254) der Firma *Roth* durchgeführt. Es wurden verschiedene Laufmittelgemische verwendet, diese sind bei den jeweiligen Reaktionen angegeben. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht, sowie Anfärbung mit *Hessain-Cer-Lösung*.

Anfärbereagenz: 5 g $Ce(SO_4)_2$ und 25 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24}{\cdot}4\ H_2O$ in 50 ml konz. H_2SO_4 gelöst und mit 450 ml H_2O verdünnt.

Hochdruckflüssigchromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie (HPLC-MS)

Reaktionskontrollen und niedrigaufgelöste Massenspektrogramme (LR-MS) wurden an einem *Shimadzu LC-30AD Nexera* LC/MS-System mit *Shimadzu SIL-30AC Autosampler*, *Shimadzu SPD-M20A* UV-Vis-Detektor und *Shimadzu LCMS-2020* Massenspektrometer aufgenommen. Der UV-Vis-Detektor scannte einen Bereich von λ = 200 nm bis 800 nm, der Massendetektor von m/z = 50 bis 1300. Als stationäre Phase diente eine *Kromasil Orbit-100-C18* 5 µm Säule in den Dimensionen 4,6 mm x 30 mm. Als Ionisierungsmethode wurde Electron-Spray-Injection (ESI) verwendet, die Laufmittel waren A: wäss. Ameisensäure 0,1 % und B: ACN mit Ameisensäure 0,1 %.

Standardmethode: 0.1 min 20% B; 4 min 20→90 % B; 1.1 min 90 % B; Flussrate 1.0 ml/min.

Hochauflösende Massenspektrometrie (HR-MS)

Zur Bestimmung eines hochaufgelösten Massenspektrogramms (HR-MS) wurde ein *Thermo Fisher LTQ Orbitrap XL Massenspektrometer* verwendet. Als Ionisierungsmethode wurde Electron-Spray-Injection (ESI) verwendet.

Automatisierte Säulenchromatographie

Für die automatisierte Niederdrucksäulenchromatographie (Flash-Chromatographie) wurde eine *Revelis X2* der Firma *Büchi* bzw. *CombiFlash R_f 200* der Firma *Teledyne-Isco* verwendet. Als stationäre Phase dienten vorgepackte Silicagel-Säulen *RediSepR_f* der Firma *Teledyne-Isco* in den Größen 4 g, 12 g oder 24 g. Das Rohprodukt wurde entweder mit *Celite®* dispergiert und als Feststoff in einer Vorsäule aufgetragen, oder in den entsprechenden Eluenten gelöst und als

Lösung direkt injiziert. Die Geräte verfügten über einen UV-Detektor, die Absorption wurde bei den Wellenlängen 254 nm und 280 nm gemessen. Die Fraktionen wurden automatisch gesammelt. Die verwendeten Lösemittel und Gradienten sind jeweils bei den Reaktionen angegeben.

Automatisierte Hochdrucksäulenchromatographie (präparative HPLC) wurde an einer *PuriFlash 4250-250* der Firma *Interchim* durchgeführt. Zur Trennung wurde eine C18-Umkehr-Phase von *M/Z* mit dem Säulenmaterial *Kromasil-100 C18* und einer Porengröße von 5 µm in den Dimensionen 20 mm x 250 mm verwendet. Das Gerät verfügte über einen PDA-Detektor, welcher den Bereich von 200 nm bis 600 nm scannte. Die verwendeten Lösemittel und Gradienten sind jeweils bei den Reaktionen angegeben.

Hochdruckflüssigchromatographie mit chiraler stationärer Phase (chirale HPLC)

Zur Trennung und Bestimmung chiraler Verbindungen wurde ein *Agilent 1100/1200 Series* HPLC-System verwendet. Das Gerät enthielt einen Einwellenlängen-UV-Detektor der auf λ = 254 nm eingestellt wurde. Als stationäre Phase diente eine *Kromasil 5-CelluCoat* Säule in den Dimensionen 4.6 mm x 250 mm. Die Säule wurde als Normalphase verwendet. Die verwendeten Laufmittel und Gradienten sind jeweils bei den Reaktionen angegeben.

Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Zur Bestimmung der Kernspinresonanz-Spektren (NMR-Spektren) wurde ein *Avance III HD 400 MHz* Spektrometer der Firma *Bruker* verwendet. Die chemischen Verschiebungen δ wurden in ppm angegeben. Die deuterierten Lösemittel und die Messfrequenz sind vor den Messdaten aufgeführt. Als Lösemittel mit den jeweiligen Referenzwerten dienten $CDCl_3$ (^{1}H: 7.26 ppm; ^{13}C: 77.16 ppm), CD3OD (^{1}H: 3.31 ppm, ^{13}C: 49.00 ppm) oder DMSO-*d*6 (^{1}H: 2.50 ppm; ^{13}C: 39.52 ppm). Die Messungen wurden bei 23 °C durchgeführt. Die Mulitplizität der ^{1}H-Signale ist mit s“ für Singulett, „d“ für Dublett, „t“ für Triplett, „q“ für Quartett und „m“ für Multiplett (oder Kombinationen daraus) angegeben. Die Angaben zu der Mulitplizität, den Kopplungskonstanten (*J* in Hertz [Hz]) und der Protonenanzahl sind jeweils in Klammern hinter der chemischen Verschiebung angegeben. Die Verschiebungen der ^{13}C-Kerne wurden aus ^{1}H-breitbandentkoppelten Spektren entnommen. Zur Zuordnung der Signale wurde auf zweidimensionale NMR-Spektren (HSQC, HMBC, COSY und NOESY) zurückgegriffen Die Anzahl der gebundenen H-Atome konnte darüber hinaus anhand von Attached-Proton-Test-

Spektren (ATP-Spektren) bestimmt werden. Falls Signale nicht eindeutig zugeordnet werden konnten, werden diese mit „q“ für C, „t“ für CH, „d“ für CH_2 und „s“ für CH_3 gekennzeichnet. Die NMR-Spektren wurden mit der Software *MestreNova* der Firma *MestreLab* ausgewertet und bearbeitet.

Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FT-IR)

Zur Bestimmung der Fourier-Transform-Infrarotspektrogramme wurde ein *FTIR alpha* System der Firma *Bruker* bei Raumtemperatur im Modus ATR (Attenuated Total Internal Reflectance) verwendet. Die Wellenzahlen sind in cm^{-1} angegeben und wurden je nach Intensität mit „s“ für strong (intensive Banden), „m“ für medium (mäßige Banden), „w“ für weak (schwach intensive Banden) und „br“ für broad (breite Banden) gekennzeichnet.

Vorbereitung und Lagerung der finalen Derivate

Die finalen Derivate wurden in tarierte Braunglasvials gefüllt, für min. 24 h an der Gefriertrocknungsanlage getrockent und die Masse an einer Feinwaage der Firma *Satorius* bestimmt. Anschließend wurden die Derivate in DMSO gelöst. Die Zugabe erfolgte auf der Feinwaage, sodass das Volumen und die Masse des Lösemittels kontrolliert werden konnte. Alle Verbindungen, die in biologischen Assay getestet wurden, wiesen eine HPLC-Reinheit von >95 % auf.

6.2 Docking-Workflow für IMB0901 und NUCC555 Derivate

Die 3-dimensionalen Strukturen der Derivate wurden mit Chem3D generiert. Alle Verbindung wurden vor dem Docking mit dem Chem3D „MM2 Energy minimization tool“ im Vakuum bei 300 K minimiert. Der Grenzwert der Minimierung wurde auf 0,01 Å RMS gesetzt. Die Strukturen wurden weiterhin auf die korrekte Stereochemie überprüft. Die Strukturen wurden im Dateiformat PDBQT verwendet. Dazu wurden die Strukturen im PDB Format gespeichert und anschließend mit AutoDOCK Tools 1.5.2 in das Format PDBQT umgewandelt. Als Zielproteine wurde die Röntgen-Kristallstruktur 3HH2 (MSTN)[35] und 2B0U (ACVA)[89] verwendet. Beide Proteinstrukturen wurden modifiziert und das cokristallisierte FST wurde jeweils entfernt.

Die Dockingstudien wurden mit AutoDOCK VINA durchgeführt.[195] Es wurde jeweils das gesamte Protein verwendet, wodurch keine Restriktion in Bezug auf mögliche Bindungsstellen vorlag.

Einstellungen der Konfigurationsdatei zum Docking:

receptor = 3hh2modified.pdbqt
ligand = LIGAND.pdbqt
center_x = -28.216
center_y = -14.516
center_z = 25.198
size_x = 52
size_y = 52
size_z = 52
exhaustiveness = 60
num_modes = 10
out = LIGAND_outMSTNganz.pdbqt
log = LIGAND_outMSTNganz.txt

LIGAND = Name des zu dockenden Derivats

Die drei besten Dockingposen eines jeweiligen Derivats wurden behalten. Die anschließende Visualisierung wurde mittels AutoDOCK Tools 1.5.2 und PyMOL vorgenommen. Die abgebildeten Grafiken wurden mit PyMOL und dem Discovery Studio Visualizer erstellt.

6.3 Synthese von Derivaten basierend auf IMB0901

6.3.1 Allgemeine Synthesevorschriften

Die allgemeinen Synthesevorschriften wurden generell wie beschrieben in den jeweiligen Reaktionen angewendet. Abweichungen bei den eingesetzten Äquivalenten, der Reaktionszeit, der Aufarbeitung oder Reinigung wurden in den entsprechenden Reaktionen beschrieben.

Allgemeine Synthesevorschrift **A**:

In EtOH (96 %, 0,1 M) wurden 1 Äq. Ethyl-2-Cyano-3-Ethoxyacrylat (**18**) in einem Rundkolben gelöst und mit dem entsprechenden Phenylhydrazin-Hydrochlorid (1,05 – 1,5 Äq.) und NEt_3 (1,05 – 1,5 Äq.) oder K_2CO_3 (0,6 - 1 Äq.) versetzt. Die Lösung wurde 2 h refluxiert und nach dem Abkühlen auf RT auf Eiswasser gegeben. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, mit Eiswasser und kaltem MeOH gewaschen und getrocknet.

Allgemeine Synthesevorschrift **B**:

Das entsprechende Ethyl-5-Amino-Pyrazol-4-Carboxylat (1 Äq.) wurde in Formamid (0,1 – 0,5 M) in einem Mikrowellenvial gelöst und für 12 h in der Synthesemikrowelle bei 60 W und 160 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde die Suspension auf Eiswasser gegeben, der Feststoff abfiltriert, mehrmals mit Eiswasser und kaltem MeOH gewaschen und getrocknet.

Allgemeine Synthesevorschrift **C**:

Das entsprechende Pyrazolopyrimidinon (1 Äq.) wurde in $POCl_3$ (0,1 – 0,2 M) unter Schutzatmosphäre in einem Rundkolben suspendiert und 3 h refluxiert. Nachdem Abkühlen auf RT wurde die Reaktionslösung tropfenweise unter Rühren auf Eiswasser gegeben. Die Lösung wurde mit ges. Na_2CO_3-Lösung neutralisiert, der ausgefallene Feststoff abfiltriert und in MTBE gelöst. Die organische Phase wurde über einen Spritzenvorsatzfilter filtriert, anschließend mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt.

Allgemeine Synthesevorschrift **D**:

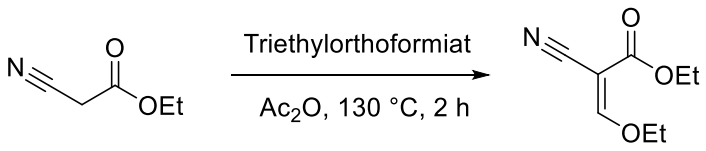
Das entsprechende Chlorpyrazolopyrimidin (1 Äq.) wurde in trockenem ACN (0,1 M) unter Schutzatmosphäre in einem Mikrowellenvial suspendiert, mit K_2CO_3 (1,5 - 2 Äq.) versetzt und nach Zugabe von Amin (2 Äq.) für 1 h in der Synthesemikrowelle bei 50 W und 90 °C erhitzt. Anschließend wurde die Suspension mit verd. NH_4Cl-Lösung versetzt und für 10 min gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und getrocknet. Das Rohprodukt wurde im Anschluss chromatographisch aufgereinigt.

Entsprechend der Literatur hergestellte Reagenzien:

- *N*-TMS-1-Aminobutan-2-ol: Simunkova N., Tobrman T., Eigner V., Dvorak D., *J. Heterocyclic Chem.* **2017**, *54*, 3565

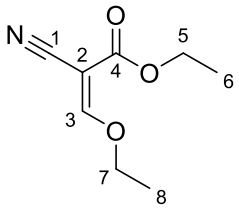
6.3.1 Derivate der 1. Generation

Synthese von Ethyl-2-Cyano-3-Ethoxyacrylat (18)



17 88 % (75 % Lit.) **18**

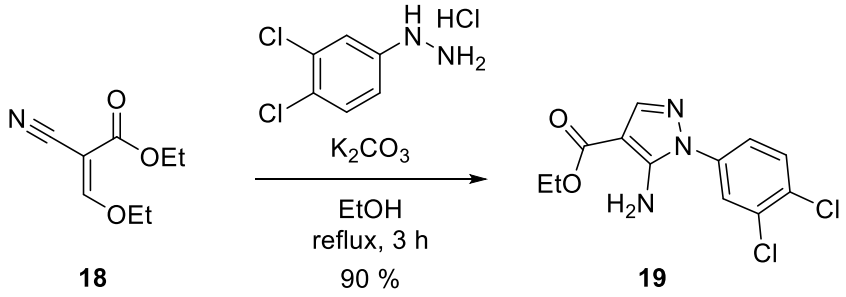
In einem Rundkolben wurden 1,25 ml Ethyl-2-Cyanoacetat (**17**) (1,3 g, 11,7 mmol, 1 Äq.) in 20 ml Ac_2O (0,6 M) unter Schutzatmosphäre gelöst und anschließend 2,9 ml Triethylorthoformiat (2,6 g, 17,6 mmol, 1,5 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 2 h bei 130 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel *in vacuo* entfernt, das erhaltene Öl wurde mit CyH gewaschen und danach getrocknet. Es wurden 1,75 g von Enolether **18** (10,4 mmol, 88 %) als nadelförmiger kristalliner Feststoff isoliert.



$C_8H_{11}NO_3$
169,18

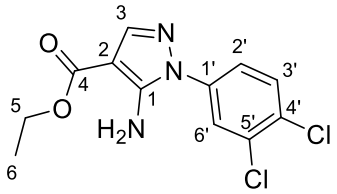
R_f = 0,38 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 170 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3402 (br), 3032 (m), 2993 (m), 2980 (m), 2942 (m), 2906 (m), 2877 (m), 2491 (w), 2226 (s), 1946 (w), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.02 (s, 1H, H-3) 4.35 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H, H-7), 4.28 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H, H-5), 1.45 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-6), 1.33 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 172.26 (d, C-3), 163.04 (s, C-4), 112.82 (s, C-1), 86.57 (s, C-2), 73.88 (t, C-7), 61.68 (t, C-5), 15.23 (q, C-8), 14.19 (q, C-6). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.[204]

Synthese von Ethyl-5-Amino-1-(3,4-Dichlorphenyl)-1*H*-Pyrazol-4-Carboxylat (19)



18 **19**

Entsprechend Synthesevorschrift **A** wurden 600 mg **18** (3,55 mmol, 1 Äq.) mit 795 mg 3,4-Dichlorphenylhydrazin-Hydrochlorid (3,73 mmol, 1,05 Äq.) und 294 mg K_2CO_3 (2,13 mmol) in 35 ml EtOH (0,1 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere Reinigung in der folgenden Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 960 mg von Pyrazol **19** (3,2 mmol, 90 %) als gelb-oranger Feststoff isoliert.

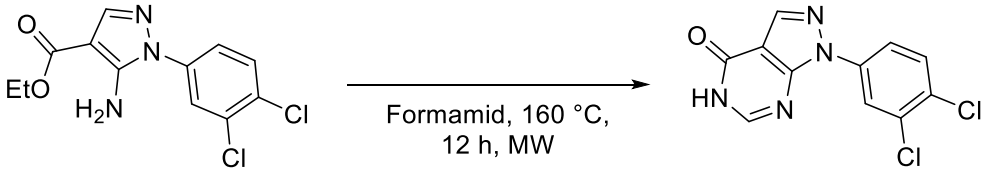


$C_{12}H_{11}Cl_2N_3O_2$
300,14

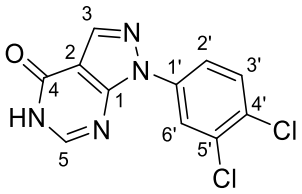
R_f = 0,56 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 300, 302 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 298, 296 $[M-H]^-$, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3367 (br), 3277 (m), 3094 (m), 3070 (m), 2994 (m), 2699 (m), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.78 (s, 1H, H-3), 7.72 (d, ^4J = 2.4 Hz, 1H, H-6‘), 7.58 (d, ^3J = 8.6 Hz, 1H, H-3‘), 7.44 (dd, ^3J = 8.6 Hz, ^4J = 2.4 Hz, 1H, H-2‘), 5.35 (s, 2H, –NH2) 4.31 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H, H-5), 1.37 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-6), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 164.43 (s, C-4), 149.18 (s, C-1), 141.26 (s, C-2), 137.00 (s, C-1‘),

133.88 (s, C-5‘), 132.11 (s, C-4‘), 131.39 (d, C-3‘), 125.44 (d, C-6‘), 122.50 (d, C-2‘), 96.76 (d, C-3), 59.91 (t, C-5), 14.52 (q, C-6).

Synthese von 1-(3,4-Dichlorphenyl)-1,5-Dihydro-4*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-on (22)



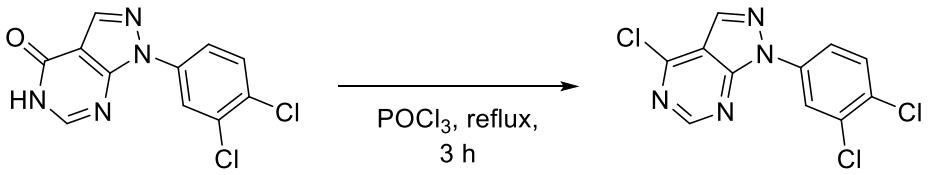
Entsprechend Synthesevorschrift **B** wurden 940 mg **19** (3,1 mmol) in 18 ml Formamid (0,18 M) in der Mikrowelle umgesetzt. Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere Reinigung in der folgenden Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 865 mg von Pyrazolopyrimidinon **22** (3,1 mmol, ~99 %) als beige-grauer schwerlöslicher Feststoff isoliert.



$C_{11}H_6Cl_2N_4O$
281,10

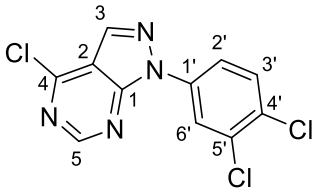
R$_f$ = 0,37 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI$^+$, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **MS** (ESI$^-$, 3,2 kV): m/z = 279, 281 [M-H]$^-$, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3361 (br), 3162 (m), 3105 (m), 2956 (s), 2853 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*6): δ [ppm] = 8.41 (d, ^4J = 2.5 Hz, 1H, H-6‘), 8.38 (s, 1H, H-5), 8.27 (s, 1H, H-3), 8.11 (dd, ^3J = 8.8 Hz, ^4J = 2.5 Hz, 1H, H-2‘), 7.83 (d, ^3J = 8.9 Hz, 1H, H-3‘), **^{13}C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*6): δ [ppm] = 157.61 (s, C-4), 152.81 (s, C-1), 149.94 (d, C-5), 138.40 (s, C-2), 137.25 (s, C-5‘), 132.05 (s, C-4‘), 131.78 (d, C-3‘), 129.56 (s, C-1‘), 122.89 (s, C-6‘), 121.50 (d, C-2‘), 108.49 (d, C-3).

Synthese von 4-Chlor-1-(3,4-Dichlorphenyl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin (23)



22 **23**

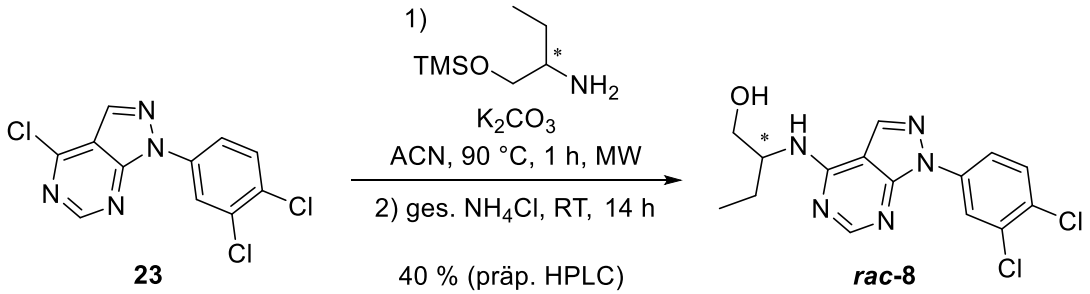
Entsprechend Synthesevorschrift **C** wurden 865 mg **22** (3,1 mmol) in 16 ml $POCl_3$ (0,2 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere Reinigung in der folgenden Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 885 mg von Pyrazolopyrimidin **23** (2,95 mmol, 95 %) als beiger Feststoff isoliert.



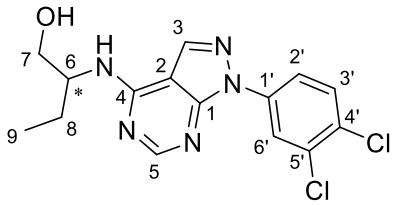
$C_{11}H_5Cl_3N_4$
299,54

R_f = 0,6 (CyH/EtOAc 3:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3105 (m), 3037 (m), 2955 (s), 2916 (s), 2848 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*6): δ [ppm] = 9.03 (s, 1H, H-5), 8.80 (s, 1H, H-3) 8.45 (d, ^4J = 2.6 Hz, 1H, H-6‘), 8.18 (dd, ^3J = 8.8 Hz, ^4J = 2.5 Hz, 1H, H-2‘), 7.86 (d, ^3J = 8.9 Hz, 1H, H-3‘), **^{13}C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*6): δ [ppm] = 156.22 (d, C-5), 154.83 (s, C-4), 153.36 (s, C-1), 137.93 (s, C-5‘), 135.32 (s, C-3), 132.24 (s, C-4‘), 131.95 (d, C-3‘), 129.77 (s, C-1‘), 122.44 (d, C-6‘), 121.04 (d, C-2‘), 115.51 (d, C-3).

Synthese von *rac*-2-((1-(3,4-Dichlorphenyl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-yl)Amino)Butan-1-ol (IMB0901, *rac*-8)



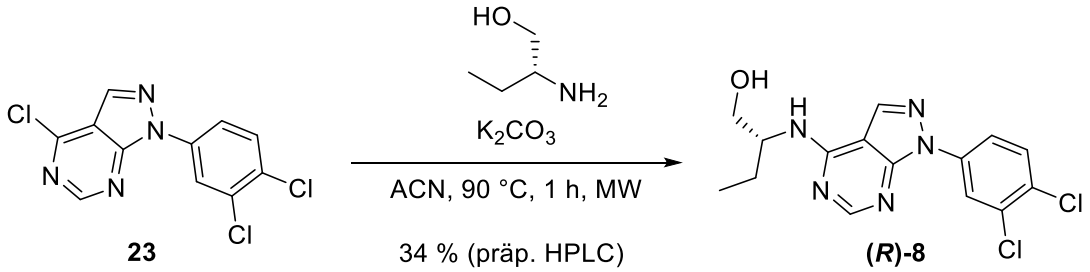
Entsprechend Synthesevorschrift **D** wurden 40 mg **23** (0,13 mmol) mit 31 mg *rac*-*O*-TMS-2-Aminobutanol (0,2 mmol, 1,5 Äq.) und 30 mg K_2CO_3 (0,2 mmol, 1,5 Äq.) in 1 ml ACN (0,1 M) umgesetzt. Nach 1 h in der Mikrowelle wurden 2 ml ges. wäss. NH_4Cl-Lösung hinzugegeben und die Reaktion für 14 h bei RT gerührt und anschließend entsprechend Vorschrift **D** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 18,3 mg von IMB0901 ***rac*-8** (0,05 mmol, 40 %) als weißer Feststoff isoliert.



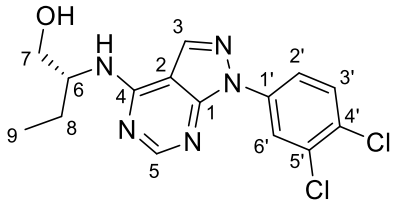
$C_{15}H_{15}Cl_2N_5O$
352,22

R_f = 0,4 (EtOAc), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 352, 354 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 349 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{15}H_{16}{}^{35}Cl_2N_5O^+$): 352,07264 gef.: 352,07240, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3311 (br), 3100 (m), 2965 (s), 2929 (s), 2877 (s), 1616 (s), 1591 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 8.44 (d, ^4J = 2.5 Hz, 1H, H-6'), 8.31 (s, 1H, H-5), 8.29 (s, 1H, H-3), 8.15 (dd, ^3J = 8.8 Hz, ^4J = 2.5 Hz, 1H, H-2'), 7.61 (d, ^3J = 8.9 Hz, 1H, H-3'), 4.34 (dt, ^2J = 10.8 Hz, ^3J = 5.4 Hz, 1H, H-6), 3.81 - 3.61 (m, 2H, H-7), 1.90 - 1.75 (m, 1H, H-8), 1.73 - 1.57 (m, 1H, H-8), 1.02 (t, ^3J = 7.4 Hz, 3H, H-9), **^{13}C-NMR** (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 158.68 (s, C-4), 157.63 (d, C-5), 154.55 (s), 139.97 (s, C-5'), 135.27 (d, C-3), 133.66 (s, C-4'), 131.85 (d, C-3'), 130.50 (s), 123.46 (d, C-6'), 121.43 (d, C-2'), 103.66 (s), 64.68 (t, C-7), 55.32 (d, C-6), 25.11 (t, C-8), 11.00 (q, C-9).

Synthese von *R*-2-((1-(3,4-Dichlorphenyl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-yl)Amino)Butan-1-ol ((*R*)-8)



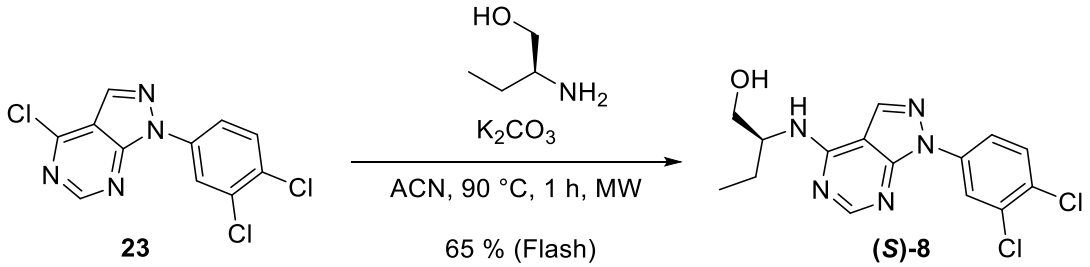
Entsprechend Synthesevorschrift **D** wurden 40 mg **23** (0,13 mmol) mit 33 µl *R*-2-Aminobutanol (0,2 mmol, 1,5 Äq.) und 30 mg K_2CO_3 (0,2 mmol, 1,5 Äq.) in 1 ml ACN (0,1 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 15,5 mg von Pyrazolopyrimidin **(*R*)-8** (0,044 mmol, 34 %) als weißer Feststoff isoliert.



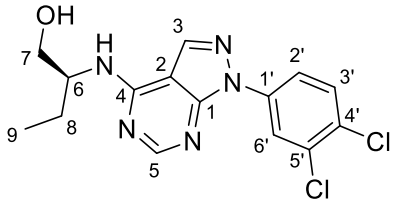
$C_{15}H_{15}Cl_2N_5O$
352,22

R_f = 0,4 (EtOAc), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 352, 354 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 349 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{15}H_{16}{}^{35}Cl_2N_5O^+$): 352,07264, gef.: 352,07290, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3309 (br), 3103 (w), 2965 (m), 2931 (m), 2877 (w), 1616 (s), 1591 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): 8.40 (m, 2H, H-5, H-6‘), 8.14 (dd, ^3J = 8.8 Hz, ^4J = 2.2 Hz, 1H, H-2‘), 8.06 (s, 1H, H-3), 7.54 (d, ^3J = 8.8 Hz, 1H, H-3‘), 4.30 (m, 1H, H-6), 3.92 (dd, ^2J = 11.1 Hz, ^3J = 3.1 Hz, 1H, H-7), 3,78 (dd, ^2J = 11.1 Hz, ^3J = 5.8 Hz, 1H, H-7), 1.77 (m, 2H, H-8), 1.0 (t, ^3J = 7.4 Hz, 3H, H-9), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 156.99 (s, C-4), 155.95 (d, C-5), 153.46 (s), 138.18 (s), 133.02 (s), 132.38 (d, C-3) 130.66 (d, C-6‘), 130.05 (s), 122.68 (d, C-2‘), 120.06 (d, C-3‘), 102,13 (s) 65.38 (t, C-7), 55.16 (d, C-6), 24.56 (t, C-8), 10.73 (q, C-9).

Synthese von *S*-2-((1-(3,4-Dichlorphenyl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-yl)Amino)Butan-1-ol ((*S*)-8)



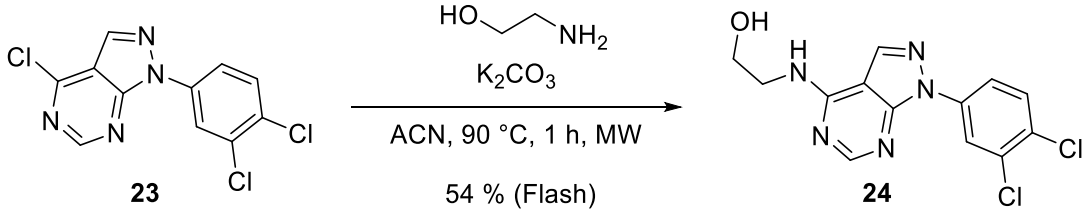
Entsprechend Synthesevorschrift **D** wurden 40 mg **23** (0,13 mmol) mit 33 µl *S*-2-Aminobutanol (0,2 mmol, 1,5 Äq.) und 42 mg K_2CO_3 (0,3 mmol, 2 Äq.) in 1 ml ACN (0,1 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie gereinigt (CyH/EtOAc: 0 % B – 100 % B). Es wurden 30 mg von Pyrazolopyrimidin **(*S*)-8** (0,085 mmol, 65 %) als weißer Feststoff isoliert.



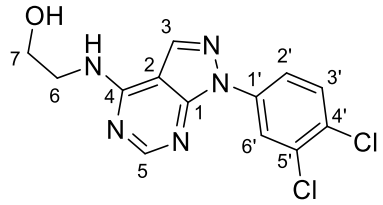
$C_{15}H_{15}Cl_2N_5O$
352,22

R_f = 0,4 (EtOAc), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 352, 354 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 349 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{15}H_{16}{}^{35}Cl_2N_5O^+$): 352,07264, gef.: 352,07284, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3308 (br), 3103 (w), 2965 (m), 2931 (m), 2877 (w), 1616 (s), 1591 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.40 (m, 2H, H-5, H-6‘), 8.14 (dd, ^3J = 8.8 Hz, ^4J = 2.2 Hz, 1H, H-2‘), 8.06 (s, 1H, H-3), 7.54 (d, ^3J = 8.8 Hz, 1H, H-3‘), 4.30 (m, 1H, H-6), 3.92 (dd, ^2J = 11.1 Hz, ^3J = 3.1 Hz, 1H, H-7), 3,78 (dd, ^2J = 11.1 Hz, ^3J = 5.8 Hz, 1H, H-7), 1.77 (m, 2H, H-8), 1.0 (t, ^3J = 7.4 Hz, 3H, H-9). **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 157.09 (s, C-4), 155.97 (d, C-5), 153.78 (s), 138.17 (s), 132.98 (s), 132.82 (d, C-3) 130.70 (d, C-6‘), 130.43 (s), 122.75 (d, C-2‘), 120.12 (d, C-3‘), 102.24 (s) 65.47 (t, C-7), 55.12 (d, C-6), 24.59 (t, C-8), 10.73 (q, C-9).

Synthese von 2-((1-(3,4-Dichlorphenyl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-yl)Amino)Ethan-1-ol (24)



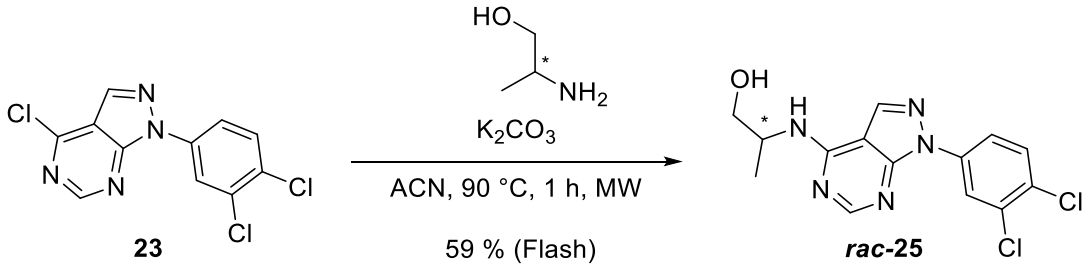
Entsprechend Synthesevorschrift **D** wurden 30 mg **23** (0,1 mmol) mit 12 µl 2-Aminoethanol (0,2 mmol, 2 Äq.) und 15 mg K_2CO_3 (0,1 mmol, 1 Äq.) in 1 ml ACN (0,1 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie gereinigt (CyH/EtOAc: 0 % B – 100 % B). Es wurden 17,5 mg von Pyrazolopyrimidin **24** (0,054 mmol, 54 %) als weißer Feststoff isoliert.



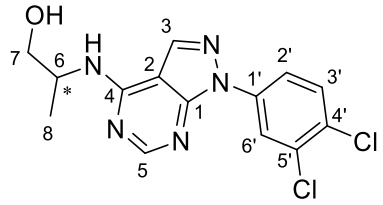
$C_{13}H_{11}Cl_2N_5O$
324,17

R_f = 0,23 (EtOAc), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 324, 326 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{13}H_{12}{}^{35}Cl_2N_5O^+$): 324,04134, gef.: 324,04157, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 2989 (m), 2909 (m), 2178 (s), 1992 (m), **^{1}H-NMR** (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 8.47 (d, ^4J = 2.4 Hz, 1H, H-6‘), 8.34 (s, 1H, H-5), 8.25 (s, 1H, H-3), 8.18 (dd, ^3J = 8.8 Hz, ^4J = 2.4 Hz, 1H, H-2‘), 7.63 (d, ^3J = 8.8 Hz, 1H, H-3‘), 3.80 (t, ^3J = 5.6 Hz, 2H, H-6), 3.72 (t, ^3J = 5.5 Hz, 2H, H-7),**^{13}C-NMR** (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 158.46 (s, C-4), 157.60 (d, C-5), 153.69 (s), 139.95 (s), 135.43 (d, C-3), 133.80 (s), 131.94 (d, C-3‘), 130.65 (s), 123.55 (d, C-6‘), 121.53 (d, C-2‘), 104.09 (s), 61.56 (t, C-7), 44.35 (t, C-6),

Synthese von *rac*-2-((1-(3,4-Dichlorphenyl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-yl)Amino)-Propan-1-ol (*rac*-25)



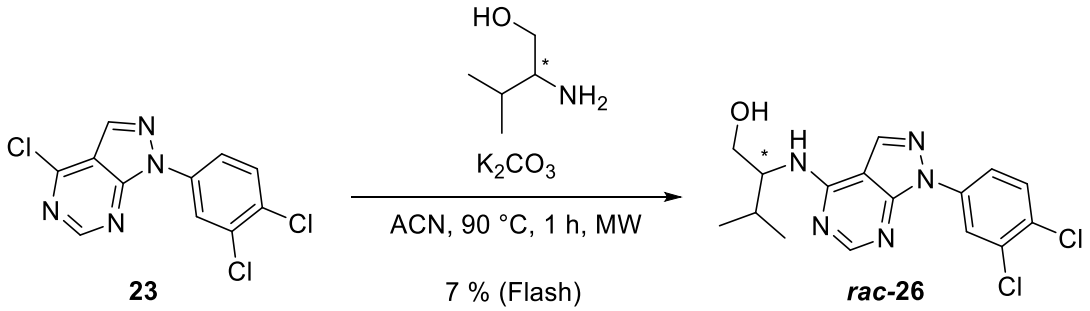
Entsprechend Synthesevorschrift **D** wurden 40 mg **23** (0,13 mmol) mit 20 µl *rac*-2-Aminopropanol (0,2 mmol, 1,5 Äq.) und 42 mg K_2CO_3 (0,3 mmol, 2 Äq.) in 1 ml ACN (0,1 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie gereinigt (CyH/EtOAc: 0 % B – 100 % B). Es wurden 36 mg von Pyrazolopyrimidin ***rac*-25** (0,077 mmol, 59 %) als weißer Feststoff isoliert.



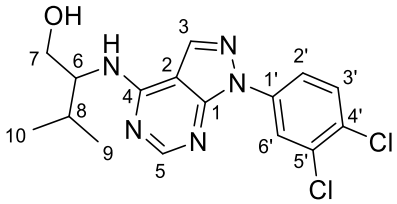
$C_{14}H_{13}Cl_2N_5O$
338,19

R_f = 0,35 (EtOAc), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 338, 340 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 336, 338 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{14}H_{14}{}^{35}Cl_2N_5O^+$): 338,05699 gef.: 338,05668, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3285 (br), 3100 (w), 2930 (m), 1780 (w), 1662 (m), 1620 (s), 1590 (s), 1530 (m). **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d6*): δ [ppm] = 8.59 (d, ^4J = 2.5 Hz, 1H, H-6‘), 8.52 (s, 1H, H- 5), 8.43 (s, 1H, H-3), 8.27 (dd, ^3J = 8.9 Hz, ^4J = 2.5 Hz, 1H, H-2‘), 7.83 (d, ^3J = 8.9 Hz, 1H, H-3‘), 4.40 (m, 1H, H-6), 3.55 (m, 2H, H-7 unter dem H_2O Peak), 1.23 (d, ^3J = 6.6 Hz, 3H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d6*): δ [ppm] = 157.64 (s, C-4), 156.88 (d, C-5), 153.68 (s), 139.14 (s), 135.50 (d, C-3), 132.01 (d, C-3‘), 131.73 (s), 128.37 (s), 121.75 (d, C-6‘), 120.38 (d, C-2‘), 102.48 (s), 64.51 (t, C-7), 48.50 (d, C-6), 17.41 (q, C-8).

Synthese von *rac*-2-((1-(3,4-Dichlorphenyl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-yl)Amino)-3-Methyl-Butan-1-ol (*rac*-26)



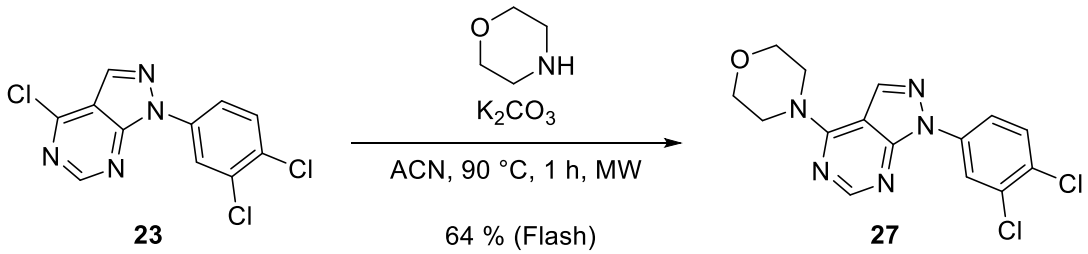
Entsprechend Synthesevorschrift **D** wurden 27 mg **23** (0,9 mmol) mit 15 mg ***rac***-Valinol (0,135 mmol, 1,5 Äq.) und 19 mg K_2CO_3 (0,135 mmol, 1,5 Äq.) in 1 ml ACN (0,1 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 2,4 mg von Pyrazolopyrimidin ***rac*-26** (0,0063 mmol, 7 %) als weißer Feststoff isoliert.



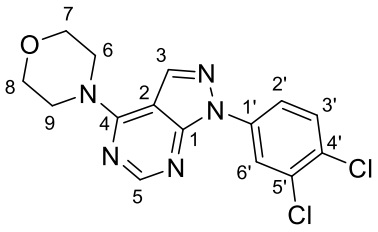
$C_{16}H_{17}Cl_2N_5O$
366,25

R_f = 0,37 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 366, 368 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 364, 366 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{16}H_{18}{}^{35}Cl_2N_5O^+$): 366,08829 gef.: 366,08857, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3294 (m), 2961 (m), 2926 (m), 1770 (w), 1758 (w), 1617 (s), 1592 (s), 1468 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 8.49 (d, ^4J = 2.5 Hz, 1H, H-6‘), 8.42 (s, 1H, H-5), 8.35 (dd, ^3J = 8.9, ^4J = 2.5 Hz, 1H, H-2‘), 7.68 (d, ^3J = 8.8 Hz, 1H, H-3‘), 4.25 (td, ^3J = 6.6, 3.8 Hz, 1H, H-6), 3.82 (dd, ^2J = 11.5, ^3J = 3.9 Hz, 1H, H-7), 3.74 (dd, ^2J = 11.4 Hz, ^3J = 6.6 Hz, 1H, H-7), 2.13 – 2.02 (m, 1H, H-8), 1.04 (dd, ^2J = 11.1, ^3J = 6.8 Hz, 6H, H-9, H-10), **^{13}C-NMR** (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 1558.33 (s, C-4), 156.70 (d, C-5), 154.81 (s), 139.58 (s), 135.65 (d, C-3), 134.31 (s), 132.00 (d, C-3‘), 129.68 (s), 123.75 (d, C-6‘), 121.73 (d, C-2‘), 103.39 (s), 63.03 (t, C-7), 59.68 (d, C-6), 30.38 (d, C-8), 19.86 (q, C-9/10), 19.52 (q, C-9/10).

Synthese von 1-(1-(3,4-Dichlorphenyl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-yl)Morpholin (27)



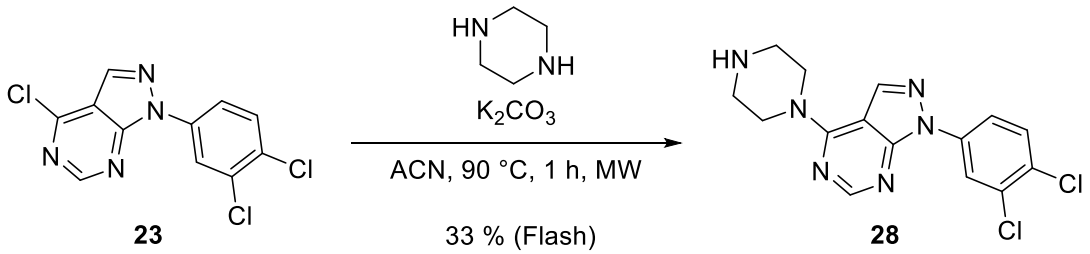
Entsprechend Synthesevorschrift **D** wurden 30 mg **23** (0,1 mmol) mit 20 µl Morpholin (0,23 mmol, 2,3 Äq.) und 15 mg K_2CO_3 (0,1 mmol, 1 Äq.) in 1 ml ACN (0,1 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie gereinigt (CyH/EtOAc: 0 % B – 100 % B). Es wurden 22,5 mg von Pyrazolopyrimidin **27** (0,064 mmol, 64 %) als weißer Feststoff isoliert.



$C_{15}H_{13}Cl_2N_5O$
350,20

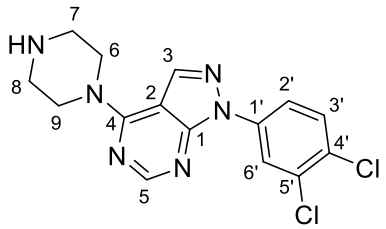
R_f = 0,35 (CyH/EtOAc 3:2), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 350, 352 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert$^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{15}H_{14}{}^{35}Cl_2N_5O^+$): 350,05699 gef.: 350,05679, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3315 (br), 3115 (m), 3032 (s), 2976 (m), 2898 (s), 2854 (s) **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.46 (s, 1H, H-5), 8.45 (d, ^4J = 2.4 Hz, 1H, H-6‘), 8.19 (dd, ^3J = 8.9 Hz, ^4J = 2.5 Hz, 1H, H-2‘), 8.10 (s, 1H, H-3), 7.50 (d, ^3J = 8.8 Hz, 1H, H-3‘), 4.05 - 3.98 (m, 4H, H-6/9), 3.93 - 3.86 (m, 4H, H-7/8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 157.31 (s, C-4), 155.78 (d, C-5), 154.82 (s), 138.36 (s), 134.29 (d, C-3), 133.08 (s), 130.73 (s), 130.09 (d, C-3‘), 123.07 (d, C-6‘), 120.47 (d, C-2‘), 101.98 (s), 66.59 (t, C-7/8), 45.66 (t, C-6/9).

Synthese von 1-(3,4-Dichlorphenyl)-4-(Piperazin-1-yl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin (28)



23 **28**

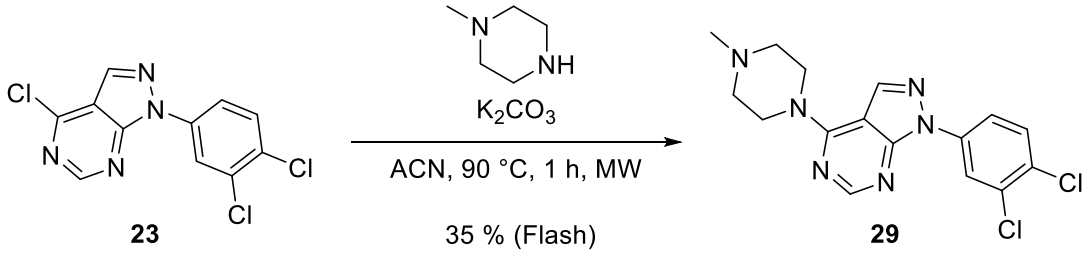
Entsprechend Synthesevorschrift **D** wurden 20 mg **23** (0,067 mmol) mit 255 mg Piperazin (2,96 mmol, 44 Äq.) und 15 mg K_2CO_3 (0,1 mmol, 1,6 Äq.) in 2 ml ACN (0,03 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie gereinigt (CyH/EtOAc: 0 % B – 100 % B). Es wurden 7,9 mg von Pyrazolopyrimidin **28** (0,02 mmol, 33 %) als weißer Feststoff isoliert.



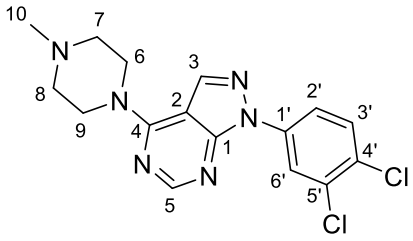
$C_{15}H_{14}Cl_2N_6$
349,22

R_f = 0,26 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 349, 351 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{15}H_{15}{}^{35}Cl_2N_6{}^+$): 349,07297 gef.: 349,07337, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3084 (w), 2916 (m), 2850 (m), 1582 (s), 1565 (s), 1543 (m), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.46 (d, ^4J = 2.4 Hz, 1H, H-6‘), 8.45 (s, 1H, H-5), 8.19 (dd, ^3J = 8.9, ^4J = 2.5 Hz, 1H, H-2‘), 8.11 (s, 1H, H-3), 7.55 (d, ^3J = 8.8 Hz, 1H, H-3‘), 4.04 – 3.97 (m, 4H, H-6/9), 3.09 – 3.03 (m, 4H, H-7/8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 157.23 (s, C-4), 155.84 (d, C-5), 154.87 (s), 138.44 (s), 134.58 (d, C-3), 133.06 (s), 130.72 (s), 130.00 (d, C-3‘), 123.09 (d, C-6‘), 120.50 (d, C-2‘), 101.96 (s), 46.01 (t, C-7/8), 29.83 (t, C6/9).

Synthese von 1-(3,4-Dichlorphenyl)-4-(4-Methylpiperazin-1-yl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin (29)



Entsprechend Synthesevorschrift **D** wurden 40 mg **23** (0,13 mmol) mit 29 µl *N*-Methyl-Piperazin (0,26 mmol, 2 Äq.) und 36 mg K_2CO_3 (0,26 mmol, 2 Äq.) in 1 ml ACN (0,1 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie gereinigt (CyH/EtOAc: 0% B – 100 % B). Es wurden 16,5 mg von Pyrazolopyrimidin **29** (0,045 mmol, 35 %) als weißer Feststoff isoliert.

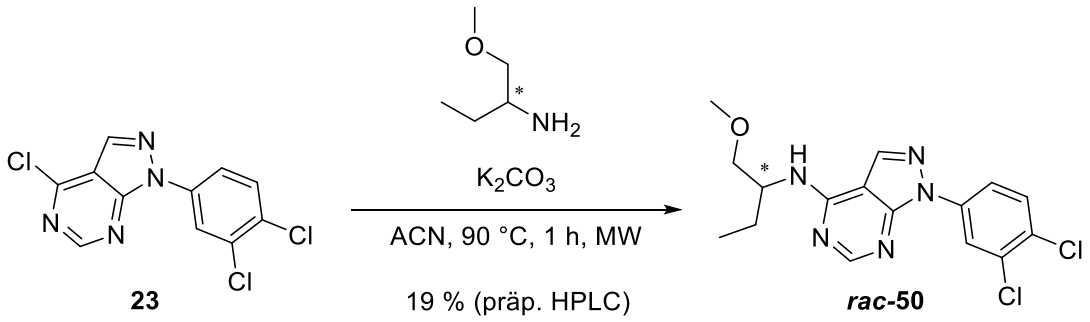


$C_{16}H_{16}Cl_2N_6$
363,25

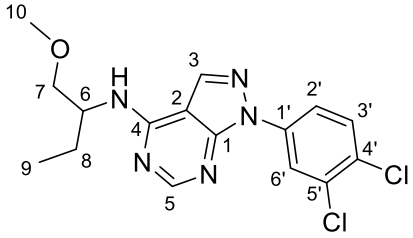
R_f = 0,07 (CH_2Cl_2/MeOH 95:5), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 363, 365 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{16}H_{17}{}^{35}Cl_2N_6^+$): 363,08862 gef.: 363,08837, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3385 (br), 3100 (w), 2939 (w), 2848 (w), 2769 (w), 1576 (s), 1566 (s), 1485 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.51 – 8.41 (m, 2H, H-5, H-6‘), 8.19 (dd, ^3J = 8.8, ^4J = 2.5 Hz, 1H, H-2‘), 8.11 (s, 1H, H-3), 7.55 (d, ^3J = 8.8 Hz, 1H, H-3‘), 4.05 (t, ^3J = 5.2 Hz, 4H, H-6/9), 2.61 (t, ^3J = 5.1 Hz, 4H, H-7/8), 2.40 (s, 3H, H-10). **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 156.97 (s, C-4), 155.72 (d, C-5), 154.75 (s), 138.32 (s), 134.39 (d, C-3), 132.95 (s), 130.60 (d, C-3‘) 129.90 (s), 122.96 (d, C-6‘), 120.36 (d, C2‘), 101.88 (s), 54.61 (t, C-6/9), 46.05 (q, C-10), 45.22 (t, C-7/8).

6.3.2 Derivate der 2. Generation

Synthese von *rac*-1-(3,4-Dichlorphenyl)-*N*-(1-Methoxybutan-2-yl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-Amin (*rac*-50)



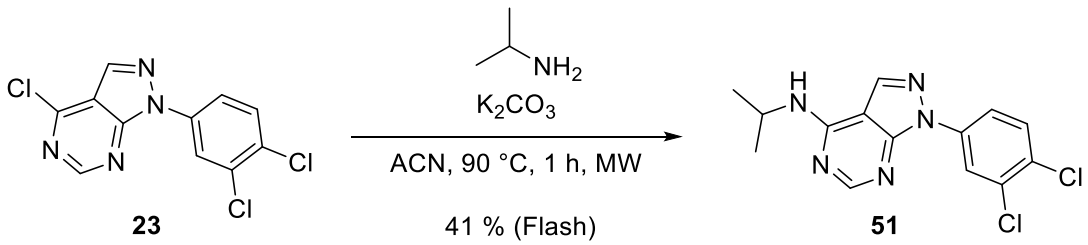
Entsprechend Synthesevorschrift **D** wurden 40 mg **23** (0,13 mmol) mit 28 µl ***rac*-1-**Methoxybutan-2-Amin (0,26 mmol, 2 Äq.) und 36 mg K_2CO_3 (0,26 mmol, 2 Äq.) in 1 ml ACN (0,1 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 9 mg von Pyrazolopyrimidin ***rac*-50** (0,025 mmol, 19 %) als weißer Feststoff isoliert.



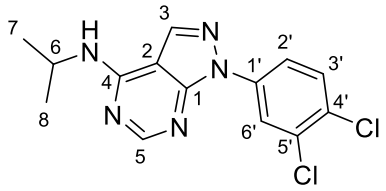
$C_{16}H_{17}Cl_2N_5O$
366,25

R_f = 0,73 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 366, 368 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 364, 366 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{16}H_{17}{}^{35}Cl_2N_5O^+$): 366,08829 gef.: 366,08799, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3322 (br), 3099 (w), 3033 (w), 2696 (m), 2928 (m), 1613 (s), 1592 (s), 1490 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d_6*): δ [ppm] = 8.59 (s, 1H, H-5), 8.52 (s, 1H, H-3), 8.44 – 8.39 (m, 1H, NH), 8.38 – 8.32 (m, 1H, H-6‘), 8.30 – 8.23 (m, 1H, H-2‘), 7.86 – 7.78 (m, 1H, H-3‘), 4.54 – 4.40 (m, 1H, H-6), 3.70 – 3.40 (m, 2H, H-7), 3.29 (s, 3H, H-10), 1.79 – 1.66 (m, 1H, H-8), 1.63 – 1.50 (m, 1H, H-8), 0.92 (t, ^3J = 7.0 Hz, 3H, H-9), **^{13}C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d_6*): δ [ppm] = 157.28 (d, C-5), 157.12 (s, C-4), 153.83 (s), 139.18 (s), 135.35 (d, C-3), 134.19 (s), 131.99 (s), 131.69 (d, C-3‘), 128.31 (s), 121.73 (d, C-6‘), 120.36 (d, C-2‘), 102.40 (s), 73.98 (t, C-7), 58.76 (q, C-10), 51.45 (d, C-6), 24.50 (t, C-8), 10.98 (q, C-9).

Synthese von 1-(3,4-Dichlorphenyl)-*N*-Isopropyl-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-Amin (51)



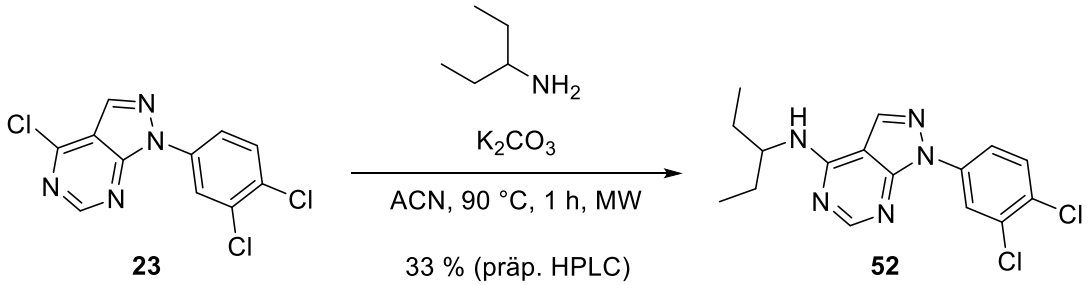
Entsprechend Synthesevorschrift **D** wurden 30 mg **23** (0,1 mmol) mit 170 µl *i*-Propylamin (0,2 mmol, 2 Äq.) und 18 mg K_2CO_3 (0,13 mmol, 1,3 Äq.) in 1 ml ACN (0,1 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie gereinigt (CyH/EtOAc: 0 % B – 100 % B). Es wurden 13,4 mg von Pyrazolopyrimidin **51** (0,041 mmol, 41 %) als weißer Feststoff isoliert.



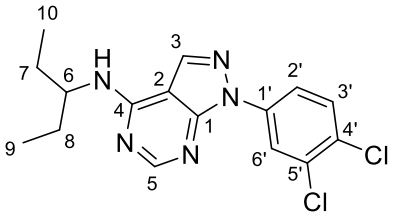
$C_{14}H_{13}Cl_2N_5$
322,19

R_f = 0,72 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 322, 324 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 320 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{14}H_{14}{}^{35}Cl_2N_5{}^+$): 322,06207 gef.: 322,06226, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3445 (br), 3226 (m), 3094 (m), 2973 (s), 2928 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.50 – 8.41 (m, 2H, H-5, H-6‘), 8.20 (dd, ^3J = 8.8, ^4J = 2.5 Hz, 1H, H-2‘), 8.04 (s, 1H, H-3), 7.56 (d, ^3J = 8.8 Hz, 1H, H-3‘), 1.90 – 1.81 (m, 1H, H-6), 1.38 (d, ^3J = 6.5 Hz, 6H, H-7/8).**^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 156.66 (d, C-5), 154.40 (s, C-4), 138.52 (s), 133.13 (s), 131.83 (d, C-3), 130.78 (d, C-3‘), 129.98 (s), 122.82 (d, C-6‘), 120.20 (d, C-2‘), 102.24 (s), 43.45 (d, C-6), 23.07 (q, C-7/8).

Synthese von 1-(3,4-Dichlorphenyl)-*N*-(Pentan-3-yl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-Amin (52)



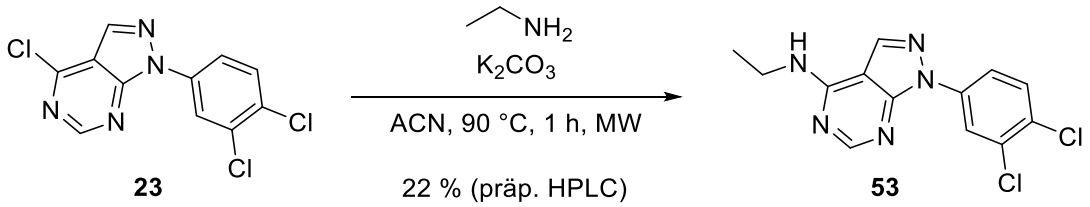
Entsprechend Synthesevorschrift **D** wurden 40 mg **23** (0,13 mmol) mit 30 µl *i*-Pentylamin (0,26 mmol, 2 Äq.) und 36 mg K_2CO_3 (0,26 mmol, 2 Äq.) in 1 ml ACN (0,1 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 15 mg von Pyrazolopyrimidin **52** (0,043 mmol, 33 %) als weißer Feststoff isoliert.



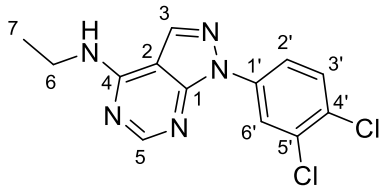
$C_{16}H_{17}Cl_2N_5$
350,25

R_f = 0,84 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 350, 352 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 348, 350 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{16}H_{17}{}^{35}Cl_2N_5{}^+$): 350,09337 gef.: 350,09306, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3283 (br), 3101 (w), 2965 (m), 2931 (m), 2875 (w), 1613 (s), 1591 (s), 1485 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.45 (d, ^3J = 2.5 Hz, 1H, H-6‘), 8,49 – 8,40 (m, 1H, H-5), 8.20 (dd, ^3J = 8.8 Hz, ^4J = 2.5 Hz, 1H, H-2‘), 8.06 (s, 1H, H-3), 7.55 (d, ^3J = 8.8 Hz, 1H, H-3‘), 5.21 – 4.93 (m, 0.5H, H-6 Rotamer) 4.52 – 4.26 (m, 0.5 H, H-6, Rotamer) 1.84 – 1.70 (m, 2H, H-7/8), 1.68 – 1,54 (m, 2H, H-7/8), 1.00 (q, ^3J = 7.5, 5.3 Hz, 6H, H-9/10). **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 156.98 (d, C-3), 153.85 (s, C-4), 138.38 (s), 133.02 (s), 132.10 (d, C-3), 130.67 (d, C-3‘), 129.80 (s), 122.76 (d, C-6‘), 120.13 (d, C-2‘), 101.91 (s), 57.23 (d, C-6), 27.37 (t, C-6/7), 10.21 (q, C-9/10).

Synthese von 1-(3,4-Dichlorphenyl)-*N*-Ethyl-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-Amin (53)



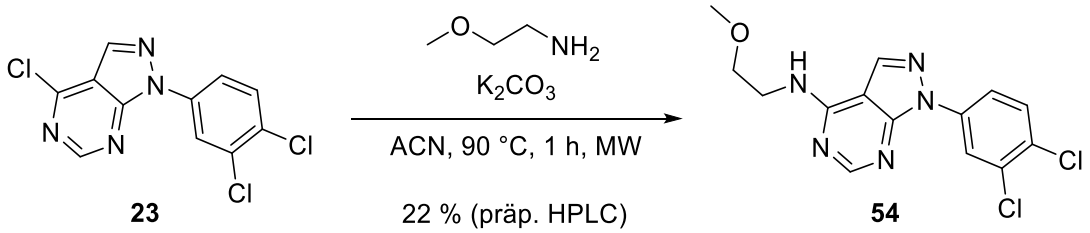
Entsprechend Synthesevorschrift **D** wurden 40 mg **23** (0,13 mmol) mit 130 µl Ethylamin (2 M in MeOH, 0,26 mmol, 2 Äq.) und 36 mg K_2CO_3 (0,26 mmol, 2 Äq.) in 1 ml ACN (0,1 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 9 mg von Pyrazolopyrimidin **53** (0,029 mmol, 22 %) als weißer Feststoff isoliert.



$C_{13}H_{11}Cl_2N_5$
308,17

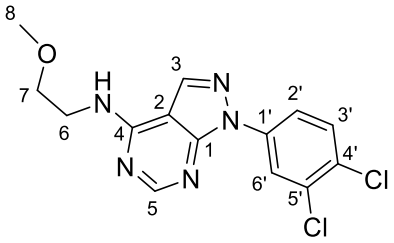
R_f = 0,63 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 308, 310 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 306, 308 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{13}H_{12}{}^{35}Cl_2N_5{}^+$): 308,04642 gef.: 308,04666, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3227 (br), 3108 (w), 2981 (w), 2924 (m), 2870 (w), 1600 (s), 1576 (s), 1488 (s)1461 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 8.60 – 8.56 (m, 2H, H-5, NH), 8.44 – 8.40 (m, 2H, H-3, H-6‘), 8.26 (dd, ^3J = 8.9 Hz, ^4J = 2.5 Hz, 1H, H-2‘), 7.81 (d, ^3J = 8.9 Hz, 1H, H-3‘), 3.56 (qd, ^3J = 7.2, 5.3 Hz, 2H, H-6), 1.24 (t, ^3J = 7.2 Hz, 3H, H-7). **^{13}C-NMR** (101 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 157.29 (d, C-5), 156.69 (s), 153.68 (s), 139.16 (s), 135.15 (d, C-3), 131.98 (s), 131.68 (d, C-3‘), 128.30 (s), 121.65 (d, C-6‘), 120.28 (d, C-2‘), 102.43 (s), 35.44 (t, C-6), 14.86 (q, C-7).

Synthese von 1-(3,4-Dichlorphenyl)-*N*-(2-Methoxyethyl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-Amin (54)



23 **54**

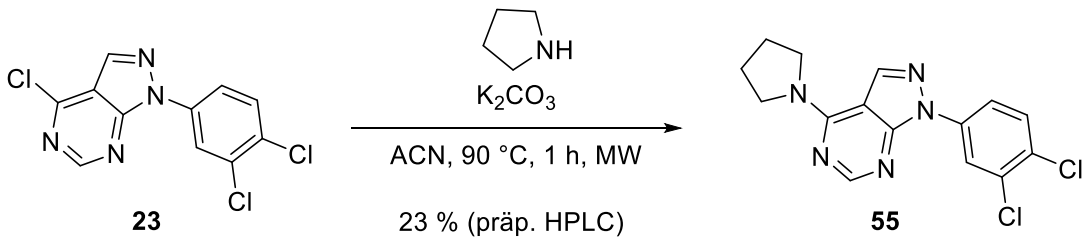
Entsprechend Synthesevorschrift **D** wurden 40 mg **23** (0,13 mmol) mit 22 µl 1-Methoxyethylamin (0,2 mmol, 1,5 Äq.) und 36 mg K_2CO_3 (0,26 mmol, 2 Äq.) in 1 ml ACN (0,1 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 9,5 mg von Pyrazolopyrimidin **54** (0,028 mmol, 22 %) als weißer Feststoff isoliert.



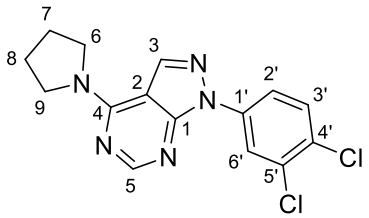
$C_{14}H_{13}Cl_2N_5O$
338,19

R_f = 0,46 (EtOAc), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 338, 340 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 336, 338 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{14}H_{14}{}^{35}Cl_2N_5O^+$): 338,05699 gef.: 338,05730, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3315 (br), 3100 (w), 2923 (m), 2854 (m), 1592 (s), 1582 (s), 1533 (m), **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*6): δ [ppm] = 8.79 – 8.72 (m, 1H, NH), 8.61 (d, ^4J = 2.5 Hz, 1H, H-6'), 8.51 (s, 1H, H-3), 8.45 (s, 1H, H-5), 8.28 (dd, ^3J = 8.9 Hz, ^4J = 2.6 Hz, 1H, H-2'), 7.84 (d, ^3J = 8.9 Hz, 1H, H-6'), 3.77 – 3.70 (m, 2H, H-6), 3.62 – 3.55 (m, 2H, H-7), 3.33 (s, 3H, H-8). **^{13}C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*6): δ [ppm] = 157.11 (d, C-5), 156.90 (s), 153.68 (s), 139.12 (s), 135.32 (d, C-3), 132.00 (s), 131.71 (d, C-3'), 128.37 (s), 121.73 (d, C-6'), 120.36 (d, C-2'), 102.51 (s), 70.75 (t, C-7), 58.49 (q, C-8), 40.38 (t, C-6, Peak unter dem DMSO-Signal).

Synthese von 1-(3,4-Dichlorphenyl)-4-(Pyrrolidin-1-yl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin (55)



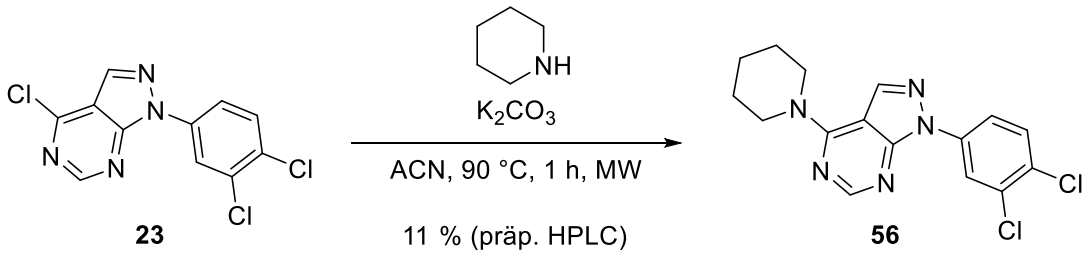
Entsprechend Synthesevorschrift **D** wurden 40 mg **23** (0,13 mmol) mit 22 µl Pyrrolidin (0,26 mmol, 2 Äq.) und 36 mg K_2CO_3 (0,26 mmol, 2 Äq.) in 1 ml ACN (0,1 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 10 mg von Pyrazolopyrimidin **55** (0,03 mmol, 23 %) als weißer Feststoff isoliert.



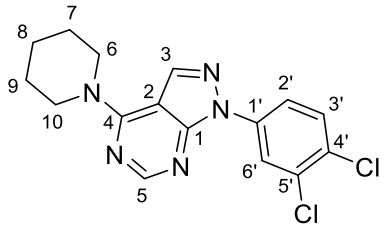
$C_{15}H_{13}Cl_2N_5$
334,20

R_f = 0,6 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 334, 336 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{15}H_{14}{}^{35}Cl_2N_5^+$): 334,06207 gef.: 334,06178, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3385 (br), 2974 (m), 2875 (w), 1655 (m), 1591 (s), 1572 (m), 1548 (m), 1522 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): 8.47 (d, ^4J = 2.5 Hz, 1H, H-6‘), 8.45 (s, 1H, H-5), 8.21 (dd, ^3J = 8.8 Hz, ^4J = 2.5 Hz, 1H, H-2‘), 8.08 (s, 1H, H-3), 7.54 (d, ^3J = 8.9 Hz, 1H, H-3‘), 3.83 (t, ^3J = 6.8 Hz, 4H, H-6/9), 2.27 – 2.17 (m, 2H, H-7/8), 2.11 – 2.01 (m, 2H, H-7/8).δ [ppm] =, **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 156.05 (d, C-5), 154.04 (s, C-4), 138.48 (s), 134.82 (d, C-3), 132.95 (s), 130.60 (d, C-3‘), 129.71 (s), 122.75 (d, C-6‘), 120.15 (d, C-2‘), 102.65 (s), 48.60 (t, C-6/9), 47.93 (t, C-6/9), 26.05 (t, C-7/8), 24.51 (t, C-7/8).

Synthese von 1-(3,4-Dichlorphenyl)-4-(Piperidin-1-yl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin (56)



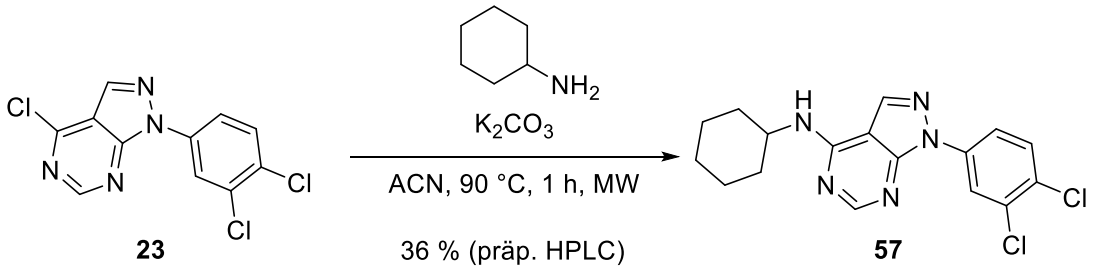
Entsprechend Synthesevorschrift **D** wurden 40 mg **23** (0,13 mmol) mit 26 µl Piperidin (0,26 mmol, 2 Äq.) und 36 mg K_2CO_3 (0,26 mmol, 2 Äq.) in 1 ml ACN (0,1 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 5,1 mg von Pyrazolopyrimidin **56** (0,014 mmol, 11 %) als weißer Feststoff isoliert.



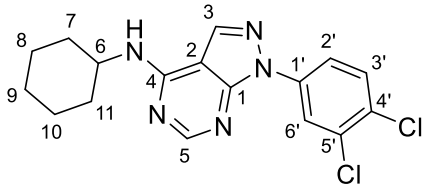
$C_{16}H_{15}Cl_2N_5$
348,23

R_f = 0,8 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 348, 350 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{16}H_{16}{}^{35}Cl_2N_5{}^+$): 348,07772 gef.: 348,07747, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3096 (w), 2924 (m), 2853 (m), 1581 (s), 1566 (s), 1515 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.45 (d, ^4J = 2.5 Hz, 1H, H-6‘), 8.44 (s, 1H, H-5), 8.19 (dd, ^3J = 8.8 Hz, ^4J = 2.5 Hz, 1H, H-2‘), 8.12 (s, 1H, H-3), 7.56 (d, ^3J = 8.8 Hz, 1H, H-3‘), 3.97 (t, ^3J = 5.1 Hz, 4H, H-6/10), 1.78 (q, ^3J = 5.7, 4.9 Hz, 6H, H-7/8/9). **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 155.48 (d, C-5), 154.92 (s), 138.38 (s), 134.75 (d, C-3), 132.97 (s), 130.61 (d, C-3‘), 129.91 (s), 129.33 (s), 123.05 (d, C-6‘), 120.44 (d, C-2‘), 101.76 (s), 47.36 (t, C-6/10), 25.72 (t, C-7/9), 24.35 (t, C-8).

Synthese von *N*-Cyclohexyl-1-(3,4-Dichlorphenyl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-Amin (57)



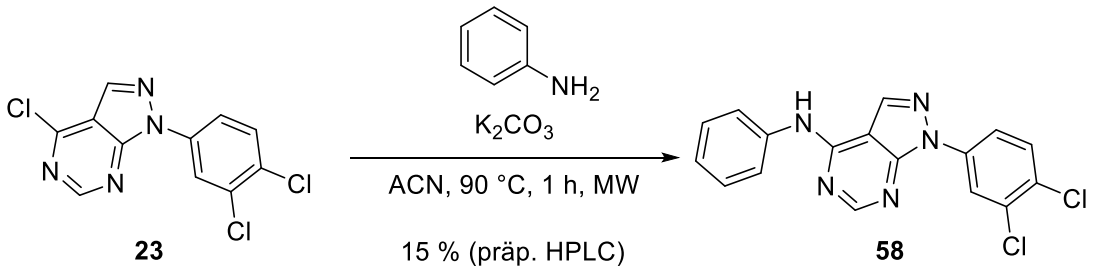
Entsprechend Synthesevorschrift **D** wurden 40 mg **23** (0,13 mmol) mit 30 µl Cyclohexylamin (0, 26mmol, 2 Äq.) und 36 mg K_2CO_3 (0,26 mmol, 2 Äq.) in 1 ml ACN (0,1 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 17 mg von Pyrazolopyrimidin **57** (0,047 mmol, 36 %) als weißer Feststoff isoliert.



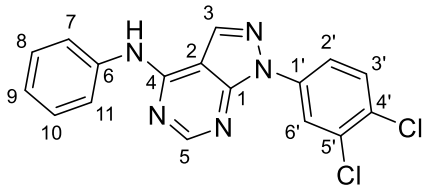
$C_{17}H_{17}Cl_2N_5$
362,26

R_f = 0,8 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 362, 364 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 360, 362 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{17}H_{18}{}^{35}Cl_2N_5{}^+$): 362,09337 gef.: 362,09304, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3281 (br), 2928 (s), 2852 (m), 1613 (s), 1591 (s), 1524 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d_6*): δ [ppm] = 8.58 (s, 1H, H-5‘), 8.48 (s, 1H, H-3‘), 8.46 – 8.39 (m, 2H), 8.28 – 8.22 (m, 1H), 7.85 – 7.76 (m, 1H), 4.30 – 3.95 (m, 1H, H-6), 2.08 – 1.95 (m, 2H), 1.85 – 1.75 (m, 2H), 1.70 – 1.60 (m, 1H), 1.44 – 1.29 (m, 4H), 1.27 – 1.14 (m, 2H). **^{13}C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d_6*): δ [ppm] = 156.97 (d, C-5), 155.81 (s), 153.70 (s), 139.13 (s), 135.37 (d, C-3), 131.98 (s), 131.68 (d, C-3‘), 128.33 (s), 121.70 (d, C-6‘), 120.32 (d, C-2‘), 102.34 (s), 49.66 (d, C-6), 32.73 (t), 25.68 (t, C-9), 25.24 (t).

Synthese von 1-(3,4-Dichlorphenyl)-*N*-Phenyl-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-Amin (58)



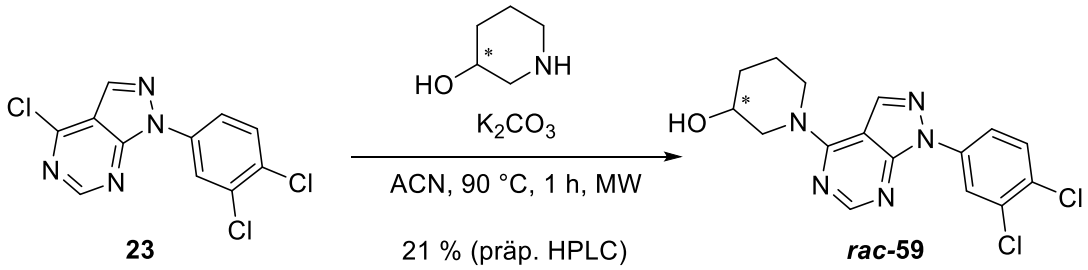
Entsprechend Synthesevorschrift **D** wurden 40 mg **23** (0,13 mmol) mit 24 µl Anilin (0,26 mmol, 2 Äq.) und 36 mg K_2CO_3 (0,26 mmol, 2 Äq.) in 1 ml ACN (0,1 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 7 mg von Pyrazolopyrimidin **58** (0,02 mmol, 15 %) als weißer Feststoff isoliert.



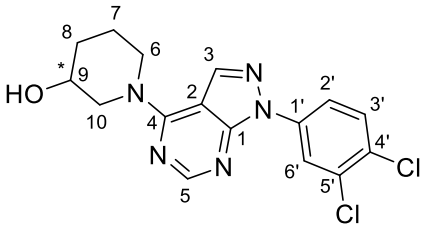
$C_{17}H_{11}Cl_2N_5$
356,21

R_f = 0,78 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 356, 358 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 354, 356 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{17}H_{11}{}^{35}Cl_2N_5{}^+$): 356,04642 gef.: 356,04684, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3218 (br), 3101 (w), 2924 (m), 2853 (w), 1627 (m), 1579 (s), 1560 (m), 1487 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 10.30 (s, 1H, NH), 8.64 – 8.53 (m, 3H, H-3,c H-5, H-6‘), 8.27 (dd, ^3J = 8.9 Hz, ^4J = 2.6 Hz, 1H, H-2‘), 7.92 – 7.77 (m, 3H, H-3‘, H-7/11), 7.42 (t, ^3J = 8.5, 7.3 Hz, 2H, H-9/11), 7.16 (t, ^3J = 7.4 Hz, 1H, H-9), **^{13}C-NMR** (101 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 156.92 (d, C-5), 155.03 (s), 153.92 (s), 139.14 (s), 138.93 (s), 135.19 (d, C-3), 132.05 (s), 131.73 (d, C-3‘), 129.25 (d, C-9/11), 128.58 (s), 125,06 (s), 124,39 (d, C-9) 121.97 (d, C-8/10) , 121.83 (d, C-6‘), 120.44 (d, C-2‘), 103.15 (s).

Synthese von *rac*-1-(1-(3,4-Dichlorphenyl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-yl)-Piperidin-3-ol (*rac*-59)



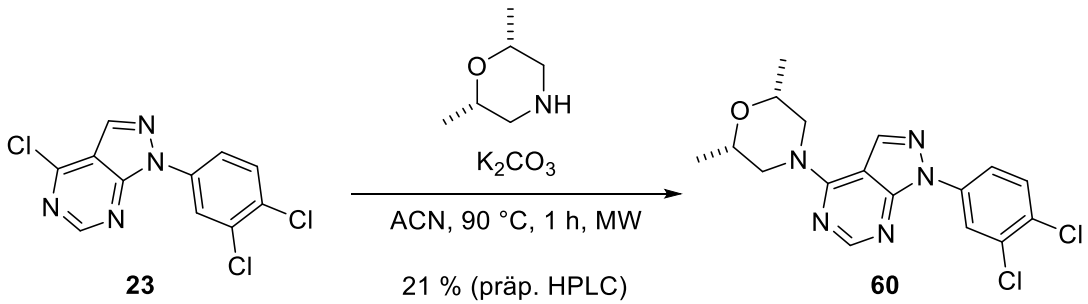
Entsprechend Synthesevorschrift **D** wurden 40 mg **23** (0,13 mmol) mit 36 mg ***rac***-3-Hydroxy-Piperidin (0,26 mmol, 2 Äq.) und 36 mg K_2CO_3 (0,26 mmol, 2 Äq.) in 1 ml ACN (0,1 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 9,9 mg von Pyrazolopyrimidin ***rac*-59** (0,027 mmol, 21 %) als weißer Feststoff isoliert.



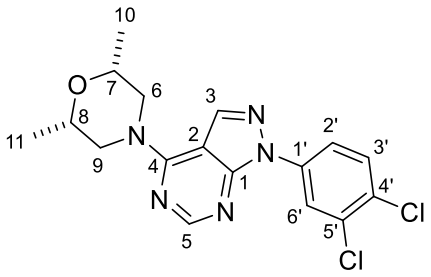
$C_{16}H_{15}Cl_2N_5O$
364,23

R_f = 0,31 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 364, 366 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 398, 400 $[M+Cl-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{16}H_{16}{}^{35}Cl_2N_5O^+$): 364,07264 gef.: 364,07287, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3376 (br), 2926 (m), 2858 (w), 1576 (s), 1566 (s), 1545 (m), 1486 (s) **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.45 – 8.40 (m, 2H, H-5, H-6‘), 8.21 – 8.12 (m, 2H, H-3, H-2‘), 7.55 (d, ^3J = 8.8 Hz, 1H, H-3‘), 4.12 (dd, ^2J = 12.8 Hz, ^3J = 2.8 Hz, 1H, H-10), 4.06 – 3.93 (m, 3H, H-6, H-9, H-10), 3.89 (ddd, ^2J = 13.0 Hz, ^3J = 7.1, 3.0 Hz, 1H, H-6), 2.10 – 1.95 (m, 2H, H-7, H-8), 1.86 – 1.75 (m, 1H, H-8), 1.75 – 1.62 (m, 1H, H-7), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 157.26 (s, C-4), 155.23 (d, C-5), 154.47 (s), 138.35 (s), 134.65 (d, C-3), 133.02 (s), 130.66 (d, C-3‘), 130.07 (s), 123.07 (d, C-6‘), 120.50 (d, C-2‘), 101.79 (s), 66.24 (d, C-9), 52.27 (t, C-10), 46.96 (t, C-6), 32.40 (t, C-8), 22.05 (t, C-7).

Synthese von (2*R*,6*S*)-4-(1-(3,4-Dichlorphenyl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-yl)-2,6-Dimethylmorpholin (60)



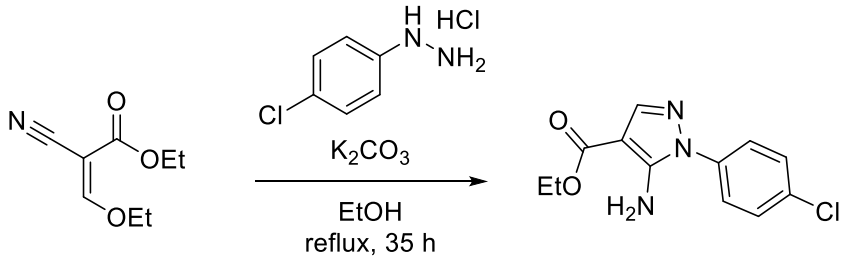
Entsprechend Synthesevorschrift **D** wurden 40 mg **23** (0,13 mmol) mit 32 µl *cis*-2,6-Dimethylmorpholin (0,26 mmol, 2 Äq.) und 36 mg K_2CO_3 (0,26 mmol, 2 Äq.) in 1 ml ACN (0,1 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 10,1 mg von Pyrazolopyrimidin **60** (0,027 mmol, 21 %) als weißer Feststoff isoliert.



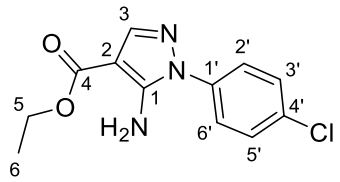
$C_{17}H_{17}Cl_2N_5O$
378,26

R_f = 0,84 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 378, 380 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{17}H_{18}{}^{35}Cl_2N_5O^+$): 378,08829 gef.: 378,08803, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3400 (m), 3099 (w), 2981 (w), 2895 (w), 1671 (s), 1578 (s), 1488 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.49 – 8.42 (m, 2H, H-5, H-6‘), 8.19 (dd, ^3J = 8.8 Hz, ^4J = 2.5 Hz, 1H, H-2‘), 8.11 (s, 1H, H-3), 7.56 (d, ^3J = 8.8 Hz, 1H, H-3‘), 4.58 (m, 2H, H-6/9), 3.76 (dtd, ^2J = 12.5 Hz, ^3J = 6.3, 2.7 Hz, 2H, H-7/8), 2.95 (m, 2H, H-6/9), 1.34 (d, ^3J = 6.2 Hz, 6H, H-10/11), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 156.59 (s, C-4), 155.44 (d, C-5), 154.65 (s), 138.21 (s), 134.32 (d, C-3), 133.00 (s), 130.64 (d, C-3‘), 130.09 (s), 123.04 (d, C-6‘), 120.42 (d, C-2‘), 101.85 (s), 71.61 (d, C-7/8), 50.80 (t, C-6/9), 18.94 (q, C-10/11).

Synthese von Ethyl-5-Amino-1-(4-Chlorphenyl)-1*H*-Pyrazol-4-Carboxylat (38)



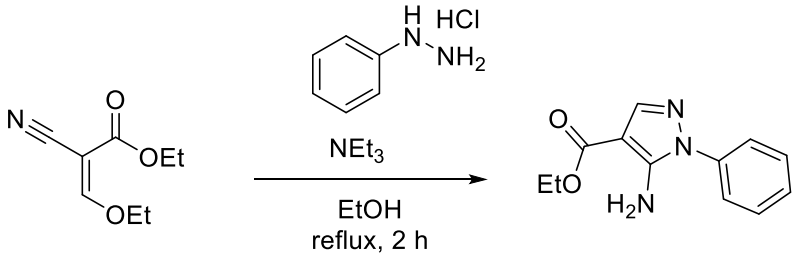
Entsprechend Synthesevorschrift **A** wurden 500 mg **18** (3 mmol) mit 626 mg 4-Chlorphenylhydrazin-Hydrochlorid (3,5 mmol, 1,5 Äq.) und 200 mg K_2CO_3 (3,5 mmol, 1,5 Äq.) in 40 ml EtOH (96 %ig, 0,075 M) umgesetzt. Die Reaktion wurde für insgesamt 35 h refluxiert und anschließend entsprechend der Vorschrift **A** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung in der folgenden Reaktion eingesetzt. Es wurden 653 mg von Pyrazol **38** (2,5 mmol, 84 %) als hellgelber Feststoff isoliert.



$C_{12}H_{12}ClN_3O_2$
265,70

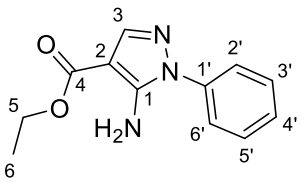
R_f = 0,59 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 266 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 264 $[M-H]^-$, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3429 (br), 3328 (m), 3029 (w), 2908 (m), 1676 (s), 1610 (s), 1547 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.78 (s, 1H, H-3), 7.54 – 7.44 (m, 4H, H-2'/3'/5'/6'), 5.30 (s, 2H, NH_2), 4.31 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H, H-5), 1.36 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-6). **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 164.51 (s, C-4), 149.09 (s), 140.91 (d, C-3), 136.16 (s), 133.88 (s), 129.96 (d, C-3'/5'), 125.00 (d, C-2'/6'), 96.50 (s), 59.80 (t, C-5), 14.54 (q, C-6). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.[222]

Synthese von Ethyl-5-Amino-1-Phenyl-1*H*-Pyrazol-4-Carboxylat (39)



18 86 % (Lit. 90 %) **39**

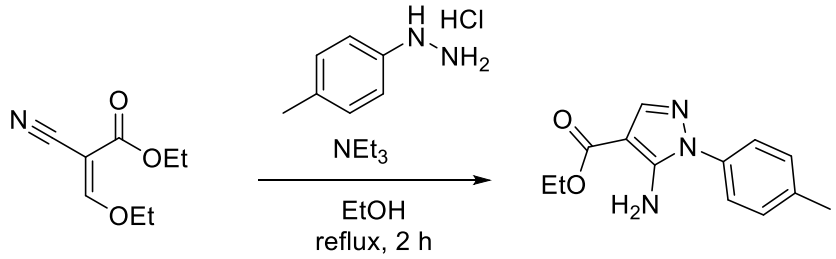
Entsprechend Synthesevorschrift **A** wurden 453 mg **18** (2,68 mmol) mit 453 mg Phenylhydrazin-Hydrochlorid (3,15 mmol, 1,15 Äq.) und 390 µl NEt_3 (2,8 mmol, 1,05 Äq.) in 40 ml EtOH (96 %, 0,07 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere Reinigung in der folgenden Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 564 mg von Pyrazol **39** (2,3 mmol, 86 %) als beiger Feststoff isoliert.



$C_{12}H_{13}N_3O_2$
231,26

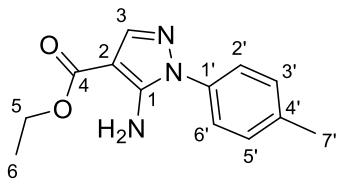
R_f = 0,41 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 232 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 230 $[M-H]^-$, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3395 (m), 3131 (w), 2907 (m), 1680 (s), 1623 (s), 1552 (s).**^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.79 (s, 1H, H-3), 7.58 – 7.47 (m, 4H, H-2'/6'/3'/5'), 7.43 – 7.37 (m, 1H, H-4'), 5.29 (s, 2H, NH_2), 4.31 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H, H-5), 1.36 (t, ^{3}J= 7.1 Hz, H-6). **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 164.60 (s, C-4), 149.04 (s), 140.62 (d, C-3), 137.57 (s, C-1'), 129.80 (d, C-3'/5'), 128.19 (d, C-4'), 123.86 (d, C-2'/6'), 96.23 (s), 59.72 (t, C-5), 14.56 (q, C-6). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.[223]

Synthese von Ethyl-5-Amino-1-(4-Methylphenyl)-1*H*-Pyrazol-4-Carboxylat (40)



18 77 % (Lit. 85 %) **40**

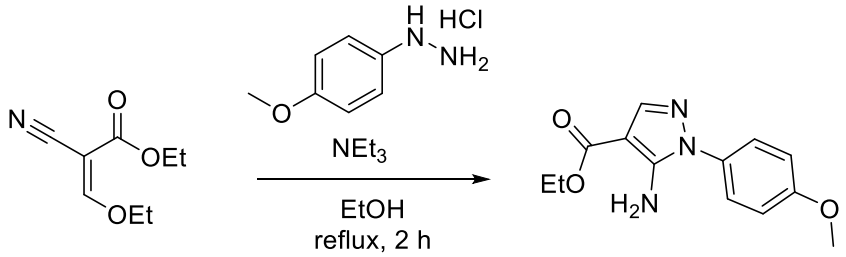
Entsprechend Synthesevorschrift **A** wurden 492 mg **18** (2,9 mmol) mit 480 mg 4-Methylphenylhydrazin-Hydrochlorid (3,05 mmol, 1,05 Äq.) und 400 µl NEt_3 (3 mmol, 1,05 Äq.) in 40 ml EtOH (96 %, 0,075 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere Reinigung in der folgenden Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 563 mg von Pyrazol **40** (2,3 mmol, 77 %) als oranger Feststoff isoliert.



$C_{13}H_{15}N_3O_2$
245,28

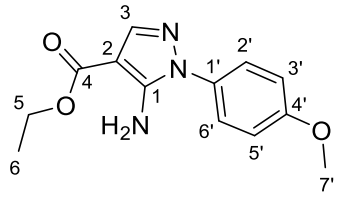
R_f = 0,26 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 246 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 244 $[M-H]^-$, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3427 (w), 3141 (w), 2922 (m), 1680 (s), 1618 (s), 1551 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.78 (s, 1H, H-3), 7.40 (d, ^3J = 8.3 Hz, 2H, H-2'/6'), 7.31 (d, ^3J = 8.1 Hz, 2H, 3'/5'), 5.24 (s, 2H, NH_2), 4.30 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H, H-5), 2.41 (s, 3H, H-7'), 1.36 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-6), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 164.58 (s, C-4), 149.00 (s), 140.33 (d, C-3), 138.39 (s, C-4'), 134.87 (s, C-1'), 130.35 (d, C-3'/5'), 123.89 (d, C-2'/6'), 96.09 (s), 59.70 (t, C-5), 21.17 (q, C-7'), 14.56 (q, C-6'). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.[223]

Synthese von Ethyl-5-Amino-1-(4-Methoxyphenyl)-1*H*-Pyrazol-4-Carboxylat (41)



18 78 % (Lit. 78 %) **41**

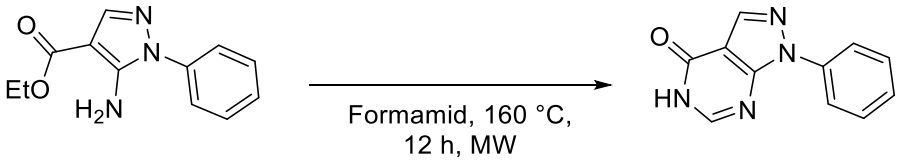
Entsprechend Synthesevorschrift **A** wurden 545 mg **18** (3,2 mmol) mit 574 mg 4-Methoxyphenylhydrazin-Hydrochlorid (3,3 mmol, 1,05 Äq.) und 460 µl NEt_3 (3,3 mmol, 1,05 Äq.) in 40 ml EtOH (96 %, 0,08 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere Reinigung in der folgenden Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 653 mg von Pyrazol **41** (2,5 mmol, 78 %) als beiger Feststoff isoliert.



$C_{13}H_{15}N_3O_3$
261,28

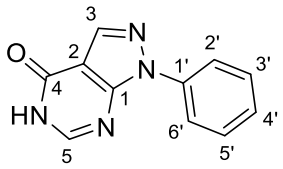
R_f = 0,15 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 262 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3414 (br), 3270 (m), 2900 (m), 1675 (s), 1618 (s), 1590 (m),1551 (s), 1513 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.76 (s, 1H, H-3), 7.42 (d, ^3J = 8.9 Hz, 2H, H-2'/6'), 7.01 (d, ^3J = 8.9 Hz, 2H, H-3'/5'), 5.18 (s, 2H, NH_2), 4.30 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H, H-5), 3.85 (s, 3H, H-7'), 1.36 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-6), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 164.57 (s, C-4), 159.47 (s, C-4'), 149.08 (s), 140.18 (d, C-3), 130.15 (s, C-1'), 125.83 (d, C-2'/6'), 114.91 (d, C-3'/5'), 95.94 (s), 59.68 (t, C-5), 55.61 (q, C-7'), 14.56 (q, C-6). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.[223]

Synthese von 1-Phenyl-1,5-Dihydro-4*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-on (42)



39 86 % **42**

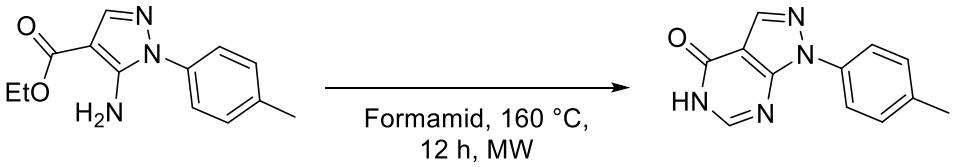
Entsprechend Synthesevorschrift B wurden 290 mg **39** (1,3 mmol) in 7 ml Formamid (0,19 M) in der Mikrowelle umgesetzt. Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere Reinigung in der folgenden Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 227 mg von Pyrazolopyrimidinon **42** (1,1 mmol, 86 %) als schwarz-kristalliner schwerlöslicher Feststoff isoliert.



$C_{11}H_8N_4O$
212,21

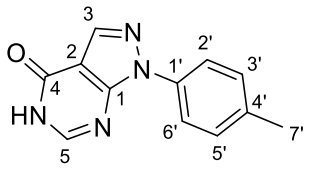
R_f = 0,07 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 213 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 211 $[M-H]^-$, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3043 (m), 2884 (m), 1723 (m), 1659 (m), 1589 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*6): δ [ppm] = 8.34 (s, 1H, H-5), 8.21 (s, 1H, H-3), 8.08 – 8.00 (m,2H, H-2'/6'), 7.61 – 7.52 (m, 2H, H-3'/5'), 7.45 – 7.36 (m, 1H, H-4'), **^{13}C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*6): δ [ppm] = 157.67 (s, C-4), 152.30 (s), 149.27 (d, C-5), 138.68 (s, C-1'), 136.46 (d, C-3), 129.67 (2C, C-3'/5'), 127.58 (1C, C-4'), 122.19 (2C, C-2'/6'), 108.08 (s). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.[344] Die Synthese der Verbindung erfolgte in der angegebenen Literatur über eine andere Reaktion.

Synthese von 1-(4-Methylphenyl)-1,5-Dihydro-4*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-on (43)



40 94 % **43**

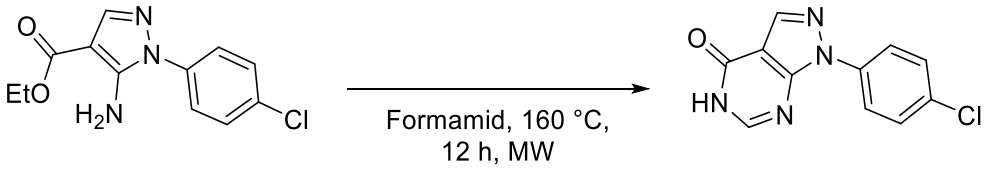
Entsprechend Synthesevorschrift **B** wurden 290 mg **40** (1,2 mmol) in 7 ml Formamid (0,17 M) in der Mikrowelle umgesetzt. Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere Reinigung in der folgenden Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 250 mg von Pyrazolopyrimidinon **43** (1,1 mmol, 94 %) als dunkelbrauner schwerlöslicher Feststoff isoliert.



$C_{12}H_{10}N_4O$
226,24

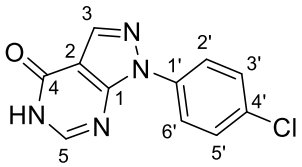
R_f = 0,11 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 227 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 225 $[M-H]^-$, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3090 (m), 2886 (m), 1669 (s), 1592 (m), 1514 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*6): δ [ppm] = 8.31 (s, 1H, H-5), 8.19 (s, 1H, H-3), 7.91 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2H, H-2'/6'), 7.36 (d, ^3J = 7.9 Hz, 2H, H-3'/5')., 2.37 (s, 3H, H-7'), **^{13}C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*6): δ [ppm] = 157.69 (s), 152.09 (s), 149.14 (d, C-5), 137.01 (s, C-1'), 136.35 (s, C-4'), 136.20 (d, C-3), 130.04 (d, C-3'/5'), 122.12 (d, C-2'/6'), 107.92 (s), 21.06 (q, C-7'). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.[199] Die Synthese der Verbindung erfolgte in der angegebenen Literatur über eine andere Reaktion.

Synthese von 1-(4-Chlorphenyl)-1,5-Dihydro-4*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-on (44)



38 n.b. **44**

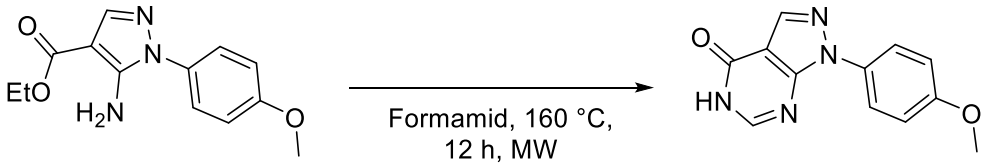
Entsprechend Synthesevorschrift **B** wurden 290 mg **38** (1,1 mmol) in 7 ml Formamid (0,17 M) in der Mikrowelle umgesetzt. Es wurden 271 mg von Pyrazolopyrimidinon **44** (1,11 mmol) als schwarzer schwerlöslicher Feststoff isoliert. Dies entsprach einer Ausbeute von 101 % nach sorgfältiger Trocknung. Das Rohprodukt wurde trotzdem in der folgenden Reaktion eingesetzt, da in den LC/MS- und NMR-Spektren nur in geringem Ausmaß Verunreinigungen beobachtet wurden.



$C_{11}H_7ClN_4O$
246,65

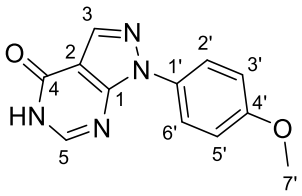
R_f = 0,12 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 247 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 245 $[M-H]^-$, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3094 (m), 2812 (m), 2965 (m), 1664 (s), 1584 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*6): δ [ppm] = 8.37 (s, 1H, H-5), 8.24 (s, 1H, H-3), 8.12 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2H, H-3'/5'), 7.65 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2H, H-2'/6'), **^{13}C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*6): δ [ppm] = 157.59 (s, C-4), 152.45 (s), 149,54 (d, C-5), 137.58 (s, C-4'), 136.81 (d, C-3), 131.67 (s, C-1'), 129.71 (d, C-3'/5'), 123.47 (d, C-2'/6'), 108.26 (s). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.[344] Die Synthese der Verbindung erfolgte in der angegebenen Literatur über eine andere Reaktion.

Synthese von 1-(4-Methoxyphenyl)-1,5-Dihydro-4*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-on (45)



41 87 % (Lit. 85 %) **45**

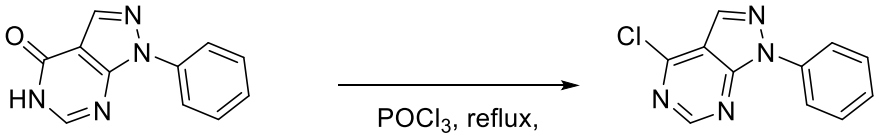
Entsprechend Synthesevorschrift **B** wurden 290 mg **41** (1,1 mmol) in 7 ml Formamid (0,17 M) in der Mikrowelle umgesetzt. Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere Reinigung in der folgenden Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 235 mg von Pyrazolopyrimidinon **45** (0,97 mmol, 87 %) als dunkelbrauner schwerlöslicher Feststoff isoliert.



$C_{12}H_{10}N_4O_2$
242,24

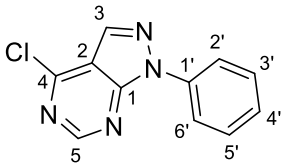
R_f = 0,06 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 243 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 241 $[M-H]^-$, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3157 (w), 2845 (m), 1665 (s), 1590 (m), 1508 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*6): δ [ppm] = 8.29 (s, 1H, H-5), 8.17 (s, 1H, H-3), 7.89 (d, ^3J = 9.1 Hz, 2H, H-2'/6'), 7.11 (d, ^3J = 9.1 Hz, 2H, H-3'/5'), 3.82 (s, 3H, H-7'), **^{13}C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*6): δ [ppm] = 158.63 (s, C-4'), 157.73 (s, C-4), 151.87 (s), 149.04 (d, C-5), 135.96 (d, C-3), 131.82 (s, C-1'), 123.97 (d, C-2'/6'), 114.75 (d, C-3'/5'), 107.68 (s), 55.91 (q, C-7'). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.[224]

Synthese von 4-Chlor-1-Phenyl-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin (46)



42 90 % (Lit. 94 %) **46**

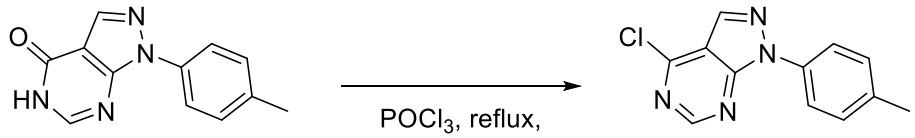
Entsprechend Synthesevorschrift **C** wurden 213 mg **42** (1 mmol) in 5 ml $POCl_3$ (0,2 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere Reinigung in der folgenden Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 208 mg von Pyrazolopyrimidin **46** (0,9 mmol, 90 %) als beiger Feststoff isoliert.



$C_{11}H_7ClN_4$
230,66

R_f = 0,6 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 231 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3111 (w), 2923 (m), 2853 (w), 1583 (m), 1542 (m), 1503 (m), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.34 (s, 1H, H-5), 8.21 (s, 1H, H-3), 8.08 – 8.00 (m, 2H, H-2‘/6‘), 7.61 – 7.52 (m, 2H, H-3‘/5‘), 7.45 – 7.36 (m, 1H, H-4‘), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 155.17 (s, C-4), 155.13 (d, C-5), 152.86 (s), 138.22 (s, C-1‘), 133.29 (d, C-3), 129.37 (d, C-3‘/5‘), 127.46 (d, C-4‘), 121.57 (d, C-2‘/6‘), 115.15 (s). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.[199]

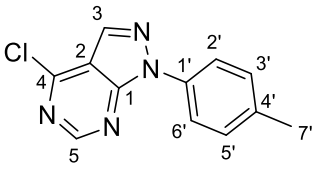
Synthese von 4-Chlor-1-(4-Methylphenyl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin (47)



43 89 % (Lit. 78 %) **47**

Entsprechend Synthesevorschrift **C** wurden 235 mg **43** (1,04 mmol) in 5 ml $POCl_3$ (0,2 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere

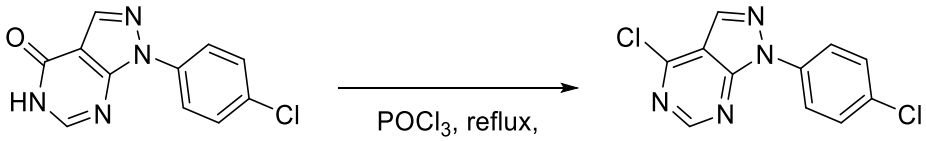
Reinigung in der folgenden Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 227 mg von Pyrazolopyrimidin **47** (0,93 mmol, 89 %) als beiger Feststoff isoliert.



$C_{12}H_9ClN_4$
244,68

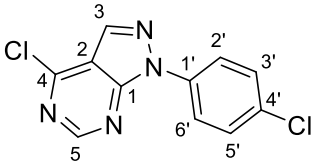
R_f = 0,59 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 245 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3097 (w), 2920 (m), 2854 (w), 1585 (m), 1539 (m), 1510 (m), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.85 (s, 1H, H-5), 8.32 (s, 1H, H-3), 8.02 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2H, H-2'/6'), 7.35 (d, ^3J = 8.0 Hz, 2H, H-3'/5'), 2.43 (s, 3H, H-7'), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 155.10 (s, C-4), 155.03 (d, C-5), 152.68 (s), 137.50 (s, C-1'), 135.76 (s, C-4'), 133.02 (d, C-3), 129.89 (d, C-2'/6'), 121.61 (d, C-3'/5'), 114.99 (s), 21.13 (q, C-7'). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.[199]

Synthese von 4-Chlor-1-(4-Chlorphenyl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin (48)



44 — $POCl_3$, reflux, 3 h — 57 % (Lit. 97 %) — **48**

Entsprechend Synthesevorschrift **C** wurden 258 mg **44** (1,05 mmol) in 5 ml $POCl_3$ (0,2 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere Reinigung in der folgenden Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 159 mg von Pyrazolopyrimidin **48** (0,6 mmol, 57 %) als beiger Feststoff isoliert.

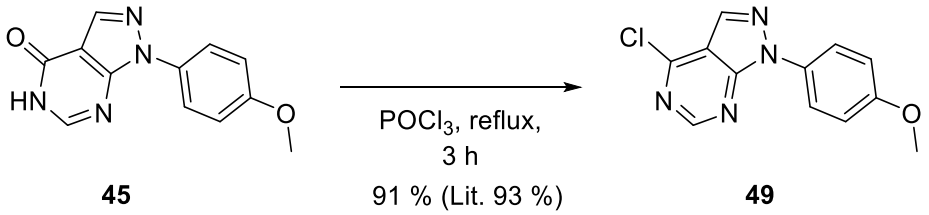


$C_{11}H_6Cl_2N_4$
265,10

R_f = 0,60 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 265 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3111 (w), 2961 (w), 1583 (m), 1541 (m), 1497 (m), **^{1}H-**

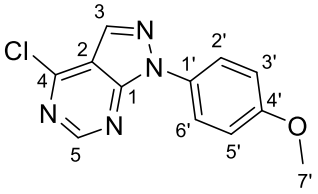
NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.88 (s, 1H, H-5), 8.34 (s, 1H, H-3), 8.14 (d, ^3J = 8.9 Hz, 2H, H-2‘/6‘), 7.45 (d, ^3J = 8.9 Hz, 2H, H-3‘/5‘), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 155.30 (s, C-4), 155.24 (d, C-5), 152.88 (s), 136.83 (s, C-1‘), 133.53 (d, C-3), 132.90 (s, C-4‘), 129.47 (d, C-2‘/6‘), 122.45 (d, C-3‘/5‘), 115.26 (s). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.[199]

Synthese von 4-Chlor-1-(4-Methoxyphenyl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin (49)



45 **49**

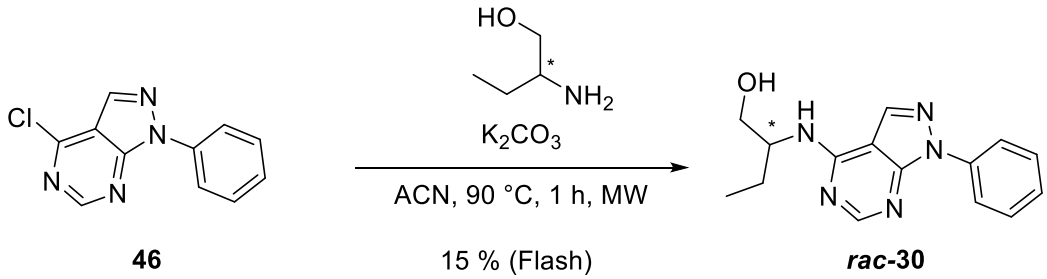
Entsprechend Synthesevorschrift **C** wurden 221 mg **45** (0,91 mmol) in 5 ml $POCl_3$ (0,2 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere Reinigung in der folgenden Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 216 mg von Pyrazolopyrimidin **49** (0,83 mmol, 91 %) als beiger Feststoff isoliert.



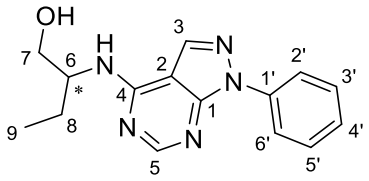
$C_{12}H_9ClN_4O$
260,68

R_f = 0,55 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 261 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 259 $[M-H]^-$, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3127 (w), 3013 (w), 2936 (w), 2828 (w), 1588 (m), 1540 (m),1512 (m), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.85 (s, 1H, H-5), 8.32 (s, 1H, H-3), 8.04 (d, ^3J = 9.2 Hz, 2H, H-2’/6’), 7.09 (d, ^3J = 9.2 Hz, 2H, H-3’/5’), 3.88 (s, 3H, H-7’), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 158.87 (s, C-4), 155.12 (d, C-5), 155.02 (s), 152.50 (s, C-4’), 132.86 (d, C-3), 131.35 (s), 123.35 (d, C-2’/6’), 114.81 (s), 114.51 (d, C-3’/5’), 55.62 (1C, C-7’). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.[224]

Synthese von *rac*-2-((1-Phenyl-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-yl)Amino)Butan-1-ol (*rac*-30)



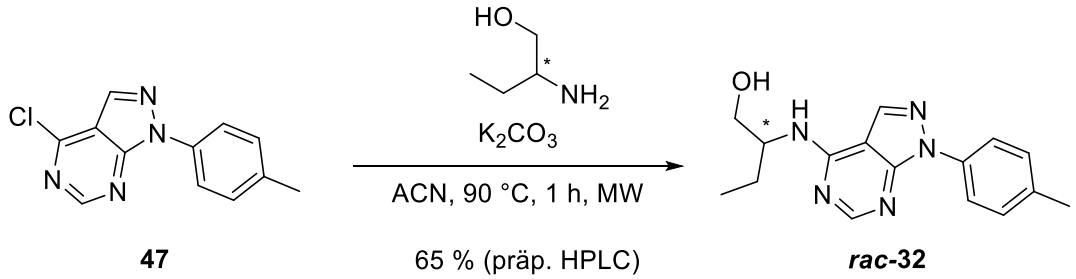
Entsprechend Synthesevorschrift **D** wurden 54 mg **46** (0,23 mmol) mit 76 µl *rac*-2-Aminobutanol (0,46 mmol, 2 Äq.) und 47 mg K_2CO_3 (0,34 mmol, 1,5 Äq.) in 1,2 ml ACN (0,2 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie gereinigt (CH_2Cl_2/MeOH: 0 % B – 15 % B). Es wurden 9,8 mg von Pyrazolopyrimidin ***rac*-30** (0,034 mmol, 15 %) als weißer Feststoff isoliert.



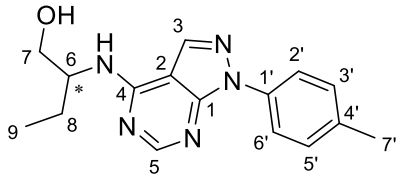
$C_{15}H_{17}N_5O$
283,34

R_f = 0,22 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 284 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 282 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{15}H_{18}N_5O^+$): 284,15058 gef.: 284,15082, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3284 (br), 2965 (m), 2932 (m), 2876 (w), 1615 (s), 1596 (s), 1566 (m), 1503 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 8.22 (s, 1H, H-3), 8.19 (s, 1H, H-5), 7.95 – 7.90 (m, 2H, H-2‘/6‘), 7.42 (t, ^3J = 7.9 Hz, 2H, H-3‘/5‘), 7.27 (t, ^3J = 7.4 Hz, 1H, H-4‘), 4.26 (dd, ^3J = 8.9, 5.0 Hz, 1H), 3.64 – 3.56 (m, 2H, H-7), 1.73 (ddd, ^2J = 13.6 Hz, ^3J = 7.6, 5.6 Hz, 1H, H-8), 1.63 – 1.48 (m, 1H, H-8), 0.92 (t, ^3J = 7.4 Hz, 3H, H-9). **^{13}C-NMR** (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 157.44 (s, C-4), 156.03 (d, C-5), 152.51 (s), 138.69 (s, C-1‘), 133.13 (d, C-3), 128.74 (d, C-3‘/5‘), 126.55 (d, C-4‘), 121.85 (C-2‘/6‘), 102.00 (s), 63.34 (t, C-7), 53.93 (d, C-6), 23.72 (t, C-8), 9.61 (q, C-9).

Synthese von *rac*-2-((1-(4-Methylphenyl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-yl)Amino)Butan-1-ol (*rac*-32)



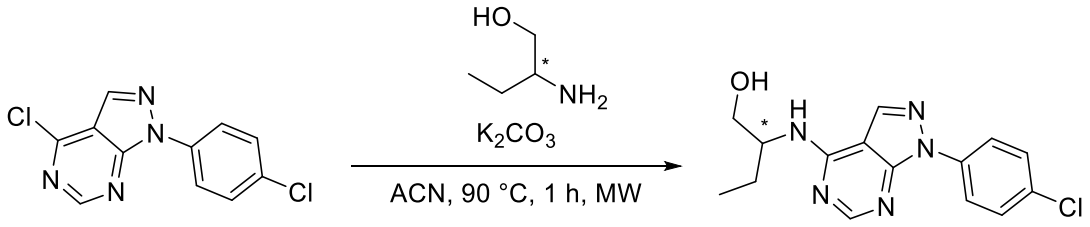
Entsprechend Synthesevorschrift **D** wurden 37 mg **47** (0,15 mmol) mit 28 µl *rac*-2-Aminobutanol (0,3 mmol, 2 Äq.) und 42 mg K_2CO_3 (0,3 mmol, 2 Äq.) in 1,2 ml ACN (0,2 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 29 mg von Pyrazolopyrimidin ***rac*-32** (0,098 mmol, 65 %) als weißer Feststoff isoliert.



$C_{16}H_{19}N_5O$
297,36

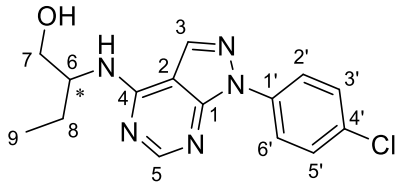
R_f = 0,22 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 298 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 296 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{16}H_{20}N_5O^+$): 298,16623 gef.: 298.16624, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3259 (br), 3166 (m), 2971 (m), 2934 (w), 2866 (w), 1606 (s),1568 (m), 1515 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): 8.36 (s, 1H, H-5), 8.09 (s, 1H, H-3), 7.91 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2H, H-2'/6'), 7.30 (d, ^3J = 8.2 Hz, 2H, H-3'/5'), 4.29 – 4.15 (m, 1H, H-6), 3.87 (dd, ^2J = 11.3 Hz, ^3J = 3.3 Hz, 1H, H-7), 3.75 (dd, ^2J = 11.3 Hz, ^3J = 5.9 Hz, 1H, H-7), 2.40 (s, 3H, H-7'), 1.86 – 1.77 (m, 1H, H-8), 1.72 (dt, ^2J = 13.9 Hz, ^3J = 7.5 Hz, 1H, H-8), 1.04 (t, ^3J = 7.4 Hz, 3H, H-9). **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 157.30 (s, C-4), 156.05 (d, C-5), 152.83 (s), 136.82 (s), 136.52 (s), 131.79 (d, C-3), 129.86 (d, C-3'/5'), 121.96 (d, C-2'/6'), 101.97 (s), 65.27 (d, C-7), 56.36 (d, C-6), 24.81 (d, C-8), 21.23 (q, C-7'), 10.90 (q, C-9).

Synthese von *rac*-2-((1-(4-Chlorphenyl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-yl)Amino)Butan-1-ol (*rac*-34)



48 48 % (präp. HPLC) ***rac*-34**

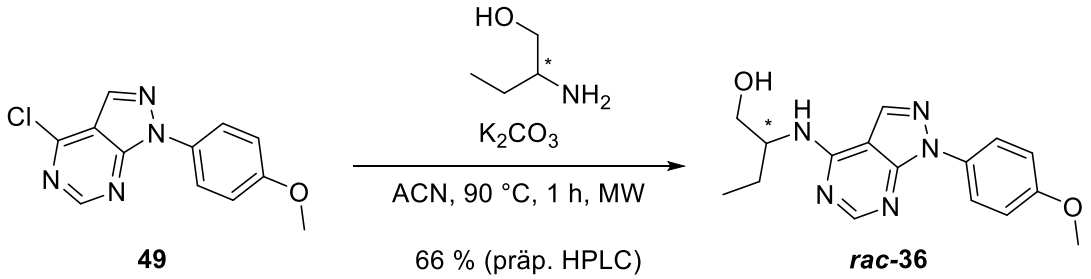
Entsprechend Synthesevorschrift **D** wurden 40 mg **48** (0,15 mmol) mit 28 µl *rac*-2-Aminobutanol (0,3 mmol, 2 Äq.) und 42 mg K_2CO_3 (0,3 mmol, 2 Äq.) in 1,2 ml ACN (0,125 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 23 mg von Pyrazolopyrimidin ***rac*-34** (0,073 mmol, 48 %) als weißer Feststoff isoliert.



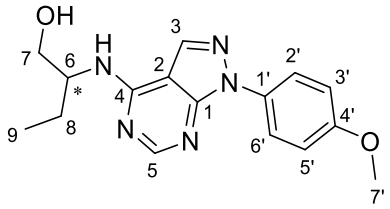
$C_{15}H_{16}ClN_5O$
317,78

R_f = 0,11 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 318 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 316 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{15}H_{17}{}^{35}ClN_5O^+$): 318,11161 gef.: 318,11116, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3260 (br), 3176 (m), 2964 (m), 2930 (m), 2871 (w), 1620 (s), 1532 (m), 1497 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): 8.39 (s, 1H, H-5), 8.17 – 8.07 (m, 3H, H-3, H2'/6'), 7.53 – 7.43 (m, 2H, H-3'/5'), 4.31 – 4.21 (m, 1H, H-6), 3.90 (dd, ^2J = 11.2 Hz, ^3J = 3.3 Hz, 1H, H-7), 3.78 (dd, ^2J = 11.2 Hz, ^3J = 5.9 Hz, 1H, H-7), 1.89 – 1.64 (m, 2H, H-8), 1.05 (t, ^3J = 7.4 Hz, 3H, H-9), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 156.88 (s, C-4), 156.68 (d, C-5), 153.12 (s), 137.35 (s), 132.21 (s), 129.23 (d, C-3, C-3'/5'), 122.65 (d, C-2'/6'), 101.81 (s), 65.42 (t, C-7), 55.36 (d, C-6), 24.54 (t, C-8), 10.70 (q, C-9).

Synthese von *rac*-2-((1-(4-Methoxyphenyl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-yl)Amino)Butan-1-ol (*rac*-36)



Entsprechend Synthesevorschrift **D** wurden 40 mg **49** (0,15 mmol) mit 28 µl *rac*-2-Aminobutanol (0,3 mmol, 2 Äq.) und 42 mg K_2CO_3 (0,3 mmol, 2 Äq.) in 1,2 ml ACN (0,2 M) umgesetzt. Nach der Zugabe von verd. NH_4Cl-Lösung wurde die Lösung mit EtOAc (3x) extrahiert, die gesammelten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 31 mg von Pyrazolopyrimidin ***rac*-36** (0,099 mmol, 66 %) als weißer Feststoff isoliert.

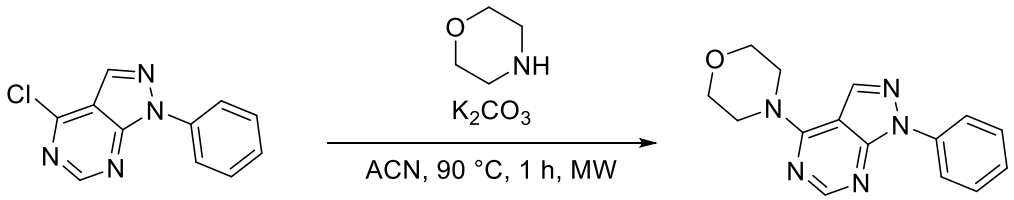


$C_{16}H_{19}N_5O_2$
313,36

d

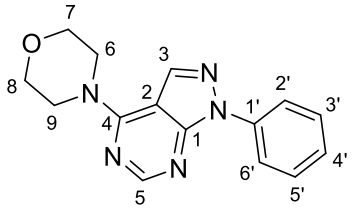
R_f = 0,16 (CyH/EtOAc 1:2), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 314 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 312 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{16}H_{20}N_5O_2^+$): 314,16115 gef.: 314,16108, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3270 (br), 3116 (w), 2966 (m), 2915 (m), 2849 (w), 1615 (s), 1572 (m), 1513 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): 8.38 (s, 1H, H-5), 8.11 (s, 1H, H-3), 7.92 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2H, H-2‘/6‘), 7.03 (d, ^3J = 8.6 Hz, 2H, H-3‘/5‘), 4.30 – 4.20 (m, 1H, H-6), 3.93 – 3.88 (m, 1H, H-7), 3.86 (s, 3H, H-7‘), 3.82 – 3.75 (m, 1H, H-7), 1.88 – 1.64 (m, 2H, H-8), 1.06 (t, ^3J = 7.4 Hz, 3H, H-9), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 158.42 (s, C-4), 157.04 (s), 131.99 (s), 131.33 (d, C-3), 129.27 (s), 123.52 (d, C-3’/5’), 114.37 (d, C-2’/6’), 101.50 (s), 60.12 (d, C-7), 55.58 (q, C-7’), 55.47 (d, C-6), 24.65 (d, C-8), 10.75 (q, C-9).

Synthese von 1-(1-Phenyl-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-yl)Morpholin (31)



46 93 % (Lit. 51 %) **31**

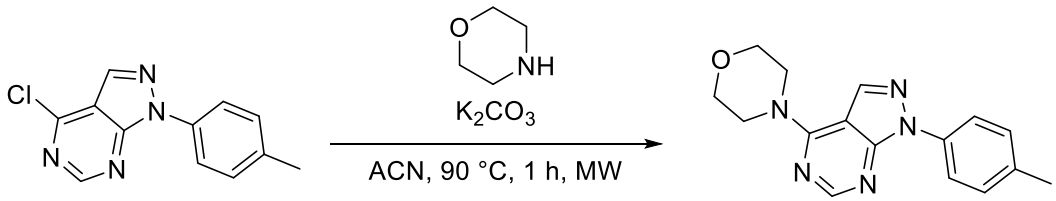
Entsprechend Synthesevorschrift **D** wurden 37 mg **46** (0,15 mmol) mit 26 µl Morpholin (0,3 mmol, 2 Äq.) und 42 mg K_2CO_3 (0,3 mmol, 2 Äq.) in 1 ml ACN (0,1 M) umgesetzt. Das isolierte Produkt **31** wies nach dem Trocknen bereits eine Reinheit >95 % auf, sodass keine weitere Reinigung erforderlich war. Es wurden 39 mg von Pyrazolopyrimidin **31** (0,14 mmol, 93 %) als weiß-hellgelber Feststoff isoliert.



$C_{15}H_{15}N_5O$
281,32

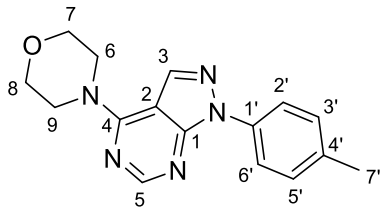
R_f = 0,29 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 282 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{15}H_{16}N_5O^+$): 282,13493 gef.: 282,13504, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 2955 (m), 2917 (m), 2869 (m), 1644 (w), 1567 (m), 1548 (m),1508 (m), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.47 (s, 1H, H-5), 8.16 – 8.08 (m, 3H, H-3, H-2‘/6‘), 7.57 – 7.48 (m, 2H, H-3‘/5‘), 7.39 – 7.30 (m, 1H, H-4‘), 4.02 (dd, ^3J = 5.8 Hz, 4.0 Hz, 4H, H-6/9), 3.89 (dd, ^3J = 5.8 Hz, 4.1 Hz, 4H, H-7/8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 157.09 (s, C-4), 155.39 (d, C-5), 154.32 (s), 138.76 (s, C-4‘), 133.58 (d, C-3), 129.15 (d, C-3‘/5‘), 126.83 (d, C-4‘), 122.10 (d, C-2‘/6‘), 101.73 (s), 66.53 (t, C-7/8), 45.61 (t, C-6/9). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.[207]

Synthese von 1-(1-(4-Methylphenyl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-yl)Morpholin (33)



47 86 % **33**

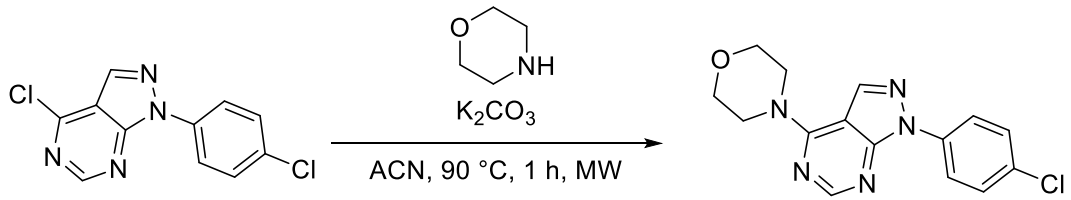
Entsprechend Synthesevorschrift **D** wurden 37 mg **47** (0,15 mmol) mit 26 µl Morpholin (0,3 mmol, 2 Äq.) und 42 mg K_2CO_3 (0,3 mmol, 2 Äq.) in 1 ml ACN (0,1 M) umgesetzt. Das isolierte Produkt **33** wies nach dem Trocknen bereits eine Reinheit >95 % auf, sodass keine weitere Reinigung erforderlich war. Es wurden 38 mg von Pyrazolopyrimidin **33** (0,13 mmol, 86 %) als weiß-hellgelber Feststoff isoliert.



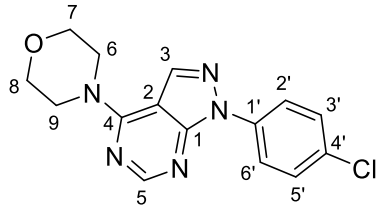
$C_{16}H_{17}N_5O$
295,35

R_f = 0,43 (CyH/EtOAc 1:2), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 296 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{16}H_{18}N_5O^+$): 296,15058 gef.: 296,15060, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3115 (w), 2969 (w), 2868 (w), 1568 (s), 1554 (s), 1517 (m), 1497 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.46 (s, 1H, H-5), 8.10 (s, 1H, H-3), 7.95 (d, ^3J = 8.4 Hz, 2H, 2‘/6‘), 7.32 (d, ^3J = 8.2 Hz, 2H, 3‘/5‘), 4.02 (dd, ^3J = 5.9, 4.0 Hz, 4H, H-6/9), 3.89 (dd, ^3J = 5.9, 3.9 Hz, 4H, H-7/8), 2.41 (s, 3H, H-7‘), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 157.11 (s, C-4), 155.02 (d, C-5), 154.15 (s), 136.76 (s), 136.28 (s), 133.29 (d, C-3), 129.69 (d, C-3‘/5‘), 122.15 (d, C-2‘/6‘), 101.61 (s), 66.54 (t, C-7/8), 45.60 (t, C-6/9), 21.11 (q, C-7‘).

Synthese von 1-(1-(4-Chlorphenyl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-yl)Morpholin (35)



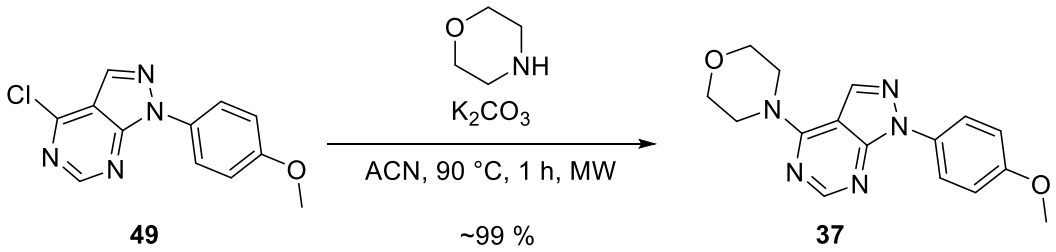
Entsprechend Synthesevorschrift **D** wurden 40 mg **48** (0,15 mmol) mit 26 µl Morpholin (0,3 mmol, 2 Äq.) und 42 mg K_2CO_3 (0,3 mmol, 2 Äq.) in 1 ml ACN (0,1 M) umgesetzt. Das isolierte Produkt **35** wies nach dem Trocknen bereits eine Reinheit >95 % auf, sodass keine weitere Reinigung erforderlich war. Es wurden 37 mg von Pyrazolopyrimidin **35** (0,12 mmol, 77 %) als weiß-hellgelber Feststoff isoliert.



$C_{15}H_{14}ClN_5O$
315,76

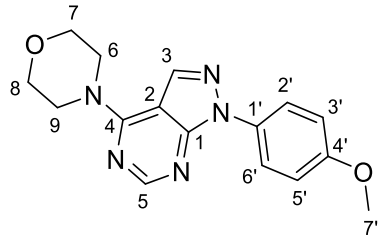
R_f = 0,51 (CyH/EtOAc 1:2), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 316 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{15}H_{15}{}^{35}ClN_5O^+$): 316,09596 gef.: 316,09556, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3128 (w), 3044 (w), 2958 (w), 2897 (w), 2860 (w), 1567 (s),1567 (m), 1493 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.46 (s, 1H, H-5), 8.15 (d, ^3J = 8.9 Hz, 2H, H-2‘/6‘), 8.11 (s, 1H, H-3), 7.48 (d, ^3J = 8.9 Hz, 2H, H-3‘/5‘), 4.02 (dd, ^3J = 5.9, 4.0 Hz, 4H, H-6/9), 3.89 (dd, ^3J = 5.8, 4.1 Hz, 4H, H-7/8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 157.09 (s, C-4), 155.38 (d, C-5), 154.37 (s), 137.40 (s), 133.86 (d, C-3), 132.15 (s), 129.21 (d, 3‘/5‘), 122.95 (d, 2‘/6‘), 101.77 (s), 66.50 (t, C-7/8), 45.67 (t, C-6/9).

Synthese von 1-(1-(4-Methoxyphenyl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-yl)Morpholin (37)



49 ~99 % **37**

Entsprechend Synthesevorschrift **D** wurden 40 mg **49** (0,15 mmol) mit 26 µl Morpholin (0,3 mmol, 2 Äq.) und 42 mg K_2CO_3 (0,3 mmol, 2 Äq.) in 1 ml ACN (0,1 M) umgesetzt. Das isolierte Produkt **37** wies nach dem Trocknen bereits eine Reinheit >95 % auf, sodass keine weitere Reinigung erforderlich war. Es wurden 46 mg von Pyrazolopyrimidin **37** (0,15 mmol, ~99 %) als weiß-hellgelber Feststoff isoliert.

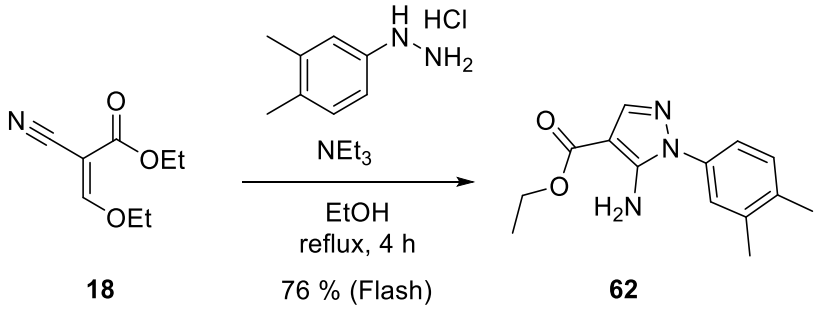


$C_{16}H_{17}N_5O_2$
311,35

R_f = 0,36 (CyH/EtOAc 1:2), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 312 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{16}H_{18}N_5O^+$): 312,14550 gef.: 312,14482, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 2960 (w), 2867 (w), 1569 (m), 1556 (m), 1518 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.45 (s, 1H, H-5), 8.09 (s, 1H, H-3), 7.99 – 7.90 (m, 2H, H-12, H-14), 7.09 – 7.00 (m, 2H, H-11, H-15), 4.02 (dd, ^3J = 5.9, 4.0 Hz, 4H, H-6/9), 3.93 – 3.84 (m, 7H, H-7‘, H-7/8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 158.46 (s, C-4), 155.38 (d, C-5), 154.60 (s), 137.31 (s), 133.13 (d, C-3), 131.91 (s), 123.86 (t, C-2‘/6‘), 114.35 (d, C-3‘/5‘), 101.45 (s), 66.54 (t, C-7/8), 55.60 (q, C-7‘), 45.62 (t, C-6/9).

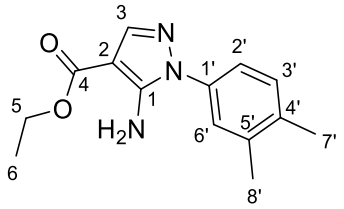
6.3.3 Derivate der 3. Generation

Synthese von Ethyl-5-Amino-1-(3,4-Dimethylphenyl)-1*H*-Pyrazol-4-Carboxylat (62)



18 76 % (Flash) **62**

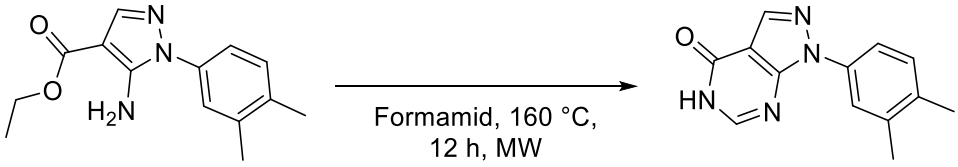
Entsprechend Synthesevorschrift **A** wurden 200 mg **18** (1,17 mmol) mit 242 mg 3,4-Dimethylphenylhydrazin-Hydrochlorid (1,4 mmol, 1,2 Äq.) und 323 mg K_2CO_3 (2,34 mmol, 2 Äq.) in 11 ml EtOH (96 %, 0,1 M) umgesetzt. Die Reaktion wurde für insgesamt 4 h refluxiert. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Flash-Chromatographie gereinigt (CyH/EtOAc: 0 % B – 100 % B). Es wurden 232 mg von Pyrazol **62** (0,89 mmol, 76 %) als gelb-oranger Feststoff isoliert.



$C_{14}H_{17}N_3O_2$
259,31

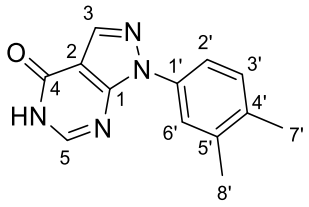
R_f = 0,75 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 260 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3436 (br), 3337 (m), 2978 (m), 1682 (s), 1614 (s), 1545 (s), 1505 (m), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.80 (s, 1H, H-3), 7.30 (d, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-6‘), 7.26 – 7.23 (m, 2H, H-2‘/3‘), 5.29 (s, 2H, NH_2), 4.31 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H, H-5), 2.32 (s, 6H, H-7‘/8‘), 1.36 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-6). **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 164.64 (s, C-4), 148.95 (s), 140.36 (d, C-3), 138.48 (s), 136.97 (s), 135.23 (s), 130.65 (d, C-3’), 125.17 (d, C-6’), 121.07 (d, C-2’), 95.99 (s), 59.62 (t, C-5), 19.84 (q, C-7’/8’), 19.48 (q, C-7’/8’), 14.55 (q, C-6). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.[345] Die Synthese der Verbindung erfolgte in der angegebenen Literatur über eine andere Reaktion.

Synthese von 1-(3,4-Dimethylphenyl)-1,5-Dihydro-4*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-on (63)



62 72 % **63**

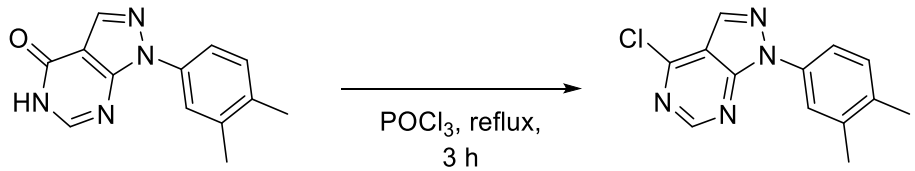
Entsprechend Synthesevorschrift B wurden 230 mg **62** (0,89 mmol) in 5 ml Formamid (0,18 M) in der Mikrowelle umgesetzt. Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere Reinigung in der folgenden Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 155 mg von Pyrazolopyrimidinon **63** (0,64 mmol, 72 %) als schwarzer schwerlöslicher Feststoff isoliert.



$C_{13}H_{12}N_4O$
240,27

R_f = 0,04 (EtOAc), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 241 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 239 $[M-H]^-$, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3113 (br), 2923 (m), 1673 (s), 1612 (m), 1589 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*6): δ [ppm] = 8.30 (s, 1H, H-5), 8.19 (s, 1H, H-3), 7.79 (d, ^4J = 2.2 Hz, 1H, H-6‘), 7.73 (dd, ^3J = 8.1 Hz, ^4J = 2.3 Hz, 1H, H-2‘), 7.32 (d, ^3J = 8.2 Hz, 1H, H-3‘), 2.31 (s, 3H), 2.29 (s, 3H), **^{13}C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*6): δ [ppm] = 158.18 (s, C-4), 151.54 (s), 136.83 (s), 136.10 (d, C-3), 130.43 (d, C-3‘), 123.24 (d, C-6‘), 119.74 (d, C-2‘), 20.19 (q), 19.46 (q).

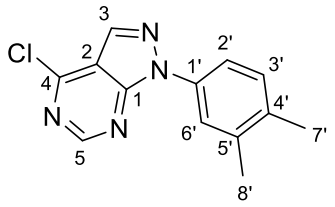
Synthese von 4-Chlor-1-(3,4-Dimethylphenyl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin (64)



63 85 % **64**

Entsprechend Synthesevorschrift **C** wurden 153 mg **63** (0,64 mmol) in 6,4 ml $POCl_3$ (0,1 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere

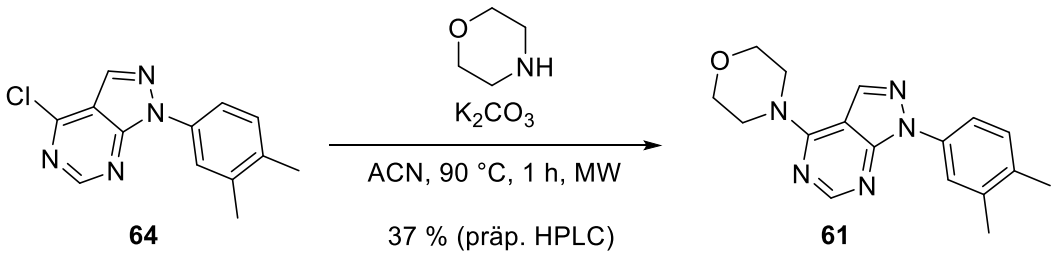
Reinigung in der folgenden Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 140 mg von Pyrazolopyrimidin **64** (0,54 mmol, 85 %) als beiger Feststoff isoliert.



$C_{13}H_{11}ClN_4$
258,71

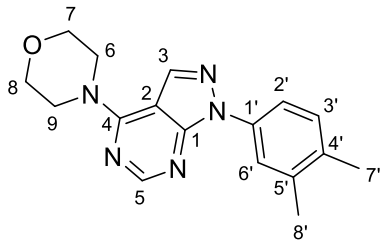
R_f = 0,9 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3108 (w), 2945 (w), 1686 (w), 1605 (s), 1591 (s), 1557 (m), 1537 (m), 1507 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.86 (s, 1H, H-5), 8.32 (s, 1H, H-3), 7.88 (d, ^4J = 2.3 Hz, 1H, H-6‘), 7.85 (dd, ^3J = 8.1 Hz, ^4J = 2.4 Hz, 1H, H-2‘), 7.31 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H, H-3), 2.38 (s, 3H), 2.34 (s, 3H), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 155.39 (s, C-4), 154.76 (d, C-5), 152.37 (s), 137.91 (s), 136.31 (s) 132.94 (d, C-3), 130.34 (d, C-3‘), 122.90 (d, C-6‘), 119.27 (d, C-2‘), 115.13 (s), 20.06 (q), 19.48 (q).

Synthese von 1-(1-(3,4-Dimethylphenyl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-yl)Morpholin (61)



64 **61**

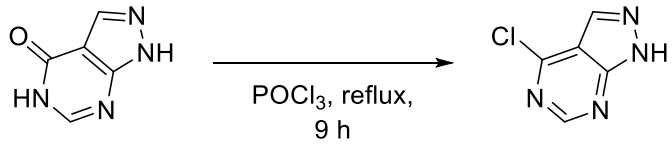
Entsprechend Synthesevorschrift **D** wurden 40 mg **64** (0,15 mmol) mit 26 µl Morpholin (0,3 mmol, 2 Äq.) und 42 mg K_2CO_3 (0,3 mmol, 2 Äq.) in 1 ml ACN (0,15 M) umgesetzt Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 17,1 mg von Pyrazolopyrimidin **61** (0,055 mmol, 37 %) als weißer Feststoff isoliert.



$C_{17}H_{19}N_5O$
309,37

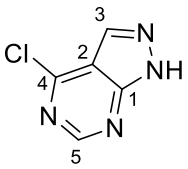
R_f = 0,59 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 310 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{17}H_{20}N_5O^+$): 310,16623 gef.: 310,16543, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =3406 (brz), 2926 (m), 2920 (m), 2857 (m), 1569 (s), 1549 (m), 1505 (m), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.45 (s, 1H, H-5), 8.08 (s, 1H, H-3), 7.83 – 7.74 (m, 2H, H-2‘/6‘), 7.26 (d, ^3J = 7.9 Hz, 1H, H-3‘), 4.00 (dd, ^3J = 5.9, 3.9 Hz, 5H, H-6/9), 3.88 (dd, ^3J = 5.8, 4.0 Hz, 4H, H-7/8), 2.35 (s, 3H, C-7‘/8‘), 2.30 (s, 3H, C-7‘/8‘), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 157.25 (s, C-4), 155.36 (d, C-5), 154.13 (s), 137.54 (s), 136.45 (s), 135.54 (s), 133.19 (d, C-3), 130.13 (d, C-3‘), 123.40 (d, C-6‘), 119.80 (d, C-2‘), 101.56 (s), 66.53 (t, C-7/8), 45.58 (t, C-6/9), 20.08 (q, C-7‘), 19.46 (q, C-8‘).

Synthese von 4-Chlor-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin (71)



9 9,4 % (Flash) **71**

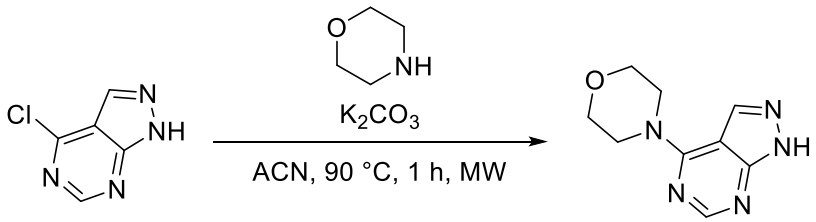
Entsprechend Synthesevorschrift **C** wurden 1 g Allopurinol (**9**, 7,3 mmol) in 7,5 ml $POCl_3$ (1 M) umgesetzt Nach 9 h refluxieren wurde die Reaktionslösung vorsichtig auf Eiswasser/$NaHCO_3$-Lösung gegeben. Die wässrige Phase wurde mit $CHCl_3$/*i*-PrOH (3:1) extrahiert (3x), die organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie gereinigt (CH_2Cl_2/MeOH: 0 % B – 20 % B). Es wurden 107 mg von Chlorpyrazolopyrimidin **71** (0,69 mmol, 9,4 %) als beiger Feststoff isoliert.



$C_5H_3ClN_4$
154,56

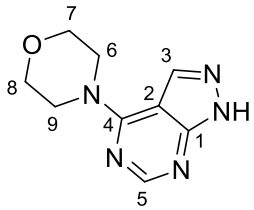
R_f = 0,39 (CH_2Cl_2/MeOH 90:10), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3095 (s), 2932 (s), 1648 (s), 1607 (s), 1465 (m), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.79 (s, 1H, H-5), 8.19 (s, H-3). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.[237]

Synthese von 1-(1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-yl)Morpholin (72)



71 88 % **72**

Entsprechend Synthesevorschrift **D** wurden 113 mg **71** (0,73 mmol) mit 96 µl Morpholin (1,1 mmol, 1,5 Äq.) und 152 mg K_2CO_3 (1,1 mmol, 1,5 Äq.) in 7,3 ml ACN (0,1 M) umgesetzt. (In diesem Ansatz wurden mehrere Chargen von Verbindung **71** vereinigt und zusammen umgesetzt). Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere Reinigung in der folgenden Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 132 mg von Pyrazolopyrimidin **72** (0,64 mmol, 88 %) als beige-weißer Feststoff isoliert.

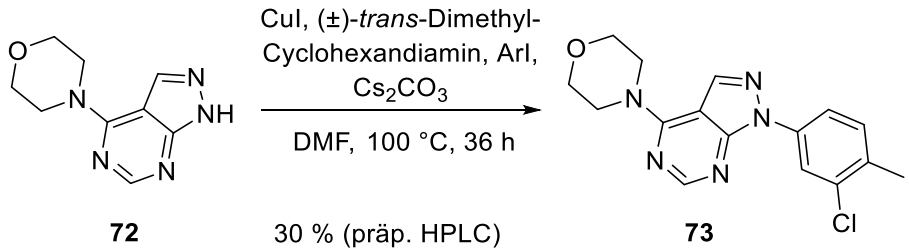


$C_9H_{11}N_5O$
205,22

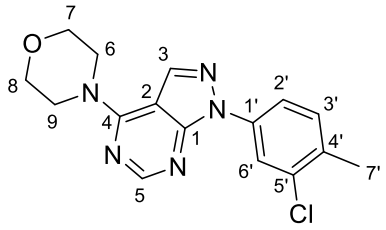
R_f = 0,54 (CH_2Cl_2/MeOH 90:10), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 206 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =3201 (br), 3116 (m), 2923 (s), 2359 (w), 1568 (s), 1506 (s), 1443 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 13.59 (s, NH), 8.29 (s, 1H, H-

3), 8.26 (s, 1H, H-5), 3.91 (dd, ^3J = 5.8, 4.1 Hz, 4H, H-6/9), 3.75 (dd, ^3J = 5.7, 4.1 Hz, 4H, H-7/8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 157.18 (s, C-4), 155.09 (d, C-5), 134.08 (d, C-3), 99.78 (s), 66.33 (t, C-7/8), 45.65 (t, C-6/9).

Synthese von 1-(1-(3-Chlor-4-Methylphenyl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-yl)Morpholin (73)



In einem Mikrowellenvial wurden 40 mg **72** (0,19 mmol), 32 µl 3-Chlor-4-Methyl-1-Iodbenzol (0,23 mmol, 1,2 Äq.), 4 mg CuI (0,019 mmol, 10 mol%), 6 µl (±)-N^1,N^2-Dimethylcyclohexan-1,2-Diamin (0,038 mmol, 20 mol%) und 123 mg Cs_2CO_3 (0,38 mmol, 2 Äq.) in 1 ml DMF (0,2 M) unter Schutzgas suspendiert. Die Reaktion wurde für insgesamt 36 h bei 100 °C gerührt. Anschließend wurde verd. $NaHCO_3$-Lösung hinzugegeben, die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert (3x), die organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 18,7 mg von Pyrazolopyrimidin **73** (0,057 mmol, 30 %) als weißer Feststoff isoliert.

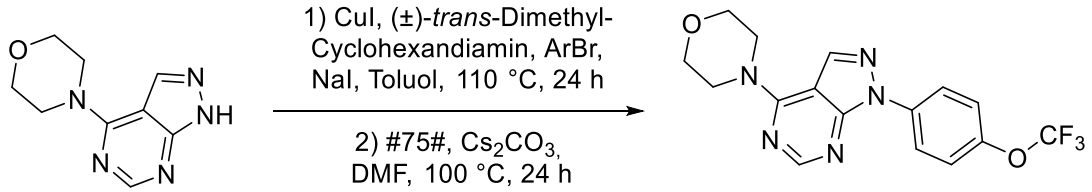


$C_{16}H_{16}ClN_5O$
329,79

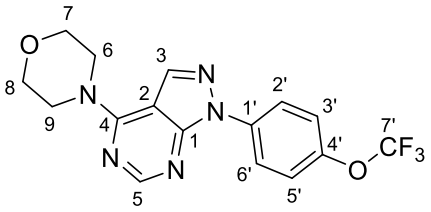
R_f = 0,65 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI$^+$, 3,2 kV): m/z = 330, 332 [M+H]$^+$, **MS** (ESI$^-$, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für [M+H]$^+$ ($C_{16}H_{17}{}^{35}ClN_5O^+$): 330,11161 gef.: 330,11158, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =2961 (w), 2922 (w), 2856 (w), 1608 (w), 1568 (s), 1501 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.46 (s, 1H, H-5), 8.21 (d, ^4J = 2.2 Hz, 1H, H-6‘), 8.09 (s, 1H, H-3), 8.00 (dd, ^3J = 8.3 Hz, ^4J = 2.2 Hz, 1H, H-2‘), 7.35 (d, ^3J = 8.3 Hz, 1H, H-3‘), 4.09 – 3.95 (m, 4H, H-6/9), 3.92 – 3.82 (m, 4H, H-7/8), 2.42 (s, 3H, H-7‘), **^{13}C-NMR** (101

MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 157.22 (s, C-4), 155.53 (d, C-5), 154.39 (s), 137.57 (s), 134.68 (s), 134.38 (s), 133.68 (d, C-3), 131.12 (d, C-3‘), 122.25 (d, C-6‘), 119.81 (d, C-2‘), 101.72 (s), 66.50 (t, C-7/8), 45.56 (t, C-6/9), 19.71 (q, C-7‘).

Synthese von 1-(1-(4-Trifluormethoxyphenyl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-yl)Morpholin (74)



In einem Mikrowellenvial wurden 32 µl 1-Brom-4-Trifluormethoxybenzol (0,23 mmol, 1,2 Äq.), 6 mg CuI (0,032 mmol, 10 mol%), 10 µl (±)-N^1,N^2-Dimethylcyclohexan-1,2-Diamin (0,064 mmol, 20 mol%) und 96 mg NaI (0,64 mmol, 2 Äq.) in 0,8 ml Toluol (0,4 M) unter Schutzgas suspendiert und für 24 h bei 110 °C gerührt. Anschließend wurden 66 mg **72** (0,32 mmol) und 218 mg Cs_2CO_3 (0,67 mmol, 2 Äq.) suspendiert in 0,8 ml DMF (0,4 M) zur Reaktion gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für weitere 24 h bei 110 °C gerührt. Anschließend wurde verd. $NaHCO_3$-Lösung hinzugegeben, die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert (3x), die organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 41 mg von Pyrazolopyrimidin **74** (0,08 mmol, 35 %) als weißer Feststoff isoliert.

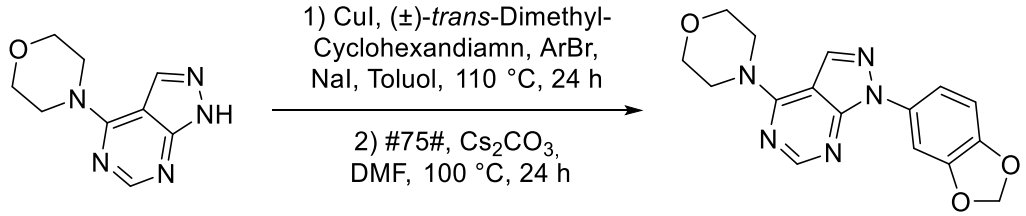


$C_{16}H_{14}F_3N_5O_2$
365,32

R_f = 0,64 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 366 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{16}H_{14}F_3N_5O_2^+$): 366,11723 gef.: 366,11730, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =3122 (w), 3049 (w), 2967 (w), 2922 (w), 2864 (w), 1576 (s), 1552 (s), 1514 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.39 (s, 1H, H-5), 8.21 – 8.12 (m,

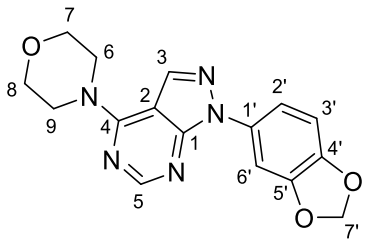
2H, H-2‘/6‘), 8.05 (s, 1H, H-3), 7.30 (dd, ^3J = 9.2 Hz, ^5J = 1.1 Hz, 2H, H-3‘/5‘), 4.02 – 3.90 (m, 4H, H-6/9), 3.82 (dd, ^3J = 5.8, 4.1 Hz, 4H, H-7/8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 157.24 (s, C-4), 155.59 (d, C-5), 154.47 (s), 147.30 (s, C-4‘), 137.36 (s, C-1‘), 133.94 (d, C-3), 123.04 (d, C-2‘/6‘), 121.77 (d, C-3‘/5‘), 101.76 (s), 66.50 (t, C-7/8), 45.59 (t, C-6/9).

Synthese von 1-(1-(3,4-Methylendioxyphenyl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-yl)Morpholin (75)



72 **75**

In einem Mikrowellenvial wurden 29 µl 1-Brom-3,4-Methylendioxybenzol (0,25 mmol, 1,2 Äq.), 4 mg CuI (0,02 mmol, 10 mol%), 6 µl (±)-*N*^{1},*N*^{2}-Dimethylcyclohexan-1,2-Diamin (0,04 mmol, 20 mol%) und 63 mg NaI (0,42 mmol, 2 Äq.) in 0,5 ml Toluol (0,4 M) unter Schutzgas suspendiert und für 24 h bei 110 °C gerührt. Anschließend wurden 43 mg **72** (0,21 mmol) und 75 mg Cs_2CO_3 (0,23 mmol, 2 Äq.) suspendiert in 0,5 ml DMF (0,4 M) zur Reaktion gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für weitere 24 h bei 110 °C gerührt. Anschließend wurde verd. $NaHCO_3$-Lösung hinzugegeben, die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert (3x), die organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 11,6 mg von Pyrazolopyrimidin **75** (0,036 mmol, 17 %) als weißer Feststoff isoliert.

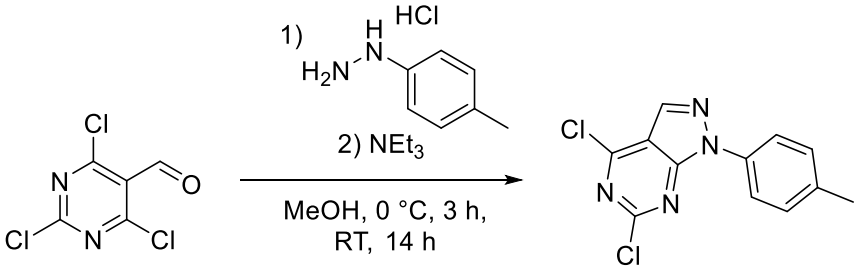


$C_{16}H_{15}N_5O_3$
325,33

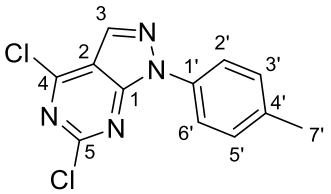
R_f = 0,52 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 326 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{16}H_{16}N_5O_3^+$): 326,12476 gef.: 326,12492, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =3397 (w), 2922 (m), 2853 (m), 1576 (s), 1557 (s), 1505 (s),

1491 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.44 (s, 1H, H-5), 8.08 (s, 1H, H-3), 7.66 – 7.47 (m, 2H, H-2‘/6‘), 6.93 (d, ^{3}J = 8.3 Hz, 1H, H-3‘), 6.04 (s, 2H, H-7‘), 4.02 (t, ^{3}J = 4.9 Hz, 4H, H-6/9), 3.89 (t, ^{3}J = 5.0 Hz, 4H, H-7/8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 157.28 (s, C-4), 155.45 (d, C-5), 154.09 (s), 148.01 (s), 146.47 (s), 133.18 (d, C-3), 132.94 (s, C-1‘), 116.02 (d, C-3‘), 108.25 (d, C-6‘), 104.43 (d, C-2‘), 101.64 (t, C-7‘), 101.52 (s), 66.53 (t, C-7/8), 45.57 (t, C-6/9).

Synthese von 4,6-Dichlor-1-(4-Methylphenyl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin (81)



In einem Rundkolben wurde 100 mg **77** (0,46 mmol) unter Schutzatmosphäre in 1 ml MeOH (0,5 M) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 82 mg 4-Methylphenylhydrazin-Hydrochlorid (0,52 mmol, 1,1 Äq.) gelöst in 0,5 ml MeOH tropfenweise hinzugefügt. Nach der Zugabe wurden 72 µl NEt_3 (0,92 mmol, 2 Äq.) gelöst in 0,5 ml MeOH hinzugegeben. Nach 3 h bei 0 °C wurden erneut 36 µl NEt_3 (0,46 mmol, 1 Äq.) hinzugefügt und die Reaktion bei RT für weitere 14 h gerührt. Nach Zugabe von Wasser und ges. NaCl-Lösung wurde die Mischung mit EtOAc extrahiert (3x), die organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie gereinigt (CyH/EtOAc: 0 % B – 30 % B). Es wurden 60 mg von Pyrazolopyrimidin **81** (0,22 mmol, 47 %) als beige-weißer Feststoff isoliert.

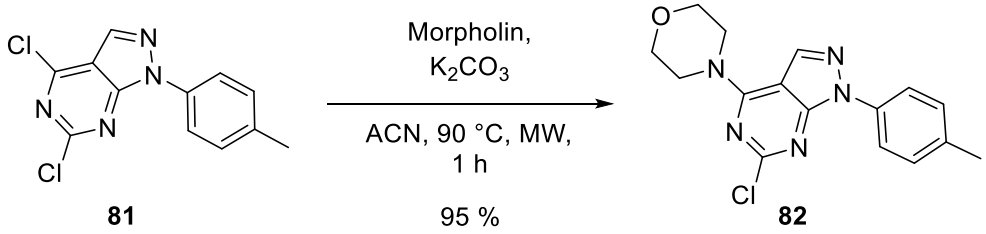


$C_{12}H_8Cl_2N_4$
279,12

R_f = 0,8 (CyH/EtOAc 4:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =2924 (w), 1583 (s), 1536 (s), 1514 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz,

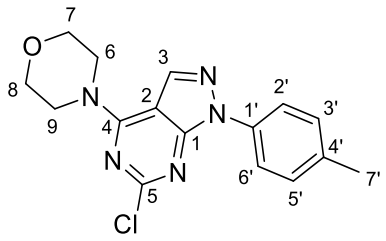
$CDCl_3$): δ [ppm] = 8.30 (s, 1H, H-3), 7.97 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2H, 2‘/6‘), 7.39 – 7.32 (m, 2H, 3‘/5‘), 2.43 (s, 3H), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 157.10 (s), 155.63 (s), 153.39 (s), 137.83 (s, C-4‘), 135.31 (s, C-1‘), 133.37 (d, C-3), 129.97 (d, C-3‘/5‘), 121.53 (d, C-2‘/6‘), 113.95 (s), 21.15 (q, C-7‘).

Synthese von 1-(6-Chlor-1-(4-Methylphenyl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-4-yl)Morpholin (82)



81 95 % **82**

Entsprechend Synthesevorschrift **D** wurden 113 mg **81** (0,41 mmol) mit 36 µl Morpholin (0,41 mmol, 1 Äq.) und 86 mg K_2CO_3 (0,62 mmol, 1,5 Äq.) in 2 ml ACN (0,2 M) umgesetzt. (In diesem Ansatz wurden mehrere Chargen von Verbindung **81** vereinigt und zusammen umgesetzt). Nach Zugabe von dest. Wasser und ges. NaCl-Lösung wurde die Lösung mit CH_2Cl_2 extrahiert (3x), die organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere Reinigung in der folgenden Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 128 mg von Pyrazolopyrimidin **82** (0,39 mmol, 95 %) als weiß-hellgelber Feststoff isoliert.

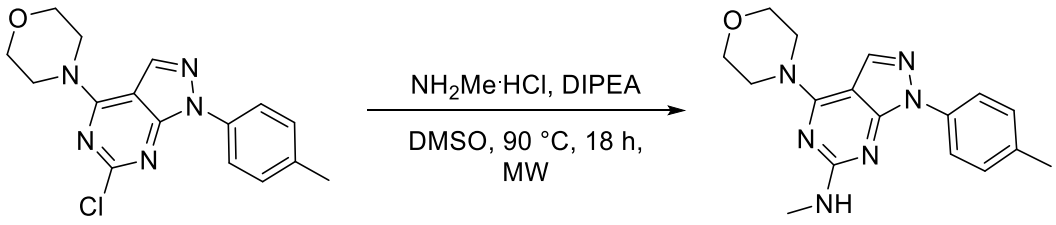


$C_{16}H_{16}ClN_5O$
329,79

R_f = 0,61 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI$^+$, 3,2 kV): m/z = 330, 332 [M+H]$^+$, **MS** (ESI$^-$, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =2959 (m), 2922 (m), 2856 (m), 1569 (s), 1543 (s), 1515 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.92 (s, 1H, H-3), 7.82 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2H, H-2‘/6‘), 7.22 – 7.18 (m, 2H, H-3‘/5‘), 3.86 (t, ^3J = 4.8 Hz, 4H, H-6/9), 3.75 (dd, ^3J = 5.9, 4.0 Hz, 4H, H-7/8), 2.31 (s, 3H, H-7‘), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 157.98 (s, C-4),

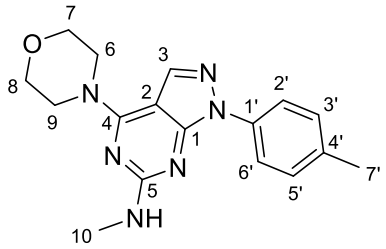
157.17 (s), 155.01 (s), 136.90 (s), 135.94 (s), 133.44 (d, C-3), 129.69 (d, C-3‘/5‘), 121.88 (d, C-2‘/6‘), 100.31 (s), 66.37 (t, C-7/8), 55.14 (t, C-6/9), 21.11 (q, C-7‘).

Synthese von *N*-Methyl-4-Morpholin-1-(4-Methylphenyl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-6-Amin (84)



82 27 % (präp. HPLC) **84**

In einem Mikrowellenvial wurden 37 mg **82** (0,11 mmol), 37 µl DIPEA (0,22 mmol, 2 Äq.) und 37 mg Methylamin-Hydrochlorid (0,55 mmol, 5 Äq.) in 1,1 ml DMSO (0,1 M) unter Schutzatmosphäre gelöst und für 18 h bei 90 °C in der Mikrowelle gerührt. Anschließend wurde dest. Wasser und ges. NaCl-Lösung hinzugegeben und das präzipitierte Rohprodukt abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC aufgreinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 9,7 mg von Pyrazolopyrimidin **84** (0,03 mmol, 27 %) als weißer Feststoff isoliert.

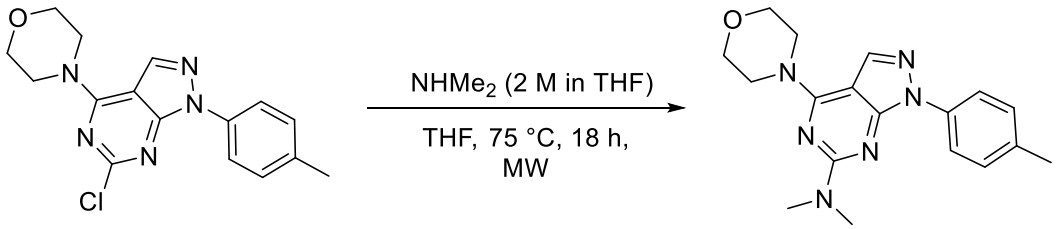


$C_{17}H_{20}N_6O$
324,39

R_f = 0,59 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 325 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{17}H_{21}N_6O^+$): 325,17713 gef.: 325,17698, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =3350 (br), 3116 (w), 2921 (m), 2858 (m), 1572 (s), 1545 (s), 1516 (s), 1447 (m), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.05 (d, ^3J = 8.1 Hz, 2H, H-2‘/6‘), 7.88 (s, 1H, H-3), 7.27 (d, ^3J = 7.8 Hz, 2H, H-3‘/5‘), 5.02 (s, 1H, NH), 3.96 – 3.89 (m, 4H, H-6/9), 3.89 – 3.82 (m, 4H, H-7/8), 3.02 (d, ^3J = 4.7 Hz, 3H, H-10), 2.39 (s, 3H, H-7‘), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 161.49 (s, C-5), 157.63 (s, C-4), 156.78 (s), 137.02 (s), 135.45

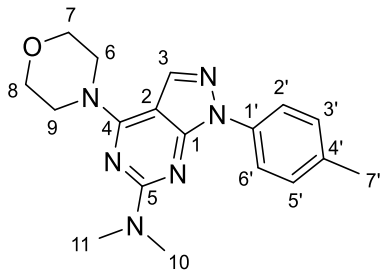
(s), 133.90 (d, C-2), 129.38 (d, C-3‘/5‘), 121.24 (d, -2‘/6‘), 95.54 (s), 66.61 (t, C-7/8), 45.48 (t, C-6/9), 28.53 (q, C-10), 21.04 (q, C-7‘).

Synthese von *N,N*-Dimethyl-4-Morpholin-1-(4-Methylphenyl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-6-Amin (85)



82 47 % (präp. HPLC) **85**

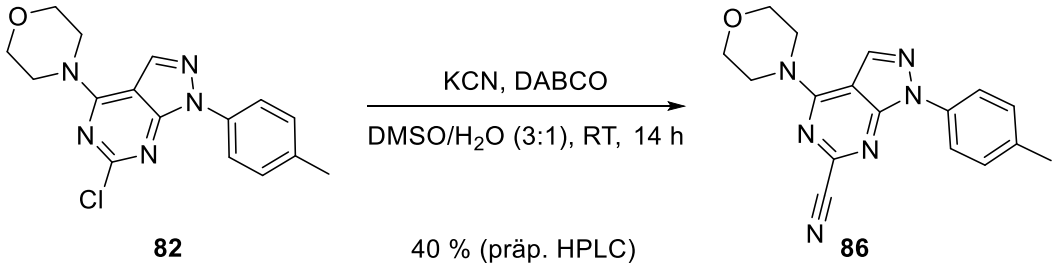
In einem Mikrowellenvial wurden 54 mg **82** (0,16 mmol) in 1,6 ml NH_2Me-Lösung (2 M in THF, entspricht 3,2 mmol, 20 Äq.) unter Schutzatmosphäre gelöst und für 18 h bei 75 °C in der Mikrowelle gerührt. Anschließend wurde dest. Wasser und ges. NaCl-Lösung hinzugegeben und das präzipitierte Rohprodukt abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 20,7 mg von Pyrazolopyrimidin **85** (0,075 mmol, 47 %) als weißer Feststoff isoliert.



$C_{18}H_{22}N_6O$
338,42

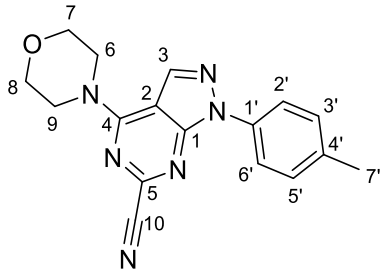
R_f = 0,73 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 339 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{18}H_{23}N_6O^+$): 339,19278 gef.: 339,19260, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =3416 (br), 2916 (m), 2858 (m), 1593 (s), 1567 (s), 1544 (s), 1514 (s), 1476 (m), 1447 (m), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.13 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2H, H-2‘/6‘), 7.86 (s, 1H, H-3), 7.30 – 7.19 (m, 2H, H-3‘/5‘), 3.92 – 3.87 (m, 4H, H-6/9), 3.87 – 3.82 (m, 4H, H-7/8), 3.20 (s, 6H, H-10/11), 2.38 (s, 3H, H-7‘)., **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 160.92 (s, C-5), 157.39 (s, C-4), 157.19 (s), 137.40 (s, C-1‘), 134.92 (s, C-4‘), 133.80 (d, C-3), 129.29 (d, C-3‘/5‘), 120.75 (d, C-2‘/6‘), 95.65 (s), 66.63 (t, C-7/8), 45.47 (t, C-6/9), 37.22 (q, C-10/11), 21.02 (q, C-7‘).

Synthese von 4-Morpholin-1-(4-Methylphenyl)-1*H*-Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin-6-Carbonitril (86)



82 **86**

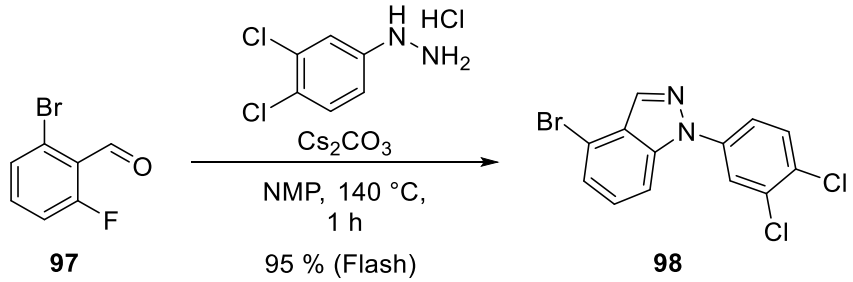
In einem Mikrowellenvial wurden 31 mg **82** (0,1 mmol), 16 mg KCN (0,25 mmol, 2,5 Äq.) und 17 mg DABCO (0,15 mmol, 1,5 Äq.) in 1 ml DMSO/H_2O (3:1, 0,1 M) gelöst und für 14 h bei RT in gerührt. Anschließend wurde dest. Wasser und ges. NaCl-Lösung hinzugegeben und das präzipitierte Rohprodukt abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 12,7 mg von Pyrazolopyrimidin **86** (0,04 mmol, 40 %) als weißer Feststoff isoliert.



$C_{17}H_{16}N_6O$
320,36

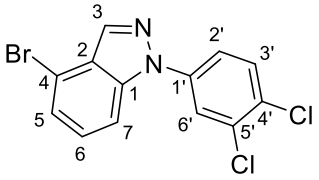
R_f = 0,58 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 321 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 319 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{17}H_{17}N_6O^+$): 321,14583 gef.: 321,14620, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =2961 (w), 2923 (w), 2858 (w), 2309 (m), 1572 (s), 1537 (m), 1516 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.14 (s, 1H, H-3), 7.95 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2H, H-2‘/6‘), 7.38 – 7.30 (m, 2H, H-3‘/5‘), 4.03 (t, ^3J = 4.8 Hz, 4H, H-6/9), 3.89 (t, ^3J = 4.9 Hz, 4H, H-7/8), 2.43 (s, 3H, H-7‘), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 156.82 (s, C-4), 152.99 (s), 140.59 (s, C-5), 137.45 (s, C-1‘), 135.70 (s, C-4‘), 133.37 (d, C-3), 129.78 (d, C-3‘/5‘), 121.99 (d, C-2‘/6‘), 116.62 (s, C-10), 102.06 (s), 66.38 (t, C-7/8), 45.70 (t, C-6/9), 21.13 (q, C-7‘).

Synthese von 4-Brom-1-(3,4-Dichlorphenyl)-1*H*-Indazol (98)



97 **98**

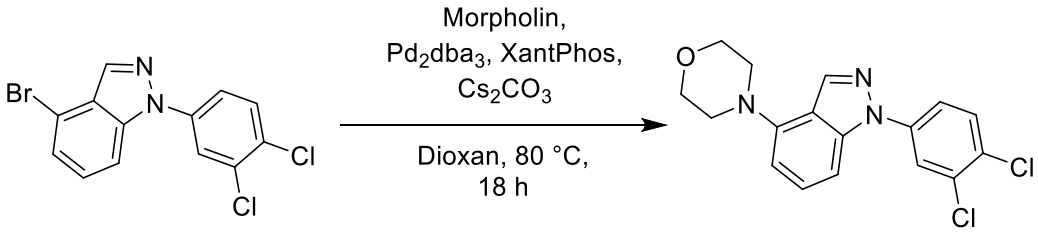
In einem Rundkolben wurden 100 mg **97** (0,5 mmol), 128 mg 3,4-Dichlorphenylhydrazin-Hydrochlorid (0,6 mmol, 1,2 Äq.) und 325 mg Cs_2CO_3 (1 mmol, 2 Äq.) in 1,6 ml NMP (0,3 M) unter Schutzatmosphäre gelöst und für 1 h bei 140 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktion nach Zugabe von dest. Wasser und ges. NaCl-Lösung mit EtOAc extrahiert (3x), die organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie gereinigt (CyH/EtOAc: 0 % B – 30 % B). Es wurden 162 mg von Indazol **98** (0,48 mmol, 95 %) als beiger Feststoff isoliert.



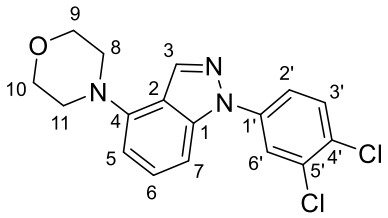
$C_{13}H_7BrCl_2N_2$
342,02

R_f = 0,85 (CyH/EtOAc 4:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =3429 (w), 1596 (s), 1573 (m), 1483 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.24 (d, ^4J = 1.0 Hz, 1H, H-3), 7.86 (dd, ^4J = 2.2, 0.6 Hz, 1H, H-6‘), 7.66 (dt, ^3J = 8.4 Hz, ^4J = 0.8 Hz, 1H, H-5), 7.64 – 7.57 (m, 2H, H-2‘/3‘), 7.42 (dd, ^3J = 7.5 Hz, ^4J = 0.7 Hz, 1H, H-7), 7.33 (dd, ^3J = 8.4, 7.5 Hz, 1H, H-6, Peak auf dem Residual-Signal), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 139.18 (s), 136.34 (d, C-3), 131.18 (d, C-3‘), 128.60 (d, C-6), 126.55 (s), 124.99 (d, C-7), 124.40 (d, C-6‘), 121.63 (d, C-2‘), 111.89 (s), 109.24 (d, C-5).

Synthese von 4-(1-(3,4-Dichlorphenyl)-1*H*-Indazol-4-yl)Morpholin (87)



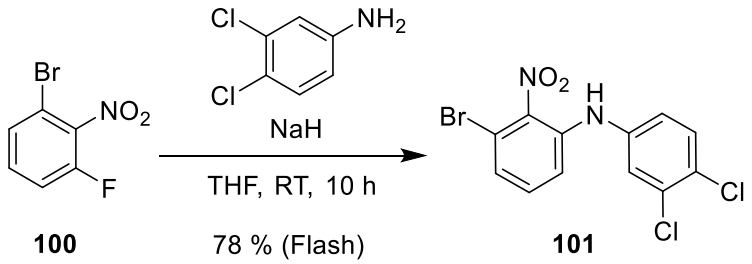
In einem Mikrowellenvial wurden 83 mg **98** (0,24 mmol), 25 µl Morpholin (0,29 mmol, 1,2 Äq.), 11 mg Pd_2dba_3 (0,012 mmol, 5 mol%), 8 mg XantPhos (0,014 mmol, 6 mol%) und 156 mg Cs_2CO_3 (0,48 mmol, 2 Äq.) in 1,2 ml Dioxan (0,2 M) unter Schutzatmosphäre gelöst und für 18 h bei 90 °C gerührt. Nach Zugabe von dest. Wasser und ges. NaCl-Lösung wurde die Lösung mit EtOAc extrahiert (3x), die organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 18,8 mg von Indazol **87** (0,053 mmol, 22 %) als weißer Feststoff isoliert.



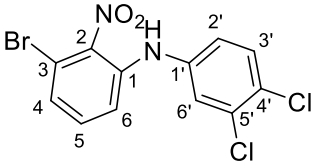
$C_{17}H_{15}Cl_2N_3O$
348,23

R_f = 0,78 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 348, 350 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{17}H_{16}{}^{35}Cl_2N_3O^+$): 348,06649 gef.: 348,06626, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =3386 (br), 2963 (m), 2892 (m), 2855 (m), 2823 (m), 1588 (s), 1504 (s), 1482 (s), 1450 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.18 (s, 1H, H-3), 7.86 (m, 1H, H-6‘), 7.62 – 7.57 (m, 2H, H-2‘/3‘), 7.40 – 7.29 (m, 2H, H-5, H-6), 6.65 (d, ^3J = 7.3 Hz, 1H, H-7), 4.04 – 3.94 (m, 4H, H-9/10), 3.37 – 3.2 (m, 4H, H-8/11), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 146.38 (s, C-4), 140.30 (s, C-1), 139.48 (s, C-1‘), 134.76 (d, C-3), 133.41 (s), 131.01 (d, C-3‘), 130.34 (s), 128.79 (d, C-6), 124.43 (d, C-3‘), 121.68 (d, C-2‘), 118.92 (s, C-2), 107.81 (d, C-7), 103.87 (d, C-5), 66.93 (t, C-9/10), 51.88 (t, C-8/11).

Synthese von 3-Brom-*N*-(3,4-Dichlorphenyl)-2-Nitroanilin (101)



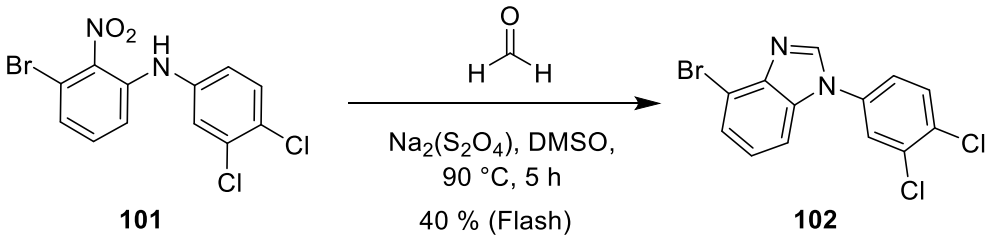
In einem Rundkolben wurden 135 mg 3,4-Dichloranilin (0,825 mmol, 1,1 Äq.) in 7,5 ml THF (0,1 M) unter Schutzatmosphäre gelöst. Anschließend wurden 45 mg festes NaH (60 % Dispersion, 1,13 mmol, 1,5 Äq.) in einer Portion hinzugegeben und die Reaktion wurde für 10 min bei RT gerührt. Danach wurden 165 mg **100** (0,75 mmol) hinzugegeben und die Reaktion wurde für 10 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von dest. Wasser und ges. NaCl-Lösung wurde die Lösung mit EtOAc extrahiert (3x), die organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie gereinigt (CyH/EtOAc: 0 % B – 40 % B). Es wurden 213 mg von Nitroanilin **101** (0,59 mmol, 78 %) als gelb-oranger Feststoff isoliert.



$C_{12}H_7BrCl_2N_2O_2$
362,00

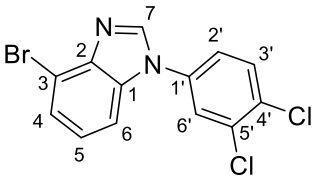
R_f = 0,48 (CyH/EtOAc 4:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 359, 361, 363 $[M-H]^-$, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =3375 (br), 2952 (m), 2853 (m), 1724 (w), 1588 (s), 1560 (s), 1538 (s), 1499 (s), 1472 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.39 (d, ^3J = 8.6 Hz, 1H, H-3‘), 7.26 – 7.16 (m, 4H, H-4, H-5, H-6, H-6‘), 7.02 (br, 1H, NH), 6.96 (dd, ^3J = 8.7, ^4J = 2.6 Hz, 1H, H-2‘), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 159.30 (s, C-2), 140.41 (s), 132.55 (d, C-5), 131.28 (d, C-3‘), 127.47 (s), 126.13 (d, C-4), 122.40 (d, C-6), 120.24 (d, C-2‘), 117.23 (d, C-6‘).

Synthese von 4-Brom-1-(3,4-Dichlorphenyl)-1*H*-Benzo[d]imidazol (102)



101 **102**

Entsprechend Synthesevorschrift **E**[29] wurden 80 mg **101** (0,22 mmol), 115 mg $Na_2(S_2O_4)$ (0,66 mmol, 3 Äq.) und 10 mg Paraformaldehyd (0,33 mmol, 1,5 mmol) in 1,1 ml DMSO (0,2 M) umgesetzt. Nach 3 h wurden erneut 10 mg Paraformaldehyd hinzugegeben und die Reaktion für weitere 2 h bei 90 °C gerührt. Anschließend wurde nach Zugabe von dest. Wasser und ges. $NaHCO_3$-Lösung die Lösung mit EtOAc extrahiert (3x), die organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie gereinigt (CyH/EtOAc: 0 % B – 30 % B). Es wurden 30 mg von Benzimidazol **102** (0,088 mmol, 40 %) als beige-gelber Feststoff isoliert.

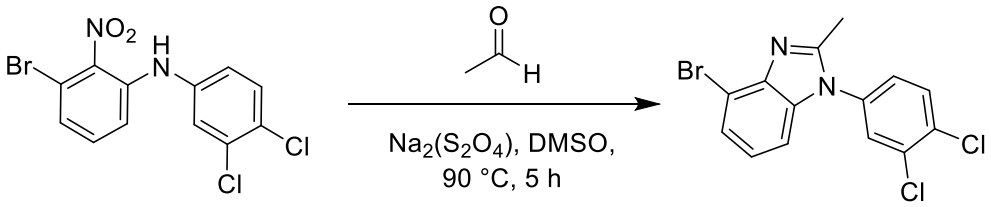


$C_{13}H_7BrCl_2N_2$
342,02

R_f = 0,73 (CyH/EtOAc 4:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 341, 343, 345 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =3084 (w), 2929 (w), 1706 (m), 1536 (s), 1495 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.31 (s, 1H, H-7), 7.69 (d, ^3J = 8.6 Hz, 1H, H-3‘), 7.66 (d, ^4J = 2.5 Hz, 1H, H-6‘), 7.59 (dd, ^3J = 7.7 Hz, ^4J = 0.9 Hz, 1H, H-4), 7.46 (dd, ^3J = 8.2 Hz, ^4J = 0.9 Hz, 1H, H-6), 7.41 (dd, ^3J = 8.5 Hz, ^4J = 2.5 Hz, 1H, H-2‘), 7.30 – 7.24 (m, 2H, H-5), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 141.71 (d, C-7), 134.92 (s), 133.70 (s), 133.20 (s), 131.97 (d, C-3‘), 126.80 (d, C-4), 126.38 (s) 126.10 (d, C-6‘), 125.50 (d, C-5), 123.48 (d, C-2‘), 113.96 (s), 109.65 (d, C-6).

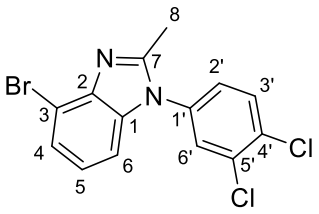
[29] Siehe Kap. 6.4.1

Synthese von 4-Brom-1-(3,4-Dichlorphenyl)-2-Methyl-1*H*-Benzo[d]imidazol (104)



101 **104**

Entsprechend Synthesevorschrift **E**[30] wurden 40 mg **101** (0,11 mmol), 57 mg $Na_2(S_2O_4)$ (0,22 mmol, 3 Äq.) und 10 µl Acetaldehyd (0,16 mmol, 1,5 mmol) in 0,6 ml DMSO (0,2 M) umgesetzt. Nach 3 h wurden erneut 10 µl Acetaldehyd hinzugegeben und die Reaktion für weitere 2 h bei 90 °C gerührt. Anschließend wurde nach Zugabe von dest. Wasser und ges. $NaHCO_3$-Lösung die Lösung mit EtOAc extrahiert (3x), die organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie gereinigt (CyH/EtOAc: 0 % B – 30 % B). Es wurden 21 mg von Benzimidazol **104** (0,058 mmol, 53 %) als beiger Feststoff isoliert.

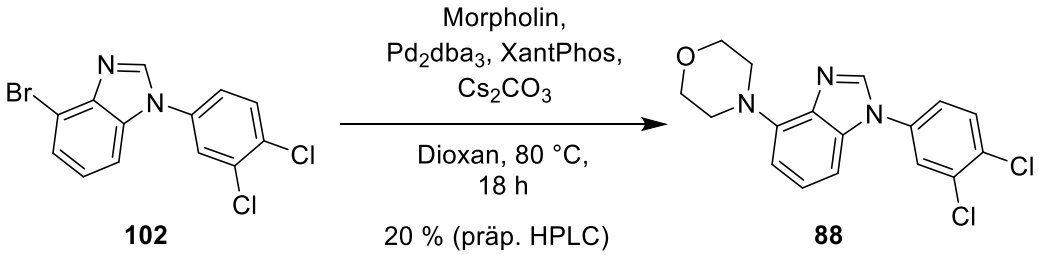


$C_{14}H_9BrCl_2N_2$
356,04

R_f = 0,78 (CyH/EtOAc 4:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 355, 357, 359 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.69 (d, ^3J = 8.5 Hz, 1H, H-3‘), 7.50 (d, ^4J = 2.4 Hz, 1H, H-6‘), 7.48 (dd, ^3J = 7.5 Hz, ^4J = 1.2 Hz, 1H, H-4), 7.24 (dd, ^3J = 8.5 Hz, ^4J = 2.4 Hz, 1H, H-2‘), 7.10 (dd, ^3J = 8.1, 7.4 Hz, 1H, H-5), 7.05 (dd, ^3J = 8.1, ^4J = 1.2 Hz, 1H, H-6), 2.56 (s, 3H), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 151.99 (s, C-7), 136.44 (s), 134.95 (s), 134.24 (s), 133.90 (s), 131.84 (d, C-3‘), 129.01 (d, C-6‘), 126.41 (d, C-4), 125.98 (d, C-2‘), 124.04 (d, C-5), 112.64 (s), 108.96 (d, C-6), 14.48 (q, C-8).

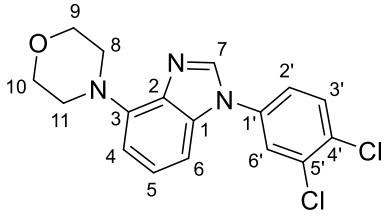
[30] Siehe Kap. 6.4.1

Synthese von 4-(1-(3,4-Dichlorphenyl)-1*H*-Benzo[d]imidazol-4-yl)Morpholin (88)



102 **88**

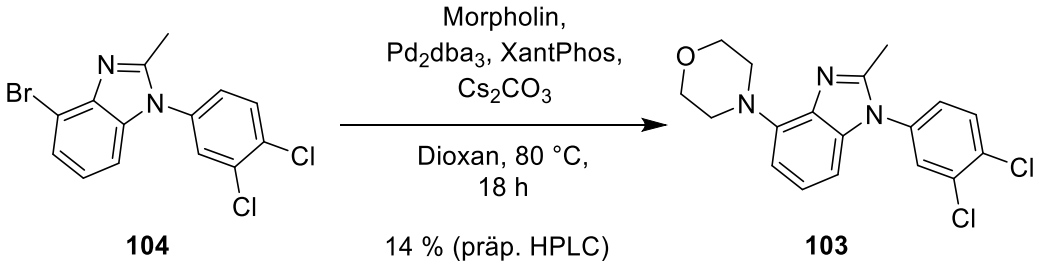
In einem Mikrowellenvial wurden 28 mg **102** (0,08 mmol), 8,5 µl Morpholin (0,1 mmol, 1,2 Äq.), 7 mg Pd_2dba_3 (0,008 mmol, 10 mol%), 4,6 mg XantPhos (0,008 mmol, 10 mol%) und 52 mg Cs_2CO_3 (0,16 mmol, 2 Äq.) in 0,8 ml Dioxan (0,2 M) unter Schutzatmosphäre gelöst und für 18 h bei 90 °C gerührt. Nach Zugabe von dest. Wasser und ges. NaCl-Lösung wurde die Lösung mit EtOAc extrahiert (3x), die organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 5,7 mg von Benzimidazol **88** (0,016 mmol, 20 %) als weiß-hellgelber Feststoff isoliert.



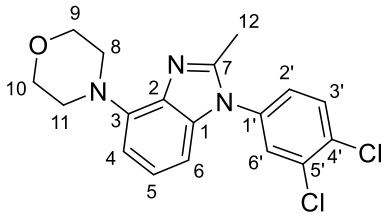
$C_{17}H_{15}Cl_2N_3O$
348,23

R_f = 0,47 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 348, 350 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): ber. für $[M+H]^+$ ($C_{17}H_{16}{}^{35}Cl_2N_3O$): 348,06649, gef.: 348,06692, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =3385 (br), 2959 (m), 2921 (m), 2853 (m), 1664 (m), 1588 (s), 1494 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.02 (s, 1H, H-7), 7.66 (d, ^3J = 8.5 Hz, 1H, H-3‘), 7.64 (d, ^4J = 2.3 Hz, 1H, H-6‘), 7.38 (dd, ^3J = 8.6 Hz, ^4J = 2.5 Hz, 1H, H-2‘), 7.29 (t, ^3J = 8.0 Hz, 1H, H-5), 7.14 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H, H-6), 4.24 – 3.94 (m, 4H, H-9/10), 3.78 – 3.58 (m, 4H, H-8/11), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 138.86 (d, C-7), 135.60 (s), 134.84 (s), 134.21 (s), 131.78 (d, C-3‘), 126.12 (d, C-6‘), 125.16 (d, C-5), 123.48 (d, C-2‘), 103.75 (d, C-6), 66.73 (t, 9/10), 50.91 (t, C-8/11).

Synthese von 4-(1-(3,4-Dichlorphenyl)-2-Methyl-1*H*-Benzo[d]imidazol-4-yl)Morpholin (103)



In einem Mikrowellenvial wurden 21 mg **104** (0,06 mmol), 8 µl Morpholin (0,09 mmol, 1,5 Äq.), 5,5 mg Pd_2dba_3 (0,006 mmol, 10 mol%), 3,5 mg XantPhos (0,006 mmol, 10 mol%) und 40 mg Cs_2CO_3 (0,12 mmol, 2 Äq.) in 0,6 ml Dioxan (0,2 M) unter Schutzatmosphäre gelöst und für 18 h bei 90 °C gerührt. Nach Zugabe von dest. Wasser und ges. NaCl-Lösung wurde die Lösung mit EtOAc extrahiert (3x), die organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 3,1 mg von Benzimidazol **103** (0,0084 mmol, 14 %) als weiß-hellgelber Feststoff isoliert.



$C_{18}H_{17}Cl_2N_3O$
362,25

R_f = 0,36 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 362, 364 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{18}H_{18}{}^{35}Cl_2N_3O^+$): 362,08214 gef.: 362,08189, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =3412 (br), 3065 (w), 2955 (m), 2853 (m), 2821 (m), 1590 (s), 1530 (m), 1498 (m), 1477 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.67 (d, ^3J = 8.5 Hz, 1H, H-3‘), 7.50 (d, ^4J = 2.4 Hz, 1H, H-6‘), 7.24 (dd, ^3J = 8.5 Hz, ^4J = 2.4 Hz, 1H, H-2‘), 7.17 (t, ^3J = 7.9 Hz, 1H, H-5), 6.73 (d, ^3J = 8.1 Hz, 2H, H-4, H-6), 4.06 – 3.99 (m, 4H, H-9/10), 3.62 – 3.48 (m, 4H, H-8/11), 2.55 (s, 3H, H-12), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 148.06 (s, C-7), 142.53 (s), 137.14 (s), 134.02 (s), 131.66 (d, C-3‘), 129.11 (d, C-6‘), 126.52 (d, C-2‘), 123.94 (d, C-5), 108.44 (d, C-6), 103.14 (d, C-4), 67.09 (t, 9/10), 50.58 (t, C-8/11), 14.27 (q, C-12).

6.4 Synthese von Derivaten basierend auf NUCC555

6.4.1 Allgemeine Synthesevorschriften

Die allgemeinen Synthesevorschriften wurden generell wie beschrieben in den jeweiligen Reaktionen angewendet. Abweichungen bei den eingesetzten Äquivalenten, der Reaktionszeit, der Aufarbeitung oder Reinigung wurden in den entsprechenden Reaktionen beschrieben.

Allgemeine Synthesevorschrift **E**:

Das entsprechende 2-Nitroanilin (1 Äq.), $Na_2(S_2O_4)$ (3 Äq.) und der entsprechende Aldehyd (1,1 - 1,5 Äq.) wurden in trockenem DMSO (0,2 M) unter Schutzatmosphäre in einem Mikrowellenvial gelöst und für 4 h auf 90 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde dest. Wasser und ges. $NaHCO_3$-Lösung hinzugegeben und die Lösung mit EtOAc extrahiert (3x). Die organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt.

Allgemeine Synthesevorschrift **F**:

Der entsprechende Benzoesäureester (1 Äq.) wurde in einem Rundkolben in MeOH (0,1 – 0,5 M) gelöst und mit 2 M NaOH-Lösung (1,05 – 2 Äq.) versetzt. Die Reaktion wurde für 4 h bei 55 °C gerührt. Zur Aufarbeitung wurden zwei Methoden angewandt:

1) Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt und die Benzoesäure wurde als Na-Salz in der nächsten Reaktion verwendet (der Überschuss an NaOH wurde in der Folgereaktion miteinbezogen).

2) Der pH-Wert wurde mit verd. HCl-Lösung auf pH = 3 eingestellt, die Lösung wurde extrahiert (3x), die organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt.

Allgemeine Synthesevorschrift **G**:

Die entsprechende Benzosäure (freie Säure oder Na-Salz, 1 Äq.) wurde in einem Rundkolben in trockenem CH_2Cl_2 (0,1 – 0,5 M) unter Schutzatmosphäre gelöst und bei RT mit $(COCl)_2$ (1,5 – 2 Äq., überschüssiges NaOH aus der vorherigen Reaktion musste beachtet werden) und DMF (katalytisch) versetzt. Nach 2 h wurde das Lösemittel *in vacuo* entfernt, und das Säurechlorid

erneut in trockenem CH_2Cl_2 (0,1 – 0,5 M) unter Schutzatmosphäre gelöst. Anschließend wurde die Lösung auf 0 °C gekühlt und das entsprechende Amin (2 - 4 Äq.) wurde tropfenweise hinzugegeben. Die Reaktion wurde für weitere 14 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurde dest. Wasser und ges. NaCl-Lösung hinzugegeben und die Lösung mit CH_2Cl_2 extrahiert (3x). Die organischen Phasen wurde mit ges. $NaHCO_3$-Lösung und ges. NH_4Cl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt.

Allgemeine Synthesevorschrift **H**:

Das entsprechende Arylbromid (1 Äq.), NaN_3 (3 Äq.), CuI (30 mol%.), DMEDA (30 - 35 mol%) und Na-*L*-Ascorbat (10 mol%) wurden in einem Mikrowellenvial in EtOH/H_2O (2:1) gelöst und für 1 h in der Synthesemikrowelle bei 100 W auf 90 °C erhitzt (falls nach 1 h Reaktionszeit ein Gemisch aus Amid und Azid vorlag, wurde erneut CuI (30 mol%) und Na-*L*-Ascorbat (10 mol%.) hinzugegeben und für 1 h auf 90 °C erhitzt). Nach dem Abkühlen auf RT wurde dest. Wasser und ges. $NaHCO_3$-Lösung hinzugegeben und die Lösung mit CH_2Cl_2 oder $CHCl_3$/*i*-PrOH (3:1) extrahiert (3x). Die organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt.

WICHTIG: Die wässrige Phase wurde gesammelt und überschüssiges NaN_3 mit H_2SO_4 und $NaNO_2$ abgebaut.

Falls nach der Extraktion eine Mischung aus gewünschtem Amin und Azid vorlag, wurde das Rohprodukt erneut in MeOH (0,1 M) gelöst und mit NH_4COOH (3 Äq.) und Zn (2 Äq.) versetzt. Die Reaktion wurde für 3 h bei RT gerührt, anschließend durch einen Spritzenvorsatzfilter filtriert und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde in Lösemittel aufgenommen, die organische Phase mit ges. $NaHCO_3$ gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt.

Allgemeine Synthesevorschrift **I**:

Das entsprechende Amin (1 Äq.) wurde in trockenem CH_2Cl_2 (0,05 – 0,2 M) unter Schutzatmosphäre gelöst und mit EDCI·HCl (1,5 Äq.) und DMAP (1,5 Äq.) versetzt. Anschließend wurde bei RT die entsprechende Säure (2 Äq.) hinzugegeben und die Reaktion für 14 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurde dest. Wasser und ges. NaCl-Lösung hinzugegeben und die Lösung mit CH_2Cl_2 extrahiert (3x). Die organischen Phasen wurde mit ges. $NaHCO_3$-

Lösung und ges. NH_4Cl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde im Anschluss chromatographisch gereinigt.

Allgemeine Synthesevorschrift **J**:

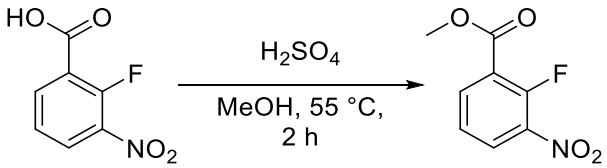
Das entsprechende Arylbromid (1 Äq.), CuI (5 - 10 mol%), BTMPO (5 - 10 mol%) und K_3PO_4 (1,5 - 2,5 Äq.) wurden in einem Mikrowellenvial in trockenem DMSO (0,1 – 0,2 M) unter Schutzamtosphäre gelöst. Anschließend wurde das entsprechende Amin (2 Äq.) hinzugegeben und die Reaktion auf 110 °C erhitzt. Die Reaktionszeit variierte stark zwischen den verschiedenen Substraten. Nach dem Abkühlen auf RT wurde dest. Wasser und ges. NaCl-Lösung hinzugegeben und die Lösung mit CH_2Cl_2 oder $CHCl_3$/*i*-PrOH (3:1) extrahiert (3x). Die organischen Phasen wurde mit ges. $NaHCO_3$-Lösung und ges. NH_4Cl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde im Anschluss chromatographisch gereinigt.

Entsprechend der Literatur hergestellte Reagenzien:

- 4-Pyrridinbenzaldehyd: A. I. M. Ibrahim, E. Batlle, S. Sneha, R. Jiménez, R. Pequerul, X. Parés, T. Rüngeler, V. Jha, T. Tuccinardi, M. Sadiq et al., *J.Med. Chem.* **2022**, *65*, 3833.
- 4-Morpholinbenzaldehyd: A. I. M. Ibrahim, E. Batlle, S. Sneha, R. Jiménez, R. Pequerul, X. Parés, T. Rüngeler, V. Jha, T. Tuccinardi, M. Sadiq et al., *J.Med. Chem.* **2022**, *65*, 3833.
- BTMPO: S. Voth, J. W. Hollett, J. A. McCubbin, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 2545. und M. Fan, W. Zhou, Y. Jiang, D. Ma, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2016**, *55*, 6211.

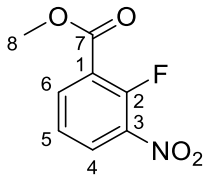
6.4.2 Derivate der 1. Generation

Synthese von Methyl-2-Fluor-3-Nitrobenzoat (120)



119 95 % (Lit. 95 %) **120**

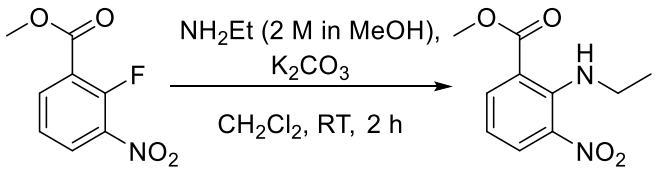
In einem Rundkolben wurden 555 mg (3 mmol) 2-Fluor-3-Nitrobenzoesäure (**119**) in 6 ml MeOH (0,5 M) gelöst und mit einigen Tropfen H_2SO_4 versetzt. Die Reaktion wurde für 2 h bei 55 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel *in vacuo* entfernt, der Rückstand in CH_2Cl_2 aufgenommen und mit dest. Wasser und ges. $NaHCO_3$-Lösung gewaschen. Die organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere Reinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 570 mg von Ester **120** (2,85 mmol, 95 %) als weißer Feststoff isoliert.



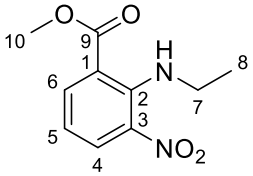
$C_8H_6FNO_4$
199,14

R_f = 0,75 (CyH/EtOAc 4:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3090 (w), 2957 (w), 1722 (s), 1613 (m), 1588 (m), 1529 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.21 (dddd, ^2J = 12.1 Hz, ^3J = 8.4, 6.3 Hz, ^4J = 1.9 Hz, 2H, H-4, H-6), 7.38 (td, ^3J = 8.1 Hz, ^4J = 1.3 Hz, 1H, H-5), 3.99 (s, 3H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 165.03 (s, C-7), 154.68 (s, C-3), 138.63 (s, C-2), 137.24 (d, C-6), 129.90 (d, C-4), 124.00 (d, C-5), 121.68 (s, C-1), 53.08 (q, C-8). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.[260]

Synthese von Methyl-2-(Ethylamino)-3-Nitrobenzoat (121)



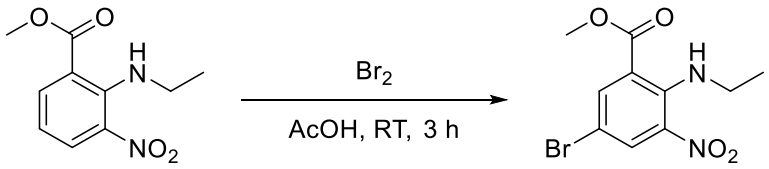
In einem Rundkolben wurden 564 mg **120** (2,83 mmol) und 783 mg K_2CO_3 (5,66 mmol, 2 Äq.) in 15 ml CH_2Cl_2 (0,2 M) unter Schutzatmosphäre suspendiert. Anschließend wurden 5,66 ml NH_2Et (2 M in MeOH, entsprach 11,33 mmol, 4 Äq.) tropfenweise hinzugegeben und für 2 h gerührt. Nach Zugabe von dest. Wasser und CH_2Cl_2 wurden die Phasen separiert. Die organischen Phasen wurden erneut mit dest. Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere Reinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 631 mg von Nitroanilin **121** (2,83 mmol, ~99 %) als gelb-oranger Feststoff isoliert.



$C_{10}H_{12}N_2O_4$
224,22

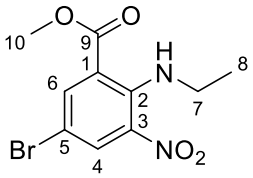
R_f = 0,83 (CyH/EtOAc 4:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 225 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3299 (m), 3266 (m), 3077 (w), 2982 (m), 2959 (m), 1686 (s), 1587 (m), 1526 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.24 (t, ^3J = 4.6 Hz, 1H, NH), 7.85 (dd, ^3J = 7.7 Hz, ^4J = 1.8 Hz, 1H, H-6), 7.74 (dd, ^3J = 8.2 Hz, ^4J = 1.8 Hz, 1H, H-4), 6.47 (t, ^3J = 7.9 Hz, 1H, H-5), 3.75 (s, 3H, H-10), 2.81 (qd, ^3J = 7.1, 4.5 Hz, 2H, H-7), 1.14 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 167.81 (s, C-9), 145.50 (s), 136.94 (s), 136.73 (d, C-6), 131.45 (d, C-4), 116.31 (s, C-1), 114.06 (d, C-5), 52.30 (q, C-10), 41.45 (t, C-7), 15.54 (q, C-8).

Synthese von Methyl-5-Brom-2-(Ethylamino)-3-Nitrobenzoat (122)



121 ~99 % **122**

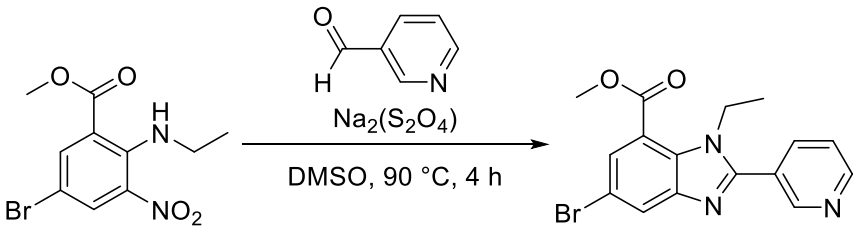
In einem Rundkolben wurden 626 mg **121** (2,8 mmol) in 12 ml CH_2Cl_2 und 12 ml Eisessig unter Schutzatmosphäre gelöst. Anschließend wurden 172 µl Br_2 (3,35 mmol, 1,2 Äq.), gelöst in 12 ml AcOH, tropfenweise bei RT hinzugefügt und für 3 h gerührt. Anschließend wurde die Reaktion auf eisgekühlte verd. $NaHSO_3$-Lösung gegeben und für 10 min bei 0 °C gerührt. Die wässrige Lösung wurde anschließend mit CH_2Cl_2 extrahiert (3x), die organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere Reinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 849 mg von Nitroanilin **122** (2,8 mmol, ~99 %) als orange-roter Feststoff isoliert.



$C_{10}H_{11}BrN_2O_4$
303,11

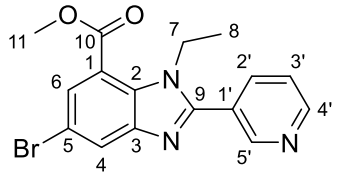
R_f = 0,95 (CyH/EtOAc 4:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 303, 305 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3314 (br), 3081 (w), 2953 (m), 1727 (m), 1696 (s), 1601 (s), 1573 (m), 1526 (s), 1503 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.12 (d, ^4J = 2.5 Hz, 1H, H-6), 8.03 (d, ^4J = 2.6 Hz, 1H, H-4), 3.92 (s, 3H, H-10), 2.95 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H, H-7), 1.29 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 166.67 (s, C-9), 144.33 (s), 138.99 (d, C-6), 137.23 (s), 133.51 (d, C-4), 117.55 (s), 104.50 (s, C-5), 52.62 (q, C-10), 41.50 (t, C-7), 15.46 (q, C-8).

Synthese von Methyl-5-Brom-1-Ethyl-2-(Pyridin-3-yl)-1*H*-Benzo[d]imidazol-7-Carboxylat (124)



122 96 % **124**

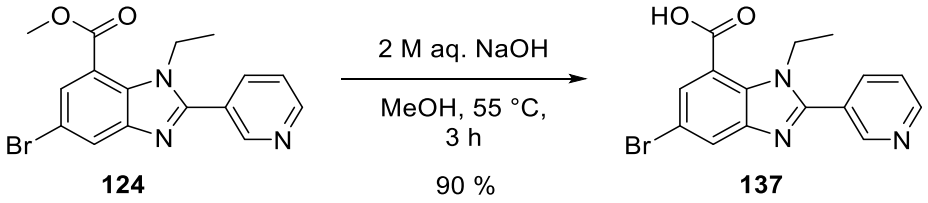
Entsprechend Synthesevorschrift **E** wurden 200 mg **122** (0,66 mmol), 348 mg $Na_2(S_2O_4)$ (2 mmol, 3 Äq.) und 94 µl Nicotinaldehyd (1 mmol, 1,5 Äq.) in 3,3 ml DMSO (0,2 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere Reinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 228 mg von Ester **124** (0,63 mmol, 96 %) als weiß-hellgelber Feststoff isoliert.



$C_{16}H_{14}BrN_3O_2$
360,21

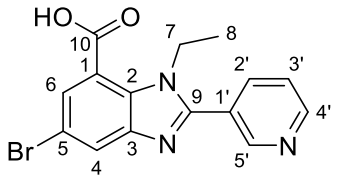
R_f = 0,52 (EtOAc), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 360, 362 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3002 (w), 2951 (w), 1796 (s), 1679 (w), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.95 (dd, ^4J = 2.3, 0.9 Hz, 1H, H-5‘), 8.80 (dd, ^3J = 4.9, ^4J = 1.7 Hz, 1H, H-4‘), 8.13 (d, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-4), 8.08 – 8.02 (m, 1H, H-2‘), 7.97 (d, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-6), 7.51 (ddd, ^3J = 7.9, 4.9 Hz, ^4J = 0.9 Hz, 1H, H-3‘), 4.61 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H, H-7), 4.02 (s, 3H, H-11), 1.13 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 165.61 (s, C-10), 154.15 (s), 151.17 (d, C-4‘), 150.05 (d, C-5‘), 146.38 (s), 137.18 (d, C-2‘), 131.72 (s), 128.95 (d, C-6), 127.27 (s), 126.51 (d, C-4), 123.59 (d, C-3‘), 118.33 (s), 114.54 (s), 52.91 (q, C-11), 42.04 (t, C-7), 15.51 (q, C-8).

Synthese von 5-Brom-1-Ethyl-2-(Pyridin-3-yl)-1*H*-Benzo[d]imidazol-7-Carbonsäure (137)



124 **137**

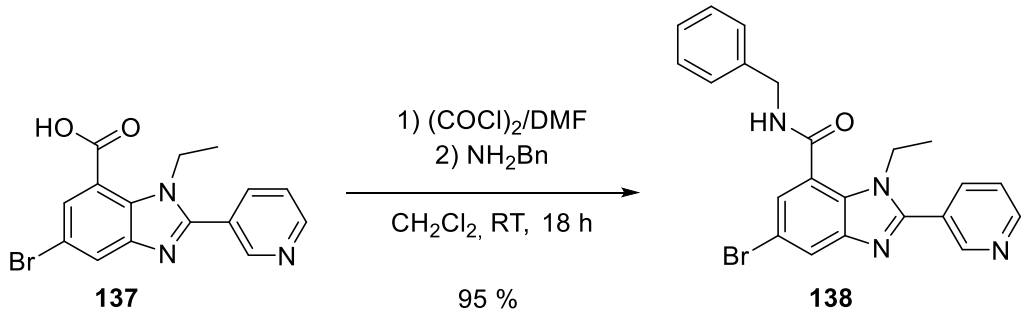
Entsprechend Synthesevorschrift **F** wurden 103 mg **124** (0,29 mmol) in 4 ml MeOH und 2 ml aq. NaOH (2 M) umgesetzt. Anschließend wurde die Reaktionslösung entsprechend der Vorschrift **F** mit HCl-Lösung auf pH-Wert = 3 gestellt und mit EtOAc extrahiert (3x). Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere Reinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 90 mg von Carbonsäure **137** (0,26 mmol, 90 %) als weißer Feststoff isoliert.



$C_{15}H_{12}BrN_3O_2$
346,18

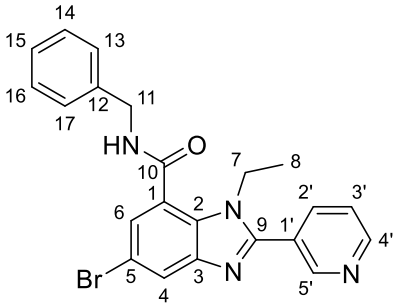
R_f = 0,07 (EtOAc), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 346, 348 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 344, 346 $[M-H]^-$, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3374 (br), 1575 (s), 1405 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 8.97 – 8.92 (m, 1H, H-5‘), 8.79 (dd, ^3J = 5.0 Hz, ^4J = 1.6 Hz, 1H, H-4‘), 8.23 (dt, ^3J = 7.9 Hz, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-2‘), 7.84 (d, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-4), 7.70 (ddd, ^3J = 8.0, 5.0 Hz, ^4J = 0.9 Hz, 1H, H-3‘), 7.62 (d, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-6), 4.64 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H, H-7), 1.25 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 172.56 (s, C-10), 152.55 (s), 150.36 (d, C-4‘), 149.29 (d, C-5‘), 144.58 (s), 137.70 (d, C-2‘), 129.25 (s), 126.78 (s), 125.51 (d, C-6), 123.95 (d, C-3‘), 121.13 (d, C-4), 114.86 (s), 40.86 (t, C-7), 14.74 (q, C-8).

Synthese von *N*-Benzyl-5-Brom-2-(Pyrdin-3-yl)-1-Ethyl-1*H*-Benzo[d]imidazol-7-Carboxamid (138)



137 **138**

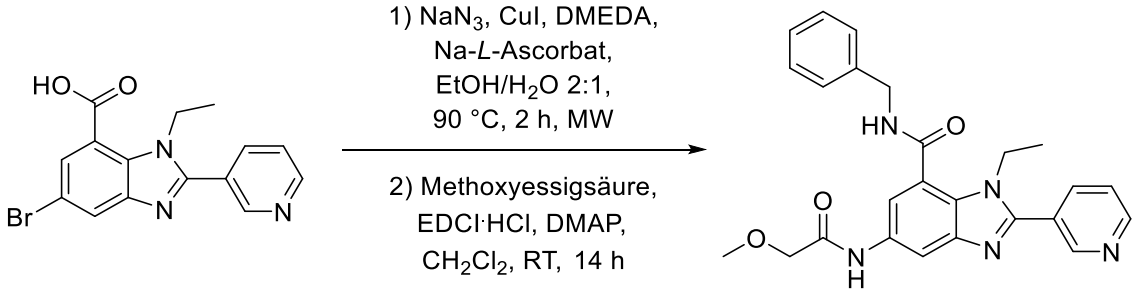
Entsprechend der Synthesevorschrift **G** wurden 260 mg **137** (0,74 mmol) mit 220 µl $(COCl)_2$ (1,48 mmol, 2 Äq.) und einer katalytischen Menge DMF in 7,4 ml CH_2Cl_2 (0,1 M) zum entsprechenden Säurechlorid umgesetzt und anschließend mit 202 µl $BnNH_2$ (1,65 mmol, 2,5 Äq.) in 7,4 ml CH_2Cl_2 (0,1 M) zum Amid umgesetzt. Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere Reinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 304 mg von Benzimidazol **138** (0,7 mmol, 95 %) als beiger Feststoff isoliert.



$C_{22}H_{19}BrN_4O$
435,33

R_f = 0,5 (EtOAc), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 435, 437 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 433, 435 $[M-H]^-$, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3246 (br), 3030 (w), 2957 (m), 2870 (m), 1640 (s), 1589 (m), 1525 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.88 (dd, ^4J = 2.3, 0.9 Hz, 1H, H-5‘), 8.76 (dd, ^3J = 4.9 Hz, ^4J = 1.7 Hz, 1H, H-4‘), 8.01 – 7.97 (m, 2H, H-4, H-2‘), 7.51 – 7.45 (m, 2H, H-6, H-3‘), 7.40 – 7.37 (m, 3H, H-15, H-17/13), 7.37 – 7.32 (m, 2H, H-14/16), 6.75 (t, ^3J = 5.8 Hz, 1H, NH), 4.67 (d, ^3J = 5.6 Hz, 2H, H-11), 4.43 (q, ^3J = 7.2 Hz, 2H, H-7), 1.09 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 166.22 (s, C-10), 153.44 (s), 151.09 (d, C-4‘), 149.84 (d, C-5‘), 146.00 (s), 137.39 (s), 137.07 (d, C-3‘), 130.46 (s), 128.97 (d, C-13/17), 128.21 (d, C-14/16), 128.02 (d, C-15), 126.39 (s), 125.20 (d, C-4), 125.13 (d, C-6), 123.60 (d, C-3‘), 123.26 (s), 114.53 (s), 44.54 (t, C-11), 41.27 (t, C-7), 15.93 (q, C-8).

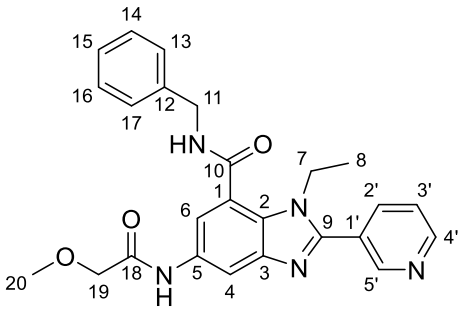
Synthese von *N*-Benzyl-1-Ethyl-5-(2-Methoxyacetamido)-2-(Pyridin-3-yl)-1*H*-Benzo[d]imidazol-7-Carboxamide (NUCC-555, 7)



138 **7**

Entsprechend der Synthesevorschrift **H** 65 mg **138** (0,15 mmol) mit 29 mg NaN_3 (0,45 mmol, 3 Äq.), 9 mg CuI (0,045 mmol, 30 mol%), 5 µl DMEDA (0,05 mmol, 35 mol%) und 3 mg Na-*L*-Ascorbat (0,015 mmol, 10 mol%) in 1,5 ml $EtOH/H_2O$ (2:1) umgesetzt. Nach 1 h bei 90 °C in der Synthesemikrowelle wurden erneut 9 mg CuI und 3 mg Na-*L*-Ascorbat hinzugegeben und für eine weitere Stunde bei 90 °C gerührt. Entsprechend der Synthesevorschrift **H** wurde die Reaktionslösung mit $CHCl_3$/*i*-PrOH (3:1) extrahiert. Es wurden 43 mg Amin isoliert, welches ohne weitere Reinigung in Folgereaktionen eingesetzt wurde.

Dazu wurden entsprechend der Synthesevorschrift **I** 43 mg Amin mit 30 mg EDCI·HCl (0,156 mmol, 1,3 Äq.), 19 mg DMAP (0,156 mmol, 1,3 Äq.) und 18 µl Methoxyessigsäure (0,24 mmol, 2 Äq.) in 0,5 ml CH_2Cl_2 umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **I** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 17,1 mg von NUCC-555 **(7)** (0,039 mmol) als beige-hellgelber Feststoff isoliert. Die kombinierte Ausbeute über zwei Stufen betrug 26 %.

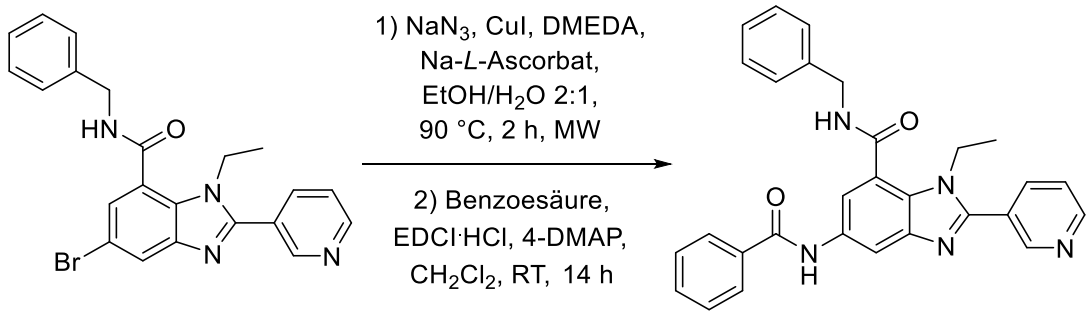


$C_{25}H_{25}N_5O_3$
443,51

R_f = 0,1 (CH_2Cl_2/MeOH 95:5), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 444 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 442 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{25}H_{26}N_5O_3^+$): 444,20301 gef.:

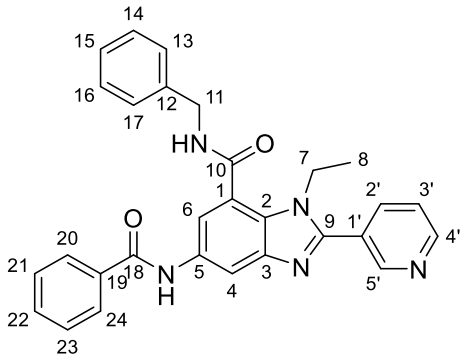
444,20283, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =3268 (br), 3061 (m), 2938 (w), 2828 (w), 1759 (w), 1652 (s), 1612 (m), 1547 (s), 1486 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.88 – 8.80 (m, 1H, H-5‘), 8.77 – 8.68 (m, 1H, H-4‘), 8.41 (s, 1H, H-4), 7.94 (dt, ^{3}J = 7.9 Hz, ^{4}J = 1.9 Hz, 1H, H-2‘), 7.84 – 7.73 (m, 2H, H-6, H-3‘), 7.52 – 7.28 (m, 5H, H-13-17), 4.65 (d, ^{3}J = 5.7 Hz, 2H, H-11), 4.37 (q, ^{3}J = 6.9 Hz, 3H, H-7), 4.00 (s, 2H, H-19), 3.50 (s, 3H, H-20), 1.03 (t, ^{3}J = 7.1 Hz, 3H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 168.67 (s, C-18), 167.13 (s, C-10), 152.05 (s), 151.24 (d, C-4‘), 149.96 (d, C-5‘), 139.51 (s), 137.88 (d, C-2‘), 133.91 (s), 128.82 (d), 128.16 (d), 127.46 (d, C-15), 127.38 (s), 124.32 (d, C-3), 123.38 (s), 116.82 (d, C-6), 111.27 (d, C-4), 72.26 (t, C-19), 59.19 (q, C-20), 43.36 (t, C-11), 40.90 (t, C-7), 15.76 (q, C-8).

Synthese von 5-Benzamido-*N*-Benzyl-1-Ethyl-2-(Pyridin-3-yl)-1*H*-Benzo[d]imidazol-7-Carboxamid (141)



Entsprechend der Synthesevorschrift **H** 31 mg **138** (0,07 mmol) mit 14 mg NaN_3 (0,22 mmol, 3 Äq.), 4 mg CuI (0,021 mmol, 30 mol%), 3 µl DMEDA (0,024 mmol, 35 mol%) und 1 mg Na-*L*-Ascorbat (0,007 mmol, 10 mol%) in 1 ml EtOH/H_2O (2:1) umgesetzt. Nach 1 h bei 90 °C in der Synthesemikrowelle wurden erneut 4 mg CuI und 1 mg Na-*L*-Ascorbat hinzugegeben und für eine weitere Stunde bei 90 °C gerührt. Entsprechend der Synthesevorschrift **H** wurde die Reaktionslösung mit $CHCl_3$/*i*-PrOH (3:1) extrahiert. Es wurden 22 mg Amin isoliert, welches ohne weitere Reinigung in Folgereaktionen eingesetzt wurde.

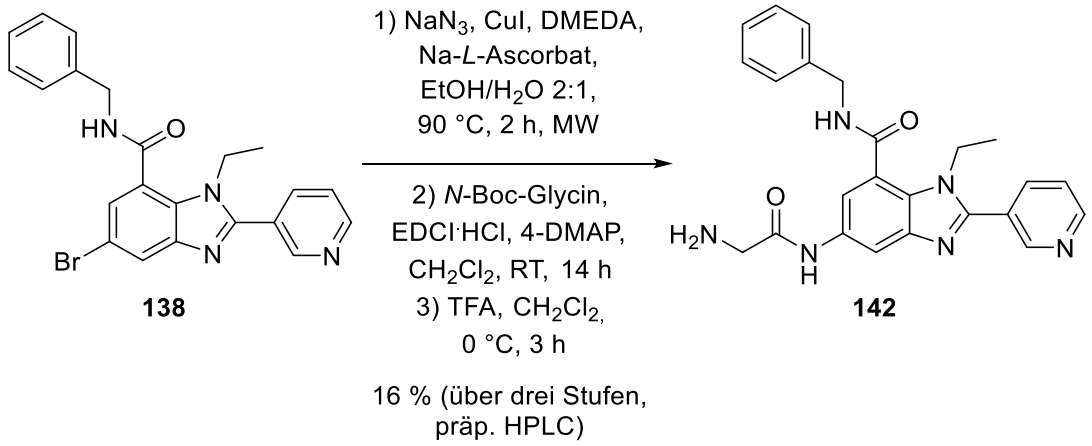
Entsprechend der Synthesevorschrift **I** wurden 22 mg Amin mit 15 mg EDCI·HCl (0,078 mmol, 1,3 Äq.), 10 mg DMAP (0,078 mmol, 1,3 Äq.) und 11 mg Benzoesäure (0,09 mmol, 1,5 Äq.) in 1 ml CH_2Cl_2 umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **I** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 7,8 mg von Benzimidazol **141** (0,016 mmol) als helloranger Feststoff isoliert. Die kombinierte Ausbeute über zwei Stufen betrug 23 %



$C_{29}H_{25}N_5O_2$
475,55

R_f = 0,2 (EtOAc), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 476 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 474 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{29}H_{26}N_5O_2^+$): 476,20810 gef.: 476,20804, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =3271 (br), 2924 (s), 2854 (m), 1650 (s), 1604 (m), 1555 (s), 1481 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 8.80 (m, 1H, H-5‘), 8.67 (m, 1H, H-4‘), 8.14 (d, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-4), 8.09 (dt, ^3J = 7.9 Hz, ^4J = 1.8 Hz, 1H, H-2‘), 7.92 – 7.85 (m, 2H, H-20/24), 7.78 (d, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-6), 7.57 (dd, ^3J = 7.9, 4.9 Hz, 1H, H-3‘), 7.53 – 7.47 (m, 1H, H-22), 7.43 (dd, ^3J = 8.2, 6.7 Hz, 2H, H-21/23), 7.38 – 7.35 (m, 2H, H-14/16), 7.26 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H, H-13/17), 7.18 (t, ^3J = 7.3 Hz, 1H, H-15), 4.53 (s, 2H, H-11), 4.29 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H, H-7), 0.93 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 168.26 (s, C-18), 167.60 (s, C-10), 152.68 (s), 150.39 (d, C-4‘), 149.23 (d, C-5‘), 143.74 (s), 138.32 (s), 137.68 (d, C-2‘), 134.64 (s), 133.70 (s), 131.63 (d, C-3‘), 128.30 (d), 128.29 (d), 127.84 (d), 127.12 (d), 122.35 (s), 117.73 (d, C-6), 113.16 (d, C-4), 43.50 (t, C-11), 40.79 (t, C-7), 14.58 (q, C-8).

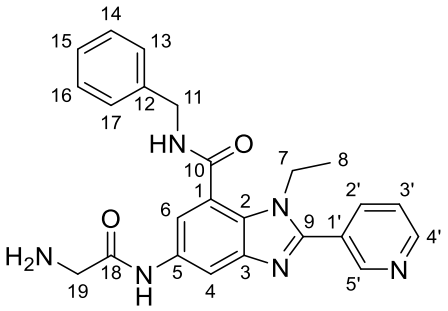
Synthese von 5-(2-Aminoacetamido)-*N*-Benzyl-1-Ethyl-2-(Pyridin-3-yl)-1*H*-Benzo[d]imidazol-7-Carboxamid (142)



Entsprechend der Synthesevorschrift **H** 62 mg **138** (0,14 mmol) mit 27 mg NaN_3 (0,42 mmol, 3 Äq.), 8 mg CuI (0,04 mmol, 30 mol%), 6 µl DMEDA (0,05 mmol, 35 mol%) und 3 mg Na-*L*-Ascorbat (0,014 mmol, 10 mol%) in 1,4 ml $EtOH/H_2O$ (2:1) umgesetzt. Nach 1 h bei 90 °C in der Synthesemikrowelle wurden erneut 8 mg CuI und 3 mg Na-*L*-Ascorbat hinzugegeben und für eine weitere Stunde bei 90 °C gerührt. Entsprechend der Synthesevorschrift **H** wurde die Reaktionslösung mit $CHCl_3$/*i*-PrOH (3:1) extrahiert. Es wurden 54 mg Amin isoliert, welches ohne weitere Reinigung in Folgereaktionen eingesetzt wurde.

Dazu wurden entsprechend der Synthesevorschrift **I** 54 mg Amin mit 42 mg EDCI·HCl (0,22 mmol, 1,5 Äq.), 26 mg DMAP (0,22 mmol, 1,5 Äq.) und 50 mg *N*-Boc-Glycin (0,29 mmol, 2 Äq.) in 1,5 ml CH_2Cl_2 umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **I** aufgearbeitet.

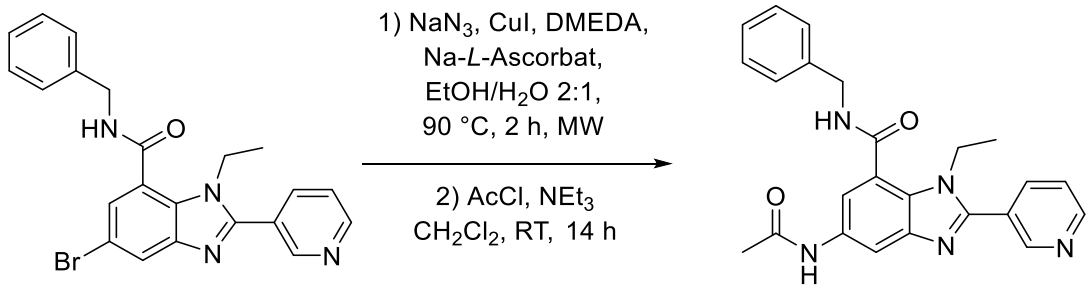
Die Boc-Schutzgruppe wurde entfernt, indem das Rohprodukt erneut in 3 ml CH_2Cl_2 gelöst und auf 0 °C gekühlt wurde. Anschließend wurde 1 ml TFA bei 0 °C tropfenweise hinzugegeben und die Reaktion für 3 h bei 0 °C gerührt. Die Lösung wurde durch Zugabe von ges. $NaHCO_3$-Lösung basisch gestellt und mit CH_2Cl_2 extrahiert (3x). Die organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 10,1 mg von Benzimidazol **142** (0,023 mmol, 16 %) als hellgelber Feststoff isoliert.



$C_{24}H_{24}N_6O_2$
428,50

R_f = 0,2 (CH_2Cl_2/MeOH 90:10), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 429 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 427 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{24}H_{25}N_6O_2^+$): 429,20335 gef.: 429,20365, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =3267 (br), 2923 (s), 2852 (S), 1655 (s), 1612 (m), 1544 (s), 1485 (m), **^{1}H-NMR** (400 MHz, MeOD δ [ppm] = 8.78 (d, ^4J = 2.2 Hz, 1H), 8.66 (dd, ^3J = 5.0 Hz, ^4J = 1.6 Hz, 1H), 8.10 – 8.02 (m, 2H, H-4. H-3‘), 7.60 (d, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-6), 7.56 (dd, ^3J = 7.9, 5.0 Hz, 1H, H-3‘), 7.35 (d, ^3J = 7.2 Hz, 2H, H-13/17), 7.27 (d, ^3J = 7.2 Hz, 2H, H-14/16), 7.21 – 7.14 (m, 1H, H-15), 4.51 (s, 2H, H-11), 4.26 (q, ^3J = 7.3 Hz, 2H, H-7), 3.45 (s, 2H, H-19), 0.91 (t, ^3J = 7.0 Hz, 3H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 170.78 (s, C-18), 168.19 (s, C-10), 159.81 (s), 152.67 (s), 150.40 (d), 149.21 (d), 143.76 (s), 138.32 (s), 137.65 (d, C-2‘), 133.36 (s), 128.29 (d, C-14/16), 127.84 (d, C-13/17), 127.63 (s), 127.13 (d, C-15), 126.60 (s), 123.96 (d, C-3‘), 122.46 (s), 116.54 (d, C-6), 111.85 (d, C-4), 43.54 (t, C-19), 43.46 (t, C-11), 40.76 (t, C-7), 14.55 (q, C-8).

Synthese von 5-Acetamido-*N*-Benzyl-1-Ethyl-2-(Pyridin-3-yl)-1*H*-Benzo[d]imidazol-7-Carboxamid (143)

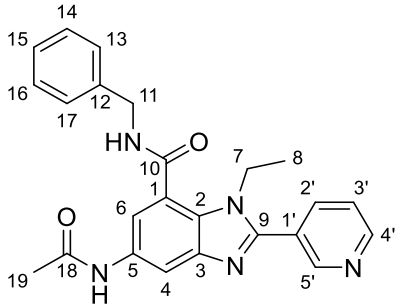


138 **143**

Entsprechend der Synthesevorschrift **H** 50 mg **138** (0,12 mmol) mit 22 mg NaN_3 (0,36 mmol, 3 Äq.), 6 mg CuI (0,036 mmol, 30 mol%), 4 µl DMEDA (0,04 mmol, 35 mol%) und 2 mg Na-*L*-Ascorbat (0,012 mmol, 10 mol%) in 1,5 ml EtOH/H_2O (2:1) umgesetzt. Nach 1 h bei 90 °C

in der Synthesemikrowelle wurden erneut 6 mg CuI und 2 mg Na-*L*-Ascorbat hinzugegeben und für eine weitere Stunde bei 90 °C gerührt. Entsprechend der Synthesevorschrift **H** wurde die Reaktionslösung mit $CHCl_3$/*i*-PrOH (3:1) extrahiert. Es wurden 38 mg Amin isoliert, welches ohne weitere Reinigung in Folgereaktionen eingesetzt wurde.

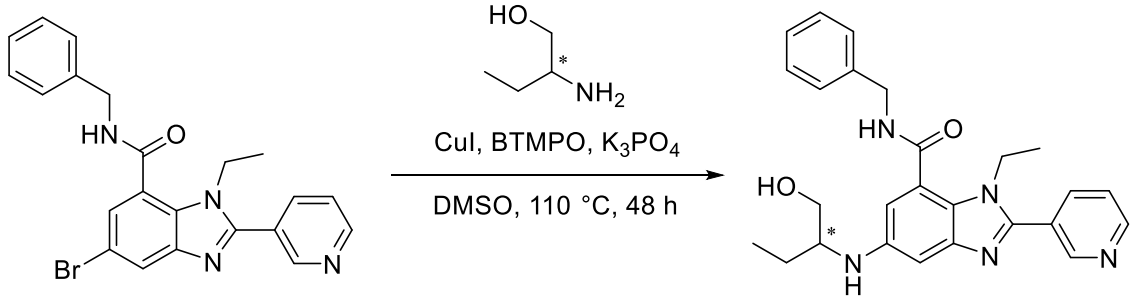
Dazu wurde in einem Rundkolben 38 mg Amin und 28 µl NEt_3 (0,2 mmol, 2 Äq.) in 1 ml CH_2Cl_2 unter Schutzatmosphäre gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 14 µl AcCl (0,2 mmol, 2 Äq.) bei 0 °C hinzugegeben und die Reaktion nach der Zugabe auf RT erwärmt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **I** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 14,1 mg von Benzimidazol **143** (0,033 mmol) als beige-hellgelber Feststoff isoliert. Die kombinierte Ausbeute über zwei Stufen betrug 28 %.



$C_{24}H_{23}N_5O_2$
413,48

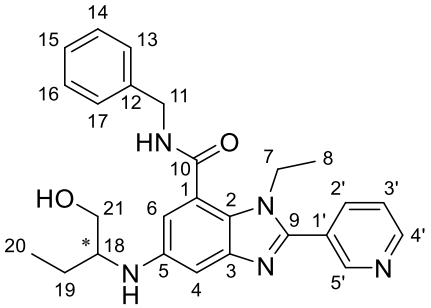
R_f = 0,12 (CH_2Cl_2/MeOH 90:10), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 414 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 412 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{24}H_{24}N_5O_2^+$): 414,19245 gef.: 414,19253, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =3270 (br), 2925 (s), 1641 (s), 1608 (m), 1565 (s), 1485 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 8.78 (s, 1H, H-5‘), 8.66 (d, ^3J = 5.0 Hz, 1H, H-4‘), 8.07 (dt, ^3J = 7.9 Hz, ^4J = 1.9 Hz, 1H), 7.99 (d, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-4), 7.60 (d, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-6), 7.56 (dd, ^3J = 7.9, 5.0 Hz, 1H, H-3‘), 7.40 – 7.33 (m, 2H, H-13/17), 7.26 (t, ^3J = 7.4 Hz, 2H, H-14/16), 7.21 – 7.15 (m, 1H, H-15), 4.51 (s, 2H, H-11), 4.26 (q, ^3J = 7.2 Hz, 2H, H-7), 2.07 (s, 3H, H-19), 0.91 (t, ^3J = 7.2 Hz, 3H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 170.41 (s, C-18), 168.25 (s, C-10), 152.57 (s), 150.37 (d, H-4‘), 149.21 (d, H-5‘), 143.70 (s), 138.33 (s), 137.66 (d, C-2‘), 133.76 (s), 128.29 (d, C-14/16),127.82 (d, C-13/17), 127.54 (s), 127.12 (d, C-15), 126.60 (s), 123.96 (d, C-3‘), 122.34 (s), 116.70 (d, C-6), 111.92 (d, C-4), 43.44 (t, C-11), 40.74 (t, C-7), 22.36 (q, C-19), 14.55 (q, C-8).

Synthese von *rac*-*N*-Benzyl-1-Ethyl-5-((1-Hydroxybutan-2-yl)amino)-2-(Pyridin-3-yl)-1*H*-Benzo[d]imidazol-7-Carboxamid (*rac*-144)



138 15 % (präp. HPLC) ***rac*-144**

Entsprechend Synthesevorschrift **J** wurden 43 mg **138** (0,1 mmol) mit 1 mg CuI (0,005 mmol, 5 mol%), 4 mg BTMPO (0,01 mmol, 10 mol%), 32 mg K_3PO_4 (0,15 mmol, 1,5 Äq.) und 19 µl *rac*-2-Aminobutanol (0,2 mmol, 2 Äq.) in 0,5 ml DMSO für 48 h bei 110 °C (Gesamtreaktionszeit: 96 h, RT + 110 °C) umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **J** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 6,7 mg von Benzimidazol ***rac*-144** (0,015 mmol, 15 %) als gelber Feststoff isoliert.

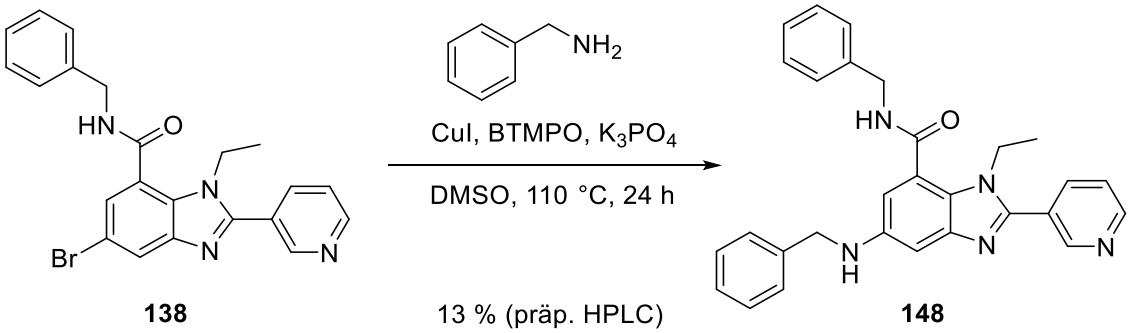


$C_{26}H_{29}N_5O_2$
443,55

R_f = 0,11 (CH_2Cl_2/MeOH 90:10), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 444 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 442 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{26}H_{30}N_5O_2^+$): 444,23940 gef.: 444,23954, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =3354 (br), 2924 (s), 2853 (s), 1653 (s), 1615 (m), 1541 (m), 1464 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 8.73 (s, 1H, H-5‘), 8.62 (s, 1H, H-4‘), 8.02 (d, ^4J = 7.9 Hz, 1H, H-2‘), 7.52 (dd, ^3J = 8.2, 4.6 Hz, 1H, H-3‘), 7.34 (d, ^3J = 7.1 Hz, 2H, H-13/17), 7.25 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H, H-14/16), 7.17 (t, ^3J = 7.3 Hz, 1H, H-15), 6.86 (dd, ^3J = 10.5, ^4J = 2.1 Hz, 2H, H-4/6), 4.48 (s, 2H, H-11), 4.18 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H, H-7), 3.52 (dd, ^2J = 11.1 Hz, ^3J = 4.9 Hz, 1H, H-21), 3.45 (dd, ^2J = 11.1 Hz, ^3J = 5.5 Hz, 1H, H-21), 3.31 – 3.22 (m, 1H, H-18), 1.70 – 1.58 (m, 1H, H-19), 1.50 – 1.40 (m, 1H, H-19), 0.89 (dt, ^2J = 10.6 Hz, ^3J = 7.2 Hz, 6H, H-8, H-20), **^{13}C-NMR** (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 169.03 (s, C-10), 150.88 (s),

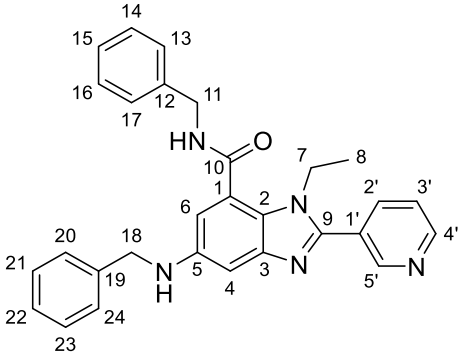
150.02 (d, C-4‘), 149.12 (d, C-5‘), 145.07 (s), 144.95 (s), 138.46 (s), 137.55 (d, C-2‘), 128.24 (d, C-14/16), 127.79 (d, C-13/17), 127.05 (d, C-15), 123.94 (d, C-3‘), 123.08 (s), 122.78 (s), 112.87 (d, C-6), 101.34 (d, C-4), 62.90 (t, C-21), 56.71 (d, C18), 43.35 (t, C-11), 40.50 (t, C-7), 24.06 (t, C-19), 14.58 (q, C-8), 9.59 (q, C-20).

Synthese von *N*-Benzyl-5-(Benzylamino)-1-Ethyl-2-(Pyridin-3-yl)-1*H*-Benzo[d]imidazol-7-Carboxamid (148)



138 13 % (präp. HPLC) **148**

Entsprechend Synthesevorschrift **J** wurden 78 mg **138** (0,18 mmol) mit 2 mg CuI (0,009 mmol, 5 mol%), 4 mg BTMPO (0,009 mmol, 5 mol%), 76 mg K_3PO_4 (0,36 mmol, 2 Äq.) und 39 µl $BnNH_2$ (0,36 mmol, 2 Äq.) in 1,8 ml DMSO für 24 h bei 110 °C umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **J** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 11,2 mg von Benzimidazol **148** (0,023 mmol, 13 %) als hellgelber Feststoff isoliert.

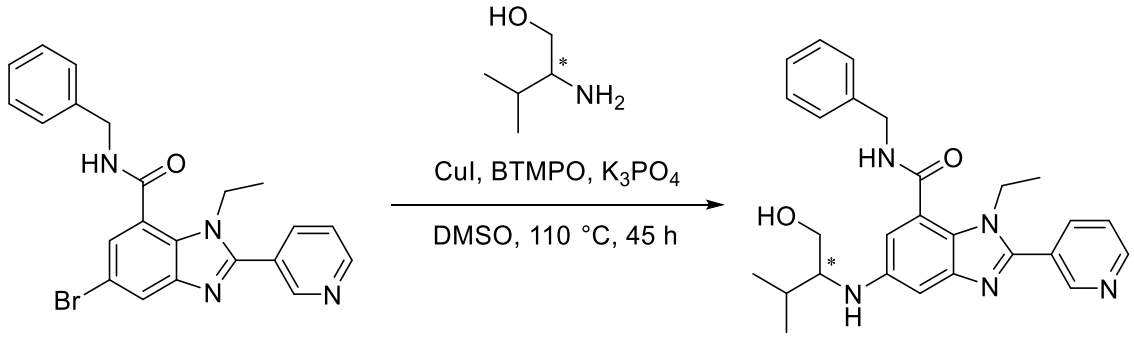


$C_{29}H_{27}N_5O$
461,57

R_f = 0,11 (CH_2Cl_2/MeOH 95:5), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 462 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 460 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{29}H_{28}N_5O^+$): 462,22883 gef.: 462,22892, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =3293 (br), 3029 (m), 2926 (m), 2853 (w), 1646 (s), 1615 (s), 1538 (s), 1493 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.82 (s, 1H, H-5‘), 8.70 (s, 1H, H-

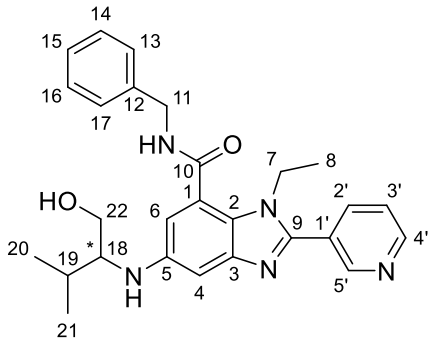
4‘), 7.92 (d, ^3J = 7.8 Hz, 1H, H-2‘), 7.47 – 7.18 (m, 11H, H-13-17, H-20-24, H-3‘), 7.03 (s, 1H, H-4), 6.85 – 6.69 (m, 2H, H-6, NH), 4.63 (d, ^3J = 5.7 Hz, 2H, H-11), 4.44 – 4.27 (m, 4H, H-7, H-18), 1.05 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 167.65 (s, C-10), 151.94 (s), 150.49 (d, C-4‘), 149.77 (d, C-5‘), 146.03 (s), 143.94 (s), 139.02 (s), 137.81 (s), 136.96 (d, C-2‘), 128.86 (d), 128.67 (d), 128.09 (d), 127.81 (d), 127.51 (d), 127.33 (d), 124.58 (d, C-3‘), 122.43 (s), 111.56 (d, C-6), 103.69 (d, C-4), 48.90 (t, C-18), 44.29 (t, C-11), 40.95 (t, C-7), 15.95 (q, C-8).

Synthese von *rac*-*N*-Benzyl-1-Ethyl-5-((1-Hydroxy-3-Methylbutan-2-yl)amino)-2-(Pyridin-3-yl)-1*H*-Benzo[d]imidazol-7-Carboxamid (*rac*-150)



138 1,7 % (präp. HPLC) ***rac*-150**

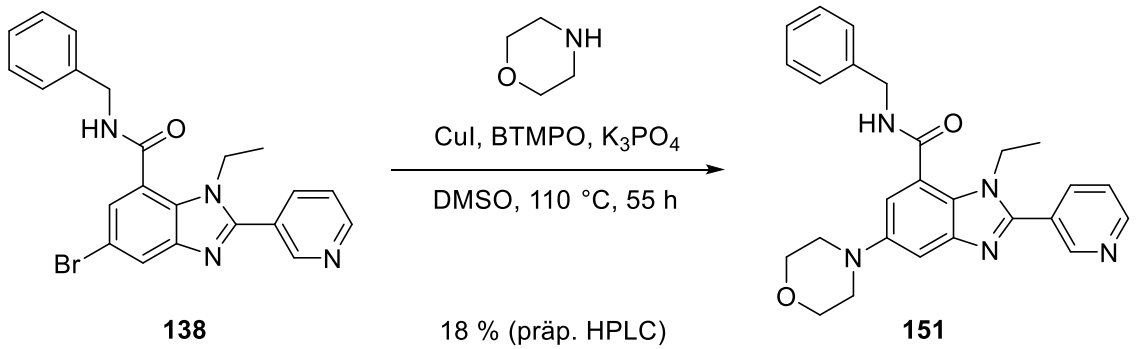
Entsprechend Synthesevorschrift **J** wurden 150 mg **138** (0,34 mmol) mit 6,4 mg CuI (0,034 mmol, 10 mol%), 14 mg BTMPO (0,034 mmol, 10 mol%), 79 mg K_3PO_4 (0,37 mmol, 1,1 Äq.) und 72 µl ***rac*-Valinol** (0,68 mmol, 2 Äq.) in 1,6 ml DMSO für 45 h bei 110 °C (Gesamtreaktionszeit: 96 h, RT + 110 °C) umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **J** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 2,7 mg von Benzimidazol ***rac*-150** (0,006 mmol, 1,7 %) als gelber Feststoff isoliert. (Ein operativer Fehler während der Chromatographie führte zum Verlust von Material.)



$C_{27}H_{31}N_5O_2$
457,58

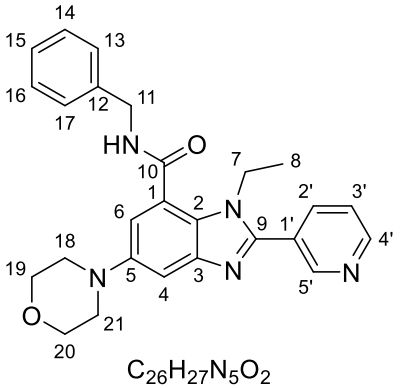
R_f = 0,13 (CH_2Cl_2/MeOH 90:10), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 458 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 457 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{27}H_{32}N_5O_2^+$): 458,25505 gef.: 458,25508, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =3331 (br), 3032 (w), 2959 (m), 2927 (m), 2872 (w), 1644 (s), 1614 (s), 1540 (s), 1476 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 8.84 (d, ^4J = 2.1 Hz, 1H, H-5‘), 8.72 (dd, ^3J = 4.9 Hz, ^4J = 1.5 Hz, 1H, H-4‘), 8.13 (dd, ^3J = 7.9 Hz, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-2‘), 7.63 (dd, ^3J = 7.9, 4.9 Hz, 1H, H-3‘), 7.44 (d, ^3J = 7.0 Hz, 2H, H-13/17), 7.35 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H, H-14/16), 7.27 (t, ^3J = 7.3 Hz, 1H, H-15), 6.98 (d, ^4J = 3.7 Hz, 2H, H-4, H-6), 4.59 (s, 2H, H-11), 4.39 – 4.20 (m, 2H, H-7), 3.68 (dd, ^2J = 11.2 Hz, ^3J = 5.2 Hz, 1H, H-22), 3.62 (dd, ^2J = 11.2 Hz, ^3J = 5.5 Hz, 1H, H-22), 3.36 – 3.26 (m, 1H , H-18), 2.02 (dq, ^2J = 13.4 Hz, ^3J = 6.7 Hz, 1H, H-19), 1.09 – 0.92 (m, 9H, H-8, H-20/21), **^{13}C-NMR** (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 169.07 (s, C-10), 150.81 (s), 150.00 (d, C-4‘), 149.13 (d, C-5‘), 145.63 (s), 144.96 (s), 138.47 (s), 137.56 (d, C-3‘), 128.25 (d, C-14/16), 127.79 (d, C-13/17), 127.05 (d, C-15), 126.98 (s), 123.93 (d, C-3‘), 122.94 (s), 122.71 (s), 112.83 (d, C-6), 101.14 (d, C-4), 61.38 (t, C-22), 60.62 (d, C-18), 43.34 (t, C-11), 40.49 (t, C-7), 29.15 (d, C-19), 18.49 (q), 17.49 (q), 14.59 (q, C-8).

Synthese von *rac*-*N*-Benzyl-1-Ethyl-5-Morpholino-2-(Pyridin-3-yl)-1*H*-Benzo[d]imidazol-7-Carboxamid (151)



138 18 % (präp. HPLC) **151**

Entsprechend Synthesevorschrift **J** wurden 47 mg **138** (0,1 mmol) mit 1 mg CuI (0,005 mmol, 5 mol%), 4 mg BTMPO (0,01 mmol, 10 mol%), 42 mg K_3PO_4 (0,2 mmol, 2 Äq.) und 22 µl Morpholin (0,2 mmol, 2 Äq.) in 1 ml DMSO für 55 h bei 110 °C (Gesamtreaktionszeit: 110 h, RT + 110 °C) umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **J** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 7,9 mg von Benzimidazol **151** (0,018 mmol, 18 %) als hellgelber Feststoff isoliert

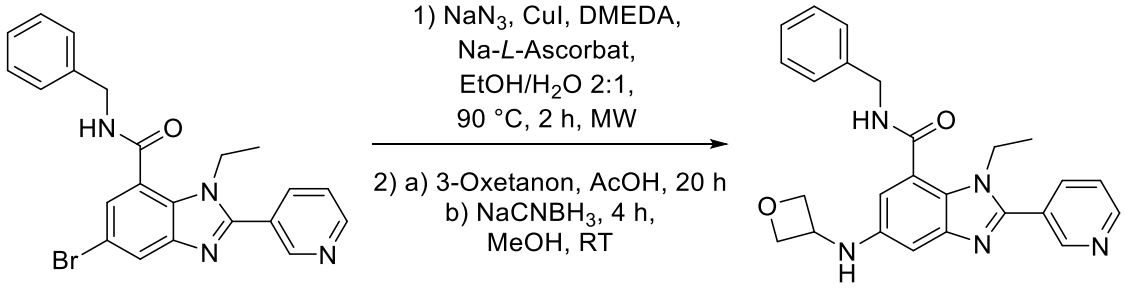


$C_{26}H_{27}N_5O_2$
441,54

R_f = 0,12 (EtOAc), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 442 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 440 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{26}H_{28}N_5O_2^+$): 442,22375 gef.: 442,22400, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =3256 (br), 3030 (m), 2963 (m), 2924 (m), 2854 (m), 1650 (s), 1612 (s), 1535 (s), 1481 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.91 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.02 (d, ^3J = 7.9 Hz, 1H, H-2‘), 7.55 – 7.29 (m, 7H, H-4, H-3‘, H-13-17), 7.12 (d, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-6), 6.71 (m, 1H, NH), 4.68 (d, ^3J = 5.8 Hz, 2H, H-11), 4.42 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H, H-7), 3.95 – 3.82 (m, 4H, H-18/20), 3.18 – 3.09 (m, 4H, H-18/21), 1.10 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 167.49 (s, C-10), 151.44 (s), 147.62 (s), 137.62 (s), 137.05 (d, C-2‘),

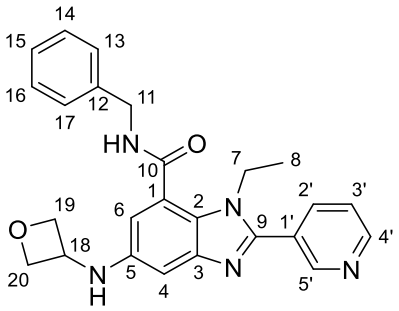
128.92 (d), 128.23 (d), 127.94 (d), 122.56 (s), 114.49 (d, C-6), 108.29 (d, C-4), 66.90 (t, C-19/20), 50.91 (t, C-18/21), 44.48 (t, C-11), 41.18 (t, C-7), 15.98 (q, C-8).

Synthese von *N*-Benzyl-1-Ethyl-5-(Oxetan-3-ylamino)-2-(Pyridin-3-yl)-1*H*-Benzo[d]imidazol-7-Carboxamid (152)



Entsprechend der Synthesevorschrift **H** 100 mg **138** (0,23 mmol) mit 45 mg NaN_3 (0,69 mmol, 3 Äq.), 13 mg CuI (0,07 mmol, 30 mol%), 8 µl DMEDA (0,07 mmol, 35 mol%) und 5 mg Na-*L*-Ascorbat (0,023 mmol, 10 mol%) in 2,3 ml $EtOH/H_2O$ (2:1) umgesetzt. Nach 1 h bei 90 °C in der Synthesemikrowelle wurden erneut 13 mg CuI und 5 mg Na-*L*-Ascorbat hinzugegeben und für eine weitere Stunde bei 90 °C gerührt. Entsprechend der Synthesevorschrift **H** wurde die Reaktionslösung mit $CHCl_3$/*i*-PrOH (3:1) extrahiert. Es wurden 70 mg Amin isoliert, welches ohne weitere Reinigung in Folgereaktionen eingesetzt wurde.

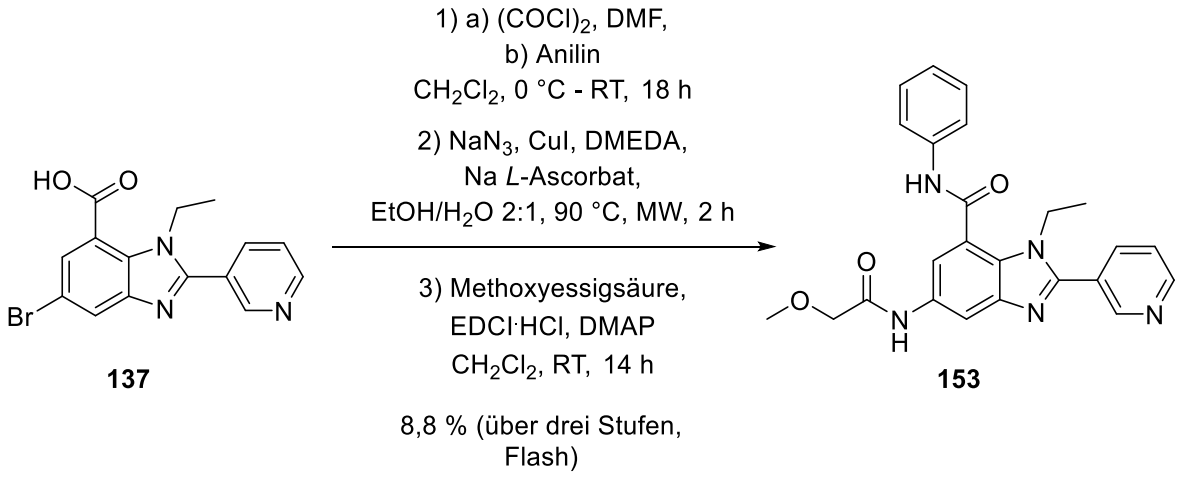
Dazu wurden in einem Rundkolben 70 mg Amin in 0,19 ml Eisessig und 1,9 ml EtOH (96 %) gelöst und bei RT mit 17 µl 3-Oxetanon (0,28 mmol, 1,5 Äq.) versetzt. Nach 20 h bei RT wurden 18 mg $NaCNBH_3$ (0,28 mmol, 1,5 Äq.) hinzugefügt und für weitere 4 h bei RT gerührt. Anschließend wurde dest. Wasser und ges. NaCl-Lösung hinzugegeben, die Lösung mit EtOAc extrahiert (3x), die organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 10,3 mg von Benzimidazol **152** (0,025 mmol) als hellgelber Feststoff isoliert. Die kombinierte Ausbeute über zwei Stufen betrug 11 %.



$C_{25}H_{25}N_5O_2$
427,51

R_f = 0,07 (CH_2Cl_2/MeOH 95:5), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 428 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 426 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{25}H_{26}N_5O_2^+$): 428,20810 gef.: 428,20823, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =3291 (br), 3031 (m), 2953 (m), 2872 (m), 1770 (w), 1758 (w), 1644 (s), 1615 (s), 1539 (s), 1479 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 8.86 (dd, ^4J = 2.3, 0.9 Hz, 1H, H-5‘), 8.75 (dd, ^3J = 5.0 Hz, ^4J = 1.6 Hz, 1H, H-4‘), 8.15 (dt, ^3J = 7.9 Hz, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-2‘), 7.66 (ddd, ^3J = 8.0, 5.0 Hz, ^4J = 0.9 Hz, 1H, H-3‘), 7.50 – 7.43 (m, 2H, H-13/17), 7.37 (t, ^3J = 7.4 Hz, 2H, H-14/16), 7.35 – 7.26 (m, 1H, H-15), 6.91 (d, ^4J = 2.2 Hz, 1H, H-6), 6.80 (d, ^4J = 2.2 Hz, 1H, H-4), 5.04 (t, ^3J = 6.5 Hz, 2H, H-19/20), 4.74 – 4.65 (m, 1H, H-18), 4.63 – 4.55 (m, 4H, H-11, H-19/20), 4.31 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H, H-7), 1.00 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 168.81 (s, C-10), 151.17 (s), 150.10 (d, C-4‘), 149.14 (d, C-5‘), 144.86 (s), 143.40 (s), 138.44 (s), 137.57 (d, C-2‘), 128.26 (d, C-14/16), 127.80 (d, C-13/17), 127.09 (d, C-15), 126.89 (s), 123.93 (d, C-3‘), 123.83 (s), 123.05 (s), 112.45 (d, C-6), 101.35 (d, C-4), 78.71 (t, C-19/20), 48.58 (d, C-18), 43.36 (t, C-11), 40.53 (t, C-7), 14.57 (q, C-8).

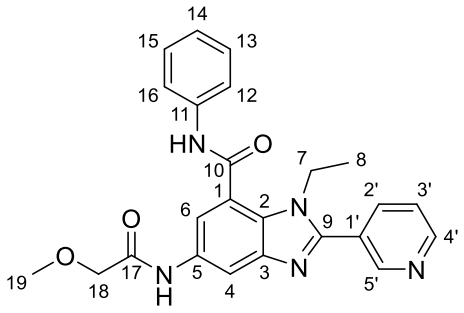
Synthese von 1-Ethyl-5-(2-Methoxyacetamido)-*N*-Phenyl-2-(Pyridin-3-yl)-1*H*-Benzo[d]imidazol-7-Carboxamid (153)



Entsprechend der Synthesevorschrift **G** wurden 54 mg **137** (0,16 mmol) mit 48 µl $(COCl)_2$ (0,32 mmol, 2 Äq.) und einer katalytischen Menge DMF in 1 ml CH_2Cl_2 (0,1 M) zum entsprechenden Säurechlorid umgesetzt und anschließend mit 36 µl Anilin (0,4 mmol, 2,5 Äq.) in 1 ml CH_2Cl_2 (0,1 M) zum Amid umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **G** aufgearbeitet. Es wurden 58 mg Amid isoliert, welches ohne weitere Reinigung in Folgereaktionen eingesetzt wurde.

Dazu wurden entsprechend der Synthesevorschrift **H** 58 mg Amid mit 27 mg NaN_3 (0,42 mmol, 3 Äq.), 8 mg CuI (0,04 mmol, 30 mol%), 5 µl DMEDA (0,05 mmol, 35 mol%) und 3 mg Na-*L*-Ascorbat (0,011 mmol, 10 mol%) in 2 ml $EtOH/H_2O$ (2:1) umgesetzt. Nach 1 h bei 90 °C in der Synthesemikrowelle wurden erneut 8 mg CuI und 3 mg Na-*L*-Ascorbat hinzugegeben und für eine weitere Stunde bei 90 °C gerührt. Entsprechend der Vorschrift **H** wurde die Reaktionslösung mit $CHCl_3$/*i*-PrOH (3:1) extrahiert. Es wurden 30 mg Amin isoliert, welches ohne weitere Reinigung in Folgereaktionen eingesetzt wurde.

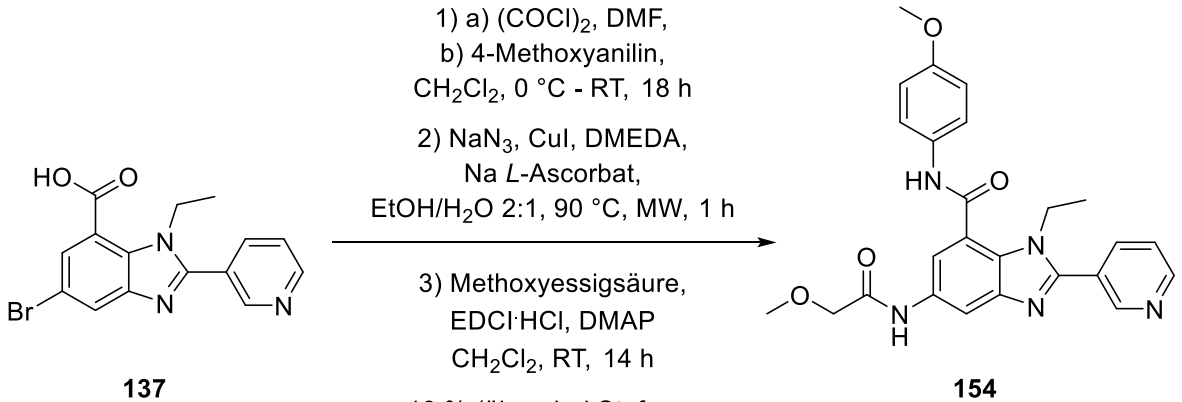
Dazu wurden entsprechend der Synthesevorschrift **I** 30 mg Amin mit 23 mg EDCI·HCl (0,12 mmol, 1,5 Äq.), 15 mg DMAP (0,12 mmol, 1,5 Äq.) und 12 µl Methoxyessisäure (0,16 mmol, 2 Äq.) in 1 ml CH_2Cl_2 umgesetzt. Nach 14 h wurde dest. Wasser und ges. NaCl-Lösung hinzugegeben, und die Lösung wurde mit CH_2Cl_2 extrahiert (3x). Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **I** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Flash-Chromatographie gereinigt (CH_2Cl_2/MeOH: 0 % B – 15 % B). Es wurden 6 mg von Benzimidazol **153** (0,014 mmol) als gelb-oranger Feststoff isoliert. Die kombinierte Ausbeute über drei Stufen betrug 8,8 %.



$C_{24}H_{23}N_5O_3$
429,48

R_f = 0,1 (EtOAc), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 430 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 428 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{24}H_{24}N_5O_3^+$): 430,18736 gef.: 430,18749, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =3265 (br), 3128 (w), 2994 (w), 2935 (w), 1770 (m), 1759 (m), 1666 (s), 1598 (s), 1545 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 8.92 (s, 1H, H-5‘), 8.78 (s, 1H, H-4‘), 8.28 – 8.16 (m, 2H, H-4, H-2‘), 7.86 (d, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-6), 7.78 – 7.71 (m, 2H, H-12/16), 7.67 (dd, ^3J = 7.9, 4.9 Hz, 1H, H-3‘), 7.39 (dd, ^3J = 8.5, 7.4 Hz, 2H, H-13/15), 7.25 – 7.15 (m, 1H, H-14), 4.47 (q, ^3J = 7.2 Hz, 2H, H-7), 4.10 (s, 2H, H-18), 3.52 (s, 3H, H-19), 1.22 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 169.77 (s, C-17), 166.31 (s, C-10), 152.81 (s), 150.43 (d, C-4‘), 149.26 (d, C-5‘), 143.79 (s), 138.35 (s), 137.70 (d, C-2‘), 132.71 (s), 128.63 (d, C-13/15), 127.92 (s), 124.53 (d, C-14), 124.00 (d, C-3‘), 122.75 (s), 120.20 (d, C-12/16), 117.37 (d, C-6), 113.08 (d, C-4), 71.57 (t, C-18), 58.27 (q, C-19), 40.93 (t, C-7), 14.47 (q, C-8).

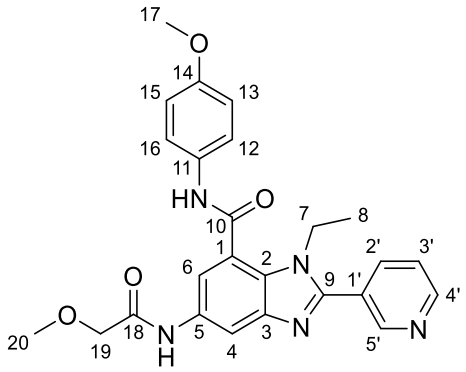
Synthese von 1-Ethyl-5-(2-Methoxyacetamido)-*N*-(4-Methoxyphenyl)-2-(Pyridin-3-yl)-1*H*-Benzo[d]imidazol-7-Carboxamid (154)



Entsprechend der Synthesevorschrift **G** wurden 80 mg **137** (0,23 mmol) mit 69 µl $(COCl)_2$ (0,46 mmol, 2 Äq.) und einer katalytischen Menge DMF in 2,3 ml CH_2Cl_2 (0,1 M) zum entsprechenden Säurechlorid umgesetzt und anschließend mit 52 µl Anilin (0,58 mmol, 2,5 Äq.) in 2,3 ml CH_2Cl_2 (0,1 M) zum Amid umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **G** aufgearbeitet. Es wurden 68 mg Amid isoliert, welches ohne weitere Reinigung in Folgereaktionen eingesetzt wurde.

Dazu wurden entsprechend der Synthesevorschrift **H** 68 mg Amid mit 30 mg NaN_3 (0,45 mmol, 3 Äq.), 8 mg CuI (0,04 mmol, 30 mol%), 6 µl DMEDA (0,05 mmol, 35 mol%) und 3 mg Na-*L*-Ascorbat (0,012 mmol, 10 mol%) in 2 ml $EtOH/H_2O$ (2:1) umgesetzt. Entsprechend der Vorschrift **H** wurde die Reaktionslösung mit $CHCl_3$/*i*-PrOH (3:1) extrahiert. Es wurden 40 mg Amin isoliert, welches ohne weitere Reinigung in Folgereaktionen eingesetzt wurde.

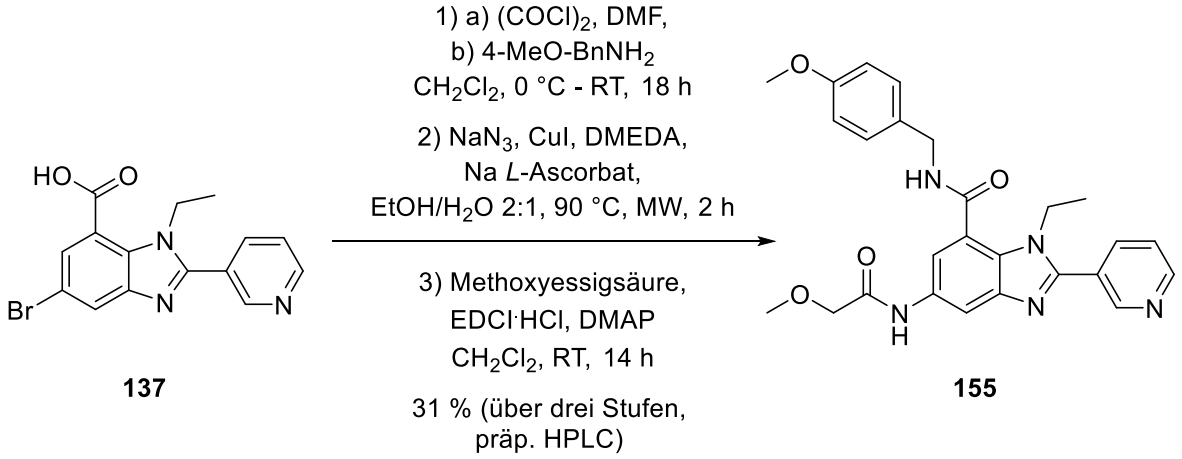
Dazu wurden entsprechend der Synthesevorschrift **I** 40 mg Amin mit 26 mg EDCI·HCl (0,13 mmol, 1,5 Äq.), 16 mg DMAP (0,13 mmol, 1,5 Äq.) und 16 µl Methoxyessigsäure (0,2 mmol, 2 Äq.) in 0,4 ml CH_2Cl_2 umgesetzt. Nach 14 h wurde dest. Wasser und ges. NaCl-Lösung hinzugegeben, und die Lösung wurde mit CH_2Cl_2 extrahiert (3x). Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **I** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Flash-Chromatographie gereinigt (CH_2Cl_2/MeOH: 0 % B – 15 % B). Es wurden 19 mg von Benzimidazol **153** (0,041 mmol) als gelb-oranger Feststoff isoliert. Die kombinierte Ausbeute über drei Stufen betrug 18 %.



$C_{25}H_{25}N_5O_4$
459,51

R_f = 0,6 (EtOAc), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 460 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 458 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{25}H_{26}N_5O_4^+$): 460,19793 gef.: 460,19791, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3273 (br), 2924 (m), 2853 (w), 1663 (s), 1600 (m), 1543 (s), 1510 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 9.09 (s, 1H, H-5‘), 8.96 – 8.72 (m, 1H, H-4‘), 8.43 (s, 1H, 4), 7.98 (d, ^3J = 8.1 Hz, H-2‘), 7.94 – 7.87 (m, 1H, H-6), 7.80 – 7.75 (m, 1H, H-3‘), 7.66 (d, ^3J = 8.8 Hz, 2H, H-13/15), 7.46 (s, 1H, NH), 6.98 – 6.89 (m, 2H, H-12/16), 4.38 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H, H-7), 4.03 (s, 2H, H-17), 3.83 (s, H-19), 3.52 (s, 3H, H-20), 1.18 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 168.05 (s, C-18), 165.06 (s, C-10), 156.81 (s), 142.02 (s), 138.46 (d, C-2‘), 137.04 (d, C-6‘), 131.77 (s), 131.16 (s), 128,34 (s), 122.84 (s), 122.01 (d, C-13/15), 116.44 (d, C-6), 114.30 (d, C-12/16), 112,95 (d, C-4), 71.96 (t, C-19), 59.35 (q, C-20), 55.53 (q, C-17), 41.36 (t, C-7), 15.84 (q, C-8).

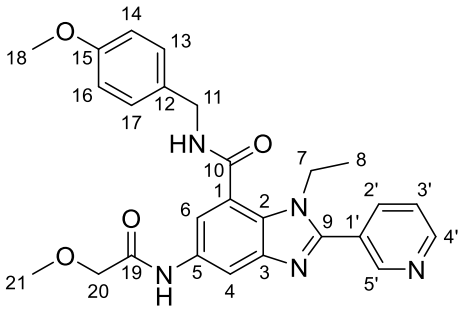
Synthese von 1-Ethyl-5-(2-Methoxyacetamido)-*N*-(4-Methoxybenzyl)-2-(Pyridin-3-yl)-1*H*-Benzo[d]imidazol-7-Carboxamid (155)



Entsprechend der Synthesevorschrift **G** wurden 75 mg **137** (0,21 mmol) mit 28 µl $(COCl)_2$ (0,32 mmol, 1,5 Äq.) und einer katalytischen Menge DMF in 2,1 ml CH_2Cl_2 (0,1 M) zum entsprechenden Säurechlorid umgesetzt und anschließend mit 56 µl 4-Methoxybenzylamin (0,43 mmol, 2 Äq.) in 2,1 ml CH_2Cl_2 (0,1 M) zum Amid umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **G** aufgearbeitet. Es wurden 100 mg Amid isoliert, welches ohne weitere Reinigung in Folgereaktionen eingesetzt wurde.

Dazu wurden entsprechend der Synthesevorschrift **H** 100 mg Amid mit 42 mg NaN_3 (0,65 mmol, 3 Äq.), 12 mg CuI (0,07 mmol, 30 mol%), 7 µl DMEDA (0,7 mmol, 35 mol%) und 5 mg Na-*L*-Ascorbat (0,02 mmol, 10 mol%) in 2,2 ml EtOH/H_2O (2:1) umgesetzt. Nach 1 h bei 90 °C in der Synthesemikrowelle wurden erneut 12 mg CuI und 5 mg Na-*L*-Ascorbat hinzugegeben und für eine weitere Stunde bei 90 °C gerührt. Entsprechend der Vorschrift **H** wurde die Reaktionslösung mit $CHCl_3$/*i*-PrOH (3:1) extrahiert. Es wurden 66 mg Amin isoliert, welches ohne weitere Reinigung in Folgereaktionen eingesetzt wurde.

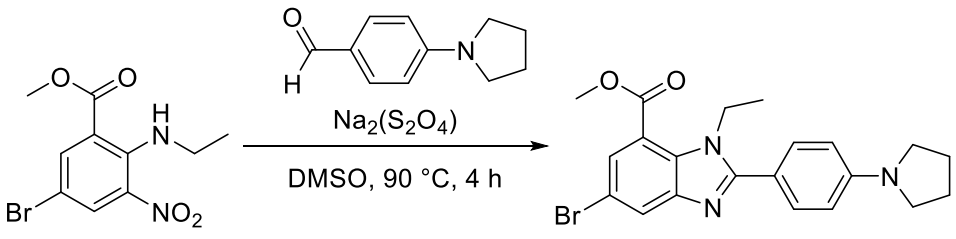
Dazu wurden entsprechend der Synthesevorschrift **I** 66 mg Amin mit 48 mg EDCI·HCl (0,25 mmol, 1,5 Äq.), 30 mg DMAP (0,25 mmol, 1,5 Äq.) und 25 µl Methoxyessigsäure (0,16 mmol, 2 Äq.) in 1,7 ml CH_2Cl_2 umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **I** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 30,8 mg von Benzimidazol **155** (0,065 mmol) als hellgelber Feststoff isoliert. Die kombinierte Ausbeute über drei Stufen betrug 31 %.



$C_{26}H_{27}N_5O_4$
473,53

R_f = 0,16 (CH_2Cl_2/MeOH 90:10), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 474 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 472 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{26}H_{28}N_5O_4^+$): 474,21358 gef.: 474,21350, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =3269 (br), 3044 (w), 2931 (m), 2835 (w), 1649 (s), 1611 (s), 1543 (s), 1512 (s), 1485 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 8.93 – 8.87 (m, 1H, H-5‘), 8.78 (dd, ^3J = 5.1 Hz, ^4J = 1.6 Hz, 1H, H-4‘), 8.19 (dt, ^3J = 8.0 Hz, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-2‘), 8.16 (d, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-4), 7.74 (d, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-6), 7.68 (ddd, ^3J = 7.9, 5.0 Hz, ^4J = 0.9 Hz, 1H, H-3‘), 7.39 (d, ^3J = 8.6 Hz, 2H, H-13/17), 6.92 (d, ^3J = 8.6 Hz, 2H, H14/16), 4.56 (s, 2H, H-11), 4.38 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H, H-7), 4.10 (s, 2H, H-17), 3.79 (s, 3H, H-18), 3.52 (s, 3H, H-21), 1.03 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 169.67 (s, C-19), 168.05 (s, C-10), 159.20 (s), 152.65 (s), 150.38 (d, C-4‘), 149.22 (d, C-5‘), 143.65 (s), 137.67 (d, C-2‘), 132.68 (s), 130.29 (s), 129.20 (d, C-13/17), 127.88 (s), 126.59 (s), 123.97 (d, C-3‘), 122.42 (s), 117.27 (d, C-6), 113.59 (d, C-14/16), 112.78 (d, C-4), 71.55 (t, C-20), 58.25 (q, C-21), 54.29 (q, C-18), 42.94 (t, C-11), 40.77 (t, C-7), 14.58 (q, C-8).

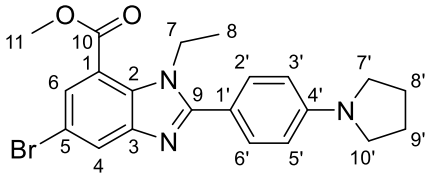
Synthese von Methyl-5-Brom-1-Ethyl-2-(4-(Pyrrolidin-1-yl)Phenyl)-1*H*-Benzo[d]imidazol-7-Carboxylat (160)



122 84 % **160**

Entsprechend Synthesevorschrift **E** wurden 200 mg **122** (0,66 mmol), 348 mg $Na_2(S_2O_4)$ (2 mmol, 3 Äq.) und 175 mg 4-Pyrrolidinbenzaldehyd (1 mmol, 1,5 Äq.) in 3,3 ml DMSO (0,2 M) umgesetzt. Nach der wässrigen Aufarbeitung und Extraktion wurde das Rohprodukt in

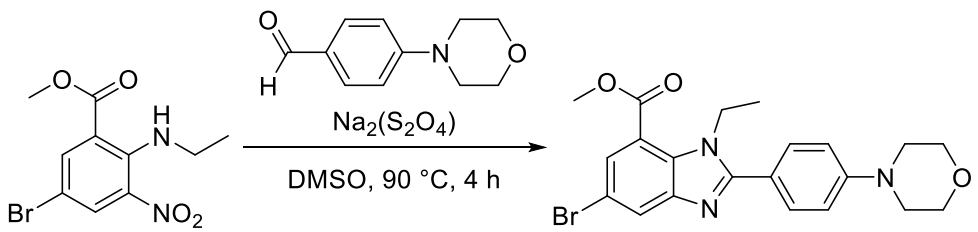
Toluol aufgenommen, mit 2 g Semicarbazid auf Kieselgel (20 %) versetzt und anschließend für 9 h refluxiert. Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere chromatographische Reinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 238 mg von Benzimidazol **160** (0,55 mmol, 84 %) beige-gelber Feststoff isoliert.



$C_{21}H_{22}BrN_3O_2$
428,33

R_f = 0,48 (EtOAc), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 428, 430 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3367 (br), 2969 (m), 2844 (w), 1721 (s), 1552 (m), 1527 (m), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.05 (d, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-4), 7.85 (d, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-6), 7.57 (d, ^3J = 8.8 Hz, 2H, H-2'/6'), 6.64 (d, ^4J = 8.8 Hz, 2H, H-3'/5'), 4.61 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H, H-7), 3.99 (s, 3H, H-11), 3.45 – 3.29 (m, 4H, H-7'/10'), 2.14 – 1.97 (m, 4H, H-8'/9'), 1.06 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-8). **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 165.98 (s, C-10), 158.64 (s), 148.86 (s), 131.99 (s), 130.80 (d, C-2'/6'), 127.40 (d, C-6), 126.27 (d, C-4), 117.80 (s), 113.82 (s), 111.39 (d, C-3'/5'), 52.72 (q, C-11), 47.55 (t, C-7'/10'), 41.90 (t, C-7), 25.53 (t, C-8'/9'), 15.12 (q, C-8).

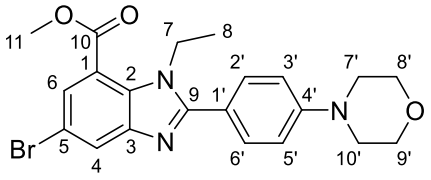
Synthese von Methyl-5-Brom-1-Ethyl-2-(4-Morpholinophenyl)-1*H*-Benzo[d]imidazol-7-Carboxylat (161)



122 96 % **161**

Entsprechend Synthesevorschrift **E** wurden 200 mg **122** (0,66 mmol), 348 mg $Na_2(S_2O_4)$ (2 mmol, 3 Äq.) und 189 mg 4-Morpholinbenzaldehyd (1,36 mmol, 1,5 Äq.) in 3,3 ml DMSO (0,2 M) umgesetzt. Nach der wässrigen Aufarbeitung und Extraktion wurde das Rohprodukt in Toluol aufgenommen, mit 2 g Semicarbazid auf Kieselgel (20 %) versetzt und anschließend für 9 h refluxiert. Anschließend wurde die Lösung über ein Kieselgelbett filtriert und mit EtOAc

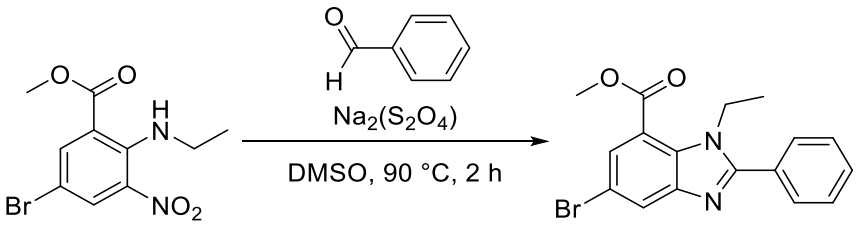
nachgewaschen. Die organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das erhaltene Produkt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere chromatographische Reinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 282 mg von Benzimidazol **161** (0,63 mmol, 96 %) als beige-gelber Feststoff isoliert.



$C_{21}H_{22}BrN_3O_3$
444,33

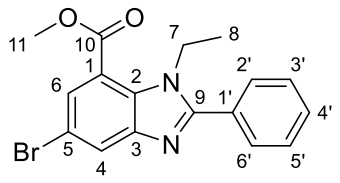
R_f = 0,46 (EtOAc), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 444, 446 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3337 (br), 3079 (w), 2954 (m), 2854 (m), 1720 (w), 1682 (m), 1530 (m), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.13 (m, 1H, H-4), 7.91 (d, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-6), 7.64 (d, ^3J = 8.8 Hz, 2H, H-2‘/6‘), 7.02 (d, ^3J = 8.9 Hz, 2H, H-3‘/5‘), 4.63 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H, H-7), 4.01 (s, 3H, H-11), 3.93 – 3.84 (m, 4H, H-8‘/9‘), 3.37 – 3.27 (m, 4H, H-7‘/10‘), 1.09 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 165.70 (s, C-10), 156.64 (s), 147.00 (s), 130.84 (d, C-2‘/6‘), 128.22 (d, C-6), 128.20 (d, C-4), 114.73 (d, C-3‘/5‘), 66.70 (d, C-8‘/9‘), 52.79 (q, C-11), 48.19 (d, C-7‘/10‘), 42.03 (t, C-7), 15.23 (q, C-8).

Synthese von Methyl-5-Brom-1-Ethyl-2-Phenyl-1*H*-Benzo[d]imidazol-7-Carboxylat (162)



122 96 % **162**

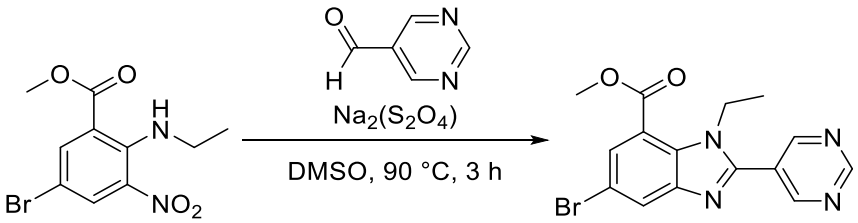
Entsprechend Synthesevorschrift **E** wurden 200 mg **122** (0,66 mmol), 350 mg $Na_2(S_2O_4)$ (2 mmol, 3 Äq.) und 99 µl Benzaldehyd (0,98 mmol, 1,5 Äq.) in 3,3 ml DMSO (0,2 M) für 2 h bei 90 °C umgesetzt. Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere Reinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 227 mg von Benzimidazol **162** (0,63 mmol, 96 %) als beiger Feststoff isoliert.



$C_{17}H_{15}BrN_2O_2$
359,22

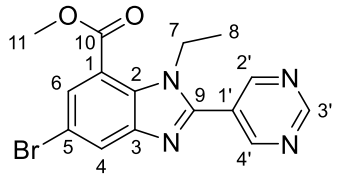
R_f = 0,77 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 359, 361 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3076 (w), 2990 (w), 2950 (w), 1720 (s), 1594 (w), 1530 (m), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.11 (d, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-4), 7.92 (d, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-6), 7.71 – 7.64 (m, 2H, H-3‘/5‘), 7.58 – 7.51 (m, 3H, H-4‘, H-2‘/6‘), 4.59 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H, H-7), 4.01 (s, 3H, H-11), 1.09 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 165.78 (s, C-10), 157.34 (s), 131.93 (s), 131.39 (s), 130.21 (d, C-4‘), 129.63 (d, C-3‘/5‘), 128.81 (d, C-2‘/6‘), 128.35 (d, C-6), 127.03 (d, C-4), 118.14 (s), 114.16 (s) 52.81 (q, C-11), 41.84 (t, C-7), 15.35 (q, C-8).

Synthese von Methyl-5-Brom-1-Ethyl-2-(Pyrimidin-5-yl)-1*H*-Benzo[d]imidazol-7-Carboxylat (163)



122 85 % **163**

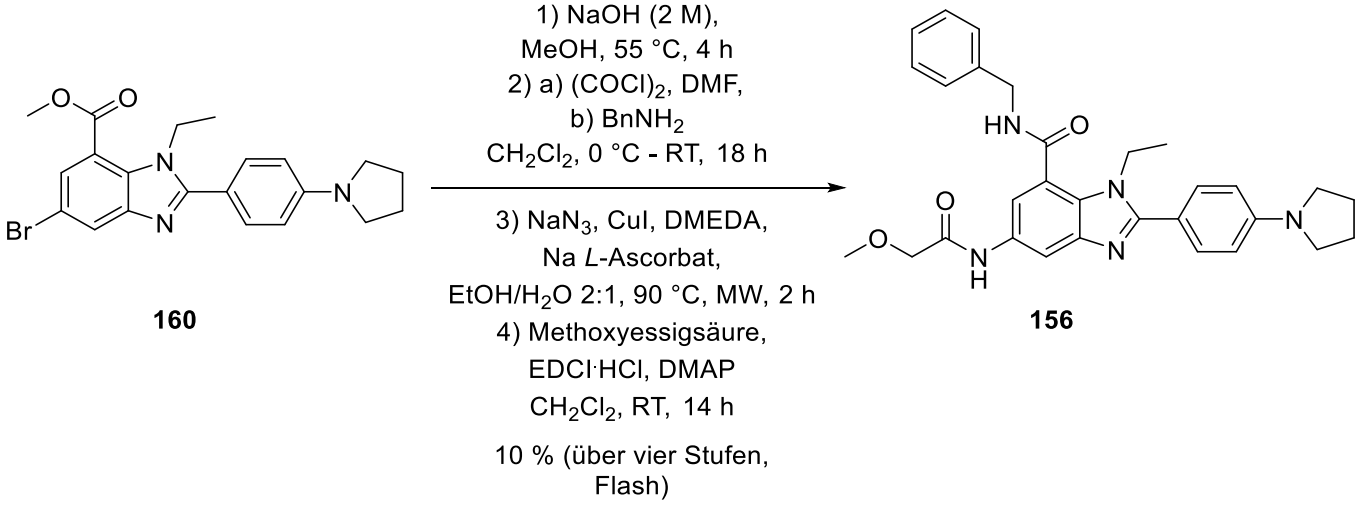
Entsprechend Synthesevorschrift **E** wurden 160 mg **122** (0,53 mmol), 280 mg $Na_2(S_2O_4)$ (1,6 mmol, 3 Äq.) und 84 mg Pyrimidin-5-Carbaldehyd (0,78 mmol, 1,5 Äq.) in 2,5 ml DMSO (0,2 M) für 3 h bei 90 °C umgesetzt. Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere Reinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 163 mg von Benzimidazol **124** (0,45 mmol, 85 %) als hellgelber Feststoff isoliert.



$C_{15}H_{13}BrN_4O_2$
361,20

R_f = 0,63 (CH_2Cl_2/MeOH 90:10), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 361, 363 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3211 (br), 2951 (w), 1719 (s), 1584 (m), 1555 (m), 1532 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 9.40 (s, 1H, H-3‘), 9.12 (s, 2H, H-2‘/4‘), 8.15 (d, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-4), 8.00 (d, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-6), 4.63 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H, H-7), 4.02 (s, 3H, H-11), 1.18 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-8) **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 165.44 (s, C-10), 159.52 (d, C-3‘), 157.14 (d, C-2‘/4‘), 150.44 (s), 146.39 (s), 131.79 (s), 129.57 (d, C-6), 127.56 (d, C-4), 125.15 (s), 118.49 (s), 114.94 (s), 52.99 (q, C-11), 42.25 (t, C-7), 15.72 (q, C-8).

Synthese von 1-Ethyl-5-(2-Methoxyacetamido)-*N*-Benzyl-2-(4-(Pyrrolidin-1-yl)Phenyl)-1*H*-Benzo[d]imidazol-7-Carboxamid (156)

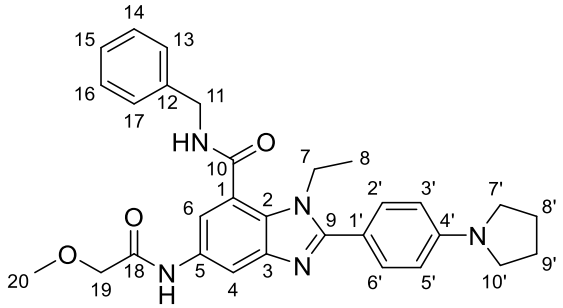


Entsprechend der Synthesevorschrift **F** wurden 77 mg **160** (0,18 mmol) mit 0,1 ml aq. NaOH (2 M) in 2 ml MeOH umgesetzt. Nach 4 h bei 55 °C wurde das Lösemittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand getrocknet. Das Natriumsalz der Carbonsäure wurde ohne weitere Reinigung zusammen mit dem überschüssigen NaOH in der nächsten Reaktion eingesetzt.

Dazu wurde entsprechend der Synthesevorschrift **G** das Natriumsalz der Carbonsäure mit 23 µl $(COCl)_2$ (0,27 mmol, 1,5 Äq.) und einer katalytischen Menge DMF in 1,8 ml CH_2Cl_2 (0,1 M) zum entsprechenden Säurechlorid umgesetzt. Nach 20 min wurden erneut 23 µl $(COCl)_2$ zur Reaktion gegeben und für eine weitere Stunde gerührt. Nach dem Entfernen des Lösemittels wurde das Säurechlorid mit 34 µl Benzylamin (0,36 mmol, 2 Äq.) in 1,8 ml CH_2Cl_2 (0,1 M) zum Amid umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **G** aufgearbeitet. Es wurden 83 mg Amid isoliert, welches ohne weitere Reinigung in Folgereaktionen eingesetzt wurde.

Dazu wurden entsprechend der Synthesevorschrift **H** 83 mg Amid mit 32 mg NaN_3 (0,50 mmol, 3 Äq.), 10 mg CuI (0,050 mmol, 30 mol%), 5 µl DMEDA (0,051 mmol, 35 mol%) und 3 mg Na-*L*-Ascorbat (0,017 mmol, 10 mol%) in 1,7 ml EtOH/H_2O (2:1) umgesetzt. Nach 1 h bei 90 °C in der Synthesemikrowelle wurden erneut 11 mg CuI und 3 mg Na-*L*-Ascorbat hinzugegeben und für eine weitere Stunde bei 90 °C gerührt. Entsprechend der Vorschrift **H** wurde das Amin mit $CHCl_3$/*i*-PrOH (3:1) extrahiert. Das Rohprodukt enthielt nach der Aufarbeitung noch das entsprechende Azid, sodass der Rückstand in 2 ml MeOH gelöst und mit 3 mg Zn und 5 mg NH_4COOH versetzt wurde. Nach 3 h wurde die Lösung mittels eines Spritzenvorsatzfilters filtriert und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Es wurden 30 mg Amin isoliert, welches ohne weitere Reinigung in Folgereaktionen eingesetzt wurde.

Dazu wurden entsprechend der Synthesevorschrift **I** 30 mg Amin mit 20 mg EDCI·HCl (0,105 mmol, 1,5 Äq.), 13 mg DMAP (0,105 mmol, 1,5 Äq.) und 11 µl Methoxyessigsäure (0,14 mmol, 2 Äq.) in 1 ml CH_2Cl_2 umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **I** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Flash-Chromatographie gereinigt (CH_2Cl_2/MeOH: 0 % B – 15 % B). Es wurden 9 mg von Benzimidazol **156** (0,018 mmol) als beige-gelber Feststoff isoliert. Die kombinierte Ausbeute über vier Stufen betrug 10 %.

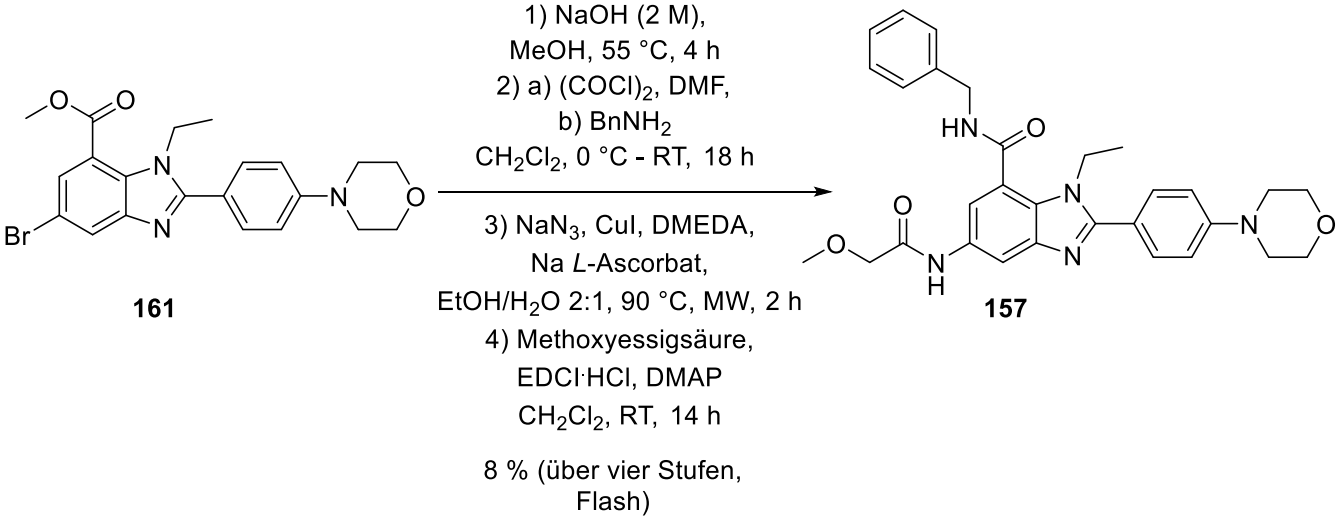


$C_{30}H_{33}N_5O_3$
511,63

R_f = 0,26 (EtOAc), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 512 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{30}H_{34}N_5O_3^+$): 512,26561 gef.: 512,26478, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =2956 (m), 2925 (s), 2854 (m), 1607 (s), 1542 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.36 (s, 1H, NH), 7.75 (d, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-6), 7.72 (d, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-4), 7.53 – 7.46 (m, 2H, H-2‘/6‘), 7.41 (d, ^3J = 6.9 Hz, 2H, H-13/17), 7.39 – 7.33 (m, 2H, H-14/16), 7.30 (dd, ^3J = 6.6 Hz, ^4J = 2.1 Hz, 1H, H-15), 7.19 (s, 1H, NH), 6.60 (d, ^3J = 8.4 Hz, 2H, H-3‘/5‘), 4.65 (d, ^3J = 5.7 Hz, 2H, H-11), 4.42 (q, ^3J = 7.2 Hz, 2H, H-7), 4.00 (s, 2H, H-19), 3.50 (s, 3H, H-20), 3.37 – 3.30 (m, 4H, H-7‘/10‘), 2.04 (td, ^3J = 6.6, 5.8, 3.2 Hz, 4H, H-8‘/9‘), 1.03 (t, ^3J = 7.0 Hz, 3H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 167.76 (s, C-18), 167.52 (s, C-10), 157.35 (s), 148.71 (s), 137.95 (s, C-12), 131.09 (s), 130.59 (d, C-2‘/6‘),

128.88 (s), 128.76 (d, C-14/16), 128.19 (d, C-13/17), 127.63 (d, C-15), 121.61 (s), 115.94 (s), 115.16 (d, C-6), 112.71 (d, C-4), 111.34 (d, C-3‘/5‘), 72.01 (t, C-19), 59.32 (q, C-20), 47.53 (t, C-7‘/10‘), 44.31 (t, C-11), 41.01 (t, C-7), 25.52 (t, C-8‘/9‘), 15.70 (q, C-8).

Synthese von 1-Ethyl-5-(2-Methoxyacetamido)-*N*-Benzyl-2-(4-Morpholinobenzyl)-1*H*-Benzo[d]imidazol-7-Carboxamid (157)



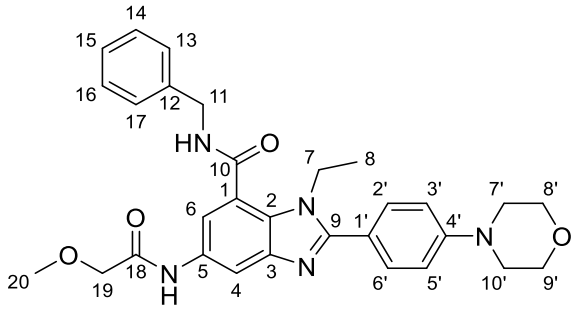
Entsprechend der Synthesevorschrift **F** wurden 72 mg **161** (0,16 mmol) mit 0,1 ml aq. NaOH (2 M) in 2 ml MeOH umgesetzt. Nach 4 h bei 55 °C wurde das Lösemittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand getrocknet. Das Natriumsalz der Carbonsäure wurde ohne weitere Reinigung zusammen mit dem überschüssigen NaOH in der nächsten Reaktion eingesetzt.

Dazu wurde entsprechend der Synthesevorschrift **G** das Natriumsalz der Carbonsäure mit 20 µl $(COCl)_2$ (0,24 mmol, 1,5 Äq.) und einer katalytischen Menge DMF in 1,8 ml CH_2Cl_2 (0,1 M) zum entsprechenden Säurechlorid umgesetzt. Nach 20 min wurden erneut 15 µl $(COCl)_2$ zur Reaktion gegeben und für eine weitere Stunde gerührt. Nach dem Entfernen des Lösemittels wurde das Säurechlorid mit 43 µl Benzylamin (0,4 mmol, 2,5 Äq.) in 1,8 ml CH_2Cl_2 (0,1 M) zum Amid umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **G** aufgearbeitet. Es wurden 68 mg Amid isoliert, welches ohne weitere Reinigung in Folgereaktionen eingesetzt wurde.

Dazu wurden entsprechend der Synthesevorschrift **H** 68 mg Amid mit 25 mg NaN_3 (0,39 mmol, 3 Äq.), 8 mg CuI (0,039 mmol, 30 mol%), 5 µl DMEDA (0,046 mmol, 35 mol%) und 3 mg Na-*L*-Ascorbat (0,013 mmol, 10 mol%) in 1,3 ml EtOH/H_2O (2:1) umgesetzt. Nach 1 h bei 90 °C in der Synthesemikrowelle wurden erneut 8 mg CuI und 3 mg Na-*L*-Ascorbat

hinzugegeben und für eine weitere Stunde bei 90 °C gerührt. Entsprechend der Vorschrift **H** wurde die Reaktionslösung mit $CHCl_3$/*i*-PrOH (3:1) extrahiert, die organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Es wurden 34 mg Amin isoliert, welches ohne weitere Reinigung in Folgereaktionen eingesetzt wurde.

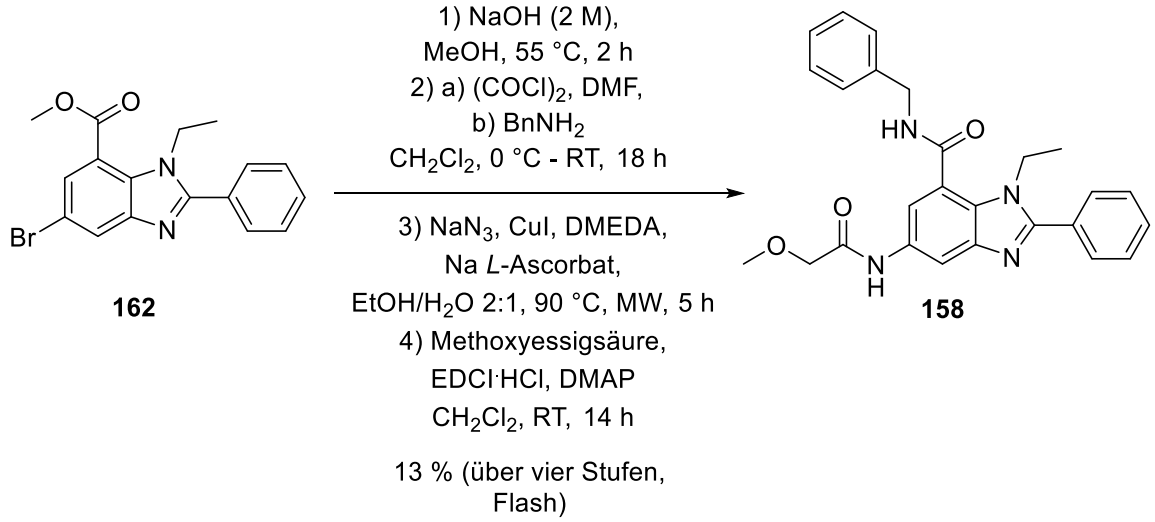
Dazu wurden entsprechend der Synthesevorschrift **I** 34 mg Amin mit 21 mg EDCI·HCl (0,11 mmol, 1,5 Äq.), 13 mg DMAP (0,11 mmol, 1,5 Äq.) und 11 µl Methoxyessigsäure (0,14 mmol, 2 Äq.) in 1 ml CH_2Cl_2 umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **I** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Flash-Chromatographie gereinigt (CH_2Cl_2/MeOH: 0 % B – 15 % B). Es wurden 6,6 mg von Benzimidazol **157** (0,013 mmol, 18 %) als beiger Feststoff isoliert. Die kombinierte Ausbeute über vier Stufen betrug 8 %.



$C_{30}H_{33}N_5O_4$
527,63

R_f = 0,22 (EtOAc), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 528 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 526 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{30}H_{34}N_5O_4^+$): 528,26053 gef.: 528,25967, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =3272 (br), 2924 (m), 2853 (m), 1651 (s), 1606 (s), 1540 (s, 1484 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.37 (s, 1H, NH), 7.81 (d, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-6), 7.75 (d, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-4), 7.55 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2H, H-2‘/6‘), 7.43 – 7.39 (m, 2H, H-13/17), 7.39 – 7.33 (m, 2H, H-14/16), 7.33 – 7.29 (m, 1H, H-15), 7.07 (t, ^3J = 5.9 Hz, 1H, NH), 6.97 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2H, H-3‘/5‘), 4.66 (d, ^3J = 5.7 Hz, 2H, H-11), 4.43 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H, H-7), 4.03 (s, 2H, H-19), 3.90 – 3.86 (m, 4H, H-8‘/9‘), 3.52 (s, 3H, H-20), 3.30 – 3.22 (m, 4H, H-7‘/10‘), 1.04 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 167.83 (s, C-18), 167.39, (s, C-10) 156.60 (s), 152.09 (s), 137.86 (s, C-12), 131.16 (s), 130.56 (d, C-2‘/6‘), 128.80 (d, C14/16), 128.18 (d, C-13/17), 127.70 (d, C-15), 127.05 (s), 121.76 (s), 120.68 (s), 115.56 (d, C-6), 114.74 (d, C-15), 113.19 (d, C-4), 72.00 (t, C-19), 66.75 (t, C-8‘/9‘), 59.34 (q, C-20), 48.32 (t, C-7‘/10‘), 44.36 (t, C-11), 41.02 (t, C-7), 15.77 (q, C-8).

Synthese von 1-Ethyl-5-(2-Methoxyacetamido)-*N*-Benzyl-2-Phenyl-1*H*-Benzo[d]imidazol-7-Carboxamid (158)



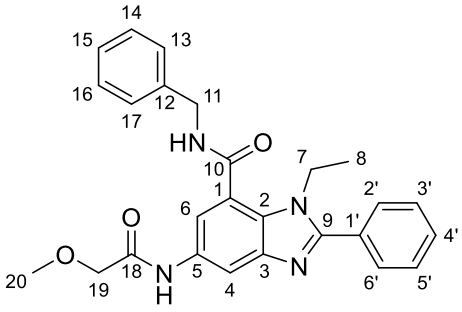
Entsprechend der Synthesevorschrift **F** wurden 135 mg **162** (0,38 mmol) mit 0,5 ml aq. NaOH (2 M) in 5 ml MeOH umgesetzt. Nach 2 h bei 55 °C wurde das Lösemittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand erneut in Wasser aufgenommen. Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl-Lösung auf < 3 gestellt und die wässrige Phase wurde mit EtOAc extrahiert (3x). Die organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Es wurden 102 mg Carbonsäure isoliert, welche ohne weitere Reinigung in der Folgereaktion eingesetzt wurden.

Dazu wurden entsprechend der Synthesevorschrift **G** 100 mg Carbonsäure mit 33 µl $(COCl)_2$ (0,48 mmol, 1,5 Äq.) und einer katalytischen Menge DMF in 3,2 ml CH_2Cl_2 (0,1 M) zum entsprechenden Säurechlorid umgesetzt. Nach dem Entfernen des Lösemittels wurde das Säurechlorid mit 87 µl Benzylamin (8 mmol, 2,5 Äq.) in 3,2 ml CH_2Cl_2 (0,1 M) zum Amid umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **G** aufgearbeitet. Es wurden 111 mg Amid isoliert, welches ohne weitere Reinigung in Folgereaktionen eingesetzt wurde.

In der Folgereaktion wurden entsprechend der Synthesevorschrift **H** 111 mg Amid mit 62 mg NaN_3 (0,96 mmol, 3 Äq.), 18 mg CuI (0,096 mmol, 30 mol%), 10 µl DMEDA (0,096 mmol, 30 mol%) und 6 mg Na-*L*-Ascorbat (0,032 mmol, 10 mol%) in 3,2 ml EtOH/H_2O (2:1) umgesetzt. Nach 1 h bei 90 °C in der Synthesemikrowelle wurden erneut 18 mg CuI und 6 mg Na-*L*-Ascorbat hinzugegeben und für eine weitere Stunde bei 90 °C gerührt. Aufgrund des nicht vollständigen Umsatz wurde die Reaktion für weitere 3 h bei 90 °C gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung entsprechend der Vorschrift **H** mit $CHCl_3$/*i*-PrOH (3:1) extrahiert, die organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Es

wurden 70 mg Amin isoliert, welches ohne weitere Reinigung in Folgereaktionen eingesetzt wurde.

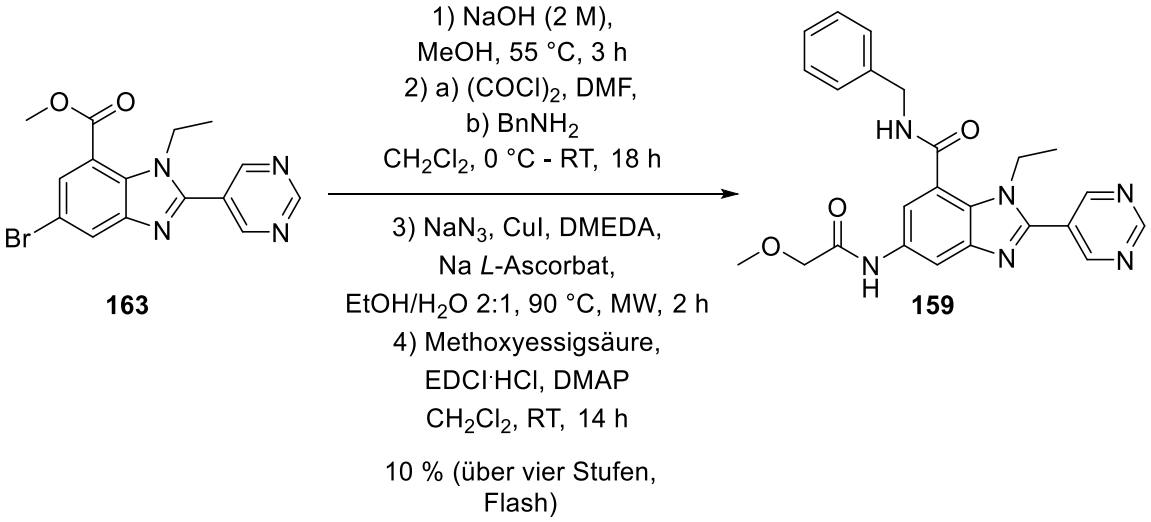
Dazu wurden entsprechend der Synthesevorschrift **I** 70 mg Amin mit 54 mg EDCI·HCl (0,28 mmol, 1,5 Äq.), 34 mg DMAP (0,28 mmol, 1,5 Äq.) und 29 µl Methoxyessigsäure (0,38 mmol, 2 Äq.) in 2 ml CH_2Cl_2 umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **I** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Flash-Chromatographie gereinigt (CyH/EtOAc: 0 % B – 80 % B). Es wurden 21,8 mg von Benzimidazol **158** (0,049 mmol) als hellbeiger Feststoff isoliert. Die kombinierte Ausbeute über vier Stufen betrug 13 %.



$C_{26}H_{26}N_4O_3$
442,52

R_f = 0,21 (CH_2Cl_2/MeOH 95:5), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 443 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 441 $[M-H]^-$,, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{26}H_{27}N_4O_3^+$): 443,20776 gef.: 443,20786, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =3271 (br), 3062 (m), 3031 (m), 2925 (s), 2853 (m), 1654 (s), 1613 (m), 1543 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.36 (s, 1H, NH), 7.78 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, H-4, H-6), 7.62 – 7.55 (m, 2H, H-2‘/3‘), 7.48 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, H-3‘/5‘, H-4‘), 7.43 – 7.38 (m, 2H, H-13/17), 7.35 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, H-14/16), 7.32 – 7.28 (m, 1H, H-15), 7.19 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, NH), 4.64 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, H-11), 4.37 (q, ^3J = 7.0 Hz, 2H, H-7), 4.00 (s, 2H, H-19), 3.50 (s, 3H, H-20), 1.00 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 167.77 (s, C-18), 167.34 (s, C-10), 156.28 (s), 144.76 (s), 137.85 (s, C-12), 131.31 (d, C-4‘), 130.29 (d, C-2‘/6‘), 129.90 (d, C-14/16), 129.45 (d, C-3‘/5‘), 128.21 (d, C-13/17), 127.69 (d, C-15), 121.93 (s), 115.76 (d, C-6), 113.36 (d, C-4), 71.98 (t, C-19), 59.33 (q, C-20), 44.33 (t, C-11), 40.94 (t, C-7), 15.79 (q, C-8).

Synthese von 1-Ethyl-5-(2-Methoxyacetamido)-*N*-Benzyl-2-(Pyrimidin-5-yl)-1*H*-Benzo[d]imidazol-7-Carboxamid (159)

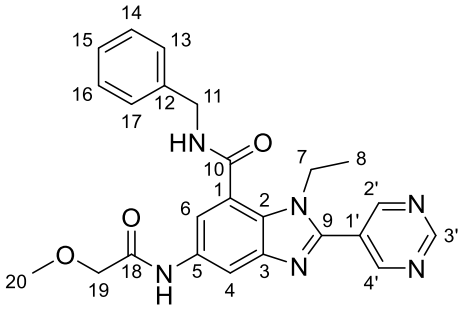


Entsprechend der Synthesevorschrift **F** wurden 144 mg **163** (0,4 mmol) mit 0,3 ml aq. NaOH (2 M) in 4 ml MeOH umgesetzt. Nach 3 h bei 55 °C wurde das Lösemittel *in vacuo* entfernt und der der Rückstand getrocknet. Das Natriumsalz der Carbonsäure wurde ohne weitere Reinigung zusammen mit dem überschüssigen NaOH in der nächsten Reaktion eingesetzt.

Dazu wurde entsprechend der Synthesevorschrift **G** das Natriumsalz der Carbonsäure mit 63 µl $(COCl)_2$ (0,8 mmol, 2 Äq.) und einer katalytischen Menge DMF in 4 ml CH_2Cl_2 (0,1 M) zum entsprechenden Säurechlorid umgesetzt. Nach 20 min wurden erneut 25 µl $(COCl)_2$ zur Reaktion gegeben und für eine weitere Stunde gerührt. Nach dem Entfernen des Lösemittels wurde das Säurechlorid mit 133 µl Benzylamin (1,2 mmol, 3 Äq.) in 4 ml CH_2Cl_2 (0,1 M) zum Amid umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **I** aufgearbeitet. Es wurden 189 mg Amid isoliert, welches ohne weitere Reinigung in Folgereaktionen eingesetzt wurde.

In der Folgereaktion wurden entsprechend der Synthesevorschrift **H** 189 mg Amid mit 84 mg NaN_3 (1,29 mmol, 3 Äq.), 21 mg CuI (0,13 mmol, 30 mol%), 15 µl DMEDA (0,14 mmol, 35 mol%) und 8 mg Na-*L*-Ascorbat (0,04 mmol, 10 mol%) in 4,3 ml $EtOH/H_2O$ (2:1) umgesetzt. Nach 1 h bei 90 °C in der Synthesemikrowelle wurden erneut 21 mg CuI und 8 mg Na-*L*-Ascorbat hinzugegeben und für eine weitere Stunde bei 90 °C gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung entsprechend der Vorschrift **H** mit $CHCl_3$/*i*-PrOH (3:1) extrahiert, die organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Es wurden 99 mg Amin isoliert, welches ohne weitere Reinigung in Folgereaktionen eingesetzt wurde.

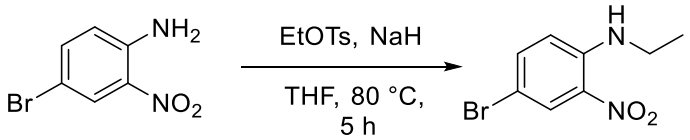
Dazu wurden entsprechend der Synthesevorschrift **I** 99 mg Amin mit 77 mg EDCI·HCl (0,4 mmol, 1,5 Äq.), 49 mg DMAP (0,4 mmol, 1,5 Äq.) und 41 µl Methoxyessigsäure (0,54 mmol, 2 Äq.) in 2,7 ml CH_2Cl_2 umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **I** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Flash-Chromatographie gereinigt (CH_2Cl_2/MeOH: 0 % B – 15 % B). Es wurden 19,5 mg von Benzimidazol **159** (0,04 mmol) hellgelber Feststoff isoliert. Die kombinierte Ausbeute über vier Stufen betrug 10 %.



$C_{24}H_{24}N_6O_3$
444,50

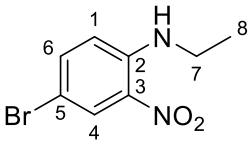
R_f = 0,09 (CH_2Cl_2/MeOH 95:5), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 445 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 443 $[M-H]^-$,, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{24}H_{25}N_6O_3^+$): 445,19826 gef.: 445,19842, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =3270 (br), 3057 (m), 2987 (m), 2931 (m), 1653 (s), 1611 (s), 1553 (s), 1486 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 9.33 (s, 1H, H-3‘), 9.01 (s, 2H, H-2‘/4‘), 8.44 (s, 1H, NH), 7.85 (d, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-4), 7.82 (d, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-6), 7.43 – 7.39 (m, 2H, H-13/17), 7.39 – 7.33 (m, 2H, H-14/16), 7.33 – 7.28 (m, 1H, H-15), 4.66 (d, ^3J = 5.8 Hz, 2H, H-11), 4.41 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H, H-7), 4.02 (s, 2H, H-19), 3.51 (s, 3H, H-20), 1.08 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 168.05 (s, C-12), 166.93 (s, C-10), 159.21 (d, C-3‘), 156.93 (d, C-2‘/4‘), 149.88 (s), 144.89 (s), 137.81 (s), 131.78 (s, C-12), 128.93 (s), 128.79 (d, C-14/16), 128.17 (d, C-13/17), 127.74 (d, C-15), 125.28 (s), 122.44 (s), 117.11 (d, C-6), 113.78 (d, C-4), 71.93 (t, C-19), 59.34 (q, C-20), 44.35 (t, C-11), 41.34 (t, C-7), 15.98 (q, C-8).

Synthese von 4-Brom-*N*-Ethyl-2-Nitroanilin (116)



115 70 % (Flash) **116**

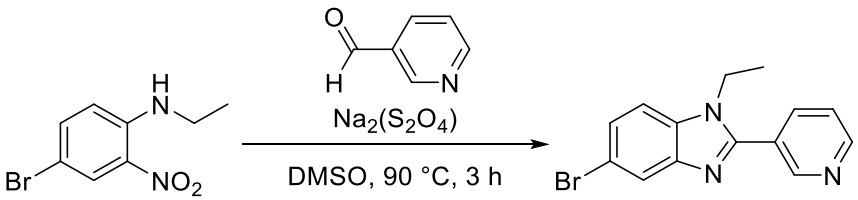
In einem Rundkolben wurden 543 mg (2,5 mmol) 4-Brom-2-Nitroanilin (**115**) in 12,5 ml THF (0,2 M) unter Schutzatmosphäre gelöst. Anschließend wurden 120 mg NaH (60 %, 3 mmol, 1,2 Äq.) hinzugegeben und die Reaktion wurde für 1 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurden 750 mg Ethyltosylat (3,75 mmol, 1,5 Äq.) hinzugegeben und die Reaktion für 4 h refluxiert. Nach dem Abkühlen auf RT wurde dest. Wasser und ges. NaCl-Lösung hinzugefügt und die Lösung mit MTBE/EtOAc (1:1) extrahiert (3x). Die organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie gereinigt (CyH/EE: 0 % B – 15 % B). Es wurden 427mg von Nitroanilin **116** (1,75 mmol, 70 %) als oranger Feststoff isoliert.



$C_8H_9BrN_2O_2$
245,08

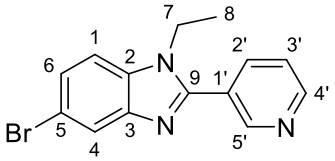
R_f = 0,59 (CyH/EtOAc 3:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 245, 247 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 244, 246 $[M-H]^-$, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =3371 (br), 3095 (m), 2986 (w), 2969 (m), 2924 (m), 2880 (m), 1772 (w), 1621 (m), 1562 (m), 1510 (m)., **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.32 (d, ^4J = 2,4 Hz, 1H, H-4), 7.96 (s, 1H, NH), 7.49 (dd, ^3J = 9,2 Hz, ^4J = 2,4 Hz, 1H, H-6), 6.76 (d, ^3J = 9,2 Hz, 1H, H-1), 3.34 (q, ^3J = 7,2 Hz, 2H, H-7), 1.37 (t, ^3J = 7,2 Hz, 3H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 144,34 (s), 138.89 (d, C-6), 131.91 (s), 128.81 (d, C-13), 115.52 (d, C-1), 106.18 (s), 37.86 (t, C-7), 14.29 (q, C-8). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.[347] Die Synthese der Verbindung erfolgte in der angegebenen Literatur über eine andere Reaktion.

Synthese von 5-Brom-1-Ethyl-2-(Pyridin-3-yl)-1*H*-Benzo[d]imidazol (169)



116 88 % **169**

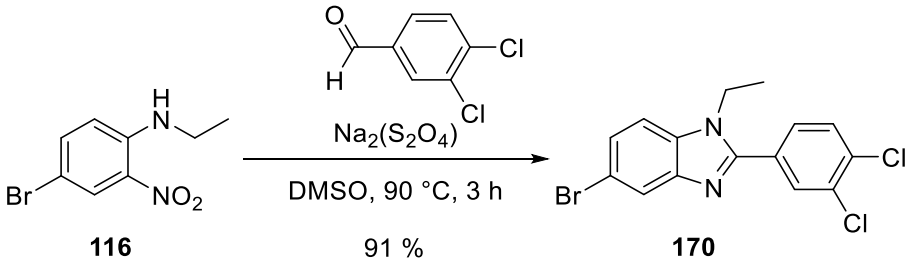
Entsprechend Synthesevorschrift **E** wurden 613 mg **116** (2,5 mmol), 1,3 g $Na_2(S_2O_4)$ (7,5 mmol, 3 Äq.) und 282 µl Nicotinaldehyd (3 mmol, 1,2 Äq.) in 5 ml DMSO (0,2 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere Reinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 668 mg von Benzimidazol **169** (2,2 mmol, 88 %) als weiß-hellgelber Feststoff isoliert.



$C_{14}H_{12}BrN_3$
302,18

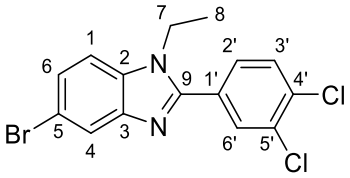
R_f = 0,57 (CyH/EtOAc 2:3), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 302, 304 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3382 (br), 3058 (m), 2977 (m), 2927 (m), 2339 (w), 1725 (w), 1598(m), 1570 (m), 1511 (m), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.97 (dd, ^4J = 2.3 Hz, ^5J = 0.9 Hz, 1H, H-5‘), 8.77 (dd, ^3J = 4.8 Hz, ^4J = 1.7 Hz, 1H, H-4‘), 8.08 (ddd, ^3J = 7.9 Hz, ^4J = 2.3, 1.7 Hz, 1H, H-2‘), 7.96 (dd, ^4J = 1.8 Hz, ^5J = 0.5 Hz, 1H, H-4), 7.49 (ddd, J = 7.9, 4.9, 0.9 Hz, 1H, H-3‘), 7.43 (dd, ^3J = 8.6 Hz, ^4J = 1.8 Hz, 1H, H-6), 7.32 (dd, ^3J = 8.6 Hz, ^5J = 0.6 Hz, 1H, H-1), 4.28 (q, ^3J = 7.3 Hz, 2H, H-7), 1.49 (t, ^3J = 7.3 Hz, 3H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 151.29 (s), 150.95 (d, C-5‘), 149.47 (d, C-4‘), 144.43 (s), 136.84 (d, H-2‘), 134.35 (s), 126.37 (s, C-1‘), 126.26 (d, C-6), 123.72 (d, C-3‘), 122.90 (d, C-4), 115.68 (s), 111.34 (d, C-1), 39.97 (t, C-7), 15.40 (q, C-8).

Synthese von 5-Brom-2-(3,4-Dichlorophenyl)-1-Ethyl-1*H*-Benzo[d]imidazol (170)



116 **170**

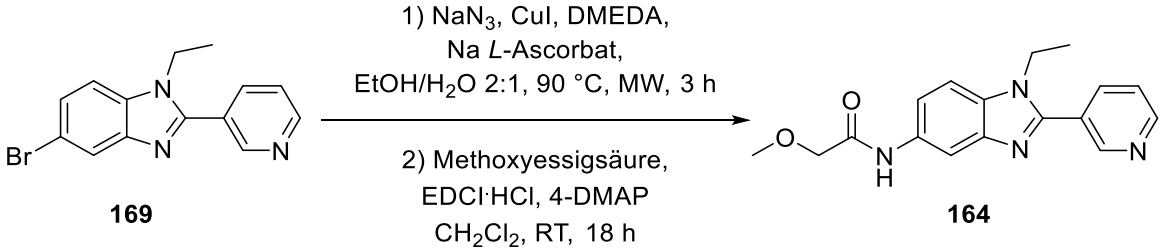
Entsprechend Synthesevorschrift **E** wurden 80 mg **116** (0,33 mmol), 174 mg $Na_2(S_2O_4)$ (1 mmol, 3 Äq.) und 63 mg 3,4-Dichlorbenzaldehyd (0,36 mmol, 1,1 Äq.) in 1,6 ml DMSO (0,2 M) umgesetzt. Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere Reinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 111 mg von Benzimidazol **170** (0,3 mmol, 91 %) als beiger Feststoff isoliert.



$C_{15}H_{11}BrCl_2N_2$
370,07

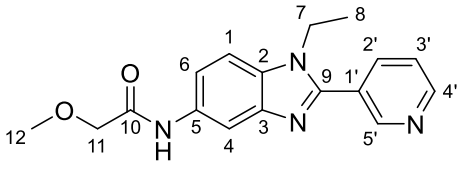
R_f = 0,53 (CyH/EtOAc 2:3), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 369, 371, 373 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3172 (w), 2974 (m), 2955 (m), 2926 (m), 2872 (w), 2854 (w), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.93 (d, ^4J = 1.8 Hz, 1H, H-4), 7.84 (d, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-6‘), 7.61 (d, ^3J = 8.3 Hz, 1H, H-3‘), 7.54 (dd, ^3J = 8.3 Hz, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-2‘), 7.42 (dd, ^3J = 8.6 Hz, ^4J = 1.8 Hz, 1H, H-6), 7.30 (d, ^3J = 8.6 Hz, 1H, H-1), 4.26 (q, ^3J = 7.3 Hz, 2H, H-7), 1.46 (t, ^3J = 7.3 Hz, 3H, H-8). **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 151.84 (s), 144.20 (s), 134.63 (s), 134.34 (s), 133.36 (s), 131.13 (d, C-6‘), 130.90 (d, C-3‘), 129.84 (s), 128.13 (d, C-2‘), 126.32 (d, C-6), 122.89 (d, C-4), 115.74 (s), 111.33 (d, C-1), 39.97 (t, C-7), 15.33 (q, C-8).

Synthese von *N*-(1-Ethyl-2-(Pyridin-3-yl)-1*H*-Benzo[d]imidazol-5-yl)-2-Methoxyacetamid (164)



Entsprechend der Synthesevorschrift **H** wurden 91 mg **169** (0,3 mmol) mit 58 mg NaN_3 (0,9 mmol, 3 Äq.), 17 mg CuI (0,09 mmol, 30 mol%), 9 µl DMEDA (0,1 mmol, 35 mol%) und 6 mg Na-*L*-Ascorbat (0,03 mmol, 10 mol%) in 3 ml EtOH/H_2O (2:1) umgesetzt. Nach 1 h bei 90 °C in der Synthesemikrowelle wurden erneut 17 mg CuI und 6 mg Na-*L*-Ascorbat hinzugegeben und für eine weitere Stunde bei 90 °C gerührt. Anschließend wurde erneut 58 mg NaN_3 hinzugegeben und die Reaktion für eine weitere Stunde bei 90 °C in der Synthesemikrowelle gerührt. Entsprechend der Vorschrift **H** wurde die Reaktionslösung mit $CHCl_3$/*i*-PrOH (3:1) extrahiert (3x). Die organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Es wurden 41 mg Amin isoliert, welches ohne weitere Reinigung in Folgereaktionen eingesetzt wurde.

Dazu wurden entsprechend der Synthesevorschrift **I** 41 mg Amin mit 50 mg EDCI·HCl (0,26 mmol, 1,5 Äq.), 32 mg DMAP (0,26 mmol, 1,5 Äq.) und 26 µl Methoxyessigsäure (0,34 mmol, 2 Äq.) in 1 ml CH_2Cl_2 umgesetzt. Nach 18 h wurde die Reaktion entsprechend der Vorschrift **I** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Flash-Chromatographie gereinigt (CH_2Cl_2/MeOH: 0 % B – 15 % B). Es wurden 39,6 mg von Benzimidazol **164** (0,107 mmol) als hellgelber Feststoff isoliert. Die kombinierte Ausbeute über zwei Stufen betrug 36 %.

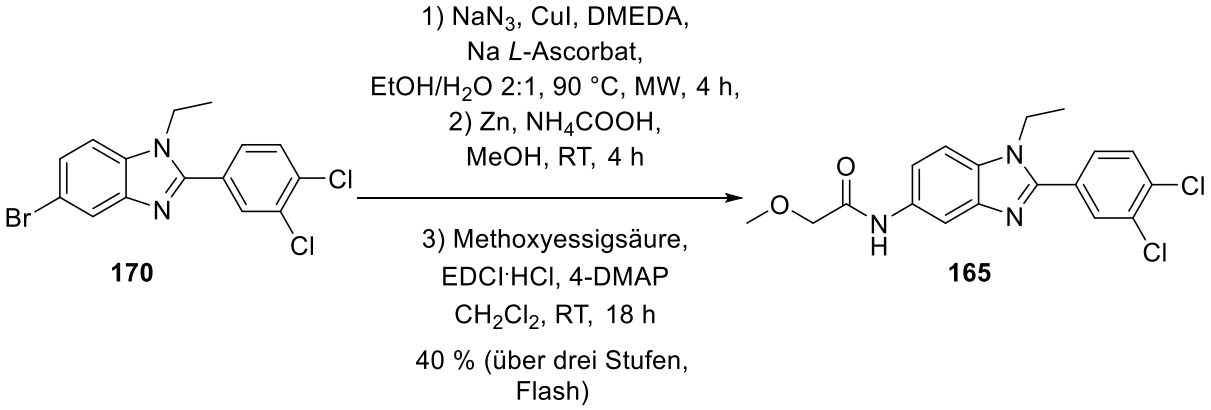


$C_{17}H_{18}N_4O_2$
310,36

R_f = 0,13 (CH_2Cl_2/MeOH 95:5), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 311 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{17}H_{19}N_4O_2^+$): 311,15025 gef.:

311,15034, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =3382 (br), 3067 (w), 2926 (m), 2852 (w), 1672 (s), 1623 (m), 1598 (m), 1541 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 8.87 – 8.82 (m, 1H, H-5‘), 8.66 (d, ^3J = 4.5 Hz, 1H, H-4‘), 8.12 (dt, ^3J = 8.0 Hz, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-2‘), 8.00 (d, ^4J = 1.8 Hz, 1H, H-4), 7.57 (dd, ^3J = 7.9, 4.9 Hz, 1H, H-3‘), 7.52 (d, ^3J = 8.8 Hz, 1H, H-4), 7.47 (dd, ^3J = 8.8 Hz, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-6), 4.26 (q, ^3J = 7.2 Hz, 2H, H-7), 3.98 (s, 2H, H-11), 3.42 (s, 3H, H-12), 1.34 (t, ^3J = 7.3 Hz, 3H, H-8)., **^{13}C-NMR** (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 169.36 (s-10), 150.18 (d, C-4‘), 148.97 (d, C-5‘), 142.20 (s), 137.28 (d, C-2‘), 133.27 (s), 132.28 (s), 126.62 (s), 124.04 (d, C-3‘), 117.73 (d, C-6), 110.93 (d, C-4), 110.47 (d, C-1), 71.60 (t, C-11), 58.25 (q, C-12), 39.54 (t, C-7), 14.11 (q, C-8).

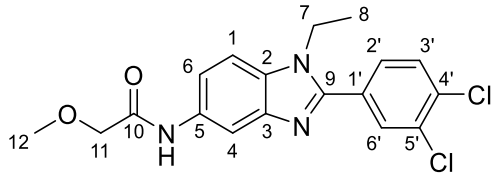
Synthese von *N*-(1-Ethyl-2-(3,4-Dichlorphenyl)-1*H*-Benzo[d]imidazol-5-yl)-2-Methoxyacetamid (165)



Entsprechend der Synthesevorschrift **H** wurden 36 mg **170** (0,1 mmol) mit 19 mg NaN_3 (0,3 mmol, 3 Äq.), 19 mg CuI (0,1 mmol, 1 Äq.), 12 µl DMEDA (0,11 mmol, 1,1 Äq.) und 2 mg Na-*L*-Ascorbat (0,01 mmol, 10 mol%) in 1 ml EtOH/H_2O (2:1) für 4 h bei 90 °C in der Synthesemikrowelle umgesetzt. Entsprechend der Vorschrift **H** wurde die Reaktionslösung mit $CHCl_3$/*i*-PrOH (3:1) extrahiert. Das Rohprodukt enthielt nach der Aufarbeitung noch das entsprechende Azid, sodass der Rückstand in 0,2 ml MeOH gelöst und bei RT mit 9 mg Zn und 13 mg NH_4COOH versetzt wurde. Nach 4 h wurde die Lösung mittels eines Spritzenvorsatzfilters filtriert und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Es wurden 24 mg Amin isoliert, welches ohne weitere Reinigung in Folgereaktionen eingesetzt wurde.

Dazu wurden entsprechend der Synthesevorschrift **I** 24 mg Amin mit 23 mg EDCI·HCl (0,12 mmol, 1,5 Äq.), 15 mg DMAP (0,12 mmol, 1,5 Äq.) und 13 µl Methoxyessigsäure (0,16 mmol, 2 Äq.) in 1 ml CH_2Cl_2 umgesetzt. Nach 18 h wurde die Reaktion entsprechend der Vorschrift **I** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Flash-Chromatographie

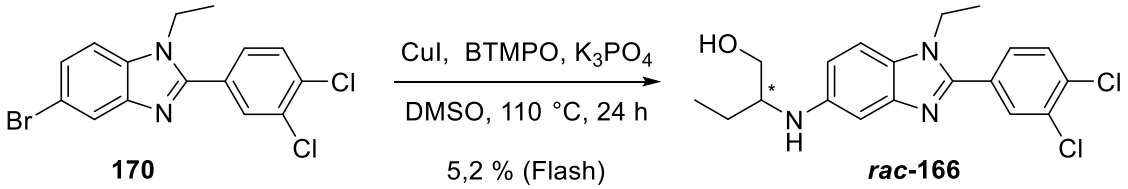
gereinigt (CH_2Cl_2/MeOH: 0 % B – 15 % B). Es wurden 14,7 mg von Benzimidazol **165** (0,04 mmol) als beige-gelber Feststoff isoliert. Die kombinierte Ausbeute über drei Stufen betrug 40 %.



$C_{18}H_{17}Cl_2N_3O_2$
378,25

R_f = 0,18 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 378, 380 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{18}H_{18}{}^{35}Cl_2N_3O_2{}^+$): 378,07705 gef.: 378,07727, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =3385 (m), 3303 (br), 3078 (w), 2987 (s), 2924 (s), 2854 (w), 1678 (s), 1624 (w), 1599 (m), 1540 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.39 (s, 1H, NH), 7.92 (d, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-4), 7.86 (d, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-6‘), 7.68 (dd, ^3J = 8.7 Hz, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-6), 7.61 (d, ^3J = 8.3 Hz, 1H, H-3‘), 7.56 (dd, ^3J = 8.3 Hz, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-2‘), 7.38 (d, ^3J = 8.7 Hz, 1H, H-1), 4.27 (q, ^3J = 7.2 Hz, 2H, H-7), 4.07 (s, 2H, H-11), 3.54 (s, 3H, H-12), 1.47 (t, ^3J = 7.2 Hz, 3H, H-8)., **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 167.60 (s, C-10), 151.57 (s), 142.97 (s), 134.41 (s), 133.27 (s), 132.70 (s), 131.12 (d, C-6‘), 130.84 (d, C-3‘), 130.10 (s), 128.20 (d, C-2‘), 117.26 (d, C-6), 111.42 (d, C-4), 110.18 (d, C-1), 72.13 (t, C-11), 59.34 (q, C-12), 39.89 (t, C-7), 15.37 (q, C-8).

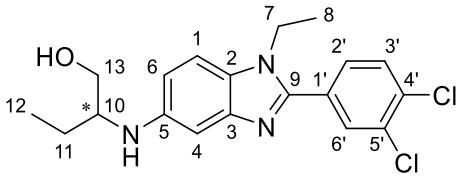
Synthese von 2-((2-(3,4-Dichlorphenyl)-1-Ethyl-1*H*-Benzo[d]imidazol-5-yl)Amino)Butan-1-ol (*rac*-166)



170 **rac-166**

Entsprechend Synthesevorschrift **J** wurden 100 mg **170** (0,33 mmol) mit 6,2 mg CuI (0,033 mmol, 10 mol%), 14 mg BTMPO (0,033 mmol, 10 mol%), 176 mg K_3PO_4 (0,83 mmol, 2,5 Äq.) und 62 µl *rac*-2-Aminobutanol (0,66 mmol, 2 Äq.) in 1 ml DMSO für 24 h bei 110 °C umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **J** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Flash-Chromatographie gereinigt (CH_2Cl_2/MeOH: 0 % B – 15 %

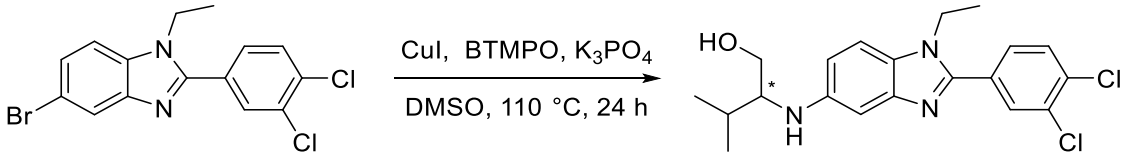
B). Es wurden 6,5 mg von Benzimidazol ***rac*-166** (0,017 mmol, 5,2 %) als hellgelber Feststoff isoliert.



$C_{19}H_{21}Cl_2N_3O$
378,30

R_f = 0,23 (CyH/EtOAc 1:4), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 378, 380 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{19}H_{22}{}^{35}Cl_2N_3O^+$): 378,11344 gef.: 378,11311, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3337 (br), 3074 (w), 2961 (m), 2929 (m), 2873 (m), 1624 (s), 1590 (w), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.84 (d, ^4J = 1.8 Hz, 1H, H-6‘), 7.60 (d, ^3J = 8.3 Hz, 1H, H-3‘), 7.55 (dd, ^3J = 8.3 Hz, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-2‘), 7.23 (d, ^4J = 8.7 Hz, 1H, H-1), 7.08 (d, ^4J = 2.1 Hz, 1H, H-4), 6.77 (dd, ^3J = 8.7 Hz, ^4J = 2.2 Hz, 1H, H-6), 4.22 (q, ^3J = 7.2 Hz, 2H, H-7), 3.82 (dd, ^2J = 10.9 Hz, ^3J = 4.1 Hz, 1H, H-13), 3.58 (dd, ^2J = 10.9 Hz, ^3J = 6.0 Hz, 1H, H-13), 3.45 (m, 1H, H-10), 1.63 (pd, ^3J = 7.4 Hz, ^4J = 1.6 Hz, 2H, H-4), 1.46 (t, ^3J = 7.2 Hz, 3H, H-8), 0.99 (t, ^3J = 7.5 Hz, 3H, H-12), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 150.41 (s), 144.56 (s), 144.00 (s), 134.05 (s), 133.15 (s) 130.99 (d, C-6‘), 130.77 (d, C-3‘), 130.38 (s), 128.91 (d, C-2‘), 128.12 (s), 113.62 (d, C-6), 110.63 (d, C-1), 102.63 (d, C-4), 63.88 (t, C-13), 57.91 (d, C-10), 39.79 (t, C-7), 24.76 (t, C-11), 15.43 (q, C-8), 10.67 (q, C-12).

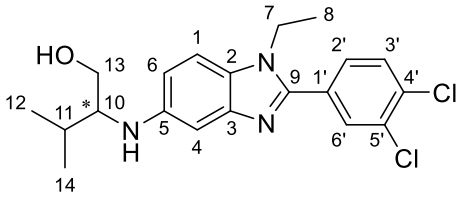
Synthese von 2-((2-(3,4-Dichlorphenyl)-1-Ethyl-1*H*-Benzo[d]imidazol-5-yl)Amino)3-Methylbutan-1-ol (*rac*-167)



170 4,8 % (Flash) ***rac*-167**

Entsprechend Synthesevorschrift **J** wurden 132 mg **170** (0,44 mmol) mit 8,4 mg CuI (0,044 mmol, 10 mol%), 18 mg BTMPO (0,044 mmol, 10 mol%), 231 mg K_3PO_4 (1,1 mmol, 2,5 Äq.) und 97 µl ***rac*-3-Methyl-2-Aminobutanol** (0,88 mmol, 2 Äq.) in 1 ml DMSO für 24 h bei 110 °C umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **J** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Flash-Chromatographie gereinigt (CH_2Cl_2/MeOH:

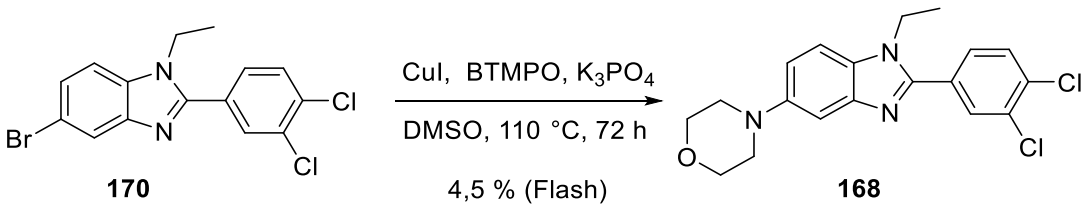
0 % B – 15 % B). Es wurden 8,3 mg von Benzimidazol ***rac*-167** (0,021 mmol, 4,8 %) hellgelber Feststoff isoliert.



$C_{20}H_{23}Cl_2N_3O$
392,32

R_f = 0,28 (CyH/EtOAc 1:4), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 392, 394 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{20}H_{24}{}^{35}Cl_2N_3O^+$): 392,12909 gef.: 392,12892, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3359 (br), 3010 (w), 2957 (m), 2927 (m), 2871 (m), 1736 (w), 1670 (s), 1624 (m), 1590 (m)., **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.84 (d, ^4J = 1.8 Hz, 1H, H-6‘), 7.59 (d, ^3J = 8.3 Hz, 1H, H-3), 7.54 (dd, ^3J = 8.3 Hz, ^4J = 1.8 Hz, 1H, H-2‘), 7.22 (d, ^3J = 8.6 Hz, 1H, H-1), 7.07 (d, ^4J = 2.1 Hz, 1H, H-13), 6.78 (dd, ^3J = 8.6 Hz, ^4J = 2.1 Hz, 1H, H-9), 4.22 (q, ^3J = 7.2 Hz, 2H, H-7), 3.83 (m, 1H, H-2), 3.57 (dd, ^2J = 10.9 Hz, ^3J = 7.2 Hz, 1H, H-2), 3.36 (m, 1H, H-3), 1.96 (dq, ^2J = 13.6 Hz, ^3J = 6.8 Hz, 1H, H-4), 1.46 (t, ^3J = 7.2 Hz, 3H, H-8), 0,99 (dd, ^2J = 16.9 Hz, ^3J = 6.9 Hz, 6H, H-12/14), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 157.68 (s), 145.14 (s), 130.99 (d, C-6‘), 130.74 (d, C-3‘), 130.56 (s), 128.07 (d, C-2‘), 124.53 (s), 120.66 (s), 116.55 (s), 113.37 (d, C-6), 110.60 (d, C-1), 102.77 (d, C-4), 62.46 (t, C-10), 62.19 (q, C-13), 39.77 (t, C-7), 30.10 (d, C-11), 19.31 (q), 18.98 (q), 15.44 (q, C-8).

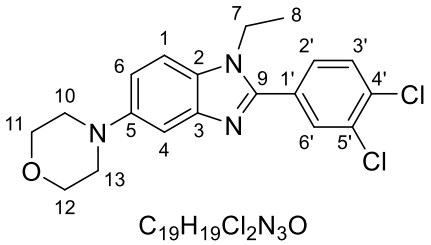
Synthese von 4-(2-(3,4-Dichlorphenyl)-1-Ethyl-1*H*-Benzo[d]imidazol-5-yl)Morpholin (168)



170 **168**

Entsprechend Synthesevorschrift **J** wurden 97 mg **170** (0,32 mmol) mit 6 mg CuI (0,032 mmol, 10 mol%), 13 mg BTMPO (0,032 mmol, 10 mol%), 135 mg K_3PO_4 (0,64 mmol, 2 Äq.) und 57 µl Morpholin (0,66 mmol, 2 Äq.) in 3,2 ml DMSO für 72 h bei 110 °C umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **J** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde

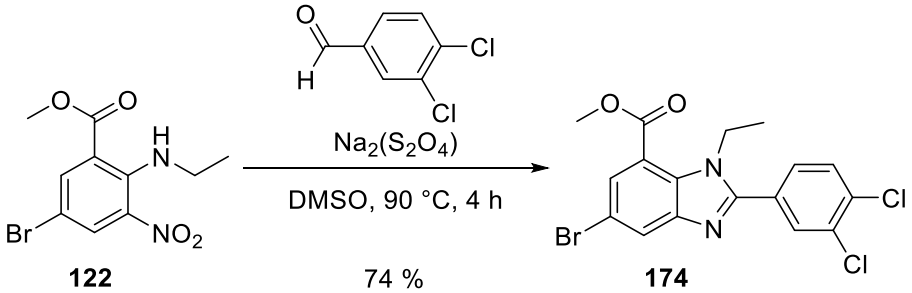
anschließend mittels Flash-Chromatographie gereinigt (CyH/EtOAc 0 % B – 70 % B). Es wurden 5,4 mg von Benzimidazol **168** (0,029 mmol, 4,5 %) als beige-gelber Feststoff isoliert.



$C_{19}H_{19}Cl_2N_3O$
376,28

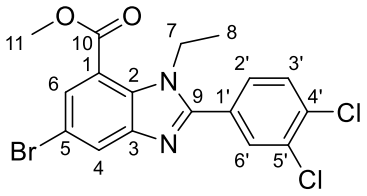
R_f = 0,34 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 376, 378 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{19}H_{20}{}^{35}Cl_2N_3O^+$): 376,09779 gef.: 376,09808, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3382 (br), 2962 (m), 2923 (m), 2853 (m), 1620 (m), 1486 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.86 (d, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-6‘), 7.62 (d, ^3J = 8.3 Hz, 1H, H-3‘), 7.59 (dd, ^3J = 8.3 Hz, ^4J = 1.9 Hz, 1H, 2‘), 7.38 – 7.34 (m, 2H, H-1, H-4), 7.11 (dd, ^3J = 8.9 Hz, ^4J = 2.2 Hz, 1H, H-6), 4.27 (q, ^3J = 7.2 Hz, 2H, H-7), 3.96 – 3.89 (m, 4H, H-11/12), 3.24 – 3.16 (m, 4H, H-10/13), 1.48 (t, ^3J = 7.2 Hz, 3H, H-8),**^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 150.45 (s), 148.69 (s), 143.09 (s), 133.32 (s), 131.02 (d, C-6‘), 130.92 (d, C-3‘), 128.22 (d, C-2‘), 115.80 (d, C-6), 110.50 (d, C-1), 106.01 (d, C-4), 67.01 (t, C-11/12), 51.20 (t, C-10/13), 39.95 (t, C-7), 15.40 (q, C-8).

Synthese von Methyl-5-Brom-2-(3,4-Dichlorophenyl)-1-Ethyl-1*H*-Benzo[d]imidazol-7-Carboxylat (174)



Entsprechend Synthesevorschrift **E** wurden 160 mg **122** (0,53 mmol), 280 mg $Na_2(S_2O_4)$ (2 mmol, 3 Äq.) und 136 mg 3,4-Dichlorbenzaldehyd (0,76 mmol, 1,5 Äq.) in 5 ml DMSO (0,1 M) umgesetzt. Nach der wässrigen Aufarbeitung und Extraktion wurde das Rohprodukt in Toluol aufgenommen, mit 2 g Semicarbazid auf Kieselgel (20 %) versetzt und anschließend für 9 h refluxiert. Anschließend wurde die Lösung über ein Kieselgelbett filtriert und mit EtOAc nachgewaschen. Die organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel

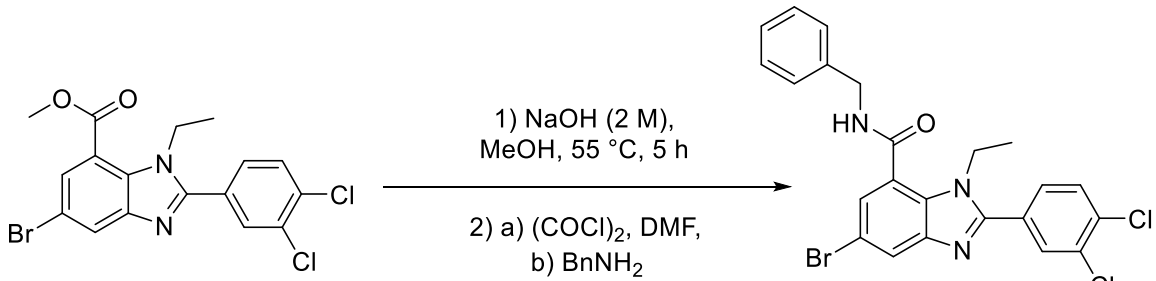
in vacuo entfernt. Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere chromatographische Reinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 168 mg von Benzimidazol **174** (0,39 mmol, 74 %) als beiger Feststoff isoliert.



$C_{17}H_{13}BrCl_2N_2O_2$
428,11

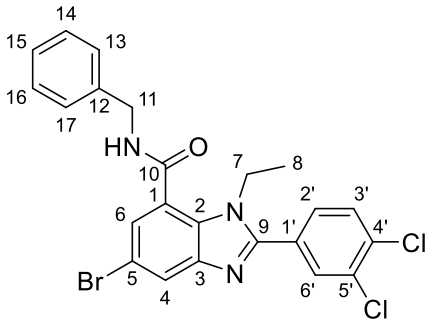
R_f = 0,61 (CyH/EtOAc 4:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 427, 429, 431 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3365 (w), 3080 (w), 2990 (m), 2950 (w), 1721 (s), 1624 (w), 1585 (m), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.09 (d, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-4), 7.94 (d, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-6), 7.81 (d, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-6‘), 7.62 (d, ^3J = 8.3 Hz, 1H, H-3‘), 7.52 (dd, ^3J = 8.3 Hz, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-2‘), 4.58 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H, H-7), 4.00 (s, 3H, H-11), 1.09 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 165.52 (s, C-10), 154.68 (s), 145.95 (s), 134.95 (s), 133.40 (s), 131.66 (s), 131.59 (d, C-6‘), 130.91 (d, C-3‘), 129.76 (s), 129.03 (d, C-6), 128.72 (d, C-2‘), 127.15 (d, C-4), 118.38 (s), 114.68 (s), 52.84 (q, C-11), 42.09 (t, C-7), 15.38 (q, C-8).

Synthese von *N*-Benzyl-5-Brom-2-(3,4-Dichlorophenyl)-1-Ethyl-1*H*-Benzo[d]imidazol-7-Carboxamid (175)



Entsprechend der Synthesevorschrift **F** wurden 168 mg **174** (0,39 mmol) mit 0,25 ml aq. NaOH (2 M) in 4 ml MeOH umgesetzt. Nach 5 h bei 55 °C wurde das Lösemittel *in vacuo* entfernt und der der Rückstand getrocknet. Das Natriumsalz der Carbonsäure wurde ohne weitere Reinigung zusammen mit dem überschüssigen NaOH in der nächsten Reaktion eingesetzt.

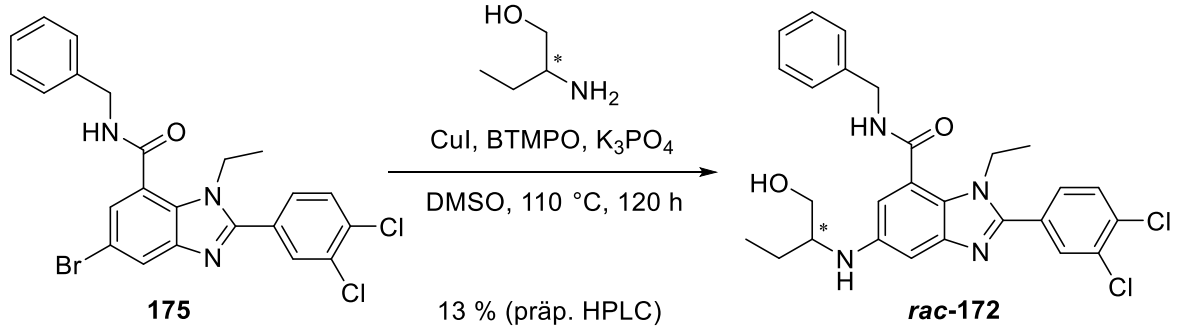
Dazu wurde entsprechend der Synthesevorschrift **G** das Natriumsalz der Carbonsäure mit 28 µl $(COCl)_2$ (0,33 mmol, 1,5 Äq.) und einer katalytischen Menge DMF in 2,2 ml CH_2Cl_2 (0,1 M) zum entsprechenden Säurechlorid umgesetzt. Nach 20 min wurden erneut 28 µl $(COCl)_2$ zur Reaktion gegeben und für eine weitere Stunde gerührt. Nach dem Entfernen des Lösemittels wurde das Säurechlorid mit 48 µl Benzylamin (0,44 mmol, 2 Äq.) in 2,2 ml CH_2Cl_2 (0,1 M) zum Amid **175** umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **G** aufgearbeitet. Nach der wässrigen Aufarbeitung wurde das Rohprodukt mittels Flash-Chromatographie gereinigt (CyH/EtOAc: 0 % B – 50 % B). Es wurden 70 mg von Benzimidazol **175** (0,14 mmol) als beiger Feststoff isoliert. Die kombinierte Ausbeute über zwei Stufen betrug 63 %.



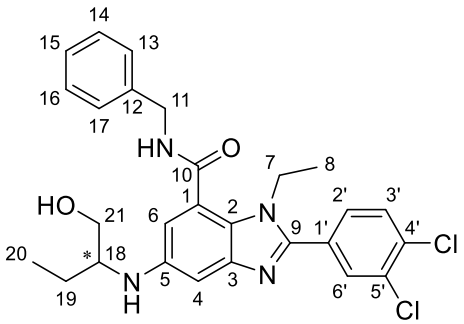
$C_{23}H_{18}BrCl_2N_3O$
503,22

R_f = 0,8 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 502, 504, 506 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 500, 502, 504 $[M-H]^-$, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3286 (s), 3053 (w), 1635 (s), 1584 (m), 1547 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.96 (d, ^4J = 2.1 Hz, 1H, H-4), 7.77 (d, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-6), 7.59 (d, ^3J = 8.4 Hz, 1H, H-3‘), 7.51 – 7.44 (m, 2H, H-2‘, H-6‘), 7.42 – 7.30 (m, 5H, H-13 - 17), 6.65 (s, 1H, NH), 4.67 (d, ^3J = 5.8 Hz, 2H, H-11), 4.42 (q, ^3J = 7.2 Hz, 2H, H-7), 1.06 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 166.17 (s, C-10), 154.06 (s), 145.83 (s), 137.38 (s), 134.81 (s), 133.34 (s), 131.46 (d, C-6), 130.86 (d, C-3‘), 130.48 (s), 129.82 (s), 128.97 (d, C-14/16), 128.52 (d, C-13/17), 128.20 (d, C-6‘), 128.03 (d, C-15), 125.19 (d), 125.11 (d, C-4), 123.23 (s), 114.54 (s), 44.53 (t, C-11, 41.27 (t, C-7), 15.84 (q, C-8).

Synthese von *N*-Benzyl-2-(3,4-Dichlorophenyl)-1-Ethyl-5-((1-Hydroxybutan-2-yl)Amino)-1*H*-Benzo[d]imidazol-7-Carboxamid (*rac*-172)



Entsprechend Synthesevorschrift **J** wurden 37 mg **175** (0,07 mmol) mit 1 mg CuI (0,007 mmol, 10 mol%), 3 mg BTMPO (0,007 mmol, 10 mol%), 30 mg K_3PO_4 (0,14 mmol, 2 Äq.) und 13 µl *rac*-2-Aminobutanol (0,14 mmol, 2 Äq.) in 0,7 ml DMSO für 120 h bei 110 °C (Gesamtreaktionszeit: 250 h, RT + 110 °C) umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **J** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 4,6 mg von Benzimidazol ***rac*-172** (0,009 mmol, 13 %) als hellgelber Feststoff isoliert.

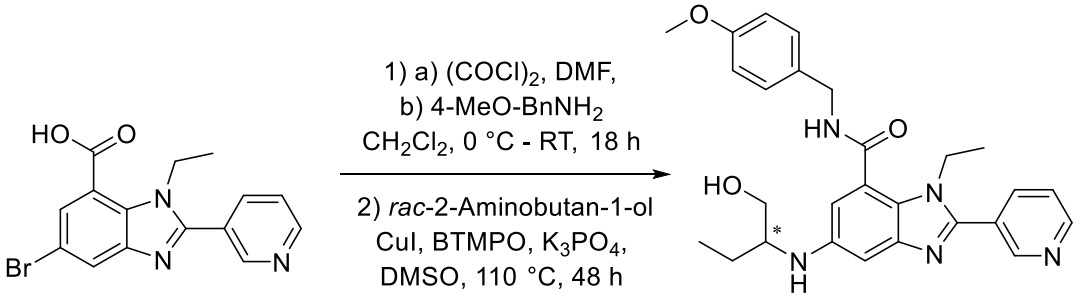


$C_{27}H_{28}Cl_2N_4O_2$
511,45

R_f = 0,42 (CyH/EtOAc 1:3), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 511, 513 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 509, 511 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{27}H_{29}{}^{35}Cl_2N_4O_2{}^+$): 511,16620 gef.: 511,16575, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3356 (br), 3065 (w), 3030 (w), 2963 (m), 2927 (m), 2873 (w), 1641 (s), 1614 (s), 1545 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.77 (d, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-6‘), 7.57 (d, ^3J = 8.2 Hz, 1H, H-3‘), 7.46 (dd, ^3J = 8.2 Hz, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-2‘), 7.42 – 7.35 (m, 4H, H-13/17, H-14/16), 7.34 – 7.29 (m, 1H, H-15), 7.07 – 7.04 (m, 1H, H-4), 6.77 (d, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-6), 6.64 (s, 1H, NH), 4.66 (d, ^3J = 5.7 Hz, 2H, H-11), 4.36 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H, H-7), 3.77 (dd, ^2J = 10.9 Hz, ^3J = 3.9 Hz, 1H, H-21), 3.55 (dd, ^2J = 11.0 Hz, ^3J = 5.7 Hz, 1H, H-21), 3.38 (d, ^3J = 5.9 Hz, 1H, H-18), 1.59 (p, ^3J = 7.3 Hz, 2H, H-19), 1.05 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-8), 0.96 (t, ^3J = 7.4 Hz, 3H, H-20), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] =

167.61 (s, C-10), 152.60 (s), 143.63 (s), 137.75 (s), 134.19 (s), 133.11 (s), 131.36 (d, C-6‘), 130.69 (d, C-3‘), 130.57 (s), 128.90 (d, C-14/16), 128.47 (d, C-2‘), 128.14 (d, C-13/17), 127.87 (d, C-15), 122.51 (s), 112.29 (d, C-6), 104.67 (d, C-4), 63.70 (t, C-21), 57.51 (d, C-18), 44.35 (t, C-11), 40.96 (t, C-7), 24.61 (t, C-19), 15.87 (q, C-8), 10.64 (q, C-20).

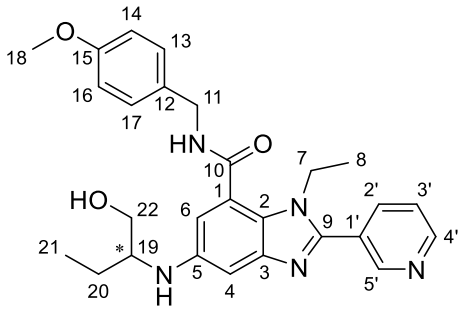
Synthese von 1-Ethyl-5-((1-Hydroxybutan-2-yl)Amino)-*N*-(4-Methoxybenzyl)-2-(Pyridin-3-yl)-1*H*-Benzo[d]imidazol-7-Carboxamid (*rac*-171)



137 **rac-171**

Entsprechend der Synthesevorschrift **G** wurden 114 mg **137** (0,32 mmol) mit 42 µl $(COCl)_2$ (0,48 mmol, 1,5 Äq.) und einer katalytischen Menge DMF in 3,2 ml CH_2Cl_2 (0,1 M) zum entsprechenden Säurechlorid umgesetzt und anschließend mit 83 µl 4-Methoxybenzylamin (0,64 mmol, 2 Äq.) in 3,2 ml CH_2Cl_2 (0,1 M) zum Amid umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **G** aufgearbeitet. Es wurden 155 mg Amid isoliert, welches ohne weitere Reinigung in Folgereaktionen eingesetzt wurde.

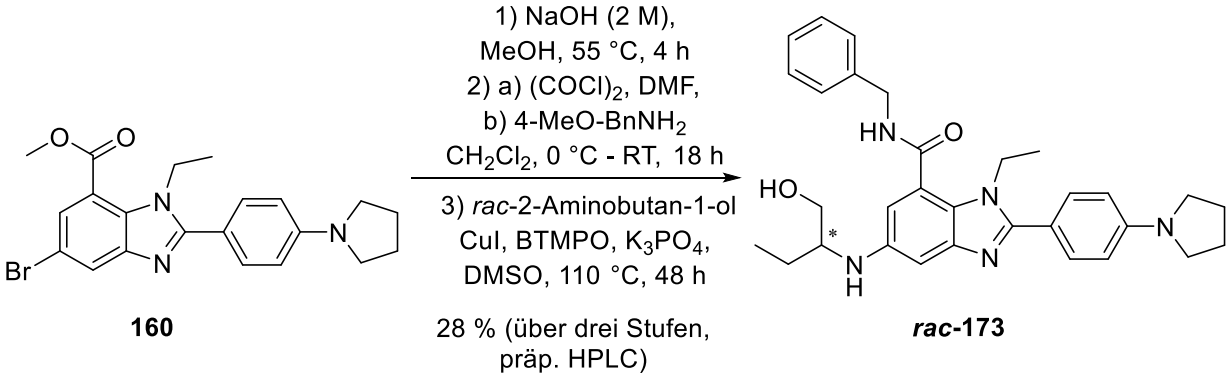
Dazu wurden entsprechend Synthesevorschrift **J** 155 mg Amid mit 3 mg CuI (0,017 mmol, 5 mol%), 7 mg BTMPO (0,017 mmol, 5 mol%), 144 mg K_3PO_4 (0,68 mmol, 2 Äq.) und 63 µl *rac*-2-Aminobutanol (0,68 mmol, 2 Äq.) in 3 ml DMSO für 48 h bei 110 °C (Gesamtreaktionszeit: 96 h, RT + 110 °C) umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **J** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 13,8 mg von Benzimidazol ***rac*-171** (0,029 mmol) als gelber Feststoff isoliert. Die kombinierte Ausbeute über zwei Stufen betrug 9 %.



$C_{27}H_{31}N_5O_3$
473,58

R_f = 0,12 (CH_2Cl_2/MeOH 90:10), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 474 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 472 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{27}H_{32}N_5O_3^+$): 474,24996 gef.: 474,25029, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3340 (br), 3066 (w), 2962 (m), 2929 (m), 2873 (w), 1642 (s), 1613 (s), 1512 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.77 – 8.60 (m, 2H, H-4‘, H-5‘), 7.94 – 7.85 (m, 1H, H-2‘), 7.45 – 7.37 (m, 1H, H-3‘), 7.30 (d, ^3J = 8.3 Hz, 2H, H-13/17), 6.97 – 6.90 (m, 1H, H-4), 6.90 – 6.84 (m, 2H, H-14/16), 6.70 – 6.65 (m, 1H, H-6), 4.55 (d, ^3J = 5.5 Hz, 2H, H-11), 4.28 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H, H-7), 3.79 (s, 3H, H-18), 3.75 – 3.66 (m, 1H, H-22), 3.53 – 3.44 (m, 1H, H-22), 3.36 – 3.23 (m, 1H, H-19), 1.52 (p, ^3J = 7.3 Hz, 2H, H-20), 1.00 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-8), 0.90 (t, ^3J = 7.4 Hz, 3H, H-21), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 167.67 (s, C-10), 159.12 (s, C-15), 151.68 (s), 150.43 (d, C-5‘), 149.65 (d, C-4‘), 145.71 (s), 143.77 (s), 136.96 (d, C-2‘), 130.03 (s, C-12), 129.58 (d, C-13/17), 126.88 (s), 124.27 (s), 123.52 (d, C-3‘), 122.70 (s), 114.11 (d, C-14/16), 112.53 (d, C-6), 103.70 (d, C-4), 63.38 (t, C-22), 57.27 (d, C-19), 55.33 (q, C-18), 43.69 (t, C-11), 40.91 (t, C-7), 24.52 (t, C-20), 15.89 (q, C-8), 10.63 (q, C-21).

Synthese von *N*-Benzyl-1-Ethyl-5-((1-Hydroxybutan-2-yl)Amino)-2-(4-(Pyrrolidin-1-yl)Phenyl)-1*H*-Benzo[d]imidazol-7-Carboxamid (*rac*-173)

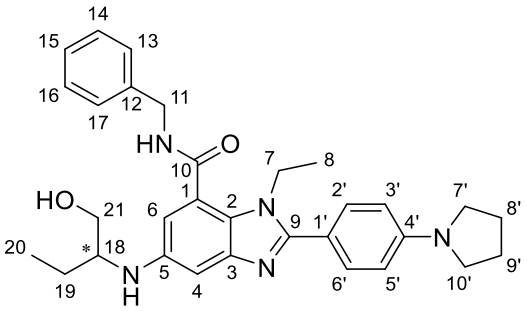


160 **rac-173**

Entsprechend der Synthesevorschrift **F** wurden 65 mg **160** (0,15 mmol) mit 0,1 ml aq. NaOH (2 M) in 2 ml MeOH umgesetzt. Nach 4 h bei 55 °C wurde das Lösemittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand getrocknet. Das Natriumsalz der Carbonsäure wurde ohne weitere Reinigung zusammen mit dem überschüssigen NaOH in der nächsten Reaktion eingesetzt.

Dazu wurde entsprechend der Synthesevorschrift **G** das Natriumsalz der Carbonsäure mit 20 µl $(COCl)_2$ (0,23 mmol, 1,5 Äq.) und einer katalytischen Menge DMF in 1,5 ml CH_2Cl_2 (0,1 M) zum entsprechenden Säurechlorid umgesetzt. Nach 20 min wurden erneut 20 µl $(COCl)_2$ zur Reaktion gegeben und für eine weitere Stunde gerührt. Nach dem Entfernen des Lösemittels wurde das Säurechlorid mit 27 µl Benzylamin (0,3 mmol, 2 Äq.) in 1,5 ml CH_2Cl_2 (0,1 M) zum Amid umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **G** aufgearbeitet. Es wurden 71 mg Amid isoliert, welches ohne weitere Reinigung in Folgereaktionen eingesetzt wurde.

Entsprechend Synthesevorschrift **J** wurden 71 mg Amid mit 3 mg CuI (0,014 mmol, 10 mol%), 6 mg BTMPO (0,014 mmol, 10 mol%), 58 mg K_3PO_4 (0,28 mmol, 2 Äq.) und 25 µl *rac*-2-Aminobutanol (0,28 mmol, 2 Äq.) in 1,4 ml DMSO für 48 h bei 110 °C (Gesamtreaktionszeit: 96 h, RT + 110 °C) umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **J** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 21,8 mg von Benzimidazol ***rac*-173** (0,043 mmol) als beige-gelber Feststoff isoliert. Die kombinierte Aubeute über drei Stufen betrug 28 %.

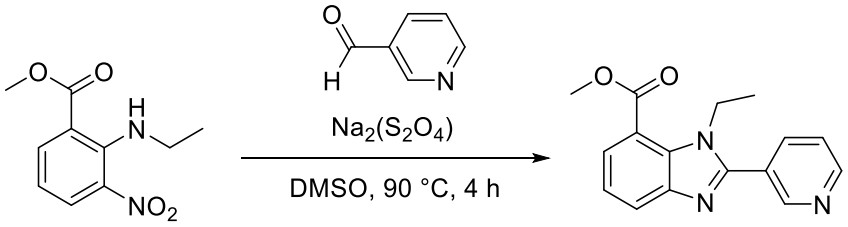


$C_{31}H_{37}N_5O_2$
511,67

R_f = 0,3 (EtOAc), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 513 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = 510 $[M-H]^-$, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{31}H_{38}N_5O_2^+$): 512,30200 gef.: 512,30226, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3324 (br), 2966 (m), 2929 (m), 2871 (w), 1606 (s), 1537 (m), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.59 – 7.51 (m, 1H, NH), 7.45 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2H, H-2‘/6‘), 7.43 – 7.38 (m, 2H, H-13/17), 7.37 – 7.31 (m, 2H, H-14/16), 7.31 – 7.27 (m, 1H, H-15), 6.91 (s, 1H, H-4), 6.66 (d, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-6), 6.60 (d, ^3J = 8.6 Hz, 2H, H-3‘/5‘), 4.60 (t, ^3J = 6.5 Hz, 2H, H-11), 4.35 – 4.27 (m, 2H, H-7), 3.65 (dd, ^2J = 11.3 Hz, ^3J = 3.9 Hz, 1H, H-21), 3.47 (dd, ^2J = 11.2 Hz, ^3J = 6.4 Hz, 1H, H-21), 3.38 – 3.30 (m, 4H, H-7‘/10‘), 3.27 – 3.19 (m, 1H, H-18), 2.08 – 2.01 (m, 4H, H-8‘/9‘), 1.47 (dq, ^2J = 11.3 Hz, ^3J = 7.0 Hz, 2H, H-19), 0.94 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-8), 0.86 (t, ^3J = 7.4 Hz, 3H, H-20), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 167.73 (s, C-10), 154.35 (s), 149.01 (s), 144.25 (s), 138.16 (s, C-12), 130.57 (d, C-2‘/6‘), 128.70 (d, C-14/16), 128.29 (d, C-13/17), 127.56 (d, C-15), 122.45 (s), 114.10 (s, C-4‘), 112.13 (d, C-6), 111.50 (d, C-3‘/5‘), 101.54 (d, C-4), 63.69 (t, C-21), 57.23 (d, C-18), 47.54 (t, C-7‘/10‘), 44.20 (t, C-11), 41.22 (t, C-8), 25.51 (t, C-8‘/9‘), 24.54 (t, C-19), 15.47 (q, C-8), 10.52 (q, C-20).

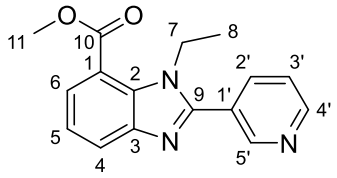
6.4.3 Derivate der 2. Generation

Synthese von Methyl-2-(Pyridin-3-yl)-1-Ethyl-1*H*-Benzo[d]imidazol-7-Carboxylat (177)



121 58 % (Flash) **177**

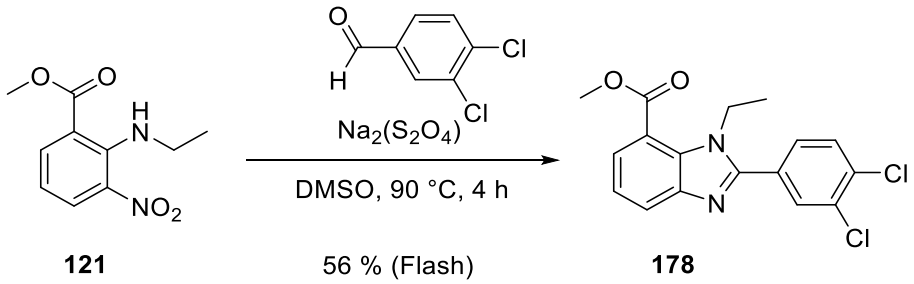
Entsprechend Synthesevorschrift **E** wurden 200 mg **121** (0,89 mmol), 470 mg $Na_2(S_2O_4)$ (2,7 mmol, 3 Äq.) und 122 µl Nicotinaldehyd (1,3 mmol, 1,5 Äq.) in 4,5 ml (0,2 M) DMSO für 4 h bei 90 °C umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **E** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Flash-Chromatographie gereinigt (CyH/EtOAc: 0 % B – 80 % B). Es wurden 144 mg von Benzimidazol **177** (0,52 mmol, 58 %) als beiger Feststoff isoliert.



$C_{16}H_{15}N_3O_2$
281,32

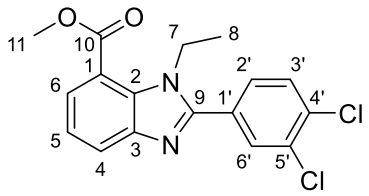
R_f = 0,25 (CyH/EtOAc 1:3), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 282 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3395 (br), 2990 (w), 2951 (w), 1715 (s), 1608 (w), 1590 (w), 1571 (w), 1517 (w), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.98 (dd, ^4J = 2.4 Hz, ^5J = 0.9 Hz, 1H, H-5‘), 8.80 (dd, ^4J = 4.9 Hz, ^5J = 1.7 Hz, 1H, H-4‘), 8.10 (ddd, ^3J = 7.9 Hz, ^4J = 2.3 Hz, ^5J = 1.7 Hz, 1H, H-2‘), 8.06 (dd, ^3J = 8.1 Hz, ^4J = 1.1 Hz, 1H, H-4), 7.88 (dd, ^3J = 7.7 Hz, ^4J = 1.2 Hz, 1H, H-5), 7.52 (ddd, ^3J = 7.9 Hz, ^4J = 4.9 Hz, ^5J = 0.9 Hz, 1H, H-2‘), 7.38 (t, ^3J = 7.8 Hz, 1H, H-6), 4.65 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H, H-7), 4.02 (s, 3H, H-11), 1.16 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-8). **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 165.91 (s, C-10), 153.20 (s), 150.96 (d, C-4‘), 149.93 (d, C-5‘), 140.35 (s), 137.44 (d, C-2‘), 126.70 (d, C-3‘), 124.59 (d, C-6), 123.65 (d, C-5), 122.27 (d, C-4), 52.64 (q, C-11), 42.01 (t, C-7), 15.48 (q, C-8).

Synthese von Methyl-2-(3,4-Dichlorphenyl)-1-Ethyl-1*H*-Benzo[d]imidazol-7-Carboxylat (178)



121 56 % (Flash) **178**

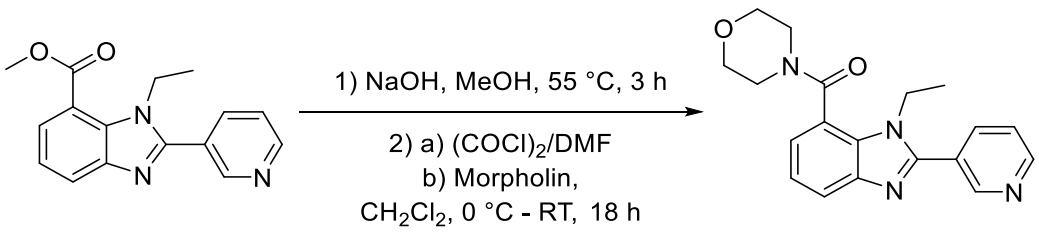
Entsprechend Synthesevorschrift **E** wurden 200 mg **121** (0,89 mmol), 470 mg $Na_2(S_2O_4)$ (2,7 mmol, 3 Äq.) und 227 mg 3,4-Dichlorbenzaldehyd (1,3 mmol, 1,5 Äq.) in 4,5 ml DMSO (0,2 M) für 4 h bei 90 °C umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **E** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Flash-Chromatographie gereinigt (CyH/EtOAc: 0 % B – 70 % B). Es wurden 174 mg von Benzimidazol **177** (0,50 mmol, 56 %) als beiger Feststoff isoliert.



$C_{17}H_{14}Cl_2N_2O_2$
349,21

R_f = 0,48 (CyH/EtOAc 1:3), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 349, 351 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 2990 (w), 2950 (w), 1718 (s), 1607 (w), 1554 (w), 1510 (w), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.10 – 8.02 (m, 1H, H-4), 7.92 – 7.84 (m, 2H, H-2‘, H-6‘), 7.69 – 7.63 (m, 1H, H-3‘), 7.60 – 7.56 (m, 1H, H-6), 7.43 – 7.34 (m, 1H, H-5), 4.65 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 4.02 (s, 3H), 1.13 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 166.33 (s, C-10), 153.03 (s), 143.24 (s), 134.42 (s), 132.10 (s), 131.63 (d, H-2‘), 131.00 (d, H-3‘), 128.86 (d, H-6), 126.85 (d, H-6‘,), 124.40 (d, C-4), 122.47 (d, C-5), 117.73 (s), 52.68 (q, C-11), 42.16 (t, C-7), 15.39 (q, C-8).

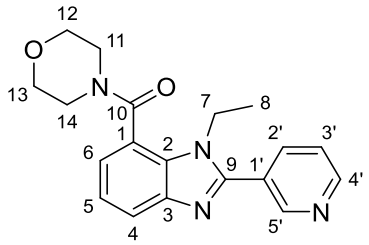
Synthese von (1-Ethyl-2-(Pyridin-3-yl)-1*H*-Benzo[d]imidazol-7-yl)(Morpholino)-Methanon (175)



177 **175**

Entsprechend der Synthesevorschrift **F** wurden 144 mg **177** (0,52 mmol) mit 0,3 ml aq. NaOH (2 M) in 2,5 ml MeOH umgesetzt. Nach 3 h bei 55 °C wurde das Lösemittel *in vacuo* entfernt und der der Rückstand getrocknet. Das Natriumsalz der Carbonsäure wurde ohne weitere Reinigung zusammen mit dem überschüssigen NaOH in der nächsten Reaktion eingesetzt.

Dazu wurde entsprechend der Synthesevorschrift **G** das Natriumsalz der Carbonsäure mit 64 µl $(COCl)_2$ (0,75 mmol, 1,5 Äq.) und einer katalytischen Menge DMF in 5 ml CH_2Cl_2 (0,1 M) zum entsprechenden Säurechlorid umgesetzt. Nach dem Entfernen des Lösemittels wurde das Säurechlorid mit 109 µl Morpholin (1,25 mmol, 2,5 Äq.) in 5 ml CH_2Cl_2 (0,1 M) zum Amid **175** umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **G** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90% B). Es wurden 81 mg von Benzimidazol **175** (0,24 mmol, 48 %) als weißer Feststoff isoliert.

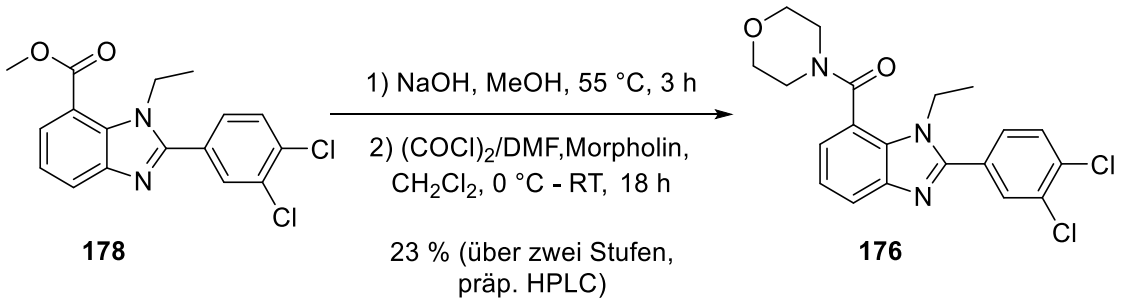


$C_{19}H_{20}N_4O_2$
336,40

R_f = 0,22 (EtOAc), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 337 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{19}H_{21}N_4O_2^+$): 337,16590 gef.: 337,16578, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3409 (br), 2969 (m), 2923 (m), 2855 (m), 1626 (s), 1572 (w), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.97 (s, 1H, H-5‘), 8.85 – 8.77 (m, 1H, H-4‘), 8.11 (d, ^3J = 7.9 Hz, 1H, H-2‘), 7.94 (dd, ^3J = 8.1 Hz, ^4J = 1.1 Hz, 1H, H-4), 7.53 (dd, ^3J = 7.9, 4.9 Hz, 1H, H-3‘), 7.37 (t, ^3J = 7.8 Hz, 1H, H-5), 7.23 (dd, ^3J = 7.4 Hz, ^4J = 1.1 Hz, 1H, H-6), 4.59 (dd, ^2J = 14.7 Hz, ^3J = 7.3 Hz, 1H, H-7), 4.22 (dd, ^2J = 14.7 Hz, ^3J = 7.5 Hz, 1H, H-7), 4.04 – 3.78 (m,

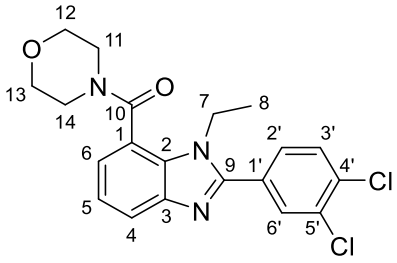
4H, H-11/14, H-12/13), 3.78 – 3.54 (m, 3H, H-11/14, H-12/13), 3.41 (d, ^2J = 14.1 Hz, 1H, H-11/14), 1.30 (t, ^3J = 7.2 Hz, 3H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 167.49 (s, C-10), 151.74 (s), 151.10 (d, C-4‘), 149.57 (d, C-5‘), 137.37 (d, C-2‘), 131.08 (s), 126.01 (s), 123.79 (d, C-3‘), 122.53 (d, C-6), 122.45 (d, C-5), 121.54 (d, C-4), 119.56 (s), 66.76 (t, C-12/13), 48.17 (t, C-11/14), 42.39 (t, C-11/14), 40.59 (t, C-7), 16.08 (q, C-8).

Synthese von (1-Ethyl-2-(3,4-Dichlorphenyl)-1*H*-Benzo[d]imidazol-7-yl)(Morpholino)-Methanon (176)



Entsprechend der Synthesevorschrift **F** wurden 174 mg **178** (0,5 mmol) mit 0,3 ml aq. NaOH (2 M) in 2,5 ml MeOH umgesetzt. Nach 3 h bei 55 °C wurde das Lösemittel *in vacuo* entfernt und der der Rückstand getrocknet. Das Natriumsalz der Carbonsäure wurde ohne weitere Reinigung zusammen mit dem überschüssigen NaOH in der nächsten Reaktion eingesetzt.

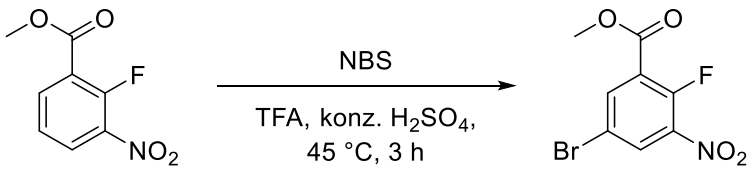
Dazu wurde entsprechend der Synthesevorschrift **G** das Natriumsalz der Carbonsäure mit 64 µl $(COCl)_2$ (0,75 mmol, 1,5 Äq.) und einer katalytischen Menge DMF in 5 ml CH_2Cl_2 (0,1 M) zum entsprechenden Säurechlorid umgesetzt. Nach dem Entfernen des Lösemittels wurde das Säurechlorid mit 109 µl Morpholin (1,25 mmol, 2,5 Äq.) in 5 ml CH_2Cl_2 (0,1 M) zum Amid **176** umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **G** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90% B). Es wurden 47 mg von Benzimidazol **176** (0,11 mmol, 23 %) als weißer Feststoff isoliert.



$C_{20}H_{19}Cl_2N_3O_2$
404,29

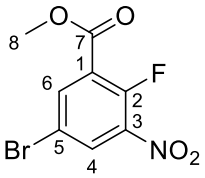
R_f = 0,24 (CyH/EtOAc 1:1), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 404, 406 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{20}H_{20}{}^{35}Cl_2N_3O_2^+$): 404,09270 gef.: 404,09316, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 2970 (m), 2901 (m), 1631 (s), 1554 (w), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.84 (dd, ^3J = 8.2 Hz, ^4J = 1.1 Hz, 1H, H-4), 7.80 (d, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-6‘), 7.59 (d, ^3J = 8.2 Hz, 1H, H-3‘), 7.51 (dd, ^3J = 8.3 Hz, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-2‘), 7.29 (dd, ^3J = 8.1, 7.4 Hz, 1H, H-5), 7.16 (dd, ^3J = 7.4 Hz, ^4J = 1.1 Hz, 1H, H-6), 4.50 (dd, ^2J = 14.7 Hz, ^3J = 7.3 Hz, 1H, H-7), 4.17 (dd, ^2J = 14.7 Hz, ^3J = 7.5 Hz, 1H, H-7), 3.99 – 3.72 (m, 4H, H-11/14, H-12/13), 3.72 – 3.48 (m, 3H, H-11/14, H-12/13), 3.35 (d, ^2J = 13.6 Hz, 1H, H-11/14), 1.22 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 167.63 (s, C-10), 152.70 (s), 144.37 (s), 134.58 (s), 133.27 (s), 131.42 (d, C-6‘), 131.29 (s), 130.84 (d, C-2‘), 130.19 (s), 128.46 (d, C-2‘), 122.16 (d, C-6), 122.11 (d, C-5) 121.72 (d, C-4), 119.40 (s), 66.74 (t, C-12/13), 48.11 (t, C-11/14), 42.33 (t, C-11/14), 40.40 (t, C-7), 16.00 (q, C-8).

Synthese von Methyl-5-Brom-2-Fluor-3-Nitrobenzoat (190)



120 96 % (Lit. 86 %) **190**

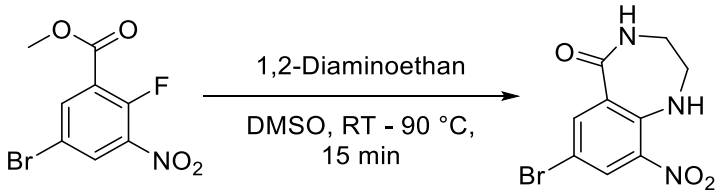
In einem Rundkolben wurden 815 mg **120** (4,1 mmol) in 6,6 ml konz. Schwefelsäure und 5 ml TFA gelöst und bei RT mit 876 mg NBS (4,9 mmol, 1,2 Äq.) versetzt. Die Reaktion wurde für 3 h bei 45 °C gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf dest. Wasser gegeben und mit CH_2Cl_2 extrahiert (3x). Die organischen Phasen wurden mit ges. $NaHCO_3$-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das erhaltene Produkt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere chromatographische Reinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 1095 mg von Ester **190** (3,94 mmol, 96 %) als hellgelber Feststoff isoliert.



$C_8H_5BrFNO_4$
278,03

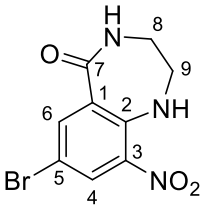
R_f = 0,48 (CyH/EtOAc 2:3), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3083 (m), 2959 (w), 1725 (s), 1606 (m), 1582 (w), 1532 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.38 – 8.25 (m, 2H, H-4, H-6), 3.99 (s, 3H, H-8) **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 161.98 (s, C-7), 155.25 (s, C-2), 152.48 (s C-3), 139.80 (d, C-6), 132.46 (d, C-4), 123.11 (s, C-1), 116.24 (s, C-5), 53.39 (q, C-8). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.[260]

Synthese von 7-Brom-9-Nitro-1,2,3,4-Tetrahydro-5*H*-Benzo[*e*][1,4]Diazepin-5-on (192)



190 96 % (Flash) **192**

In einem Rundkolben wurden 1390 mg (5 mmol) **190** in 15 ml DMSO (0,3 M) gelöst. Diese Lösung wurde tropfenweise zu einer Lösung von 1 ml 1,2-Diaminoethan (15 mmol, 3 Äq.) in 18 ml DMSO bei RT unter Schutzatmosphäre gegeben. Nach der Zugabe wurde die Reaktion für 15 min auf auf 90 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde dest. Wasser und ges. NaCL-Lösung hinzugegeben und die wässrige Phase mit CH_2Cl_2 extrahiert (3x). Die organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie gereinigt (CH_2Cl_2/MeOH: 0 % B – 10 % B). Es wurden 1,375 g von Amid **192** (4,8 mmol, 96 %) als gelb-oranger Feststoff isoliert.

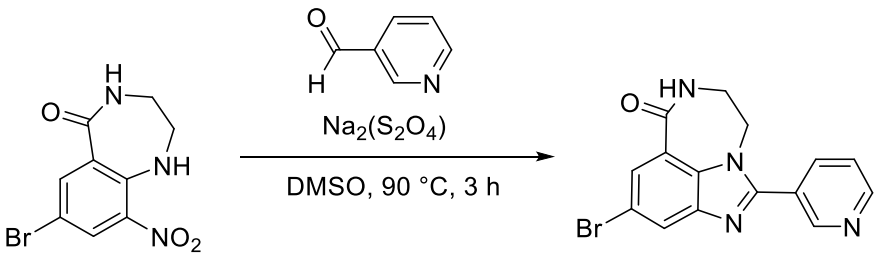


$C_9H_8BrN_3O_3$
286,09

R_f = 0,27 (CH_2Cl_2/MeOH 97:3), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 286, 288 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3316 (w), 3176 (w), 2954 (s), 2923 (s), 2869 (m), 2853 (m), 1696 (w),1652 (s), 1599 (m), 1508 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 8.73 (t, ^3J = 4.4 Hz, 1H, NH), 8.55 (t, ^3J = 5.8 Hz, 1H, NH), 8.30 (d, ^4J = 2.7 Hz, 1H, H-4), 8.17 (d, ^4J = 2.7 Hz, 1H, H-6), 3.64 (q, ^3J = 4.5 Hz, 2H, H-8), 3.39 – 3.33 (m, 2H,

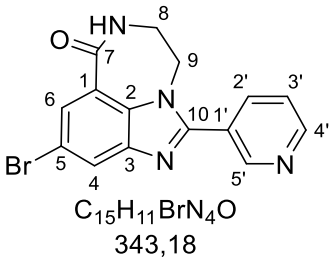
H-9), **^{13}C-NMR** (101 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 167.20 (s, C-7), 143.17 (d, C-6), 142.44 (s, C-2), 135.78 (s), 132.38 (d, C-4), 125.40 (s), 104.88 (s), 48.82 (t, C-8), 40.65 (d, C-9).

Synthese von 9-Brom-5,6-Dihydro-2-(Pyridin-3-yl)Imidazo[4,5,1-*jk*][1,4]Benzodiazepin-7-on (193)



192 92 % **193**

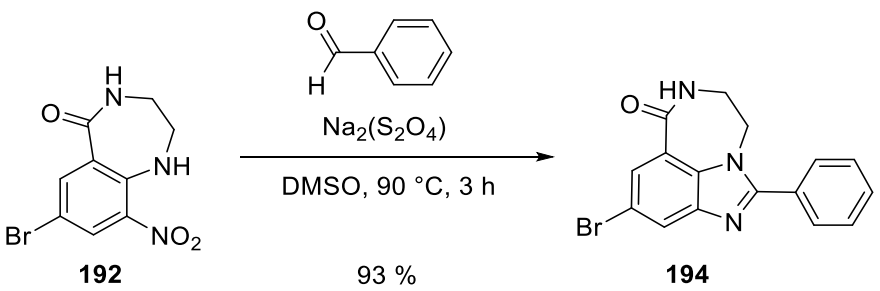
Entsprechend Synthesevorschrift **E** wurden 50 mg **192** (0,175 mmol), 91 mg $Na_2(S_2O_4)$ (0,525 mmol, 3 Äq.) und 20 µl Nicotinaldehyd (0,21 mmol, 1,2 Äq.) in 1 ml DMSO (0,2 M) für 3 h bei 90 °C umgesetzt. Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere chromatographische Reinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 55 mg von Benzimidazol **193** (0,161 mmol, 92 %) als hellgelber Feststoff isoliert.



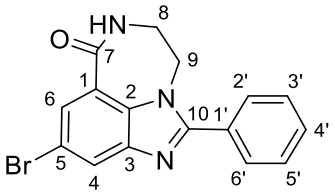
$C_{15}H_{11}BrN_4O$
343,18

R_f = 0,14 (CH_2Cl_2/MeOH 95:5), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 343, 345 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3302 (bm), 2929 (w), 1659 (m), 1584 (w), 1568 (w), **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 9.06 (d, ^4J = 2.1 Hz, 1H, H-5‘), 8.76 (dd, ^3J = 4.8 Hz, ^4J = 1.6 Hz, 1H, H-4‘), 8.63 (t, ^3J = 5.8 Hz, 1H, NH), 8.26 (dt, ^3J = 7.9 Hz, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-2‘), 8.07 (d, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-4), 7.99 (d, ^4J = 1.7 Hz, 1H, H-6), 7.59 (dd, ^3J = 7.9, 4.9 Hz, 1H, H-3‘), 4.55 – 4.46 (m, 2H, H-9), 3.61 (d, ^3J = 4.1 Hz, 2H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 165.93 (s, C-7), 152.31 (s), 150.63 (d, C-4‘), 149.77 (d, C-5‘), 144.74 (s), 136.84 (d, C-2‘), 131.49 (s), 127.82 (d, C-6), 125.01 (d, C-4), 123.33 (d, C-3‘), 119.13 (s), 114.10 (s), 50.19 (t, C-8), 40.14 (t, C-9, Peak unter dem DMSO-Signal).

Synthese von 9-Brom-5,6-Dihydro-2-Phenylimidazo[4,5,1-*jk*][1,4]Benzodiazepin-7-on (194)



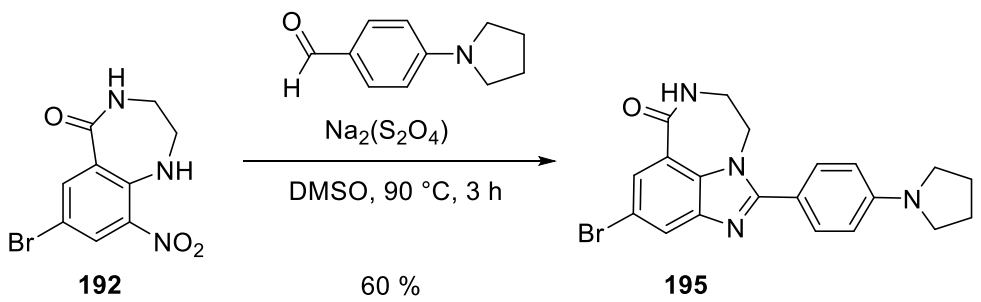
Entsprechend Synthesevorschrift **E** wurden 286 mg **192** (1 mmol), 522 mg $Na_2(S_2O_4)$ (3 mmol, 3 Äq.) und 121 µl Benzaldehyd (1,2 mmol, 1,2 Äq.) in 5 ml DMSO (0,2 M) für 3 h bei 90 °C umgesetzt. Nach Abkühlung auf RT wurde dest. Wasser und ges. NaCl-Lösung hinzugegeben. Das präzipitierte Produkt wurde abfiltriert und der Filterkuchen mit Wasser gewaschen und getrocknet. Es wurden 317 mg von Benzimidazol **194** (0,93 mmol, 93 %) als gelber Feststoff isoliert. (Das Produkt war in verschiedenen Lösemittel sehr schwer löslich und konnte deshalb nicht extrahiert werden. Möglicherweise verblieben schwerlösliche Salze im Rohprodukt)



$C_{16}H_{12}BrN_3O$
342,20

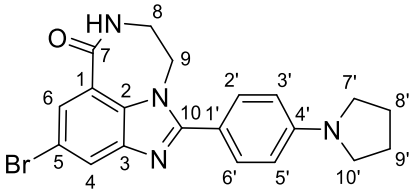
R_f = 0,26 (CH_2Cl_2/MeOH 97:3), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 342, 344 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3066 (w), 2918 (w), 1651(s), 1619 (m), 1505 (w), **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 8.65 (t, ^3J = 5.8 Hz, 1H, NH), 8.15 (d, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-4), 7.94 (d, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-6), 7.91 – 7.86 (m, 2H, H-2'/6'), 7.65 – 7.60 (m, 3H, H- 3'/5', H-4'), 4.48 (d, ^3J = 6.1 Hz, 2H, H-9), 3.62 – 3.52 (m, 2H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 165.82 (s, C-7), 154.86 (s), 144.08 (s), 131.47 (s), 130.58 (d, C-4'), 129.80 (d, C-2'/6'), 128.78 (d, C-3'/5'), 128.44 (s), 127.55 (d, C-4), 124.58 (d, C-6), 119.45 (s), 114.10 (s), 50.53 (t, C-8), 40.15 (t, C-9 Peak unter dem DMSO-Signal).

Synthese von 9-Brom-5,6-Dihydro-2-[4-(1-Pyrrolidinyl)Phenyl]Imidazo[4,5,1-*jk*][1,4]Benzodiazepin-7-on (195)



192 60 % **195**

Entsprechend Synthesevorschrift **E** wurden 218 mg **192** (0,76 mmol), 397 mg $Na_2(S_2O_4)$ (2,28 mmol, 3 Äq.) und 160 mg 4-Pyrrolidinbenzaldehyd (0,91 mmol, 1,2 Äq.) in 4 ml DMSO (0,2 M) für 3 h bei 90 °C umgesetzt. Nach Abkühlung auf RT wurde dest. Wasser und ges. NaCl-Lösung hinzugegeben, und die Lösung wurde mit $CHCl_3$/*i*-PrOH (3:1) extrahiert (7x). Die organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde anschließend in Wasser supendiert, filtriert und der Filterkuchen mit CH_2Cl_2 gewaschen. Das getrocknete Rohprodukt wies anschließend eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere chromatographische Reinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 186 mg von Benzimidazol **195** (0,45 mmol, 60 %) als beige-brauner Feststoff isoliert.

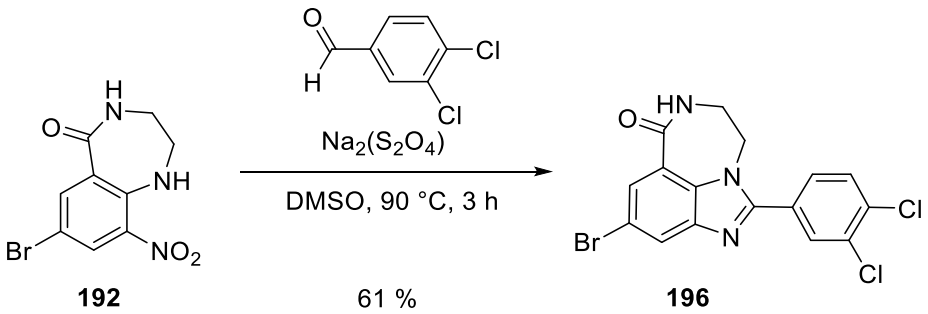


$C_{20}H_{19}BrN_4O$
411,30

R_f = 0,23 (CH_2Cl_2/MeOH 97:3), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 343, 345 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3064 (w), 2922 (w), 1652 (s), 1608 (m), **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ [ppm] = 8.59 (t, ^3J = 5.7 Hz, 1H, NH), 8.00 (d, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-4), 7.82 (d, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-6), 7.70 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2H, H-2'/6'), 6.68 (d, ^3J = 8.6 Hz, 2H, H-3'/5'), 4.54 – 4.38 (m, 2H, H-9), 3.55 (d, ^3J = 6.8 Hz, 2H, H-8), 3.40 – 3.28 (m, 4H, H-7'/10' Peak liegt unter dem H_2O-Signal), 2.05 – 1.94 (m, 4H, H-8'/9'), **^{13}C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ [ppm] = 166.68 (s, C-7), 156.73 (s), 149.18 (s, C-4'), 145.77 (s), 132.31 (s), 131.29 (d, C-2'/6'), 126.62 (d, C-6), 124.40 (d, C-4), 119.23 (s, C-1'), 115.08 (s), 113.85 (s),

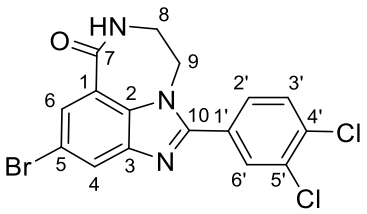
111.77 (d, C-3'/5'), 51.19 (t, C-8), 47.72 (t, C-7'/10'), 40.72 (t, C-9, Peak unter dem DMSO-Signal), 25.47 (t, C-8'/9').

Synthese von 9-Brom-5,6-Dihydro-2-(3,4-Dichlorphenyl)Imidazo[4,5,1-*jk*][1,4]Benzodiazepin-7-on (196)



192 61 % **196**

Entsprechend Synthesevorschrift **E** wurden 300 mg **192** (1,05 mmol), 548 mg $Na_2(S_2O_4)$ (3,15 mmol, 3 Äq.) und 221 mg 3,4-Dichlorbenzaldehyd (1,26 mmol, 1,2 Äq.) in 5 ml DMSO (0,2 M) für 3 h bei 90 °C umgesetzt. Nach Abkühlung auf RT wurde dest. Wasser und ges. NaCl-Lösung hinzugegeben, und die Lösung wurde mit $CHCl_3$/*i*-PrOH (3:1) extrahiert (7x). Die organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere chromatographische Reinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 263 mg von Benzimidazol **196** (0,64 mmol, 61 %) als hellgelber Feststoff isoliert.

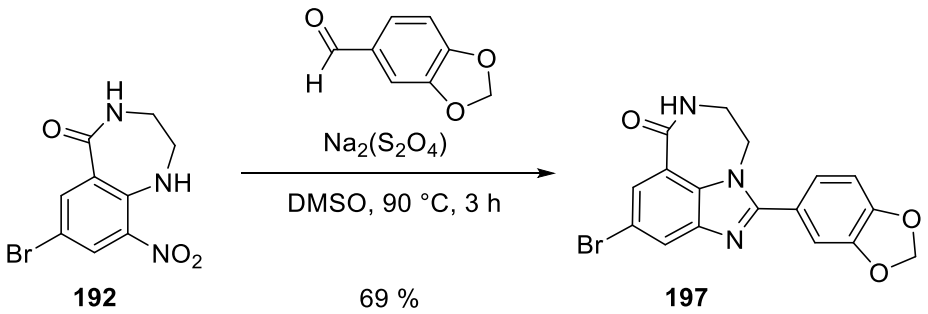


$C_{16}H_{10}BrCl_2N_3O$
411,08

R_f = 0,23 (CH_2Cl_2/MeOH 97:3), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 412, 414 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3193 (m), 3071 (m), 2936 (m), 1655 (s), 1587 (w), **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 8.72 – 8.61 (m, 1H, NH), 8.18 – 8.12 (m, 2H, H-4, H-6), 7.99 – 7.81 (m, 3H, H-2', H-3', H-6'), 4.68 – 4.34 (m, 2H, H-9), 3.71 – 3.49 (m, 2H, H-7), **^{13}C-NMR** (101 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 166.27 (s, C-7), 145.20 (s), 133.77

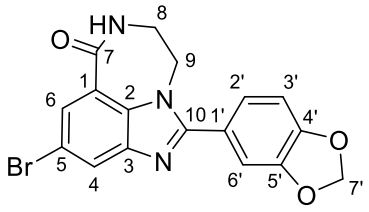
(s), 131.82 (d, C-6'), 131.49 (s), 130.33 (d, C-2'), 130.05 (s), 128.24 (d, C-6), 127.82 (s), 125.62 (d, C-4), 119.94 (s), 50.81 (t, C-8), 40.61 (t, C-9, Peak unter dem DMSO-Signal).

Synthese von 9-Brom-5,6-Dihydro-2-(1,3-Methylendioxy-5-Phenyl)Imidazo[4,5,1-*jk*][1,4]Benzodiazepin-7-on (197)



192 69 % **197**

Entsprechend Synthesevorschrift **E** wurden 233 mg **192** (0,82 mmol), 427 mg $Na_2(S_2O_4)$ (2,45 mmol, 3 Äq.) und 147 mg 3,4-Methylendioxybenzaldehyd (0,98 mmol, 1,2 Äq.) in 4 ml (0,2 M) DMSO für 3 h bei 90 °C umgesetzt. Nach Abkühlung auf RT wurde dest. Wasser und ges. NaCl-Lösung hinzugegeben, und die Lösung wurde mit $CHCl_3$/*i*-PrOH (3:1) extrahiert (6x). Die organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere chromatographische Reinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt werden. Es wurden 221 mg von Benzimidazol **197** (0,57 mmol, 61 %) als hellroter Feststoff isoliert.

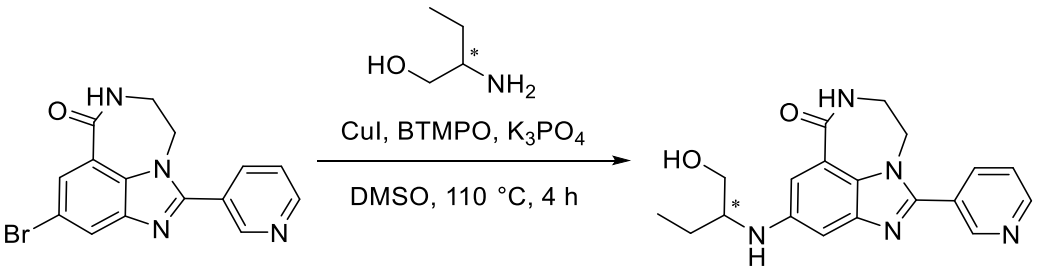


$C_{17}H_{12}BrN_3O_3$
386,21

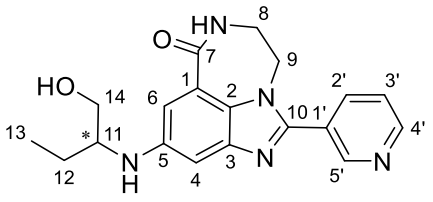
R_f = 0,29 (CH_2Cl_2/MeOH 97:3), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 386, 388 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3063 (m), 2913 (m), 1650 (m), 1620 (m), 1503 (w), **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 8.66 (t, ^3J = 5.7 Hz, 1H, NH), 8.11 (d, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-4), 7.93 (d, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-6), 7.43 (d, ^4J = 1.6 Hz, 1H, H-6'), 7.40 (dd, ^3J = 8.1 Hz, ^4J = 1.7 Hz, 1H, H-2'), 7.16 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H, H-3'), 6.18 (s, 2H, H-7'), 4.47 (d, ^3J = 6.1 Hz, 2H, H-9), 3.60 – 3.52 (m, 2H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm]

= 166.22 (s, C-7), 154.94 (s), 149.89 (s), 148.07 (s), 131.71 (s), 127.99 (d, C-6), 125.29 (d, C-2'), 124.52 (d, C-4), 121.97 (s, C-1'), 119.92 (s), 114.75 (s), 110.17 (d, C-6'), 109.14 (d, C-3'), 102.38 (t, C-7'), 51.11 (t, C-8), 40.53 (t, C-9).

Synthese von 4-((1-Hydroxybutan-2-yl)Amino)-1-(Pyridin-3-yl)-8,9-Dihydro-2,7,9ª-Triazabenzo[*cd*]Azulen-6-on (*rac*-181)



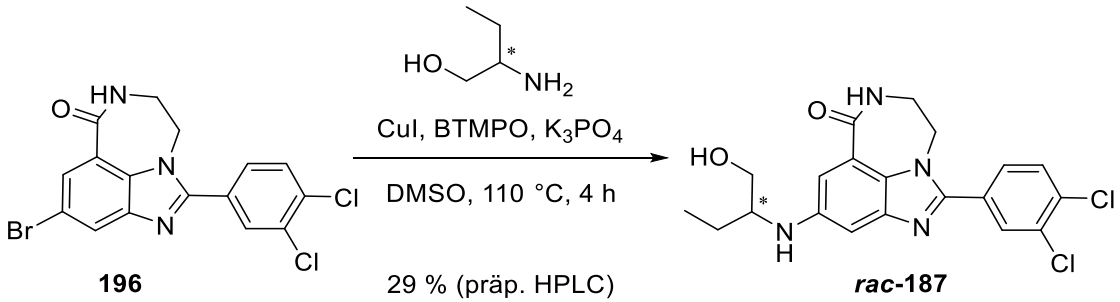
Entsprechend Synthesevorschrift **J** wurden 150 mg **193** (0,427 mmol) mit 8 mg CuI (0,042 mmol, 10 mol%), 19 mg BTMPO (0,042 mmol, 10 mol%), 236 mg K_3PO_4 (1,06 mmol, 2,5 Äq.) und 81 µl *rac*-2-Aminobutanol (0,84 mmol, 2 Äq.) in 4,2 ml DMSO (0,1 M) für 4 h bei 110 °C umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **J** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 10,1 mg von Benzimidazol ***rac*-181** (0,029 mmol, 3,9 %) als gelber Feststoff isoliert.



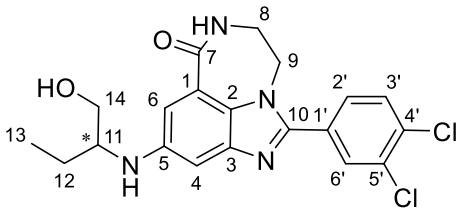
R_f = 0,16 (CH_2Cl_2/MeOH 95:5), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 352 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{19}H_{22}N_5O_2^+$): 352,17680 gef.: 352,17675, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] =3064 (w), 2922 (w), 1652 (s), 1608 (m), **^{1}H-NMR** (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 8.99 (s, 1H, H-5'), 8.72 (d, ^3J = 4.9 Hz, 1H, H-4'), 8.30 – 8.22 (m, 1H, H-2'), 7.65 (dd, ^3J = 7.9, 4.9 Hz, 1H, H-3'), 7.48 (d, ^4J = 2.2 Hz, 1H, H-4), 7.16 (d, ^4J = 2.2 Hz, 1H, H-6), 4.48 (dd, ^3J = 5.7, 2.7 Hz, 2H, H-9), 3.69 – 3.62 (m, 3H, H-14, H-8), 3.58 (dd, ^2J = 11.1 Hz, ^3J = 5.5 Hz, 1H, H-14), 3.42 (dt, ^3J = 7.1, 5.4 Hz, 1H, H-11), 1.85 – 1.67 (m, 1H, H-

12), 1.56 (dt, ^2J = 14.2 Hz, ^3J = 7.3 Hz, 1H, H-12), 1.02 (t, ^3J = 7.4 Hz, 3H, H-13), **^{13}C-NMR** (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 169.37 (s, C-7), 150.32 (s), 150.04 (d, C-4'), 149.27 (d, C-5'), 145.45 (s), 144.16 (s), 137.53 (d, C-2'), 125.98 (s, C-1'), 125.08 (s), 123.89 (d, C-3'), 117.23 (s), 115.13 (d, C-6), 104.65 (d, C-4), 62.91 (t, C-14), 56.91 (d, C-11), 50.04 (t, C-8), 40.68 (t, C-9), 24.08 (t, C-12), 9.58 (q, C-13).

Synthese von 4-((1-Hydroxybutan-2-yl)Amino)-1-(3,4-Dichlorphenyl)-8,9-Dihydro-2,7,9^a-Triazabenzo[*cd*]Azulen-6-on (*rac*-187)



Entsprechend Synthesevorschrift **J** wurden 150 mg **196** (0,365 mmol) mit 7 mg CuI (0,036 mmol, 10 mol%), 15 mg BTMPO (0,036 mmol, 10 mol%), 194 mg K_3PO_4 (0,91 mmol, 2,5 Äq.) und 69 µl *rac*-2-Aminobutanol (0,73 mmol, 2 Äq.) in 3,6 ml DMSO (0,1 M) für 4 h bei 110 °C umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **J** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 37,8 mg von Benzimidazol ***rac*-187** (0,09 mmol, 29 %) als gelber Feststoff isoliert.

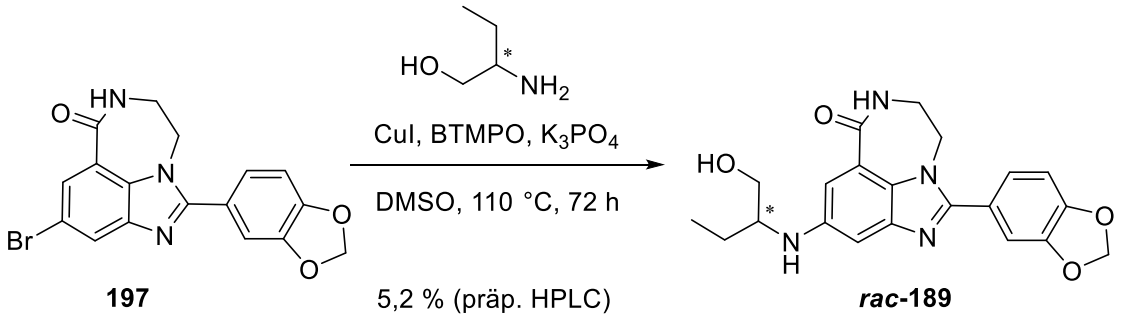


$C_{20}H_{20}Cl_2N_4O_2$
419,31

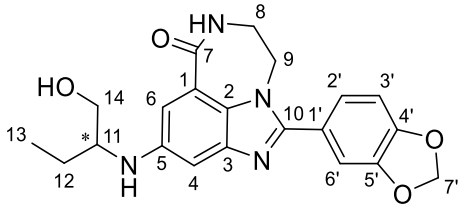
R_f = 0,25 (CH_2Cl_2/MeOH 97:3), **MS** (ESI$^+$, 3,2 kV): m/z = 419, 421 $[M+H]^+$, **MS** (ESI$^-$, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{20}H_{21}{}^{35}Cl_2N_4O_2^+$): 419,10360 gef.: 419,10385, **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 8.35 (t, J = 5.8 Hz, 1H, NH), 8.08 (dd, ^4J = 1.6, 0.8 Hz, 1H, H-6'), 7.84 – 7.81 (m, 2H, H-2', H-3'), 7.35 (d, ^4J = 2.2 Hz, 1H, H-4), 7.03 (d, ^4J = 2.3 Hz, 1H, H-6), 5.34 (s, 1H, NH), 4.48 – 4.36 (m, 2H, H-9),

3.50 (q, ^3J = 6.1 Hz, 3H, H-8, H-14), 3.35 – 3.22 (m, 2H, H-11, H-14, Peak unter dem H_2O-Signal), 1.71 (ddd, ^2J = 13.7 Hz, ^3J = 7.4, 5.1 Hz, 1H, H-12), 1.44 (dt, ^2J = 14.0 Hz, ^3J = 7.2 Hz, 1H, H-12), 0.94 (t, ^3J = 7.4 Hz, 3H, H-13), **^{13}C-NMR** (101 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 167.88 (s, C-7), 150.72 (s), 145.36 (s), 132.82 (s), 131.92 (s), 131.37 (d, C-3'), 131.30 (d, C-6'), 130.96 (s, C-1'), 129.88 (d, C-2'), 125.31 (s), 118.27 (s), 114.85 (d, C-6), 104.25 (d, C-4), 63.04 (t, C-14), 56.87 (d, C-11), 50.63 (d, C-8), 40.91 (t, C-9), 24.49 (t, C-12), 11.05 (q, C-13).

Synthese von 4-((1-Hydroxybutan-2-yl)Amino)-1-(3,4-Methylendioxyphenyl)-8,9-Dihydro-2,7,9^a-Triazabenzo[*cd*]Azulen-6-on (*rac*-189)



Entsprechend Synthesevorschrift **J** wurden 90 mg **197** (0,232 mmol) mit 4 mg CuI (0,023 mmol, 10 mol%), 10 mg BTMPO (0,023 mmol, 10 mol%), 123 mg K_3PO_4 (0,58 mmol, 2,5 Äq.) und 44 µl *rac*-2-Aminobutanol (0,46 mmol, 2 Äq.) in 2,3 ml DMSO (0,1 M) für 72 h bei 110 °C (Gesamtzeit: RT + 110 °C = 150 h) umgesetzt. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift **J** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 20 % B – 90 % B). Es wurden 4,8 mg von Benzimidazol ***rac*-189** (0,012 mmol, 5,2 %) als gelber Feststoff isoliert.

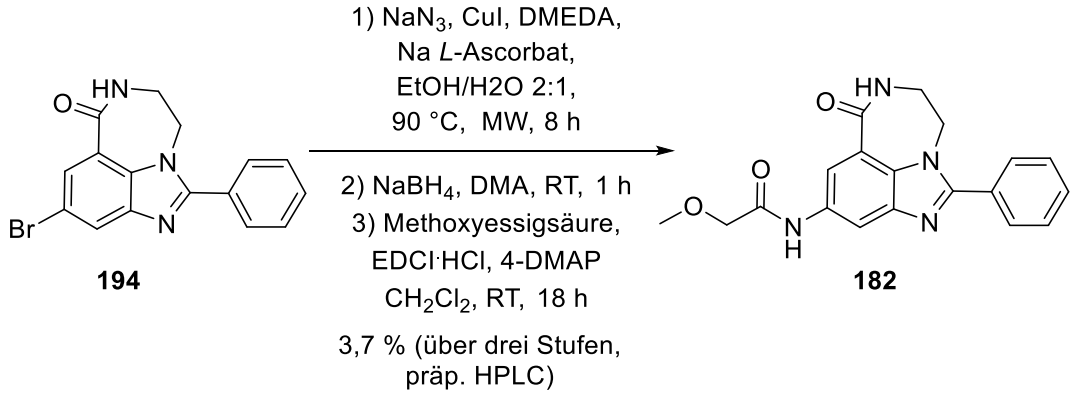


$C_{21}H_{22}N_4O_4$
394,43

R_f = 0,20 (CH_2Cl_2/MeOH 95:5), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 395 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{21}H_{23}N_4O_4^+$): 395,17138 gef.: 395,17146, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3328 (br), 2960 (w), 2924 (m), 2854 (w), 1650 (m), 1613 (s), 1471 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 7.43 (d, ^4J = 2.1 Hz, 1H, H-4), 7.32 – 7.27

(m, 2H, H-2', H-6'), 7.15 (d, ^4J = 2.2 Hz, 1H, H-6), 7.04 (d, ^3J = 8.5 Hz, 1H, H-3'), 6.09 (s, 2H, H-7'), 4.50 – 4.40 (m, 2H, H-9), 3.66 (q, ^3J = 4.9, 3.4 Hz, 3H, H-8, H-14), 3.59 (dd, ^2J = 11.1 Hz, ^3J = 5.6 Hz, 1H, H-14), 3.49 – 3.38 (m, 1H, H-11), 1.78 (ddd, ^2J = 13.6 Hz, ^3J = 7.6, 5.9 Hz, 1H, H-12), 1.58 (dp, ^2J = 14.6 Hz, ^3J = 7.4 Hz, 1H, H-12), 1.04 (t, ^3J = 7.4 Hz, 3H, H-13), **^{13}C-NMR** (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 169.68 (s, C-7), 149.58 (s), 148.19 (s), 145.27 (s), 143.96 (s), 123.95 (d, C-2'), 122.51 (s), 116.86 (s), 114.05 (d, C-6), 109.21 (d, C-6'), 108.13 (d, C-3'), 104.78 (d, C-4), 101.84 (t, C-7'), 62.96 (t, C-14), 56.91 (d, C-11), 50.30 (t, C-9), 40.75 (t, C-8), 24.11 (t, C-12), 9.58 (q, C-13).

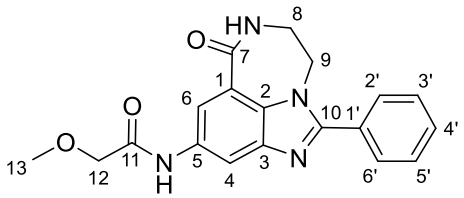
Synthese von 2-Methoxy-*N*-(6-Oxo-1-Phenyl-6,7,8,9-Tetrahydro-2,7,9^a-Triazabenzo[*cd*]Azulen-4-yl)Acetamid (182)



Entsprechend der Synthesevorschrift **H** wurden 250 mg **194** (0,73 mmol) mit 142 mg NaN_3 (2,19 mmol, 3 Äq.), 42 mg CuI (0,22 mmol, 30 mol%), 27 µl DMEDA (0,24 mmol, 35 mol%) und 11 mg Na-*L*-Ascorbat (0,07 mmol, 10 mol%) in 7 ml EtOH/H_2O (2:1) umgesetzt. Nach 1 h bei 90 °C in der Synthesemikrowelle wurden erneut 42 mg CuI und 11 mg Na-*L*-Ascorbat hinzugegeben und für insgesamt 7 h bei 90 °C gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung entsprechend der Vorschrift **H** mit $CHCl_3$/*i*-PrOH (3:1) extrahiert, die organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt.

Der Rückstand wurde in 5 ml DMA unter Schutzatmosphäre gelöst und bei RT mit 55 mg $NaBH_4$ (1,46 mmol) versetzt. Nach 1 h wurde dest. Wasser hinzugegeben und die Lösung mit CH_2Cl_2 extrahiert (5x). Die organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das erhaltene Amin wurde ohne weiter Reinigung in der Folgereaktion eingesetzt.

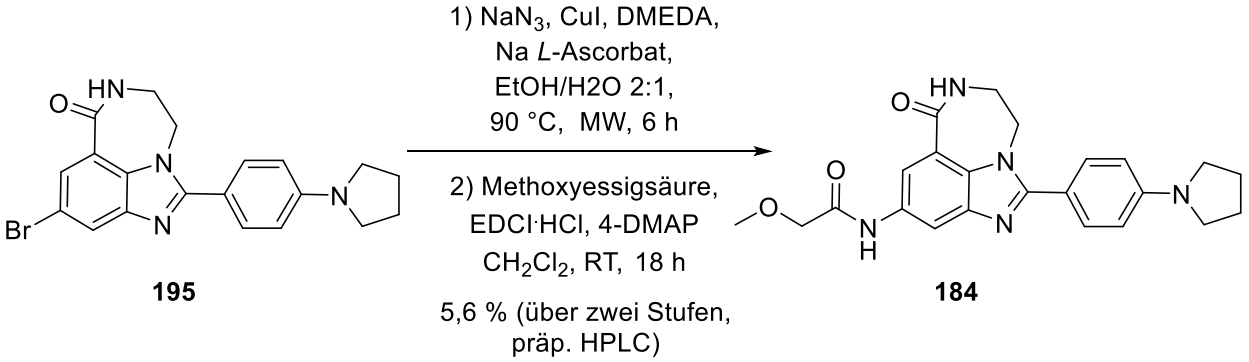
Dazu wurde entsprechend der Synthesevorschrift **I** das Amin mit 210 mg EDCI·HCl (1,1 mmol, 1,5 Äq.), 134 mg DMAP (1,1 mmol, 1,5 Äq.) und 111 µl Methoxyessigsäure (1,5 mmol, 2 Äq.) in 7 ml CH_2Cl_2 umgesetzt. Nach 18 h wurde die Reaktion entsprechend der Vorschrift **I** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 5 % B – 50 % B). Es wurden 6,8 mg von Benzimidazol **182** (0,019 mmol) als oranger Feststoff isoliert. Die kombinierte Ausbeute über drei Stufen betrug 3,7 %.



$C_{19}H_{18}N_4O_3$
350,38

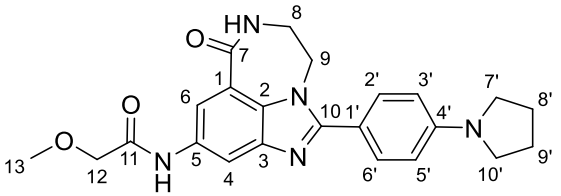
R_f = 0,10 (CH_2Cl_2/MeOH 95:5), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 351 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{19}H_{19}N_4O_3^+$): 351,14516 gef.: 351,14508, **^{1}H-NMR** (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 8.36 (d, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-4), 8.12 (d, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-6), 7.87 – 7.79 (m, 2H, H-2'/6'), 7.69 – 7.57 (m, 3H, H-3'/5', H-4'), 4.56 – 4.49 (m, 2H, H-9), 4.10 (s, 2H, H-12), 3.68 (s, 3H, H-13), 3.56 – 3.49 (m, 2H, H-8), **^{13}C-NMR** (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 169.65 (s, C-11), 169.19 (s, C-7), 155.18 (s), 143.01 (s), 139.71 (s), 132.98 (s), 130.36 (d, C-4'), 129.47 (d, C2'/6'), 129.09 (s), 128.60 (d, C-3'/5'), 127.78 (s), 119.76 (d, C-6), 116.91 (s), 115.23 (d, C-4), 71.58 (t, C-12), 58.25 (q, C-13), 50.39 (t, C-9), 40.63 (t, C-8).

Synthese von 2-Methoxy-*N*-(6-Oxo-1-(4-(Pyrrolidin-1-yl)Phenyl)-6,7,8,9-Tetrahydro-2,7,9^{a}-Triazabenzo[*cd*]Azulen-4-yl)Acetamid (184)



Entsprechend der Synthesevorschrift **H** wurden 110 mg **195** (0,267 mmol) mit 52 mg NaN_3 (0,8 mmol, 3 Äq.), 15 mg CuI (0,08 mmol, 30 mol%), 9 µl DMEDA (0,09 mmol, 35 mol%) und 4 mg Na-*L*-Ascorbat (0,03 mmol, 10 mol%) in 2,7 ml EtOH/H_2O (2:1) umgesetzt. Nach 1 h bei 90 °C in der Synthesemikrowelle wurden erneut 15 mg CuI und 4 mg Na-*L*-Ascorbat hinzugegeben und für insgesamt 4 h bei 90 °C gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktion entsprechend der Vorschrift **H** mit $CHCl_3$/*i*-PrOH (3:1) extrahiert (5x), die organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das erhaltene Amin wurde ohne weitere Reinigung eingesetzt in der Folgereaktion eingesetzt.

Dazu wurde entsprechend der Synthesevorschrift **I** das Amin mit 80 mg EDCI·HCl (0,4 mmol, 1,5 Äq.), 50 mg DMAP (0,4 mmol, 1,5 Äq.) und 41 µl Methoxyessigsäure (0,54 mmol, 2 Äq.) in 2,7 ml CH_2Cl_2 umgesetzt. Nach 18 h wurde die Reaktion entsprechend der Vorschrift **I** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 5 % B – 50 % B). Es wurden 6,3 mg von Benzimidazol **184** (0,015 mmol) als hellroter Feststoff isoliert. Die kombinierte Ausbeute über zwei Stufen betrug 5,6 %.

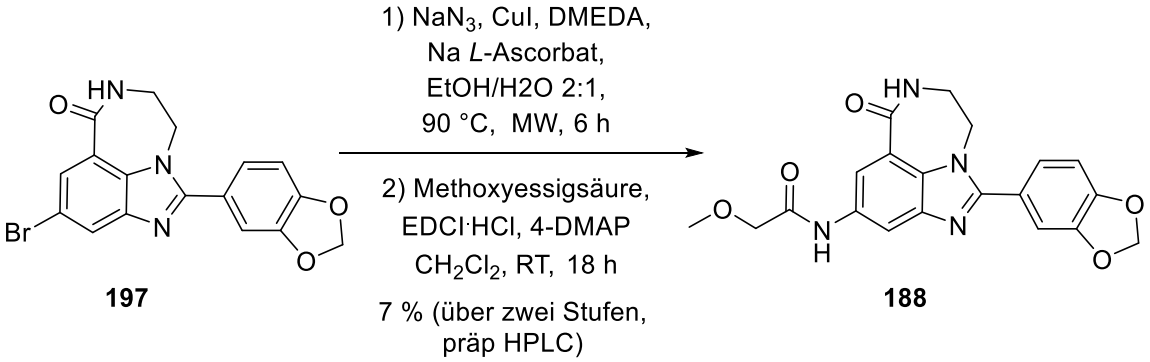


$C_{23}H_{25}N_5O_3$
419,49

R_f = 0,10 (CH_2Cl_2/MeOH 97:3), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 420 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{23}H_{26}N_5O_3^+$): 420,20301 gef.: 420,20322, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3313 (br), 2920 (w), 2850 (w), 1648 (m), 1606 (s), 1559 (m), 1479 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 8.28 (d, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-4), 8.16 (s, 1H,

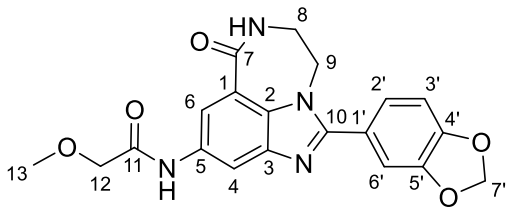
NH), 8.04 (d, ^4J = 1.9 Hz, 1H, H-6), 7.65 (d, ^3J = 8.4 Hz, 2H, H, H-2‘/6‘), 6.73 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2H, H-3‘/5‘), 4.51 (t, ^3J = 4.2 Hz, 2H, H-8), 4.09 (s, 2H, H-12), 3.66 (d, J = 6.0 Hz, 2H, H-9), 3.52 (s, 3H, H-13), 3.37 (d, J = 6.3 Hz, 4H, H-7‘/10‘), 2.24 – 2.03 (m, 4H, H-8‘/9‘), **^{13}C-NMR** (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 169.62 (s, C-11), 169.00 (s, C-7), 156.39 (s), 149.54 (s), 130.59 (d, C-2‘/6‘), 118.80 (d, C-6), 114.25 (d, C-4), 111.21 (d, C-3‘/5‘), 71.58 (t, C-12), 58.24 (q, C-13), 50.83 (t, C-8), 47.09 (t, C-7‘/10‘), 40.62 (t, C-9), 25.07 (t, C-8‘/9‘).

Synthese von 2-Methoxy-*N*-(6-Oxo-1-(3,4-Methylendioxyphenyl)-6,7,8,9-Tetrahydro-2,7,9^a-Triazabenzo[*cd*]Azulen-4-yl)Acetamid (188)



Entsprechend der Synthesevorschrift **H** wurden 110 mg **197** (0,28 mmol) mit 55 mg NaN_3 (0,84 mmol, 3 Äq.), 16 mg CuI (0,08 mmol, 30 mol%), 10 µl DMEDA (0,1 mmol, 35 mol%) und 4 mg Na-*L*-Ascorbat (0,03 mmol, 10 mol%) in 2,8 ml EtOH/H_2O (2:1) umgesetzt. Nach 1 h bei 90 °C in der Synthesemikrowelle wurden erneut 16 mg CuI und 4 mg Na-*L*-Ascorbat hinzugegeben und für insgesamt 5 h bei 90 °C gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktion entsprechend der Synthesevorschrift **H** mit $CHCl_3$/*i*-PrOH (3:1) extrahiert (5x), die organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das erhaltene Amin wurde ohne weitere Reinigung eingesetzt in der Folgereaktion eingesetzt.

Dazu wurde entsprechend der Synthesevorschrift **I** mit 80 mg EDCI·HCl (0,4 mmol, 1,5 Äq.), 50 mg DMAP (0,4 mmol, 1,5 Äq.) und 41 µl Methoxyessigsäure (0,54 mmol, 2 Äq.) in 2,7 ml CH_2Cl_2 umgesetzt. Nach 18 h wurde die Reaktion entsprechend der Vorschrift **I** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels präparativer HPLC gereinigt (Wasser/ACN: 5 % B – 50 % B). Es wurden 7,8 mg von Benzimidazol **188** (0,02 mmol) als gelber Feststoff isoliert. Die kombinierte Ausbeute über zwei Stufen betrug 7 %.



$C_{20}H_{18}N_4O_5$
394,39

R_f = 0,48 (CH_2Cl_2/MeOH 97:3), **MS** (ESI^+, 3,2 kV): m/z = 395 $[M+H]^+$, **MS** (ESI^-, 3,2 kV): m/z = nicht ionisiert, **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{20}H_{21}N_4O_5^+$): 395,13499 gef.: 395,13469, **FT-IR**: [ν in cm^{-1}] = 3358 (m), 2921 (m), 2851 (m), 1658 (s), 1632 (s), 1537 (w), 1469 (s), **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d6*): δ [ppm] = 8.46 (t, ^3J = 5.7 Hz, 1H, NH), 8.25 (t, ^4J = 2.3 Hz, 1H, H-4), 8.11 (t, ^4J = 2.3 Hz, 1H, H-6), 7.41 (d, ^4J = 1.7 Hz, 1H, H-6'), 7.37 (dd, ^3J = 8.1 Hz, ^4J = 1.8 Hz, 1H, H-2'), 7.12 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H, H-3'), 6.15 (s, 2H, H-7'), 4.47 – 4.38 (m, 2H, H-9), 4.04 (s, 2H, H-12), 3.59 – 3.49 (m, 2H, H-8), 3.41 (s, 3H, H-13), **^{13}C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d6*): δ [ppm] = 168.45 (s, C-11), 167.50 (s, C-7), 154.54 (s), 149.24 (s), 147.95 (s), 143.74 (s), 133.49 (s), 129.62 (s), 124.72 (d, C-2'), 123.50 (s), 118.81 (d, C-6), 117.66 (s), 114.35 (d, C-4), 110.06 (d, C-6'), 108.98 (d, C-3'), 102.15 (t, C-7'), 72.20 (t, C-12), 59.16 (q, C-13), 50.88 (t, C-9), 40.84 (t, C-8).

7 EXPERIMENTELLER TEIL II

Beschreibung der experimentellen Arbeiten während des Auslandsaufenthalts im Labor von Prof. Mouriño.

7.1 Allgemeine experimentelle Bedingungen

Reagenzien und Lösemittel

Die verwendeten Reagenzien und Lösemittel wurden von *Sigma Aldrich*, *ABCR*, *FischerScientific* bezogen. Lösemittel zur Extraktion oder zur Chromatographie wurden als Technical Grade erhalten und über einer Rektifikationskolonne destilliert. Trockene Lösemittel wurden nach Destillation über einem geeigneten Trocknungsmittel erhalten (THF – Na/Benzophenon, Et_2O – Na/Benzophenon, Toluol – Na/Benzophenon, CH_2Cl_2 – P_2O_5, Piperidin – CaH_2). Das verwendete CuI wurde durch Umkristallisation und Ausfällung aus ges. NaI-Lösung und nachfolgendem Waschen mit EtOH (96 %) und Pentan gereinigt. Die Lösungen von *n*-BuLi und *n*-HexylLi wurden vor der Verwendung mit *N*-Benzylbenzamid titriert.

Entfernen der Lösemittel

Die Lösemittel wurden an einem Rotationsverdampfer der Firma *Büchi* mittels einer Wasserstrahlpumpe entfernt. Nachfolgendes Trocknen erfolgte durch eine Drehschieberpumpe der Firma *Ilmvac* über eine Schlenkapparatur.

Arbeiten unter Schutzgas

Sofern nicht anders angegeben wurden alle Reaktionen unter Schutzatmosphäre durchgeführt. Dazu wurden die Glasgeräte vor der Verwendung entweder über Nacht in einem Trockenschrank bei 150 °C gelagert, oder mit einem Heißluftgebläse bei ~500 °C ausgeheizt. Die getrockneten Gefäße wurden anschließend durch einen Strom von Argon 4.6 (99,996 %) ausgekühlt und anschließend verwendet.

Säulenchromatographie

Zur chromatographischen Reinigung wurden Glassäulen mit verschiedenen Durchmessern (0,5 cm – 5 cm) verwendet. Die Säulen wurden mit Kieselgel 60 (230-400 mesh) der Firma *Merck* beladen. Die Menge an Silicagel wurde für die Trennung angepasst. Die verwendeten Lösemittel, Säulendurchmesser und Säulenlängen sind in den Reaktionen jeweils angegeben.

Dünnschichtchromatographie

Reaktionskontrollen und R_f-Wertbestimmungen mittels Dünnschichtchromatographie wurden auf Kieselgelplatten (Aluminiumfolie, Kieselgel 60 F254) der Firma *Merck* durchgeführt. Es wurden verschiedene Laufmittelgemische verwendet, diese sind bei den jeweiligen Reaktionen angegeben. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht, sowie Anfärbung mit *Hessain-Cer-Lösung* oder Pd-Färbereagenz für Carborane.

Cer-Färbereagenz: 5 g $Ce(SO_4)_2$ und 25 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot 4\ H_2O$ in 50 ml konz. H_2SO_4 gelöst und mit 450 ml H_2O verdünnt.

Pd-Färbereagenz für Carborane: 150 mg $PdCl_2$ in 10 ml 37 %HCl gelöst und mit 100 ml Aceton verdünnt.

Hochdruckflüssigchromatographie mit chiraler stationärer Phase (chirale HPLC)

Zur Bestimmung chiraler Verbindungen wurde ein *Agilent 1100/1200 Series* HPLC-System verwendet. Das Gerät enthielt einen Einwellenlängen-UV-Detektor der auf $\lambda = 267$ nm eingestellt wurde. Als stationäre Phase diente eine *CHIRALPAK IA*- oder *IJ*-Säule der Firma *Daicel* in den Dimensionen 4.6 mm x 250 mm. Die Säulen konnten sowohl als Normalphase als auch als Umkehrphase eingesetzt werden. Laufmittelgemische sind bei den jeweiligen Trennungen angeben.

Zur Trennung chiraler Verbindungen wurde das Gerät *PuriFash 4250-250* der Firma *Interchim*® verwendet. Als stationäre Phase diente eine *CHIRALPAK IA*- oder *IJ*-Säule der Firma *Daicel* in den Dimensionen 20 mm x 250 mm. Das Gerät verfügte über einen PDA-Detektor, welcher den Bereich von 200 nm bis 600 nm scannte. Die Säulen konnten sowohl als Normalphase als auch als Umkehrphase eingesetzt werden. Laufmittelgemische sind bei den jeweiligen Trennungen angegeben. Die Sammlung der Fraktionen erfolgte automatisch.

Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Zur Bestimmung der Kernspinresonanz-Spektren (NMR-Spektren) wurde ein *DPX 250 MHz* Spektrometer der Firma *Bruker* verwendet. Die chemischen Verschiebungen δ wurden in ppm angegeben. Die deuterierten Lösemittel und die Messfrequenz werden jeweils vor den Messdaten aufgeführt. Als Lösemittel diente $CDCl_3$ (^{1}H: 7.26 ppm; ^{13}C: 77.16 ppm) mit Zugabe von Tetramethylsilan (Referenz: ^{1}H/^{13}C 0 ppm). Die Messungen wurden bei RT durchgeführt. Die Mulitplizität der ^{1}H-Signale ist mit „s“ für Singulett, „d“ für Dublett, „t“ für Triplett, „q“ für Quartett und „m“ für Multiplett (oder Kombinationen daraus) angegeben. Die Angaben zu den der Mulitplizität, Kopplungskonstanten (*J* in Hertz [Hz]) und der Protonenanzahl sind jeweils in Klammern hinter der chemischen Verschiebung angegeben. Die Verschiebungen der ^{13}C-Kerne wurden aus ^{1}H-breitbandentkoppelten Spektren entnommen. Die Anzahl der gebundenen H-Atome konnte anhand von Distortionless Enhancement by Polarization Transfer-Spektren (DEPT-135) bestimmt werden. Die Signale sind mit „s“ für C, „d“ für CH „t“ für CH_2 und „q“ für CH_3 gekennzeichnet. Die NMR-Spektren wurden mit der Software *MestreNova* der Firma *MestreLab* ausgewertet und bearbeitet.

Vorbereitung und Lagerung der finalen Derivate

Die finalen Verbindungen wiesen eine HPLC-Reinheit von >95 % auf und wurden unter Lichtausschluss bei –25 °C gelagert.

7.2 Docking-Workflow für Carboran-haltige Vitamin D_3 Analoga

7.2.1 Docking mit GOLD

Die 3-dimensionalen Strukturen der Derivate wurden mit Chem3D generiert. Alle Verbindungen wurden vor dem Docking mit dem Chem3D „MM2 Energy minimization tool“ im Vakuum bei 300 K minimiert. Die Strukturen wurden im Dateiformat Mol2 verwendet. Der Grenzwert der Minimierung wurde auf 0.01 Å RMS gesetzt. Die Strukturen wurden weiterhin auf die korrekte Stereochemie überprüft. Als Zielprotein wurde die Röntgen-Kristallstruktur 1DB1 des humanen VD-Rezeptors verwendet.[305] Das in der Kristallstruktur vorhandene 1,25VD_3 (**204**) wurde als Referenzligand verwendet. Die Dockingstudien wurden mit dem GOLD Dockingprogramm (Version Suite 5.2) durchgeführt.[322]

Die Proteinstruktur wurde modifiziert (Fehlende H-Atome wurden hinzugefügt, Lücken aufgefüllt und das His Tautomer von His397 angepasst). Daneben wurde eine Version mittels PyMOL eine Version der Proteinstruktur ohne Helix-12 erstellt, um die Dockingstudien jeweils mit und ohne H-12 durchführen zu können.

Die Liganden-Bindungsstelle des natürlichen Liganden 1,25VD_3 (**204**) wurde als Bindungstasche für das Docking gewählt, der Radius der Tasche wurde auf 10 Å festgelegt. Die Derivate wurden in 10 unabhängigen Genetic Algorithm (GA) Läufen gedockt, jeweils mit einem Maximum von 125000 GA Operationen für jede einzelne Population. Die Grenze für Wasserstoffbrückenbindungen wurde auf 4.0 Å festgelegt und für Van-der-Waals-Interaktionen auf 2.5 Å. Ein möglicher Ringflip wurde deaktiviert. Als Scoring-Funktion wurde CHEMPLP ausgewählt, zum Rescore wurde ChemScore ausgewählt. Die drei besten Dockingposen eines jeweiligen Derivats wurden behalten. Die anschließende Visualisierung wurde mittels GOLD und PyMOL vorgenommen. Die abgebildeten Grafiken wurden mit PyMOL und dem Discovery Studio Visualizer erstellt.

7.2.2 Molecular Dynamics mit YASARA

Die besten Dockingposen wurden in der Bindungstasche als Komplex mit dem VDR (1DB1.pdb) gespeichert, um Molecular Dynamics Simulationen durchführen zu können. Diese Studien wurden mit der YASARA Suite durchgeführt.[323]

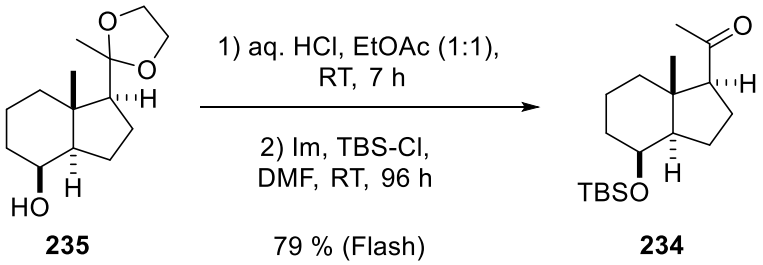
Der Ligand-Protein-Komplex wurde dazu in eine kubische Matrix geladen, welche mit H_2O Molekülen und Na^+- und Cl^-Ionen zum Ladungsausgleich gefüllt wurde. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt. Zunächst wurden die Wassermoleküle angelagert und eine Energieminimierung mit maximaler Steigung durchgeführt. Anschließend wurden überschüssige Wassermoleküle entfernt und der Prozess wurde wiederholt. Nach dieser intitalen Anpassung der Wassermoleküle wurden 50 MD Schritte für nur für die H_2O-Teilchen durchgeführt, daraufhin wurde das gesamte System energieminimiert.

Nach diesen vorbereitenden Schritten startete die MD Simulation (AMBER14 Forcefield) mit den Standardeinstellungen für Bindungslängen, Bindungswinkel, van der Waals-, Coloumb- und elektrostatische Interaktionen (10,5 Å Grenze) bei einer Temperatur von 298 K. Insgesamt wurden die Bewegungen für einen Zeitraum von 20 ns (1,25 fs Simulations-Subschritt, 2,5 fs Simulationsschritt) simuliert. Die abgebildeten Grafiken wurden mit PyMOL erstellt.

7.3 Synthese Carboran-haltiger Vitamin D_3 Analoga

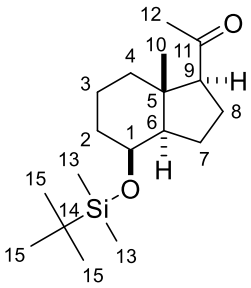
7.3.1 Synthese des Diin-Grundgerüsts

Synthese von 1-((1*S*,3a*R*,4*S*,7a*S*)-4-((*tert*-Butyldimethylsilyl)Oxy)-7a-Methyloctahydro-1*H*-Inden-1-yl)Ethan-1-on (234)



Zunächst wurden 5 g von Acetal **235** (Rohprodukt aus der Ozonolyse) mittels manueller Säulenchromatographie gereinigt (Hex/EtOAc: 8 % B – 20 %). Das erhaltene Rohprodukt (Mischung aus dem Ketal und Keton) wurde anschließend in 100 ml Hex/EtOAc (1:1) gelöst und mit 50 ml HCl-Lösung (10 %) versetzt. Die Reaktion wurde für 7 h bei RT stark gerührt, anschließend wurden die Phasen separiert und die wässrige Phase mit Hex/EtOAc (1:1) extrahiert (2x). Die organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Es wurden 2,585 g von Keton **230** (13,2 mmol) erhalten, welches ohne weitere Reinigung in der Folgereaktion eingesetzt wurde.

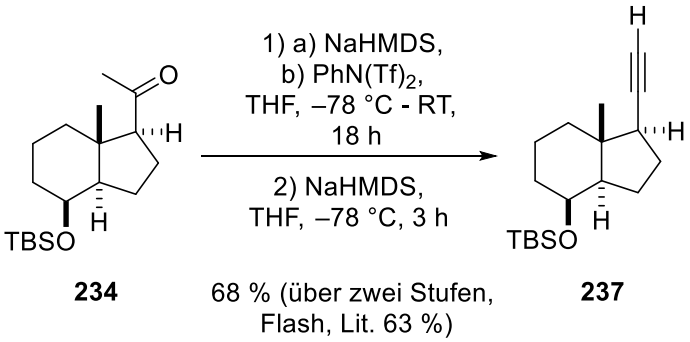
Dazu wurden 2,5 g von Keton **230** (12,7 mmol) in 40 ml DMF unter Schutzatmosphäre gelöst und mit 3,48 g Imidazol (50,72 mmol, 4 Äq.) versetzt. Nach 5 min wurden 5,76 g TBS-Cl (38,2, 3 Äq.) bei RT hinzugefügt und die Reaktion wurde für 96 h in der Dunkelheit gerührt. Anschließend wurde dest. Wasser hinzugefügt und die Lösung mit Hex/EtOAc (95:5) extrahiert (3x). Die organischen Phasen wurden erneut mit dest. Wasser gewaschen (2x), über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels manueller Säulenchromatographie gereinigt (Hex/EtOAc: 0 % B – 5 %). Es wurden 3,1 g von Keton **234** (10 mmol, 79 %) als weißer pulverförmiger Feststoff isoliert.



$C_{18}H_{34}O_2Si$
310,55

R_f = 0,24 (Hex/EtOAc 95:5), **^{1}H-NMR** (250 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 4.00 (d, ^3J = 2.7 Hz, 1H, H-1), 2.45 (t, ^3J = 8.7 Hz, 1H, H-9), 2.26 – 1.93 (m, 5H), 1.90 – 1.27 (m, 6H), 1.00 – 0.77 (m, 15H, H-10, H-15), 0.17 – -0.09 (m, 9H). Struktur bestätigt anhand der Referenzdaten von Prof. Mouriño und Prof. Maestro.

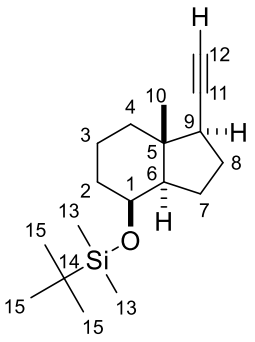
Synthese von *tert*-Butyl(((1*R*,3a*R*,4*S*,7a*R*)-1-Ethynyl-7-Methyloctahydro-1*H*-Inden-4-yl)Oxy)Dimethylsilan (237)



234 68 % (über zwei Stufen, Flash, Lit. 63 %) **237**

In einem Rundkolben wurden 150 mg **234** (0,48 mmol) in 5 ml THF (0,1 M) unter Schutzatmosphäre gelöst und auf –78 °C gekühlt. Anschließend wurde 480 µl NaHMDS (2 M in THF, 0,96 mmol, 2 Äq.) tropfenweise hinzugefügt und für 20 min bei –78 °C gerührt, für weiter 20 min aus dem Kühlbad entfernt und im Anschluss wieder auf –78 °C gekühlt. Dann wurden 514 mg $PhN(Tf)_2$ (1,44 mmol, 3 Äq.) gelöst in 2,5 ml THF über eine Transferkanüle zur Reaktion hinzugefügt. Nach der Zugabe wurde die Reaktion auf RT erwärmt und für weitere 18 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ges. NaCl-Lösung beendet, die wässrige Phase zuerst mit MTBE extrahiert (1x) und anschließend mit CH_2Cl_2 (3x). Die organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels manueller Säulenchromatographie gereinigt (Hexan 100 %). Es wurden 184 mg Enoltriflat (0,42 mmol, 87 %) isoliert.

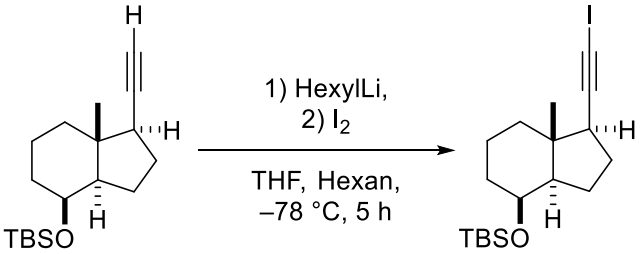
In der Folgereaktion wurden 184 mg Enoltriflat (0,42 mmol) in 4,2 ml THF (0,1 M) unter Schutzatmosphäre gelöst und auf –78 °C gekühlt. Anschließend wurden 416 µl NaHMDS (2 M in THF, 0,84 mmol, 2 Äq.) tropfenweise hinzugefügt und die Reaktion für weitere 20 min bei –78 °C gerührt. Im Anschluss wurde das Kühlbad entfernt und die Reaktion für 3 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ges. NaCl-Lösung beendet, die wässrige Phase mit MTBE extrahiert (3x). Die organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels manueller Säulenchromatographie gereinigt (Hexan 100 %). Es wurden 95 mg von Alkin **237** (0,32 mmol, 78 %) als farbloses Öl isoliert. Die kombinierte Ausbeute über zwei Stufen betrug 68 %.



$C_{18}H_{32}OSi$
292,54

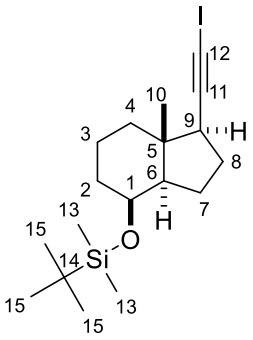
R_f = 0,72 (Hexan), **^{1}H-NMR** (250 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 4.00 (t, ^3J = 2.7 Hz, 1H, H-1), 2.31 – 1.89 (m, 3H), 1.86 – 1.57 (m, 5H), 1.51 – 1.09 (m, 4H), 1.08 – 0.95 (m, 4H, H-10 + 1H), 0.87 (s, 9H, H-15), -0.01 (d, ^3J = 4.3 Hz, 6H, H-13), **^{13}C-NMR** (63 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 85.63 (d, C-12), 70.02 (s, C-11), 68.58 (d, C-1), 51.40 (d, C-6), 42.91 (s, C-5), 42.56 (d, C-9), 37.87 (t), 34.24 (t), 28.08 (t), 25.63 (q, C-15), 23.03 (t), 17.86 (s, C-14), 17.33 (t), 15.20 (q, C-10), -4.95 (q, C-13), -5.33 (q, C-13). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.[324]

Synthese von *tert*-Butyl(((1*R*,3a*R*,4*S*,7a*R*)-1-(Iodethynyl)-7-Methyloctahydro-1*H*-Inden-4-yl)Oxy)Dimethylsilan (229)



237 99 % (Flash, Lit. 85 %) **229**

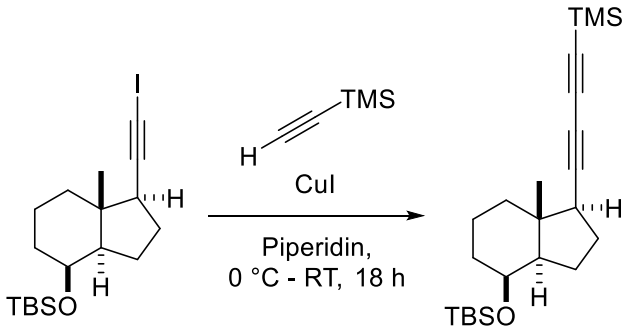
In einem Rundkolben wurden 492 mg **237** (1,68 mmol) in 10 ml THF (0,17 M) unter Schutzatmosphäre gelöst und auf –78 °C gekühlt. Anschließend wurden 4,5 ml Hexyllithium (1,48 M in THF, 6,73 mmol, 4 Äq.) tropfenweise hinzugefügt und die Reaktion für 1 h bei –78 °C gerührt. Im Anschluss wurden 2,13 g I_2 (8,4 mmol, 5 Äq.) in einer Portion hinzugefügt und für 10 min bei –78 °C gerührt, dann auf RT erwärmt und für 4 h abgedunkelt gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ges. NaCl-Lösung beendet, die wässrige Phase mit MTBE extrahiert (3x). Die organischen Phasen wurden mit verd. $Na_2S_2O_3$-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels manueller Säulenchromatographie gereinigt (Hexan 100 %). Es wurden 700 mg von Iodalkin **229** (1,68 mmol, ~99 %) als farbloses Öl isoliert.



$C_{18}H_{31}IOSi$
418,43

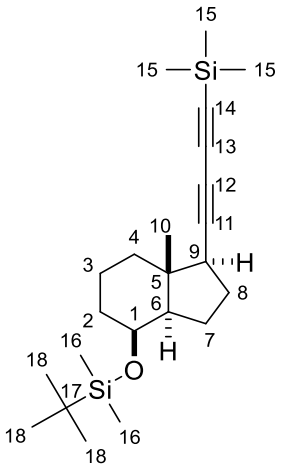
R_f = 0,68 (Hexan), **^{1}H-NMR** (250 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 3.99 (q, ^3J = 2.7 Hz, 1H, H-1), 2.26 (t, ^3J = 9.2 Hz, 1H, H-9), 2.03 – 1.87 (m, 1H), 1.86 – 1.54 (m, 4H), 1.54 – 1.34 (m, 3H), 1.33 – 1.09 (m, 4H), 0.99 (d, ^3J = 3.6 Hz, 4H, H-10 + 1H), 0.86 (d, ^3J = 2.8 Hz, 9H, H-15), -0.02 (d, ^3J = 4.7 Hz, 6H, H-13), **^{13}C-NMR** (63 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 96.08 (s, C-12), 68.58 (d, C-1), 51.16 (d, C-6), 44.91 (d, C-9), 43.62 (s, C-5), 37.94 (t), 34.22 (t), 27.94 (t), 25.63 (q, C-15), 23.04 (t), 17.86 (s, C-14), 17.33 (t), 15.53 (q, C-10), -4.93 (q, C-13), -5.33 (q, C-13). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.[324]

Synthese von *tert*-Butyldimethyl(((1*R*,3a*R*,4*S*,7a*R*)-7-Methyl-1-((Trimethylsilyl)Buta-1,3-Diin-1-yl)-Octahydro-1*H*-Inden-4-yl)Oxy)Silan (238)



229 94 % (Flash, Lit. 89 %) **238**

In einem Rundkolben wurden 700 mg **229** (1,68 mmol) und 706 µl TMS-Acetylen (5 mmol, 3 Äq.) in 8,4 ml entgastem Piperidin (0,2 M) gelöst und unter Lichtausschluss auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 63 mg gereinigtes CuI (0,33 mmol, 20 mol%) hinzugegeben, nach 10 min das Kühlbad entfernt und die Reaktion für 18 h abgedunkelt bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ges. NH_4Cl-Lösung beendet, die wässrige Phase mit MTBE extrahiert (3x). Die organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels manueller Säulenchromatographie gereinigt (Hexan 100 %). Es wurden 649 mg von Diin **238** (1,67 mmol, ~99 %) als weißer Feststoff isoliert.

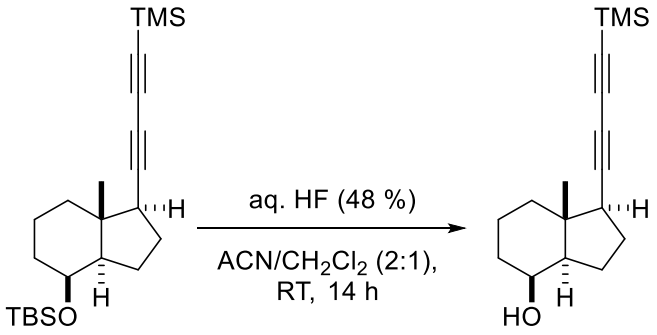


$C_{23}H_{40}OSi_2$
388,74

R_f = 0,52 (Hexan) **^{1}H-NMR** (250 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 4.02 – 3.94 (m, 1H, H-1), 2.16 (dd, ^2J = 11.0 Hz, ^3J = 7.0 Hz, 1H), 2.04 – 1.86 (m, 1H), 1.87 – 1.59 (m, 5H), 1.51 – 1.08 (m, 5H), 1.06 – 0.92 (m, 4H), 0.85 (s, 9H), 0.14 (s, 9H), -0.03 (d, 6H), **^{13}C-NMR** (63 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 88.53 (s), 82.94 (s), 81.17 (s), 68.52 (d, C-1), 67.53 (s, C-14), 51.40 (d, C-6), 44.10

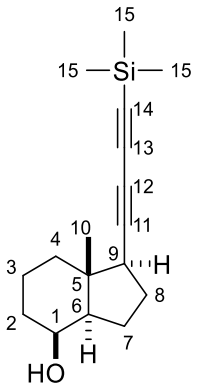
(s, C-5), 43.21 (d, C-9), 37.96 (t), 34.15 (t), 27.82 (t), 25.62 (q, C-18), 23.10 (t), 17.83 (s, C-17), 17.30 (t), 15.69 (q, C-10), -0.43 (q, C-15), -4.94 (q, C-16), -5.34 (q, C-16). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.[324]

Synthese von (1*R*,3a*R*,4*S*,7a*R*)-7-Methyl-1-((Trimethylsilyl)Buta-1,3-Diin-1-yl)-Octahydro-1*H*-Inden-4-ol (239)



238 98 % (Flash, Lit. 98 %) **239**

In ein PE-Gefäß wurden 762 mg **238** (1,96 mmol) in 20 ml ACN und 10 ml CH_2Cl_2 gelöst und anschließend bei RT mit 8 ml HF-Lösung (48 %) versetzt (WICHTIG: Es wurde eine Teflon-Kanüle verwendet). Nach 14 h bei RT wurde die Reaktionslösung vorsichtig zu 300 ml ges. $NaHCO_3$-Lösung in einem Erlenmeyerkolben gegeben und für 2 h bei RT gerührt. Die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 extrahiert (3x), die organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels manueller Säulenchromatographie gereinigt (Hex/EtOAc: 0 % B - 5 % B). Es wurden 529 mg von Alkohol **239** (1,93 mmol, 98 %) als gelbliches Öl isoliert.

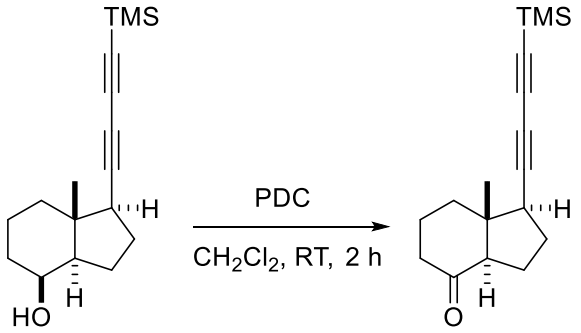


$C_{17}H_{26}OSi$
274,48

R_f = 0,3 (Hex/EtOAc 80:20) **^{1}H-NMR** (250 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 4.08 – 4.00 (m, 1H, H-1), 2.31 – 2.07 (m, 1H, H-9), 2.08 – 1.88 (m, 1H), 1.88 – 1.33 (m, 9H), 1.30 – 1.15 (m, 2H),

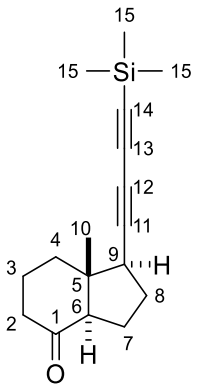
1.00 (s, 3H, H-10), 0.90 – 0.72 (m, 1H), 0.13 (s, 9H, H-15), **^{13}C-NMR** (63 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 88.39 (s), 83.32 (s), 80.82 (s), 68.27 (d, C-1), 67.70 (s, C-14), 50.93 (d, C-6), 43.81 (s, C-5), 43.16 (d, C-9), 37.68 (t), 33.49 (t), 27.63 (t), 22.60 (t), 17.09 (t), 15.36 (q, C-10), -0.47 (q, C-15). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.[324]

Synthese von (1*S*,3a*R*,7a*R*)-7-Methyl-1-((Trimethylsilyl)Buta-1,3-Diin-1-yl)-Octahydro-4*H*-Inden-4-on (240)



239 99 % (Flash, Lit. 98 %) **240**

In einem Rundkolben wurden 190 mg **239** (0,69 mmol) in 13 ml CH_2Cl_2 (0,05 M) unter Schutzatmosphäre gelöst. Anschließend wurden 1,17 g PDC (3,1 mmol, 4,5 Äq.) in einer Portion hinzugefügt und die Reaktion wurde für 2 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde über einem Kieselgel/Celite-Bett filtriert und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels manueller Säulenchromatographie gereinigt (Hex/EtOAc: 0 % B - 4 % B). Es wurden 187 mg von Keton **240** (0,69 mmol, ~99 %) als weißer Feststoff isoliert.

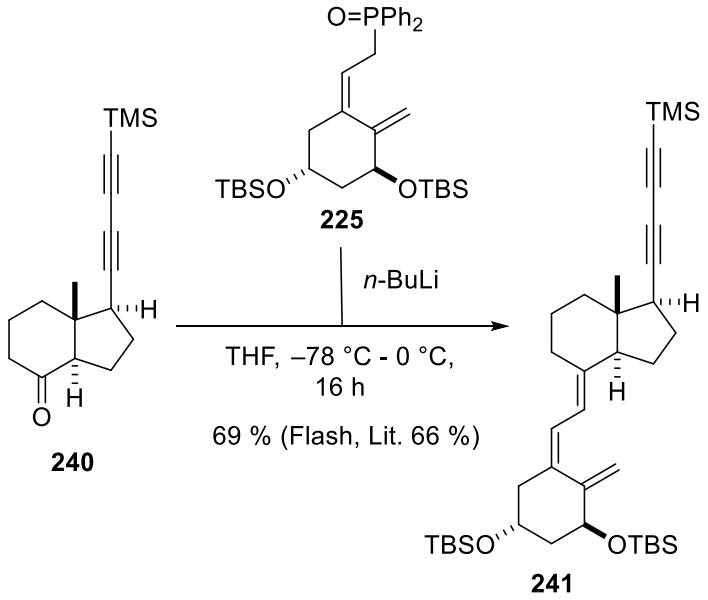


$C_{17}H_{24}OSi$
272,46

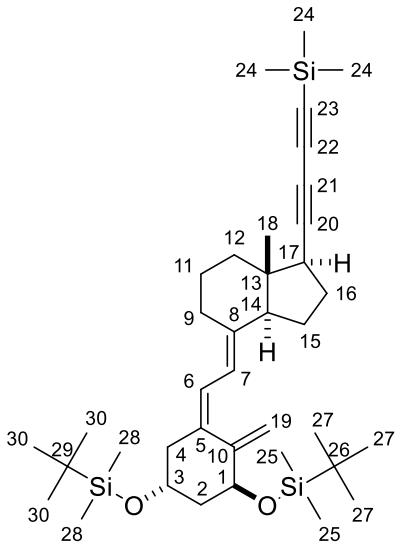
R_f = 0,41 (Hex/EtOAc 80:20) **^{1}H-NMR** (250 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 2.50 (t, ^3J = 9.3 Hz, 1H), 2.39 – 2.09 (m, 3H), 2.09 – 1.32 (m, 7H), 0.85 – 0.73 (m, 1H), 0.68 (s, 3H), 0.10 (s, 9H), **^{13}C-NMR** (63 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 209.82 (s, C-1), 87.97 (s), 84.09 (s), 79.26 (s), 67.85

(s, C-14), 59.64 (d, C-6), 50.90 (s, C-5), 42.69 (d, C-9), 40.39 (t), 36.29 (t), 27.89 (t), 23.29 (t), 19.55 (t), 13.97 (q, C-10), -0.54 (q, C-15). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.[324]

Synthese von (((1*R*,3*S*,*Z*)-5-(2-((1*S*,3a*S*,7a*S*,*E*)-7a-Methyl-1-((Trimethylsilyl)Buta-1,3-Diin-1-yl)Octahydro-4*H*-Inden-4-yliden)Ethyliden)-4-Methylenecyclohexan-1,3-diyl)Bis(Oxy))Bis(*tert*-Butyldimethylsilan) (241)

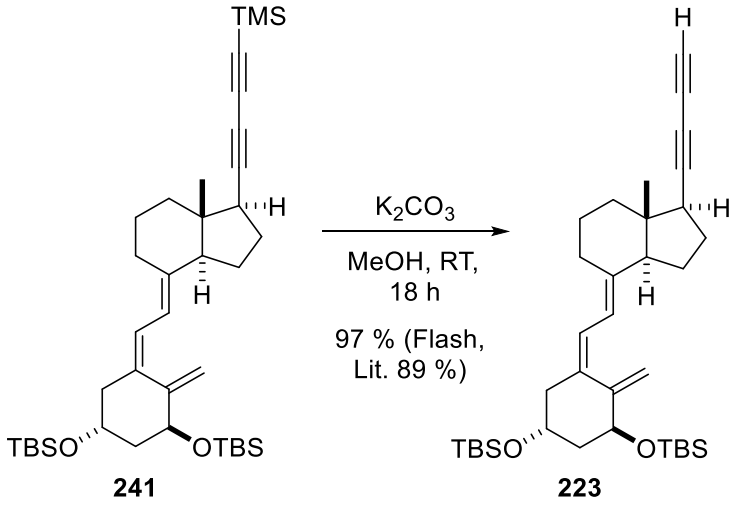


In einem Rundkolben wurden 527 mg Phosphinoxid **225** (0,9 mmol, 1,3 Äq.) in 10 ml THF unter Schutzatmosphäre gelöst und auf –78 °C gekühlt. Anschließend wurden 544 µl *n*-BuLi (1,58 M, 0,86 mmol, 0,95 Äq. in Bezug auf **225**) tropfenweise hinzugegeben und die Reaktion wurde für 1 h bei –78 °C gerührt. Im Anschluss wurden 188 mg **240** (0,69 mmol) gelöst in 5 ml THF über eine Spritzenpumpe (1 Tropfen/5 s) zum deprotonierten Phosphinoxid **225** gegeben. Nach der vollständigen Zugabe wurde die Kühlung ausgeschaltet, sodass sich die Reaktion über einen Zeitraum von 14 h auf 0 °C erwärmen konnte. Dann wurde das Lösemittel *in vacuo* entfernt, der Rückstand in Hex/EtOAc (80:20) aufgenommen und die organische Phase mit ges. NH_4Cl-Lösung gewaschen (2x). Die organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels manueller Säulenchromatographie gereinigt (Hex/EtOAc: 1 % B - 35 % B). Es wurden 302 mg von Trien **241** (0,47 mmol, 69 %) als weißer schaumförmiger Feststoff isoliert. (WICHTIG: Das Produkt war lichtempfindlich! Die Reaktionen wurden nach Möglichkeit unter strengem Lichtausschluss durchgeführt und das Produkt in Braunglasgefäßen gelagert.)

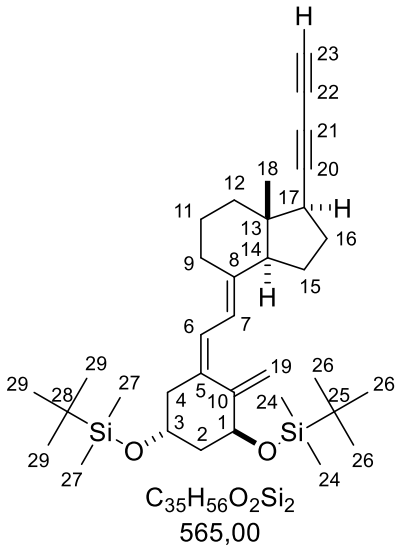


R_f = 0,82 (Hex/EtOAc 90:10) **^{1}H-NMR** (250 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 6.19 (d, ^3J = 11.2 Hz, 1H, H-7), 5.99 (d, ^3J = 11.2 Hz, 1H, H-6), 5.20 – 5.08 (m, 1H, H-19), 4.82 (d, ^2J = 2.7 Hz, 1H, H-19), 4.34 (dd, ^3J = 6.6, 3.7 Hz, 1H, H-1), 4.16 (dt, ^3J = 8.5, 4.2 Hz, 1H, H-3), 2.93 – 2.74 (m, 1H), 2.41 (dt, ^2J = 18.4 Hz, ^3J = 6.6 Hz, 2H), 2.31 – 2.11 (m, 1H), 2.10 – 1.96 (m, 1H) , 19.4 – 1.42 (m, 11H), 1.28 – 1.06 (m, 2H), 0.84 (d, ^4J = 2.7 Hz, 18H, H-27/30), 0.63 (s, 3H, H-18), 0.15 (s, 9H, H-24), 0.03 (d, ^3J = 2.4 Hz, 12H, H-25/28), **^{13}C-NMR** (63 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 148.07 (s), 139.55 (s), 135.72 (s), 122.66 (d), 118.25 (d), 111.16 (t, C-19), 88.38 (s), 83.34 (s), 81.29 (s), 71.93 (d), 67.32 (d), 67.05 (s, C-23), 54.38 (d, C-14), 47.61 (s, C-13), 45.93 (t), 44.64 (t), 42.60 (d, C-17), 37.96 (t), 28.35 (t), 28.07 (t), 25.71 (q, C-27/30), 25.65 (q, C-27/30), 22.88 (t), 22.43 (t), 18.06 (s, C-26/29), 17.99 (s, C-26/29), 13.71 (q, C-18), -0.44 (q, C-24), -4.83 (q, C-25/28), -4.93 (q, C-25/28), -5.20 (q, C-25/28).

Synthese von (((1*R*,3*S*,*Z*)-5-(2-((1*S*,3a*S*,7a*S*,*E*)-1-(Buta-1,3-diin-1-yl)-7a-Methyloctahydro-4*H*-Inden-4-yliden)Ethyliden)-4-Methylenecyclohexan-1,3-diyl)Bis(Oxy))Bis(*tert*-Butyldimethylsilan) (223)



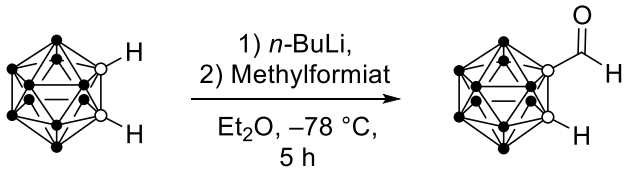
In einem Braunglasrundkolben wurden 300 mg **241** (0,47 mmol) in 2,5 ml THF und 5 ml MeOH gelöst und mit 195 mg K_2CO_3 (1,41 mmol, 3 Äq.) versetzt. Die Reaktion wurde abgedunkelt für 18 h bei RT gerührt. Anschließend wurde ges. NH_4Cl-Lösung und dest. Wasser hinzugegeben und die organischen Lösemittel *in vacuo* entfernt. Die verbliebene wässrige Phase wurde mit MTBE extrahiert (3x), die organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels manueller Säulenchromatographie gereinigt (Hex/EtOAc: 0 % B – 0,5 % B). Es wurden 257 mg von Trien **223** (0,45 mmol, 97 %) isoliert. (WICHTIG: Das Produkt war lichtempfindlich! Die Reaktionen wurden nach Möglichkeit unter strengem Lichtausschluss durchgeführt und das Produkt in Braunglasgefäßen gelagert.)



R_f = 0,66 (Hex/EtOAc 95:5) **^{1}H-NMR** (250 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 6.19 (d, ^3J = 11.3 Hz, 1H, H-7), 5.99 (d, ^3J = 11.2 Hz, 1H, H-6), 5.15 (d, ^2J = 2.6 Hz, 1H, H-19), 4.82 (d, ^2J = 2.6 Hz, 1H, H-19), 4.34 (dd, ^3J = 6.7, 3.7 Hz, 1H, H-1), 4.17 (dt, ^3J = 7.5, 3.8 Hz, 1H, H-3), 2.95 – 2.74 (m, 1H), 2.52 – 2.30 (m, 2H), 2.28 – 2.19 (m, 1H), 2.08 – 1.95 (m, 2H, H-23 + 1H), 1.96 – 1.46 (m, 10H), 1.30 – 1.19 (m 1H), 0.84 (s, 18H, H-26/29), 0.64 (s, 3H, H-18), 0.03 (s, 12H, H-24/27), **^{13}C-NMR** (63 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 148.08 (s), 139.48 (s), 135.77 (s), 122.65 (d), 118.29 (d), 111.14 (t, C-19), 79.66 (s), 71.91 (d), 68.43 (s), 67.32 (d), 66.24 (s), 64.92 (d, C-23), 54.37 (d, C-14), 47.54 (s, C-13), 45.91 (t), 44.64 (t), 42.37 (d, C-17), 37.96 (t), 28.34 (t), 27.97 (t), 25.70 (q, C-26/29), 25.65 (q, C-26/29), 22.87 (t), 22.44 (t), 18.07 (s, C-25/28), 17.99 (s, C-25/28), 13.68 (q, C-18), -4.83 (q, C-24/27), -4.93 (q, C-24/27), -5.20 (q, C-24/27).

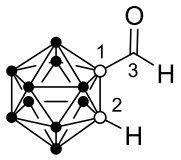
7.3.2 Synthese der Carboran-Bausteine

Synthese von *C*-Formyl-*closo*-*ortho*-1,2-Dicarbacarboran (231)



214 76 % (Flash, Lit. 95 %) **231**

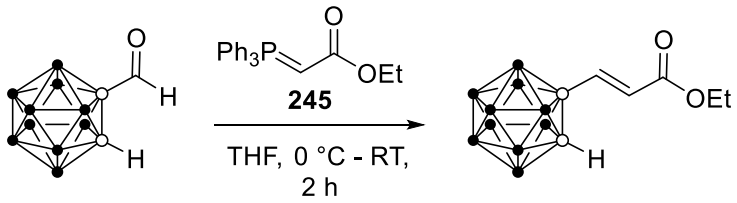
In einem Rundkolben wurden 2,015 g *closo*-*ortho*-*1,2*-Dicarbacarboran (**214**) (14 mmol) in 130 ml trockenem Et_2O (0,11 M) unter Schutzatmosphäre gelöst und auf –78 °C gekühlt. Anschließend wurden 8,84 ml (14 mmol, 1 Äq.) *n*-BuLi tropfenweise hinzugefügt und die Reaktion für 2,5 h bei –78 °C gerührt. Dann wurden 3 ml Methylformiat tropfenweise hinzugegeben und die Reaktion für weitere 1,5 h bei –78 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von HCl-Lösung (4 %) bei –78 °C beendet und anschließend auf RT erwärmt. Das organische Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt und die verbliebene wässrige Phase mit Hexan extrahiert (5x). Die organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels manueller Säulenchromatographie gereinigt (Hexan 100 %). Es wurden 1,83 g von Aldehyd **231** (10,64 mmol, 76 %) als weißer pulverförmiger Feststoff isoliert.



$C_3H_{12}B_{10}O$
172,22

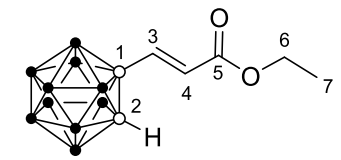
R_f = 0,1 (Hexan), Das Material wurde Prof. Sousa-Pedrares überlassen, welcher die Struktur anhand seiner eigenen Daten und der Literaturdaten bestätigte. Das Material für folgende Reaktionen wurde von seiner Arbeitsgruppe bezogen.[334]

Synthese von *C*-Ethyl-(*E*)-*closo*-*ortho*-1,2-Dicarbacarboran-But-2-enoat (246)



231 79 % (Flash) **246**

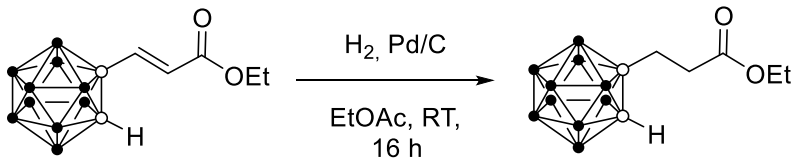
In einem Rundkolben wurden 85 mg **231** (0,5 mmol) in 5 ml THF (0,1 M) unter Schutzatmosphäre gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 209 mg **245** (0,6 mmol, 1,2 Äq.) in einer Portion hinzugefügt, die Reaktion für 10 min bei 0 °C und weitere 2 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von dest. Wasser beendet und mit Hex/EtOAc (95:5) extrahiert (4x). Die organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels manueller Säulenchromatographie gereinigt (Hex/EtOAc: 0 % B – 2 % B). Es wurden 96 mg von Ester **246** (0,395 mmol, 79 %) als weißer Feststoff isoliert.



$C_7H_{18}B_{10}O_2$
242,22

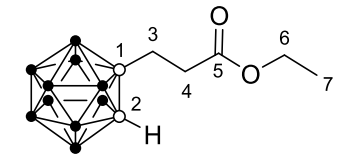
R_f = 0,21 (Hex/EtOAc 95:5) **^{1}H-NMR** (250 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 6.82 (d, ^3J = 15.5 Hz, 1H, H-3), 6.17 (d, ^3J = 15.5 Hz, 1H, H-4), 4.19 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H, H-6), 3.69 (s, 1H, H-2), 3.37 – 1.44 (m, 9H, BH), 1.27 (t, ^3J = 7.1 Hz, 4H, H-7 + BH), **^{13}C-NMR** (63 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 164.16 (s, C-5), 139.01 (d, C-3), 127.66 (d, C-2), 70.87 (s, C-1), 61.36 (t, C-6), 59.69 (d, C-2), 13.94 (q, C-7).

Synthese von *C*-Ethyl-*closo*-*ortho*-1,2-Dicarbacarboran-Butanoat (247)



246 98 % **247**

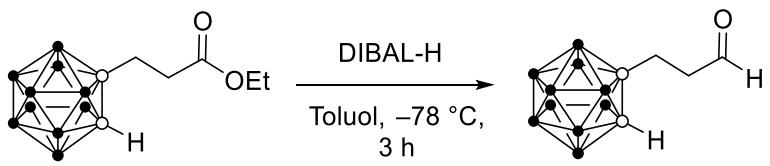
In einem Rundkolben wurden 285 mg **246** (1,17 mmol) in 11 ml EtOAc (0,1 M) gelöst und mit 56 mg Pd/C (10 %) versetzt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß entgast und zuerst mit Ar-Atmosphäre zurückgeflutet (1x) und anschließend mit H_2-Atmosphäre (3x). Die Reaktion wurde für 16 h bei RT unter H_2-Atmosphäre gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung über ein Celitebett filtriert und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wies eine ausreichend hohe Reinheit auf und konnte ohne weitere Reinigung eingesetzt werden. Es wurden 281 mg von Ester **247** (1,15 mmol, 98 %) als weißer Feststoff isoliert.



$C_7H_{20}B_{10}O_2$
244,22

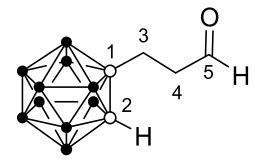
R_f = 0,12 (Hex/EtOAc 95:5) **^{1}H-NMR** (250 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 4.10 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H, H-6), 3.72 (s, 1H, H-2), 3.34 – 2.61 (m, 3H, BH), 2.59 – 2.37 (m, 5H, H-3, H-4 + BH), 2.30 – 1.29 (m, 5H), 1.22 (t, ^3J = 7.1 Hz, 4H, H-7 + BH), **^{13}C-NMR** (63 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 171.23 (s, C-5), 73.95 (s, C-1), 61.43 (d, C-2), 61.09 (t, C-6), 33.30 (t, C-3/4), 32.44 (t, C-3/4), 13.94 (q, C-7).

Synthese von *C*-*closo*-*ortho*-1,2-Dicarbacarboran-3-Propanal (248)



247 83 % (Flash) **248**

In einem Rundkolben wurden 280 mg **247** (1,15 mmol) in 10 ml Toluol (0,1 M) unter Schutzatmosphäre gelöst und auf –78 °C gekühlt. Anschließend wurden 1,5 ml DIBAL-H (0,85 M in Toluol, 1,28 mmol, 1,1 Äq.) tropfenweise hinzugegeben und für 10 min bei –78 °C gerührt. Im Anschluss wurde das Kühlbad entfernt und die Reaktion für 3 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ges. NaCl-Lösung beendet und mit MTBE extrahiert (3x). Die organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels manueller Säulenchromatographie gereinigt (Hex/EtOAc: 5 % B – 7 % B). Es wurden 190 mg von Aldehyd **248** (0,95 mmol, 83 %) als weißer Feststoff isoliert.

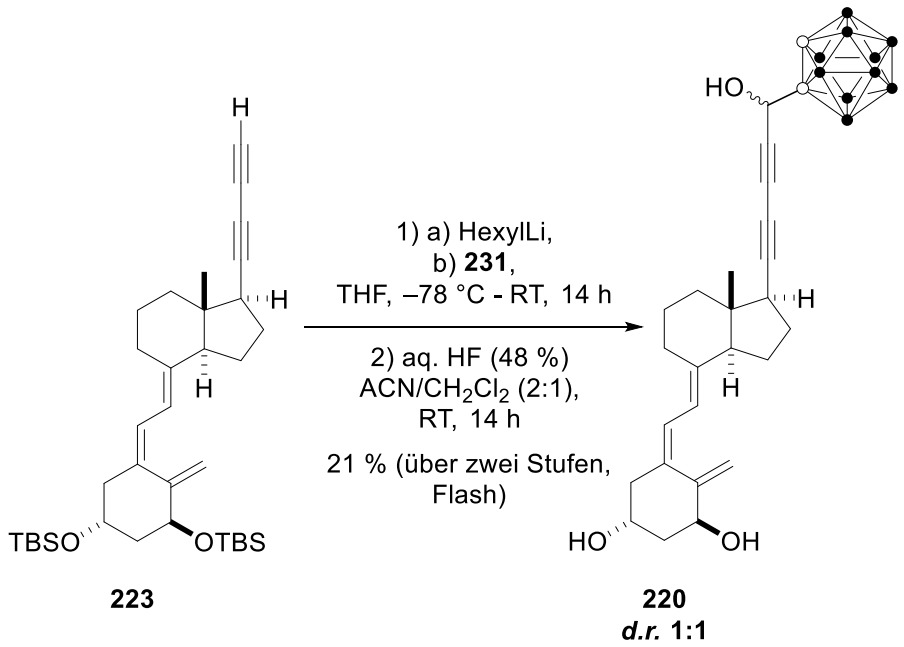


$C_5H_{16}B_{10}O$
200,22

R_f = 0,33 (Hex/EtOAc 80:20) **^{1}H-NMR** (250 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 9.71 (s, 1H, H-5), 3.67 (s, 1H, H-2), 3.50 – 2.85 (m, 2H, BH), 2.72 (q, J = 6.7 Hz, 2H, H-4), 2.54 (t, ^3J = 7.0 Hz, 3H, H-3 + BH), 2.43 – 0.79 (m, 7H, BH), **^{13}C-NMR** (63 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 198.59 (d, C-5), 73.79 (s, C-1), 61.58 (d, C-2), 42.82 (t, C-4), 29.86 (t, C-3).

7.3.3 Synthese der Carboran-haltigen Derivate

Synthese von Verbindung 220 (24*R* und 24*S*)

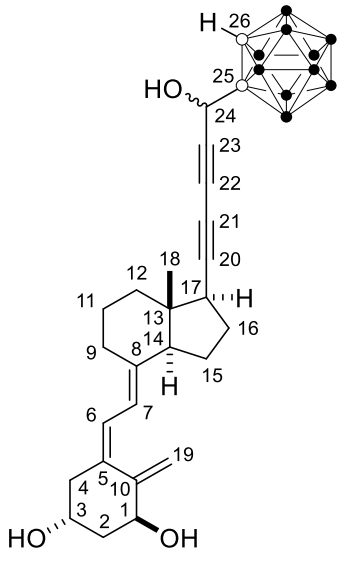


223 **220**
***d.r.* 1:1**

In einem Braunglasrundkolben wurden 253 mg **223** (0,45 mmol) in 4,5 ml THF unter Schutzatmosphäre gelöst und auf –78 °C gekühlt. Anschließend wurden 265 µl Hexyllithium (1,7 M in THF, 0,45 mmol, 1 Äq.) tropfenweise hinzugefügt. Die Reaktion wurde für 1 h bei –78 °C gerührt, dann wurden 93 mg *C*-Formyl-*closo*-*ortho*-1,2-Dicarbacarboran (**231**) (0,54 mmol, 1,2 Äq.) gelöst in 4 ml THF *via* Spritzenpumpe über einen Zeitraum von 10 min hinzugefügt. Die Reaktion wurde für 1 h bei –78 °C gerührt, auf RT erwärmt und für weitere 14 h gerührt. Nach der Zugabe von ges. NaCl-Lösung wurde die Reaktion mit MTBE extrahiert (3x), die organischen Phasen wurden mit ges. NH_4Cl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels manueller Säulenchromatographie gereinigt (Hex/EtOAc: 0 % B – 5 % B). Es wurden 100 mg von Alkohol **254** (0,136 mmol, 30 %) isoliert, welches unmittelbar in der Folgereaktion eingesetzt wurde.

Dazu wurden 100 mg **254** (0,136 mmol) in 3 ml ACN und 1,5 ml CH_2Cl_2 in einem PE-Reaktionsgefäß gelöst und mit 0,5 ml HF-Lösung (48 %) versetzt. Die Reaktion wurde für 14 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktion vorsichtig auf 150 ml $NaHCO_3$-Lösung in einem Erlenmeyerkolben gegeben und abgedunkelt für 2 h bei RT gerührt. Die wässrige Phase wurde im Anschluss mit CH_2Cl_2 extrahiert (4x), die organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels manueller

Säulenchromatographie gereinigt (Hex/EtOAc: 40 % B – 50 % B). Es wurden 48 mg von **220** (0,092 mmol, 71 %, beide Epimere zusammen) als weißer schaumartiger Feststoff erhalten. Die kombinierte Ausbeute betrug 21 %.



$C_{26}B_{10}H_{40}O_3$
510,22

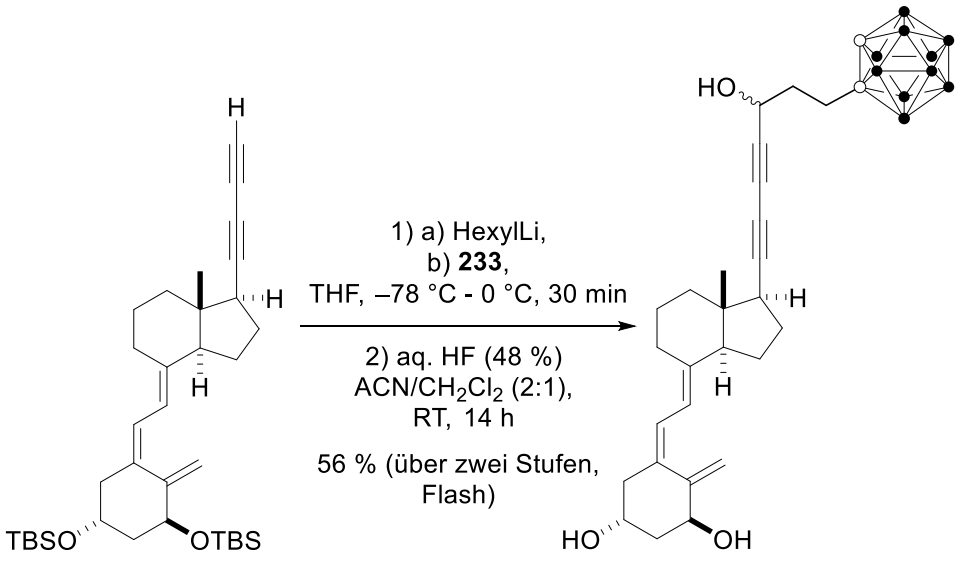
R_f = 0,3 (Hex/EtOAc 30:70)

Das erhaltene Diastereomerengemisch wurde anschließend mittels chiraler präparativer HPLC getrennt (Säule: CHIRALPAK IA, *n*-Heptan/*i*-PrOH: 5 % B - 40 % B). Es wurden jeweils 11 mg der reinen Enantiomere erhalten. (WICHTIG: Das Produkt war lichtempfindlich! Die Reaktionen wurden nach Möglichkeit unter strengem Lichtausschluss durchgeführt und das Produkt in Braunglasgefäßen gelagert.)

Epimer 1: **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{26}H_{41}O_3{}^{11}B_{10}{}^+$): 511,39807, gef.: 511,39605, ber. für $[M-H]^-$ ($C_{26}H_{39}O_3{}^{11}B_{10}{}^-$): 509,38352, gef.: 509,38384, **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 6.36 (d, ^3J = 11.2 Hz, 1H, H-7), 6.02 (d, ^3J = 11.2 Hz, 1H, H-6), 5.33 (t, ^2J = 1.7 Hz, 1H, H-19), 4.99 (t, ^2J = 1.6 Hz, 1H, H-19), 4.95 (s, 1H, H-24), 4.44 (dd, ^3J = 8.0, 4.3 Hz, 1H, H-1), 4.24 (tt, ^3J = 6.8, 3.7 Hz, 1H, H-3), 4.11 – 4.01 (m, 1H, H-26), 3.25 – 2.92 (m, 1H, BH), 2.91– 2.55 (m, 5H), 2.46 (t, ^3J = 9.3 Hz, 2H, H-17, BH), 2.32 (dd, ^2J = 13.5 Hz, ^3J = 6.5 Hz, 2H), 2.16 – 2.00 (m, 5H), 2.00 – 1.87 (m, 5H), 1.82 – 1.50 (m, 10H), 1.25 – 1.18 (m, 1H), 0.68 (s, 3H, H-18). **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 147.46 (s), 141.50 (s), 133.93 (s), 124.57 (d, C-7), 117.73 (d, C-6), 111.96 (t, C-19), 86.28 (s), 75.87 (s, C-25), 74.36 (s), 70.79 (d, C-1), 70.45 (s), 66.87 (d, C-3), 65.21 (s), 64.61 (d, C-24), 59.09 (d, C-26), 54.54 (d, C-14), 47.92 (s, C-13), 45.13 (t), 42.79 (t), 42.75 (d, C-17), 37.97 (t), 28.65 (t), 28.03 (t), 23.06 (t), 22.73 (t), 13.93 (q, C-18).

Epimer 2: **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{26}H_{41}O_3{}^{11}B_{10}{}^+$): 511,39807, gef.: 511,39510, ber. für $[M-H]^-$ ($C_{26}H_{39}O_3{}^{11}B_{10}{}^-$): 509,38352, gef.: 509,38382, **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 6.36 (d, ^3J = 11.2 Hz, 1H, H-7), 6.02 (d, ^3J = 11.2 Hz, 1H, H-6), 5.33 (t, ^2J = 1.7 Hz, 1H, H-19), 4.99 (t, ^2J = 1.6 Hz, 1H, H-19), 4.95 (s, 1H, H-24), 4.44 (dd, ^3J = 8.0, 4.3 Hz, 1H, H-1), 4.24 (tt, ^3J = 6.8, 3.7 Hz, 1H, H-3), 4.11 – 4.01 (m, 1H, H-26), 3.25 – 2.92 (m, 1H, BH), 2.91 –2.55 (m, 5H), 2.46 (t, ^3J = 9.3 Hz, 2H, H-17, BH), 2.32 (dd, ^2J = 13.5 Hz, ^3J = 6.5 Hz, 2H), 2.19 – 1.99 (m, 5H), 1.98 – 1.85 (m, 5H), 1.82 – 1.50 (m, 10H), 1.25 – 1.18 (m, 1H), 0.68 (s, 3H, H-18). **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 147.46 (s), 141.49 (s), 133.93 (s), 124.58 (d, C-7), 117.73 (d, C-6), 111.95 (t, C-19), 86.32 (s), 75.87 (s, C-25), 74.40 (s), 70.78 (d, C-1), 70.40 (s), 66.88 (d, C-3), 65.20 (s), 64.63 (d, C-24), 59.08 (d, C-26), 54.54 (d, C-14), 47.92 (s, C-13), 45.13 (t), 42.78 (t), 42.75 (d, C-17), 37.98 (t), 28.65 (t), 28.03 (t), 23.06 (t), 22.73 (t), 13.93 (q, C-18).

Synthese von Verbindung 222 (24*R* und 24*S*)

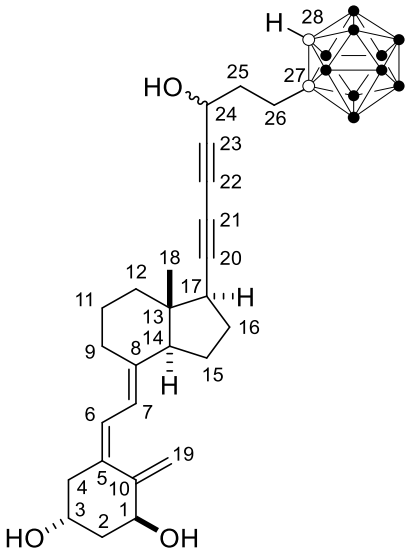


223 → **222** ***d.r.* 1:1**

In einem Braunglasrundkolben wurden 222 mg **223** (0,39 mmol) in 4 ml THF unter Schutzatmosphäre gelöst und auf –78 °C gekühlt. Anschließend wurden 230 µl Hexyllithium (1,7 M in THF, 0,39 mmol, 1 Äq.) tropfenweise hinzugefügt. Die Reaktion wurde für 1 h bei –78 °C gerührt, dann wurden 117 mg *C-closo-ortho*-1,2-Dicarbacarboran-3-Propanal (**233**) (0,59 mmol, 1,5 Äq.) gelöst in 3 ml THF tropfenweise hinzugefügt. Die Reaktion wurde für 10 h bei –78 °C gerührt, auf RT erwärmt und für weitere 30 gerührt. Nach der Zugabe von ges. NaCl-Lösung wurde die Reaktion mit MTBE extrahiert (3x), die organischen Phasen wurden

mit ges. NH_4Cl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels manueller Säulenchromatographie gereinigt (Hex/EtOAc: 0 % B – 5 % B). Es wurden 230 mg **254** + *C-closo-ortho*-1,2-Dicarbacarboran-3-Propanal (**233**) isoliert. Das Produktgemsich wurde in der Folgereaktion eingesetzt.

Dazu wurden 230 mg des Produktgemischs in 8 ml ACN und 4 ml CH_2Cl_2 in einem PE-Reaktionsgefäß gelöst und mit 1 ml HF-Lösung (48 %) versetzt. Die Reaktion wurde für 14 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktion vorsichtig auf 200 ml $NaHCO_3$-Lösung in einem Erlenmeyerkolben gegeben und abgedunkelt für 2 h bei RT gerührt. Die wässrige Phase wurde im Anschluss mit CH_2Cl_2 extrahiert (4x), die organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels manueller Säulenchromatographie gereinigt (Hex/EtOAc: 40 % B – 50 % B). Es wurden 120 mg von **222** (0,22 mmol, beide Epimere zusammen) als weißer schaumartiger Feststoff erhalten. Die kombinierte Ausbeute betrug 56 %.



$C_{28}B_{10}H_{44}O_3$
538,22

R_f = 0,42 (Hex/EtOAc 30:70)

Das erhaltene Diastereomerengemisch wurde anschließend mittels chiraler präparativer HPLC getrennt (Säule: CHIRALPAK IJ, Wasser/ACN: 60 % B - 80 % B). Es wurden jeweils 17 mg der reinen Enantiomere erhalten. (WICHTIG: Das Produkt war lichtempfindlich! Die Reaktionen wurden nach Möglichkeit unter strengem Lichtausschluss durchgeführt und das Produkt in Braunglasgefäßen gelagert.)

Epimer 1: **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+H]^+$ ($C_{28}H_{45}O_3{}^{11}B_{10}{}^+$): 539,42937, gef.: 539,42847, ber. für $[M-H]^-$ ($C_{28}H_{43}O_3{}^{11}B_{10}{}^-$): 537,41482, gef.: 537,41308, **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 6.36 (d, ^3J = 11.2 Hz, 1H, H-7), 6.02 (d, ^3J = 11.2 Hz, 1H, H-6), 5.33 (t, ^2J = 1.8 Hz, 1H, H-19), 4.99 (t, ^2J = 1.6 Hz, 1H, H-19), 4.49 – 4.40 (m, 2H, H-1, H-24), 4.30 – 4.20 (m, 1H, H-3), 3.59 (s, 1H, H-28), 2.92 –2.55 (m, 4H), 2.56 – 2.27 (m, 6H), 2.26 – 2.16 (m, 1H), 2.15 – 2.00 (m, 4H), 1.99 – 1.81 (m, 8H), 1.81 – 1.46 (m, 10H), 1.23 – 1.20 (m, 1H), 0.67 (s, 3H, H-18), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 147.60 (s), 141.61 (s), 133.93 (s), 124.58 (d, C-7), 117.67 (d, C-6), 111.88 (t, -19), 84.05 (s), 74.96 (s), 71.23 (s), 70.80 (d, C-1), 66.85 (d, C-3), 65.72 (s), 61.60 (d, C-28), 61.32 (d, C-24), 54.52 (d, C-14), 47.83 (s, C-13), 45.23 (t), 42.88 (t), 42.77 (d, C-17), 38.00 (t), 36.46 (t, C-25), 33.42 (t, C-26), 28.69 (t), 28.11 (t), 23.10 (t), 22.71 (t), 13.90 (q, C-18).

Epmier 2: **HR-MS** (ESI): m/z = ber. für $[M+Na]^+$ ($C_{28}H_{45}O_3{}^{11}B_{10}Na^+$): 561,41132, gef.: 561,40788, ber. für $[M-H]^-$ ($C_{28}H_{43}O_3{}^{11}B_{10}{}^-$): 537,41482, gef.: 537,41034, **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 6.36 (d, ^3J = 11.2 Hz, 1H, H-7), 6.02 (d, ^3J = 11.2 Hz, 1H, H-6), 5.33 (t, ^2J = 1.8 Hz, 1H, H-19), 4.99 (t, ^2J = 1.6 Hz, 1H, H-19), 4.49 – 4.40 (m, 2H, H-1, H-24), 4.30 – 4.20 (m, 1H, H-3), 3.59 (s, 1H, H-28), 2.92 –2.55 (m, 4H), 2.56 – 2.27 (m, 6H), 2.26 – 2.16 (m, 1H), 2.15 – 2.00 (m, 4H), 1.99 – 1.81 (m, 8H), 1.81 – 1.46 (m, 10H), 1.23 – 1.20 (m, 1H), 0.67 (s, 3H, H-18), **^{13}C-NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 147.60 (s), 141.61 (s), 133.94 (s), 124.58 (d, C-7), 117.67 (d, C-6), 111.88 (t, -19), 84.05 (s), 74.96 (s), 71.23 (s), 70.80 (d, C-1), 66.84 (d, C-3), 65.72 (s), 62.06 (d, C-28), 61.32 (d, C-24), 54.52 (d, C-14), 47.83 (s, C-13), 45.23 (t), 42.88 (t), 42.78 (d, C-17), 38.00 (t), 36.46 (t, C-25), 33.41 (t, C-26), 28.69 (t), 28.11 (t), 23.09 (t), 22.71 (t), 13.90 (q, C-18).

Synthese der Mosher-Ester

Die Synthese der Mosher-Ester wurde an Hoye *et al.* angelehnt.[342]

In einem Braunglas-GC-Vial wurden ~0,5 mg der jeweiligen Substanz in $CHCl_3$ gelöst, mit 10 µl Pyridin und 20 µl des jeweiligen Mosher-Säurechlorids unter Schutzgas versetzt. Nach 3 h wurde die Reaktion durch Zugabe von dest. Wasser und NaCl-Lösung beendet und die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert (3x). Die organischen Phasen wurden mit ges. $NaHCO_3$-Lösung und ges. NH_4Cl-Lösung gewaschen und das Lösemittel *in vacuo* entfernt.

Für beide Derivate konnte jeweils nur ein Epimer vollständig in den Mosher-Ester überführt werden. Die erhaltenen Rohprodukte wurden anschließend im NMR charakterisiert.

8 ANHANG

8.1 ^{1}H und ^{13}C NMR-Spektren „Myostatin-Projekt“

8.1.1 IMB0901-Projekt

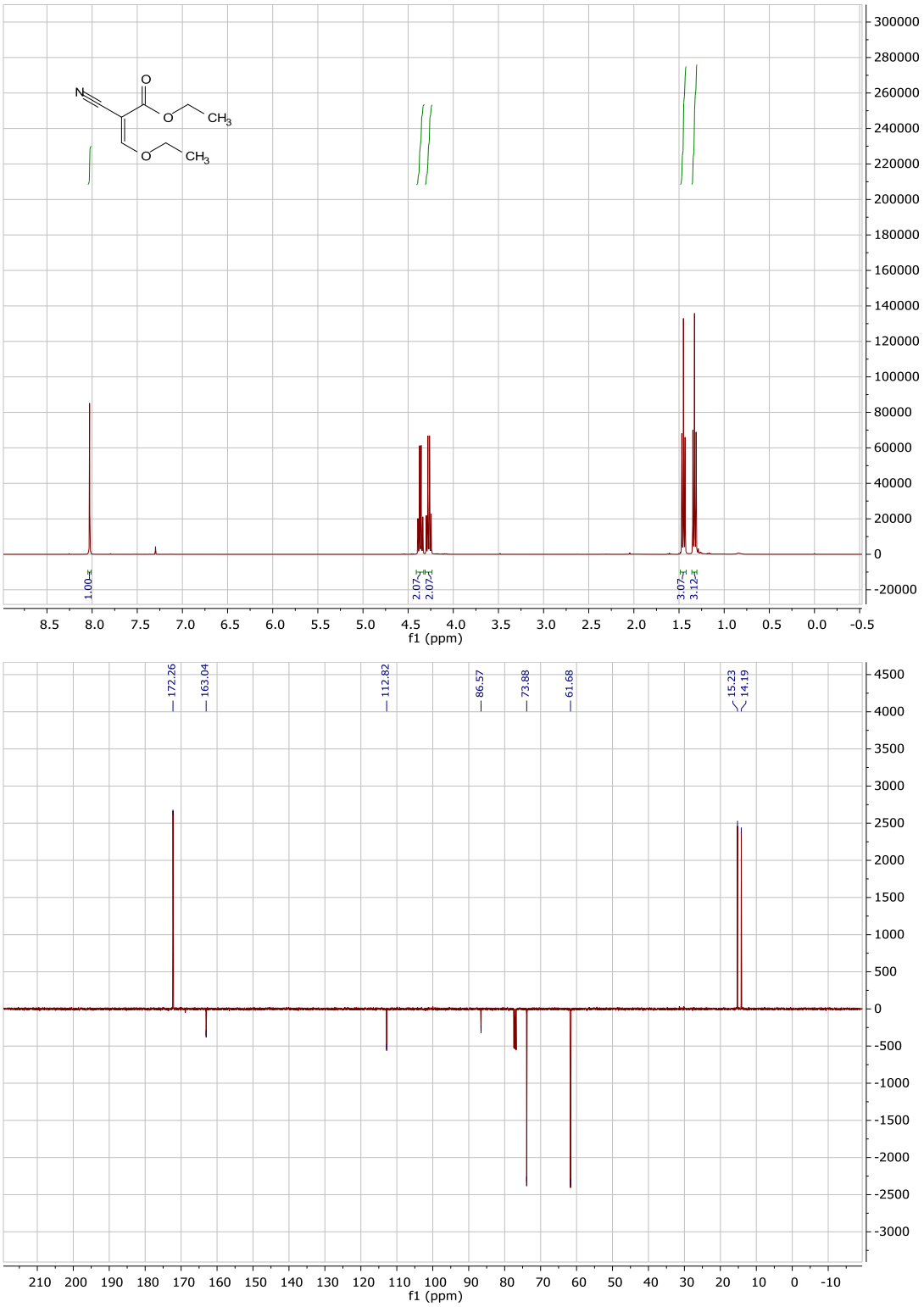


*Abbildung 103: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **18**.*

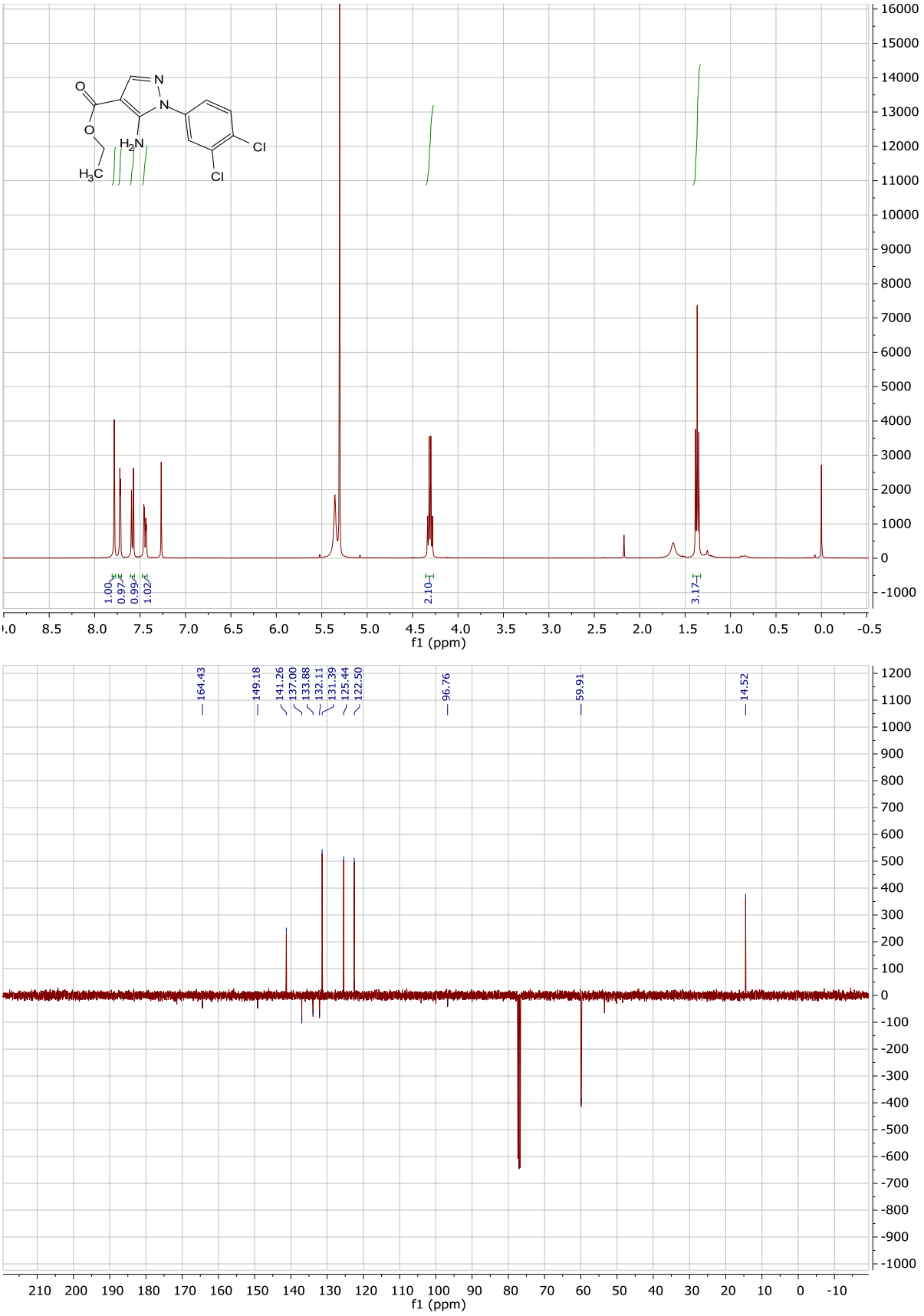


*Abbildung 104: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **19**.*

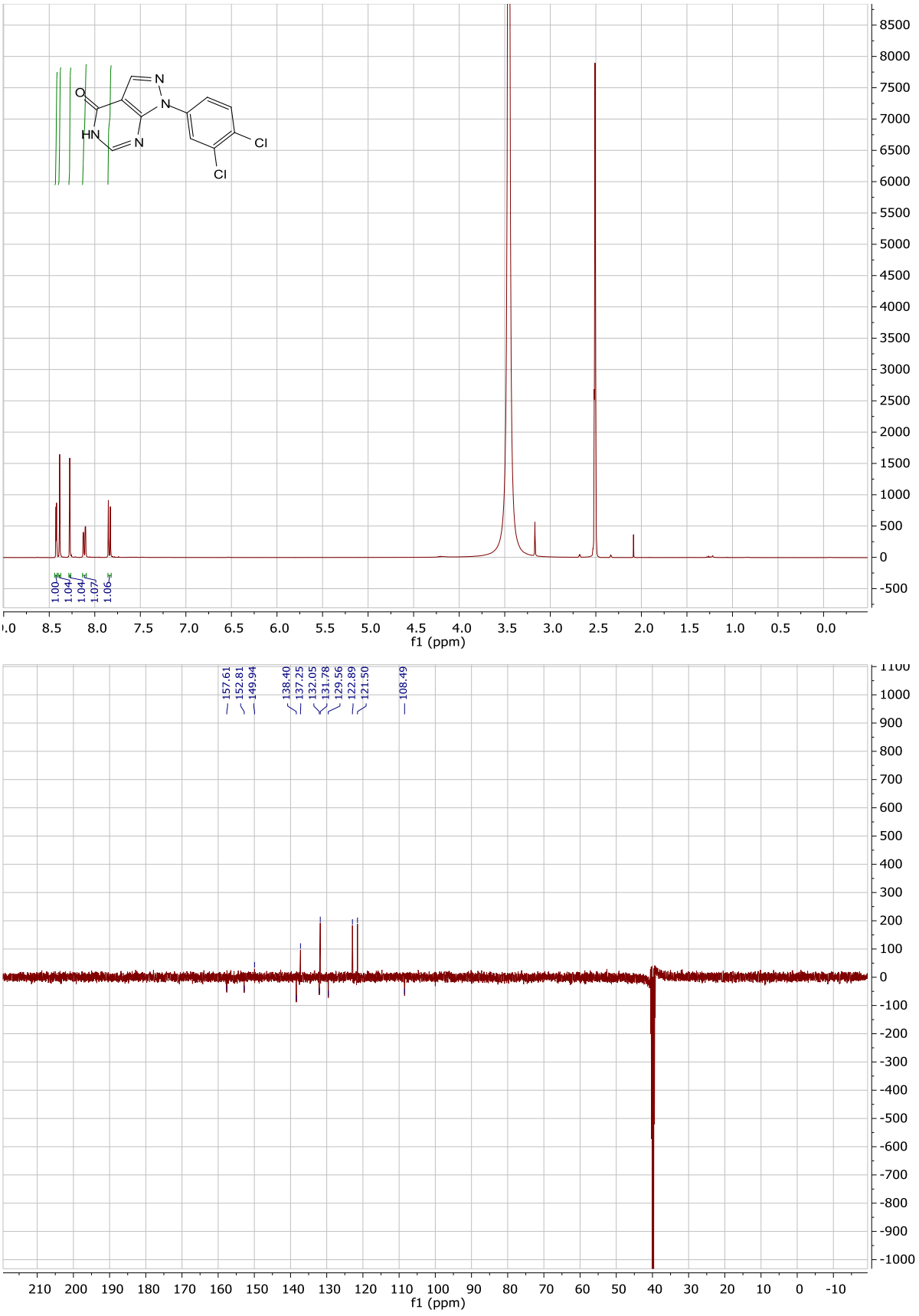


*Abbildung 105: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **22**.*

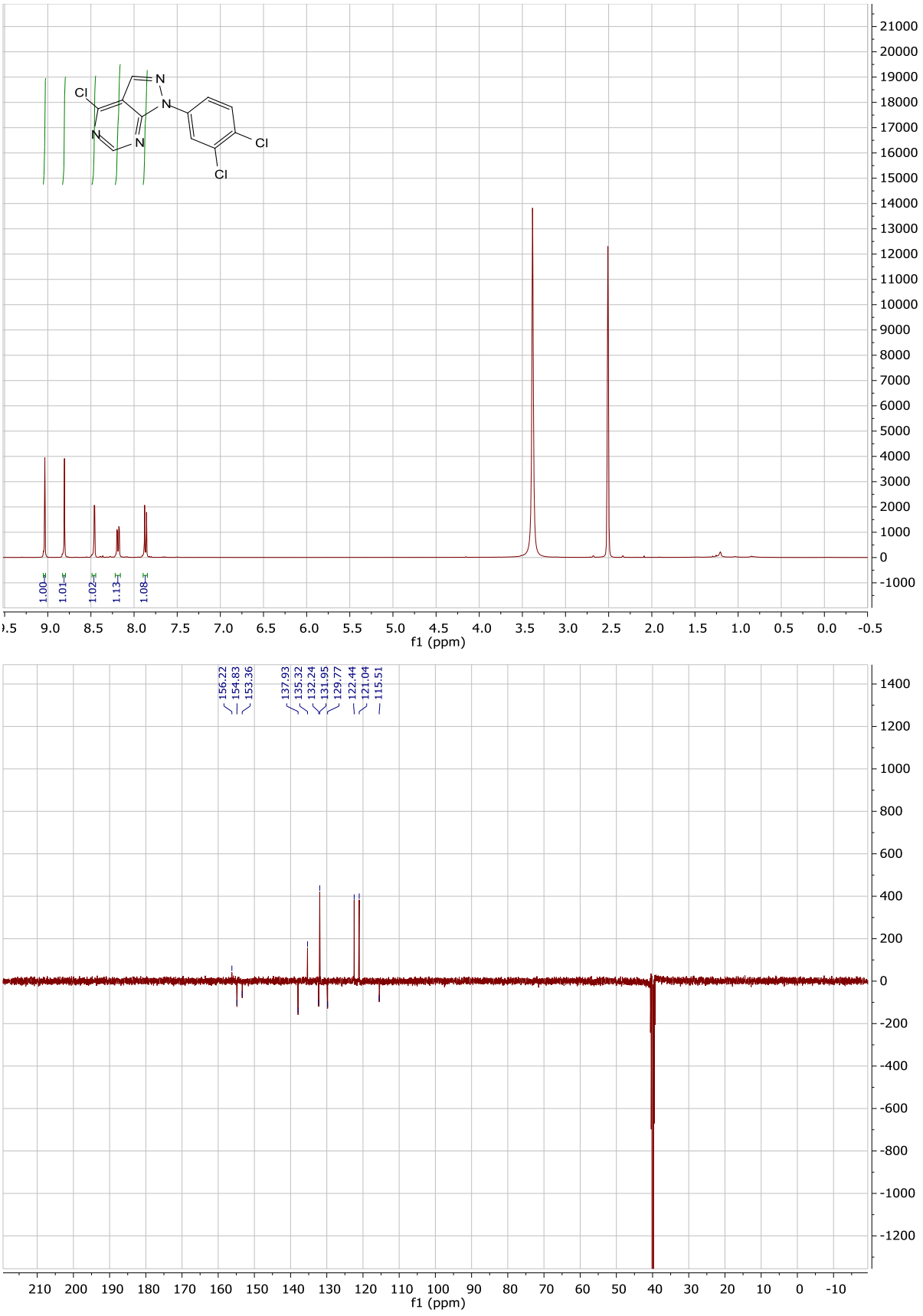


*Abbildung 106: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **23**.*

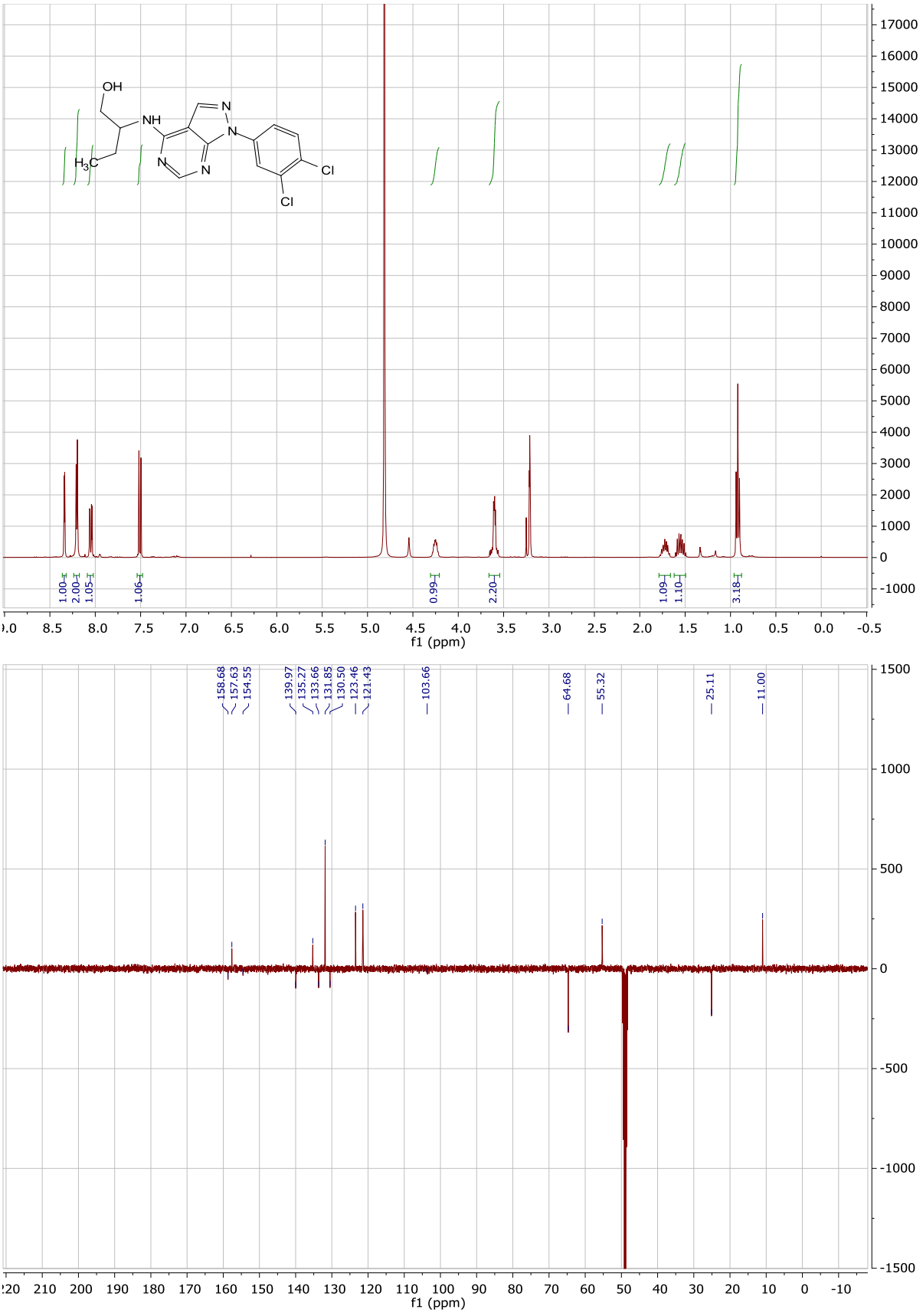


*Abbildung 107: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **rac-8** (IMB0901).*

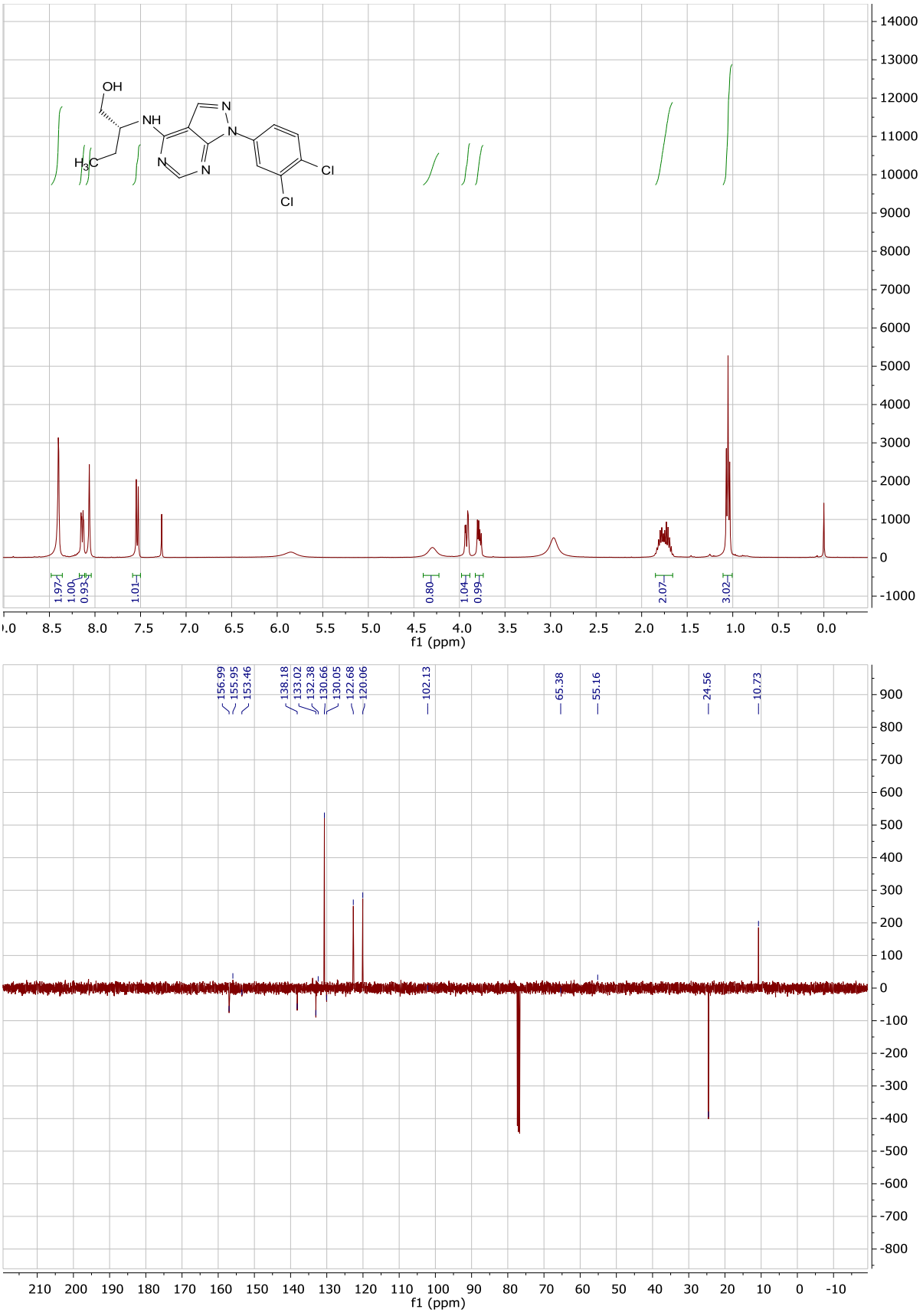


*Abbildung 108: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **(R)-8**.*

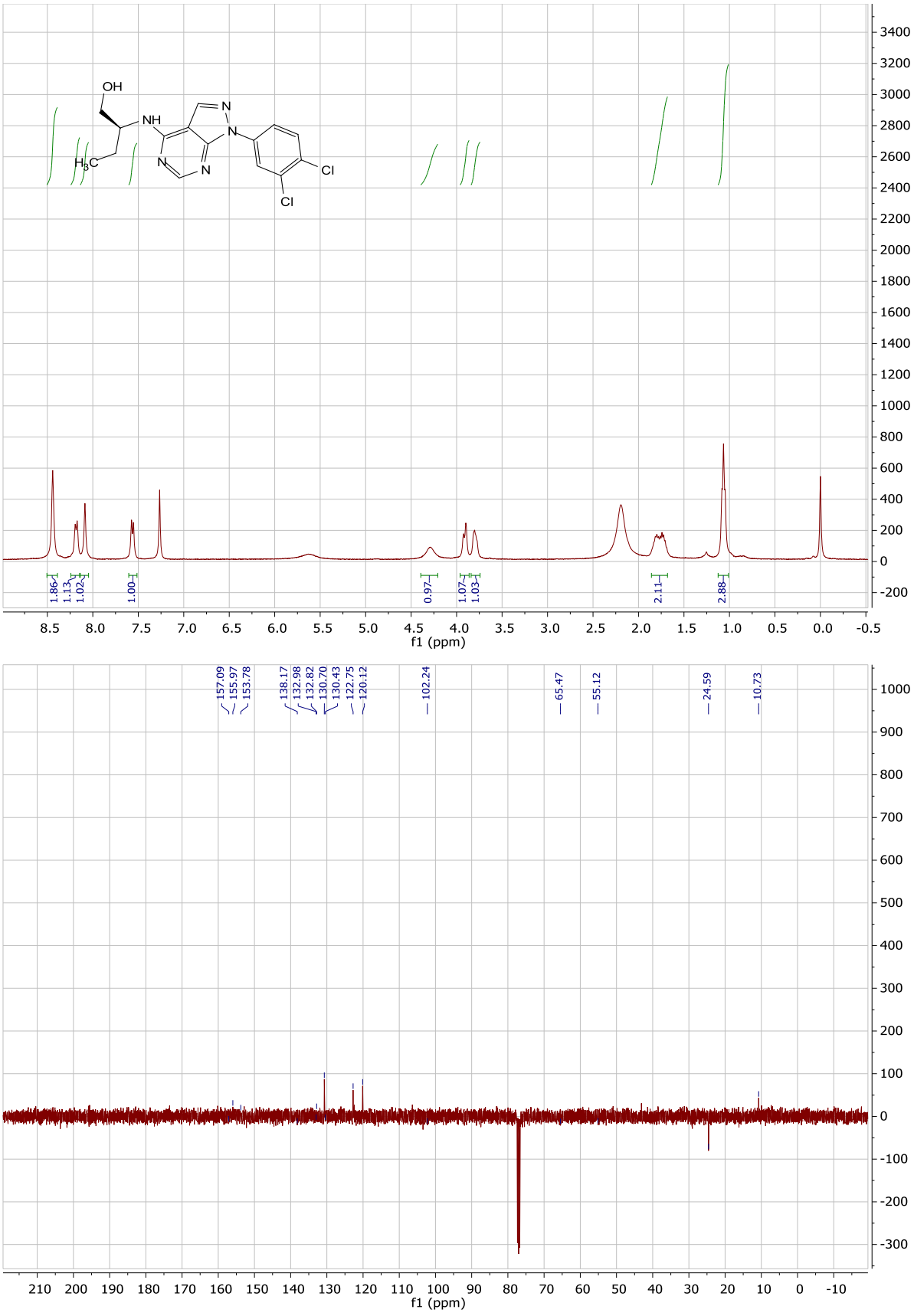


*Abbildung 109: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **(S)-8**.*

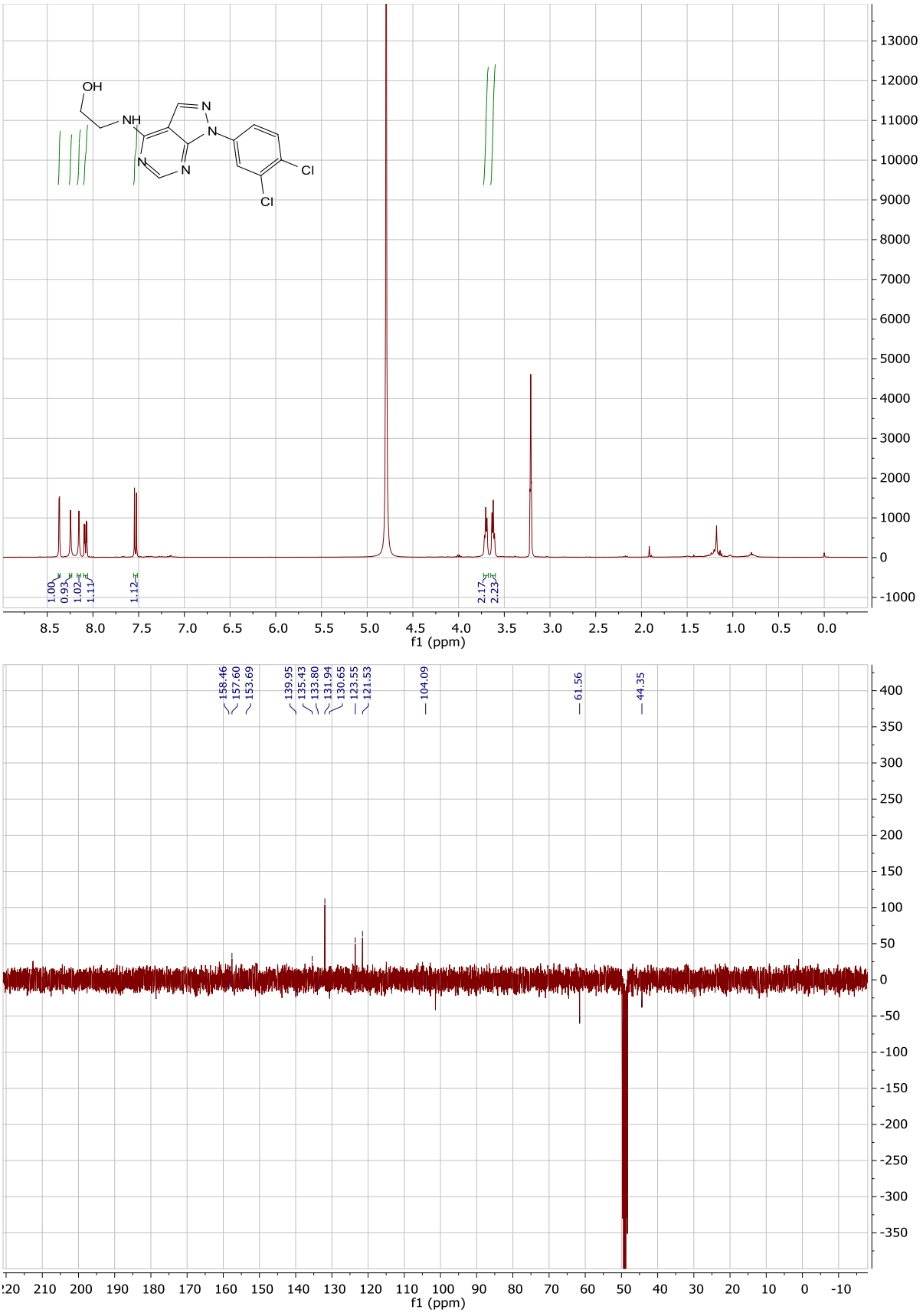


*Abbildung 110: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **24**.*

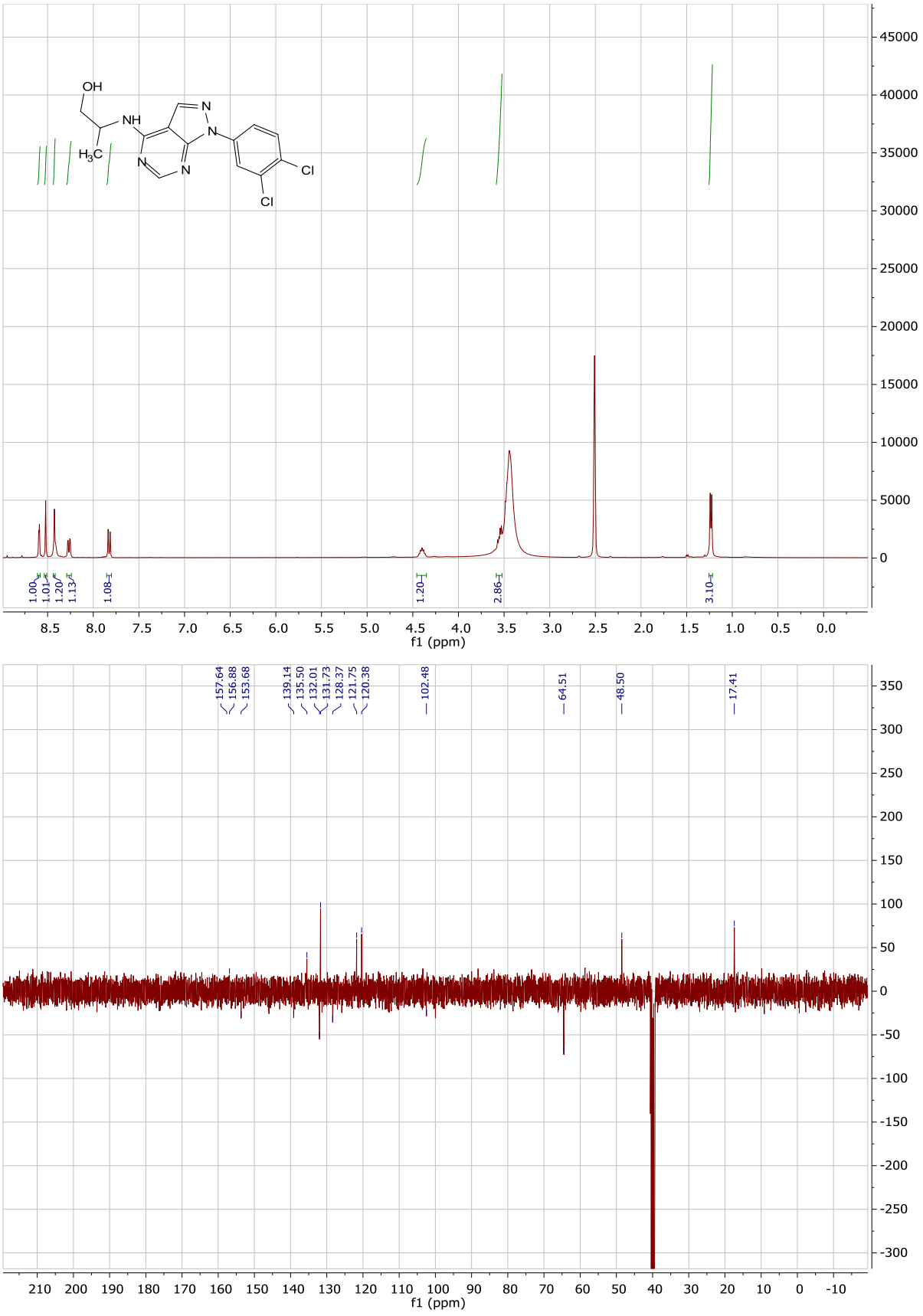


*Abbildung 111: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **rac-25**.*

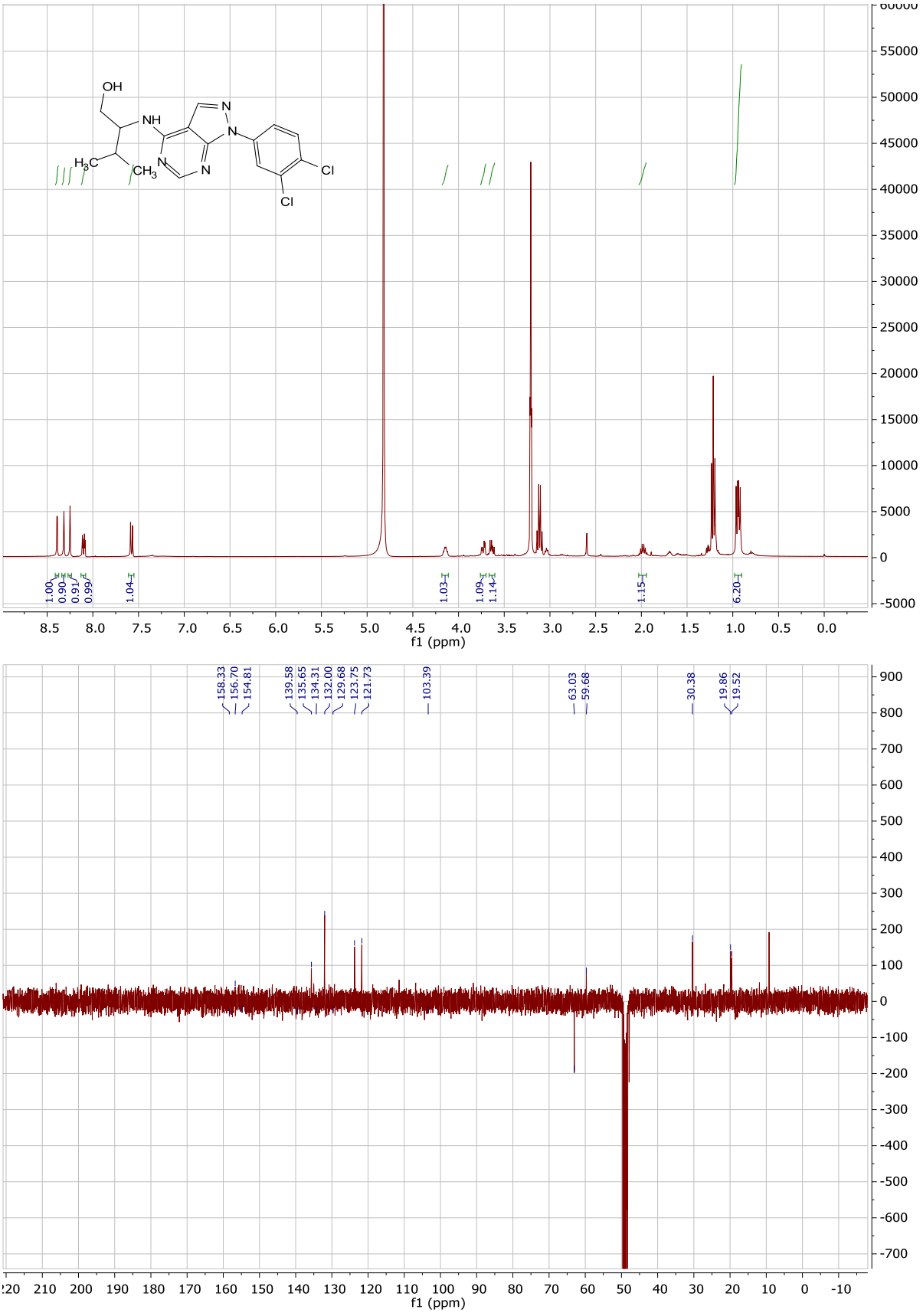


*Abbildung 112: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **rac-26**.*

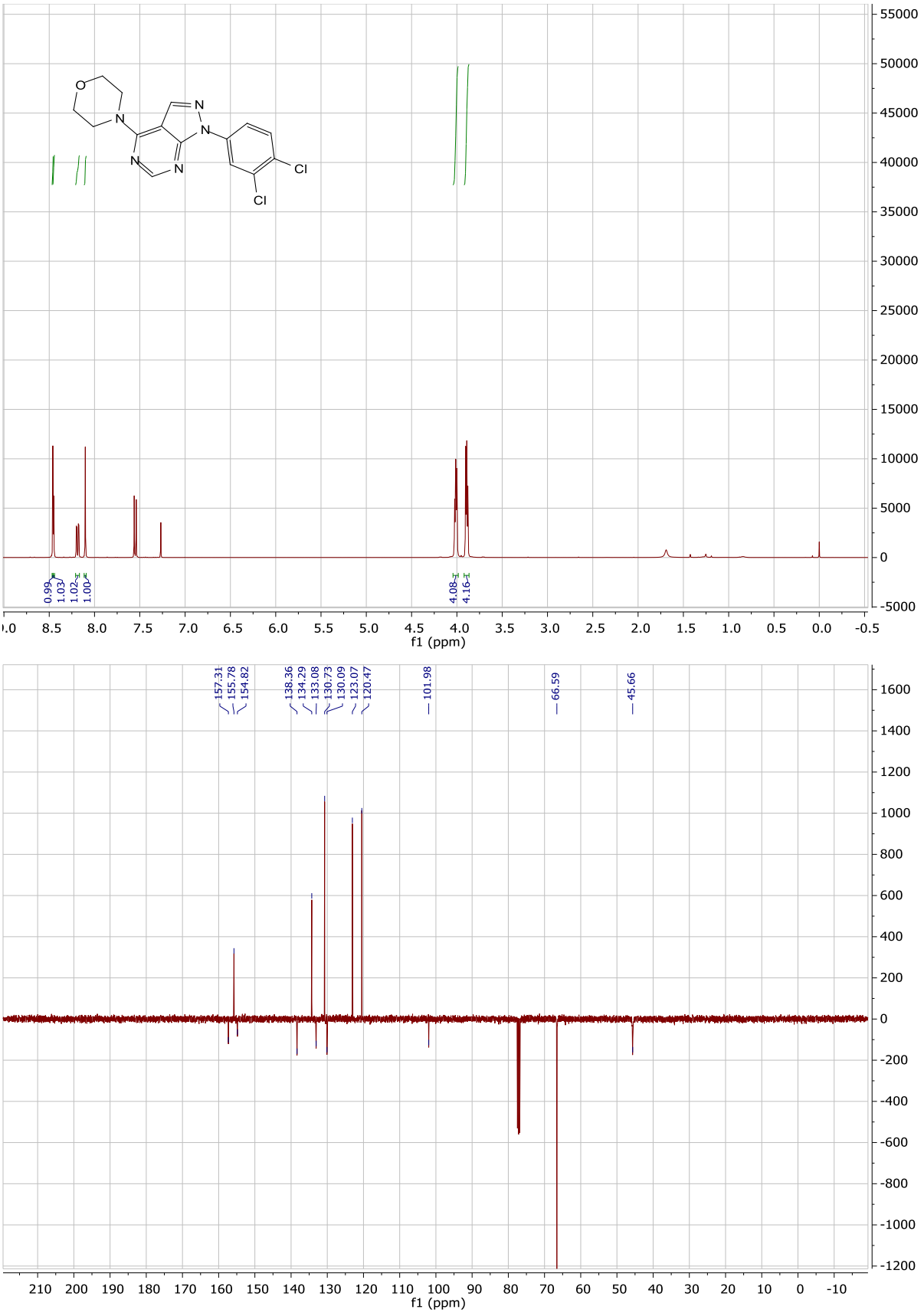


*Abbildung 113: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **27**.*

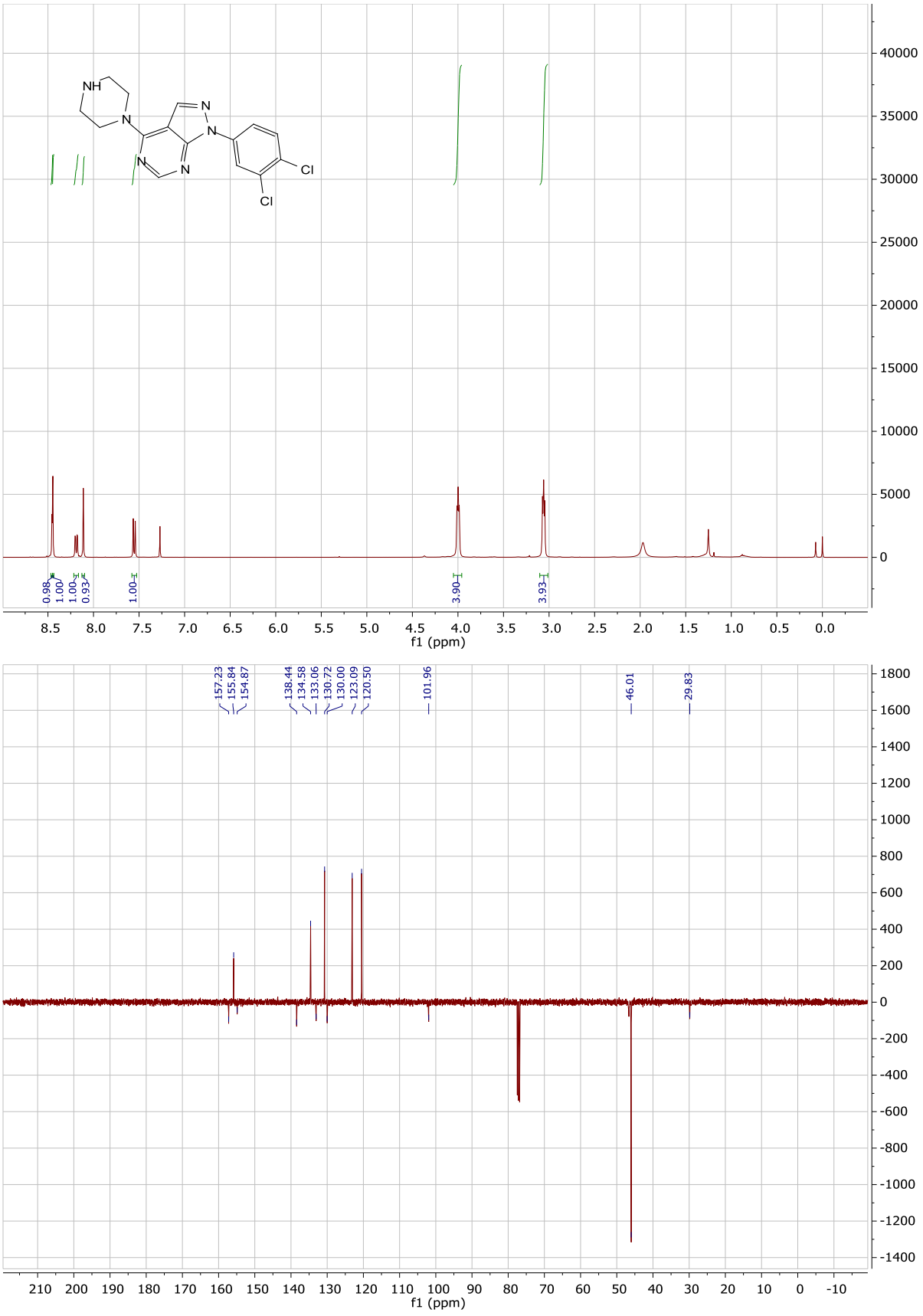


*Abbildung 114: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **28**.*

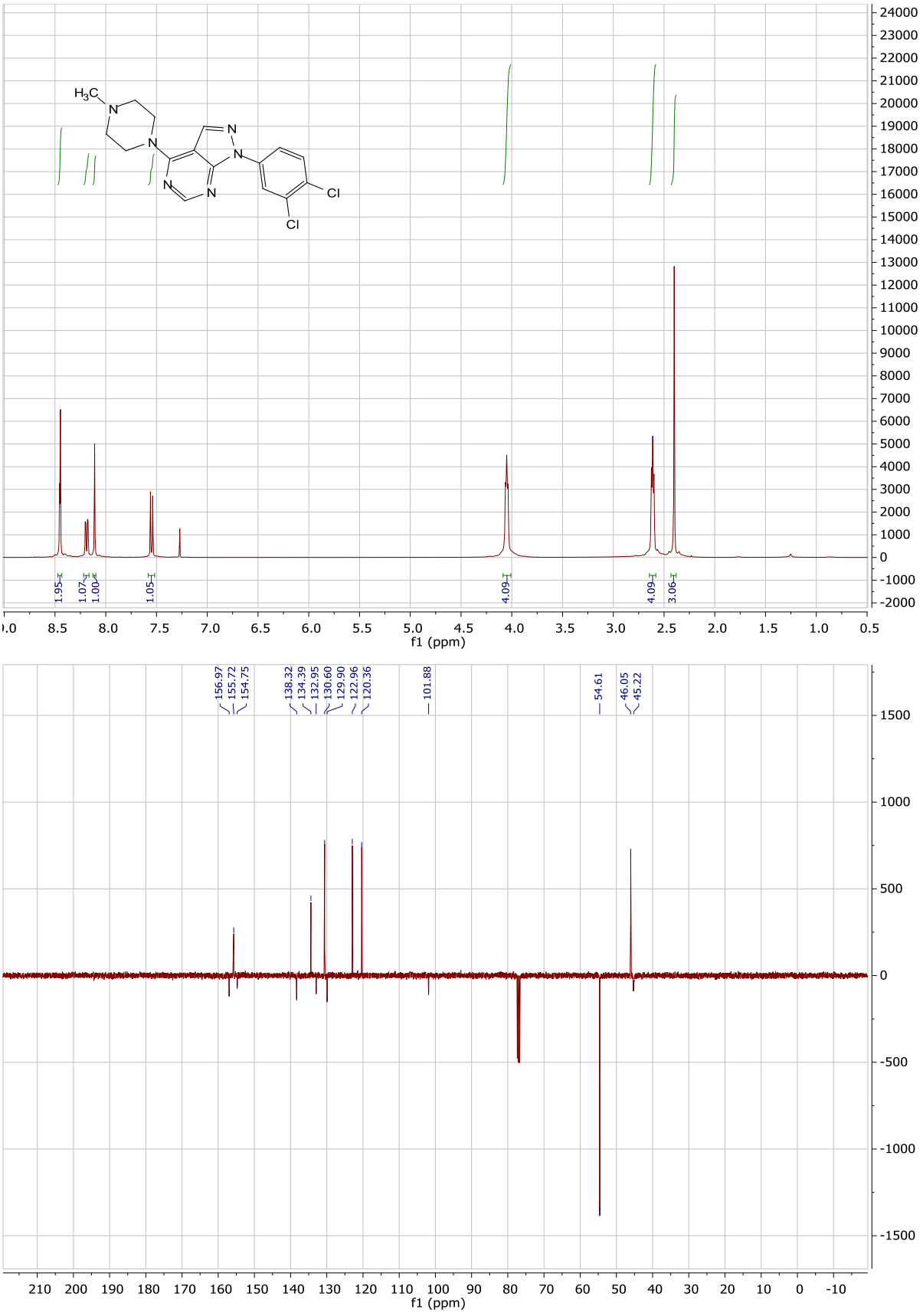


*Abbildung 115: [1]H- und [13]C-Spektrum von **29**.*

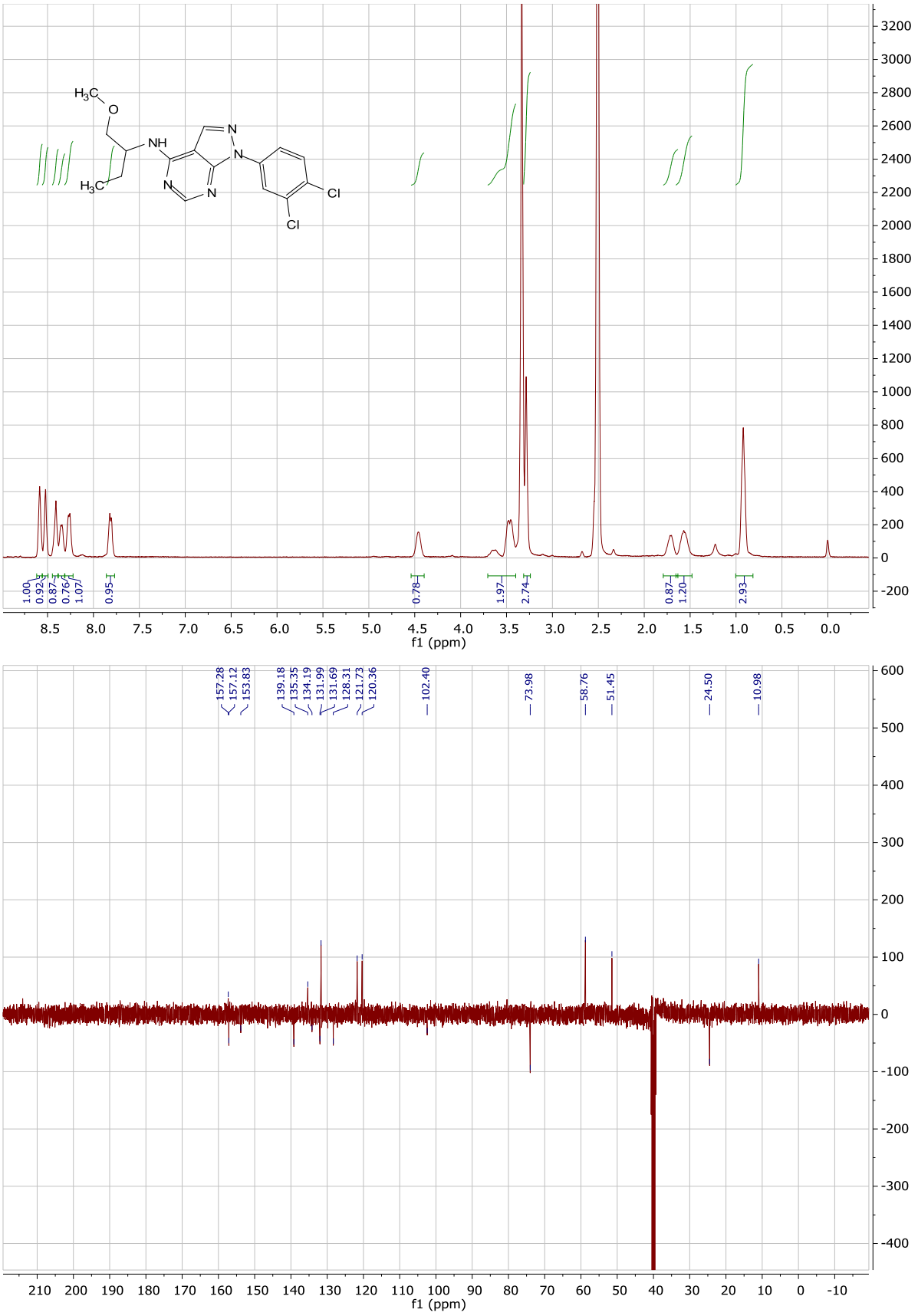


*Abbildung 116: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **rac-50**.*

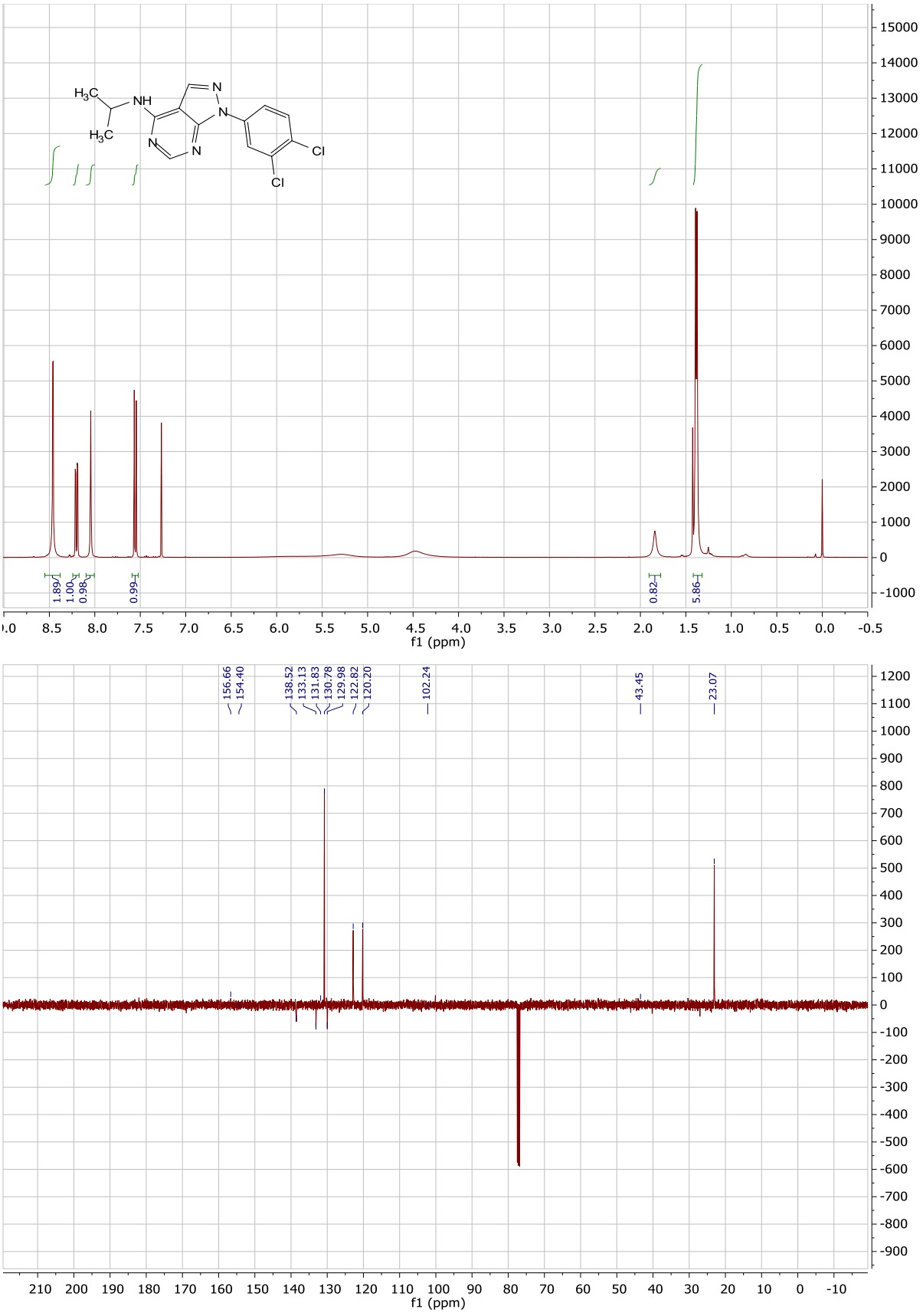


*Abbildung 117: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **51**.*

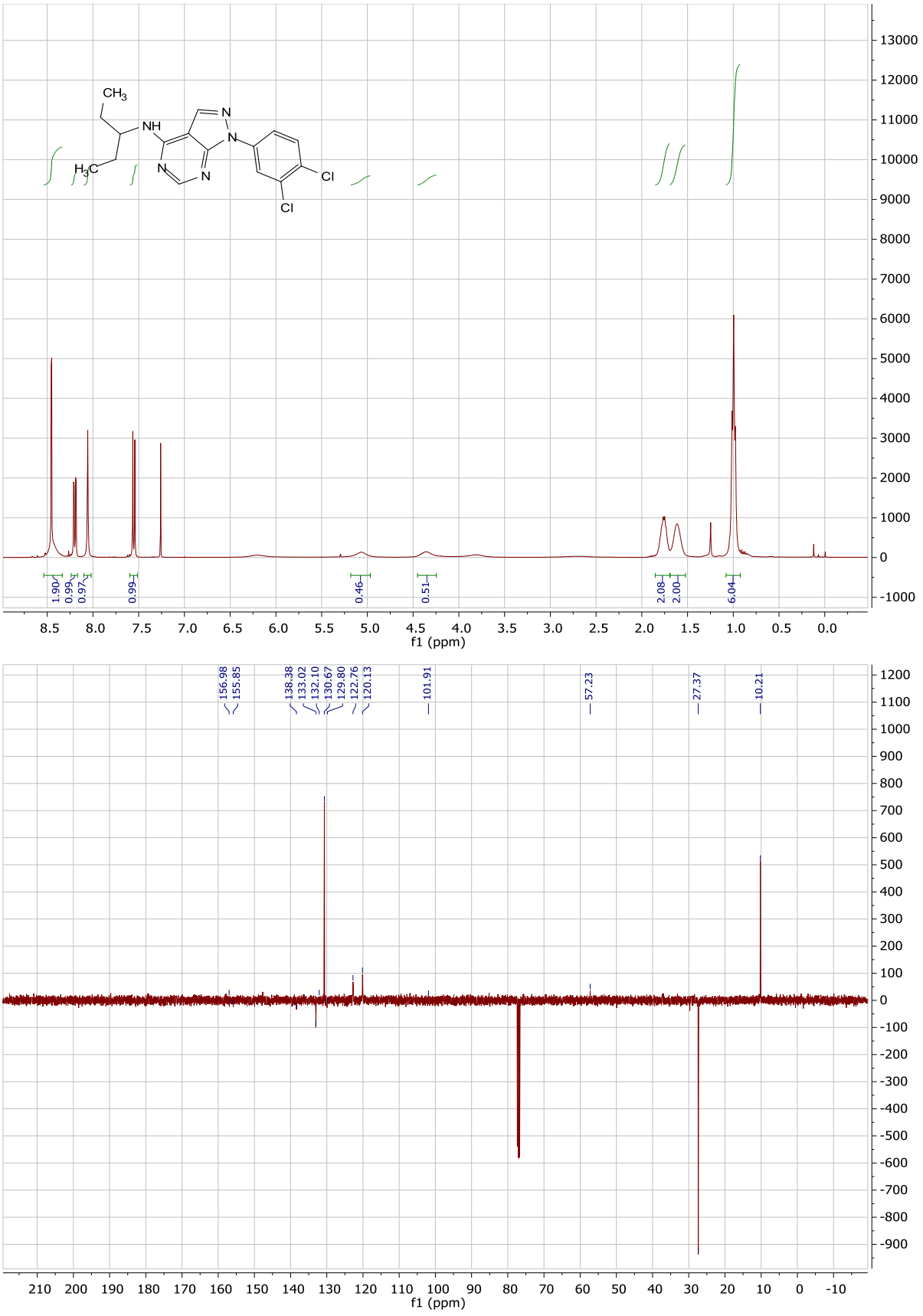


*Abbildung 118: [1]H- und [13]C-Spektrum von **52**.*

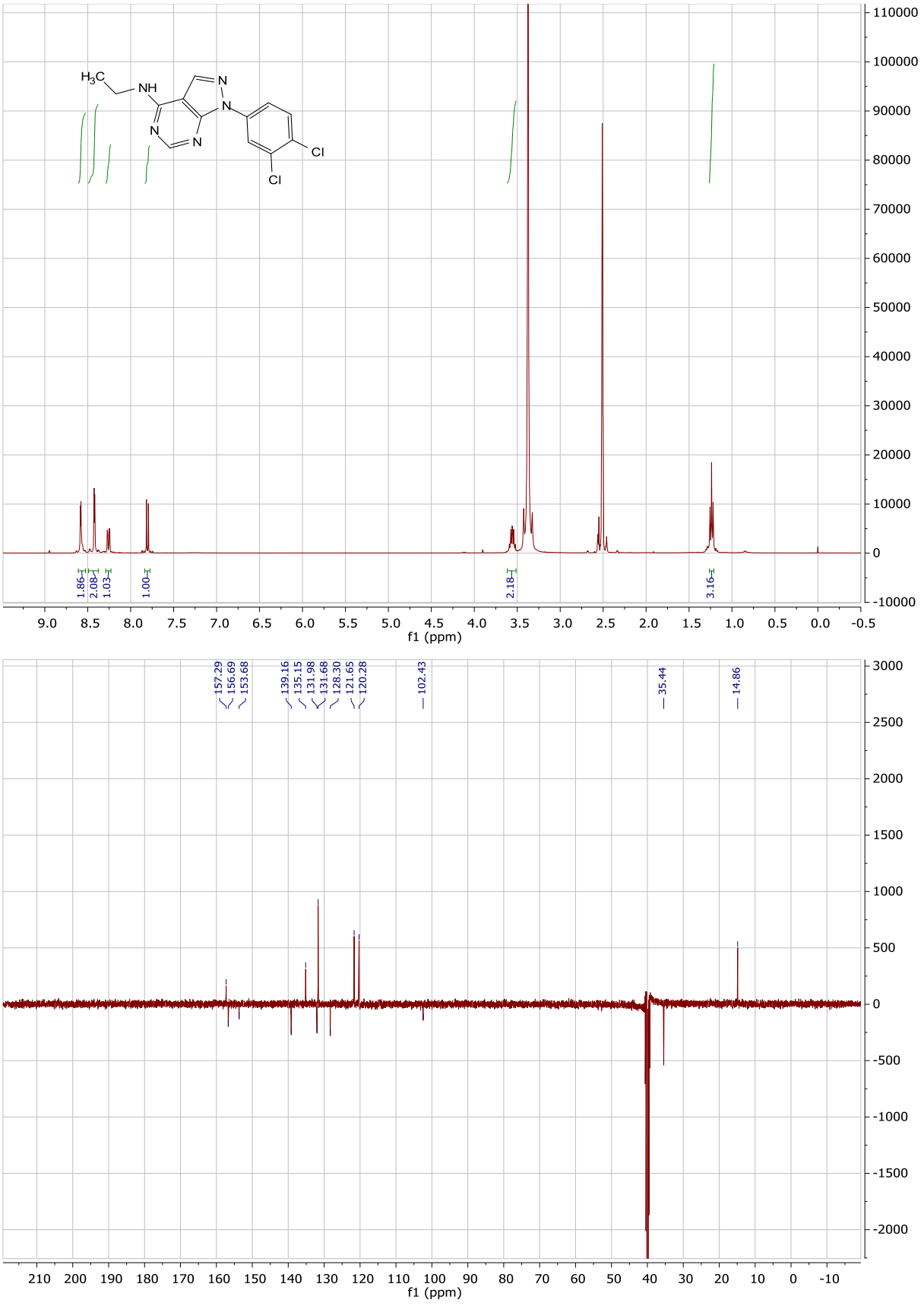


*Abbildung 119: [1]H- und [13]C-Spektrum von **53**.*

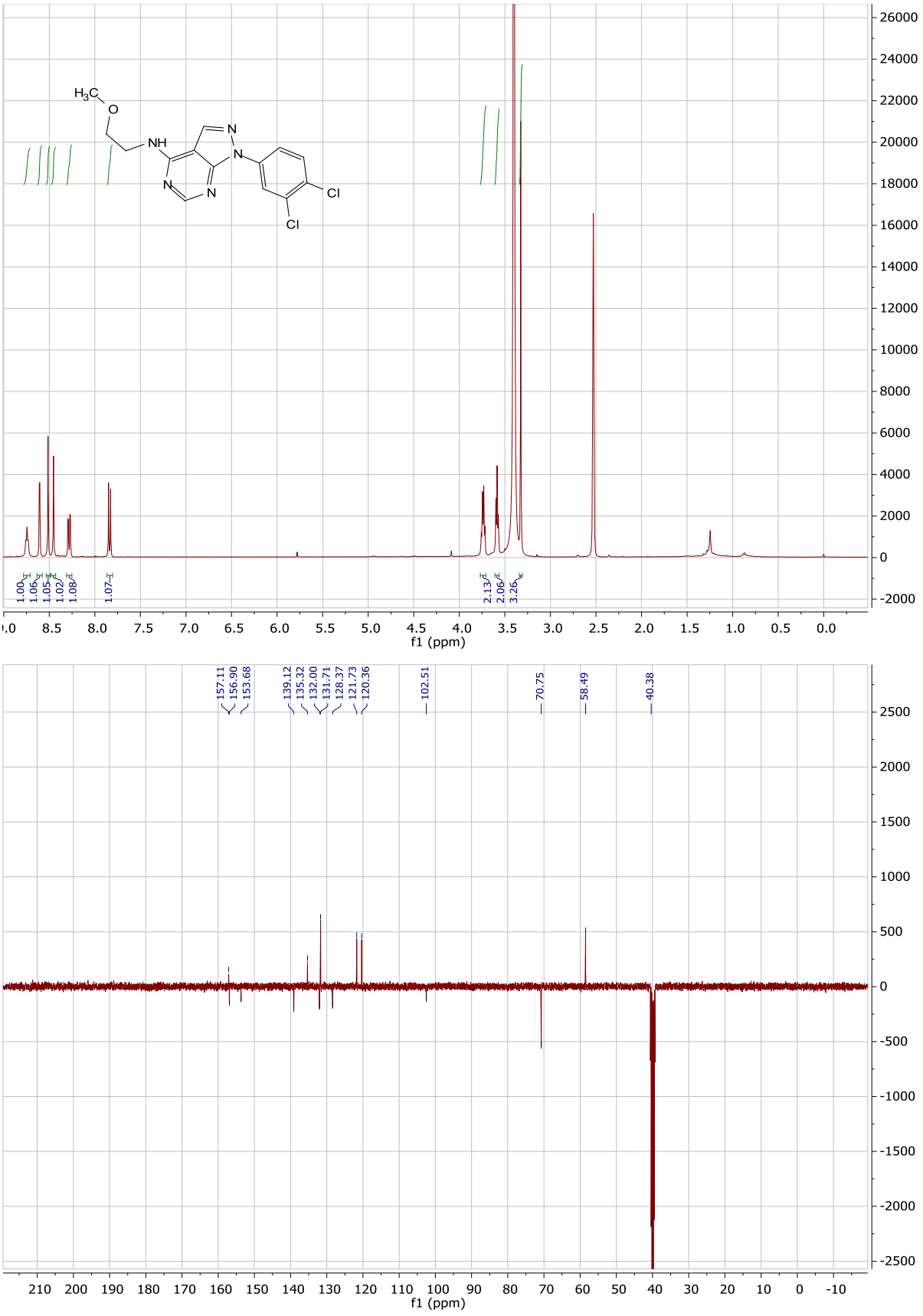


*Abbildung 120: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **54**.*

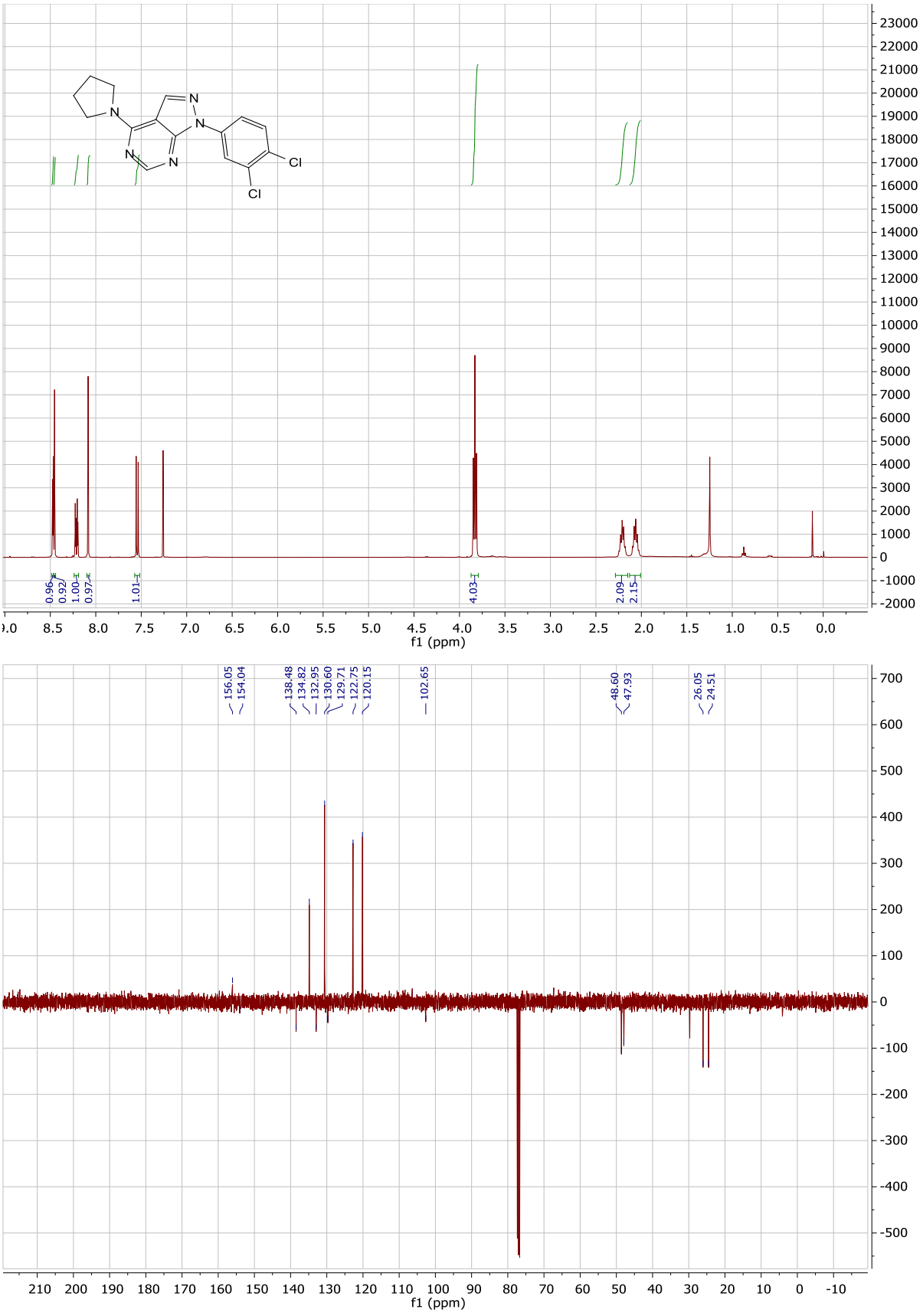


*Abbildung 121: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **55**.*

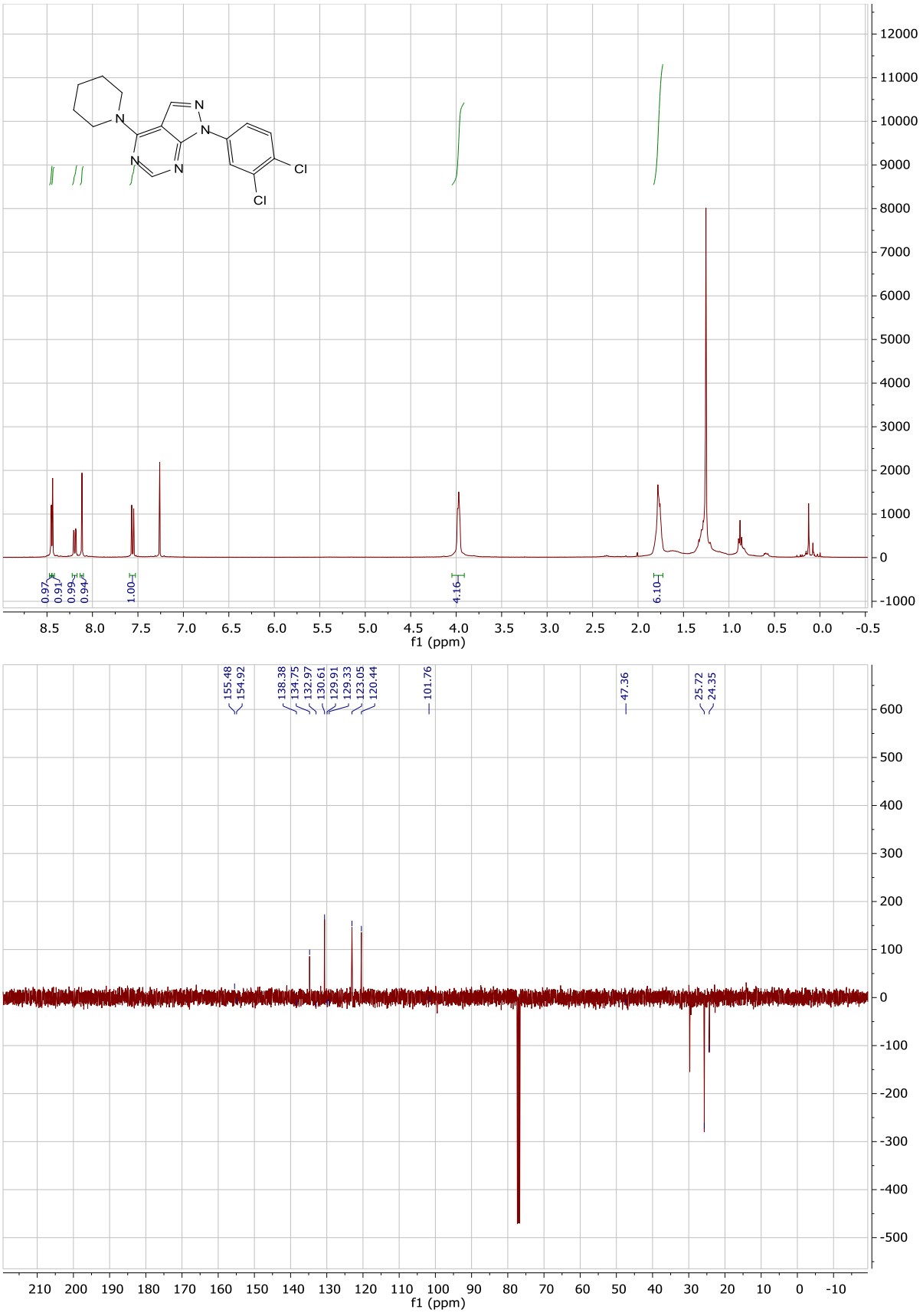


*Abbildung 122: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **56**.*

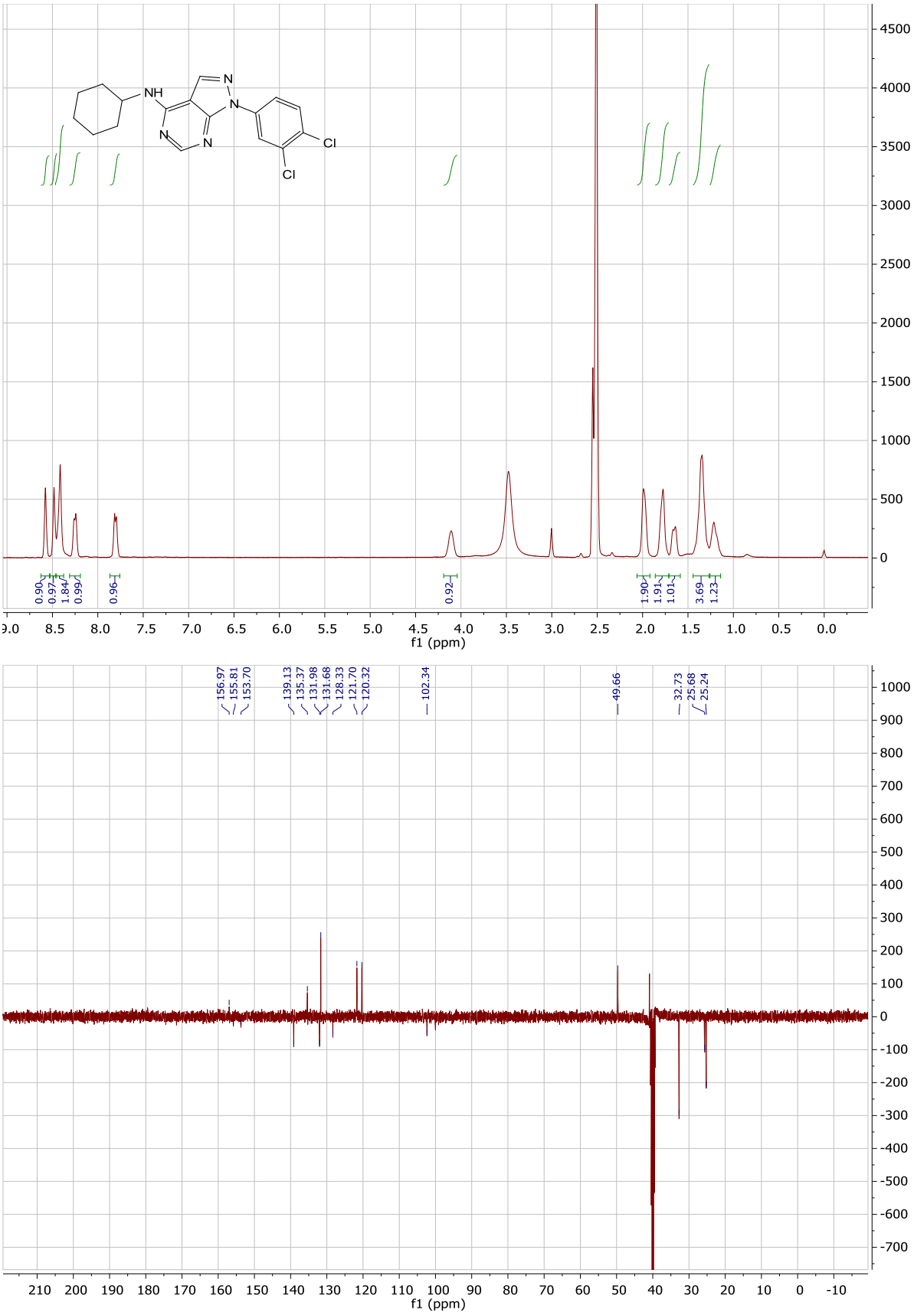


*Abbildung 123: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **57**.*

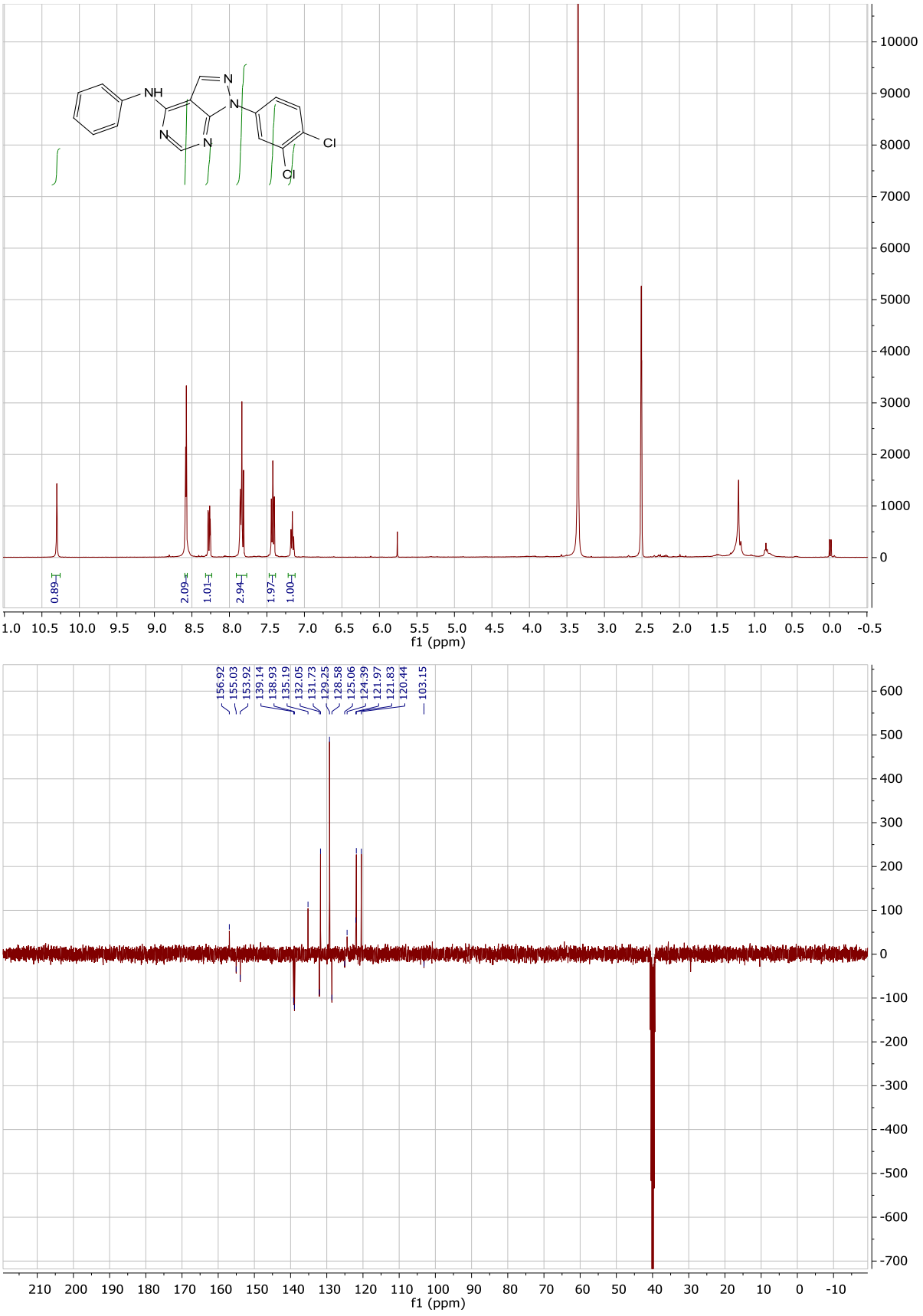


*Abbildung 124: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **58**.*

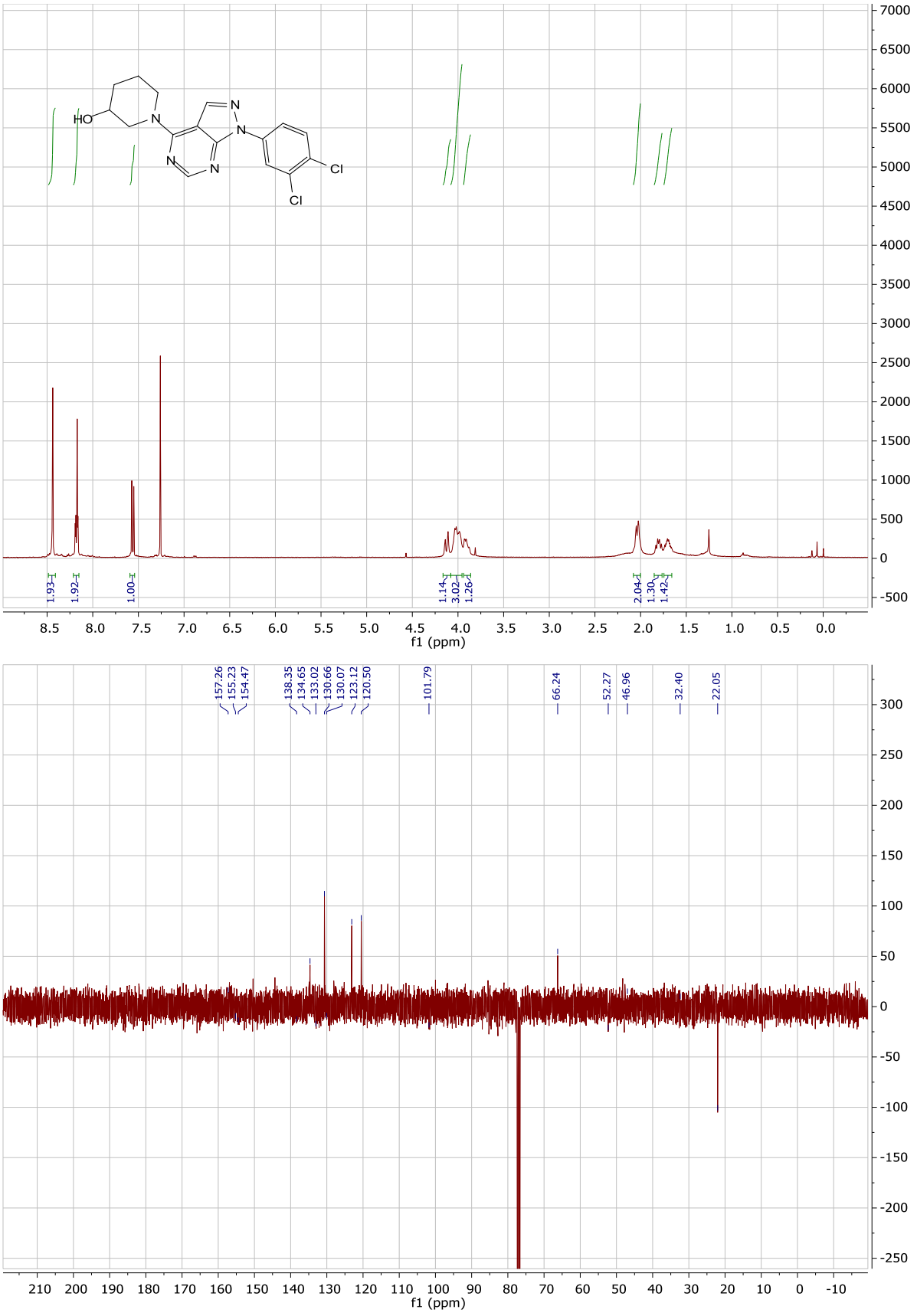


*Abbildung 125: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **59**.*

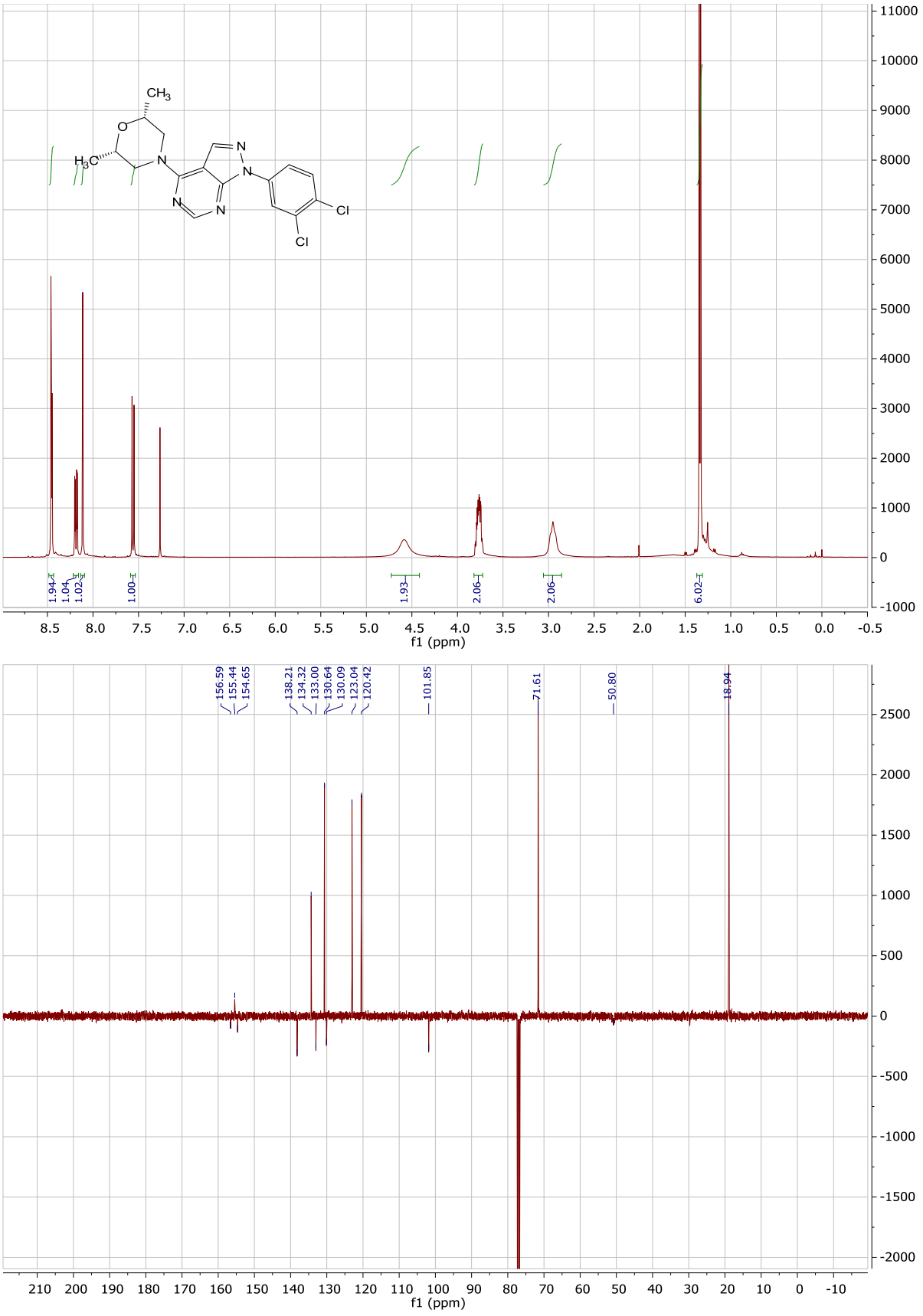


*Abbildung 126: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **60**.*

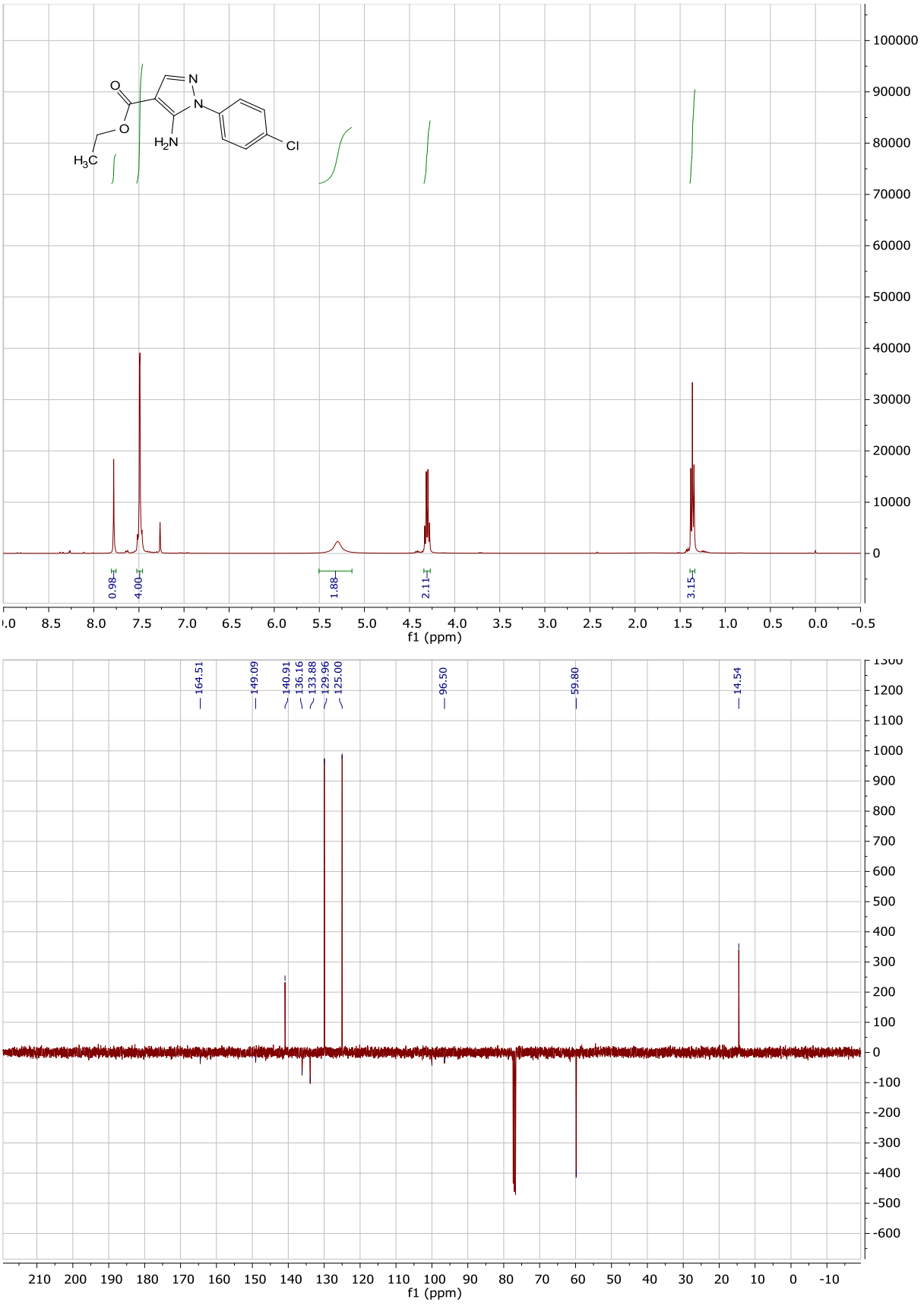


*Abbildung 127: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **38**.*

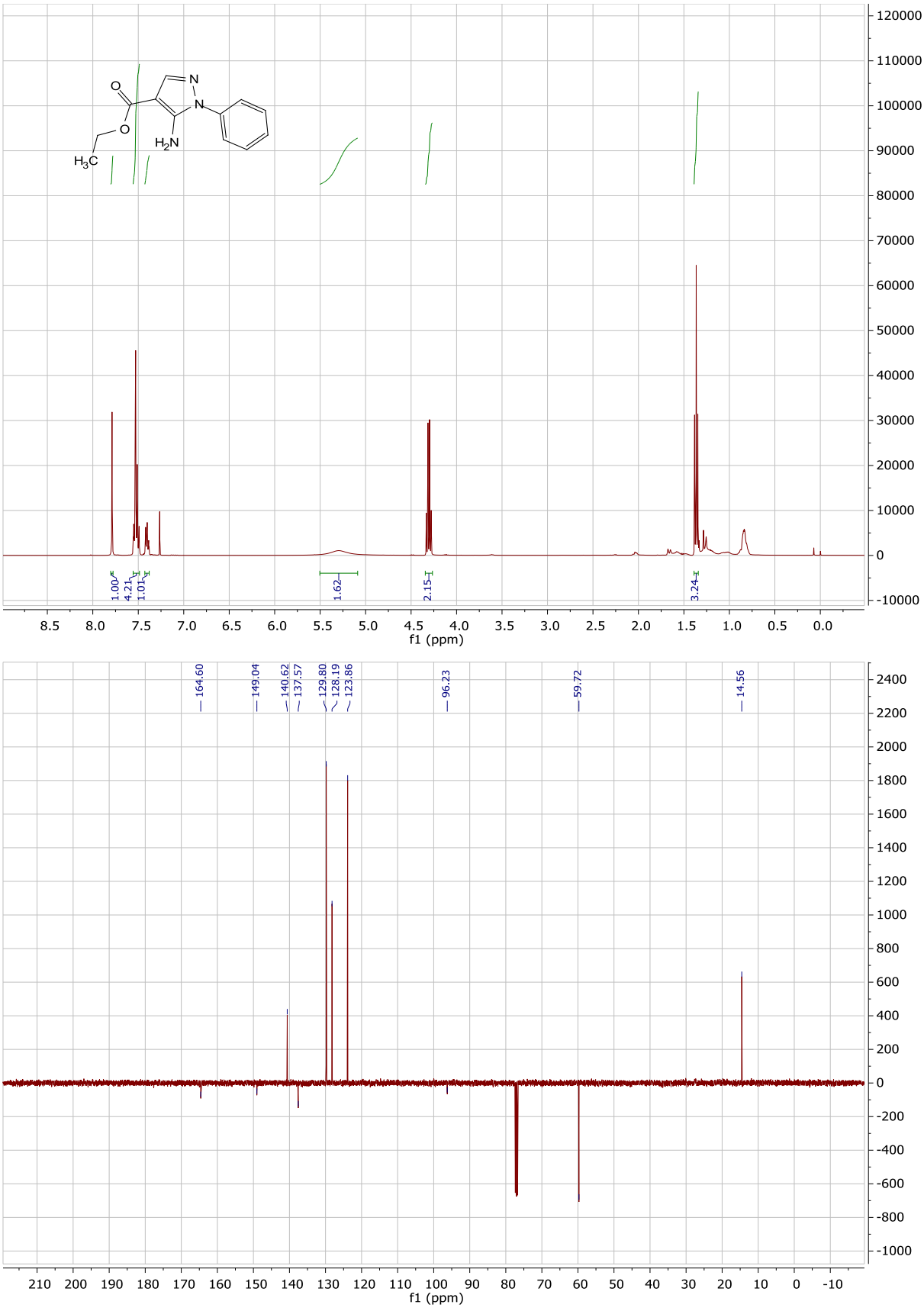


*Abbildung 128: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **39**.*

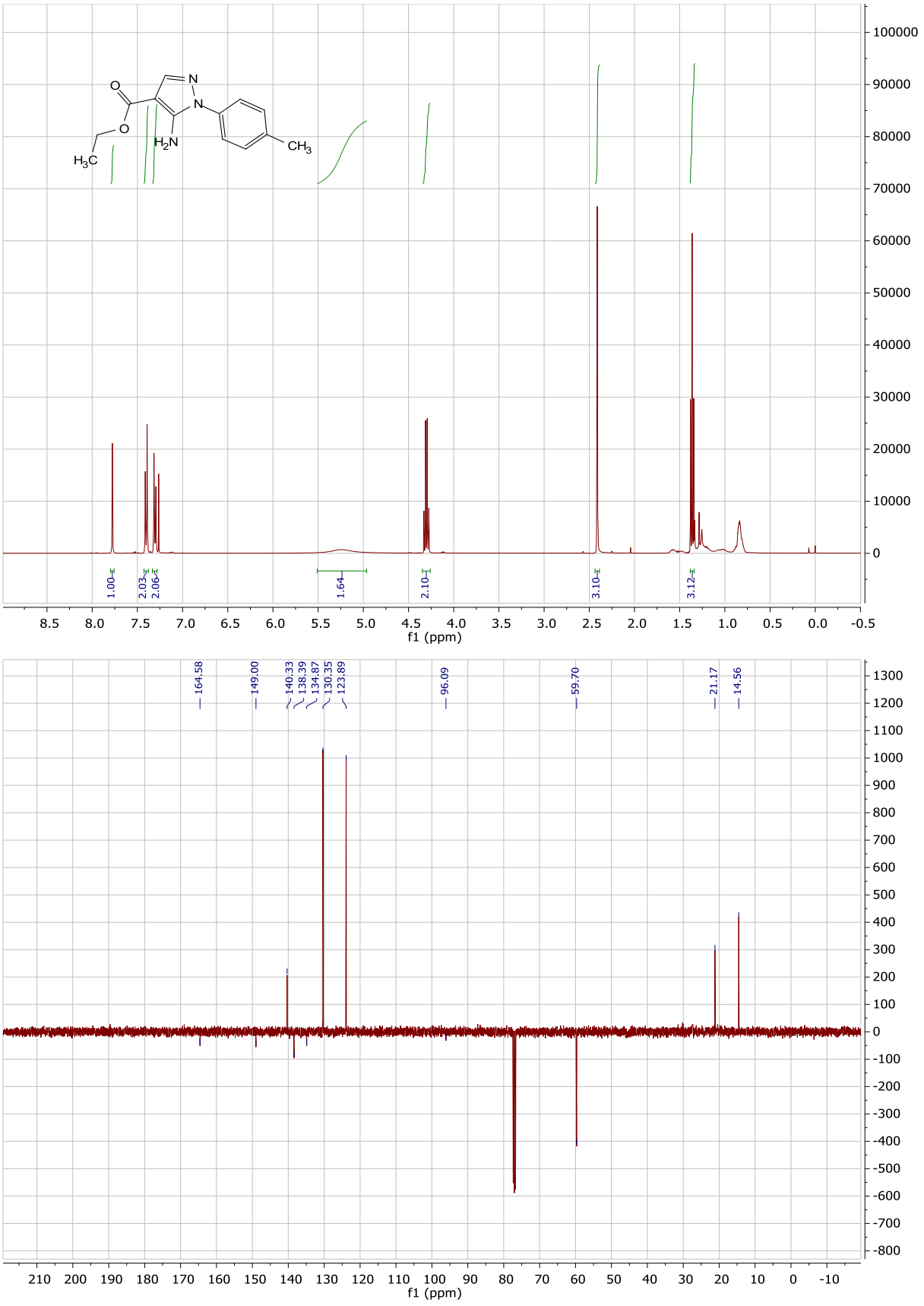


*Abbildung 129: [1]H- und [13]C-Spektrum von **40**.*

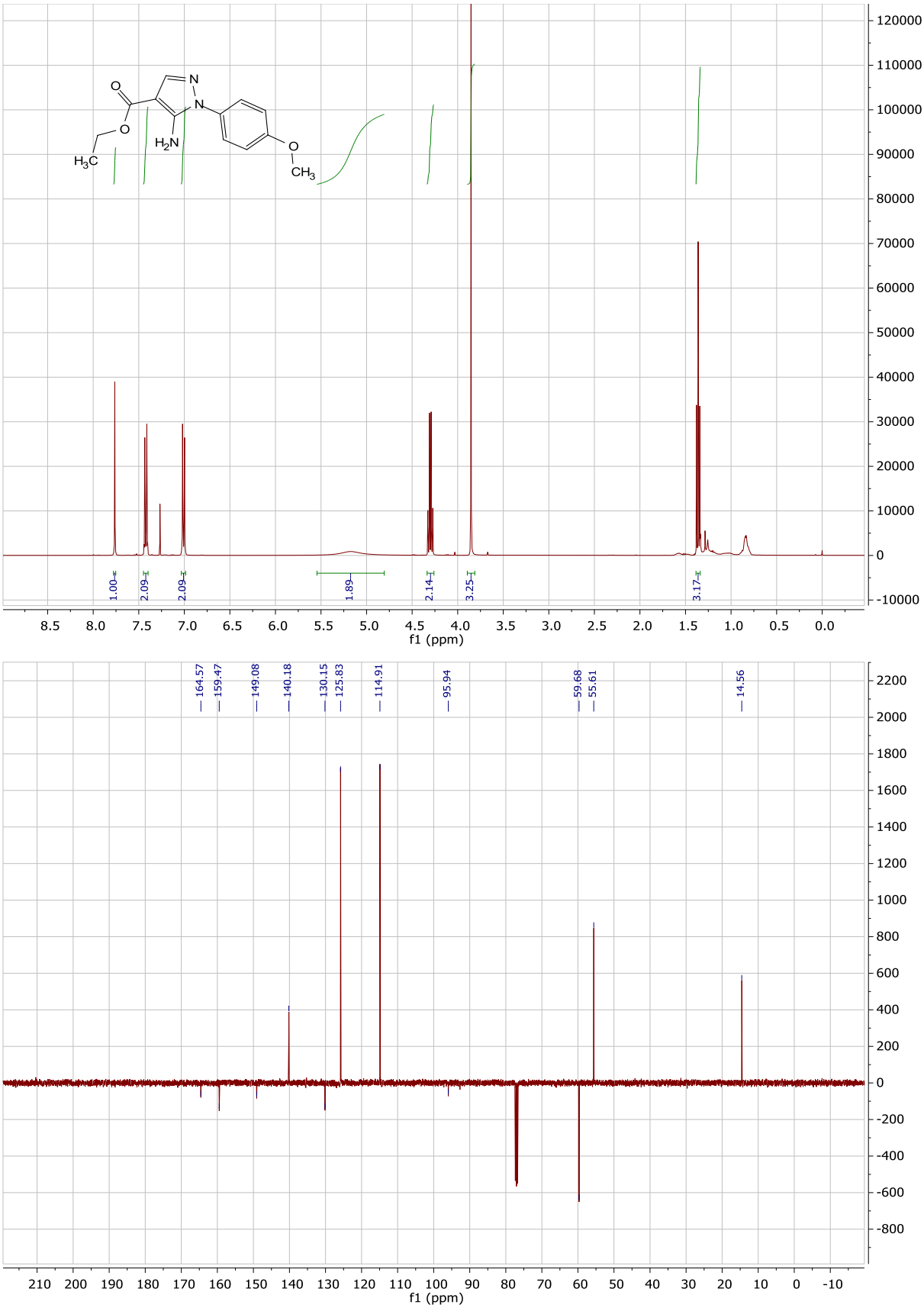


*Abbildung 130: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **41**.*

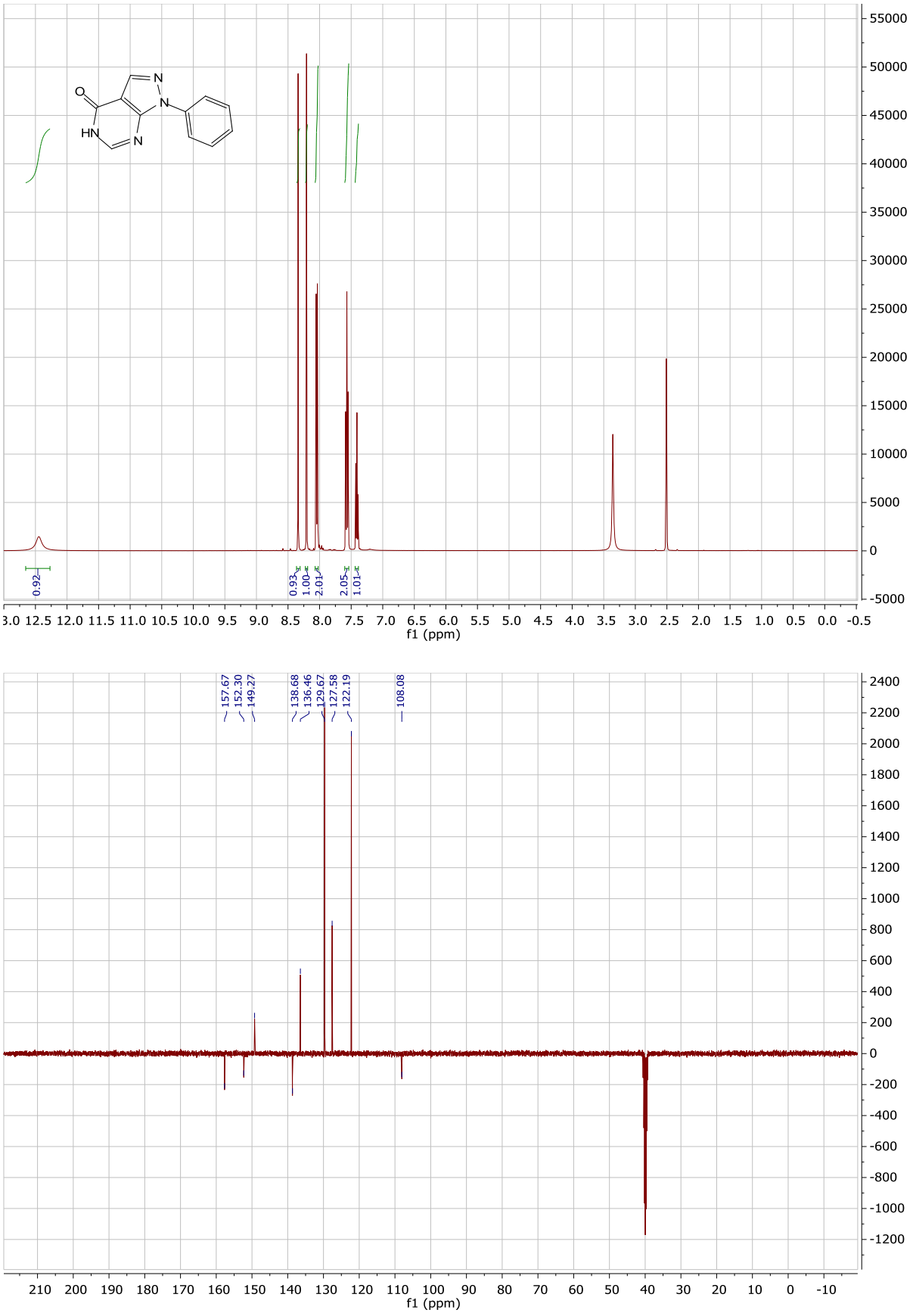


*Abbildung 131: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **42**.*

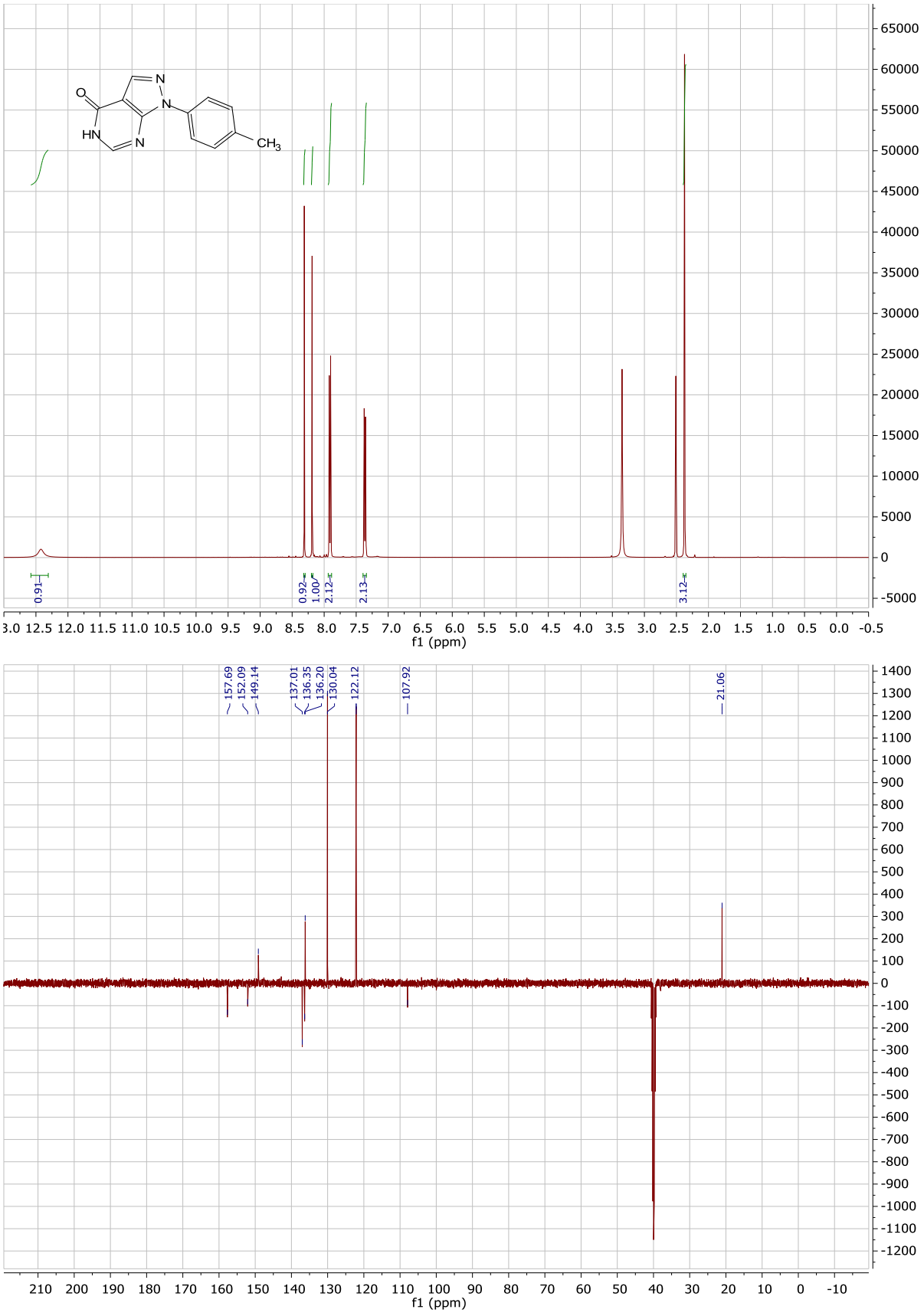


*Abbildung 132: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **43**.*

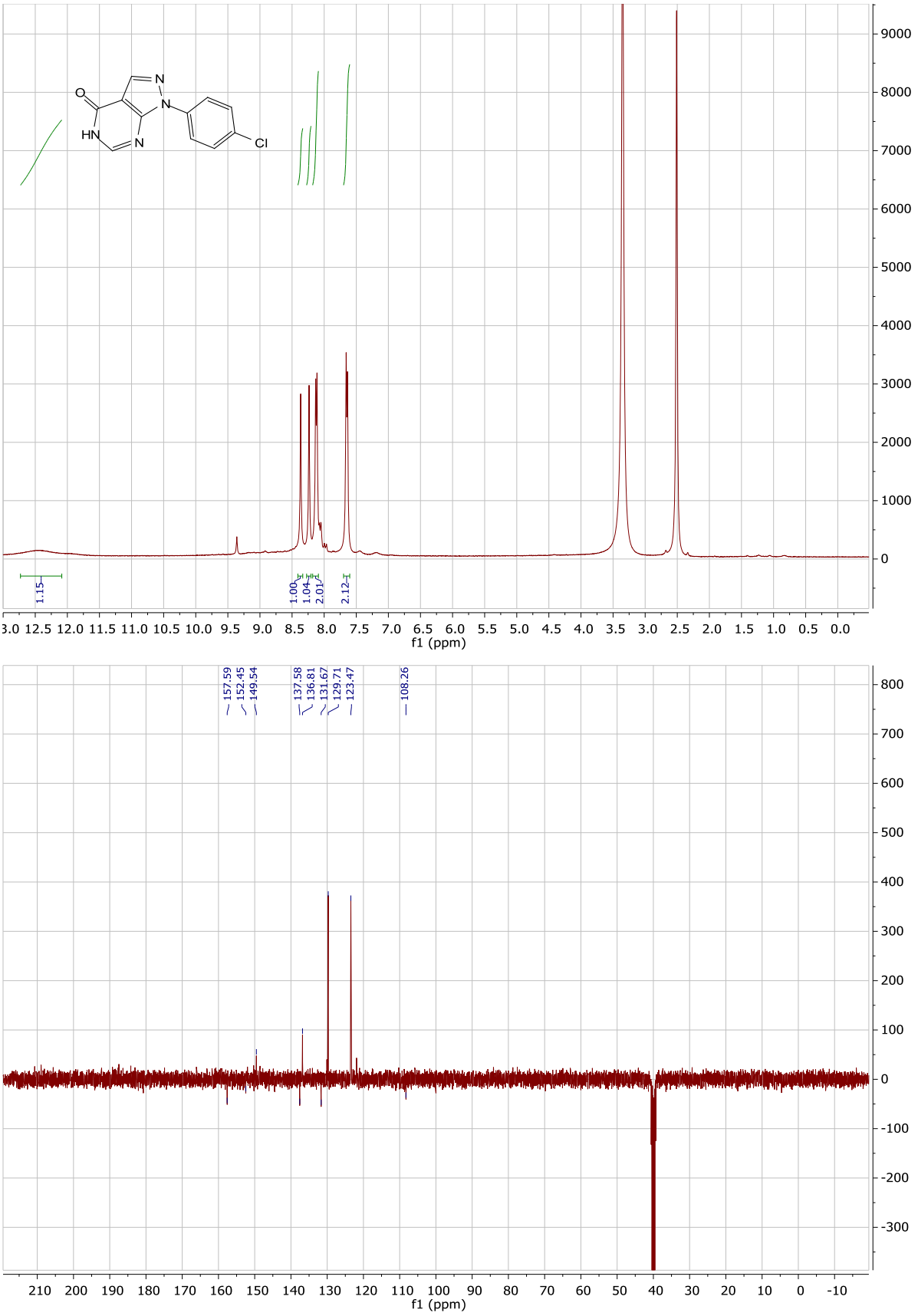


*Abbildung 133: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **44**.*

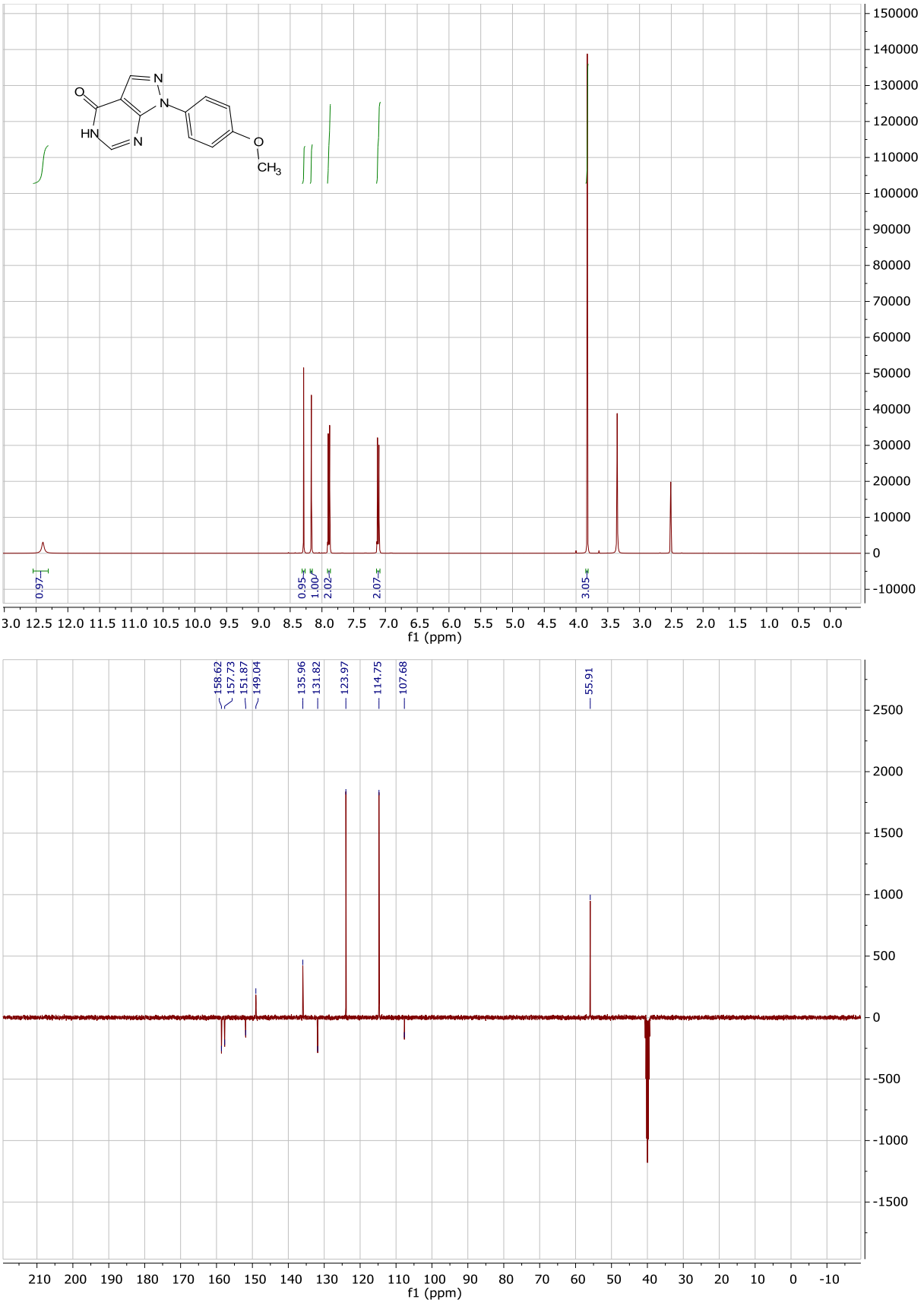


*Abbildung 134: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **45**.*

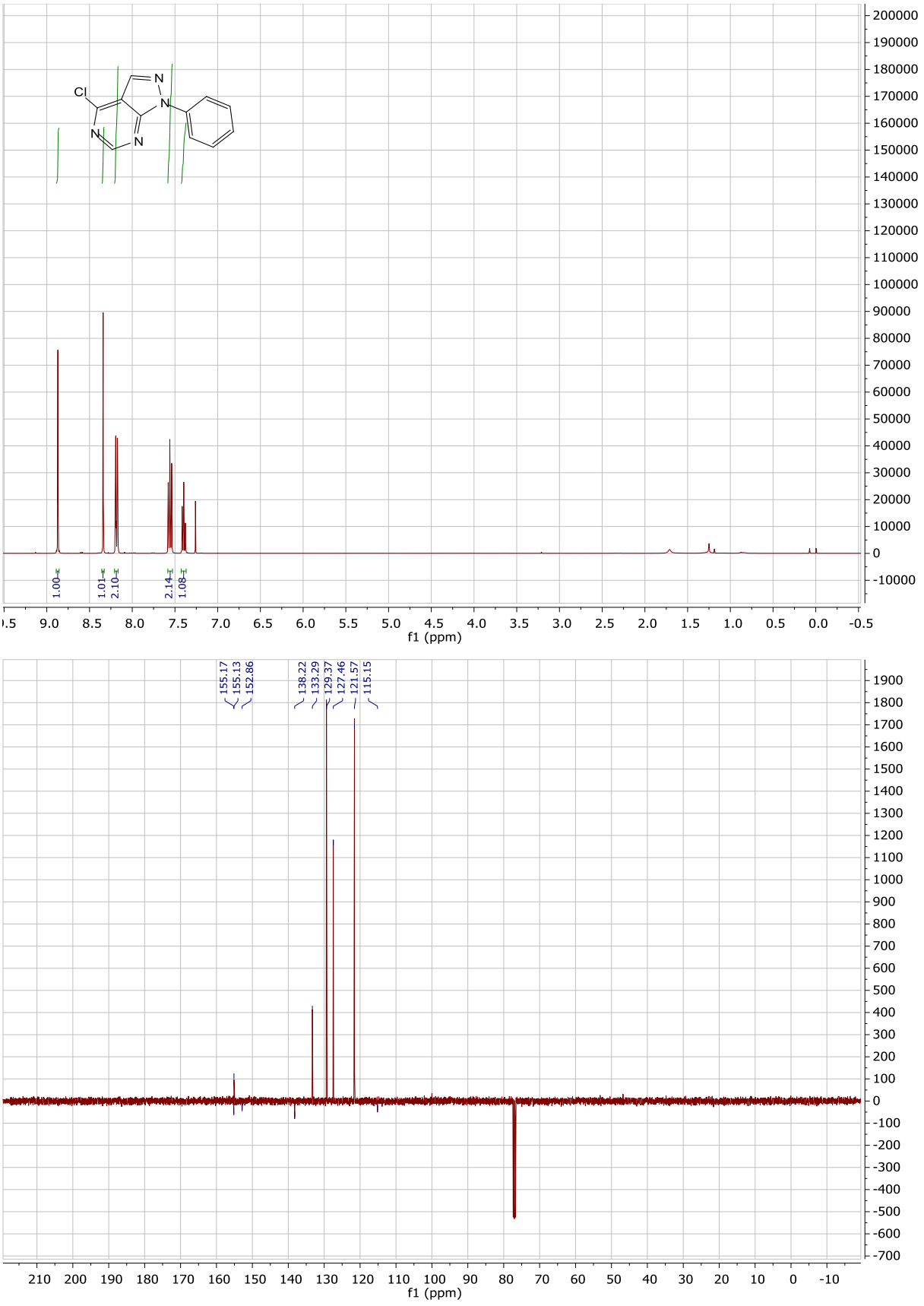


*Abbildung 135: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **46**.*

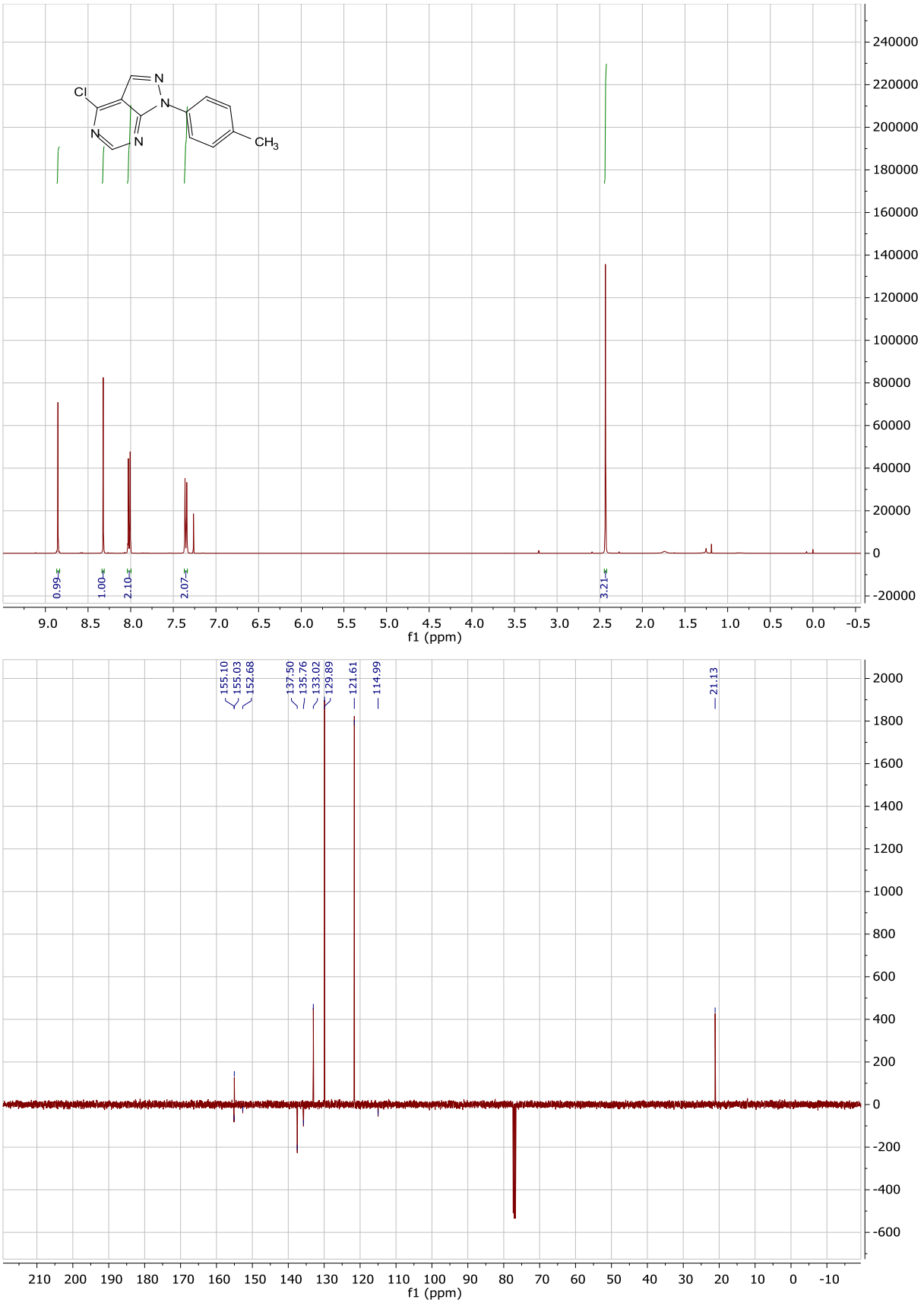


*Abbildung 136: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **47**.*

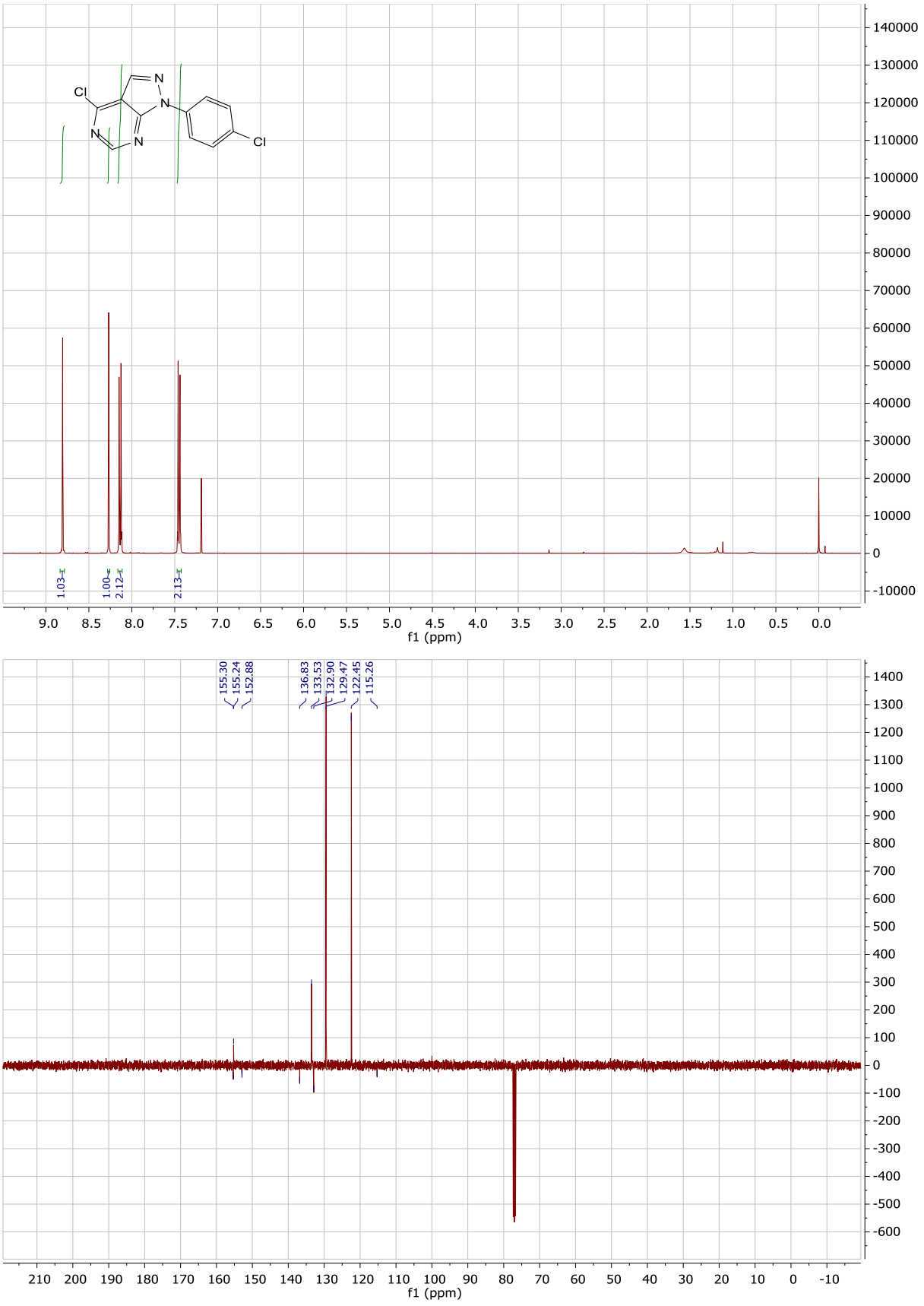


*Abbildung 137: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **48**.*

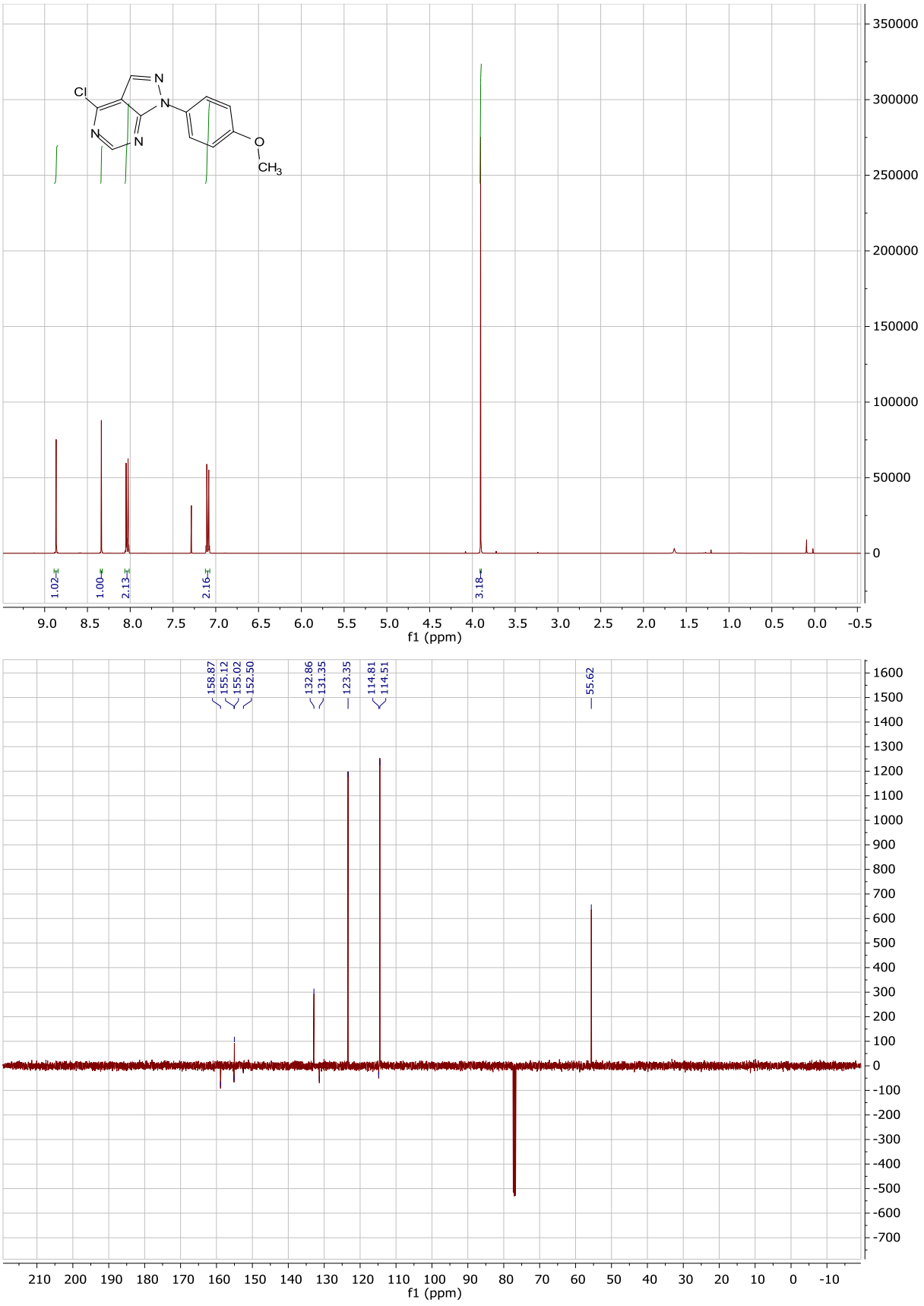


*Abbildung 138: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **49**.*

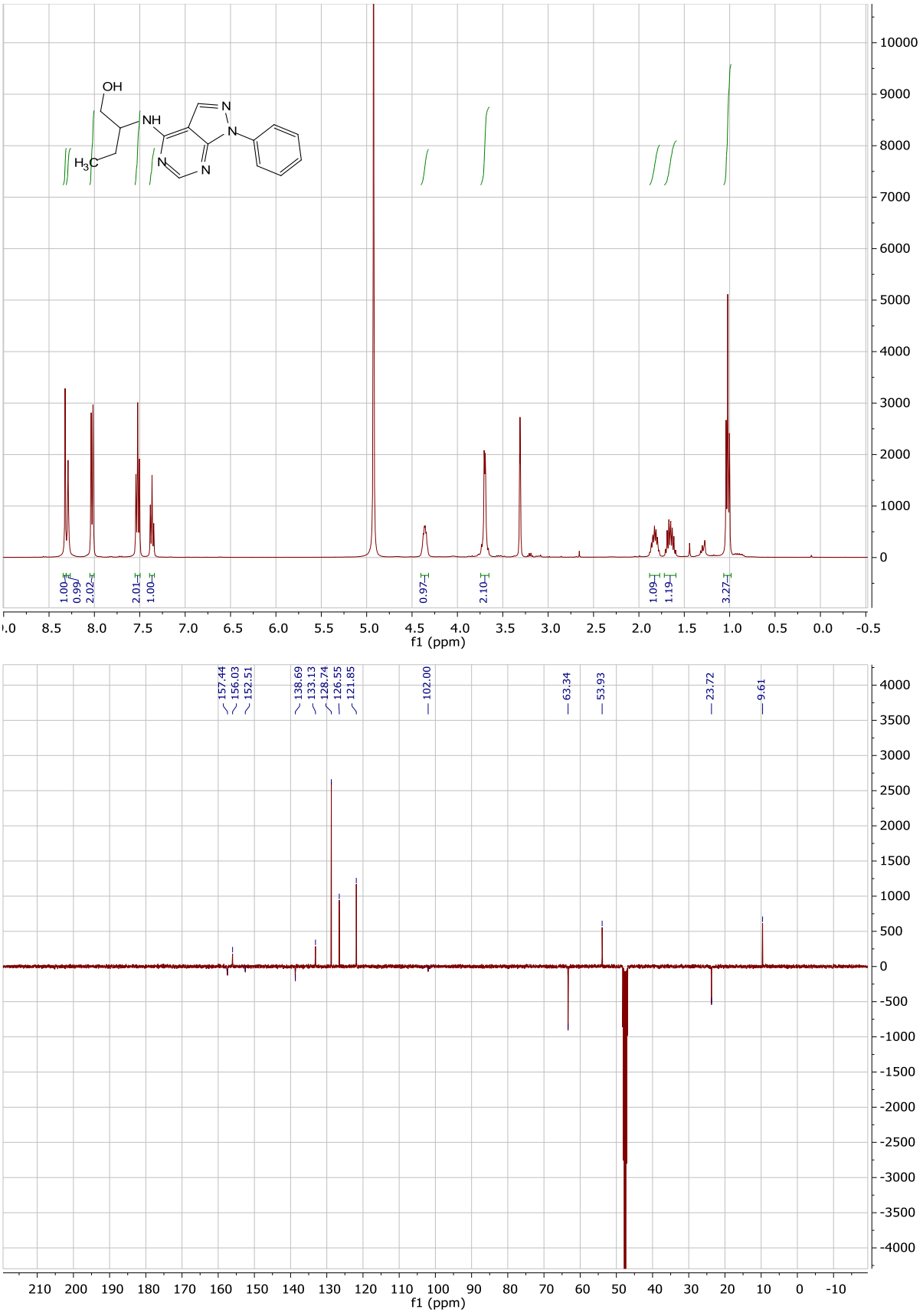


*Abbildung 139: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **rac-30**.*

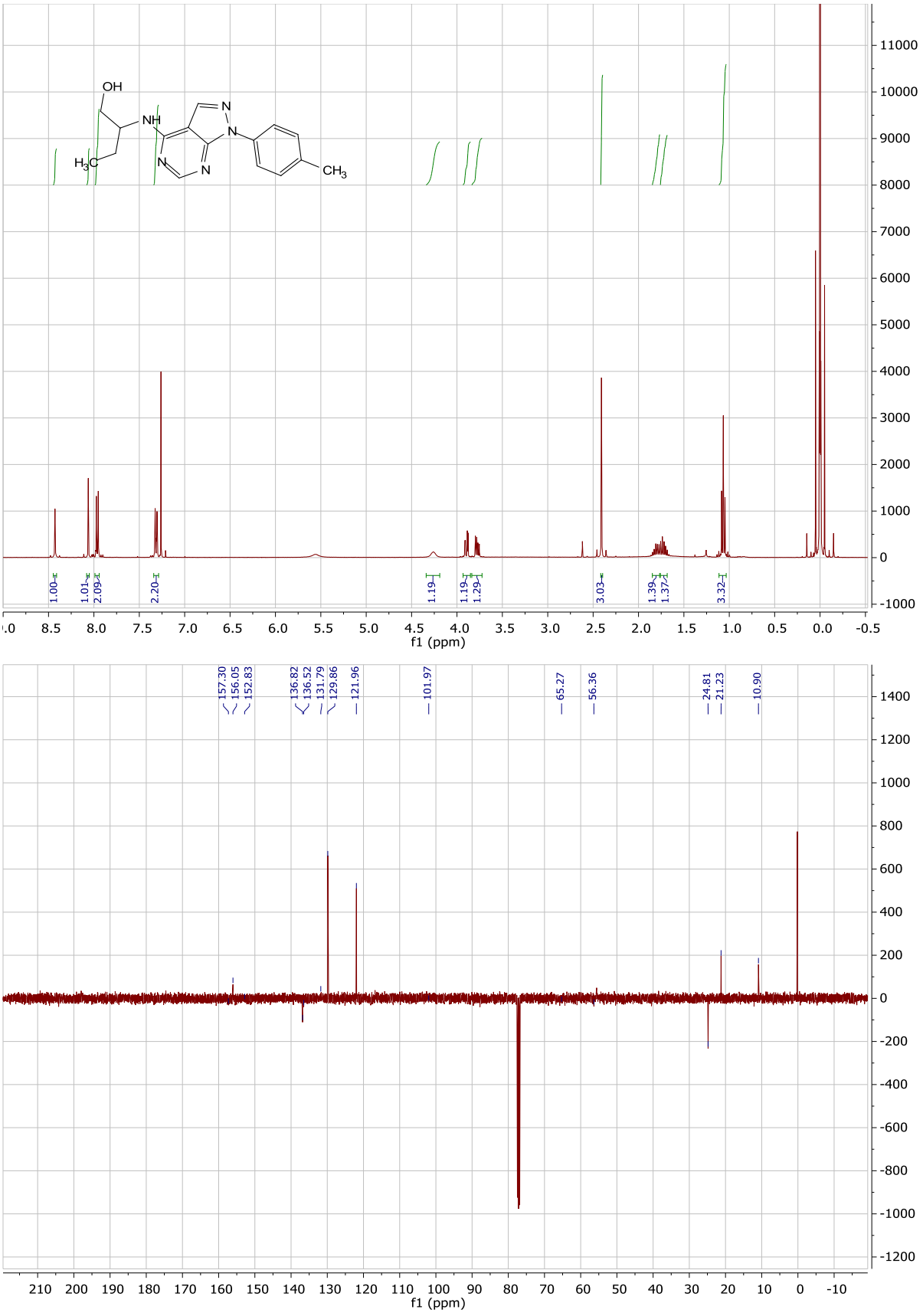


*Abbildung 140: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **rac-32**.*

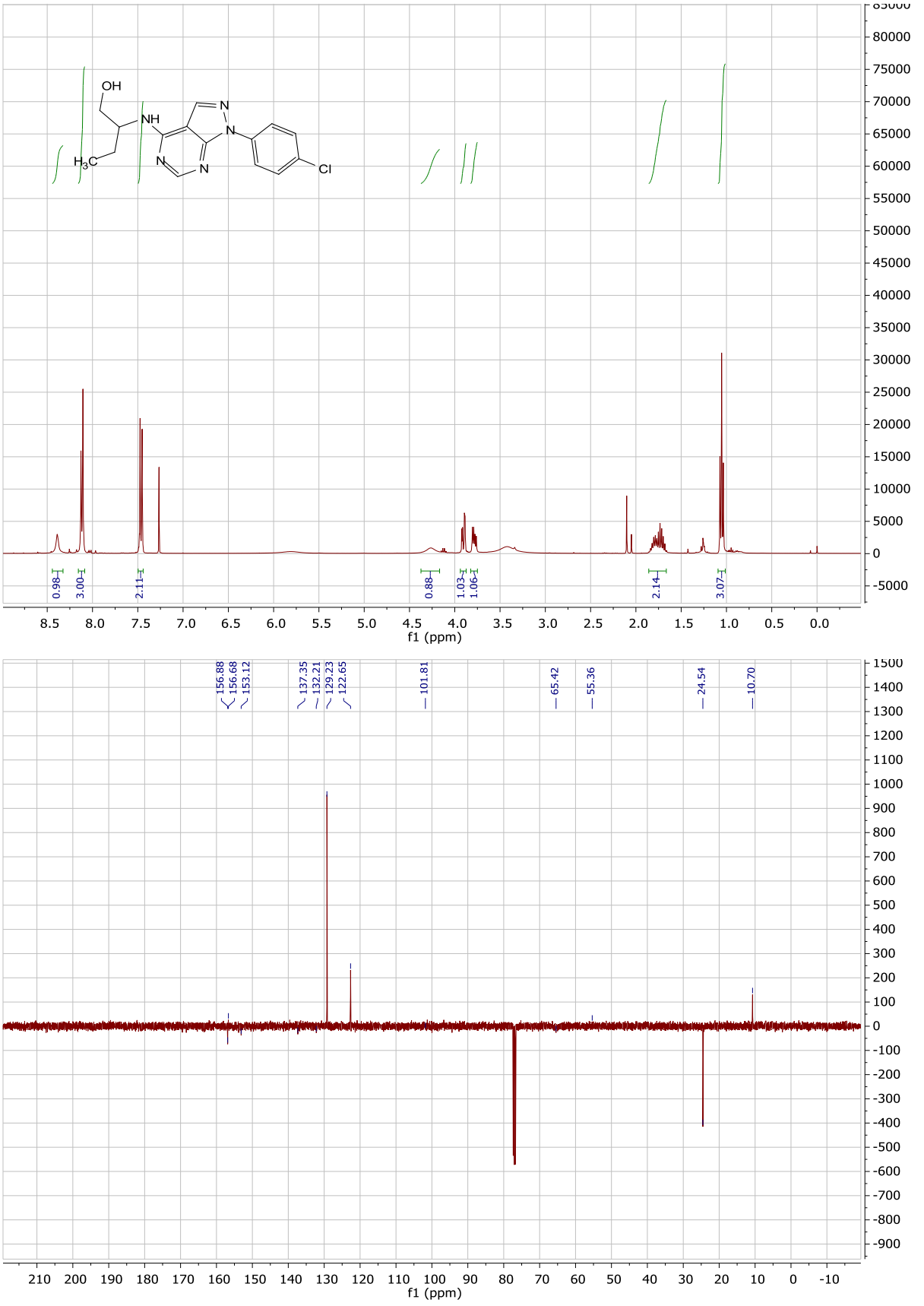


*Abbildung 141: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **rac-34**.*

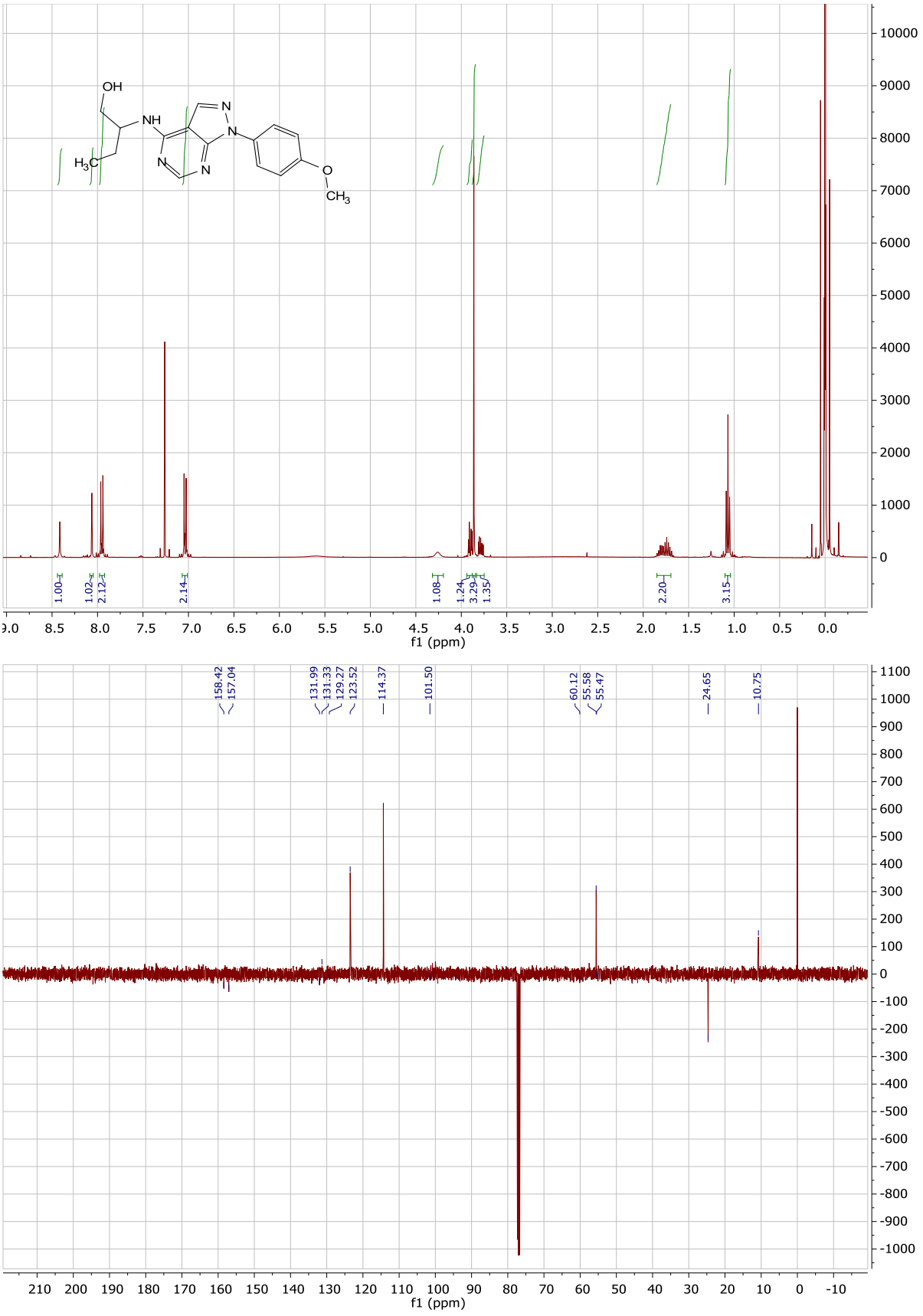


*Abbildung 142: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **rac-36**.*

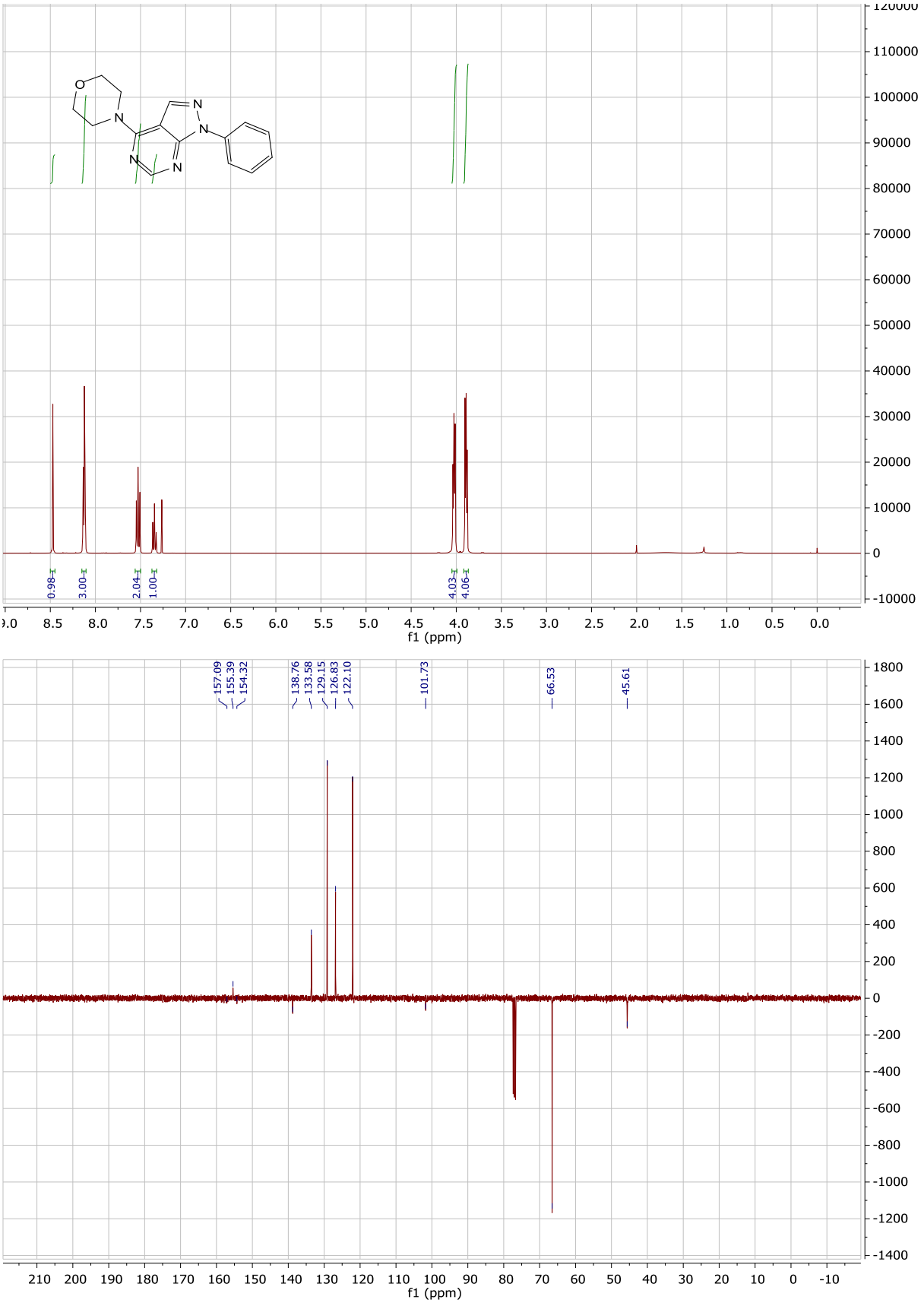


*Abbildung 143: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **31**.*

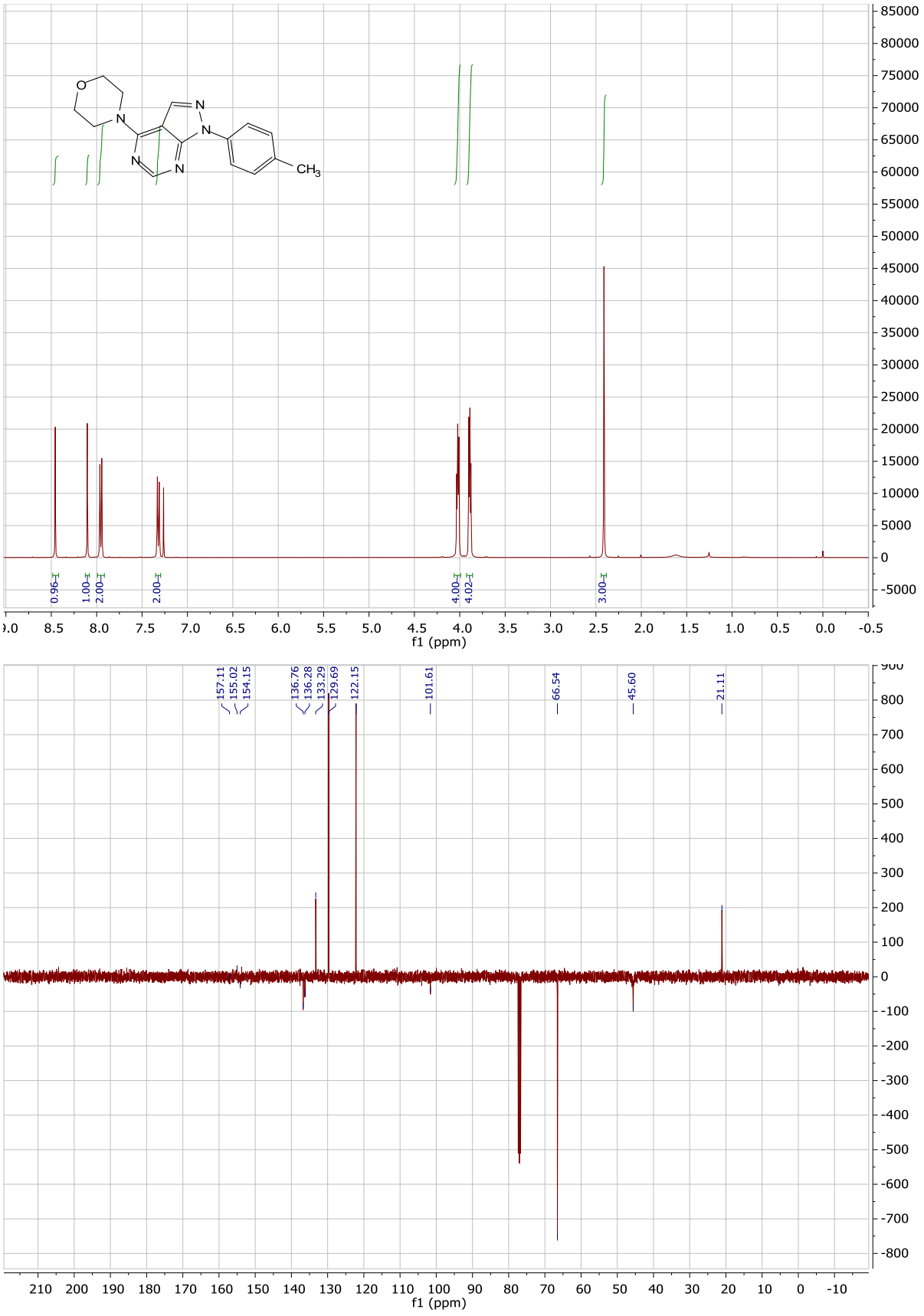


*Abbildung 144: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **33**.*

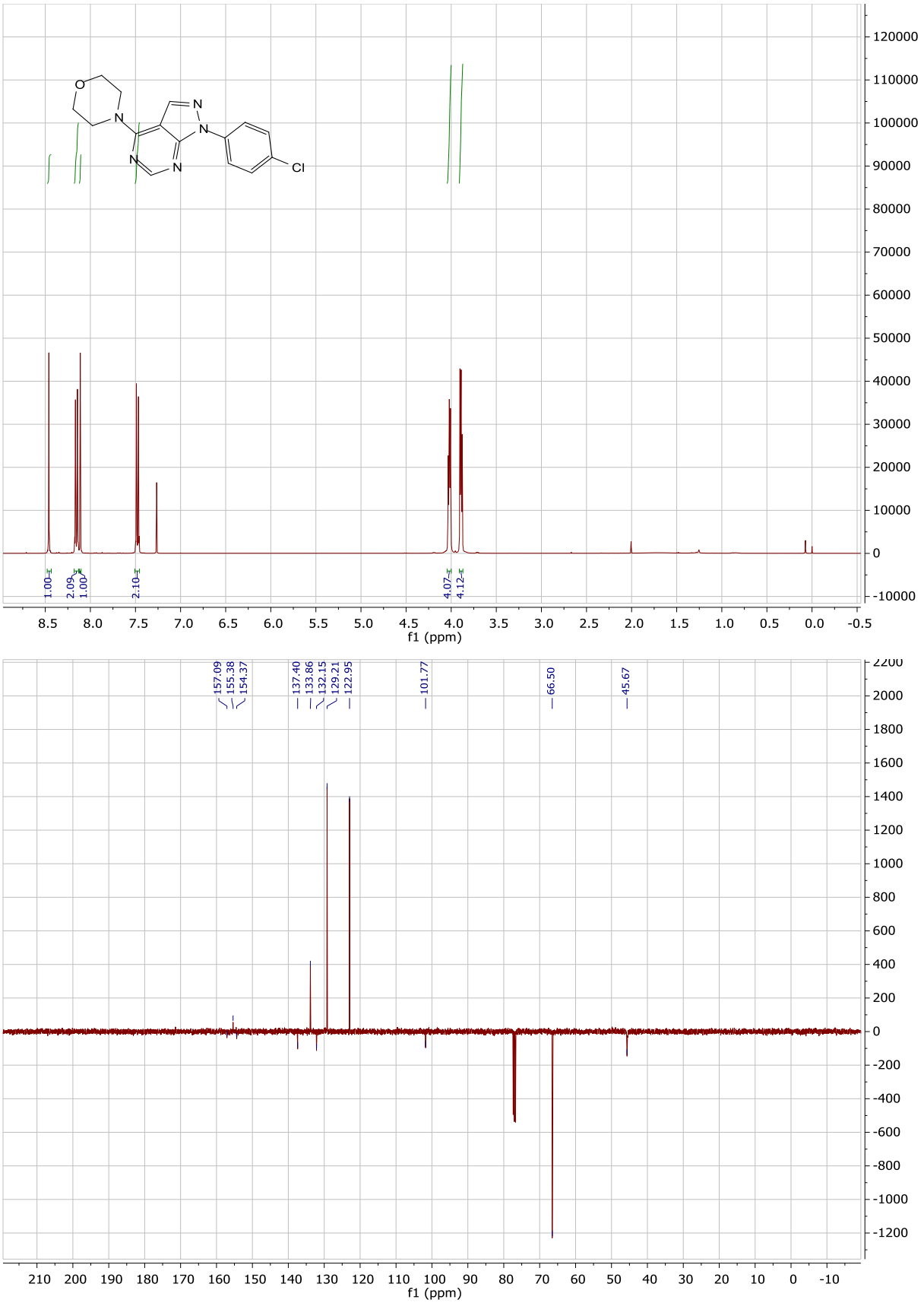


*Abbildung 145: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **35**.*

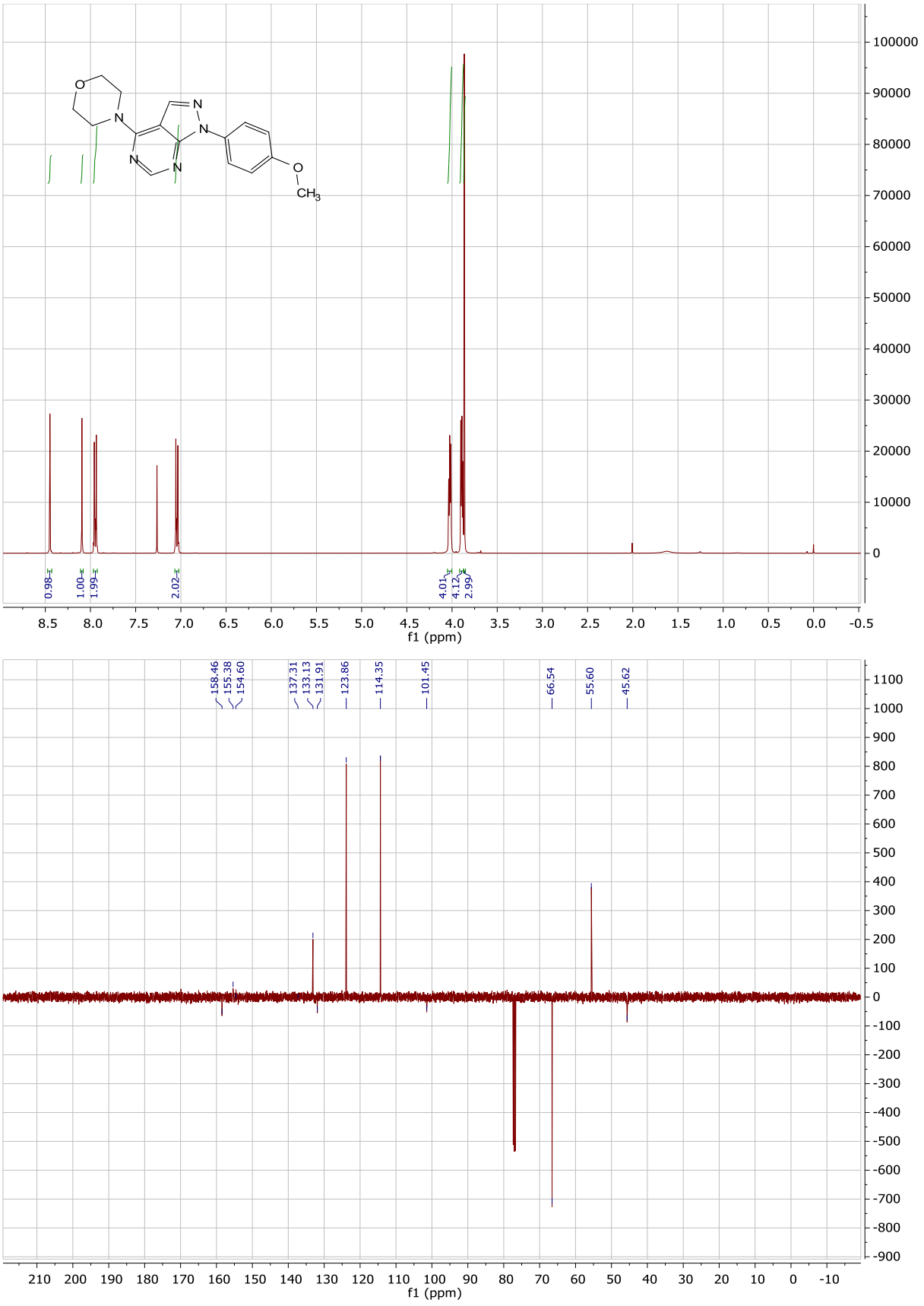


*Abbildung 146: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **37**.*

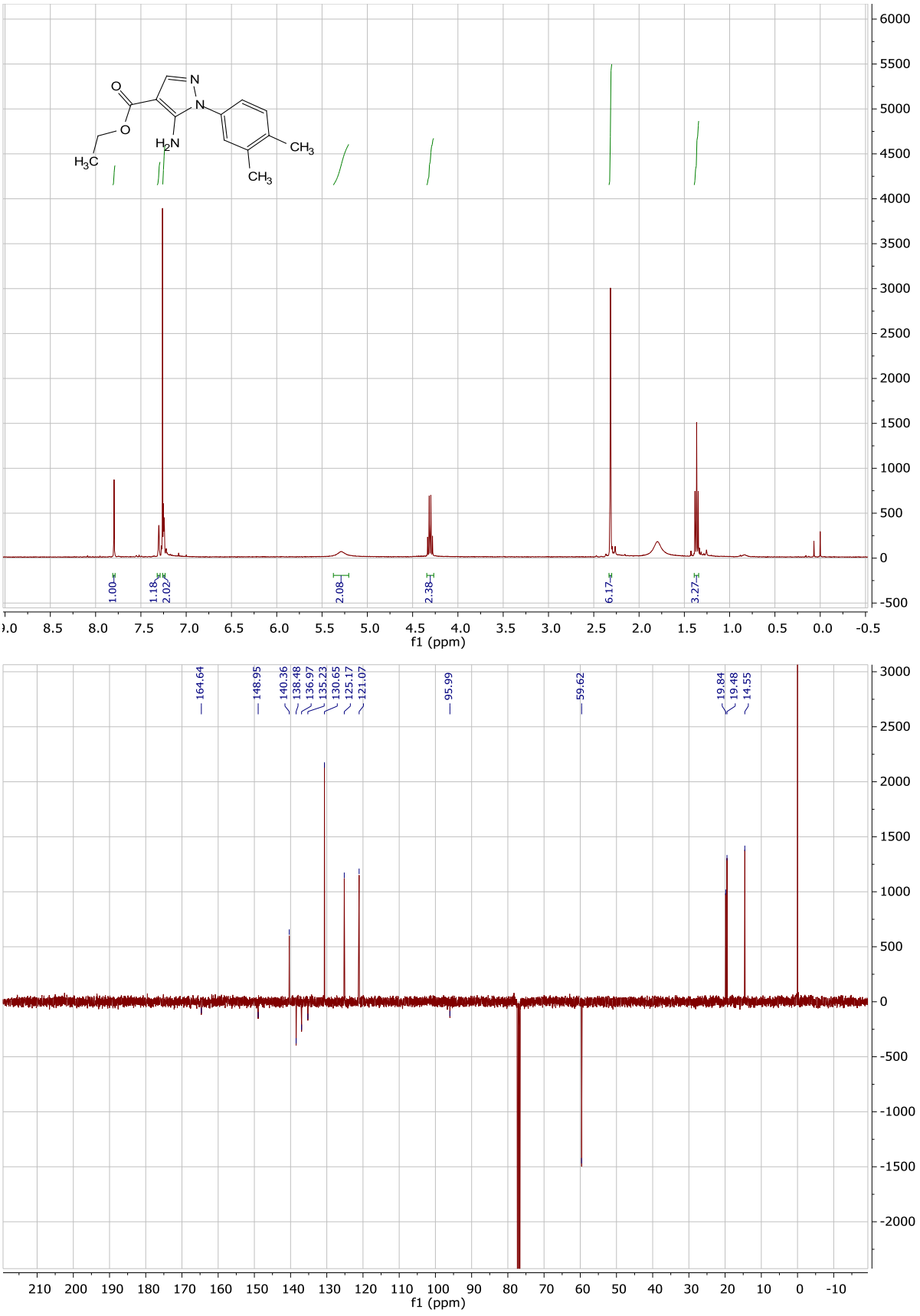


*Abbildung 147: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **62**.*

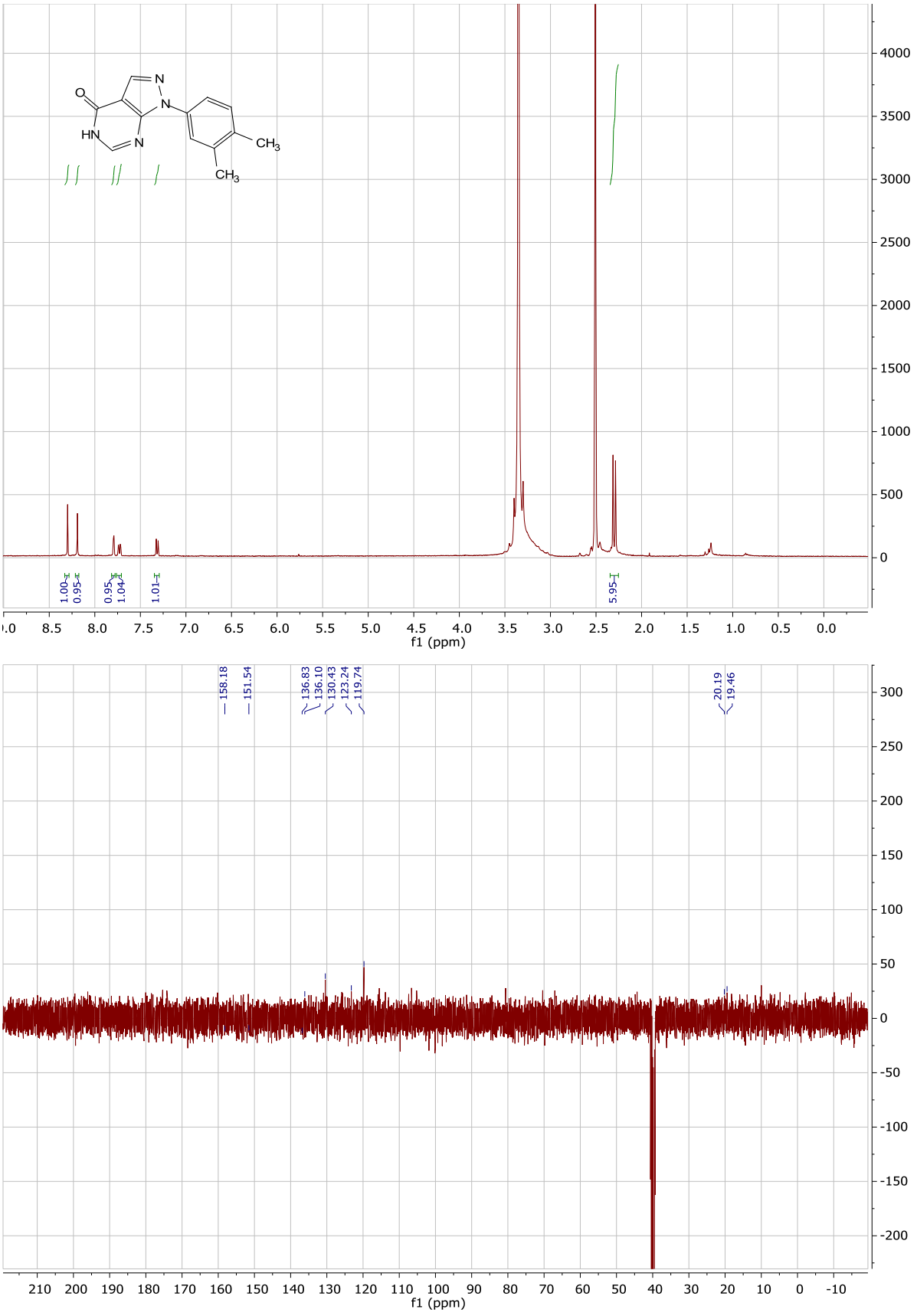


*Abbildung 148: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **63** (schwerlöslich).*

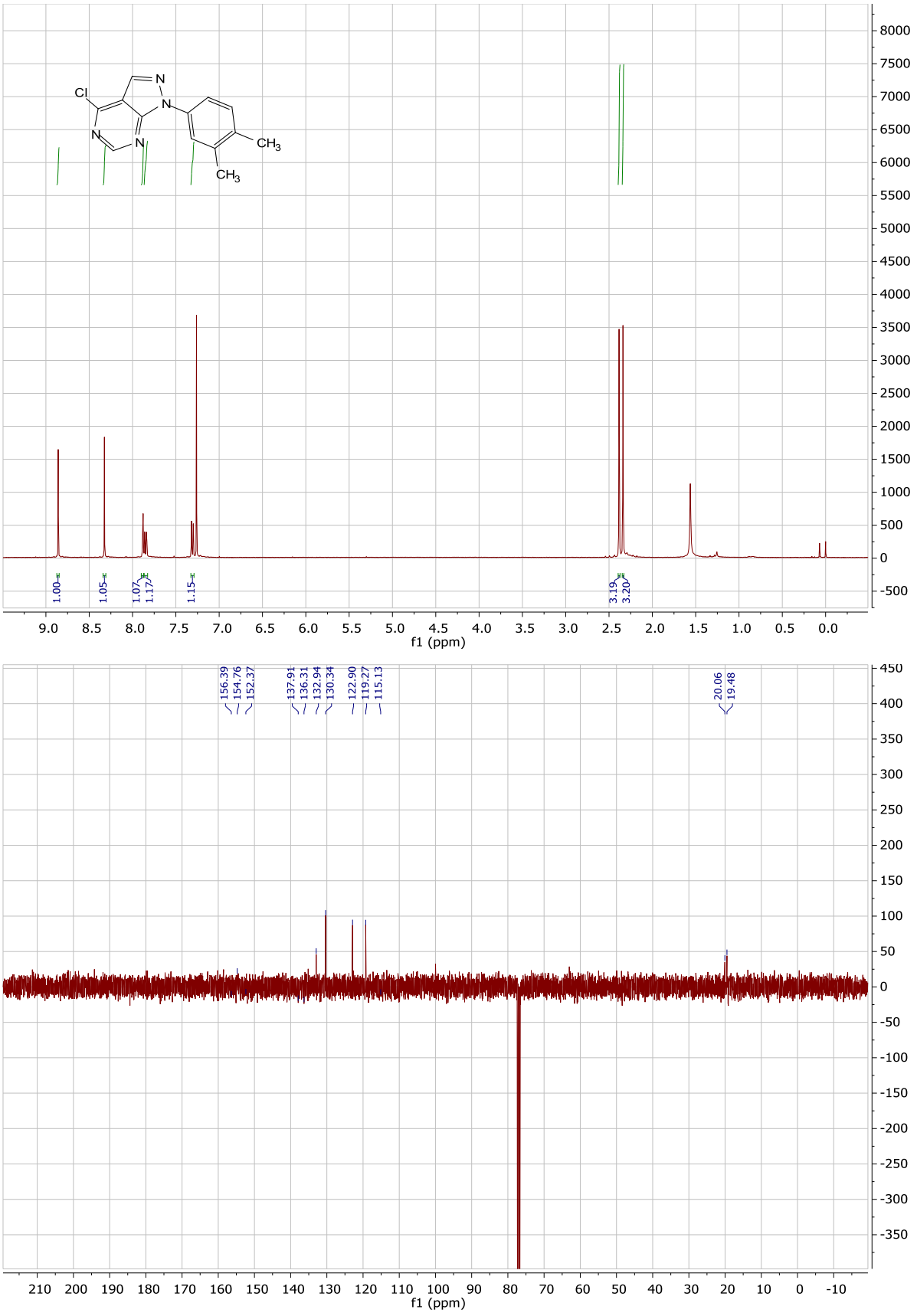


*Abbildung 149: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **64**.*

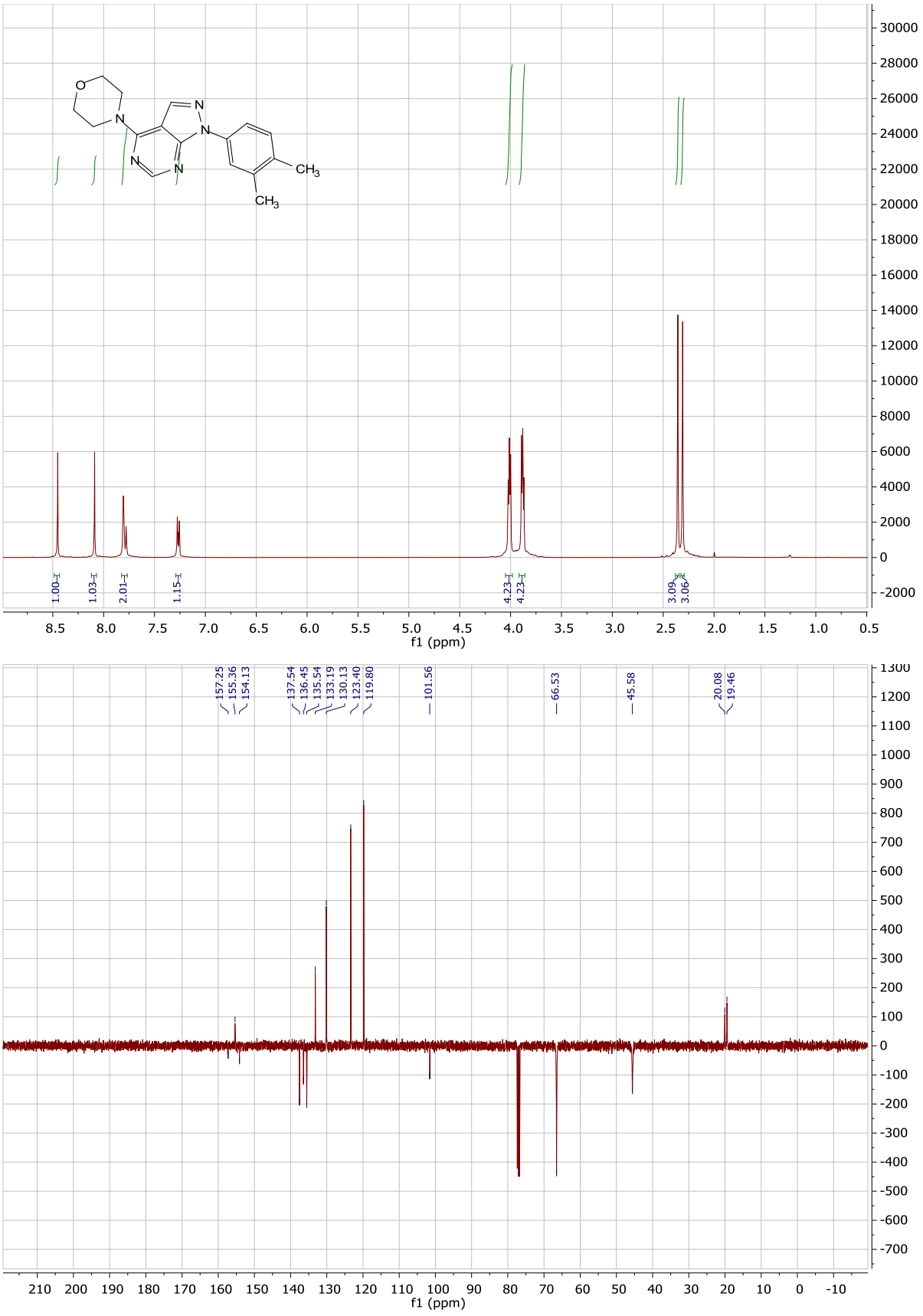


*Abbildung 150: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **61**.*

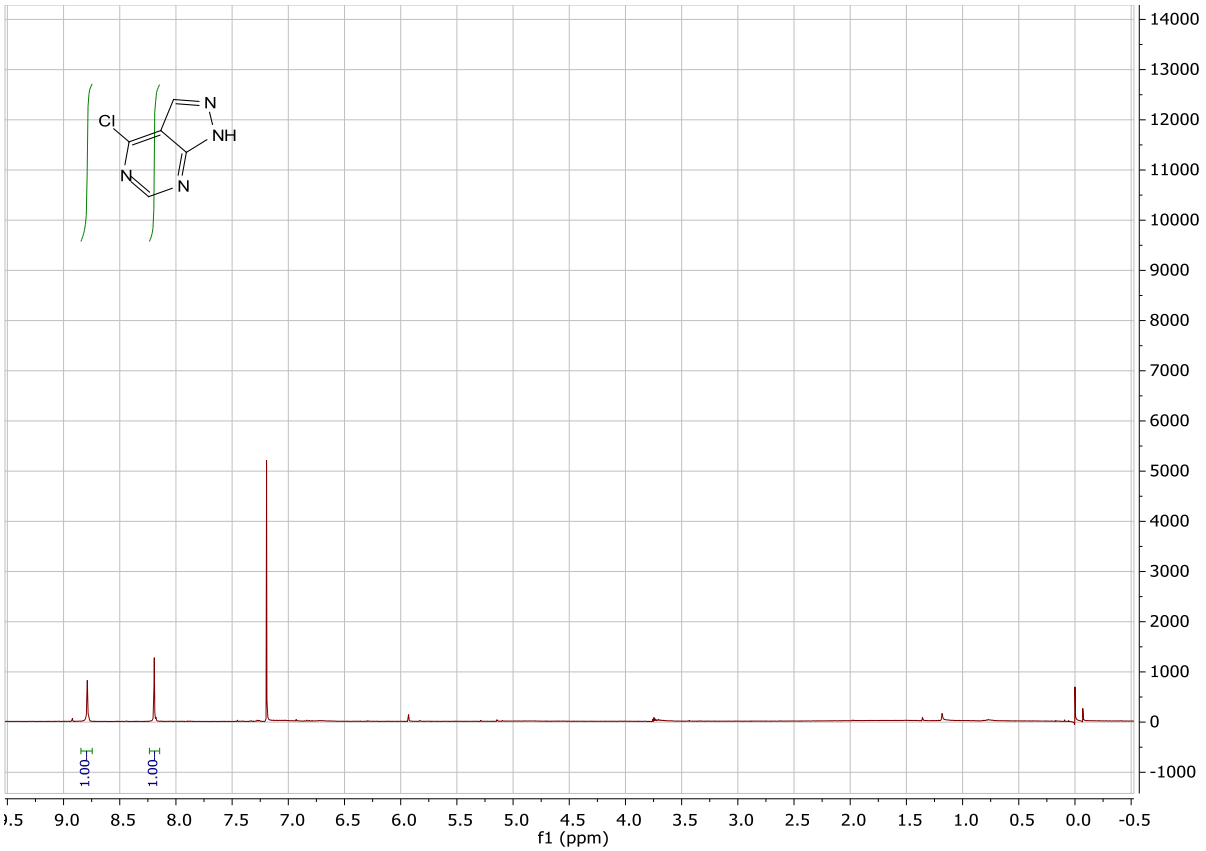


*Abbildung 151: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **71**.*

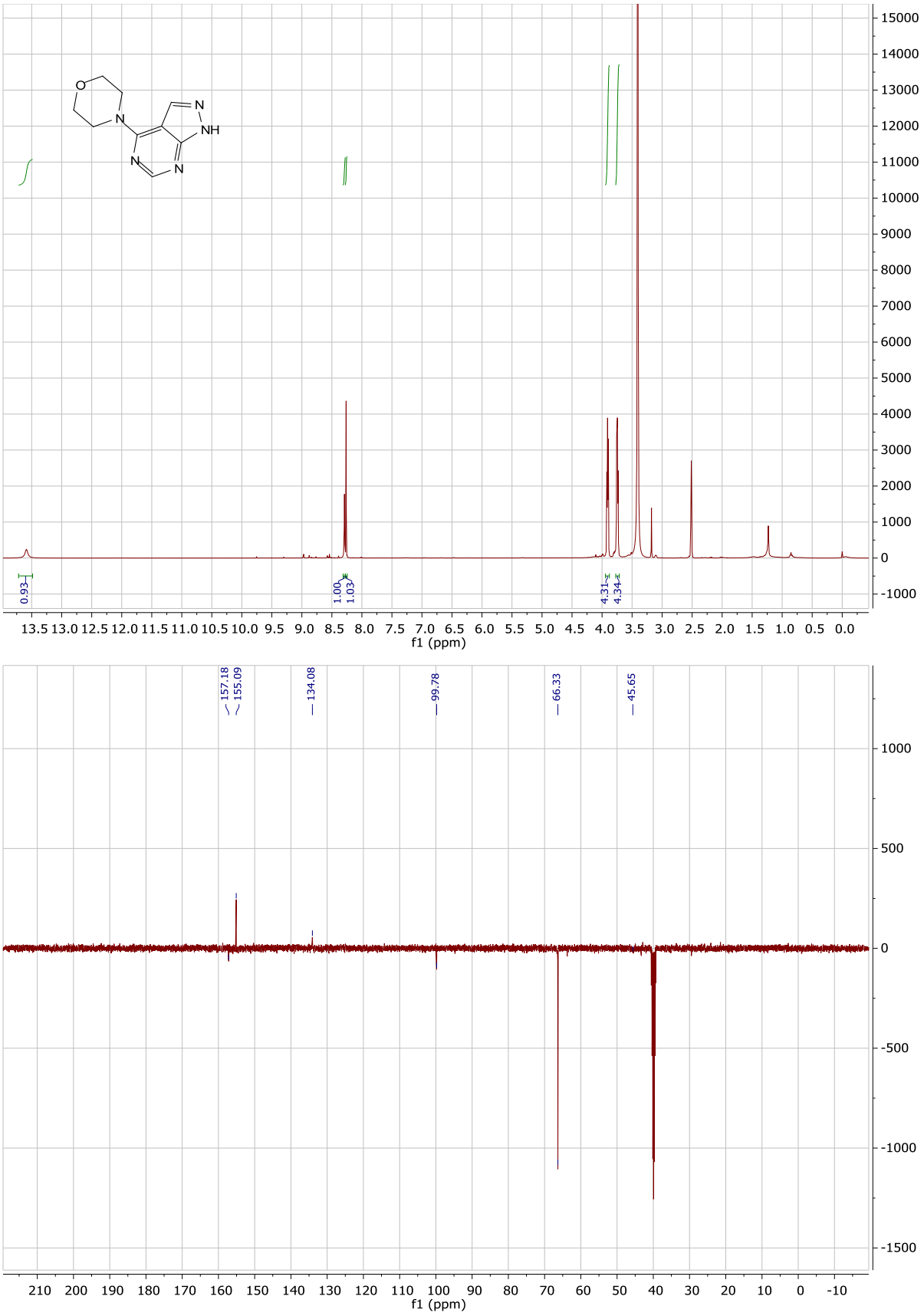


*Abbildung 152: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **72**.*

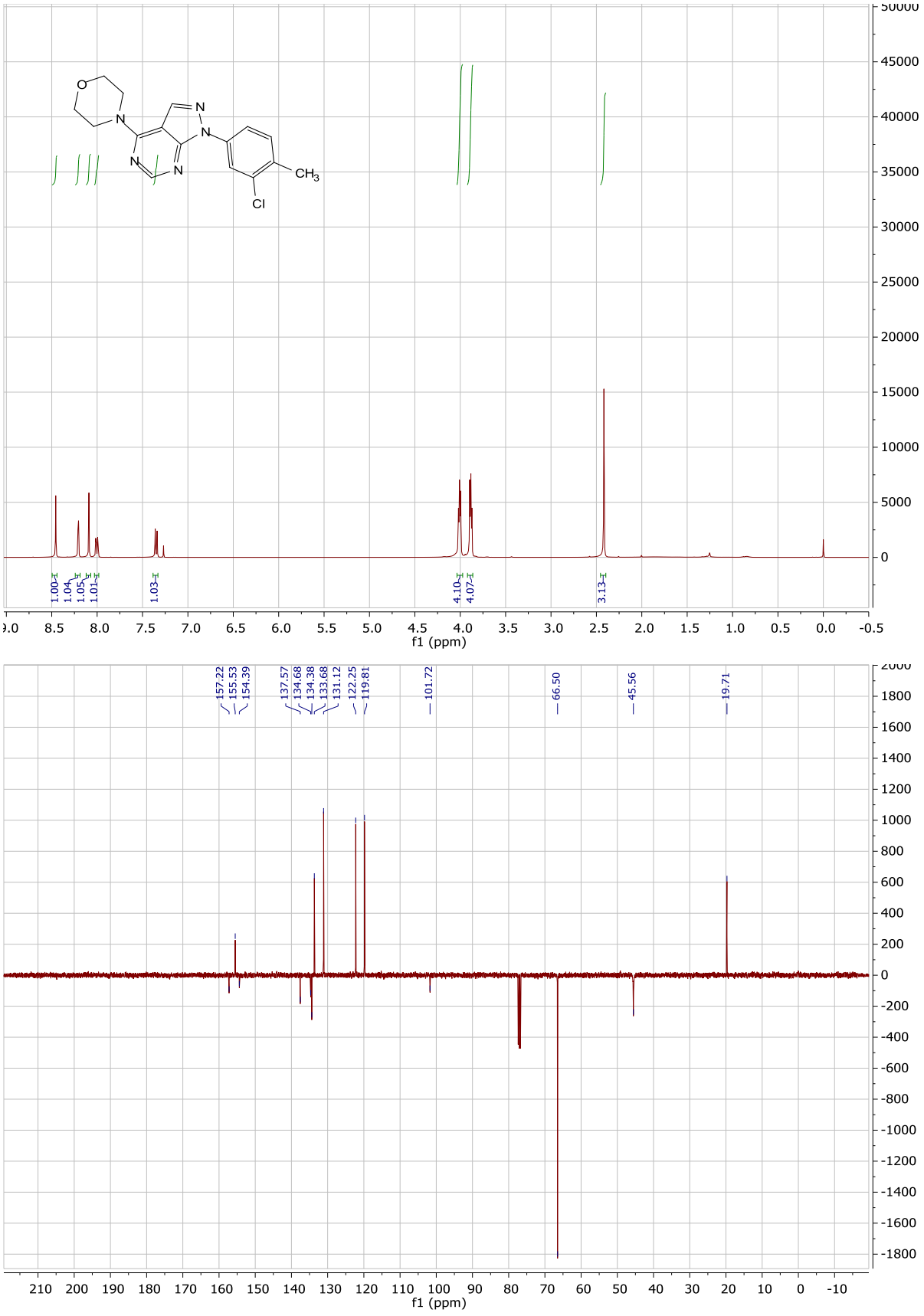


*Abbildung 153: [1]H- und [13]C-Spektrum von **73**.*

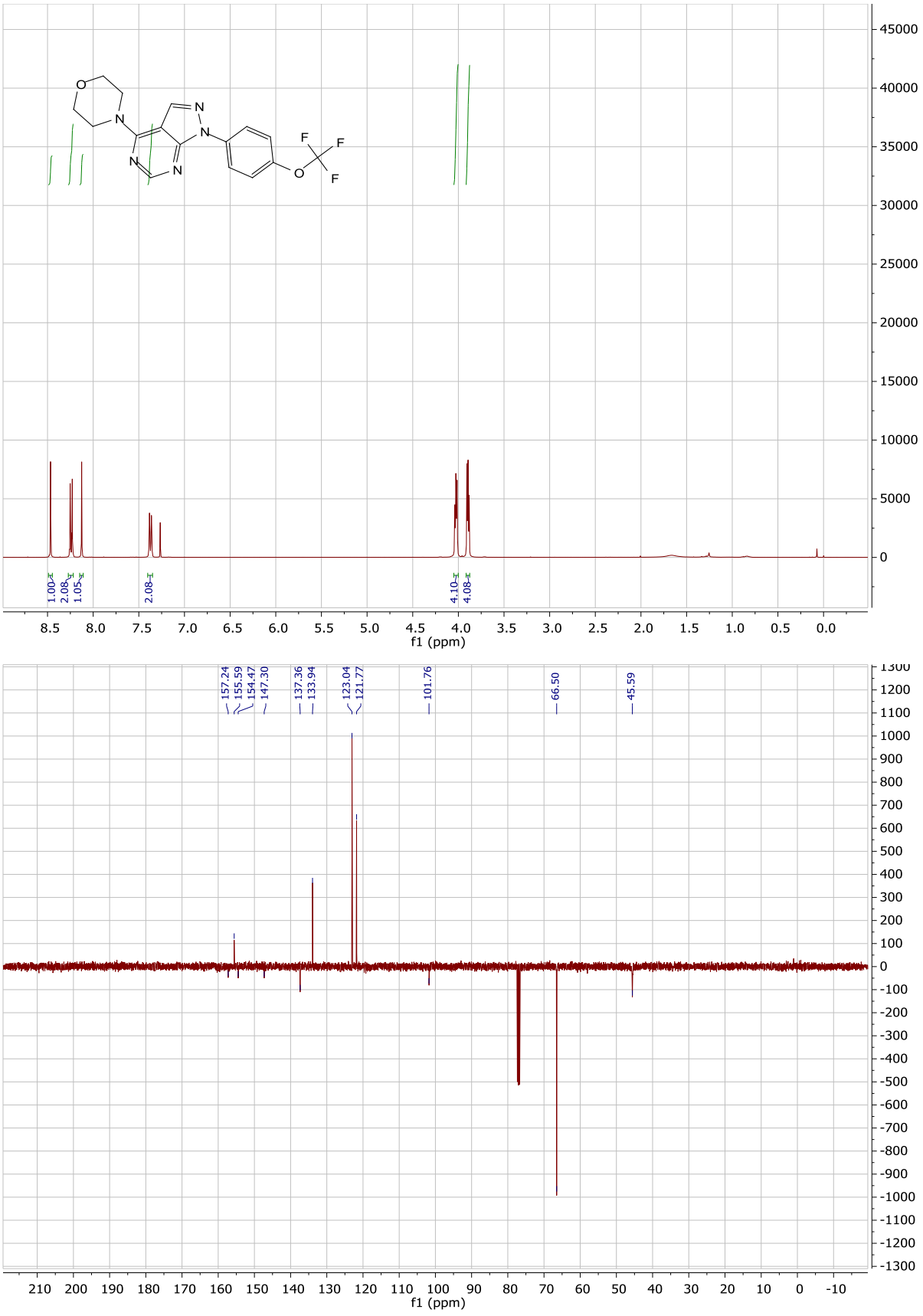


*Abbildung 154: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **74**.*

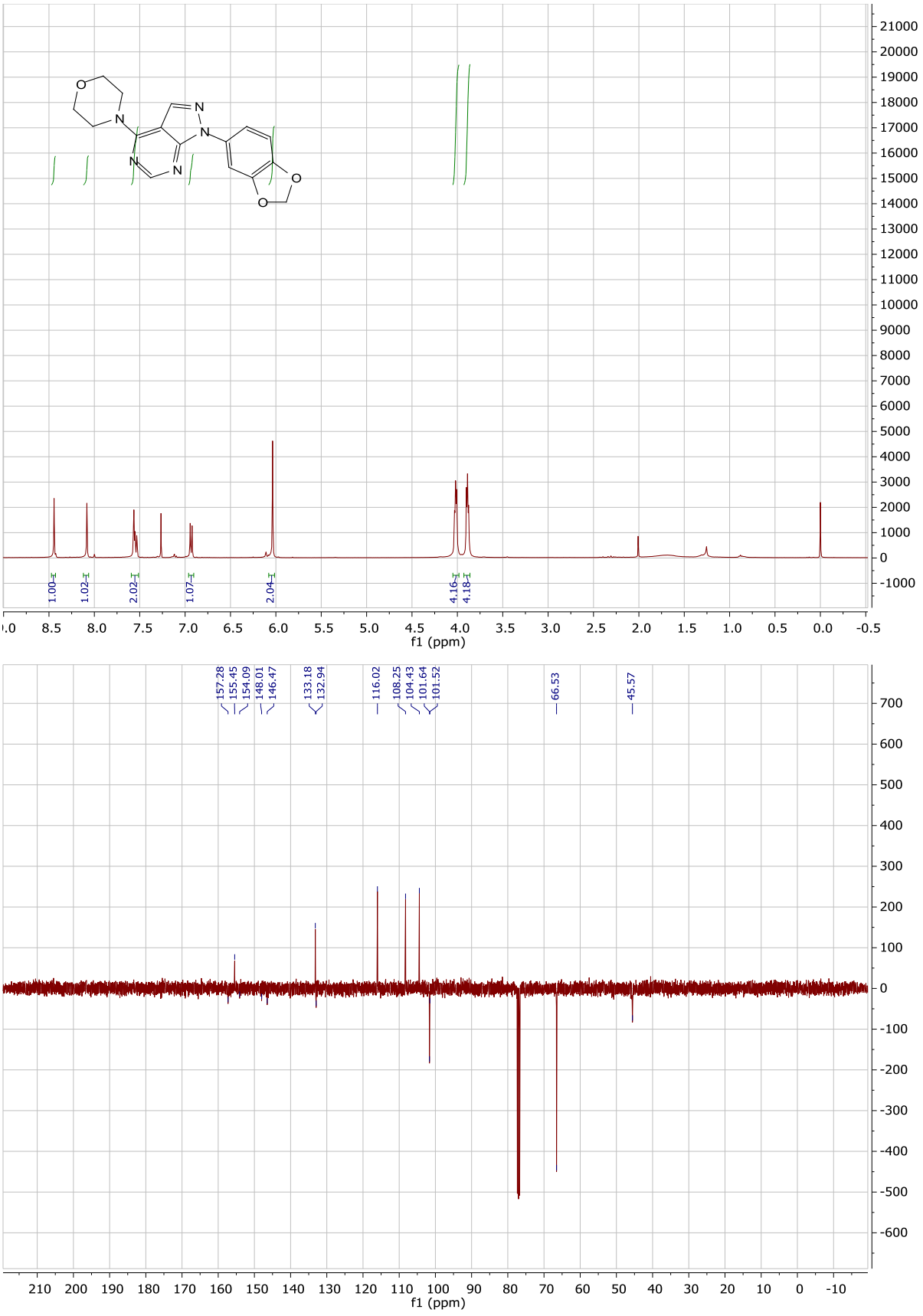


*Abbildung 155: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **75**.*

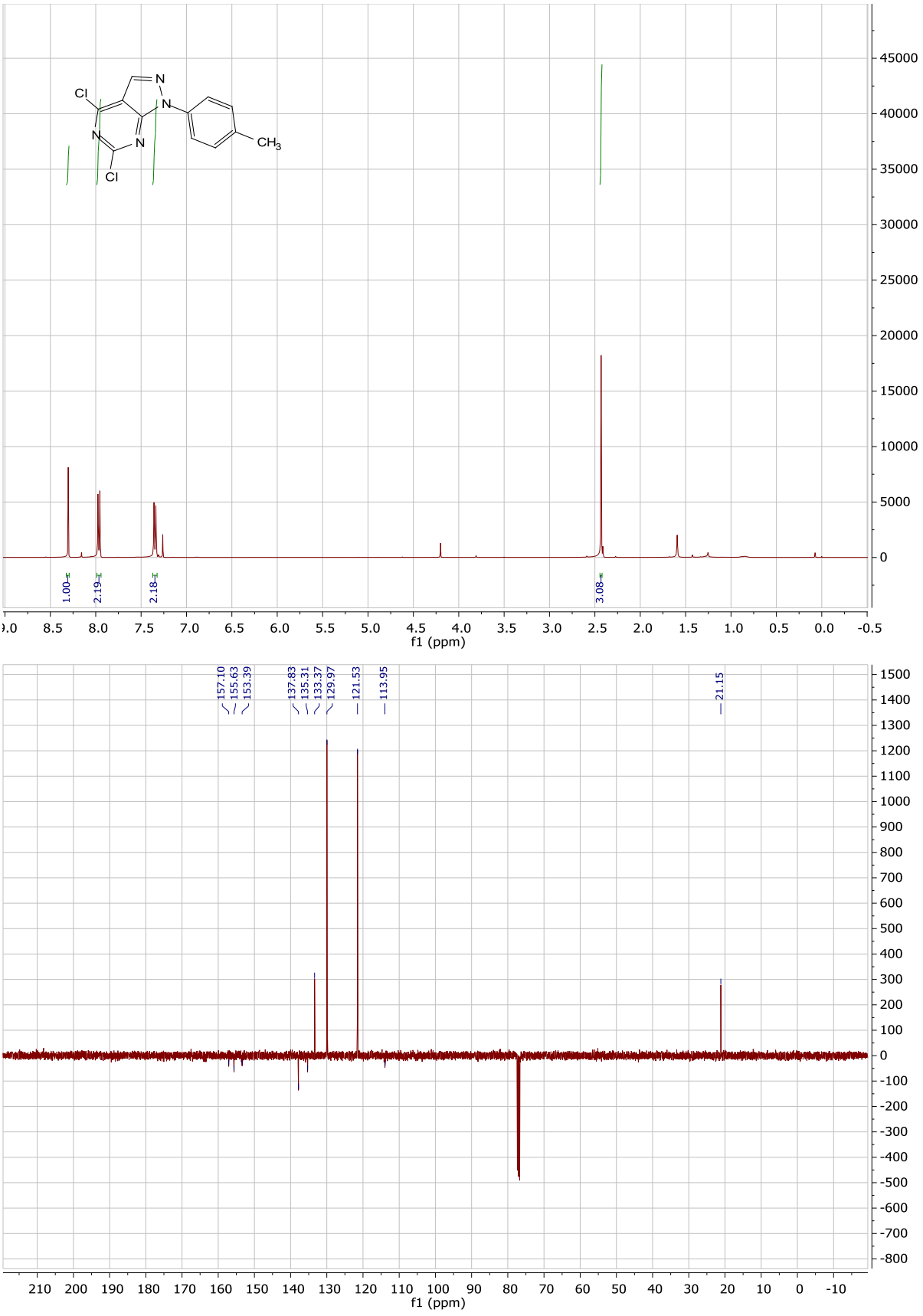


*Abbildung 156: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **81**.*

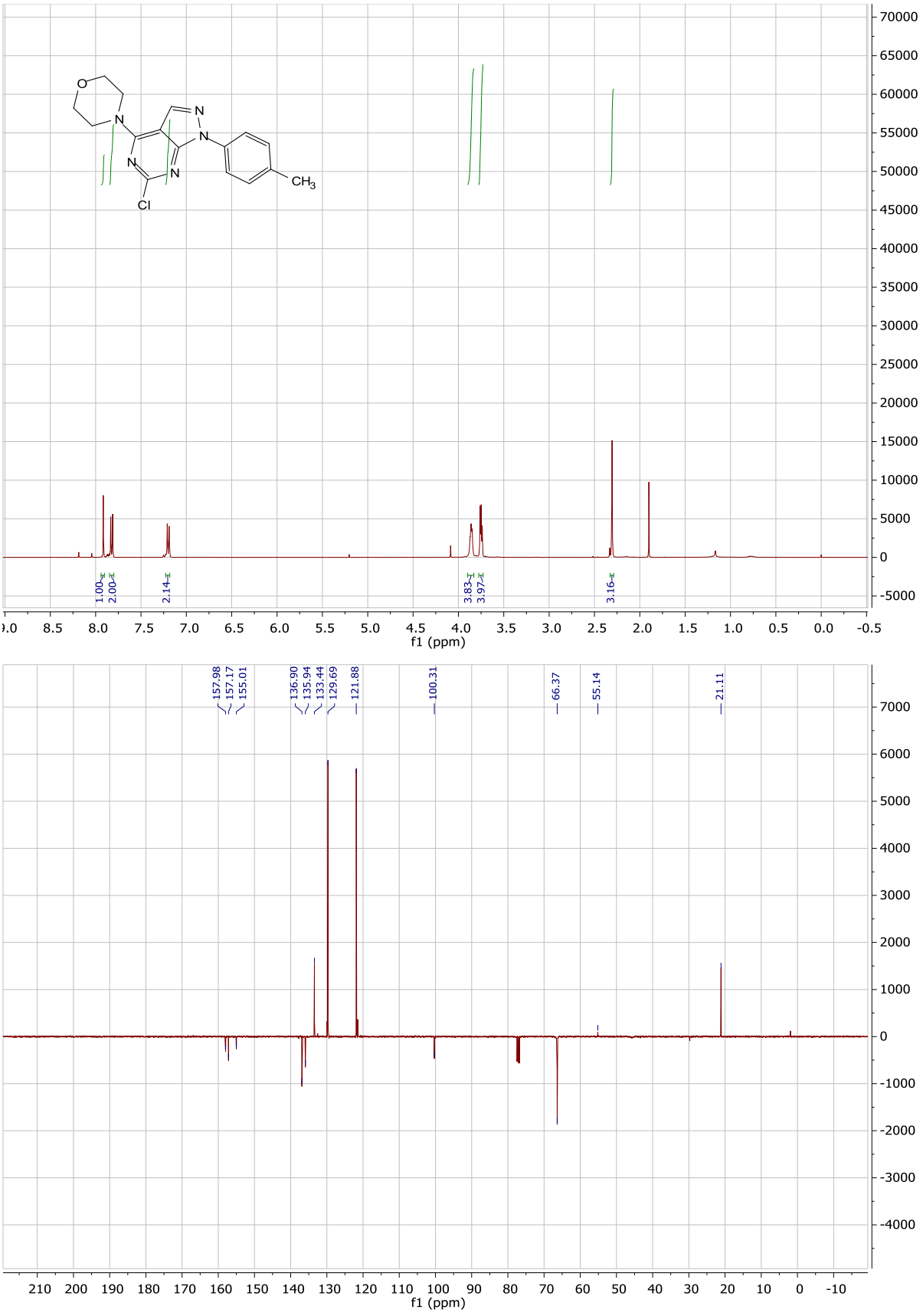


*Abbildung 157: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **82**.*

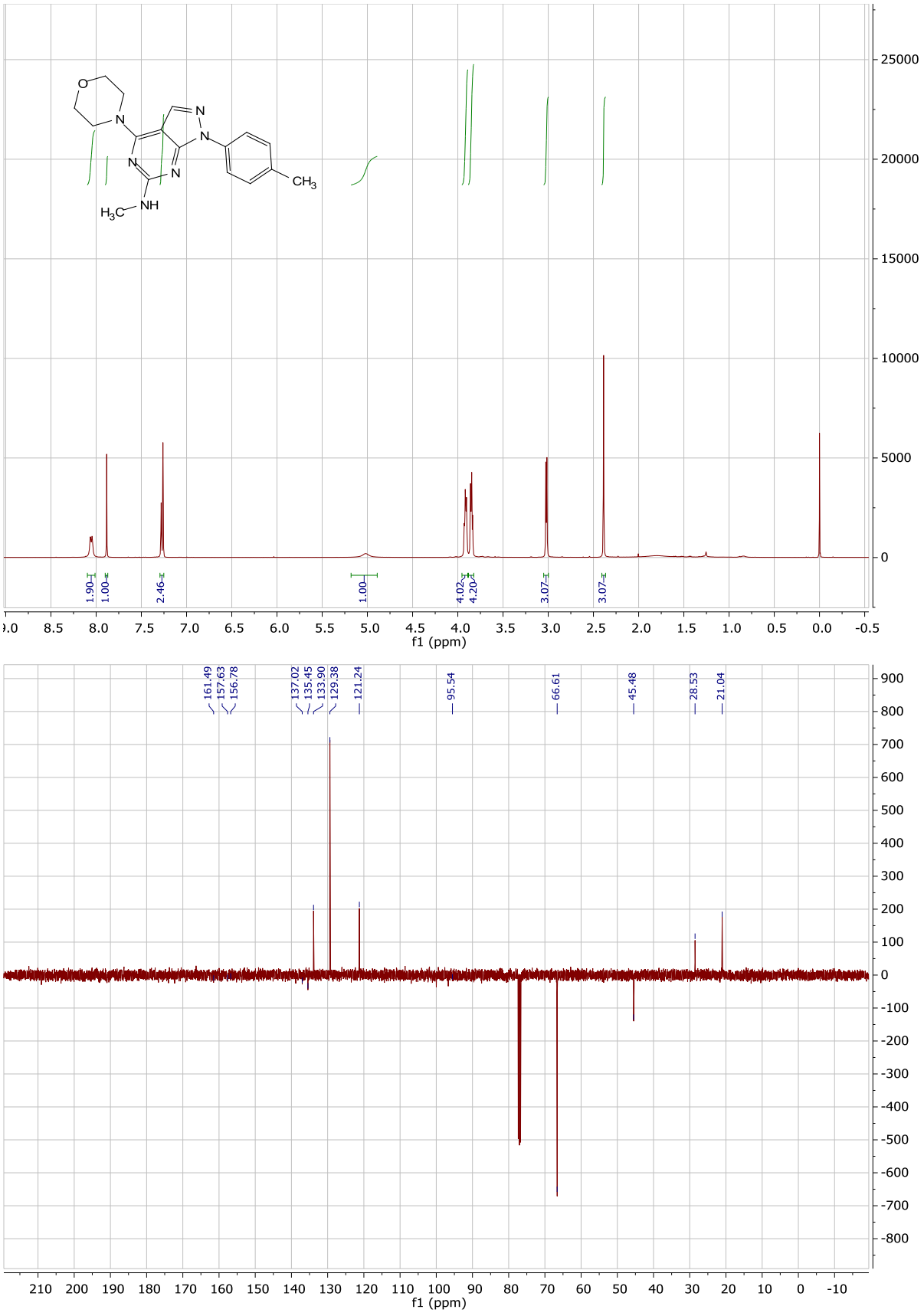


*Abbildung 158: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **84**.*

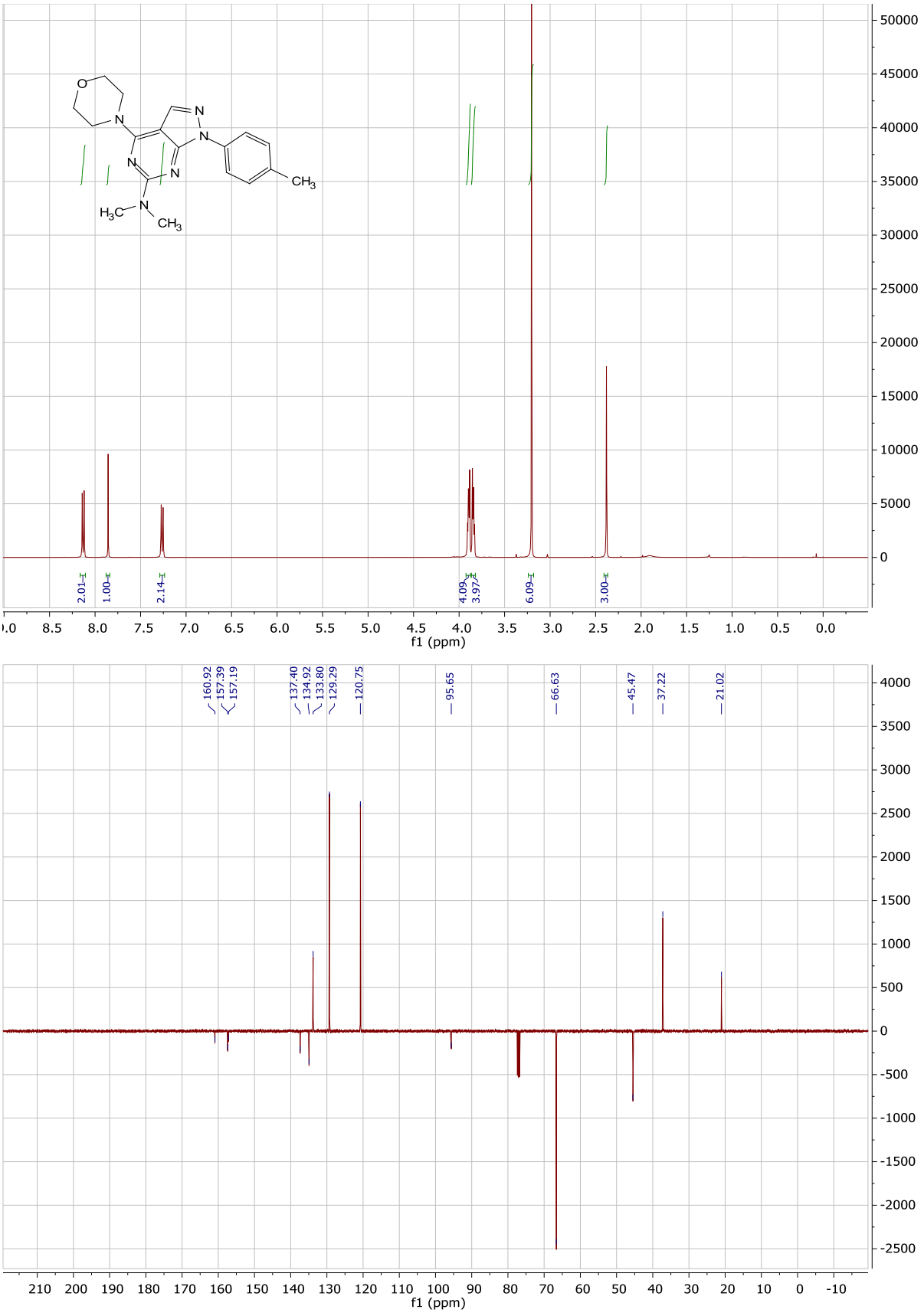


*Abbildung 159: [1]H- und [13]C-Spektrum von **85**.*

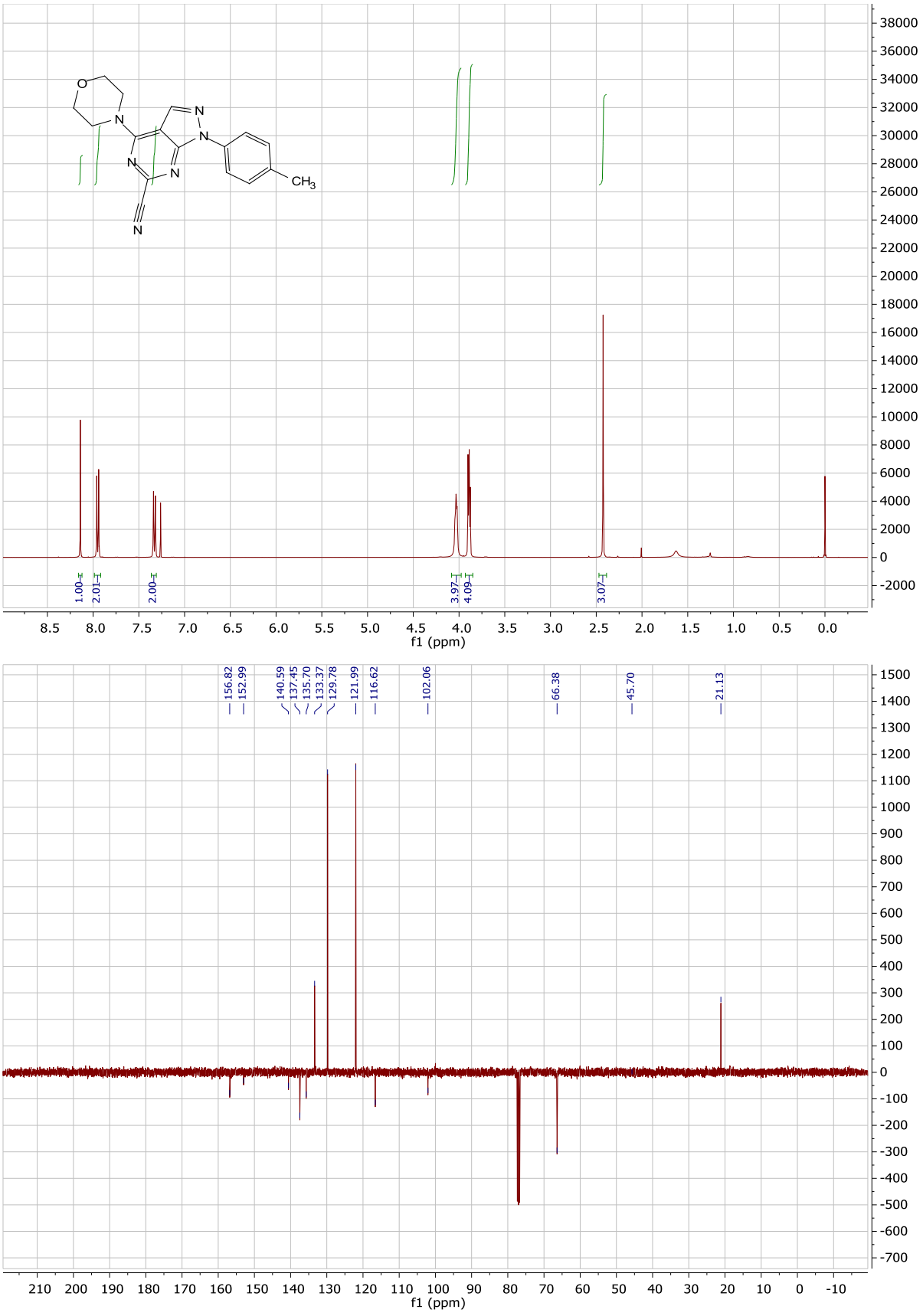


*Abbildung 160: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **86**.*

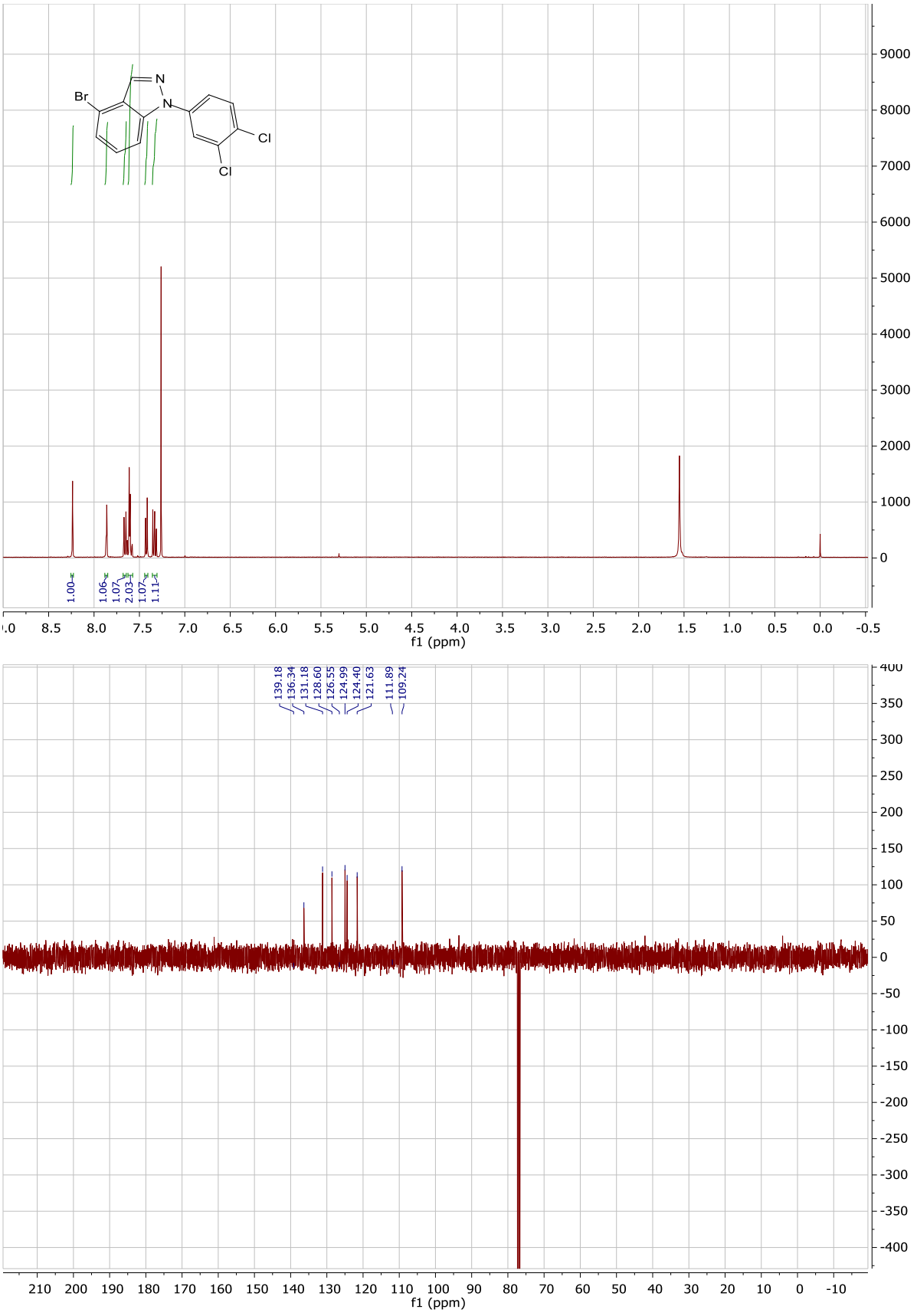


*Abbildung 161: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **98**.*

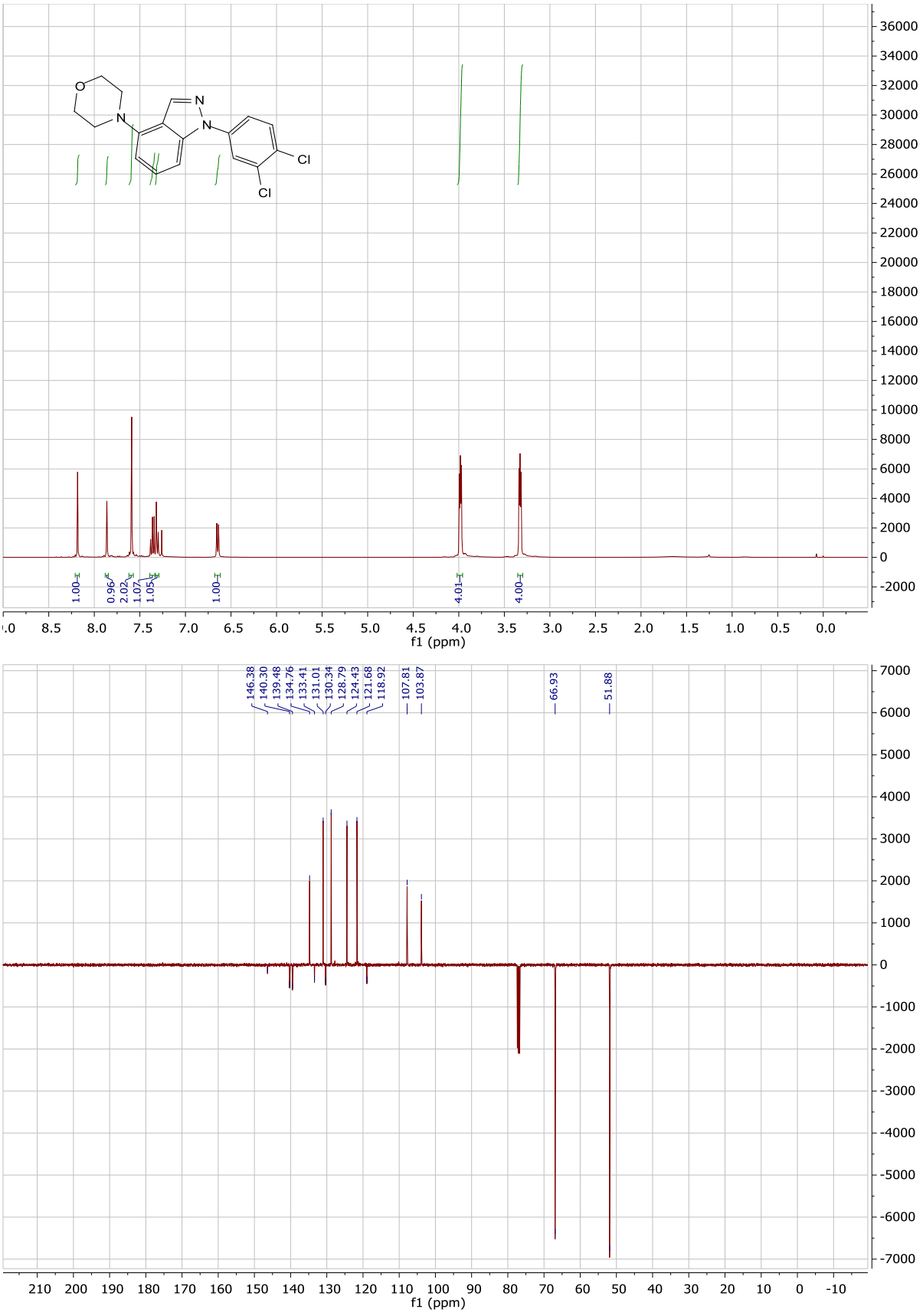


*Abbildung 162: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **87**.*

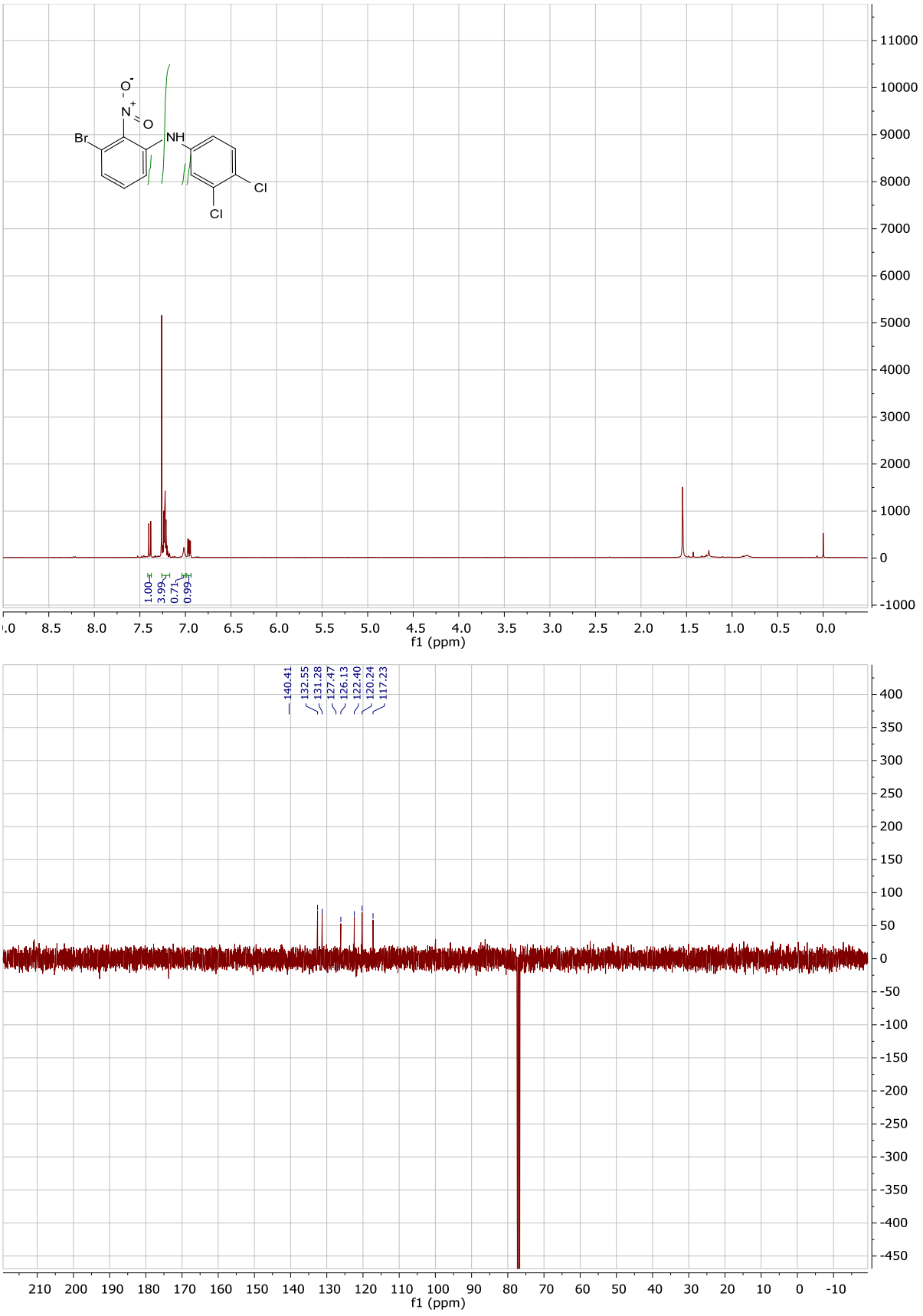


*Abbildung 163: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **101**.*

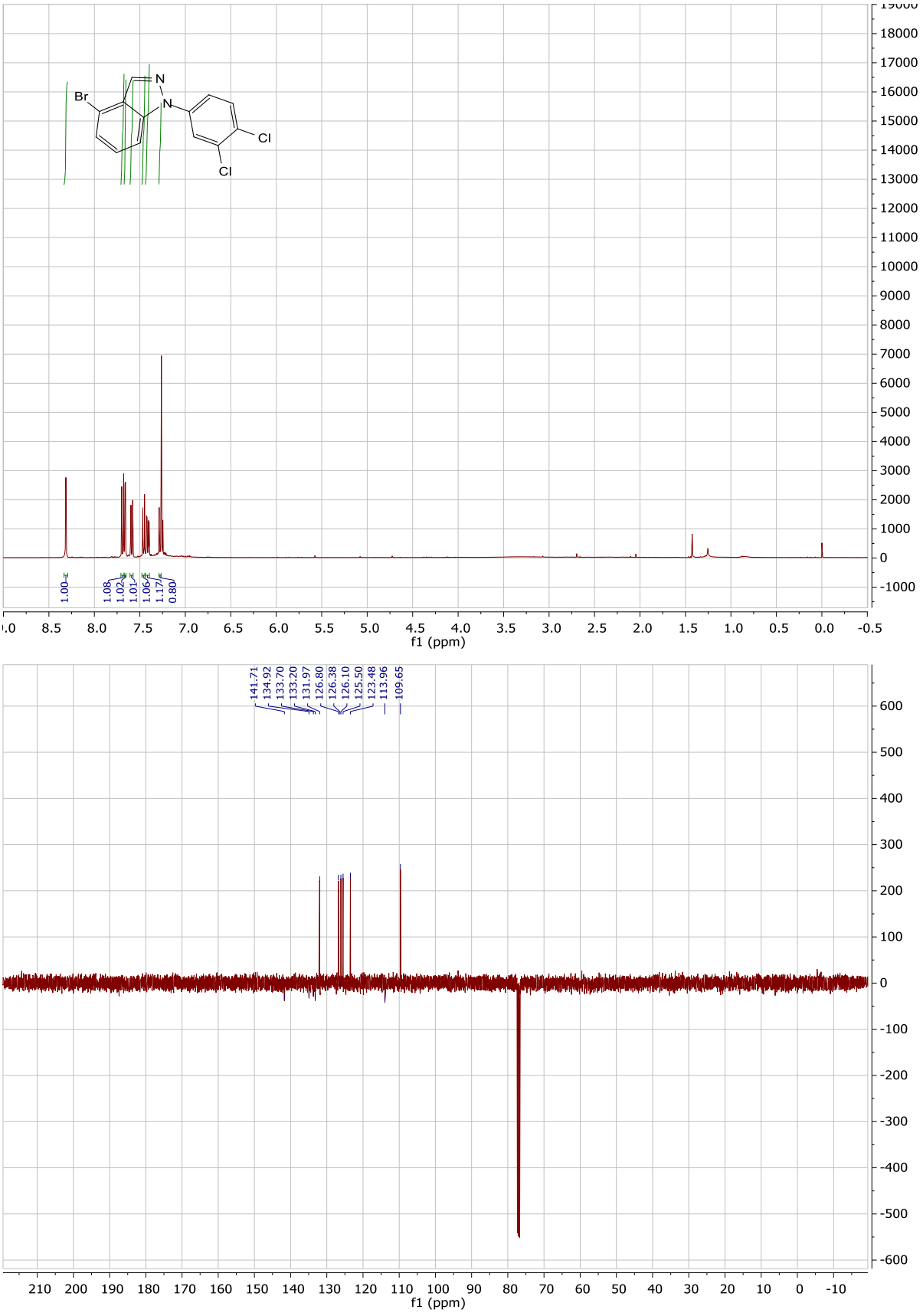


*Abbildung 164: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **102**.*

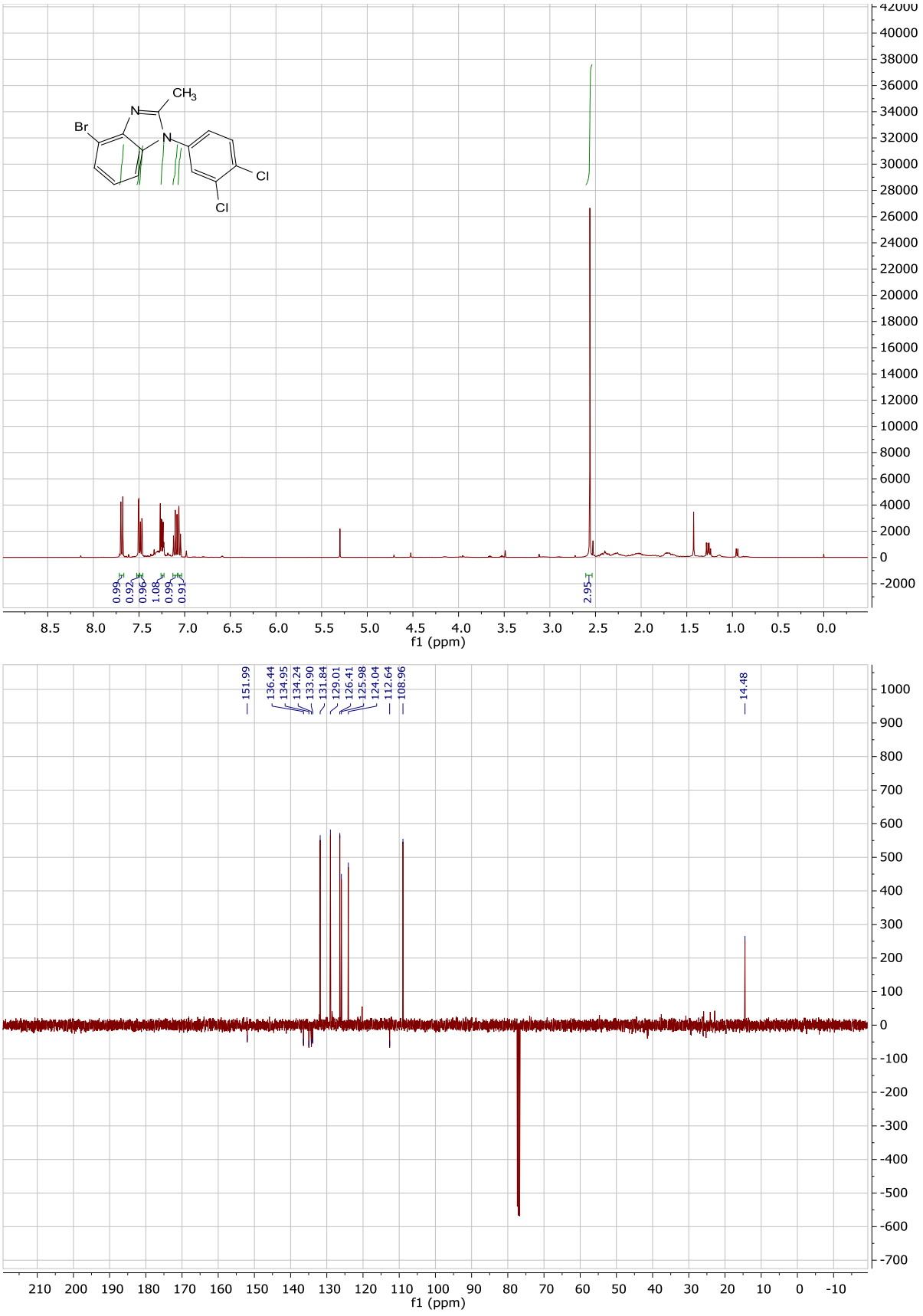


*Abbildung 165: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **104**.*

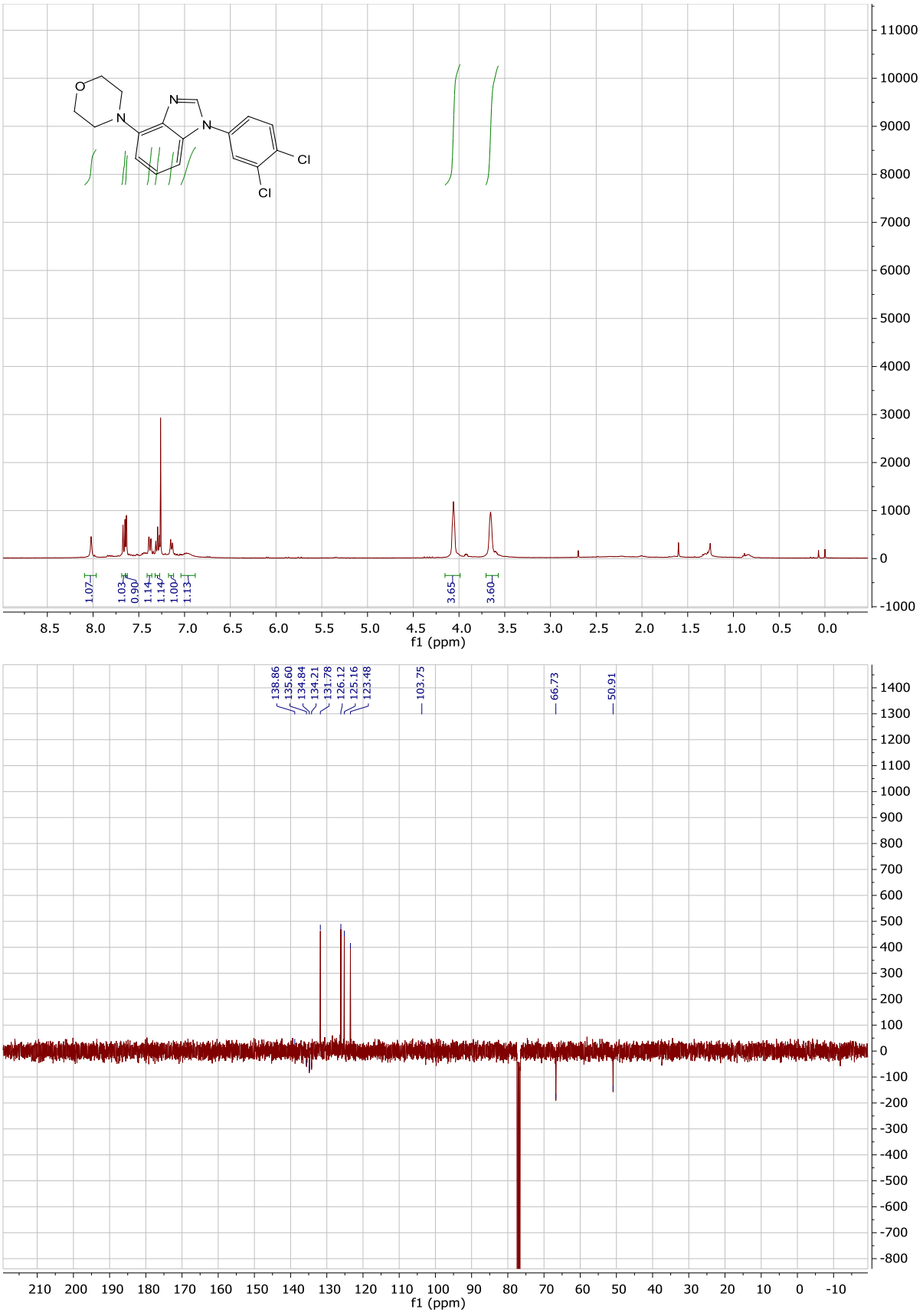


*Abbildung 166: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **88**.*

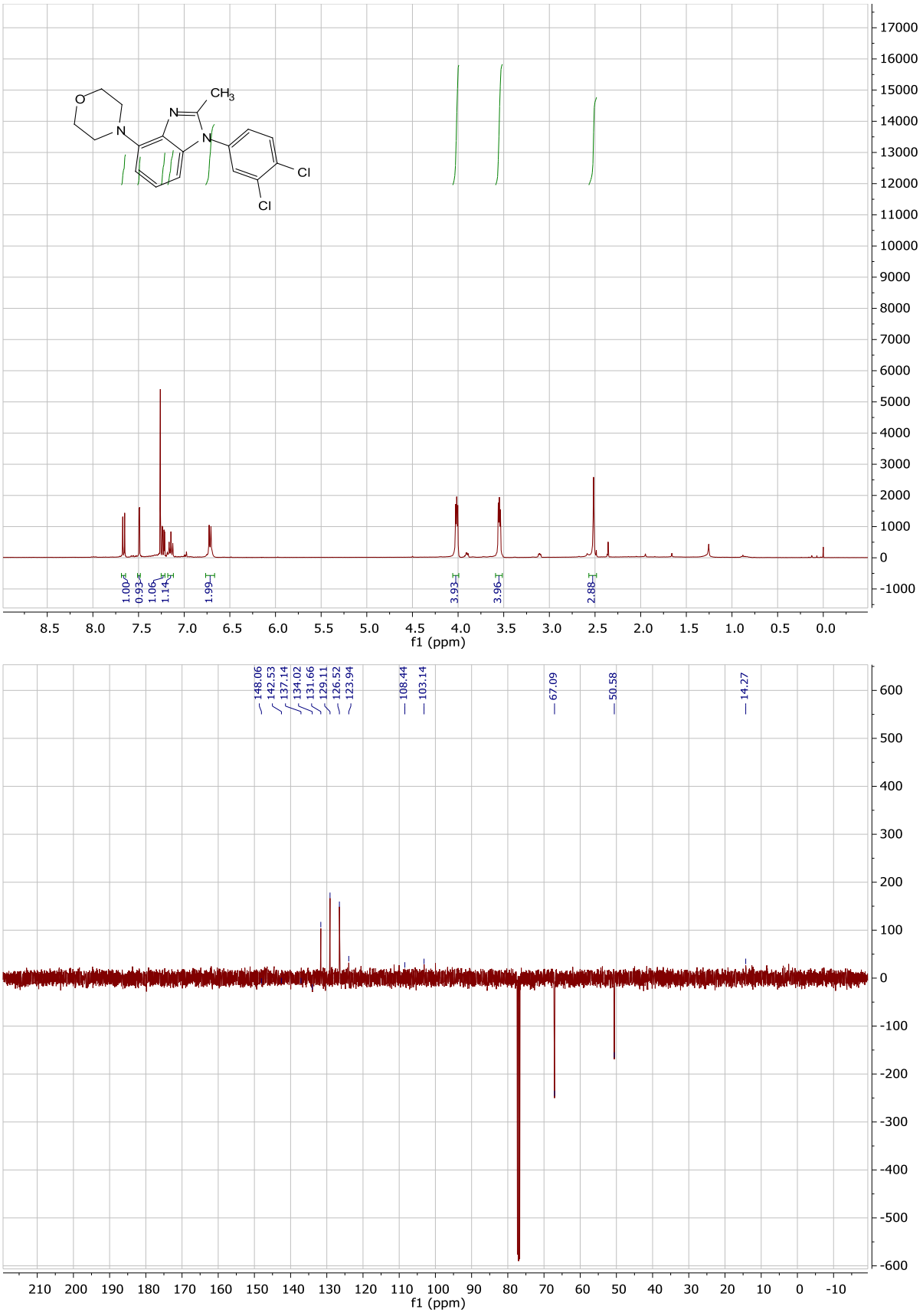


*Abbildung 167: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **103**.*

8.1.2 NUCC-555-Projekt

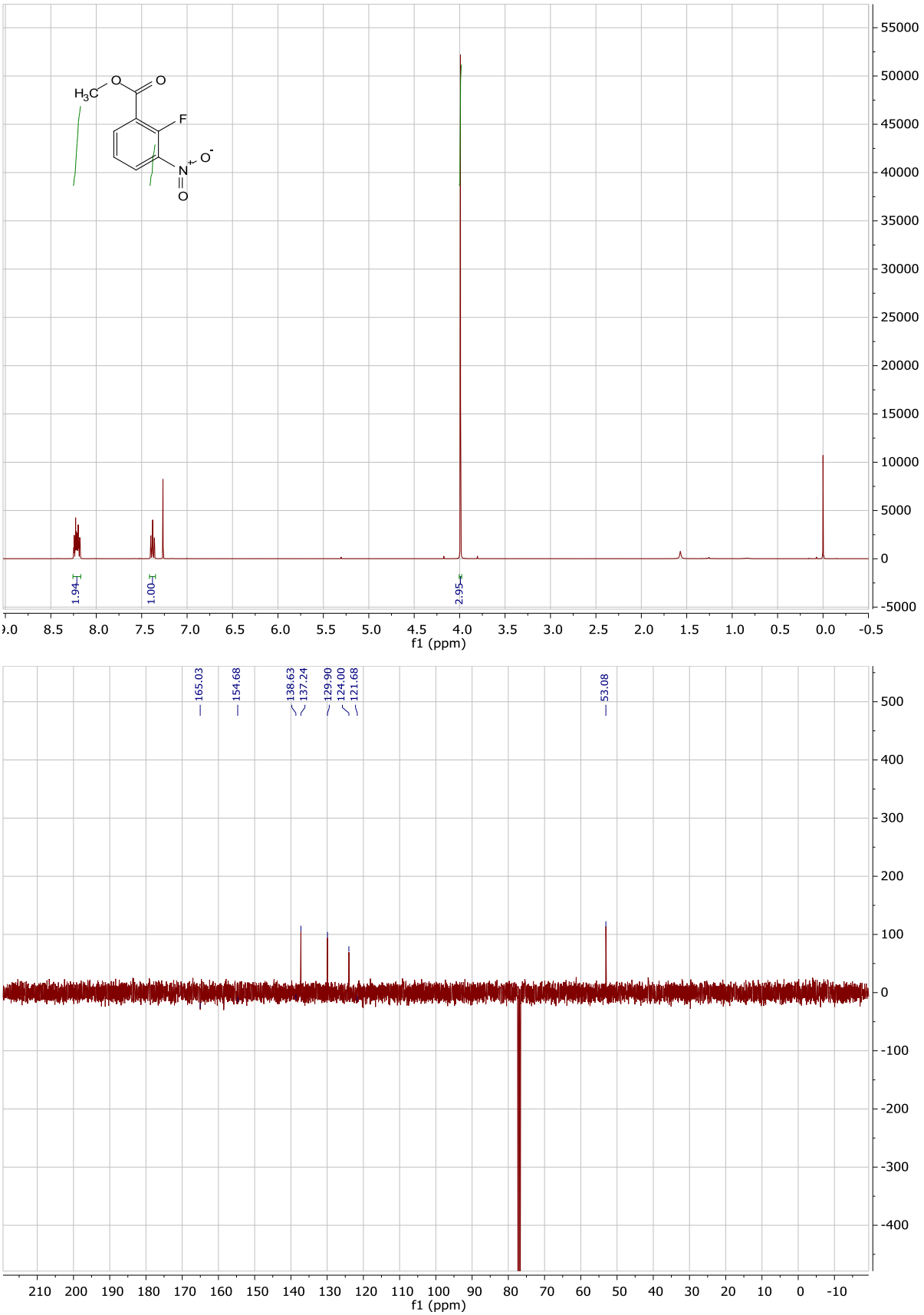


*Abbildung 168: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **120**.*

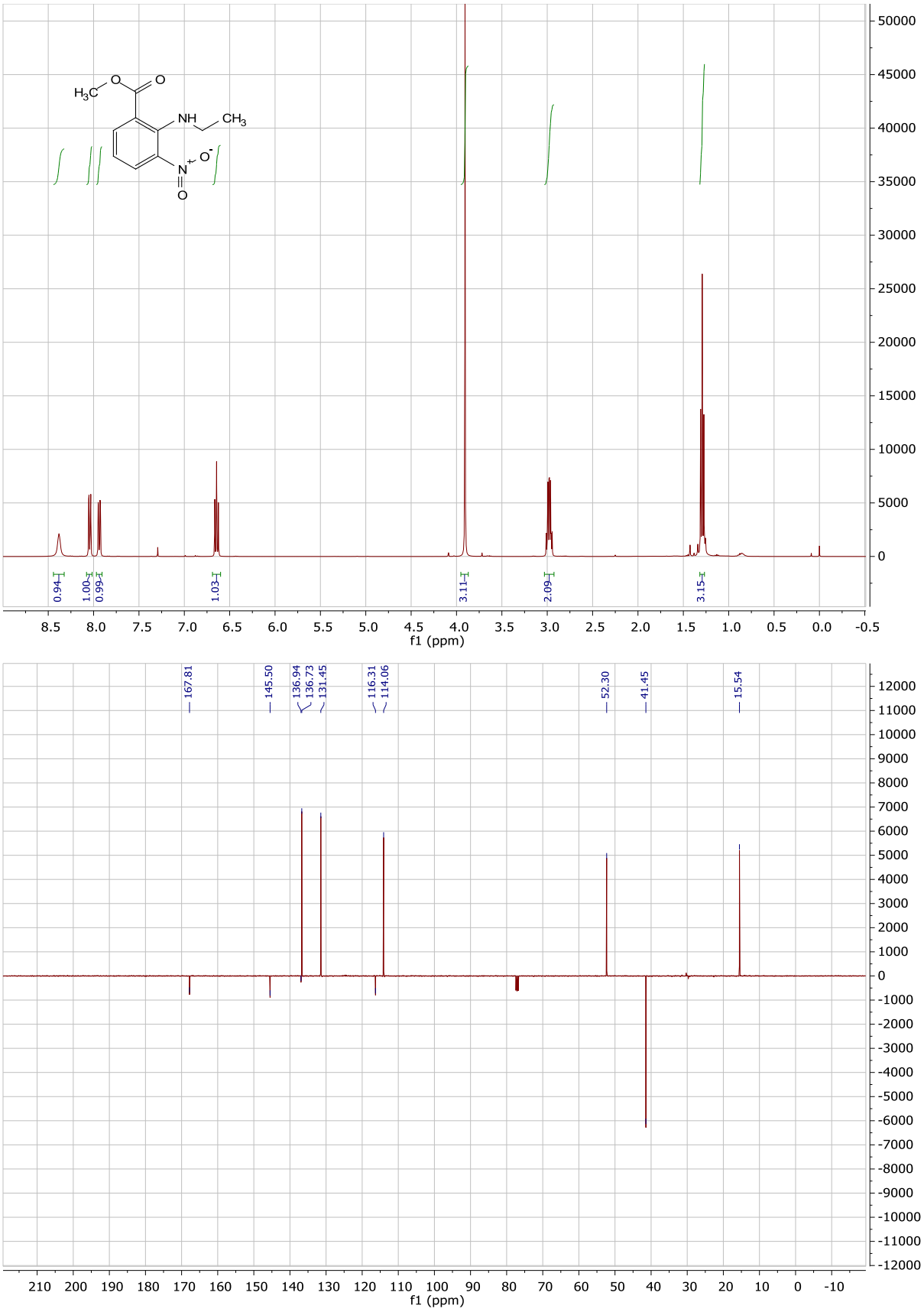


*Abbildung 169: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **121**.*

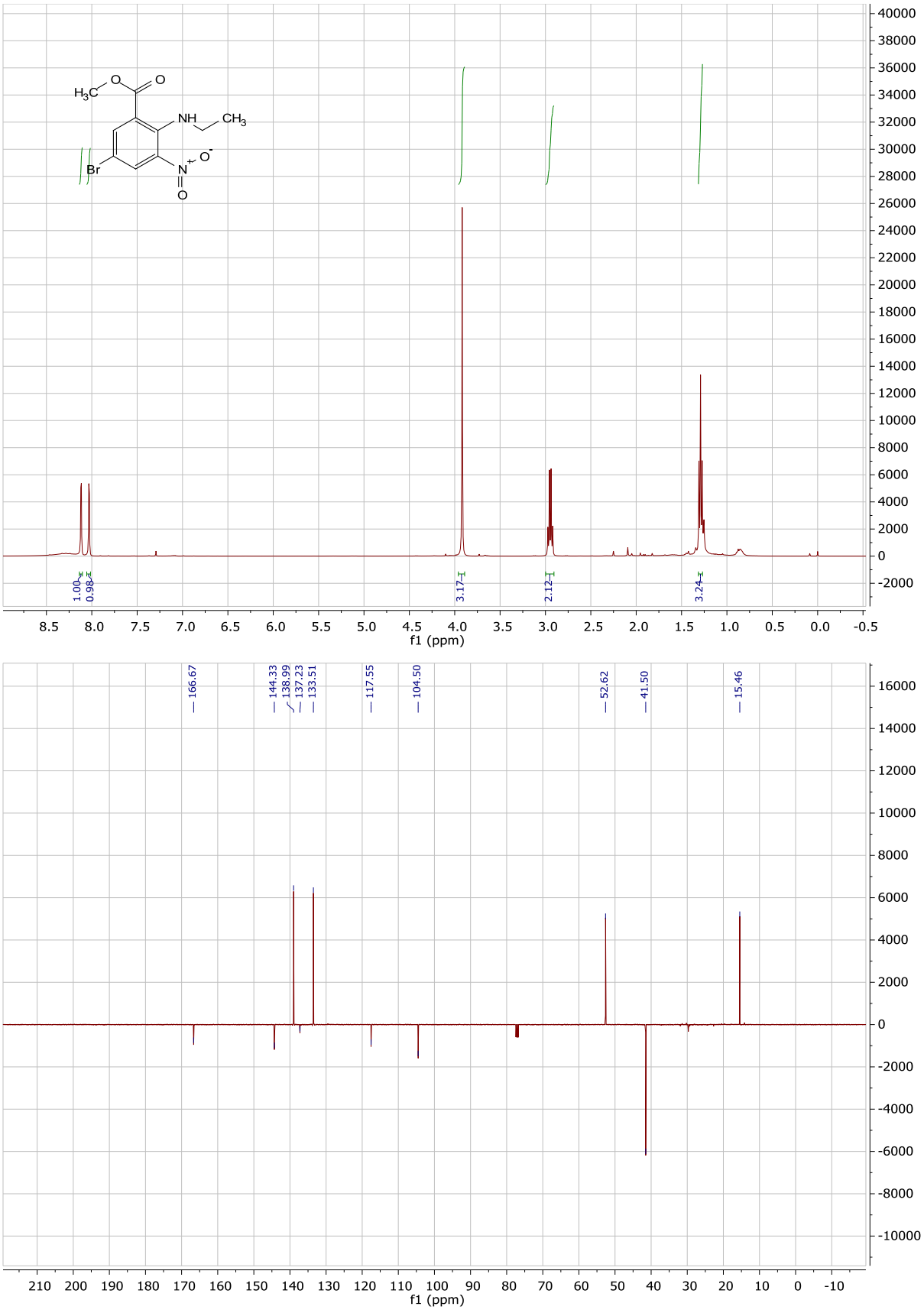


*Abbildung 170: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **122**.*

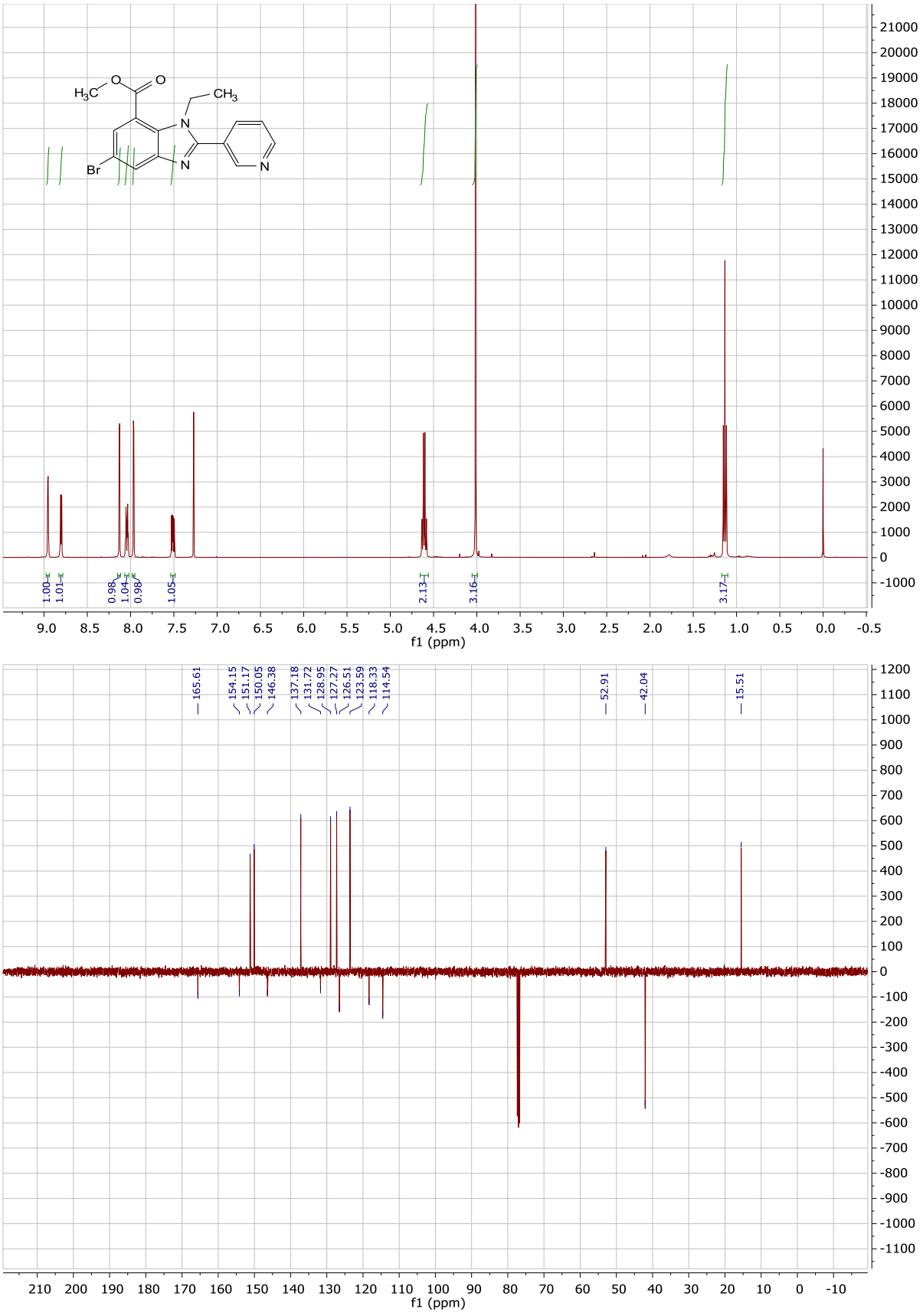


*Abbildung 171: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **124**.*

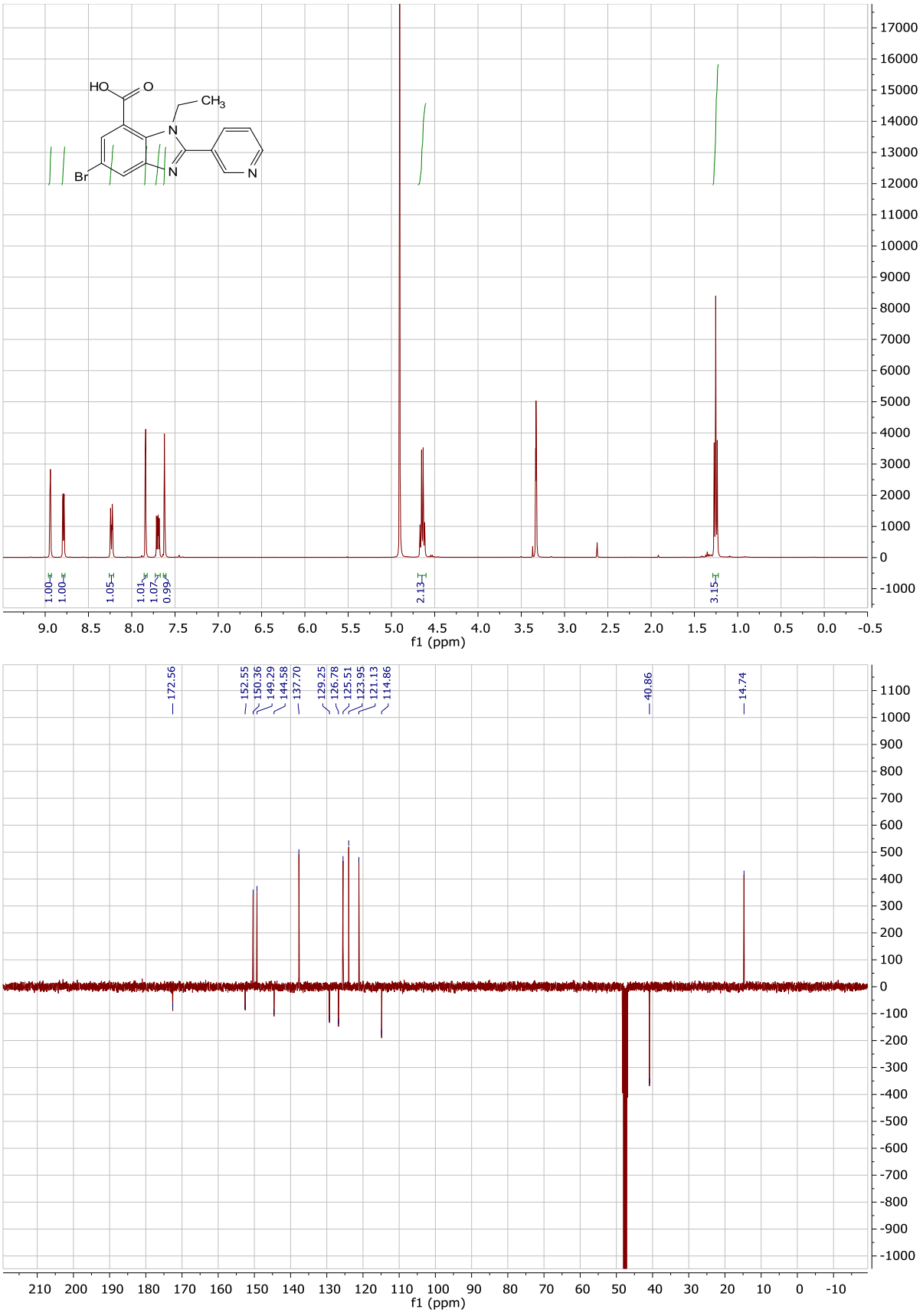


*Abbildung 172: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **137**.*

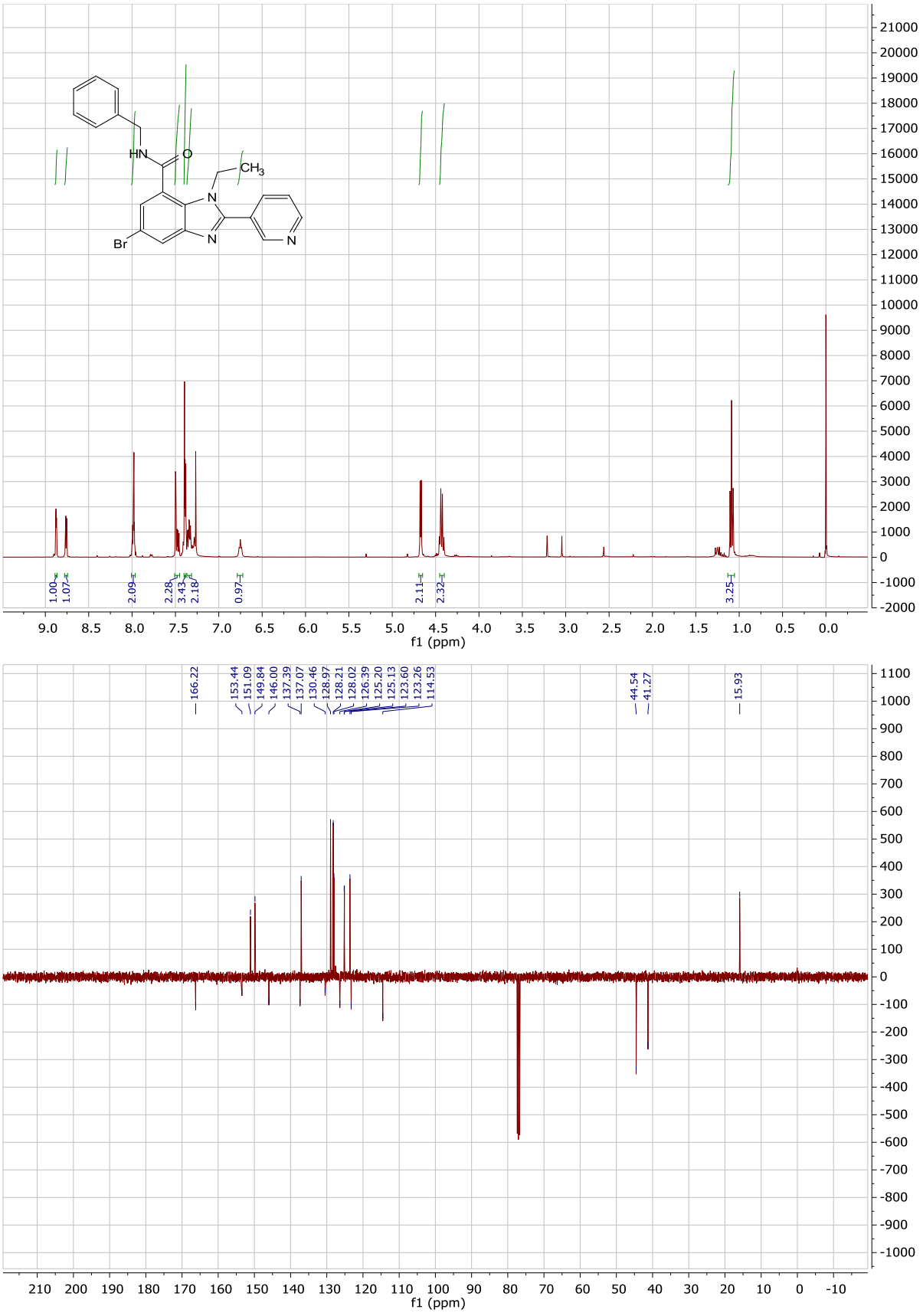


*Abbildung 173: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **138**.*

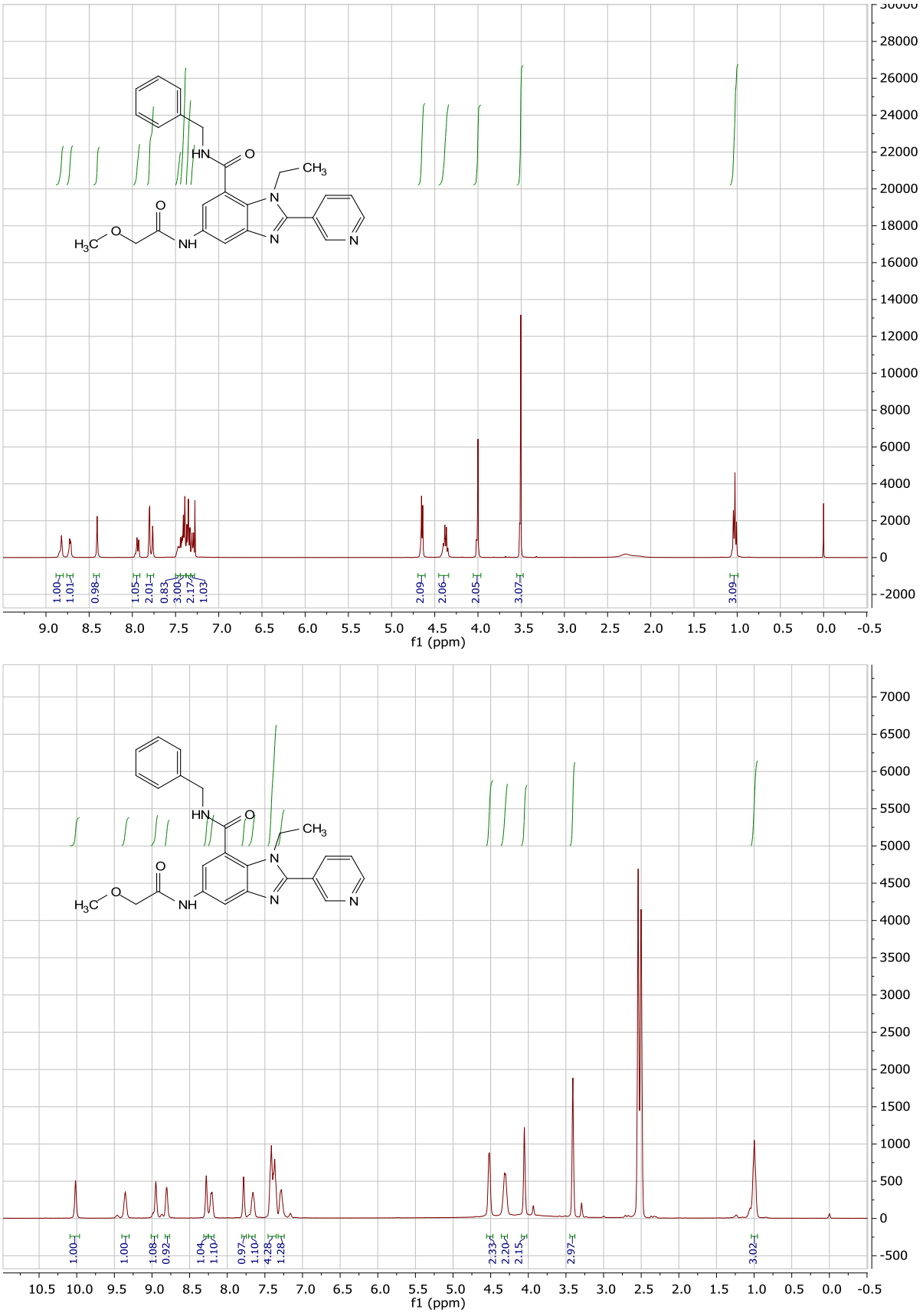


*Abbildung 174: ^{1}H-Spektrum von **7** (oben $CDCl_3$ unten DMSO-d_6).*

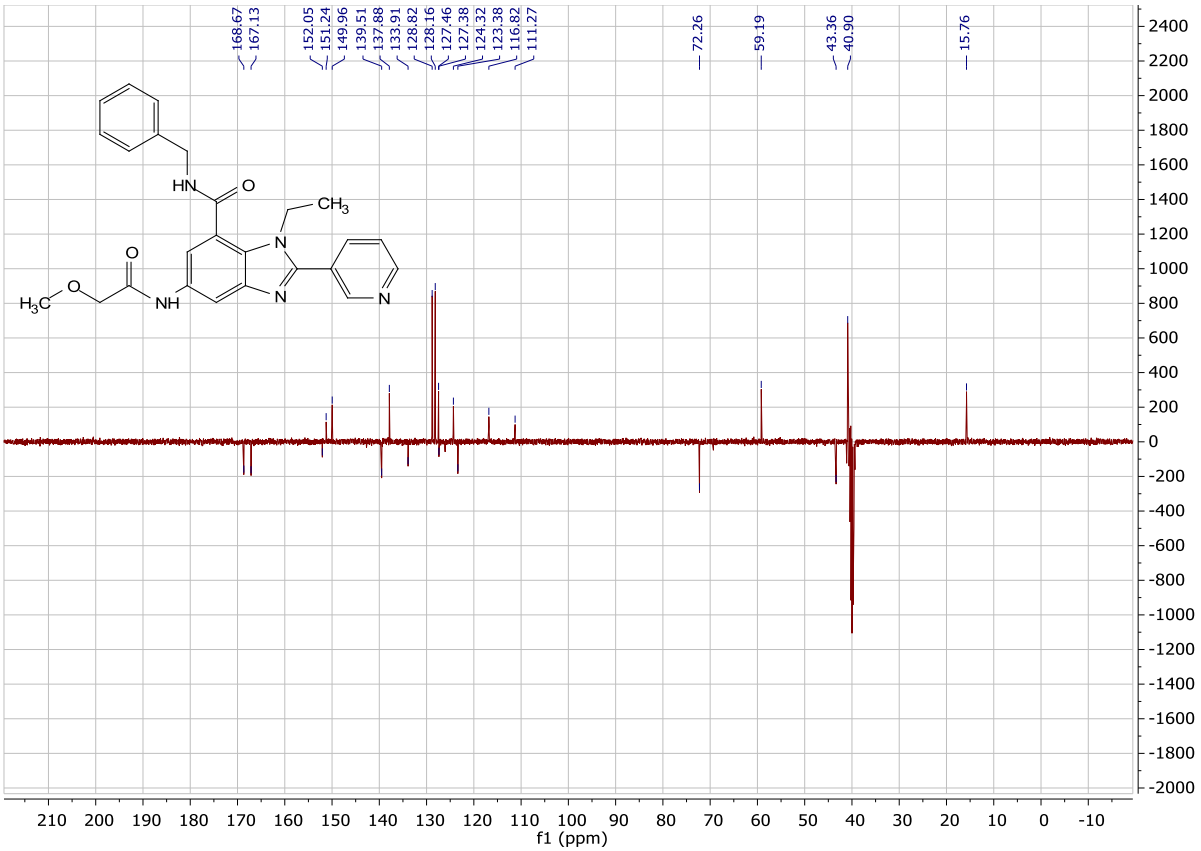


*Abbildung 175: ^{13}C-Spektrum von **7** (DMSO-d_6).*

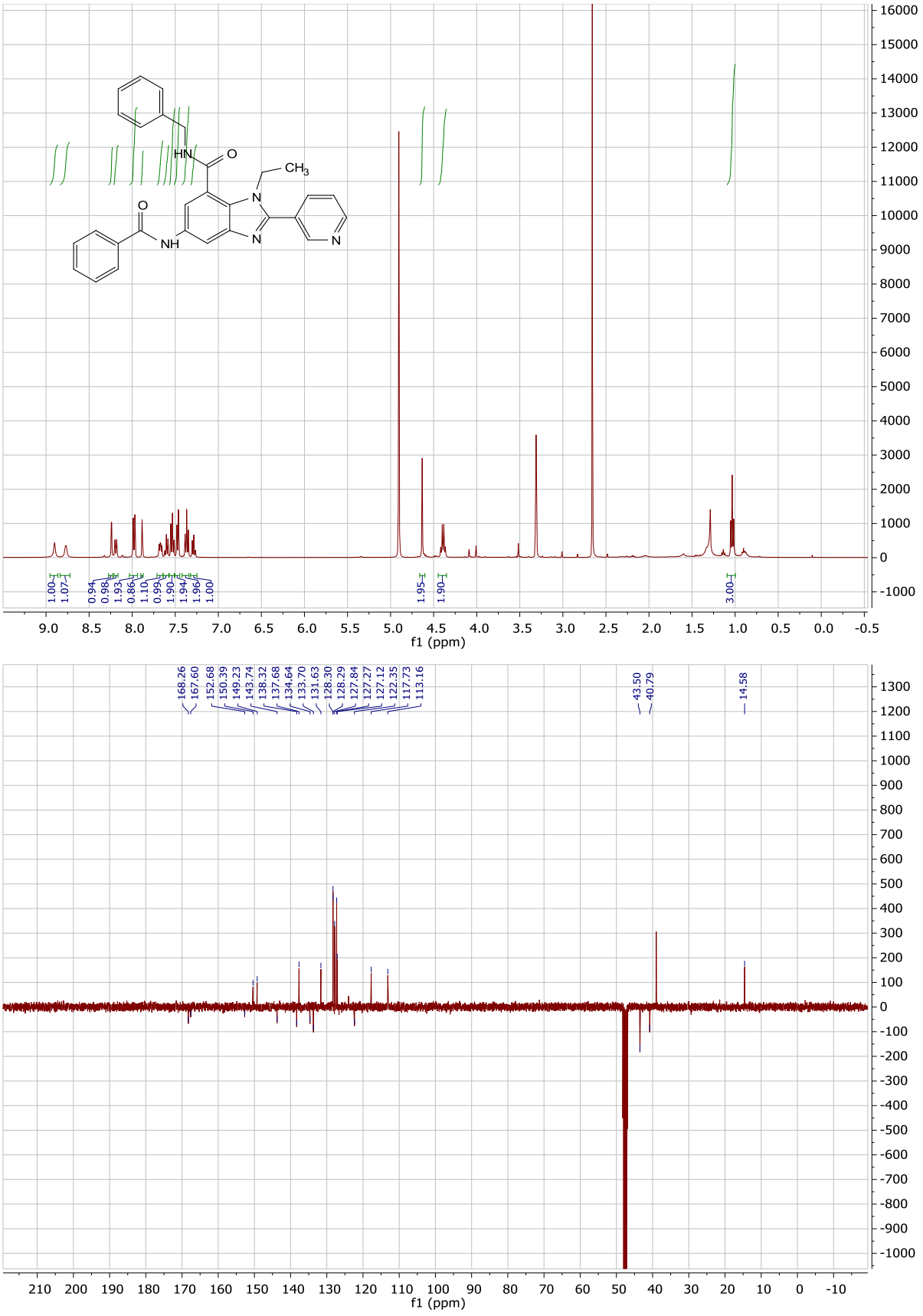


*Abbildung 176: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **141**.*

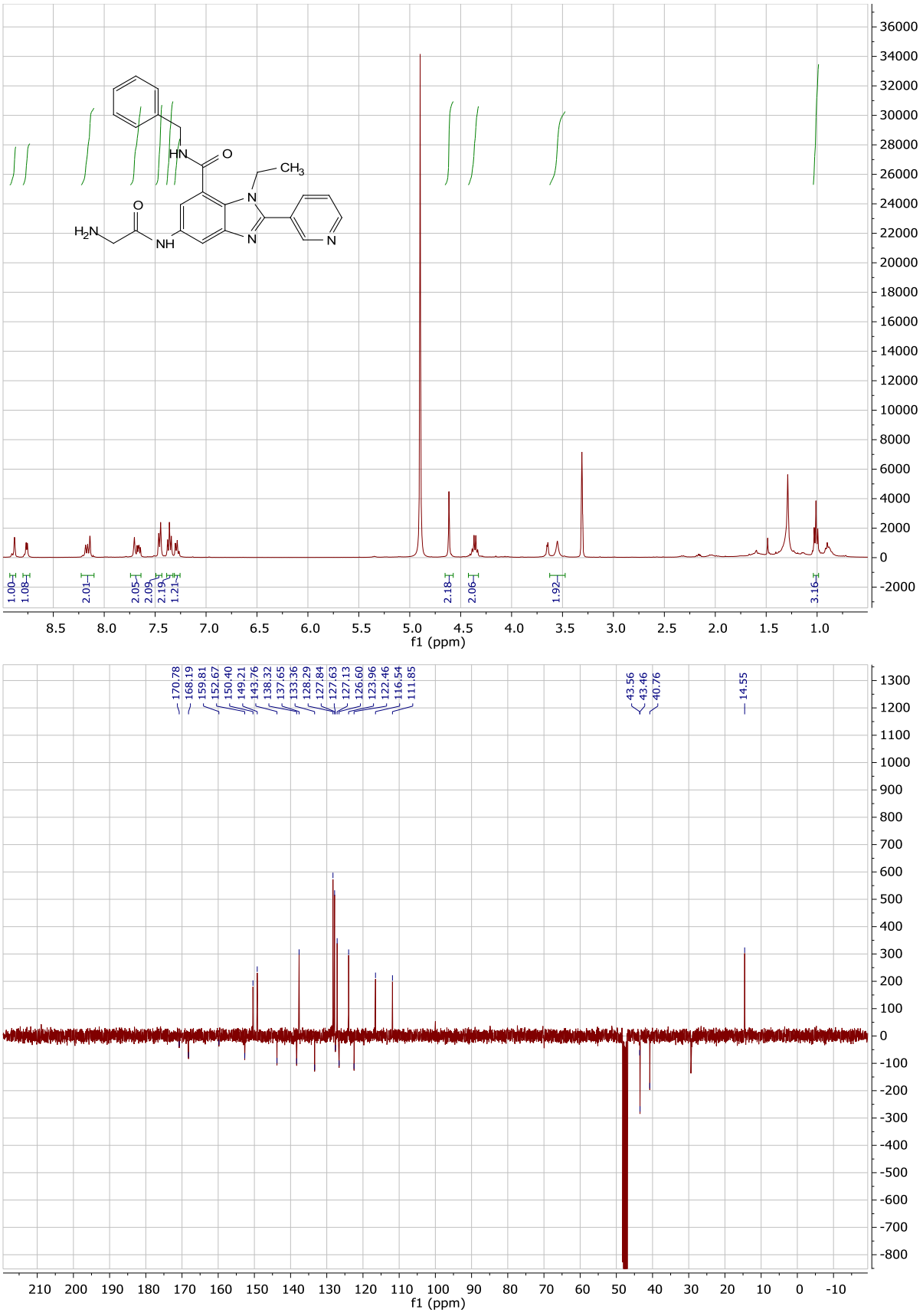


*Abbildung 177: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **142**.*

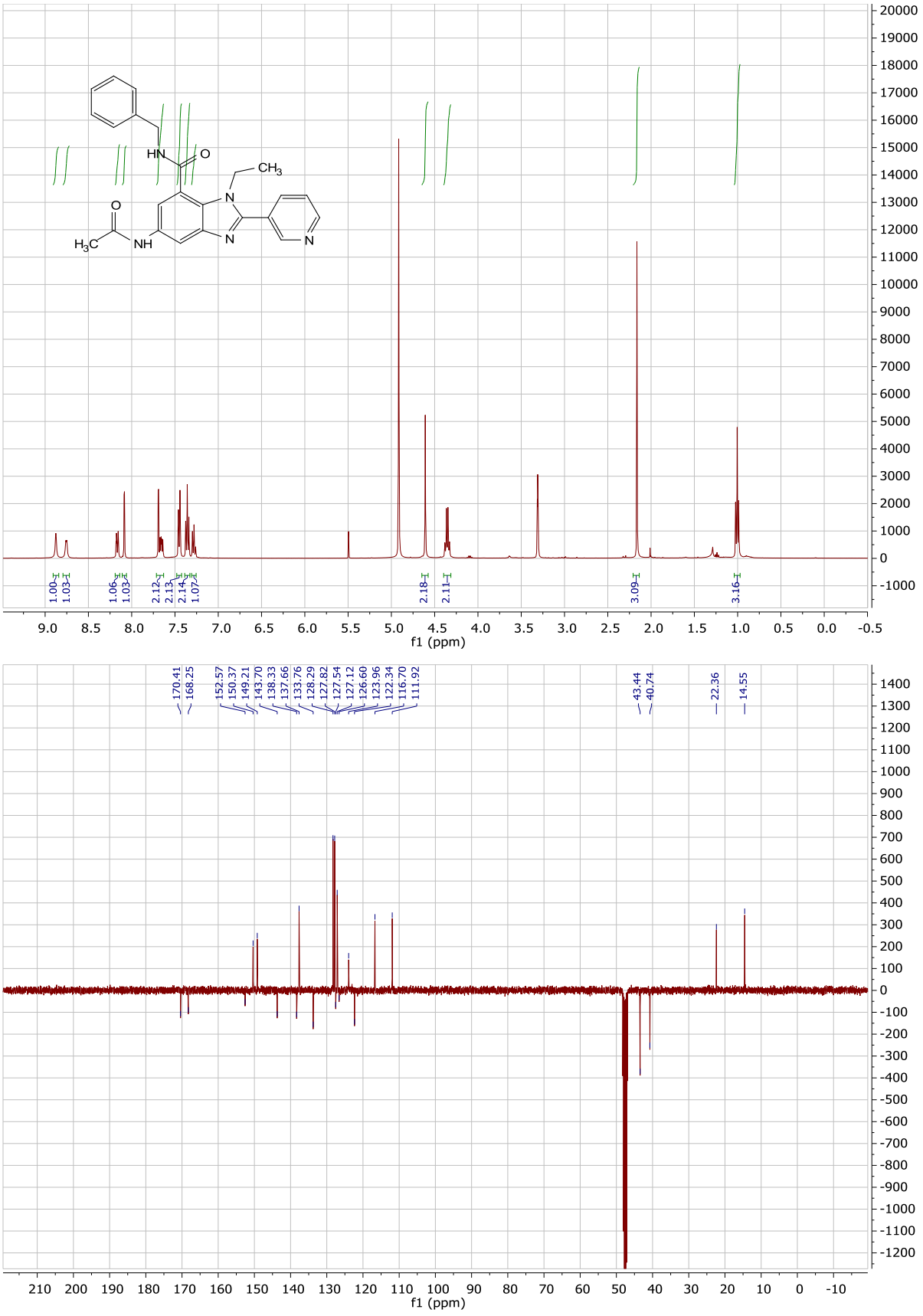


*Abbildung 178: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **143**.*

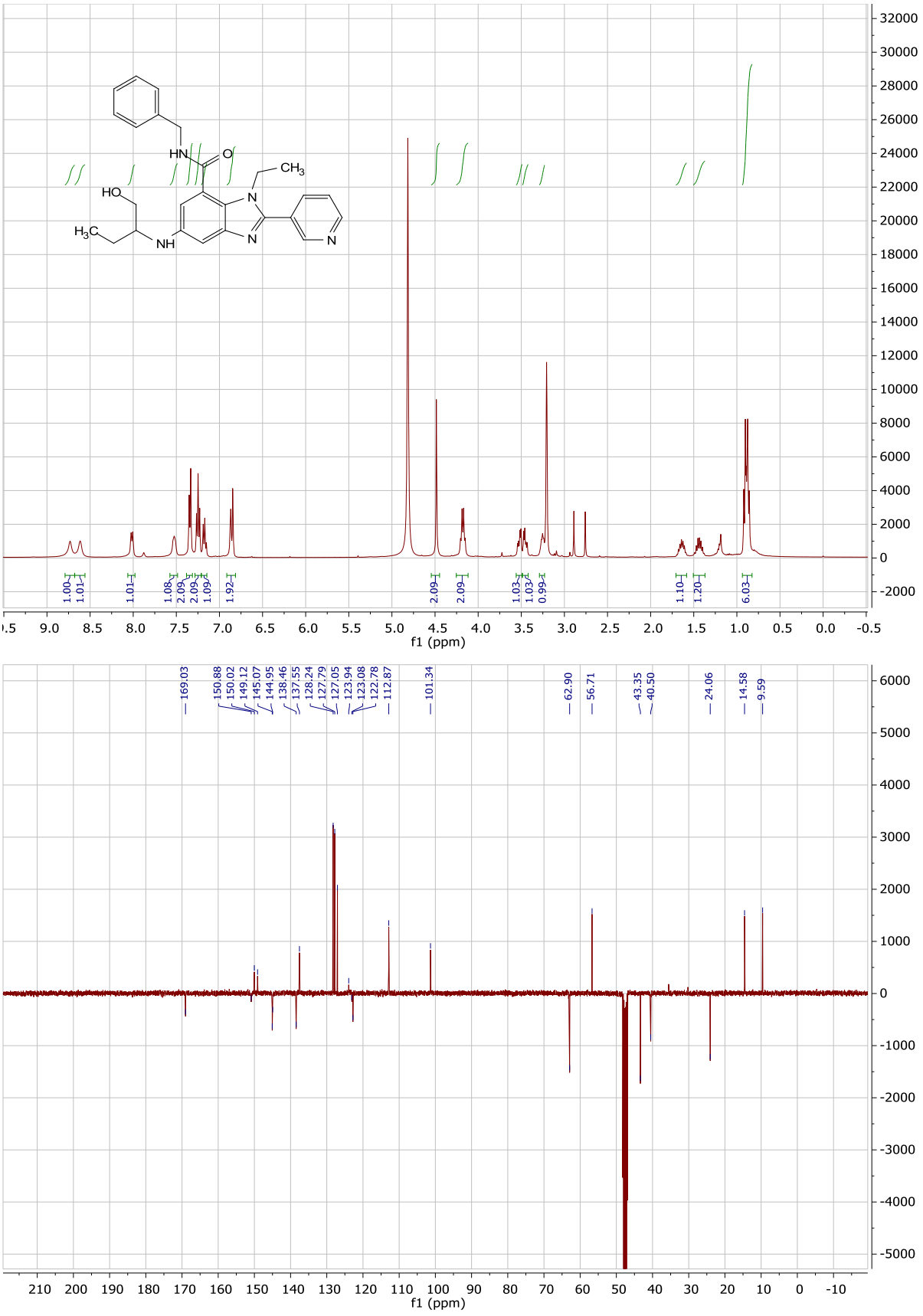


*Abbildung 179: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **rac-144**.*

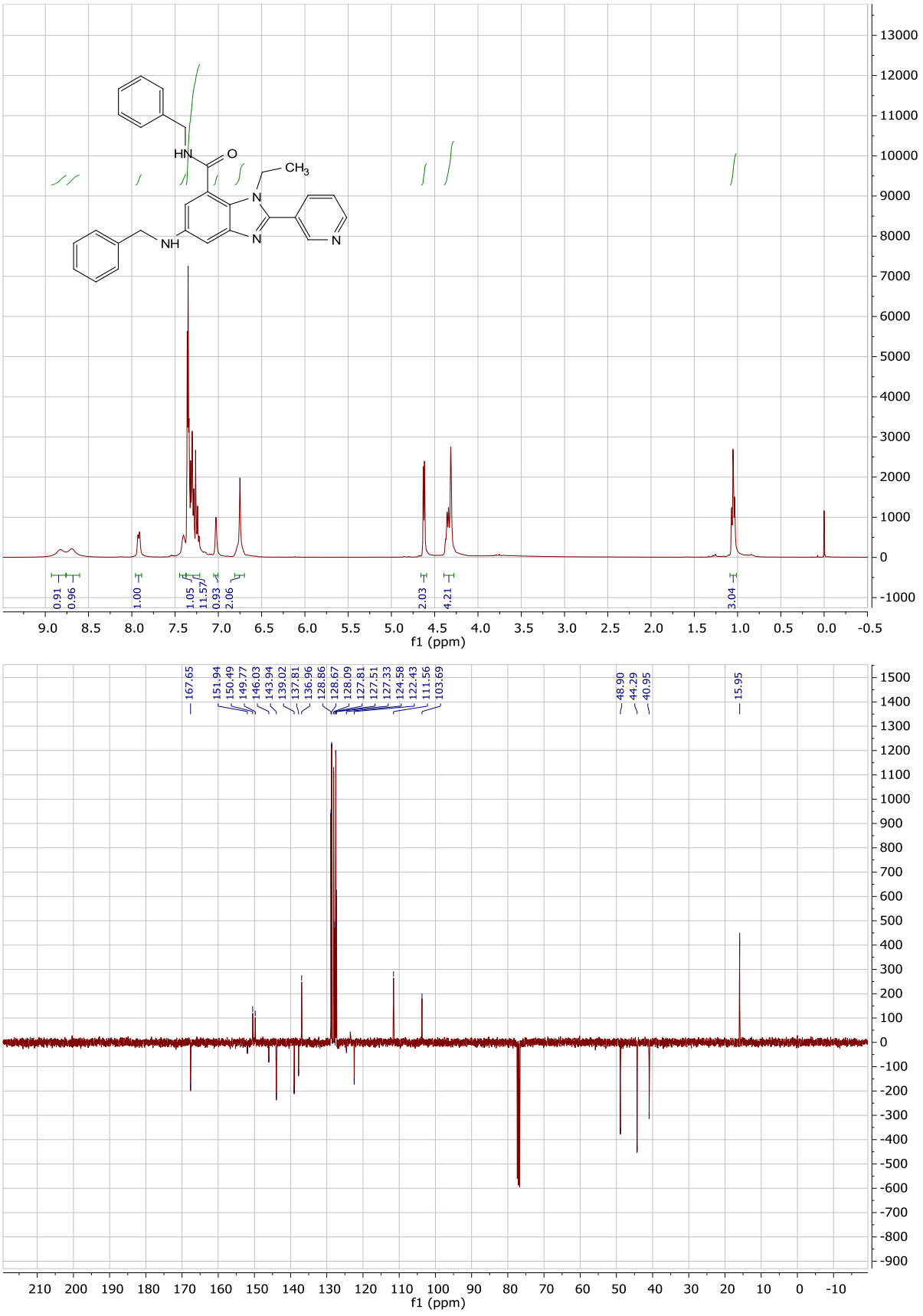


*Abbildung 180: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **148**.*

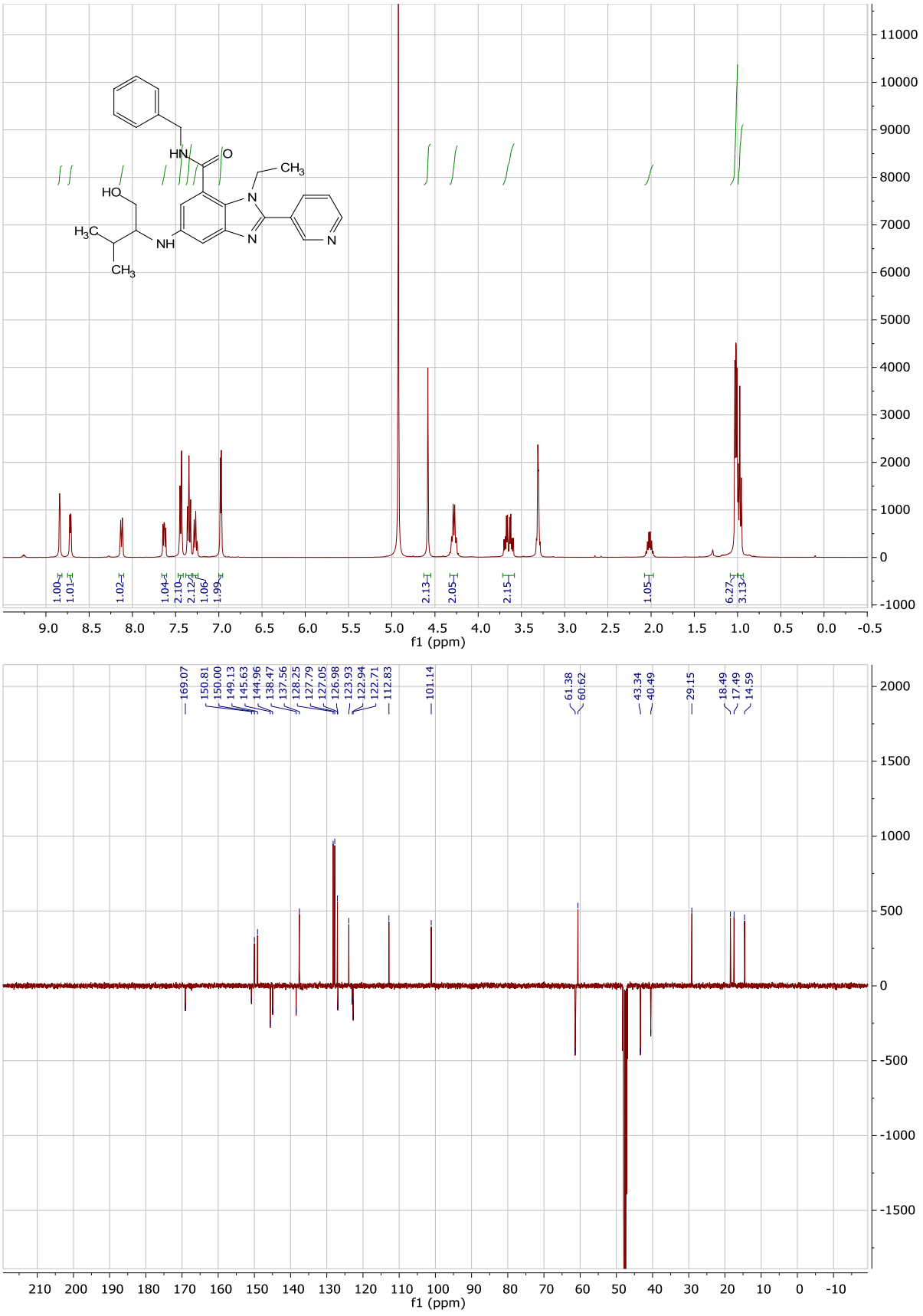


*Abbildung 181: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **rac-150**.*

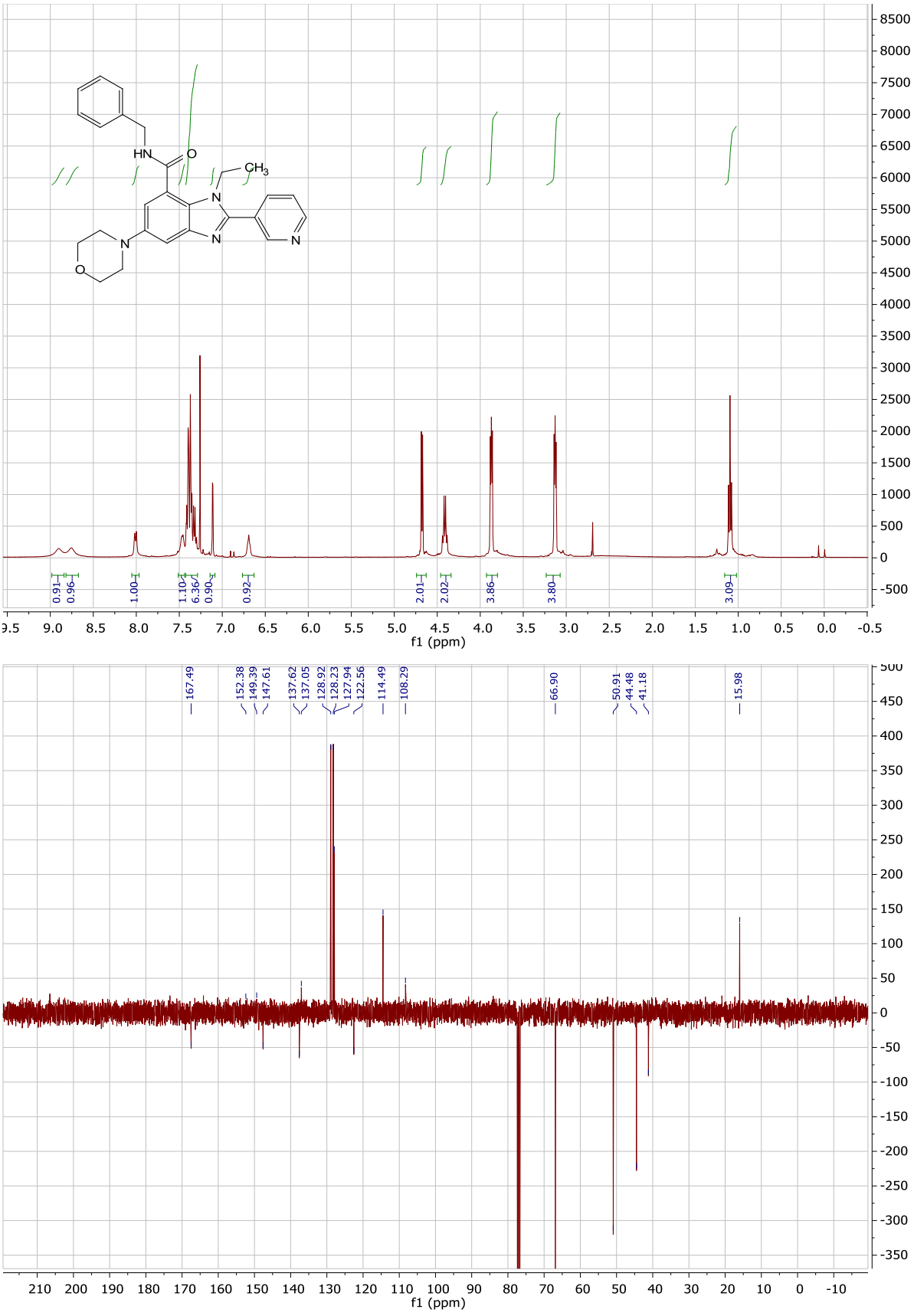


*Abbildung 182: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **151**.*

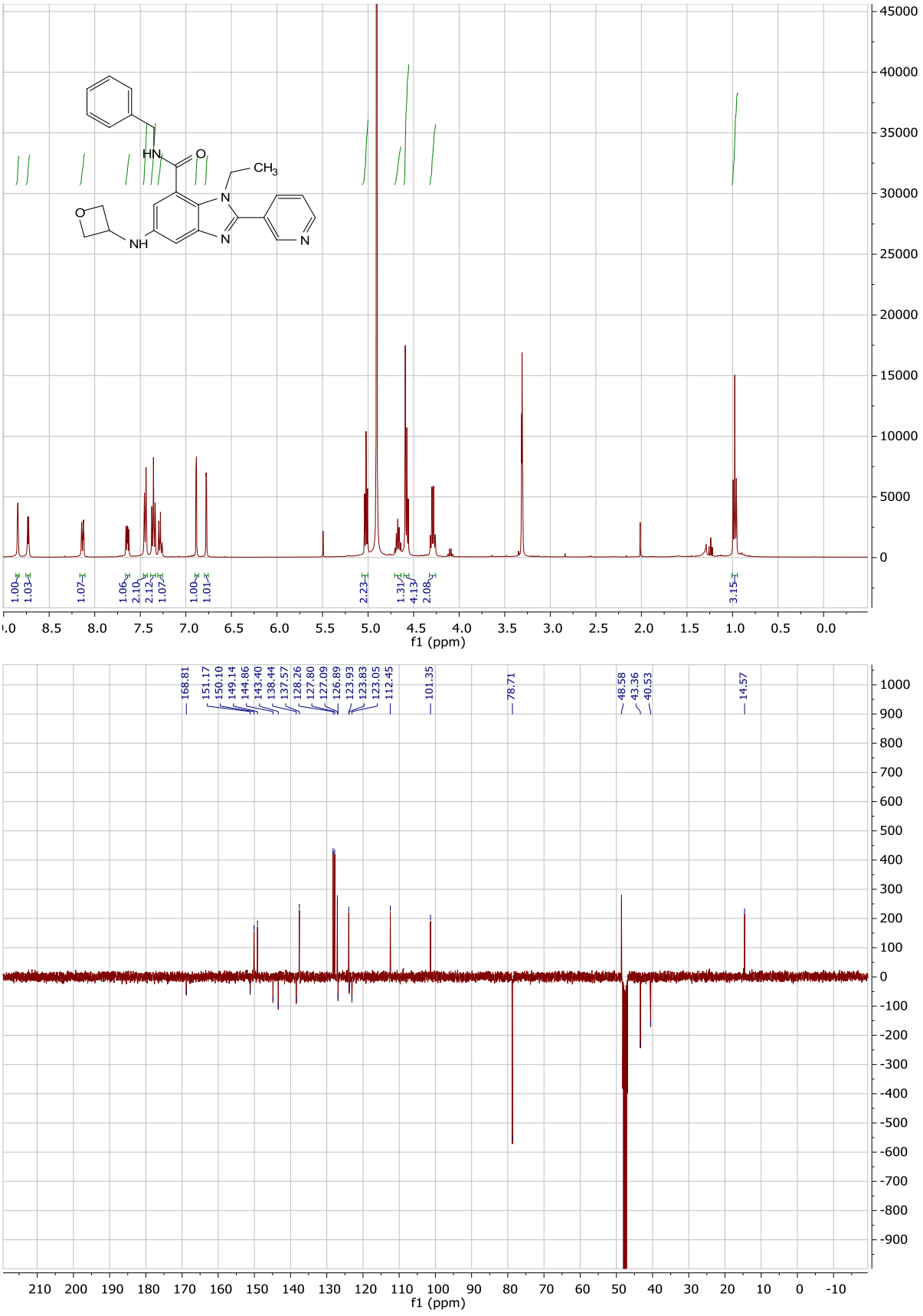


*Abbildung 183: [1]H- und [13]C-Spektrum von **152**.*

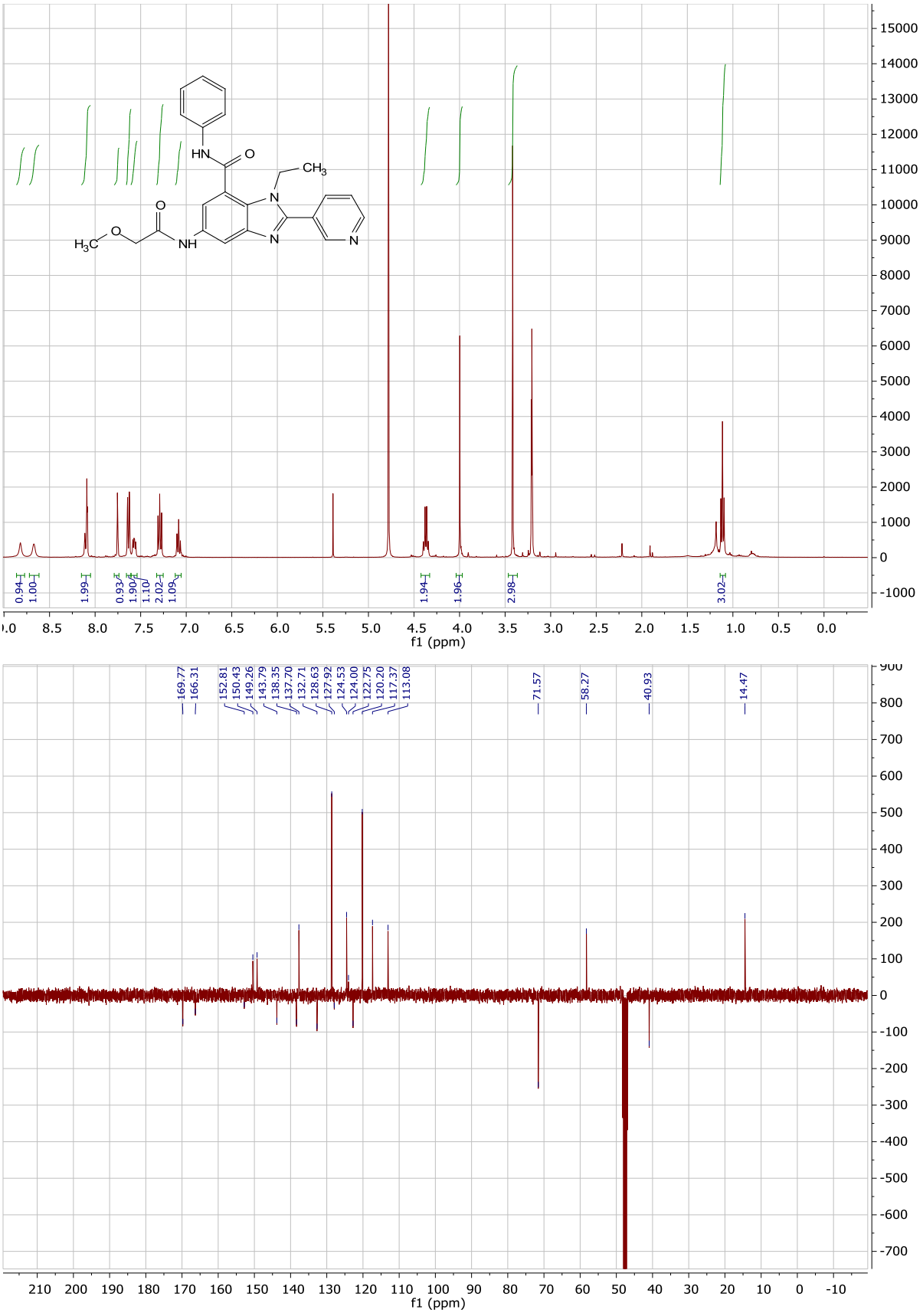


*Abbildung 184: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **153**.*

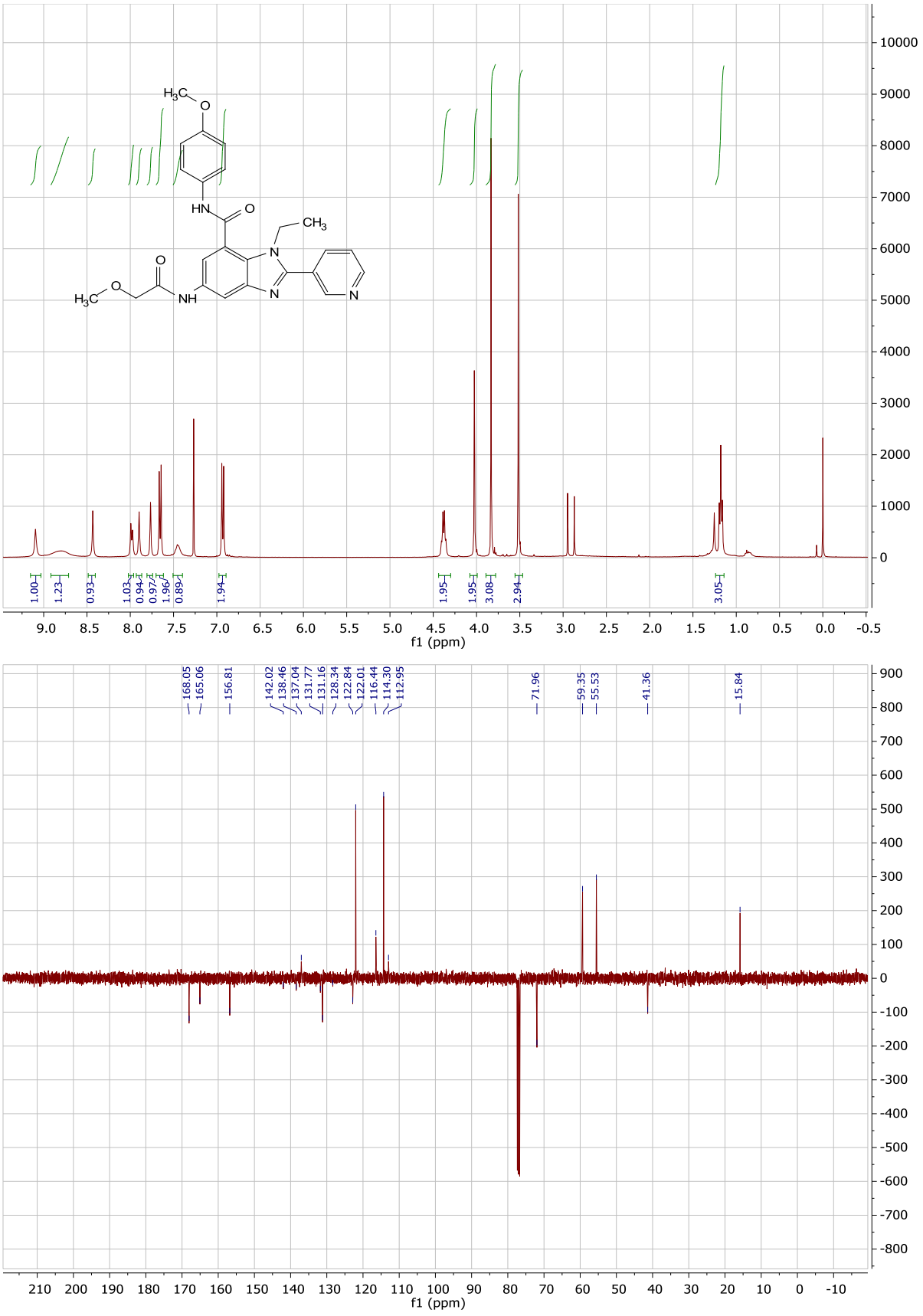


*Abbildung 185: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **154**.*

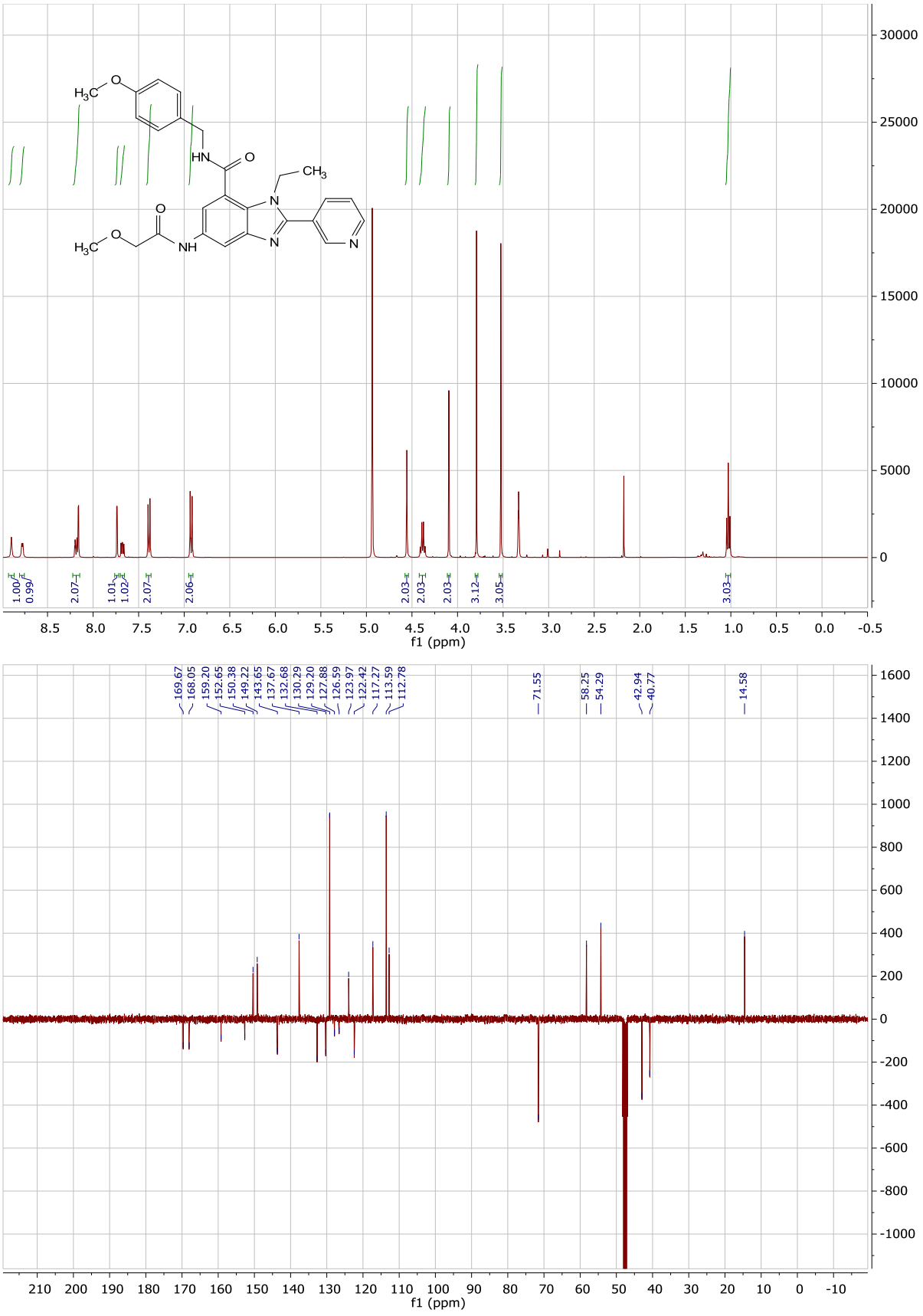


*Abbildung 186: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **155**.*

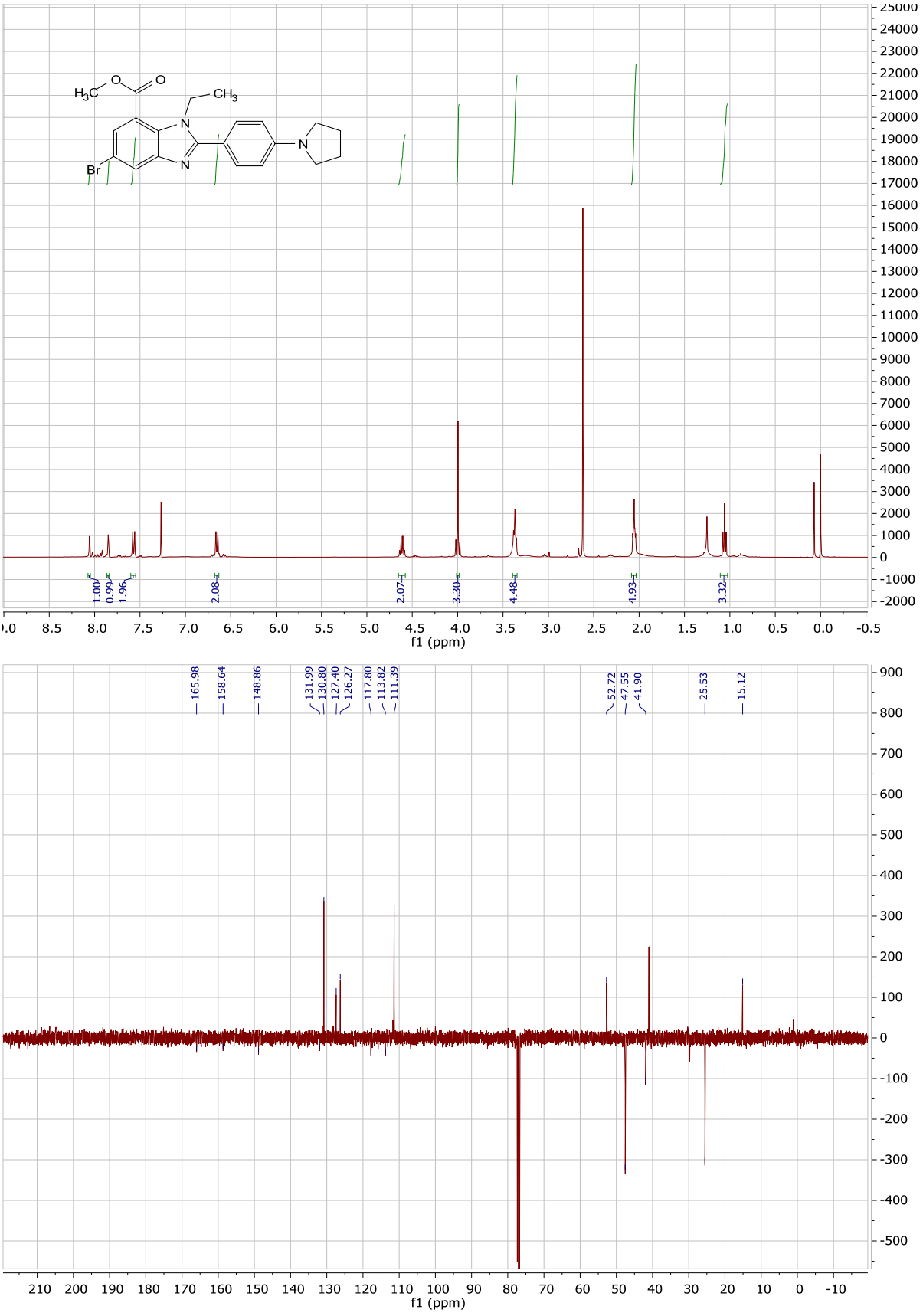


*Abbildung 187: [1]H- und [13]C-Spektrum von **160**.*

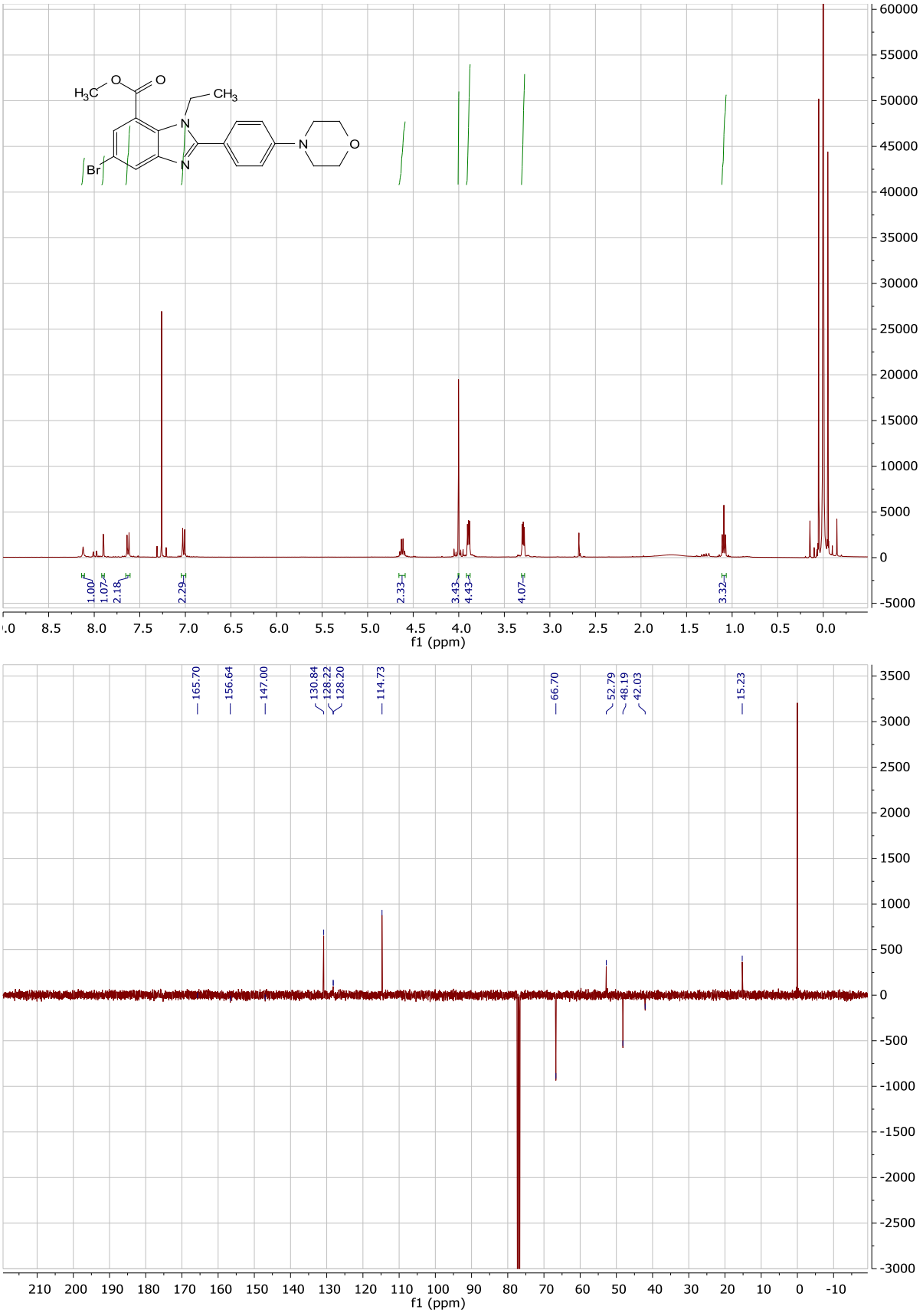


*Abbildung 188: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **160**.*

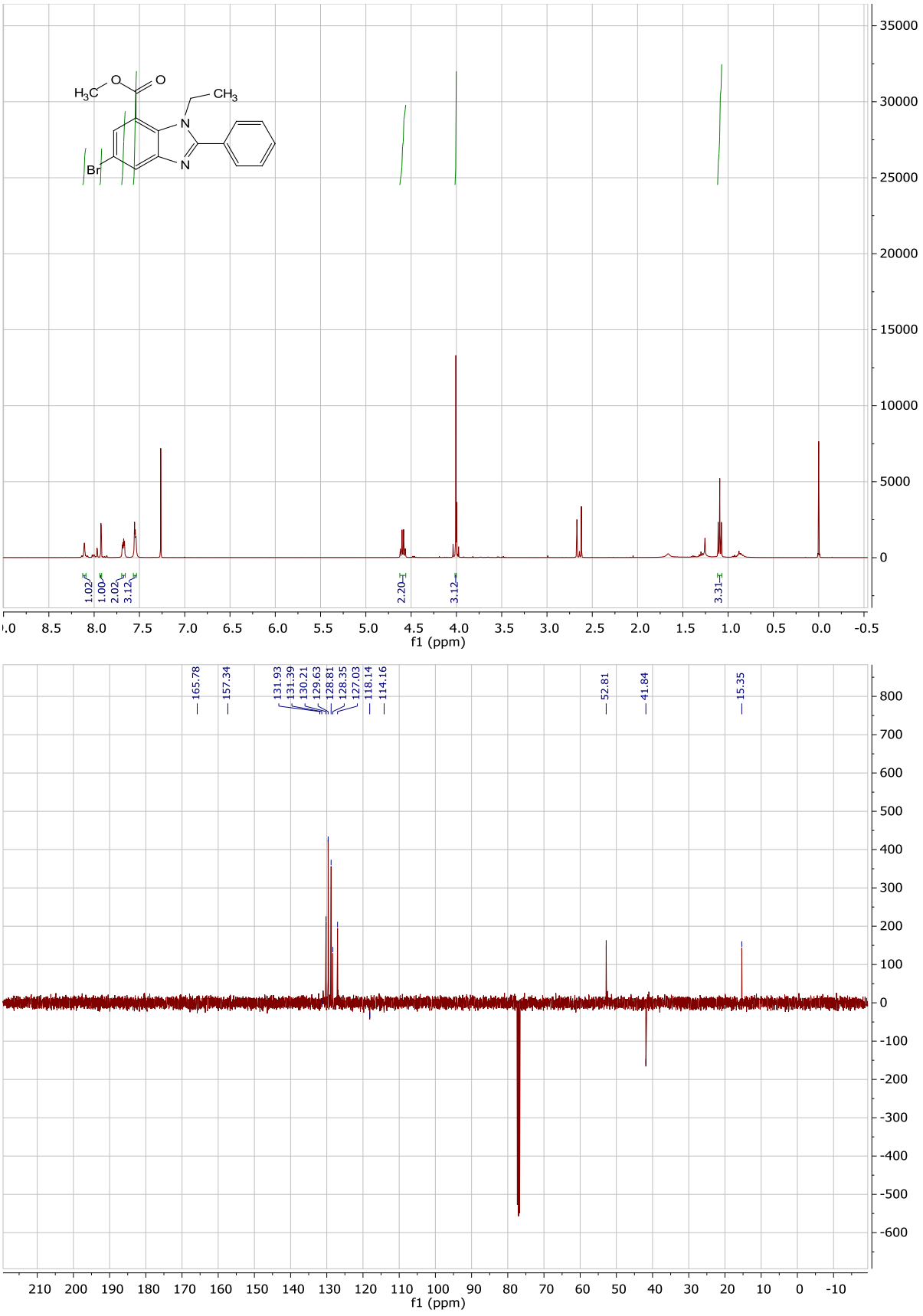


*Abbildung 189: [1]H- und [13]C-Spektrum von **162**.*

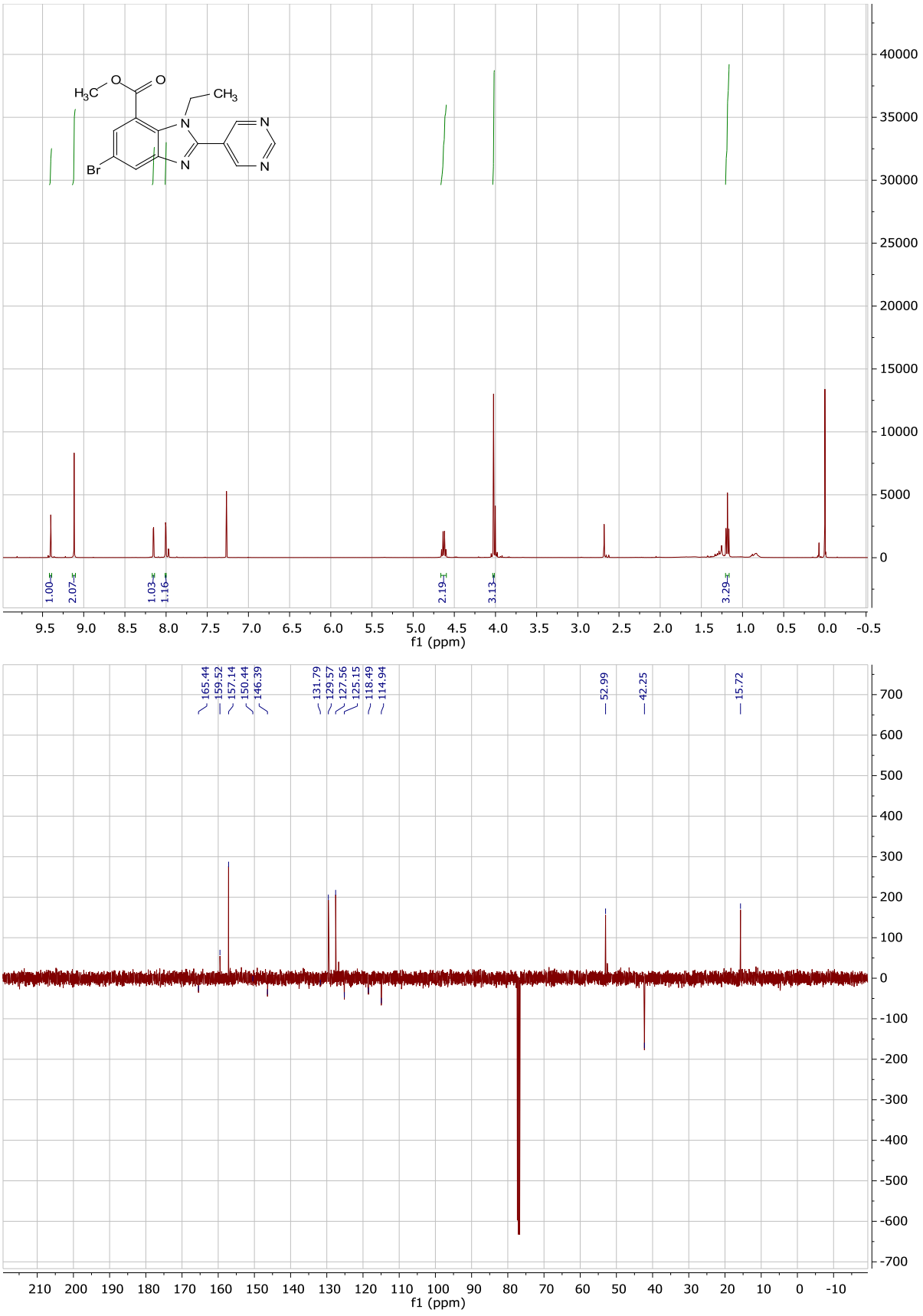


*Abbildung 190: [1]H- und [13]C-Spektrum von **163**.*

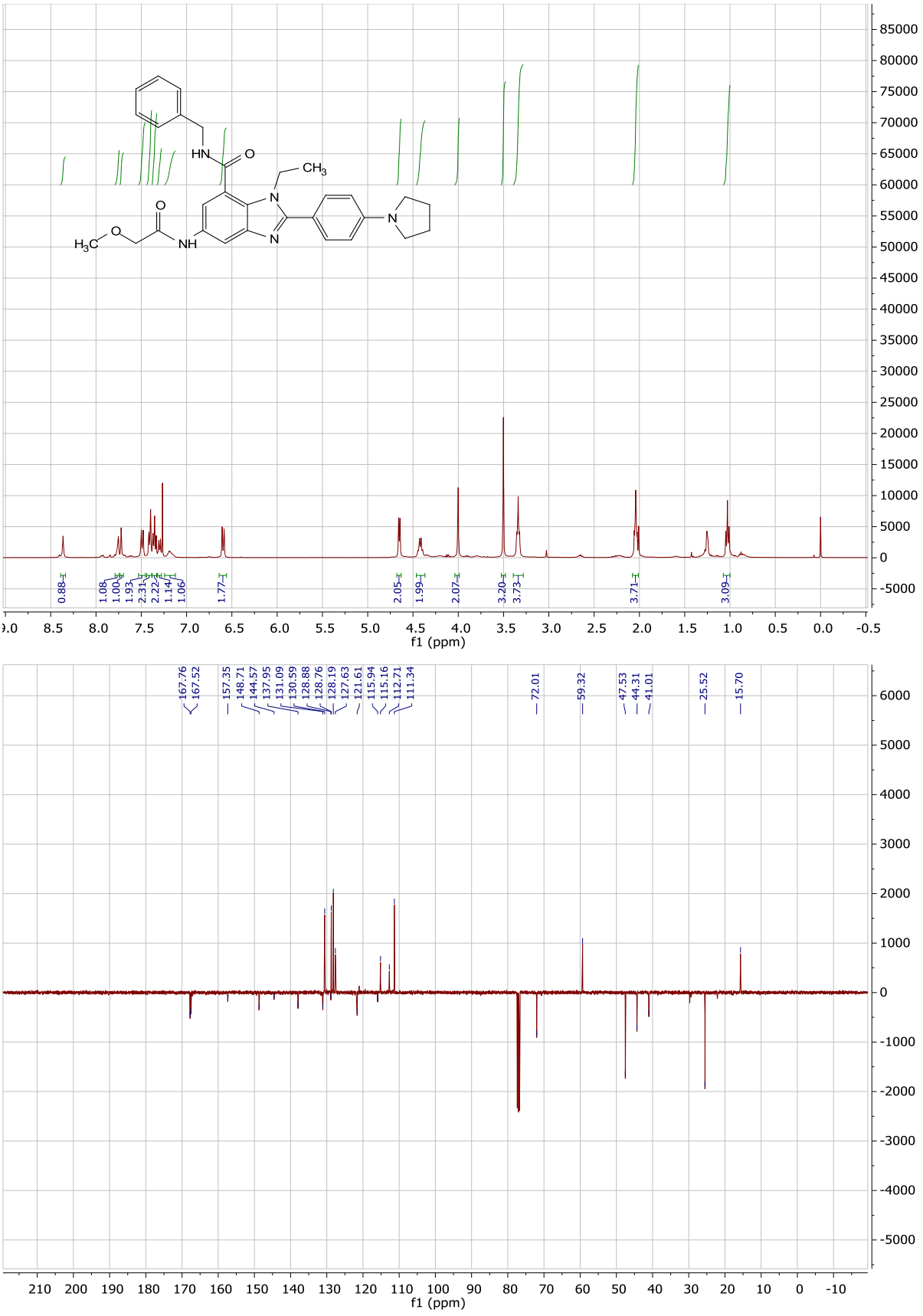


*Abbildung 191: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **156**.*

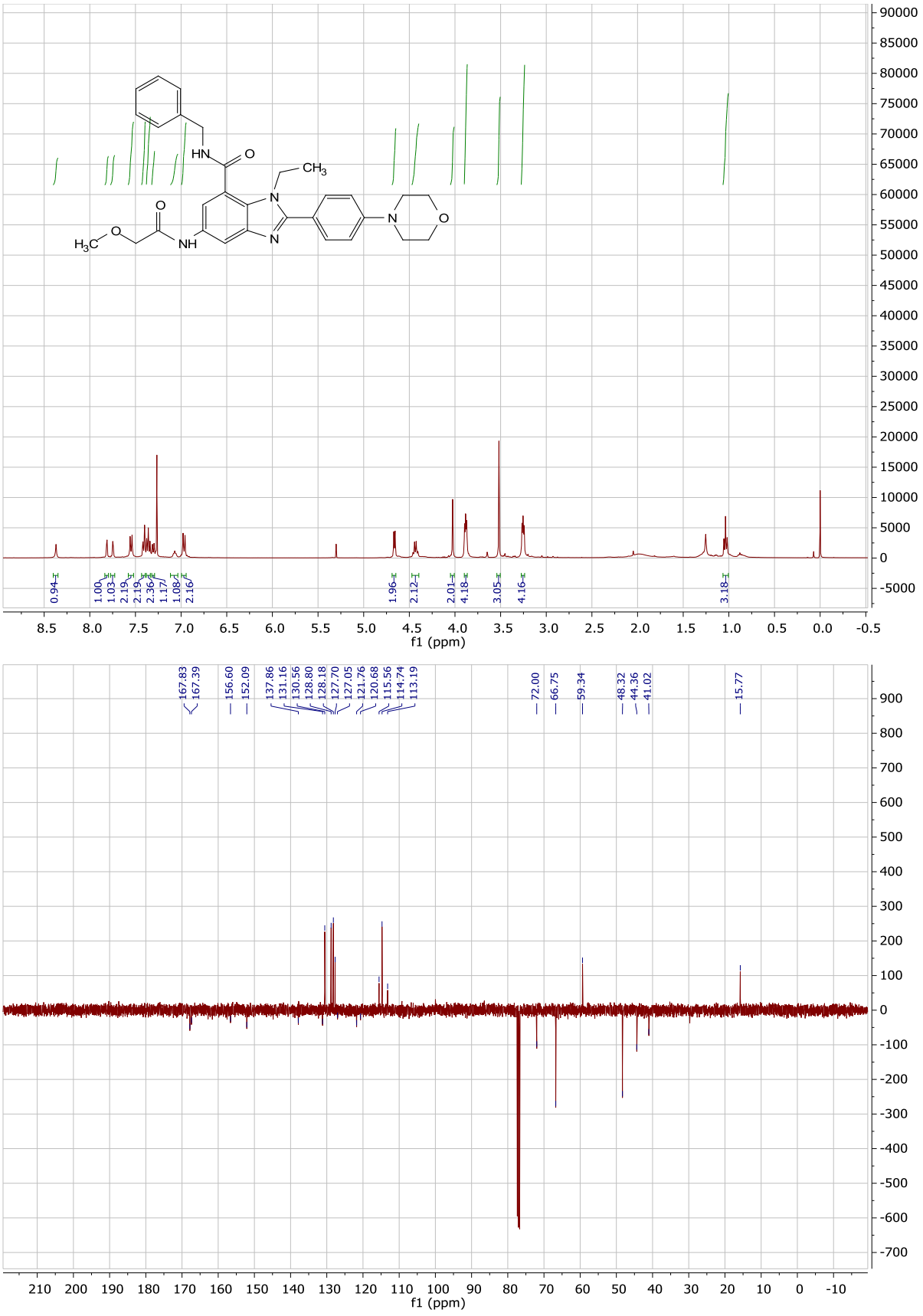


*Abbildung 192: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **157**.*

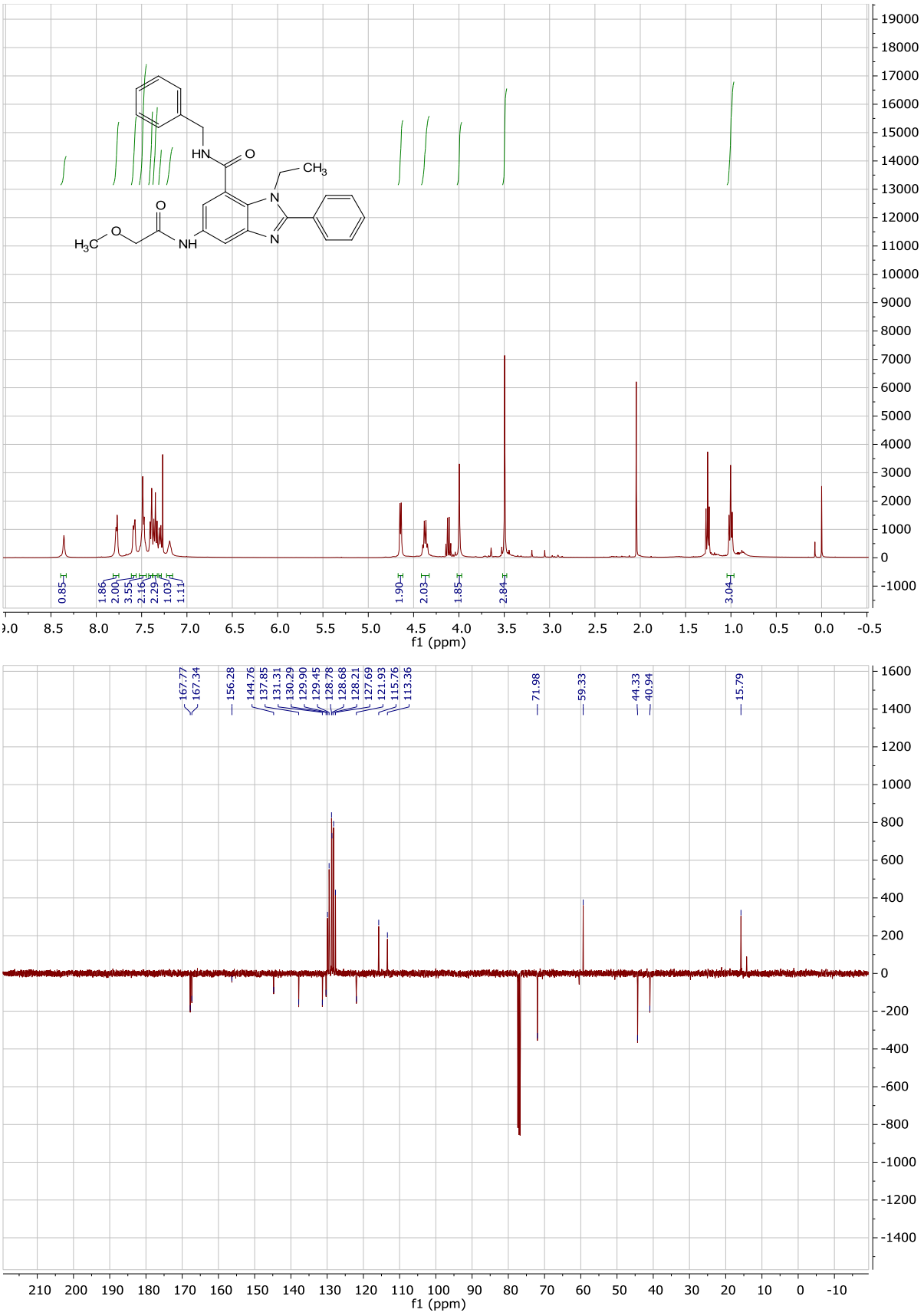


*Abbildung 193: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **158**.*

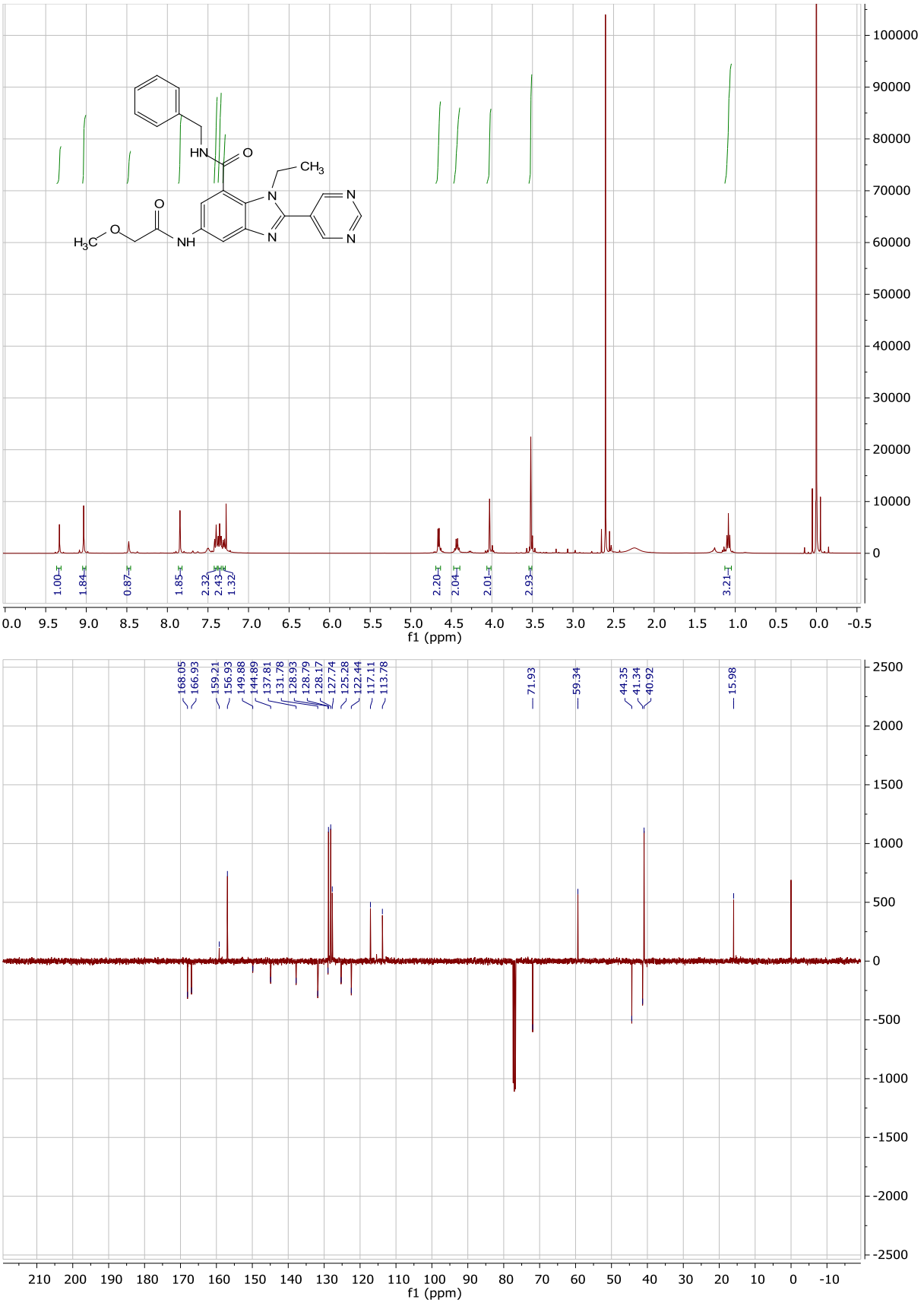


*Abbildung 194: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **159**.*

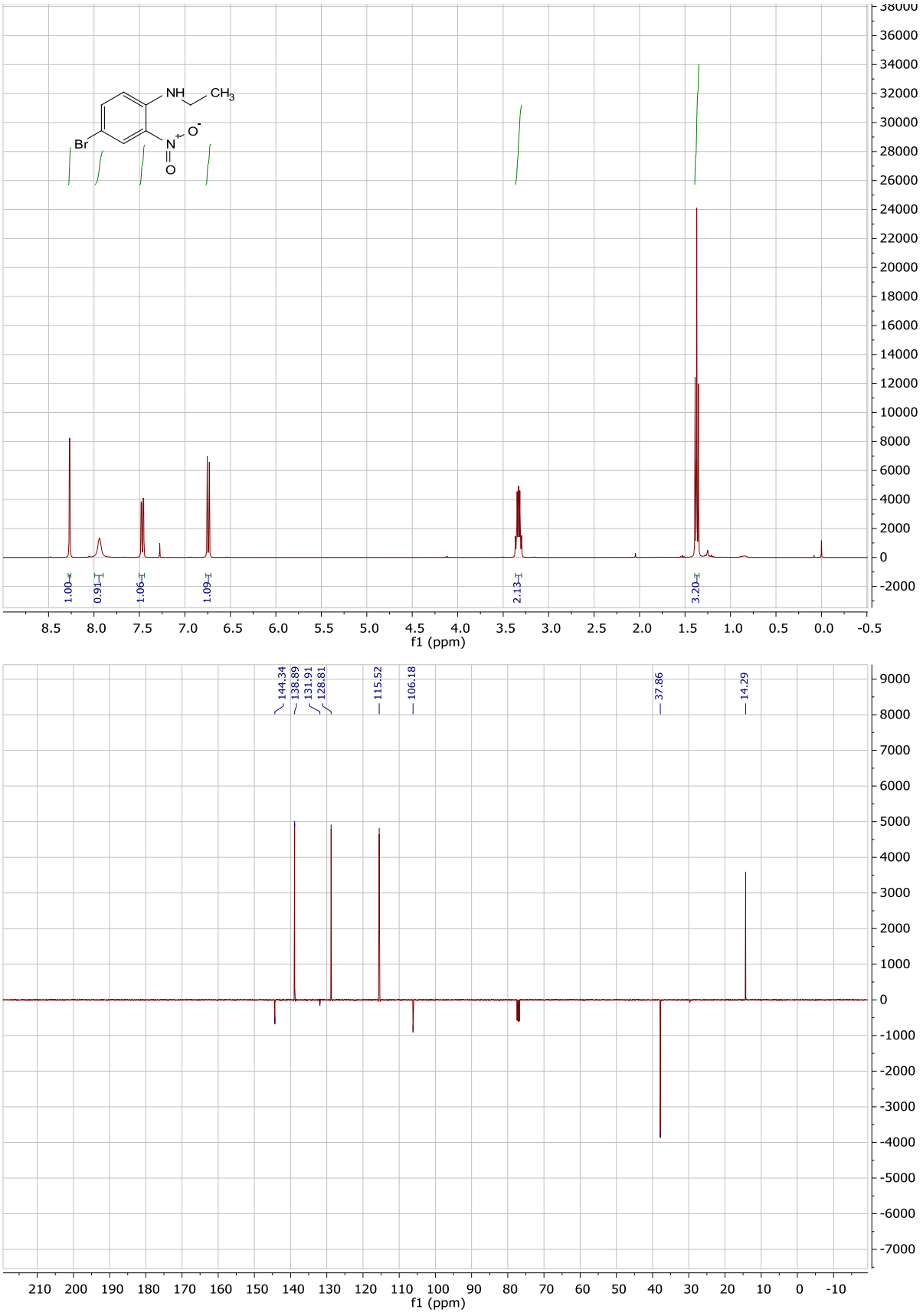


*Abbildung 195: [1]H- und [13]C-Spektrum von **116**.*

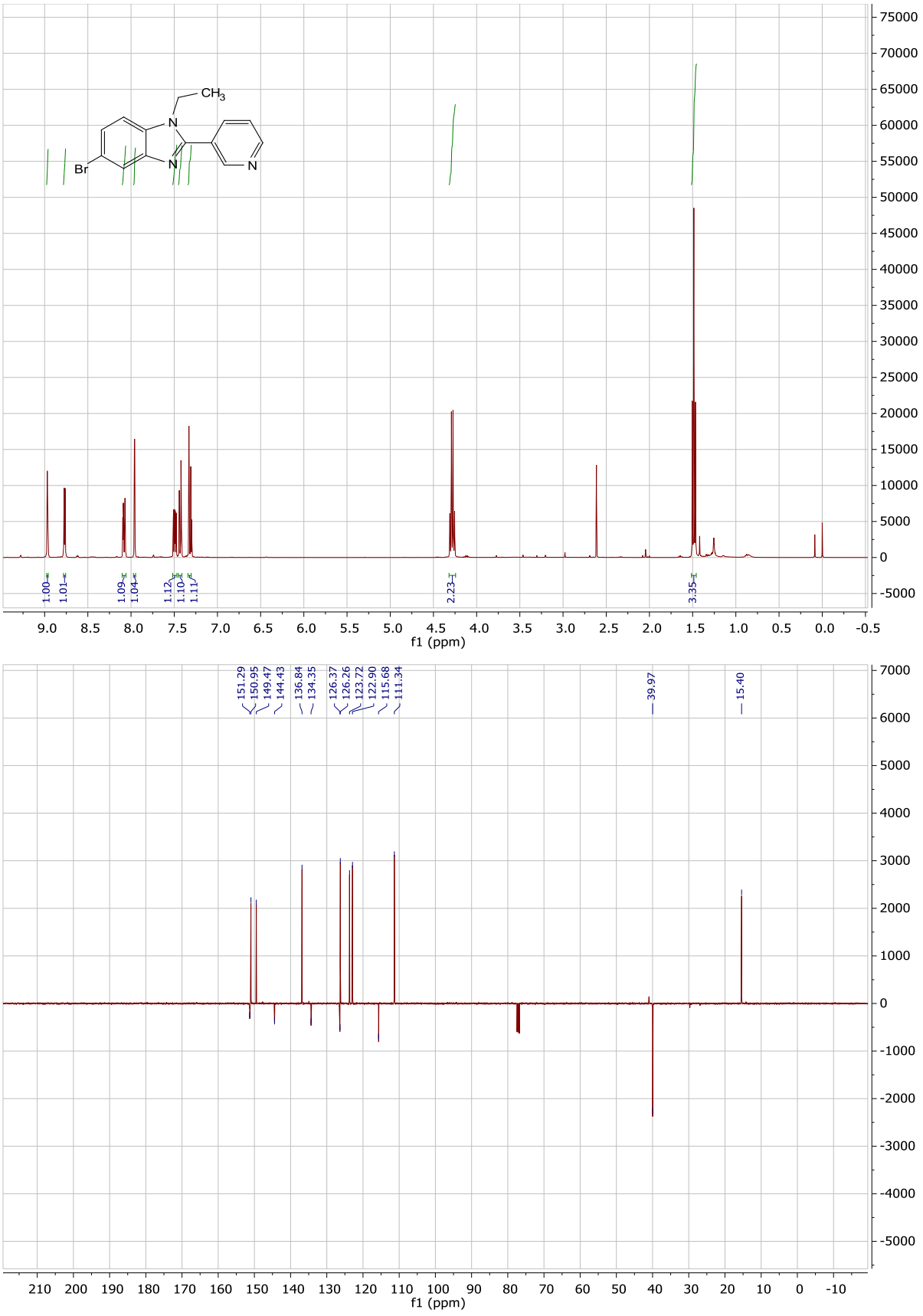


*Abbildung 196: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **169**.*

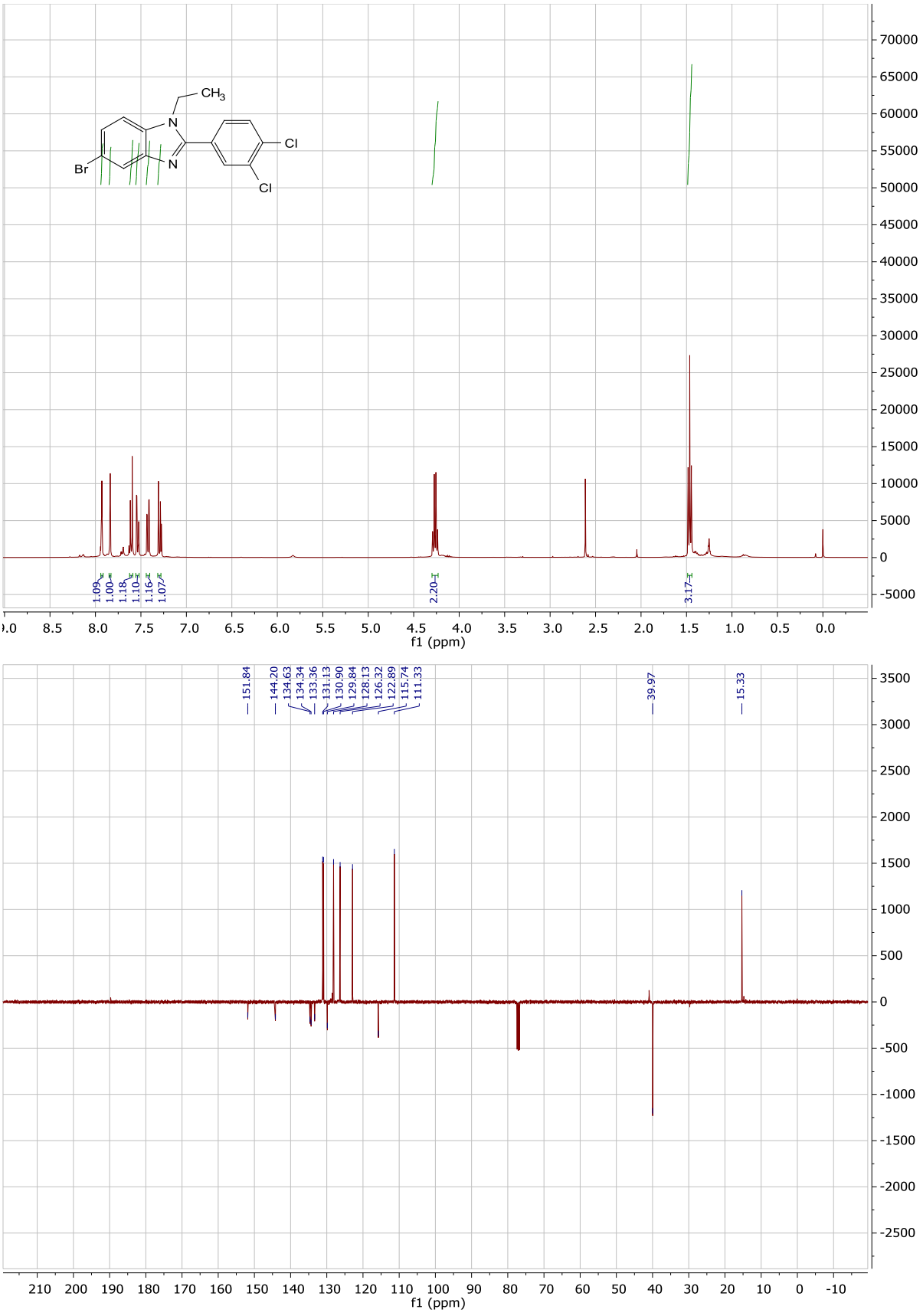


*Abbildung 197: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **170**.*

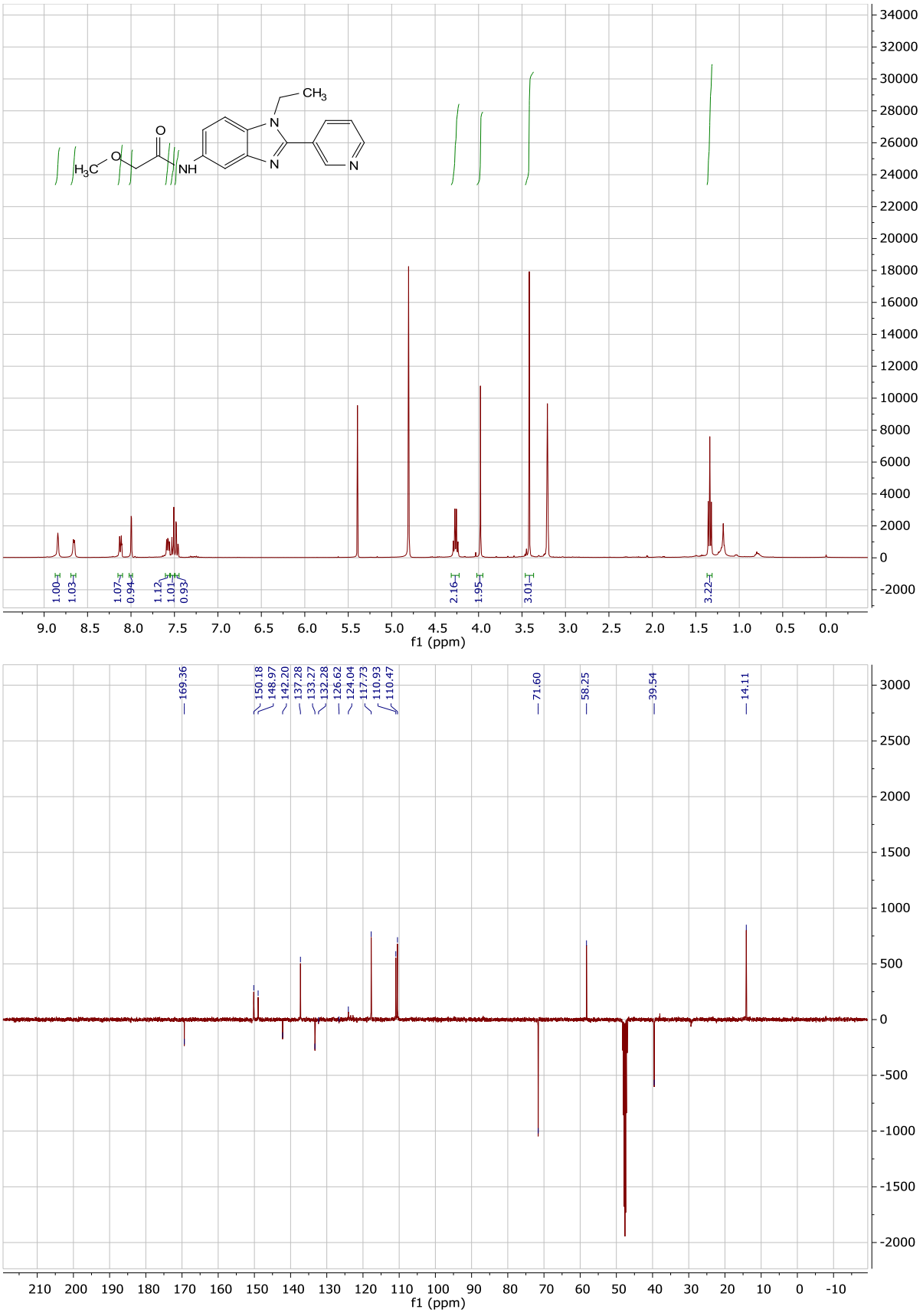


*Abbildung 198: [1]H- und [13]C-Spektrum von **164**.*

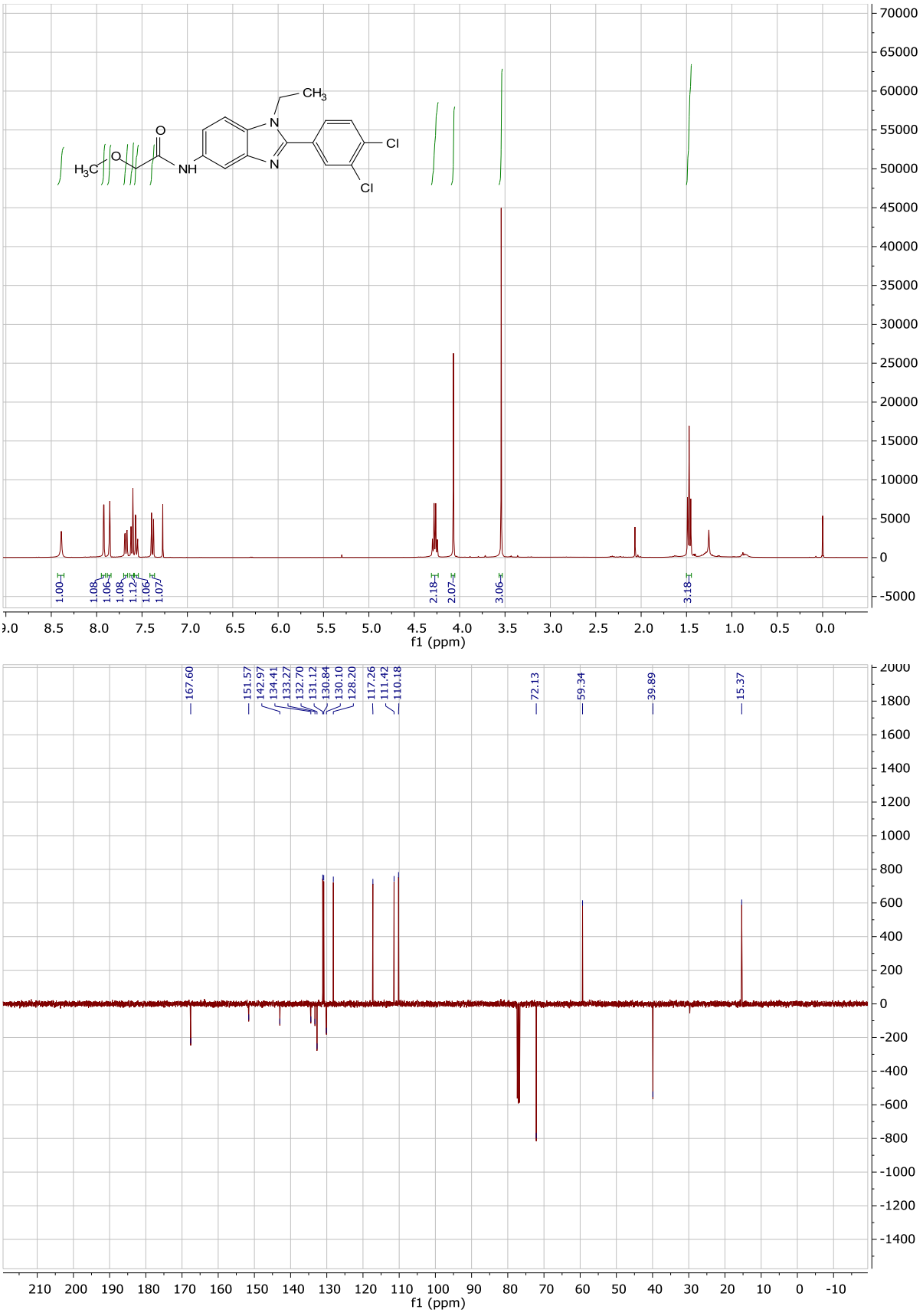


*Abbildung 199: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **165**.*

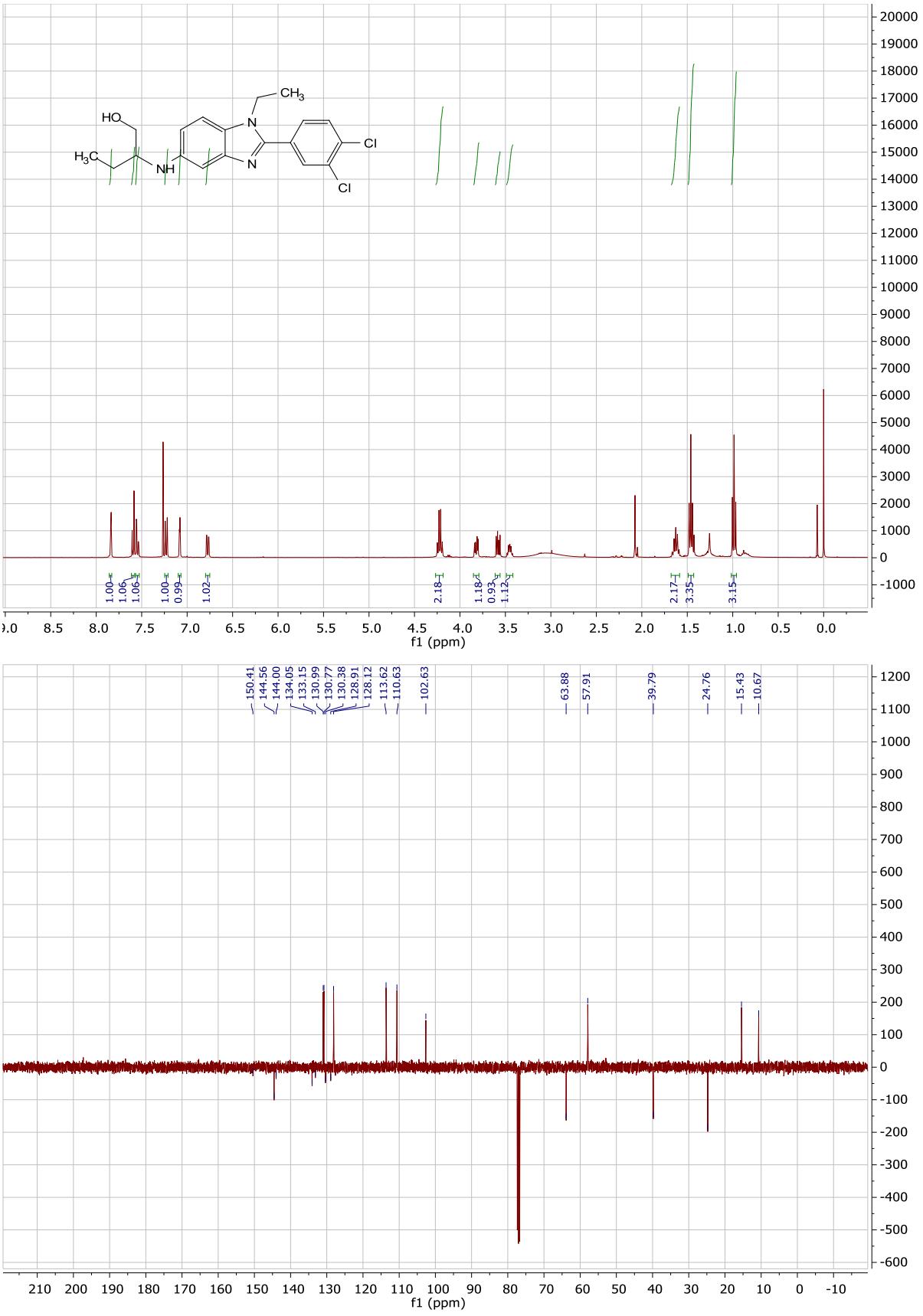


*Abbildung 200: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **rac-166**.*

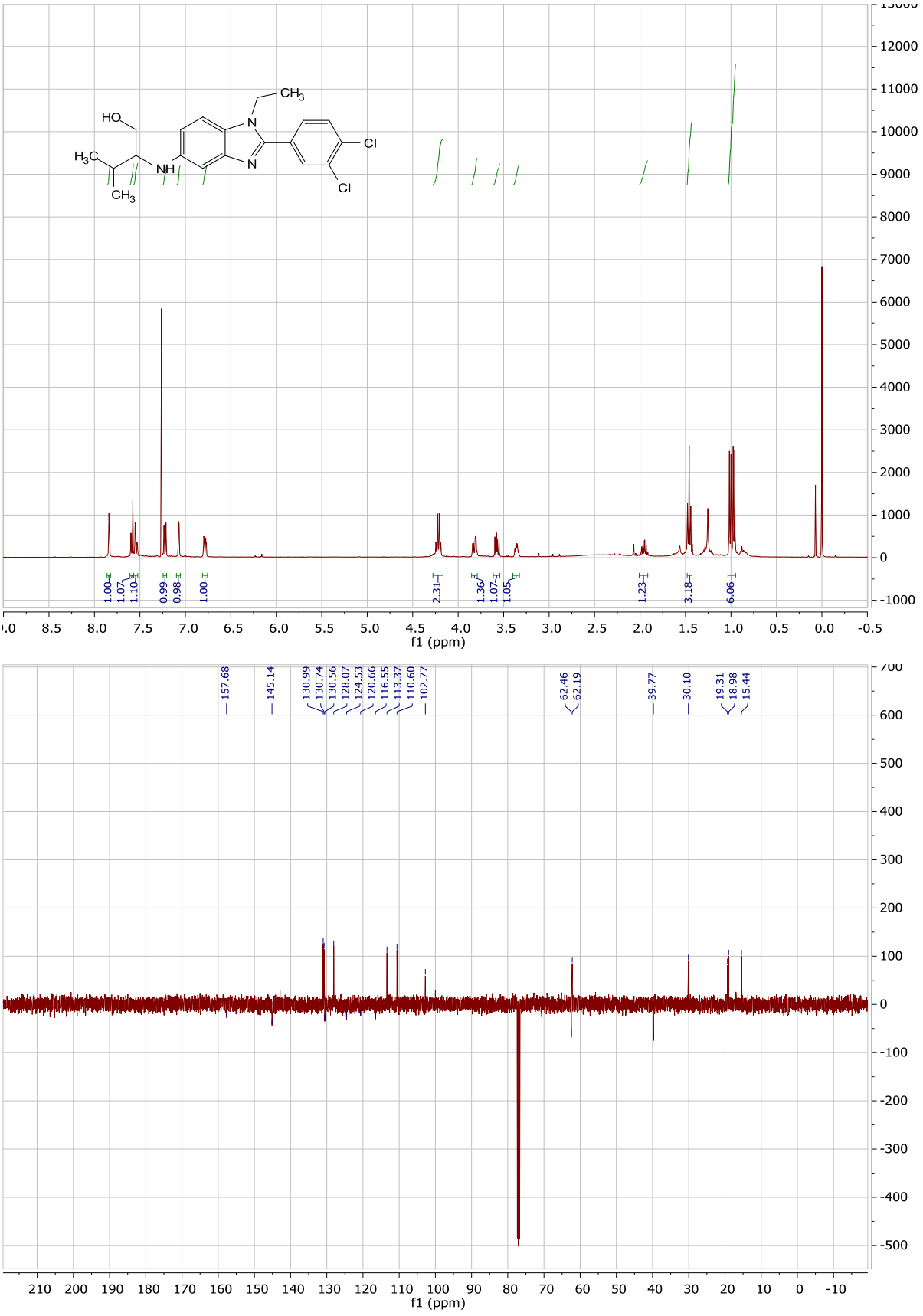


*Abbildung 201: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **rac-167**.*

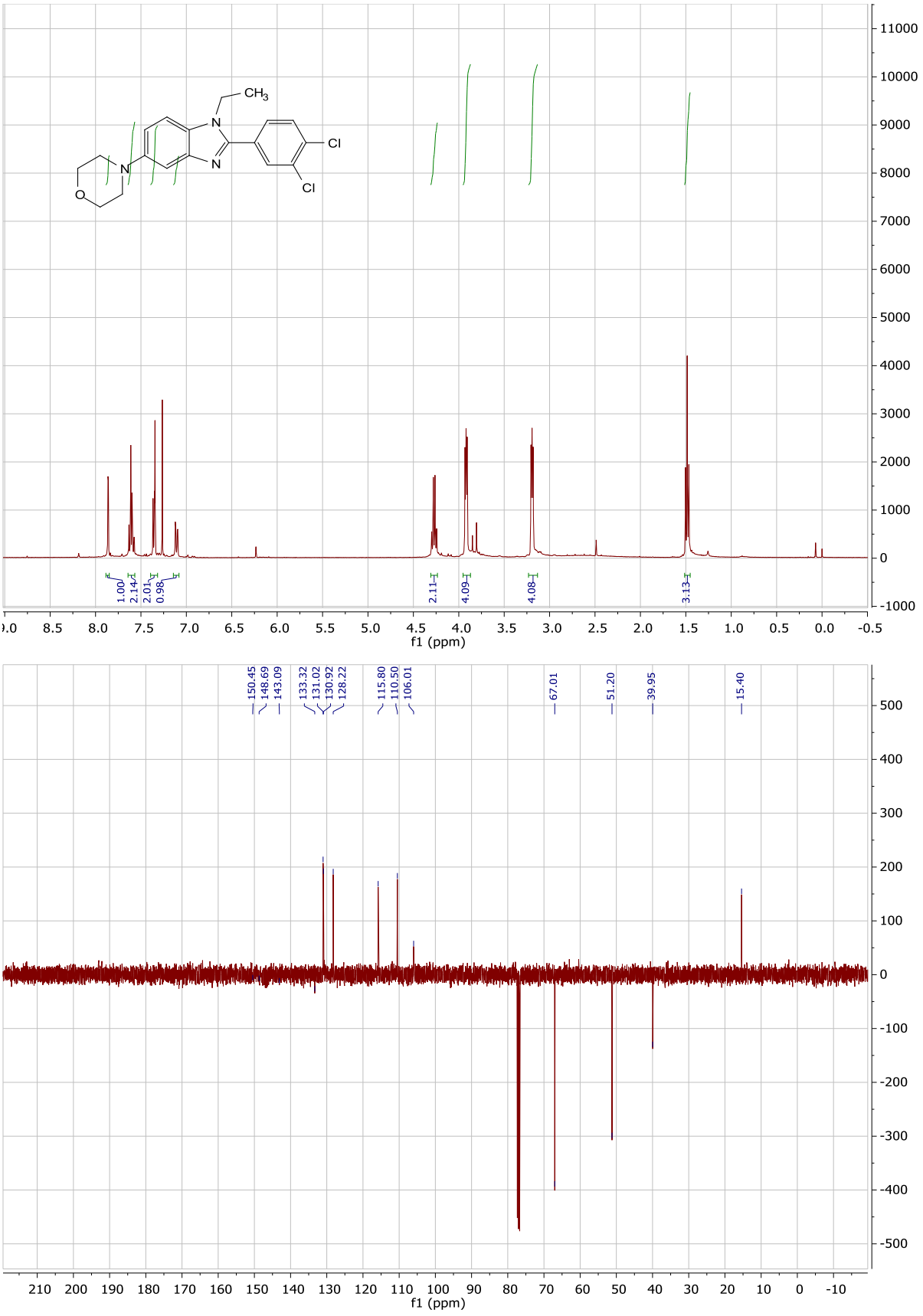


*Abbildung 202: [1]H- und [13]C-Spektrum von **168**.*

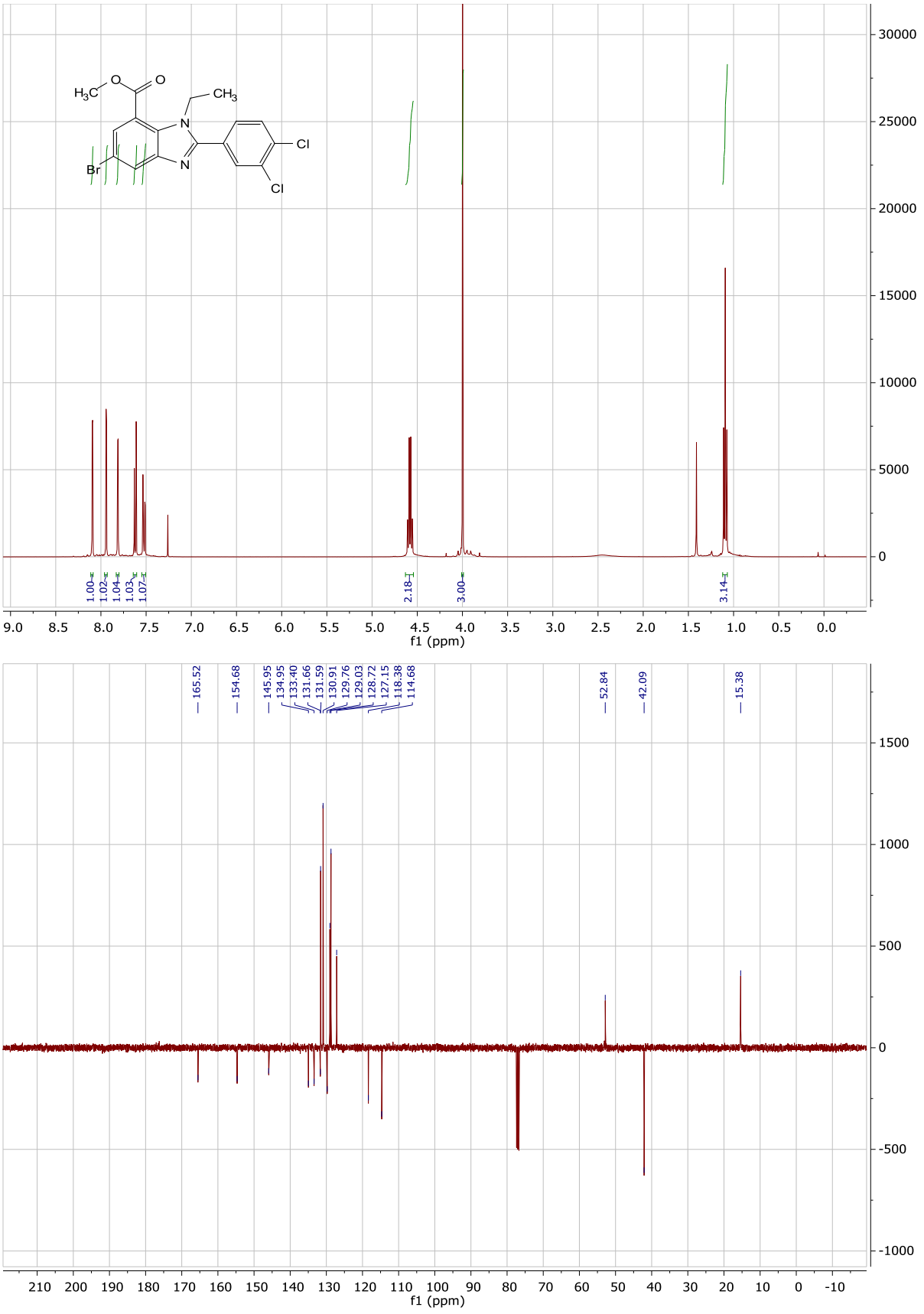


*Abbildung 203: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **174**.*

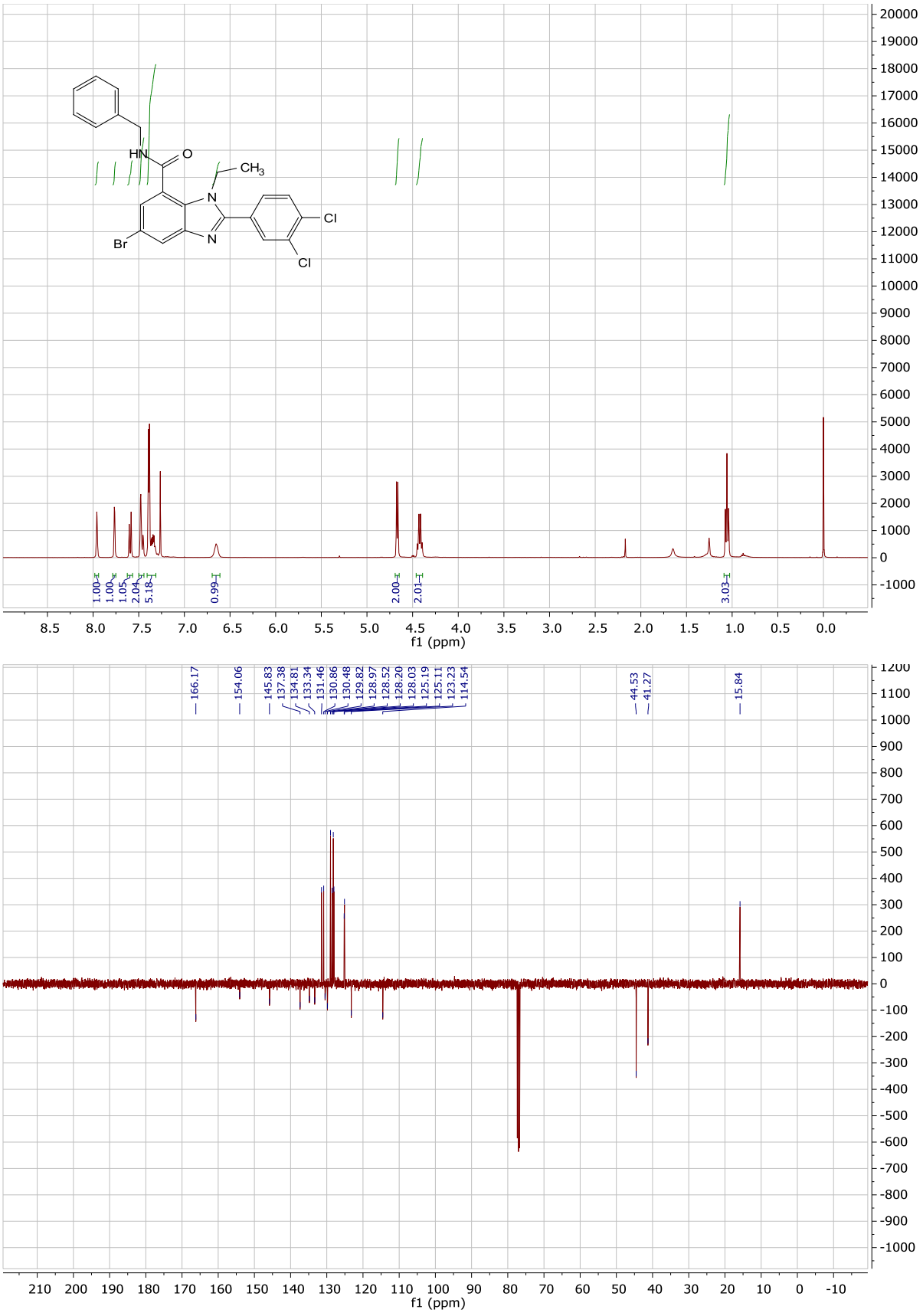


*Abbildung 204: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **175**.*

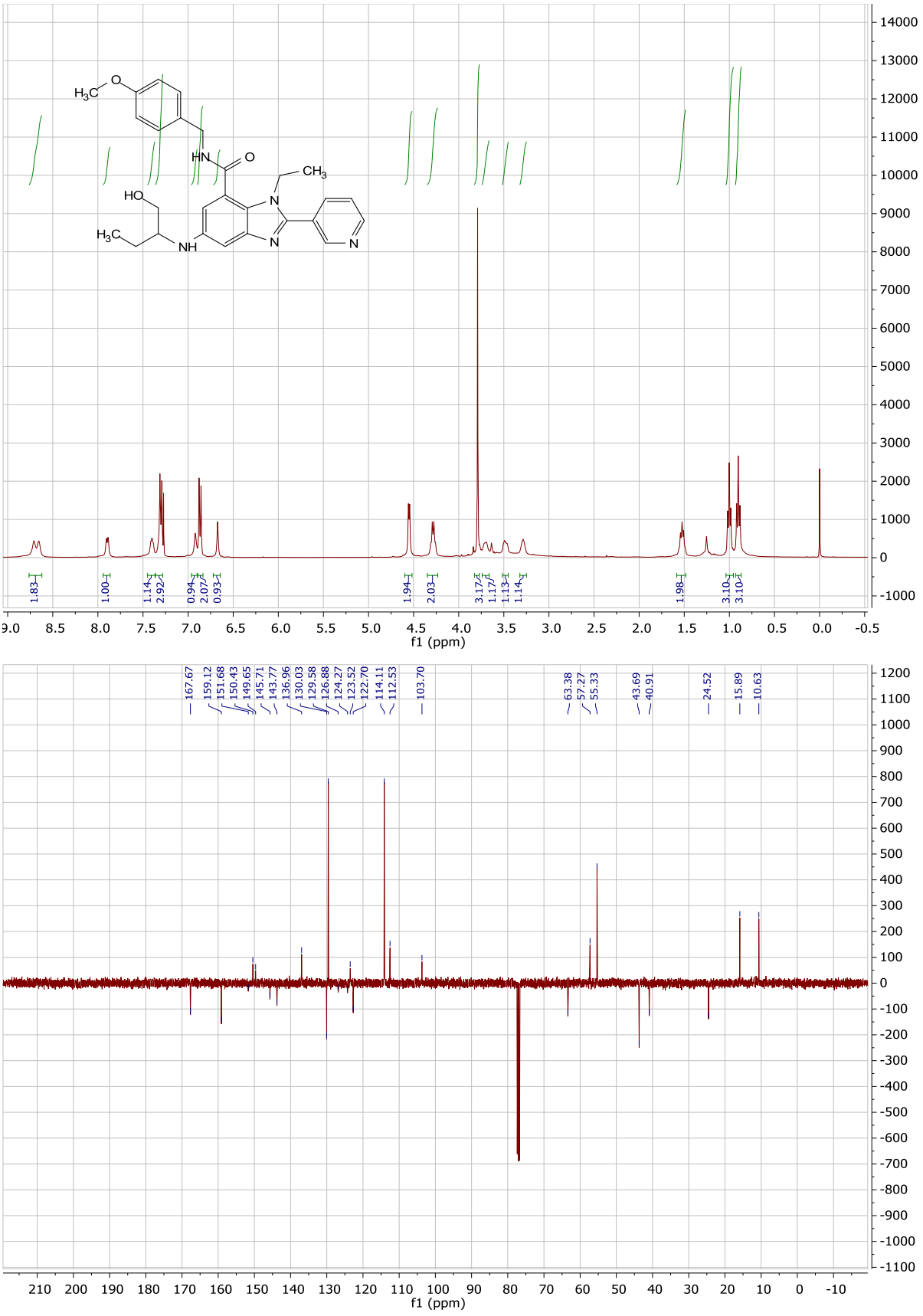


*Abbildung 205: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **rac-171**.*

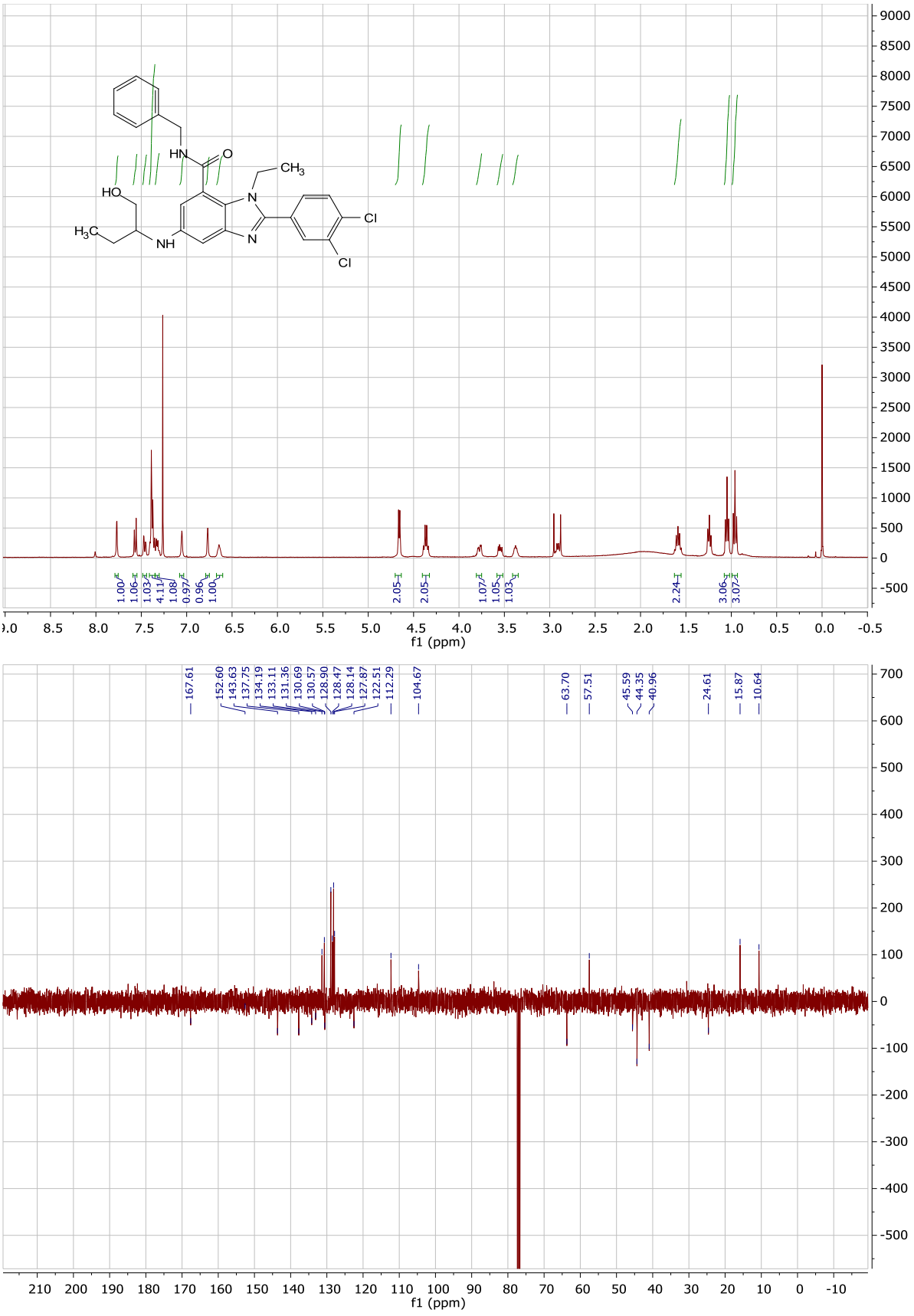


*Abbildung 206: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **rac-172**.*

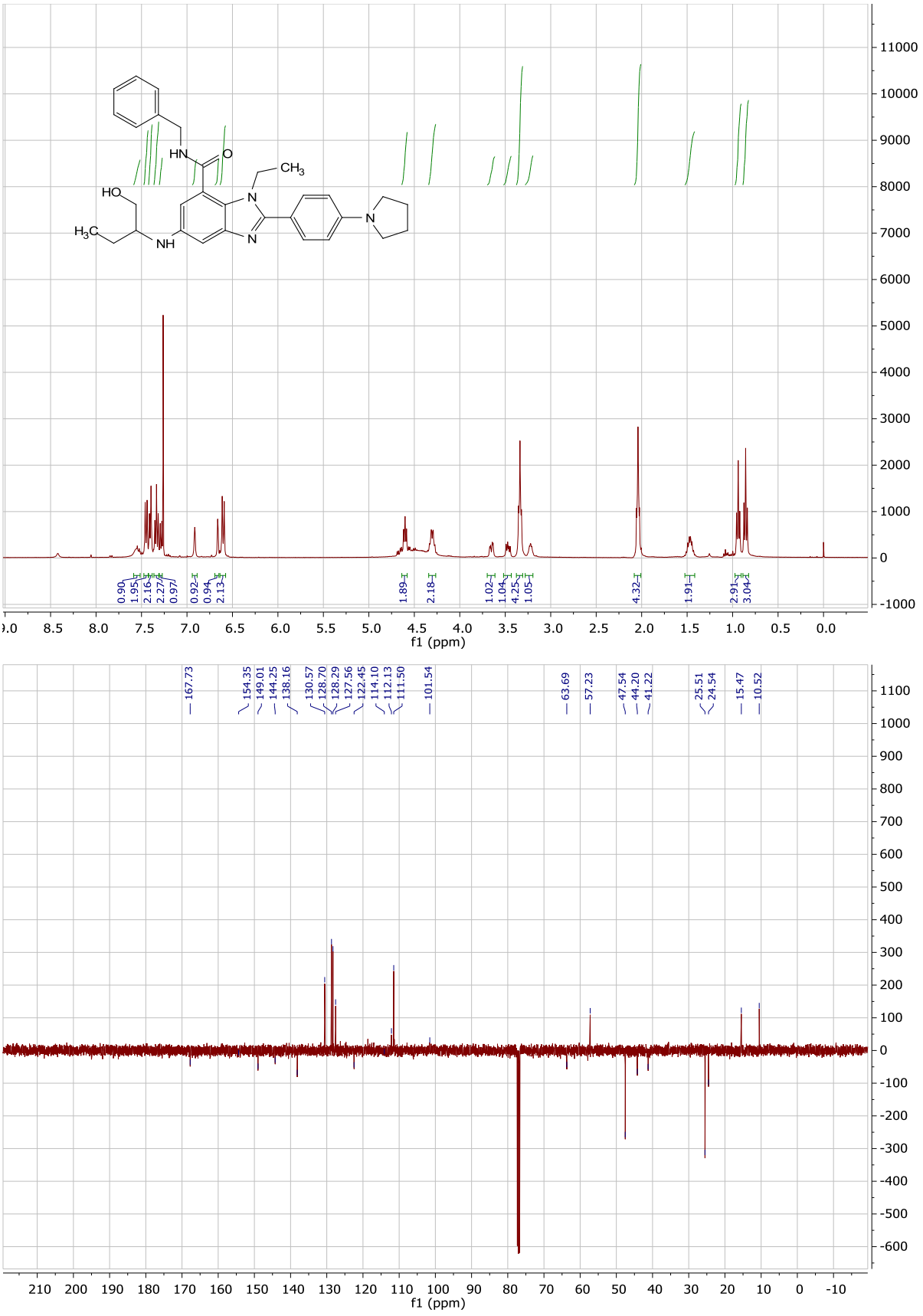


*Abbildung 207: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **rac-173**.*

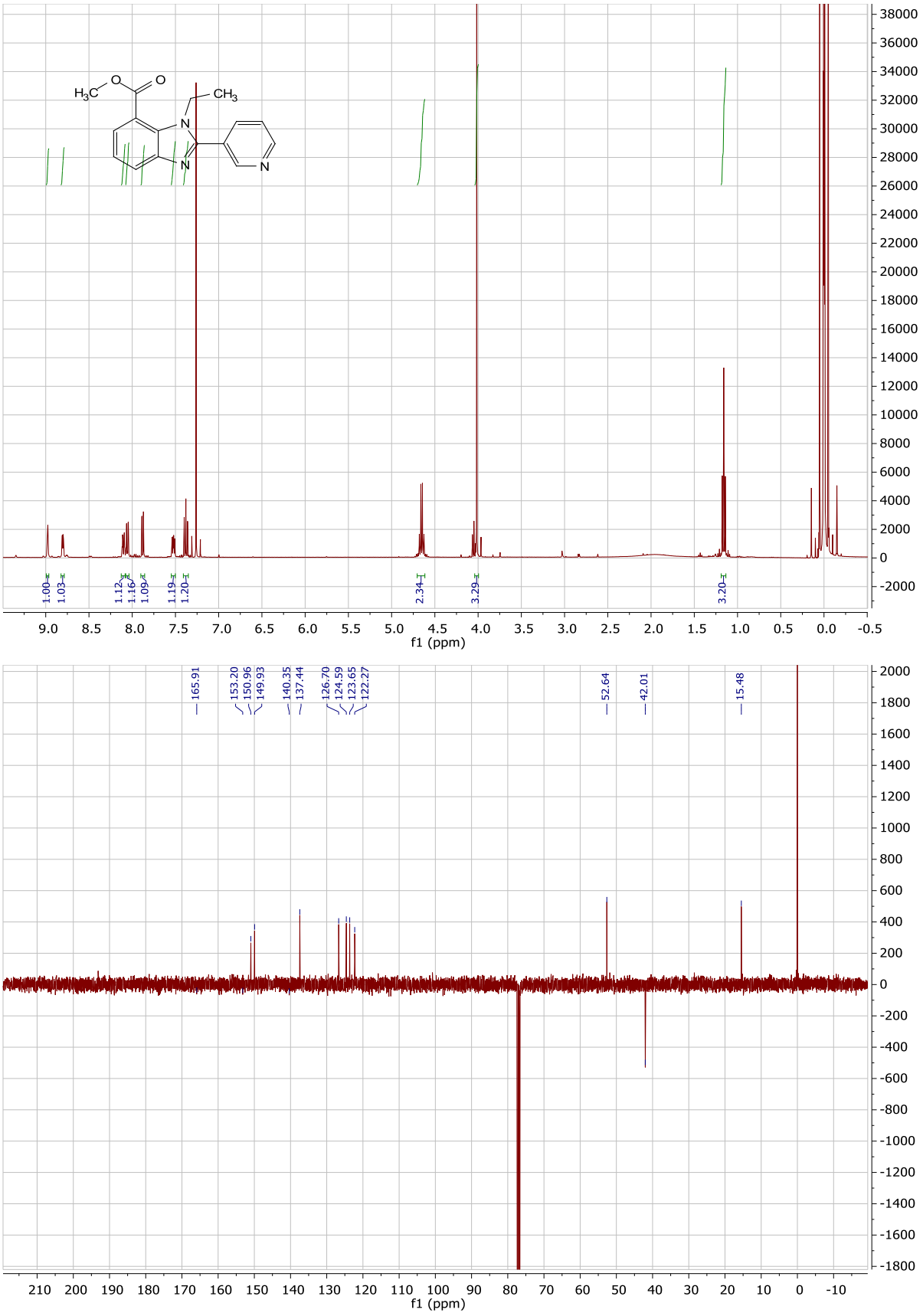


*Abbildung 208: [1]H- und [13]C-Spektrum von **177**.*

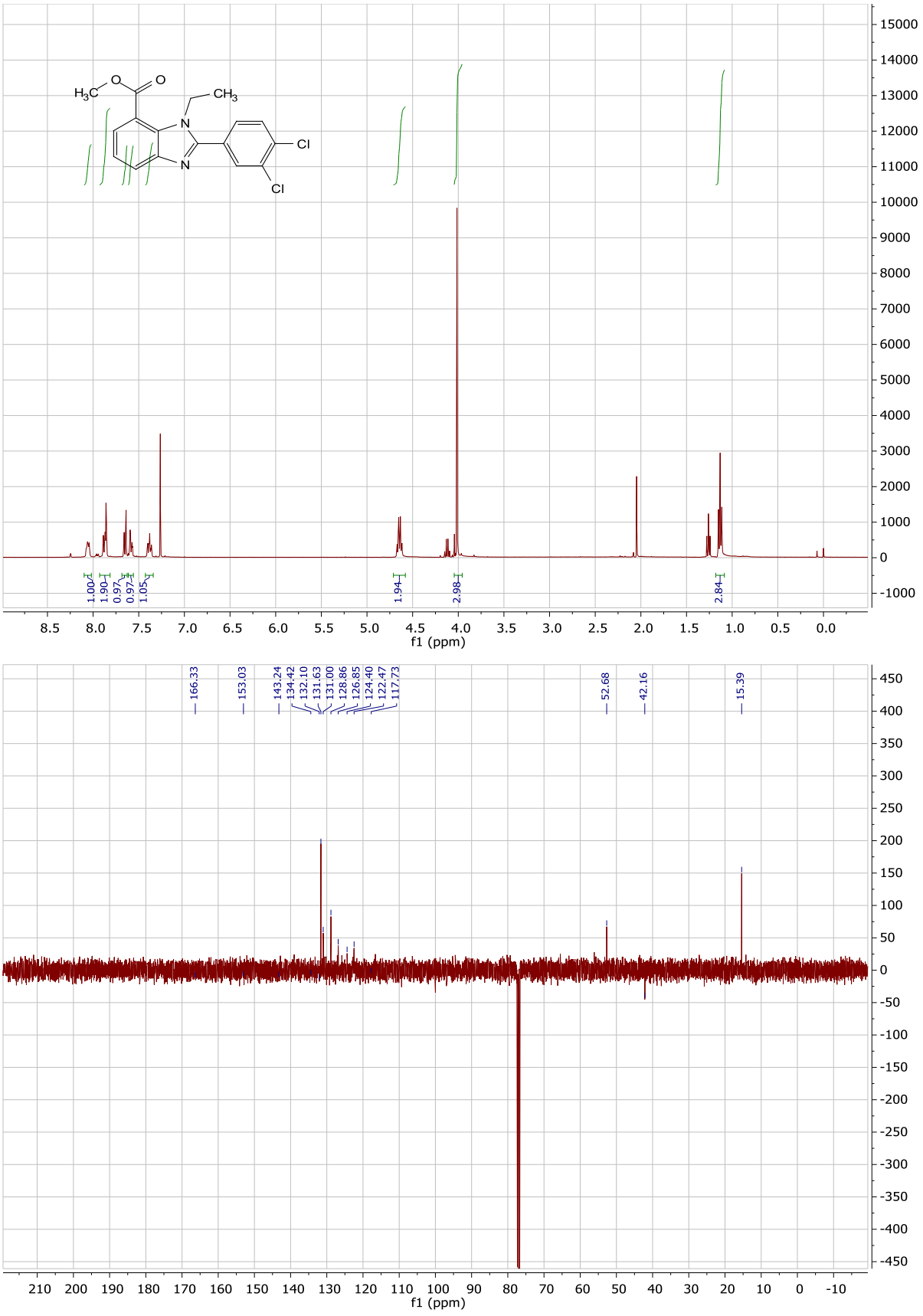


*Abbildung 209: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **178**.*

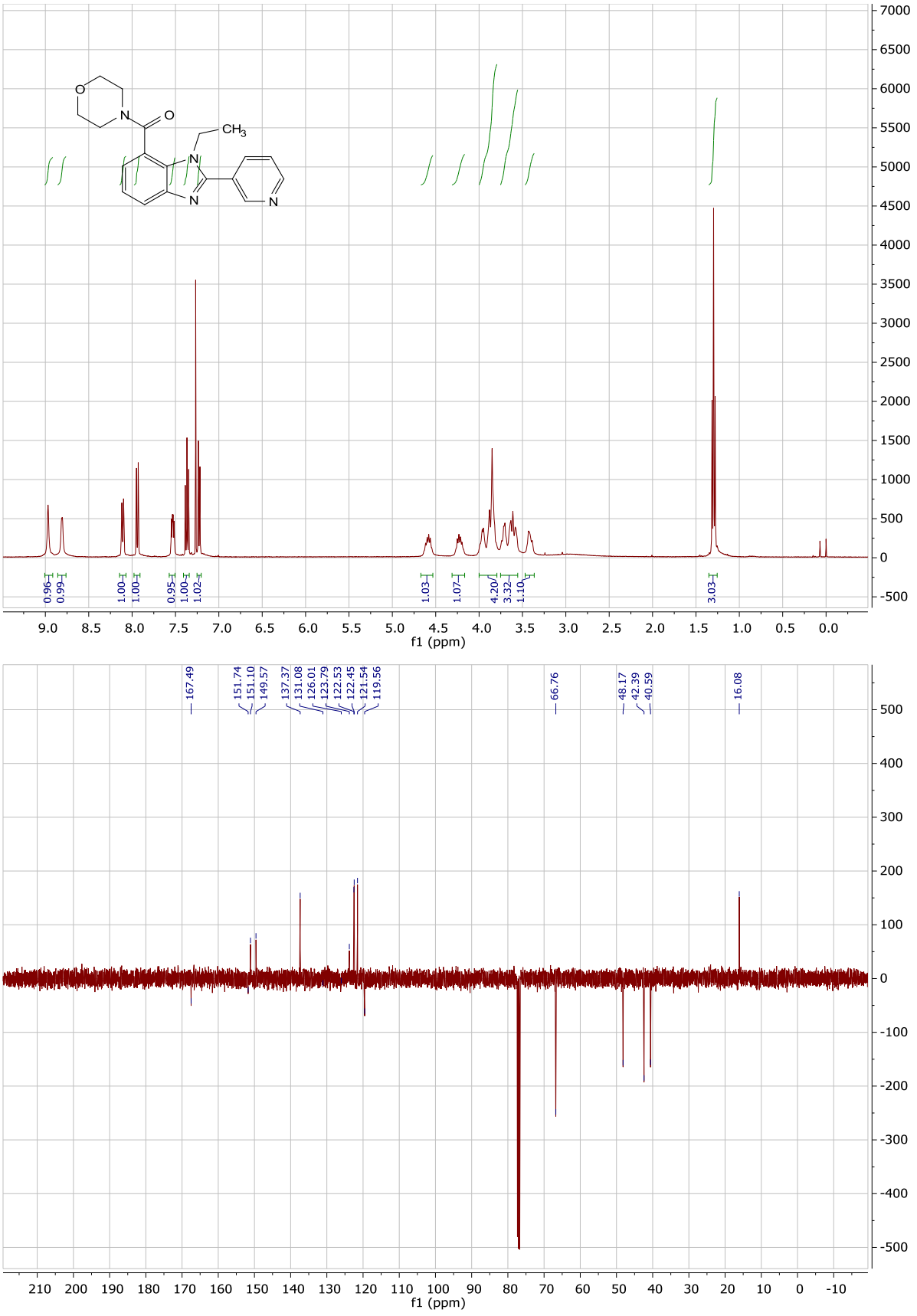


*Abbildung 210: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **175**.*

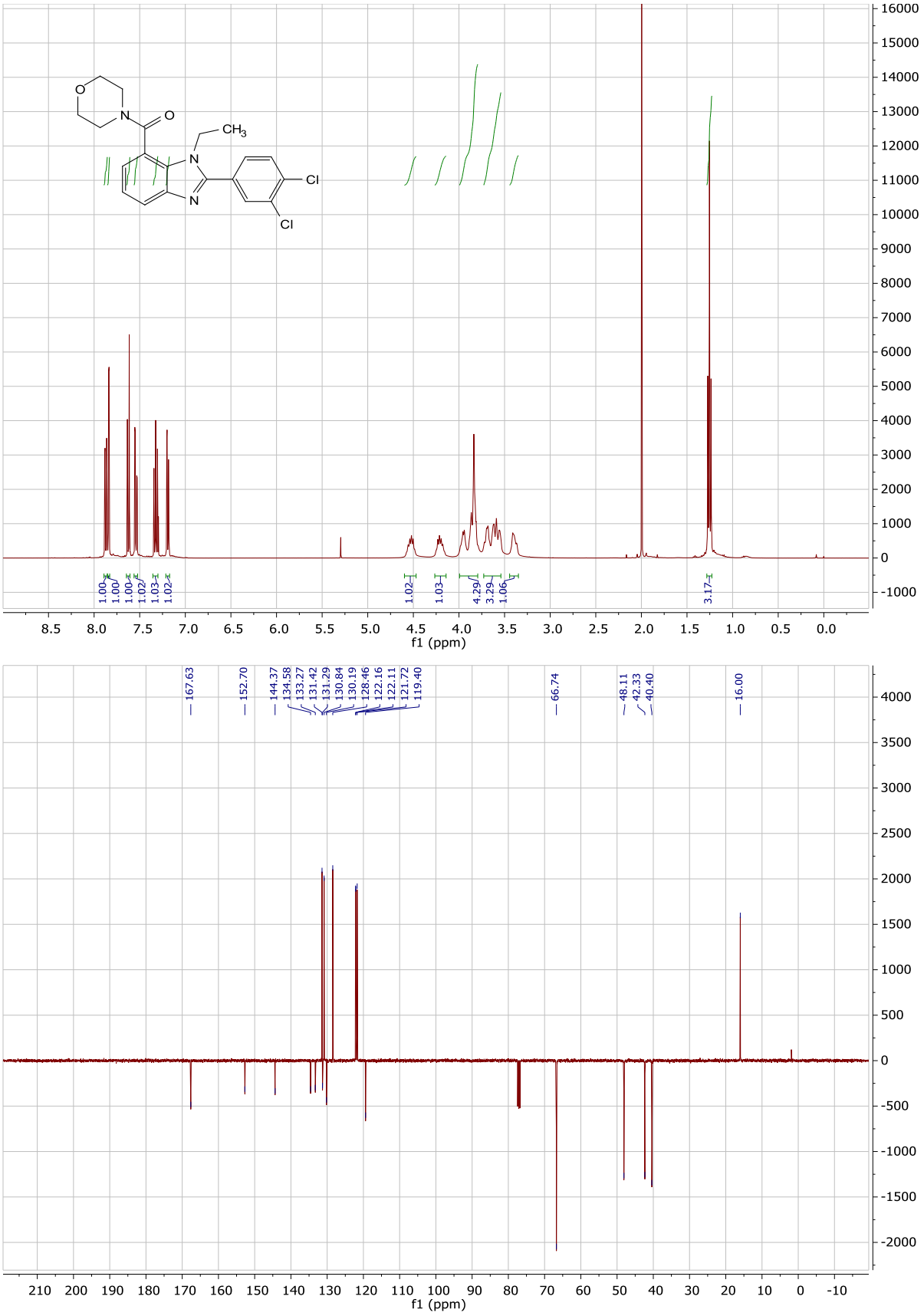


*Abbildung 211: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **176**.*

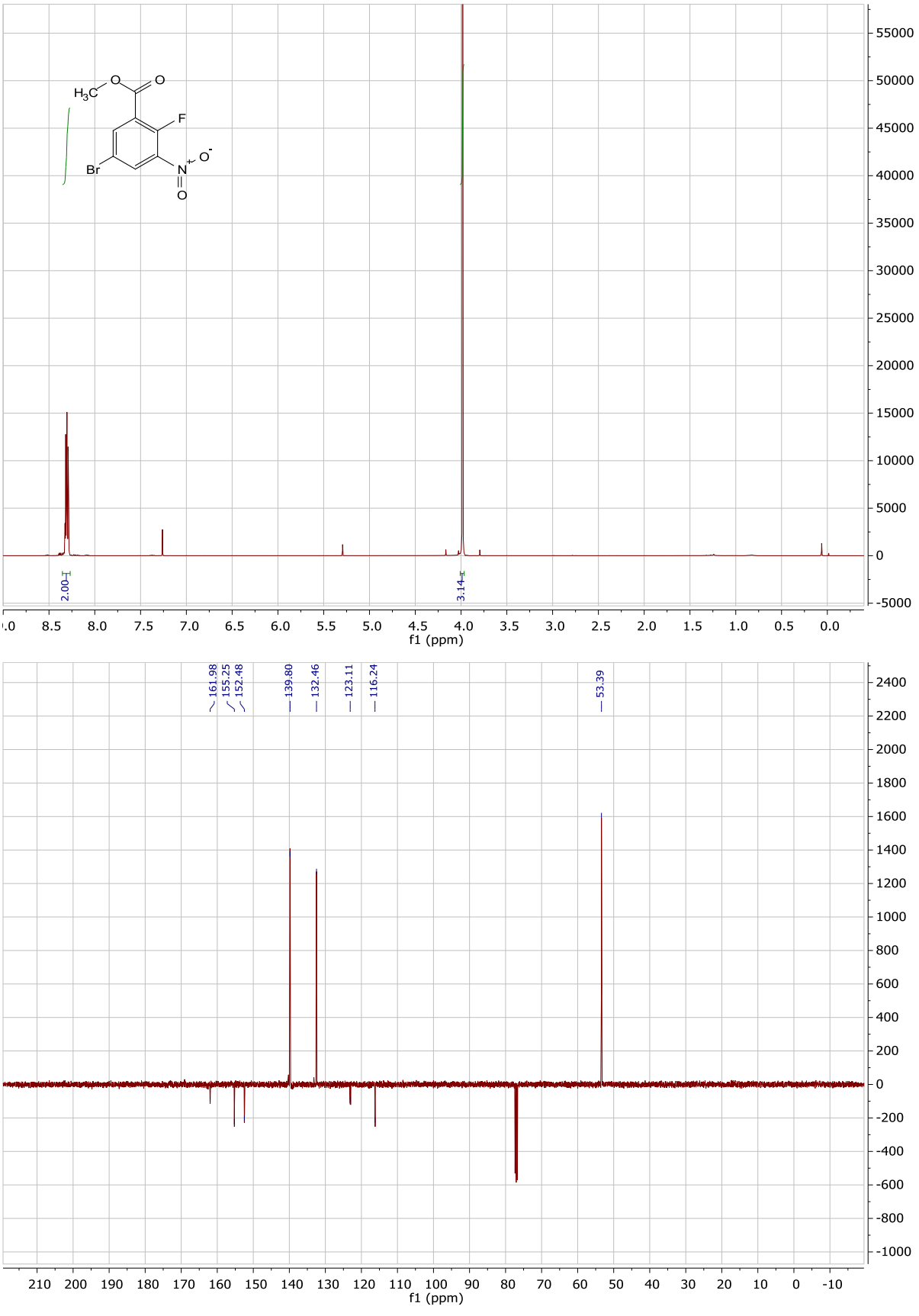


*Abbildung 212: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **190**.*

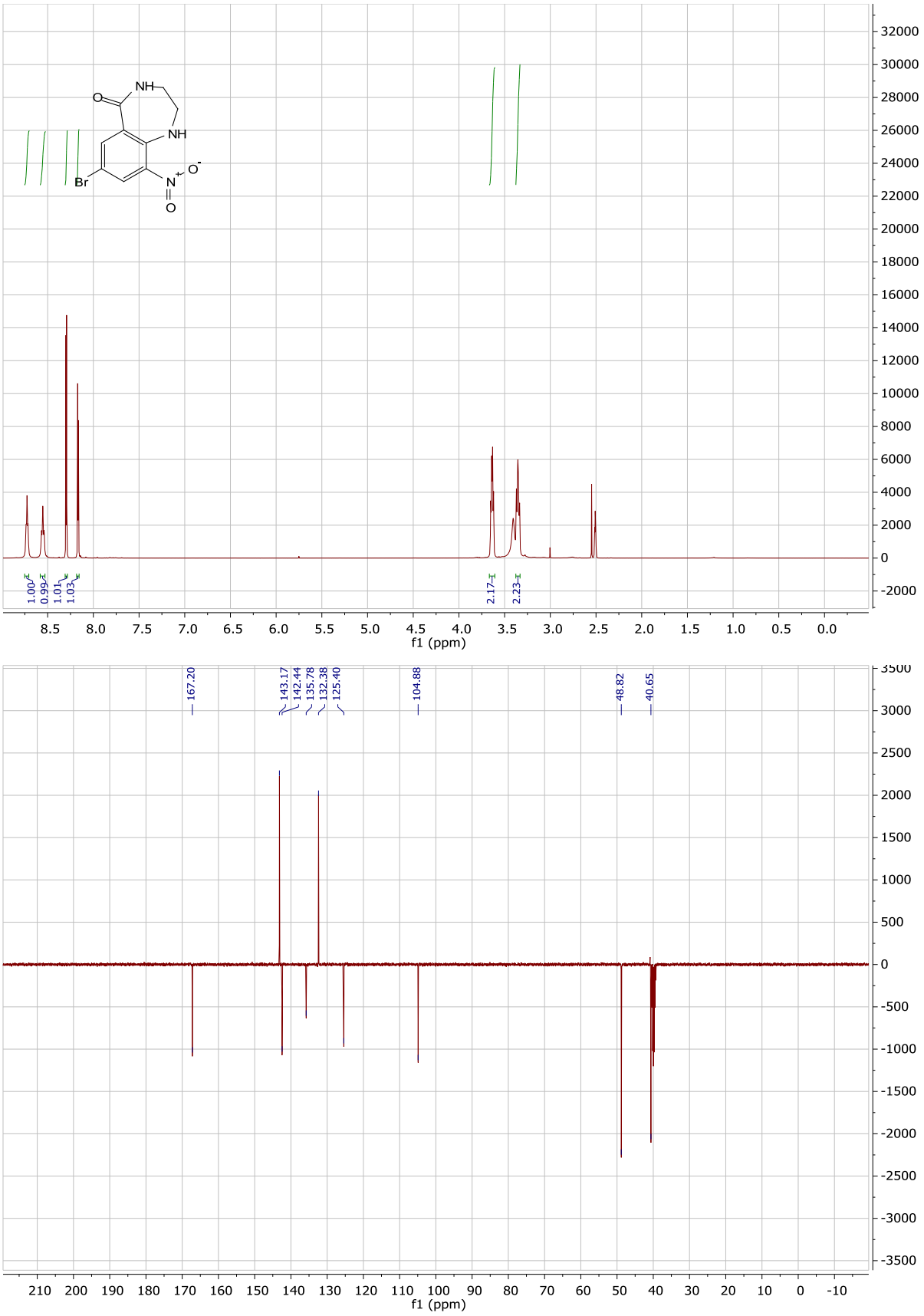


*Abbildung 213: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **192**.*

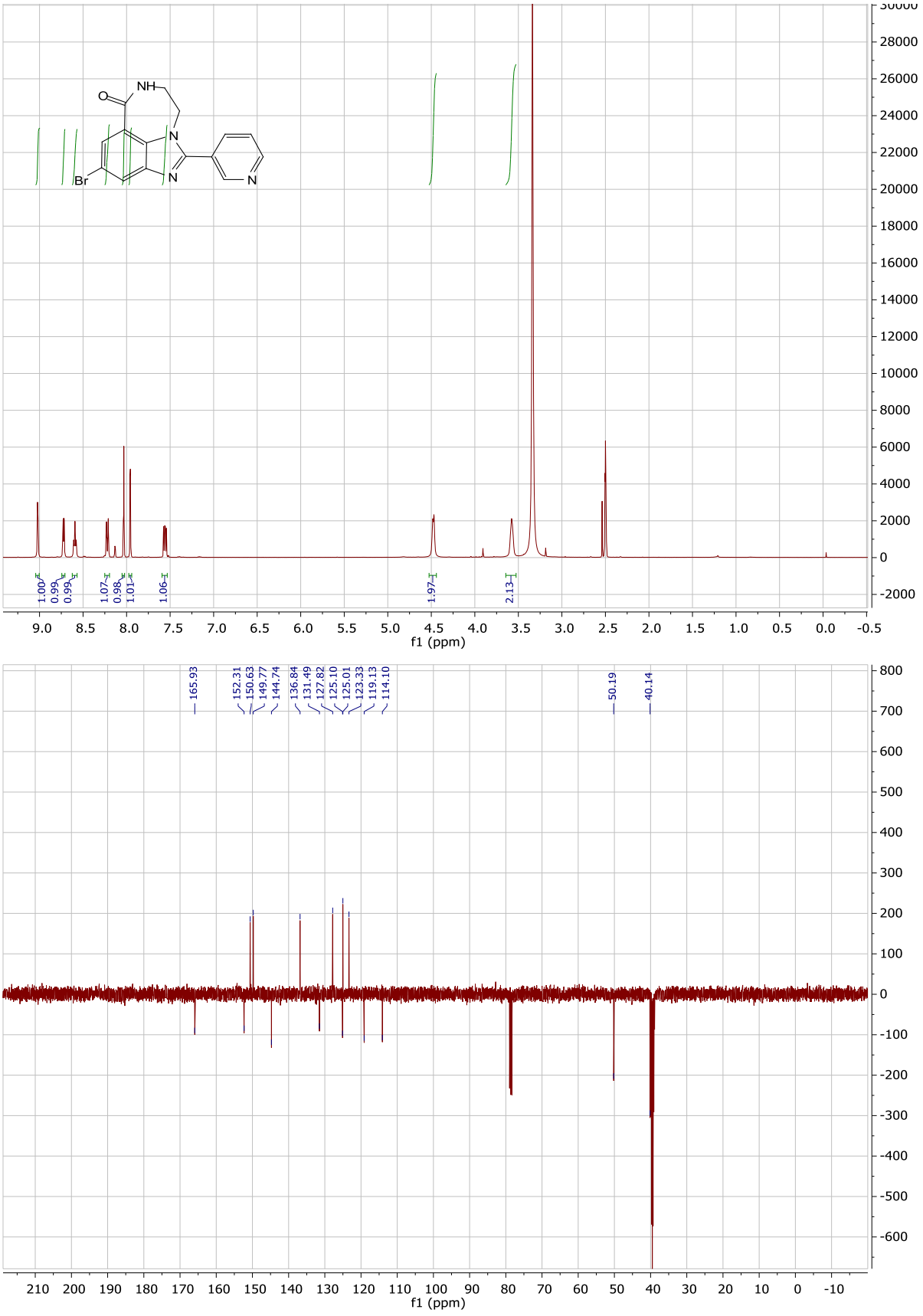


*Abbildung 214: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **193**.*

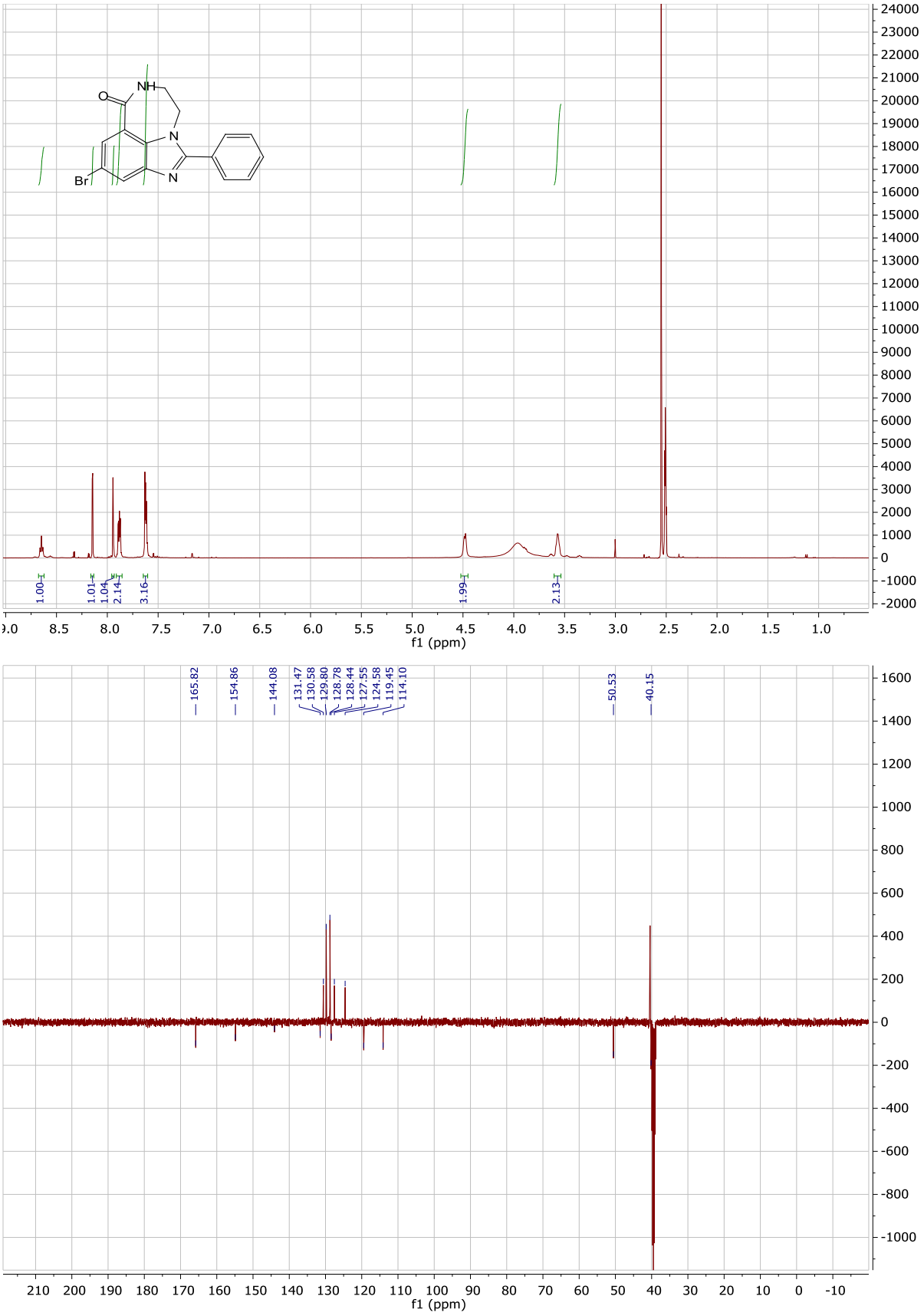


*Abbildung 215: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **194**.*

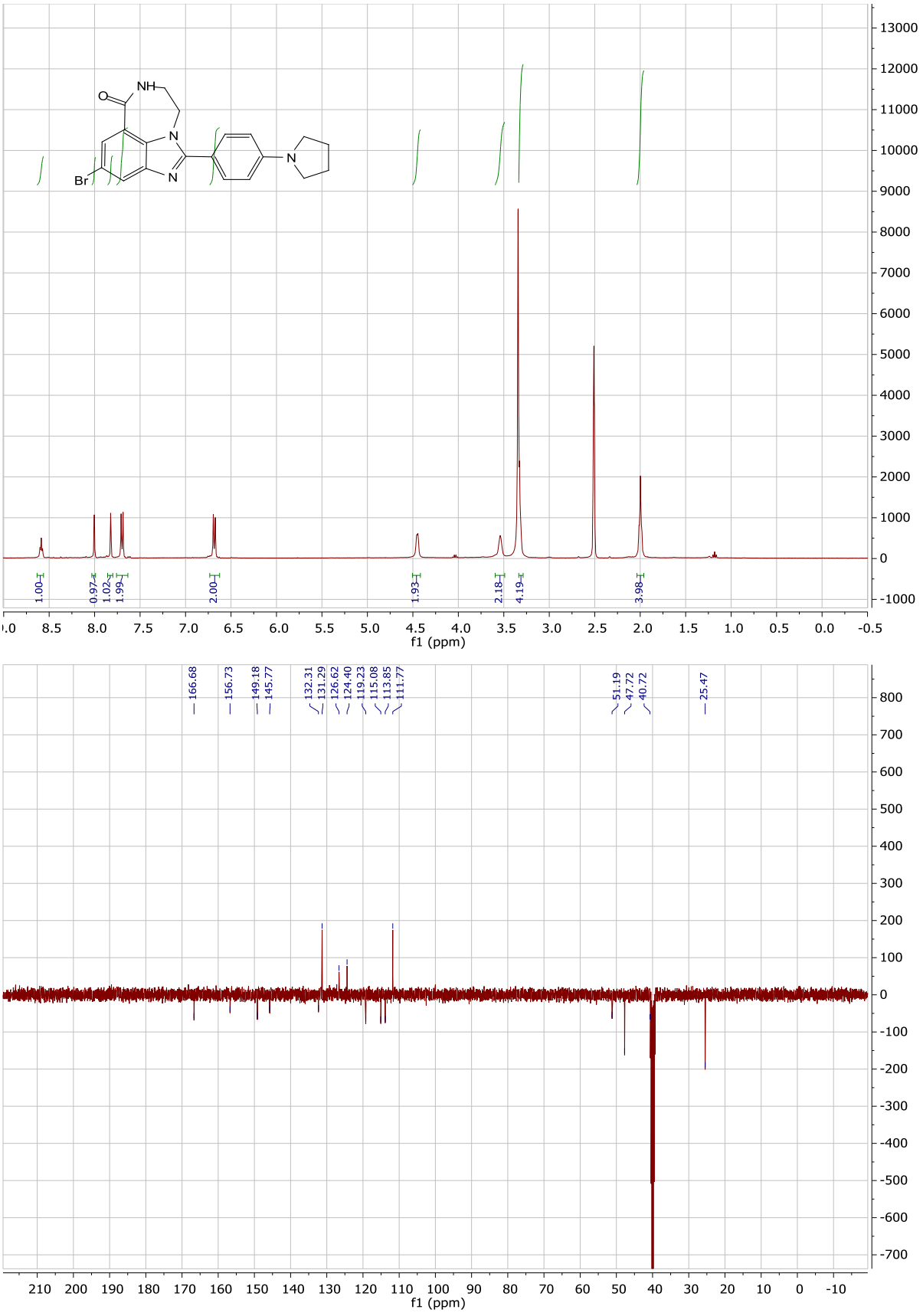


*Abbildung 216: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **195**.*

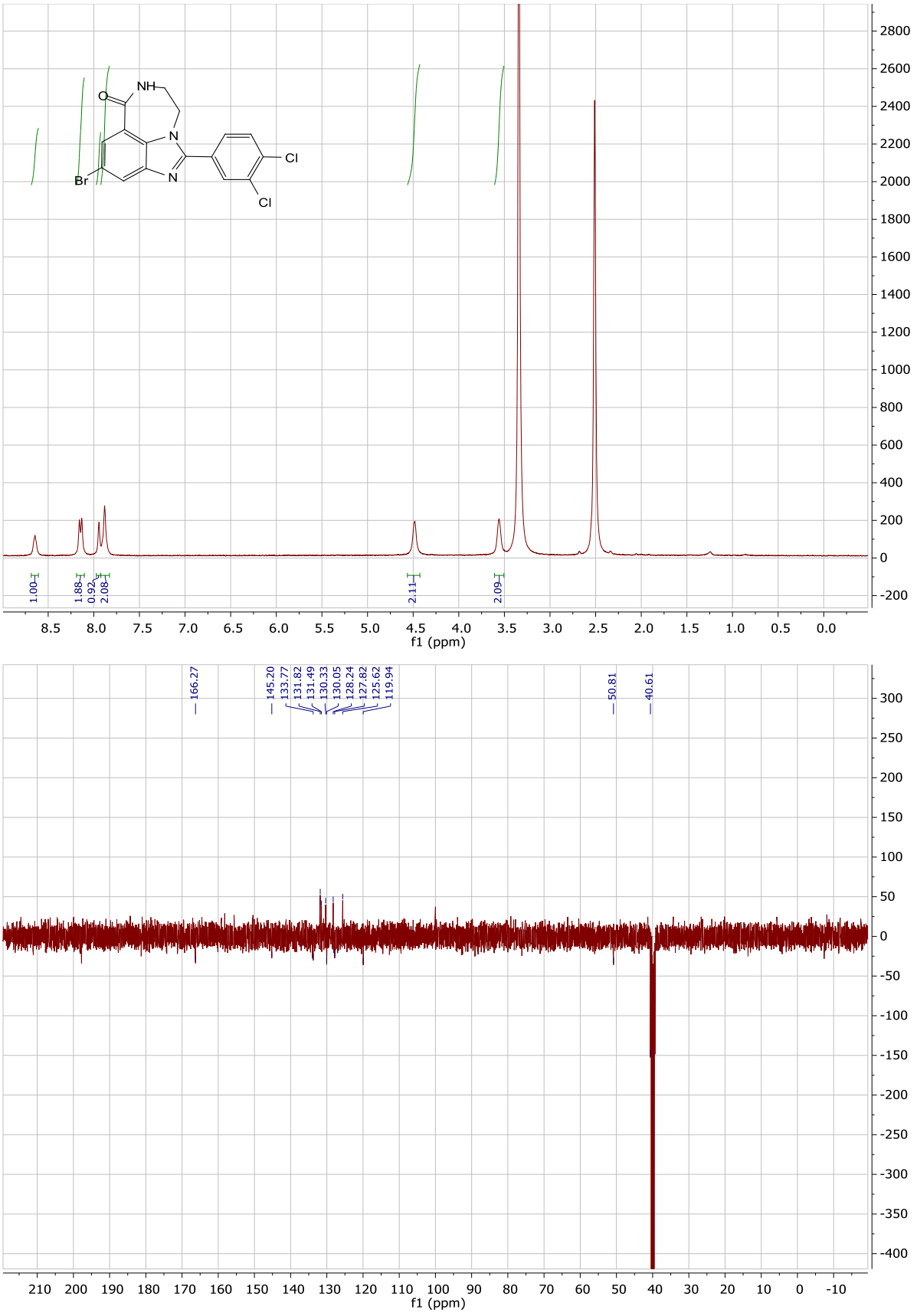


*Abbildung 217: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **196** (Schwerlöslich).*

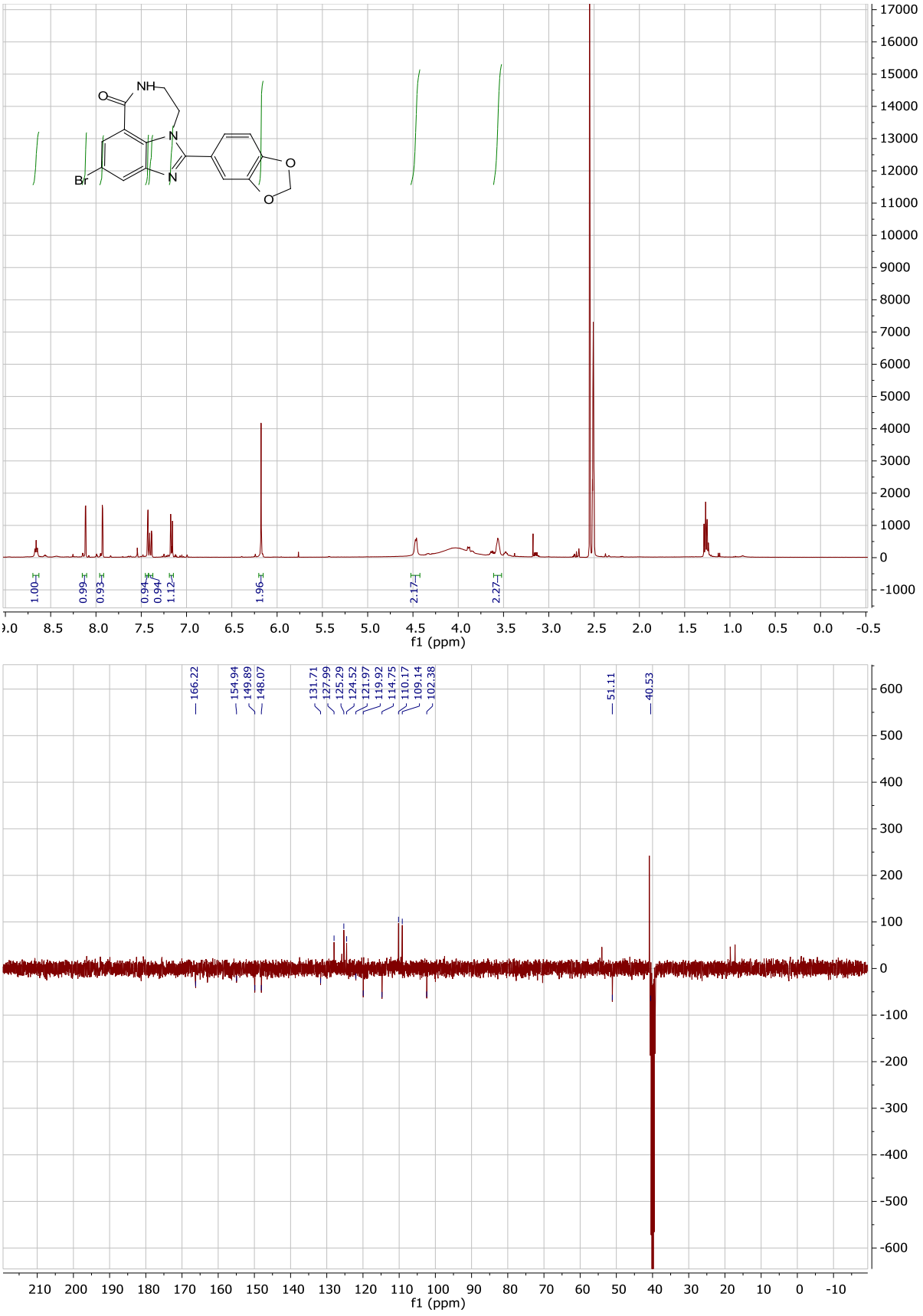


*Abbildung 218: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **197** (Schwerlöslich).*

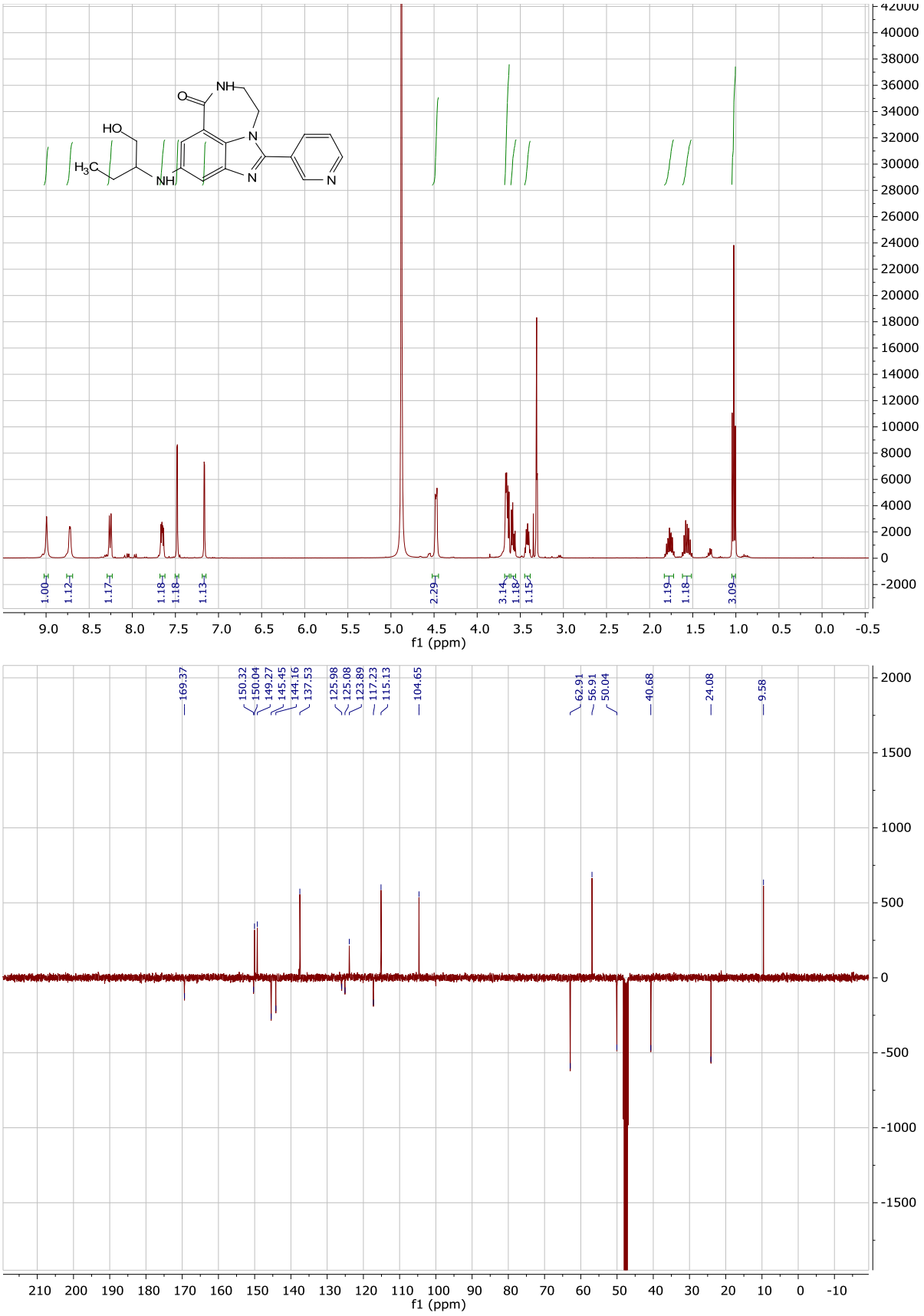


*Abbildung 219: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **rac-181**.*

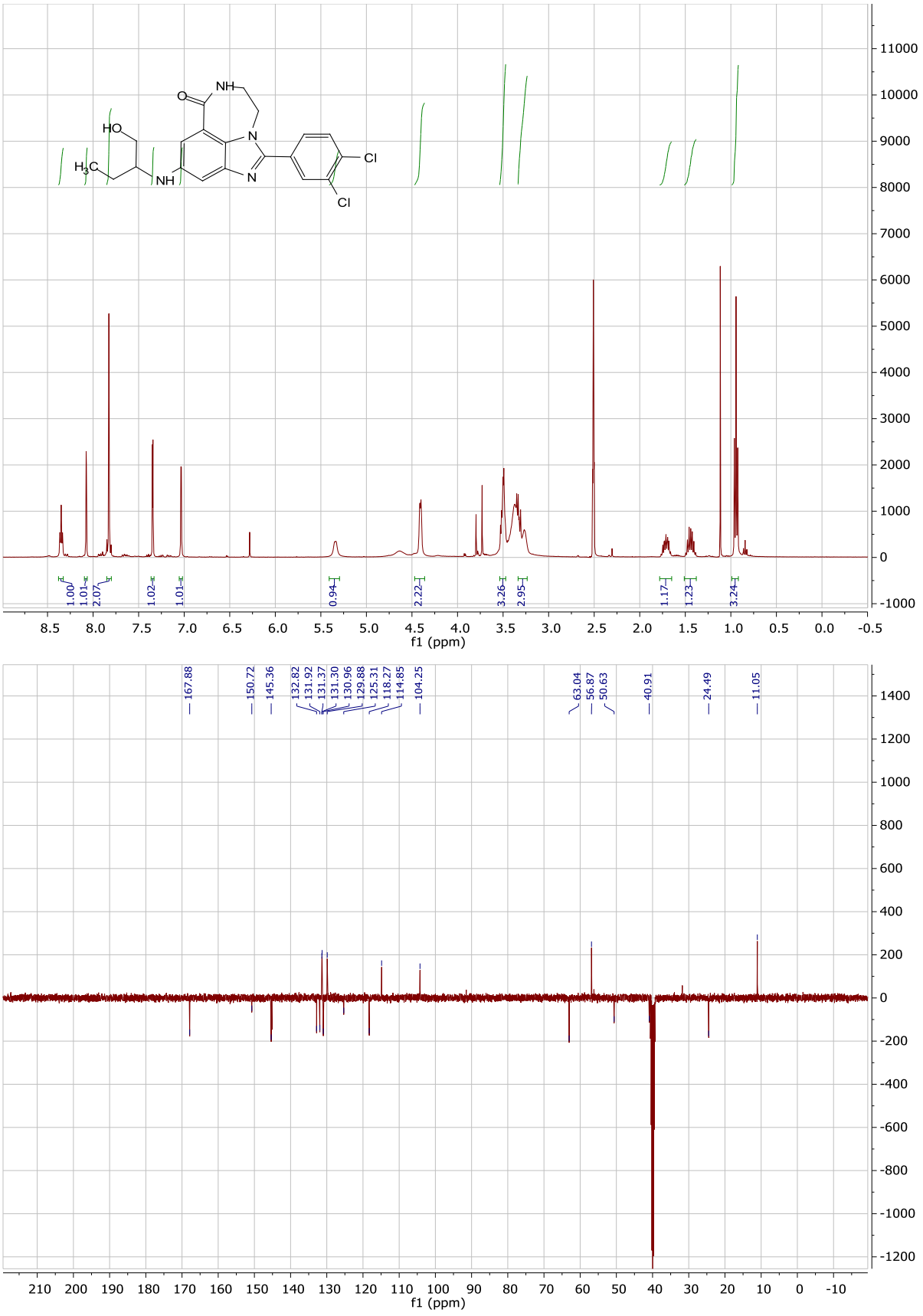


*Abbildung 220: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **rac-187**.*

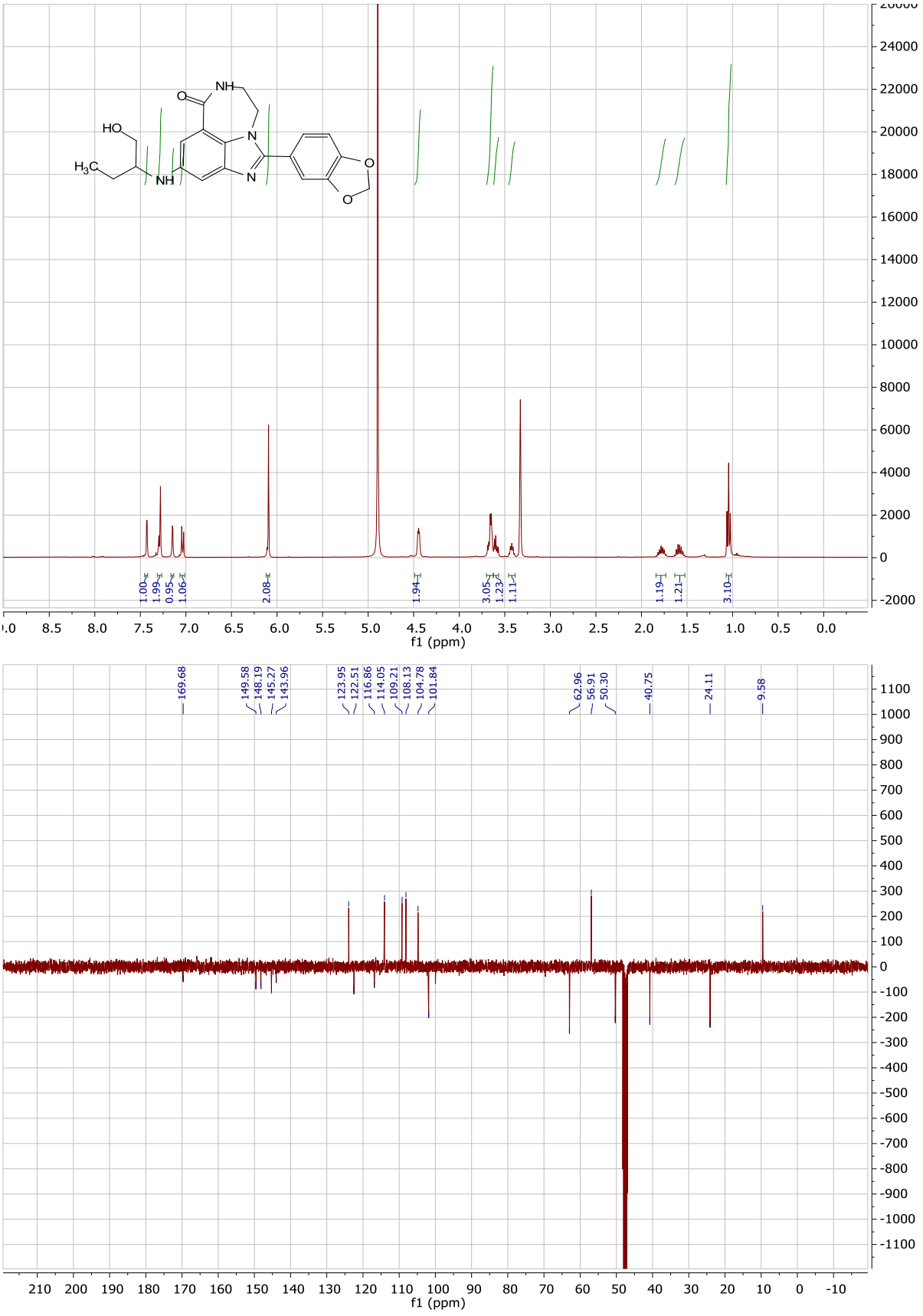


*Abbildung 221: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **rac-189**.*

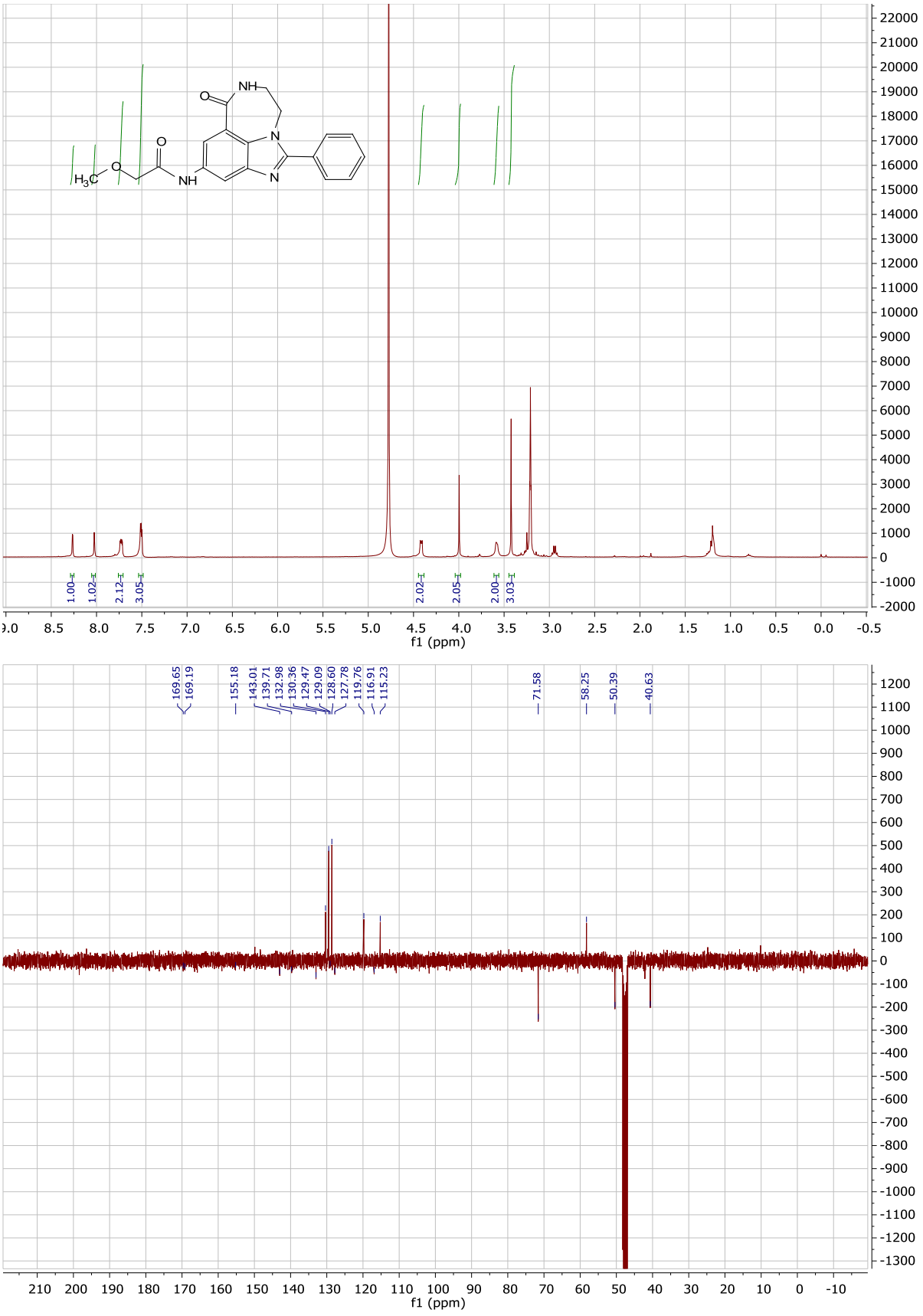


*Abbildung 222: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **182**.*

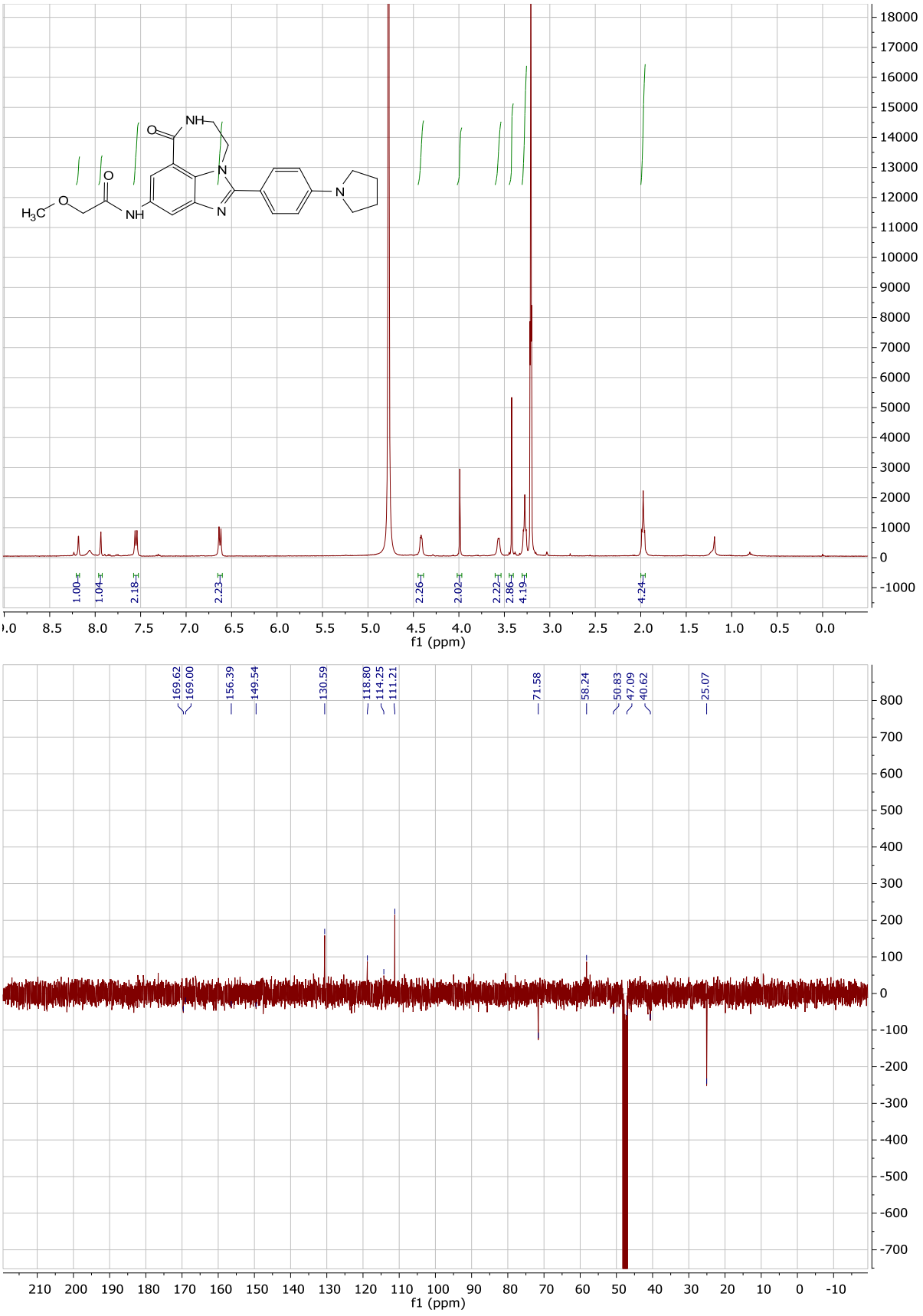


*Abbildung 223: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **184**.*

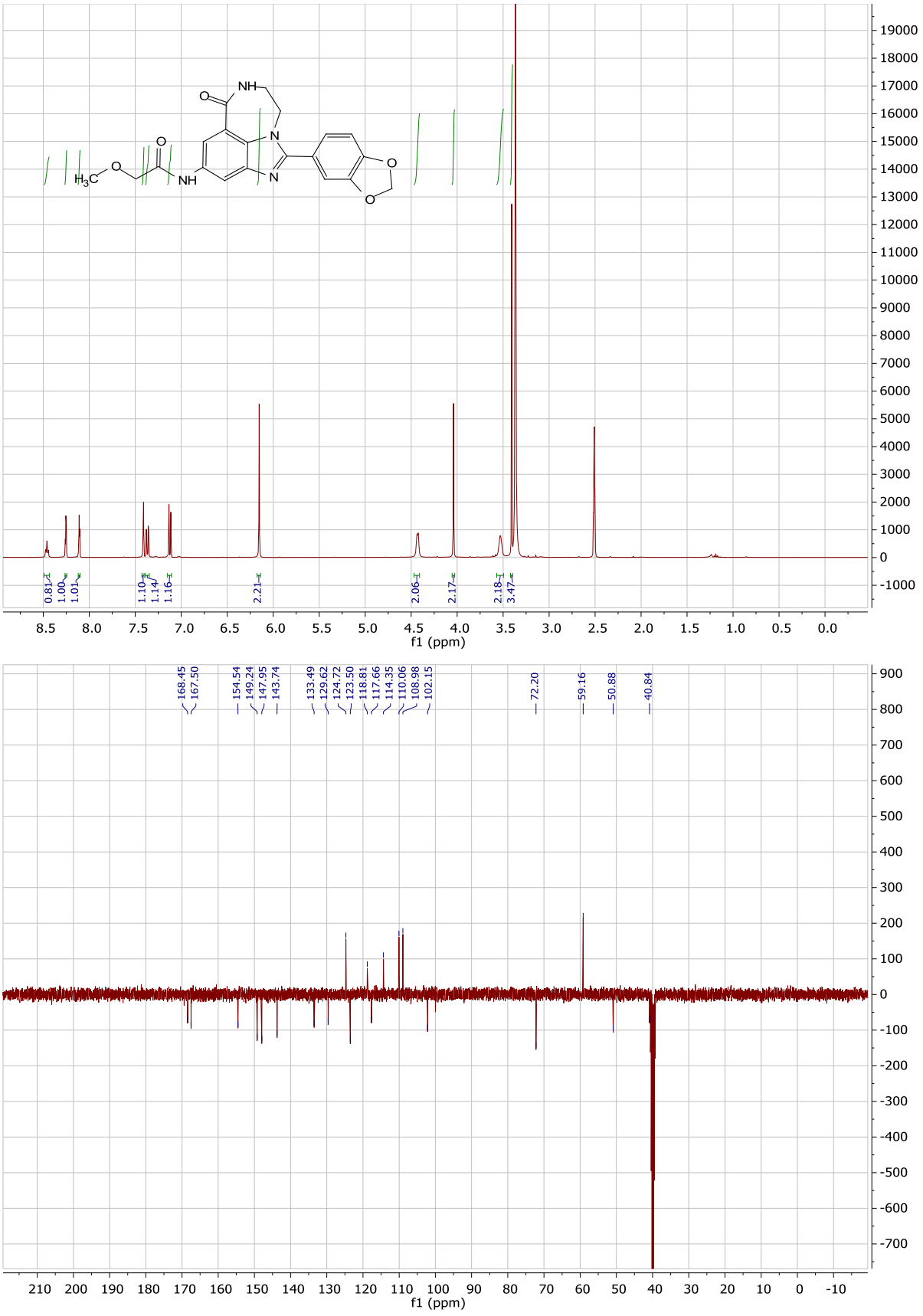


*Abbildung 224: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **188**.*

8.2 ^{1}H und ^{13}C NMR-Spektren „AG Mouriño“

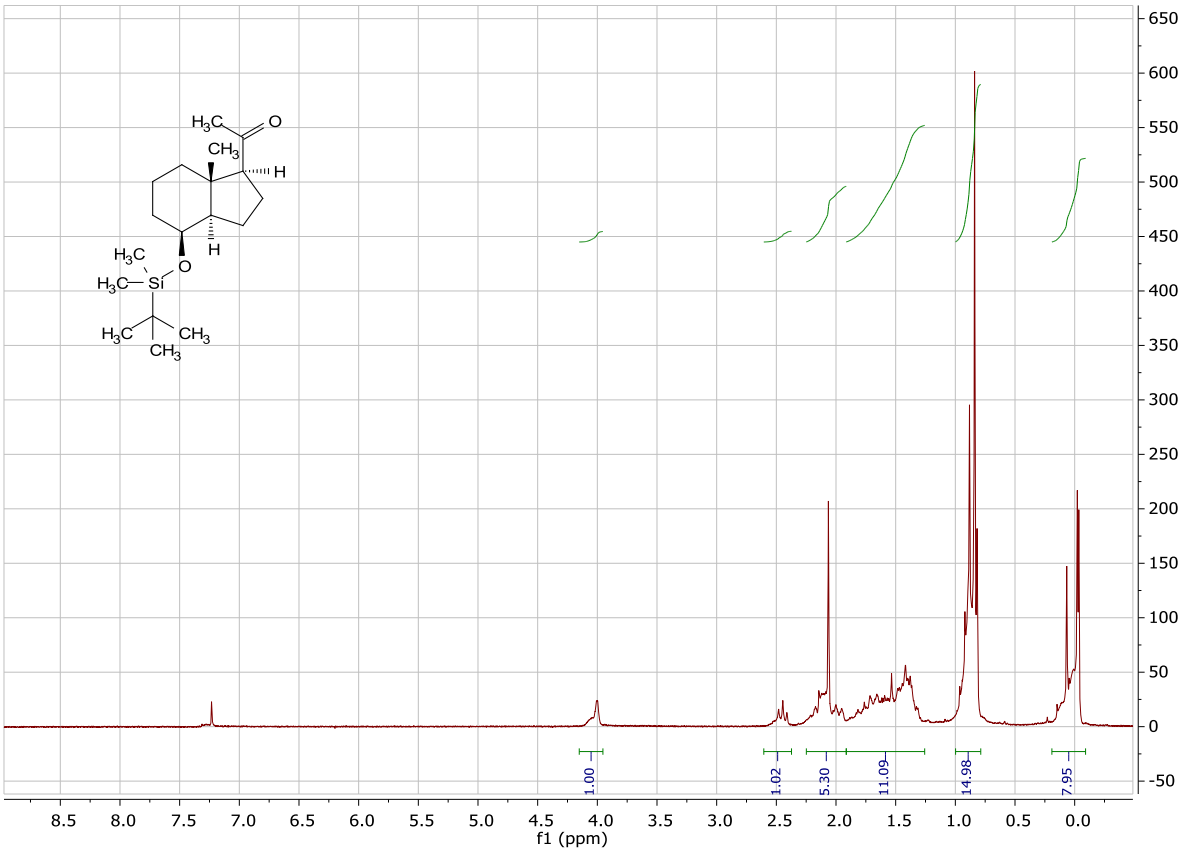


*Abbildung 225: ^{1}H-Spektrum von **234**.*

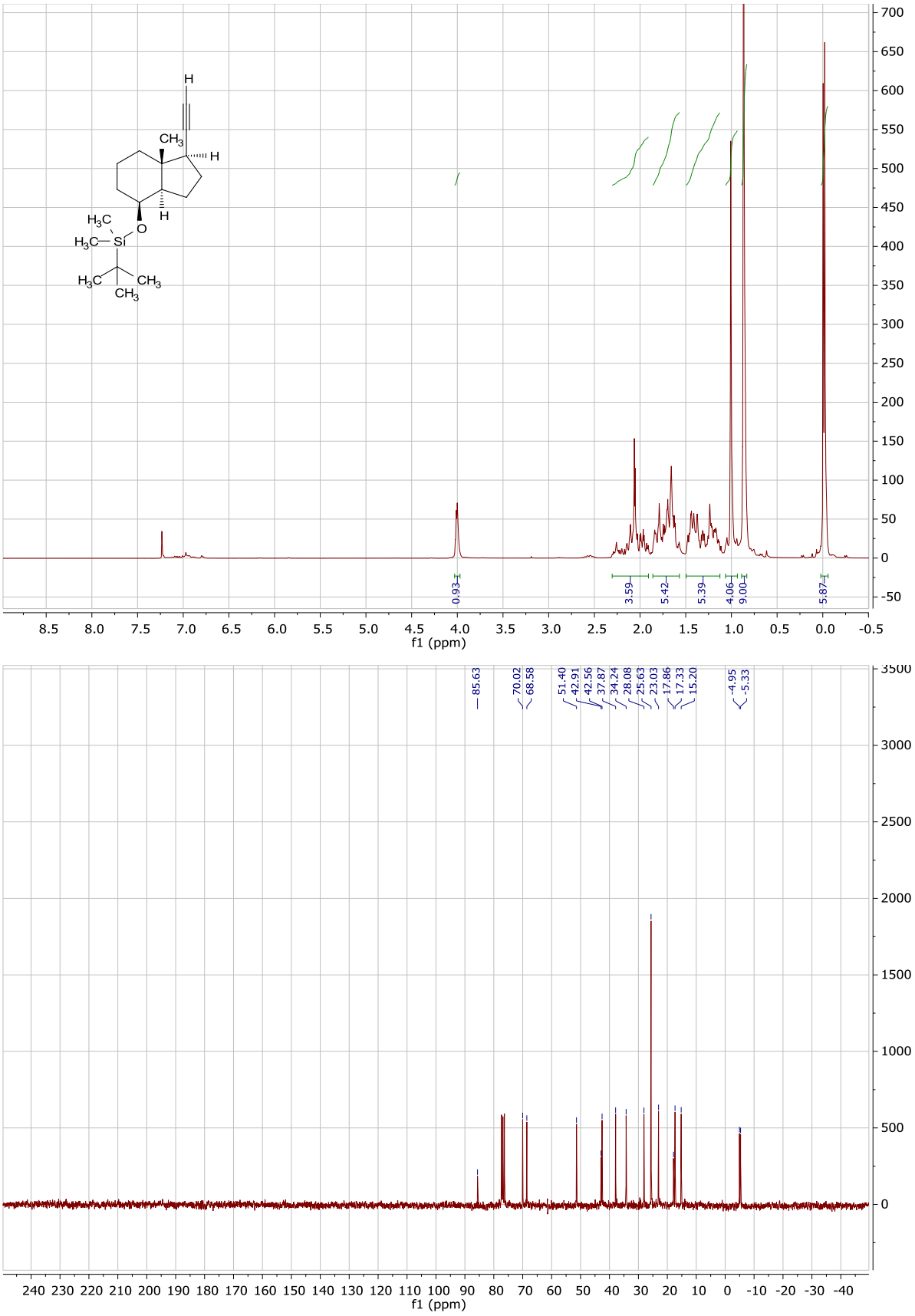


*Abbildung 226: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **237**.*

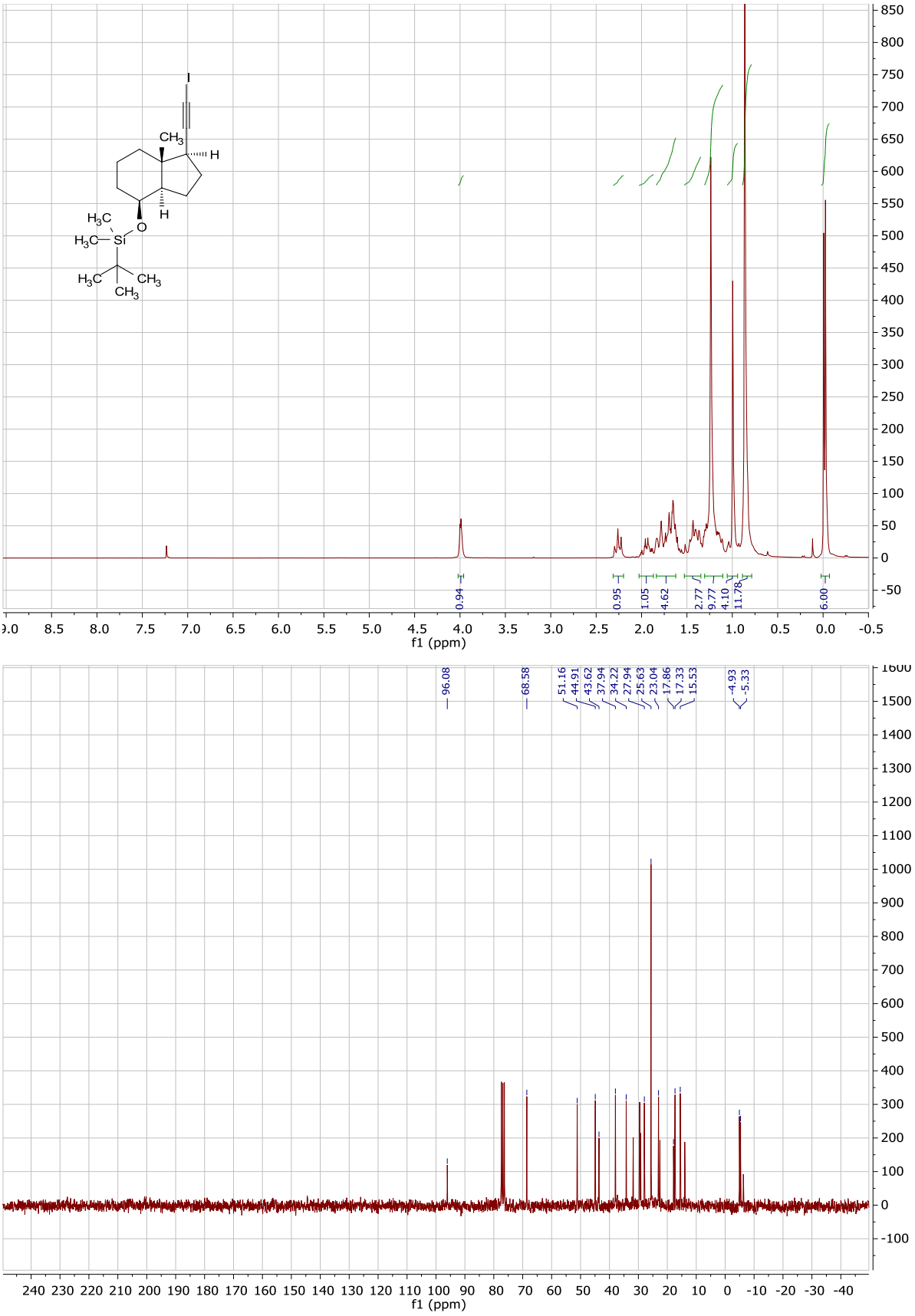


*Abbildung 227: [1]H- und [13]C-Spektrum von **229**.*

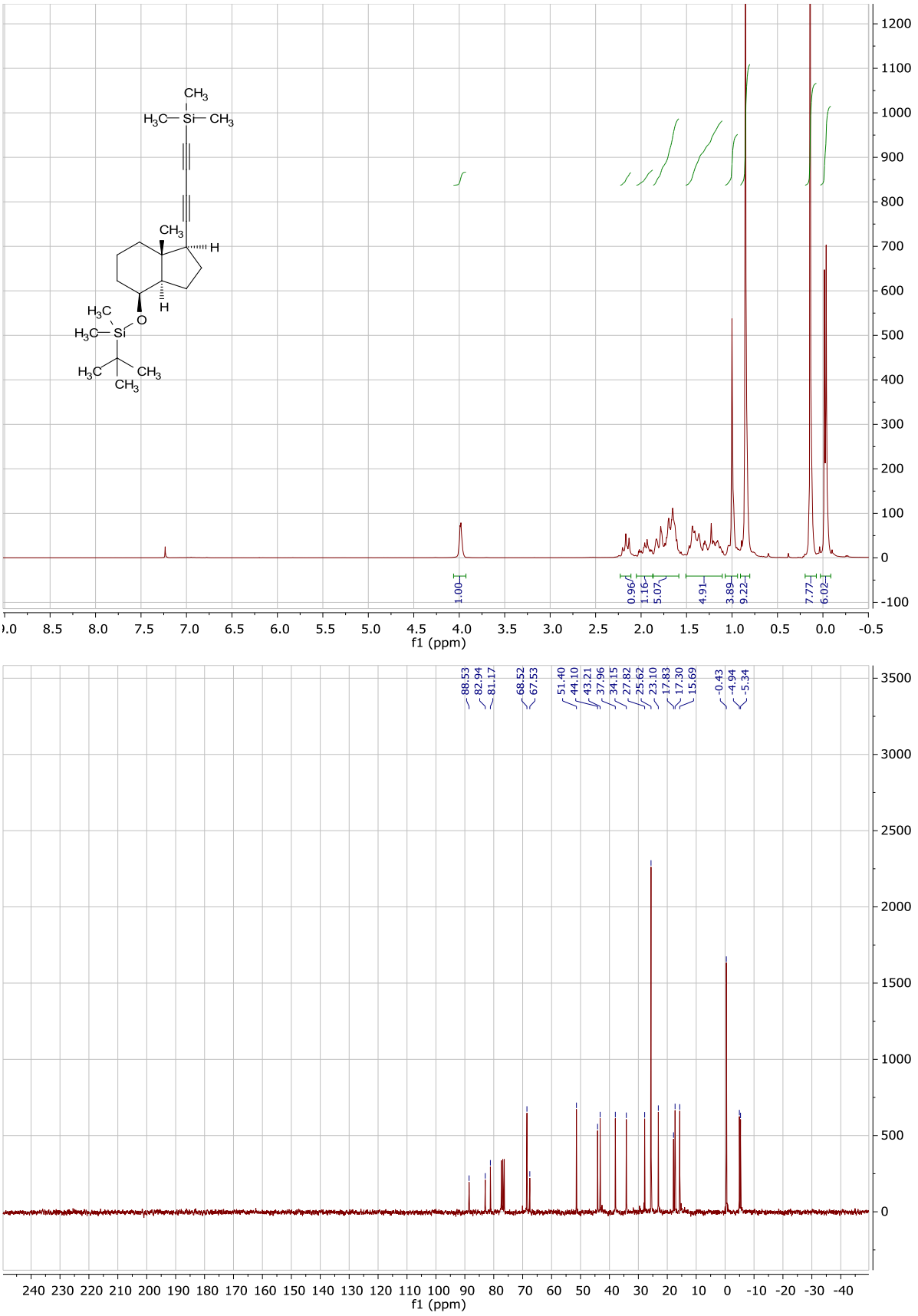


*Abbildung 228: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **238**.*

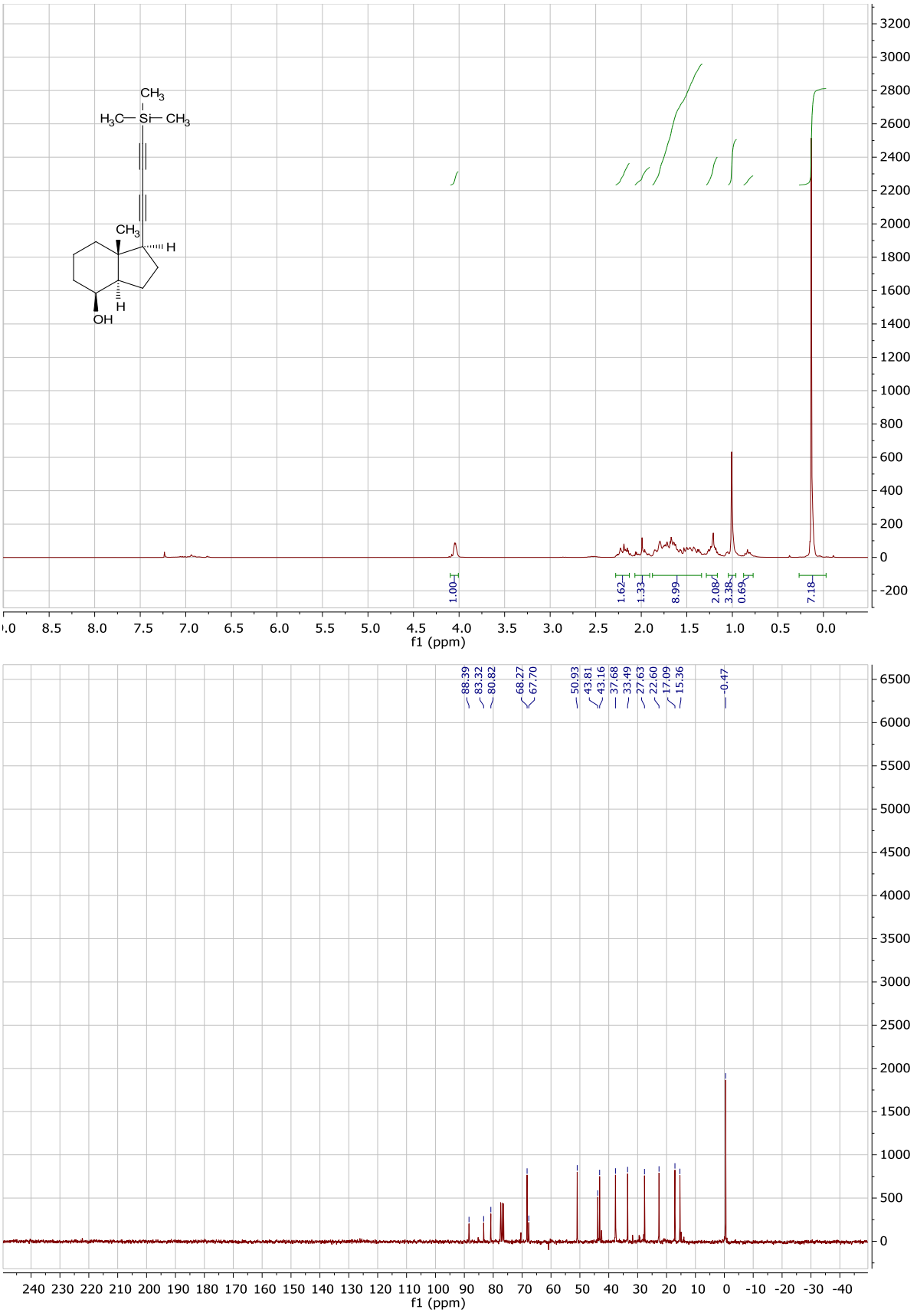


*Abbildung 229: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **239**.*

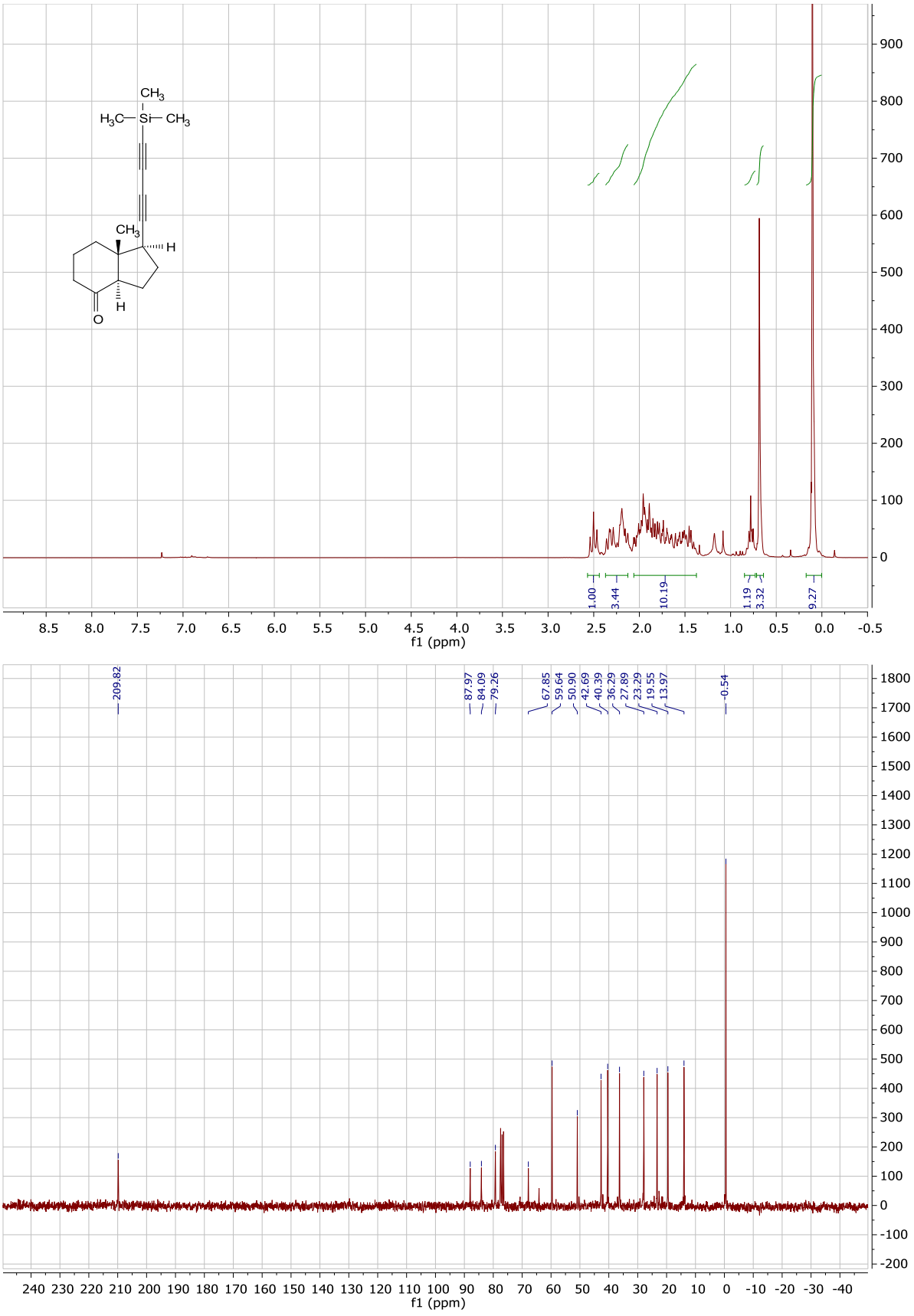


*Abbildung 230: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **240**.*

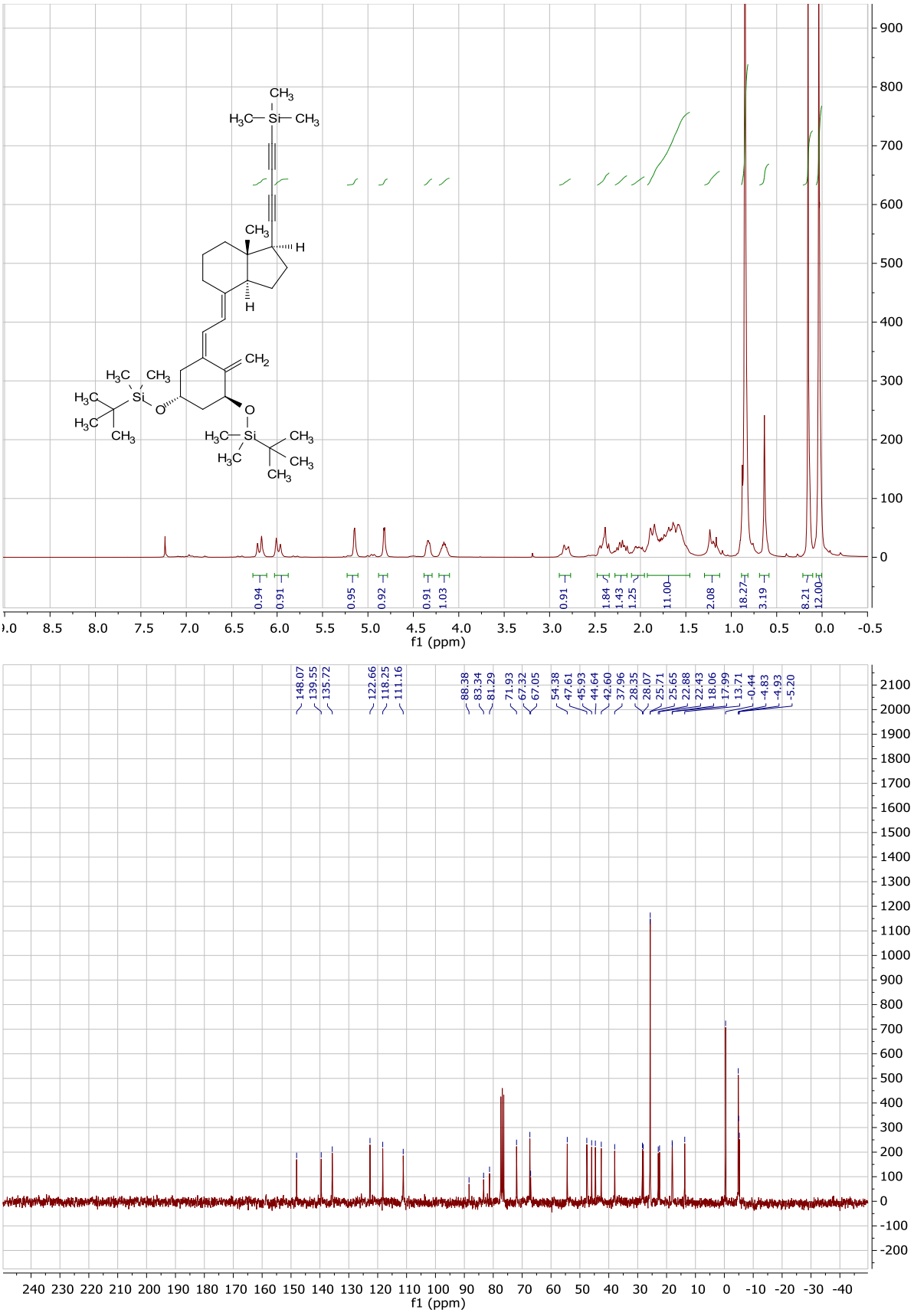


*Abbildung 231: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **241**.*

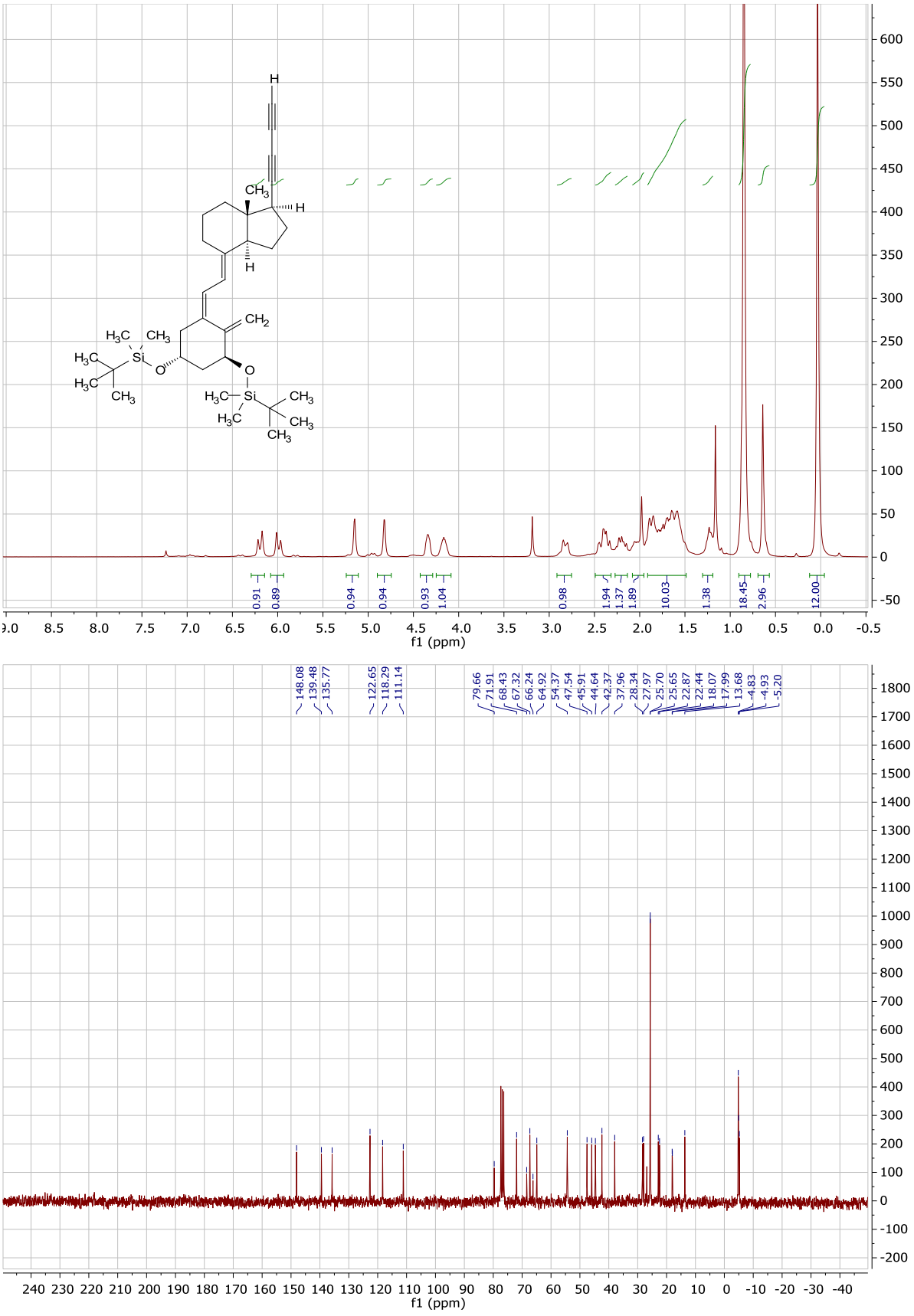


*Abbildung 232: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **223**.*

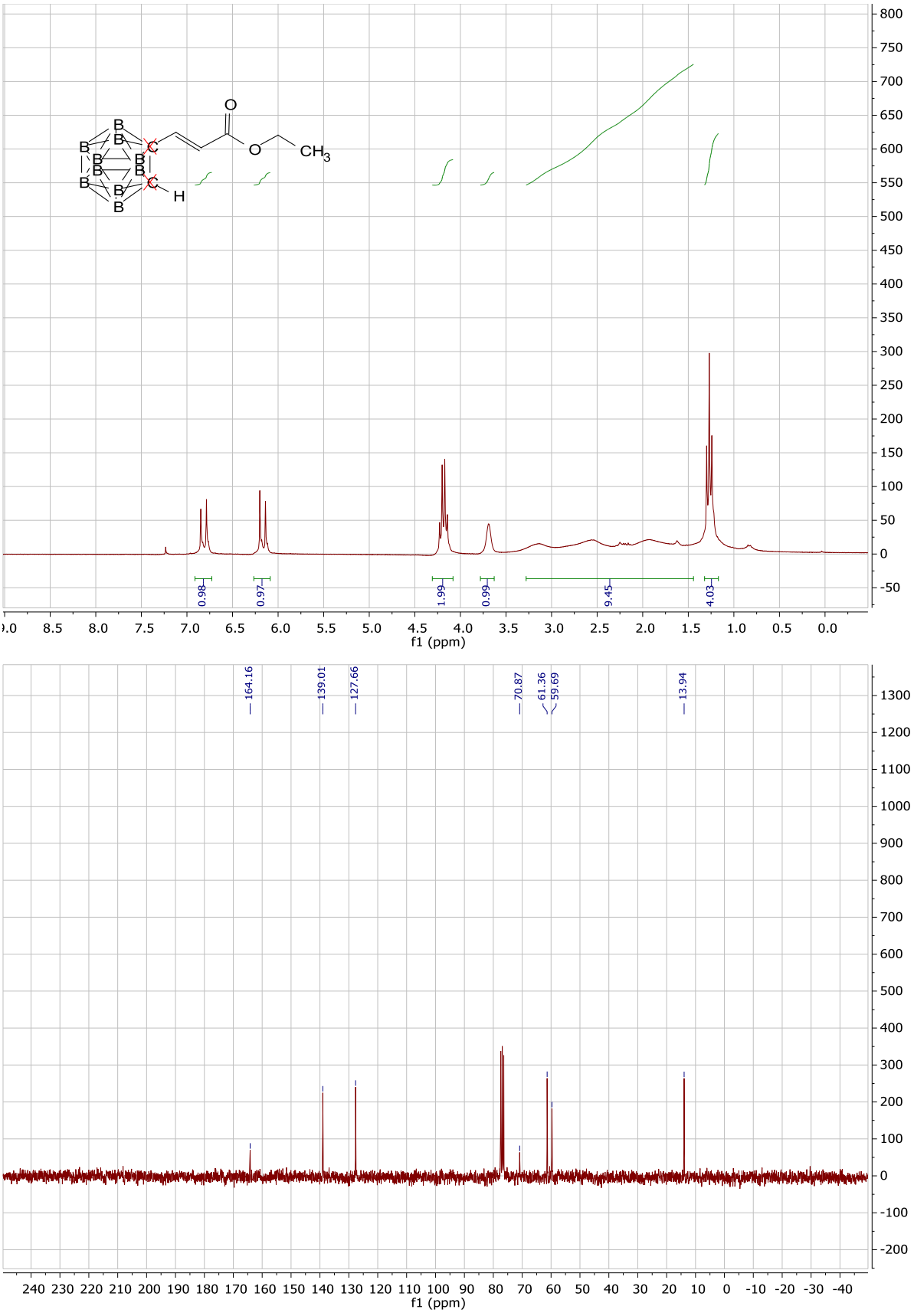


*Abbildung 233: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **246** (B entspricht B-H, Vereinfachung für die Übersichtlichkeit).*

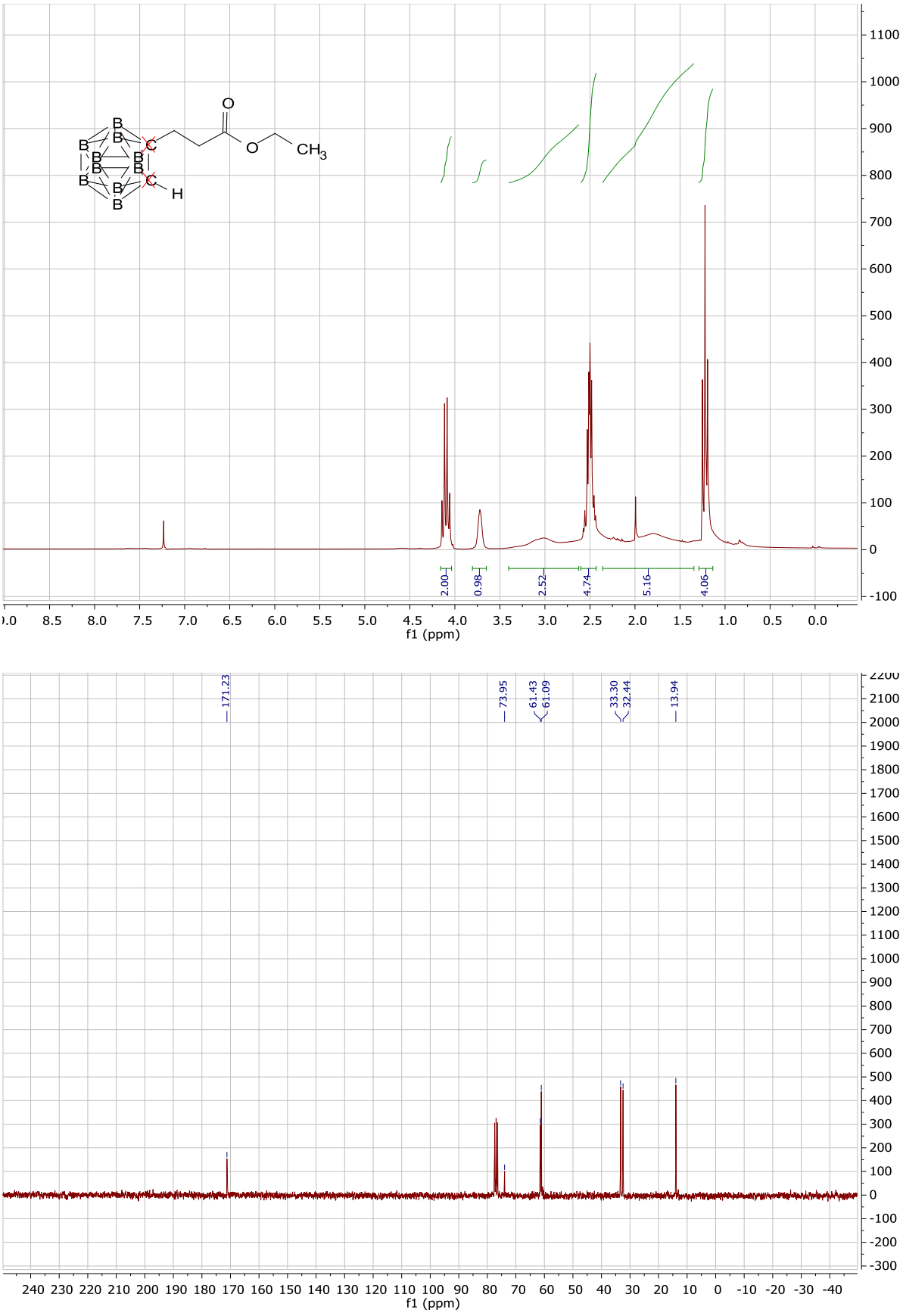


*Abbildung 234: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **247** (B entspricht B-H, Vereinfachung für die Übersichtlichkeit).*

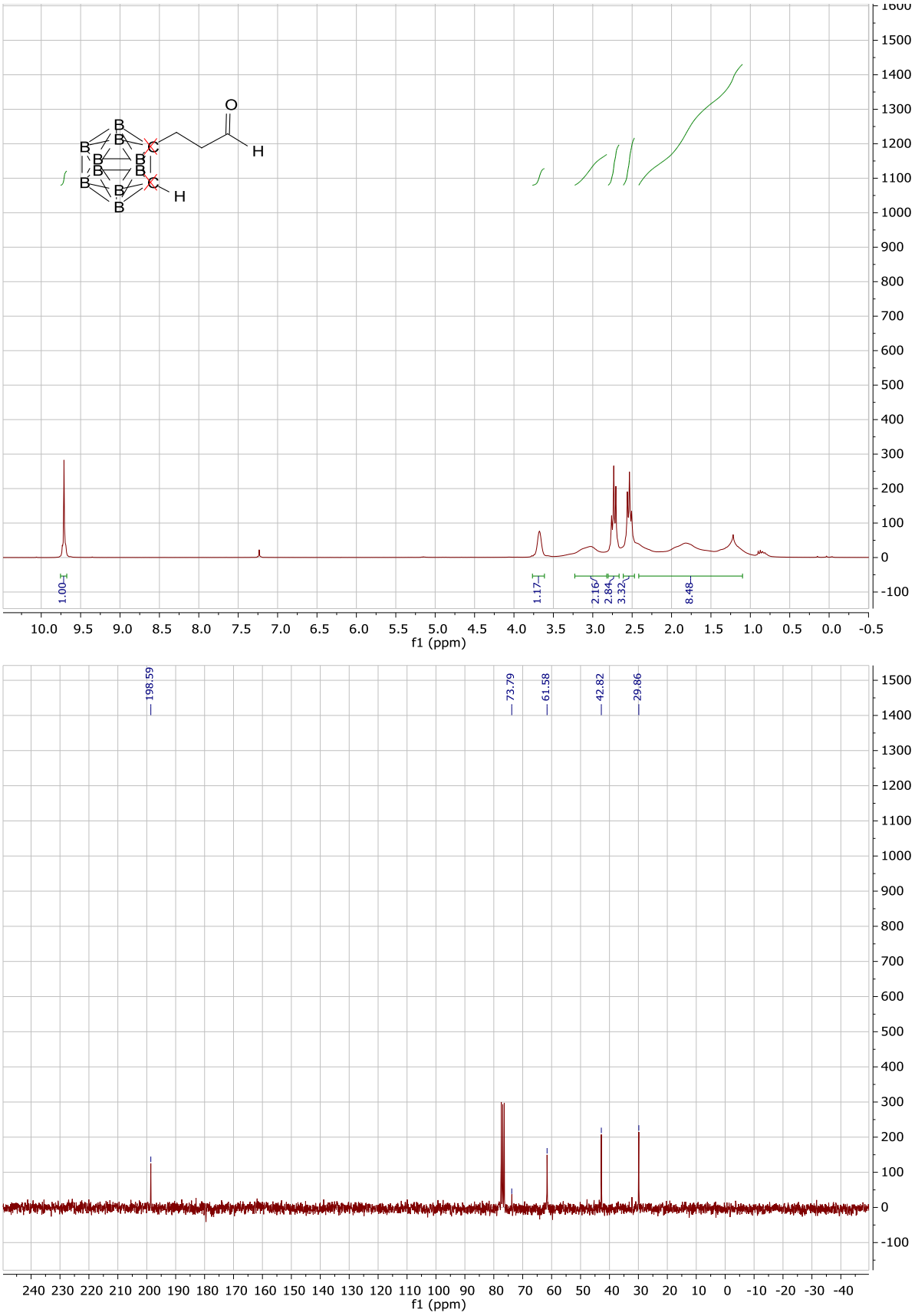


*Abbildung 235: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **248** (B entspricht B-H, Vereinfachung für die Übersichtlichkeit).*

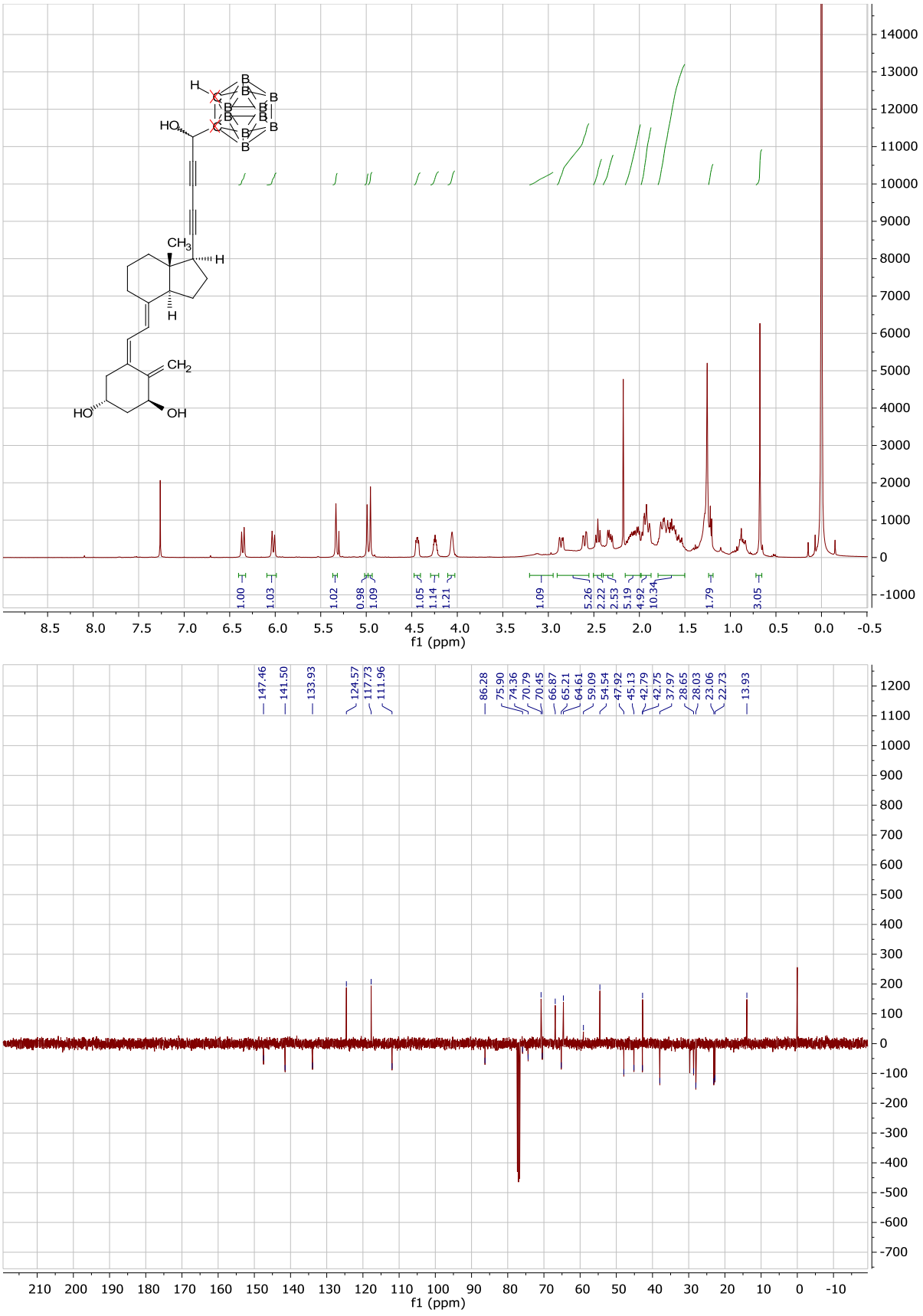


*Abbildung 236: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **220** Epimer 1 (B entspricht B-H, Vereinfachung für die Übersichtlichkeit).*

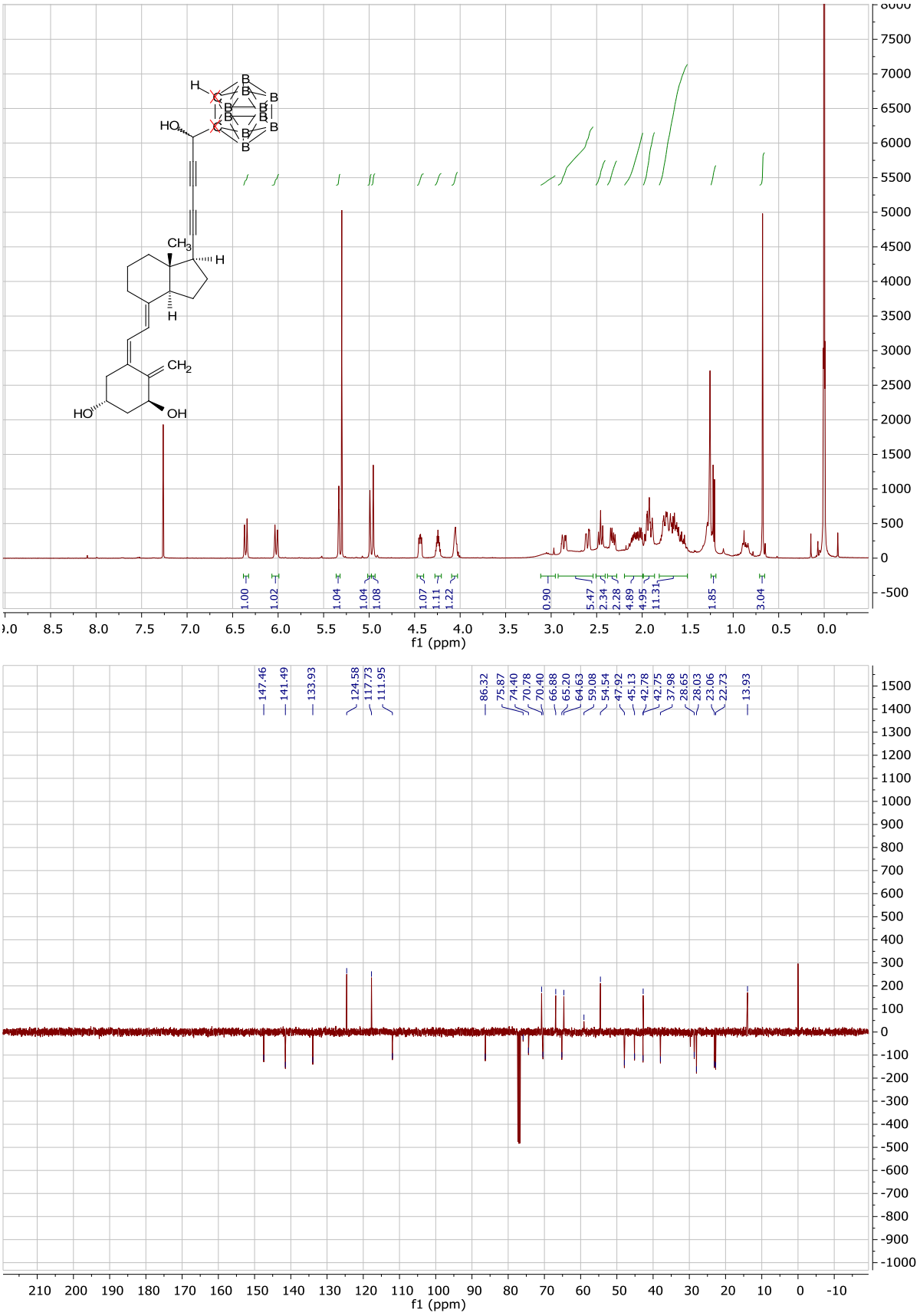


*Abbildung 237: [1]H- und [13]C-Spektrum von **220** Epimer 2 (B entspricht B-H, Vereinfachung für die Übersichtlichkeit).*

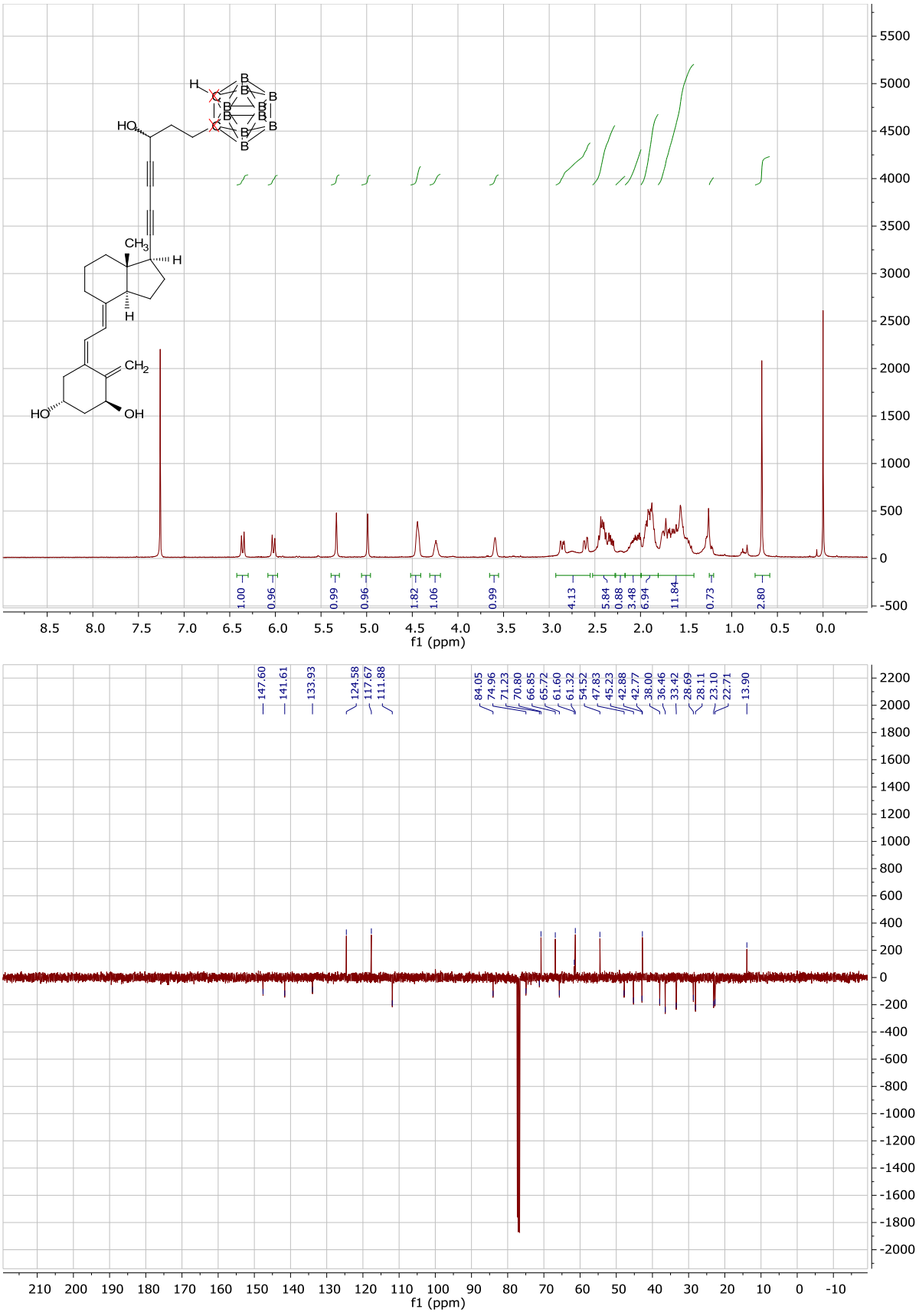


*Abbildung 238: ^{1}H- und ^{13}C-Spektrum von **222** Epimer 1 (B entspricht B-H, Vereinfachung für die Übersichtlichkeit).*

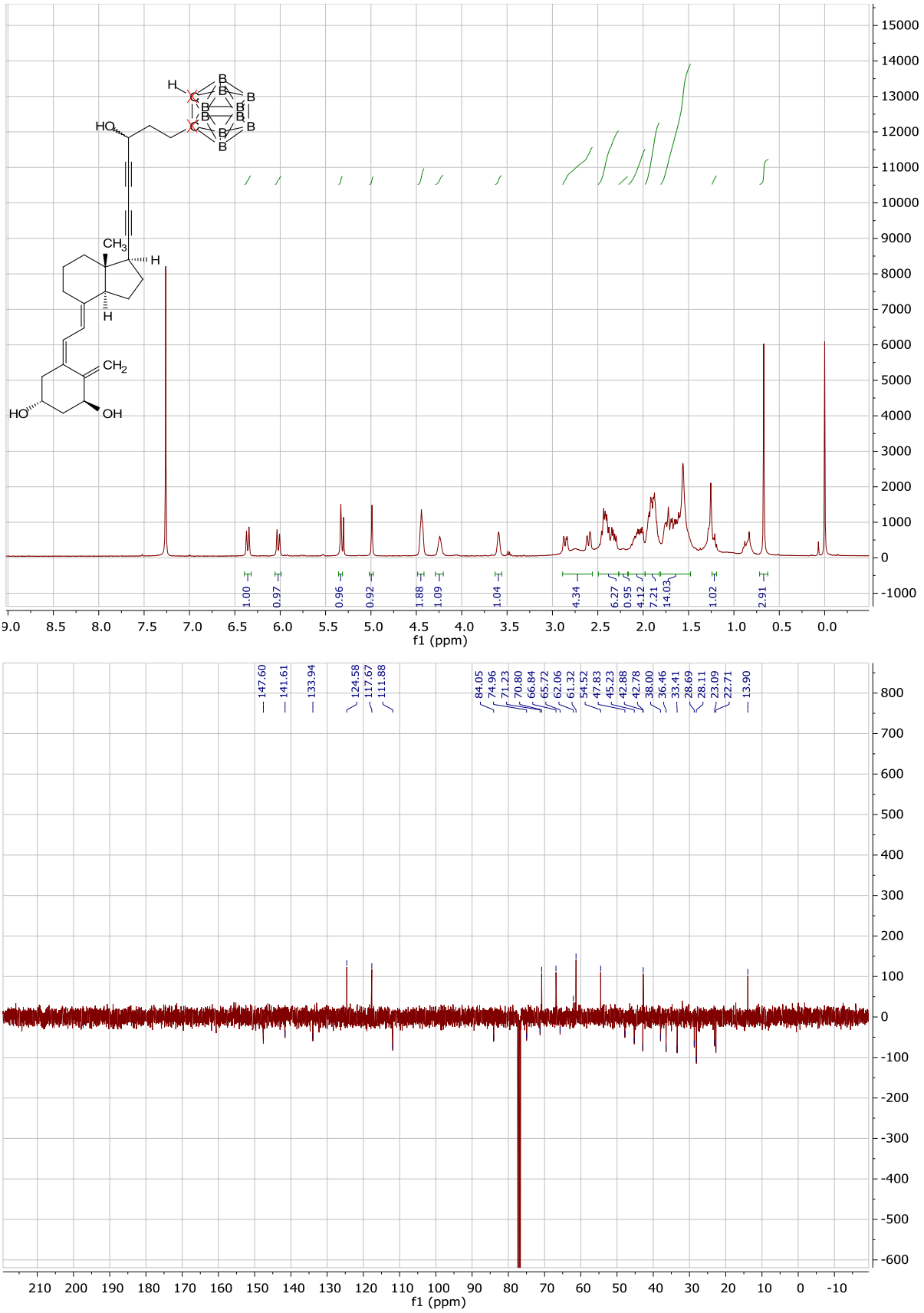


*Abbildung 239: [1]H- und [13]C-Spektrum von **222** Epimer 2 (B entspricht B-H, Vereinfachung für die Übersichtlichkeit).*

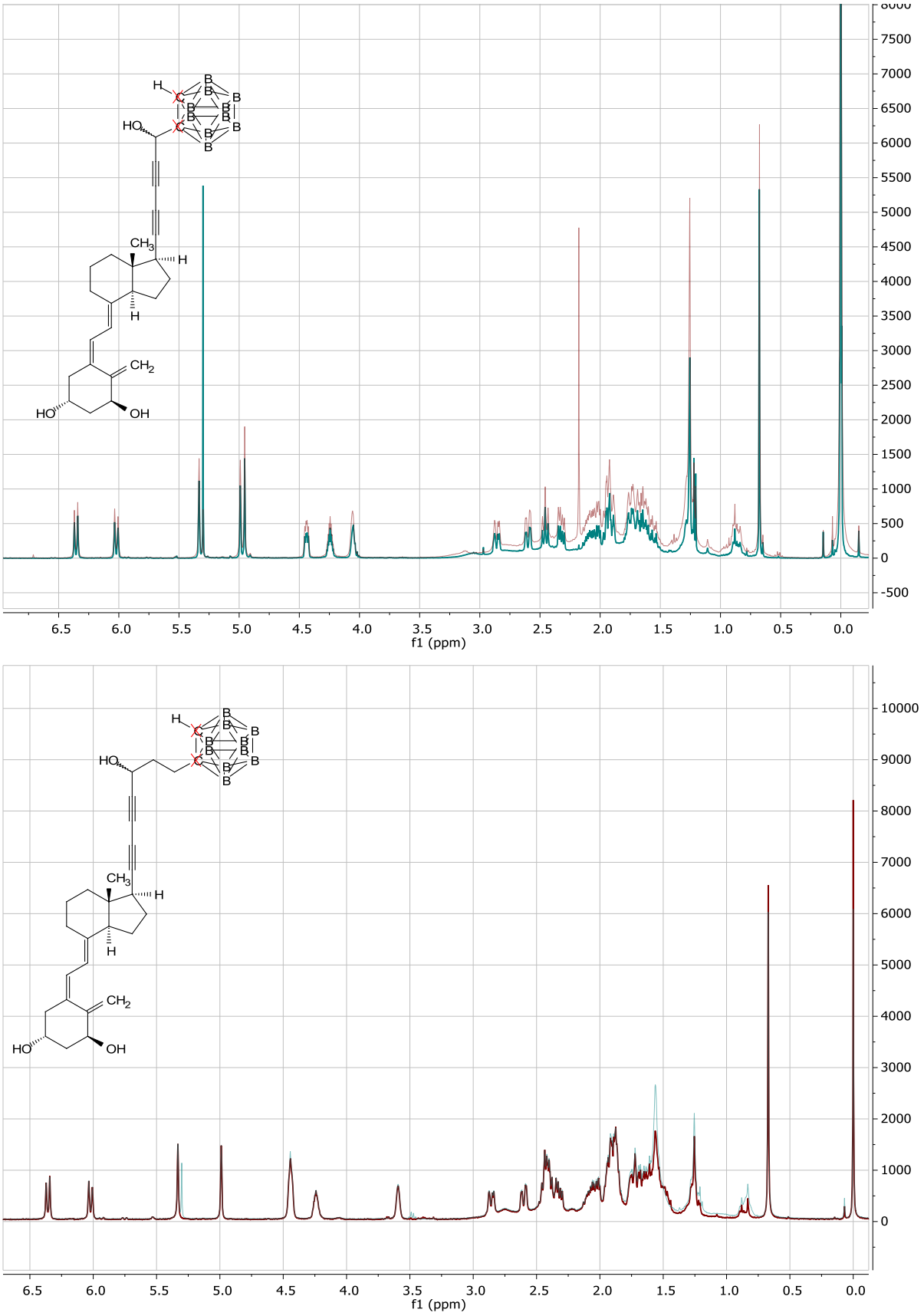


*Abbildung 240: Überlagerung der ^{1}H-NMR-Spektren der einzelnen Epimere von **220** (oben) und **222** (unten). (B entspricht B-H, Vereinfachung für die Übersichtlichkeit).*

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$1,25VD_3$	1α,25-Dihydroxyvitamin D_3
AAV	Adeno-assoziierters Virus
Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
ActR	Activin-Rezeptor
ACVA	Activin A
AIDS	Erworbenes Immunschwächesyndrom (acquired immunodeficiency syndrome)
Akt	Proteinkinase B
ALK	Activin receptor-like kinase
Äq.	Äquivalente
AS	Aminosäure
BMP	Bone morphogenic factor
BMPR	BMP Rezeptor
Bn	Benzyl
BNCT	Bor-Neutronen-Einfangtherapie (boron neutron capture therapy)
Boc	*tert*-Butyloxycarbonyl
BTMPO	Bis-2,4,6-Trimethoxyphenyl-Oxaldiamid
Bu	Butyl
CDK	Cyclin-abhängige Kinase (cyclin-dependent kinase)
CKGF	Cystein knot growth factor
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary disease)
CT	Computertomographie
CyH	Cyclohexan
CYP	Cytochrom P450 Enzym
d.r.	Diastereomerenverhältnis (diastereomeric ratio)
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
dba	Dibenzylidenaceton
DNA	Desoxyribonukelinsäure
DC	Dünnschichtchromatographie
DIPEA	Di-*iso*-Propylethylamin
DMD	Duchenne Muskeldystrophy
DMEDA	*N*,*N*′-Dimethylethylendiamin
DMF	Dimethylformamid

DMSO	Dimethylsulfoxid
DXA	Dual-Röntgen-Absorptiometrie (dual energy X-ray absorptiometry)
EDCI	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid
ee	Enantiomerenüberschuss (enantiomeric excess)
ERK	Extracellular-signal regulated kinases
Et	Ethyl
et al.	et alii
EtOAc	Ethylacetat
EWG	Elektronenziehende Gruppe (electron withdrawing group)
FOXO1	Forkhead-Box-O-1-Transkriptionsfaktor
FSD	Fst-Domäne
Fst	Follistatin
FSTL	Follistatin like protein
GASP	Growth and differentiation factor associated protein
GDF	Growth differentiation factor
GF	Wachstusfaktor (growth factor)
h	Stunde
HAT	Halogen-Atom-Transfer
HBTU	(2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-Tetramethyluronium-Hexafluorophosphat)
HMDS	1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan
HOSA	Hydroxylamin-O-sulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
HTS	Hochdurchsatz Screening (high throughput screening)
IC50	Mittlere inhibitorische Konzentration
IGF	Insulin-like growth factor
IR	Infrarot
ISS	Internationale Raumstation (international space station)
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie (isothermal titration calorimetry)
JNK	C-Jun-N-terminale Kinasen
kat.	Katalytisch
Kd	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
LC/MS	Flüssigchromatographie - Massenspektrometrie(liquid chromatography-mass spectometry)
Lit.	Literatur
M	Molar
mAB	Monoklonaler Antikörper (monoclonal antibody)

MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MD	Molecular Dynamics Simulation
Me	Methyl
min	Minuten
MKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MoA	Wirkmechanismus (mechanism of action)
MRF	Myelin gene regulatory factor
MRT	Magnetresonanztomographie
MSTN	Myostatin
MTBE	Methyl-*tert*-Butylether
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MW	Mikrowelle
Myf5	Myogener Faktor 5
MyoD	Myogener Faktor 3 (myoblast determination protein 1)
NBS	*N*-Bromsuccinimid
NIS	*N*-Iodsuccinimid
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance)
NOESY	Nuclear overhauser enhancement spectroscopy
OA	Oxidative Addition
Ox.	Oxidation
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PDB	Protein Databank
PDC	Pyridiniumdichromat
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PPI	Protein-Protein Interaktion
Pr	Propyl
präp.	präparativ
R	Rest
rac	racemisch
Ras	kleines G-Protein (von „rat sarcoma“)
RE	Reduktive Eliminierung
RMS	Quadratisches Mittel (root mean square)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RXR	Retinoid-X-Rezeptor

SAR	Struktur-Wirkungs-Beziehungen (structure activity relations)
SBE	SMAD binding element
SET	Einzelelektronentransfer (singe electron transfer)
SMAD	Sma + mothers against decapentaplegic
SNAr	Nukleophile aromatische Substitution
SPP	Surface plasmon polaritons
SPR	Surface plasmon resonance
TAK	Transforming growth factor beta-activated kinase
TBS	*tert*-Butyl-Dimethyl-Silyl
Tf	Triflyl
TFA	Trifluoressigsäure
TGF-β	Transforming Growth Factor β
THF	Tetrahydrofuran
TLD	Tolloid protein
TMEDA	*N,N,N',N'*-Tetramethylethylendiamin
TMS	Tri-Methylsilyl
TRIC	Temperaturabhängiger Intensitätssprung (temperature-related intensity change)
Ts	Tosyl
TUG	Timed up and go Test
TβR	TGF β Rezeptor
UV-Vis	Ultraviolettes bis Sichtbares Licht
VD_3	Vitamin D_3
VDR	Vitamin D Rezeptor
vgl.	Vergleiche
VINA	VINA is not AutoDock
z.B.	zum Beispiel

LITERATURVERZEICHNIS

[1] R. T. Hepple, *Sci. Aging Knowledge Environ.* **2003**, *2003*, 31.

[2] J. M. Argilés, S. D. Anker, W. J. Evans, J. E. Morley, K. C. H. Fearon, F. Strasser, M. Muscaritoli, V. E. Baracos, *J. Am. Med. Dir. Assoc.* **2010**, *11*, 229.

[3] A. C. McPherron, A. M. Lawler, S.-J. Lee, *Nature* **1997**, *387*, 83.

[4] A. C. McPherron, S.-J. Lee in *Growth Factors and Cytokines in Health and Disease : Growth Factors* (Eds.: D. Leroith, C. Bondy), JAI, **1996**, 357–393.

[5] A. C. McPherron, S. J. Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 12457.

[6] M. Schuelke, K. R. Wagner, L. E. Stolz, C. Hübner, T. Riebel, W. Kömen, T. Braun, J. F. Tobin, S.-J. Lee, *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350*, 2682.

[7] A. Clop, F. Marcq, H. Takeda, D. Pirottin, X. Tordoir, B. Bibé, J. Bouix, F. Caiment, J.-M. Elsen, F. Eychenne *et al.*, *Nat. Genet.* **2006**, *38*, 813.

[8] L. Grobet, L. J. Martin, D. Poncelet, D. Pirottin, B. Brouwers, J. Riquet, A. Schoeberlein, S. Dunner, F. Ménissier, J. Massabanda *et al.*, *Nat. Genet.* **1997**, *17*, 71.

[9] D. S. Mosher, P. Quignon, C. D. Bustamante, N. B. Sutter, C. S. Mellersh, H. G. Parker, E. A. Ostrander, *PLoS Genet.* **2007**, *3*, 79.

[10] R. Kambadur, M. Sharma, T. P. Smith, J. J. Bass, *Genome Res.* **1997**, *7*, 910.

[11] J.-C. Gabillard, P. R. Biga, P.-Y. Rescan, I. Seiliez, *Gen. Comp. Endocrinol.* **2013**, *194*, 45.

[12] M. F. Rooney, E. W. Hill, V. P. Kelly, R. K. Porter, *PLoS One* **2018**, *13*, 205664.

[13] A. C. McPherron, S.-J. Lee, *J. Clin. Invest.* **2002**, *109*, 595.

[14] C. López-Otín, M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano, G. Kroemer, *Cell* **2013**, *153*, 1194.

[15] B. J. Shad, J. L. Thompson, A. M. Holwerda, B. Stocks, Y. S. Elhassan, A. Philp, L. J. C. van Loon, G. A. Wallis, *Med. Sci. Sports Exerc.* **2019**, *51*, 2125.

[16] S.-J. Lee, *J. Clin. Invest.* **2021**, *131*.

[17] J. Baczek, M. Silkiewicz, Z. B. Wojszel, *Nutrients* **2020**, *12*, 2401.

[18] D. Yadin, P. Knaus, T. D. Mueller, *Cytokine Growth Factor Rev.* **2016**, *27*, 13.

[19] A. P. Hinck, T. D. Mueller, T. A. Springer, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2016**, *8*.

[20] M. Morikawa, R. Derynck, K. Miyazono, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2016**, *8*.

[21] R. W. Pelton, B. Saxena, M. Jones, H. L. Moses, L. I. Gold, *J. Cell Biol.* **1991**, *115*, 1091.

[22] V. Kaartinen, J. W. Voncken, C. Shuler, D. Warburton, D. Bu, N. Heisterkamp, J. Groffen, *Nat. Genet.* **1995**, *11*, 415.

[23] L. P. Sanford, I. Ormsby, A. C. Gittenberger-de Groot, H. Sariola, R. Friedman, G. P. Boivin, E. L. Cardell, T. Doetschman, *Development (Cambridge, England)* **1997**, *124*, 2659.

[24] Q. Liu, G. Chen, J. Moore, I. Guix, D. Placantonakis, M. H. Barcellos-Hoff, *Mol. Cancer Ther.* **2022**, *21*, 16.

[25] C. Peng, S. T. Mukai, *Biochem. Cell Biol.* **2000**, *78*, 261.

[26] B. Barakat, C. Itman, S. H. Mendis, K. L. Loveland, *Mol. Cell. Endocrinol.* **2012**, *359*, 66.

[27] H. Q. Han, X. Zhou, W. E. Mitch, A. L. Goldberg, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2013**, *45*, 2333.

[28] H. Cheng, W. Jiang, F. M. Phillips, R. C. Haydon, Y. Peng, L. Zhou, H. H. Luu, N. An, B. Breyer, P. Vanichakarn *et al.*, *J. Bone Joint Surg. Am.* **2003**, *85*, 1544.

[29] S. H. Settle, R. B. Rountree, A. Sinha, A. Thacker, K. Higgins, D. M. Kingsley, *Dev. Biol.* **2003**, *254*, 116.

[30] S.-J. Lee, *PLoS One* **2007**, *2*, 789.

[31] S. J. Lee, A. C. McPherron, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 9306.

[32] R. G. Walker, T. Poggioli, L. Katsimpardi, S. M. Buchanan, J. Oh, S. Wattrus, B. Heidecker, Y. W. Fong, L. L. Rubin, P. Ganz *et al.*, *Circ. Res.* **2016**, *118*, 1125-1142.

[33] S.-J. Lee, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2004**, *20*, 61.

[34] S. McCroskery, M. Thomas, L. Maxwell, M. Sharma, R. Kambadur, *J. Cell Biol.* **2003**, *162*, 1135.

[35] J. N. Cash, T. B. Thompson, *Crystal structure of the myostatin:follistatin 288 complex*, *PDB* **2009**.

[36] N. L. Daly, D. J. Craik, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 362.

[37] M. de Caestecker, *Cytokine Growth Factor Rev.* **2004**, *15*, 1.

[38] J. N. Cash, C. A. Rejon, A. C. McPherron, D. J. Bernard, T. B. Thompson, *EMBO J.* **2009**, *28*, 2662.

[39] T. R. Cotton, G. Fischer, X. Wang, J. C. McCoy, M. Czepnik, T. B. Thompson, M. Hyvönen, *EMBO J.* **2018**, *37*, 367.

[40] J. Massagué, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 753.

[41] S.-J. Lee, L. A. Reed, M. V. Davies, S. Girgenrath, M. E. P. Goad, K. N. Tomkinson, J. F. Wright, C. Barker, G. Ehrmantraut, J. Holmstrom *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 18117.

[42] M. P. de Caestecker, W. T. Parks, C. J. Frank, P. Castagnino, D. P. Bottaro, A. B. Roberts, R. J. Lechleider, *Genes Dev.* **1998**, *12*, 1587.

[43] J. L. Wrana, L. Attisano, J. Cárcamo, A. Zentella, J. Doody, M. Laiho, X.-F. Wang, J. Massague, *Cell* **1992**, *71*, 1003.

[44] R. G. Walker, M. Czepnik, E. J. Goebel, J. C. McCoy, A. Vujic, M. Cho, J. Oh, S. Aykul, K. L. Walton, G. Schang *et al.*, *BMC Biol.* **2017**, *15*, 19.

[45] H. A. Loomans, C. D. Andl, *Am. J. Cancer Res.* **2016**, *6*, 2431.

[46] D. Sako, A. V. Grinberg, J. Liu, M. V. Davies, R. Castonguay, S. Maniatis, A. J. Andreucci, E. G. Pobre, K. N. Tomkinson, T. E. Monnell *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 21037.

[47] P. J. Hart, S. Deep, A. B. Taylor, Z. Shu, C. S. Hinck, A. P. Hinck, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2002**, *9*, 203.

[48] C. Rodriguez, F. Chen, R. A. Weinberg, H. F. Lodish, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 15919.

[49] G. P. Allendorph, W. W. Vale, S. Choe, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 7643.

[50] J. Groppe, C. S. Hinck, P. Samavarchi-Tehrani, C. Zubieta, J. P. Schuermann, A. B. Taylor, P. M. Schwarz, J. L. Wrana, A. P. Hinck, *Mol. Cell* **2008**, *29*, 157.

[51] J. N. Cash, E. B. Angerman, C. Kattamuri, K. Nolan, H. Zhao, Y. Sidis, H. T. Keutmann, T. B. Thompson, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 1043.

[52] K. A. Lewis, P. C. Gray, A. L. Blount, L. A. MacConell, E. Wiater, L. M. Bilezikjian, W. Vale, *Nature* **2000**, *404*, 411.

[53] A. Rebbapragada, H. Benchabane, J. L. Wrana, A. J. Celeste, L. Attisano, *Mol Cell Biol* **2003**, *23*, 7230.

[54] S. Busquets, M. Toledo, M. Orpí, D. Massa, M. Porta, E. Capdevila, N. Padilla, V. Frailis, F. J. López-Soriano, H. Q. Han *et al.*, *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **2012**, *3*, 37.

[55] T. B. Thompson, T. K. Woodruff, T. S. Jardetzky, *EMBO J.* **2003**, *22*, 1555.

[56] J. L. Wrana, L. Attisano, R. Wieser, F. Ventura, J. Massagué, *Nature* **1994**, *370*, 341.

[57] C. H. Heldin, K. Miyazono, P. ten Dijke, *Nature* **1997**, *390*, 465.

[58] J. Massagué, J. Seoane, D. Wotton, *Genes Dev.* **2005**, *19*, 2783.

[59] B. Schmierer, C. S. Hill, *Mol. Cell Biol.* **2005**, *25*, 9845.

[60] L. J. C. Jonk, S. Itoh, C.-H. Heldin, P. ten Dijke, W. Kruijer, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 21145.

[61] R. Derynck, Y. Zhang, X.-H. Feng, *Cell* **1998**, *95*, 737.

[62] L. Zawel, J. Le Dai, P. Buckhaults, S. Zhou, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, S. E. Kern, *Mol. Cell* **1998**, *1*, 611.

[63] Y. Shi, J. Massagué, *Cell* **2003**, *113*, 685.

[64] J. Seoane, H.-V. Le, L. Shen, S. A. Anderson, J. Massagué, *Cell* **2004**, *117*, 211.

[65] C. McFarlane, E. Plummer, M. Thomas, A. Hennebry, M. Ashby, N. Ling, H. Smith, M. Sharma, R. Kambadur, *J. Cell. Physiol.* **2006**, *209*, 501.

[66] M.-M. Chen, Y.-P. Zhao, Y. Zhao, S.-L. Deng, K. Yu, *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 785712.

[67] A. Retamales, R. Zuloaga, C. A. Valenzuela, C. Gallardo-Escarate, A. Molina, J. A. Valdés, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *464*, 596.

[68] R. Sartori, G. Milan, M. Patron, C. Mammucari, B. Blaauw, R. Abraham, M. Sandri, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2009**, *296*, 1248.

[69] B. Langley, M. Thomas, A. Bishop, M. Sharma, S. Gilmour, R. Kambadur, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 49831.

[70] J. M. Argilés, S. Busquets, B. Stemmler, F. J. López-Soriano, *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14*, 754.

[71] B. Philip, Z. Lu, Y. Gao, *Cell. Signal.* **2005**, *17*, 365.

[72] M. Drysch, S. V. Schmidt, M. Becerikli, F. Reinkemeier, S. Dittfeld, J. M. Wagner, M. Dadras, A. Sogorski, M. von Glinski, M. Lehnhardt *et al.*, *Cells* **2021**, *10*.

[73] W. Yang, Y. Chen, Y. Zhang, X. Wang, N. Yang, D. Zhu, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 1320.

[74] M. Sharma, R. Kambadur, K. G. Matthews, W. G. Somers, G. P. Devlin, J. V. Conaglen, P. J. Fowke, J. J. Bass, *J. Cell. Physiol.* **1999**, *180*, 1.

[75] S. Ji, R. L. Losinski, S. G. Cornelius, G. R. Frank, G. M. Willis, D. E. Gerrard, F. F. Depreux, M. E. Spurlock, *Am. J. Physiol.* **1998**, *275*, 1265.

[76] T. A. Zimmers, M. V. Davies, L. G. Koniaris, P. Haynes, A. F. Esquela, K. N. Tomkinson, A. C. McPherron, N. M. Wolfman, S.-J. Lee, *Science* **2002**, *296*, 1486.

[77] C. A. Harrison, S. L. Al-Musawi, K. L. Walton, *Growth Factors* **2011**, *29*, 174.

[78] R. S. Tries, T. Chen, M. V. Da Vies, K. N. Tomkinson, A. A. Pearson, Q. A. Shakey, N. M. Wolfman, *Growth Factors* **2001**, *18*, 251.

[79] K. Takayama, Y. Noguchi, S. Aoki, S. Takayama, M. Yoshida, T. Asari, F. Yakushiji, S. Nishimatsu, Y. Ohsawa, F. Itoh *et al.*, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 1544.

[80] M.-S. Jiang, L.-F. Liang, S. Wang, T. Ratovitski, J. Holmstrom, C. Barker, R. Stotish, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *315*, 525.

[81] N. M. Wolfman, A. C. McPherron, W. N. Pappano, M. V. Davies, K. Song, K. N. Tomkinson, J. F. Wright, L. Zhao, S. M. Sebald, D. S. Greenspan *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 15842.

[82] S. B. Anderson, A. L. Goldberg, M. Whitman, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 7027.

[83] G. Szláma, M. Trexler, L. Buday, L. Patthy, *FEBS Lett.* **2015**, *589*, 295.

[84] C. McFarlane, B. Langley, M. Thomas, A. Hennebry, E. Plummer, G. Nicholas, C. McMahon, M. Sharma, R. Kambadur, *Dev. Biol.* **2005**, *283*, 58.

[85] D. L. Allen, T. G. Unterman, *Am. J. Cell Physiol.* **2007**, *292*, 188.

[86] M. Budasz-Rwiderska, M. Jank, T. Motyl, *J. Physiol. Pharmacol.* **2005**, *56 Suppl 3*, 195.

[87] Y.-S. Lee, S.-J. Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2013**, *110*, 3713.

[88] T. Miura, Y. Kishioka, J. Wakamatsu, A. Hattori, A. Hennebry, C. J. Berry, M. Sharma, R. Kambadur, T. Nishimura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *340*, 675.

[89] T. B. Thompson, T. F. Lerch, R. W. Cook, T. K. Woodruff, T. S. Jardetzky, *Dev. Cell* **2005**, *9*, 535.

[90] H. Amthor, G. Nicholas, I. McKinnell, C. F. Kemp, M. Sharma, R. Kambadur, K. Patel, *Dev. Biol.* **2004**, *270*, 19.

[91] Y. Sidis, A. Mukherjee, H. Keutmann, A. Delbaere, M. Sadatsuki, A. Schneyer, *Endocrinology* **2006**, *147*, 3586.

[92] M. Nakatani, Y. Takehara, H. Sugino, M. Matsumoto, O. Hashimoto, Y. Hasegawa, T. Murakami, A. Uezumi, S. Takeda, S. Noji *et al.*, *FASEB J.* **2008**, *22*, 477.

[93] O. Hashimoto, T. Nakamura, H. Shoji, S. Shimasaki, Y. Hayashi, H. Sugino, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 13835.

[94] Y. Sidis, A. L. Schneyer, H. T. Keutmann, *Endocrinology* **2005**, *146*, 130.

[95] J. J. Hill, Y. Qiu, R. M. Hewick, N. M. Wolfman, *Mol. Endocrinol.* **2003**, *17*, 1144.

[96] K. Kondás, G. Szláma, M. Trexler, L. Patthy, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 23677.

[97] R. G. Walker, E. B. Angerman, C. Kattamuri, Y.-S. Lee, S.-J. Lee, T. B. Thompson, *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 7506.

[98] A. J. Cruz-Jentoft, G. Bahat, J. Bauer, Y. Boirie, O. Bruyère, T. Cederholm, C. Cooper, F. Landi, Y. Rolland, A. A. Sayer *et al.*, *Age Ageing* **2019**, *48*, 16.

[99] A. J. Mayhew, K. Amog, S. Phillips, G. Parise, P. D. McNicholas, R. J. de Souza, L. Thabane, P. Raina, *Age Ageing* **2019**, *48*, 48.

[100] T. K. Malmstrom, D. K. Miller, E. M. Simonsick, L. Ferrucci, J. E. Morley, *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **2016**, *7*, 28.

[101] S. Goisser, R. Kob, C. C. Sieber, J. M. Bauer, *Der Internist* **2019**, *60*, 141.

[102] S. Welle, A. I. Brooks, J. M. Delehanty, N. Needler, C. A. Thornton, *Physiol. Genomics* **2003**, *14*, 149.

[103] G. Bahat, B. Saka, F. Tufan, S. Akin, S. Sivrikaya, N. Yucel, N. Erten, M. A. Karan, *Aging Male* **2010**, *13*, 211.

[104] A. Bian, Y. Ma, X. Zhou, Y. Guo, W. Wang, Y. Zhang, X. Wang, *BMC Musculoskelet. Disord.* **2020**, *21*, 214.

[105] R. N. Baumgartner, D. L. Waters, D. Gallagher, J. E. Morley, P. J. Garry, *Mech. Ageing Dev.* **1999**, *107*, 123.

[106] P. Kortebein, T. B. Symons, A. Ferrando, D. Paddon-Jones, O. Ronsen, E. Protas, S. Conger, J. Lombeida, R. Wolfe, W. J. Evans, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2008**, *63*, 1076.

[107] T. Phillips, C. Leeuwenburgh, *FASEB J.* **2005**, *19*, 668.

[108] Y.-D. Rong, A.-L. Bian, H.-Y. Hu, Y. Ma, X.-Z. Zhou, *BMC Geriatr.* **2018**, *18*, 308.

[109] M. Visser, D. J. H. Deeg, P. Lips, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2003**, *88*, 5766.

[110] L. A. Schaap, S. M. F. Pluijm, J. H. Smit, N. M. van Schoor, M. Visser, L. J. G. Gooren, P. Lips, *Clin. Endocrinol.* **2005**, *63*, 152.

[111] F. Riuzzi, G. Sorci, C. Arcuri, I. Giambanco, I. Bellezza, A. Minelli, R. Donato, *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **2018**, *9*, 1255.

[112] J. E. Morley, *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **2018**, *9*, 1196.

[113] I. Janssen, *Clin. Geriatr. Med.* **2011**, *27*, 355.

[114] I. Lee, J. Cho, H. Hong, Y. Jin, D. Kim, H. Kang, *Iran. J. Public Health* **2018**, *47*, 327.

[115] E. Picazzo-Palencia, *Hisp. Health Care Int.* **2016**, *14*, 94.

[116] P. Soysal, N. Veronese, T. Thompson, K. G. Kahl, B. S. Fernandes, A. M. Prina, M. Solmi, P. Schofield, A. Koyanagi, P.-T. Tseng *et al.*, *Ageing Res. Rev.* **2017**, *36*, 78.

[117] Z. He, Y. Tian, P. L. Valenzuela, C. Huang, J. Zhao, P. Hong, Z. He, S. Yin, A. Lucia, *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 1735.

[118] K. Kerschan-Schindl, M. M. Thalmann, E. Weiss, M. Tsironi, U. Föger-Samwald, J. Meinhart, K. Skenderi, P. Pietschmann, *PLoS One* **2015**, *10*, 132478.

[119] D.-S. Han, K.-V. Chang, C.-M. Li, Y.-H. Lin, T.-W. Kao, K.-S. Tsai, T.-G. Wang, W.-S. Yang, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 19457.

[120] L. Tay, Y. Y. Ding, B. P. Leung, N. H. Ismail, A. Yeo, S. Yew, K. S. Tay, C. H. Tan, M. S. Chong, *AGE* **2015**, *37*, 121.

[121] G. Zhang, S. Chen, K. Song, P. Pan, Y. Qiu, L. Amaravadi, J. Wu, *Bioanalysis* **2019**, *11*, 957.

[122] D. L. Allen, A. S. Cleary, K. J. Speaker, S. F. Lindsay, J. Uyenishi, J. M. Reed, M. C. Madden, R. S. Mehan, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2008**, *294*, 918.

[123] D. S. Hittel, J. R. Berggren, J. Shearer, K. Boyle, J. A. Houmard, *Diabetes* **2009**, *58*, 30.

[124] G. Milan, E. Dalla Nora, C. Pilon, C. Pagano, M. Granzotto, M. Manco, G. Mingrone, R. Vettor, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2004**, *89*, 2724.

[125] T. Guo, W. Jou, T. Chanturiya, J. Portas, O. Gavrilova, A. C. McPherron, *PLoS One* **2009**, *4*, 4937.

[126] C. Zhang, C. McFarlane, S. Lokireddy, S. Masuda, X. Ge, P. D. Gluckman, M. Sharma, R. Kambadur, *Diabetologia* **2012**, *55*, 183.

[127] C. Becker, S. R. Lord, S. A. Studenski, S. J. Warden, R. A. Fielding, C. P. Recknor, M. C. Hochberg, S. L. Ferrari, H. Blain, E. F. Binder *et al.*, *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2015**, *3*, 948.

[128] J. E. Morley, *Calcif. Tissue Int.* **2016**, *98*, 319.

[129] T. A. White, N. K. LeBrasseur, *Gerontology* **2014**, *60*, 289.

[130] M. J. Tisdale, *Physiol. Rev.* **2009**, *89*, 381.

[131] M. J. Tisdale, *J. Support. Oncol.* **2005**, *3*, 209.

[132] L. Martin, L. Birdsell, N. Macdonald, T. Reiman, M. T. Clandinin, L. J. McCargar, R. Murphy, S. Ghosh, M. B. Sawyer, V. E. Baracos, *Am. J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 1539.

[133] S. Warren, *Am. J. Med. Sci.* **1932**, *184*, 610.

[134] J. M. Argilés, S. Busquets, R. Moore-Carrasco, M. Figueras, V. Almendro, F. J. López-Soriano, *Front. Biosci.* **2007**, *12*, 3024.

[135] K. Fearon, J. Arends, V. Baracos, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2013**, *10*, 90.

[136] J. M. Argilés, F. J. López-Soriano, *Trends Pharmacol. Sci.* **1996**, *17*, 223.

[137] C. Mammucari, G. Milan, V. Romanello, E. Masiero, R. Rudolf, P. Del Piccolo, S. J. Burden, R. Di Lisi, C. Sandri, J. Zhao *et al.*, *Cell Metab.* **2007**, *6*, 458.

[138] J. M. Argilés, F. J. López-Soriano, S. Busquets, *Curr. Opin. Support. Palliat. Care.* **2007**, *1*, 293.

[139] S. Lokireddy, I. W. Wijesoma, S. Bonala, M. Wei, S. K. Sze, C. McFarlane, R. Kambadur, M. Sharma, *Biochem. J.* **2012**, *446*, 23.

[140] J. L. Chen, K. L. Walton, C. E. Winbanks, K. T. Murphy, R. E. Thomson, Y. Makanji, H. Qian, G. S. Lynch, C. A. Harrison, P. Gregorevic, *FASEB J.* **2014**, *28*, 1711.

[141] P. Costelli, M. Muscaritoli, A. Bonetto, F. Penna, P. Reffo, M. Bossola, G. Bonelli, G. B. Doglietto, F. M. Baccino, F. Rossi Fanelli, *Eur. J. Clin. Invest.* **2008**, *38*, 531.

[142] S. Levolger, E. A. C. Wiemer, J. L. A. van Vugt, S. A. Huisman, M. G. van Vledder, S. van Damme-van Engel, G. Ambagtsheer, J. N. M. IJzermans, R. W. F. de Bruin, *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 9826.

[143] M. E. Benny Klimek, T. Aydogdu, M. J. Link, M. Pons, L. G. Koniaris, T. A. Zimmers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *391*, 1548.

[144] X. Zhou, J. L. Wang, J. Lu, Y. Song, K. S. Kwak, Q. Jiao, R. Rosenfeld, Q. Chen, T. Boone, W. S. Simonet *et al.*, *Cell* **2010**, *142*, 531.

[145] N. F. Gonzalez-Cadavid, W. E. Taylor, K. Yarasheski, I. Sinha-Hikim, K. Ma, S. Ezzat, R. Shen, R. Lalani, S. Asa, M. Mamita *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 14938.

[146] C.-R. Ju, R.-C. Chen, *Respir. Med.* **2012**, *106*, 102.

[147] K. E. Yarasheski, S. Bhasin, I. Sinha-Hikim, J. Pak-Loduca, N. F. Gonzalez-Cadavid, *J. Nutr. Health Aging* **2002**, *6*, 343.

[148] I. George, L. T. Bish, G. Kamalakkannan, C. M. Petrilli, M. C. Oz, Y. Naka, H. L. Sweeney, S. Maybaum, *Eur. J. Heart Fail.* **2010**, *12*, 444.

[149] S. Girgenrath, K. Song, L.-A. Whittemore, *Muscle Nerve* **2005**, *31*, 34.

[150] J. O. Chung, S.-Y. Park, D. J. Chung, M. Y. Chung, *J. Diabetes Complicat.* **2020**, 107592.

[151] J. Zhu, Y. Li, A. Lu, B. Gharaibeh, J. Ma, T. Kobayashi, A. J. Quintero, J. Huard, *Am. J. Clin. Pathol.* **2011**, *179*, 915.

[152] S.-J. Lee, A. Lehar, J. U. Meir, C. Koch, A. Morgan, L. E. Warren, R. Rydzik, D. W. Youngstrom, H. Chandok, J. George *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* **2020**, *3*, 14716.

[153] I. Cariati, M. Scimeca, R. Bonanni, R. Triolo, V. Naldi, G. Toro, M. Marini, V. Tancredi, R. Iundusi, E. Gasbarra *et al.*, *Front. Physiol.* **2022**, *13*.

[154] S. Bogdanovich, T. O. B. Krag, E. R. Barton, L. D. Morris, L.-A. Whittemore, R. S. Ahima, T. S. Khurana, *Nature* **2002**, *420*, 418.

[155] T. L. Nielsen, J. Vissing, T. O. Krag, *Cells* **2021**, *10*, 533.

[156] P. M. Burch, O. Pogoryelova, J. Palandra, R. Goldstein, D. Bennett, L. Fitz, M. Guglieri, C. M. Bettolo, V. Straub, T. Evangelista *et al.*, *J. Neurol.* **2017**, *264*, 541.

[157] T. Golan, R. Geva, D. Richards, S. Madhusudan, B. K. Lin, H. T. Wang, R. A. Walgren, S. M. Stemmer, *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **2018**, *9*, 871.

[158] H. Muramatsu, T. Kuramochi, H. Katada, A. Ueyama, Y. Ruike, K. Ohmine, M. Shida-Kawazoe, R. Miyano-Nishizawa, Y. Shimizu, M. Okuda *et al.*, *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 2160.

[159] A. A. Amato, K. Sivakumar, N. Goyal, W. S. David, M. Salajegheh, J. Praestgaard, E. Lach-Trifilieff, A.-U. Trendelenburg, D. Laurent, D. J. Glass *et al.*, *Neurology* **2014**, *83*, 2239.

[160] I. Akpan, M. D. Goncalves, R. Dhir, X. Yin, E. E. Pistilli, S. Bogdanovich, T. S. Khurana, J. Ucran, J. Lachey, R. S. Ahima, *Int. J. Obes. (Lond.)* **2009**, *33*, 1265.

[161] A. M. Haidet, L. Rizo, C. Handy, P. Umapathi, A. Eagle, C. Shilling, D. Boue, P. T. Martin, Z. Sahenk, J. R. Mendell *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 4318.

[162] R. Tang, N. S. Harasymowicz, C.-L. Wu, K. H. Collins, Y.-R. Choi, S. J. Oswald, F. Guilak, *Sci. Adv.* **2020**, *6*, 7492.

[163] J. Kota, C. R. Handy, A. M. Haidet, C. L. Montgomery, A. Eagle, L. R. Rodino-Klapac, D. Tucker, C. J. Shilling, W. R. Therlfall, C. M. Walker *et al.*, *Sci. Transl. Med.* **2009**, *1*, 15.

[164] T. Asari, K. Takayama, A. Nakamura, T. Shimada, A. Taguchi, Y. Hayashi, *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 113.

[165] K. Takayama, C. Rentier, T. Asari, A. Nakamura, Y. Saga, T. Shimada, K. Nirasawa, E. Sasaki, K. Muguruma, A. Taguchi *et al.*, *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 751.

[166] M. Boido, O. Butenko, C. Filippo, R. Schellino, J. W. Vrijbloed, R. G. Fariello, A. Vercelli, *PLoS One* **2020**, *15*, 228653.

[167] N. Lu-Nguyen, A. Malerba, L. Popplewell, F. Schnell, G. Hanson, G. Dickson, *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2017**, *6*, 15.

[168] A. Malerba, J. K. Kang, G. McClorey, A. F. Saleh, L. Popplewell, M. J. Gait, M. J. Wood, G. Dickson, *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2012**, *1*, 62.

[169] S. Weng, F. Gao, J. Wang, X. Li, B. Chu, J. Wang, G. Yang, *Cancer Gene Ther.* **2020**.

[170] T. Khan, H. Weber, J. DiMuzio, A. Matter, B. Dogdas, T. Shah, A. Thankappan, J. Disa, V. Jadhav, L. Lubbers *et al.*, *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2016**, *5*, 342.

[171] C. Qiao, J. Li, J. Jiang, X. Zhu, B. Wang, J. Li, X. Xiao, *Hum. Gene Ther.* **2008**, *19*, 241.

[172] K. R. Wagner, H. Z. Abdel-Hamid, J. K. Mah, C. Campbell, M. Guglieri, F. Muntoni, Y. Takeshima, C. M. McDonald, A. Kostera-Pruszczyk, P. Karachunski *et al.*, *Neuromuscul. Disord.* **2020**, *30*, 492.

[173] K. R. Wagner, B. L. Wong, B. J. Byrne, C. Tian, L. K. Jacobsen, G. S. Tirucherai, M. Rabbia, H. Kletzl, J. Dukart, R. Ong *et al.*, *Neurology* **2019**, *92*.

[174] K. R. Wagner, J. L. Fleckenstein, A. A. Amato, R. J. Barohn, K. Bushby, D. M. Escolar, K. M. Flanigan, A. Pestronk, R. Tawil, G. I. Wolfe *et al.*, *Ann. Neurol.* **2008**, *63*, 561.

[175] D. S. Rooks, D. Laurent, J. Praestgaard, S. Rasmussen, M. Bartlett, L. B. Tankó, *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **2017**, *8*, 727.

[176] W.-H. Boehncke, N. C. Brembilla, *Expert Rev. Clin. Immunol.* **2018**, *14*, 513.

[177] S. Boyer-Suavet, M. Andreani, M. Lateb, B. Savenkoff, V. Brglez, S. Benzaken, G. Bernard, P. H. Nachman, V. Esnault, B. Seitz-Polski, *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 3069.

[178] X.-Z. E. Tang, S. X. Tan, S. Hoon, G. W. Yeo, *Nat. Med.* **2022**.

[179] V. M. Chauhan, H. Zhang, P. A. Dalby, J. W. Aylott, *J. Control. Release* **2020**, *327*, 397.

[180] H. Wang, M. Chen, X. Sang, X. You, Y. Wang, I. C. Paterson, W. Hong, X. Yang, *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *191*, 112154.

[181] T. Hanke, J. F. Wong, B.-T. Berger, I. Abdi, L. M. Berger, R. Tesch, C. Tredup, A. N. Bullock, S. Müller, S. Knapp, *ACS Chem. Biol.* **2020**, *15*, 862.

[182] V. Santini, D. Valcárcel, U. Platzbecker, R. S. Komrokji, A. L. Cleverly, M. M. Lahn, J. Janssen, Y. Zhao, A. Chiang, A. Giagounidis *et al.*, *Clinical Cancer Res.* **2019**, *25*, 6976.

[183] R. K. Kelley, E. Gane, E. Assenat, J. Siebler, P. R. Galle, P. Merle, I. O. Hourmand, A. Cleverly, Y. Zhao, I. Gueorguieva *et al.*, *Clin. Transl. Gastroenterol.* **2019**, *10*, 56.

[184] G. J. Inman, F. J. Nicolás, J. F. Callahan, J. D. Harling, L. M. Gaster, A. D. Reith, N. J. Laping, C. S. Hill, *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62*, 65.

[185] J. F. Callahan, J. L. Burgess, J. A. Fornwald, L. M. Gaster, J. D. Harling, F. P. Harrington, J. Heer, C. Kwon, R. Lehr, A. Mathur *et al.*, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 999.

[186] C. H. Jin, M. Krishnaiah, D. Sreenu, V. B. Subrahmanyam, K. S. Rao, H. J. Lee, S.-J. Park, H.-J. Park, K. Lee, Y. Y. Sheen *et al.*, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 4213.

[187] S. Herbertz, J. S. Sawyer, A. J. Stauber, I. Gueorguieva, K. E. Driscoll, S. T. Estrem, A. L. Cleverly, D. Desaiah, S. C. Guba, K. A. Benhadji *et al.*, *Drug Des. Devel. Ther.* **2015**, *9*, 4479.

[188] F. Gellibert, A.-C. de Gouville, J. Woolven, N. Mathews, V.-L. Nguyen, C. Bertho-Ruault, A. Patikis, E. T. Grygielko, N. J. Laping, S. Huet, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2210.

[189] E. T. Grygielko, W. M. Martin, C. Tweed, P. Thornton, J. Harling, D. P. Brooks, N. J. Laping, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *313*, 943.

[190] J. Zhu, R. K. Mishra, G. E. Schiltz, Y. Makanji, K. A. Scheidt, A. P. Mazar, T. K. Woodruff, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 5637.

[191] C. A. Harrison, P. C. Gray, W. H. Fischer, C. Donaldson, S. Choe, W. Vale, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 28036.

[192] J. N. Cash, E. B. Angerman, R. J. Kirby, L. Merck, W. L. Seibel, M. D. Wortman, R. Papoian, S. Nelson, T. B. Thompson, *J. Biomol. Screen.* **2013**, *18*, 837.

[193] D. Liu, X. Qiao, Z. Ge, Y. Shang, Y. Li, W. Wang, M. Chen, S. Si, S.-Z. Chen, *Skelet. Muscle* **2019**, *9*, 8.

[194] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3.

[195] O. Trott, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455.

[196] G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785.

[197] A. Rahmouni, A. Romdhane, M. Besbes, N. Elie, D. Touboul, H. Ben Jannet, *Mediterr. J. Chem.* **2014**, *2*, 679.

[198] M. Kopp, J.-C. Lancelot, P. Dallemagne, S. Rault, *J. Heterocyclic Chem.* **2001**, *38*, 1045.

[199] L. M. Feitosa, E. R. da Silva, L. V. B. Hoelz, D. L. Souza, J. A. A. S. S. Come, C. Cardoso-Santos, M. M. Batista, M. d. N. C. Soeiro, N. Boechat, L. C. S. Pinheiro, *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 3061.

[200] S. Babu, C. Morrill, N. G. Almstead, Y.-C. Moon, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 1882.

[201] P. Pacher, A. Nivorozhkin, C. Szabó, *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 87.

[202] H. V. Pechmann, O. Baltzer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1891**, *24*, 3144.

[203] J. E. Baldwin, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1976**, 734.

[204] I. A. Borisova, A. A. Zubarev, L. A. Rodinovskaya, A. M. Shestopalov, *Arkivoc* **2017**, *2017*, 73.

[205] M. C. Bagley, M. Baashen, V. L. Paddock, D. Kipling, T. Davis, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 8429.

[206] A. Pinkerton, E. Sergienko, Y. Kiyotsuka, K. Kagechika, Y. Kurosaki, Y. Arai, M. Nagamochi, K. Ishibashi *et al.*, WO 2021133915 A1, **2021**.

[207] M. Devarakonda, R. Doonaboina, S. Vanga, J. Vemu, S. Boni, R. P. Mailavaram, *Med. Chem. Res.* **2013**, *22*, 1090.

[208] N. Šimůnková, T. Tobrman, V. Eigner, D. Dvořák, *J. Heterocyclic Chem.* **2017**, *54*, 3565.

[209] E. J. Ariëns, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1984**, *26*, 663.

[210] S. Zeng, D. Baillargeat, H.-P. Ho, K.-T. Yong, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 3426.

[211] M. M. Pierce, C. S. Raman, B. T. Nall, *Methods (San Diego, Calif.)* **1999**, *19*, 213.

[212] C. Ludwig, *Diffusion zwischen ungleich erwärmten Orten gleich zusammengesetzter Lösung*, Aus der KK Hof-und Staatsdruckerei, in Commission bei W. Braumüller, **1856**.

[213] C. Soret, *Sur l'etat d'équilibre que prend au point de vue de sa concentration une dissolution saline primitivement homogène dont deux parties sont portées a des températures différentes: Deuxieme note*, **1880**.

[214] C. J. Wienken, P. Baaske, U. Rothbauer, D. Braun, S. Duhr, *Nat. Commun.* **2010**, *1*, 100.

[215] M. Jerabek-Willemsen, C. J. Wienken, D. Braun, P. Baaske, S. Duhr, *Assay Drug. Dev. Technol.* **2011**, *9*, 342.

[216] N. Tschammer, S. Galinec, S. Weigert, M. Yves, C. You, J. Piehler, D. Breitsprecher, *Sci. Rep.* **2016,** *8*, 4977.

[217] J. R. Ferraro, J. Zipper, W. Wozniak, *Appl. Spectrosc.* **1969**, *23*, 160.

[218] M. Luo, Y. H. Huang, J. C. Zhang, X. B. Zou, *Russ. J. Coord. Chem.* **2014**, *40*, 439.

[219] S. V. Zubkevich, V. A. Tuskaev, S. C. Gagieva, A. A. Pavlov, V. N. Khrustalev, D. N. Zarubin, D. A. Kurmaev, N. A. Kolosov, B. M. Bulychev, *J. Mol. Struct.* **2020**, *1206*, 127692.

[220] Promega, "Reporter Genes and their Applications", unter https://www.promega.de/resources/guides/cell-biology/bioluminescent-reporters/ (zuletzt abgerufen: 02.01.2023).

[221] S. J. Baker, S. Markowitz, E. R. Fearon, J. K. Willson, B. Vogelstein, *Science* **1990**, *249*, 912.

[222] G. T. Kim, J. S. Koh, H. O. Han, S. H. Kim, K.-H. Kim, H.-K. Chung, Y. C. Kim, M. Kim, K. D. Koo, H. J. Yim *et al.*, WO 2005 040127, **2005**.

[223] Y.-J. Heo, M.-K. Jeon, *Tetrahedron* **2017**, *73*, 5959.

[224] Z.-F. Tao, L. Hasvold, Le Wang, X. Wang, A. M. Petros, C. H. Park, E. R. Boghaert, N. D. Catron, J. Chen, P. M. Colman *et al.*, *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 1088.

[225] H. Schönherr, T. Cernak, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2013**, *52*, 12256.

[226] L. E. Evans, M. D. Cheeseman, K. Jones, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 3546.

[227] D. F. Taber, W. Tian, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1058.

[228] W. Kltzer, M. Herberz, *Monatsh. Chem.* **1965**, *96*, 1567.

[229] F. Ullmann, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1903**, *36*, 2382.

[230] I. Goldberg, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1907**, *40*, 4541.

[231] J. C. Antilla, J. M. Baskin, T. E. Barder, S. L. Buchwald, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5578.

[232] A. Klapars, X. Huang, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7421.

[233] E. Sperotto, G. P. M. van Klink, G. van Koten, J. G. de Vries, *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 10338.

[234] M. Radi, C. Tintori, F. Musumeci, C. Brullo, C. Zamperini, E. Dreassi, A. L. Fallacara, G. Vignaroli, E. Crespan, S. Zanoli *et al.*, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 5382.

[235] S. Moon, Y. Kwon, J. Lee, J. Choo, *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 3221.

[236] R. W. Freudenmann, F. Oxler, S. Bernschneider-Reif, *Addiction (Abingdon, England)* **2006**, *101*, 1241.

[237] K. Verschueren, M. Cobbaut, J. Demaerel, L. Saadah, A. R. D. Voet, J. van Lint, W. M. de Borggraeve, *MedChemComm* **2017**, *8*, 640.

[238] F. Bruening, L. E. Lovelle, *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2017*, 3222.

[239] D. J. Brown, *J. Appl. Chem.* **1957**, *7*, 109.

[240] Edward C. Taylor, Malcolm J. Thompson, *J. Org. Chem.* **1961**, 5224.

[241] J. Šturala, S. Boháčová, J. Chudoba, R. Metelková, R. Cibulka, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 2676.

[242] A. S. Guram, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7901.

[243] F. Paul, J. Patt, J. F. Hartwig, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5969.

[244] N. C. Bruno, N. Niljianskul, S. L. Buchwald, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 4161.

[245] P. Ruiz-Castillo, S. L. Buchwald, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 12564.

[246] L. Kürti, B. Czako, *Strategic applications of named reactions in organic synthesis*. *Background and detailed mechanisms*, Elsevier Academic, Burlington, MA, **2005**.

[247] M. Hemmerling, K. Edman, M. Lepistö, A. Eriksson, S. Ivanova, J. Dahmén, H. Rehwinkel, M. Berger, R. Hendrickx, M. Dearman *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Letters* **2016**, *26*, 5741.

[248] H.-R. Lee, Farhanullah, J. Lee, R. Jajoo, S.-Y. Kong, J.-Y. Shin, J.-O. Kim, J. Lee, J. Lee, H.-J. Kim, *ACS Chem. Neurosci.* **2016**, *7*, 90.

[249] T. Bzeih, D. Lamaa, G. Frison, A. Hachem, N. Jaber, J. Bignon, P. Retailleau, M. Alami, A. Hamze, *Org. Lett.* **2017**, *19*, 6700.

[250] M. C. Macinnis, S. Beers, H.-F. Chen, G. Szigethy, J. A. Macor, J. Brooks *et al.*, US 2021040129 A1, **2020**.

[251] J. Charton, S. Girault-Mizzi, M.-A. Debreu-Fontaine, F. Foufelle, I. Hainault, J.-G. Bizot-Espiard, D.-H. Caignard, C. Sergheraert, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 4490.

[252] M. K. Kim, H. Shin, K. Park, H. Kim, J. Park, K. Kim, J. Nam, H. Choo, Y. Chong, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 7596.

[253] D. Yang, D. Fokas, J. Li, L. Yu, C. M. Baldino, *Synthesis* **2005**, 47.

[254] P. Mandapati, P. K. Giesbrecht, R. L. Davis, D. E. Herbert, *Inorg. Chem.* **2017**, *56*, 3674.

[255] V. Ramadoss, A. J. Alonso-Castro, N. Campos-Xolalpa, C. R. Solorio-Alvarado, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 10627.

[256] A. Ikeda, M. Omote, K. Kusumoto, M. Komori, A. Tarui, K. Sato, A. Ando, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 2127.

[257] E. W. Baxter, A. B. Reitz *Org. React.* **2004**, 1.

[258] I. I. Sahay, P. S. Ghalsasi, *Synth. Commun.* **2017**, *47*, 825.

[259] Y. H. Kim, D. B. Kim, S. S. Jang, S. W. Youn, *J. Org. Chem.* **2022**, *87*, 7574.

[260] C. Ren, F. Zhou, B. Qin, R. Ye, S. Shen, H. Su, H. Zeng, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, *50*, 10612.

[261] E. Aktoudianakis, G. Chin, K. Corkey Britton, J. Du, K. Elbel, R. H. Jiang, T. Kobayashi, R. Lee, R. Martinez, S. E. Metobo *et al.*, WO 2014182929 A1, **2014**.

[262] A. G. Uslu, T. Gür Maz, A. Nocentini, E. Banoglu, C. T. Supuran, B. Çalışkan, *Bioorg. Chem.* **2020**, *95*, 103544.

[263] V. Kumar, B. Poojary, A. Prathibha, N. Shruthi, *Synth. Commun.* **2014**, *44*, 3414.

[264] B. Zhou, B. Li, W. Yi, X. Bu, L. Ma, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 3759.

[265] S. Oda, H. Shimizu, Y. Aoyama, T. Ueki, S. Shimizu, H. Osato, Y. Takeuchi, *Org. Process Res. Dev.* **2012**, *16*, 96.

[266] M. P. Surpur, P. R. Singh, S. B. Patil, S. D. Samant, *Synth. Commun.* **2007**, *37*, 1375.

[267] J. Kim, S. Ahn, Y. Jeon, D. Park, Y.-I. Yang, D. Lee, S. Lee, J. Ahn, J. Kim, K. Nam *et al.*, WO 2016016421, **2016**.

[268] K. K. Brown, D. Chai, C. S. Dodson, K. J. Duffy, A. N. Shaw *et al.*, WO 2013096151, **2013**.

[269] R. White, A. Amegadzie, A. Bryan, M. C. Chen, J. Jian *et al.*, WO 2010030954 A1, **2010**.

[270] S. Bhagwat, B. Wang, G. R. Luedtke, M. Spyvee *et al.*, WO 2016057834, **2016**.

[271] C. Amatore, F. Pfluger, *Organometallics* **1990**, *9*, 2276.

[272] D. A. Claremon, L. W. Dillard, Y. Fan, S. D. Lotesta, S. Singh, C. M. Tice, W. Zhao, L. Zhung *et al.*, WO 2017132432 A1, **2017**.

[273] Y. Xia, W. Li, F. Qu, Z. Fan, X. Liu, C. Berro, E. Rauzy, L. Peng, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1695.

[274] Y. Goriya, C. V. Ramana, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 7642.

[275] G. R. Srinivasa, L. Nalina, K. Abiraj, D. C. Gowda, *J. Chem. Res.* **2003**, *2003*, 630.

[276] W. Zhou, M. Fan, J. Yin, Y. Jiang, D. Ma, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 11942.

[277] S. Voth, J. W. Hollett, J. A. McCubbin, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 2545.

[278] M. Fan, W. Zhou, Y. Jiang, D. Ma, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2016**, *55*, 6211.

[279] J. Kim, S. Ahn, Y. Jeon, D. Park, Y.-I. Yang, D. Lee, S. Lee, J. Ahn, J. Kim, K. Nam *et al.*, WO 2016016421 A1, **2016**.

[280] A. I. M. Ibrahim, E. Batlle, S. Sneha, R. Jiménez, R. Pequerul, X. Parés, T. Rüngeler, V. Jha, T. Tuccinardi, M. Sadiq *et al.*, *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 3833.

[281] R. P. Singh, H. N. Subbarao, S. Dev, *Tetrahedron* **1981**, *37*, 843.

[282] M. Trigo-López, J. L. Pablos, F. C. García, F. Serna, J. M. García, *J. Polym. Sci., Part A-1: Polym. Chem.* **2014**, *52*, 1469.

[283] T. Wang, X. Liu, M. Hao, J. Qiao, C. Ju, L. Xue, C. Zhang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 2936.

[284] S. P. Davies, H. Reddy, M. Caivano, P. Cohen, *Biochem. J.* **2000**, *351*, 95.

[285] Reaction Biology, "Kinase Assay Details", gefunden unter https://www.reactionbiology.com/services/kinase-assays/kinase-screening (zuletzt abgerufen am 02.01.2023).

[286] Eurofins, "DiscoverX - Receptor Dimerization Assays. Quantitative assays for receptor dimer formation", gefunden unter https://www.discoverx.com/products-applications/cell-based-assays-for-biologics/receptor-dimerization-assays (zuletzt abgerufen am 02.01.2023).

[287] The Procter & Gamble Company, "VIGANTOL®1000 I.E.", gefunden unter https://www.vigantolvit.de/produkte/vigantol-1000, (zuletzt abgerufen am 03.01.2023).

[288] J. E. Gunton, C. M. Girgis, *Bone Rep.* **2018**, *8*, 163.

[289] P. Szulc, M. Schoppet, C. Goettsch, M. Rauner, T. Dschietzig, R. Chapurlat, L. C. Hofbauer, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2012**, *97*, 3700.

[290] C. M. Latham, C. R. Brightwell, A. R. Keeble, B. D. Munson, N. T. Thomas, A. M. Zagzoog, C. S. Fry, J. L. Fry, *Front. Physiol.* **2021**, *12*, 660498.

[291] A. S. Dusso, A. J. Brown, E. Slatopolsky, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2005**, *289*, F8-28.

[292] M. F. Holick, H. K. Schnoes, H. F. DeLuca, T. Suda, R. J. Cousins, *Biochemistry* **1971**, *10*, 2799.

[293] J. R. Wu-Wong, *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *158*, 395.

[294] D. D. Bikle, *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 319.

[295] S. Pilz, A. Zittermann, C. Trummer, V. Theiler-Schwetz, E. Lerchbaum, M. H. Keppel, M. R. Grübler, W. März, M. Pandis, *Endocr. Connect.* **2019**, *8*, R27-R43.

[296] J. G. J. Hoenderop, T. Voets, S. Hoefs, F. Weidema, J. Prenen, B. Nilius, R. J. M. Bindels, *EMBO J.* **2003**, *22*, 776.

[297] M. Hewison, F. Burke, K. N. Evans, D. A. Lammas, D. M. Sansom, P. Liu, R. L. Modlin, J. S. Adams, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.***2007**, *103*, 316.

[298] N. Estébanez, I. Gómez-Acebo, C. Palazuelos, J. Llorca, T. Dierssen-Sotos, *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 9039.

[299] M. T. Cantorna, L. Snyder, Y.-D. Lin, L. Yang, *Nutrients* **2015**, *7*, 3011.

[300] A. C. Ross, C. L. Taylor, A. L. Yaktine, H. B. Del Valle, *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*, Washington (DC), **2011**.

[301] A. W. Norman, *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, *88*, 491.

[302] C. Leyssens, L. Verlinden, A. Verstuyf, *Front. Physiol.* **2014**, *5*, 122.

[303] M. J. Duffy, A. Murray, N. C. Synnott, N. O'Donovan, J. Crown, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2017**, *112*, 190.

[304] M. A. Maestro, F. Molnár, C. Carlberg, *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 6854.

[305] N. Rochel, J. M. Wurtz, A. Mitschler, B. Klaholz, D. Moras, *Mol. Cell* **2000**, *5*, 173.

[306] J. P. Bilezikian, M. A. Levine, R. Marcus, *Parathyroids*, **2001**, *3*.

[307] Jan Niklas Herbel, "Calcipotriol", gefunden unter https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Calcipotriol_17350, (zuletzt abgerufen am 02.01.2023).

[308] R. Otero, S. Seoane, R. Sigüeiro, A. Y. Belorusova, M. A. Maestro, R. Pérez-Fernández, N. Rochel, A. Mouriño, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 1033.

[309] J. F. Valliant, K. J. Guenther, A. S. King, P. Morel, P. Schaffer, O. O. Sogbein, K. A. Stephenson, *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *232*, 173.

[310] A. Marfavi, P. Kavianpour, L. M. Rendina, *Nat. Rev. Chem.* **2022**, *6*, 486.

[311] P. Stockmann, M. Gozzi, R. Kuhnert, M. B. Sárosi, E. Hey-Hawkins, *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 3497.

[312] R. L. Moss, *Appl. Radiat. Isot.***2014**, *88*, 2.

[313] A. H. Soloway, W. Tjarks, B. A. Barnum, F.-G. Rong, R. F. Barth, I. M. Codogni, J. G. Wilson, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1515.

[314] T. D. Malouff, D. S. Seneviratne, D. K. Ebner, W. C. Stross, M. R. Waddle, D. M. Trifiletti, S. Krishnan, *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 601820.

[315] M. Lamblin, R. Spingarn, T.-T. Wang, M. C. Burger, B. Dabbas, N. Moitessier, J. H. White, J. L. Gleason, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7461.

[316] S. A. Abedin, C. M. Banwell, K. W. Colston, C. Carlberg, M. J. Campbell, *Anticancer Res.* **2006**, *26*, 2557.

[317] B. Czogalla, E. Deuster, Y. Liao, D. Mayr, E. Schmoeckel, C. Sattler, T. Kolben, A. Hester, S. Fürst, A. Burges *et al.*, *Histochem. Cell Biol.* **2020**, *154*, 421.

[318] K. K. Deeb, D. L. Trump, C. S. Johnson, *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 684.

[319] A. Agic, H. Xu, C. Altgassen, F. Noack, M. M. Wolfler, K. Diedrich, M. Friedrich, R. N. Taylor, D. Hornung, *Reprod. Sci.* **2007**, *14*, 486.

[320] D. Miura, K. Manabe, K. Ozono, M. Saito, Q. Gao, A. W. Norman, S. Ishizuka, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 16392.

[321] G. Tocchini-Valentini, N. Rochel, J.-M. Wurtz, D. Moras, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1956.

[322] G. Jones, P. Willett, R. C. Glen, A. R. Leach, R. Taylor, *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 727.

[323] E. Krieger, G. Vriend, *J. Comput. Chem.* **2015**, *36*, 996.

[324] X. Pérez-García, A. Rumbo, M. J. Larriba, P. Ordóñez, A. Muñoz, A. Mouriño, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4033.

[325] Y. Watarai, M. Ishizawa, T. Ikura, F. C. M. Zacconi, S. Uno, N. Ito, A. Mouriño, H. Tokiwa, M. Makishima, S. Yamada, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 9510.

[326] R. Sigüeiro, M. A. Maestro, A. Mouriño, *Org. Lett.* **2018**, *20*, 2641.

[327] B. Lythgoe, T. A. Moran, M. E. N. Nambudiry, J. Tideswell, P. W. Wright, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1978**, 590.

[328] B. M. Trost, J. Dumas, M. Villa, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9836.

[329] B. López-Pérez, M. A. Maestro, A. Mouriño, *ChemComm.* **2017**, *53*, 8144.

[330] C. Glaser, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1869**, *2*, 422.

[331] P. Cadiot, W. Chodkiewicz, *Chemistry of Acetylenes*, **1969**, 597.

[332] W. Yin, C. He, M. Chen, H. Zhang, A. Lei, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 709.

[333] A. R. Daniewski, L. M. Garofalo, S. D. Hutchings, M. M. Kabat, W. Liu, M. Okabe, R. Radinov, G. P. Yiannikouros, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1580.

[334] P. Dozzo, R. A. Kasar, S. B. Kahl, *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 8053.

[335] A. Sousa-Pedrares, C. Viñas, F. Teixidor, *ChemComm.* **2010**, *46*, 2998.

[336] H. Nakamura, K. Aoyagi, Y. Yamamoto, *J. Organomet. Chem.* **1999**, *574*, 107.

[337] V. A. Ol'shevskaya, A. V. Makarenkov, E. G. Kononova, P. V. Petrovskii, E. V. Verbitskii, G. L. Rusinov, V. N. Kalinin, V. N. Charushin, *Dokl. Chem.* **2010**, *434*, 245.

[338] M. F. Hawthorne, D. C. Young, P. M. Garrett, D. A. Owen, S. G. Schwerin, F. N. Tebbe, P. A. Wegner, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 862.

[339] R. A. Wiesboeck, M. F. Hawthorne, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1642.

[340] J. A. Dale, H. S. Mosher, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 512.

[341] R. S. Cahn, C. Ingold, V. Prelog, *Angew. Chem. - Int. Ed.* **1966**, *78*, 413.

[342] T. R. Hoye, C. S. Jeffrey, F. Shao, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2451.

[343] S. Seoane, P. Gogoi, A. Zárate-Ruíz, C. Peluso-Iltis, S. Peters, T. Guiberteau, M. A. Maestro, R. Pérez-Fernández, N. Rochel, A. Mouriño, *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 13112.

[344] A. M. Salaheldin, A. M. F. Oliveira-Campos, L. M. Rodrigues, *Synth. Commun.* **2009**, *39*, 1186.

[345] M. E. Zhidkov, A. V. Kutkin, E. N. Fetisova, D. M. Zverev, N. V. Zaraeva, V. V. Gorokhov, O. V. Chubarova, *Russ. J. Org. Chem.* **2017**, *53*, 592.

[346] I. S. Mitchell, K. L. Spencer, P. Stengel, Y. Han, N. C. Kallan, M. Munson, G. P. A. Vigers, J. Blake, A. Piscopio, J. Josey, S. Miller, D. Xiao, R. Xu, C. Rao, B. Wang, A. L Bernacki, WO 2005051304 A3, **2004**.

[347] J.-F. Lemonnier, L. Guénée, C. Beuchat, T. A. Wesolowski, P. Mukherjee, D. H. Waldeck, K. A. Gogick, S. Petoud, C. Piguet, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16219.

ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne die Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Ich versichere an Eides statt, dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen und eingebundenen Artikeln und Manuskripten - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine Veröffentlichung der Dissertation vor Abschluss der Promotion nicht ohne Genehmigung des Promotionsausschusses vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Ordnung sind mir bekannt. Darüber hinaus erkläre ich hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten der Universität zu Köln gelesen und sie bei der Durchführung der Dissertation zugrundeliegenden Arbeiten und der schriftlich verfassten Dissertation beachtet habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen. Ich versichere, dass die eingereichte elektronische Fassung der eingereichten Druckfassung vollständig entspricht.

Nachfolgend genannte Teilpublikationen liegen vor:

- "Design, Synthesis, Biological Activity, and Structural Analysis of Novel Des-C-Ring and Aromatic-D-Ring Analogs of 1α,25-Dihydroxyvitamin D3", S. Seoane, P. Gogoi, A. Zárate-Ruíz, C. Peluso-Iltis, S. Peters, T. Guiberteau, M. A. Maestro, R. Perez-Fernandez, N. Rochel, A. Mouriño, *J. Med. Chem.,* **2022**, *65*, 13112, https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c00900

09.02.2023 — Datum

 — Unterschrift