

Synthese und Charakterisierung substituierter Pyrazole und Chinoxalin-
derivate als potenzielle Inhibitoren des Tat-TAR-Komplexes von HIV-1

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Gunther Seifert
aus Frankenthal

Frankfurt am Main
2007
(D 30)

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

Dekan: Prof. Dr. H. Schwalbe

Erster Gutachter: Prof. Dr. M. W. Göbel

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. J. W. Engels

Datum der Disputation: 22.02.2008

Kurzfassung

Synthese und Charakterisierung substituierter Pyrazole und Chinoxalinderivate als potenzielle Inhibitoren des Tat-TAR-Komplexes von HIV-1

Gunther Seifert

HIV als Auslöser von Aids ist ein Retrovirus. Nach reverser Transkription des RNA-Genoms und Integration in die DNA der Wirtszelle kommt es nach Aktivierung der viralen Gene zur Produktion der viralen Proteine und schließlich zur Bildung neuer Viruspartikel. Ein wichtiges Element zur Steuerung der Transkriptionseffizienz ist das Tat/TAR-System. TAR ist ein 59 Nukleotide langer RNA-Abschnitt. Tat ist ein kleines Peptid mit einer argininreichen und zugleich basischen Domäne, die an TAR bindet. Liganden der TAR-RNA, welche die Bindungsstelle für Tat blockieren, können dadurch den viralen Zyklus unterbrechen. Ziel der vorliegenden Dissertation war es, ausgehend von einer strukturellen Hypothese des TAR-Argininamid-Komplexes, kleine Heterozyklen als potenzielle Tat-TAR-Inhibitoren zu entwerfen.

Arginin und Argininamid gehören bis heute zu den wohl am besten untersuchten und charakterisierten TAR-Liganden. Liganden die hohe Affinitäten zur TAR-RNA zeigen, zeichnen sich sowohl durch die Möglichkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, als auch durch aromatische Grundgerüste zur Erhöhung der *stacking*-Effekte aus. Durch eine Vielzahl von NMR-Untersuchungen und molekulardynamischen Berechnungen konnte eine Änderung in der Konformation der TAR-RNA durch Wechselwirkungen mit Arginin- oder Guanidingruppen belegt werden. In der vorliegenden Arbeit sollte das Bindungskonzept von zwei überlagerten Guanidinen an die TAR-RNA untersucht werden. Die daraus hervorgehende Struktur ergab ein dreifach aminiertes Pyrazol. Triaminopyrazol erwies sich als Reinverbindung im Vergleich zu monokationischen Guanidinanaloga ähnlicher Größe als ein recht effizienter Tat-TAR-Inhibitor, der sich in Zellkultur-Assays als wirksam gegen HIV-1 erwies. Nach der Synthese des 1H-Pyrazol-3,4,5-triamin-sulfates sollte diese Verbindung dann in größere Struktur motive eingebettet werden, von denen man sich erhoffte, dass sie in ihrer reduzierten Form in der Lage sein sollten, weitere H-Brücken zu benachbarten Basen der RNA auszubilden und dadurch die Affinität zu erhöhen. Daraufhin wurde eine Synthesestrategie ausgearbeitet, die es erlaubte, sowohl am Ringstickstoff des Pyrazolringes methylierte, als auch nicht methylierte Phenazinderivate herzustellen. Dies gelang in einfachen, konvergenten Synthesen in guten Ausbeuten. Mit der Her-

stellung der beiden Acetylphenazine **147** und **151** und der Synthese der am Pyrazolringstickstoff methylierten Verbindung **98** konnten drei Moleküle präsentiert werden, die in der oxidierten Form IC_{50} -Werte aufwiesen, die etwa 2-4fach besser waren als der Wert des Triaminopyrazols. Die synthetisierte Phenazin-Stammverbindung **112** konnte zwar mit Natriumdithionit reduziert werden, wurde aber an Luft rasch reoxidiert. Es bestand die Hoffnung, dass die reduzierte Form als leicht protonierbares, nichtplanares aber lipophiles Analogon des Triaminopyrazols ein interessanter Liganden-Kandidat für die TAR-RNA sein könnte. Auch die durch reduktive Zyklisierung erhaltene Verbindung **98** ließ sich mit Natriumdithionit reduzieren. Laut Cyclovoltametrie ist dieser Vorgang reversibel (Redoxpotenzial -1.377 V gegen Standard-Kalomelektrode). Es ist bekannt, dass die Redoxpotenziale von Phenazinen durch Alkylierung gegen 0 V verschoben werden können. Leider gelang die $NaBH_4$ induzierte Zyklisierung von Verbindung **93** nicht. An die zyklisierte Form von Verbindung **93** und an die Phenazin-Stammverbindung **112** bestanden die Erwartungen, dass diese Strukturen in reduzierter Form stabil und luftbeständig sein könnten oder sich vielleicht in vivo, d.h. im Zytoplasma, wo reduzierende Bedingungen herrschen, von einer Prodrug-Form in die eigentliche Wirkform überführen lassen könnten (vgl. FAD/FADH₂). Eine weitere Möglichkeit zur Verringerung des Redoxpotenzials bestand in der Einführung von Acetylresten und Halogenatomen als Elektronenakzeptoren. Die Acetylverbindungen **147** und **151** sollten weiterhin in der Lage sein, eine zusätzliche H-Brücke zu C 39 auszubilden und dadurch den Komplex mit TAR stabilisieren.

Es zeigte sich, dass die im Rahmen dieser Dissertation synthetisierten Phenazinderivate zwar alle mit Natriumdithionit reduziert werden konnten, diese Strukturen aber nicht luftstabil waren. Zudem störten die zugesetzten Mengen Reduktionsmittel durch auftretende Präzipitationseffekte den Assay ab einer bestimmten Konzentration so empfindlich, sodass keine vernünftigen und aussagekräftigen Messergebnisse für die reduzierten Phenazine erhalten werden konnten. Daher soll in zukünftigen Arbeiten die Stoffklasse der Phenazine nicht weiter als TAR-Liganden in Betracht gezogen werden.

Abstract

Synthesis and characterization of substituted pyrazoles and quinoxalinderivatives as potential inhibitors of the Tat-TAR-complex of HIV-1

Gunther Seifert

HIV, the causing agent of Aids is a retrovirus. After reverse transcription of the RNA genome and integration into the DNA of the host cell the viral genes are activated and the formation of viral proteins is initiated. Thereby new viral-particles are formed. A very important element to control the efficiency of viral transcription is the tat/TAR-system. TAR is a 59 nucleotides long RNA section. Tat is a small peptide with an arginine rich basic domain, which binds to TAR. Ligands of the TAR-RNA which block the binding site for Tat, are able to disrupt the viral cycle. The main goal of this work was, starting from a structural assumption of the TAR-arginine amide complex, to design small heterocyclic molecules as potential inhibitors of the Tat-TAR-system. Arginine and arginineamide are until now the best known and characterised TAR-ligands. Ligands with high affinity to the TAR-RNA typically have the possibility to form hydrogen bonds as well as to arise stacking effects. Due to NMR-studies and molecular dynamic calculations the conformational change of the TAR-RNA by virtue of interactions with arginine or guanidine groups could be shown. In this work the binding model of two overlaid guanidine structures should be determined. The resulting molecule was 1H-pyrazole-3,4,5-triamine. This purified compound compared to monocationic guanidine analogues of similar dimension proved to be a quite efficient Tat-TAR-inhibitor, which showed activity against HIV-1 in a cell culture assay. After the successful synthesis of this small molecule the structural diversity should be enhanced. The reduced compounds should be able to form additional hydrogen bonds with the bases of the RNA to increase affinity. A concept to synthesize methylated as well as non methylated phenazines was elaborated. This could be done in simple and convergent synthetic steps with good yields. With the synthesis of the two acetylated phenazines **147** and **151** and the methylated compound **98** there could be presented three molecules which have in the oxidised form IC_{50} values which are 2-4 times better than the affinity of triaminopyrazole. The synthesised phenazine compound **112** could be reduced with sodium dithionite, but it was reoxidised on air very fast. We hoped that the reduced form as an easily protonable, not planar, but lipophilic analogon of 1H-pyrazole-3,4,5-triamine could be an interesting ligand for the

TAR-RNA. Even compound **98**, which was obtained by reductive cyclisation could be reduced with sodium dithionite. Measurement results showed that this process was reversible. (redox potential -1.377 V against standard calomel electrode). It is a fact that the redox potentials of phenazines could be shifted to 0 V by alkylation. Unfortunately the sodium borohydride induced cyclisation of compound **93** was infeasible. We expected from the compounds **93** and **112** that they are in the reduced form stable when exposed to air, or that they could maybe transferred from a prodrug into an active form inside of the cytoplasm were reductive conditions prevail (cp. FAD/FADH₂). Another opportunity to decrease the redox potential was the introduction of acetyl groups and halogen atoms as electron acceptors. The acetyl compounds **147** and **151** should have the ability to form an additional hydrogen bond to C 39 and stabilise the complex with TAR. All the synthesised phenazines within this dissertation could be reduced with sodium dithionite, but it must be pointed out that these compounds were not stable in the air. Furthermore the reducing agent only could be added up to a defined quantity until precipitation bothered the assay so that there cannot be achieved any significant results. In the future phenazines should not be considered as TAR-ligands.

Für meinen Bruder

„Einer neuen Wahrheit ist nichts schädlicher als ein alter Irrtum“

Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832)

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde von September 2002 bis Mai 2007 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. M. W. Göbel am Institut für Organische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main angefertigt.

Herrn Prof. Dr. M. W. Göbel möchte ich für die Aufnahme in den Arbeitskreis, für die interessante Themenstellung und die ausgezeichneten experimentellen Bedingungen zur Durchführung dieser Arbeit danken.

Frau Dr. U. Scheffer bin ich für die unzähligen FRET-Messungen, das Bereitstellen der RNA-Proben sowie die kritische Durchsicht dieser Arbeit sehr dankbar.

Der DFG danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Sonderforschungsbereiches RNA-Ligand-Wechselwirkungen (SFB 579).

Frau T. Ruppenthal danke ich für ihre jederzeit vorhandene Hilfsbereitschaft bei organisatorischen Dingen und ihre aufmunternden Gespräche.

Des weiteren möchte ich mich bei den Mitarbeitern der spektroskopischen Abteilung, ganz besonders bei Herrn Dr. G. Zimmermann für die Messungen der NMR-Spektren bedanken, bei Frau M. Christoph für die Messung der Elementaranalysen, bei Frau I. Prieß und Frau H. Brill für die Anfertigung der Massenspektren.

Herrn Dr. J. W. Bats danke ich für die Aufnahme der Röntgenstrukturen.

Zu besonderem Dank bin ich der HPLC-Serviceabteilung um Herrn Dr. G. Dürner und Frau G. Stracke für die unermüdliche Trennung der Verbindungen und die Bereitstellung der destillierten Lösungsmittel verpflichtet.

Der Arbeitsgruppe um Frau Dr. U. Dietrich, insbesondere Frau M. Stoll danke ich für die Durchführung der Zellkulturexperimente.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. G. Schneider und seinen Mitarbeitern für die ausgezeichnete Zusammenarbeit.

Ich möchte mich bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises für die sehr gute Zusammenarbeit und die gute Arbeitsatmosphäre bedanken, namentlich Frau N. Brüssler, Frau A. Dlabal, Herrn Dr. M. Hey, Herrn Dr. Z. Nazir, Herrn Dr. S. Peter, Herrn Dr. Ch. Roussev, Herrn F. Stupp, Herrn Dipl.-Chem. Ch. Timm, Herrn Dipl.-Chem. M. Weimar, Herrn Dipl.-Chem. H. Walther, Frau Dipl.-Chem. N. Tatarovic Herrn Dipl.-Chem. S. Breitung, Herrn Dipl.-Chem. S. Ullrich, Herrn Dipl.-Chem. M. Zeiger, Herrn Dipl.-Chem. Ch. Gomez, Herrn Dr. A. Krebs.

Frau Dipl.-Chem. K. Dörr danke ich besonders für ihr Verständnis, ihre aufmunternden Gespräche und ihre freundliche Art.

Meinem Laborkollegen Herrn Dipl.-Chem. D. Akalay danke ich nicht nur für seine fachlichen Diskussionen, das kritische Korrekturlesen dieser Arbeit, sondern auch für die lustigen Gespräche außerhalb des Laboralltags, beispielsweise das „Eintreten“ todsicherer Ereignisse.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meiner Freundin Vera, ohne deren Unterstützung und Rückhalt diese Arbeit niemals zustande gekommen wäre.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Zielsetzung.....	5
3	HIV.....	7
3.1	Genereller Aufbau eines HI-Virus.....	7
3.2	Membranproteine	9
3.3	Tat-Proteine.....	11
3.4	Replikationszyklus des HIV-1	12
3.4.1	Integration des viralen Genoms in das Genom der infizierten Zelle.....	12
3.4.2	Frühe Phase der Replikation und Expression viraler Regulationsgene	13
3.4.3	Späte Phase der Replikation und Expression der Strukturproteine mit anschließender Freisetzung infektiöser Partikel	15
3.4.4	Die akzessorischen Proteine	17
3.4.5	Antiretrovirale Medikamente und Angriffsziele zur Behandlung von HIV	18
3.4.6	Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs).....	21
3.4.7	Nicht-Nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTIs).....	24
3.4.8	Protease Inhibitoren (PIs).....	24
3.4.9	Entry-Inhibitoren	26
4	RNA-Liganden.....	28
4.1	TAR-RNA-Liganden.....	29
4.2	Small Molecules	30
4.3	Aminoglykoside	35
4.4	Peptidische Strukturen	36
5	Eigene synthetische Arbeiten	40
5.1	Versuche zur Herstellung von 1H-Pyrazol-3,4,5-triamin	40
5.2	Versuche zur Demethylierung von 4-Brom-1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol.....	43
5.3	Versuche zur Synthese von 4-Brom-3,5-dinitro-1H-pyrazol	43
5.4	Synthese von 1H-Pyrazol-3,4,5-triamin-sulfat durch Aminierung von 3,5-dinitro-1H-pyrazol und anschließende Reduktion.....	45
5.5	Synthese von 1H-Pyrazolo[3,4-b]pyrazin-3-ylamin	47
5.6	Synthesestrategie zur Herstellung des Phthalimidderivates	47
5.7	Versuche zur Kupplung von 5-Amino-2-methyl-isoindol-1,3-dion mit 4-Brom-1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol	48
5.8	Umsetzung verschiedener Amine mit 4-Brom-1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol	56
5.9	Natriumborhydrid induzierte, reduktive Zyklisierung der Kupplungsprodukte zu Phenazinderivaten.....	57
5.10	Versuche zur Synthese von 1,9-Dimethyl-4,9-dihydro-1H-pyrazolo[3,4-b]-chinoxalin-3-amin.....	57

Inhaltsverzeichnis

5.11	Synthese substituierter Benzofurazan-1-oxide	59
5.12	Gleichgewichtsreaktion zwischen Benzofurazan 1-oxiden und ortho-Dinitroverbindungen.....	60
5.13	Synthese von 1H-Pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3-ylamin	61
5.14	Synthese weiterer Phenazinderivate durch Beirut-Reaktion	64
5.15	Synthese der beiden „Acetyl-Phenazine“ aus 4-Chlor-acetophenon.....	67
5.16	Versuche zur Synthese von 3-Amino-7-methyl-1H-1,2,4,7,10-pentaazadicyclopenta[b,g]naphthalin-6,8-dion durch Beirut-Reaktion	70
6	Charakterisierung der RNA-Liganden bezüglich ihrer Bindungsaffinität	72
6.1	Physikalisch-Chemischer Hintergrund.....	72
6.2	Anwendung des FRET-Assays zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten	76
6.3	Bestimmung der IC ₅₀ -Werte	77
7	Reportergen-Assay	80
7.1	Aufbau des Assays.....	80
7.2	Zellkulturuntersuchungen der Verbindungen.....	81
8	Zusammenfassung und Ausblick	84
8.1	Zusammenfassung	84
8.2	Ausblick	90
9	Experimenteller Teil	92
9.1	Allgemeine Experimentelle Bedingungen	92
9.2	Liste der synthetisierten Verbindungen.....	95
9.3	Darstellung und Charakterisierung der Einzelverbindungen	98
9.3.1	Synthese von 4-Brom-1H-pyrazol	98
9.3.2	Synthese von 4-Brom-1-methyl-1H-pyrazol	99
9.3.3	Synthese von 4-Brom-1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol	100
9.3.4	Synthese von Methyl-(2-nitro-phenyl)-amin.....	101
9.3.5	Synthese von N-Methyl-benzol-1,2-diamin.....	102
9.3.6	Synthese von 1-Methyl-4-(2-(methylamino)phenylamino)-3,5-dinitro-1H-pyrazol	103
9.3.7	Synthese von N ⁵ ,1-Dimethyl-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3,5-diamin	104
9.3.8	Synthese von 1-Methyl-3,5-dinitro-4-phenylamino-1H-pyrazol	105
9.3.9	Synthese von 1-Methyl-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3-amin	107
9.3.10	Synthese von 4-(2-Aminophenylamino)-1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol.....	115
9.3.11	Synthese von 1-Methyl-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3,5-diamin	116
9.3.12	Synthese von 4-(3,4-Dimethylphenylamino)-1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol.....	117
9.3.13	Synthese von 1,6,7-Trimethyl-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3-ylamin	118
9.3.14	Synthese von 1,3-Dihydro-5-nitroisobenzofuran	120
9.3.15	Synthese von 1,3-Dihydroisobenzofuran-5-ylamin	121

Inhaltsverzeichnis

9.3.16	Synthese von 4-(1,3-Dihydroisobenzofuran-5-yl)amino-1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol	122
9.3.17	Synthese von 7-Methyl-3,7-dihydro-1H-2-oxa-6,7,8,10-tetraaza-dicyclopenta[a,g]naphthalin-9-ylamin	123
9.3.18	Synthese von 1H-Pyrazolo[3,4-b]pyrazin-3-ylamin	124
9.3.19	Synthese von 1-Nitro-1H-pyrazol	125
9.3.20	Synthese von 3-Nitro-1H-pyrazol	126
9.3.21	Synthese von 1,3-Dinitro-1H-pyrazol.....	127
9.3.22	Synthese von 3,5-Dinitro-1H-pyrazol.....	128
9.3.23	Synthese von 1,1,1-Trimethylhydraziniumiodid.....	129
9.3.24	Synthese von 3,5-Dinitro-1H-pyrazol-4-ylamin;als DMSO-Monosolvat.....	130
9.3.25	Synthese von 1H-Pyrazol-3,4,5-triamin-sulfat	134
9.3.26	Synthese von Benzo[1,2,5]oxadiazol 1-oxid.....	139
9.3.27	Synthese von 3-Amino-1,4-dioxy-chinoxalin-2-carbonitril	140
9.3.28	Synthese von 3-Amino-chinoxalin-2-carbonitril	141
9.3.29	Synthese von 3-Chlor-chinoxalin-2-carbonitril.....	142
9.3.30	Synthese von 1H-Pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3-ylamin	144
9.3.31	Synthese von N-(3,4-Dichlor-phenyl)-acetamid.....	148
9.3.32	Synthese von N-(4,5-Dichlor-2-nitrophenyl)-acetamid	149
9.3.33	Synthese von 4,5-Dichlor-2-nitrophenylamin.....	151
9.3.34	Synthese von 5,6-Dichlor-benzo[1,2,5]oxadiazol-1-oxid	152
9.3.35	Synthese von 3-Amino-6,7-dichlor-1,4-dioxy-chinoxalin-2-carbonitril	153
9.3.36	Synthese von 3-Amino-6,7-dichlor-chinoxalin-2-carbonitril	154
9.3.37	Synthese von 3,6,7-Trichlorchinoxalin-2-carbonitril.....	155
9.3.38	Synthese von 6,7-Dichlor-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3-ylamin	156
9.3.39	Synthese von 5,6-Dimethylbenzo[c][1,2,5]oxadiazol-1-oxid	157
9.3.40	Synthese von 3-Amino-6,7-dimethyl-1,4-dioxy-chinoxalin-2-carbonitril.....	159
9.3.41	Synthese von 3-Amino-6,7-dimethyl-chinoxalin-2-carbonitril	160
9.3.42	Synthese von 3-Chlor-6,7-dimethyl-chinoxalin-2-carbonitril	161
9.3.43	Synthese von 6,7-Dimethyl-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3-ylamin	162
9.3.44	Synthese von 4-Chlor-3-nitro-acetophenon.....	163
9.3.45	Synthese von 1-(3-Oxy-benzo[1,2,5]oxadiazol-5-yl)-ethanon	164
9.3.46	Synthese von 5-(2-Methyl-[1,3]dioxolan-2-yl)benzo[1,2,5]oxadiazol-3-oxid	165
9.3.47	Synthese von 3-Amino-7-(2-methyl-[1,3]dioxolan-2-yl)-1,4-dioxy-chinoxalin-2-carbonitril, und 3-Amino-6-(2-methyl-[1,3]dioxolan-2-yl)-1,4-dioxy-chinoxalin-2-carbonitril	166

Inhaltsverzeichnis

9.3.48	Synthese von 3-Amino-7-(2-methyl-[1,3]dioxolan-2-yl)chinoxalin-2-carbonitril und 3-Amino-6-(2-methyl-[1,3]dioxolan-2-yl)-chinoxalin-2-carbonitril	167
9.3.49	Synthese von 6-Acetyl-3-chlor-chinoxalin-2-carbonitril	170
9.3.50	Synthese von 3-Chlor-6-(2-methyl-[1,3]-dioxolan-2-yl)-chinoxalin- 2-carbonitril.....	175
9.3.51	Synthese 7-(2-Methyl-(1,3)-dioxolan-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-b]quin-oxalin-3-amin....	176
9.3.52	Synthese von 1-(3-Amino-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-7-yl)-ethanon	177
9.3.53	Synthese von 7-Acetyl-3-chlor-chinoxalin-2-carbonitril	178
9.3.54	Synthese von 3-Chlor-7-(2-methyl-[1,3]dioxolan-2-yl)-chinoxalin-2-carbonitril.....	179
9.3.55	Synthese von 6-(2-Methyl-(1,3)-dioxolan-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3-ylamin	186
9.3.56	Synthese 1-(3-Amino-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-6-yl)-ethanon.....	187
9.3.57	Synthese von 5-Chlor-isoindol-1,3-dion	188
9.3.58	Synthese von 5-Chlor-6-nitroisoindol-1,3-dion	189
9.3.59	Synthese von 5-Chlor-2-methyl-6-nitro-isoindol-1,3-dion	190
9.3.60	Synthese von 6-Methyl-1-oxy-pyrrol[3',4',4,5]benzo[1,2-c][1,2,5]oxadiazol-5,7-dion	191
9.3.61	Synthese von 5-Amino-2-methyl-6-nitro-isoindol-1,3-dion	196
9.3.62	Synthese von 5-Nitro-isoindol-1,3-dion	197
9.3.63	Synthese von 5-Amino-isoindol-1,3-dion	198
9.3.64	Synthese von 2-Methyl-5-nitro-isoindol-1,3-dion	199
9.3.65	Synthese von 5-Amino-2-methyl-isoindol-1,3-dion	200
9.3.66	Synthese von Malondiimidsäure-diethylester-dihydrochlorid	201
9.3.67	Synthese von 1H-Pyrazol-3,5-diamin	202
9.3.68	Synthese von 4-Brom-1H-pyrazol-3,5-diamin	203
9.3.69	Synthese von Methyl-(1-methyl)-3,5-dinitro-1H-pyrazol-4-yl)-amin	204
9.3.70	Synthese von (2-Hydroxymethyl-4-nitro-phenyl)-methanol	205
9.3.71	Synthese von Bis(pyridin)iodonium(I)tetrafluorborat	206
a)	Herstellung des Quecksilber(II)oxid-HBF ₄ -Kieselgel-Komplexes	206
b)	Synthese von Bis(pyridin)iodonium(I)tetrafluorborat	206
9.3.72	Synthese von Kupferphenylacetylid	207
9.3.73	Synthese von 4-Iod-1,3,5-trimethyl-1H-pyrazol	208
9.3.74	Synthese von 1,3,5-Trimethyl-4-phenylethynyl-1H-pyrazol	209
9.3.75	Synthese von 1H-Pyrazol-1-carboxamidin, Salz mit Salzsäure	210
9.3.76	Synthese von Methyl-(1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol-4-yl)-phenylamin.....	211
10	Anhang	212
10.1	Abkürzungsverzeichnis.....	212
10.2	FRET-Messungen	214
10.2.1	Experimentelle Bedingungen.....	214

Inhaltsverzeichnis

10.2.2	Graphiken der vermessenen Verbindungen	215
10.3	UV-Spektren des Reoxidationsprozesses der Phenazine	217
10.4	Zellkulturuntersuchungen	220
10.5	Literaturverzeichnis	222
10.6	Lebenslauf	227
10.7	Publikationsverzeichnis	228

1 Einleitung

Die weltweite HIV/Aids-Pandemie hat sich von der Entdeckung der Krankheit bis zum heutigen Tag zu einem der größten Gesundheitsprobleme entwickelt (**Abbildung 1**). Trotz intensiver weltweiter Forschung zur Bekämpfung dieser Infektionskrankheit, die ohne medikamentöse Behandlung tödlich verläuft und bislang auch nicht heilbar ist, konnte bis heute noch kein Impfstoff gefunden werden. Mit den zurzeit in klinischem Einsatz befindlichen Medikamenten kann man lediglich die Beschwerden der Betroffenen lindern, den Verlauf der Krankheit verzögern und damit ihre Lebenserwartung erhöhen. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzt die Zahl der Menschen, die im Dezember 2006 mit der Infektionskrankheit leben, auf über 42 Millionen. Jährlich sind zwischen fünf und sieben Millionen Neuinfektionen zu verzeichnen^[1-4].



Abbildung 1: Derzeitiger Stand der weltweiten HIV-Pandemie zum Ende des Jahres 2006^[5].

Der Krankheitserreger ist ein Virus, das erstmals im Jahre 1983 von den Wissenschaftlern Françoise Barré-Sinoussi und Robert C. Gallo unabhängig voneinander entdeckt wurde^[6]. Die beiden Forscher beschrieben das Auftreten des humanen Immundefizienzvirus, kurz HIV-1. Kurze Zeit später konnten Wissenschaftler um Luc Montagnier die Existenz des HIV-1 verifizieren. Mit der Entdeckung einer neuen Virusvariante im Jahre 1986, die unter anderem in ihrem Genomaufbau von dem des HIV-Typ-1 differierte und nach ihrem Entdecker Clavel humanes Immundefizienzvirus HIV-Typ-2 benannt wurde, konnten diese beiden Viren als Auslöser der damit einhergehenden Immunschwächekrankheit Aids (acquired immunodeficiency sndrome) eindeutig identifiziert werden^[6]. Da Viren selbst zu keinen eigenen Stoffwechsellvorgängen fähig sind, benötigen sie einen Wirt. Sie sind in der Lage, zelluläre Prozesse

ihrer Wirtszelle umzusteuern, und somit für einen optimalen Verlauf ihrer Vermehrung zu sorgen. Neben der Erbinformation für ihre eigenen Komponenten besitzen Viren auch Gene für verschiedene regulatorisch aktive Proteine (z.B. Transaktivatoren) und für Enzyme (z.B. Proteasen und Polymerasen)^[7]. Bis 1970 ging man davon aus, dass der Fluss der Erbinformation immer von der DNA über die RNA hin zum Protein laufen müsse. Dies galt als das zentrale Dogma der Molekularbiologie. Als Forscher 1970 bei Retroviren ein Enzym, die Reverse Transkriptase fanden, welches in der Lage war, RNA in DNA umzuschreiben, war dies eine wissenschaftliche Sensation. Daraufhin begannen umfangreiche genetische und gentechnische Untersuchungen der RNA und der bis dahin bekannten Viren. Lange Zeit war unklar, dass das Virus im menschlichen Körper hauptsächlich CD4-T-Zellen befällt und damit die körpereigene Immunabwehr ausschaltet. Mit dem fortschreitenden Wissen über die molekularbiologischen Abläufe innerhalb einer vom HI-Virus befallenen Zelle wurden neue innovative Ansätze zum Auffinden antiviraler Wirkstoffe gesucht. Die Vorgehensweise war dadurch geprägt, dass man versuchte, wenig selektiv wirkende Agenzien durch chemische Strukturveränderungen zu verbessern. Erste Ergebnisse konnten durch die Synthese von speziell modifizierten Verbindungen auf der Basis natürlich vorkommender Nukleoside erzielt werden. Die heute sehr gut etablierten Methoden zur Sequenzierung der viralen Erbinformation und zur Strukturaufklärung viruscodierter Enzyme, sowie neue Erkenntnisse der Molekulargenetik erlauben inzwischen, die Angriffspunkte antiviraler Substanzen gezielt zu analysieren. Zusammen mit dem Wissen über die Pathogenese der entsprechenden Virusinfektion ist somit die Basis für die zielorientierte Entwicklung optimal angepasster, inhibitorisch wirkender Antimetabolite und zugleich für das Design von Virostatika, gelegt. So ist heute bekannt, dass sich in einer Zelle weitaus mehr RNA als DNA befindet. Aufgrund ihrer Funktion und ihres Vorkommens innerhalb der Zelle unterscheidet man mehrere Klassen von RNA. Häufig wird die RNA durch Proteine fixiert, die zur Stabilisierung und zum Transport der RNA dienen. Im Gegensatz zur DNA kann die RNA durch Faltung sekundäre und tertiäre Strukturmuster ausbilden. Bei vielen Viren, besonders bei den humanpathogenen Viren, spielen RNA-Protein-Wechselwirkungen eine entscheidende Rolle bei ihrer Replikation. Durch intensive Studien des HI-Virus konnte gezeigt werden, dass die Virusreplikation essenziell von Wechselwirkungen der RNA mit Proteinen abhängt^[8]. Die TAR-RNA (TAR = trans-activation-response) ist an den 5'-Enden aller viralen mRNA-Stränge lokalisiert. Unter einer mRNA ver-

steht man eine RNA-Kopie eines zu einem Gen gehörigen Teilabschnittes der DNA. Hier liegen die RNA-Moleküle in einer besonders ausgeprägten Sekundärstruktur vor und bilden beim HIV-1 über die ersten 59 Nucleotide eine teilweise doppelsträngige RNA-Haarnadelschleife aus. Durch die Bindung der TAR-RNA an die Tat-Proteine (Tat = Transactivator of transcription) wird die Transkription vom LTR-Promotor (LTR = long terminal repeats) ausgehend aktiviert, und um mehr als das Hundertfache verstärkt. Die hohe Mutationsrate bei der Virusreplikation und die damit verbundene Ausbildung von Resistenzen gegen die bestehenden antiviralen Wirkstoffe erfordert die zielorientierte Suche nach neuen Substanzen, die an einer Stelle im Zyklus die Neubildung von Viruspartikeln stören oder verhindern. Die TAR-RNA bietet sich als Target für neue Wirkstoffe an, da diese Struktur sehr konserviert und explizit untersucht ist. Ein Ansatz zur Bekämpfung von HIV/Aids geht von der Inhibierung der Tat-TAR-Wechselwirkungen aus. So konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass eine Konformationsänderung der TAR-RNA durch Wechselwirkungen mit Arginin oder Guanidin hervorgerufen werden kann^[9-11]. Bei der Entwicklung neuer Medikamente gegen das Virus wurden in den letzten Jahren sehr große Fortschritte gemacht, da mittlerweile der Replikationszyklus des Virus und die molekularen Vorgänge in einer infizierten Zelle sehr gut verstanden sind. Im Rahmen dieser Arbeit sollte durch strukturbasiertes Design der Zugang zu einer neuen Substanzklasse potenzieller TAR-RNA-Liganden untersucht werden. Die Liganden sollten eine hohe Affinität zur TAR-RNA haben und somit die Wechselwirkungen von Tat-TAR inhibieren. Basierend auf biochemischen Experimenten und NMR-spektroskopischen Untersuchungen war ein erster Ansatz zur Beschreibung der Bindungsverhältnisse der TAR-RNA an das Tat-Protein, das „Arginin-fork-Modell“^[12]. Bevor die TAR-RNA genauer untersucht war, ging man davon aus, dass Arginin in der Lage war, gleichzeitig Wasserstoffbrückenbindungen mit Guanosin-26, und den negativ geladenen Phosphaten P(22) und P(23) auszubilden (Bild **A** in **Abbildung 2**). Kurze Zeit später konnten Williamson et al.^[13] durch NMR-Spektroskopie zeigen, dass eine Konformationsänderung der RNA durch Wechselwirkung mit Arginin induziert wird. Der Arbeitsgruppe um G. Varani gelang es, das bisher als gültig angenommene „Arginin-fork-Modell“ zu widerlegen^[14]. Demnach ist eine Bindung entweder zu G(26) (Bild **B** in **Abbildung 2**) oder zu den Phosphaten P(22) und P(23) (Bild **C** in **Abbildung 2**) möglich. Die TAR-RNA ist eine sehr konservierte Struktur und bietet kleinen heterozyklischen und peptidischen Verbindungen ein gutes Angriffsziel. Aufgrund dieser Überlegungen wurden in unserer Arbeitsgruppe guanidinanaloge Verbindungen synthetisiert, die

rer Arbeitsgruppe guanidinanalogue Verbindungen synthetisiert, die durch Überlagerungen von zwei Guanidiniumgruppen kleine heterozyklische Verbindungen, wie beispielsweise Derivate des 3,5-Diamino-1H-pyrazols, ergaben (Bild **D** in **Abbildung 2**). Diese Verbindungen sollten eine hohe Affinität zur TAR-RNA besitzen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Derivate des 3,5-Diamino-1H-pyrazols synthetisiert und als potenzielle RNA-Liganden getestet.

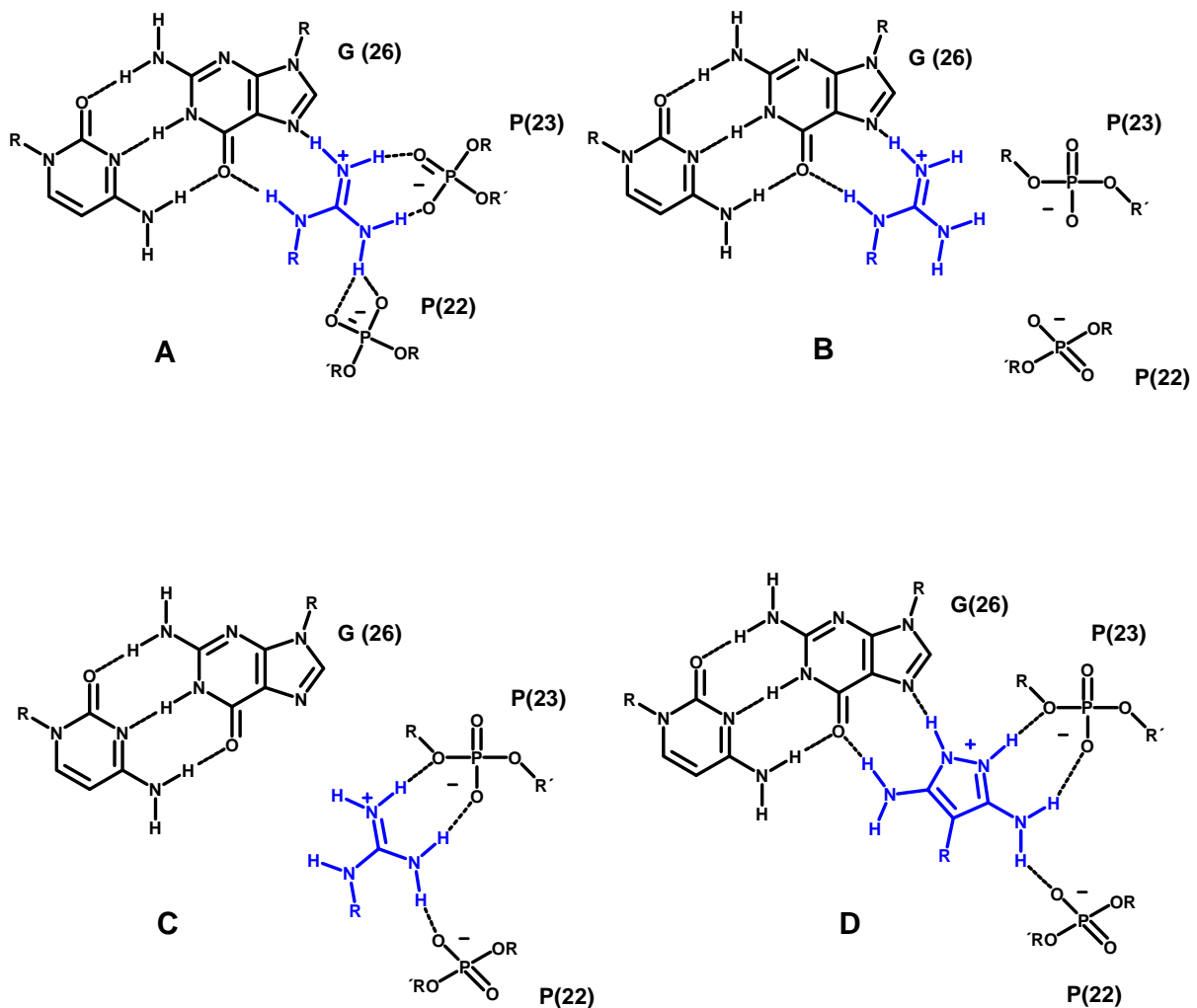


Abbildung 2: Arginin-Fork-Modell zur Beschreibung der Wechselwirkungen eines Arginins mit G(26), P(22) und P(23) (**A**), Abstandsmessungen mittels NMR zeigten, dass eine Bindung nur entweder zu G(26) (**B**) oder den Phosphaten P(22) und P(23) möglich ist (**C**). Bild **D** zeigt das Bindungsmodell des 3,5-Diaminopyrazols

2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Ausarbeitung eines Syntheseweges zur Herstellung von 1H-Pyrazol-3,4,5-triamin. Wie eingangs schon erwähnt, sollte diese Verbindung in der Lage sein, sowohl zu den Phosphaten P (22) und P (23), als auch zu der Base G 26 Wasserstoffbrücken auszubilden. Nach erfolgter Synthese sollte, je nach gemessener Bindungsaffinität versucht werden, das Grundgerüst des 1H-Pyrazol-3,4,5-triamins in größere, planare Struktur motive zu integrieren. Dabei sollte der zu Beginn vorhandene heterozyklische Fünfring sukzessive um einen aromatischen Ring erweitert werden. Durch die Strukturaufweitung sollte untersucht werden, ob zusätzlich noch Wasserstoffbrückenbindungen zur Base C 39 ausgebildet werden können, was eine zusätzliche Stabilisierung und Fixierung der entsprechenden Verbindung in der Bindungstasche der RNA und eine damit einhergehende Stabilisierung des negativen Phosphodiesterückgrates zur Folge haben sollte. Im Nachfolgenden ist das Bindungsmodell der einzelnen Strukturen nochmals dargestellt.

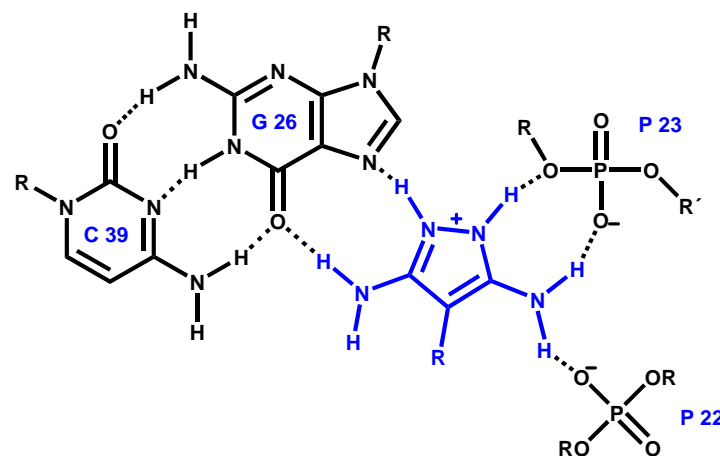


Abbildung 3: Postuliertes Bindungsmodell der Verbindung 57 (R = H) an die TAR-RNA

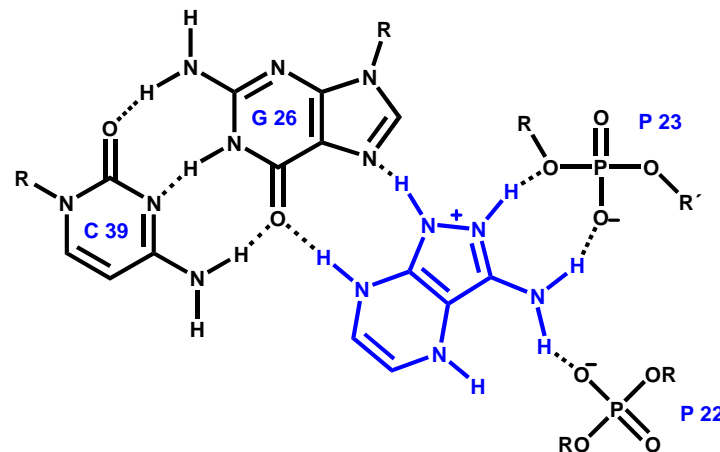


Abbildung 4: Postuliertes Bindungsmodell für die reduzierte Verbindung 76

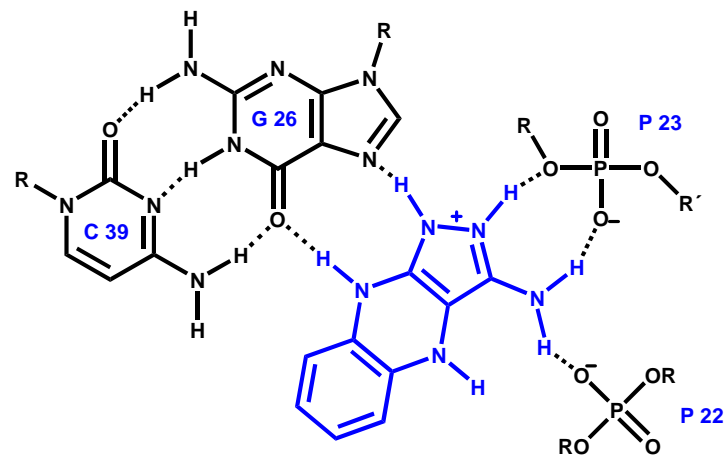


Abbildung 5: Postuliertes Bindungsmodell des reduzierten Phenazinderivates 112

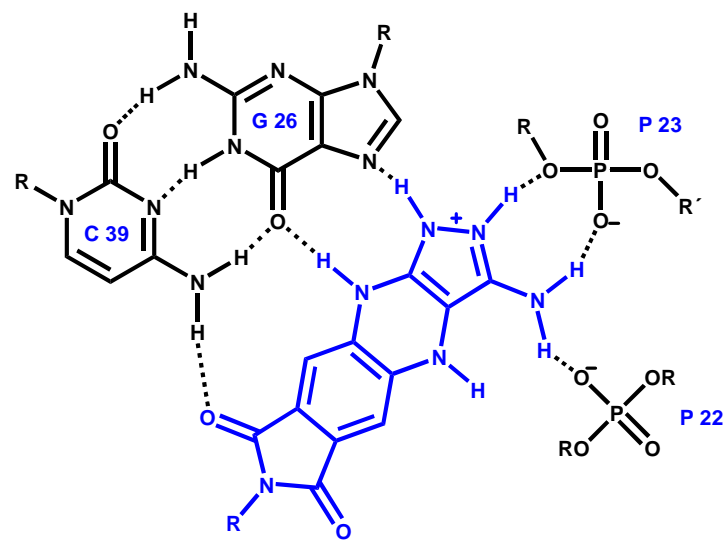


Abbildung 6: Bindungsmodell bei der Einführung eines weiteren H-Brücken-Akzeptors in Form einer Carbonylgruppe 151

3 HIV

3.1 Genereller Aufbau eines HI-Virus

Das HI-Virus weist eine konische Form auf und gehört mit einer Größe von etwa 100 nm zu den mittelgroßen Viren. Es gehört zur Familie der exogenen Retroviren, es ist also in der Lage, mithilfe der reversen Transkriptase das virale RNA-Genom in DNA umzuschreiben, und trägt gleichzeitig in seinem Genom alle Informationen, die für den Ablauf eines Infektionszyklus mit erfolgreicher Freisetzung neuer, hochinfektöser Viruspartikel relevant sind. Sämtliche bekannten Retroviren lassen sich nochmals in sieben Unterklassen, nämlich in die α -, β -, γ -, δ -, ϵ -Retroviren sowie in die Lentiviren und Spumaviren unterteilen. Die Klassifizierung erfolgte aufgrund morphologischer und genetischer Unterschiede. HIV-1 und HIV-2 gehören in die Unterklasse der Lentiviren. Das Kapsid liegt im Inneren des Viruspartikels und umschließt zwei identische, einzelsträngige RNA-Moleküle, die weder kovalent, noch durch Basenpaarung miteinander verbunden sind. Dieses diploide Genom liegt im Komplex mit den Nucleokapsidproteinen (p7) vor und weist Charakteristika einer zellulären mRNA auf. Das HIV-Genom hat eine Größe von etwa neun Kilobasen (kB) und besteht aus neun Genen, die alle für diverse Proteine codieren. Zu den drei Strukturgenen pol, env und gag, die alle Retroviren enthalten, kommen sechs Regulationsgene, die Informationen für regulatorische Proteine enthalten und den Replikationszyklus steuern. Zusätzlich enthält das Kapsid noch drei für das Virus essenzielle Enzyme, die wichtige Funktionen in seinem Lebenszyklus übernehmen. Es sind dies die Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR). Gebildet wird das Kapsid, auch Core genannt, aus Kapsidproteinen (p24). Es ist von einer Hüllmembran umgeben, die sich von der Zytoplasmamembran ableitet. Die Innenseite der Membran wird von einer Schicht von Matrixproteinen (p17) ausgekleidet. Mit der Hüllmembran assoziiert sind zwei Glykoproteine, von denen eines als transmembranes Protein (TP) über eine etwa 20 hydrophobe Aminosäuren große Region verankert ist. Das andere Protein, auch externes Glykoprotein (EP) genannt, ist nichtkovalent mit dem außerhalb der Membran gelegenen Teil des transmembranen Proteins verbunden. Man bezeichnet den externen auch als aminoterminalen, den transmembranen auch als carboxyterminalen Anteil. Beide werden als gemeinsame Vorläuferproteine bei der Virusreplikation gebildet. Sowohl die Bildung, als auch die Spaltung der beiden

Anteile erfolgt im Laufe der Virusmorphogenese durch eine mit dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgiapparat verbundene Protease. Beim HIV-1 haben die durch diverse Zuckergruppen modifizierten Formen der externen und transmembranen Proteine Molekulargewichte von 120 kD (gp120) beziehungsweise 41 kD (gp41). In den folgenden Abschnitten soll auf den Aufbau und die Funktion der einzelnen Virusbestandteile noch genauer eingegangen werden.

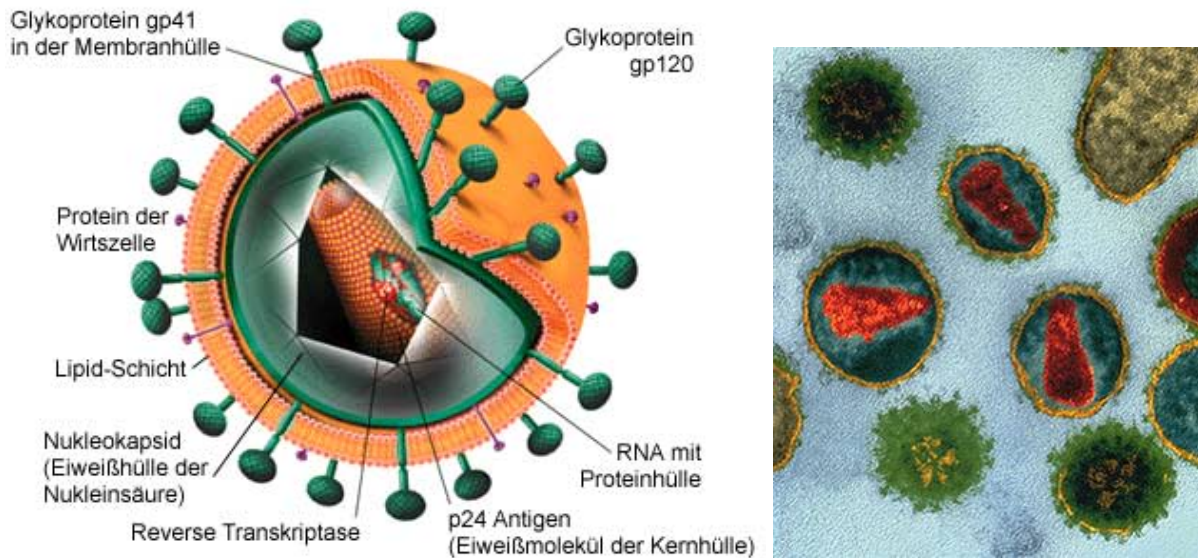


Abbildung 7: HIV-1-Partikel im Querschnitt^[15] und elektronenmikroskopische Aufnahme des Virus^[16]

Tabelle 1: Eigenschaften und Funktion der HIV-1-Proteine

Protein	Bezeichnung	Merkmale/Funktion
Vpu , p14/16	viral protein out	Abbau von CD4-Rezeptoren, Förderung der Freisetzung von Nachkommenviren
Vpr , p11/15	viral protein rapid	Transport des PIK (PIK = Pre-Integrationskomplex) in den Zellkern, Beschleunigung der Virusreplikation durch Infektion von T-Zellen
Vif , p23	viral infectivity factor	Infektion von peripheren Blutlymphozyten, Steigerung der Infektiosität der Nachkommenviren
Rev , p19	Regulator of expression of virion proteins	Bindung an RRE, Transport von ungespleißter oder einfach gespleißter mRNA aus dem Kern

Fortsetzung von Tabelle 1: Eigenschaften und Funktion der HIV-1-Proteine

Nef , p25/27	negative factor	Eingriff in virale Signalkaskaden, in vivo multiple Funktionen
Tat , p14	Transactivator of transcription	Effiziente Bildung von Transkripten durch Bindung an TAR, Aktivierung des 5'LTR
Gag-Pol , pr160	Group specific antigene polymerase	Vorläufer für gp120 und gp41
RT , p51/p66	reverse transcriptase	Umschreiben viraler RNA in provirale DNA, RNase-Aktivität, kann sowohl als RNA- als auch als DNA-abhängige Polymerase wirken
IN , p38	integrase	Integration des Virusgenoms in das Wirtsgenom
PR , p9	protease	Spaltung von Gag/Pol und Gag in die Einzelkomponenten
Gag , pr55	Group specific antigene	Myristyliert, Bildung virusähnlicher Partikel
MA , p17	matrix	Virusstruktur, ist im PIK enthalten
CA , p24	capsid	Strukturprotein des konischen Kapsids
NC , p7	Nucleic capsid	Eiweißhülle der Nukleinsäure
LI , p6	link protein	Verbindung zwischen Capsid und Membran

3.2 Membranproteine

Das env-Gen des HIV-1 codiert für die beiden Glycoproteine gp120 und gp41. Dabei gehen beide Proteine aus einem gemeinsamen Vorläuferprodukt, dem gp160 hervor. Eine einfach gespleißte mRNA übernimmt die Translation, wobei die Sequenzen für das externe Protein gp120 in der Nähe der aminoterminalen Domäne zu finden sind. Mittels einer aminoterminalen Signalsequenz erfolgt die Translation des Proteins an der Membran des endoplasmatischen Retikulums. Anschließend erfolgt die Durchschleusung der Aminosäurekette in das Lumen. Es gibt Hinweise darauf, dass die translatierten Proteine als trimere Komplexe vorliegen und durch eine am Golgiapparat assoziierte und HIV spezifische Furinprotease in den externen und den transmembranen Teil gespalten werden. Das externe gp120 weist sowohl in seinem Aufbau, als auch in seiner Struktur noch einige Besonderheiten auf, die für die Adsorption der Viruspartikel an zelluläre Oberflächen essenziell sind.

Besonders auffällig ist die extrem hohe Variabilität des gp120 in den Bereichen V1 bis V5. Die V-Regionen alternieren mit strukturell ziemlich hoch konservierten C-Bereichen (C1 bis C6). Die flexiblen V-Regionen unterscheiden sich zum einen durch ein unterschiedliches Glykosylierungsmuster der N-glycosidisch gebundenen Zuckergruppen an die Aminosäuren, zum anderen aber auch durch eine signifikant unterschiedliche Abfolge der einzelnen Aminosäuren bei verschiedenen HIV-Isolaten. Die V3-Domäne weist unter den variablen Bereichen des gp120 noch die Besonderheit auf, dass sie nicht glykosyliert ist. Sie ist etwa 30 bis 35 Aminosäuren lang und wird von Cysteinresten flankiert, die eine Disulfidbrücke ausbilden und dadurch die Bildung einer oberflächenexponierten V3-Proteinschleife induzieren. Innerhalb ihres Zentrums ist eine bei nahezu allen HIV-Isolaten konservierte Aminosäureabfolge aus den Aminosäuren Glycin-Prolin-Glycin-Arginin zu finden, die eine stabile β -Turn-Struktur bilden. Wozu diese Sequenz genau dient und warum sie so stabil ist, ist noch unklar. Die Membranproteine des HI-Virus haben während des Infektionsverlaufs verschiedene Aufgaben, die man bestimmten Domänen zuordnen kann. Die einzelnen Aufgaben und Funktionen werden im Replikationszyklus erläutert.

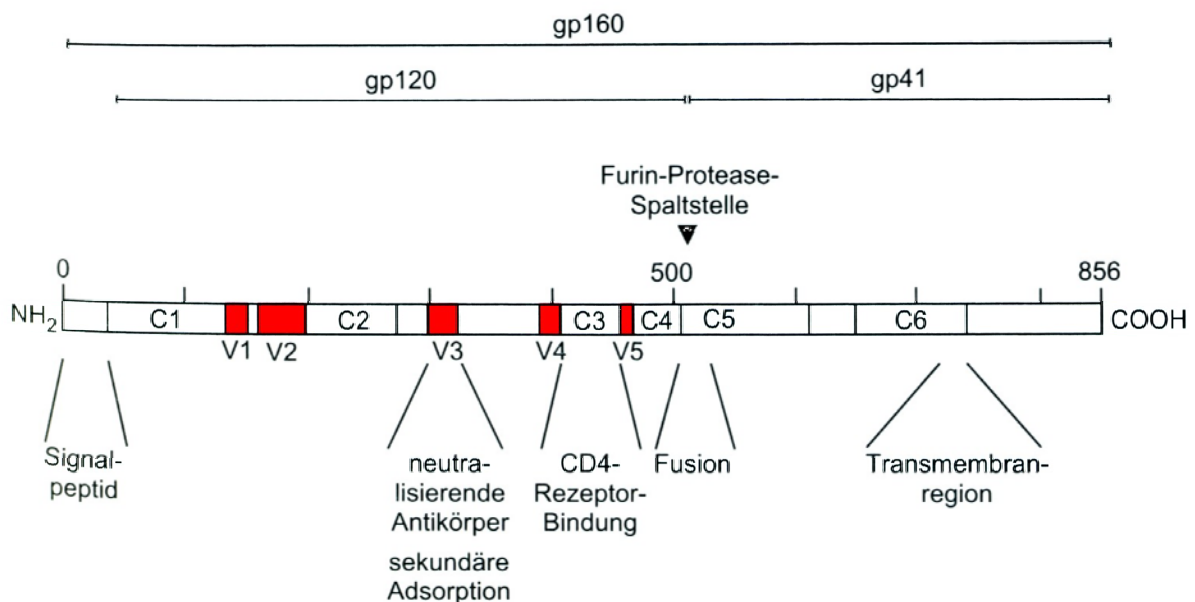


Abbildung 8: Membranproteine des HIV-1^[17]

3.3 Tat-Proteine

Tat-Proteine konnten als virale Bestandteile bisher nur bei den Lentiviren identifiziert werden. Beim HIV-1 können die Proteine aus 86 bis 104 Aminosäuren aufgebaut sein, wobei ihre Molekulargewichte zwischen neun und 14 kD variieren. Während des viralen Replikationszyklus sind es die Proteine, die sehr früh synthetisiert werden, da sie sowohl für die Genexpression des Virus, als auch für seine Replikation und Pathogenese von entscheidender Bedeutung sind. Die Tat-Proteine werden beim HIV-1 von zwei Exons codiert, wobei auch hier eine große Variabilität besteht und daher Sequenzen auftreten, bei denen eventuell das zweite Exon fehlen kann. Alternativ dazu findet man tev-Proteine, welche in der Lage sind, durch alternative Spleißmechanismen das erste Exon von Tat mit verschiedenen Abschnitten der env- und Rev-Gene zu verknüpfen (tev = Tat, env, Rev). Die Tat-Proteine besitzen große Bedeutung als Transaktivatoren der viralen Replikation. Man vermutet, dass sie am aminoterminalen Ende des ersten Exons lokalisiert sind, das sich nochmals in fünf Segmente unterteilen lässt. Dem aminoterminalen Ende, das je nach Virus eine unterschiedliche Länge aufweisen kann und eine sehr konservierte Struktur aus sauren Aminosäuren besitzt, folgt eine aus etwa 15 Aminosäuren bestehende, cysteinreiche Domäne, die an Zn^{2+} -Ionen binden kann. Anschließend folgt eine etwa zehn Aminosäuren umfassende Kernregion. Der nachfolgende Abschnitt zeichnet sich durch einen hohen Anteil an basischen Aminosäuren aus, die sowohl den Transport des Tat-Proteins in den Kern, als auch die Bindung an die RNA regulatorisch beeinflussen. Man vermutet, dass die transkriptionsverstärkende Wirkung des Tat-Proteins auch durch die am carboxyterminalen Ende des ersten Exons lokalisierten Aminosäuren hervorgerufen wird. Die genaue Funktion der im zweiten Exon codierten Aminosäuren ist noch unklar.

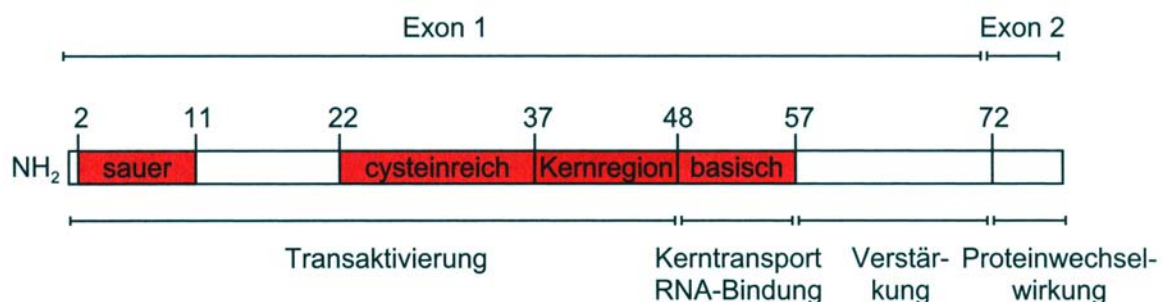


Abbildung 9: Tat-Peptid mit verschiedenen Proteindomänen^[17]

3.4 Replikationszyklus des HIV-1

3.4.1 Integration des viralen Genoms in das Genom der infizierten Zelle

Zu Beginn des Replikationszyklus des HIV-1 adsorbiert das Viruspartikel mittels des glykosylierten viralen Oberflächenproteins gp120 an den Zielzellenrezeptor CD4. Die Bindung des HIV-1 an die Wirtszellen erfolgt wahrscheinlich über die strukturell sehr konservierte Domäne C3, die in der Nähe des carboxyterminalen Endes von gp120 lokalisiert ist. CD4 ist ein etwa 55 kD schweres Protein aus der Immunglobulinsuperfamilie. Es besteht aus vier extrazellulären, immunglobulinähnlichen Domänen. Der aminoterminal Bereich zeigt strukturell sehr große Ähnlichkeiten mit den complementarity-determining-regions (CDR) der Immunglobuline. Durch bestimmte konformationelle Änderungen des gp120 wird eine Bindung an den entsprechenden Chemokin-Korezeptor (CXCR4 auf T-Lymphozyten oder CCR5 auf Makrophagen) erleichtert und eine Verschmelzung von viraler und zellulärer Membran erreicht. Nach der Membranfusion erfolgt ein sogenannter *uncoating*-Prozess, bei dem das Kapsid neben den beiden einzelsträngigen RNA-Genomen auch die Proteine Integrase (IN), Matrix (MA), Reverse Transkriptase (RT) und einige andere zelluläre Proteine, die zur Stabilisierung des Komplexes dienen, ins Zytoplasma freigesetzt. Auf dem Transportweg vom Zellplasma in den Zellkern, der durch das Vpr-Protein und andere zelluläre Faktoren übernommen wird, erfolgt durch die Reverse Transkriptase das Umschreiben der viralen RNA in doppelsträngige DNA (cDNA), an deren Enden sich LTR-Regionen (LTR = long terminal repeats) befinden. Das nun in eine doppelsträngige DNA überführte Virusgenom bleibt als Teil eines Pre-Integrationskomplexes auch auf dem Weg vom Zellplasma in den Zellkern weiterhin mit den viralen Proteinen verbunden. Anschließend übernehmen die Integrase (IN) sowie andere Proteine die Neuorganisation der Virusbestandteile und die Integration des DNA-Doppelstranges in das Genom der Wirtszelle. Nur wenn das Virusgenom vollständig integriert wurde, ist eine erfolgreiche Genexpression möglich.

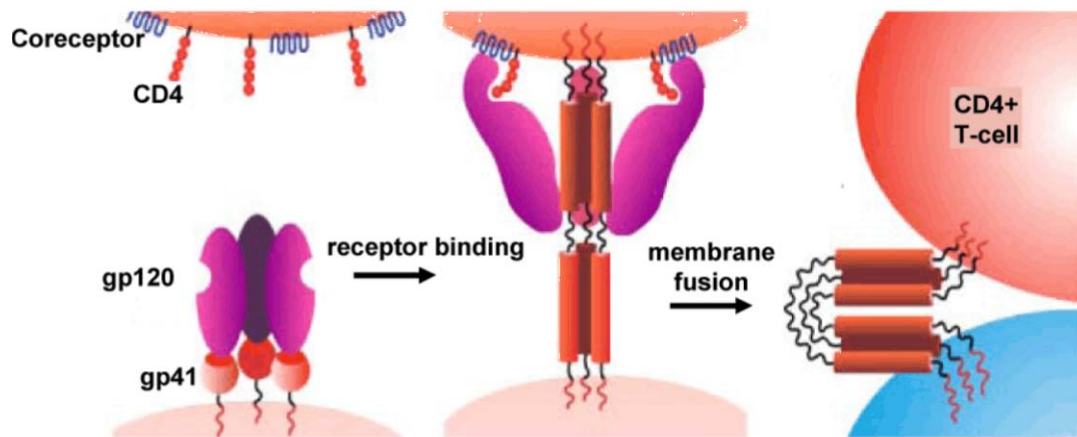


Abbildung 10: Schematische Darstellung der HIV-1-env-vermittelten Membranfusion^[18]

3.4.2 Frühe Phase der Replikation und Expression viraler Regulationsgene

Von den LTR-Regionen (LTR = long terminal repeats), die nach der Integration in die Wirtszelle als eukariotischer Promotor dienen, wird durch die zelluläre RNA-Polymerase II die Transkription ermöglicht. Beim HIV-1 spielen die Proteine NFκB und Sp1 eine wichtige Rolle. Bei ausreichender Konzentration dieser zellulären Faktoren, die zusätzlich nach Stimulierung der infizierten T-Lymphozyten durch das Immunsystem aktiviert werden, wird eine Transkription initiiert, die jedoch oft nach den TAR-Sequenzen wieder abbricht. Während dieser frühen Phase der Gen-Expression bindet das Tat-Protein an das in einer ausgeprägten Sekundärstruktur vorliegende TAR-Element. Dadurch wird eine vollständige und effiziente Elongation des viralen Genoms ermöglicht. Das Heterodimer, bestehend aus CDK9 und Cyclin T1, lagert sich in dieser Replikationsphase an den Tat-TAR-Komplex an. Dies gewährleistet eine effiziente und vollständige Elongation der viralen Transkripte^[19]. Desweiteren zeichnet sich die Bildung des Tat-TAR-Komplexes durch eine drastische Erhöhung der viralen Transkriptionsrate aus. Nachfolgend ist die aktivierende Wirkung des Tat-Peptides schematisch dargestellt (**Abbildung 11**).

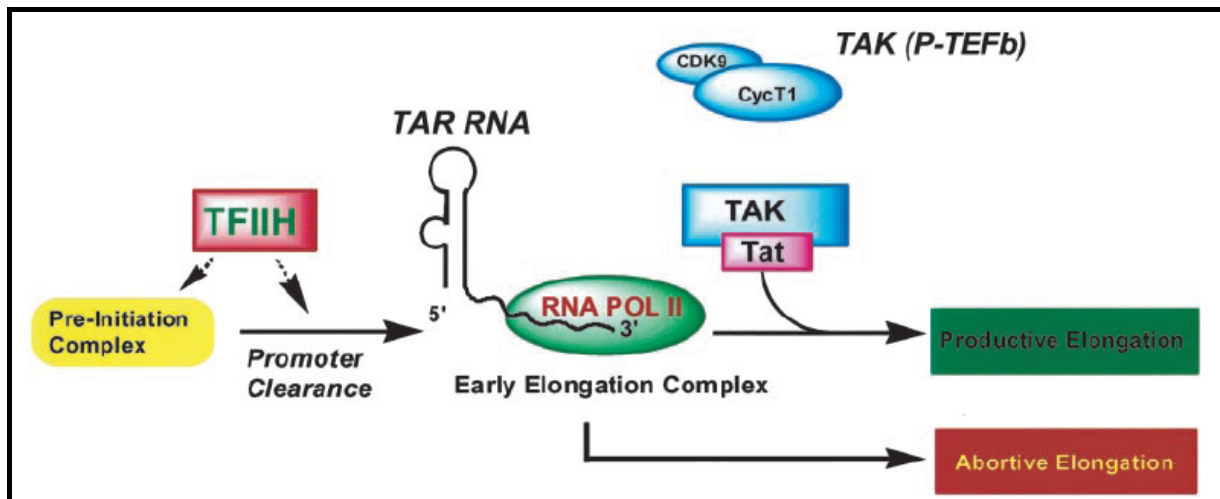


Abbildung 11: Mechanismus der Transkriptionsaktivierung durch das Tat-Peptid^[19].

Durch die Kinase TFIIH wird der virale Promotor vom Pre-Initiationskomplex gelöst. Durch die menschliche RNA-Polymerase II wird die virale Transkription eingeleitet. Das Tat-Protein, das an den P-TEFb-Kinase-Komplex, bestehend aus CDK9 und CycT1, anelliert ist, bindet über die CycT1-Komponente an die TAR-RNA. Anschließende Phosphorylierung der einzelnen Transkripte durch CDK9 führt zu einer effizienten und beschleunigten viralen Transkription. In Abwesenheit des Tat-Proteins findet eine unvollständige und sehr langsame Transkription statt.

Es wird angenommen, dass diese Interaktionen zu einer Konformationsänderung des Tat-TAR-Komplexes führen. Nach Aktivierung der Polymerase II durch Phosphorylierung resultiert daraus eine gesteigerte Transkriptionsrate. In dieser Phase werden mehrfach gespleißte mRNAs in das Zytoplasma transportiert und bilden dort die Regulationsproteine Nef, Rev und Tat. Das Rev-Protein dient dem Virus als zellulärer Exportfaktor. Sobald im Zellkern eine kritische Konzentration viraler Replikationsprodukte erreicht ist, bindet es an das RRE-Element (RRE = Rev response element) sowohl der einfach, als auch der nicht-gespleißten mRNA-Spezies und ermöglicht so den Transport ins Zytoplasma, wo sie translatiert oder als RNA-Genome in die entsprechenden Viruspartikel verpackt werden. Durch das verminderte Spleißen wird die Translationsrate der frühen Genprodukte sehr eingeschränkt. Gleichzeitig fungiert das Rev-Protein als molekularer Schalter zwischen der frühen und der späten Phase der Virusreplikation. Dieses sehr früh exprimierte Protein rev beeinflusst die Anteile und das Gleichgewicht zwischen regulatorischen Proteinen und Strukturproteinen, indem es die Expression struktureller Gene aktiviert und die Bildung regulatorischer Proteine hemmt. Somit wird die Ausreifung neuer, infektiöser Viruspartikel begünstigt. Es ist für die Expression der späten Genprodukte ein essenzieller Bestandteil des Virus.

3.4.3 Späte Phase der Replikation und Expression der Strukturproteine mit anschließender Freisetzung infektiöser Partikel

Die HIV-1-Gene gag und pol codieren für die Vorläuferproteine pr55 (Gag) und pr160 (Gag/Pol), die das Virus zur Synthese der env-Proteine an der Membran des endoplasmatischen Retikulums benötigt. Über die aminoternale Domäne, die als Signalpeptid wirkt, wird ein Signalerkennungspartikel (signal-recognition-particle) gebunden. Sobald die Ketten eine bestimmte Länge erreichen, werden sie durch die Membran des endoplasmatischen Retikulums geschleußt und dort mittels einer hydrophoben Region im carboxyterminalen Bereich verankert. Nach Glykosylierungsreaktionen an Asparaginresten wird das gp160-Vorläuferprotein über den Golgiapparat zur Zelloberfläche transportiert, wo es durch die Protease Furin in die beiden aktiven Spezies gp120 (externer Teil) und gp41 (transmembraner Teil) gespalten wird. Dabei verhindert die Aktivität des Vpu-Proteins, welches ebenfalls an der Zellmembran des endoplasamtischen Retikulums gebunden ist, dass die viralen Glykoproteine vorzeitig mit den CD4-Rezeptoren wechselwirken. An freien Ribosomen im Zytoplasma werden die übrigen Virusbestandteile translatiert. Die Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine werden während der Synthese am N-terminalen Ende myristyliert und mithilfe zellulärer Transportproteine zur Zellmembran dirigiert, an die sie sich anlagern. Hier findet die Virusmorphogenese statt. Dabei binden sich RNA-Dimere über das Verpackungssignal ψ an die Zinkfingerstruktur der Nucleokapsidproteine in den Gag und Gag/Pol-Vorläuferprodukten. Treten diese RNA-Moleküle mit der Membranoberfläche in Kontakt, stülpen sich diese Membranbereiche an der Oberfläche aus und bilden Vesikel, die sich abschnüren. Innerhalb dieser noch unreifen Vesikel findet man eine sehr hohe Konzentration der Gag und Gag/Pol-Vorläuferproteine, die dann in einem autokatalytischen Schritt herausgelöst werden. Anschließend werden durch die virale Protease die Gag und Gag/Pol-Vorläufer in die Matrix- (MA, p17), Kapsid- (CA, p24), Nucleokapsid- (NC, p7), Link-(LI, p6) Proteine sowie in die Reverse Transkriptase und die Integrase sezerniert. Nach strukturbedingten Umlagerungen, der Translation einiger akzessorischer Proteine und Ausbildung des konischen Kapsids werden die Viruspartikel infektiös. Nachfolgende Abbildung zeigt schematisch den Lebenszyklus des HI-Virus (**Abbildung 12**).

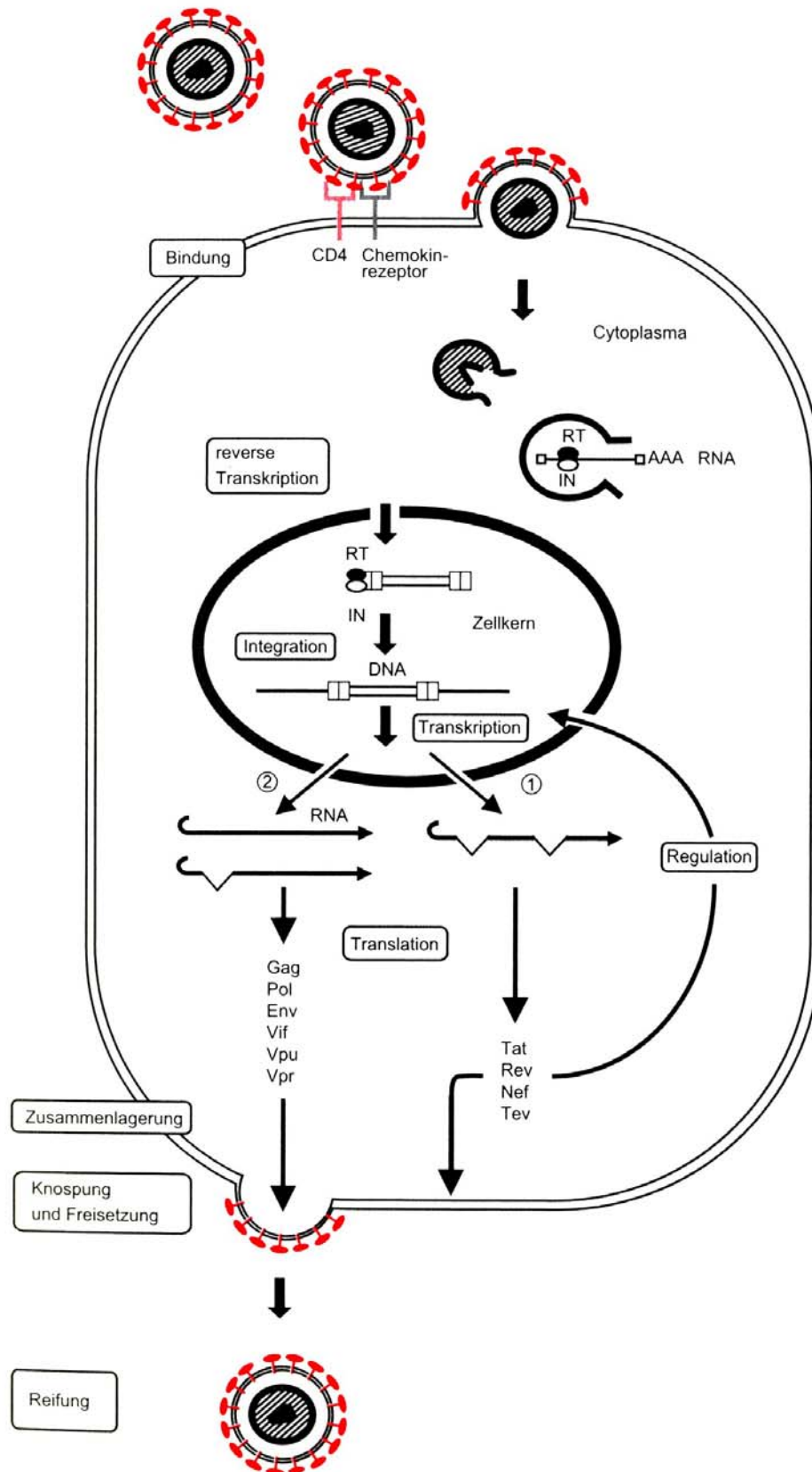


Abbildung 12: Replikationszyklus des HI-Virus^[17]

3.4.4 Die akzessorischen Proteine

Das **Vif**-Protein (Vif = viral infectivity factor) wird von einer einfach gespleißten mRNA translatiert und besitzt beim HIV-1 eine Länge von 192 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 23 kD. Das Vif-Protein ist bei den Lentiviren zwischen den pol- und env-Genen lokalisiert und ein mit der RNA assoziierter Bestandteil des Nucleoproteinkomplexes der bereits infektiösen Partikel. Das Vif-Protein beeinflusst die Infektiosität der neu gebildeten Viren. Die genaue Funktion des **Vpu**-Proteins (Vpu = viral protein out) ist noch nicht eindeutig geklärt. Man nimmt jedoch an, dass es für eine effiziente Virusproduktion verantwortlich ist. Die Translation des Vpu-Proteins wird von einer bicistronischen mRNA übernommen, die ebenfalls die Sequenzen für die env-Proteine enthält. Das Vpu-Protein des HIV-1 besitzt ein Molekulargewicht von 16 kD und eine 80 bis 82 Aminosäuren lange Kette. Das Vpu-Protein geht während des Infektionsprozesses eine Bindung mit der zytoplasmatischen Domäne des CD4-Rezeptors ein und fördert durch eine Ubiquitylierung seine Zersetzung. Dadurch kann der Transportfluss von env-Glykoproteinen zur Plasmamembran erhöht werden. Es gibt Hinweise darauf, dass das Vpu-Protein auch die Funktion eines Ionenkanals für das Virus übernimmt. Welche Auswirkungen sich daraus für den Infektionszyklus ergeben ist noch nicht geklärt. Das ebenfalls von einer einfach gespleißten mRNA translatierte **Vpr**-Protein (Vpr = viral protein rapid) kommt nahezu in allen Lentiviren vor. Es hat Molekulargewichte zwischen 11 und 15 kD und eine zwischen 78 und 96 Aminosäuren lange Kette. Die Hauptaufgabe des Vpr-Proteins besteht vermutlich in dem Transport des Pre-Integrationskomplexes in den Zellkern und der Beschleunigung der Virusreplikation durch vermehrte Infektion der T-Zellen.

Das **Nef**-Protein (Nef = negative factor) wird sehr früh während der Infektion gebildet. Seine Proteinkette besteht aus etwa 206 Aminosäuren, und es hat ein Molekulargewicht von etwa 25 bis 27 kD beim HIV-1. Das Nef-Protein kann beim Infektionszyklus in zelluläre Signalkaskaden eingreifen und durch die Expression von NFκB, AP-1 und NF-AT die virale Replikation erhöhen. Weiterhin ist das Nef-Protein an einer Herunterregulierung der MHC-Klasse I Proteine und einem Abbau der CD4-Rezeptoren beteiligt, wodurch die Virusvermehrung begünstigt wird. Alle akzessorischen Proteine besitzen eine wichtige Funktion für die Virulenz *in vivo*.

3.4.5 Antiretrovirale Medikamente und Angriffsziele zur Behandlung von HIV

In den letzten 25 Jahren wurden in keinem Forschungsgebiet der medizinischen Chemie so große Fortschritte erzielt, wie bei der Entwicklung neuer Medikamente gegen die Immunschwächekrankheit HIV/Aids. Seit der erstmaligen Markteinführung von Retrovir[®] im Jahre 1987 ist die Zahl der Medikamente zur Behandlung von HIV/Aids auf über 20 angewachsen. Nachdem man den Aufbau des Virus und seinen Replikationszyklus intensiver untersucht hatte, gelang die Entwicklung verschiedener Medikamente mit unterschiedlichen Angriffspunkten im viralen Replikationsprozess. Momentan stehen etwa 20 verschiedene Substanzen zur HIV/Aids-Behandlung zur Verfügung, die entweder einzeln, oder in sogenannten Kombinationstherapien verabreicht werden (HAAR-Therapien = Highly Active Anti-Retroviral-Therapy). Bei dieser 1996 eingeführten Therapieform werden mindestens drei antiretrovirale Medikamente verabreicht. Man kann diese Verbindungen in vier Wirkstoffklassen einteilen: Nukleosidanaloga und Nukleotidanaloga (NRTIs) zur Inhibierung der Reversen Transkriptase, Nicht-Nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTIs), Proteaseinhibitoren (PIs), und der Fusionshemmer T-20. Untersuchungsergebnisse zeigen, dass die besten Ergebnisse bei der Anwendung von zwei Nukleosidanaloga und einem Proteasehemmer erzielt werden. Ein großes Problem bei der Behandlung der Aids-Patienten mit den verschiedenen Medikamenten ist zum einen die Resistenzentwicklung des Virus gegen einen oder eventuell sogar gegen alle Wirkstoffe, die in der Therapie eingesetzt werden, zum anderen aber die immer noch sehr massiven Nebenwirkungen der Substanzen auf den Organismus des Betroffenen, sodass die Gabe der Kombinationspräparate nach relativ kurzer Zeit ineffektiv wird, oder gestoppt werden muss. Diese Tatsache erfordert dringend die Neuentwicklung von weiteren Wirkstoffen. Zurzeit wird intensiv an neuen Substanzklassen, als auch an neuen Wirkorten zur Einbringung der Medikamente in den viralen Replikationszyklus geforscht. Man erhofft sich dadurch, den Lebenszyklus des HI-Virus an mehreren Stellen gezielt zu blockieren oder zu unterbrechen. In den nächsten Jahren ist mit der Zulassung von weiteren Präparaten und neuen Substanzen zu rechnen. Das nachfolgende Schaubild gibt einen Überblick über wichtige Angriffsziele antiretroviraler Medikamente, die momentan in klinischer Anwendung sind (**Abbildung 13**).

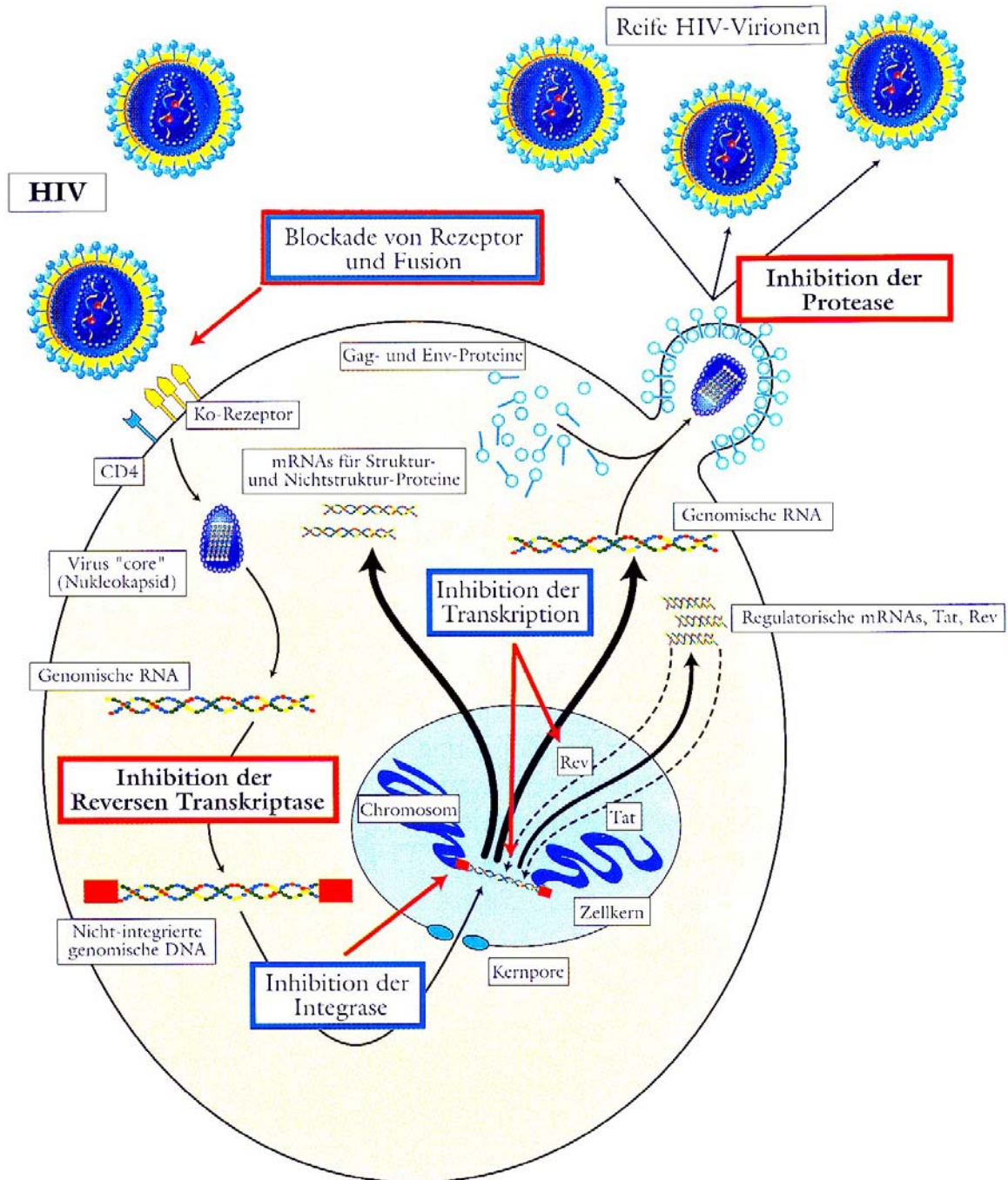


Abbildung 13: Angriffsziele von Medikamenten im Replikationszyklus des HI-Virus', die bereits klinisch eingesetzt werden (rote Umrahmung) und Ziele von Medikamenten, die in unterschiedlichen klinischen Phasen zurzeit noch getestet werden (blauer Rahmen)^[20].

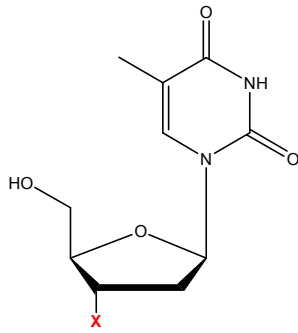
In der nachfolgenden Tabelle sind die vier Wirkstoffklassen nach ihren Angriffszielen im viralen Replikationszyklus aufgelistet.

Tabelle 2: Übersicht über die derzeit eingesetzten Medikamente in der HIV-Therapie

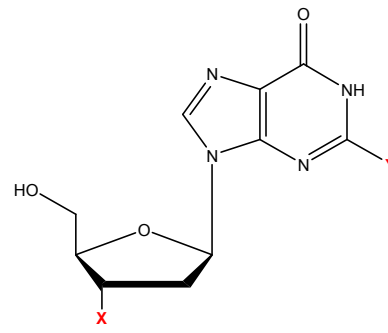
Handelsname	Abkürzung	Substanzname	Hersteller
Nukleosidische und Nukleotidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs)			
Ziagen [®]	ABC		GSK
Epivir [®]	3TC	Abacavir	GSK
Trizivir [®]	TZV	3TC, Lamivudin	GSK
Truvada [®]		AZT + 3TC + ABC	Gilead
Kivexa [®]		FTC + TDF	GSK
Retrovir [®]	AZT	3TC + ABC	GSK
HIVID [®]	DDC	AZT, Zidovudin	Roche
Videx [®]	DDI	DDC, Zalcitabin	BMS
Emtriva [®]	FTC	DDI, Didanosin	Gilead
Viread [®]	TDF	Emtricitabin	Gilead
Zerit [®]	D4T	Tenofovir	BMS
Combivir [®]	CBV	D4T, Stavudin AZT, 3TC	GSK
Nicht-Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs)			
Viramune [®]	NVP	Nevirapin	Boehringer-Ingelheim
Sustiva [®]	EFV	Efavirenz	BMS
Rescriptor [®]	DLV	Delaviridin	Pfizer
Protease-Inhibitoren (PIs)			
Viracept [®]	NFV	Nelvinavir	Roche/Pfizer
Kaletra [®]	LPV	Lipinavir/Ritonavir	Abbott
Norvir [®]	RTV	Ritonavir	Abbott
Invirase 500 [®]	SQV	Saquinavir	Roche
Crixivan [®]	IDV	Indinavir	MSD
Agenerase [®]	APV	Amprenavir	GSK
Aptivus [®]	TPV	Tipranavir	Boehringer-Ingelheim
Reyataz [®]	ATV	Atazanavir	BMS
Telzir [®]	FPV	Fosamprenavir	GSK
Prezista [®]	DRV	Darunavir	Tibotec
Fusionsinhibitoren			
Fuzeon [®]	T-20	Enfurvirtide	Roche

3.4.6 Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs)

Die Nukleosidanaloga- oder Nukleotid-analogen Verbindungen, die umgangssprachlich auch „Nukes“ genannt werden, greifen an dem Enzym Reverse Transkriptase an. Sie unterscheiden sich durch geringfügige Modifikationen von den „physiologischen Bausteinen“ und konkurrieren nach einer intrazellulären Phosphorylierung mit ihnen um den Einbau in die virale DNA-Kette (siehe **Abbildung 15**). Da bei allen modifizierten Verbindungen die 3'-OH-Gruppe am Zucker fehlt, induziert deren Einbau einen Abbruch der DNA-Kette. Daher ist die Ausbildung von zusätzlich stabilisierend wirkenden Phosphodiesterbrücken nicht möglich. Das Umschreiben der genetischen Information von RNA in DNA wird dadurch blockiert. Die „Nukes“ haben allerdings den Nachteil, dass sie gegen bereits inkorporierte Viren nicht wirksam sind. Sie können jedoch den Befall und die Infektion weiterer Zellen verhindern. Zurzeit stehen acht Reinsubstanzen zur Verfügung. Durch Kombination der Wirkstoffe untereinander soll verhindert werden, dass es zu Resistenzen kommt. Die Medikamentenkombination aus AZT und 3TC ist unter dem Handelsnamen Combivir[®] bekannt. Kivexa[®] und Trizivir[®] enthalten beide die Wirkstoffe 3TC und ABC. Zusätzlich ist in dem zweitgenannten Präparat noch AZT enthalten. Das von Gilead vertriebene Produkt Truvada[®] wird aus den Wirkstoffen FTC und TDF aufgebaut. Die einzige nukleotidanalogue Verbindung derzeit ist Tenofovir[®], die durch zwei intrazelluläre Phosphorylierungsschritte aktiviert wird. Ein entscheidender Vorteil dieser Verbindung ist die sehr gute Verträglichkeit, sowohl in der Einzeltherapie, als auch bei der Kombinationsanwendung mit anderen Substanzen. Desweiteren zeichnet sich Tenofovir[®] durch eine in der phosphorylierten Form sehr geringe Affinität zu mitochondrialen Polymerasen aus. Ein Nachteil dieses Wirkstoffs ist jedoch die potenzielle Nephrotoxizität, die sich in einer mittelstarken Nierenfunktionsstörung äußern kann. Es sind jedoch auch schon einzelne Fälle von Nierenversagen bekannt geworden. So stehen zwölf Medikamente auf der Basis von modifizierten natürlichen Bausteinen zur Inhibierung der Reverse Transkriptase zur Verfügung. Aufgrund der hohen Resistenzbildungen der Viren gegenüber den bisherigen Wirkstoffen und des doch noch sehr breiten Spektrums an Nebenwirkungen wird intensiv an der Entwicklung innovativer Substanzen gearbeitet. Im Folgenden sind die zurzeit in klinischer Anwendung befindlichen NRTIs aufgelistet (**Abbildung 14**).



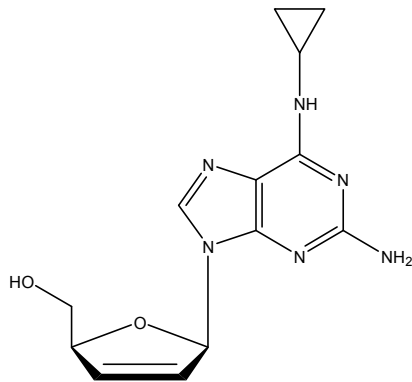
X = OH: 2'-Desoxythymidin (dT) **1**



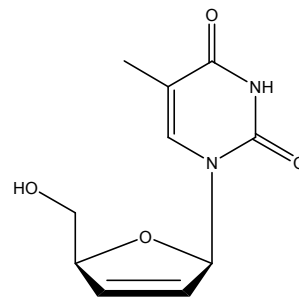
X = Y = H: 2',3'-Dideoxyinosin (Didanosin, DDI) **3**

X = N₃: 2',3'-Dideoxy-3'-azidothymidin (Zidovudin, AZT) **2**

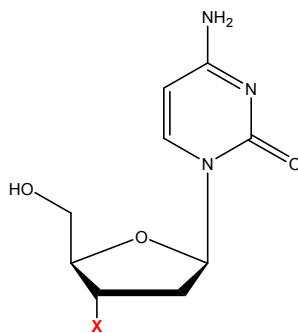
X = OH, Y = NH₂: 2'-Desoxyguanosin (Guanosin, dl) **4**



Abacavir (ABC) **5**

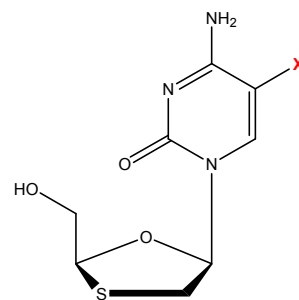


2',3'-Dideoxy-2',3'-dideoxythymidin
(Stavudin, D4T) **6**



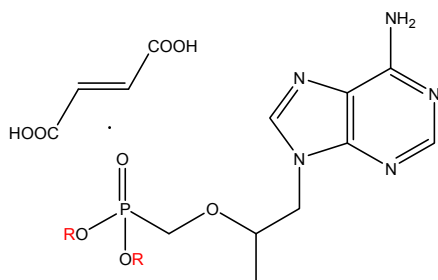
x = OH: 2'-Desoxycytidin (dC) **7**

x = H: 2',3'-Dideoxycytidin (Zalcitabin, DDC) **8**



x = F: L-5-Fluor-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidin (Emtricitabin, FTC) **9**

x = H: L-2',3'-Dideoxy-3'-thiacytidin (Lamivudin, 3TC) **10**



R = (CH₃)₂CH-O-CO-O-CH₂- (Tenofovir, TDF) Erster Nukleotidischer Reverse Transkriptase-Inhibitor **11**

Abbildung 14: Inhibitoren der Reversen Transkriptase und ihre natürlichen Stammverbindungen

Die Abbildung zeigt exemplarisch den Mechanismus der Hemmwirkung von AZT:

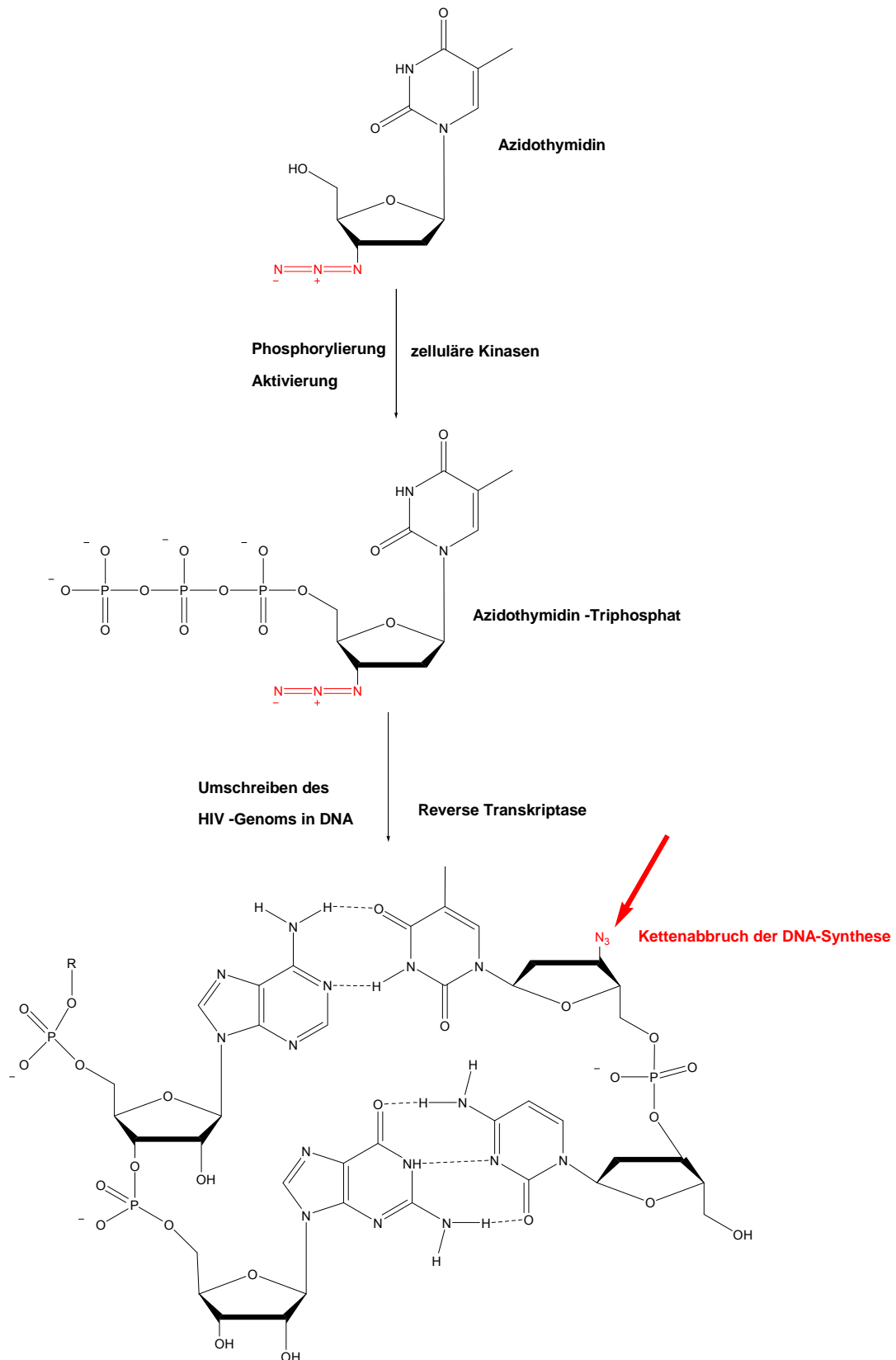


Abbildung 15: Mechanismus der Hemmwirkung von Azidothymidin (Zidovudin, AZT) 2

3.4.7 Nicht-Nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTIs)

Die im Jahre 1990 erstmals beschriebenen NNRTIs hemmen genau wie ihre nukleosidischen Vertreter das Enzym Reverse Transkriptase. Die NNRTIs weisen jedoch nicht die bekannten Struktur motive aus einer Nukleobase und einem Zucker (Ausnahme: Tenofovir[®]) auf, sondern besitzen strukturell gesehen untereinander sehr wenig Ähnlichkeit. Die Wirkungsweise dieser Substanzen besteht darin, dass sie sehr nahe an der Substratbindungsstelle für Nukleotide direkt und nicht kompetitiv an das Enzym Reverse Transkriptase binden. Der dadurch gebildete Komplex blockiert die katalytisch aktive Bindungsstelle des Enzyms entscheidend, was sich in einer sehr verlangsamten DNA-Polymerisation ausdrückt. Eine Aktivierung dieser Verbindungen durch intrazelluläre Phosphorylierung ist nicht notwendig.

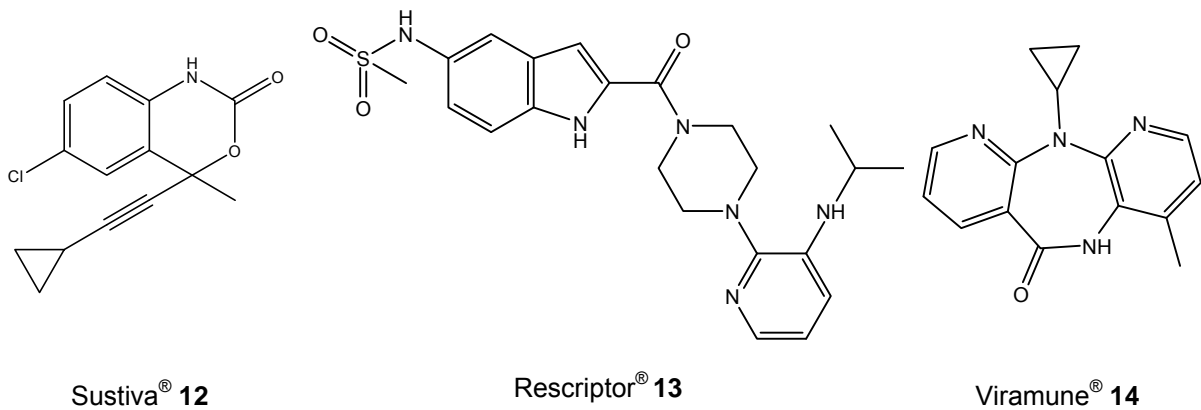


Abbildung 16: Nicht-Nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs), die sich zurzeit in klinischer Anwendung befinden

3.4.8 Protease Inhibitoren (PIs)

Das Gag/Pol-Vorläuferprotein wird durch das virale Enzym Protease in die funktionellen Untereinheiten gespalten. Mit der Hemmung der viralen Protease unterbleiben auch die proteolytische Aufspaltung und die Ausbildung infektiöser Viruspartikel. Durch Strukturaufklärung der HIV-Protease gelang es, HIV-Proteasehemmer zu designen und so zu modifizieren, dass sie das aktive Zentrum der Protease blockieren. Mit Ausnahme von Aptivus[®] 18 weisen alle Proteaseinhibitoren Statinstruktur auf. Nachfolgend sind alle PIs aufgeführt, die momentan auf dem Markt sind.

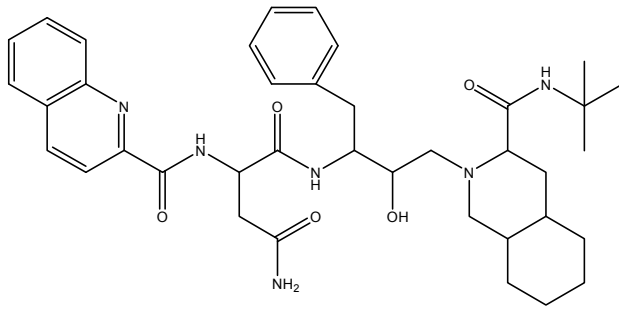
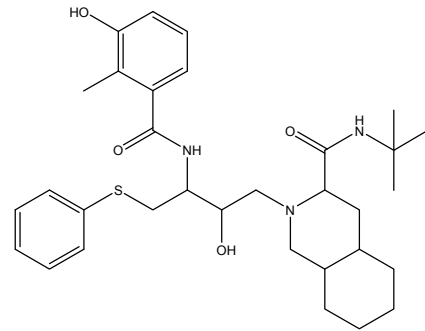
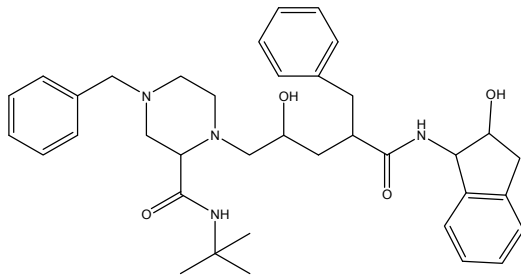
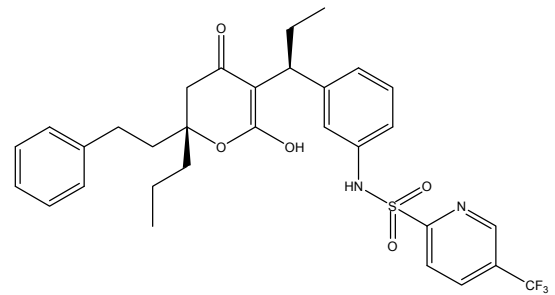
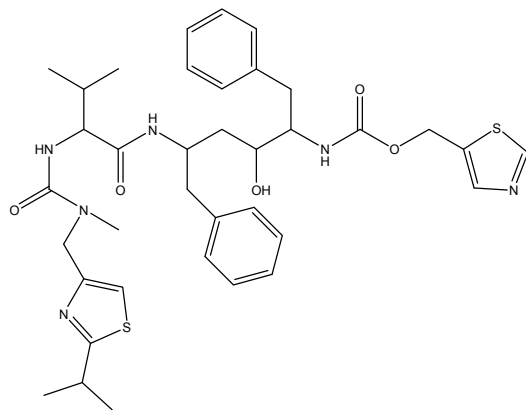
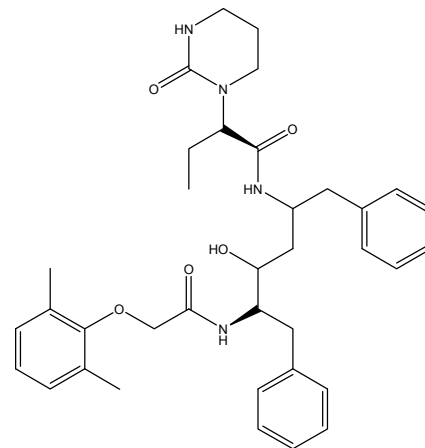
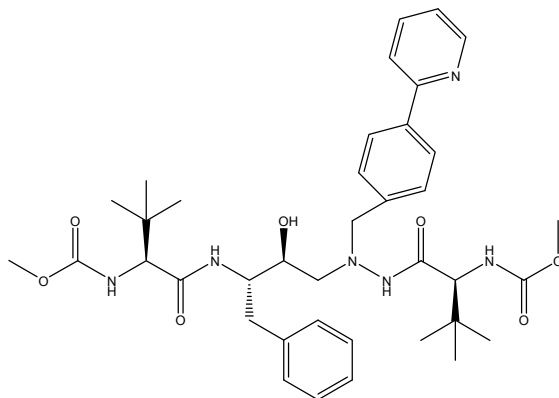
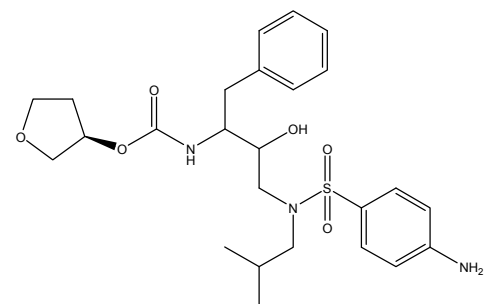
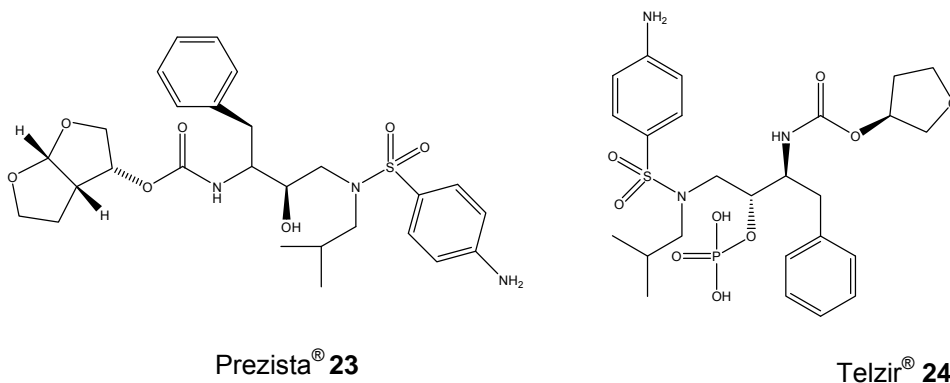
Invirase 500[®] 15Viracept[®] 16Crixivan[®] 17Aptivus[®] 18Ritonavir[®] 19Lopinavir[®] 20Reyataz[®] 21Aprenavir[®] 22

Abbildung 17: In der HIV-Therapie eingesetzte Proteaseinhibitoren (PIs).

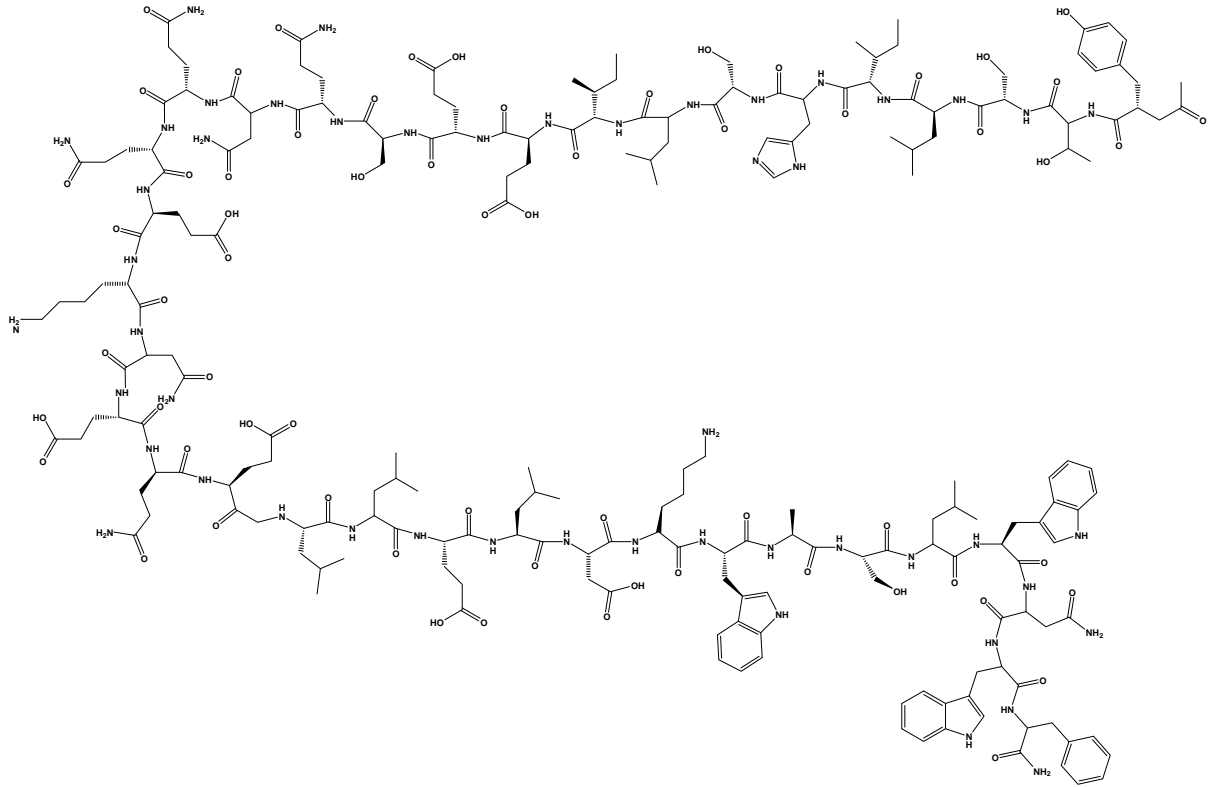
Fortsetzung Abbildung 17:



3.4.9 Entry-Inhibitoren

Um zu verhindern, dass das HI-Virus in die Wirtszelle gelangt, gibt es derzeit drei therapeutische Ansätze. „Attachment-Inhibitoren“ sollen die Wechselwirkung des viralen Hüllproteins gp120 mit den CD4 T-Lymphozyten verhindern. Mit den Verbindungen Pro-542 und BMS-488043 sind zwei gut verträgliche und wirksame Verbindungen in der klinischen Anwendung. Der von BMS entwickelte Vorläuferwirkstoff BMS-806 zeigte in klinischen Studien nur unzureichende Hemmwirkung, sodass dieser Stoff nicht als entry-Inhibitor eingesetzt werden konnte. Mit dem Medikament TNX-355 befindet sich derzeit ein weiteres Präparat in fortgeschrittenen klinischen Studien. Um in die Wirtszelle zu gelangen, benötigt das HI-Virus auch zelluläre Korezeptoren. Die wichtigsten derzeit bekannten Korezeptoren sind CXCR4 und CCR5. Einer der wirksamsten CCR5-Antagonisten ist das von der Firma Pfizer entwickelte Produkt UK427,857 (Maraviroc®). Mit den Medikamenten Pro 140 und SCH-D (Vicriviroc®) befinden sich weitere vielversprechende Wirkstoffe in klinischen Phase III-Studien. Desweiteren wird intensiv an der Entwicklung neuer CXCR4-Antagonisten gearbeitet, von denen sich einige schon in den fortgeschrittenen Stadien der klinischen Prüfung befinden (AMD-070, AK-602, TAK-652).

Der einzige derzeit verwendete Fusionsinhibitor ist Fuzeon® 25 (T-20, Enfuvirtide, **Abbildung 18**). Diese Verbindung wurde 2003 in Europa zugelassen und besteht aus 36 Aminosäuren. Charakteristisch für dieses Medikament ist die Bindung des Peptids an die Übergangstruktur des gp41-Proteins während des Fusionsvorgangs des Virus mit der Zielzelle.



25

Abbildung 18: Der Fusionsinhibitor T-20

4 RNA-Liganden

Die gezielte Suche nach antiviral wirkenden Chemotherapeutika ist seit geraumer Zeit ein sehr großes Forschungsgebiet der medizinischen Chemie. Mit der Erkenntnis, dass die Funktionen und Aufgaben der RNA weit über die alleinige Transformation von codierten Informationen hinausgehen, könnte die RNA zu einem wichtigen therapeutischen *Target* zur Behandlung von Krankheiten wie Krebs und HIV/Aids werden. Ein entscheidendes Kriterium für die Anwendung von Substanzen zur Behandlung von viralen Erkrankungen ist die Selektivität der eingesetzten Stoffe. Nach der Entdeckung von viruscodierten Enzymen wie beispielsweise Proteasen, DNA-Polymerasen oder Thymidinkinasen, wurde anfangs versucht, durch gezielte Empirie unter vielen wirkungsähnlichen Substanzen eine zu isolieren, die die Virusreplikation bei einer HIV-Infektion mit hoher Selektivität und ohne zelltoxische Effekte beeinflussen sollte. Nachdem es gelungen war, DNA-Sequenzen zu analysieren, eröffnete sich dadurch die Möglichkeit, Enzymmodelle von viruscodierten Enzymen ähnlicher Funktion und bekannter dreidimensionaler Struktur zu entwickeln. Durch die verbesserten Methoden zur chemischen Strukturaufklärung, wie beispielsweise hochauflösende NMR-Spektroskopie oder Kristallstrukturanalyse gelang es, potenzielle aktive Zentren der Enzyme zu identifizieren und gezielt Substanzen zu entwickeln, die in die Bindungstasche der Enzyme passen und sie dadurch hemmen sollten.

Erste Erfolge auf dem Forschungsgebiet der antiviralen Chemotherapeutika gelangen Gertrude Elion^[17] mit der Entwicklung von Acycloguanosin zur Behandlung der Herpes-Encephalitis. Mittlerweile haben sich die Wechselwirkungen von RNA mit Proteinen und Peptiden als ein neues Forschungsgebiet der medizinischen Chemie etabliert. RNA ist in der Lage, zahlreiche Sekundär- und Tertiärstrukturen auszubilden, wodurch die einzelnen Abschnitte durch kleine Moleküle (Small Molecules) oder Peptide adressiert werden können. In den letzten Jahren wurde die TAR-RNA aus dem HI-Virus-1 intensiv untersucht. Sowohl durch *Screening*, als auch durch strukturbasiertes *Design*, konnten einige Substanzen als effektive Tat-TAR-Inhibitoren identifiziert werden, wobei bislang keine Verbindung in der Therapie eingesetzt werden konnte. Daher ist es sehr wichtig neue Liganden als Tat-TAR-Antagonisten zu finden.

4.1 TAR-RNA-Liganden

Einer der Schlüsselschritte im Replikationszyklus des HI-Virus ist die Bindung des TAR-RNA-Elementes an das Tat-Protein. Die molekularen Wechselwirkungen finden zwischen der argininreichen Region von Tat, dem nicht gepaarten Uridin in Position 23 und Basenpaaren im *bulge*-Bereich statt. Dabei erkennt das Tat-Peptid eine drei Nukleotide große, in ungebundener Form sehr flexible Bindungsdomäne der TAR-RNA. Besonders der Argininrest passt sich optimal in eine aus den Basen G26, A22 und U23 bestehende Bindungstasche im *bulge*-Bereich ein.

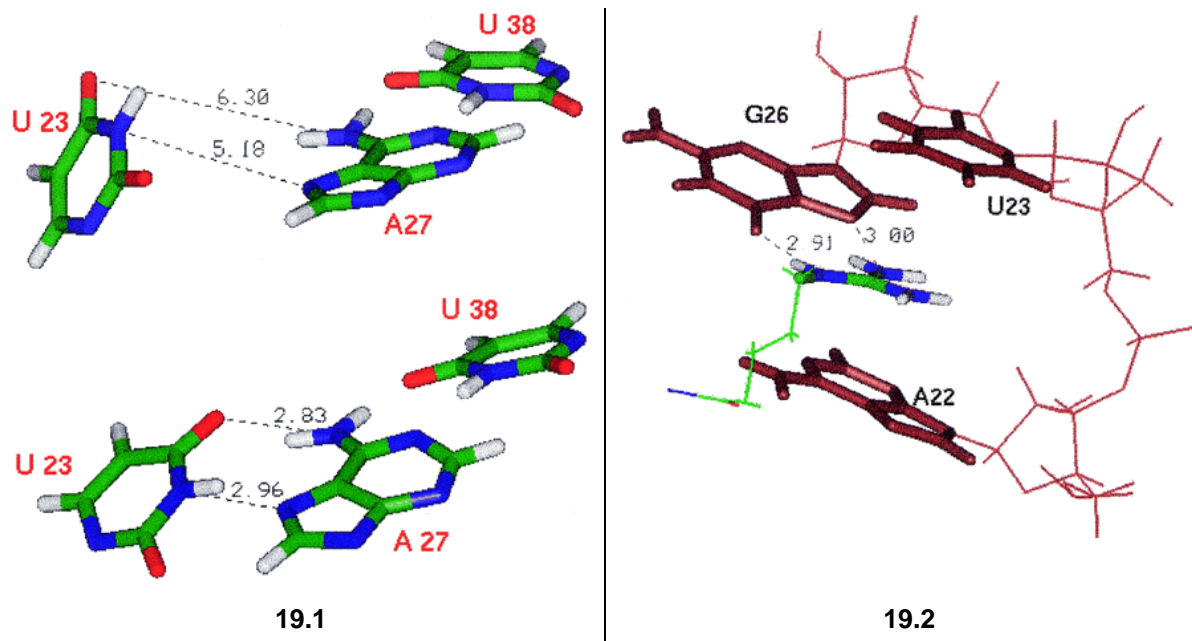


Abbildung 19: Ausbildung eines Basentriplets zwischen U23-A27-U38 in gebundener Form der TAR-RNA (Abbildung 19.1). Ausgangslage der Basen in gebundener Form (obere Abbildung von 19.1). In einer molekulardynamischen Simulation ist nach einer Zeit von 270 ps die Ausbildung eines *Watson-Crick*-Basenpaares zwischen U38-A27 gezeigt. Während der Simulation nähert sich U23 immer mehr an das *Watson-Crick*-Basenpaar an (untere Abbildung von 19.1). Die Ausbildung dieses Basentriplets ist für die Bindung an Liganden wichtig. So können sich Liganden wie Argininamid optimal in eine Bindungstasche einpassen (Bild 19.2)^[21].

Die Guanidiniumgruppe induziert dabei konformationelle Änderungen beider Bindungspartner. Eine Stabilisierung des gebildeten Komplexes wird durch die Ausbildung von ionischen Interkalationen zwischen den positiv geladenen, kationischen Aminosäuren im Tat-Protein und den negativ geladenen Phosphaten der TAR-RNA erreicht. Weiterhin sind zusätzlich ausgebildete Wasserstoffbrücken-Bindungen und *Stacking*-Wechselwirkungen für die erhöhte Stabilität des gebildeten Komplexes ver-

antwortlich. Nachfolgend ist nochmals eine dreidimensionale Struktur von freier und gebundener TAR-RNA gezeigt (Abbildung 20).

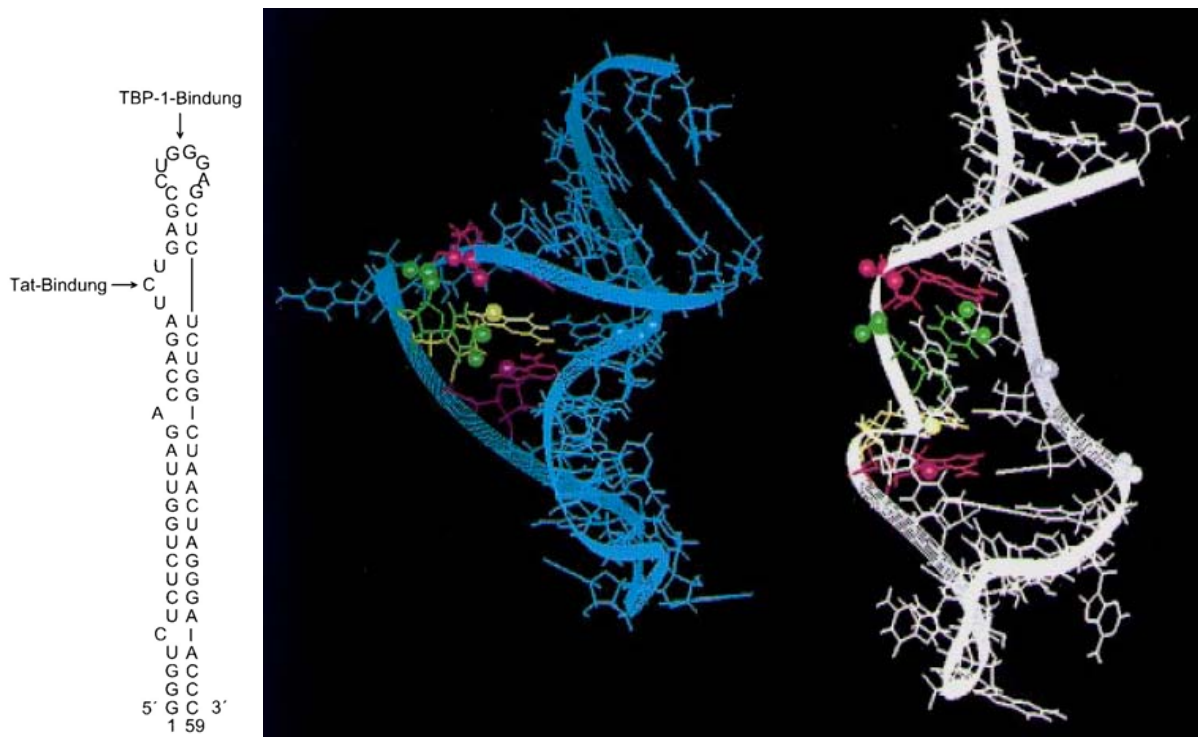


Abbildung 20: Links abgebildet sind die Nukleotide 1-59 der TAR-RNA. Man erkennt den drei nt großen *bulge*-Bereich, der für die Bindung an das Tat-Peptid essenziell ist, sowie den sechs nt großen *loop*-Bereich^[17]. Die mittlere Abbildung zeigt freie TAR-RNA und die für die Bindung an Tat essenziellen Nukleotide (bunt eingefärbt). Im gebundenen Zustand ist sehr gut die Konformationsänderung der TAR-RNA zu erkennen (rechte Abbildung)^[22].

Mit der Erkenntnis, dass die Inhibierung des Tat-TAR-Komplexes einen entscheidenden Einfluss auf die virale Replikation hat, begann die intensive Suche nach neuen TAR-Liganden. Mittlerweile konnten einige sehr potente Verbindungen mit einer hohen Affinität an die TAR-RNA synthetisiert werden. Im Nachfolgenden soll etwas genauer auf die Substanzen, die sich in drei große Gruppen unterteilen lassen, eingegangen werden.

4.2 Small Molecules

Zu diesen Verbindungen gehören kleine, nicht-peptidische Strukturen mit einem Molekulargewicht von bis zu 500 Da. Die ersten Substanzen, die fälschlicherweise als Tat-Antagonisten angesehen wurden, waren Benzodiazepine und Epoxysteroiden.

Kurze Zeit später konnte in der Arbeitsgruppe um Mei^[23] gezeigt werden, dass ein anderer Mechanismus für die beobachteten IC_{50} -Werte von 0.1-1.0 μ M (Ro5-3335) bei **26** verantwortlich war, die Verbindung jedoch nicht als Tat-TAR-Inhibitor fungierte. Ein weiteres Benzodiazepinderivat, das Ro24-7429 **27**, das durch geringfügige Modifikation ausgehend von Verbindung **26** entwickelt wurde, zeigte jedoch erstaunliche Effekte. So zeichnete es sich durch ein breites Wirkungsspektrum in unterschiedlichen Zelllinien und keinerlei zelltoxische Effekte aus. Bislang konnte jedoch nicht genau geklärt werden, ob es sich um einen Tat-Inhibitor oder eine Verbindung handelt, die auf anderem Wege die virale Replikation hemmt^[24]. Auch der genaue Wirkmechanismus des Epoxysteroids **29** mit einem IC_{50} -Wert von 2.6 μ M in einem HIV-Tat-Assay ist bis heute noch unklar. 1996 gelang die Synthese der Verbindung **28**, die strukturell sehr verwandt mit den Verbindungen **26** und **27** ist, jedoch keinen Benzodiazepinring aufweist. Bei dieser Verbindung konnte anti-HIV-Aktivität nachgewiesen werden, wobei der genaue Mechanismus noch unklar ist. Bei Verbindung **30** vermutet man, dass sie auf ähnliche Weise an die TAR-RNA bindet, wie der Argininrest des Tat-Peptides. Mit einer Bindungskonstanten von 50-100 nM soll sie recht gute Inhibitionseigenschaften zeigen^[24].

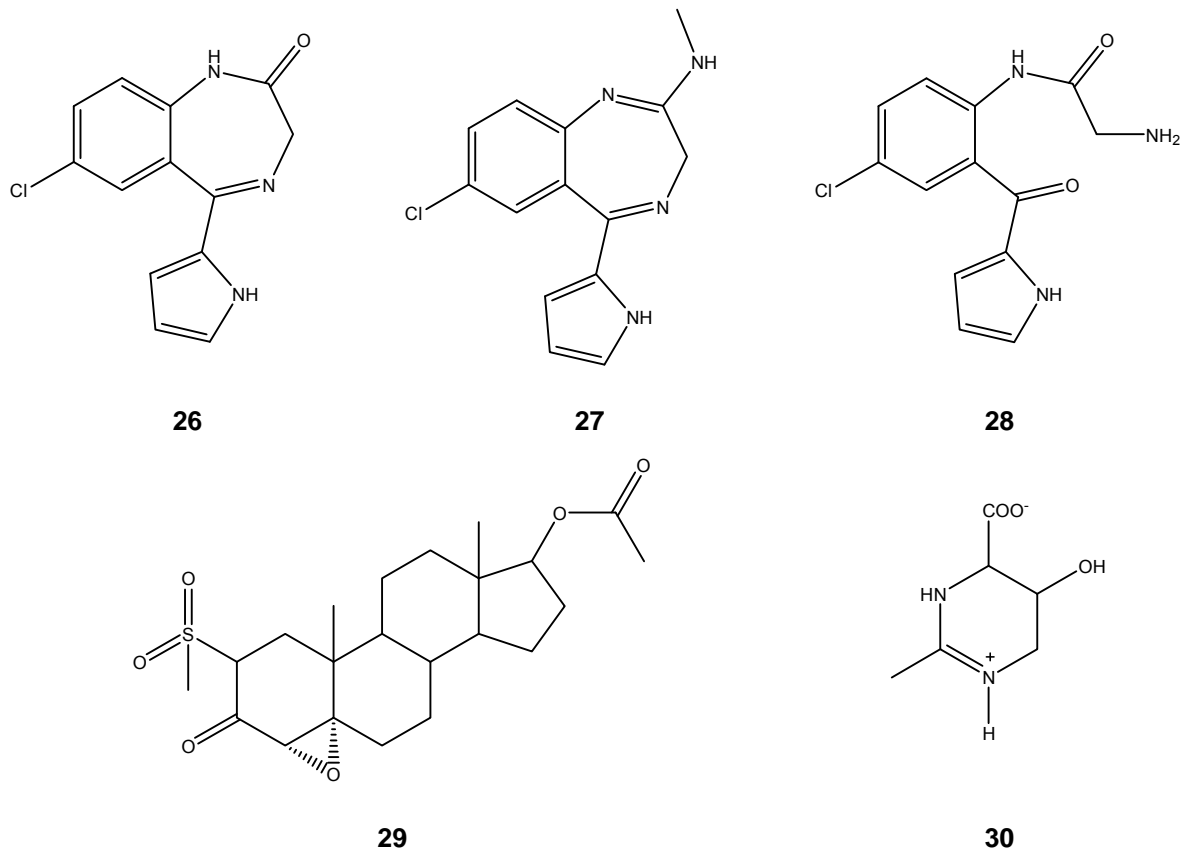


Abbildung 21: Strukturen potenzieller TAR-Liganden^[24]

Im Jahre 1992 gelang es Frankel und Williamson, einen Komplex, bestehend aus Argininamid und RNA genauer zu untersuchen^[10, 21, 22, 25]. Basierend auf NMR-spektroskopischen Daten wurde eine Bindungshypothese dieser Verbindung an die virale RNA aufgestellt. Bis heute sind Argininamid **31**, als auch Arginin selbst, die wohl am besten charakterisierten TAR-Liganden. Unterstützt durch molekulardynamische Berechnungen gelang es wiederum durch hoch aufgelöste ¹H-NMR-Spektroskopie zu zeigen, dass die Anwesenheit eines Arginins oder Argininamids **31** eine konformationelle Änderung der viralen RNA induziert^[21]. Daraufhin begann eine fieberhafte Suche nach neuen Strukturen, die Ligandeneigenschaften haben sollten. 1996 konnte in der Gruppe um Bailly^[26, 27] eine Verbindung mit der Bezeichnung „Hoechst 33258“ **32** als ein sehr guter TAR-Ligand identifiziert werden. Durch „*high throughput Screening*“ ausgehend von einer Substanzbibliothek mit 150.000 Verbindungen wurden im selben Jahr von Mei und seinen Mitarbeitern zwei Verbindungen mit sehr guten Bindungseigenschaften an die RNA charakterisiert^[23]. Ein gefundenes Chinoxalinderivat **33** und ein Derivat des Quinozalins **34** zeigten mit IC₅₀-Werten von 1.3 µM beziehungsweise 10 µM hohe Affinität zur RNA. Den bisher besten Binder aus der Stoffklasse der Acridine stellt das CGP 40336A **35** mit einem in *vitro* gemessenen IC₅₀-Wert von 22 nM. Auch in *in vivo* blockiert diese Verbindung die Tat-induzierte virale Transkription und zeigt mit einem IC₅₀-Wert von 1.2 µM beachtliche Hemmeffekte. Durch *footprinting*-Experimente und Untersuchungen des Schmelzpunktes konnte folgendes Bindungsmuster postuliert werden:

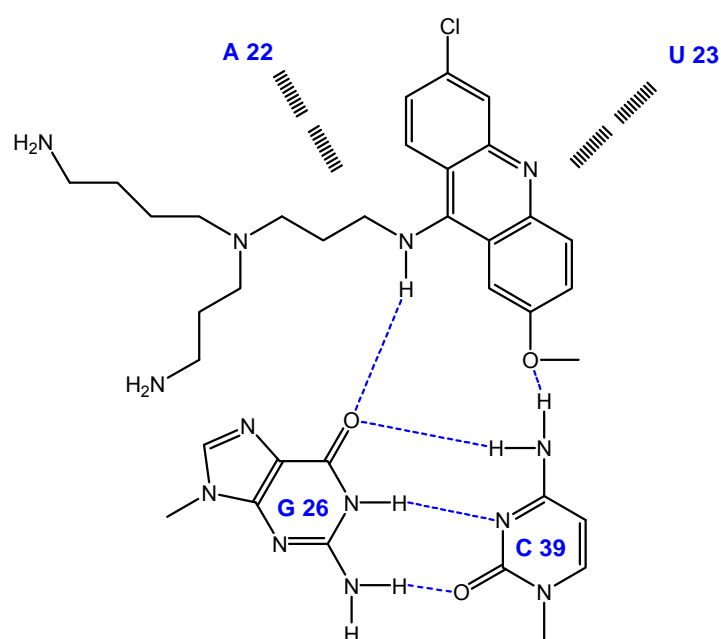


Abbildung 22: Bindungsmodell des Acridinderivates **35** an die TAR-RNA^[24]

Als weitere gute TAR-Liganden erwiesen sich die Polyamidine TAPP **36** und TAPB **37**. Diese Verbindungen konnten in der Arbeitsgruppe um Mischati et al.^[28] als effiziente Inhibitoren des Tat-TAR-Systems identifiziert werden. Durch virtuelles Screening gelang es James und seinen Mitarbeitern im Jahre 2000, eine aus 153000 Verbindungen bestehende Bibliothek auf 350 potenzielle TAR-Liganden zu reduzieren^[29]. Darunter waren auch Strukturen, die aufgrund ihrer Struktur keine oder nur unzureichende Affinität zur RNA zeigen sollten. Zwei dieser Verbindungen, zum einen das Trisaminderivat **38**, zum anderen das Anthrachinonderivat **39** zeigten IC₅₀-Werte von etwa 1 µM. Mit der Entdeckung des Acetylpromazins **40** gelang es derselben Arbeitsgruppe zwei Jahre später, eine weitere Verbindung in die Liste der TAR-Liganden mit nanomolarer Bindungsaffinität zu integrieren^[30].

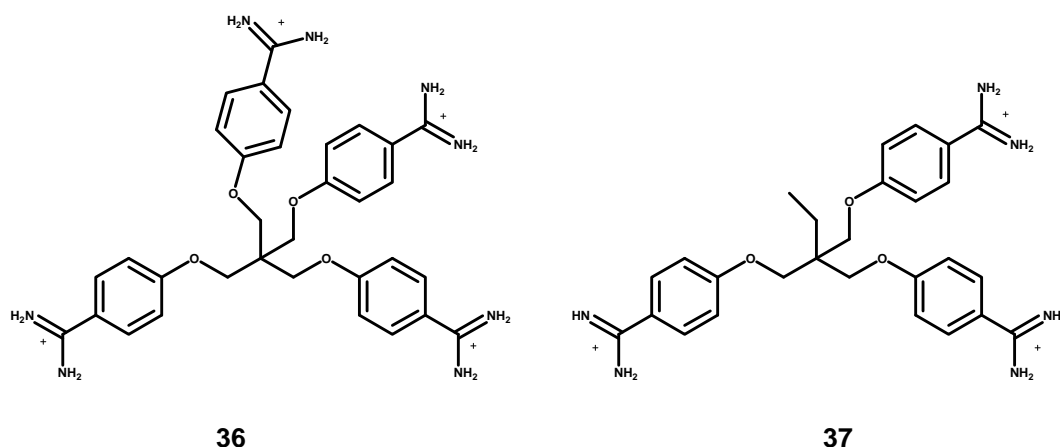


Abbildung 23: Polyamidine TAPP **36** und TAPB **37** von Mischati et al.^[28] mit hoher TAR-Affinität

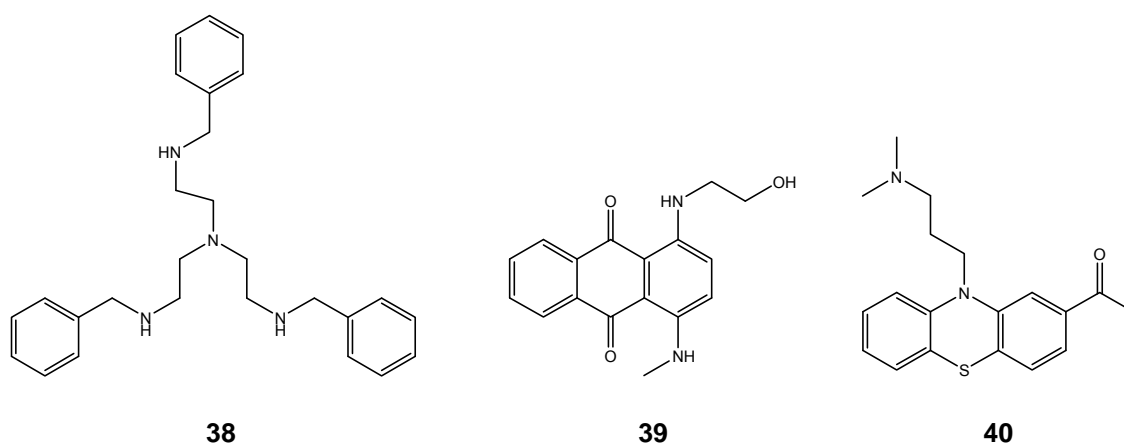


Abbildung 24: Trisaminderivat **38**, Anthrachinonderivat **39**, die von James et al.^[29] als TAR-Liganden mit einem IC₅₀-Wert von etwa 1 µM identifiziert werden konnten. Derivat **40** zeigt nanomolare Affinität

Im Jahre 2003 wurde in der Arbeitsgruppe um G. Palu^[31] von einem antiviralen 6-Aminoquinolonderivat **41** berichtet, das sich in einem Zellassay als sehr effektiver und bei einer Konzentration von 5 μM als aktiver Tat-TAR-Inhibitor erwies.

In der nachfolgenden Abbildung sind bekannte TAR-Liganden sowie ihre jeweilige Bindungsstelle an die RNA nochmals zusammengestellt.

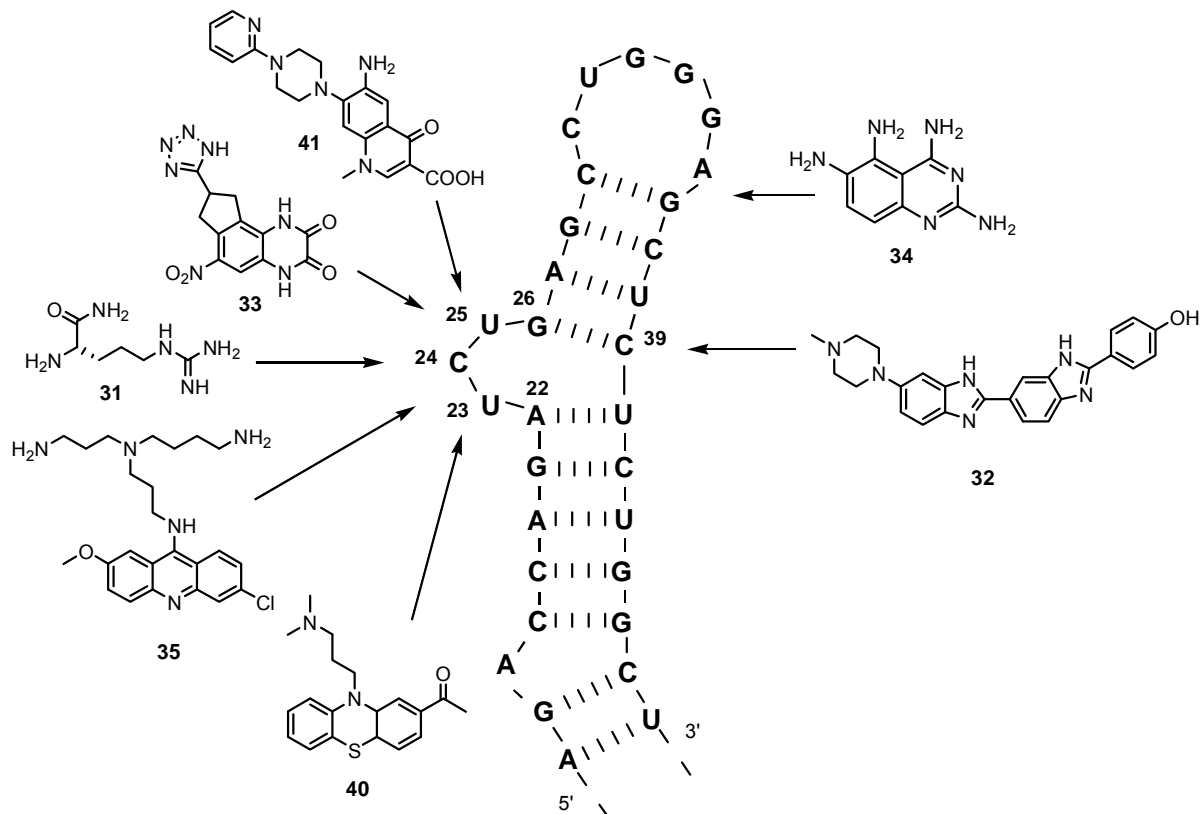


Abbildung 25: Bindungsstellen einiger bekannter TAR-RNA-Liganden^[32]

4.3 Aminoglykoside

Im Jahre 1995 konnten die Bindungsaffinitäten einiger Verbindungen, die in die Stoffklasse der Aminoglykoside gehören, mithilfe eines „*electrophoretic mobility shift*“-Assays bestimmt werden. In nachfolgender Abbildung sind die gemessenen Ergebnisse sowie die Strukturen der Verbindungen abgebildet. Bei der Anwendung dieser Untersuchungsmethode ist es möglich, die Bindung der entsprechenden Strukturen an RNA oder DNA über die Mobilität innerhalb eines Gels zu deuten^[33].

In Kontrast zu den klassischen in der Literatur beschriebenen Interkalatoren, die nicht selektiv an DNA und RNA binden, zeichnen Aminoglykoside sich durch nichtinterkalative Bindung aus. Die Bindungseigenschaften der Verbindungen Neomycin **42**, Streptomycin **43** und Gentamicin **44** beruhen auf elektrostatischen Wechselwirkungen. Die gemessenen IC₅₀-Werte der Verbindungen liegen im niederen mikromolaren Bereich. Die Werte betragen für Neomycin 0.92 µM, für Streptomycin 9.5 µM und für Gentamicin 45 µM. Aufgrund dieser Daten kann keine Beziehung zwischen Bindungsaffinität und Anzahl der positiven Ladungen gefunden werden. So zeigt Streptomycin eine etwa um den Faktor fünf höhere Bindungsaffinität zur RNA als Gentamicin, obgleich die Anzahl positiver Ladungen beim Gentamicin höher ist. Durch die Einführung weiterer Guanidiniumgruppen bei den Verbindungen Kanamycin und Gentamicin an der Position C1 konnte die Affinität an die TAR-RNA weiter gesteigert werden. Diese polykationischen Verbindungen zeigten eine bedeutende biologische Aktivität in Zellkulturen^[34, 35]. Die Bindungsstellen der Aminoglykoside an die TAR-RNA konnten durch *footprinting*-Experimente charakterisiert werden. Zusätzlich konnten Hermann und Westhoff durch computergestützte Studien die Ergebnisse untermauern. Ihnen gelang es, einen Komplex aus Neomycin und TAR genauer zu untersuchen^[36]. Die Computerstudien zeigten, dass die Bindungsstellen von Tat und Neomycin unterschiedlich waren, was auch in Einklang mit weiteren durchgeführten biochemischen Experimenten stand und durch NMR-Untersuchungen bewiesen wurde^[23, 37].

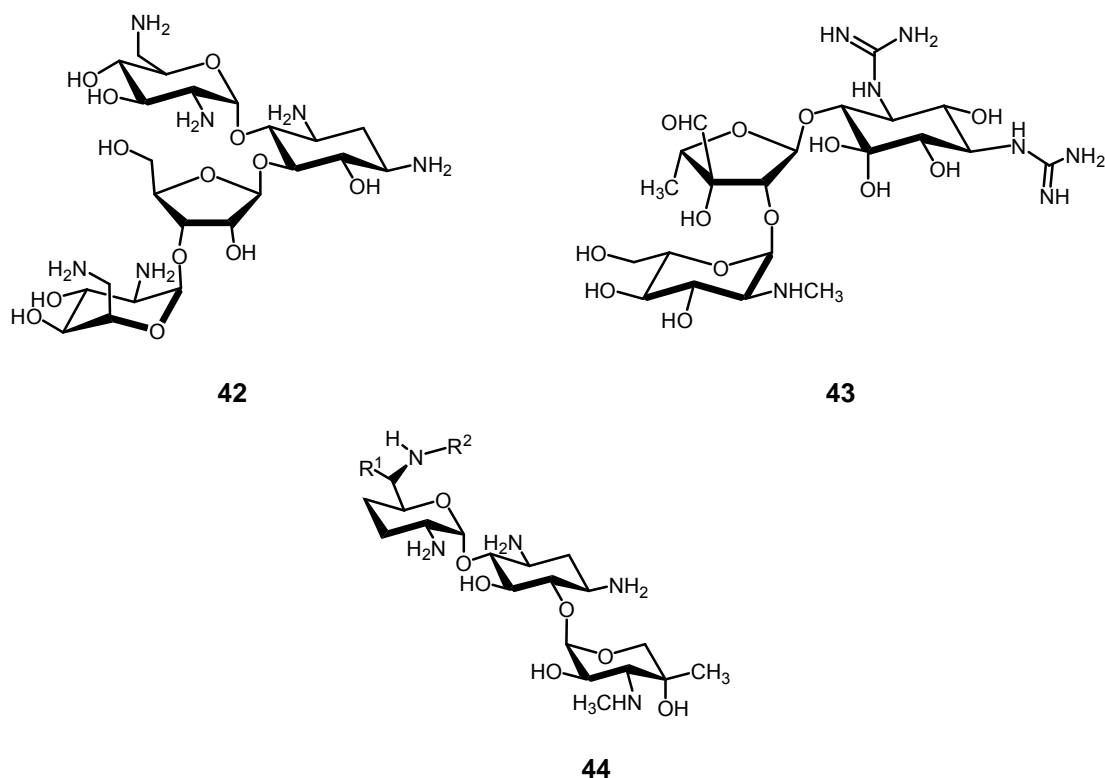
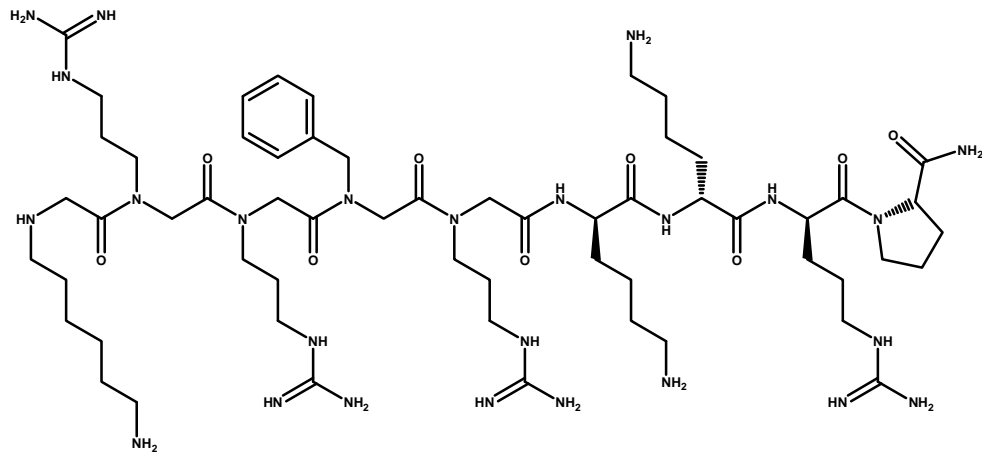


Abbildung 26: Strukturen der Aminoglycoside, die an TAR binden

4.4 Peptidische Strukturen

In den letzten Jahren wurden eine Reihe neuer peptidischer Verbindungen synthetisiert, von denen man sich erhoffte, dass ihre Bindungsstelle an die RNA im *bulge*-Bereich liegen würde. Diese Peptide sollten dann in der Lage sein, mit dem Tat-Peptid zu konkurrieren und die virale Replikation zu unterbinden oder wenigstens extrem zu verlangsamen. Dabei wurde auch versucht, die peptidischen Verbindungen in die bereits beschriebenen aminoglykosidischen Strukturen einzubetten^[38].

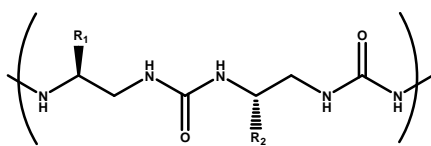
Im Jahre 1997 gelang es der Arbeitsgruppe um Hamy durch Dekonvolution einer kombinatorischen Bibliothek, das Peptid CGP 64222 **45** zu identifizieren^[39]. Es stellte sich heraus, dass das Nonamer die Tat/TAR-Wechselwirkung in einem durchgeführten Zell-Assay bei Konzentrationen von 10-30 μM inhibierte. Auch in menschlichen Lymphozyten konnte die virale Replikation durch CGP 64222 **45** blockiert werden. Zudem konnte durch NMR Studien eindeutig die Bindung an den drei Nukleotide umfassenden *bulge* belegt werden.



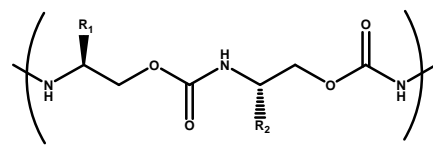
45

Abbildung 27: Das von Hamy beschriebene Peptid mit hoher TAR-Affinität und bulge-Selektivität

Um den Einfluss der Stereochemie der RNA bindenden Peptide zu untersuchen, wurden in der Arbeitsgruppe um Rana et al.^[40, 41] kurze Tat-Peptid analoge Verbindungen synthetisiert (Aminosäuren 37-72), die sowohl D- als auch L-konfiguriert waren. Überraschenderweise zeigten das D-Tat-Peptid mit einer Bindungskonstanten von 0.13 μM und das L-Tat-Peptid mit einer Bindungskonstanten von 0.22 μM sehr ähnliche Bindungseigenschaften. Die gleiche Gruppe synthetisierte Peptid-analoge Verbindungen auf Basis von Carbamat- und Harnstoffderivaten, die die gleiche Sequenz wie das Tat-Peptid hatten^[42, 43] (**Abbildung 28**).



46



47

Abbildung 28: Strukturen der Verbindungen auf Harnstoff- und Carbamatbasis

Das Oligoharnstoffderivat **46** wies mit einer Bindungskonstanten von 0.11 μM eine zehnfach höhere Bindungsaffinität auf als das Oligocarbamatderivat **47** mit einem K_D -Wert von 1.1 μM und eine etwa siebenfach höhere Affinität als das natürliche L-Peptid (K_D 0.78 μM). In weiteren Assays wurden die hergestellten Peptide sowohl auf ihre Beständigkeit gegenüber zellulären Proteasen, als auch auf ihre genregulatorischen Eigenschaften im HIV-1 getestet. Um einen intrazellulären Abbau der Verbindungen zu unterdrücken, wurden die Strukturen zusätzlich durch Ester-, als auch Amidgruppen funktionalisiert^[44]. Das Ester-Peptoid-Derivat **48** enthielt das Struktur-

motiv von Tat (47-57) und zeigte mit einem K_D -Wert von $0.068 \mu\text{M}$ (Fluoreszenz-Quenching) eine sehr gute Affinität zur RNA.

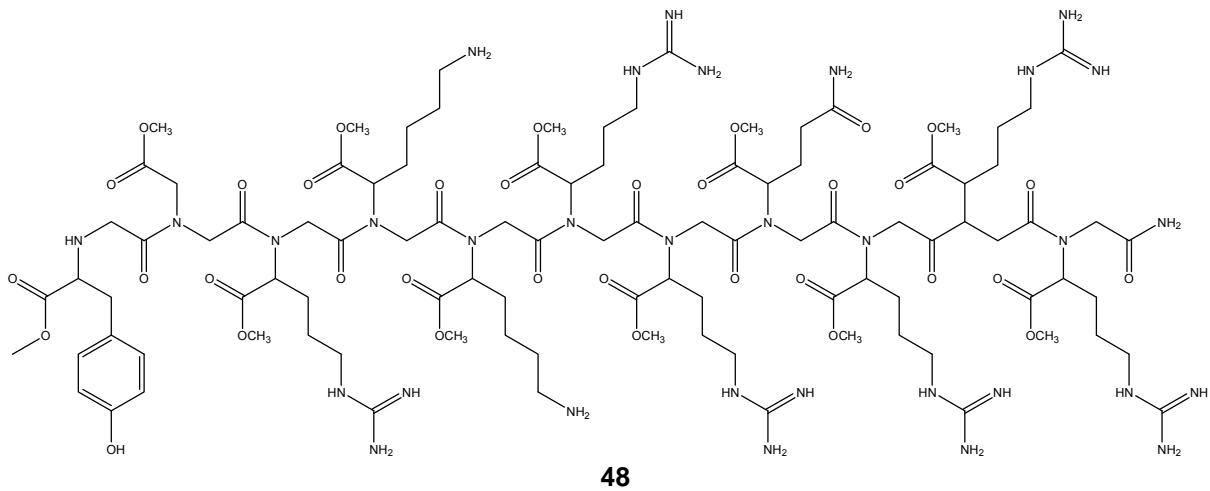


Abbildung 29: Struktur des TAR-bindenden Ester-Peptoids

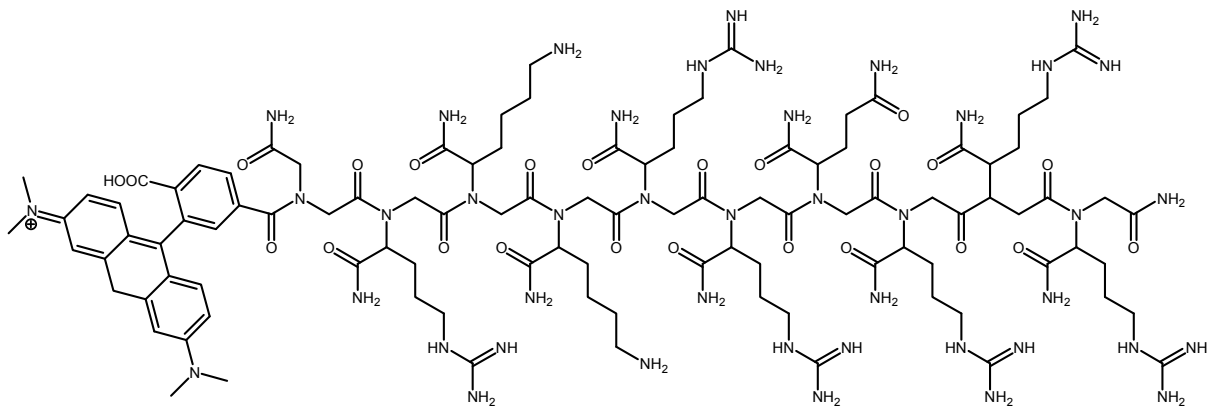


Abbildung 30: Struktur des TAR-bindenden Amid-Peptoids

Die Bindungskonstante des Amid-Peptoids **49** lag nur wenig darüber. Um herauszufinden, ob auch kürzere Peptide, die sich nicht von Tat ableiteten als TAR-Liganden fungieren konnten, wurde eine kombinatorische Bibliothek aus 24389 hergestellten Tripeptiden die sowohl D-, als auch L-Aminosäuren enthielten, untersucht. Aus dieser Bibliothek erwiesen sich acht Verbindungen als vielversprechende Kandidaten für weitere Tests^[45]. Die besten Binder wiesen folgendes Strukturmotiv auf: $\text{H}_2\text{N}(\text{L})\text{Lys}(\text{D})\text{Lys}(\text{L})\text{Asn-OH}$ ($K_D = 0.42 \mu\text{M}$) **50** und $\text{H}_2\text{N}(\text{D})\text{Thr}(\text{D})\text{Lys}(\text{L})\text{Asn-OH}$ ($K_D = 0.56 \mu\text{M}$). Aufgrund dieser Ergebnisse konnte ein bevorzugtes Strukturmotiv mit der Sequenz X-Lys-Asn gedeutet werden. Die übrigen Peptide waren Diastereomere von $\text{H}_2\text{N-Lys-Lys-Asn-OH}$ und zeigten deutlich schlechtere Bindungseigenschaften. Ein weiterer Versuch, die biologische Aktivität dieser Verbindungen zu verbessern, be-

stand darin, das Tripeptid **50** in eine zyklische Struktur einzubauen. Dadurch konnten die Bindungseigenschaften des Pentapeptides **51** im Gegensatz zu der nichtzyklischen Struktur jedoch nicht entscheidend verbessert werden^[46].

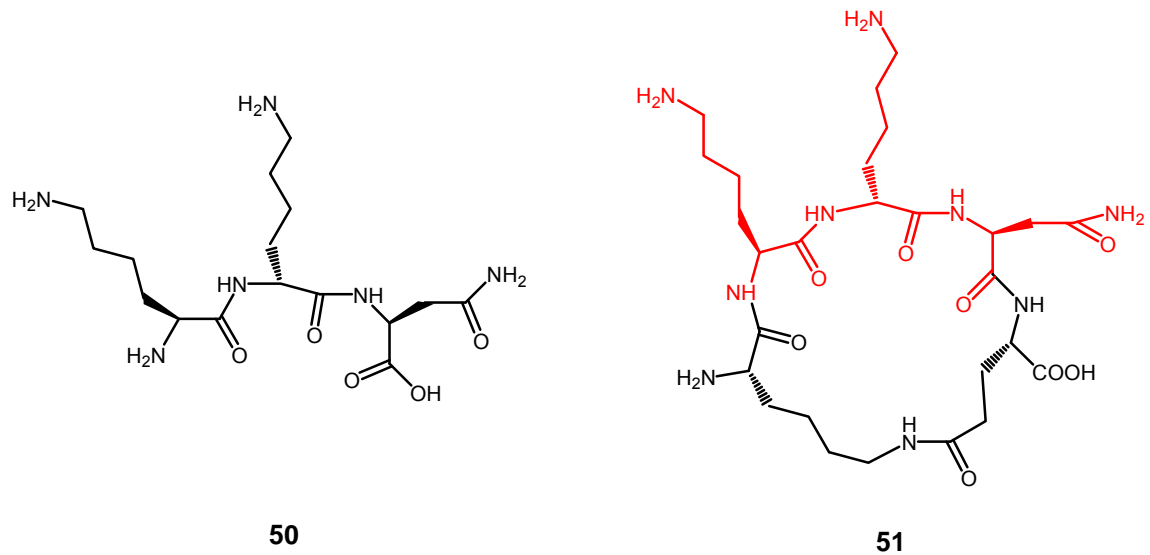
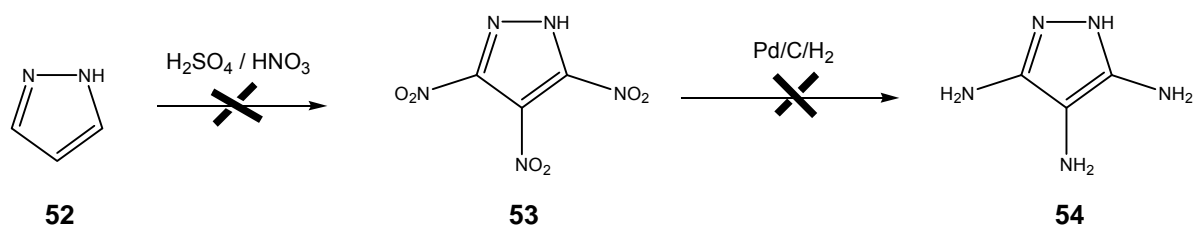


Abbildung 31: Integration des nichtzyklischen Tripeptids in ein zyklisches Pentapeptid

5 Eigene synthetische Arbeiten

5.1 Versuche zur Herstellung von 1H-Pyrazol-3,4,5-triamin

Ausgehend von 1H-Pyrazol **52** sollte durch dreifache Nitrierung die Trinitroverbindung **53** und durch anschließende Reduktion der Nitrogruppen das gewünschte Produkt **54** erhalten werden.



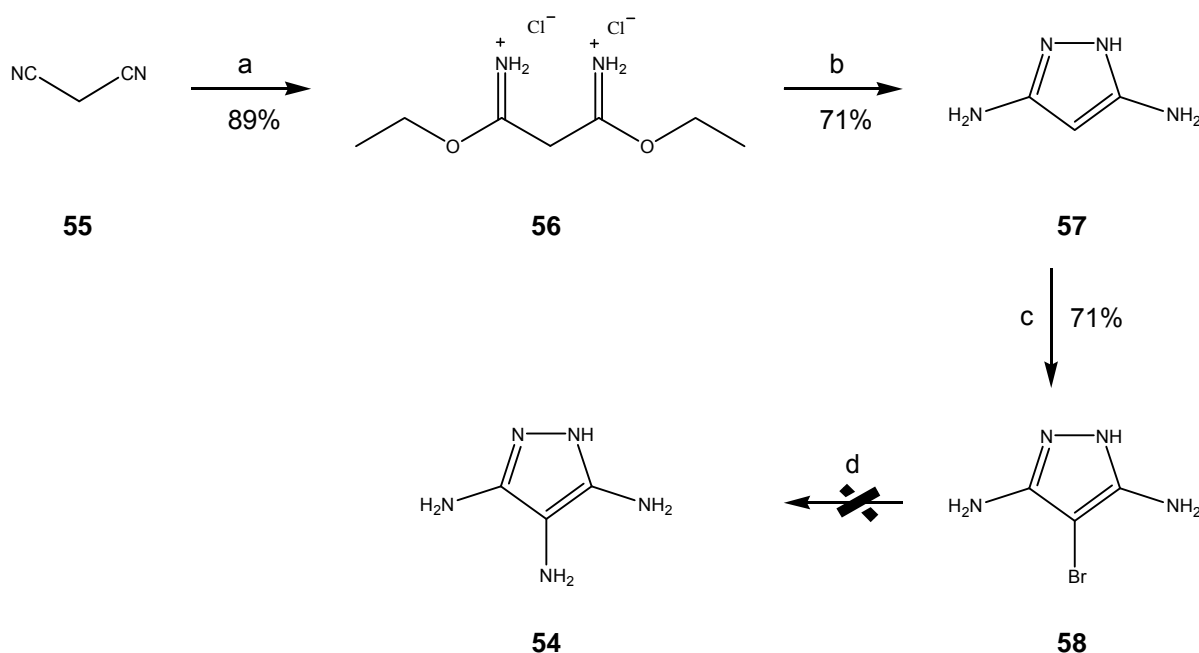
Dazu wurden verschiedene Reagenzien und unterschiedliche Bedingungen gewählt. In einer in unserer Arbeitsgruppe angefertigten Dissertation von Oliver Boden^[47] wurden diese Reaktionsbedingungen bereits diskutiert, wobei keine dieser gewählten Reaktionsbedingungen die gewünschte Zielverbindung **53** ergab. Zur endgültigen Verifizierung dieser Ergebnisse wurden die fehlgeschlagenen Versuche nochmals überprüft. Nach der Aufarbeitung konnte das gewünschte Produkt nicht isoliert werden. Vielfach zersetzte sich das Edukt schon während der Reaktion. Nachfolgende Tabelle 3 gibt einen Überblick über die gewählten Reaktionsbedingungen zur Herstellung von **54**.

Tabelle 3: Fehlgeschlagene Versuche zur Synthese von **54**

Reagenzien	Zeit [h]	Temperatur [°C]	Ausbeute[%]
HNO ₃ (65%) + H ₂ SO ₄ (98%) 1:1	3	0-5, dann RT	0
KNO ₃ + H ₂ SO ₄	3	0-5, dann RT	0
HNO ₃ + Ac ₂ O	2	-10-0, dann RT	0
HNO ₃ (100%) + H ₂ SO ₄ (98%) 1:1	2	-10-0, dann RT	0
HNO ₃ (100%) + H ₂ SO ₄ (Oleum) 1:1	1	-10-0, dann RT	0
HNO ₃ (100%) + H ₂ SO ₄ (Oleum) 1:1	3	Rückfluß	0

Bei allen Nitrierungsversuchen war das Edukt 1H-Pyrazol **52** zwar nach einiger Reaktionszeit verschwunden, jedoch konnten mittels DC-Kontrolle eine Vielzahl von Produkten nachgewiesen werden, die nicht weiter voneinander getrennt werden konnten. Stokes et al.^[48] berichteten schon 1968 im J. Org. Chem. von einer effizienten Synthese zur Herstellung von 3,5-Diamino-1H-pyrazol **57** aus dem billigen, käuflichen

Malonsäuredinitril **55**. Dabei sollte das gebildete Pinner-Produkt **56** dann mit Hydrazinhydrat cyclisiert werden. In der gleichen Publikation beschrieben sie die Synthese von 4-Brom-1H-pyrazol-3,5-diamin **58** in guten Ausbeuten. Die so erhaltene, in 4-Position halogenierte Verbindung sollte dann durch Umsetzung mit Ammoniak das gewünschte Produkt **54** ergeben. Nachfolgend ist der alternativ erarbeitete Syntheseweg nochmals dargestellt (**Abbildung 32**).



a) EtOH/HCl (g) b) Na₂CO₃/H₂O, Hydrazin (wasserfrei) c) Br₂/H₂O d) NH₃

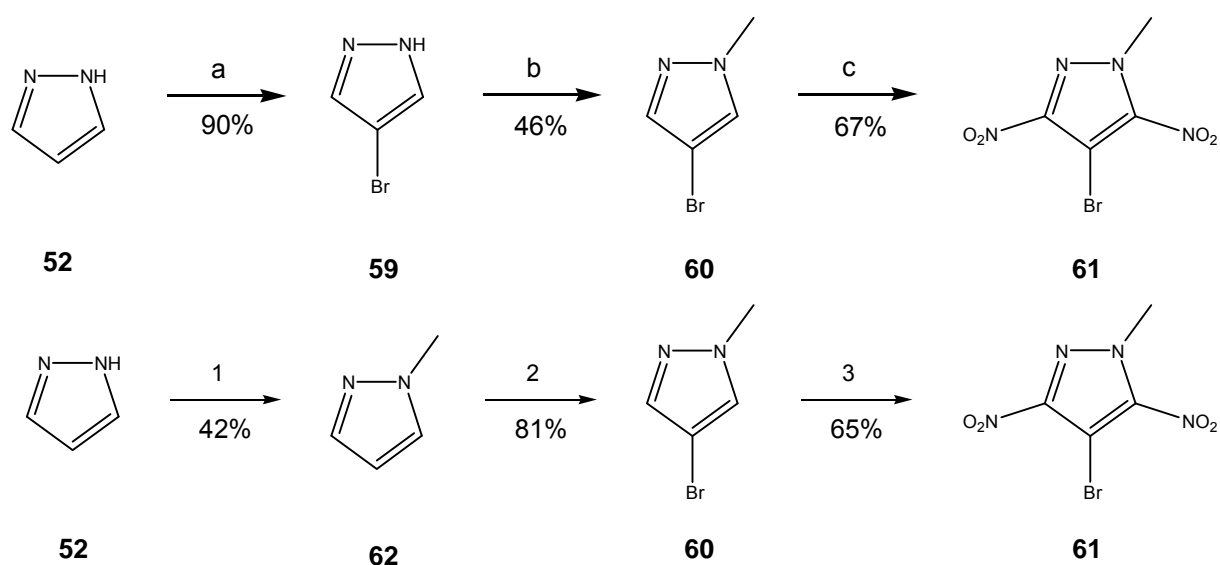
Abbildung 32: Versuche zur Herstellung von 1H-Pyrazol-3,4,5-triamin aus Malodinitril

Sowohl durch den Einsatz von flüssigem Ammoniak unter erhöhtem Druck, als auch bei dem Versuch durch Zugabe von Kupfer/Kupfer-(I)-bromid als Katalysatoren konnte die gewünschte Produktumsetzung nicht beobachtet werden. Auch die Nucleophilie anderer Amine, wie Methylamin oder Anilin, reichte nicht zu einer erfolgreichen Umsetzung aus (**Tabelle 4**).

Tabelle 4: Versuche zur Umsetzung von Verbindung **58** mit Aminen

Reagenz	Temperatur [°C]	Zeit [h]	Druck [bar]	Umsatz [%]
NH ₃ (wässrig, 25%)	RT	24	1	0
NH ₃	40	12	40	0
NH ₃ /Cu (10 mol%)	40	12	40	0
NH ₃ /Cu (30 mol%) +Cu-(I)-Br(30 mol%)	60	8	50	0
Anilin	40	6	30	0
Methylamin (30% in H ₂ O)	40	4	20	0

Es wurde so zunächst eine Syntheseroute zur Einführung von Aminoalkylsubstituenten in 4-Position des derivatisierten 1H-Pyrazols ausgearbeitet. Dabei stellte sich heraus, dass die Bromierung von 1H-Pyrazol **52** in 4-Position nach einer bekannten Literaturvorschrift^[49] in wässriger Lösung mit sehr guten Ausbeuten durchgeführt werden konnte (**59**). Anschließend sollte die Verbindung dann in 3,5-Position nitriert werden. Auch hier gelang die Einführung der beiden Nitrogruppen nicht. Ein literaturbekanntes Derivat des Pyrazols war das 4-Brom-1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol **61**, wobei eine zweifache Nitrierung nur nach Substitution des Protons am Ringstickstoff durch eine Methylgruppe gelang (**60**). Ausgehend von 1H-Pyrazol **52** war es egal, ob man zunächst die Bromierung und dann die N-Methylierung durchführte **60**, oder ob man die umgekehrte Reihenfolge wählte (**60**). Entscheidend für die Nitrierung war jedoch wie schon erwähnt, die Einführung einer Methylgruppe am Ringstickstoff in Position 1 (**Abbildung 33**).



- a) $\text{Br}_2/\text{H}_2\text{O}$, Rückfluss b) KOH, TMAB, MeI c) HNO_3 (100%), H_2SO_4 (98%) 1:1, Rückfluß
 1) KOH, TMAB, MeI 2) $\text{Br}_2/\text{H}_2\text{O}$, Rückfluss 3) HNO_3 (100%), H_2SO_4 (98%) 1:1, Rückfluß

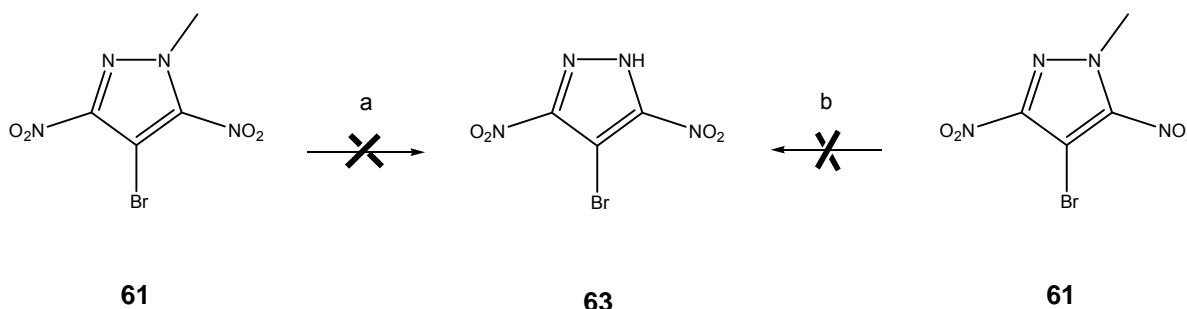
Abbildung 33: Syntheschema für die Herstellung von 4-Brom-1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol **61**

Verbindung **61** stellte dann im Folgenden eine wichtige Verbindung zur Kupplung von verschiedenen Aminien dar, die dann zu entsprechenden Phenazinen zyklisiert werden sollten. Auf die Möglichkeiten zur Synthese der Phenazine soll in einem späteren Kapitel noch genauer eingegangen werden. Durch verschiedene Substitutionsversu-

che konnte gezeigt werden, dass beide Nitrogruppen in 3 und 5 Position der Verbindung **61** essentiell für die weiteren Syntheseschritte waren. So gelang beispielsweise die Substitution des Halogens in Verbindung **60** gegen Stickstoff nicht.

5.2 Versuche zur Demethylierung von 4-Brom-1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol

Nach erfolgreicher Umsetzung von Verbindung **60** mit Nitriersäure, sollte die Methylgruppe am Stickstoff in 1-Position wieder entfernt werden. Dazu war ein Verfahren beschrieben, wonach das tertiäre Amin zunächst in einem Oxidationsschritt, gefolgt von einer N-Demethylierung und anschließender Aufreinigung in guten Ausbeuten in ein sekundäres Amin überführt werden sollte^[50]. Leider konnte das Verfahren bei Verbindung **61** nicht erfolgreich angewendet werden. Auch Versuche zur Entfernung der Methylgruppe mit Pyridiniumhydrochlorid bei hohen Temperaturen führten nicht zum gewünschten Produkt.

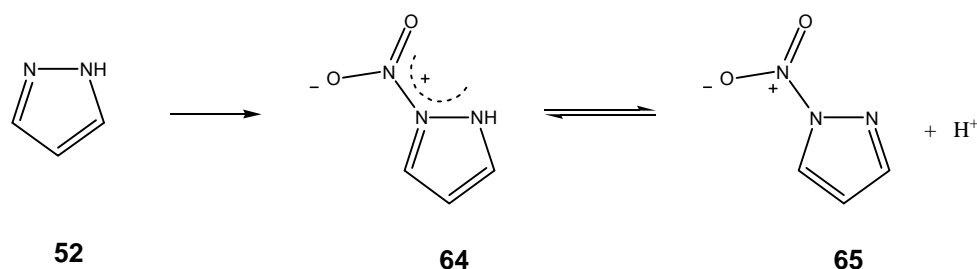


- a) Na_2CO_3 :1,5 H_2O_2 ; Natrium-4,6-Dichlor-2-phenolat-1,3,5-triazin b) Pyridiniumhydrochlorid 200-220°C

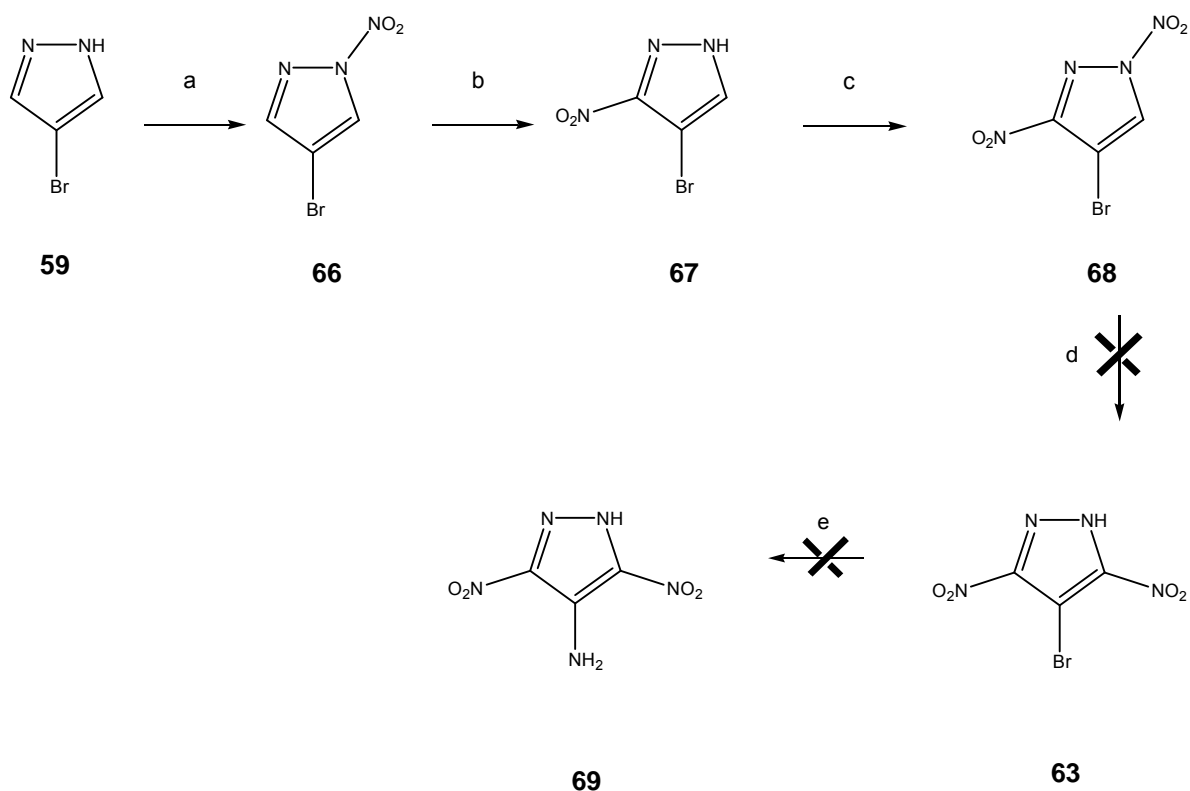
Abbildung 34: Versuche zur Demethylierung von 4-Brom-1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol

5.3 Versuche zur Synthese von 4-Brom-3,5-dinitro-1H-pyrazol

In einer Publikation von Rudolf Hüttel und Friedrich Büchele^[51] war die Synthese von N-Nitro-pyrazolen beschrieben, bei der durch Umsetzung von 1H-Pyrazol **52** mit Essigsäure/Essigsäureanhydrid und rauchender Salpetersäure das gebildete Nitroniumion zunächst den tertiären Stickstoff des Pyrazolringes angreift (**64**), da hier eine höhere Nucleophilie zu erwarten ist. Anschließende Deprotonierung ergab das N-Nitro-pyrazol **65**.



Die präparative Bedeutung dieser Synthese lag darin, dass durch direkte Nitrierung nicht zugängliche C-Nitro-pyrazole durch die schonende N-Nitrierung und anschließende thermische Umlagerung erhalten werden konnten. Ein weiterer Syntheseanatz zur Herstellung von Verbindung 63 ging von der in 4-Position bromierten Verbindung 59 aus. Anschließend sollte diese Verbindung selektiv N-nitriert und thermisch umgelagert werden. Durch erneute Einführung einer Nitrogruppe am Stickstoff in 1-Position gefolgt von einer Umlagerung sollte dann das 4-Brom-3,5-dinitro-1H-pyrazol 63 liefern. Durch die Verringerung der Elektronendichte in dem aromatischen Pyrazolring sollte dann eine Reaktion mit Ammoniak als Nukleophil leicht möglich sein. Nachfolgende **Abbildung 35** zeigt die geplante Reaktionssequenz.



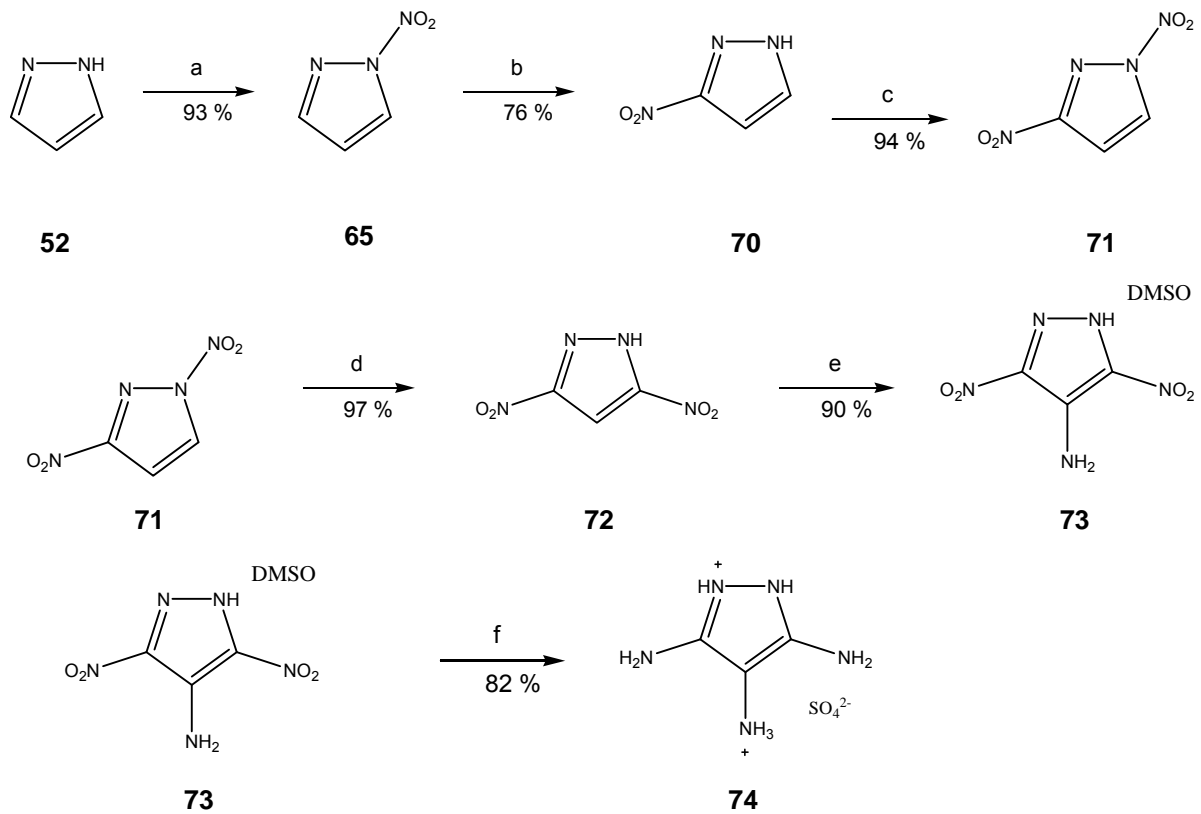
a) AcOH/Ac₂O, HNO₃ (100%ig) b) Benzonitril, Rückfluß c) AcOH/Ac₂O, HNO₃ (100%ig) d) Benzonitril, Rückfluß e) NH₃

Abbildung 35: Geplante Reaktionssequenz zur Herstellung der methyolfreien Verbindung

Während der Synthese traten bei der letzten Umlagerung nach N-Nitrierung Probleme auf. Während die N-Nitrierung von Verbindung **59** noch problemlos und in guten Ausbeuten das Produkt **66** lieferte, das dann in Verbindung **67** umgelagert werden konnte, traten bei der thermischen Umlagerung von Verbindung **68** Schwierigkeiten auf. Das Edukt **68** zersetzte sich schon nach sehr kurzer Reaktionszeit in eine Vielzahl von Reaktionsprodukten. Die Separation dieser Produkte erwies sich als schwierig, so dass keine Aussage über die erhaltenen Produkte gemacht werden konnte. Die gewünschte Zielverbindung **63** konnte nicht isoliert werden.

5.4 Synthese von 1H-Pyrazol-3,4,5-triamin-sulfat durch Aminierung von 3,5-dinitro-1H-pyrazol und anschließende Reduktion

R. Schmidt et al.^[52] berichteten 2001 von einem Reagens zur direkten Aminierung von aromatischen Verbindungen. Demnach sollte die Einführung einer Aminogruppe in den Pyrazolring in 4-Position mit 1,1,1-Trimethylhydraziniumiodid **174** in DMSO als Lösungsmittel mit guten Ausbeuten möglich sein. Nach Durchführung der Reaktion konnte das gewünschte Produkt dann auch erhalten werden, das dann nach Reduktion der beiden verbliebenen Nitrogruppen zu der entsprechenden „tris-aminieren“ Verbindung umgesetzt werden konnte. Sowohl das 4-Amino-3,5-dinitro-1H-pyrazol, als auch das 1H-Pyrazol-3,4,5-triamin-sulfat konnten in elementaranalysenreiner Form erhalten und zusätzlich mittels Röntgenstrukturanalyse charakterisiert werden. Im Folgenden sind das Reaktionsschema, sowie die Bedingungen und die Röntgenstrukturen der beiden Verbindungen dargestellt.



a) AcOH/Ac₂O, HNO₃ (100%ig) b) Benzonitril, Rückfluß c) AcOH/Ac₂O, HNO₃ (100%ig) d) Benzonitril, Rückfluß e) Trimethylhydraziniumiodid (TMHI), KOTBu, DMSO f) H₂/Pd/C; H₂O/H₂SO₄

Abbildung 36: Synthese von 1H-Pyrazol-3,4,5-triamin-sulfat

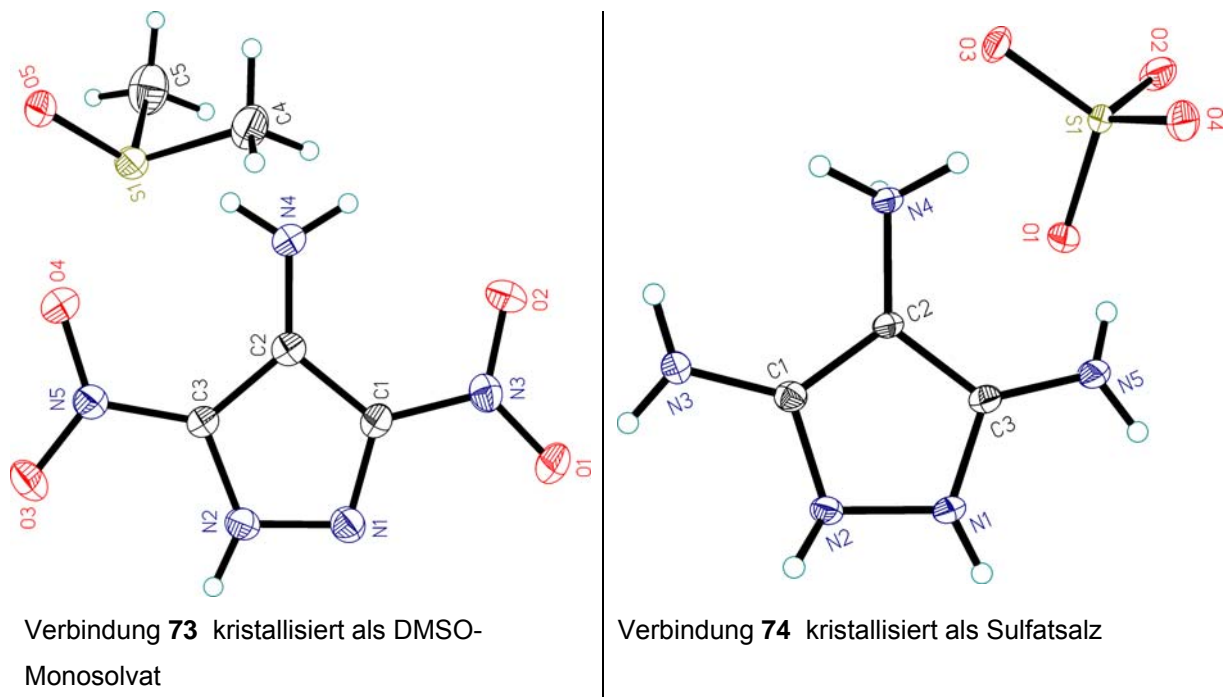
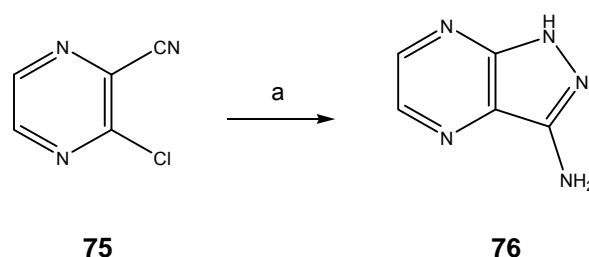


Abbildung 37: Kristallstrukturen der beiden Verbindungen **73** und **74**. Beide Verbindungen konnten in analysenreiner Form zum einen als DMSO-Monosolvat (**73**), zum anderen als Sulfatsalz (**74**) erhalten werden.

5.5 Synthese von 1H-Pyrazolo[3,4-b]pyrazin-3-ylamin

Die literaturbekannte^[53] Synthese dieser bityklischen Verbindung **75** erfolgte in einem Reaktionsschritt in Ethanol als Lösungsmittel in sehr guten Ausbeuten von 94%. Diese Verbindung stellte zugleich die erste Struktur dar, in die das 1H-Pyrazol-3,4,5-triamin **54** integriert war. Durch die Einführung eines Pyrazinringes sollte zum einen das Molekül strukturell erweitert werden, um die Bindungseigenschaften an die TAR-RNA eventuell zu verbessern, zum anderen sollte die Möglichkeit für „Stacking-Wechselwirkungen“ der aromatischen Grundgerüste erhöht werden.



a) EtOH/Hydrazinhydrat, 94%

Abbildung 38: Einstufige Synthese der bityklischen Verbindung

5.6 Synthesestrategie zur Herstellung des Phthalimidderivates

Nach erfolgreicher Synthese des 1H-Pyrazol-3,4,5-triamin-sulfates **74** und der Herstellung der Pyrazinverbindung **76**, sollten nun noch zwei weitere Ringe an das Grundgerüst von Verbindung **76** anneliert werden. Der Aufbau der Zielstruktur sollte ausgehend von einfachen, käuflichen Grundbausteinen durch eine konvergente Synthesestrategie realisiert werden. Ausgehend von 1H-Pyrazol **52** sollte in drei Syntheseschritten Verbindung **61** hergestellt werden. Diese Verbindung enthielt in 4-Position mit einem Bromatom eine gute Abgangsgruppe, so dass eine nukleophile Substitution, erleichtert durch den zusätzlichen Elektronenzug der beiden Nitrogruppen, mittels eines Stickstoffatoms leicht erfolgen sollte. Der zweite Kupplungspartner **79** sollte ausgehend von dem käuflichen und sehr billigen Phthalimid ebenfalls in drei Stufen hergestellt werden. Nachfolgende Kupplung der beiden Bausteine **61** und **79** sollte eventuell unter dem Einsatz von Kupfer und Kupfer-(I)-salzen in einem aprotischen Lösungsmittel erfolgen. Als letzter Syntheseschritt war geplant, die Verbindung **78**

durch reduktive Zyklisierung mit NaBH_4 in alkalischer Lösung zur gewünschten Zielstruktur umzusetzen. Die ausgearbeitete Synthesestrategie zeigt folgende Abbildung

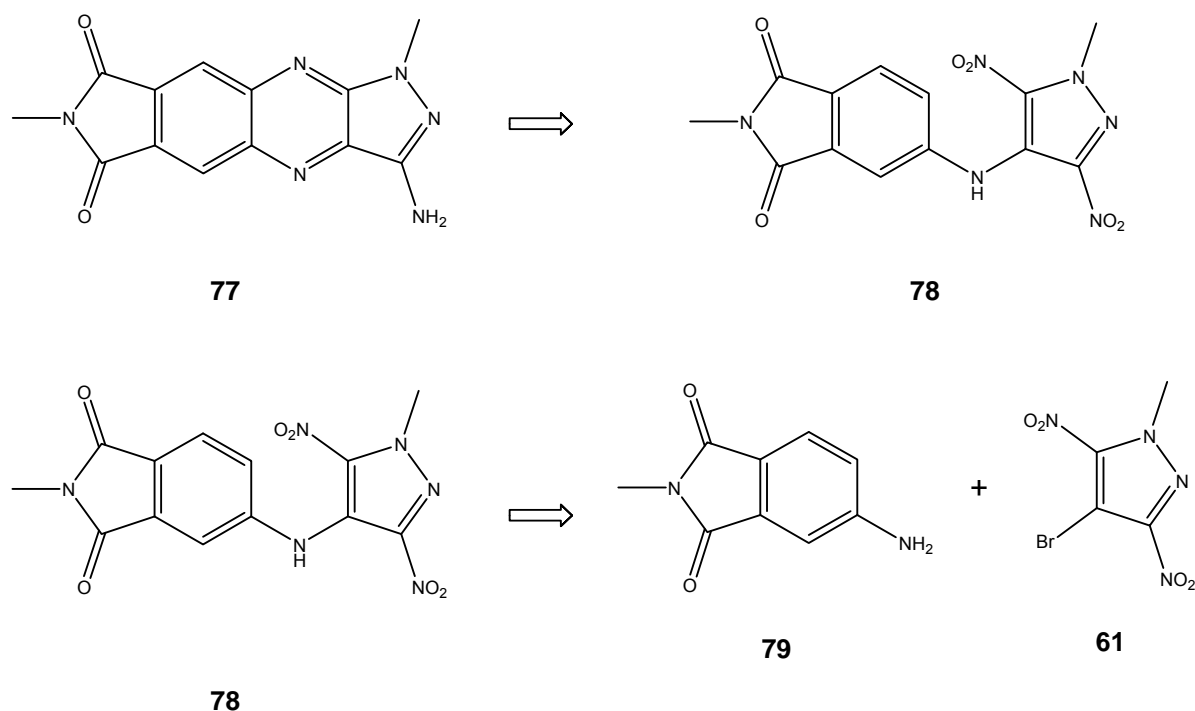


Abbildung 39: Retrosynthetische Übersicht zum Aufbau der Zielstruktur 77

5.7 Versuche zur Kupplung von 5-Amino-2-methyl-isoindol-1,3-dion mit 4-Brom-1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol

Nach der erfolgreichen Synthese der Verbindungen 61 und 79 sollten diese in DMSO bei 100 °C unter Ullmann-Bedingungen gekuppelt werden. Sämtliche Reaktionsversuche schlugen fehl, wobei eine Vielzahl von Versuchen zur Herstellung von Verbindung 78 unternommen wurde. Weder durch die Reaktionen mit verschiedenen Kupferkatalysatoren, noch durch die Variation der Lösungsmittel konnte die gewünschte Verbindung in ausreichender Menge erhalten werden. In einem einzigen Reaktionsansatz gelang die Synthese von Verbindung 78 in wenigen Milligramm, so dass nach säulenchromatographischer Aufreinigung ein $^1\text{H-NMR}$ Spektrum aufgenommen werden konnte, dass die Existenz der Struktur verifizierte. Leider konnte die Synthese zu keinem späteren Zeitpunkt reproduziert werden. In allen weiteren durchgeführten Reaktionsansätzen konnte kein Reaktionsumsatz beobachtet werden. Nachfolgende Tabelle zeigt nochmals die verwendeten Katalysatoren, sowie die Lösungsmittel und

übrigen Reaktionsbedingungen die zur Herstellung der gewünschten Verbindung angewandt wurden (Tabelle 5).

Tabelle 5: Reaktionsbedingungen für die Reaktion von 5-Amino-2-methyl-isoindol-1,3-dion mit 4-Brom-1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol

Lösungsmittel	Temperatur [°C]	Zeit [h]	Katalysator	Base	Ausbeute [%]
DMSO	100	3	-	-	0
DMSO	100	36	Cu/CuBr	-	2
DMSO	100	36	Cu/CuBr	KOH	0
DMSO	100	8	Cu/CuBr	K ₂ CO ₃	0
NMP	120	5	-	-	0
NMP	100	3	Cu/CuBr	-	0
NMP	100	3	Cu/CuBr	K ₂ CO ₃	0
NMP	100	3	Cu/CuBr	KOH	0
Toluol	Rückfluß	12	-	KOH	0
Toluol	Rückfluß	8	Cu/CuBr	-	0
Toluol	Rückfluß	8	Cu/CuBr	KOH	0
Pyridin	100	3	-	-	0
Pyridin	Rückfluß	3	Cu/CuBr	-	0
Pyridin	Rückfluß	8	Cu/CuBr	KOH	0

Da in keinem Fall der in Tabelle 5 durchgeführten Reaktionen eine Produktumsetzung beobachtet werden konnte (mit Ausnahme der zwei Prozent Ausbeute), wurden die Experimente zur Kupplung dieser beiden Bausteine eingestellt. Auch bei der weiteren Literaturrecherche konnten keine aussichtsreichen Reaktionsbedingungen, die eventuell andere Katalysatoren oder Lösungsmittel aufgezeigt hätten, gefunden werden. Es gelang, eine sehr geringe Menge einer intensiv fluoreszierenden Verbindung chromatographisch aufzureinigen (Eluent AcOEt:n-Hexan 3:1). Die auf diese Weise erhaltenen 7 mg einer gelblichen Verbindung wurden getrocknet und anschließend NMR-spektroskopisch vermessen. Es konnte gezeigt werden, dass es gelungen war, das Kupplungsprodukt zu isolieren. Auf der folgenden Seite sind die NMR-Spektren des gewünschten Produktes zu sehen (Abbildung 40 a und 40 b). Leider konnte die Synthese nicht mehr reproduziert werden. Weder unter gleichen, noch unter abgewandelten Reaktionsbedingungen (Tabelle 5) konnte die gewünschte Zielstruktur nochmals hergestellt werden.

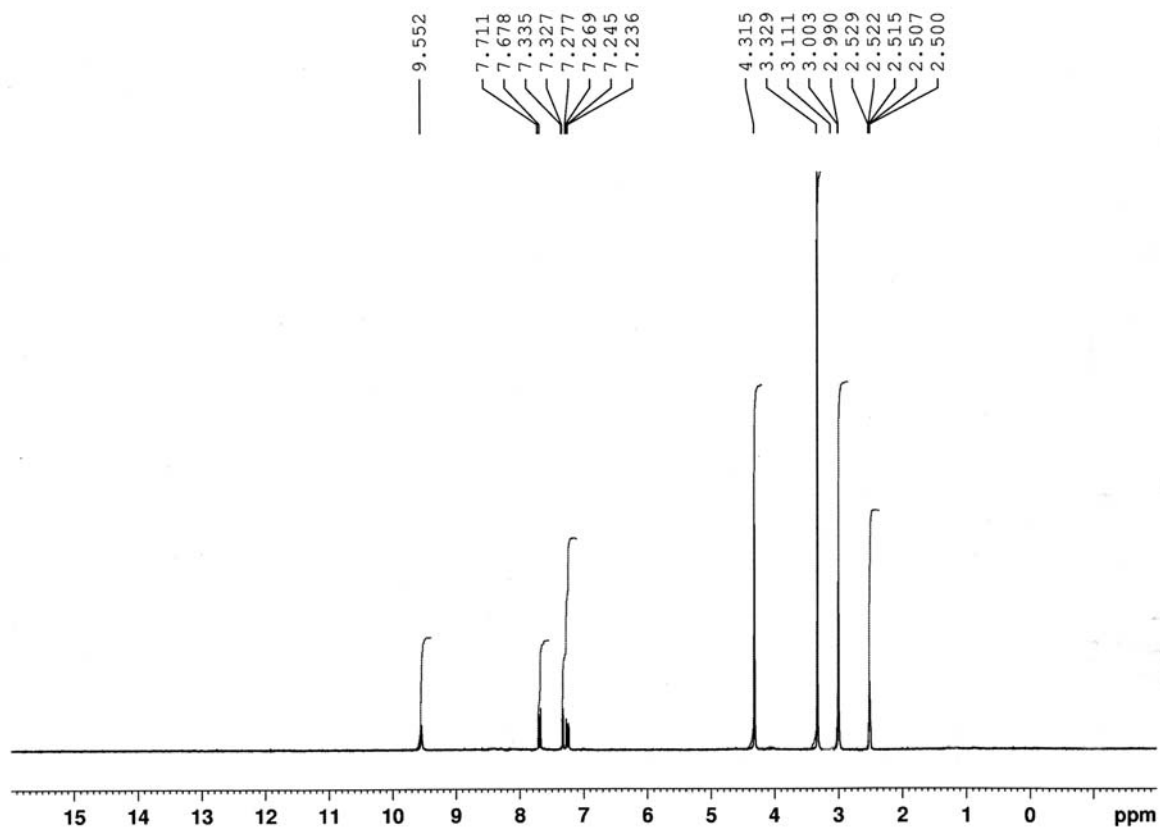


Abbildung 40 a) 250 MHz ¹H-NMR-Spektrum des Kupplungsproduktes 78

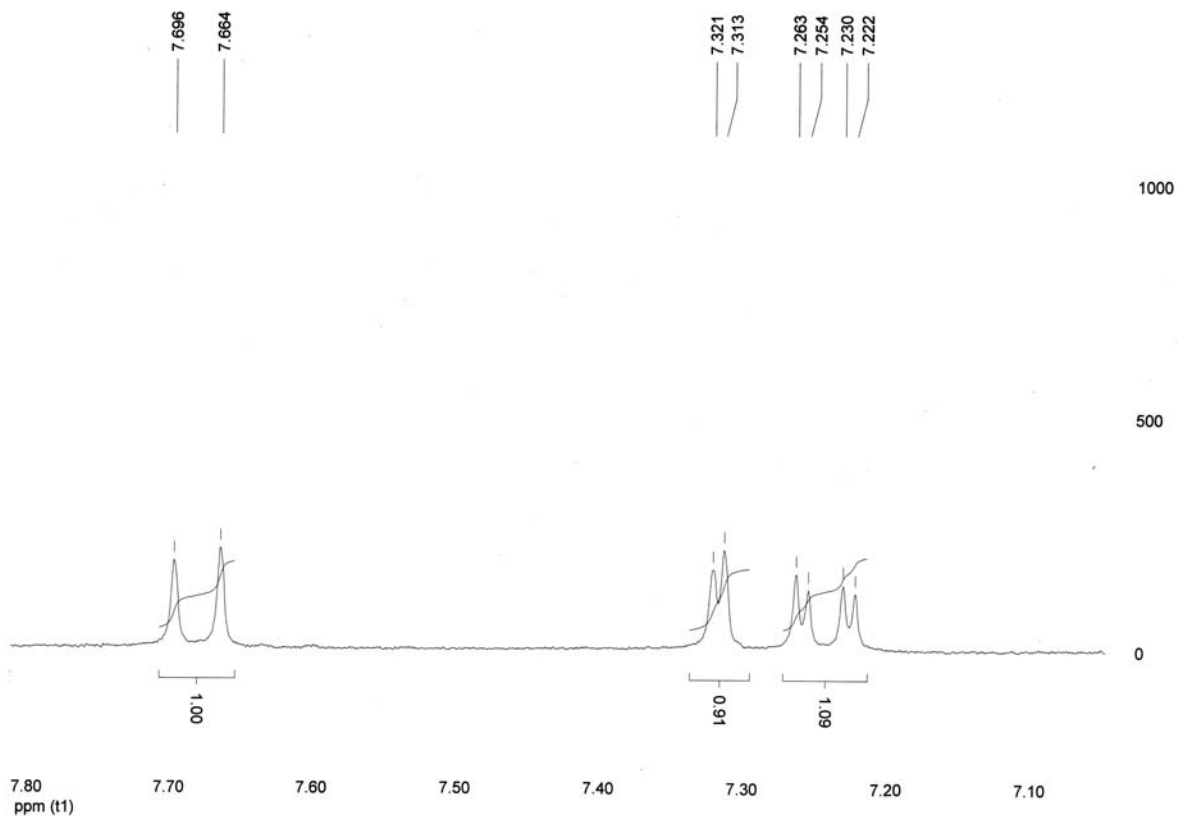


Abbildung 40 b) integrierte Ausschnittsvergrößerung des aromatischen Bereiches von 78

Mögliche Gründe für das Scheitern der Kupplungsversuche lagen in der sehr herabgesetzten Reaktivität des Phthalimidderivates **79**. Durch den starken Elektronenzug der beiden Carbonylfunktionen wurde die Nucleophilie des Stickstoffs der Aminogruppe so weit herabgesetzt, dass sie nicht mehr ausreichte das Bromatom in 4-Position der Pyrazolverbindung zu substituieren. Ein neues Synthesekonzept sah nun vor, das Phthalimidderivat in Form eines 4-Aminobisbenzylalkohols an die Pyrazolverbindung **61** zu koppeln. Durch die Reduktion des Amids zum Alkohol sollte die Nucleophilie des Stickstoffs der Aminogruppe erhöht und eine Reaktion mit Verbindung **61** ermöglicht werden. Ausgehend von 4-Nitrophthalsäure **80** sollte zunächst die Reduktion der beiden Carbonsäuregruppen erfolgen. Nach Umsetzung der Nitrofunktion mit Pd/C unter Wasserstoffgasatmosphäre zum freien Amin, sollte dann die Reaktion des 4-Aminobisbenzylalkohols **82** mit der bromierten Pyrazolverbindung **61** in DMSO bei 100 °C erfolgen. Nach Kupplung sollte das Reaktionsprodukt dann cyclisiert werden. Oxidation der beiden Alkoholfunktionen zur freien Carbonsäure und Reaktion mit Essigsäureanhydrid sollte dann die Zielverbindung liefern. Der große Vorteil dieser Reaktionssequenz sollte darin bestehen, dass nun eine Substitution der Anhydridfunktion mit unterschiedlichsten Aminen möglich gewesen wäre.

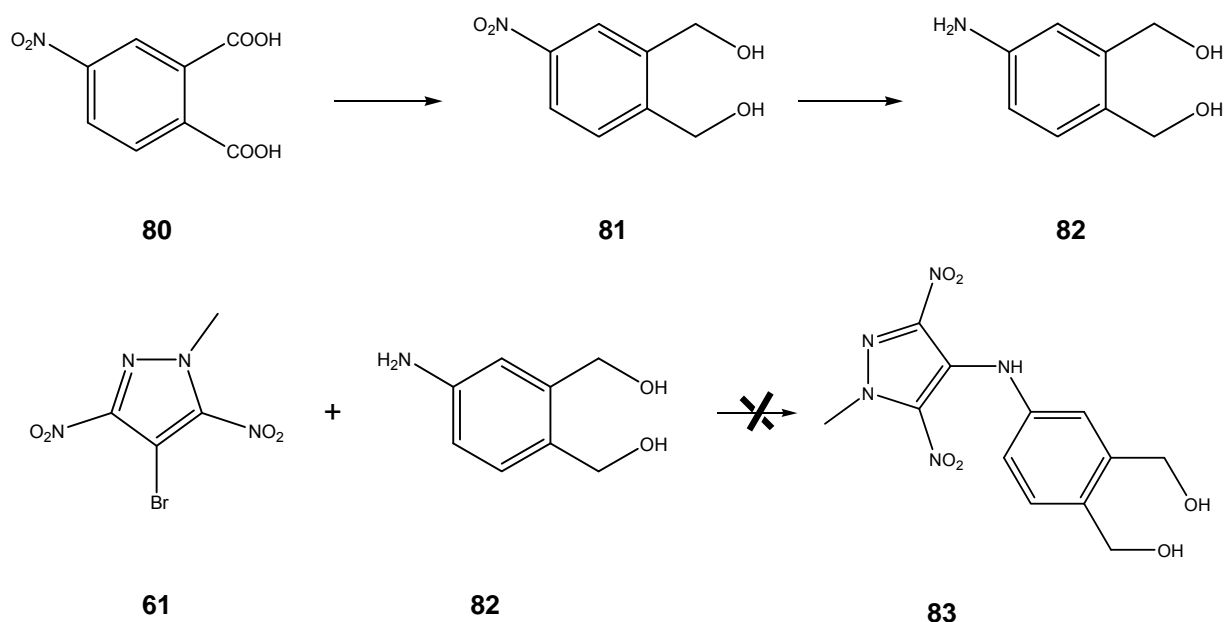


Abbildung 41: Gescheiterter Syntheseweg zur Herstellung der Zielverbindung

Die Herstellung von Verbindung **81** gelang nach einer Synthesevorschrift von A. I. Meyers et al.^[54] durch die Reaktion von 4-Nitrophthalsäure mit einer Mischung aus $\text{NaBH}_4\text{-I}_2$ in THF. Die reduzierte Verbindung konnte in Form eines bräunlichen Feststoffes isoliert werden. Anschließende Reduktionsversuche der Nitrogruppe mit Pd/C unter Wasserstoffdruck ergaben einen leicht gelblichen Feststoff, der nach Säulenchromatographie und Umkristallisation nicht in elementaranalysenreiner Form erhalten werden konnte. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigte, dass die Reduktion der Nitrogruppe erfolgreich war und ein Proton einer benzyllischen OH-Gruppe unter dem Signal der Aminogruppe lag. Nach Zugabe von D_2O waren die entsprechenden Signale verschwunden, wie die beiden nachfolgenden $^1\text{H-NMR}$ -Spektren deutlich zeigen (**Abbildung 42**).

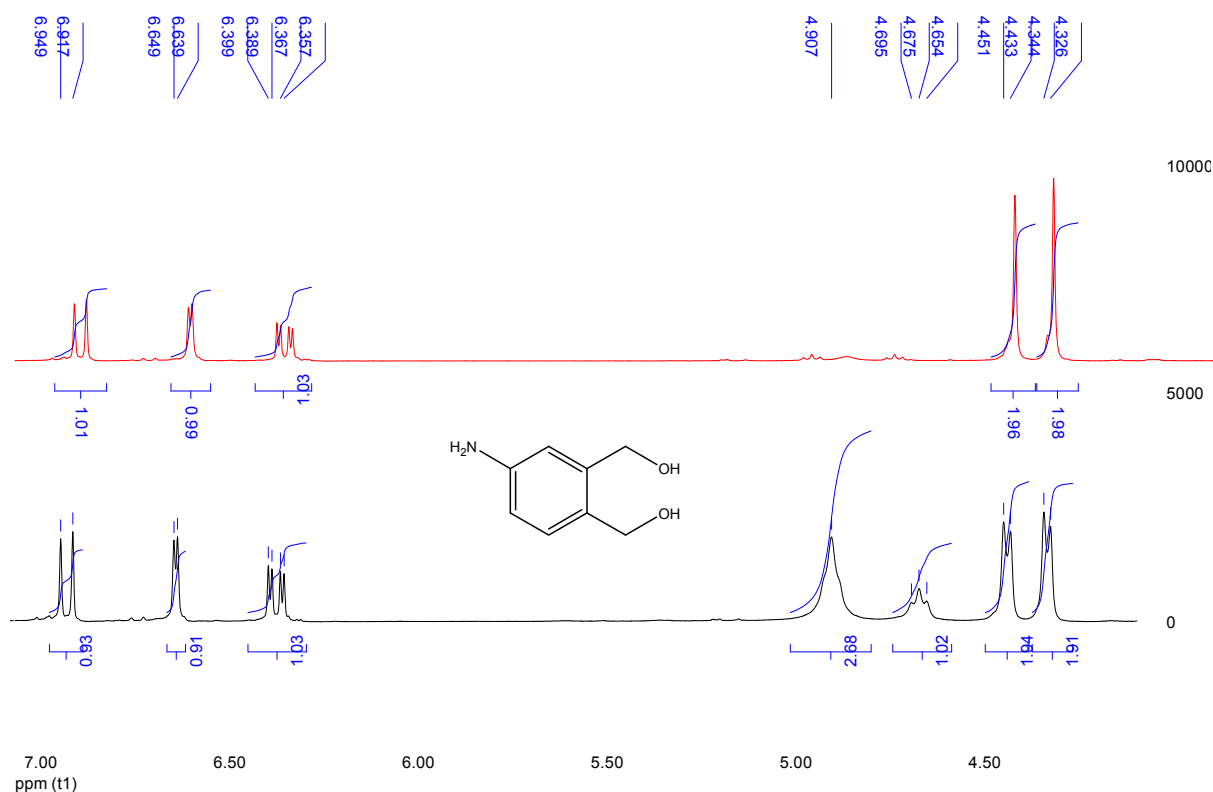


Abbildung 42: Ausschnittsvergrößerung des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums des (5-Amino-2-hydroxymethylphenyl)-methanols (schwarzes Spektrum), sowie nach Zugabe von D_2O (rotes Spektrum)

Im nachfolgenden Syntheseschritt sollte nun ein Testansatz zur Reaktion von dem Aminobisbenzylalkohol **82** mit 4-Brom-1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol gemacht werden, um die optimalen Reaktionsbedingungen bezüglich Lösungsmittel, Temperatur und eventueller Zugabe eines Katalysators, zu finden. Es stellte sich zudem die Fra-

ge, ob die beiden Hydroxygruppen vor der Reaktion geschützt werden mussten. Ein erster Reaktionsansatz wurde in einem protischen Lösungsmittel bei Raumtemperatur durchgeführt. Jedoch konnte in diesem Fall auch nach 36 Stunden Reaktionszeit kein Umsatz festgestellt werden. Der nächste Parameter, der nun variiert wurde, war die Temperatur. Bei Temperaturerhöhung traten jedoch Schwierigkeiten auf, die anfangs nicht erklärt werden konnten. Es stellte sich heraus, dass sich bei einer Erhöhung der Temperatur der Aminoalkohol vermutlich unter Ausbildung eines Chinonmethides zersetzte. Hinweise dafür gab es auch auf dem Dünnschichtchromatogramm (Abbildung 43). Waren zu Beginn der Reaktion noch zwei UV-aktive Spots der Edukte 4-Brom-1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol **61** (Edukt 1) und (5-Amino-2-hydroxymethyl-phenyl)-methanol **82** (Edukt 2) auf dem DC zu erkennen, so war nach sehr kurzer Reaktionszeit bei einer Temperatur von 40-50 °C der Spot für Edukt 2 verschwunden, ohne dass sich ein neues Produkt gebildet hatte. Auch bei allen weiteren Reaktionsansätzen, wobei nochmals Lösungsmittel und Temperaturen variiert wurden, konnte keine Produktumsetzung beobachtet werden.

Lösungsmittel	Temperatur [°C]	Zeit [h]	Umsatz [%]
MeOH	RT	36	0
MeOH	50	1	0
Toluol	RT	12	0
Toluol	50	1	0
DMSO	RT	12	0
DMSO	50	1	0
DMF	RT	12	0
DMF	50	1	0

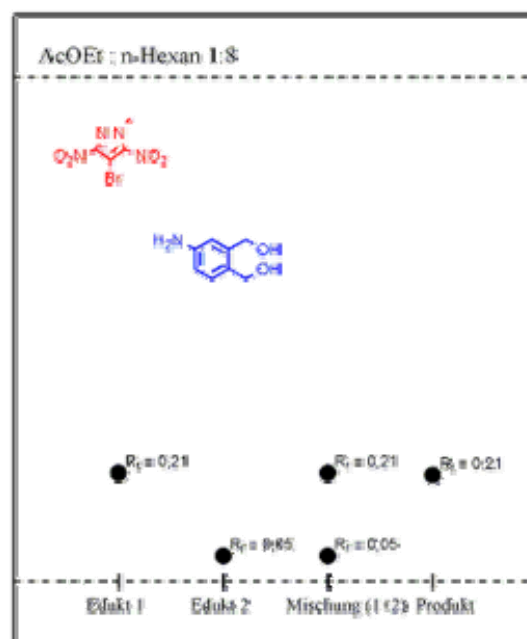
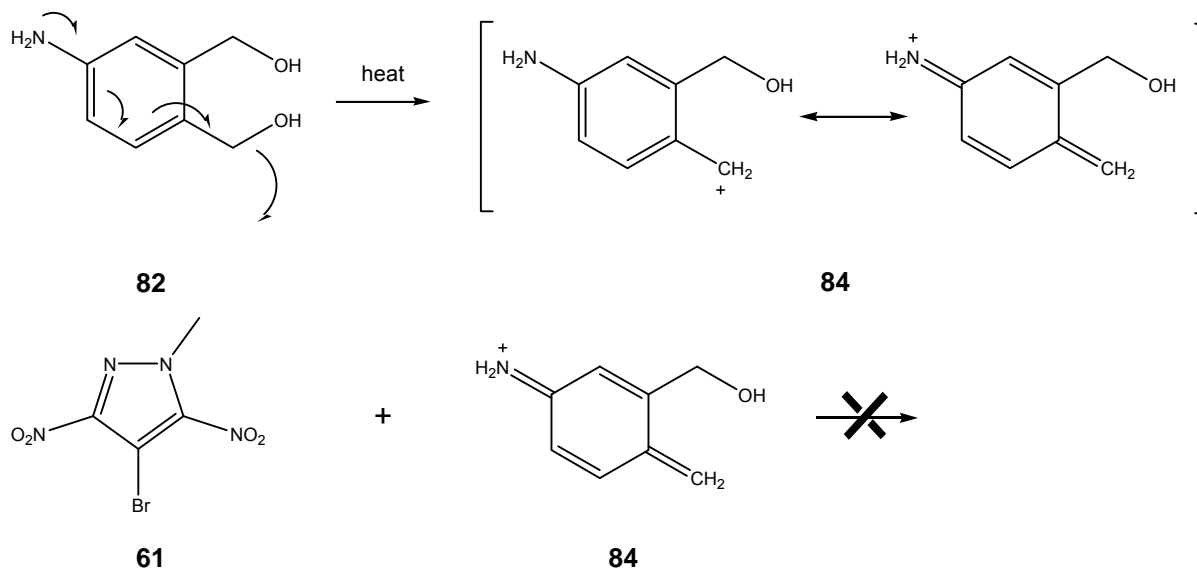


Abbildung 43: Dünnschichtchromatogramm der Reaktion von 4-Brom-1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol mit (5-Amino-2-hydroxymethyl-phenyl)-methanol (rechts) Gewählte Reaktionsbedingungen (links)

Ein möglicher Ansatz zur Erklärung dieser Reaktionsergebnisse besteht darin, dass sich der Aminoalkohol in der Hitze in einer intramolekularen 1,6-Eliminierung zu einem para-Chinonmethid umsetzt. In einer Publikation von Stefan Bräse et al.^[55] war ein ähnliches Reaktionsverhalten im Falle von 2-Aminobenzylalkoholen beschrieben.

Auch diese Verbindungen bildeten nach Erwärmung unter 1,4-Eliminierung ortho-Chinonmethide. Dadurch war die Nukleophilie der Aminogruppe so weit herabgesetzt, dass eine nukleophile Substitution nicht mehr möglich war.



Die Eliminierung dürfte in dem Fall von Verbindung **82** auch dadurch erleichtert werden, dass die Abgangsgruppe senkrecht auf der aromatischen Ringebene stehen kann. In einem weiteren Experiment wurde Verbindung **82** mit einer katalytischen Menge p-Toluolsulfonsäure in Toluol zum Rückfluß erhitzt. Nach kurzer Reaktionszeit konnte eine neue Verbindung isoliert werden, die keine OH-Gruppen mehr aufwies. Das ^1H -NMR-Spektrum, sowie Elementaranalyse, Schmelzpunkt und IR-Spektrum bestätigten die Existenz des 1,3-Dihydroisobenzofuran-5-ylamins **85**. Eine stereoelektronische Voraussetzung für die Eliminierung zum Chinonmethid ist die senkrechte Orientierung der Abgangsgruppe zum π -System des sich entwickelnden Produktes. Durch Säurebehandlung konnte das Diol in den cyclischen Ether überführt werden. Die beiden C-O-Bindungen liegen in der Molekülebene, wodurch die stereoelektronische Voraussetzung für die Chinonmethideliminierung nicht mehr erfüllbar ist. In Einklang mit dieser Erwartung zeigte Verbindung **85** keinerlei Zersetzung mehr, sondern reagierte mit dem 4-Brom-1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol **61** glatt zu dem gewünschten Produkt (**86**). Nach Zyklisierung der Verbindung mittels Natriumborhydrid in alkalischer Lösung, sollte die Herstellung der Zielverbindung dann durch selektive Oxidation der Methylengruppen erfolgen. Die NaBH_4 induzierte, reduktive Zyklisierung der Verbindung **86**, die möglicherweise über einen Radikal-Anion-Mechanismus verläuft^[56], ergab jedoch nicht das gewünschte Produkt. Nach Aufreinigung und Cha-

rakterisierung des Reaktionsproduktes mittels $^1\text{H-NMR}$ konnten die beiden erhaltenen Dubletts mit Kopplungskonstanten von jeweils 8.5 Hz dahingehend gedeutet werden, dass der Ringschluss nicht linear, sondern gewinkelt erfolgt sein musste.

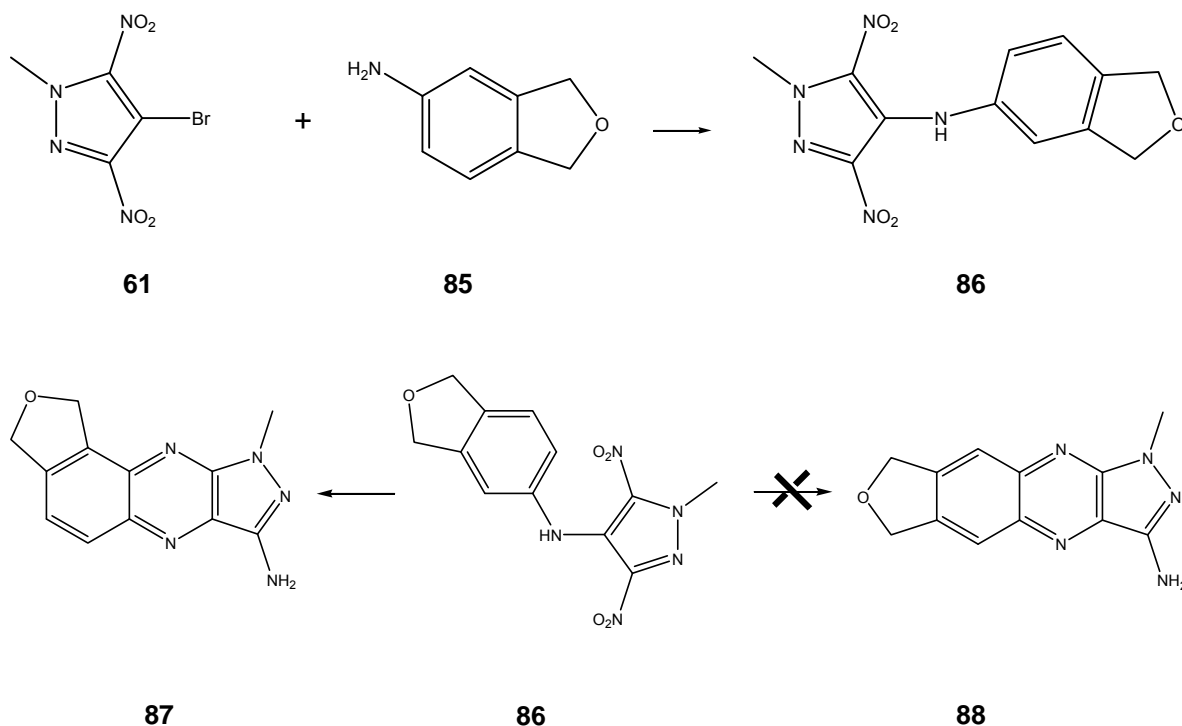


Abbildung 44: Syntheschema zur Herstellung von Verbindung **86**. Beim nachfolgenden Ringschluss, konnte Verbindung **87** als einziges Reaktionsprodukt erhalten werden

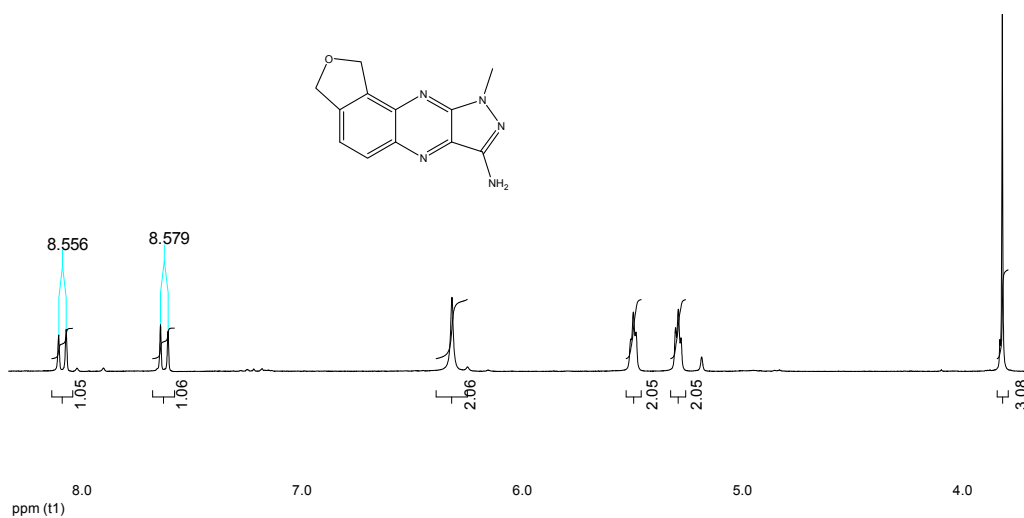


Abbildung 45: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Zyklisierungsproduktes **87**. Die Dubletts im aromatischen Bereich zeigen, dass die gewünschte Verbindung nicht erhalten werden konnte

5.8 Umsetzung verschiedener Amine mit 4-Brom-1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol

Die Kupplungsversuche verschiedener Amine mit Verbindung **61** gelangen in DMSO als Lösungsmittel mit Ausbeuten zwischen 19 und 87 %. Dabei konnte in allen Fällen (bis auf eine Ausnahme) auf die Zugabe von Kupfer/Kupfer-(I)-bromid, also auf die Reaktionsführung unter klassischen Ullmann-Bedingungen, verzichtet werden. Leider gelang die entscheidende Kupplung zur Synthese der Zielverbindung trotz Einsatz von Katalysatoren (Cu/Cu-(I)-bromid mit nur 2% Ausbeute. Nach Aufreinigung des Rohproduktes konnte ein ¹H-NMR-Spektrum aufgenommen werden, das die Existenz der Verbindung zeigte. Da die Synthese sehr ineffizient und mit extrem schlechten Ausbeuten verlief, sollte die Verbindung auf einem alternativen Weg hergestellt werden. Nachfolgendes Schema zeigt die synthetisierten Verbindungen, ausgehend von Verbindung **61**, sowie die Reaktionsbedingungen und die Ausbeuten (Tabelle 6).

Tabelle 6: Reaktionsbedingungen für die Reaktion von **61** mit verschiedenen Aminen

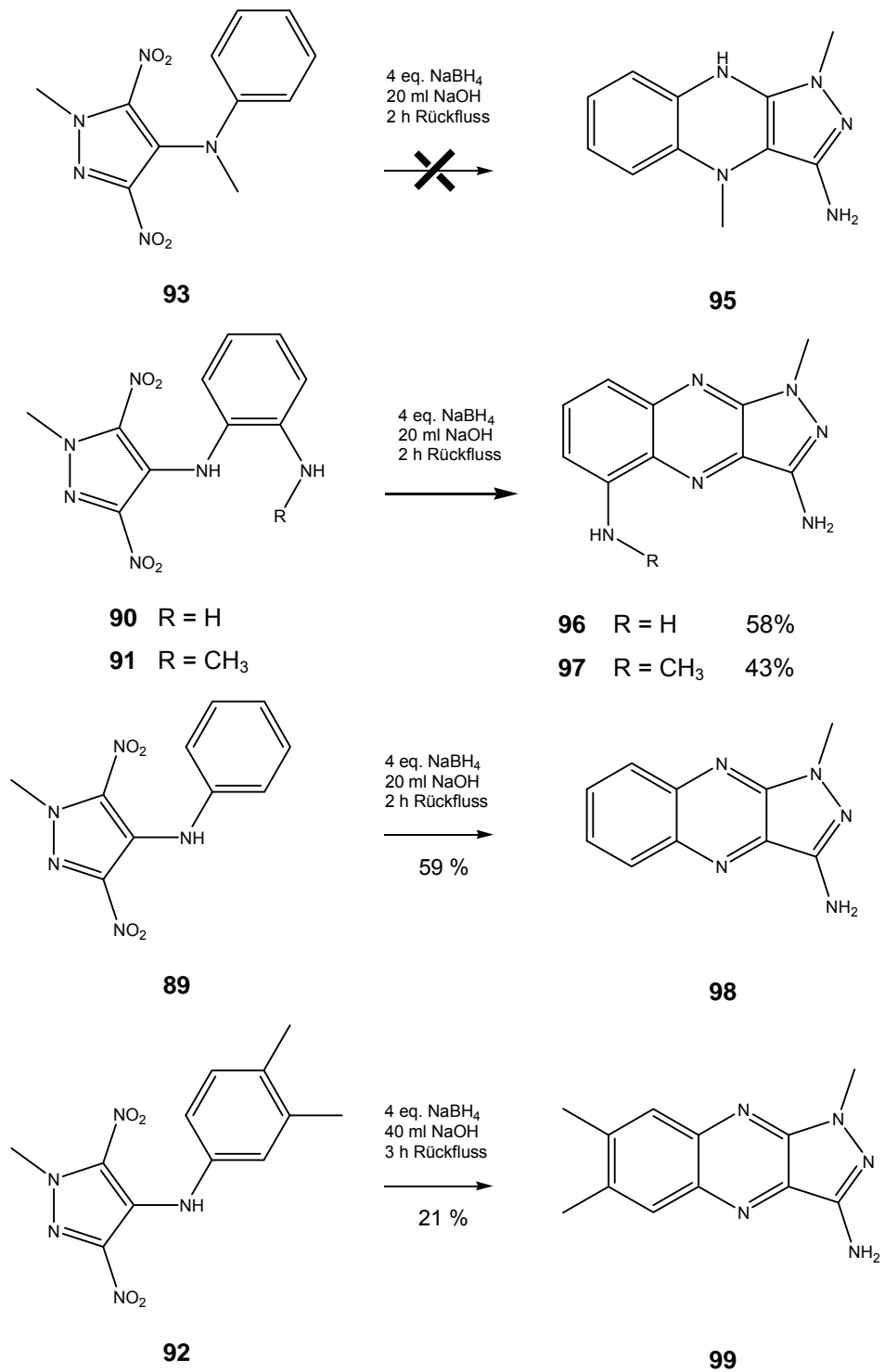
Edukt	eq. Amin	Temperatur [°C]	Zeit [h]	Lösungsmittel	Ausbeute[%]	Produkt
61	3.0	100	24	DMSO	52	89
61	3.0	100	8	DMSO	68	90 R = H
	2.2	100	36	DMSO	19	91 R=CH ₃
61	1.2	100	4	DMSO	49	92
61	1.1	100	5	DMSO	87	86
61	3.0	100	5	DMSO	65	93
61	3.0	50-60,dann RT	3	DMSO	50	94
61	3.0 +Cu/C uBr	100-130	36	DMSO	2	78

5.9 Natriumborhydrid induzierte, reduktive Zyklisierung der Kupplungsprodukte zu Phenazinderivaten

Nach eindeutiger Charakterisierung aller Kupplungsprodukte sollten nun die beiden Nitrogruppen reduziert und gleichzeitig eine Zyklisierung durchgeführt werden. F. G. Holliman et al.^[57] berichteten in einer schon im Jahre 1970 erschienenen Publikation über die Reaktion von aromatischen 2-Nitro-diphenylaminen mit NaBH₄ in alkalischer Lösung. Dabei sollten die entsprechenden Phenazine in Ausbeuten zwischen 32 und 80 Prozent erhalten werden. Das beschriebene Verfahren konnte in leicht abgeänderter Form, zur Herstellung der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Phenazinderivate angewendet werden. Holliman et al. setzten die verschiedenen 2-Nitro-diphenylamine mit jeweils 2 Äquivalenten Natriumborhydrid pro NO₂-Gruppe in 5 N ethanolischer Natriumethanolatlösung zu Phenazinen um. Im Rahmen dieser Arbeit wurde als Base in Anlehnung an eine Publikation von G. W. Rewcastle^[58] 2 N NaOH verwendet. Der Mechanismus dieser Umsetzung ist unklar. Ein über Nitrene verlaufender Weg ist ebenso denkbar, wie der bereits erwähnte Radikal-Anion-Mechanismus.

5.10 Versuche zur Synthese von 1,9-Dimethyl-4,9-dihydro-1H-pyrazolo[3,4-b]-chinoxalin-3-amin

Bei den Zyklisierungsversuchen traten bei Verbindung **93** Schwierigkeiten auf. Der Syntheseversuch wurde unter genau denselben Reaktionsbedingungen ausgeführt, unter denen auch schon der Ringschluss der anderen Verbindungen gelungen war. Nachdem die Reaktionspartner in dem entsprechenden stöchiometrischen Verhältnis zusammen gegeben worden waren, und der Ansatz zum Rückfluss erwärmt wurde, konnte das gewünschte Produkt nicht erhalten werden. Auch durch Variation der Reaktionsbedingungen gelang der Zyklisierungsversuch nicht. So konnte, nachdem ethanolische Natriumethanolatlösung als Base verwendet wurde, das gewünschte Produkt **95** ebenfalls nicht erhalten werden. Nach kurzer Zeit hatte sich das Edukt zwar umgesetzt, die dabei gebildeten Reaktionsprodukte konnten jedoch nicht isoliert und charakterisiert werden. Die Versuche zur Zyklisierung der Verbindung **93** wurden daraufhin nicht weiter verfolgt.

Abbildung 46: Synthese der Phenazinderivate durch NaBH₄ induzierte Zyklisierung

5.11 Synthese substituierter Benzofurazan-1-oxide

Im Rahmen dieser Dissertation wurden drei unterschiedliche Methoden zur Herstellung der entsprechenden precursor-Verbindungen für die Beirut-Reaktion angewandt. Je nach Verfügbarkeit der benötigten Edukte wurde die Abgangsgruppe durch Reaktion von o-Nitro-chlorverbindungen **100** mit NaN_3 in DMSO oder durch Diazotierung von o-Nitroanilinderivaten **103** und Zugabe einer wässrigen Natriumazidlösung generiert. Anschließende Thermolyse in Toluol lieferte nach Aufarbeitung die gewünschten Benzofurazan-1-oxide **102**. Die zwischenzeitlich erhaltenen Azido-Verbindungen wurden aus Sicherheitsgründen nicht weiter charakterisiert, sondern sofort in Toluol gelöst. Spuren von Wasser konnten erfolgreich durch mehrmaliges Trocknen der organischen Phase über MgSO_4 entfernt werden. Eine ebenfalls gängige Methode zur Synthese der Vorläuferprodukte ist die Reaktion der o-Nitroanilinderivate **103** mit einer wässrigen NaOCl -Lösung in basischer Ethanollösung. Nach Zugabe von Wasser schieden sich die gebildeten Benzofurazan 1-oxide ab. Es stellte sich heraus, dass zur Synthese sowohl die Reaktionen von o-Nitrohalogenverbindungen **100** mit NaN_3 in DMSO, als auch die Reaktionen der jeweiligen o-Nitroanilinderivate **103** mit NaOCl -Lösung besser geeignet waren, als die Diazotierungsreaktionen. Daher kamen zur Herstellung der Benzofurazan 1-oxide vorwiegend die Methoden **A** und **B** zum Einsatz. Methode **C** sei erwähnt worden, wurde jedoch nicht weiter verfolgt.

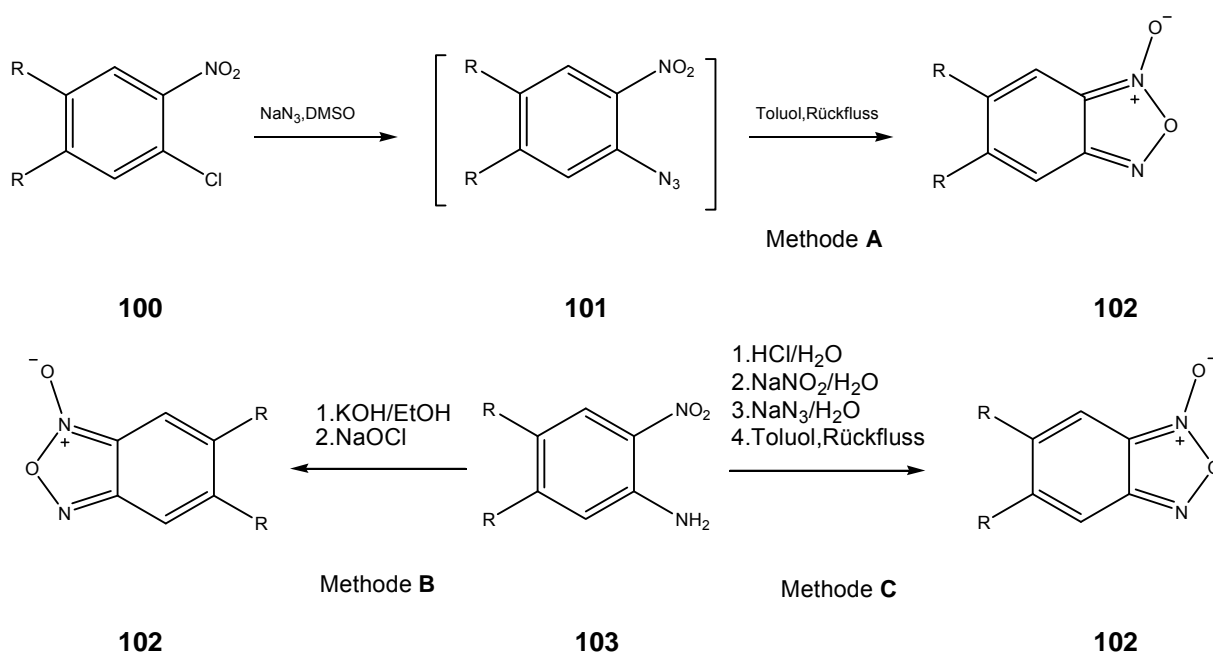


Abbildung 47: Methoden zur Herstellung substituierter Benzofurazan 1-oxide

5.12 Gleichgewichtsreaktion zwischen Benzofurazan 1-oxiden und ortho-Dinitrosoverbindungen

Sowohl Prinzbach^[59], als auch F. B. Mallory et al.^[60] berichteten unabhängig voneinander über NMR-Experimente bezüglich unsubstituierter und substituierter Benzofurazan-1-oxide. Demnach liegen diese Verbindungen in Lösung nicht ausschließlich als eine Verbindung vor, sondern stehen im Gleichgewicht mit einigen anderen valenzisomeren Formen. Die bei einigen unterschiedlichen Temperaturen gemessenen ¹H-NMR-Spektren bekräftigten diese Aussagen. Aufgrund der schnellen Gleichgewichtsreaktion zwischen den drei fluktuierenden Strukturen, konnte bei der Synthese der Benzofurazan 1-oxide bei einigen Strukturen nicht zwischen den Protonen in 4 und in 7 Position unterschieden werden.

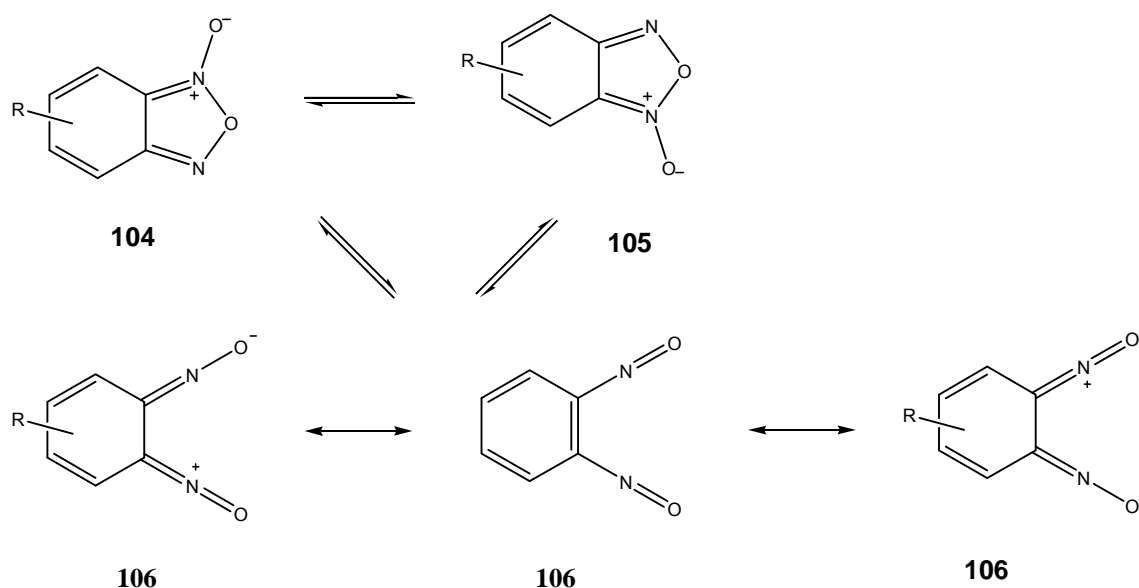
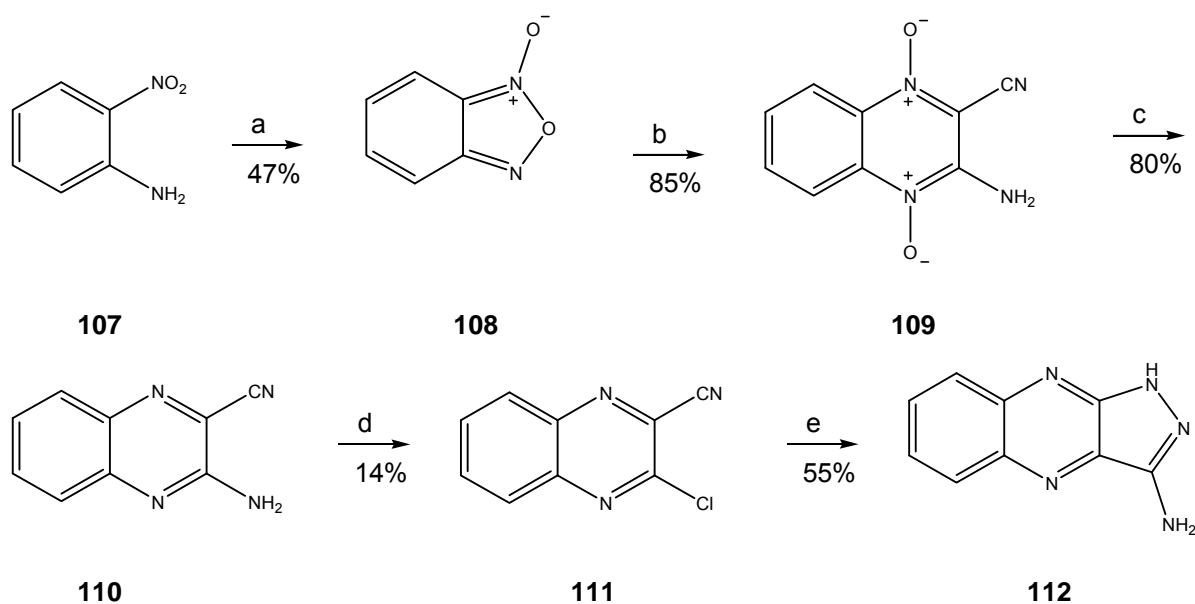


Abbildung 48: Mögliche Gleichgewichtsreaktionen zwischen Benzofurazan 1-oxiden und ortho-Dinitrosoverbindungen

5.13 Synthese von 1H-Pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3-ylamin

Da es bisher nicht gelungen war, mit Ausnahme von Verbindung **74** eine Struktur zu präsentieren, die am Pyrazolring-Stickstoff in 1-Position nicht methyliert war, sollte nun eine Syntheseroute zur Herstellung von methyolfreien Spezies erarbeitet werden. Alle Versuche zur Demethylierung von Verbindung **61** waren erfolglos, so dass dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde. Von A. Monge et al. wurde 1994 eine Synthese zur Darstellung substituierter Chinoxalinderivate publiziert^[61]. In Anlehnung an diese Synthesevorschrift sollte die Darstellung von 1H-Pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3-ylamin **112**, ausgehend von Benzo[1,2,5]oxadiazol 1-oxid (Benzofurazan-1-oxid) **108** in vier Syntheseschritten erfolgen. Aufgrund anfänglicher Lieferprobleme des benötigten Eduktes, erfolgte die Synthese ausgehend von o-Nitroanilin **107**. Dazu wurde o-Nitroanilin in ethanolischer KOH-Lösung gelöst. Nach der Zugabe von Natriumhypochlorit-Lösung konnte das Benzofurazan 1-oxid **108** nach Umkristallisation in Form gelber Nadeln erhalten werden. Die so entstandene Verbindung wurde dann in DMF mit Malonsäuredinitril in einer Beirut-Reaktion zu 3-Amino-1,4-dioxy-chinoxalin-2-carbonitril **109** umgesetzt. Nach Reduktion der Verbindung mit Na₂S₂O₄ konnten die Sauerstoffe entfernt werden, so dass Verbindung **110** nach Aufreinigung in Form von intensiv gelb gefärbten Kristallen erhalten werden konnte. Weiterhin war eine Diazotierungsreaktion vorgesehen, wobei die Aminogruppe in 3-Position durch ein Chloratom substituiert werden sollte. Die Reaktion wurde in einer Mischung aus AcOH und HCl durchgeführt und ergab das gewünschte Produkt als farblosen Feststoff **111**. In einem weiteren Ansatz wurde das Produkt nun in einer wässrigen Hydrazinhydratlösung suspendiert und zum Rückfluß erhitzt, wobei sich das Phenazinderivat **112** als intensiv rot gefärbter Feststoff ausschied. Nach Umkristallisation aus wenig MeOH konnte so die methyolfreie Komponente erhalten werden, deren Struktur auch durch Röntgenstrukturanalyse eindeutig bewiesen werden konnte. In den folgenden Abschnitten soll auf die Synthese und Herstellungsmethoden der substituierten Benzofurazan-1-oxide eingegangen werden. Aus diesen Verbindungen wurden dann durch Beirut-Reaktion als zentralem Schlüsselschritt in mehreren Synthesestufen die entsprechenden Phenazinderivate hergestellt.



- a) EtOH/KOH, NaOCl b) DMF/Malonsäuredinitril, kat. NEt₃ c) MeOH/H₂O, Na₂S₂O₄
 d) AcOH/HCl, NaNO₂/H₂O d) Hydrazinmonohydratlösung (24-26%)

Abbildung 49: Syntheseweg zur Herstellung des methylfreien Phenazinderivates 112

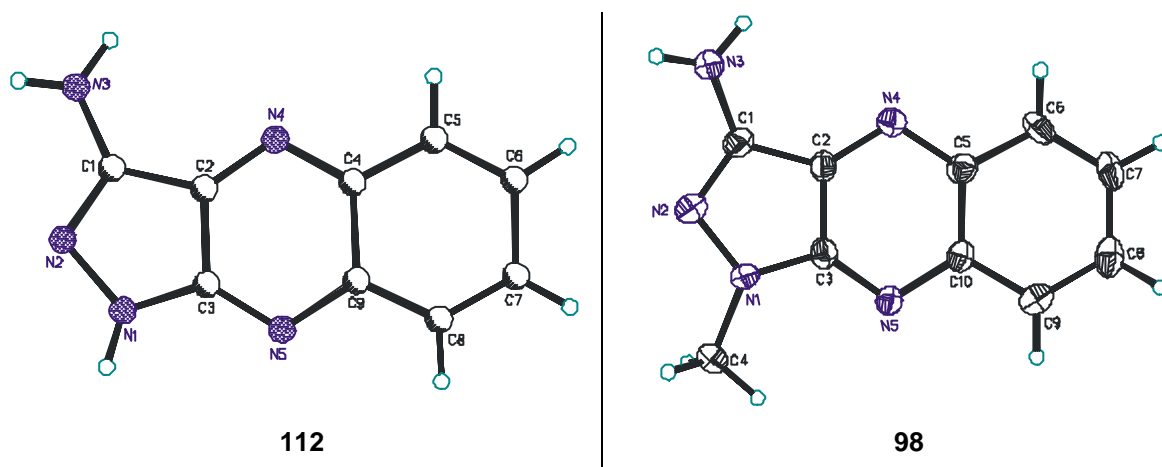
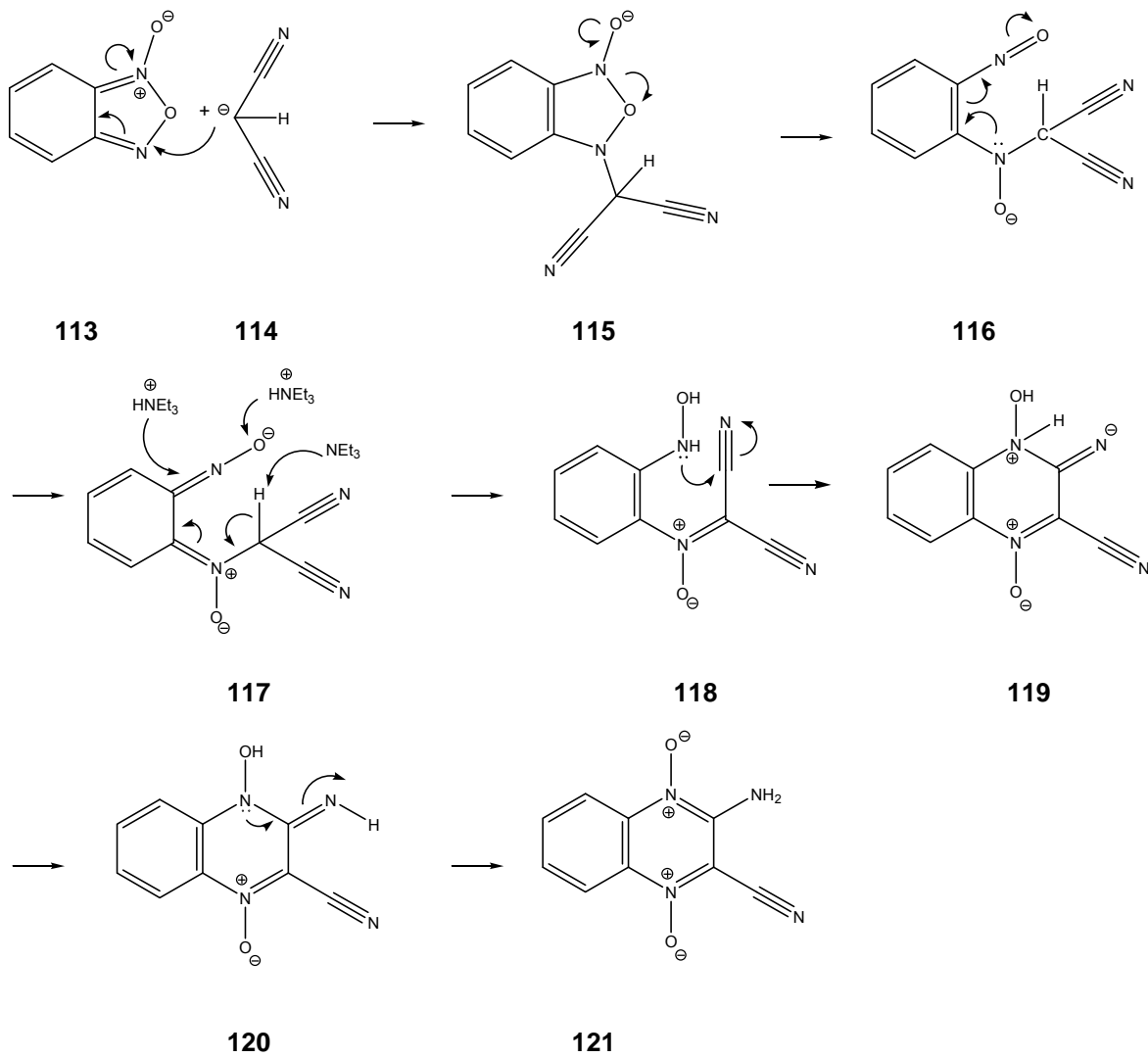


Abbildung 50: Nicht-methyliertes Phenazinderivat durch Beirut-Reaktion (linke Abbildung). Phenazinderivat mit Methylgruppe durch reduktive Zyklisierung (rechts)

Im Rahmen dieser Arbeit kam der Beirut-Reaktion eine zentrale Rolle beim Aufbau der weiteren Verbindungen zu. So konnten alle Phenazinderivate, die am Pyrazolring-Stickstoff keine Methylgruppe trugen, in einer sehr effizienten, konvergenten Synthesestrategie durch Reaktion der entsprechenden Benzofurazan 1-oxide mit Malonsäuredinitril in DMF erhalten werden. Für die Beirut-Reaktion sind zwei Mechanismen denkbar, die nachfolgend diskutiert werden sollen.

I.



II.

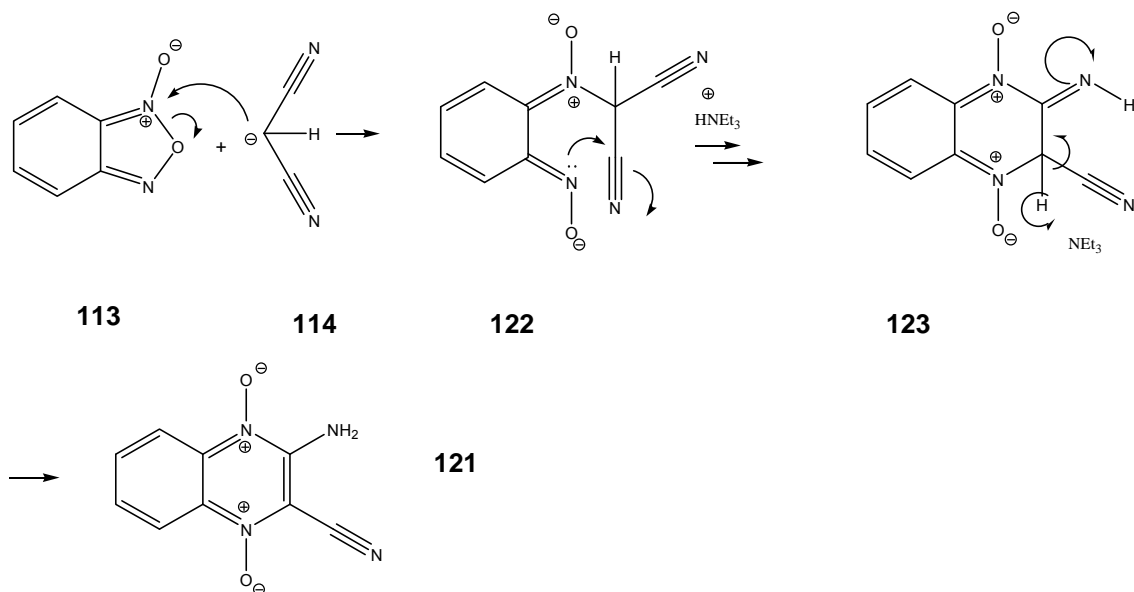
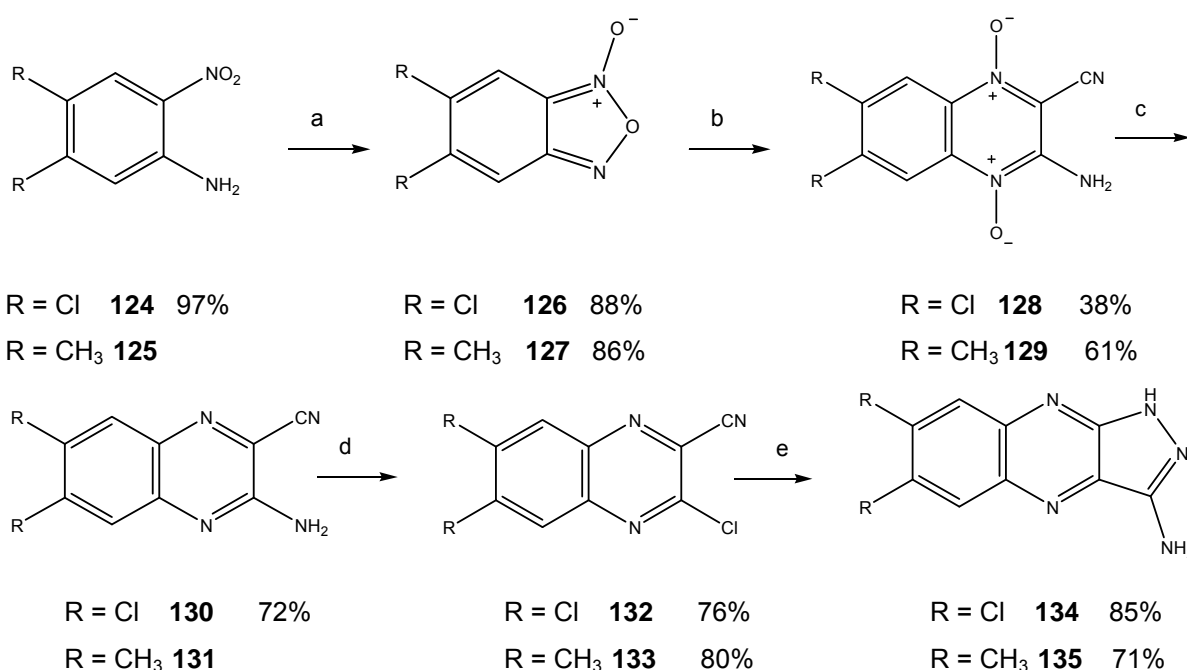


Abbildung 51: Mögliche Reaktionsmechanismen der Beirut-Reaktion

5.14 Synthese weiterer Phenazinderivate durch Beirut-Reaktion

Aufgrund des sehr effizienten Syntheseweges zur Herstellung von 1H-Pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3-ylamin bestand die Erwartung, dass Verbindungen mit weiteren Substituenten ebenfalls sehr leicht durch Beirut-Reaktion darstellbar sein sollten. Diese Substituenten sollten dann so gewählt werden, dass beispielsweise durch die Einführung zweier Methylgruppen mehr Informationen bezüglich des Raumanpruches der Phenazinderivate innerhalb der Bindungstasche der TAR-RNA gewonnen werden konnten. Auch sollte durch die Einführung von stark elektronenziehenden Substituenten das Redoxpotential der Verbindungen beeinflussbar sein. In Reduktionsversuchen, konnte gezeigt werden, dass die Phenazinderivate durch Natriumdithionit reduzierbar sind. Dazu wurde zu einer methanolischen Phenazinlösung der 10fache Überschuß einer wässrigen $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -Lösung zu gegeben. Dieser reversible Vorgang konnte anhand einer Entfärbung der anfangs leicht rötlichen Lösungen demonstriert werden. Nach kurzer Zeit jedoch bildete sich die rötliche Ausgangsfarbe wieder zurück. Durch die Reduzierbarkeit der Verbindungen erhoffte man, wie in dem Bindungsmodell beschrieben, die weitere Ausbildung einer zusätzlichen Wasserstoffbrücke, wodurch die Affinität zur TAR-RNA deutlich erhöht werden sollte.



- a) 1. EtOH/KOH 2. NaOCl b) DMF, Malonsäuredinitril, kat. NEt_3 c) MeOH/ H_2O , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$
 d) 1. AcOH/HCl 2. $\text{NaNO}_2/\text{H}_2\text{O}$ e) Hydrazinhydratlösung (24-26%)

Abbildung 52: Standardverfahren zur Herstellung verschiedener Phenazine

Alle hergestellten Phenazine wurden auf ihr Redoxverhalten nach der oben beschriebenen Art und Weise hin untersucht. Dazu wurden Vorversuche in kleinen Quarzküvetten gemacht. Der Vorteil dieser Art der Experimente lag darin, dass die Küvetten luftdicht verschließbar waren, und man auf diese Weise auch UV-Absorptionsspektren der entsprechenden Verbindungen in Abhängigkeit ihrer jeweiligen „Oxidationsstufe“ untersuchen konnte. Dazu wurde jeweils eine 100 μM Stammlösung der Phenazine hergestellt, zu der man dann bis zur qualitativen (quantitative Bestimmungen wurden auf diesem Weg nicht untersucht) Entfärbung der Stammlösung wässrige $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -Lösung zugab (1 mM). Das Entfärben der Lösung bzw. die Rückoxidation der Lösungen konnte dann durch die Küvetten und anhand der Spektren beobachtet werden. In der nachfolgenden **Abbildung 53** sind zwei unterschiedliche Phenazine jeweils in ihrer oxidierten und reduzierten Form dargestellt. Nach Zugabe der Reduktionslösungen blieben die Phenazine einige Zeit in der reduzierten Form stabil. Nach dem Öffnen der Küvetten konnte man jedoch nach kurzer Zeit die Reoxidation der Verbindungen beobachten. Wurden die Küvetten jedoch nicht geöffnet, dauerte der Oxidationsprozess wesentlich länger, so dass immer in Abständen einiger Minuten UV-Absorptionsspektren gemessen werden konnten. Diese Kurven wurden dann graphisch aufgetragen, so dass der zeitliche Verlauf der Redoxreaktion beobachtet werden konnte. Zwei UV-Spektren sind nachfolgend gezeigt. Die UV-Spektren der anderen Verbindungen sind im Anhang beigelegt.



Abbildung 53: Oxidierte und reduzierte (farblose) Form der Phenazine. Das linke Schaubild zeigt die Phenazin-Stammverbindung (1H-Pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3-ylamin) **112**. Das rechte Schaubild zeigt die Pyrazolring-N-methylierte Spezies **98** (1-Methyl-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3-amine) jeweils in der oxidierten (links) und der reduzierten (rechts, farblose Küvette) Form

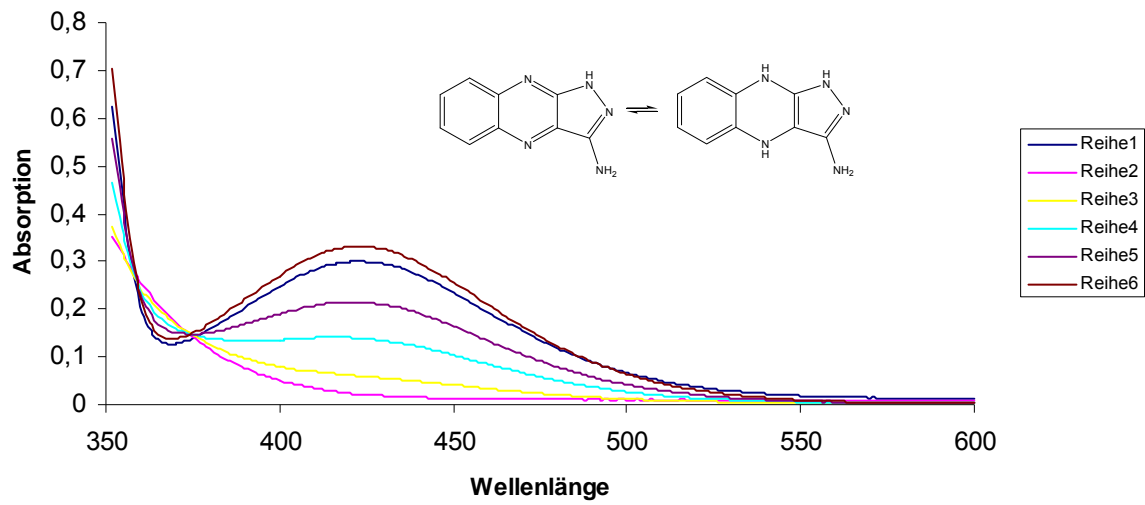


Abbildung 54: gemessenes UV-Spektrum von Verbindung 112

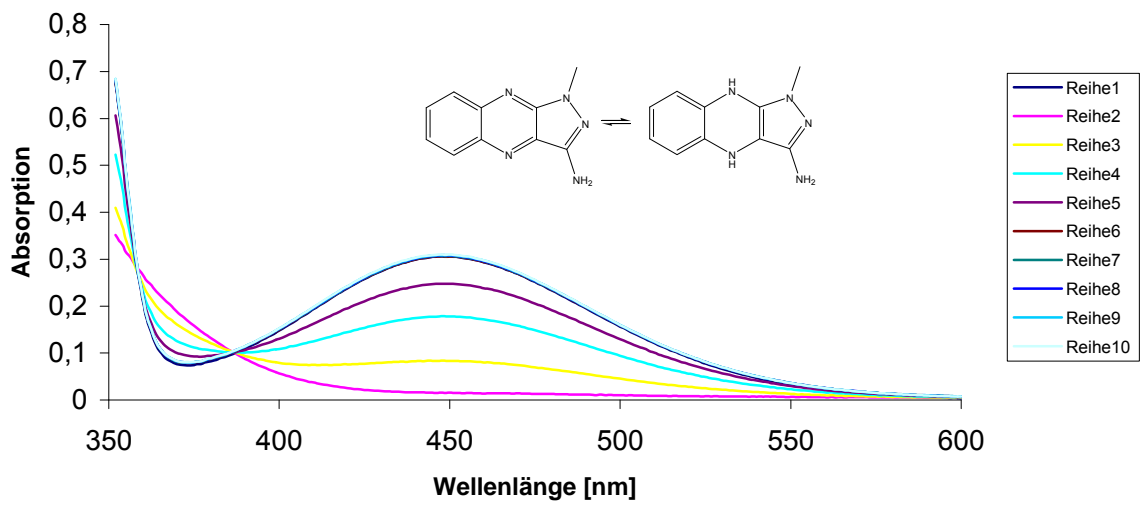
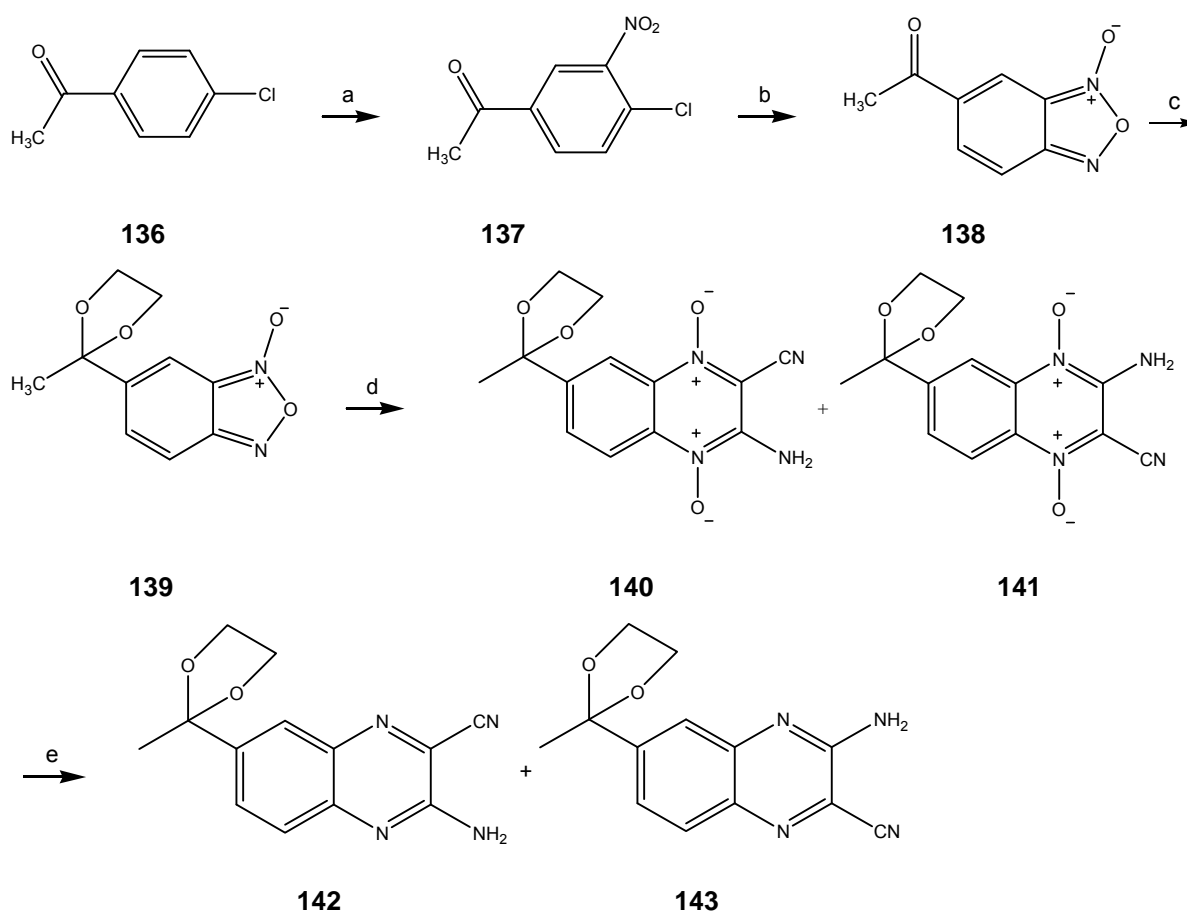


Abbildung 55: gemessenes UV-Spektrum von Verbindung 98

5.15 Synthese der beiden „Acetyl-Phenazine“ aus 4-Chlor-acetophenon

Ein weiterer wichtiger Aspekt zur Überprüfung des Bindungsmodells der synthetisierten Liganden bezüglich der TAR-RNA war die Einführung einer Carbonylgruppe. Diese sollte in der Lage sein, eine weitere Wasserstoffbrückenbindung zu der Base C 39 auszubilden (siehe **Abbildung 6**). Es bestand die Erwartung, dass diese Verbindungen in der reduzierten Form durch die Ausbildung weiterer H-Brücken die Affinität zur TAR-RNA weiter erhöhen sollten und daher gute TAR-Liganden sein sollten. Wie in vorherigen Abschnitten dieser Arbeit schon dargelegt, gelang die Synthese eines Phthalimidderivates, also potentieller „Donor einer Carbonylgruppe“ nicht. Es sollte nun eine Synthese zur Einführung einer Carboxylat-, Aldehyd- oder Carbonylgruppe erarbeitet werden. Hierbei bot sich nun der Einsatz eines Acetophenonderivates an. Das Edukt sollte in ortho-Position zur Nitrogruppe ein Halogenatom tragen, so dass eine Substitution durch eine Azidgruppe durchgeführt werden konnte. Da das käuflich zu erwerbende 4-Chlor-3-nitroacetophenon **137** sehr teuer war, und abzusehen war, dass aufgrund des ausgearbeiteten Synthesekonzeptes diese Verbindung in großen Mengen benötigt werden würde, wurde die Synthese der gewünschten Zielverbindungen ausgehend von dem sehr billigen 4-Chlor-acetophenon **136** realisiert. Die Nitrierung in 3-Position gelang mit sehr guten Ausbeuten von 87 %. Das weitere Konzept sah vor, das Chloratom anschließend durch eine Azidgruppe zu ersetzen, und die Verbindung dann durch thermische Eliminierung von Stickstoff in das entsprechende Acetylbenzofurazan-1-oxid **138** zu überführen. Schützungen der Acetylfunktion lieferte das Vorläufermolekül für die Beirut-Reaktion **139**. Bei der Durchführung der Beirut-Reaktion wurden zwei Regioisomere **140** und **141** erwartet und auch erhalten. Die beiden Verbindungen **140** und **141** wurden auf dieser Stufe jedoch nicht getrennt. Der gemessene Schmelzpunkt wurde als „Mischschmelzpunkt“ beider Regioisomeren bezeichnet. Anhand der spektroskopischen Analytik konnten diese Verbindungen nicht unterschieden werden. Trennversuche mittels HPLC erwiesen sich als schwierig, sodass beide Verbindungen in der nächsten Stufe eingesetzt wurden. Diese Stufe sah nun die reduktive Entfernung der Sauerstoffatome an den Ringstickstoffatomen mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ vor. Problematisch bei diesem Syntheseschritt war der extreme Ausbeuteverlust. Nach säulenchromatographischer Reinigung zur Entfernung der anorganischen Salze, bot sich auf dieser Synthesestufe aufgrund der nun unterschiedlichen Polarität der Verbindungen die Möglichkeit, die Regioisomeren jetzt

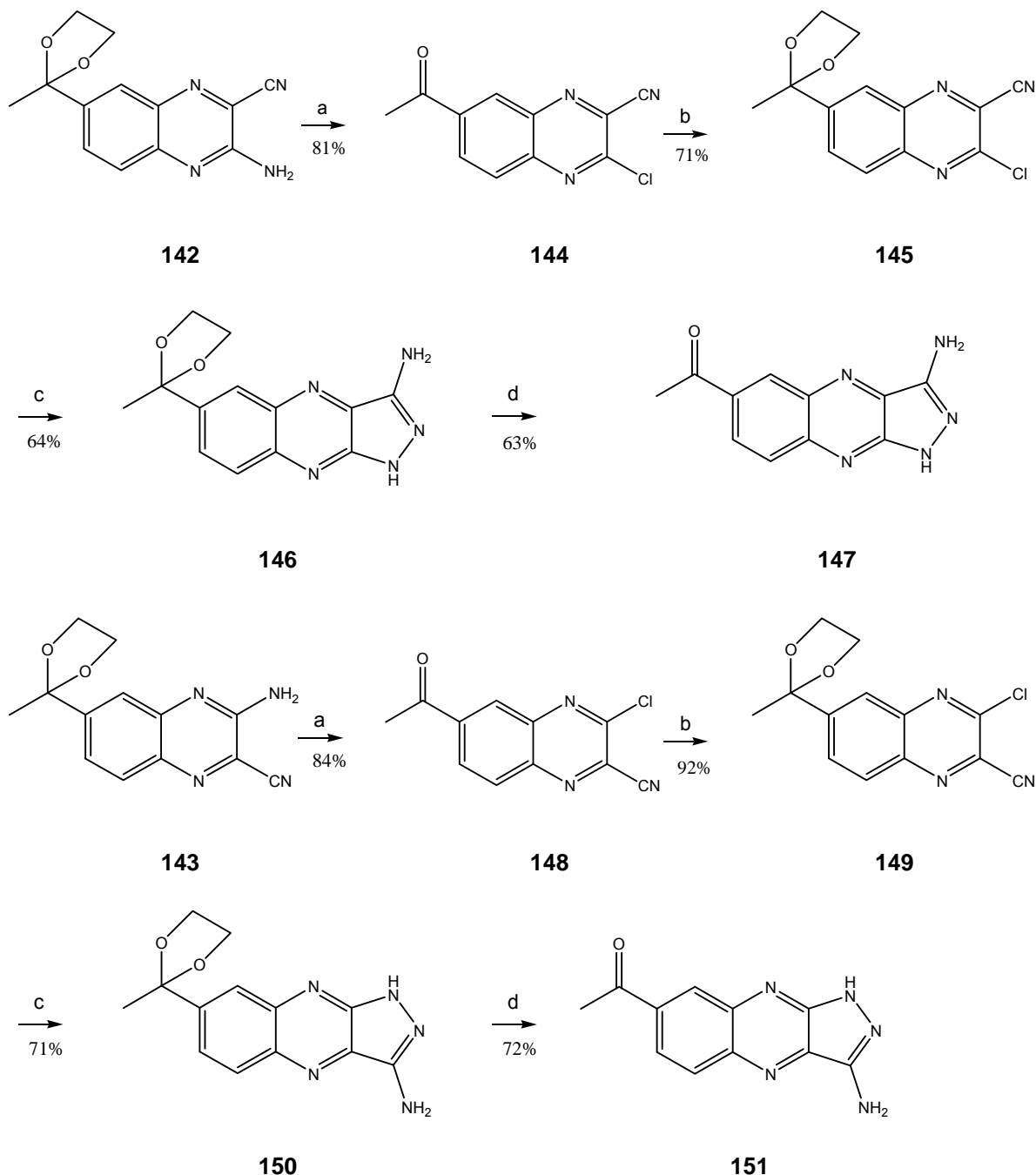
durch HPLC zu trennen (Eluent:AcOEt/n-Hexan/CH₂Cl₂ 2:1:3). Die beiden gewünschten Verbindungen konnten nun separiert werden und ergaben Ausbeuten von 5 % bei **142** und 12 % bei **143**. Bei der anschließenden Substitution der Aminogruppe gegen Chlor wurde zusätzlich die Schutzgruppe entfernt. Auch der Versuch die Aminogruppe nach einer von Monge et al.^[62] beschriebenen Methode mittels tert.-Butylnitrit und CuCl₂ in Acetonitril gegen ein Chloratom zu substituieren gelang nur unter gleichzeitigem Verlust der Ketalschutzgruppe. Nach erneuter Schützung konnten die beiden Verbindungen **145** und **149** getrennt voneinander jeweils zu den entsprechenden Phenazinderivaten zyklisiert werden und ergaben so die Verbindungen **146** und **150**. Durch säurekatalysierte Abspaltung der Schutzgruppen konnten nun die beiden gewünschten Zielstrukturen **147** und **151** erhalten werden.



a) H₂SO₄/HNO₃ (87%) b) 1. DMSO/NaN₃, 2. Toluol, Rückfluss (91%) c) Toluol, Ethylenglycol, p-TsOH, Rückfluss (91%) d) DMF, Malonsäuredinitril (83%) e) MeOH, Na₂S₂O₄/H₂O (5% für **142** und 12% für **143**)

Abbildung 56: Herstellung der beiden Isomeren **142** und **143**. Auf dieser Stufe gelang die Trennung

Die beiden intensiv gelb gefärbten Regioisomere wurden mittels HPLC säulenchromatographisch an Normalphase (Eluent: AcOEt:n-Hexan:CH₂Cl₂: 2:1:3) voneinander getrennt. Die weiteren Synthesestufen der einzelnen Verbindungen sind in nachfolgendem Schema getrennt voneinander dargestellt. Die eindeutige Charakterisierung erfolgte durch Röntgenstrukturanalyse der Verbindungen auf der Stufe **142** und **143**.



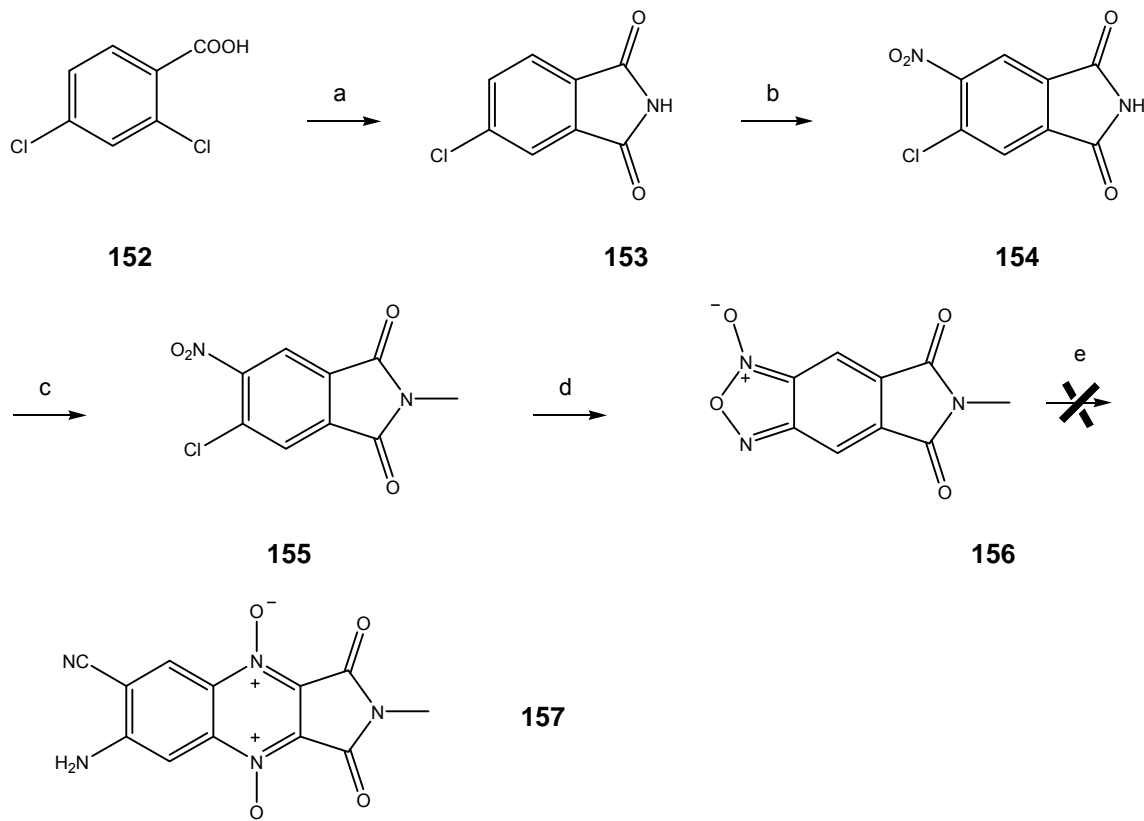
a) 1. AcOH/HCl 2. NaNO₂/H₂O b) Toluol, Ethylenglycol, p-TsOH, Rückfluss c) Hydrazinhydratlösung (24-26%ig) d) bei **147** Et₂O/HCl bei **151** Aceton/HCl (aq.)

Abbildung 57: Syntheschema zur Herstellung der beiden Acetylphenazine

5.16 Versuche zur Synthese von 3-Amino-7-methyl-1H-1,2,4,7,10-pentaaza-dicyclopenta[b,g]naphthalin-6,8-dion durch Beirut-Reaktion

Nach erfolgreich durchgeführter Synthese der oben beschriebenen Phenazinderivate, die keine Methylgruppe am Pyrazolringstickstoff enthielten, bot sich diese Synthesestrategie nun zur Herstellung des methylnfreien Phthalimidderivates an. Dazu sollte 5-Chlor-isoindol-1,3-dion in ortho-Position zu dem Chloratom nitriert werden. Leider war das einfach chlorierte Derivat käuflich nicht zugänglich, so dass es zuerst synthetisiert werden musste. Ausgehend von 2,4-Dichlorbenzoesäure **152** wurde der Aufbau des Phthalimidderivates durch Reaktion mit CuCN erreicht (**153**). Anschließende Nitrierung der Verbindung mit Nitriersäure, bestehend aus Oleum und 100%iger HNO₃ lieferte Verbindung **154**. Nach Methylierung des Phthalimidstickstoffs mit MeI in Aceton unter dem Einsatz von Kaliumcarbonat als Base konnte Verbindung **155** in sehr guter Ausbeute erhalten werden. Die Substitution von Chlor gegen Azid gelang anschließend in DMSO. Nach der Reaktion der Verbindung in siedendem Toluol gelang es, Verbindung **156** in 85 % Ausbeute zu isolieren. Nach Umkristallisation des gelblichen Rückstandes aus EtOH gelang es sowohl eine Elementaranalyse, als auch eine Röntgenstruktur von Verbindung **156** zu erhalten. Bei den Versuchen, das Vorläuferprodukt der Beirut-Reaktion **156** dann unter den gängigen Reaktionsbedingungen mit Malonsäuredinitril in DMF unter Zusatz katalytischer Mengen NEt₃ umzusetzen, traten erhebliche Schwierigkeiten auf. Bei der Durchführung der Beirut-Reaktion verfärbte sich die anfangs gelbliche Lösung intensiv rot. Bei allen vorherigen Reaktionsansätzen war ebenfalls diese rote Farbe der Reaktionslösung zu beobachten. Der Farbumschlag galt als Indiz für die Bildung der 3-Amino-1,4-dioxy-chinoxalin-2-carbonitril-Derivate. Bei allen durchgeführten Beirut-Reaktionen, war zu beobachten, dass das gewünschte Produkt mit zunehmender Reaktionszeit (meist über Nacht) aus der Lösung ausfiel. In diesem Fall konnte auch nach längerer Reaktionszeit keine Präzipitation der gewünschten Verbindung beobachtet werden. Daraufhin wurde das Lösungsmittel am Kugelrohr entfernt und der verbliebene rötlichbraune Rückstand säulenchromatographisch getrennt. In keiner der erhaltenen Fraktionen konnte das Produkt nachgewiesen werden. Auch massenspektroskopische Untersuchungen gaben keinen Hinweis darauf, dass das gewünschte Produkt in der Probe enthalten war. Sowohl das aufgenommene ¹H-NMR-Spektrum, als auch eine Verbrennungsanalyse lieferten unbefriedigende Ergebnisse.

Daraufhin wurden diverse Reaktionsparameter variiert, um eventuell Hinweise auf den Reaktionsablauf erhalten zu können. In keinem der Fälle konnte das gewünschte Produkt der Beirut-Reaktion **157** erhalten werden. Es konnte nicht geklärt werden, welche Verbindungen bei dieser Reaktion entstanden sind.



a) CuCN, Pyridin, 130 °C, (61%) b) H₂SO₄ (Oleum, 20% SO₃)/HNO₃ (100%ig), (8:1), 0 °C, dann RT, (62%) c) Aceton, K₂CO₃, Mel, Rückfluss, (82%) d) DMSO, NaN₃, Toluol, Rückfluss, (85%)

Tabelle 7: Versuche zur Beirut-Reaktion von Verbindung **156**

Solvens	Zeit [h]	Temperatur [°C]	Base	Farbe	Ausbeute [%]
DMF	3	RT	NEt ₃	rot	0
DMF	12	RT	NEt ₃	rot	0
DMF	48	0°C,dann RT	NEt ₃	rot	0
DMF	8	RT, dann 60°C	NEt ₃	rot	0
DMF	3	RT	Hünig-Base	rötlich	0
Toluol	5	RT	NEt ₃	rötlich-braun	0
Toluol	5	Rückfluß	NEt ₃	rötlich-schwarz	0
Toluol	3	0°C,dann RT	Hünig-Base	gelblich-rot	0
Pyridin	3	RT	kein	gelblich-rot	0
Pyridin	12	RT	NEt ₃	rötlich	0
Pyridin	4	Rückfluß	NEt ₃	rötlich	0

6 Charakterisierung der RNA-Liganden bezüglich ihrer Bindungsaffinität

Die Untersuchung der hier synthetisierten Verbindungen wurde mittels eines in unserer Arbeitsgruppe bereits in der Vergangenheit erfolgreich angewandten und etablierten Assays durchgeführt. Dazu wurde eine Methode, die im Jahre 2000 von Matsumoto et al. bereits in der Literatur zitiert wurde, leicht abgewandelt^[63].

6.1 Physikalisch-Chemischer Hintergrund

Chromophore sind in der Lage, Licht bestimmter Wellenlänge zu absorbieren und dabei in einen angeregten Zustand überzugehen. Beim Zurückfallen in den Grundzustand emittieren sie spontan elektromagnetische Strahlung einer längerwelligen Frequenz. Dieses Phänomen bezeichnet man als Fluoreszenz. Die Fluoreszenzspektroskopie macht sich genau diese Eigenschaften zu nutze. Ein Fluoreszenzmolekül, das sich im angeregten Zustand befindet, kann unter bestimmten Bedingungen seine Energie auch strahlungslos an ein anderes, zweites Molekül abgeben, wobei die Abstände zwischen den Molekülen bei diesem Vorgang bei 10-100 Å liegen. Diese Art der Wechselwirkung zwischen zwei nicht unmittelbar miteinander verbundenen Fluorophoren, die auf einer Art „Fernkopplung“ beruht, nennt man auch FRET-Effekt. (E luoreszenz Resonanz Energie Transfer). Die durchschnittliche Lebensdauer des angeregten Zustandes ist mit 10^{-9} Sekunden sehr kurz, und daher erfolgen Emission und Absorption in kurzem Abstand. Der Unterschied besteht jedoch darin, dass die Emission mit einer etwas geringeren Frequenz erfolgt, als mit der, die eingestrahlt wurde. Die Differenz der resultierenden Wellenlängen kann mit Hilfe des Stokes-Shiftes^[64] erklärt werden, und wird auch als Rotverschiebung bezeichnet. Die Intensität der beobachteten Wechselwirkung zwischen dem energieabgebenden Molekül, dem Donorfluorophor einerseits und dem energieaufnehmenden Molekül, dem Akzeptorfluorophor auf der anderen Seite, kann durch nachfolgende Gleichung beschrieben werden.

$$I = \lim_{a \rightarrow \infty} \int_0^a I_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) dt = I_0 \tau \quad (1)$$

I_0 = Intensität bei $t = 0$

τ = durchschnittliche Lebensdauer der Fluoreszenz

Eine entscheidende Kenngröße zur Beschreibung des FRET-Effektes ist die Effizienz mit welcher der Energie-Transfer zwischen den beiden Partnern vonstatten geht. Wird der Donor mit elektromagnetischer Strahlung bestrahlt, so strahlt dieser mit einer bestimmten Intensität zurück. Ist in unmittelbarer Nachbarschaft jetzt aber ein Akzeptor, so nimmt die Intensität ab. Gleichermaßen ist ein Anstieg der Intensität der Emission des Akzeptors zu erkennen, sofern dieser fähig ist, zu fluoreszieren. Die Transfer-Effizienz erhält man somit aus dem Verhältnis der Quanten, die pro Zeiteinheit vom angeregten Donorzustand auf den Akzeptor übertragen werden, zur Gesamtzahl der in der gleichen Zeiteinheit vom Donor absorbierten Photonen. Man kann für E daher auch schreiben.

$$E = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D} \quad (2)$$

I_{DA} = normierte Intensität des Donors bei Anwesenheit eines Akzeptors

I_D = normierte Intensität des Donors bei Abwesenheit eines Akzeptors

Ergibt sich für E_{FRET} ein Wert von 1, so kann man aus Gleichung (2) erkennen, dass die gesamte Energie vom Donor auf den Akzeptor übertragen wurde. Daraus folgt, dass beim Donor keinerlei Fluoreszenz mehr zu erkennen ist. Zur Beurteilung des beobachteten FRET-Effektes werden u.a. die Größe der Überlappung des Emissionsspektrums des vorhandenen Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors, die relative Orientierung der Donor- und Akzeptordipole zueinander, sowie die Abstände zueinander herangezogen.

FRET: Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer

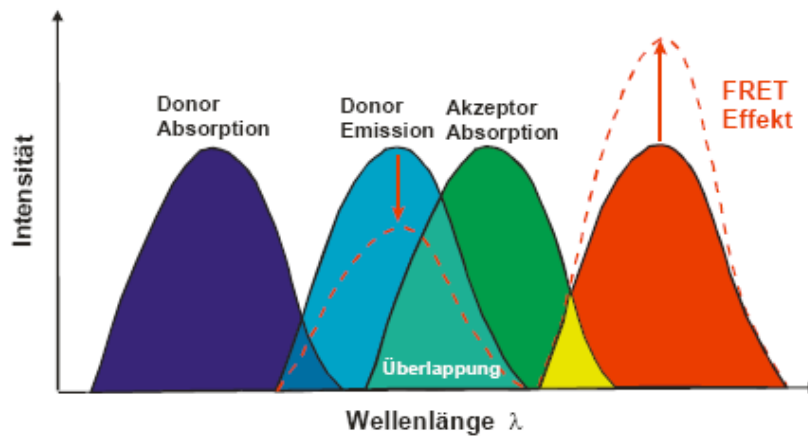
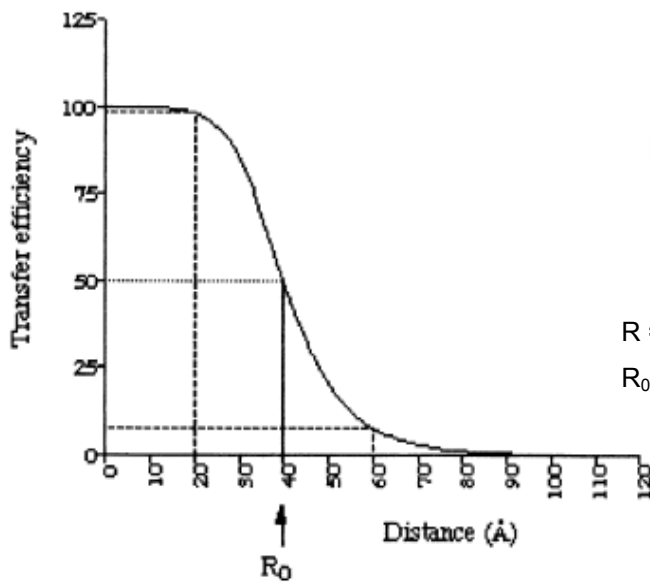


Abbildung 58: Entstehung eines FRET-Effektes bei optimaler Überlappung des Emissionsspektrums und des Absorptionsspektrums



$$E_{\text{FRET}} = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6} \quad (3)$$

R = Abstand zwischen Donor/Akzeptorpaar
 R₀ = Förster-Radius

Abbildung 59: Abhängigkeit der Transfereffizienz vom Abstand r

Berücksichtigt man noch die Abstandsabhängigkeit, so wird E_{FRET} durch eine von Förster beschriebene Gleichung definiert. Nach Förster sollte die übertragene Energie proportional dem Kehrwert des Abstandes der beiden Fluorophore zur sechsten Potenz sein.

Aus der Korrelation der Strahlungsintensität bezüglich der Molekülabstände ergibt sich folgende Gleichung:

$$\frac{I_D}{I_{DA}} = 1 + \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \quad (4)$$

Der Förster Radius gibt also genau den Abstand an, bei dem die Effizienz der Energieübertragung 50 % beträgt, was auch aus obiger Grafik zu ersehen ist. Der gemessene Betrag des Förster-Radius ist auch abhängig von der Wahl der beiden Fluorophore. In den letzten Jahren hat sich die FRET-Technik stark weiterentwickelt und wird in immer größerem Umfang zur Bestimmung von Abständen u.a. in Biomolekülen eingesetzt. Die Anzahl der eingesetzten Farbstoffe ist sehr groß, wobei im Rahmen dieser Arbeit nur die Farbstoffe Fluorescein und Tetramethylrhodamin Verwendung fanden.

6.2 Anwendung des FRET-Assays zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten

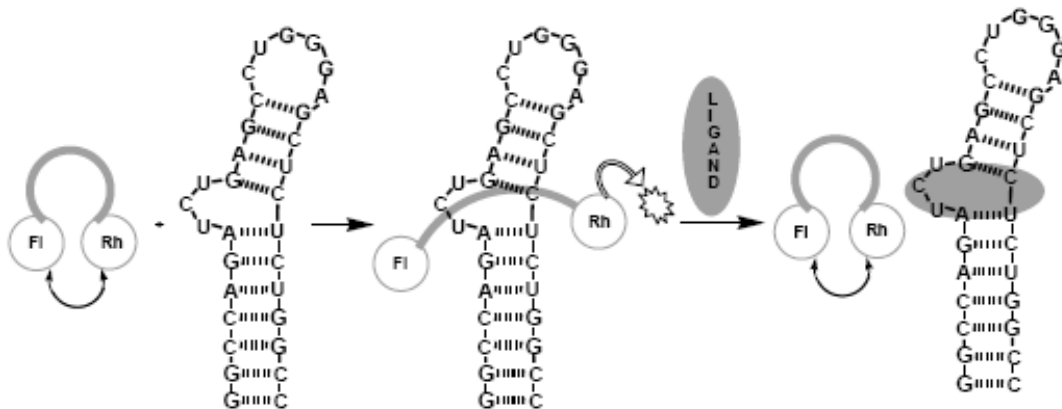


Abbildung 60: Schematischer Aufbau des Verdrängungs-Assays (FRET-Assay)

Alle im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen, die als potentielle RNA-Liganden in Frage kamen, wurden mittels des in unserem Arbeitskreis etablierten FRET-Assays auf ihre Bindungseigenschaften hin untersucht. Dazu wurde eine kurze Sequenz des bekannten Tat-Peptides, bestehend aus 16 Aminosäuren verwendet, das mit zwei Fluorophoren gelabelt war. Am aminoterminalen Ende des Peptides wurde der Farbstoff Fluorescein gekuppelt, während die Markierung am carboxyterminalen Ende mit Tetramethylrhodamin über eine Thiolgruppe eines Maleinimidlinkers erfolgte. Um unerwünschte Wechselwirkungen der beiden Farbstoffmoleküle mit der RNA zu unterbinden, wurde auf beiden Seiten eine aus jeweils drei Alaninresten bestehende „Spacersequenz“ eingeführt.

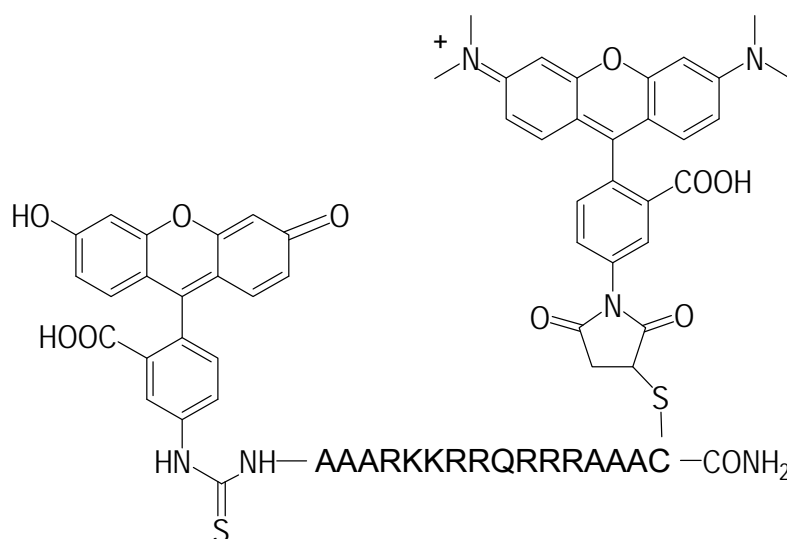


Abbildung 61: Farbstoffgelabeltes Tat-Peptid (Fluorescein-Tat-Rhodamin, FTatRh)

Das mit den beiden Farbstoffen markierte Tat-Peptid liegt in Abwesenheit von RNA in einer *random-coil*-Konformation vor, bei der der Abstand der beiden Farbstoffe sehr gering ist und es zu einem „intramolekularen Quenchen“ kommt. In diesem Zustand kann man wenig Fluoreszenzeffekte beobachten. Geht die RNA jedoch mit dem Tat-Peptid in einen gebundenen Zustand über, äußert sich dies in einer etwa 2.6fachen Verstärkung der Fluoreszenz. Innerhalb dieses Komplexes aus RNA und Peptid nehmen diese beiden Fluorophore einen größeren Abstand zueinander ein, der eine Abnahme des Quench-Effektes zur Folge hat. Die Anregung von Fluorescein im Wellenlängenbereich von 489 nm ergab eine darauffolgende Emission von Licht bei einer Wellenlänge von 530 nm. Die Energie wurde dann auf das Rhodamin übertragen, dessen Absorptionsmaximum bei 540 nm liegt und welches im Wellenlängenbereich von 590 nm ein Emissionsmaximum aufweist. Die für die FRET-Messungen benötigte RNA wurde von der Firma Biospring bezogen. Dabei betrug die letztendlich für die FRET-Messungen verwendete Konzentration an RNA 10 nM. Die Bestimmung der IC_{50} -Werte der synthetisierten Verbindungen erfolgte bei einer 1:1-Stöchiometrie von TAR-RNA und Tat-Peptid. Zur Bestimmung der Affinität der potenziellen RNA-Liganden zur TAR-RNA wurde der auftretende FRET-Effekt in Abhängigkeit der Ligandkonzentration untersucht. Das Prinzip dieser Messungen basierte darauf, dass die zugesetzten Liganden nach dem Massenwirkungsgesetz mit dem Fluorescein markierten Referenzliganden um die Bindungsstelle der TAR-RNA in Konkurrenz traten. Durch die Verringerung des Abstandes des Donor- und Akzeptorpaars verringert sich die Signalintensität, die experimentell bestimmt werden kann.

6.3 Bestimmung der IC_{50} -Werte

Die Bestimmung der IC_{50} -Werte der synthetisierten Verbindungen erfolgte in 96er-Microtiterplatten die eine „nicht-bindende“ Oberfläche besaßen. Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt. Zur Einstellung des pH-Wertes auf 7.4 wurde in jedes *well* TK-Puffer (50 mM Tris-HCl, 20 mM KCl, 0.01% Triton-X 100) gegeben. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte durch graphische Auftragung der relativen Fluoreszenz gegen die Konzentration an eingesetztem Ligand. Zu Beginn jeder Messung wurde zunächst das farbstoffgelabelte Tat-Peptid, sowie der Komplex aus dem Tat-Peptid und der TAR-RNA separat vermessen. Aus den auf diese Weise bestimmten Werten konnte der Verstärkungsfaktor bestimmt werden,

der mindestens bei 2.5 und maximal bei 2.7 lag. Das arithmetische Mittel der Fluoreszenz des freien Tat-Peptides, sowie der Fluoreszenz des Komplexes aus Tat-Peptid und TAR-RNA am Endpunkt der Titration ergab dann den IC_{50} -Wert. Um nun die Konzentration der untersuchten Verbindung zu erhalten, bei der die Hemmkonzentration halbmaximal war (eine 50%ige Inhibierung), wurde in drei unterschiedliche, sterile Eppendorfgläser eine Konzentrationsreihe mit den Konzentrationen 10, 100, sowie 1000 μM mit der Substanz, die getestet werden sollte, angesetzt. Mit diesen drei Konzentrationen wurden erste grobe Titrationsversuche unternommen, wodurch sich der Bereich, in dem der IC_{50} -Wert erwartet wurde, eingrenzen ließ.

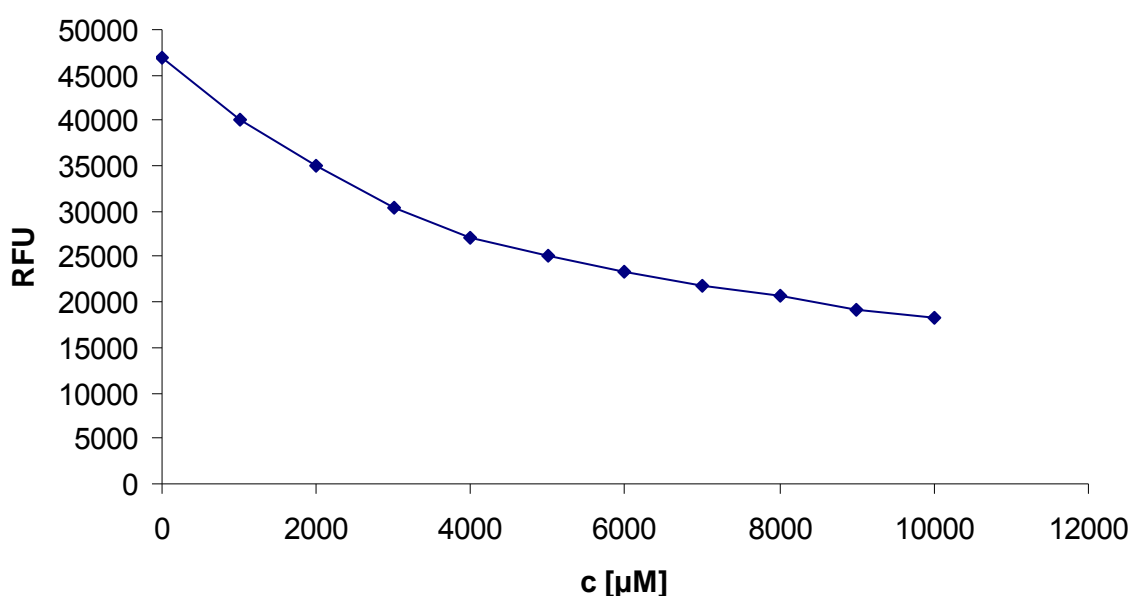
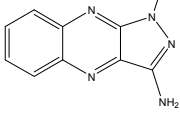
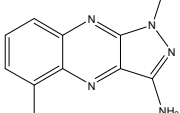
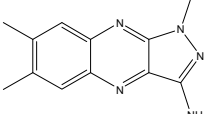
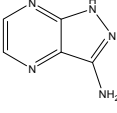
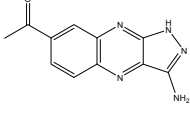
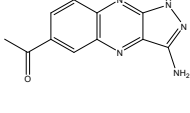
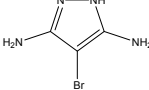
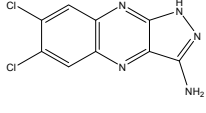
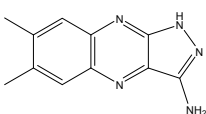
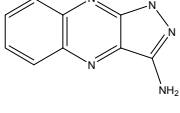


Abbildung 62: Fluoreszenztitrationskurve des 1H-Pyrazol-3,4,5-triamin-sulfates

In **Abbildung 62** ist die Fluoreszenztitrationskurve des 1H-Pyrazol-3,4,5-triamin-sulfates abgebildet, wobei auf der Abszisse die Konzentration c [μM] aufgetragen ist und auf der Ordinate, die relative Fluoreszenz [RFU]. Die frisch angesetzte Probe wurde vor der Messung mit einer wässrigen KOH-Lösung zur Deprotonierung des 1H-Pyrazol-3,4,5-triamin-sulfates versetzt. Durch Zugabe von TK-Puffer wurde der pH-Wert auf 7.0 eingestellt. Der RFU-Endwert der Titration lag bei etwa 18300. Der des Komplexes aus Tat-TAR, lag bei 47000. Daraus ergibt sich ein arithmetisches Mittel von etwa 32700 RFU. Die zugehörige Hemmkonzentration lag demnach bei 2000-3000 μM . In der nachfolgenden Tabelle sind die weiteren IC_{50} -Werte der Verbindungen, die im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert wurden, dargestellt.

Tabelle 8: IC₅₀-Werte der synthetisierten Pyrazol- und Phenazinderivate

Verbindung	Nr	IC ₅₀ [μM]	Bemerkung
	98	400-600	
	96	Kein Endwert bestimmbar	Bei dieser Verbindung konnte kein aussagekräftiger Endwert bestimmt werden. Verbindung 96 zeigte bis zu einer Konzentration von 2500 μM keine Hemmwirkung. Anschließend störten Präzipitationseffekte die weitere Titration.
	99	gemessen bis 200	Die Verbindung wurde bis zu einer Konzentration von 200 μM vermessen. Von da an nahm die RFU zu, was eventuell auch auf Präzipitationseffekte der Verbindung zurückzuführen ist.
	76	Kein Endwert bestimmbar	Die Verbindung zeigt bis zu einer Konzentration von 2500 μM keine Hemmwirkung. Bei weiterer Titration störten Präzipitationseffekte die Endpunktbestimmung.
	151	600-700	Bessere Löslichkeit als Verbindung 147 , aber auch hier war keine genaue Endwertbestimmung möglich, da der Anteil an DMSO zu groß war
	147	700-800	Unlöslich ab ~1mM, ab dieser Konzentration nimmt die RFU zu, was durch die erhöhte Konzentration an N ₂ S ₂ O ₄ oder Präzipitationseffekte verursacht werden kann.
	58	8000	Diese Verbindung zeigt im frisch angesetzten Zustand einen IC ₅₀ -Wert von 8 mM. In Lösung „altert“ die Probe schnell. Dabei verbessert sich der IC ₅₀ -Wert zunehmend. Dieser Effekt beruht jedoch nicht auf Verbindung 58 .
	134	gemessen bis 200	Diese Verbindung zeichnete sich durch ihre extreme Schwerlöslichkeit aus. Eine vollständige Lösung gelang nur in reinem DMSO. Bis zu einer Konzentration von 200 μM zeigte sie keinerlei Hemmwirkung. Danach verhinderte das Ausfallen der Verbindung eine Endpunktbestimmung.
	135	gemessen bis 800	Bis zu einer Konzentration von 800 μM zeigt diese Verbindung keine Hemmeffekte. Die Zunahme der RFU beruht eventuell auf Löslichkeits- oder Präzipitationseffekten.
	112	Keine Aktivität	Diese Verbindung zeigt entgegen den Erwartungen keine Affinität. Weder in der oxidierten, noch in der reduzierten Form.

7 Reporter-Gen-Assay

7.1 Aufbau des Assays

Nach Untersuchung der synthetisierten Verbindungen im FRET-Assay wurden die Verbindungen, die in *in vitro* Aktivität gezeigt hatten, in einem weiteren Assay zur Bestimmung ihrer Tat-TAR Hemmwirkung in Zellkulturen untersucht. In Zusammenarbeit mit Frau Dr. Ursula Dietrich vom Georg-Speyer-Haus in Frankfurt am Main wurde die „Phenazinstammverbindung“ 112, ihr am Pyrazolringstickstoff methyliertes Analogon 98, sowie die Phenazinderivate 147 und 151, das Pyrazolderivat 74 und die Pyrazinverbindung 76 in einem Zellkultur-Assay mit HeLa P4 Zellen auf ihre Wirksamkeit gegen HIV-1 untersucht. Das Zellexperiment beruht darauf, dass neben den für eine HIV-Infektion relevanten Rezeptoren CD4, CCR5, und CXCR4 auch ein β -Galaktosidase-Gen unter der Kontrolle des Tat/TAR-Systems inkloniert wurde. Wie in vorherigen Abschnitten dieser Arbeit beschrieben, wird die effiziente Transkription durch Wechselwirkung der TAR-RNA mit dem Tat-Peptid eingeleitet, wobei in diesem Fall dann das β -Galaktosidase-Gen transkribiert wird. Die Zunahme des neu transkribierten Tat-Peptids korreliert mit einer Zunahme des β -Galaktosidase-Gens. Die Enzymaktivität lässt sich nun kolorimetrisch bestimmen. Die infizierten Zellen können blau angefärbt werden, wobei durch die Färbung die Zahl der befallenen Zellen quantifizierbar ist. Bei der Zugabe eines potentiellen Liganden zur Inhibierung des Tat-TAR-Komplexes, kann man nun durch die Intensität der Blaufärbung Rückschlüsse auf die Inhibitionswirkung der Verbindungen ziehen.

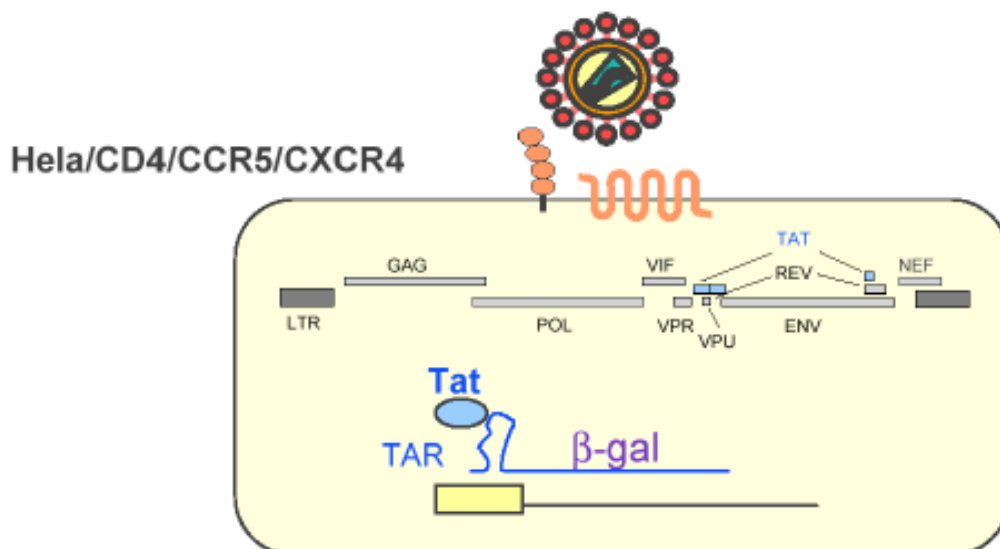


Abbildung 63: Bildliche Darstellung des beschriebenen Reporter-Gen-Assays

Ein sehr gut untersuchter und bekannter Inhibitor der HIV-Replikation ist ein Tat 10mer. Nachfolgende beiden Abbildungen zeigen deutlich, dass mit zunehmender Zugabe des Tat 10mers eine signifikante Inhibierung der HIV-1 Produktion einhergeht. Die Inkubationszeit der HeLa P4 Zellen mit HIV-1_{Lai} betrug 48 Stunden. Der gemessene IC₅₀-Wert des Tat 10mers betrug 20 µM.

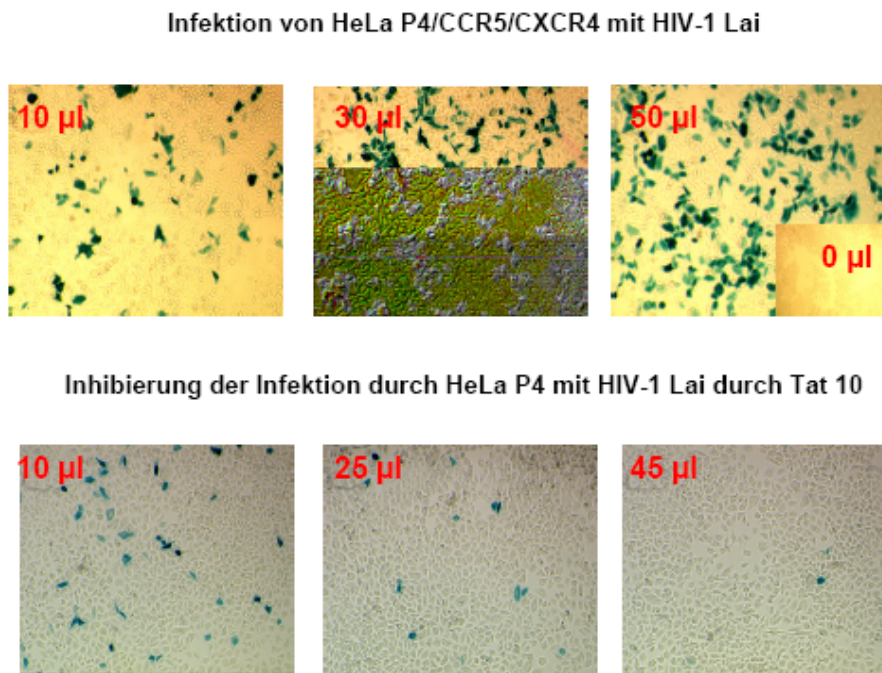


Abbildung 64:Die Abbildung zeigt in der oberen Zeile, die Infektion der Zellen mit HIV-1 Lai. In dem unteren Bild kann man erkennen, dass die Infektion mit zunehmender Konzentration von Tat 10mer inhibiert wird.

7.2 Zellkulturuntersuchungen der Verbindungen

In einem ersten Experiment wurde das 1H-Pyrazol-3,4,5-triamin auf seine Aktivität hin getestet. Dazu wurden zwei unterschiedliche Test durchgeführt. Zum einen wurden die zu testenden Verbindungen auf ihre Eigenschaften als HIV-1-Inhibitor hin getestet, zum anderen wurde zusätzlich noch ein Toxizitätstest durchgeführt, um sicher ausschließen zu können, dass eventuelle Hemmeffekte auf toxische Metabolite zurückzuführen sind. In den nachfolgenden Graphiken sind die Ergebnisse zusammengestellt. In der Graphik sind auf der Abszisse die jeweils zugesetzten Mengen an

1H-Pyrazol-3,4,5-triamin-sulfat aufgezeigt, auf der Ordinate ist die konzentrationsabhängige Änderung der Blaufärbung zu sehen.

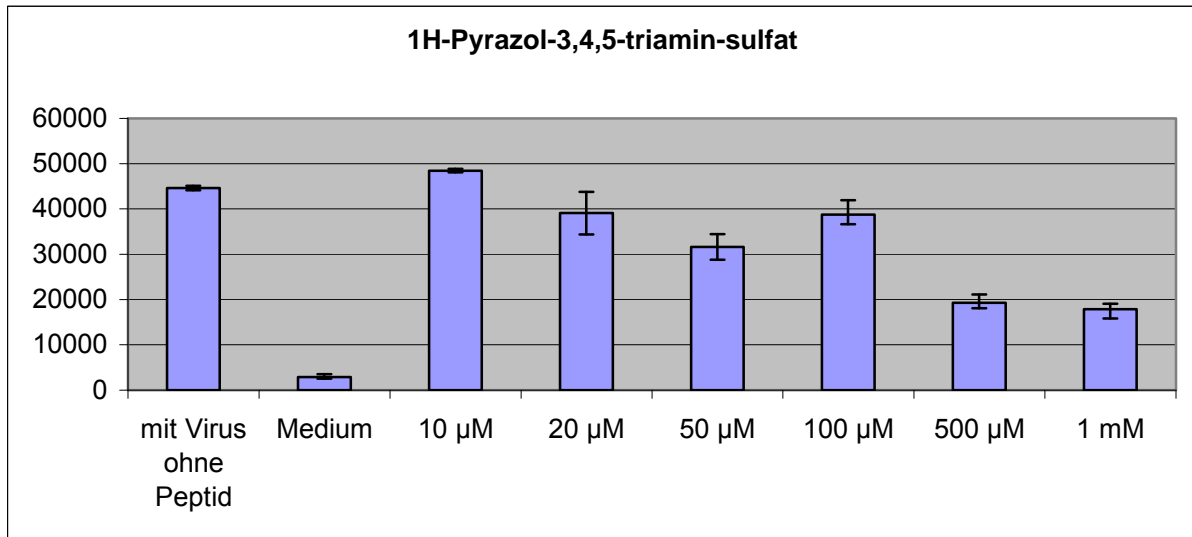


Abbildung 65: Hemmeffekte auf die Reportergen-Aktivität bedingt durch Verbindung 74

Wie in **Abbildung 65** ersichtlich, liegt die halbmaximale Hemmkonzentration von Verbindung 74 bei einer Konzentration zwischen 50 und 500 µM. Bei der Untersuchung der beiden Acetylphenazine, zeigte sich, dass Verbindung 147 im Zellkulturassay gewisse inhibitorische Eigenschaften aufwies.

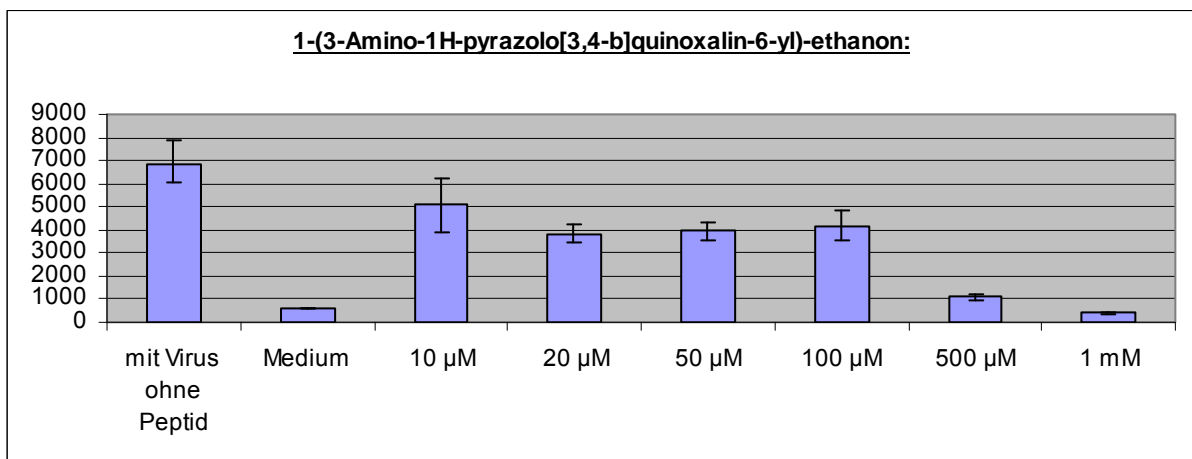


Abbildung 66: Hemmeffekte auf die Reportergen-Aktivität bedingt durch Verbindung 147

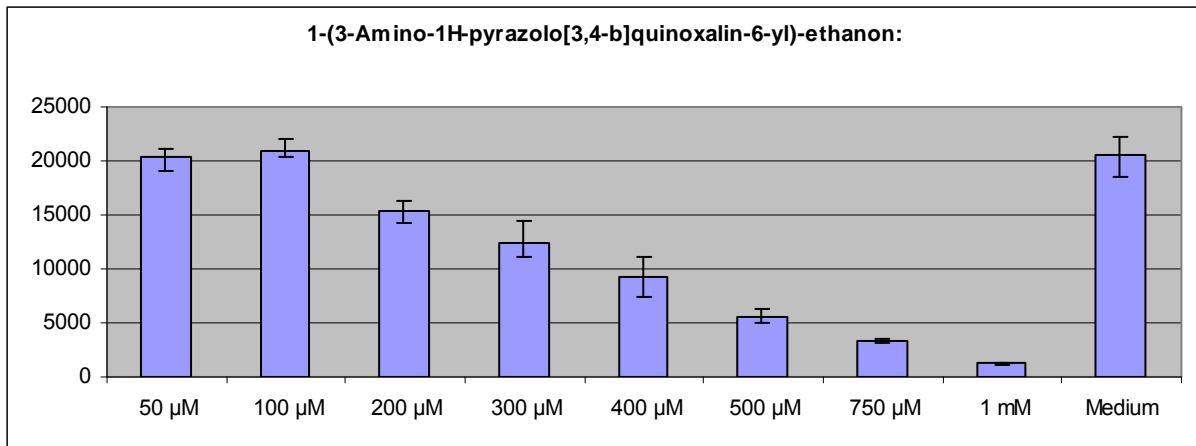


Abbildung 67: Toxizitätstest von Verbindung 147

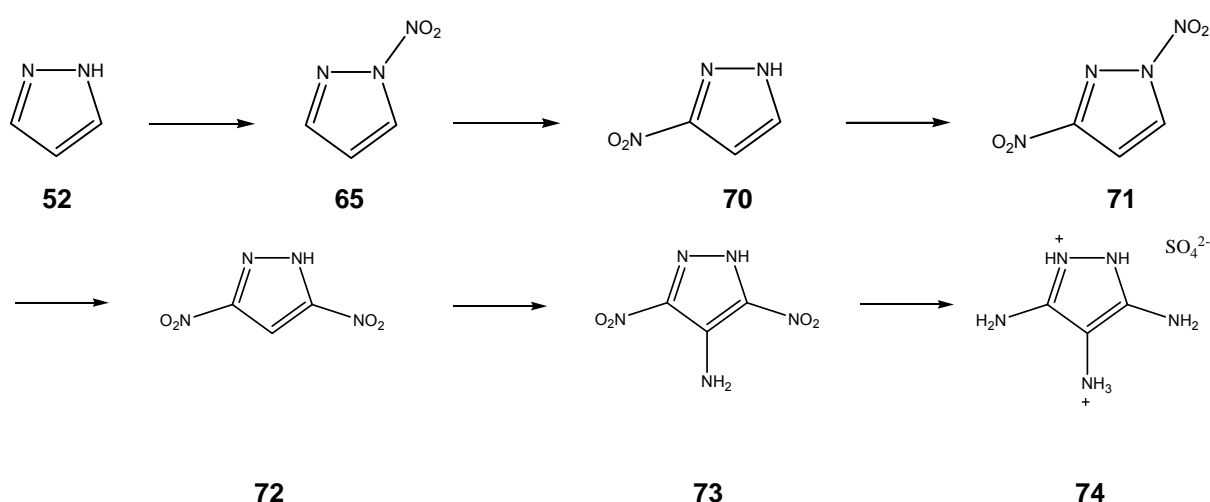
Der halbmaximale Hemmeffekt der Verbindung 147 lag bei etwa 250-300 µM. Ab einer Konzentration von 300 µM beginnt die Substanz jedoch toxisch auf die Zellen zu wirken.

Da die anderen synthetisierten Phenazinderivate leider alle keinerlei Effekte auf die infizierten Zellen ausübten, soll an dieser Stelle nicht weiter auf die anderen Messungen eingegangen werden. Die übrigen Messergebnisse sind dem Anhang beigefügt. Aufgrund der enttäuschenden Werte wurde bei allen Versuchsdurchführungen auf die Unterscheidung zwischen entry-Inhibitor und *post-entry*-Inhibitor verzichtet. Daher kann bei den Zellunteruntersuchungen nicht eindeutig eine Aussage gemacht werden, ob die Verbindungen letztlich als Hemmstoffe des Tat-TAR-Komplexes wirken.

8 Zusammenfassung und Ausblick

8.1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Bindungsmodell des 1H-Pyrazol-3,4,5-triamins **74** als Ligand für die TAR-RNA aus HIV-1 verifiziert und durch Anknüpfung von aromatischen Ringen sukzessive erweitert werden. Die Bindungshypothese, basierend auf dem „Arginin-fork-Model“ wurde bereits von Oliver Boden im Rahmen seiner Dissertation in unserem Arbeitskreis untersucht^[47]. Die synthetisierten Liganden sollten durch Bindung an die TAR-RNA das Tat-Peptid als Bindungspartner verdrängen und somit den viralen Replikationszyklus stören. Die Synthese des 1H-Pyrazol-3,4,5-triamins **74** gelang in guten Ausbeuten, wobei die Identität der beiden letzten Synthesestufen sowohl durch eine Röntgenstruktur, als auch eine Elementaranalyse eindeutig belegt werden konnte.



Basierend auf den frühen Messergebnissen von O. Boden für das 1H-Pyrazol-3,4,5-triamin **74**, der in seiner Arbeit einen IC_{50} -Wert für diese Verbindung von 30 μM angab, wurde das Strukturmotiv des trisaminierten Pyrazols erweitert, und mit der Synthese der Phenazine eine neue Substanzklasse bereitgestellt, die in der reduzierten Form die bevorzugten Eigenschaften von zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen, als auch von aromatischen Stacking-Effekten in sich vereinen sollten. Eine der ersten in meiner Dissertation synthetisierten Phenazinverbindungen, das 1H-Pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3-ylamin **112** wurde ebenfalls von O. Boden vermessen. Für diese Struktur gab er einen IC_{50} -Wert von 120 μM in der oxidierten und sogar 5 μM in der reduzierten Form an. Diese Messergebnisse erwiesen sich im Nachhinein leider

als fehlerhaft. Verbindung **74** konnte in analysenreiner Form erhalten und eindeutig charakterisiert werden. Die aufgereinigte Verbindung lieferte reproduzierbare IC_{50} -Werte. In einem weiteren Experiment konnte gezeigt werden, dass der sehr gute IC_{50} -Wert des 1H-Pyrazol-3,4,5-triamins, das O. Boden in seiner Arbeit vermessen hatte, nicht der Verbindung zuzuordnen ist, sondern wahrscheinlich von Verunreinigungen oder Zerstörungsprodukten des Pyrazolderivates verursacht wurde. Dazu wurde die mehrfach aufgereinigte und analysenreine Verbindung in Wasser gelöst und sofort im FRET-Assay vermessen. Das ergab den bereits beschriebenen IC_{50} -Wert von 2000-3000 μ M. Beim Stehen lassen der wässrigen Probe über Nacht in einem verschlossenen Eppendorf-Cap, konnte eine Farbänderung von nahezu farblos, nach dunkelbraun beobachtet werden. Nachfolgendes Photo zeigt eine deutliche Farbänderung der gelösten Verbindung **74**, mit der eine drastische Verbesserung des IC_{50} -Wertes der Pyrazolverbindung einhergeht.

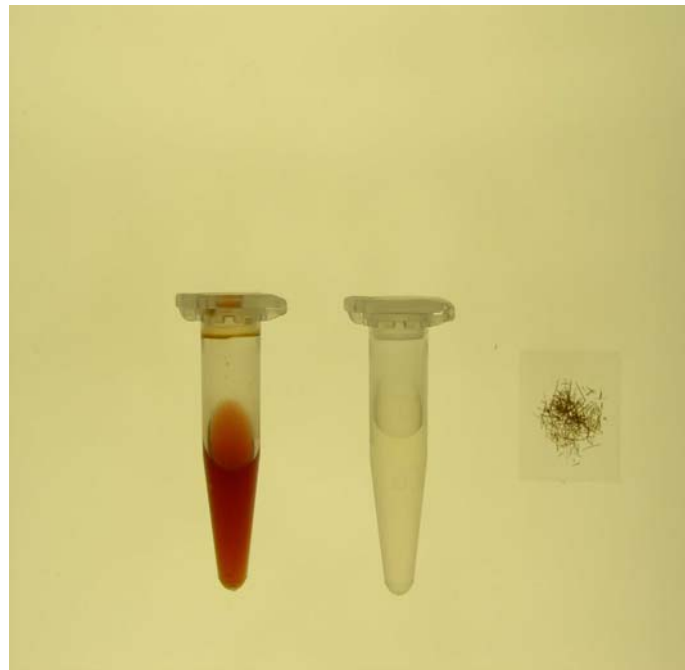
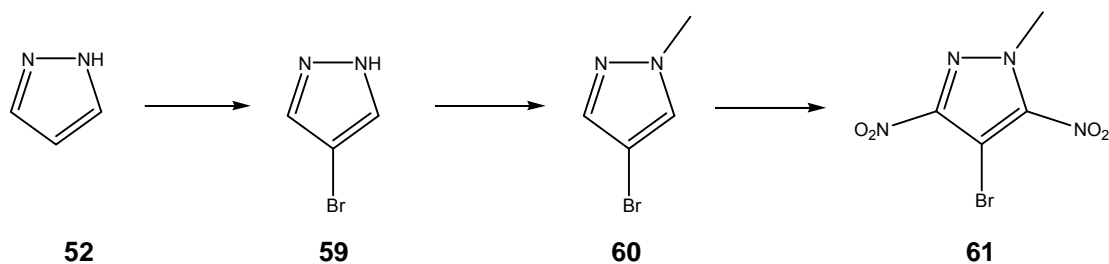
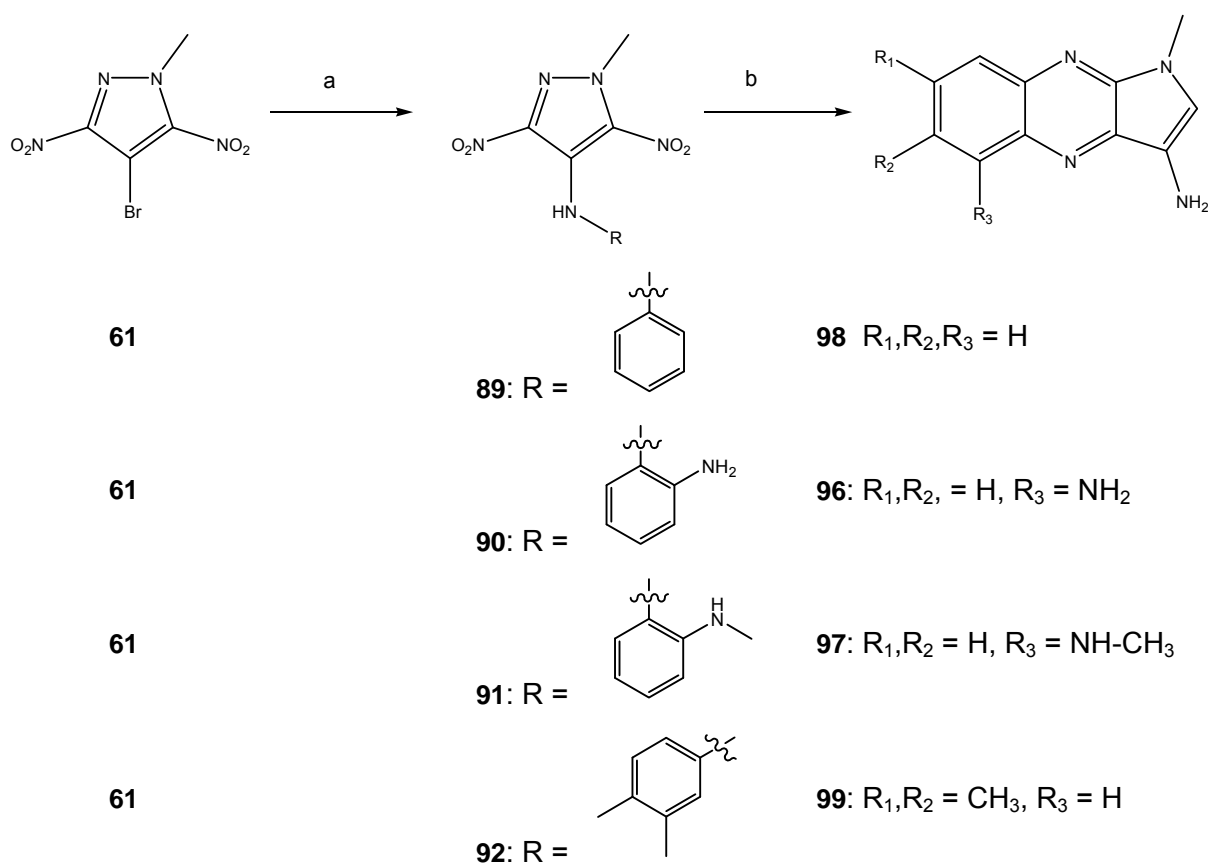


Abbildung 68: Analysenreine Kristalle des 1H-Pyrazol-3,4,5-triamins als Sulfatsalz auf einem Objektträger (rechts). Das mittlere Eppendorf-Cap zeigt die in Wasser gelöste Pyrazolverbindung unmittelbar nach dem Auflösen. Die mittlere Verbindung wurde sofort im FRET-Essay vermessen und lieferte einen IC_{50} -Wert von 2000-3000 μ M. Das linke, braunefärbte Eppendorf-Cap zeigt die Farbänderung der Pyrazolverbindung beim Stehen lassen über Nacht. Hier konnte dann ein IC_{50} -Wert von 30 μ M gemessen werden

Es gelang auch die Synthese von Verbindung **61**, die die Basisverbindung für die Herstellung der N-methylierten Phenazine darstellte.

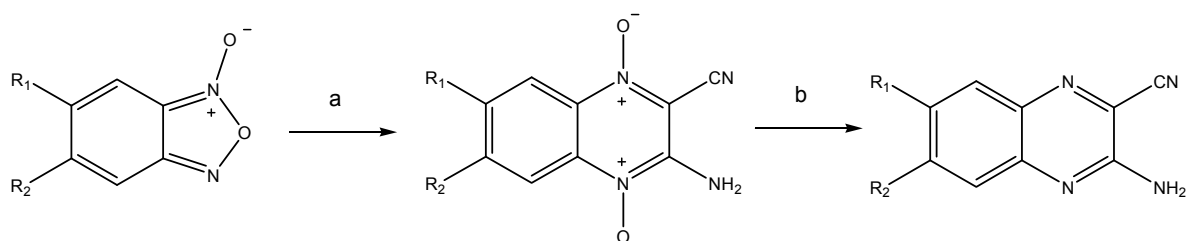
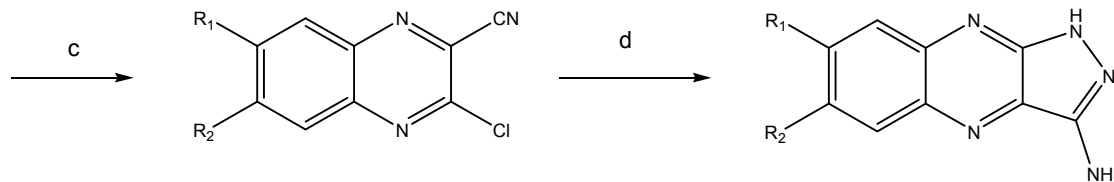


Nach erfolgreicher Umsetzung der verschiedenen Amine mit Verbindung **61**, konnten diese dann mit Hilfe von NaBH_4 in alkalischer Lösung reaktiv cyclisiert werden.



a) DMSO, H_2NR , 100°C b) NaBH_4 , 2 N NaOH, reflux

Auf diese Weise waren die am Pyrazolring-Stickstoff methylierten Verbindungen in Ausbeuten zwischen 21 und 70 % zugänglich. Die Synthese der methylfreien Verbindungen gelang auf sehr effiziente Weise über die Beirut-Reaktion. Diese Reaktionssequenz zeichnete sich durch hohe Flexibilität und Vielfältigkeit bezüglich der entsprechenden Ring-Substituenten aus.

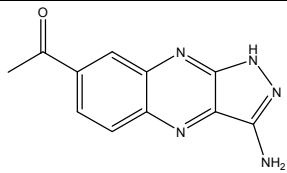
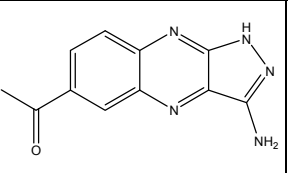
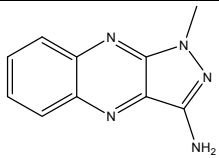
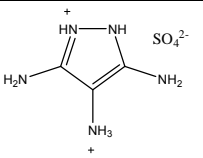
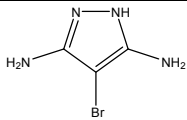
**102****158****159****108** R₁,R₂ = H**109** R₁,R₂ = H**110** R₁,R₂ = H**126** R₁,R₂ = Cl**128** R₁,R₂ = Cl**130** R₁,R₂ = Cl**127** R₁,R₂ = CH₃**129** R₁,R₂ = CH₃**131** R₁,R₂ = CH₃**139** R₁=H₃CC(OCH₂)₂,R₂=H**140** R₁=H₃CC(OCH₂)₂,R₂=H**142** R₁=H₃CC(OCH₂)₂,R₂=H**139** R₁=H₃CC(OCH₂)₂,R₂=H**141** R₁=H,R₂= H₃CC(OCH₂)₂**143** R₁=H,R₂= H₃CC(OCH₂)₂**160****161****111** R₁,R₂ = H**112** R₁,R₂ = H**132** R₁,R₂ = Cl**134** R₁,R₂ = Cl**133** R₁,R₂ = CH₃**135** R₁,R₂ = CH₃**144** R₁ = Acetyl, R₂ = H**147** R₁ = Acetyl, R₂ = H**148** R₂ = Acetyl, R₁ = H**151** R₂ = Acetyl, R₁ = H

a) DMF, Malodinitril, kat. NEt₃ b) MeOH (50-60 °C), Na₂S₂O₄ (aq.) c) 1. AcOH/HCl 2. NaNO₂ (aq.)
d) Hydrazinhydratlösung (24-26 %ig)

Anmerkung: Da bei allen anderen Phenazinderivaten keine Schutzgruppe nötig war, ist in dieser Abbildung die erneute Schützung der Verbindungen **144** und **148**, also nach Durchführung der Sandmeyer-Reaktion, und die Abspaltung der Schutzgruppe unter sauren Bedingungen bei beiden Acetylphenazinen nicht mehr explizit darge-

stellt. Die Bedingungen sind **Abbildung 57** oder dem experimentellen Teil zu entnehmen. Das 1H-Pyrazol-3,4,5-triamin lag mit einem gemessenen IC_{50} -Wert von 2000-3000 μM deutlich unter den Hoffnungen für diese Verbindung. Wenn man bedenkt, dass Verbindung **74** bei einem pH-Wert von 7.4 nur teilweise protoniert ist, liegt der IC_{50} -Wert im Vergleich mit Argininamid (Dikation, $IC_{50}=1500 \mu\text{M}$) erstaunlich gut. Die früher beobachteten noch günstigeren Inhibierungswirkungen dürften allerdings auf Zersetzungsprodukte von Verbindung **74** in Lösung zurück gehen. Daher wurden substituierte Triaminopyrazole als TAR-Liganden nicht weiter verfolgt. Trotz dieses doch enttäuschenden Ergebnisses gelang durch Strukturweiterung die Synthese von drei Phenazin-analogen Pyrazolo-chinoxalin-Verbindungen, die durch weitere Anknüpfung von aromatischen Ringen eine höhere Affinität zur TAR-RNA zeigten. Dabei wurde das Grundgerüst des Triaminopyrazols in ein heteroaromatisches Grundgerüst eingebunden, wobei nur die reduzierte Form dieser Verbindungen (vgl. $FADH_2/FAD$) als protonierbare, aktive Spezies in Frage kommen sollte. Im Zytoplasma herrschen reduzierende Bedingungen. Daher erhoffte man sich, dass die Verbindungen erst durch intrazelluläre Reduktion in die eigentliche Wirkform übergehen sollten. Die IC_{50} -Werte der Verbindungen **58**, **74**, **98**, **147** und **151** waren in dem bereits beschriebenen Fluoreszenz-Assay sehr gut bestimmbar, wobei die erhaltenen Messwerte reproduzierbar waren und auch nach mehrmaligem Umkristallisieren konstant blieben. In der nachfolgenden Tabelle sind die bestimmten IC_{50} -Werte der Verbindungen die Affinität zur TAR-RNA zeigen nochmals aufgelistet.

Tabelle 9: IC_{50} -Werte der Verbindungen die gut bestimmbar waren

Verbindung	Nr.	IC_{50} -Wert [μM]	Verbindung	Nr.	IC_{50} -Wert [μM]
	151	600-700		147	700-800
	98	400-600		74	2000-3000
	58	8000			

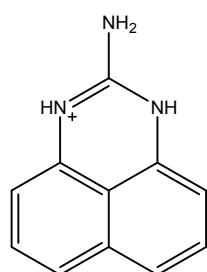
Die Messung des 6,7-Dichlor-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3-ylamins **134**, gelang im FRET-Assay bis zu einer Konzentration von 200 μM . Bis zu dieser Konzentration konnte keine Affinität zur TAR-RNA beobachtet werden. Ein Nachteil dieser Verbindung war die extrem schlechte Löslichkeit. Die Verbindung war ausschließlich in DMSO vollständig löslich. Bei der Verdünnung mit Wasser oder anderen Solventien mit denen der Fluoreszenz-Assay ohne Störeffekte durchführbar war, traten erhebliche Präzipitationseffekte auf, die keine genauere Bestimmung des IC_{50} -wertes erlaubten. Das 1-Methyl-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3,5-diamin **97** wurde in MeOH aufgenommen, wobei die Verbindung vollständig in Lösung ging. Bei der Verdünnung mit DEPC-Wasser traten ab einer Konzentration von 2500 μM Präzipitationseffekte auf. Bis zu dieser Konzentration zeigte die Verbindung keine Affinität zur TAR-RNA. Im Falle des 6,7-Dimethyl-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3-ylamins **135**, war ab einer Konzentration von 800 μM eine Zunahme der Fluoreszenz zu beobachten. Dieser Effekt war vermutlich auch auf Präzipitation der Verbindung in diesem Konzentrationsbereich zurückzuführen. Bis zu einer Konzentration von 800 μM zeigte die Verbindung keine positiven Eigenschaften im Fluoreszenz-Assay. Sowohl das 1H-Pyrazolo[3,4-b]pyrazin-3-ylamin **76**, als auch die Phenazin-Stammverbindung **112** zeigten im FRET-Assay keinerlei Effekte. Der Fluoreszenz-Assay konnte bis zu einem maximalen DMSO-Gehalt in der Probe von 1% durchgeführt werden, ohne dass störende Effekte zu beobachten waren. Diese beiden Verbindungen hatten leider den Nachteil, dass sie keine ausreichende Löslichkeit in DEPC-Wasser zeigten. Sie waren zwar in DMSO sehr gut löslich, jedoch fielen die Verbindungen beim Verdünnen fast vollständig wieder aus. Trotzdem gelang im Rahmen dieser Arbeit die Herstellung einiger Verbindungen, die als TAR-Liganden fungieren konnten. Ausgehend vom 1H-Pyrazol-3,4,5-triamin, das nach dem erweiterten „Arginin-fork-Modell“ ein sehr guter Ligand sein sollte, konnten durch Strukturweiterung die Bindungseigenschaften einiger Substanzen doch um den Faktor 2-4 verbessert werden. Es konnte gezeigt werden, dass alle Phenazine mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ reduziert werden konnten. Es bestand die Hoffnung, dass die reduzierten Verbindungen luftbeständig und als leicht protonierbare, nicht planare Spezies, interessante TAR-Liganden hätten sein können. Leider zeigten diese Strukturen auch eine Instabilität gegenüber Luftsauerstoff und wurden rasch reoxidiert, so dass die reduzierten Strukturen nicht im FRET-Assay vermessen werden konnten. Auch ein weiterer Ansatzpunkt zur Verringerung des Redoxpotentials führte nicht zum Erfolg. Zwar gelang es, die beiden Acetylphenazine

147 und 151, sowie das Dichlorphenazin 134 zu synthetisieren, allerdings ließ sich auch bei diesen Verbindungen, obwohl sie Elektronenakzeptoren als Substituenten trugen, die Lage des Redoxgleichgewichtes nicht begünstigen. An die Phenazinderivate bestanden eigentlich die Erwartungen, dass die ausschließlich in der reduzierten Form eine aktive Wirkform darstellen sollten. Das rasche Redoxverhalten dieser Verbindungen, sowie die schlechte Löslichkeit in Wasser, verbunden mit den dadurch auftretenden Präzipitationseffekten lässt erkennen, dass diese Substanzklasse nicht weiter als Liganden für die TAR-RNA in Betracht gezogen werden kann. Daher wird in zukünftigen Arbeiten die Strukturoptimierung der potentiellen TAR-Liganden nicht mehr in diese Richtung von heterozyklischen Verbindungen gehen.

8.2 Ausblick

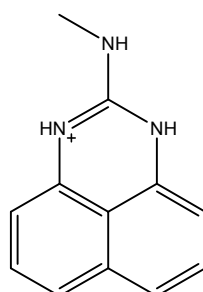
Im Rahmen einer in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Diplomarbeit^[65] wurden einige käufliche Verbindungen mit unterschiedlicher Struktur auf ihre Affinität zur TAR-RNA untersucht. Dabei konnten durch dieses „Ligandscreening“ einige sehr vielversprechende Strukturen gefunden werden. Es stellte sich heraus, dass die besten Verbindungen auch ein ausgeprägtes aromatisches π -Elektronensystem beinhalten und strukturell sehr hohe Ähnlichkeit mit Amidin- oder Guanidinanalogen Verbindungen aufwiesen. Die Strukturklasse der 2-Aminoperimidine zeigte erstaunlich hohe Affinität zur TAR-RNA. Sowohl das 2-Aminoperimidin, als auch das einfach und doppelt methylsubstituierte Derivat zeigten Affinitäten zur TAR-RNA im niederen μ molaren Bereich. **Tabelle 10** stellt nochmals die 2-Aminoperimidinderivate dar, die als TAR-Liganden identifiziert werden konnten.

Tabelle 10: Aminoperimidinderivate mit sehr guter TAR-Affinität



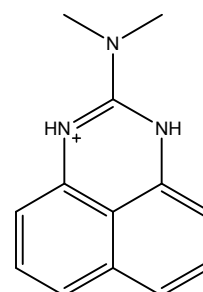
162

IC₅₀ [μ M] 40-60



163

Ca. 50

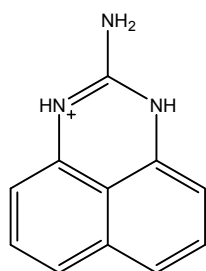


164

150

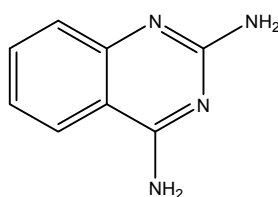
Eine weitere sehr interessante Stoffklasse von TAR-Liganden wurde mit den Diaminoquinazolin-Derivaten identifiziert. So zeigte sich, dass durch gezielte Variation der Aminogruppen eine extreme Erhöhung der Affinität zur RNA erreicht werden konnte. Das 2,4-Diaminoquinazolinderivat **166** ergab einen IC_{50} -Wert von 400 μM . Bei der Einführung einer zusätzlichen Aminogruppe in 6-Position **167** konnte der IC_{50} -Wert um den Faktor 10 verbessert werden. Nachfolgende Tabelle stellt nochmals die im Rahmen der Diplomarbeit von M. Zeiger hergestellten Verbindungen, die sehr niedrige IC_{50} -Werte und hohe Affinität zur TAR-RNA zeigen, zusammen.

Tabelle 11: Verbindungen aus der Diplomarbeit von M. Zeiger



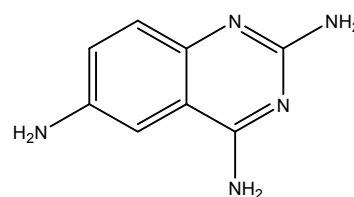
165

IC_{50} [μM] 40-60



166

400



167

50

In zukünftigen Arbeiten wird versucht, durch Derivatisierung der Perimidin- oder Aminoquinazolinderivate eine noch höhere und bulge-selektive Bindungsaffinität zur TAR-RNA zu erreichen.

9 Experimenteller Teil

9.1 Allgemeine Experimentelle Bedingungen

Kernresonanzspektroskopie (NMR):

NMR-Spektren wurden auf dem Gerät AM 250 (250 MHz) der Firma Bruker aufgenommen. Chemische Verschiebungen wurden als δ -Werte in ppm angegeben und auf das entsprechende Lösungsmittel bezogen: $\delta = 2.50$ (DMSO- d_6), $\delta = 7.26$ ($CDCl_3$). Die Kopplungskonstanten J wurden in Hertz (Hz) angegeben. Die Charakterisierung der Signalaufspaltung erfolgte gemäß br. = breit, s = Singulett, d = Dublett, dd = Doppeldublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett.

Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR):

Zur Aufnahme der FT-IR-Spektren diente das Gerät 1600 Series der Firma Perkin-Elmer mit einem Hewlett-Packard Color Plotter und einem Drucker Epson LQ 850. Die Wellenzahlen wurden auf ganze Zahlen gerundet und in cm^{-1} angegeben. Die Intensität der Banden wurde mit s = stark, m = mittel und w = schwach abgekürzt.

Massenspektroskopie (MS):

Die ESI-Spektren (Electron-spray-ionisation) wurden auf einem Elektrospray-Gerät der Firma Fisons (VG Plattform II) aufgenommen.

MALDI-Massenspektren (Matrix-assisted-laser-desorption-ionisation-spectroscopy) wurden auf einem Gerät der Firma Fisons (TOF SPEC) aufgenommen.

Elementaranalysen:

Die Elementaranalysen wurden im Institut für Organische Chemie und chemische Biologie der Universität Frankfurt mit dem Gerät HERAEUS CHN Rapid durchgeführt. Die Angaben erfolgten in Prozent (%).

Schmelzpunkte:

Die Bestimmung der Schmelzpunkte wurde an einem Heitztischmikroskop nach Kofler durchgeführt. Die gemessenen Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

Dünnschichtchromatographie (DC):

Für die Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel 60 beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator verwendet (Merck Nr. 5554; 0.2 mm Schichtdicke). Alle R_f -Werte wurden bei Kammer sättigung ermittelt. Das Laufverhalten der Verbindungen wurde durch Bestrahlen mit einer UV-Lampe der Firma Konrad Benda (Typ NU-6KL) bei Wellenlängen von 254 Nanometer (nm) bzw. 366 Nanometer (nm) sichtbar gemacht.

Färbereagenzien für DC:

Als Färbereagenz wurde Ninhydrin-Lösung verwendet. Diese bestand aus 3.75 g Ninhydrin, gelöst in einem Gemisch aus 25 ml n-Butanol und 25 ml Aceton. Amine färben nach erwärmen in der Regel rot-rotbraun an.

Präparative Säulenchromatographie:

Zur Aufreinigung der Rohprodukte wurde das Kieselgel 60 (0.04-0.063 mm) der Firma Merck verwendet.

Wasserfreie (abs.) Lösungsmittel:

Nach Vortrocknen des THF über Aluminiumoxid (ICN Alumina N-Super I) wurde von Natrium/Benzophenon abdestilliert.

Dichlormethan, Pyridin, Toluol, Methanol wurden in käuflicher, wasserfreier Qualität von Fluka, Ethanol von Roth bezogen.

Lyophilisierung:

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

Kristallstrukturanalysen:

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

Steriles Arbeiten:

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

Fluoreszenztitrationen:

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

9.2 Liste der synthetisierten Verbindungen

Die Benennung der Verbindungen erfolgte mit Beilstein-Autonom.

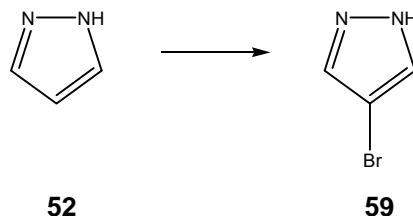
1. 4-Brom-1H-pyrazol **59**
2. 4-Brom-1-methyl-1H-pyrazol **60**
3. 4-Brom-1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol **61**
4. Methyl-(2-nitro-phenyl)-amin **169**
5. N-Methyl-benzol-1,2-diamin **170**
6. 1-Methyl-4-(2-(methylamino)phenylamino)-3,5-dinitro-1H-pyrazol **91**
7. N⁵,1-Dimethyl-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3,5-diamin **97**
8. 1-Methyl-3,5-dinitro-4-phenylamino-1H-pyrazol **89**
9. 1-Methyl-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3-amin **98**
10. 4-(2-Aminophenylamino)-1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol **90**
11. 1-Methyl-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3,5-diamin **96**
12. 4-(3,4-Dimethylphenylamino)-1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol **92**
13. 1,6,7-Trimethyl-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3-ylamin **99**
14. 1,3-Dihydro-5-nitroisobenzofuran **172**
15. 1,3-Dihydroisobenzofuran-5-ylamin **85**
16. (1,3-Dihydroisobenzofuran-5-yl)amino-1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol **86**
17. 7-Methyl-3,7-dihydro-1H-2-oxo-6,7,8,10-tetraaza-dicyclopenta[a,g]naphthalin-9-ylamin **87**
18. 1H-Pyrazolo[3,4-b]pyrazin-3-ylamin **76**
19. 1-Nitro-1H-pyrazol **65**
20. 3-Nitro-1H-pyrazol **70**
21. 1,3-Dinitro-1H-pyrazol **71**
22. 3,5-Dinitro-1H-pyrazol **72**
23. 1,1,1-Trimethylhydraziniumiodid **174**
24. 3,5-Dinitro-1H-pyrazol-4-ylamin; als DMSO-Monosolvat **73**
25. 1H-Pyrazol-3,4,5-triamin-sulfat **74**
26. Benzo[1,2,5]oxadiazol 1-oxid **108**
27. 3-Amino-1,4-dioxy-chinoxalin-2-carbonitril **109**
28. 3-Amino-chinoxalin-2-carbonitril **110**

29. 3-Chlor-chinoxalin-2-carbonitril 111
30. 1H-Pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3-ylamin 112
31. N-(3,4-Dichlor-phenyl)-acetamid 176
32. N-(4,5-Dichlor-2-nitrophenyl)-acetamid 177
33. 4,5-Dichlor-2-nitrophenylamin 124
34. 5,6-Dichlor-benzo[1,2,5]oxadiazol 1-oxid 126
35. 3-Amino-6,7-dichlor-1,4-dioxy-chinoxalin-2-carbonitril 128
36. 3-Amino-6,7-dichlor-chinoxalin-2-carbonitril 130
37. 3,6,7-Trichlor-chinoxalin-2-carbonitril 132
38. 6,7-Dichlor-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3-ylamin 134
39. 5,6-Dimethyl[1,2,5]oxadiazol 1-oxid 127
40. 3-Amino-6,7-dimethyl-1,4-dioxy-chinoxalin-2-carbonitril 129
41. 3-Amino-6,7-dimethyl-chinoxalin-2-carbonitril 131
42. 3-Chlor-6,7-dimethyl-chinoxalin-2-carbonitril 133
43. 6,7-Dimethyl-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3-amin 135
44. 4-Chlor-3-nitro-acetophenon 137
45. 1-(3-Oxy-benzo[1,2,5]oxadiazol-5-yl)-ethanon 138
46. 5-(2-Methyl-[1,3]dioxolan-2-yl)benzo[1,2,5]oxadiazol 3-oxid 139
47. 3-Amino-6-(2-methyl-[1,3]dioxolan-2-yl)-1,4-dioxy-chinoxalin-2-carbonitril 140; 3-Amino-7-(2-methyl-[1,3]dioxolan-2-yl)-1,4-dioxy-chinoxalin-2-carbonitril 141
48. 3-Amino-6-(2-methyl-[1,3]dioxolan-2-yl)-chinoxalin-2-carbonitril 143; 3-Amino-7-(2-methyl-[1,3]dioxolan-2-yl)-chinoxalin-2-carbonitril 142
49. 6-Acetyl-3-chlor-chinoxalin-2-carbonitril 148
50. 3-Chlor-6-(2-methyl-[1,3]-dioxolan-2-yl)-chinoxalin-2-carbonitril 149
51. 7-(2-Methyl-[1,3]-dioxolan-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3-amin 150
52. 1-(3-Amino-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-7-yl)-ethanon 151
53. 7-Acetyl-3-chlor-chinoxalin-2-carbonitril 144
54. 3-Chlor-7-(2-methyl-[1,3]-dioxolan-2-yl)-chinoxalin-2-carbonitril 145
55. 6-(2-Methyl-[1,3]-dioxolan-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3-amin 146
56. 1-(3-Amino-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-6-yl)-ethanon 147
57. 5-Chlor-isoindol-1,3-dion 153

58. 5-Chlor-6-nitroisindol-1,3-dion **154**
59. 5-Chlor-2-methyl-6-nitro-isindol-1,3-dion **155**
60. 6-Methyl-1-oxy-pyrrolo[3',4',4,5]benzo[1,2-c][1,2,5]oxadiazol-5,7-dion **156**
61. 5-Amino-2-methyl-6-nitro-isindol-1,3-dion **178**
62. 5-Nitro-isindol-1,3-dion **180**
63. 5-Amino-isindol-1,3-dion **181**
64. 2-Methyl-5-nitro-isindol-1,3-dion **182**
65. 5-Amino-2-methyl-isindol-1,3-dion **79**
66. Malondiimidsäure-diethylester-dihydrochlorid **56**
67. 1H-Pyrazol-3,5-diamin **57**
68. 4-Brom-1H-pyrazol-3,5-diamin **58**
69. Methyl-(1-methyl)-3,5-dinitro-1H-pyrazol-4-yl)-amin **94**
70. (2-Hydroxymethyl-4-nitro-phenyl)-methanol **81**
71. Bis(pyridin)iodonium(I)tetrafluoroborat **185**
72. Kupferphenylacetylid **187**
73. 4-Iod-1,3,5-trimethyl-1H-pyrazol **189**
74. 1,3,5-Trimethyl-4-phenylethynyl-1H-pyrazol **190**
75. 1H-Pyrazol-1-carboxamidin;Salz mit Salzsäure **191**
76. Methyl-(1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol-4-yl)-phenylamin **93**

9.3 Darstellung und Charakterisierung der Einzelverbindungen

9.3.1 Synthese von 4-Brom-1H-pyrazol



10.5 g (154.2 mmol) Pyrazol **52** wurden in 50-60 ml Wasser gelöst. Zu der Reaktionslösung wurden zügig 7.92 ml (1.0 eq., 154.2 mmol, 24.6 g) Brom zuge-
tropft und der Ansatz dann für 60 Minuten zum Rückfluß erhitzt. Nach dem Er-
kalten tropfte man zu dieser Lösung 24.5 ml 6 N Natronlauge. Dabei schied sich
ein farbloser Niederschlag ab. Man ließ das Reaktionsgemisch auf Raumtem-
peratur abkühlen und vervollständigte die beginnende Kristallisation durch Eis-
badkühlung. Die farblosen Kristalle wurden abgesaugt und in wenig Ether ge-
löst. Die Etherphase wurde über MgSO_4 getrocknet und der Ether dann im Va-
kuum entfernt. Der Rückstand wurde aus n-Hexan umkristallisiert. Man erhielt
farblose Kristalle (**59**).

Ausbeute: 20.32 g (90%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:3; $R_f = 0.19$

Schmelzpunkt: 85-87°C (n-Hexan)

Lit.: 76-77°C^[49]

IR (KBr): 3155 (w), 3070 (w), 2984 (w), 2938 (w), 2876 (w), 2811 (w), 2756 (w),
2697 (w), 2628 (w), 1646 (w), 1591 (w), 1564 (w), 1493 (w), 1375 (s), 1335 (s),
1278 (w), 1248 (w), 1186 (w), 1141 (s), 1033 (s), 950 (s), 939 (s), 853 (s), 800
(s), 642 (w), 608 (w)

¹H-NMR: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

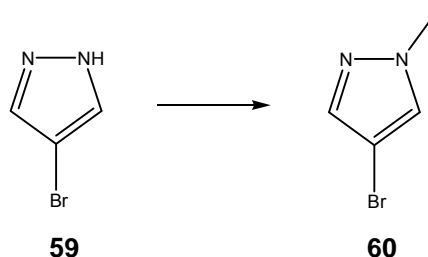
13.09 (s, br, 1H, NH, austauschbar mit D_2O), 7.98 und 7.57 (jeweils s, H-C(3)
und H-C(5))

Elementaranalyse: (%) für $\text{C}_3\text{H}_3\text{BrN}_2$ (145.95)

ber.: C 24.52 H 2.06 N 19.06

gef.: C 24.78 H 2.09 N 18.81

9.3.2 Synthese von 4-Brom-1-methyl-1H-pyrazol



In einem 250 ml Kolben wurden 15.4 g (104.8 mmol) **59** mit 8.81 g (1.5 eq.; 157.17 mmol) gemörserterem Kaliumhydroxid und 2.42 g (10 Gew.%; 15.72 mmol) Tetramethylammoniumbromid (TMAB) zusammengegeben. Die Reaktionsmischung wurde mit einem Eisbad auf 0-5° C abgekühlt. Anschließend gab man 6.52 ml (104.8 mmol; 14.9 g) Methyljodid dazu. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das Produkt dann im Wasserstrahlvakuum über eine kurze Vigreux-Kolonnen bei einer Siedetemperatur von 90-92° C und einem Druck von 12 mbar fraktioniert destilliert. Man erhielt als Produkt eine farblose Flüssigkeit **60** (Lit.: 77-79 °C, 18 Torr)^[66].

Ausbeute: 7.68 g (46 %)

DC: AcOEt/EtOH 8:1; $R_f = 0.6$

Brechungsindex: 1.5146

IR (KBr): 3191 (w), 3129 (m), 2943 (m), 2802 (w), 2697 (w), 1604 (w), 1521 (m), 1437 (m), 1416 (m), 1379 (s), 1322 (s), 1297 (s), 1284 (s), 1252 (w), 1184 (m), 1116 (m), 1053 (w), 980 (s), 954 (s), 842 (m), 800 (m), 699 (m), 647 (m), 605 (s)

¹H-NMR: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

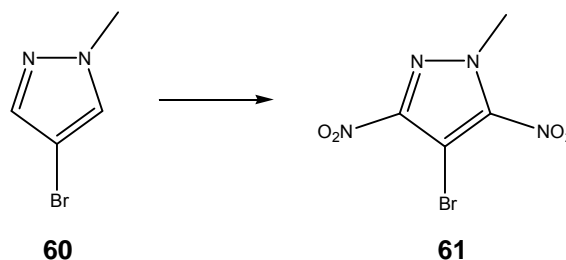
7.93 (s, 1H, H-C(3)), 7.51 (s, 1H, H-C(5)), 3.83 (s, 3H, CH₃)

Elementaranalyse: (%) für C₄H₅BrN₂ (161.00)

ber.: C 29.84 H 3.13 N 17.40

gef.: C 29.62 H 3.25 N 17.13

9.3.3 Synthese von 4-Brom-1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol



In einem 250 ml Rundkolben wurden 50.0 ml rauchende Salpetersäure (1.2 mol, 76.0 g; $d = 1.52$) vorgelegt. Unter Rühren und Kühlen im Eisbad gab man langsam 65 ml konzentrierte Schwefelsäure (1.21 mol, 119.6 g; $d = 1.84$) dazu. Man ließ die Nitriersäure noch 10 min. rühren und tropfte dann langsam 7.68 g (47.70 mmol) 4-Brom-1-methyl-1H-pyrazol **60** zu. Nach beendeter Zugabe entfernte man das Eisbad und erhitze die gelbe Reaktionslösung für 2 Stunden zum Sieden. Nachdem die dunkelgelbe Reaktionsmischung auf RT abgekühlt war, gab man den Ansatz vorsichtig auf 500 ml Eiswasser. Nach kurzer Zeit fiel ein farbloser Niederschlag aus, der abgesaugt und mit Wasser nachgewaschen wurde. Nach dem Trocknen wurde ein blassgelber Feststoff **61** erhalten.

Ausbeute: 8.06 g (67%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:8 $R_f = 0.21$

Schmelzpunkt: 108-109 °C

Lit.: 111-112 °C^[67]

IR (KBr): 2856 (w), 1566 (s), 1535 (m), 1498 (m), 1461 (w), 1424 (s), 1392 (w), 1366 (w), 1329 (s), 1297 (m), 1144 (w), 1080 (w), 1033 (m), 874 (s), 742 (m), 673 (w), 615 (w),

¹H-NMR: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

4.28 (s, 3H, CH₃)

¹³C-NMR: (δ [ppm], 62.90 MHz, DMSO- d_6)

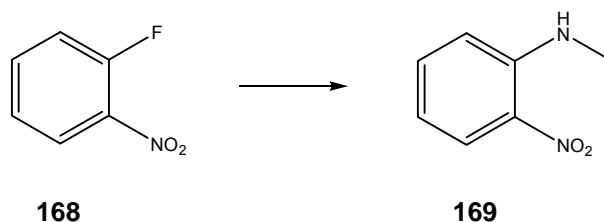
149.60 (C(3)-NO₂), 144.50 (C(5)-NO₂), 90.53 (C(4)-Br), 43.39 (N-CH₃)

Elementaranalyse: (%) für C₄H₃BrN₄O₄ (251.00)

ber.: C 19.14 H 1.20 N 22.32

gef.: C 19.38 H 1.48 N 22.07

9.3.4 Synthese von Methyl-(2-nitro-phenyl)-amin



In einem 50 ml Zweihalsrundkolben wurden 0.75 ml (7.08 mmol; 1.00 g) 2-Fluornitrobenzol **168** in 3.0 ml Methanol gelöst. Man erwärmte das Reaktionsgemisch auf 50-60 °C und tropfte dann 1.80 ml (3.0 eq., 21.24 mmol; 0.66 g) einer 41 prozentigen wässrigen Methylaminlösung dazu. Nach kurzer Zeit verfärbte sich die Lösung intensiv orange. Man ließ noch 3 Stunden bei dieser Temperatur rühren, kühlte dann das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur ab, und vervollständigte die beginnende Kristallisation durch Eisbadkühlung. Man erhielt einen orangefarbenen Feststoff **169**.

Ausbeute: 1.07 g (quantitativ)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:8; $R_f = 0.4$

Schmelzpunkt: 33-35 °C (EtOH)

Lit.: 33-34.5 °C^[68]

IR (KBr): 3385 (m), 3092 (w), 2935 (w), 1619 (s), 1572 (s), 1515 (s), 1441 (m), 1410 (m), 1352 (s), 1326 (m), 1263 (s), 1232 (s), 1174 (s), 1127 (w), 1080 (w), 1049 (w), 1033 (w), 865 (w), 782 (w), 740 (s), 698 (w), 672 (w)

¹H-NMR: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

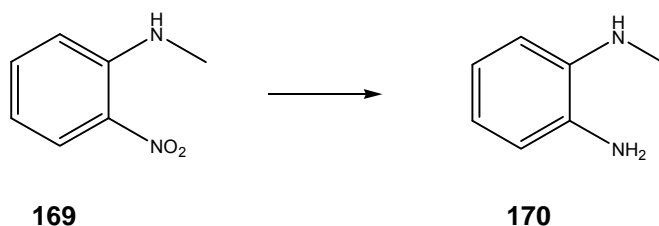
8.15 (s, 1H, NH, austauschbar mit D₂O), 8.05 (dd, $J_1 = 8.7$ Hz, $J_2 = 1.6$ Hz, H-C(3)), 7.55 (ddd, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 6.9$ Hz, $J_3 = 1.8$ Hz, 1H, H-C(5)), 6.98 (dd, $J_1 = 8.8$ Hz, $J_2 = 0.9$ Hz, 1H, H-C(6)), 6.68 (ddd, $J_1 = 8.4$ Hz, $J_2 = 6.9$ Hz, $J_3 = 1.2$ Hz, 1H, H-C(4)), 2.96 (d, $J = 5.0$ Hz, 3H, CH₃)

Elementaranalyse: % für C₇H₈N₂O₂ (152.15)

ber.: C 55.26 H 5.30 N 18.41

gef.: C 55.46 H 5.30 N 18.18

9.3.5 Synthese von N-Methyl-benzol-1,2-diamin



In einem einseitig verschlossenen Quarzrohr wurden 1.50 g (9.85 mmol) der Nitroverbindung **169** in 25 ml 1,4-Dioxan gelöst. Nach der Zugabe von 150 mg (10 Gew.%) Pd/C wurde die Reaktionsmischung für 4 Stunden bei einer Temperatur von 50 °C und einem Wasserstoffdruck von 30 bar in einer verschlossenen, zuvor mit Argon gespülten Druckapparatur, gerührt. Nach beendeter Reaktion filtrierte man vom Katalysator über Celite[®] ab, wusch mit 1,4-Dioxan nach, und entfernte das Lösungsmittel dann im Vakuum. Das Rohprodukt wurde an 30 g Flashkieselgel (Eluent:AcOEt/n-Hexan 2:1) säulenchromatographisch aufgereinigt. Das Reaktionsprodukt wurde in Form eines dunkelbraunen Öles **170** erhalten.

Ausbeute: 1.14 g (95%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:3; $R_f = 0.21$

Schmelzpunkt: (Lit.: 17-19 °C)^[69]

IR (KBr): 3350 (m) 3047 (w), 2963 (w), 2880 (w), 2806 (w), 1623 (m), 1597 (m), 1508 (s), 1477 (w), 1445 (w), 1346 (w), 1309 (w), 1267 (s), 1231 (m), 1162 (m), 1126 (w), 1073 (w), 1058 (w), 1037 (w), 911 (w), 854 (w), 744 (s), 587 (w), 560 (w),

¹H-NMR: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

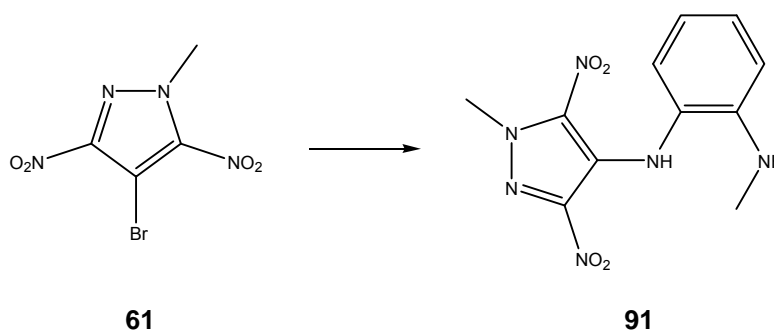
6.54-6.39 (m, 4H, aromatische H-Atome), 4.53 (s, br, 1H, NH, austauschbar mit D₂O), 4.40 (s, br, 2H, NH₂, austauschbar mit D₂O), 2.69 (s, br, 3H, CH₃)

Elementaranalyse: % für C₇H₁₀N₂ (122.17)

ber.: C 68.82 H 8.25 N 22.93

gef.: C 68.55 H 8.01 N 22.66

9.3.6 Synthese von 1-Methyl-4-(2-(methylamino)phenylamino)-3,5-dinitro-1H-pyrazol



680 mg (2.7 mmol) **61** wurden in 10 ml DMSO gelöst. Nach der Zugabe von 0.72 g (2.2 eq., 5.90 mmol) **170** verfärbte sich die anfangs leicht gelbliche Lösung tiefbraun. Man erwärmte die Reaktionsmischung nun für 36 Stunden auf 100 °C, ließ auf RT abkühlen und gab den Ansatz dann auf 100 ml Eiswasser. Die wässrige Phase wurde nun fünfmal mit jeweils 100 ml AcOEt extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel dann im Vakuum entfernt. Der verbliebene rotbraune Rückstand wurde an 300.00 g Flashkieselgel (Eluent: AcOEt/n-Hexan 1:4) säulenchromatographisch aufgereinigt. Das erhaltene Rohprodukt wurde zur weiteren Aufreinigung aus wenig MeOH umkristallisiert. Es wurden 150 mg **91** erhalten.

Ausbeute: 150 mg (19%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:3; R_f = 0.28

Schmelzpunkt: 128-130 °C (MeOH)

IR (KBr): 3386 (m), 3058 (w), 2932 (w), 2817 (w), 1602 (w), 1560 (w), 1518 (m), 1508 (m), 1492 (m), 1435 (m), 1403 (w), 1377 (w), 1356 (w), 1314 (s), 1272 (w), 1225 (w), 1194 (w), 1162 (m), 1126 (w), 1110 (w), 1063 (w), 927 (w), 848 (w), 822 (w), 796 (w), 749 (w), 628 (w), 576 (w),

¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆)

8.21 (s, br, 1H, NH, austauschbar mit D₂O), 6.99 (ddd, J₁ = 8.4 Hz, J₂ = 6.9 Hz, J₃ = 1.5 Hz, 1H, H-C(5)), 6.85 (dd, J₁ = 7.8 Hz, J₂ = 1.5 Hz, 1H, H-C(6)), 6.59 (dd, J₁ = 8.1 Hz, J₂ = 1.1 Hz, 1H, H-C(3)), 6.49 (ddd, J₁ = 8.9 Hz, J₂ = 7.6 Hz, J₃ = 1.3 Hz, 1H, H-C(4)), 5.12 (q, J = 4.9 Hz, 1H, NH-CH₃, austauschbar mit D₂O),

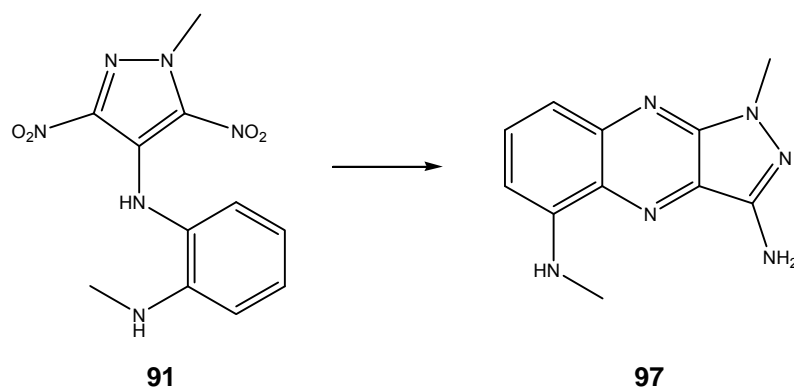
4.22 (s, 3H, CH₃-Pyrazolring), 2.67 (d, J = 4.9 Hz, 3H, NH-CH₃, wird nach Zugabe von D₂O zu einem Singulettsignal)

Elementaranalyse: % für C₁₁H₁₂N₆O₄ (292.25)

ber.: C 45.21 H 4.14 N 28.76

gef.: C 45.33 H 4.29 N 28.49

9.3.7 Synthese von N⁵,1-Dimethyl-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3,5-diamin



500 mg (1.71 mmol) der Verbindung **91** wurden in 20 ml 2 N NaOH suspendiert. Zu dieser Suspension gab man 0.26 g (4.0 eq., 6.84 mmol) fein gemörstertes NaBH₄ und erhitze den Reaktionsansatz dann für drei Stunden zum Rückfluß. Dabei war eine Farbänderung von gelb nach Rot zu beobachten. Nach dem Abkühlen wurde die rote Lösung insgesamt fünfmal mit jeweils 100 ml AcOEt extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Der verbliebene Rückstand wurde an 20 g Flashkieselgel (Eluent:AcOEt/n-Hexan 1:2) säulenchromatographisch aufgereinigt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde nochmals aus wenig EtOH umkristallisiert. Das Chinoxalinderivat **97** wurde in Form eines rotbraunen Feststoffes erhalten.

Ausbeute: 225 mg (58%)

und getrocknet wurde. Das Filtrat wurde noch dreimal mit jeweils 50 ml AcOEt extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel dann im Vakuum entfernt. Der verbliebene Rückstand wurde zusammen mit der ersten Ausfällung säulenchromatographisch aufgereinigt (Eluent: AcOEt/n-Hexan 1:3). Es wurde ein dunkelgelber Feststoff erhalten, der aus EtOH umkristallisiert wurde. Das Produkt **89** fiel in Form gelber Nadeln an.

Ausbeute: 1.36 g (52%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:8; R_f = 0.17

Schmelzpunkt: 157-158 °C (EtOH)

Lit.: 158-159 °C^[70]

IR (KBr): 3319 (m), 1586 (s), 1508 (m), 1482 (s), 1456 (w), 1435 (m), 1377 (s), 1356 (s), 1314 (s), 1241 (w), 1199 (w), 1168 (w), 1115 (w), 1079 (w), 1058 (w), 1026 (w), 948 (w), 906 (w), 864 (w), 822 (w), 801 (w), 754 (w), 707 (w), 697 (w), 670 (w), 597 (w),

¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆)

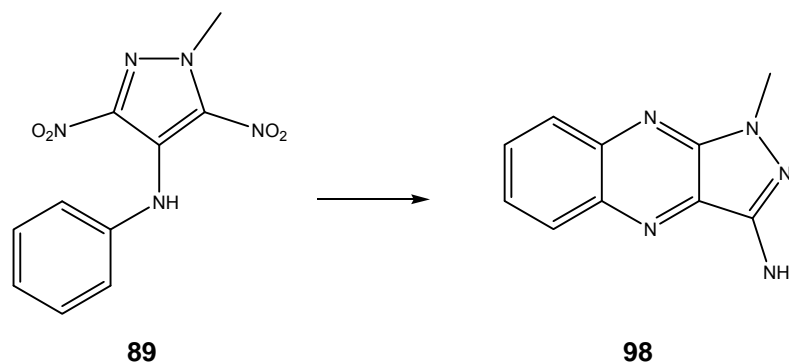
8.92 (s, 1H, NH, austauschbar mit D₂O), 7.25-7.19 (m, 2H, aromatische H-Atome), 6.98-6.92 (m, 3H, aromatische H-Atome), 4.26 (s, 3H, CH₃)

Elementaranalyse: % für C₁₀H₉N₅O₄ (263.21)

ber.: C 45.63 H 3.45 N 26.61

gef.: C 45.90 H 3.56 N 26.33

9.3.9 Synthese von 1-Methyl-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3-amin



1.0 g (3.8 mmol) **89** wurden zusammen mit 0.57 g (4.0 eq., 15.2 mmol) NaBH₄ in 20 ml einer 2 N NaOH für 2 Stunden zum Sieden erhitzt. Nach kurzer Zeit wurde die Reaktionslösung rot. Nach beendeter Reaktion ließ man die Mischung erkalten und extrahierte die wässrige Phase viermal mit jeweils 100 ml AcOEt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel dann im Vakuum entfernt. Der verbliebene rotbraune Rückstand wurde an 20.00 g Flashkieselgel aufgereinigt (Eluent: AcOEt/n-Hexan 1:1). Der erhaltene rote Feststoff wurde mehrmals aus wenig EtOH umkristallisiert. Das Produkt **98** wurde in Form roter Kristalle isoliert.

Ausbeute: 450 mg (59%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:5; R_f = 0.2

Schmelzpunkt: 177-178 °C (EtOH)

Lit.: 178 °C^[71]

IR (KBr): 3378 (s), 3320 (m), 3189 (m), 3061 (w), 2927 (w), 1642 (m), 1622 (m), 1577 (s), 1561 (s), 1490 (s), 1397 (s), 1354 (m), 1324 (w), 1247 (w), 1193 (m), 1112 (m), 1048 (w), 977 (w), 826 (w), 819 (w), 798 (w), 757 (w), 744 (w), 686 (w), 639 (w), 618 (w), 598 (w),

¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆)

8.15 (dd, J₁ = 8.5 Hz, J₂ = 1.1 Hz, 1H, H-C(5) oder H-C(8)), 8.02 (dd, J₁ = 8.6 Hz, J₂ = 0.9 Hz, 1H, H-C(8) oder H-C(5)), 7.83 (ddd, J₁ = 8.5 Hz, J₂ = 6.8 Hz, J₃ = 1.6 Hz, 1H, H-C(6)) oder H-C(7)), 7.66 (ddd, J₁ = 8.4 Hz, J₂ = 6.8 Hz, J₃ = 1.5 Hz, 1H, H-C(7)) oder H-C(6)), 6.30 (s,br,2H, NH₂, austauschbar mit D₂O), 3.84 (s, 3H, CH₃)

^{13}C -NMR: (δ [ppm], 62.90 MHz, DMSO- d_6)

147.66 (C(3)-NH₂), 142.53 (C(3a)), 141.35 (C(9a)), 138.27 (C(4a)), 131.07 (C(8a)), 130.70 (C(6)), 129.72 (C(7)), 127.66 (C(8)), 125.98 (C(5)), 32.97 (N(CH₃)),

Elementaranalyse: % für C₁₀H₉N₅ (199.21)

ber.: C 60.29 H 4.55 N 35.16

gef.: C 60.10 H 4.56 N 34.91

Kristallstruktur der Verbindung 98

Die Kristallisation erfolgte aus Ethanol

Kristallsystem: orthorhombisch; Raumgruppe Pbc_a; Elementarzelle: $a = 23.287(4) \text{ \AA}$, $b = 7.1720(9) \text{ \AA}$, $c = 33.031(5) \text{ \AA}$; $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$; $V = 5516.6(13) \text{ \AA}^3$; $Z = 24$, $\rho_{\text{ber}} = 1.439 \text{ Mg/m}^3$; Siemens Smart Diffraktometer; Absorptionskoeffizient: $= 0.095 \text{ mm}^{-1}$; Wellenlänge = 0.71073 \AA ; $T = 155(2) \text{ K}$; Reflexe gemessen: 46156, davon 6297 unabhängige, ($R_{(\text{int})} = 0.2380$); $R_w = 0.1807$; goodness of fit = 1.067; Theta Bereich für Datenerfassung: 1.51 bis 28.31° ; Restelektronendichte: zwischen 0.357 und -0.365 e/\AA^3 , Extinktionskoeffizient: 0.0016 (2). Zur Kristallstrukturbestimmung wurde ein roter, nadelförmiger Einkristall, mit folgenden Dimensionen vermessen: $0.03 \text{ mm} \cdot 0.07 \text{ mm} \cdot 1.25 \text{ mm}$. Die Messung erfolgte bei einer Temperatur von -118°C , mittels eines SIEMENS SMART Diffraktometers. Es wurde keinerlei Absorptionskorrektur vorgenommen. Die Werte der wiederholt gemessenen Reflexe blieben stabil. Gleiche Reflexe wurden gemittelt. $R(I) = 0.269$. Die Struktur konnte durch direkte Methoden mit Hilfe des Programms SHELXS gelöst werden. Die Wasserstoffatome wurden geometrisch angeordnet und als nicht starre Atome betrachtet. Die Strukturverfeinerung erfolgte auch mit F^2 -Werten und mit dem Programm SHELXL-97. Die absolute Restelektronendichte lag zwischen -0.32 und 0.44 e/\AA^3 . Die R-Werte waren im Vergleich zu vielen schwachen Reflexen ziemlich groß.

Diskussion der Struktur:

Die asymmetrische Einheit enthält drei unabhängige Moleküle. Die Abmessungen der drei Moleküle sind ziemlich ähnlich. Die Bindungslängen in der bezeichneten Verbindung ähneln sehr den Bindungslängen, die man in der Kristallstruktur von 3-Phenylpyrazolo[4,5-b]chinoxalin (Mamedov et al., *Zh. Org. Khim.*, 39, 2003, 141, CSD-Refcode IJBAE) erhalten hat. Die Bindungslängen in dem Chinoxalinfragment ähneln sehr den Bindungslängen, die man beim Naphthalin erhalten hat. Die Pyrazolochinoxalgruppen sind nahezu planar (größte Abweichung von der Planarität: Molekül 1: 0.020 Å, Molekül 2: 0.015 Å und Molekül 3: 0.019 Å). Die Moleküle bilden „Stapel“ in der kristallographischen b-Richtung aus, welche auch mit den „Nadelaxen“ des Kristalls korrespondieren. Es sind zwei unterschiedliche „Stapel“ vorhanden. Der eine „Stapel“ besteht ausschließlich aus symmetriegleichen Molekülen der Nummer 1. Der Winkel zwischen benachbarten Stapeln in dieser Ebene beträgt 6.5 °. Der kürzeste intermolekulare C...C-Abstand beträgt 3.274 (6) Å. Der zweite Stapel besteht aus alternierenden Molekülen 2 und 3. Der Winkel zwischen benachbarten Ebenen in diesem „Stapel“ beträgt 1.0 °. Die kürzesten intermolekularen C...C-Abstände betragen hier 3.389 (6) Å. Die beiden „Molekülstapel“ sind untereinander über N-H...N-Wasserstoffbrückenbindungen zu zweidimensionalen Strukturen parallel zur [001] Ebene verbunden. Nur 5 von 6 N-H-Bindungen sind an der Ausbildung von Wasserstoffbrücken beteiligt. Die Wasserstoffbrücken sind ziemlich schwach (H...N-Abstände zwischen 2.11 und 2.43 Å). Die N8-H8B-Bindung, welche keine Wasserstoffbrücken ausbildet, zeigt eine schwache intermolekulare N-H...pi-Wechselwirkung mit zwei Benzol-C-Atomen. Diese Wechselwirkung verbindet benachbarte Schichten in c-Richtung.

Tabelle 12: Wasserstoffbrücken der Verbindung **98**

N-H...N	N-H [Å]	H...N [Å]	N...N [Å]	N-H-N [°]
N3-H3A...N12	0.88	2.19	3.073 (5)	176
N3-H3B...N15	0.88	2.38	3.172 (4)	150
N8-H8A...N14	0.88	2.31	3.157 (4)	161
N13-H13A...N2	0.88	2.43	3.307 (5)	172
N13-H13B...N7	0.88	2.11	2.979 (4)	169

Tabelle 13: Torsionswinkel von Verbindung 98

Torsionswinkel		Torsionswinkel	
Atome	[°]	Atome	[°]
C(5)-N(4)-C(2)-C(3)	-0.5 (5)	N(4)-C(2)-C(3)-N(5)	1.6 (6)
C(5)-N(4)-C(2)-C(1)	-179.2 (4)	C(1)-C(2)-C(3)-N(5)	-179.4 (4)
C(3)-N(5)-C(10)-C(9)	179.8 (4)	N(4)-C(2)-C(3)-N(1)	-177.9 (4)
C(3)-N(5)-C(10)-C(5)	-0.4 (5)	C(1)-C(2)-C(3)-N(1)	1.2 (4)
C(1)-N(2)-N(1)-C(3)	1.7 (4)	N(5)-C(10)-C(9)-C(8)	178.8 (4)
C(1)-N(2)-N(1)-C(4)	175.6 (3)	C(5)-C(10)-C(9)-C(8)	-1.1 (6)
C(2)-N(4)-C(5)-C(6)	178.1 (4)	N(1)-N(2)-C(1)-N(3)	178.6 (4)
C(2)-N(4)-C(5)-C(10)	-0.9 (5)	N(1)-N(2)-C(1)-C(2)	-0.9 (4)
N(5)-C(10)-C(5)-N(4)	1.4 (6)	N(4)-C(2)-C(1)-N(2)	178.7 (4)
C(9)-C(10)-C(5)-N(4)	-178.7 (4)	C(3)-C(2)-C(1)-N(2)	-0.2 (5)
N(5)-C(10)-C(5)-C(6)	-177.5 (3)	N(4)-C(2)-C(1)-N(3)	-0.7 (7)
C(9)-C(10)-C(5)-C(6)	2.3 (6)	C(3)-C(2)-C(1)-N(3)	-179.6 (4)
N(4)-C(5)-C(6)-C(7)	179.6 (4)	C(5)-C(6)-C(7)-C(8)	-0.8 (6)
C(10)-C(5)-C(6)-C(7)	-1.4 (6)	C(10)-C(9)-C(8)-C(7)	-1.1 (6)
C(10)-N(5)-C(3)-N(1)	178.3 (4)	C(6)-C(7)-C(8)-C(9)	2.1 (6)
C(10)-N(5)-C(3)-C(2)	-1.0 (6)	N(11)-N(12)-C(21)-N(13)	-176.8 (4)
N(2)-N(1)-C(3)-N(5)	178.8 (4)	N(11)-N(12)-C(21)-C(22)	1.7 (4)
C(4)-N(1)-C(3)-N(5)	5.3 (7)	C(25)-N(14)-C(22)-C(23)	0.6 (5)
N(2)-N(1)-C(3)-C(2)	-1.8 (4)	C(25)-N(14)-C(22)-C(21)	-177.6 (4)
C(4)-N(1)-C(3)-C(2)	-175.2 (4)	N(12)-C(21)-C(22)-N(14)	177.9 (4)
N(13)-C(21)-C(22)-N(14)	-3.7 (7)	C(21)-C(22)-C(23)-N(11)	-0.9 (4)
N(12)-C(21)-C(22)-C(23)	-0.6 (4)	N(10)-C(13)-N(6)-N(7)	-179.3 (4)
N(13)-C(21)-C(22)-C(23)	177.8 (4)	C(12)-C(13)-N(6)-N(7)	-0.4 (4)
C(21)-N(12)-N(11)-C(23)	-2.3 (4)	N(10)-C(13)-N(6)-C(14)	6.8 (7)
C(21)-N(12)-N(11)-C(24)	-170.0 (3)	C(12)-C(13)-N(6)-C(14)	-174.3 (4)
C(22)-N(14)-C(25)-C(26)	179.0 (3)	C(11)-N(7)-N(6)-C(13)	0.3 (4)
C(22)-N(14)-C(25)-C(30)	-1.5 (5)	C(11)-N(7)-N(6)-C(14)	174.8 (4)
C(20)-N(10)-C(13)-N(6)	178.3 (4)	C(15)-N(9)-C(12)-C(13)	-0.7 (5)
C(20)-N(10)-C(13)-C(12)	-0.4 (6)	C(15)-N(9)-C(12)-C(11)	-178.8 (4)
C(12)-N(9)-C(15)-C(16)	179.5 (3)	N(10)-C(13)-C(12)-N(9)	0.8 (6)
C(12)-N(9)-C(15)-C(20)	0.4 (5)	N(6)-C(13)-C(12)-N(9)	-178.2 (4)
C(30)-N(15)-C(23)-N(11)	179.2 (4)	N(10)-C(13)-C(12)-C(11)	179.3 (4)
C(30)-N(15)-C(23)-C(22)	-1.0 (5)	N(6)-C(13)-C(12)-C(11)	0.4 (4)
N(12)-N(11)-C(23)-N(15)	-178.2 (4)	C(23)-N(15)-C(30)-C(29)	-178.1 (3)
C(24)-N(11)-C(23)-N(15)	-12.1 (7)	C(23)-N(15)-C(30)-C(25)	0.1 (5)

Fortsetzung von Tabelle 13

N(12)-N(11)-C(23)-C(22)	2.0 (4)	C(28)-C(29)-C(30)-N(15)	179.2 (4)
C(24)-N(11)-C(23)-C(22)	168.1 (4)	C(28)-C(29)-C(30)-C(25)	0.9 (6)
N(14)-C(22)-C(23)-N(15)	0.7 (6)	N(14)-C(25)-C(30)-N(15)	1.2 (6)
C(21)-C(22)-C(23)-N(15)	179.3 (4)	C(26)-C(25)-C(30)-N(15)	-179.3 (4)
N(14)-C(22)-C(23)-N(11)	-179.5 (3)	N(14)-C(25)-C(30)-C(29)	179.4 (3)
C(26)-C(25)-C(30)-C(29)	-1.1 (5)	N(9)-C(12)-C(11)-N(7)	178.1 (4)
N(14)-C(25)-C(26)-C(27)	-179.7 (4)	C(13)-C(12)-C(11)-N(7)	-0.2 (5)
C(30)-C(25)-C(26)-C(27)	0.8 (6)	N(9)-C(12)-C(11)-N(8)	2.4 (7)
C(13)-N(10)-C(20)-C(19)	-178.8 (4)	C(13)-C(12)-C(11)-N(8)	-175.9 (4)
C(13)-N(10)-C(20)-C(15)	0.1 (5)	C(25)-C(26)-C(27)-C(28)	-0.2 (6)
N(9)-C(15)-C(20)-N(10)	-0.1 (6)	C(15)-C(16)-C(17)-C(18)	0.0 (6)
C(16)-C(15)-C(20)-N(10)	-179.2 (4)	C(16)-C(17)-C(18)-C(19)	-0.1 (6)
N(9)-C(15)-C(20)-C(19)	178.8 (4)	C(17)-C(18)-C(19)-C(20)	0.1 (6)
C(16)-C(15)-C(20)-C(19)	-0.3 (6)	N(10)-C(20)-C(19)-C(18)	179.1 (4)
N(9)-C(15)-C(16)-C(17)	-178.9 (4)	C(15)-C(20)-C(19)-C(18)	0.1 (6)
C(20)-C(15)-C(16)-C(17)	0.2 (6)	C(30)-C(29)-C(28)-C(27)	-0.3 (6)
N(6)-N(7)-C(11)-N(8)	176.0 (4)	C(26)-C(27)-C(28)-C(29)	0.0 (6)
N(6)-N(7)-C(11)-C(12)	0.0 (4)		

Tabelle 14: Bindungslängen [Å] von Verbindung 98

Atome	Bindungslängen [Å]	Atome	Bindungslängen [Å]
N(5)-C(3)	1.320 (5)	C(21)-C(22)	1.451 (5)
N(5)-C(10)	1.373 (5)	N(9)-C(12)	1.319 (4)
N(4)-C(2)	1.325 (5)	N(9)-C(15)	1.371 (5)
N(4)-C(5)	1.371 (5)	C(22)-C(23)	1.425 (5)
C(2)-C(3)	1.423 (5)	N(11)-C(23)	1.351 (5)
C(2)-C(1)	1.435 (5)	N(11)-C(24)	1.443 (4)
C(10)-C(9)	1.413 (5)	C(25)-C(26)	1.414 (5)
C(10)-C(5)	1.434 (5)	C(25)-C(30)	1.434 (5)
N(2)-C(1)	1.326 (5)	C(13)-N(6)	1.354 (5)
N(2)-N(1)	1.411 (4)	C(13)-C(12)	1.430 (5)
N(1)-C(3)	1.349 (4)	C(15)-C(16)	1.427 (5)
N(1)-C(4)	1.439 (4)	C(15)-C(20)	1.430 (5)
C(5)-C(6)	1.417 (5)	N(7)-C(11)	1.315 (5)
C(6)-C(7)	1.356 (5)	N(7)-N(6)	1.398 (4)
C(9)-C(8)	1.365 (5)	C(29)-C(28)	1.356 (5)
C(1)-N(3)	1.357 (5)	C(29)-C(30)	1.429 (5)

Fortsetzung von Tabelle 14

Atome	Bindungslängen [Å]	Atome	Bindungslängen [Å]
C(7)-C(8)	1.414 (5)	N(6)-C(14)	1.446 (5)
N(14)-C(22)	1.326 (4)	C(12)-C(11)	1.432 (5)
N(14)-C(25)	1.366 (4)	C(26)-C(27)	1.360 (5)
N(15)-C(23)	1.321 (4)	C(20)-C(19)	1.408 (5)
N(15)-C(30)	1.371 (5)	C(16)-C(17)	1.375 (5)
N(10)-C(13)	1.323 (4)	C(11)-N(8)	1.377 (5)
N(10)-C(20)	1.370 (5)	C(27)-C(28)	1.408 (5)
N(12)-C(21)	1.330 (5)	C(17)-C(18)	1.416 (6)
N(12)-N(11)	1.404 (4)	C(18)-C(19)	1.366 (6)
N(13)-C(21)	1.355 (4)		

Tabelle 15: Bindungswinkel [°] von Verbindung 98

Atome	Bindungswinkel [°]	Atome	Bindungswinkel [°]
C(3)-N(5)-C(10)	112.3 (3)	C(23)-C(22)-C(21)	104.6 (3)
C(2)-N(4)-C(5)	113.7 (3)	C(23)-N(11)-N(12)	111.1 (3)
N(4)-C(2)-C(3)	122.9 (4)	C(23)-N(11)-C(24)	128.4 (3)
N(4)-C(2)-C(1)	131.7 (4)	N(12)-N(11)-C(24)	119.1 (3)
C(3)-C(2)-C(1)	105.4 (3)	N(14)-C(25)-C(26)	119.7 (3)
N(5)-C(10)-C(9)	118.6 (3)	N(14)-C(25)-C(30)	121.9 (3)
N(5)-C(10)-C(5)	122.8 (3)	C(26)-C(25)-C(30)	118.4 (3)
C(9)-C(10)-C(5)	118.7 (4)	N(10)-C(13)-N(6)	128.2 (4)
C(1)-N(2)-N(1)	106.0 (3)	N(10)-C(13)-C(12)	125.3 (3)
C(3)-N(1)-N(2)	111.6 (3)	N(6)-C(13)-C(12)	106.5 (3)
C(3)-N(1)-C(4)	127.3 (3)	N(9)-C(15)-C(16)	117.4 (4)
N(2)-N(1)-C(4)	120.8 (3)	N(9)-C(15)-C(20)	123.3 (3)
N(4)-C(5)-C(6)	118.9 (3)	C(16)-C(15)-C(20)	119.3 (4)
N(4)-C(5)-C(10)	122.5 (4)	C(11)-N(7)-N(6)	106.8 (3)
C(6)-C(5)-C(10)	118.6 (3)	C(28)-C(29)-C(30)	120.7 (4)
C(7)-C(6)-C(5)	121.4 (4)	N(15)-C(23)-N(11)	127.7 (3)
N(5)-C(3)-N(1)	127.9 (3)	N(15)-C(23)-C(23)	124.9 (3)
N(5)-C(3)-C(2)	125.7 (4)	N(11)-C(23)-C(22)	107.3 (3)
N(1)-C(3)-C(2)	106.4 (3)	C(13)-N(6)-N(7)	111.1 (3)
C(8)-C(9)-C(10)	120.5 (4)	C(13)-N(6)-C(14)	128.8 (3)
N(2)-C(1)-N(3)	123.3 (3)	N(7)-N(6)-C(14)	119.8 (3)
N(2)-C(1)-C(2)	110.6 (3)	N(9)-C(12)-C(13)	123.5 (3)
N(3)-C(1)-C(2)	126.1 (4)	N(9)-C(12)-C(11)	131.8 (4)

Fortsetzung von Tabelle 15

Atome	Bindungswinkel [°]	Atome	Bindungswinkel [°]
C(6)-C(7)-C(8)	119.7 (4)	C(13)-C(12)-C(11)	104.7 (3)
C(9)-C(8)-C(7)	121.0 (4)	N(15)-C(30)-C(29)	118.3 (3)
C(22)-N(14)-C(25)	114.3 (3)	N(15)-C(30)-C(23)	123.1 (3)
C(23)-N(15)-C(30)	112.8 (3)	C(29)-C(30)-C(25)	118.6 (3)
C(13)-N(10)-C(20)	112.3 (3)	C(27)-C(26)-C(25)	121.2 (4)
C(21)-N(12)-N(11)	106.8 (3)	N(10)-C(20)-C(19)	118.6 (4)
N(12)-C(21)-N(13)	122.7 (3)	N(10)-C(20)-C(15)	122.7 (4)
N(12)-C(21)-C(22)	110.1 (3)	C(19)-C(20)-C(15)	118.7 (4)
N(13)-C(21)-C(22)	127.1 (3)	C(17)-C(16)-C(15)	119.8 (4)
C(12)-N(9)-C(15)	113.0 (3)	N(7)-C(11)-N(8)	121.0 (3)
N(14)-C(22)-C(23)	123.0 (3)	N(7)-C(11)-C(12)	111.0 (3)
N(14)-C(22)-C(21)	132.4 (3)	N(8)-C(11)-C(12)	127.9 (4)

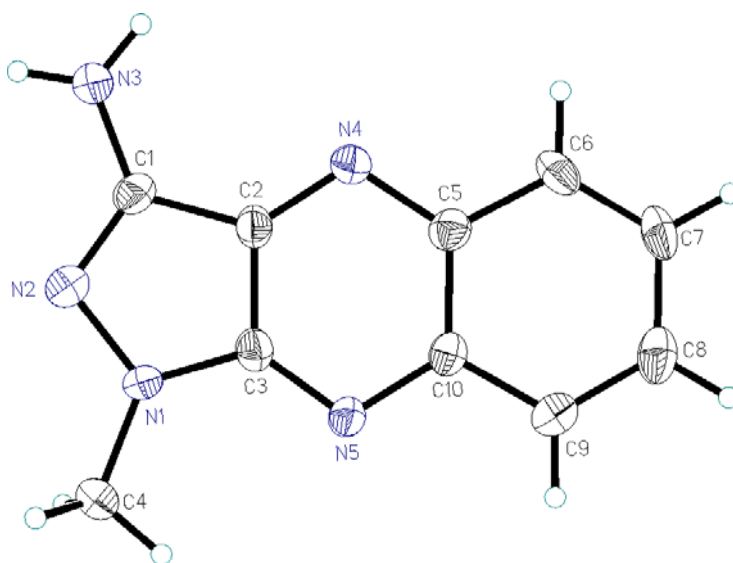


Abbildung 69: Kristallstruktur der Verbindung 98 (Molekül 1)

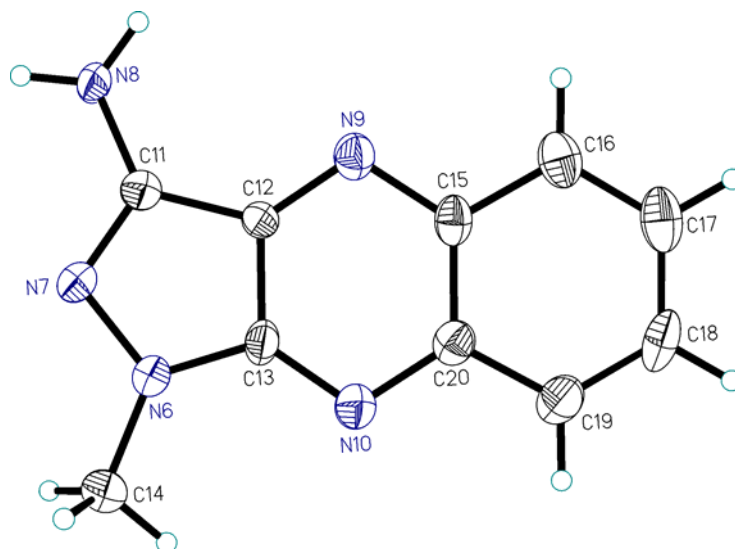


Abbildung 70: Kristallstruktur der Verbindung 98 (Molekül 2)

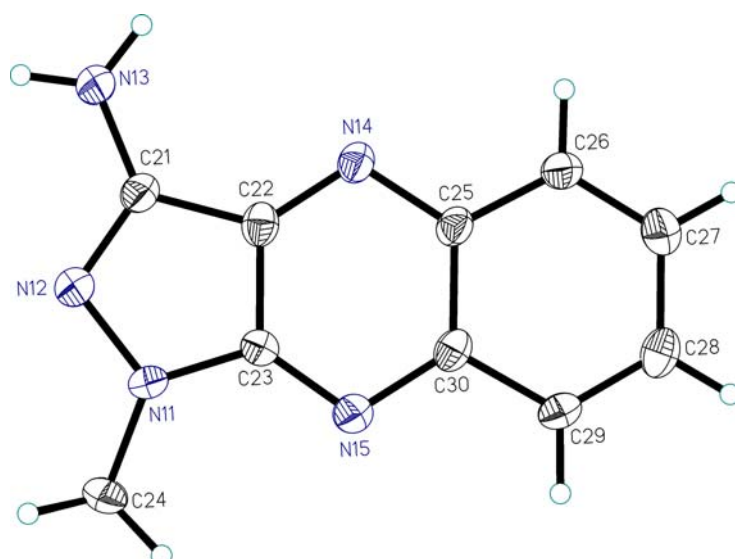


Abbildung 71: Kristallstruktur der Verbindung 98 (Molekül 3)

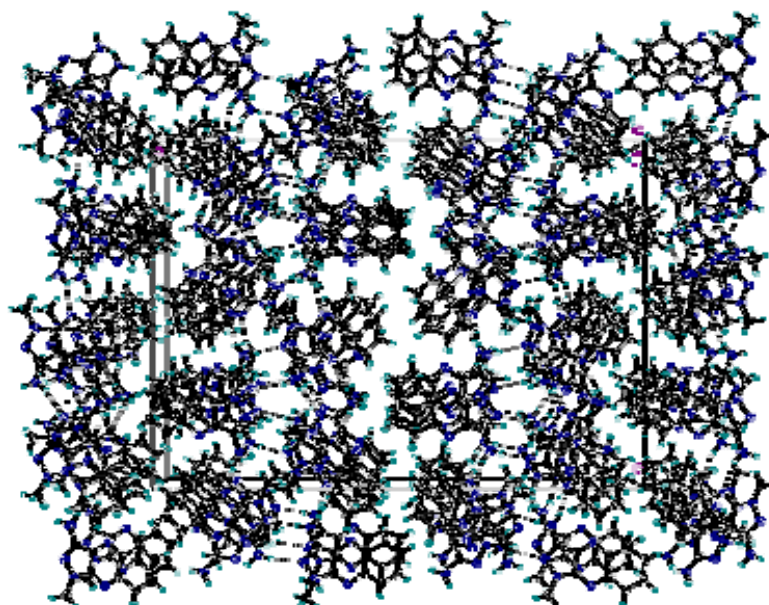
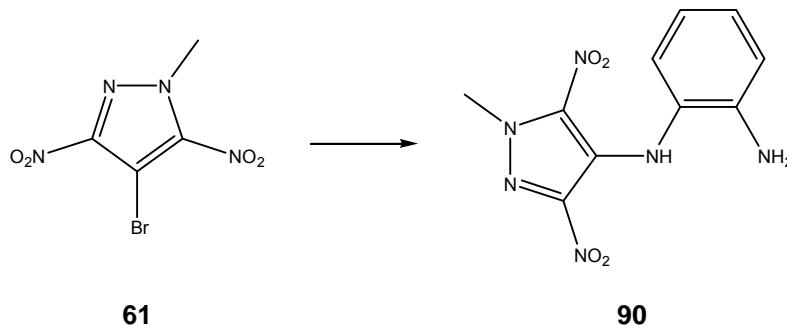


Abbildung 72: Struktur der Verbindung **98** im Kristallverbund

9.3.10 Synthese von 4-(2-Aminophenylamino)-1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol



In einem 50 ml Zweihalskolben wurden 3.0 g (11.9 mmol) **61** in 5 ml DMSO gelöst. Die gelbe, klare Lösung wurde auf 50- 60 °C erwärmt. Bei dieser Temperatur tropfte man innerhalb von 5 Minuten eine Lösung von 3.87 g (3.0 eq., 35.9 mmol) 1,2-Diaminobenzol in 5 ml DMSO dazu. Die Lösung verfärbte sich dabei rötlich-braun. Nach beendeter Zugabe erwärmte man die Reaktionsmischung für 8 Stunden auf 100 °C. Nach dem Erkalten gab man den Ansatz auf 200 ml Eiswasser. Der ausgefallene Niederschlag wurde abgesaugt und aus EtOH umkristallisiert. Das Produkt **90** wurde als rotes Pulver erhalten.

Ausbeute: 2.26 g (68%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:4; $R_f = 0.1$

Schmelzpunkt: 171-173 °C (EtOH)

IR (KBr): 3435 (w), 3361 (w), 3309 (w), 1623 (w), 1592 (s), 1534 (w), 1503 (m), 1482 (s), 1456 (w), 1429 (w), 1377 (m), 1361 (m), 1340 (m), 1309 (s), 1204 (w), 1157 (w), 1105 (w), 1058 (w), 953 (w), 932 (w), 875 (w), 827 (m), 796 (m), 748 (m), 702 (w), 660 (w), 581 (w),

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

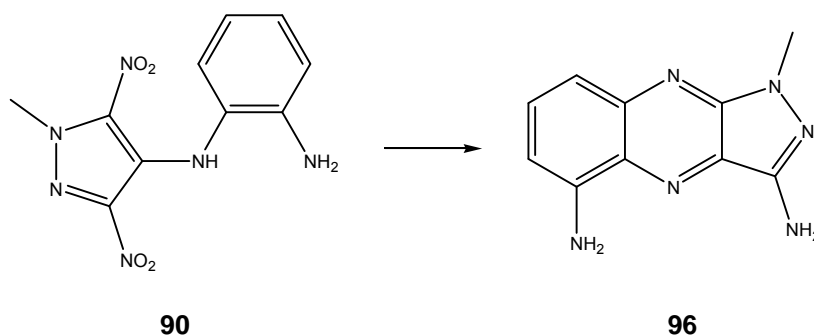
8.30 (s, br, 1H, NH, austauschbar mit D_2O), 6.88-6.82 (m, 2H, aromatische H-Atome, 6.71-6.68 (m, 1H, H-Atom des Aromaten), 6.50-6.44 (m, 1H, H-Atom des Aromaten), 4.90 (s, br, 2H, NH_2 , austauschbar mit D_2O), 4.22 (s, 3H, CH_3)

Elementaranalyse: % für $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_6\text{O}_4$ (278.22)

ber.: C 43.17 H 3.62 N 30.21

gef.: C 43.17 H 3.47 N 29.98

9.3.11 Synthese von 1-Methyl-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3,5-diamin



1.5 g (5.4 mmol) **90** wurden zusammen mit 0.81 g (4.0 eq., 21.6 mmol) fein gemörsertem NaBH_4 in 30 ml 2 N NaOH suspendiert. Der Reaktionsansatz wurde nun für 3 h zum Rückfluß erhitzt. Die Lösung verfärbte sich dabei dunkelrotbraun. Nachdem kein Edukt mehr nachzuweisen war, kühlte man die Reaktionsmischung auf RT ab und extrahierte die wässrige Phase nun fünfmal mit jeweils 100 ml AcOEt. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das verbliebene Roh-

produkt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt. (Eluent: AcOEt/n-Hexan 1:1). Der erhaltene Rückstand wurde nochmals aus EtOH umkristallisiert. Das Produkt **96** wurde als roter Feststoff erhalten.

Ausbeute: 810 mg (70%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:2; $R_f = 0.15$

Schmelzpunkt: 216-217 °C (EtOH)

IR (KBr): 3411 (w), 3317 (s), 3286 (s), 3160 (s), 2930 (s), 2814 (w), 1627 (m), 1606 (m), 1575 (s), 1560 (s), 1538 (w), 1517 (w), 1486 (s), 1397 (s), 1350 (s), 1287 (m), 1250 (w), 1198 (m), 1156 (m), 1109 (m), 1020 (w), 821 (m), 769 (m), 737 (s), 695 (w), 622 (w)

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

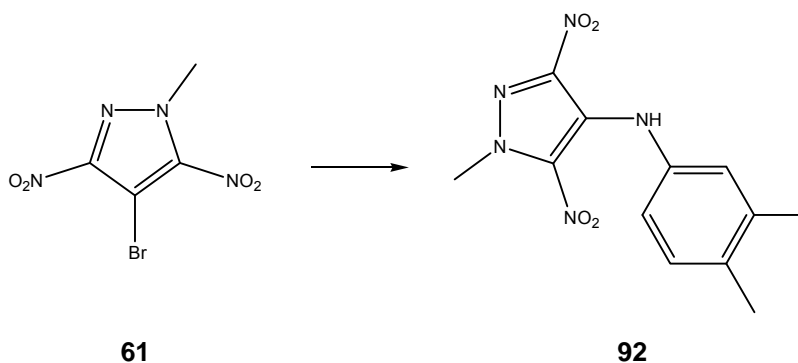
7.50 (ψ t, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-C(7)), 7.10 (dd, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 1.2$ Hz, 1H, H-C(6)), 6.71 (dd, $J_1 = 7.5$ Hz, $J_2 = 1.2$ Hz, 1H, H-C(8)), 6.13 (ψ d, 4H, NH_2 -Gruppen, austauschbar mit D_2O), 3.80 (s, 3H, CH_3),

Elementaranalyse: % für $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_6$ (214.23)

ber.: C 56.07 H 4.71 N 39.23

gef.: C 56.34 H 4.81 N 39.48

9.3.12 Synthese von 4-(3,4-Dimethylphenylamino)-1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol



10.0 g (39.8 mmol) der Verbindung **61** wurden zusammen mit 5.8 g (1.20 eq.; 47.80 mmol) 3,4-Dimethylanilin in 40 ml DMSO gelöst. Die intensiv rot gefärbte

Lösung wurde nun für 4 h auf 100 °C erwärmt. Nach dem Erkalten gab man die dunkelrote, klare Lösung auf 300 ml Eiswasser, wobei sich ein orangefarbener, amorpher Feststoff abschied. Das Produkt wurde dreimal mit jeweils 200 ml AcOEt extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der zurückgebliebene rot-schwarze Feststoff dann aus EtOH umkristallisiert. Beim Erkalten kristallisierten 5.66 g **92** in Form orangefarbener Kristalle aus der Lösung aus.

Ausbeute: 5.66 g (49 %)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:4; R_f = 0.4

Schmelzpunkt: 140-141 °C (EtOH)

IR (KBr): 3445 (w), 3319 (m), 2911 (w), 2859 (w), 1602 (s), 1566 (w), 1545 (w), 1487 (s), 1429 (m), 1367 (m), 1330 (s), 1309 (s), 1251 (w), 1220 (w), 1105 (w), 1058 (m), 875 (m), 827 (m), 791 (w), 749 (w), 691 (w), 670 (w), 613 (w)

¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆)

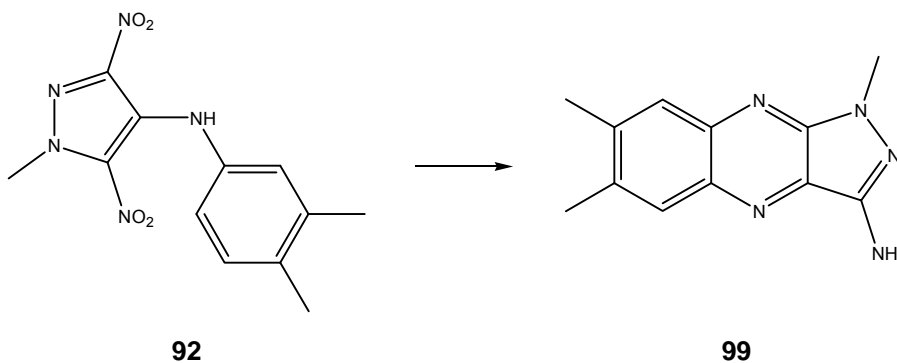
8.78 (s, br, 1H, NH, austauschbar mit D₂O), 6.97 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-C(5)), 6.79 (s, br, 1H, H-C(2)), 6.68 (dd, J₁ = 8.0 Hz, J₂ = 2.23 Hz, 1H, H-C(6)), 4.24 (s, 3H, N-CH₃), 2.13 (s, 6H, C-CH₃)

Elementaranalyse: (%) für C₁₂H₁₃N₅O₄ (291.26)

ber.: C 49.48 H 4.50 N 24.04

gef.: C 49.56 H 4.27 N 23.81

9.3.13 Synthese von 1,6,7-Trimethyl-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3-ylamin



250 mg (0.85 mmol) **92** wurden in 40 ml 2 N NaOH suspendiert. Nach Zugabe von 130 mg (4.0 eq., 3.43 mmol) fein gemörsertem NaBH₄ wurde der Reaktionsansatz für 3 h zum Sieden erhitzt. Nach beendeter Reaktion ließ man auf RT abkühlen und extrahierte die dunkelrote Lösung insgesamt viermal mit jeweils 100 ml AcOEt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel dann im Vakuum entfernt. Der rotbraune Rückstand wurde an 30.00 g Flashkieselgel (Eluent: AcOEt/n-Hexan 1:1) aufgereinigt. Durch nochmaliges Umkristallisieren des erhaltenen Feststoffes aus EtOH konnten so 40 mg elementaranalysenreines Produkt **99** erhalten werden.

Ausbeute: 40 mg (21%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:5; R_f = 0.13

Schmelzpunkt: 222-224 °C (EtOH)

IR (KBr): 3424 (w), 3332 (w), 3298 (w), 3194 (w), 2922 (w), 2859 (w), 1623 (m), 1581 (s), 1555 (s), 1492 (w), 1461 (w), 1408 (m), 1367 (m), 1314 (w), 1225 (w), 1210 (w), 1183 (w), 1157 (w), 1115 (w), 1089 (w), 1021 (w), 822 (w), 791 (m), 655 (m), 618 (w), 587 (w)

¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆)

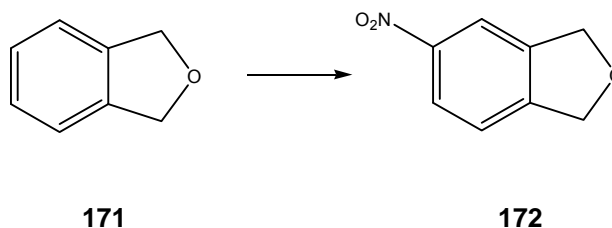
7.88 (s, br, 1H, H-C(8) oder H-C(5)), 7.80 (s, br, 1H, H-C(5) oder H-C(8)), 6.16 (s, br, 2H, NH₂, austauschbar mit D₂O), 3.81 (s, 3H, N-CH₃), 2.46 (br, 6H, CH₃-Gruppen, liegen unter DMSO-Signal).

Elementaranalyse: (%) für C₁₂H₁₃N₅ (227.27)

ber.: C 63.42 H 5.77 N 30.82

gef.: C 63.56 H 5.93 N 30.84

9.3.14 Synthese von 1,3-Dihydro-5-nitroisobenzofuran



5.5 ml (0.05 mol, 6.0 g) Phthalan **171** wurden in 75 ml konz. H_2SO_4 gelöst. Die gelbe, klare Reaktionslösung wurde auf 0-5 °C abgekühlt, bevor man langsam unter Rühren eine Lösung von 5.10 g KNO_3 (0.05 mol) in 25 ml konz. Schwefelsäure zutropfte. Nach beendeter Zugabe hielt man die Reaktionsmischung noch eine Stunde bei einer Temperatur von 0-10 °C, entfernte dann das Kältebad, rührte das Gemisch noch eine Stunde bei RT und gab die Mischung dann auf 500 ml Eiswasser. Der ausgefallene Niederschlag wurde abfiltriert und das Rohprodukt dann aus EtOH umkristallisiert. Das Produkt **172** wurde als gelbbrauner, kristalliner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 5.3 g (64%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:5; $R_f = 0.25$

Schmelzpunkt: 91-92 °C (EtOH)

Lit.: 90-92 °C^[72]

IR (KBr): 3100 (w), 3047 (w), 2922 (w), 2859 (w), 1613 (w), 1592 (w), 1518 (s), 1471 (m), 1456 (m), 1419 (w), 1346 (s), 1309 (m), 1257 (w), 1220 (w), 1178 (w), 1126 (w), 1068 (w), 1047 (s), 922 (m), 901 (m), 880 (m), 838 (m), 817 (m), 744 (s), 707 (w), 665 (w)

¹N-NMR: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

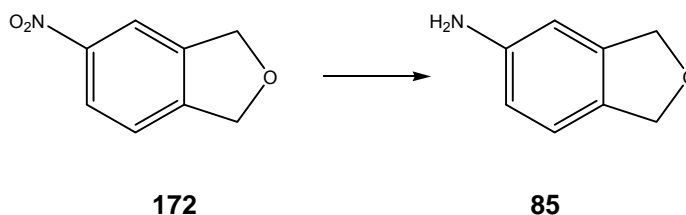
8.20-8.15 (m, 2H, H-(4) und H-(6)), 7.58 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-(7)), 5.08 (s, 4H, 2- CH_2 -Gruppen)

Elementaranalyse: (%) für $\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}_3$ (165.15)

ber.: C 58.18 H 4.27 N 8.48

gef.: C 58.10 H 4.30 N 8.40

9.3.15 Synthese von 1,3-Dihydroisobenzofuran-5-ylamin



In einem einseitig verschlossenen Quarzrohr wurden 3.0 g (18.0 mmol) der Verbindung **172** in 50 ml AcOEt gelöst. Nach Zugabe von 30 mg Pd/C brachte man das Quarzrohr in eine Druckapparatur ein, spülte mit Argon und rührte das Reaktionsgemisch über Nacht bei einer Temperatur von 40 °C und einem Wasserstoffgasdruck von 40 bar. Nachdem kein Edukt mehr nachzuweisen war, filtrierte man die Lösung über wenig Zelite[®] ab, wusch gründlich mit AcOEt nach, und entfernte das Lösungsmittel im Vakuum. Der zurückgebliebene braungelbe Feststoff wurde mehrmals aus EtOH umkristallisiert. Es wurde ein dunkelgelber Feststoff **85** erhalten.

Ausbeute: 2.23 g (91%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:2; $R_f = 0.27$

Schmelzpunkt: 104-105 °C (EtOH)

Lit.: 104-105 °C^[72]

IR (KBr): 3372 (m), 3330 (m), 3225 (m), 3026 (w), 2890 (w), 2838 (m), 1916 (w), 1874 (w), 1628 (s), 1613 (s), 1586 (s), 1492 (s), 1471 (m), 1450 (m), 1367 (s), 1325 (m), 1293 (s), 1257 (w), 1210 (w), 1178 (w), 1152 (w), 1126 (w), 1094 (w), 1026 (s), 895 (s), 859 (m), 822 (s), 733 (m), 691 (m), 587 (w), 560 (m)

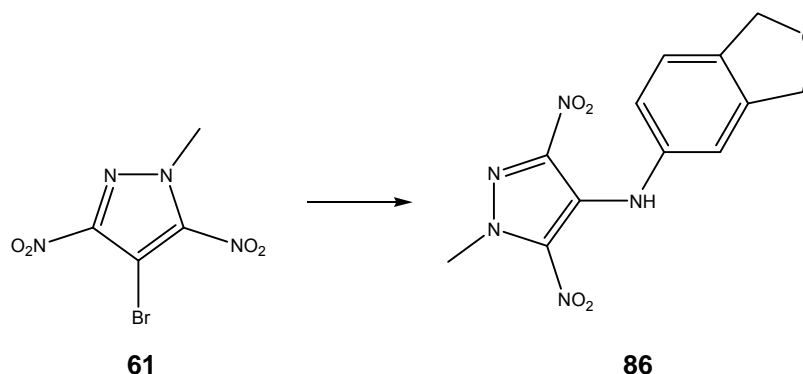
¹N-NMR: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

6.91 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-C(7)), 6.48-6.45 (m, 2H, H-C(4) und H-C(6)), 5.02 (s, br, 2H, NH₂, austauschbar mit D₂O), 4.83 (s, 4H, 2-CH₂-Gruppen)

Elementaranalyse: (%) für C₈H₉NO (135.16)

ber.: C 71.09 H 6.71 N 10.36

gef.: C 70.80 H 6.75 N 10.18

9.3.16 Synthese von 4-(1,3-Dihydroisobenzofuran-5-yl)amino-1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol

2.5 g (9.96 mmol) **61** wurden in 10 ml DMSO gelöst. Nach Zugabe einer Lösung von 1.5 g (1.10 eq., 10.95 mmol) **85** in 5 ml DMSO erwärmte man die gelbe Reaktionslösung für 5 Stunden auf 100 °C. Mit zunehmender Reaktionsdauer verfärbte sich die Lösung dunkelbraun-schwarz. Nach beendeter Reaktion ließ man die Reaktionsmischung auf RT abkühlen und gab sie dann auf 200 ml Eiswasser. Die wässrige Phase wurde insgesamt fünfmal mit jeweils 100 ml AcOEt extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand kristallisierte an der Luft langsam aus. Mehrmaliges Umkristallisieren aus wenig EtOH ergab das Produkt **86** in Form eines intensiv orange gefärbten Pulvers.

Ausbeute: 2.65 g (87%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:3; R_f = 0.20

Schmelzpunkt: 170-171 °C

IR (KBr): 3456 (w), 3309 (w), 3037 (w), 2848 (w), 1597 (s), 1487 (s), 1435 (s), 1377 (m), 1351 (m), 1309 (s), 1115 (w), 1037 (m), 953 (w), 890 (m), 833 (m), 796 (w), 754 (w), 743 (w), 707 (w), 665 (w), 608 (w), 566 (w)

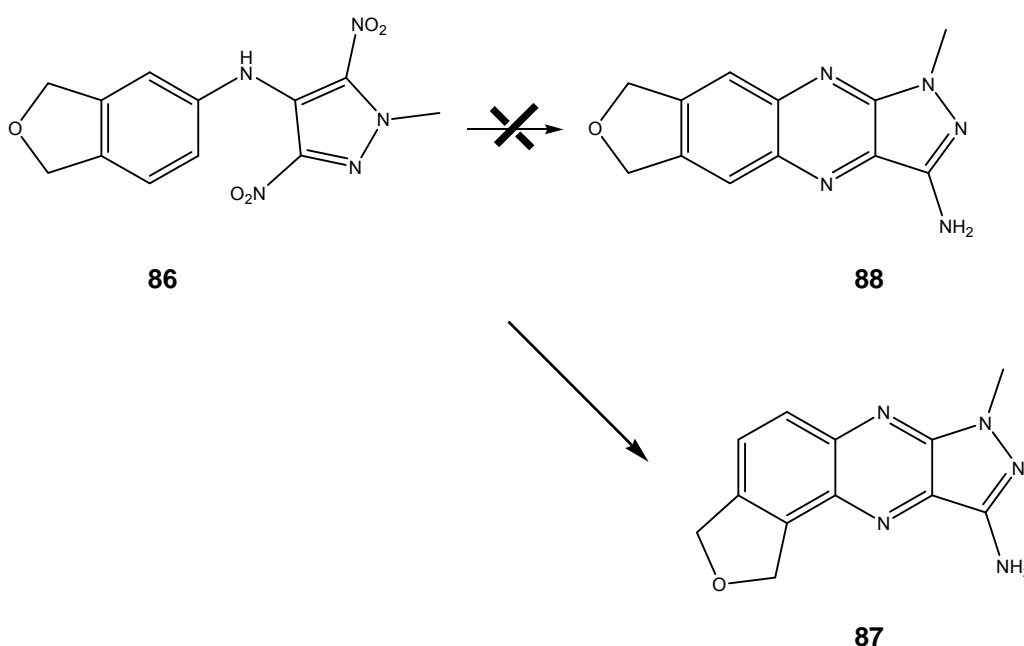
¹N-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆)

8.94 (s, br, 1H, NH, austauschbar mit D₂O), 7.14 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-C(7)), 6.92-6.86 (m, 2H, H-C(4) und H-C(6)), 4.92 (2s, 4H, CH₂-Gruppen), 4.25 (s, 3H, N-CH₃)

Elementaranalyse: (%) für C₁₂H₁₁N₅O₅ (305.25)

ber.: C 47.22 H 3.63 N 22.94

gef.: C 47.03 H 3.81 N 22.90

9.3.17 Synthese von 7-Methyl-3,7-dihydro-1H-2-oxa-6,7,8,10-tetraaza-dicyclopenta[a,g]naphthalin-9-ylamin

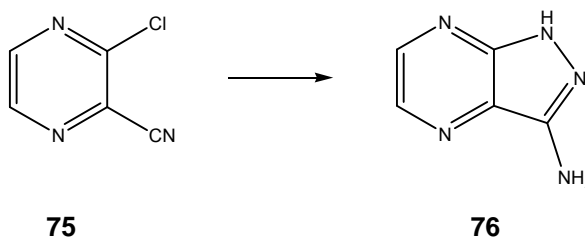
50 mg (0.16 mmol) **86** wurden in einem 100 ml Rundkolben vorgelegt. Nach Zugabe von 3 ml 2N NaOH und 0.024 g (4.00 eq. 0.64 mmol) fein gemörsertem NaBH₄ wurde die orangefarbene Suspension für 2 Stunden zum Rückfluß erhitzt. Nach dem Erkalten wurde die wässrige Phase insgesamt dreimal mit jeweils 50 ml AcOEt extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Das verbliebene Rohprodukt wurde an 15 g Kieselgel säulenchromatographisch aufgereinigt (Eluent: AcOEt/n-Hexan 1:2). Umkristallisation des Produktes aus EtOH ergab 15 mg eines dunkelorange-farbenen, amorphen Pulvers. Wie sich später anhand des ¹H-NMR-Spektrums zeigte, konnte nicht das gewünschte Produkt **88**, sondern das Produkt **87** erhalten werden. Daher wurde auf eine weitere und ausführliche Charakterisierung der Verbindung verzichtet.

Ausbeute: 15 mg (39%)

$^1\text{N-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

8.09 (d, $J = 8.50$ Hz, 1H, H-C(5)), 7.62 (d, $J = 8.60$ Hz, 1H, H-C(4)), 6.32 (br, s, 2H, NH_2 , das Signal tauscht nach Zugabe von D_2O), 5.50-5.48 (m, 2H, O- CH_2), 5.30-5.27 (m, 2H, O- CH_2), 3.81 (s, 3H, CH_3)

9.3.18 Synthese von 1H-Pyrazolo[3,4-b]pyrazin-3-ylamin



1.0 g (7.16 mmol) **75** wurden in 10 ml abs. EtOH gelöst. Nach der Zugabe von 13.9 ml (10.0 eq., 3.58 g, 71.6 mmol) einer wässrigen Hydrazinhydratlösung (24-26%) wurde die nun gelb-orangefarbene Lösung für 3 h zum Rückfluß erhitzt. Nach beendeter Reaktion ließ man auf RT abkühlen und entfernte das Lösungsmittel dann im Vakuum. Der verbliebene Rückstand wurde aus wenig EtOH umkristallisiert. Das Produkt **76** konnte in Form eines dunkelbraunen Pulvers isoliert werden.

Ausbeute: 900 mg (94%)

DC: MeOH/AcOEt 1:20; $R_f = 0.43$

Schmelzpunkt: 245-246 °C (EtOH)

Lit.: 244-246 °C^[73]

IR (KBr): 3403 (m), 3310 (m), 3194 (m), 3110 (m), 3068 (w), 3016 (w), 2911 (w), 2859 (w), 2806 (w), 1618 (s), 1592 (w), 1560 (s), 1545 (m), 1492 (w), 1466 (w), 1388 (s), 1335 (m), 1257 (m), 1215 (m), 1126 (s), 1053 (w), 922 (s), 848 (m), 796 (w), 780 (w), 754 (w), 712 (w), 623 (w), 560 (w)

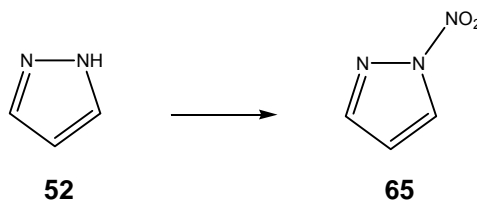
$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

12.34 (s, br, 1H, NH, austauschbar mit D_2O), 8.40 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-C(5) oder H-C(6)), 8.34 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-C(6) oder H-C(5)), 5.69 (s, br, 2H, NH_2 , austauschbar mit D_2O)

Elementaranalyse: (%) für C₅H₅N₅ (135.13)

ber.: C 44.44 H 3.73 N 51.83

gef.: C 44.67 H 3.80 N 51.57

9.3.19 Synthese von 1-Nitro-1H-pyrazol

10.0 g (147 mmol) Pyrazol **52** wurden in 30 ml Eisessig gelöst. Die klare, gelbe Reaktionslösung wurde auf 0-5 °C abgekühlt. Zu dieser Lösung tropfte man innerhalb einer Stunde 6.7 ml (1.10 eq., 162 mmol, 10.18 g) Salpetersäure (d = 1.52). Nach beendeter Zugabe war aus der Lösung ein farbloser Feststoff ausgefallen. Jetzt tropfte man zu dieser Suspension über einen Zeitraum von 2 Stunden 20.7 ml (1.5 eq. 220.3 mmol, 22.5 g) Essigsäureanhydrid. Während der Zugabe ging der Niederschlag langsam wieder in Lösung. Nach beendeter Zugabe ließ man die dunkelgelbe Reaktionslösung noch 30 min. bei RT rühren und gab den Ansatz dann auf 300 ml Eiswasser, wobei ein farbloser, kristalliner Niederschlag ausfiel, der abgesaugt und aus n-Hexan umkristallisiert wurde. Produkt **65** wurde in Form von farblosen Kristallen erhalten.

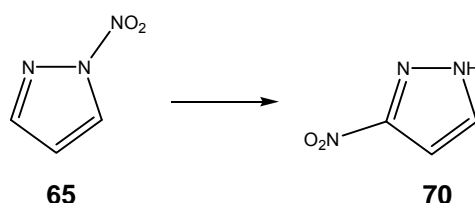
Ausbeute: 15.46 g (93%)**DC:** AcOEt/n-Hexan 1:5; R_f = 0.43**Schmelzpunkt:** 90-91 °C (n-Hexan)Lit.: 92-93 °C^[51]**IR (KBr):** 3116 (s), 2884 (w), 1829 (w), 1792 (w), 1613 (s), 1560 (w), 1528 (w), 1481 (w), 1449 (w), 1401 (w), 1370 (m), 1322 (m), 1290 (m), 1259 (m), 1227 (m), 1164 (s), 1063 (s), 1026 (m), 935 (s), 905 (m), 852 (w), 820 (m), 778 (s), 735 (m), 630 (m), 561 (m)**¹H-NMR:** (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆)

8.80 (m, 1H, H-C(3)), oder H-C(5)), 7.89 (m, 1H, H-C(5)) oder H-C(3)), 6.71 (m, 1H, H-C(4))

Elementaranalyse: (%) für C₃H₃N₃O₂ (113.07)

ber.: C 31.87 H 2.67 N 37.16

gef.: C 32.04 H 2.79 N 36.92

9.3.20 Synthese von 3-Nitro-1H-pyrazol

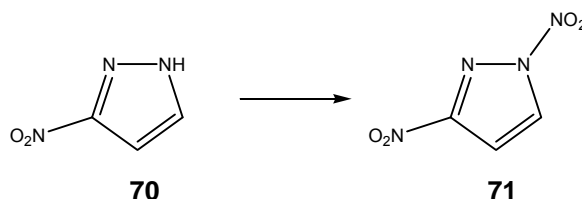
2.7 g (23.9 mmol) **65** wurden in 30 ml Benzonnitril gelöst und die gelbe Reaktionslösung dann über einen Zeitraum von 3 h zum Rückfluß erhitzt. Nach dem Erkalten gab man die Lösung auf 70 ml n-Hexan, wobei ein farbloser, flockiger Niederschlag ausfiel. Der Feststoff wurde abgesaugt, mit wenig n-Hexan gewaschen und schließlich aus Wasser umkristallisiert. Das umgelagerte Produkt **70** wurde in Form eines farblosen Feststoffes isoliert.

Ausbeute: 2.06 g (76%)**DC:** AcOEt/n-Hexan 1:4; R_f = 0.41**Schmelzpunkt:** 173-174 °C (H₂O)Lit.: 173-174 °C^[74]**IR (KBr):** 1557 (s), 1514 (s), 1484 (m), 1438 (w), 1423 (m), 1382 (s), 1353 (s), 1250 (m), 1210 (s), 1091 (m), 1059 (w), 1048 (s)**¹H-NMR:** (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆)13.94 (s, br, 1H, Pyrazol-NH, austauschbar mit D₂O), 8.04 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H-C(5)), 7.04 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H-C(4))**Elementaranalyse: (%) für C₃H₃N₃O₂ (113.07)**

ber.: C 31.87 H 2.67 N 37.16

gef.: C 31.80 H 2.70 N 36.93

9.3.21 Synthese von 1,3-Dinitro-1H-pyrazol



19.0 g (168 mmol) der Verbindung **70** wurden in 160 ml Eisessig gelöst. Unter Eiskühlung tropfte man nun langsam 9 ml (1.3 eq., 218 mmol, 13.8 g) Salpetersäure (100 %ig, $d = 1.52$) dazu, wobei ein farbloser, kristalliner Niederschlag ausfiel. Nach beendeter Zugabe ließ man die Suspension noch eine Stunde weiterrühren und tropfte dann bei 0 °C 31.5 ml (2.00 eq; 336 mmol, 34.3 g) Essigsäureanhydrid innerhalb von 2 h dazu. Nach beendeter Zugabe entfernte man das Kältebad und ließ den Ansatz bei RT rühren, bis sich eine völlig klare Lösung gebildet hatte. Die Reaktionslösung wurde nun auf 1000 ml Eiswasser gegeben. Der ausgefallene farblose Niederschlag wurde abgesaugt und aus n-Hexan umkristallisiert. Man erhielt **71** in Form von farblosen Nadeln.

Ausbeute: 24.87 g (94%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:8; $R_f = 0.15$

Schmelzpunkt: 65-67 °C (n-Hexan)

Lit.: 67 °C^[74]

IR (KBr): 3158 (s), 2903 (w), 2629 (w), 2551 (w), 1791 (w), 1640 (w), 1552 (w), 1508 (m), 1473 (w), 1434 (w), 1395 (m), 1351 (m), 1322 (m), 1283 (s), 1238 (s), 1116 (s), 1038 (s), 984 (s), 960 (m), 813 (s), 784 (s), 754 (s)

¹H-NMR: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

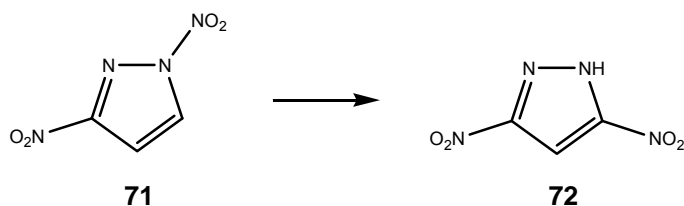
9.16 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, H-C(5)), 7.51 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, H-C(4))

Elementaranalyse: (%) für C₃H₂N₄O₄ (158.07)

ber.: C 22.79 H 1.28 N 35.44

gef.: C 22.89 H 1.40 N 35.65

9.3.22 Synthese von 3,5-Dinitro-1H-pyrazol



7.0 g (44.3 mmol) der Verbindung **71** wurden in 70 ml Benzonitril gelöst und zum Sieden erhitzt. Innerhalb von 2-3 Stunden lagerte sich das 1,3-Dinitro-1H-pyrazol in das 3,5-Dinitro-1H-pyrazol um. Während dieser Zeit wurde der Reaktionsfortschritt häufig (alle 10-15 min.) mittels DC kontrolliert, da eine zu lange Reaktionsdauer zu einer Abspaltung und somit einem Verlust der Nitrogruppe am Stickstoff des Pyrazolringes geführt hätte. Nach beendeter Reaktion wurde das Benzonitril am Kugelrohr (70-80 °C; 0.05 mbar) entfernt. Als Rückstand konnte ein hellbraunes Öl erhalten werden, welches in der Kälte langsam kristallisierte. Mehrmaliges Umkristallisieren aus Toluol ergab das 3,5-Dinitro-1H-pyrazol **72** in Form von schwach gelben Nadeln.

Ausbeute: 6.82 g (97%)

DC: MeOH/AcOEt 1:10; $R_f = 0.45$

Schmelzpunkt: 172-173 °C (Toluol)

Lit.: 173-174 °C^[74]

IR (KBr): 3437 (w), 3225 (w), 3152 (w), 2963 (w), 2639 (w), 1686 (w), 1566 (s), 1529 (s), 1482 (m), 1445 (m), 1367 (s), 1340 (s), 1267 (w), 1199 (m), 1084 (m), 1011 (m), 984 (m), 848 (m), 833 (s), 765 (w), 744 (s), 697 (w), 634 (w), 576 (w)

¹H-NMR: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

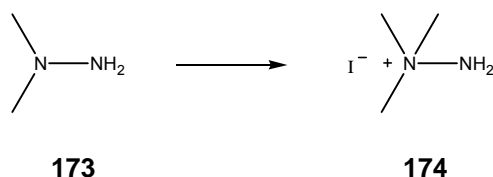
9.75 (s, br, 1H, NH, austauschbar mit D₂O), 7.93 (s, 1H, H-C(4))

Elementaranalyse: (%) für C₃H₂N₄O₄ (158.07)

ber.: C 22.79 H 1.28 N 35.44

gef.: C 22.78 H 1.44 N 35.29

9.3.23 Synthese von 1,1,1-Trimethylhydraziniumiodid



In 400 ml trockenem Tetrahydrofuran wurden 20.4 ml (16.0 g; 268 mmol) 1,1-Dimethylhydrazin **173** unter kräftigem Rühren gelöst. Die farblose Lösung wurde in einem Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Unter Rühren tropfte man innerhalb von 20 Minuten 16.5 ml Methyljodid hinzu. Nach kurzer Zeit fiel ein farbloser Feststoff aus der Lösung aus. Nach beendeter Zugabe entfernte man das Eisbad und ließ den Ansatz über Nacht bei RT rühren. Der Feststoff wurde über eine Glasfritte abgesaugt und aus 500 ml Ethanol umkristallisiert. Es wurden farblose Kristalle von **174** erhalten.

Ausbeute: 49.64 g (92%)

DC: AcOEt/MeOH 10:1; $R_f = 0.42$ (färbt mit Ninhydrin beim Erwärmen an)

Schmelzpunkt: 234-235 °C (Zersetzung) (EtOH) Lit.: 233-235 °C^[52]

IR (KBr): 3445 (w), 3278 (s), 3141 (s), 3005 (s), 2942 (w), 1602 (m), 1466 (m), 1429 (w), 1393 (w), 1278 (w), 1136 (w), 1053 (s), 943 (s), 895 (s), 738 (w)

¹H-NMR: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

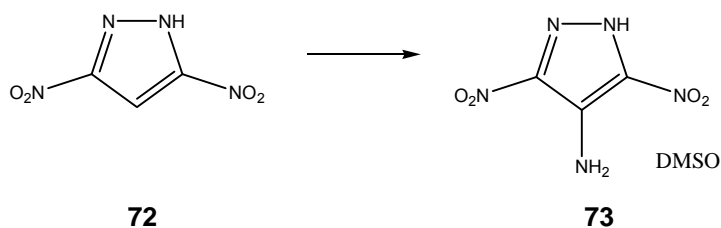
6.09 (s, br, 2H, NH₂, austauschbar mit D₂O), 3.27 (s, 9H, 3-CH₃-Gruppen)

Elementaranalyse: (%) für C₃H₁₁IN₂ (202.04)

ber.: C 17.83 H 5.49 N 13.87

gef.: C 17.90 H 5.56 N 14.06

9.3.24 Synthese von 3,5-Dinitro-1H-pyrazol-4-ylamin; als DMSO-Monosolvat



26.0 g (164 mmol) **72** und 36.55 g (1.1 eq., 181 mmol) Trimethylhydraziniumiodid **174** (TMHI) wurden unter Eisbadkühlung in 600 ml trockenem DMSO gelöst. Zu dieser gelben Lösung gab man bei 0 °C 55.4 g (3.0 eq; 493.44 mmol) KOtBu in einer Portion dazu. Die Lösung verfärbte sich sofort dunkelrot. Der Reaktionsansatz wurde für 3 h bei 0 °C gerührt. Man entfernte das Kältebad, ließ die Reaktionsmischung auf RT auftauen und gab den Ansatz dann auf 500 ml Eiswasser. Nach dem Auftauen des Eises wurde mit konzentrierter Salzsäure ein pH-Wert von 3 eingestellt. Nach kurzer Zeit schied sich aus der Lösung ein gelbbrauner Niederschlag aus. Der entstandene Feststoff wurde abgesaugt, mit wenig Wasser gewaschen und anschließend aus Acetonitril umkristallisiert. Das Produkt wurde in Form des DMSO-Monosolvates **73** erhalten.

Ausbeute: 37.2 g (90%)

DC: MeOH/AcOEt 1:15; $R_f = 0.37$

Schmelzpunkt: 157-159 °C (Acetonitril)

Lit.: 160-162 °C^[75]

IR (KBr): 3433 (s), 3250 (s), 3200 (s), 3149 (m), 3007 (m), 2916 (w), 2795 (w), 1820 (s), 1638 (s), 1582 (w), 1536 (w), 1511 (s), 1486 (s), 1466 (s), 1415 (w), 1385 (m), 1354 (w), 1314 (s), 1258 (m), 1212 (w), 1136 (m), 1071 (w), 1015 (s), 1000 (m), 949 (m), 929 (m), 868 (w), 827 (m), 756 (m), 716 (m), 676 (m)

¹H-NMR: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

14.44 (s, br, 1H, NH, austauschbar mit D₂O), 7.05 (s, br, 2H, NH₂, austauschbar mit D₂O), 2.50 (s, br, 6H, CH₃-Gruppen des DMSO; sind auch bei einer Messung eines Spektrums in CDCl₃ zu sehen)

Elementaranalyse: (%) für C₅H₉N₅O₅S (251.22)

ber.: C 23.90 H 3.61 N 27.88

gef.: C 24.13 H 3.57 N 28.01

Kristallstruktur von Verbindung 73

Die Kristallisation erfolgte aus Acetonitril

Kristallsystem: monoklin; Raumgruppe P 21/c; Elementarzelle: $a = 10.745 (3) \text{ \AA}$, $b = 14.157 (5) \text{ \AA}$, $c = 6.720 (3) \text{ \AA}$; $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 95.39 (13)^\circ$, $\gamma = 90^\circ$; $V = 1017.8 (6) \text{ \AA}^3$; $Z = 4$, $\rho_{\text{ber}} = 1.640 \text{ Mg / m}^3$; Siemens Smart Diffraktometer; Absorptionskoeffizient : $= 0.336 \text{ mm}^{-1}$; Wellenlänge = 071073 \AA ; $T = 164 (2) \text{ K}$; Reflexe gemessen: 11988, davon 2458 unabhängige, gleiche Reflexe wurden gemittelt ($R_{(\text{int})} = 0.1216$); $R = 0.0733$, $R_w = 0.1106$; goodness of fit = 1.238; Theta Bereich für Datenerfassung: 1.90 bis 28.95° ; Restelektronendichte: zwischen 0.437 und -0.321 e / \AA^3 . Zur Kristallstrukturbestimmung wurde ein gelber, nadelförmiger Einkristall, mit folgenden Dimensionen vermessen: $0.04 \text{ mm} \cdot 0.12 \text{ mm} \cdot 0.60 \text{ mm}$. Die Messung erfolgte bei einer Temperatur von -109°C , mittels eines SIEMENS SMART Diffraktometers. Es wurde keinerlei Absorptionskorrektur gemacht. Gleiche Reflexe wurden gemittelt. Die Struktur konnte durch direkte Methoden mit Hilfe des Programms SHELXS gelöst werden. Die Wasserstoffatome der Methylgruppen wurden geometrisch angeordnet. Die Wasserstoffatome an Stickstoffen wurden mit einem anderen Programm zugeordnet und wurden verfeinert. Alle nicht-Wasserstoffatome wurden mit anisotropen Temperaturparametern verfeinert. Die Strukturverfeinerung erfolgte auch mit F^2 -Werten und mit dem Programm SHELXL-97. Die absolute Restelektronendichte war zwischen -0.32 und 0.44 e / \AA^3 .

Diskussion der Struktur: (für die Atombezeichnung siehe **Abbildung 73**):

Der Nitrogruppen sind nahezu koplanar mit der Pyrazolringebene, der Winkel zwischen der Pyrazolringebene und der Ebene der Nitrogruppen beträgt 3.5 und 1.1° . Die Moleküle sind über N-H...O-Wasserstoffbrücken zu Ketten in der kristallographischen b-Richtung verbunden. Die N2-H2-Bindung „zeigt“ direkt auf das Sauerstoffatom eines DMSO-Moleküles. Die N4-H4A und N4-H4B sind beide involviert in die Ausbildung von Wasserstoffbrücken: Eine intramolekulare N-HO (Nitro)-Bindung und eine intermolekulare N-H...O (DMSO)-Bindung. Die Moleküle bilden kleine „Stapel“ entlang der c-Richtung.

Tabelle 16: Wasserstoffbrücken der Verbindung 73

N-H.....O	N-H [Å]	H.....O [Å]	N.....O [Å]	N-H-O [°]
N2-H2A...O5	0.87 (4)	1.79 (4)	2.661 (4)	177 (4)
N4-H4A...O4	0.86 (3)	2.45 (3)	2.930 (4)	116 (2)
N4-H4A...O5	0.86 (3)	2.06 (3)	2.866 (4)	157 (3)
N4-H4B...O2	0.87 (4)	2.31 (4)	2.824 (4)	118 (3)
N4-H4B...O3	0.87 (4)	2.24 (4)	2.963 (4)	141 (4)

Tabelle 17: Torsionswinkel [°] von Verbindung 73

Atome	Torsionswinkel [°]	Atome	Torsionswinkel [°]
O(4)-N(5)-C(3)-N(2)	-179.6 (3)	N(2)-N(1)-C(1)-C(2)	0.4 (4)
O(3)-N(5)-C(3)-N(2)	0.3 (4)	N(2)-N(1)-C(1)-N(3)	179.5 (3)
O(4)-N(5)-C(3)-C(2)	-1.3 (5)	N(4)-C(2)-C(1)-N(1)	179.4 (3)
N(2)-C(3)-C(2)-N(4)	178.5 (3)	C(3)-C(2)-C(1)-N(1)	-0.1 (3)
N(2)-C(3)-C(2)-N(4)	-179.7 (3)	N(4)-C(2)-C(1)-N(3)	0.3 (5)
N(5)-C(3)-C(2)-N(4)	1.9 (6)	C(3)-C(2)-C(1)-N(3)	-179.1 (3)
N(2)-C(3)-C(2)-C(1)	-0.2 (3)	O(1)-N(3)-C(1)-N(1)	-2.8 (4)
N(5)-C(3)-C(2)-C(1)	-178.7 (3)	O(2)-N(3)-C(1)-N(1)	176.8 (3)
C(1)-N(1)-N(2)-C(3)	-0.5 (3)	O(1)-N(3)-C(1)-C(2)	176.2 (3)
C(2)-C(3)-N(2)-N(1)	0.5 (4)	O(2)-N(3)-C(1)-C(2)	-4.1 (4)
N(5)-C(3)-N(2)-N(1)	179.1 (3)		

Tabelle 18: Bindungswinkel [°] und Bindungslängen [Å] von 73

Atome	Bindungswinkel [°]	Atome	Bindungslängen [Å]
O(4)-N(5)-O(3)	124.7 (3)	O(4)-N(5)	1.236 (3)
O(4)-N(5)-C(3)	117.1 (3)	O(1)-N(3)	1.231 (3)
O(3)-N(5)-C(3)	118.1 (3)	N(4)-C(2)	1.340 (4)
N(2)-N(1)-C(1)	104.6 (2)	O(2)-N(3)	1.243 (3)
N(2)-C(3)-C(2)	109.1 (3)	N(5)-O(3)	1.236 (3)
N(2)-C(3)-N(5)	121.2 (3)	N(5)-C(3)	1.405 (4)
C(2)-C(3)-N(5)	129.7 (3)	N(1)-N(2)	1.322 (4)
N(4)-C(2)-C(3)	130.2 (3)	N(1)-C(1)	1.352 (4)
N(4)-C(2)-C(1)	128.9 (3)	C(3)-N(2)	1.368 (4)
C(3)-C(2)-C(1)	100.9 (3)	C(3)-C(2)	1.399 (4)
N(1)-N(2)-C(3)	111.8 (3)	C(2)-C(1)	1.419 (4)
O(1)-N(3)-O(2)	123.9 (3)	N(3)-C(1)	1.423 (4)
O(1)-N(3)-C(1)	119.8 (3)	S(1)-O(5)	1.530 (2)

Fortsetzung von Tabelle 18

O(2)-N(3)-C(1)	116.3 (3)	S(1)-C(5)	1.771 (4)
N(1)-C(1)-C(2)	113.6 (3)	S(1)-C(4)	1.780 (4)
N(1)-C(1)-N(3)	119.6 (3)		
C(2)-C(1)-N(3)	126.9 (3)		
O(5)-S(1)-C(5)	104.54 (16)		
O(5)-S(1)-C(4)	105.23 (15)		
C(5)-S(1)-C(4)	98.98 (18)		

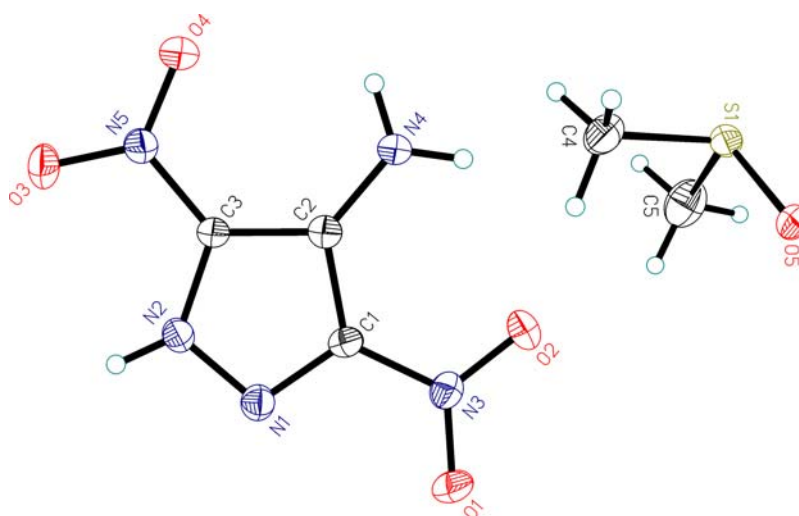


Abbildung 73: Kristallstruktur von 73 als DMSO-Monosolvat

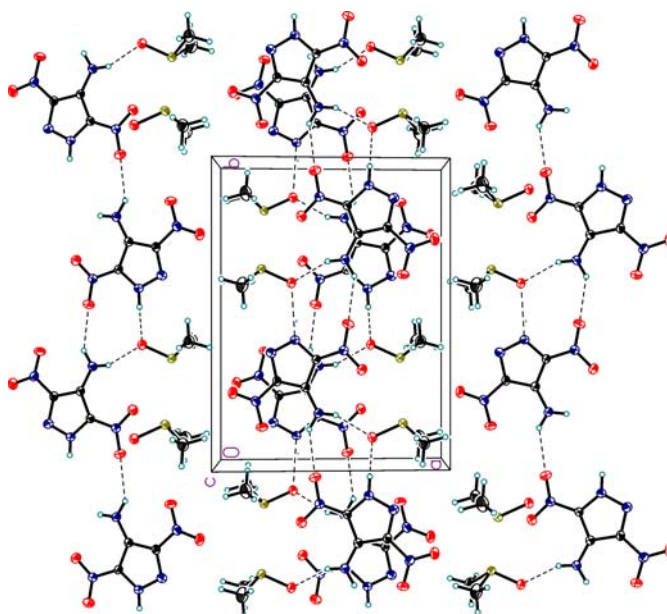
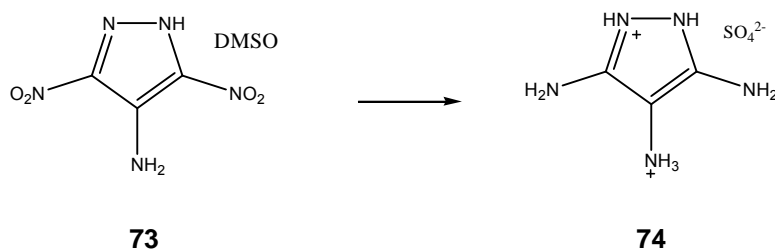


Abbildung 74: Kristallstruktur von Verbindung 73 im Kristallverbund

9.3.25 Synthese von 1H-Pyrazol-3,4,5-triamin-sulfat



In einem einseitig verschlossenen Quarzrohr wurden 4.0 g (23.1 mmol) **73** in 40 ml MeOH suspendiert. Zu dieser gelb-orangefarbenen Suspension wurden unter Argon-Schutzgasatmosphäre 300 mg Pd/C gegeben. Das Quarzrohr wurde in eine Druckapparatur gegeben und verschlossen. Der Reaktionsansatz wurde nun für 60 Stunden bei einer Temperatur von 60 °C und einem Wasserstoffgasdruck von 40 bar gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde die Reaktionsmischung über Celite[®] in einen Kolben mit 10 ml halbkonzentrierter (5 ml dest. Wasser; 5 ml konz. H₂SO₄) abfiltriert. Man wusch mit 200-300 ml MeOH nach, wobei sich die Lösung trübte und ein hellbrauner Niederschlag ausfiel. Die Ausfällung wurde durch Zugabe von 300 ml Diethylether und anschließendes Stehenlassen über Nacht bei 4 °C vervollständigt. Der ausgefallene Feststoff wurde abgesaugt und mehrmals aus wenig Wasser umkristallisiert. Das Produkt wurde in Form des Sulfatsalzes **74** erhalten.

Ausbeute: 4.03 g (82 %)

DC: AcOEt/EtOH/H₂O/AcOH 20:2:2:1 ; R_f = 0.04 (färbt mit Ninhydrin an)

Schmelzpunkt: 241-243 °C (H₂O)

IR (KBr): 3340 (w), 3131 (w), 2922 (w), 2838 (w), 2576 (w), 2073 (w), 1681 (s), 1634 (s), 1555 (s), 1482 (m), 1388 (m), 1262 (m), 1189 (w), 1136 (s), 1094 (s), 1058 (s), 969 (m), 786 (m), 723 (w), 665 (w), 613 (m)

¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆)

7.13 (s, br, 9H, alle NH, austauschbar mit D₂O)

¹³C-NMR: (δ[ppm], 62.90 MHz, DMSO-d₆)

149.13 (C(3)-NH₂, C(4)-NH₂ und C(5)-NH₂)

Elementaranalyse: (%) für C₃H₉N₅O₄S (211.2)

ber.: C 17.06 H 4.30 N 33.16

gef.: C 17.03 H 4.43 N 33.40

MS (ESI⁺): 113.7 (113.12 berechnet für C₃H₇N₅)**Kristallstruktur von Verbindung 74**

Die Kristallisation erfolgte aus Wasser

Kristallsystem: monoklin; Raumgruppe P 21/n; Elementarzelle: a = 8.5141 (16) Å, b = 9.4948 (13) Å, c = 10.1685 (17) Å; $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 96.142 (13)^\circ$, $\gamma = 90^\circ$; V = 817.3 (2) Å³; Z = 4, $\rho_{\text{ber}} = 1.717 \text{ Mg / m}^3$; Siemens Smart Diffraktometer; Absorptionskoeffizient : = 0.392 mm⁻¹; Wellenlänge = 0.71073 Å; T = 165 (2) K; Reflexe gemessen: 11164, davon 2509 unabhängige, gleiche Reflexe wurden gemittelt ($R_{(\text{int})} = 0.0232$); R = 0.0284, $R_w = 0.0742$; goodness of fit = 1.020; Theta Bereich für Datenerfassung: 2.94 bis 31.55 °; Restelektronendichte: zwischen 0.383 und -0.483 e/Å³. Zur Kristallstrukturbestimmung wurde ein hellbrauner, nadelförmiger Kristall der Dimension 0.14 · 0.2 · 0.6 mm bei einer Temperatur von -108 °C vermessen. Eine empirische Absorptionskorrektur mit dem Programm SADABS ergab einen Korrektionsfaktor zwischen 0.893 und 0.948. Gleiche Reflexe wurden gemittelt. Die Struktur wurde mit direkten Methoden mit Hilfe des Programms SHELXS bestimmt. Die Lage der H-Atome wurde mit einer Fouriersynthese ermittelt und mit isotropen Temperaturparametern verfeinert.

Diskussion der Struktur: (Bezeichnung der Atome siehe **Abbildung 75**). Die Pyrazoliumgruppe zeigt eine signifikante Abweichung von der Planarität: Der Ring-Stickstoff N1 weicht um etwa 0.12 Å aus der Ebene zwischen C1/C2/C3/N2 heraus. Diese Abweichung von der planaren Struktur könnte eventuell aus Kristallpackungseffekten resultieren. Die Aminogruppen mit der Bezeichnung N3 und N5 zeigen nur geringe Abweichung von der Planarität: Die Summe der drei Valenzwinkel zwischen den Stickstoffen beträgt 358.2 beziehungsweise 356.2 °. Die Aminogruppe in 4-Position ist protoniert und besitzt tetraedrische Struktur. Die Bindung zwischen N4-C2 ist mit 1.450 (1) Å um 0.11

Å länger, als die Bindung zwischen N3-C1 und N5-C3. Die Ringatome N1 und N2 zeigen auch eine geringfügige Abweichung von der Planarität. Die Summe der drei Valenzwinkel zwischen N1 und N2 beträgt 355.5 beziehungsweise 344.9°. Die Kationen sind mit den Anionen über ein dreidimensionales Netzwerk aus Wasserstoffbrücken verbunden. Jedes Kation bildet H-Brücken zu sechs „symmetrieverwandten“ Anionen aus.

Tabelle 19: Wasserstoffbrücken von Verbindung 74

D-H...A	d (D-H)	d (H...A)	d (D...A)	(DHA)
N(1)-H(1A)...O(1)	0.85 (2)	1.99 (2)	2.824 (1)	166 (2)
N(2)-H(2A)...O(2)	0.89 (2)	1.94 (2)	2.820 (2)	172 (2)
N(3)-H(3A)...O(4)	0.86 (2)	2.15 (2)	2.950 (2)	155 (2)
N(3)-H(3B)...O(1)	0.85 (2)	2.17 (3)	2.946 (2)	153 (2)
N(4)-H(4A)...O(4)	0.94 (2)	1.87 (2)	2.797 (1)	170 (2)
N(4)-H(4B)...O(3)	0.92 (2)	1.82 (2)	2.716 (1)	166 (2)
N(4)-H(4C)...O(1)	0.93 (2)	1.88 (2)	2.804 (1)	177 (2)
N(5)-H(5A)...O(3)	0.86 (2)	2.02 (2)	2.858 (2)	162 (2)
N(5)-H(5B)...O(2)	0.80 (2)	2.16 (2)	2.953 (2)	173 (2)

Tabelle 20: Torsionswinkel [°] von 74

Atome	Torsionswinkel [°]	Atome	Torsionswinkel [°]
N(3)-C(1)-N(2)-N(1)	-173.88 (11)	N(2)-C(1)-C(2)-C(3)	-0.54 (13)
C(2)-C(1)-N(2)-N(1)	5.54 (13)	N(3)-C(1)-C(2)-N(4)	-6.7 (2)
C(3)-N(1)-N(2)-C(1)	-8.75 (13)	N(2)-C(1)-C(2)-N(4)	173.93 (11)
N(2)-N(1)-C(3)-N(5)	-171.66 (11)	N(5)-C(3)-C(2)-C(1)	175.17 (13)
N(2)-N(1)-C(3)-C(2)	8.35 (13)	N(1)-C(3)-C(2)-C(1)	-4.85 (13)
N(3)-C(1)-C(2)-C(3)	178.82 (12)	N(5)-C(3)-C(2)-N(4)	0.7 (2)
N(1)-C(3)-C(2)-N(4)	-179.35 (11)		

Tabelle 21: Bindungswinkel [°] und Bindungslängen [Å] von 74

Atome	Bindungswinkel [°]	Atome	Bindungslängen [Å]
O(2)-S(1)-O(4)	110.31 (6)	S(1)-O(2)	1.4754 (9)
O(2)-S(1)-O(3)	110.05 (5)	S(1)-O(4)	1.4776 (9)
O(4)-S(1)-O(3)	109.12 (5)	S(1)-O(3)	1.4786 (9)
O(2)-S(1)-O(1)	109.17 (5)	S(1)-O(1)	1.4888 (9)
O(4)-S(1)-O(1)	108.79 (5)	N(5)-C(3)	1.3373 (16)
O(3)-S(1)-O(1)	109.37 (5)	N(5)-H(5A)	0.86 (2)
C(3)-N(5)-H(5A)	115.7 (13)	N(5)-H(5B)	0.80 (2)
C(3)-N(5)-H(5B)	119.6 (13)	N(1)-C(3)	1.3484 (16)
H(5A)-N(5)-H(5B)	121.5 (18)	N(1)-N(2)	1.3930 (14)
C(3)-N(1)-N(2)	109.13 (10)	N(1)-H(1A)	0.853 (19)
C(3)-N(1)-H(1A)	129.2 (12)	N(4)-C(2)	1.4502 (14)
N(2)-N(1)-H(1A)	117.2 (12)	N(4)-H(4A)	0.942 (17)
C(2)-N(4)-H(4A)	108.2 (10)	N(4)-H(4B)	0.919 (19)
C(2)-N(4)-H(4B)	110.7 (12)	N(4)-H(4C)	0.931 (19)
H(4A)-N(4)-H(4B)	105.6 (15)	C(1)-N(3)	1.3415 (15)
C(2)-N(4)-H(4C)	111.3 (12)	C(1)-N(2)	1.3610 (15)
H(4A)-N(4)-H(4C)	112.8 (16)	C(1)-C(2)	1.3905 (16)
H(4B)-N(4)-H(4C)	108.0 (15)	N(2)-H(2A)	0.89 (2)
N(3)-C(1)-N(2)	121.54 (11)	C(3)-C(2)	1.4046 (15)
N(3)-C(1)-C(2)	130.03 (11)	N(3)-H(3A)	0.86 (2)
N(2)-C(1)-C(2)	108.43 (10)	N(3)-H(3B)	0.84 (2)
C(1)-N(2)-N(1)	107.28 (10)		
C(1)-N(2)-H(2A)	121.3 (13)		
N(1)-N(2)-H(2A)	116.3 (13)		
N(5)-C(3)-N(1)	122.74 (11)		
N(5)-C(3)-C(2)	129.92 (11)		
N(1)-C(3)-C(2)	107.34 (10)		
C(1)-C(2)-C(3)	107.07 (10)		

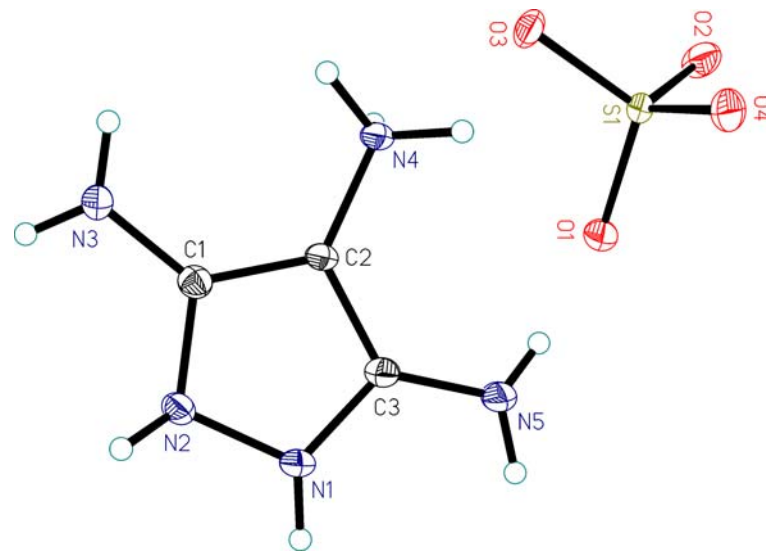


Abbildung 75: Kristallstruktur von 74

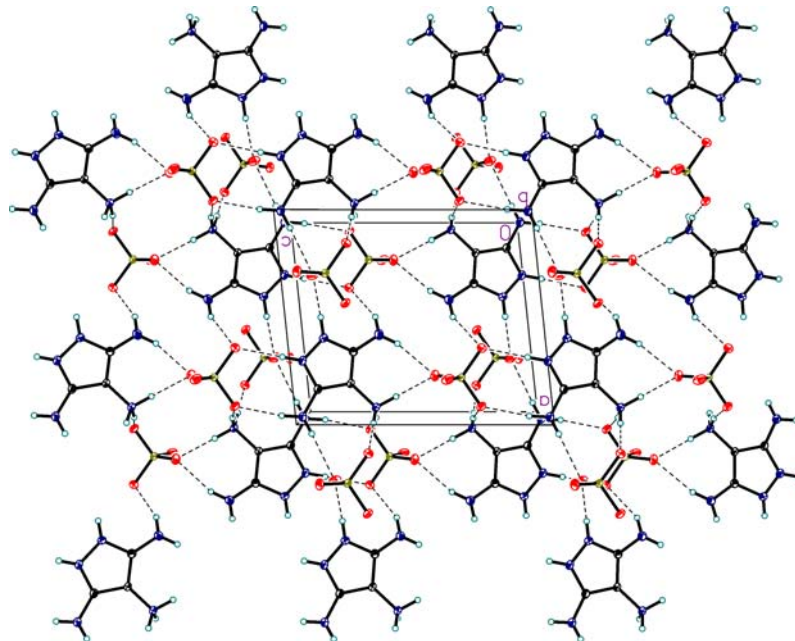
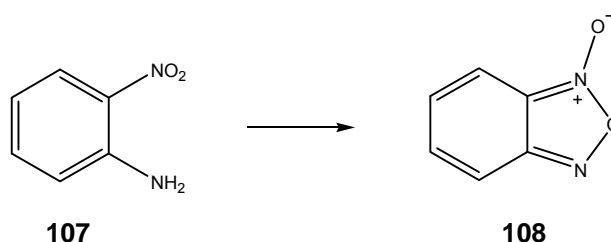


Abbildung 76: Struktur von 74 im Kristallverbund

9.3.26 Synthese von Benzo[1,2,5]oxadiazol 1-oxid



20.0 g (145 mmol) 2-Nitroanilin **107** wurden in 250 ml EtOH gelöst. Nach der Zugabe von 5 g (89.1 mmol) KOH verfärbte sich die Lösung rötlich-orange. Man ließ den Reaktionsansatz 30 min. bei RT Rühren und tropfte dann innerhalb einer Stunde 250 ml einer wässrigen NaOCl-Lösung (12 % freies Chlor) dazu. Die Lösung wurde nun intensiv rot. Während der Zugabe schied sich aus der Lösung langsam ein Feststoff aus. Die Reaktionsmischung wurde noch 30 min gerührt und anschließend auf 1 l Eiswasser gegeben. Der ausgefallene gelbliche Niederschlag wurde abgesaugt und aus EtOH unkristallisiert. Beim langsamen Erkalten der dunkelgelben Lösung schieden sich insgesamt 9.21 g des Produktes **108** in Form gelber, nadelförmiger Kristalle ab.

Ausbeute: 9.21 g (47 %)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:8; $R_f = 0.34$

Schmelzpunkt: 69-70 °C (EtOH)

Lit.: 72 °C^[76]

IR (KBr): 3110 (w), 3068 (w), 1969 (w), 1791 (w), 1723 (w), 1613 (s), 1581 (s), 1529 (s), 1477 (s), 1440 (w), 1414 (w), 1346 (w), 1278 (w), 1194 (m), 1147 (m), 1121 (m), 1042 (w), 1011 (s), 974 (w), 890 (s), 827 (s), 744 (s), 670 (m), 576 (m), 560 (m)

¹N-NMR: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

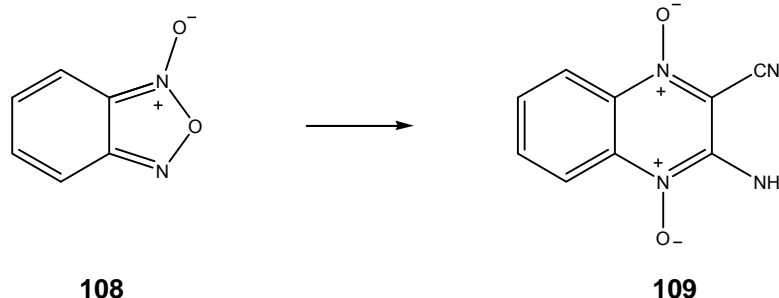
7.68 (s, br, 2H, aromatische H-Atome), 7.46 (s, br, 2H, aromatische H-Atome)

Elementaranalyse: (%) für $C_6H_4N_2O_2$ (136.11)

ber.: C 52.95 H 2.96 N 20.58

gef.: C 52.75 H 3.05 N 20.74

9.3.27 Synthese von 3-Amino-1,4-dioxy-chinoxalin-2-carbonitril



In einem 100 ml Zweihalskolben wurden 2.72 g (20.0 mmol) **108** und 1.4 g (21.2 mmol) Malonsäuredinitril in 8 ml DMF gelöst. Die Reaktionslösung färbte sich gelb. Man kühlte die Mischung auf 0-4 °C ab und tropfte dann innerhalb einer Stunde eine Lösung von 0,5 ml Triethylamin in 3 ml DMF dazu. Mit zunehmender Reaktionsdauer färbte sich die Lösung intensiv rot. Man ließ den Ansatz 5 h Rühren, saugte den ausgefallenen Niederschlag ab, wusch mit wenig Ether und dann mit MeOH nach und trocknete den Feststoff im Ölpumpenvakuum. Das Produkt wurde in Form eines orangefarbenen Feststoffes **109** erhalten.

Ausbeute: 3.43 g (85%)

DC: AcOEt/MeOH 20:1; $R_f = 0.45$

Schmelzpunkt: 190-191 °C (Dioxan)

Lit.: 190 °C^[61]

IR (KBr): 3351 (s), 3257 (s), 3110 (w), 2231 (m), 1623 (s), 1602 (s), 1588 (s), 1524 (m), 1482 (m), 1445 (w), 1372 (s), 1346 (s), 1293 (m), 1231 (s), 1204 (w), 1178 (w), 1152 (w), 1110 (s), 1100 (s), 1037 (m), 1016 (w), 974 (w), 922 (w), 848 (m), 770 (s), 733 (w), 665 (w), 639 (w), 608 (w), 560 (m)

¹N-NMR: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

8.30-8.25 (m, 2H, H-C(5) und H-C(8)), 8.06 (s,br,2H,NH₂, austauschbar mit D₂O), 7.92 (ddd, $J_1 = 8.4$ Hz, $J_2 = 7.1$ Hz, $J_3 = 1.3$ Hz, 1H, H-C(6) oder H-C(7)), 7.65 (ddd, $J_1 = 8.4$ Hz, $J_2 = 7.2$ Hz, $J_3 = 1.2$ Hz, 1H, H-C(7) oder H-C(6))

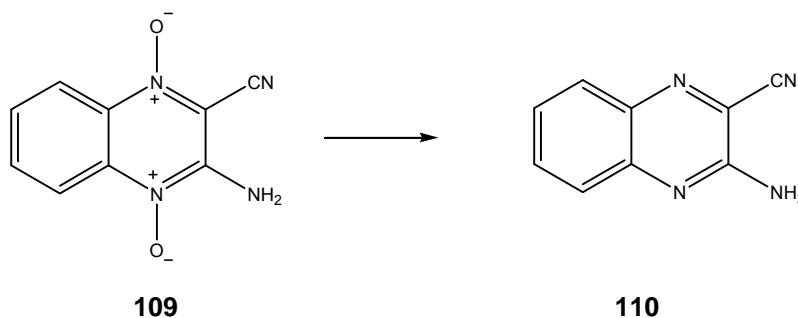
¹³C-NMR: (δ [ppm], 62.90 MHz, DMSO- d_6)

145.82 (C(3)-NH₂), 136.73 (C(4a)), 134.07 (C(8a)), 131.58 (C(6)), 127.39 (C(5)), 119.62 (C()), 117.87 (C()), 110.51 (C()), 108.62 (C())

Elementaranalyse: (%) für C₉H₆N₄O₂ (202.17)

ber.: C 53.47 H 2.99 N 27.71

gef.: C 53.40 H 3.09 N 27.43

9.3.28 Synthese von 3-Amino-chinoxalin-2-carbonitril

2.0 g (9.9 mmol) **109** wurden in 18 ml MeOH suspendiert. Man erwärmte die Reaktionsmischung für 2 h auf 50-60 °C. Anschließend tropfte man eine Lösung von 5.6 g (2.8 eq; 32.1 mmol) Natriumdithionit (Na₂S₂O₄, tech. ca. 85 %) in 18 ml Wasser dazu. Während der Zugabe des Reduktionsmittels verfärbte sich die anfangs rote Suspension zuerst orange, dann wurde sie intensiv gelb. Nach beendeter Zugabe ließ man das Reaktionsgemisch noch 3 h bei der oben genannten Temperatur Rühren, kühlte dann auf RT ab und suspendierte dann den gelben Reaktionsansatz in 200 ml Wasser. Der Niederschlag wurde abgesaugt, gründlich mit Wasser gewaschen und aus EtOH umkristallisiert. Beim Abkühlen kristallisierte das Produkt **110** in Form gelber Nadeln.

Ausbeute: 1.34 g (80%)**DC:** AcOEt/n-Hexan 1:5; R_f = 0.15**Schmelzpunkt:** 203-204 °C (EtOH)Literatur.: 201 °C^[61]**IR (KBr):** 3403 (s), 3319 (w), 3131 (m), 2744 (w), 2231 (m), 1660 (s), 1607 (m), 1555 (s), 1487 (m), 1435 (m), 1393 (w), 1361 (m), 1325 (w), 1283 (w), 1251 (w), 1220 (m), 1173 (w), 1142 (m), 1094 (w), 1005 (w), 954 (w), 916 (w), 864 (w), 759 (s), 697 (w), 660 (w), 613 (w)

¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆)

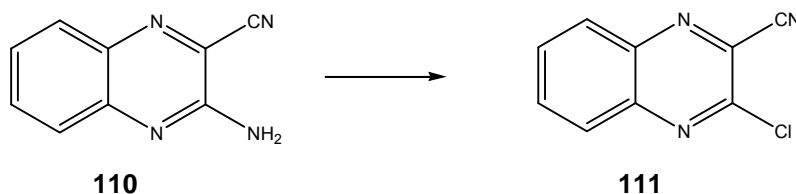
7.84 (dd, $J_1 = 8.4$ Hz, $J_2 = 0.9$ Hz, 1H, H-C(8)), 7.74 (ddd, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 7.0$ Hz, $J_3 = 1.5$ Hz, 1H, H-C(6)), 7.59 (dd, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 1.0$ Hz, 1H, H-C(5)), 7.47 (ddd, $J_1 = 8.4$ Hz, $J_2 = 6.9$ Hz, $J_3 = 1.5$ Hz, 1H, H-C(7)), 7.42 (s,br,2H,NH₂, austauschbar mit D₂O)

¹³C-NMR: (δ[ppm], 62.90 MHz, DMSO-d₆)

152.90 (C(3)-NH₂), 142.81 (C(4a)), 135.86 (C(8a)), 133.35 (C(6)), 128.93 (C(8)), 125.67 (C(7)), 125.43 (C(5)), 119.30 (C(2)), 115.14 (C(CN)),

Elementaranalyse: (%) für C₉H₆N₄ (170.17)

ber.:	C 63.52	H 3.55	N 32.92
gef.:	C 63.37	H 3.57	N 32.69

9.3.29 Synthese von 3-Chlor-chinoxalin-2-carbonitril

Eine Mischung aus 1.0 g (5.87 mmol) **110**, 14 ml konz. HCl und 12 ml Eisessig wurden für 20 min. bei 0-5 °C gerührt. Zu dieser Mischung tropfte man nun eine Lösung von 1.21 g (3.0 eq., 17.6 mmol) NaNO₂ in 10 ml H₂O und ließ den Ansatz über Nacht bei RT stehen. Der ausgefallene Niederschlag wurde abgesaugt und aus MeOH/H₂O umkristallisiert. Das Produkt **111** konnte in Form eines farblosen Feststoffes erhalten werden.

Ausbeute: 160 mg (14 %)*

DC: AcOEt/n-Hexan 1:15; R_f = 0.23

Schmelzpunkt: 198-199 °C (MeOH/H₂O)

Literatur.: 200 °C^[61]

IR (KBr): 3037 (m), 2932 (w), 2848 (w), 2241 (w), 1990 (w), 1869 (w), 1670 (w), 1607 (w), 1555 (s), 1524 (m), 1482 (m), 1456 (m), 1346 (m), 1314 (w), 1283 (s), 1262 (m), 1248 (w), 1210 (s), 1189 (w), 1131 (m), 1047 (s), 979 (w), 901 (w), 780 (s), 676 (w), 618 (w), 587 (w)

¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆)

8.25 (dd, $J_1 = 7.5$ Hz, $J_2 = 1.25$ Hz, 1H, H-C(8)), 8.18-8.01 (m, 3H, H-C(7), H-C(6) und H-C(5))

¹³C-NMR: (δ[ppm], 62.90 MHz, DMSO-d₆)

145.97 (C(3)-Cl), 141.31 (C(4a)), 139.47 (C(8a)), 134.76 (C(6)), 132.15 (C(7)), 129.62 (C(2)), 129.24 (C(8)), 128.12 (C(5)), 114.66 (CN)

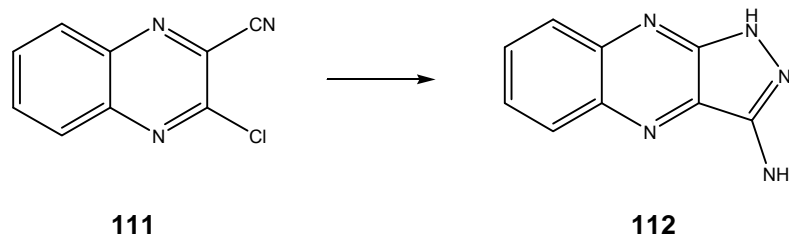
Elementaranalyse: (%) für C₉H₄ClN₃ (189.60)

ber.: C 57.01 H 2.13 N 22.16

gef.: C 56.75 H 2.19 N 21.91

***Anmerkung:** Durch kürzere Reaktionszeiten kann eine deutlich höhere Ausbeute erzielt werden. Meist ist die Reaktion nach 3-4 Stunden komplett beendet. Wenn das Produkt dann abgetrennt wird, können Ausbeuten von 60-70% erhalten werden. Die 14 % Ausbeute und der analytische Datensatz beziehen sich auf die Ausbeute nach einmaliger Durchführung der Reaktion.

9.3.30 Synthese von 1H-Pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3-ylamin



150 mg (0.9 mmol) **111** wurden in 6.8 ml (39.5 eq., 1.74 g, 35 mmol) Hydrazinmonohydrat-Lösung (24-26 %ige Lösung, d 1.027) suspendiert. Die anfangs gelbe Suspension wurde für 1,5 h zum Sieden erhitzt. Während dem Sieden verfärbte sich die Lösung intensiv rot. Nach beendeter Reaktion wurde das Reaktionsgemisch auf RT abgekühlt, wobei sich ein roter, kristalliner Niederschlag abschied. Zur Vervollständigung der Kristallisation wurde der Ansatz über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Der ausgefallene Niederschlag wurde abgesaugt und aus MeOH umkristallisiert. Das Produkt **112** wurde in Form roter Kristalle erhalten.

Ausbeute: 90 mg (55 %)

DC: AcOEt/n-Hexan 2:1; $R_f = 0.53$

Schmelzpunkt: 280-281 °C (MeOH)

Literatur.: 285 °C^[61]

IR (KBr): 3382 (m), 3319 (m), 3183 (s), 3047 (w), 2922 (w), 2827 (w), 1644 (s), 1623 (m), 1586 (m), 1560 (s), 1508 (w), 1477 (m), 1398 (m), 1367 (w), 1346 (w), 1314 (w), 1251 (w), 1204 (m), 1152 (m), 1115 (w), 1100 (s), 1021 (w), 948 (w), 916 (w), 859 (w), 817 (w), 801 (w), 744 (s), 691 (m), 602 (m)

¹N-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆)

12.22 (s, br, 1H, NH-Pyrazol-Ring H, austauschbar mit D₂O), 8.15 (dd, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 1$ Hz, 1H, H-C(8)), 7.99 (dd, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 1$ Hz, 1H, H-C(5)), 7.81 (ddd, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 6.9$ Hz, $J_3 = 1.6$ Hz, 1H, H-C(6)), 7.67 (ddd, $J_1 = 8.3$ Hz, $J_2 = 6.8$ Hz, $J_3 = 1.4$ Hz, 1H, H-C(7)), 6.14 (s, br, 2H, NH₂, tauscht mit D₂O aus)

¹³C-NMR: (δ[ppm], 62.90 MHz, DMSO-d₆)

148.37 (C(3)-NH₂), 143.96 (C(3a)), 141.33 (C(9a)), 138.53 (C(4a)), 130.64 (C(8a)), 130.39 (C(6)), 129.66 (C(7)), 127.83 (C(8)), 126.12 (C(5))

Elementaranalyse: (%) für C₉H₇N₅ (185.19)

ber.: C 58.37 H 3.81 N 37.82

gef.: C 58.60 H 3.83 N 37.69

Kristallstruktur von Verbindung 112

Die Kristallisation erfolgte aus Methanol

Kristallsystem: orthorhombisch; Raumgruppe P 212121; Elementarzelle: $a = 3.8064 (12) \text{ \AA}$, $b = 5.8607 (18) \text{ \AA}$, $c = 35.278 (12) \text{ \AA}$; $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$; $V = 787.0 (4) \text{ \AA}^3$; $Z = 4$, $\rho_{\text{ber}} = 1.563 \text{ Mg/m}^3$; Siemens Smart Diffraktometer; Absorptionskoeffizient $\mu = 0.105 \text{ mm}^{-1}$; Wellenlänge = 0.71073 \AA ; $T = 155 (2) \text{ K}$; Reflexe gemessen: 6301, davon 1117 unabhängige, keine Absorptionskorrektur; ($R_{\text{int}} = 0.4155$); $R = 0.2257$, $R_w = 0.3398$; goodness of fit = 1.193; Theta Bereich für Datenerfassung: 2.31 bis 28.11° ; Restelektronendichte: zwischen 0.576 und -0.533 e/\AA^3 . Zur Kristallstrukturbestimmung wurde ein orangefarbener, nadelförmiger Kristall der Dimension $0.02 \cdot 0.10 \cdot 2.0 \text{ mm}$ bei einer Temperatur von -118°C vermessen. Es wurde keine Absorptionskorrektur vorgenommen. Gleiche Reflexe wurden gemittelt. $R(I)$ intern = 0.415. Die Struktur wurde mit direkten Methoden mit Hilfe des Programms SHELXS bestimmt. Die Strukturverfeinerung wurde mittels des Programms SHELXL-97 durchgeführt.

Diskussion der Struktur: (Atombezeichnung siehe **Abbildung 77**)

Die Bindungslängen in dieser Struktur sind sehr ähnlich zu den Bindungslängen, die in der Struktur mit einer Methylgruppe am Ringstickstoff N1 des Pyrazolrings gefunden wurden. Die Pyrazolchinoxalingruppen sind nahezu planar (größte Abweichung von der Planarität 0.019 \AA). Die Moleküle stapeln sich kristallographisch gesehen in a -Richtung, was auch durch die „Nadelachsen“ des Kristalls verursacht wird. Der kürzeste, intermolekulare C-C und C-N-Kontakt in dem Stapel beträgt $3.37 (2)$ und $3.36 (2) \text{ \AA}$. Die Stapel sind untereinander durch N-H-N-Wasserstoffbrücken in zwei Ebenen parallel zur $[001]$ Ebene verbunden. Die Wasserstoffbrücken sind ziemlich schwach. (H-N-Abstände sind zwischen 2.1 und 2.28 \AA). Der kürzeste Kontakt zwischen benachbarten Schichten wird durch sehr schwache intermolekulare C-H-C-Wechselwirkungen erzeugt. Der Abstand zwischen H-C beträgt hier 3.07 \AA .

Tabelle 22: Wasserstoffbrücken von Verbindung 112

N-H.....N	N-H [Å]	H...N[Å]	N...N[Å]	N-H-N [deg]
N1-H1...N2	0.88	2.10	2.95(1)	161
N3-H3A...N2	0.88	2.27	3.13(2)	166
N3-H3B...N5	0.88	2.28	3.06(1)	148

Tabelle 23: Torsionswinkel [°] von 112

Atome	Torsionswinkel [°]	Atome	Torsionswinkel[°]
N(1)-C(3)-N(5)-C(9)	179.0 (12)	C(7)-C(8)-C(9)-C(4)	-0.8 (17)
C(2)-C(3)-N(5)-C(9)	2.9 (17)	N(4)-C(4)-C(9)-N(5)	-2.9 (15)
C(2)-N(4)-C(4)-C(5)	178.7 (11)	C(5)-C(4)-C(9)-N(5)	179.2 (11)
C(2)-N(4)-C(4)-C(9)	0.9 (15)	N(4)-C(4)-C(9)-C(8)	178.6 (10)
C(4)-N(4)-C(2)-C(1)	178.4 (11)	C(5)-C(4)-C(9)-C(8)	0.6 (15)
C(4)-N(4)-C(2)-C(3)	2.8 (15)	C(9)-C(8)-C(7)-C(6)	-0.5 (18)
N(5)-C(3)-C(2)-N(4)	-5.1 (17)	C(5)-C(6)-C(7)-C(8)	1.9 (17)
N(1)-C(3)-C(2)-N(4)	178.0 (10)	N(1)-N(2)-C(1)-N(3)	-179.7 (10)
N(5)-C(3)-C(2)-C(1)	178.2 (11)	N(1)-N(2)-C(1)-C(2)	2.0 (13)
N(1)-C(3)-C(2)-C(1)	1.2 (12)	N(4)-C(2)-C(1)-N(2)	-178.4 (12)
N(4)-C(4)-C(5)-C(6)	-177.0 (11)	C(3)-C(2)-C(1)-N(2)	-2.1 (13)
C(9)-C(4)-C(5)-C(6)	0.9 (18)	N(4)-C(2)-C(1)-N(3)	3 (2)
C(4)-C(5)-C(6)-C(7)	-2.1 (18)	C(3)-C(2)-C(1)-N(3)	179.7 (11)
C(3)-N(5)-C(9)-C(8)	179.2 (11)	N(5)-C(3)-N(1)-N(2)	-176.6 (12)
C(3)-N(5)-C(9)-C(4)	0.7 (15)	C(2)-C(3)-N(1)-N(2)	-0.1 (12)
C(7)-C(8)-C(9)-N(5)	-179.3 (12)	C(1)-N(2)-N(1)-C(3)	-1.2 (13)

Tabelle 24: Bindungslängen [Å] und Bindungswinkel [°] von 112

Atome	Bindungswinkel [°]	Atome	Bindungslängen [Å]
C(2)-N(4)-C(4)	116.9 (9)	N(4)-C(2)	1.306 (13)
N(5)-C(3)-N(1)	131.3 (11)	N(4)-C(4)	1.336 (13)
N(5)-C(3)-C(2)	123.0 (10)	C(3)-N(5)	1.315 (14)
N(1)-C(3)-C(2)	105.7 (10)	C(3)-N(1)	1.327 (14)
C(3)-N(5)-C(9)	115.9 (10)	C(3)-N(2)	1.452 (14)
N(4)-C(4)-C(5)	123.3 (10)	N(5)-C(9)	1.352 (15)
N(4)-C(4)-C(9)	121.2 (11)	C(4)-C(5)	1.383 (16)
C(5)-C(4)-C(9)	115.5 (9)	C(4)-C(9)	1.492 (14)

Fortsetzung von Tabelle Tabelle 24

Atome	Bindungswinkel [°]	Atome	Bindungslängen [Å]
C(7)-C(8)-C(9)	125.5 (10)	C(8)-C(7)	.328 (16)
N(4)-C(2)-C(1)	133.3 (9)	C(8)-C(9)	1.378 (15)
N(4)-C(2)-C(3)	122.6 (9)	C(2)-C(1)	1.425 (15)
C(1)-C(2)-C(3)	104.1 (9)	C(5)-C(6)	1.366 (15)
C(6)-C(5)-C(4)	125.8 (10)	C(6)-C(7)	1.458 (15)
C(5)-C(6)-C(7)	117.1 (11)	N(2)-C(1)	1.311 (15)
C(5)-C(9)-C(8)	122.1 (10)	N(2)-N(1)	1.410 (12)
N(5)-C(9)-C(4)	120.6 (10)	N(3)-C(1)	1.349 (15)
C(8)-C(9)-C(4)	117.3 (11)		
C(1)-N(2)-N(1)	105.0 (9)		
C(8)-C(7)-C(6)	118.7 (10)		
N(2)-C(1)-N(3)	121.5 (11)		
N(2)-C(1)-C(2)	112.2 (10)		
N(3)-C(1)-C(2)	126.2 (11)		
C(3)-N(1)-N(2)	113.0 (10)		

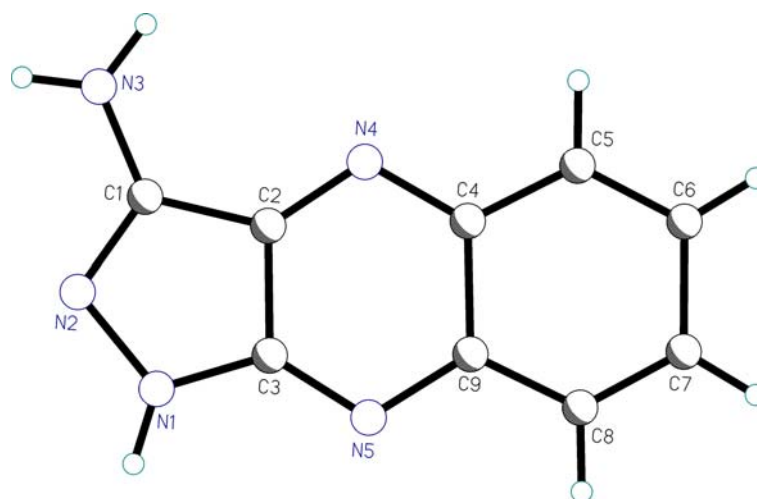


Abbildung 77: Kristallstruktur von 112

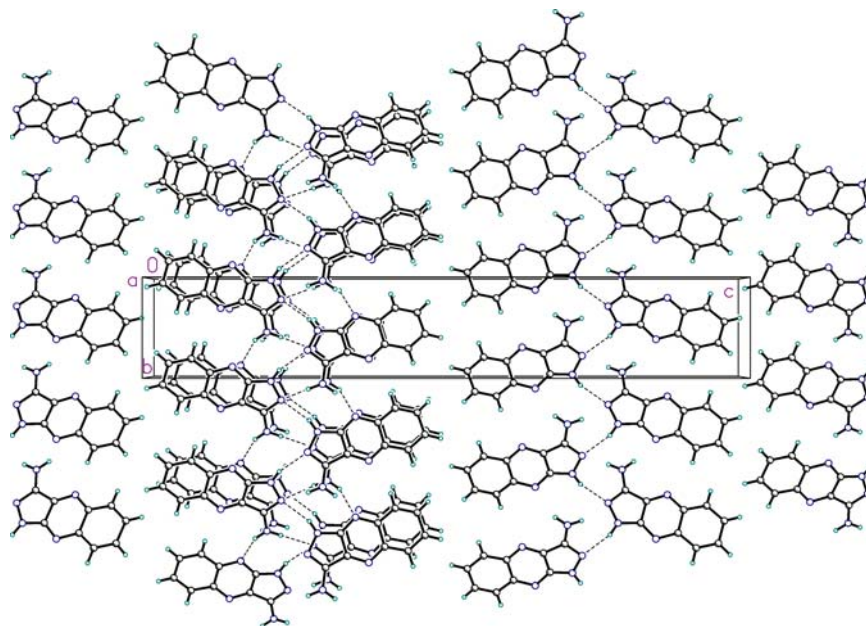
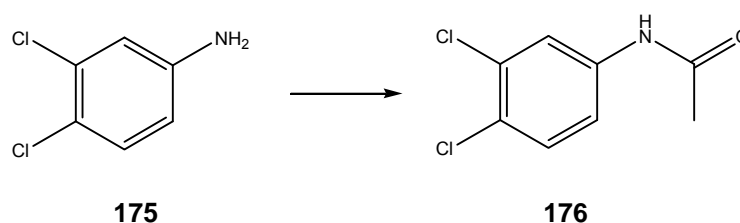


Abbildung 78: Schichtstruktur von **112** im Kristallverbund

9.3.31 Synthese von N-(3,4-Dichlor-phenyl)-acetamid



In einem 250 ml Dreihalsrundkolben mit Rückflusskühler wurden 30.0 g (185.1 mmol) 3,4-Dichloranilin **175** in einer Mischung aus 50 ml Eisessig und 50 ml Essigsäureanhydrid gelöst. Die hellbraune Reaktionslösung wurde für 2 h zum Rückfluß erhitzt. Nach dem Erkalten gab man den Ansatz auf 200 ml Eiswasser. Der ausgefallene Niederschlag wurde abgesaugt und aus EtOH umkristallisiert. Es wurde ein farbloser Feststoff **176** erhalten.

Ausbeute: 41.49 g (quantitativ)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:1; $R_f = 0.36$

Schmelzpunkt: 121-122 °C (EtOH)

Lit.: 122-123 °C^[77]

IR (KBr): 3306 (s), 3263 (m), 3188 (w), 3113 (w), 3049 (w), 1739 (w), 1664 (s), 1606 (m), 1584 (s), 1526 (s), 1472 (s), 1440 (m), 1387 (s), 1365 (m), 1301 (m), 1258 (m), 1221 (w), 1157 (w), 1125 (w), 1039 (w), 1018 (w), 970 (w), 911 (w), 874 (m), 810 (m), 746 (w), 724 (w), 676 (w), 612 (w), 569 (w)

¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆)

10.22 (s, 1H, NH, austauschbar mit D₂O), 7.97 (d, J = 2.25 Hz, 1H, H-C(2)), 7.54 (d, J = 9 Hz, 1H, H-C(5)), 7.45 (dd, J₁ = 8.75, J₂ = 2.5, 1H, H-C(6)), 2.05 (s, 3H, CH₃)

¹³C-NMR: (δ[ppm], 62.90 MHz, DMSO-d₆)

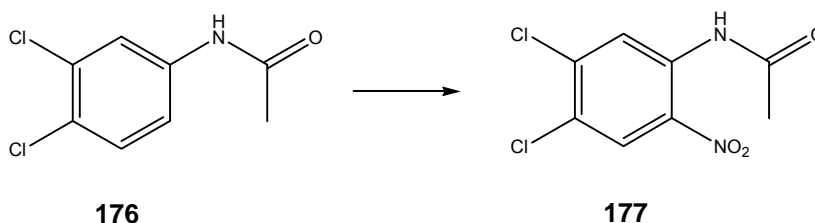
168.67 (C(C=O)), 139.25 (C(1)), 130.80 (C(3)), 130.46 (C(4)), 124.24 (C(5)), 119.96 (C(2)), 118.80 (C(6)), 23.91 (C(CH₃))

Elementaranalyse: (%) für C₈H₇Cl₂NO (204.05)

ber.: C 47.09 H 3.46 N 6.86

gef.: C 47.24 H 3.48 N 6.68

9.3.32 Synthese von N-(4,5-Dichlor-2-nitrophenyl)-acetamid



Zu einer auf 0-5 °C gekühlten Mischung aus 100 ml konz. H₂SO₄ und 100 ml HNO₃ (65%ig) wurden über einen Zeitraum von 20 Minuten 20.00 g (98.01 mmol) **176** zugegeben. Nach beendeter Zugabe ließ man den Reaktionsansatz noch 15 Minuten bei Eisbadkühlung rühren, entfernte dann das Kältebad und ließ noch 1 h bei RTiterrühren. Nach beendeter Reaktion gab man die gelbe Reaktionslösung auf 1 l Eiswasser. Der ausgefallene gelbe Niederschlag wurde abgesaugt und aus EtOH umkristallisiert. Das Produkt **177** wurde in Form blassgelber Plättchen isoliert.

Ausbeute: 12.11 g (50%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:8; $R_f = 0.26$

Schmelzpunkt: 124-125 °C

Lit.: 122-124 °C^[78]

IR (KBr): 3476 (w), 3284 (w), 3209 (w); 3156 (w); 3113 (w); 3059 (w); 1675 (s), 1606 (w), 1574 (s), 1542 (m), 1494 (s); 1467 (m); 1376 (s); 1333 (s); 1301 (w); 1269 (s); 1253 (s); 1141 (m); 1098 (w); 1034 (w); 1018 (w); 970 (w); 938 (w); 885 (m); 863 (w); 842 (w); 804 (w); 772 (w); 746 (w); 719 (w); 687 (w); 650 (w); 591 (w)

¹H-NMR: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO-d₆)

10.45 (s, br, 1H, NH, austauschbar mit D₂O), 8.29 (s, 1H, H-C(3)), 7.99 (s, 1H, H-C(6)), 2.10 (s, 3H, CH₃)

¹³C-NMR: (δ [ppm], 62.90 MHz, DMSO-d₆)

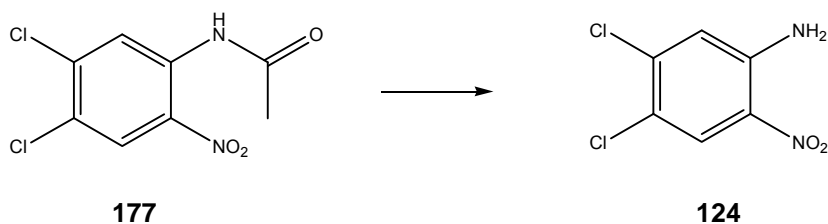
168.71 (C(C=O)), 140.53 (C(2)), 136.21 (C(5)), 131.14 (C(1)), 126.51 (C(4)), 126.45 (C(3)), 125.79 (C(6)), 23.41 (C(CH₃))

Elementaranalyse: % für C₈H₆Cl₂N₂O₃ (249.05)

ber.: C 38.58 H 2.43 N 11.25

gef.: C 38.70 H 2.63 N 11.05

9.3.33 Synthese von 4,5-Dichlor-2-nitrophenylamin



21.8 g (105.2 mmol) **177** wurden portionsweise in 50 ml konz. H_2SO_4 eingetragen. Nach beendeter Zugabe erwärmte man die gelbe Lösung für 1 h auf 100 °C. Nach dem Erkalten gab man die dunkelgelbe, klare Lösung auf 300 ml Eiswasser. Der ausgefallene Niederschlag wurde abgesaugt, getrocknet und aus Essigsäure (100%) umkristallisiert. Das Produkt **124** konnte in Form orangefarbener Nadeln erhalten werden.

Ausbeute: 18.63 g (97%)

DC: AcOEt/Hexan 1:15 $R_f = 0.19$

Schmelzpunkt: 179-180 °C (Eisessig)

Lit.: 176°C^[79]

IR (KBr): 3476 (s), 3348 (s), 3103 (w), 1622 (s), 1574 (w), 1547 (s), 1483 (s), 1456 (m), 1403 (m), 1365 (m), 1312 (s), 1242 (s), 1146 (s), 1098 (w), 959 (m), 890 (m), 858 (w), 836 (w), 804 (w), 762 (m), 730 (m), 671 (m), 623 (w),

¹H-NMR: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

8.15 (s, 1H, H-C(3)), 7.66 (s, br, 2H, NH_2 , austauschbar mit D_2O), 7.29 (s, 1H, H-C(6))

¹³C-NMR: (δ [ppm], 62.90 MHz, DMSO- d_6)

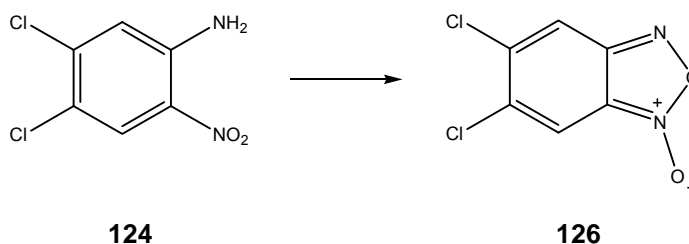
145.10 (C(1)- NH_2), 138.15 (C(5)-Cl), 129.18 (C(2)- NO_2), 126.44 (C(3)), 119.71 (C(4)-Cl), 116.24 (C(6))

Elementaranalyse: (%) für $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2$ (207.01)

ber.: C 34.81 H 1.95 N 13.53

gef.: C 34.82 H 2.14 N 13.32

9.3.34 Synthese von 5,6-Dichlor-benzo[1,2,5]oxadiazol-1-oxid



18.0 g (87 mmol) **124** wurden in 250 ml EtOH suspendiert. Nach Zugabe von 5 g (89.11 mmol) KOH verfärbte sich die Lösung dunkelgelb-rötlich. Nun tropfte man über einen Zeitraum von 1 h 500 ml einer NaOCl-Lösung (12 % freies Chlor) dazu. Nach beendeter Zugabe hatte die Lösung eine braunrote Farbe angenommen. Der Ansatz wurde noch 1 h bei RT gerührt und anschließend auf 1 l Wasser gegeben. Der ausgefallene Niederschlag wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus MeOH/H₂O umkristallisiert. Es konnte ein hellbrauner Feststoff **126** isoliert werden.

Ausbeute: 29.6 g (88%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:100; R_f = 0.42

Schmelzpunkt: 96-98 °C (MeOH/Wasser)

Lit.: 97-98 °C^[80]

IR (KBr): 3476 (w), 3070 (w), 2996 (w), 1723 (w), 1611 (s), 1568 (w), 1526 (s), 1461 (s), 1445 (s), 1376 (m), 1285 (m), 1178 (w), 1082 (s), 1023 (s), 970 (w), 869 (w), 799 (m), 703 (m), 660 (w), 639 (m)

¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆)

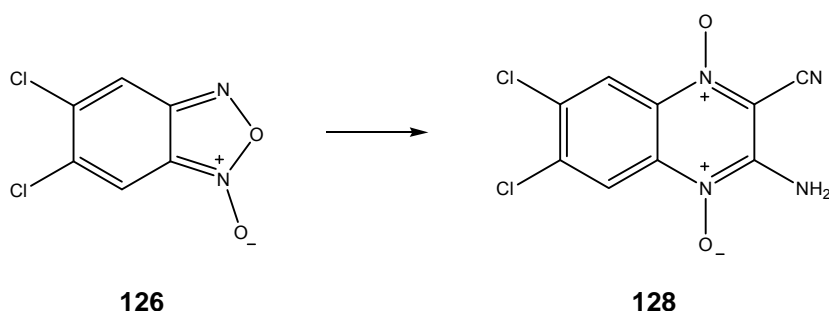
8.30 (s, 2H, br, H-C(4) und H-C(7))

Elementaranalyse: (%) für C₆H₂Cl₂N₂O₂ (205.00)

ber.: C 35.15 H 0.98 N 13.67

gef.: C 35.32 H 1.05 N 13.88

9.3.35 Synthese von 3-Amino-6,7-dichlor-1,4-dioxy-chinoxalin-2-carbonitril



126 (3.9 g, 19.26 mmol) und 1.3 g (1.06 eq., 20.4 mmol) Malonsäuredinitril wurden bei einer Temperatur von 0-4 °C in 30 ml DMF gelöst. Zu dieser dunkelgelben Lösung gab man tropfenweise 0.5 ml NEt₃. Die Lösung verfärbte sich nach kurzer Zeit tiefrot. Der Ansatz wurde noch für 30 min. bei Eisbadkühlung gerührt, anschließend entfernte man das Kältebad und ließ über Nacht bei RT stehen. Dabei schied sich aus der Lösung ein orangefarbener Niederschlag ab. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit wenig MeOH gewaschen und aus 1,4-Dioxan umkristallisiert. Das Produkt **128** konnte in Form eines orangefarbenen Pulvers erhalten werden.

Ausbeute: 1.98 g (38 %)

DC: AcOEt +1% AcOH; R_f = 0.56

Schmelzpunkt: 265-267°C (Dioxan)

Lit.: 265°C^[81]

IR (KBr): 3361 (m), 3278 (s), 3100 (w), 2241 (w), 1623 (s), 1597 (m), 1581 (w), 1560 (w), 1529 (w), 1508 (w), 1450 (m), 1408 (m), 1367 (s), 1330 (s), 1220 (m), 1194 (m), 1168 (m), 1126 (m), 1094 (m), 1053 (m), 969 (m), 890 (m), 754 (m), 681 (m), 665 (m), 623 (m)

¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆)

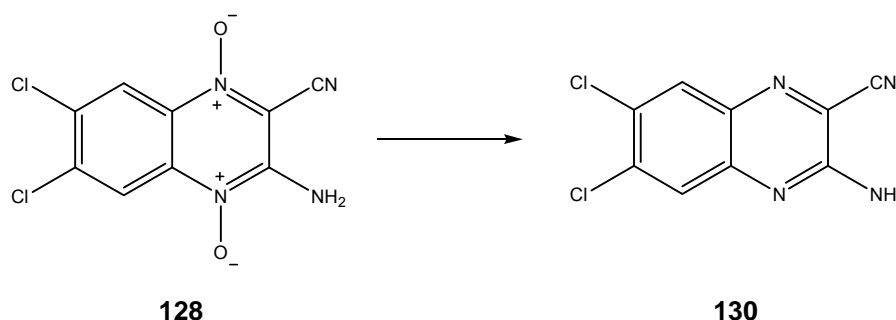
8.47 (s, 1H, H-C(5)), 8.44 (s, 1H, H-C(8)), 8.35 (s, br, 2H, NH₂, tauscht mit D₂O)

Elementaranalyse: (%) für C₉H₄Cl₂N₄O₂ (271.06)

ber.: C 39.88 H 1.49 N 20.67

gef.: C 39.99 H 1.74 N 20.43

9.3.36 Synthese von 3-Amino-6,7-dichlor-chinoxalin-2-carbonitril



15.9 g (58.6 mmol) **128** wurden in 150 ml MeOH suspendiert. Die tiefrote Suspension wurde für 2 h auf 50-60 °C erwärmt und gerührt. Bei dieser Temperatur tropfte man eine Lösung von 28.57 g (2.8 eq., 164 mmol) Na₂S₂O₄ in 250 ml Wasser hinzu. Mit zunehmender Reaktionszeit verfärbte sich der Reaktionsansatz intensiv gelb. Man ließ die Suspension noch eine Stunde bei 50-60 °C rühren und gab die gelbe Reaktionsmischung dann nach dem Erkalten auf 1 l Wasser. Der gelbe Niederschlag wurde abgesaugt und aus DMF umkristallisiert. Das Produkt wurde in Form von gelben Kristallen **130** isoliert.

Ausbeute: 10.11 g (72%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:4; R_f = 0.4

Schmelzpunkt: Zersetzung der Verbindung ab 260°C (DMF)

IR (KBr): 3403 (s), 3319 (w), 3141 (m), 2932 (w), 2231 (m), 1660 (s), 1597 (w), 1555 (s), 1545 (m), 1503 (w), 1450 (s), 1419 (m), 1382 (w), 1351 (m), 1288 (w), 1262 (w), 1189 (s), 1168 (m), 1110 (m), 984 (w), 880 (m), 765 (w), 655 (w), 592 (w)

¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆)

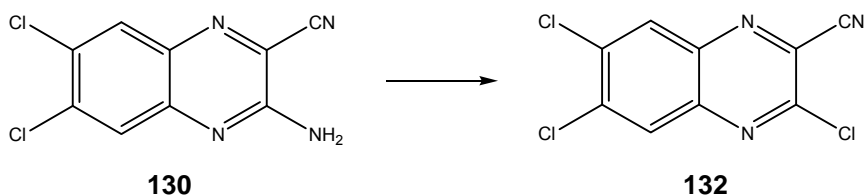
8.17 (s, 1H, H-C(5)), 7.84 (s, 1H, H-C(8)), 7.73 (s, br, 2H, NH₂, austauschbar mit D₂O)

Elementaranalyse: (%) für C₆H₄Cl₂N₄ (239.06)

ber.: C 45.22 H 1.69 N 23.44

gef.: C 45.31 H 1.75 N 23.31

9.3.37 Synthese von 3,6,7-Trichlorchinoxalin-2-carbonitril



In einem 250 ml Rundkolben wurden 10.00 g (41.8 mmol) **130** mit einer auf 0-5 °C gekühlten Mischung aus 50 ml AcOH und 40 ml HCl versetzt. Zu diesem Gemisch tropfte man über einen Zeitraum von 1 Stunde eine Lösung von 8.60 g (3.00 eq., 125.49 mmol) NaNO₂ in 15 ml H₂O dazu. Nach kurzer Zeit war eine Gasentwicklung zu beobachten. Nach beendeter Zugabe entfernte man das Eisbad und ließ den Reaktionsansatz über Nacht bei RT stehen. Der ausgefallene Niederschlag wurde abgesaugt, mit wenig Wasser gewaschen und aus MeOH umkristallisiert. Es wurden 8.26 g **132** in Form eines grauen Feststoffes erhalten.

Ausbeute: 8.26 g (76%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:15; R_f = 0.45

Schmelzpunkt: 194-195°C (MeOH)

IR (KBr): 3444 (w), 3070 (w), 2932 (w), 2237 (w), 1777 (w), 1590 (w), 1526 (m), 1451 (s), 1408 (m), 1381 (w), 1344 (w), 1285 (s), 1242 (w), 1168 (s), 1104 (m), 1061 (s), 1034 (w), 981 (m), 895 (s), 836 (w), 724 (w), 628 (w)

¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆)

8.69 (s, 1H, H-C(5)); 8.59 (s, 1H, H-C(8))

¹³C-NMR: (δ[ppm], 62.90 MHz, DMSO-d₆)

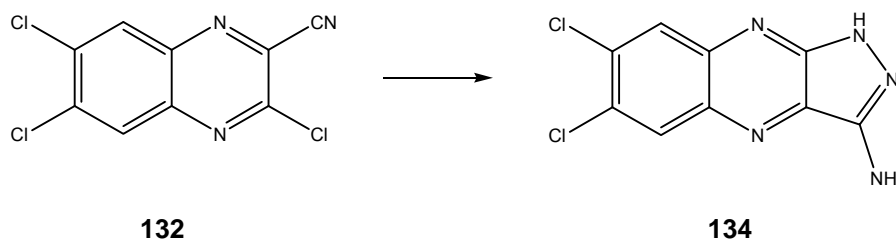
147.36 (C(3)-Cl), 140.19 (C(4a)), 138.41 (C(6)-Cl), 137.55 (C(7)-Cl), 135.05 (C(8a)), 130.95 (C(2)-CN), 129.96 (C(8)), 129.08 (C(5)), 114.33 (C(CN))

Elementaranalyse: (%) für C₉H₂Cl₃N₃ (258.49)

ber.: C 41.82 H 0.78 N 16.16

gef.: C 41.90 H 0.95 N 16.23

9.3.38 Synthese von 6,7-Dichlor-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3-ylamin



132 (5.00 g; 19.34 mmol) wurden in 50 ml einer wässrigen Hydrazinhydratlösung (24-26 %) für 2 h zum Rückfluss erhitzt. Dabei färbte sich die anfangs gelbe Reaktionsmischung intensiv rot. Nach beendeter Reaktion ließ man das Reaktionsgemisch auf RT abkühlen und filtrierte den dunkelroten Feststoff ab. Dieser wurde mit wenig Essigsäureethylester gewaschen und anschließend eine kleine Menge aus viel Toluol umkristallisiert. Es konnten so 4.23 g eines roten Feststoffes **134** gewonnen werden.

Ausbeute: 4.23 g (85%)

DC: AcOEt +1% AcOH; $R_f = 0.56$

Schmelzpunkt: ab 315 °C Zersetzung (Toluol)

IR (KBr): 3393 (m), 3310 (m), 3236 (m), 3194 (m), 3079 (w), 3049 (w), 2922 (w), 2827 (w), 1754 (w), 1712 (w), 1686 (w), 1680 (w), 1639 (s), 1613 (m), 1560 (s), 1508 (w), 1492 (w), 1445 (s), 1419 (w), 1408 (w), 1377 (m), 1330 (s), 1288 (w), 1257 (w), 1220 (w), 1178 (s), 1115 (s), 1021 (w), 979 (m), 880 (s), 812 (m), 738 (m), 660 (w), 644 (w), 571 (w),

¹N-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

12.46 (s, 1H, NH, austauschbar mit D_2O); 8.39 (s, 1H, H-C(5)); 8.30 (s, 1H, H-C(8)); 6.25 (s, 2H, NH_2 , austauschbar mit D_2O)

¹³C-NMR: (δ[ppm], 62.90 MHz, DMSO- d_6)

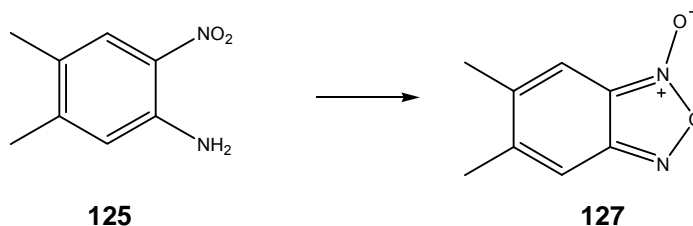
148.59 (C(3)- NH_2), 143.83, 140.38, 137.21, 133.05, 128.56, 128.38

Elementaranalyse: (%) für $C_9H_5N_5Cl_2$ (254.08)

ber.: C 42.54 H 1.98 N 27.56

gef.: C 42.33 H 2.12 N 27.76

9.3.39 Synthese von 5,6-Dimethylbenzo[c][1,2,5]oxadiazol-1-oxid



I.

In einem 1 l Rundkolben wurden 20.0 g (120.3 mmol) **125** in 300 ml EtOH gelöst. Nach Zugabe von 8.6 g (1.3 eq., 154 mmol) KOH verfärbte sich die anfangs orangefarbene Lösung dunkelrot. Man ließ den Ansatz noch 30 Minuten Rühren und tropfte dann innerhalb einer Stunde 250 ml einer wässrigen NaOCl-Lösung (12 % freies Chlor) dazu. Während der Zugabe schied sich aus der Lösung ein Niederschlag aus. Nach beendeter Reaktion gab man den Ansatz auf 500 ml Wasser, wobei noch mehr Produkt in Form eines schwach gelben, voluminösen Feststoffes ausfiel. Der Feststoff wurde abgesaugt und aus EtOH umkristallisiert. Das Produkt wurde in Form eines hellbraunen Pulvers **127** erhalten.

Ausbeute: 17.00 g (86%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:5; $R_f = 0.42$

Schmelzpunkt: 140-142 °C (EtOH)

Lit.: 139.4-139.7 °C^[60]

IR (KBr): 3442 (m), 3100 (w), 3037 (w), 2974 (w), 1623 (s), 1586 (s), 1524 (s), 1477 (s), 1450 (m), 1388 (m), 1314 (w), 1257 (w), 1215 (w), 1157 (w), 1100 (w), 1026 (m), 990 (m), 843 (m), 738 (m), 665 (w)

¹N-NMR: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

7.44 (s, br, 2H, H-C(4) und H-C(7)), 2.31 (s, 6H, 2-CH₃-Gruppen)

Elementaranalyse: (%) für C₈H₈N₂O₂ (164.16)

ber.: C 58.53 H 4.91 N 17.06

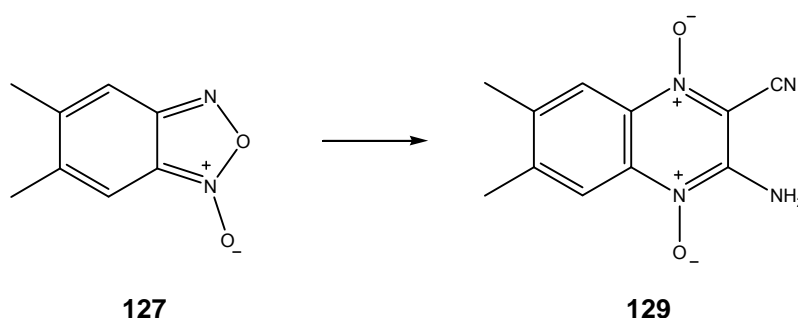
gef.: C 58.27 H 4.83 N 16.84

II.

In einem 1 l Rundkolben wurden 20.0 g (120.3 mmol) fein gemörseretes 4,5-Dimethyl-2-nitro-anilin in 400 ml einer Lösung aus 200 ml konzentrierter HCl und 200 ml Wasser suspendiert. Zu dieser orangefarbenen Suspension gab man unter kräftigem Rühren und Kühlung mittels eines Eis/NaCl-Kältebades innerhalb von 2 Stunden eine Lösung von 16.6 g (2.0 eq. 240.7 mmol) NaNO_2 in 100 ml Wasser hinzu. (**Vorsicht !** Ansatz schäumt bei zu schneller Zugabe sehr heftig auf!). Nach beendeter Zugabe ließ man die helle Suspension noch eine Stunde bei RT Rühren und filtrierte dann von ungelöstem Feststoff ab. Das klare, orangefarbene Filtrat wurde dann **sehr langsam**, tropfenweise in eine Lösung aus 15.6 g (2.0 eq. 240.7 mmol) NaN_3 in 200 ml Wasser eingetragen. Dabei schied sich ein farbloser, voluminöser Feststoff aus der Lösung aus. Der Feststoff wurde abgesaugt, gründlich mit Wasser nachgewaschen und ohne weitere Analytik sofort in Toluol aufgenommen. Die vereinigten Toluolphasen wurden zur Entfernung des Wassers mehrmals über MgSO_4 getrocknet und anschließend über einen Zeitraum von 2 Stunden zum Rückfluß erhitzt. Nach beendeter Reaktion (**DC Kontrolle!!!**) wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das ausgeschiedene gelbliche Rohprodukt wurde aus EtOH umkristallisiert. Nach dem Erkalten schieden sich 14.25 g des gewünschten Benzofurazan 1-oxides in Form eines hellbraunen Feststoffes ab. Der analytische Datensatz war identisch mit der nach Methode I. hergestellten Verbindung. Das Reaktionsprodukt wurde anschließend in die nächste Stufe eingesetzt. Da die Ausbeute bei dieser Reaktion schlechter war, wurden die Benzofurazan 1-oxide nicht mehr auf diesem Weg synthetisiert.

Ausbeute: 14.25 g (72%)

9.3.40 Synthese von 3-Amino-6,7-dimethyl-1,4-dioxy-chinoxalin-2-carbonitril



10.0 g (61 mmol) **127** wurden unter Rühren in 20 ml DMF gelöst. Nach Zugabe von 4.2 g (1.06 eq., 65 mmol) Malodinitril ließ man die dunkelgelbe Reaktionsmischung noch 15 Minuten bei RT Rühren und tropfte dann über einen Zeitraum von 1 Stunde eine Lösung von 0.5 ml NEt_3 in 5 ml DMF dazu. Nach kurzer Reaktionszeit verfärbte sich die Lösung intensiv rot und trübte sich, wobei sich ein rot-orangefarbener Feststoff ausschied. Der Ansatz wurde noch über Nacht bei RT gerührt, der ausgefallene Feststoff abgesaugt und aus wenig DMF umkristallisiert. Es wurde ein orangefarbenes Pulver **129** erhalten.

Ausbeute: 8.50 g (61%)

DC: MeOH/AcOEt 1:15; $R_f = 0.28$

Schmelzpunkt : 252-253 °C (DMF)

Lit.: 253 °C^[82]

IR (KBr): 3361 (s), 3267 (s), 3131 (w), 2932 (w), 2241 (w), 1618 (s), 1581 (m), 1524 (m), 1497 (w), 1471 (w), 1445 (w), 1377 (w), 1351 (w), 1330 (s), 1220 (s), 1173 (w), 1115 (s), 1021 (w), 911 (w), 880 (w), 780 (w), 681 (w), 670 (w), 655 (w)

¹N-NMR: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

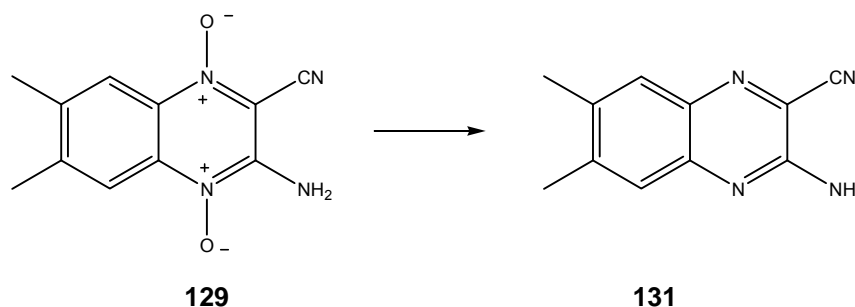
8.07 (s, 1H, H-C(5)), oder H-C(8)), 8.04 (s, 1H, H-C(8)), oder H-C(5)), 7.91 (s, 2H, NH_2 , austauschbar mit D_2O), 2.46 (s, 3H, CH_3 an C(6), oder C(7)), 2.41 (s, 3H, CH_3 an C(7) oder C(6))

Elementaranalyse: (%) für $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$ (230.22)

ber.: C 57.39 H 4.38 N 24.34

gef.: C 57.26 H 4.41 N 24.34

9.3.41 Synthese von 3-Amino-6,7-dimethyl-chinoxalin-2-carbonitril



5.0 g (21.7 mmol) **129** wurden in 50 ml MeOH suspendiert. Zu dieser orangefarbenen Suspension tropfte man langsam eine Lösung von 10.6 g (2.8 eq., 60.9 mmol) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ in 20 ml Wasser. Nach beendeter Zugabe war eine gelbe, noch leicht orangefarbene Suspension entstanden. Der ausgefallene Feststoff wurde abgesaugt, gründlich mit Wasser gewaschen und anschließend in Wasser suspendiert. Man filtrierte erneut und kristallisierte den Rückstand aus wenig DMF um. Das Produkt wurde in Form eines orangefarbenen Feststoffes **131** isoliert.

Anmerkung: Aufgrund der Schwerlöslichkeit der Verbindung konnte keine analysenreine Probe erhalten werden. Auch durch Umkristallisation konnte die Verbindung nicht aufgereinigt werden. Das ^1H -NMR-Spektrum zeigte, dass die Verbindung erhalten wurde, jedoch dass sie noch verunreinigt war. Daher wurde die Substanz in die nächste Stufe eingesetzt und dann vollständig charakterisiert. Hier wurde auf die Bestimmung der Ausbeute, des Dünnschichtchromatogramms, des Schmelzpunktes, sowie des IR-Spektrums und der Elementaranalyse verzichtet.

Ausbeute: nicht bestimmt (wurde auf der Folgestufe bestimmt).

DC: nicht bestimmt

Schmelzpunkt: nicht bestimmt

IR (KBr): nicht bestimmt

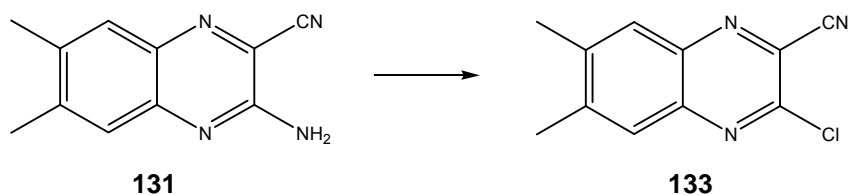
^1N -NMR: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

7.59 (br, s, 1H, H-C(5) oder H-C(8)), 7.39 (br, s, 1H, H-C(8) oder H-C(5)), 7.22 (br, s, 2H, NH_2 , austauschbar mit D_2O), 2.37 (s, 6H, 2- CH_3)

Elementaranalyse: (%) für $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_4$ (198.22)

ber.: C 66.65 H 5.08 N 28.26 es wurde keine Analyse erhalten!

9.3.42 Synthese von 3-Chlor-6,7-dimethyl-chinoxalin-2-carbonitril



Man überschichtete 4.5 g (22.7 mmol) **131** mit einer eisgekühlten Mischung aus 30 ml AcOH und 20 ml HCl (37%ige wässrige Lösung). Unter leichtem Rühren tropfte man zu dieser gelben Suspension eine Lösung von 4.69 g (3.0 eq., 68.1 mmol) NaNO₂ in 5 ml Wasser. Während der Zugabe war eine Gasentwicklung erkennbar. Nach beendeter Zugabe ließ man die blassgelbe Suspension noch 6 Stunden bei RT stehen. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, gründlich mit Wasser gewaschen und mehrmals aus wenig Ethanol umkristallisiert. Es wurden 3.80 g **133** in Form eines farblosen Feststoffes erhalten.

Ausbeute: 3.80 g (80%, bezogen auf **129**)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:8; R_f = 0.39

Schmelzpunkt: 167-168 °C (EtOH)

IR (KBr): 3422 (s), 2930 (m), 2375 (w), 2344 (w), 1774 (w), 1748 (w), 1716 (w), 1685 (w), 1680 (w), 1653 (w), 1617 (w), 1596 (w), 1544 (w), 1517 (w), 1481 (s), 1459 (m), 1434 (w), 1413 (w), 1381 (w), 1355 (m), 1292 (s), 1277 (w), 1245 (w), 1209 (m), 1161 (m), 1114 (m), 1088 (w), 1051 (s), 884 (m)

¹N-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, CDCl₃-d₁)

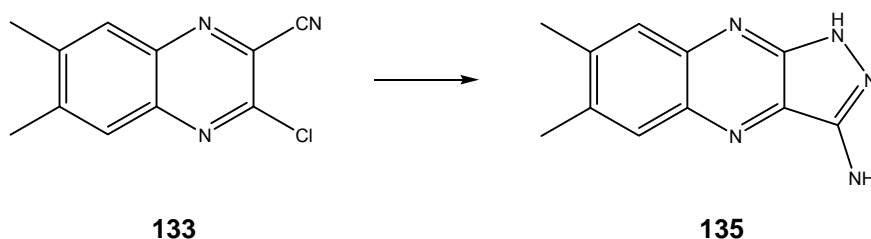
7.90 (s, 1H, H-C(5)), oder H-C(8)), 7.82 (s, 1H, H-C(8)), oder H-C(5)), 2.55-2.53 (Ψs, 6H, 2-CH₃)

Elementaranalyse: (%) für C₁₁H₈ClN₃ (217.65)

ber.: C 60.70 H 3.70 N 19.31

gef.: C 60.69 H 3.68 N 19.27

9.3.43 Synthese von 6,7-Dimethyl-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3-ylamin



In einem 500 ml Dreihalskolben mit Rückflusskühler wurden 2.50 g (11.5 mmol) **133** mit 50 ml (22.3 eq., 12.8 g; 256.4 mmol) einer Hydrazinhydratlösung (24-26 %) für 3 Stunden zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen filtrierte man von dem ausgefallenen Feststoff ab und wusch mit Wasser nach. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an 40 g Flashkieselgel (Eluent: n-Hexan/AcOEt 1:1) aufgereinigt. Anschließende Umkristallisation aus AcOEt/n-Hexan ergab das Produkt **135** in Form roter Kristalle.

Ausbeute: 1.75 g (71%)

DC: AcOEt/n-Hexan 2:1; $R_f = 0.44$

Schmelzpunkt: 298-299 °C (AcOEt:n-Hexan) Lit.: 297 °C^[83]

IR (KBr): 3326 (m), 3175 (s), 3054 (w), 2933 (w), 2843 (w), 2752 (w), 1646 (s), 1596 (m), 1556 (s), 1490 (m), 1470 (m), 1445 (w), 1415 (w), 1385 (w), 1370 (w), 1334 (s), 1269 (w), 1254 (w), 1214 (m), 1173 (w), 1153 (w), 1108 (s), 1022 (m), 1002 (m), 861 (s), 831 (s), 751 (m), 725 (w), 665 (w),

¹N-NMR: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

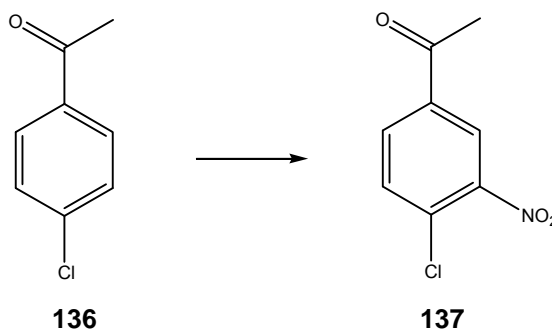
12.05 (s, 1H, NH-Pyrazol, austauschbar mit D₂O), 7.88 (s, 1H, H-C(5)), oder H-C(8)), 7.75 (s, 1H, H-C(8)), oder H-C(5)), 5.99 (s, br, 2H, NH₂, austauschbar mit D₂O), 2.47-2.46 (Ψ s, 6H, 2-CH₃)

Elementaranalyse: (%) für C₁₁H₁₁N₅ (213.24)

ber.: C 61.96 H 5.20 N 32.84

gef.: C 61.73 H 5.40 N 33.11

9.3.44 Synthese von 4-Chlor-3-nitro-acetophenon



3.0 g (19.4 mmol, 2.5 ml) **136** wurden in 50 ml konz. H_2SO_4 vorgelegt. Die gelbe, klare Lösung wurde mit Hilfe eines Eis/ NaCl -Kältebades auf $-4-0\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt. Der Ansatz wurde für 10 min. gerührt. Anschließend tropfte man über einen Zeitraum von 1 h eine Mischung aus 20 ml konz. H_2SO_4 und 20 ml Salpetersäure (65%ig) dazu. Der vorher intensiv gelb gefärbte Reaktionsansatz wurde im Laufe der Reaktion schwach orange. Nach beendeter Reaktion wurde der Ansatz vorsichtig auf 200 ml Eiswasser gegeben. Der ausgefallene blaugelbe Niederschlag wurde abgesaugt und aus EtOH umkristallisiert. Das Produkt **137** wurde in Form eines farblosen Pulvers erhalten.

Ausbeute: 3.36 g (87%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:8; $R_f = 0.23$

Schmelzpunkt: 96-97 $^\circ\text{C}$ (EtOH)

Lit.: 98-100 $^\circ\text{C}$ ^[84]

IR (KBr): 3364 (w), 3095 (w), 3032 (w), 2981 (w), 2866 (w), 1962 (w), 1687 (s), 1594 (s), 1573 (m), 1557 (m), 1526 (s), 1474 (m), 1453 (w), 1432 (w), 1386 (w), 1360 (m), 1344 (s), 1298 (m), 1277 (m), 1241 (s), 1148 (w), 1117 (w), 1086 (m), 1044 (s), 1023 (w), 961 (m), 889 (s), 837 (s), 780 (s), 754 (s), 702 (m), 666 (m), 640 (w), 614 (s), 572 (s)

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO-d_6)

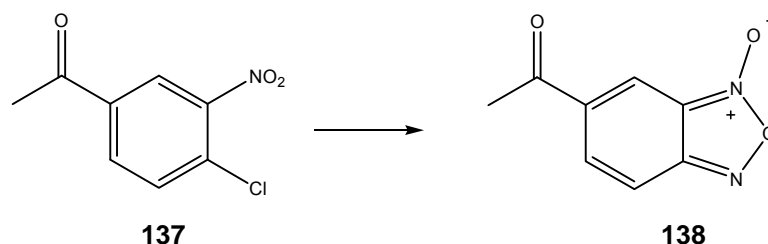
8.54 (d, $J = 2\text{ Hz}$, 1H, H-C(2)); 8.21 (dd, $J_1 = 8.25\text{ Hz}$, $J_2 = 2\text{ Hz}$, 1H, H-C(6)), 7.94 (d, $J = 8.25\text{ Hz}$, 1H, H-C(5)); 2.64 (s, 3H, CH_3)

Elementaranalyse: (%) für $\text{C}_8\text{H}_6\text{ClNO}_3$ (199.59)

ber.: C 48.14 H 3.03 N 7.02

gef.: C 47.97 H 3.09 N 6.85

9.3.45 Synthese von 1-(3-Oxy-benzo[1,2,5]oxadiazol-5-yl)-ethanon



In einem 500 ml Rundkolben wurden 50.0 g (250 mmol) **137** in 300 ml DMSO gelöst. Nach der Zugabe von 16.3 g (1eq. 250 mmol) NaN₃ verfärbte sich die Lösung orange-rötlich. Man ließ den Ansatz über Nacht bei RT rühren und gab die dunkelgelbe Lösung anschließend auf 500 ml Eiswasser. Der ausgefallene Niederschlag wurde abgesaugt und in Toluol gelöst. Das Filtrat wurde noch zweimal mit jeweils 100 ml Toluol extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und anschließend für 5 h zum Rückfluß erhitzt. Nach dem Erkalten wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der verbliebene gelbe Rückstand aus MeOH umkristallisiert. Produkt **138** kristallisierte in Form gelber Nadeln aus der Lösung aus.

Ausbeute: 40.61 g (91 %)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:4; R_f = 0.38

Schmelzpunkt: 91-92° C (MeOH)

Lit.: 90-91°C^[85]

IR (KBr): 3327 (w), 3083 (w), 2745 (w), 1976 (w), 1812 (w), 1754 (w), 1675 (s), 1611 (s), 1585 (s), 1532 (s), 1479 (s), 1458 (w), 1415 (m), 1394 (m), 1352 (s), 1273 (s), 1241 (s), 1220 (w), 1178 (w), 1156 (m), 1135 (m), 1045 (w), 1014 (s), 950 (m), 924 (w), 881 (m), 850 (w), 829 (s), 770 (w), 744 (m), 696 (m), 659 (m), 633 (m), 595 (s)

¹N-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆)

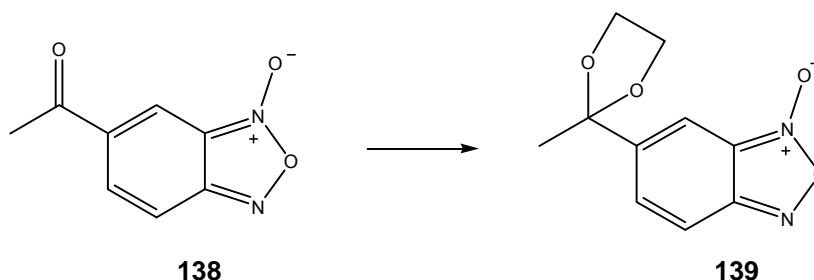
8.35 (s, br, 1H, H-C(4)), 7.79 (s, br, 2H, H-C(6) und H-C(7)), 2.64 (s, 3H, CH₃)

Elementaranalyse: (%) für C₈H₆N₂O₃ (178.14)

ber.: C 53.94 H 3.39 N 15.73

gef.: C 53.97 H 3.48 N 15.81

9.3.46 Synthese von 5-(2-Methyl-[1,3]dioxolan-2-yl)benzo[1,2,5]oxadiazol-3-oxid



30.0 g (168 mmol) **138** wurden in 300 ml Toluol gelöst. Nach Zugabe von 18.8 ml (2.0 eq., 20.9 g, 337 mmol) 1,2-Ethandiol und 200 mg (1.2 mmol) p-Toluolsulfonsäure wurde das hellgelbe Reaktionsgemisch für 3 h am Wasserabscheider zum Sieden erhitzt. Nach beendeter Reaktion trennte man die Phasen, trocknete die organische Phase über MgSO_4 und entfernte das Lösungsmittel im Vakuum. Der verbliebene Rückstand wurde aus EtOH umkristallisiert. Es wurden gelbe Kristalle von **139** erhalten.

Ausbeute: 34.13 g (91%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:4; $R_f = 0.36$

Schmelzpunkt: 79-80 °C (EtOH)

Lit.: 80-81 °C^[85]

IR (KBr): 3079 (m), 3026 (w), 2074 (m), 2901 (m), 2702 (w), 2042 (w), 1953 (w), 1906 (w), 1848 (w), 1791 (w), 1765 (w), 1691 (w), 1618 (s), 1592 (s), 1529 (s), 1482 (s), 1440 (m), 1377 (m), 1351 (w), 1304 (w), 1272 (w), 1199 (s), 1147 (m), 1115 (m), 1053 (m), 1026 (s), 1011 (s), 979 (w), 953 (m), 932 (w), 875 (s), 838 (w), 817 (s), 775 (m), 744 (w), 681 (w), 660 (w), 628 (s), 566 (s)

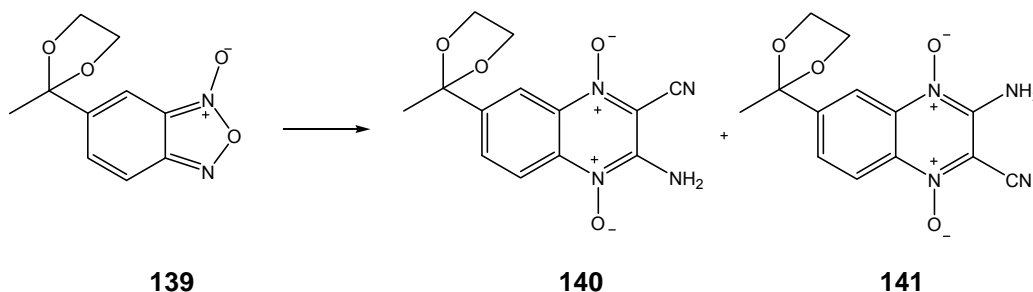
¹H-NMR: (δ [ppm], 250 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$)

7.56-7.38 (m, 3H, aromatische H-Atome, H-C(4); H-C(6) und H-C(7)); 4.14-4.01 (m, 2H, CH_2) und 3.87-3.74 (m, 2H, CH_2); 1.63 (s, 3H, CH_3)

Elementaranalyse: (%) für $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4$ (222.2)

ber.: C 54.05 H 4.54 N 12.61

gef.: C 54.25 H 4.65 N 12.66

9.3.47 Synthese von 3-Amino-7-(2-methyl-[1,3]dioxolan-2-yl)-1,4-dioxy-chinoxalin-2-carbonitril, und 3-Amino-6-(2-methyl-[1,3]dioxolan-2-yl)-1,4-dioxy-chinoxalin-2-carbonitril

40.0 g (180 mmol) **139** wurden unter leichtem Erwärmen in 50 ml DMF gelöst. Nach dem Erkalten auf RT gab man 12.60 g (1.06 eq., 191 mmol) Malodinitril dazu und ließ die dunkelgelbe Reaktionsmischung noch 10 Minuten rühren, bevor man über einen Zeitraum von 1 h eine Lösung von 1.0 ml NEt₃ in 5 ml DMF dazutropfte. Nach kurzer Zeit verfärbte sich die Lösung intensiv rot. Nach etwa einer Stunde Reaktionszeit begann sich die Lösung zu trüben, und ein rot-orangefarbener Feststoff schied sich aus der Lösung aus. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei RT gerührt, anschließend saugte man den ausgefallenen Niederschlag ab, engte die Mutterlauge auf die Hälfte des Volumens ein und ließ erneut stehen. Aus der Mutterlauge kristallisierten über Nacht im Kühlschrank nochmals 5.21 g der beiden Regioisomeren **140** und **141** in Form roter Kristalle aus. Die Regioisomere wurden auf dieser Stufe nicht voneinander getrennt.

Ausbeute: 43.24 g (83%)

DC: MeOH/AcOEt 1:20; R_f = 0.18

Schmelzpunkt: (von beiden Isomeren, Mischschmelzpunkt): 253-255 °C

IR (KBr): 3327 (s), 3274 (w), 3168 (w), 3105 (w), 2988 (w), 2893 (w), 2227 (m), 1638 (s), 1611 (s), 1585 (m), 1537 (m), 1511 (w), 1490 (w), 1458 (w), 1410 (m), 1373 (s), 1331 (s), 1273 (w), 1230 (s), 1204 (s), 1146 (s), 1109 (s), 1067 (m), 1030 (s), 950 (w), 876 (w), 860 (w), 837 (w), 737 (w), 679 (w), 636 (w), 615 (w), 568 (w)

¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆)

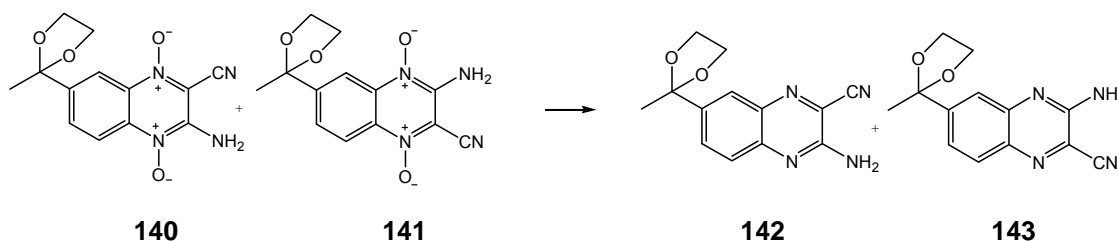
8.29 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H-C(5)), und H-C(8)), 8.23 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H-C(8)), und H-C(5)), 8.09 (s, br, 2H, NH₂, austauschbar mit D₂O), 7.94 (dd, J₁ = 8.9 Hz, J₂ = 1.8 Hz, 1H, H-C(6)) und H-C(7)), 4.12-3.98 (m, 2H, CH₂), 3.79-3.66 (m, 2H, CH₂), 1.62 (s, 3H, CH₃)

Elementaranalyse: (%) für C₁₃H₁₂N₄O₄ (288.26)

ber.: C 54.17 H 4.20 N 19.44

gef.: C 53.97 H 4.26 N 19.51

9.3.48 Synthese von 3-Amino-7-(2-methyl-[1,3]dioxolan-2-yl)chinoxalin-2-carbonitril und 3-Amino-6-(2-methyl-[1,3]dioxolan-2-yl)chinoxalin-2-carbonitril



30.0 g (104 mmol) der beiden Regioisomeren **140** und **141** wurden in 500 ml MeOH suspendiert. Die orangefarbene Suspension wurde für 30 Minuten bei RT gerührt. Innerhalb von 2 Stunden tropfte man eine Lösung von 59.7 g (2.8 eq., 291 mmol) Na₂S₂O₄ (85 %ig) in 100 ml Wasser dazu. Nach beendeter Zugabe ließ man die intensiv gelb gefärbte Suspension noch 2 Stunden bei RT Rühren, filtrierte den ausgefallenen Feststoff ab und suspendierte das Rohprodukt dann in 500 ml Wasser. Es wurde erneut abgesaugt und das Produktgemisch an 200 g Flashkieselgel (Eluent: AcOEt/n-Hexan 2:1) säulenchromatographisch aufgereinigt. Nach dem Chromatographieren wurden 14.04 g noch leicht verunreinigtes Gemisch **142** und **143** erhalten. 6.50 g der beiden Regioisomeren konnten mittels HPLC (an Normalphase, Eluent: AcOEt/n-Hexan/CH₂Cl₂ 2:1:3) voneinander getrennt werden. Es wurden so 1.32 g von Verbindung **142** und 3.24 g von Verbindung **143** erhalten. Beide Verbindungen wurden als intensiv gelb gefärbte Kristalle gewonnen.

Charakterisierung der Verbindungen 142 und 143

3-Amino-7-(2-methyl-[1,3]-dioxolan-2-yl)-chinoxalin-2-carbonitril 142

Ausbeute: 1.32 g (5 %)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:2; $R_f = 0.21$

Schmelzpunkt: 221-222 °C (EtOH)

IR (KBr): 3393 (s), 3330 (w), 3152 (w), 2984 (w), 2890 (w), 2744 (w), 2231 (m), 1665 (s), 1639 (w), 1618 (w), 1555 (s), 1497 (w), 1466 (w), 1424 (w), 1377 (m), 1356 (m), 1309 (w), 1236 (w), 1204 (s), 1183 (s), 1162 (s), 1136 (w), 1100 (w), 1032 (s), 943 (w), 901 (w), 875 (w), 859 (w), 838 (s), 754 (w), 717 (w), 655 (w), 634 (w), 618 (w), 581 (w)

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

7.80 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, H-C(8)), 7.76 (dd, $J_1 = 8.7$, $J_2 = 2.0$ Hz, 1H, H-C(6)), 7.59 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-C(5)), 7.44 (s, br, 2H, NH_2 , austauschbar mit D_2O), 4.09-3.95 (m, 2H, CH_2), 3.81-3.68 (m, 2H, CH_2), 1.62 (s, 3H, CH_3)

Elementaranalyse: (%) für $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2$ (256.26)

ber.: C 60.93 H 4.72 N 21.86

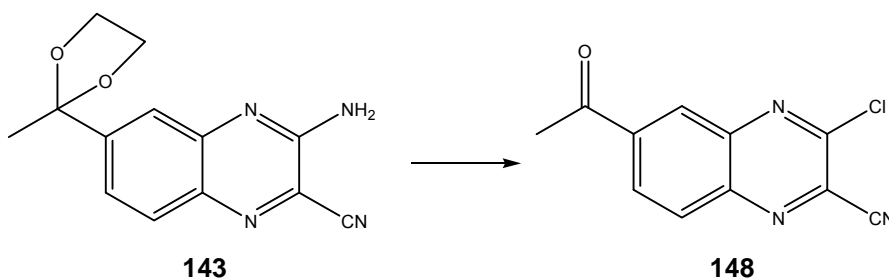
gef.: C 60.80 H 4.77 N 22.11

3-Amino-6-(2-methyl-[1,3]-dioxolan-2-yl)-chinoxalin-2-carbonitril 143**Ausbeute:** 3.24 g (12%)**DC:** AcOEt/n-Hexan 1:2; $R_f = 0.20$ **Schmelzpunkt:** 223-225 °C (EtOH)**IR (KBr):** 3393 (s), 3330 (m), 3141 (s), 2981 (w), 2890 (w), 2754 (w), 2241 (m), 1686 (w), 1654 (s), 1613 (m), 1560 (s), 1497 (w), 1429 (s), 1361 (s), 1299 (w), 1251 (w), 1199 (s), 1173 (w), 1147 (w), 1130 (w), 1105 (w), 1063 (w), 1037 (s), 948 (m), 875 (m), 827 (m), 786 (w), 738 (w), 686 (w), 665 (w), 634 (w), 618 (w) **$^1\text{H-NMR}$:** (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)7.84 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-C(8)), 7.56 (d, $J = 1.8$, H-C(5)), 7.50 dd, $J_1 = 8.7$ Hz, $J_2 = 1.8$ Hz, 1H, H-C(7)), 7.45 (s, br, 2H, NH_2 , tauscht mit D_2O aus), 4.10-3.96 (m, 2H, CH_2), 3.80-3.67 (m, 2H, CH_2), 1.62 (s, 3H, CH_3) **$^{13}\text{C-NMR}$:** (δ [ppm], 62.90 MHz, DMSO- d_6)153.62 (C(3))- NH_2 , 148.45 (C(4a)), 142.60 (C(6)), 135.48 (C(8a)), 129.19 (C(7)), 123.17 (C(8)), 121.45 (C(5)), 119.38 (C(2))-CN, 115.15 (CN) 107.67 (quartäres Ketal-C-Atom), 64.27 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$, fallen im Spektrum zusammen), 26.80 (CH_3),**Elementaranalyse: (%) für $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2$ (256.26)**

ber.: C 60.93 H 4.72 N 21.86

gef.: C 60.73 H 4.79 N 22.13

9.3.49 Synthese von 6-Acetyl-3-chlor-chinoxalin-2-carbonitril



500 mg (1.9 mmol) der Verbindung **143** wurden mit einer eisgekühlten Mischung aus 3 ml Eisessig und 2.0 ml konz. HCl überschichtet. Unter Rühren tropfte man langsam eine Lösung von 0.40 g NaNO₂ (3.0 eq., 5.9 mmol) in 3.0 ml Wasser dazu. Nach beendeter Zugabe ließ man die gelbe Reaktionsmischung noch 3 Stunden bei RT stehen und filtrierte den ausgefallenen Feststoff ab. Es wurde gründlich mit Wasser gewaschen und das Rohprodukt dann aus wenig EtOH umkristallisiert. Es konnten so 380 mg eines farblosen Feststoffes **148** erhalten werden.

Ausbeute: 380 mg (84%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:8; R_f = 0.15

Schmelzpunkt: 177-178 °C

IR (KBr): 3064 (w), 2249 (w), 2018 (w), 1682 (s), 1616 (w), 1556 (w), 1521 (w), 1420 (w), 1365 (m), 1344 (m), 1284 (m), 1268 (m), 1259 (w), 1234 (m), 1168 (s), 1128 (m), 1073 (w), 1048 (s), 957 (w), 937 (w), 917 (w), 856 (s), 811 (w), 720 (w)

¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆)

8.86 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H-C(5)), 8.47 (dd, J₁ = 8.8 Hz, J₂ = 1.9 Hz, 1H, H-C(7)), 8.24 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H-C(8)), 2.79 (s, 3H, CH₃)

Elementaranalyse: (%) für C₁₁H₆ClN₃O (231.64)

ber.: C 57.04 H 2.61 N 18.14

gef.: C 57.06 H 2.79 N 18.29

Kristallstruktur von 6-Acetyl-3-chlor-chinoxalin-2-carbonitril 148

Die Kristallisation erfolgte aus Ethanol

Kristallsystem: monoklin; Raumgruppe P 21/c; Elementarzelle: $a = 3.906 (3) \text{ \AA}$, $b = 12.139 (9) \text{ \AA}$, $c = 21.698 (12) \text{ \AA}$; $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90.354 (17)^\circ$, $\gamma = 90^\circ$; $V = 1028.8 (13) \text{ \AA}^3$; $Z = 4$, $\rho_{\text{ber}} = 1.496 \text{ Mg/m}^3$; Siemens Smart Diffraktometer; Absorptionskoeffizient $\mu = 0.350 \text{ mm}^{-1}$; Wellenlänge = 0.71073 \AA ; $T = 162 (2) \text{ K}$; Reflexe gemessen: 5313, davon 1423 unabhängige, keine Absorptionskorrektur; ($R_{\text{int}} = 0.268$); $R = 0.1807$, $R_w = 0.2048$; goodness of fit = 1.107; Theta Bereich für Datenerfassung: 1.88 bis 22.99° ; Restelektronendichte: zwischen -0.37 und $+0.43 \text{ e / \AA}^3$. Zur Strukturklärung wurde ein farbloser, nadelförmiger Kristall der Dimension $0.02 \text{ mm} \cdot 0.10 \text{ mm} \cdot 1.6 \text{ mm}$ bei einer Temperatur von -111° C vermessen. Es wurde keine Absorptionskorrektur vorgenommen. Gleiche Reflexe wurden gemittelt. $R(I)$ intern = 0.268. Die Struktur wurde mit direkten Methoden mit Hilfe des Programms SHELXS bestimmt. Die genau definierte Anzahl der Wasserstoffatome wurde in geometrischer Weise angeordnet. Die „Nicht-Wasserstoffatome“ wurden mit anisotropen Temperaturparametern verfeinert. Zur Strukturklärung wurde das Programm SHELXL-97 verwendet.

Diskussion der Struktur:

Die Chinoxalingruppe ist nahezu völlig planar. (maximale Abweichung aus der Ebene: 0.007 \AA . Der Winkel zwischen den Ebenen der Chinoxalingruppe und der Ketogruppe beträgt 5.1° . Die „Chinoxalingruppen“ sind entlang der a-Richtung gestapelt. Die kürzesten C (pi)...C (pi) Abstände innerhalb des Stapels betragen 3.49 , 3.49 und 3.56 \AA . Die Kristallpackung weist sowohl zwei intermolekulare C-H...N (Nitril), als auch zwei intermolekulare C-H...Cl-Wechselwirkungen auf.

Tabelle 25: Torsionswinkel [°] von Verbindung 148

Atome	Torsionswinkel [°]	Atome	Torsionswinkel [°]
C(8)-C(7)-C(6)-C(5)	0.8 (9)	C(10)-C(6)-C(5)-C(4)	177.3 (6)
C(8)-C(7)-C(6)-C(10)	-177.4 (5)	C(8)-N(1)-C(1)-C(2)	-1.3 (9)
C(1)-N(1)-C(8)-C(7)	-179.9 (6)	C(8)-N(1)-C(1)-Cl(1)	178.0 (4)
C(1)-N(1)-C(8)-C(3)	1.6 (8)	C(7)-C(6)-C(10)-O(1)	174.4 (6)
C(6)-C(7)-C(8)-N(1)	-179.0 (6)	C(5)-C(6)-C(10)-O(1)	-3.8 (9)
C(6)-C(7)-C(8)-C(3)	-0.5 (8)	C(7)-C(6)-C(10)-C(11)	-6.7 (9)
C(2)-N(2)-C(3)-C(8)	2.0 (8)	C(5)-C(6)-C(10)-C(11)	175.1 (6)
C(2)-N(2)-C(3)-C(4)	-178.9 (6)	C(3)-N(2)-C(2)-C(9)	179.1 (6)
N(1)-C(8)-C(3)-N(2)	-2.1 (9)	C(3)-N(2)-C(2)-C(1)	-1.7 (9)
C(7)-C(8)-C(3)-N(2)	179.4 (5)	N(3)-C(9)-C(2)-N(2)	-157 (16)
N(1)-C(8)-C(3)-C(4)	178.9 (5)	N(3)-C(9)-C(2)-C(1)	23 (16)
C(7)-C(8)-C(3)-C(4)	0.4 (8)	N(1)-C(1)-C(2)-N(2)	1.5 (10)
N(2)-C(3)-C(4)-C(5)	-179.6 (6)	Cl(1)-C(1)-C(2)-N(2)	-177.9 (5)
C(8)-C(3)-C(4)-C(5)	-0.6 (9)	N(1)-C(1)-C(2)-C(9)	-179.4 (6)
C(3)-C(4)-C(5)-C(6)	0.9 (9)	Cl(1)-C(1)-C(2)-C(9)	1.3 (8)
C(7)-C(6)-C(5)-C(4)	-1.0 (9)		

Tabelle 26: Bindungslängen [Å] der Verbindung 148

Atome	Bindungslängen [Å]	Atome	Bindungslängen [Å]
Cl(1)-C(1)	1.751 (7)	C(8)-C(3)	1.442 (9)
N(1)-C(1)	1.299 (8)	O(1)-C(10)	1.202 (7)
N(1)-C(8)	1.373 (8)	C(9)-N(3)	1.149 (8)
N(2)-C(2)	1.301 (8)	C(9)-C(2)	1.440 (10)
N(2)-C(3)	1.373 (8)	C(3)-C(4)	1.445 (9)
C(7)-C(6)	1.395 (8)	C(4)-C(5)	1.369 (9)
C(7)-C(8)	1.416 (9)	C(1)-C(2)	1.446 (10)
C(6)-C(5)	1.412 (9)	C(10)-C(11)	1.525 (10)
C(6)-C(10)	1.517 (9)		

Tabelle 27: Bindungswinkel [°] von Verbindung 148

Atome	Bindungswinkel [°]	Atome	Bindungswinkel [°]
C(1)-N(1)-C(8)	116.5 (6)	C(8)-C(3)-C(4)	118.7 (6)
C(2)-N(2)-C(3)	116.3 (5)	C(5)-C(4)-C(3)	119.5 (6)
C(6)-C(7)-C(8)	119.9 (6)	C(4)-C(5)-C(6)	122.0 (6)
C(7)-C(6)-C(5)	120.1 (6)	N(1)-C(1)-C(2)	123.4 (6)
C(7)-C(6)-C(10)	122.4 (6)	N(1)-C(1)-Cl(1)	118.7 (5)
C(5)-C(6)-C(10)	117.5 (6)	C(2)-C(1)-Cl(1)	117.9 (6)
N(1)-C(8)-C(7)	120.1 (6)	O(1)-C(10)-C(6)	120.8 (6)
N(1)-C(8)-C(3)	120.1 (6)	O(1)-C(10)-C(11)	120.3 (6)
C(7)-C(8)-C(3)	119.8 (6)	C(6)-C(10)-C(11)	118.9 (6)
N(3)-C(9)-C(2)	177.4 (8)	N(2)-C(2)-C(9)	118.1 (6)
N(2)-C(3)-C(8)	121.6 (6)	N(2)-C(2)-C(1)	122.0 (6)
N(2)-C(3)-C(4)	119.7 (6)	C(9)-C(2)-C(1)	119.9 (6)

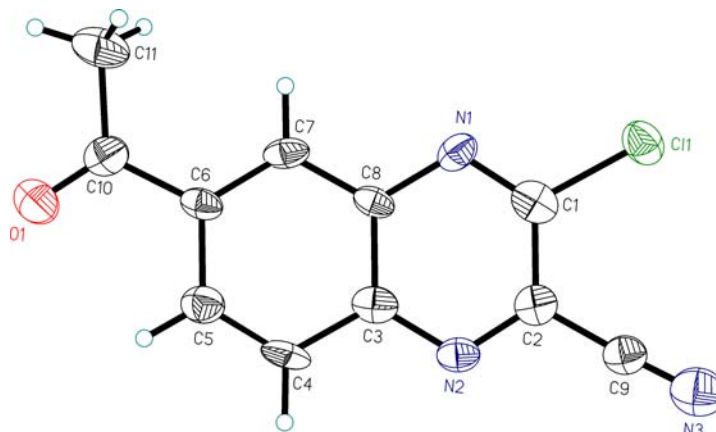


Abbildung 79: Kristallstruktur von Verbindung 148

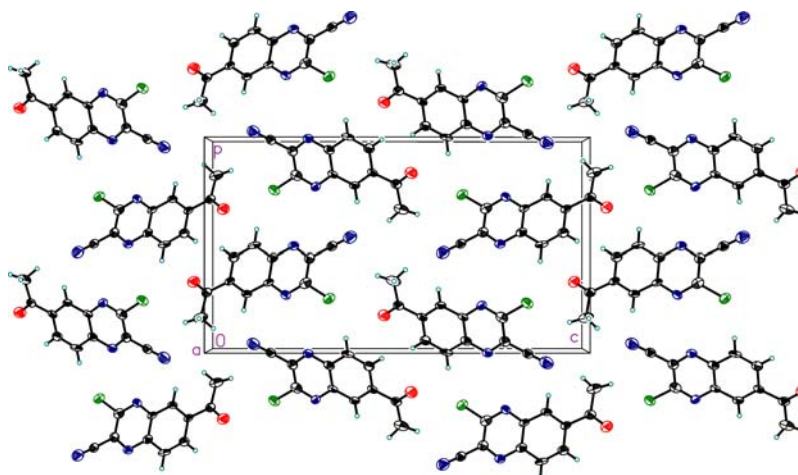


Abbildung 80: Elementarzelle von 148 mit Z = 4

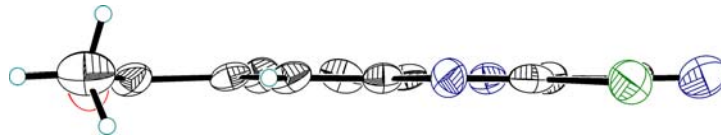


Abbildung 81: Verbindung 148 in der Ebene

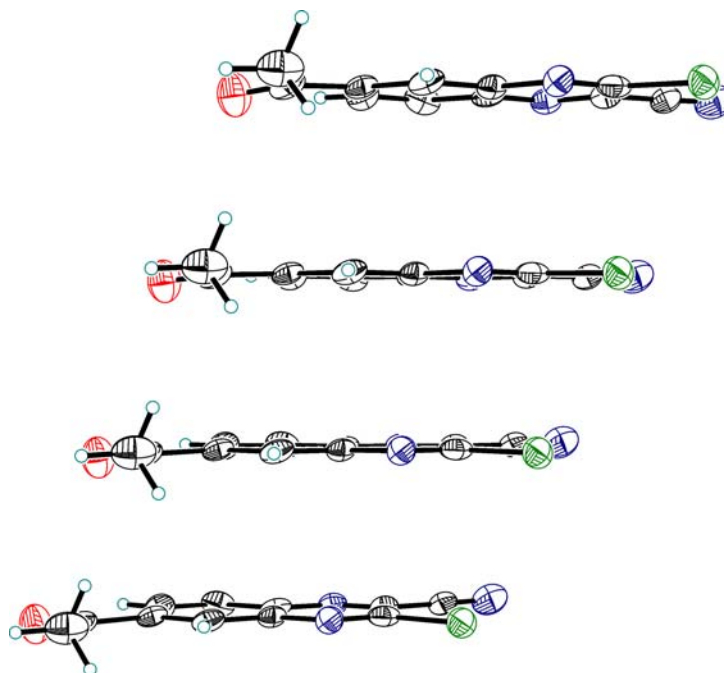
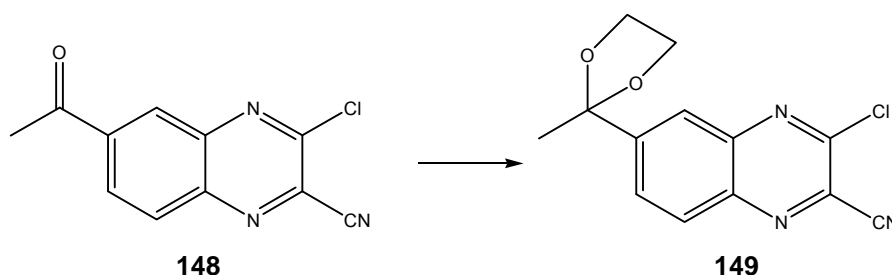


Abbildung 82: Stapelanordnung von 148 in a-Richtung

9.3.50 Synthese von 3-Chlor-6-(2-methyl-[1,3]-dioxolan-2-yl)-chinoxalin-2-carbonitril

1.0 g (4.3 mmol) **148** wurden in 50 ml Toluol vorgelegt. Nach der Zugabe von 2.4 ml (10.0 eq., 2.7 g, 43.2 mmol) Ethylenglycol und einer katalytischen Menge p-Toluolsulfonsäure erhitze man die leicht gelbliche Reaktionslösung für 5 Stunden am Wasserabscheider zum Sieden. Nach beendeter Reaktion ließ man den Ansatz auf RT abkühlen, überführte das zweiphasige Reaktionsgemisch dann in einen Scheidetrichter und trennte die Toluolphase ab. Die Glycol-Phase wurde dreimal mit jeweils 50 ml Toluol extrahiert. Die vereinigten Toluolphasen wurden zweimal mit wenig Wasser gewaschen und dann über MgSO₄ getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum verblieb ein leicht gelber Rückstand, der zur weiteren Aufreinigung dann aus EtOH umkristallisiert wurde. Es konnten so 1.15 g **149** isoliert werden.

Ausbeute: 1.15 g (92 %)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:10; R_f = 0.10

Schmelzpunkt: 105-106 °C

IR (KBr): 2981 (w), 2887 (w), 1718 (w), 1656 (w), 1619 (w), 1552 (w), 1521 (w), 1490 (w), 1474 (w), 1422 (m), 1371 (m), 1350 (m), 1283 (w), 1267 (m), 1220 (m), 1200 (s), 1169 (s), 1132 (m), 1111 (w), 1044 (s), 1023 (s), 940 (m), 909 (m), 873 (s), 837 (m), 801 (w), 754 (w), 718 (w), 671 (w), 645 (w), 614 (w)

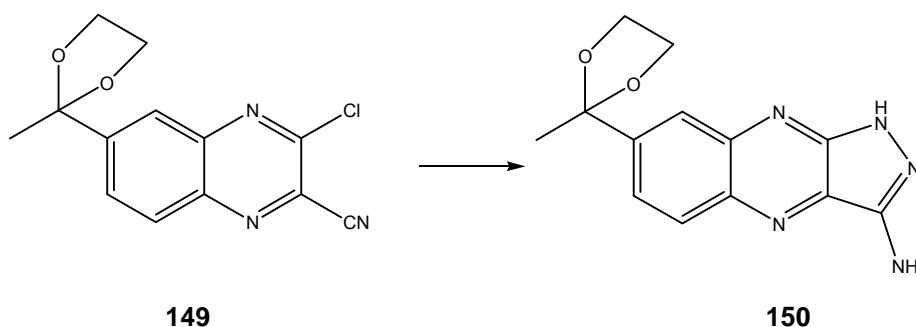
¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆)

8.19-8.15 (m, 2H, H-C(5) und H-C(8)), 8.12 (dd, J₁ = 8.7 Hz, J₂ = 1.8 Hz, H-C(7)), 4.15-4.01 (m, 2H, CH₂) 3.84-3.71 (m, 2H, CH₂), 1.69 (s, 3H, CH₃)

Elementaranalyse: (%) für C₁₃H₁₀ClN₃O₂ (275.69)

ber.: C 56.64 H 3.66 N 15.24

gef.: C 56.69 H 3.78 N 15.44

9.3.51 Synthese 7-(2-Methyl-(1,3)-dioxolan-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-b]quin-oxalin-3-amin

500 mg (1.81 mmol) von **149** wurden in 5.0 ml (14.0 eq., 25.6 mmol, 1.3 g) einer wässrigen Hydrazinhydratlösung (24-26%ig) zum Sieden erhitzt. Dabei schied sich aus der Lösung ein roter Feststoff aus. Man ließ auf RT abkühlen und filtrierte das ausgefallene Produkt ab. Es wurde zunächst mit Wasser, anschließend mit wenig AcOEt nachgewaschen. Das Produkt wurde aus wenig AcOEt/n-Hexan umkristallisiert. Es konnten so 360 mg eines intensiv rot gefärbten Feststoffes **150** erhalten werden.

Ausbeute: 360 mg (71%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:1; $R_f = 0.11$

Schmelzpunkt: 243-245 °C (AcOEt:n-Hexan)

IR (KBr): 3410 (m), 3329 (m), 3197 (m), 3054 (w), 2983 (w), 2881 (w), 1632 (s), 1591 (m), 1561 (s), 1505 (w), 1474 (w), 1444 (m), 1398 (w), 1368 (w), 1327 (m), 1261 (w), 1225 (w), 1190 (s), 1164 (m), 1113 (s), 1032 (s), 945 (w), 874 (w), 859 (w), 828 (s), 803 (w), 737 (w), 696 (w)

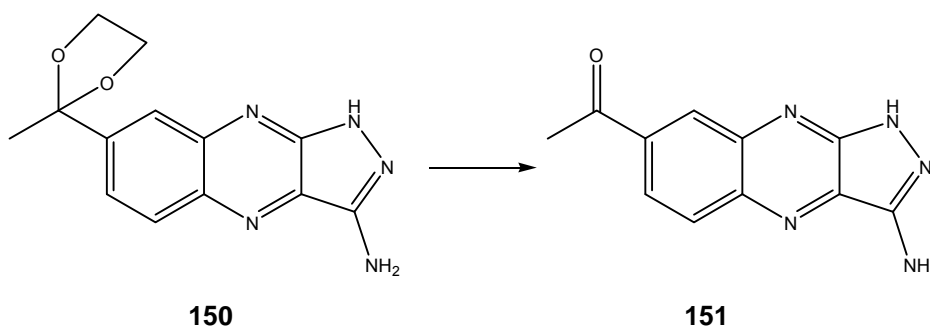
$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

12.23 (s, br, 1H, NH, austauschbar mit D_2O), 8.12 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-C(8)), 7.99 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-C(5)), 7.83 (dd, $J_1 = 8.9$ Hz, $J_2 = 1.9$ Hz, 1H, H-C(6)), 6.12 (s, br, 2H, NH_2 , austauschbar mit D_2O), 4.13-3.99 (m, 2H, CH_2), 3.85-3.72 (m, 2H, CH_2), 1.69 (s, 3H, CH_3)

Elementaranalyse: (%) für $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_2$ (271.27)

ber.: C 57.56 H 4.83 N 25.82

gef.: C 57.33 H 4.92 N 25.97

9.3.52 Synthese von 1-(3-Amino-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-7-yl)-ethanon

200 mg (0.73 mmol) der geschützten Verbindung **150** wurden in 30 ml Aceton gelöst. Nach der Zugabe von 0.5 ml konz. HCl verfärbte sich die anfangs rote Lösung bräunlich. Man erhitzte das Gemisch daraufhin eine Stunde zum Rückfluß. Nach dem Erkalten entfernte man das Lösungsmittel im Vakuum und reinigte das Produkt **151** durch Chromatographie (Eluent: AcOEt/n-Hexan 1:1).

Ausbeute: 120 mg (72%)

DC: AcOEt/n-Hexan 3:1; $R_f = 0.47$

Schmelzpunkt: Zersetzung ab 310 °C

IR (KBr): 3382 (s), 3319 (s), 3236 (s), 3183 (s), 2932 (w), 1681 (s), 1649 (s), 1623 (s), 1586 (s), 1565 (s), 1508 (w), 1445 (w), 1424 (w), 1403 (w), 1361 (w), 1330 (m), 1304 (w), 1246 (m), 1189 (m), 1152 (m), 1115 (s), 1058 (w), 833 (m), 613 (w), 597 (w)

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

12.48 (s, br, 1H, Pyrazol-Ring-NH, austauschbar mit D_2O), 8.76 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-C(8)), 8.24 (dd, $J_1 = 9.0$ Hz, $J_2 = 2.0$ Hz, 1H, H-C(6)), 8.03 (d, $J = 9$ Hz, 1H, H-C(5)), 6.30 (s, br, NH_2 , austauschbar mit D_2O), 2.75 (s, 3H, CH_3)

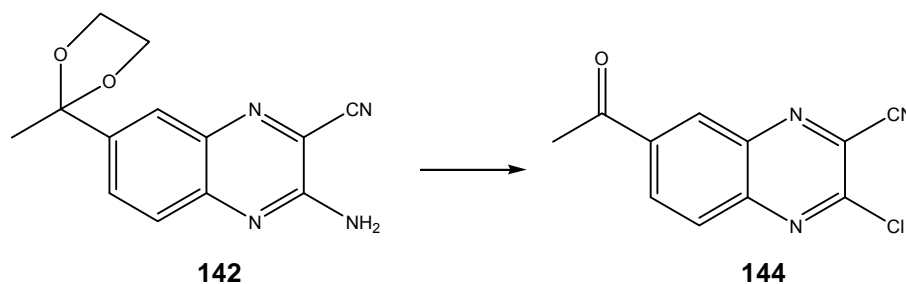
Elementaranalyse: (%) für $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N}_5\text{O}$ (227.22)

ber.: C 58.14 H 3.99 N 30.82

gef.: C 56.24 H 4.04 N 30.27

MS (ESI $^+$): 227.9 ($\text{M}+\text{H}^+$) (227.08 berechnet)

9.3.53 Synthese von 7-Acetyl-3-chlor-chinoxalin-2-carbonitril



1.0 g (3.9 mmol) **142** wurden unter Eisbadkühlung in einem 100 ml Rundkolben mit einer eisgekühlten Mischung aus 5.0 ml Eisessig und 5.0 ml konz. Salzsäure überschichtet. Unter Rühren tropfte man nun langsam eine Lösung von 0.80 g (3.0 eq., 11.7 mmol) NaNO_2 in 3.0 ml Wasser dazu. Nach beendeter Zugabe ließ man die Mischung noch eine Stunde im Eisbad Rühren, entfernte dann das Kältebad und ließ die hellgelbe Reaktionslösung über einen Zeitraum von 4 Stunden auf RT auftauen. Der ausgefallene Niederschlag wurde abfiltriert, gründlich mit Wasser gewaschen und aus wenig EtOH umkristallisiert. Es wurden 730 mg eines schwach gelben Feststoffes **144** erhalten.

Ausbeute: 730 mg (81%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:5; $R_f = 0.33$

Schmelzpunkt: 185-186 °C (EtOH)

IR (KBr): 3068 (w), 2922 (w), 2818 (w), 2241 (w), 1992 (w), 1681 (s), 1652 (w), 1613 (w), 1560 (w), 1518 (w), 1421 (w), 1361 (m), 1346 (m), 1283 (m), 1267 (m), 1236 (m), 1168 (s), 1131 (w), 1068 (w), 1047 (s), 913 (w), 906 (w), 864 (m), 812 (w), 775 (w), 712 (w), 681 (w), 639 (w), 613 (w), 587 (w)

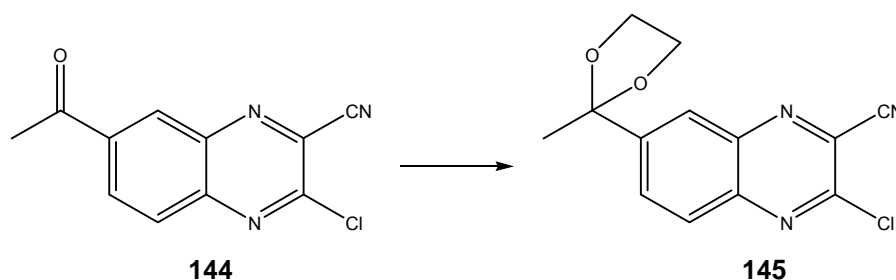
$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

8.86 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, H-C(8)), 8.47 (dd, $J_1 = 8.8$ Hz, $J_2 = 1.9$ Hz, 1H, H-C(6)), 8.24 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-C(5)), 2.79 (s, 3H, CH_3)

Elementaranalyse: (%) für $\text{C}_{11}\text{H}_6\text{ClN}_3\text{O}$ (231.64)

ber.: C 57.04 H 2.61 N 18.14

gef.: C 56.78 H 2.79 N 18.16

9.3.54 Synthese von 3-Chlor-7-(2-methyl-[1,3]dioxolan-2-yl)-chinoxalin-2-carbonitril

1.0 g (4.3 mmol) **144** wurden in 50 ml Toluol suspendiert. Nach Zugabe von 2.4 ml (10.0 eq., 2.7 g, 43.2 mmol) Ethylenglycol und wenig p-TsOH, erhitze man das Reaktionsgemisch für 5 Stunden am Wasserabscheider zum Rückfluß. Nach beendeter Reaktion ließ man das zweiphasige Reaktionsgemisch auf RT abkühlen, überführte es dann in einen Scheidetrichter und trennte die Toluolphase ab. Die organische Phase wurde mehrmals mit wenig Wasser gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum verblieb das Rohprodukt **145** in Form eines leicht gelblichen Feststoffes. Zur Aufreinigung wurde **145** aus wenig EtOH umkristallisiert. Es wurde ein schwach gelbes, kristallines Pulver erhalten.

Ausbeute: 848 mg (71%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:5; $R_f = 0.4$

Schmelzpunkt: 107-108 °C (EtOH)

IR (KBr): 2981 (m), 2898 (m), 2224 (w), 1811 (w), 1718 (w), 1682 (w), 1656 (w), 1619 (w), 1562 (w), 1521 (w), 1490 (w), 1474 (w), 1428 (m), 1376 (m), 1345 (m), 1283 (m), 1267 (m), 1220 (s), 1205 (s), 1169 (s), 1137 (s), 1106 (w), 1044 (s), 1023 (s), 946 (m), 909 (m), 873 (s), 837 (s), 801 (w), 754 (w), 718 (w), 666 (w), 645 (w), 609 (w)

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO-d_6)

8.17-8.10 (m, 3H, aromatische H-Atome), 4.14-4.01 (m, 2H, CH_2), 3.84-3.71 (m, 2H, CH_2), 1.69 (s, 3H, CH_3)

Elementaranalyse: (%) für $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{ClN}_3\text{O}_2$ (275.69)

ber.: C 56.64 H 3.66 N 15.24

gef.: C 56.62 H 3.76 N 15.48

Kristallstruktur von Verbindung 145

Die Kristallisation erfolgte aus Ethanol

Kristallsystem: monoklin; Raumgruppe P 21/n; Elementarzelle: $a = 11.714 (3) \text{ \AA}$, $b = 7.2305 (13) \text{ \AA}$, $c = 30.164 (7) \text{ \AA}$; $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 100.199^\circ$, $\gamma = 90^\circ$; $V = 2512.9 (10) \text{ \AA}^3$; $Z = 8$, $\rho_{\text{ber}} = 1.457 \text{ Mg / m}^3$; Siemens Smart Diffraktometer; Absorptionskoeffizient $\mu = 0.305 \text{ mm}^{-1}$; Wellenlänge = 0.71073 \AA ; $T = 161 (2) \text{ K}$; Reflexe gemessen: 39663, davon 6893 unabhängige, empirische Absorptionskorrektur; ($R_{\text{(int)}} = 0.176$); $R = 0.2067$, $R_w = 0.2815$; goodness of fit = 1.156; Theta Bereich für Datenerfassung: 1.37 bis 30.11° ; Restelektronendichte: zwischen -0.79 und $+ 1.24 \text{ e / \AA}^3$. Zur Kristallstrukturbestimmung wurde ein blassgelber, nadelförmiger Kristall mit Abmessungen von $0.08 \text{ mm} \cdot 0.16 \text{ mm} \cdot 1.08 \text{ mm}$ bei einer Temperatur von -112°C auf einem Siemens Smart Diffraktometer vermessen. Wiederholt gemessene Reflexe blieben konstant. Eine empirische Absorptionskorrektur mit dem Programm SADABS ergab einen Korrekturfaktor zwischen 0.709 und 1.000. Gleiche Reflexe, inklusive der „Friedel Gegensätze“ wurden gemittelt. $R(I)$ intern = 0.176. Die Struktur wurde mit direkten Methoden mit Hilfe des Programms SHELXS bestimmt. Die definierte Anzahl der Wasserstoffatome wurde in geometrischer Weise angeordnet. Die Nicht-Wasserstoffatome wurden mit anisotropen Temperaturparametern verfeinert. Der Kristall wies „Zwillingsstruktur“ auf, wobei galt: $h' = h$, $k' = -k$ und $l' = -0.92h-l$. Die Verfeinerung der Struktur erfolgte mit dem Programm SHELXL-97. Doppelte Reflexe wurden gemittelt zu 0.232 (2). Die Restelektronendichte lag zwischen -0.79 und $+ 1.24 \text{ e / \AA}^3$. Die relativ großen R-Werte sind das Resultat der „Zwillingsstruktur“ und vieler schwacher Reflexe in dem Datensatz.

Diskussion der Struktur:

Die Struktur enthält zwei unabhängige Moleküle. Die Abmessungen von beiden Verbindungen sind sehr ähnlich. Die Chinoxalingruppe ist im Grunde planar. (die größte Abweichung der Atome aus der Ebene beträgt bei dem ersten Molekül 0.014 \AA und bei dem zweiten Molekül 0.017 \AA). Der fünfgliedrige Dioxolanring liegt bei beiden Molekülen bevorzugt in einer „Briefumschlagskonformation“ vor. Die Kristallpackung zeigt zwei intermolekulare C (Benzol)-H...pi (Benzol)-Wechselwirkungen und vier intermolekulare C-H...Cl-Wechselwirkungen.

Tabelle 28: Torsionswinkel [°] von Verbindung 145

Torsionswinkel		Torsionswinkel	
Atome	[°]	Atome	[°]
N(5)-C(20)-C(15)-N(4)	-1.7 (10)	C(1)-N(1)-C(2)-C(3)	179.9 (6)
C(19)-C(20)-C(15)-N(4)	178.8 (6)	C(1)-N(1)-C(2)-C(7)	-3.7 (9)
N(5)-C(20)-C(15)-C(16)	179.9 (6)	N(1)-C(2)-C(7)-N(2)	4.8 (10)
C(19)-C(20)-C(15)-C(16)	0.4 (9)	C(3)-C(2)-C(7)-N(2)	-178.7 (6)
N(5)-C(21)-C(22)-N(6)	172 (17)	N(1)-C(2)-C(7)-C(6)	-177.9 (6)
C(14)-C(21)-C(22)-N(6)	-5 (18)	C(3)-C(2)-C(7)-C(6)	-1.5 (10)
C(19)-C(18)-C(23)-O(4)	29.9 (9)	N(2)-C(7)-C(6)-C(5)	179.5 (6)
C(17)-C(18)-C(23)-O(4)	-153.7 (6)	C(2)-C(7)-C(6)-C(5)	2.1 (10)
C(19)-C(18)-C(23)-O(3)	145.8 (6)	C(7)-C(6)-C(5)-C(4)	-1.6 (10)
C(17)-C(18)-C(23)-O(3)	-37.8 (8)	C(7)-C(6)-C(5)-C(10)	-178.7 (6)
C(19)-C(18)-C(23)-C(24)	-94.1 (8)	C(6)-C(7)-N(2)-C(8)	178.2 (6)
C(17)-C(18)-C(23)-C(24)	82.4 (8)	C(2)-C(7)-N(2)-C(8)	-4.5 (9)
C(17)-C(18)-C(19)-C(20)	2.9 (10)	C(6)-C(5)-C(4)-C(3)	0.4 (10)
C(23)-C(18)-C(19)-C(20)	179.5 (6)	C(10)-C(5)-C(4)-C(3)	177.6 (6)
N(5)-C(20)-C(19)-C(18)	178.2 (6)	C(2)-N(1)-C(1)-C(8)	2.8 (10)
C(15)-C(20)-C(19)-C(18)	-2.3 (10)	C(2)-N(1)-C(1)-Cl(1)	-179.2 (5)
C(16)-C(15)-N(4)-C(14)	179.0 (6)	C(5)-C(4)-C(3)-C(2)	0.2 (10)
C(20)-C(15)-N(4)-C(14)	0.6 (9)	N(1)-C(2)-C(3)-C(4)	176.9 (6)
O(3)-C(23)-O(4)-C(26)	-38.1 (6)	C(7)-C(2)-C(3)-C(4)	0.3 (10)
C(24)-C(23)-O(4)-C(26)	-153.5 (6)	C(13)-O(2)-C(10)-O(1)	36.4 (6)
C(18)-C(23)-O(4)-C(26)	81.3 (7)	C(13)-O(2)-C(10)-C(11)	153.6 (5)
N(4)-C(15)-C(16)-C(17)	-177.6 (6)	C(13)-O(2)-C(10)-C(5)	-82.6 (6)
C(20)-C(15)-C(16)-C(17)	0.8 (10)	C(12)-O(1)-C(10)-O(2)	-39.7 (6)
C(15)-C(16)-C(17)-C(18)	-0.2 (10)	C(12)-O(1)-C(10)-C(11)	-156.7 (5)
C(19)-C(18)-C(17)-C(16)	-1.7 (10)	C(12)-O(1)-C(10)-C(5)	80.2 (6)
C(23)-C(18)-C(17)-C(16)	-178.2 (6)	C(6)-C(5)-C(10)-O(2)	-27.9 (9)
C(14)-C(21)-N(5)-C(20)	-2.7 (10)	C(4)-C(5)-C(10)-O(2)	155.1 (6)
C(22)-C(21)-N(5)-C(20)	-179.5 (6)	C(6)-C(5)-C(10)-O(1)	-144.0 (6)
C(19)-C(20)-N(5)-C(21)	-177.9 (6)	C(4)-C(5)-C(10)-O(1)	38.9 (8)
C(15)-C(20)-N(5)-C(21)	2.7 (9)	C(6)-C(5)-C(10)-C(11)	94.4 (7)
O(4)-C(23)-O(3)-C(25)	40.1 (7)	C(4)-C(5)-C(10)-C(11)	-82.7 (7)
C(24)-C(23)-O(3)-C(25)	156.6 (6)	C(10)-O(2)-C(13)-C(12)	-18.6 (6)
C(18)-C(23)-O(3)-C(25)	-81.0 (7)	C(10)-O(1)-C(12)-C(13)	26.9 (6)
C(23)-O(4)-C(26)-C(25)	20.1 (7)	O(2)-C(13)-C(12)-O(1)	-5.4 (7)
C(23)-O(3)-C(25)-C(26)	-27.1 (8)	C(7)-N(2)-C(8)-C(1)	3.5 (9)

Fortsetzung von Tabelle 28

Atome	Torsionswinkel [°]	Atome	Torsionswinkel [°]
O(4)-C(26)-C(25)-O(3)	4.8 (8)	C(7)-N(2)-C(8)-C(9)	179.4 (6)
C(15)-N(4)-C(14)-C(21)	-0.7 (10)	N(1)-C(1)-C(8)-N(2)	-2.9 (11)
C(15)-N(4)-C(14)-Cl(2)	-179.3 (5)	Cl(1)-C(1)-C(8)-N(2)	179.0 (5)
N(5)-C(21)-C(14)-N(4)	1.8 (11)	N(1)-C(1)-C(8)-C(9)	-178.7 (6)
C(22)-C(21)-C(14)-N(4)	178.5 (6)	Cl(1)-C(1)-C(8)-C(9)	3.2 (9)
N(5)-C(21)-C(14)-Cl(2)	-179.5 (5)	N(3)-C(9)-C(8)-N(2)	-146 (20)
C(22)-C(21)-C(14)-Cl(2)	-2.9 (9)	N(3)-C(9)-C(8)-C(1)	30 (21)

Tabelle 29: Bindungslängen [Å] von 145

Atome	Bindungslängen [Å]	Atome	Bindungslänge [Å]
Cl(2)-C(14)	1.729 (6)	Cl(1)-C(1)	1.733 (6)
C(20)-N(5)	1.381 (8)	O(2)-C(10)	1.410 (7)
C(20)-C(19)	1.400 (8)	O(2)-C(13)	1.440 (8)
C(20)-C(15)	1.437 (8)	N(1)-C(1)	1.313 (8)
C(15)-N(4)	1.366 (8)	N(1)-C(2)	1.378 (8)
C(15)-C(16)	1.405 (8)	C(2)-C(3)	1.421 (9)
C(21)-N(5)	1.359 (8)	C(2)-C(7)	1.427 (9)
C(21)-C(14)	1.429 (9)	C(7)-N(2)	1.397 (8)
C(21)-C(22)	1.445 (9)	C(7)-C(6)	1.406 (8)
C(22)-N(6)	1.130 (8)	C(6)-C(5)	1.355 (8)
C(18)-C(19)	1.384 (8)	C(5)-C(4)	1.424 (8)
C(18)-C(17)	1.411 (8)	C(5)-C(10)	1.522 (8)
C(18)-C(23)	1.510 (9)	O(1)-C(10)	1.432 (7)
C(23)-O(4)	1.402 (7)	O(1)-C(12)	1.449 (8)
C(23)-O(3)	1.424 (8)	N(2)-C(8)	1.332 (8)
C(23)-C(24)	1.506 (10)	C(4)-C(3)	1.360 (8)
N(4)-C(14)	1.290 (8)	C(9)-N(3)	1.441 (8)
O(4)-C(26)	1.413 (9)	C(9)-C(8)	1.446 (9)
C(16)-C(17)	1.370 (8)	C(1)-C(8)	1.425 (9)
O(3)-C(25)	1.411 (10)	C(10)-C(11)	1.505 (9)
C(26)-C(25)	1.540 (12)	C(13)-C(12)	1.521 (10)

Tabelle 30: Bindungswinkel [°] von 145

Atome	Bindungswinkel [°]	Atome	Bindungswinkel [°]
N(5)-C(20)-C(19)	119.0 (5)	C(10)-O(2)-C(13)	105.9 (5)
N(5)-C(20)-C(15)	121.6 (6)	C(1)-N(1)-C(2)	114.4 (5)
C(19)-C(20)-C(15)	119.4 (6)	N(1)-C(2)-C(3)	119.8 (6)
N(4)-C(15)-C(16)	121.7 (6)	N(1)-C(2)-C(7)	122.0 (6)
N(4)-C(15)-C(20)	120.6 (6)	C(3)-C(2)-C(7)	118.1 (6)
C(16)-C(15)-C(20)	117.7 (6)	N(2)-C(7)-C(6)	118.9 (6)
N(5)-C(21)-C(14)	121.1 (6)	N(2)-C(7)-C(2)	121.4 (5)
N(5)-C(21)-C(22)	117.2 (6)	C(6)-C(7)-C(2)	119.7 (6)
C(14)-C(21)-C(22)	121.6 (6)	C(5)-C(6)-C(7)	121.2 (6)
N(6)-C(22)-C(21)	177.3 (8)	C(6)-C(5)-C(4)	119.3 (6)
C(19)-C(18)-C(17)	118.2 (6)	C(6)-C(5)-C(10)	120.9 (5)
C(19)-C(18)-C(23)	120.4 (6)	C(4)-C(5)-C(10)	119.8 (5)
C(17)-C(18)-C(23)	121.3 (6)	C(10)-O(1)-C(12)	104.1 (5)
O(4)-C(23)-O(3)	104.2 (5)	C(8)-N(2)-C(7)	115.0 (6)
O(4)-C(23)-C(24)	109.6 (6)	C(3)-C(4)-C(5)	121.4 (6)
O(3)-C(23)-C(24)	108.0 (6)	N(3)-C(9)-C(8)	177.9 (7)
O(4)-C(23)-C(18)	112.6 (5)	N(1)-C(1)-C(8)	125.2 (6)
O(3)-C(23)-C(18)	110.2 (6)	N(1)-C(1)-Cl(1)	116.6 (5)
C(24)-C(23)-C(18)	111.8 (6)	C(8)-C(1)-Cl(1)	118.2 (5)
C(18)-C(19)-C(20)	121.9 (6)	C(4)-C(3)-C(2)	120.2 (6)
C(14)-N(4)-C(15)	117.2 (5)	O(2)-C(10)-O(1)	105.2 (5)
C(23)-O(4)-C(26)	107.8 (6)	O(2)-C(10)-C(11)	109.1 (6)
C(17)-C(16)-C(15)	121.5 (6)	O(1)-C(10)-C(11)	109.3 (5)
C(16)-C(17)-C(18)	121.3 (6)	O(2)-C(10)-C(5)	111.2 (5)
C(21)-N(5)-C(20)	115.3 (5)	O(1)-C(10)-C(5)	110.0 (5)
C(25)-O(3)-C(23)	103.6 (5)	C(11)-C(10)-C(5)	111.9 (5)
O(4)-C(26)-C(25)	102.2 (7)	O(2)-C(13)-C(12)	105.1 (5)
O(3)-C(25)-C(26)	106.0 (7)	O(1)-C(12)-C(13)	104.3 (6)
N(4)-C(14)-C(21)	124.1 (6)	N(2)-C(8)-C(1)	121.9 (6)
N(4)-C(14)-Cl(2)	118.5 (5)	N(2)-C(8)-C(9)	117.8 (6)
C(21)-C(14)-Cl(2)	117.4 (5)	C(1)-C(8)-C(9)	120.2 (6)

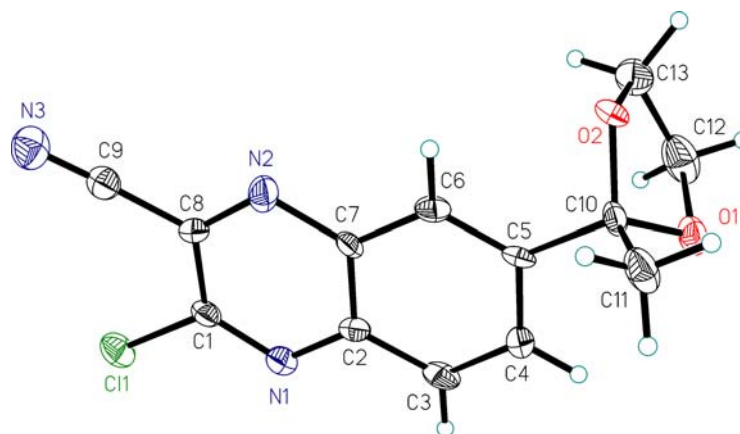


Abbildung 83: Kristallstruktur von Verbindung 145 (Molekül 1)

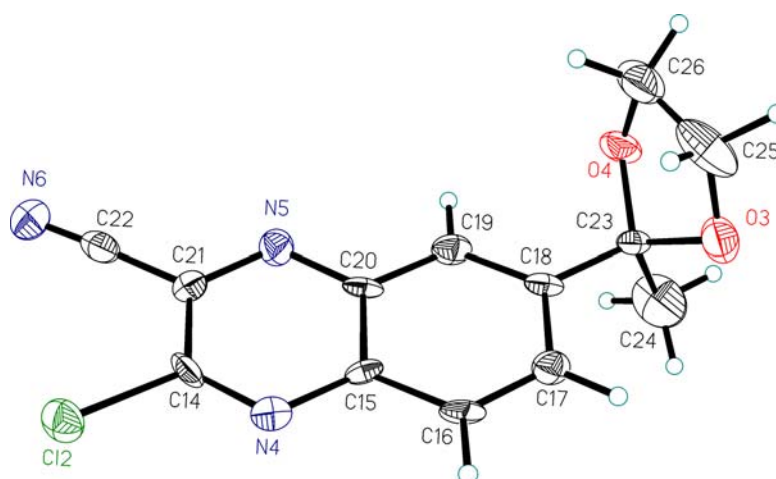


Abbildung 84: Kristallstruktur von Verbindung 145 (Molekül 2)

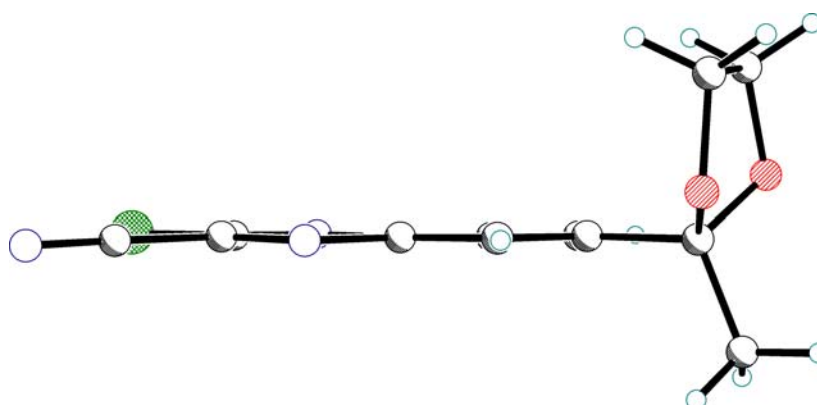


Abbildung 85: Kristallstruktur von 145 in der Ebene

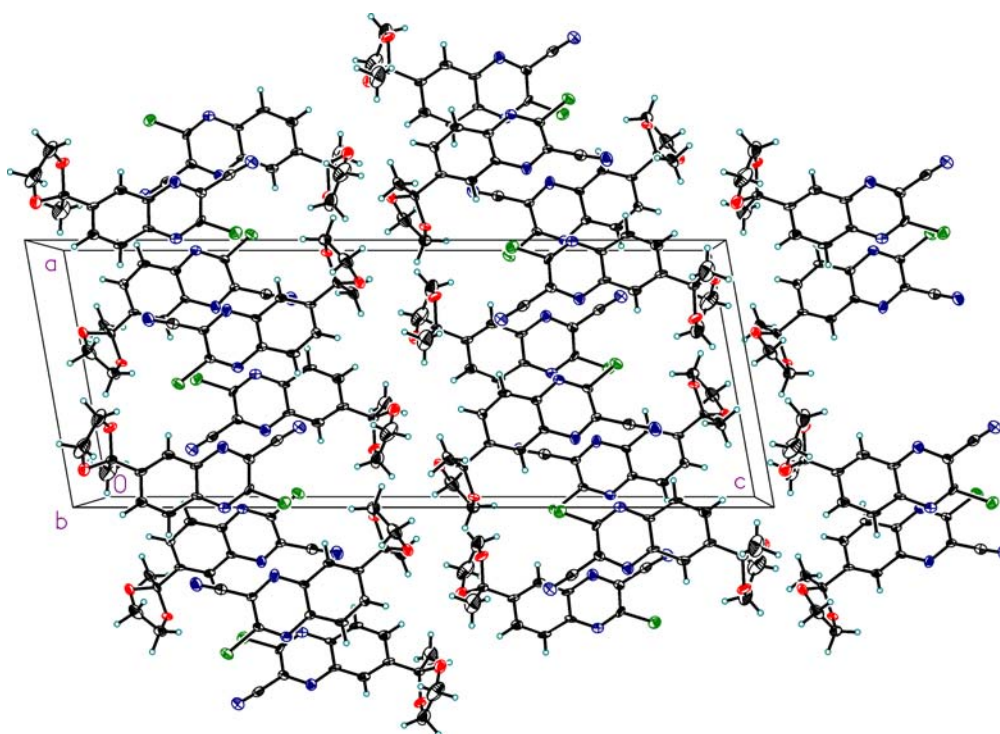
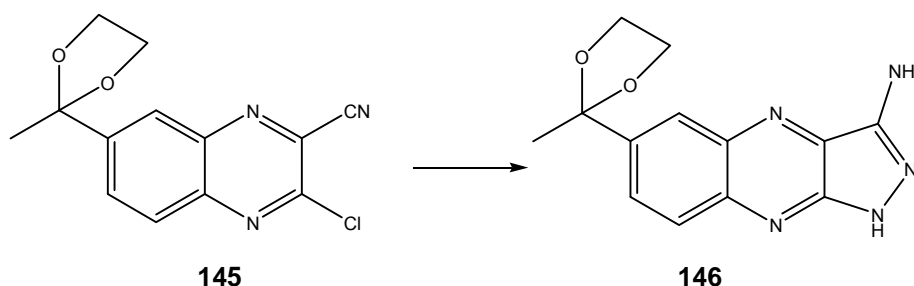


Abbildung 86: Kristallstruktur von 145 im Kristallverband.

9.3.55 Synthese von 6-(2-Methyl-(1,3)-dioxolan-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-3-ylamin

300 mg (1.1 mmol) von Verbindung **145** wurden in einem 100 ml Dreihalskolben in 5.0 ml (14.0 eq., 25.6 mmol, 1.3 g) einer 24-26%igen wässrigen Hydrazinhydratlösung suspendiert. Die Mischung wurde für 3 Stunden zum Rückfluß erhitzt. Dabei schied sich aus der anfangs klaren Lösung ein roter Feststoff aus. Nach beendeter Reaktion ließ man auf RT abkühlen, filtrierte das Rohprodukt ab, wusch zunächst mit wenig Wasser, dann mit AcOEt nach. Das Produkt **146** wurde zur weiteren Aufreinigung aus AcOEt/n-Hexan umkristallisiert.

Ausbeute: 190 mg (64%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:1; $R_f = 0.13$

Schmelzpunkt: 295-297 °C

IR (KBr): 3414 (s), 3330 (m), 3215 (m), 3058 (w), 2974 (w), 2890 (w), 1628 (s), 1592 (m), 1560 (m), 1503 (w), 1477 (w), 1445 (m), 1398 (w), 1372 (w), 1330 (m), 1257 (w), 1231 (w), 1194 (s), 1162 (m), 1115 (s), 1032 (s), 943 (w), 869 (w), 833 (s), 806 (w), 697 (w), 676 (w), 608 (w)

¹H-NMR: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

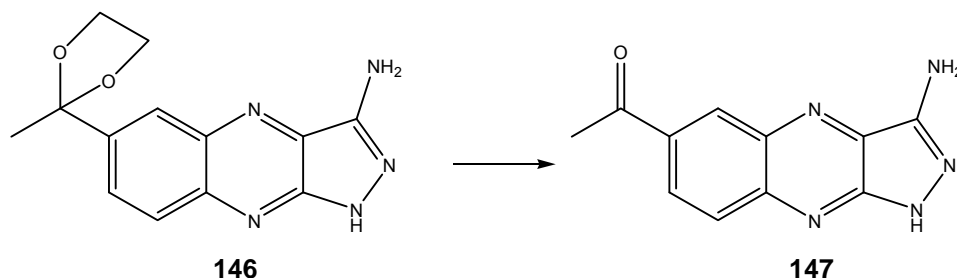
12.23 (s, br, 1H, NH, austauschbar mit D₂O), 8.12 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H-C(5)), 7.99 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-C(8)), 7.83 (dd, $J_1 = 8.9$ Hz, $J_2 = 2$ Hz, 1H, H-C(7)), 6.12 (s, br, 2H, NH₂, Signal austauschbar mit D₂O), 4.13-3.99 (m, 2H, CH₂), 3.85-3.72 (m, 2H, CH₂), 1.69 (s, 3H, CH₃)

Elementaranalyse: (%) für C₁₃H₁₃N₅O₂ (271.27)

ber.: C 57.56 H 4.83 N 25.82

gef.: C 57.71 H 5.04 N 26.03

9.3.56 Synthese 1-(3-Amino-1H-pyrazolo[3,4-b]chinoxalin-6-yl)-ethanon



400 mg (1.47 mmol) der geschützten Verbindung **146** wurden in einer Mischung aus 10 ml salzsaurem Ether für 1 Stunde bei RT gerührt. Anschließend ließ man das violettgefärbte Reaktionsgemisch noch 1 Stunde stehen und entfernte dann das Lösungsmittel im Vakuum. Das Rohprodukt wurde durch Chromatographie weiter aufgereinigt. (Eluent: AcOEt/n-Hexan 1:1). Als Produkt wurde ein rotes Pulver **147** erhalten.

Ausbeute: 210 mg (63%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:1; $R_f = 0.20$

Schmelzpunkt: Zersetzung ab 295 °C

IR (KBr): 3435 (w), 3298 (w), 3183 (w), 2995 (w), 2932 (w), 2880 (w), 2827 (w), 1681 (w), 1628 (s), 1586 (s), 1566 (s), 1503 (w), 1440 (m), 1419 (w), 1393 (w), 1367 (w), 1330 (s), 1257 (m), 1236 (w), 1183 (s), 1147 (w), 1105 (s), 1073 (s), 1032 (s), 943 (w), 875 (w), 833 (w), 796 (w), 733 (w), 712 (w), 670 (w), 613 (w), 581 (w)

¹H-NMR: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

12.48 (s, 1H, NH, austauschbar mit D₂O), 8.76 (d, $J = 1.80$ Hz, 1H, H-C(5)), 8.25 (dd, $J_1 = 9.0$ Hz, $J_2 = 2$ Hz, 1H, H-C(7)), 8.04 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-C(8)), 6.29 (s, br, 2H, NH₂, austauschbar mit D₂O), 2.76 (s, 3H, CH₃)

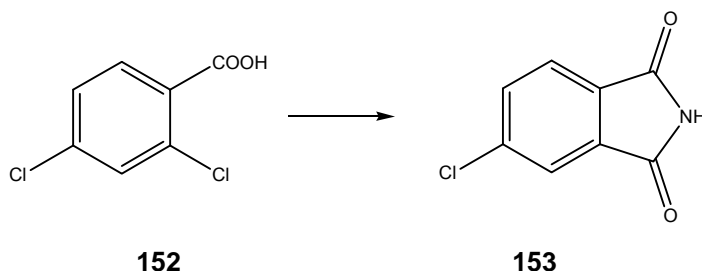
Elementaranalyse: (%) für C₁₁H₉N₅O (227.22)

ber.: C 58.14 H 3.99 N 30.82

gef.: C 55.81 H 4.20 N 28.82

MS (ESI): 225.7 (M-H⁺) (227.08 berechnet)

9.3.57 Synthese von 5-Chlor-isoindol-1,3-dion



In einem 2 Liter Dreihalsrundkolben wurden 50,0 g (261.8 mmol) **152** mit 28.1 g (1.2 eq., 314 mmol) CuCN vorgelegt. Man gab nun 28.0 ml (1.3 eq., 27.3 g, 346 mmol) Pyridin dazu und erwärmte den Reaktionsansatz dann langsam auf etwa 130 °C. Mit zunehmender Reaktionsdauer verfärbte sich der Ansatz dunkelblau. Der Ansatz wurde noch etwa eine halbe Stunde bei 130 °C gerührt, bis die Temperatur plötzlich auf etwa 180-200 °C anstieg. Man entfernte die Heizquelle und ließ die Reaktionsmischung langsam auf RT abkühlen. Der feste, grünblaue Rückstand wurde nun mehrmals aus Essigsäure umkristallisiert. Das Produkt **153** konnte in Form von rosafarbenen Kristallen erhalten werden.

Ausbeute: 29.3 g (61%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:5; $R_f = 0.29$

Schmelzpunkt: 211-213 °C (Essigsäure)

Lit.: 210 °C^[86]

IR (KBr): 3198 (m), 3070 (m), 2745 (w), 1969 (w), 1905 (w), 1777 (m), 1723 (s), 1704 (s), 1600 (m), 1546 (w), 1458 (m), 1428 (m), 1349 (s), 1295 (m), 1251 (w), 1212 (w), 1177 (w), 1157 (w), 1113 (s), 1074 (s), 1044 (s), 980 (w), 897 (w), 867 (m), 803 (w), 749 (s)

¹N-NMR: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

11.50 (s, br, 1H, NH, austauschbar mit D₂O), 7.92-7.81 (m, 3H, H-C(4)), H-C(6)), und H-C(7))

¹³C-NMR: (δ [ppm], 62.90 MHz, DMSO- d_6)

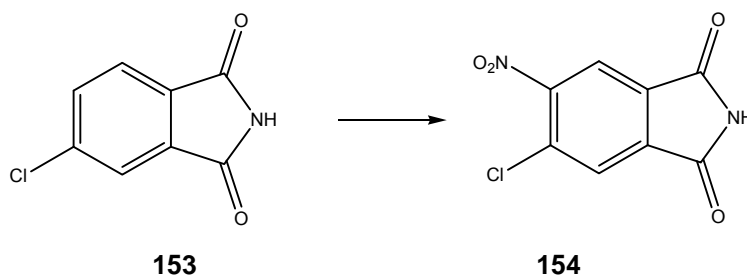
168.29 (C(1)) oder (C(3)), 167.90 (C(3)) oder C(1)), 139.20 (C(5))-Cl, 134.64 (C(3a)), 134.21 (C(6)), 131.18 (C(7a)), 124.84 (C(7)), 123.11 (C(4))

Elementaranalyse: (%) für C₈H₄ClNO₂ (181.58)

ber.: C 52.92 H 2.22 N 7.71

gef.: C 52.98 H 2.39 N 7.78

9.3.58 Synthese von 5-Chlor-6-nitroisindol-1,3-dion



In eine Mischung aus 40 ml H_2SO_4 (20 % SO_3 , Oleum) und 5 ml HNO_3 (100 %ig, $d = 1.52$) wurden unter Eiskühlung 5.9 g (32.5 mmol) **153** langsam unter Rühren eingetragen. Nach beendeter Zugabe ließ man den dunkelgelben Reaktionsansatz noch 1 Stunde bei 0 °C weiterrühren, entfernte dann das Kältebad, rührte noch 30 Minuten bei RT und gab dann die Mischung auf 200 ml Eiswasser. Der ausgefallene blassgelbe Niederschlag wurde abgesaugt und aus wenig EtOH umkristallisiert. Das Produkt **154** konnte in Form eines farblosen Pulvers isoliert werden.

Ausbeute: 4.57 g (62 %)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:5; $R_f = 0.15$

Schmelzpunkt: 178-180 °C (EtOH)

Lit.: 201-202^[87]

IR (KBr): 3208 (s), 3090 (s), 3040 (s), 2745 (w), 1787 (s), 1713 (s), 1610 (s), 1551 (s), 1458 (w), 1413 (m), 1344 (s), 1290 (s), 1172 (m), 1148 (s), 1103 (m), 1074 (s), 946 (m), 916 (m), 818 (s), 798 (w), 744 (s),

¹N-NMR: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

11.86 (s, br, 1H, NH, tauscht mit D_2O aus), 8.50 (s, 1H, H-C(7)), 8.26 (s, 1H, H-C(4))

¹³C-NMR: (δ [ppm], 62.90 MHz, DMSO- d_6)

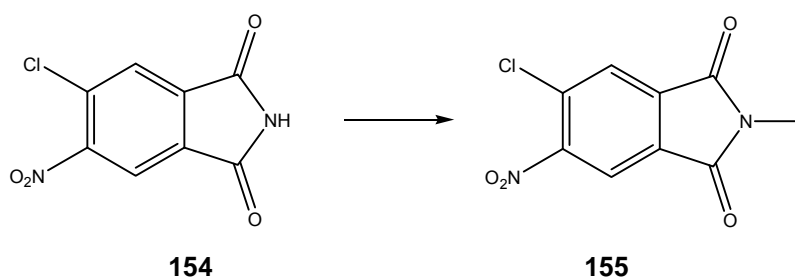
166.75 (C(1)) oder (C(3)), 166.71 (C(3)) oder (C(1)), 151.44 (C(6))-NO₂, 136.11 (C(3a)), 132.52 (C(5))-Cl, 130.72 (C(7a)), 126.29 (C(4)), 119.89 (C(7))

Elementaranalyse: (%) für $\text{C}_8\text{H}_3\text{ClN}_2\text{O}_4$ (226.57)

ber.: C 42.41 H 1.33 N 12.36

gef.: C 42.67 H 1.62 N 12.40

9.3.59 Synthese von 5-Chlor-2-methyl-6-nitro-isoindol-1,3-dion



In einem 250 ml Dreihalskolben mit Rückflusskühler wurden 4.50 g (19.9 mmol) **154** in 40 ml Aceton gelöst. Zu dieser gelben Lösung gab man 3.30 g (1.20 eq., 24 mmol) fein gepulvertes K_2CO_3 und 1.48 ml (3.4 g, 1.20 eq., 24 mmol) CH_3I . Der Reaktionsansatz verfärbte sich nach Zugabe des Alkylierungsmittels rot. Nun erhitzte man für 3 Stunden zum Rückfluß. Nach beendeter Reaktion wurde heiß filtriert und das gelb-orangefarbene Filtrat auf etwa ein fünftel seines Volumens eingeeengt. Beim Erkalten auf RT kristallisierten aus der Mutterlauge 3.32 g der N-methylierten Verbindung **155** aus. Diese wurden abgesaugt und getrocknet. Der Filterkuchen wurde noch zweimal in jeweils 50 ml Aceton suspendiert, zum Sieden erhitzt und heiß filtriert. Die organischen Phasen wurden mit der Mutterlauge aus der ersten Fällung vereinigt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der verbliebene Rückstand zusammen mit der ersten Fällung aus wenig MeOH umkristallisiert. So konnten insgesamt 3.91 g einer schwach gelben, kristallinen Verbindung **155** erhalten werden.

Ausbeute: 3.91 g (82 %)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:8; $R_f = 0.34$

Schmelzpunkt: 173-174 °C (MeOH)

Lit.: 171-172 °C^[87]

IR (KBr): 3089 (w), 3037 (w), 2942 (w), 1859 (w), 1785 (w), 1702 (s), 1618 (w), 1545 (s), 1429 (s), 1403 (w), 1377 (s), 1361 (s), 1320 (m), 1257 (m), 1241 (w), 1199 (w), 1142 (m), 1115 (m), 1026 (s), 979 (w), 953 (s), 943 (m), 911 (w), 827 (m), 801 (w), 765 (w), 733 (s), 691 (w), 623 (m), 602 (m), 566 (m)

¹H-NMR: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

8.54 (s, 1H, H-C(7)), 8.32 (s, 1H, H-C(4)), 3.07 (s, 3H, CH_3)

¹³C-NMR: (δ[ppm], 62.90 MHz, DMSO-d₆)

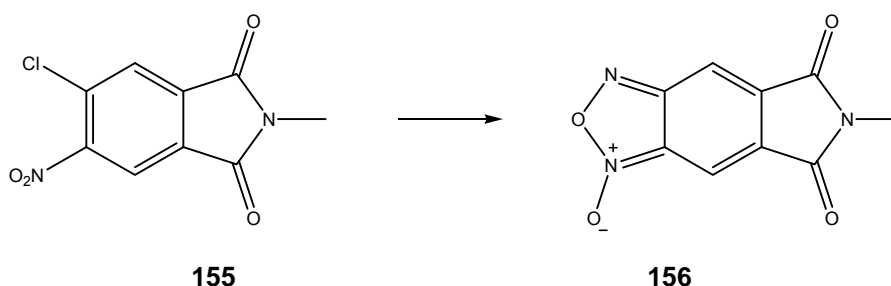
165.51 (C(1)) oder (C(3)), 165.48 (C(3)) oder C(1)), 151.16 (C(6))-NO₂, 135.19 (C(3a)), 131.61 (C(5))-Cl, 130.36 (C(7a)), 125.94 (C(4)), 119.51 (C(7)), 24.23 (C(CH₃))

Elementaranalyse: (%) für C₉H₅ClN₂O₄ (240.6)

ber.: C 44.93 H 2.09 N 11.64

gef.: C 44.81 H 2.35 N 11.62

9.3.60 Synthese von 6-Methyl-1-oxy-pyrrol[3,4,4,5]benzo[1,2-c][1,2,5]oxadiazol-5,7-dion



2.0 g (8.3 mmol) **155** wurden zusammen mit 0.54 g (1.0 eq., 8.3 mmol) NaN₃ in 20 ml DMSO suspendiert. Die dunkelgelbe Suspension wurde über Nacht bei RT gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle!) gab man den Ansatz auf 50 ml Wasser und rührte. Nach kurzer Zeit schied sich ein gelbbrauner Feststoff aus. Der Feststoff wurde abfiltriert und noch feucht in Toluol aufgenommen. Die organische Phase wurde gründlich über MgSO₄ getrocknet und anschließend für 5 Stunden zum Rückfluß erhitzt. Nachdem sich kein Azid mehr nachweisen ließ (DC-Kontrolle) ließ man die gelbe, klare Lösung auf RT abkühlen und entfernte dann das Lösungsmittel im Vakuum. Der auskristallisierte braungelbe Rückstand wurde mehrmals aus EtOH umkristallisiert. Das Produkt **156** konnte in Form gelber Kristalle erhalten werden.

Ausbeute: 1.55 g (85%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:5; R_f = 0.16

Schmelzpunkt: 208-209 °C (EtOH)

IR (KBr): 3445 (w), 3058 (w), 3026 (w), 2942 (w), 2105 (w), 1827 (w), 1770 (m), 1702 (s), 1607 (s), 1560 (s), 1487 (m), 1441 (m), 1429 (m), 1372 (m), 1314 (w), 1262 (m), 1194 (m), 1142 (m), 1110 (w), 1021 (w), 995 (m), 979 (m), 922 (w), 854 (w), 806 (m), 770 (w), 738 (m), 702 (w), 675 (w), 608 (w), 576 (w)

¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆)

8.47 (s, br, 1H, H-C(4)), oder H-C(8)), 8.20 (s, br, 1H, H-C(8)), oder H-C(4)), 3.09 (s, 3H, CH₃)

Elementaranalyse: (%) für C₉H₅N₃O₄ (219.15)

ber.: C 49.32 H 2.30 N 19.17

gef.: C 49.48 H 2.44 N 19.28

Kristallstruktur von Verbindung 156

Die Kristallisation erfolgte aus Ethanol

Kristallsystem: triklin; Raumgruppe P-1; Elementarzelle: a = 6.3436 (18) Å, b = 8.121 (3) Å, c = 9.547 (2) Å; α = 94.163 (19)°, β = 109.16 (3)°, γ = 98.82 (3)°; V = 455.1 (2) Å³; Z = 2, ρ_{ber} = 1.599 Mg / m³; Siemens Smart Diffraktometer; Absorptionskoeffizient : = 0.130 mm⁻¹; Wellenlänge = 0.71073 Å; T = 159 (2) K; Reflexe gemessen: 6182, davon 2481 unabhängige, gleiche Reflexe wurden gemittelt (R_(int) = 0.115); R = 0.0710, R_w = 0.1521; goodness of fit = 1.172; Theta Bereich für Datenerfassung: 2.28 bis 30.82 °; Restelektronendichte: zwischen -0.29 und + 0.3 e / Å³. Zur Strukturbestimmung wurde ein Einkristall mit den Dimensionen 0.06 mm · 0.38 mm · 0.44 mm bei einer Temperatur von -114 °C auf einem Siemens Smart Diffraktometer vermessen. Die gemessenen Reflexe blieben konstant. Es wurde keine Absorptionskorrektur vorgenommen. Gleiche Reflexe wurden gemittelt (R_{int.} = 0.115). Die Strukturlösung erfolgte mit direkten Methoden mit Hilfe des Programms SHELXS. Die Anordnung der H-Atome erfolgte geometrisch. Es wurden zwei mögliche Positionen für die Anordnung der mit den Stickstoffen verbundenen Sauerstoffatome gefunden. Die Aufenthaltswahrscheinlichkeit von O3 an N2 beträgt 0.775 (5); die von O2 an N1 beträgt 0.225 (5). Die Strukturverfeinerung erfolgte mit dem Programm SHELXS-97. Die bestimmte Restelektronendichte lag zwischen -0.29 und + 0.30 e/Å³.

Diskussion der Struktur:

Das Molekül ist nahezu planar. Die größte Abweichung der C-, N-, und O-Atome aus der Ebene heraus, beträgt 0.029 Å. Der Unterschied zwischen den Bindungslängen von N1 zu O2 und von N2 zu O2 ist etwas kleiner, als bei Verbindungen vom Typ der Benzofurazan-N-oxide angenommen. Dies könnte daran liegen, dass die N-Oxid-Gruppe keine genau definierte Struktur besitzt.

Die Moleküle sind in der kristallographischen [2,1,1] Richtung durch intermolekulare C-H...O Kontakte mit H...O Abständen von 2.29 Å und 2.34 Å verbunden.

Tabelle 31: Torsionswinkel [°] der Verbindung **156**

Atome	Torsionswinkel [°]	Atome	Torsionswinkel [°]
C(1)-N(3)-C(8)-O(4)	-179.8 (2)	O(3')-N(1)-C(4)-C(3)	-1.4 (9)
C(9)-N(3)-C(8)-O(4)	-1.6 (3)	O(2)-N(1)-C(4)-C(3)	-178.5 (2)
C(1)-N(3)-C(8)-C(7)	0.3 (2)	N(2)-C(5)-C(4)-N(1)	-0.1 (3)
C(9)-N(3)-C(8)-C(7)	178.45 (19)	C(6)-C(5)-C(4)-N(1)	-178.1 (2)
O(3)-N(2)-C(5)-C(6)	0.2 (5)	N(2)-C(5)-C(4)-C(3)	178.5 (2)
O(2)-N(2)-C(5)-C(6)	178.1 (2)	C(6)-C(5)-C(4)-C(3)	0.4 (3)
O(3)-N(2)-C(5)-C(4)	-177.7 (3)	C(2)-C(3)-C(4)-N(1)	176.9 (2)
O(2)-N(2)-C(5)-C(4)	0.1 (2)	C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	-1.4 (3)
C(7)-C(6)-C(5)-N(2)	-176.4 (2)	C(4)-C(3)-C(2)-C(7)	0.9 (3)
C(7)-C(6)-C(5)-C(4)	1.2 (3)	C(4)-C(3)-C(2)-C(1)	178.5 (2)
C(5)-C(6)-C(7)-C(2)	-1.8 (3)	C(6)-C(7)-C(2)-C(3)	0.8 (4)
C(5)-C(6)-C(7)-C(8)	177.7 (2)	C(8)-C(7)-C(2)-C(3)	-178.8 (2)
O(4)-C(8)-C(7)-C(6)	-0.1 (4)	C(6)-C(7)-C(2)-C(1)	-179.7 (2)
N(3)-C(8)-C(7)-C(6)	179.8 (2)	C(8)-C(7)-C(2)-C(1)	0.7 (2)
O(4)-C(8)-C(7)-C(2)	179.5 (2)	O(1)-C(1)-C(2)-C(3)	-1.4 (4)
N(3)-C(8)-C(7)-C(2)	-0.6 (2)	N(3)-C(1)-C(2)-C(3)	179.0 (2)
C(8)-N(3)-C(1)-O(1)	-179.6 (2)	O(1)-C(1)-C(2)-C(7)	179.2 (2)
C(9)-N(3)-C(1)-O(1)	2.3 (4)	N(3)-C(1)-C(2)-C(7)	-0.5 (2)
C(8)-N(3)-C(1)-C(2)	0.1 (2)	O(3')-N(1)-O(2)-N(2)	-177.9 (5)
C(9)-N(3)-C(1)-C(2)	-178.0 (2)	C(4)-N(1)-O(2)-N(2)	0.1 (2)
O(3')-N(1)-C(4)-C(5)	177.1 (8)	O(3)-N(2)-O(2)-N(1)	178.2 (2)
O(2)-N(1)-C(4)-C(5)	0.0 (3)	C(5)-N(2)-O(2)-N(1)	-0.2 (2)

Tabelle 32: Bindungswinkel [°] und Bindungslängen [Å] von Verbindung 156

Atome	Bindungswinkel [°]	Atome	Bindungslängen [Å]
C(1)-N(3)-C(8)	112.96 (19)	O(1)-C(1)	1.218 (3)
C(1)-N(3)-C(9)	124.45 (19)	N(3)-C(1)	1.385 (3)
C(8)-N(3)-C(9)	122.6 (2)	N(3)-C(8)	1.404 (3)
O(3)-N(2)-C(5)	136.9 (3)	N(3)-C(9)	1.458 (3)
O(3)-N(2)-O(2)	116.4 (2)	N(2)-O(3)	1.223 (3)
C(5)-N(2)-O(2)	106.7 (2)	N(2)-C(5)	1.341 (3)
O(4)-C(8)-N(3)	124.5 (2)	N(2)-O(2)	1.430 (3)
O(4)-C(8)-C(7)	129.4 (2)	C(8)-O(4)	1.214 (3)
N(3)-C(8)-C(7)	106.1 (2)	C(8)-C(7)	1.481 (3)
C(2)-C(3)-C(4)	114.7 (2)	C(3)-C(2)	1.346 (3)
C(7)-C(6)-C(5)	113.9 (2)	C(3)-C(4)	1.433 (3)
O(3')-N(1)-C(4)	141.4 (5)	C(6)-C(7)	1.361 (3)
O(3')-N(1)-O(2)	112.7 (5)	C(6)-C(5)	1.414 (3)
C(4)-N(1)-O(2)	105.8 (2)	N(1)-O(3')	1.097 (10)
N(2)-C(5)-C(6)	129.2 (2)	N(1)-C(4)	1.325 (3)
N(2)-C(5)-C(4)	107.0 (2)	N(1)-O(2)	1.391 (3)
C(6)-C(5)-C(4)	123.7 (2)	C(5)-C(4)	1.418 (4)
C(6)-C(7)-C(2)	123.0 (2)	C(7)-C(2)	1.451 (3)
C(6)-C(7)-C(8)	129.5 (2)	C(1)-C(2)	1.490 (3)
C(2)-C(7)-C(8)	107.46 (19)		
O(1)-C(1)-N(3)	124.7 (2)		
O(1)-C(1)-C(2)	128.6 (2)		
N(3)-C(1)-C(2)	106.65 (18)		
N(1)-C(4)-C(5)	111.5 (2)		
N(1)-C(4)-C(3)	127.6 (2)		
C(5)-C(4)-C(3)	121.0(2)		
C(3)-C(2)-C(7)	123.7 (2)		
C(3)-C(2)-C(1)	129.5 (2)		
C(7)-C(2)-C(1)	106.8 (2)		
N(1)-O(2)-N(2)	108.97 (18)		

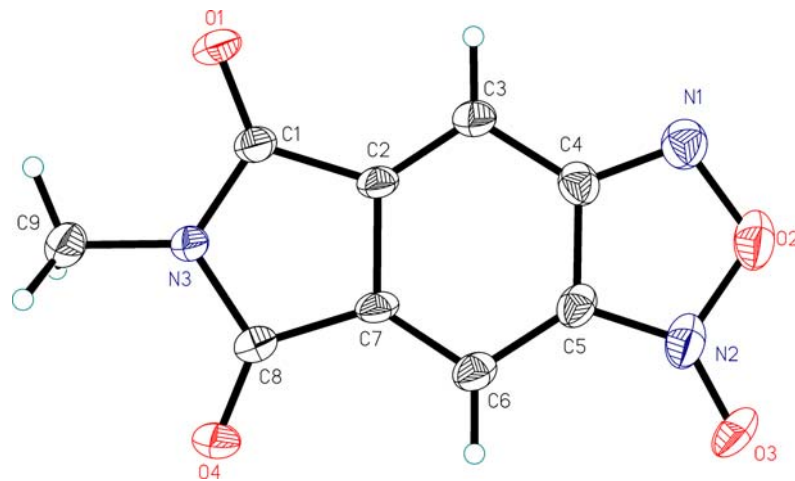


Abbildung 87: Kristallstruktur von Verbindung 156

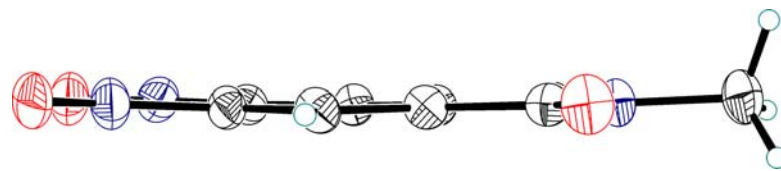


Abbildung 88: Verbindung 156 in der Ebene

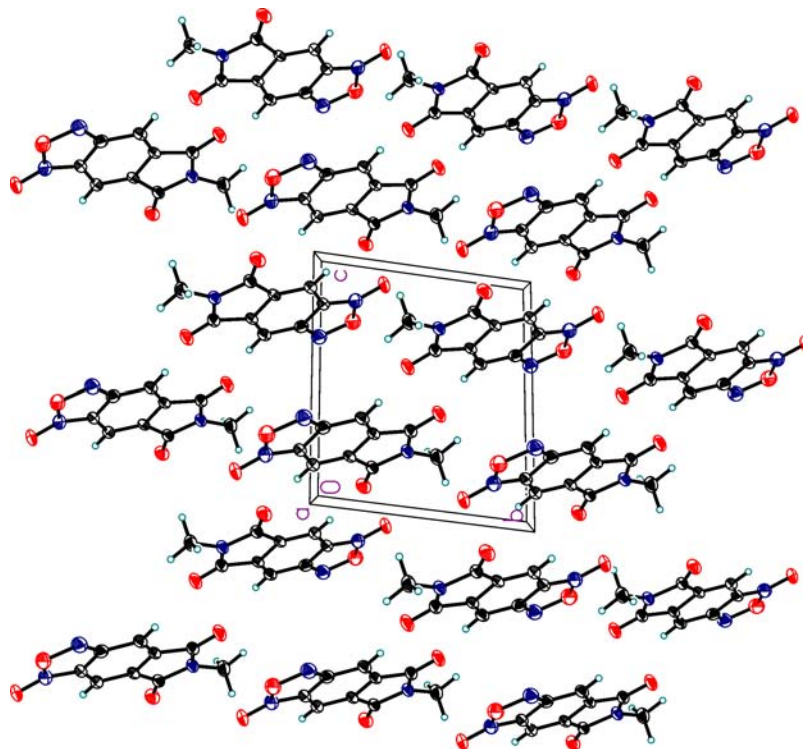
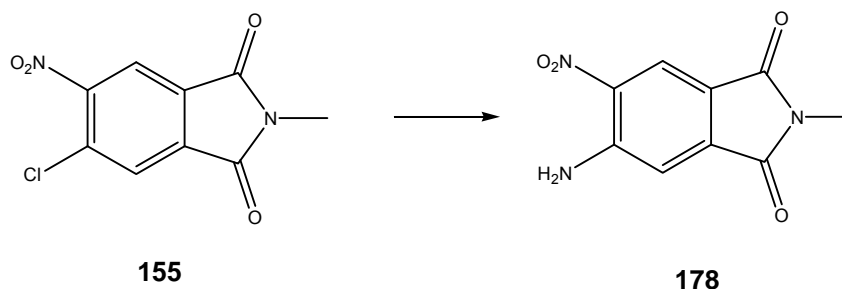


Abbildung 3: Struktur 156 im Kristallverbund

9.3.61 Synthese von 5-Amino-2-methyl-6-nitro-isoindol-1,3-dion



In einem 100 ml Dreihalskolben mit Rückflusskühler, Rührkern und Gaseinleitungsrohr wurden 4.0 g (16.6 mmol) **155** in 100 ml Diphenylether suspendiert. Nach Zugabe von 3.0 g (47.2 mmol) Cu-Pulver wurde der Reaktionsansatz langsam auf eine Temperatur von 130-150 °C erwärmt, wobei sich der Feststoff löste. Nun wurde über einen Zeitraum von 4 Stunden ein schwacher NH₃-Gasstrom eingeleitet. Nachdem kein Edukt mehr nachweisbar war, filtrierte man die Mischung heiß und ließ dann auf RT abkühlen. Das ausgefallene Produkt wurde abgesaugt und das Lösungsmittel dann durch Vakuumdestillation entfernt. Die beiden Produktfraktionen wurden vereinigt und mehrmals aus EtOH umkristallisiert. Das Produkt schied sich in Form gelber, nadelförmiger Kristalle **178** aus der Lösung aus.

Ausbeute: 1.25 g (34 %)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:1; R_f = 0.45

Schmelzpunkt: 257-260 °C (EtOH)

Lit.: 255-262 °C^[87]

IR (KBr): 3424 (m), 3309 (m), 3194 (w), 1759 (m), 1702 (s), 1639 (s), 1602 (w), 1524 (s), 1440 (m), 1382 (m), 1336 (m), 1278 (m), 1251 (w), 1157 (w), 1063 (w), 1047 (w), 1005 (w), 985 (w), 916 (w), 895 (w), 833 (w), 801 (w), 770 (w), 744 (m), 723 (w), 697 (w), 670 (w), 634 (w), 602 (w), 567 (w)

¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆)

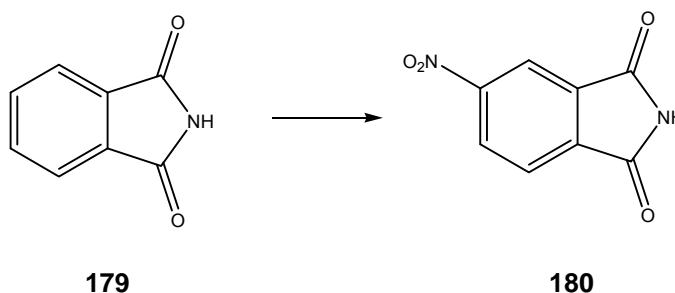
8.37 (s, br, 2H, NH₂, austauschbar mit D₂O), 8.29 (s, 1H, H-C(7)), 7.43 (s, 1H, H-C(4)), 3.00 (s, 3H, CH₃)

Elementaranalyse: (%) für C₉H₇N₃O₄ (221.17)

ber.: C 48.87 H 3.19 N 19.00

gef.: C 48.81 H 3.35 N 18.87

9.3.62 Synthese von 5-Nitro-isoindol-1,3-dion



Zu einer auf 0-5 °C gekühlten Mischung aus 200 ml konz. H₂SO₄ und 50 ml HNO₃ (100%, d = 1.52) wurden unter Rühren über einen Zeitraum von 60 Minuten 20.0 g (135.9 mmol) **179** in kleinen Portionen eingetragen. Dabei war zu beachten, dass die Temperatur nicht über 30 °C anstieg. Nach beendeter Reaktion entfernte man das Eisbad und ließ die nun dunkelgelbe Reaktionsmischung noch eine Stunde bei RT rühren. Anschließend gab man die klare Lösung vorsichtig auf etwa 1000 ml Eiswasser. Der dabei ausgefallene schwachgelbe Feststoff wurde abgesaugt, mehrmals gründlich mit Wasser gewaschen und zweimal aus EtOH umkristallisiert. Das nitrierte Produkt **180** konnte in Form farbloser Plättchen erhalten werden.

Ausbeute: 15.63 g (60 %)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:2; R_f = 0.43

Schmelzpunkt: 194-195 °C (EtOH)

Lit.: 194.5-195 °C^[88]

IR (KBr): 3327 (m), 3104 (w), 3012 (w), 2720 (w), 1958 (w), 1867 (w), 1791 (m), 1734 (s), 1705 (s), 1621 (m), 1545 (s), 1466 (w), 1431 (w), 1412 (w), 1375 (w), 1348 (s), 1307 (s), 1257 (w), 1172 (w), 1138 (w), 1110 (m), 1075 (m), 1030 (m), 937 (w), 900 (w), 865 (w), 800 (w), 762 (w), 755 (w), 720 (s), 688 (w), 665 (w), 651 (w), 606 (w), 556 (w)

¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆)

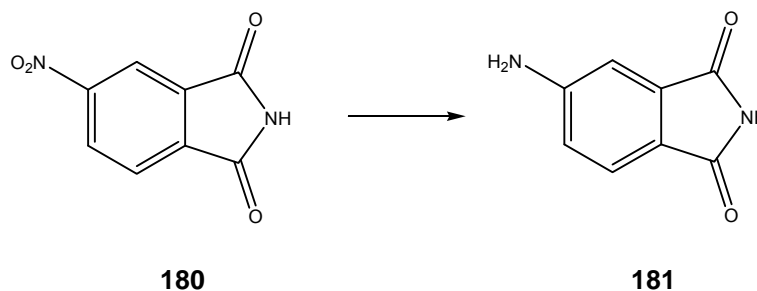
11.83 (s, br, 1H, NH, austauschbar mit D₂O), 8.60 (dd, J₁ = 8.1 Hz, J₂ = 2.0 Hz, 1H, H-C(6)), 8.43 (d, J = 1.6 Hz, 1H, H-C(4)), 8.10 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-C(7))

Elementaranalyse: (%) für C₈H₄N₂O₄ (192.13)

ber.: C 50.01 H 2.10 N 14.58

gef.: C 49.74 H 2.15 N 14.31

9.3.63 Synthese von 5-Amino-isoindol-1,3-dion



In einem einseitig verschlossenen Quarzglasrohr wurden 2.0 g (10.4 mmol) der Verbindung **180** in 30 ml AcOEt suspendiert. Nach Zugabe von 30 mg Pd/C überführte man die Hülse in eine zuvor mit Argon gespülte Druckapparatur. Der Ansatz wurde nun über Nacht bei einem Wasserstoffgasdruck von 40 bar und einer Temperatur von 40 °C gerührt. Nachdem sich kein Edukt mehr nachweisen ließ, entfernte man das Lösungsmittel im Vakuum und reinigte das Rohprodukt an 30 g Flashkieselgel (Eluent: AcOEt) auf. Der erhaltene gelbe Feststoff wurde aus EtOH umkristallisiert. Das Produkt **181** wurde in Form eines gelben Pulvers erhalten.

Ausbeute: 1.32 g (77 %)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:2; $R_f = 0.10$

Schmelzpunkt: 277-278 °C (EtOH)

Lit.: 278 °C^[89]

IR (KBr): 3445 (m), 3351 (m), 3236 (m), 3058 (w), 2932 (w), 2848 (w), 2702 (w), 1759 (m), 1712 (s), 1644 (m), 1612 (m), 1581 (m), 1503 (m), 1477 (w), 1382 (m), 1346 (m), 1320 (m), 1257 (w), 1183 (w), 1142 (w), 1110 (w), 1068 (w), 1037 (m), 916 (w), 854 (w), 838 (w), 749 (m), 655 (w), 566 (w)

¹H-NMR: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

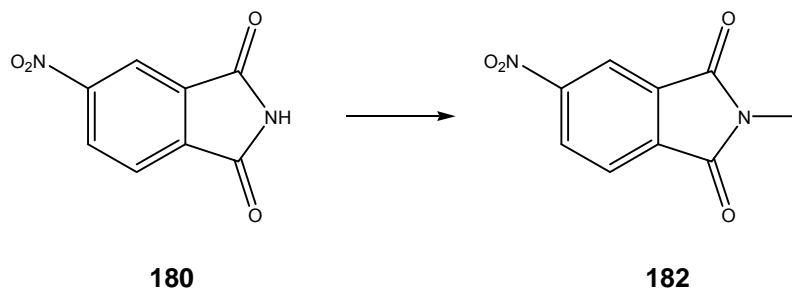
10.71 (s, br, 1H, NH, austauschbar mit D₂O), 7.42 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-C(7)), 6.85 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H-C(4)), 6.78 (dd, J₁ = 8.20 Hz, J₂ = 2.0 Hz, 1H, H-C(6)), 6.38 (s, br, 2H, NH₂, austauschbar mit D₂O)

Elementaranalyse: (%) für C₈H₆N₂O₂ (162.15)

ber.: C 59.26 H 3.73 N 17.28

gef.: C 59.51 H 3.88 N 17.01

9.3.64 Synthese von 2-Methyl-5-nitro-isoindol-1,3-dion



In einem 250 ml Rundkolben wurden 2.0 g (10.4 mmol) **180** und 0.90 g (6.5 mmol) wasserfreies K_2CO_3 in 20 ml DMF suspendiert. Nach der Zugabe von 3 ml (4.6 eq., 48.2 mmol, 6.8 g) MeI verfärbte sich die Mischung dunkelrot. Nun erwärmte man für 2 Stunden auf 135-135 °C. Nach dem Erkalten gab man die Mischung auf 100 ml Eiswasser. Der ausgefallene blassgelbe Feststoff **182** wurde abfiltriert und zur Aufreinigung aus EtOH/H₂O umkristallisiert.

Ausbeute: 1.91 g (89%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:5; $R_f = 0.2$

Schmelzpunkt: 178-179 °C (EtOH/H₂O)

Lit.: 177-178 °C^[90]

IR (KBr): 3456 (w), 3100 (w), 3058 (w), 2942 (w), 2869 (w), 1979 (w), 1885 (w), 1770 (w), 1707 (s), 1618 (w), 1529 (s), 1440 (m), 1388 (m), 1340 (m), 1267 (m), 1246 (w), 1194 (w), 1168 (w), 1105 (w), 1063 (m), 1011 (s), 974 (w), 948 (w), 906 (w), 875 (w), 827 (m), 759 (w), 723 (s), 613 (w), 592 (w)

¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆)

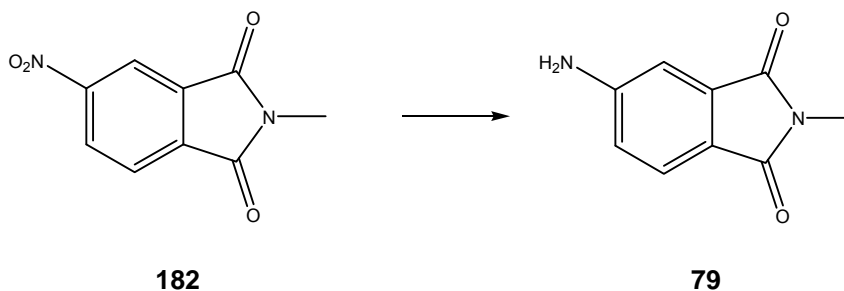
8.61 (dd, $J_1 = 8.1$ Hz, $J_2 = 2.0$ Hz, 1H, H-C(6)), 8.47 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-C(4)), 8.10 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-C(7)), 3.08 (s, 3H, CH₃)

Elementaranalyse: (%) für C₉H₆N₂O₄ (206.15)

ber.: C 52.43 H 2.93 N 13.59

gef.: C 52.36 H 2.98 N 13.42

9.3.65 Synthese von 5-Amino-2-methyl-isoindol-1,3-dion



1.65 g (8.0 mmol) **182** wurden in einer Mischung aus 20 ml AcOEt und 30 ml MeOH suspendiert und in ein einseitig verschlossenes Quarzrohr überführt. Nach Zugabe von 20 mg Pd/C überführte man den Reaktionsansatz in eine Druckapparatur und rührte die Mischung über Nacht bei einer Temperatur von 40 °C und einem Wasserstoffgasdruck von 20 bar. Die gelbe Lösung wurde über Celite® abfiltriert, der Filterkuchen gründlich mit AcOEt nachgewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Umkristallisation des leicht bräunlichen Rückstandes aus THF ergab das Produkt **79** in Form gelber Kristalle.

Ausbeute: 1.15 g (82%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:2; $R_f = 0.23$

Schmelzpunkt: 240-242 °C (THF)

Lit.: 247 °C^[91]

IR (KBr): 3466 (s), 3361 (s), 3204 (w), 3058 (w), 2953 (w), 1916 (w), 1754 (s), 1686 (s), 1613 (s), 1497 (m), 1471 (w), 1429 (s), 1382 (s), 1325 (s), 1267 (m), 1246 (m), 1157 (w), 1105 (w), 1073 (w), 1011 (s), 984 (m), 890 (w), 838 (m), 796 (m), 738 (s), 717 (w), 686 (w), 655 (w), 608 (w), 550 (w)

¹H-NMR: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

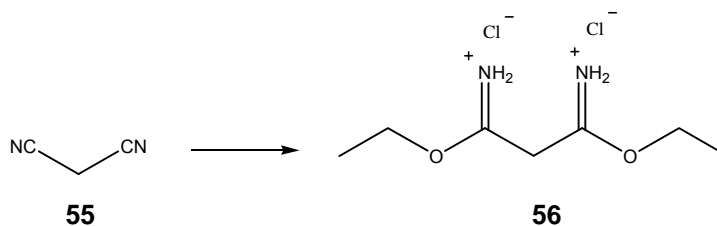
7.46 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-C(7)), 6.90 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-C(4)), 6.79-6.74 (m, 1H, H-C(6)), 6.42 (s, br, 2H, NH₂, austauschbar mit D₂O), 2.94 (s, 3H, CH₃)

Elementaranalyse: (%) für C₉H₈N₂O₂ (176.17)

ber.: C 61.36 H 4.58 N 15.90

gef.: C 61.13 H 4.58 N 15.80

9.3.66 Synthese von Malondiimidsäure-diethylester-dihydrochlorid



In einem 2 l Dreihalskolben legte man 800 ml Dioxan und 38.4 ml abs. EtOH (2.2 eq.; 660 mmol, 30.4 g) vor. Unter Eisbadkühlung und einem konstanten Gasstrom an HCl tropfte man über einen Zeitraum von zwölf Stunden eine Lösung von 19.8 g (1.0 eq., 300 mmol) **55** in 800 ml Dioxan dazu. Während der Reaktion fiel aus der Lösung ein farbloser Niederschlag aus. Nach beendeter Zugabe wurde noch eine Stunde HCl-Gas eingeleitet, anschließend filtrierte man den farblosen, kristallinen Niederschlag ab, wusch mit wenig Dioxan nach und trocknete den Niederschlag **56** dann im Ölpumpenvakuum.

Ausbeute: 61.76 g (89%)

DC: AcOEt/MeOH 3:1; $R_f = 0.22$ (färbt mit Ninhydrin beim Erwärmen rötlich an)

Schmelzpunkt: 125-126 °C Lit.: 122 °C^[92]

IR (KBr): 2830 (s), 2512 (w), 2280 (w), 2227 (w), 2110 (w), 2026 (w), 1955 (w), 1897 (w), 1743 (w), 1669 (s), 1574 (s), 1463 (s), 1442 (s), 1389 (s), 1357 (s), 1294 (m), 1204 (m), 1140 (s), 1093 (s), 1003 (s), 945 (s), 903 (s), 850 (w), 823 (s), 728 (w), 633 (s),

¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆)

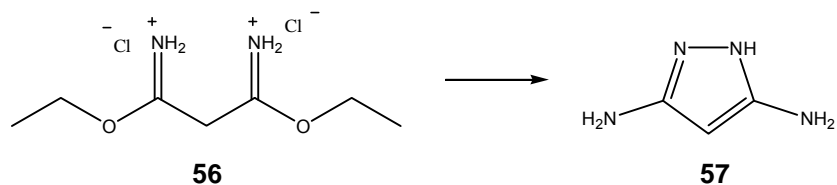
8.34 (s, br, 4H, NH₂, austauschbar mit D₂O), 4.46 (s, br, 2H, -(EtO)C-CH₂-C(OEt)-), 4.21 (q, J = 6.8 Hz, 4H, O-CH₂), 1.30 (t, J = 7.0 Hz, 6H, O-CH₂CH₃)

Elementaranalyse: (%) für C₇H₁₆Cl₂N₂O₂ (231.12)

ber.: C 36.38 H 6.98 N 12.12

gef.: C 36.55 H 6.92 N 12.31

9.3.67 Synthese von 1H-Pyrazol-3,5-diamin



23.0 g (99.5 mmol) **56** wurden in 400 ml eiskaltem Diethylether suspendiert. Zu dieser Suspension gab man langsam so lange wässrige, gesättigte Na₂CO₃-Lösung hinzu, bis keine Gasentwicklung mehr zu erkennen war und sich zwei klare Phasen gebildet hatten. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase noch dreimal mit jeweils 50 ml kaltem Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel dann im Vakuum entfernt. Es verblieben 11.52 g eines leicht gelben Öles. Dieses Öl wurde nun langsam zu einer Mischung aus 50 ml abs. EtOH und 2.3 ml Hydrazin (wasserfrei) zugetropft, so dass die Mischung bei RT gelinde siedete. Nach beendeter Zugabe kühlte man den Ansatz in einem Eis/Kochsalz-Bad ab, wobei sich aus der Lösung ein Feststoff ausschied. Zur Vervollständigung der Kristallisation ließ man noch eine Stunde im Kältebad, filtrierte den Feststoff dann ab und kristallisierte aus Isopropanol um. Das Produkt **57** wurde in Form bräunlicher Kristalle erhalten.

Ausbeute: 5.14 g (71%)

DC: AcOEt/EtOH:H₂O:AcOH 15:5:4:1, R_f = 0.15

Schmelzpunkt: 109-110°C (Isopropanol)

Lit.: 110 °C^[48]

IR (KBr): 3361 (w), 2932 (w), 2775 (w), 2440 (w), 1806 (w), 1586 (s), 1529 (s), 1497 (s), 1429 (s), 1367 (s), 1189 (m), 1068 (s), 995 (s), 801 (w), 738 (m), 691 (w), 613 (w), 586 (w)

¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆)

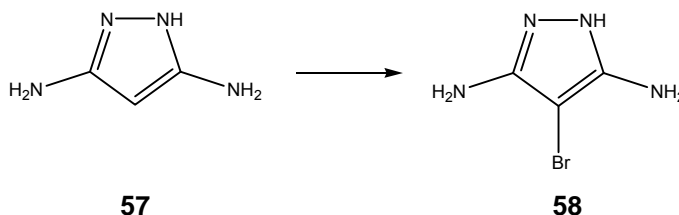
9.90 (s, br, 1H, NH, austauschbar mit D₂O), 4.56 (s, 1H, H-C(4)), 4.41 (s, br, 4H, NH₂-Gruppen, tauschen nach Zugabe von D₂O aus)

Elementaranalyse: (%) für C₃H₆N₄ (98.11)

ber.: C 36.73 H 6.16 N 57.11

gef.: C 36.86 H 6.22 N 57.16

9.3.68 Synthese von 4-Brom-1H-pyrazol-3,5-diamin



0.98 g (9.98 mmol) **57** wurden in 50 ml Wasser gelöst. Unter intensivem Rühren tropfte man nun langsam eine Lösung von 0.5 ml (1.0 eq., 1.6 g, 10.0 mmol) Brom in 150 ml Wasser dazu. Nach beendeter Zugabe erwärmte man die schwarzbraune Lösung für drei Stunden auf 80 °C. Nach dem Erkalten gab man eine Spatelspitze Aktivkohle dazu und rührte den Ansatz 10 Minuten bei RT, bevor man über Celite[®] abfiltrierte. Man wusch mit Wasser nach und neutralisierte das dunkelgelbe Filtrat anschließend mit gesättigter Na₂CO₃-Lösung. Die Reaktionsmischung wurde nun zur Trockne eingeeengt und der verbliebene, gelbliche Rückstand dann mehrmals in Ethanol aufgeköcht und heiß filtriert. Die Ethanolauszüge wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde dreimal aus Ethanol umkristallisiert. Man erhielt **58** in Form von gelben Kristallen.

Ausbeute: 1.25 g (71%)

DC: AcOEt/EtOH/H₂O/AcOH 20:2:2:1; R_f = 0.15 (färbt mit Ninhydrin rötlich an)

Schmelzpunkt: 133-134 °C (EtOH) Lit.: 133-134 °C^[48]

IR (KBr): 3414 (w), 3372 (w), 3288 (w), 3162 (w), 2942 (w), 2869 (w), 2785 (w), 1618 (s), 1592 (w), 1508 (s), 1450 (w), 1356 (w), 1142 (w), 1037 (s), 792 (w), 697 (m), 623 (m)

¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆)

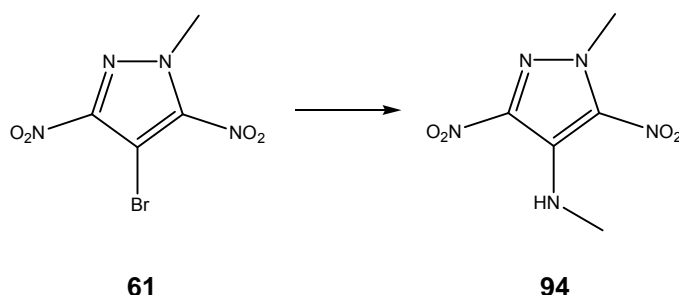
10.44 (s, br, 1H, NH, tauscht mit D₂O aus), 4.60 (s, br, 4H, NH₂, tauscht mit D₂O aus)

Elementaranalyse: (%) für C₃H₅BrN₄ (177.00)

ber.: C 20.36 H 2.85 N 31.65

gef.: C 20.34 H 2.96 N 31.45

9.3.69 Synthese von Methyl-(1-methyl)-3,5-dinitro-1H-pyrazol-4-yl)-amin



200 mg (0.79 mmol) der bromierten Verbindung **61** wurden in 5 ml DMSO gelöst. Man erwärmte diese Lösung auf 50-60°C und gab dann 0.2 ml (3.0 eq., 2.4 mmol, 0.074 g) einer 41%igen wässrigen Methylaminlösung dazu. Dabei verfärbte sich die Lösung intensiv gelb. Die klare, gelbe Lösung wurde nun 3 Stunden bei RT gerührt und gab den Ansatz dann auf 100 ml Eiswasser. Der ausgefallene gelbe Niederschlag wurde abgesaugt, mit Wasser nachgewaschen und aus wenig EtOH umkristallisiert. Das Produkt **94** wurde in Form von gelben Kristallen erhalten.

Ausbeute: 80 mg (50%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:5; $R_f = 0.42$

Schmelzpunkt: 114-115 °C (EtOH)

IR (KBr): 3361 (m), 3319 (m), 2942 (w), 1613 (s), 1524 (m), 1477 (m), 1440 (m), 1403 (w), 1361 (w), 1330 (w), 1304 (s), 1220 (w), 1162 (w), 1136 (w), 1068 (w), 1026 (m), 890 (m), 827 (w), 775 (m), 749 (m), 660 (w), 618 (w), 597 (w)

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

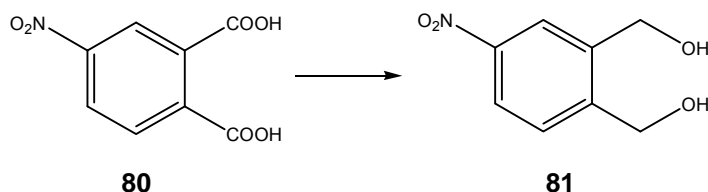
7.25 (s, br, 1H, NH, austauschbar mit D_2O), 4.16 (s, 3H, N- CH_3), 2.94 (d, J = 4.14 Hz, 3H, NH- CH_3)

Elementaranalyse: (%) für $\text{C}_5\text{H}_7\text{N}_5\text{O}_4$ (201.14)

ber.: C 29.86 H 3.51 N 34.82

gef.: C 29.90 H 3.52 N 34.59

9.3.70 Synthese von (2-Hydroxymethyl-4-nitro-phenyl)-methanol



Zu einer Suspension von 1.43 g (37.9 mmol, 4.0 eq.) NaBH₄ in 30 ml THF tropfte man bei RT eine Lösung von 2.0 g (9.5 mmol) **80** in 40 ml THF innerhalb einer Stunde zu. Nach beendeter Gasentwicklung gab man eine Lösung von 2.4 g (9.5 mmol) Iod in 30 ml THF langsam zu. Nach beendeter Zugabe verfärbte sich die Lösung dunkelgelb. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei RT gerührt. Nach Zugabe von 15 ml 3N HCl überführte man das Reaktionsgemisch in einen Scheidetrichter und trennte die Phasen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit jeweils 100 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten Etherphasen wurden nun dreimal mit jeweils 50 ml 3N NaOH gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, mit der THF-Phase vereinigt und das Lösungsmittel dann im Vakuum entfernt. Es wurde ein schwach gelber Feststoff erhalten, der zur Aufreinigung chromatographiert wird. (Eluent: AcOEt/n-Hexan 3:1). Anschließendes Umkristallisieren aus Chloroform ergab das Produkt in Form eines bräunlichen Feststoffes **81**.

Ausbeute: 550 mg (32%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:1; R_f = 0.16

Schmelzpunkt: 86-87 °C (CHCl₃)

Lit.: 88 °C^[93]

IR (KBr): 3257 (s), 2932 (w), 2859 (w), 2649 (w), 1613 (w), 1586 (w), 1524 (s), 1456 (w), 1424 (w), 1340 (s), 1257 (w), 1215 (w), 1173 (m), 1126 (w), 1084 (m), 1032 (s), 990 (w), 958 (w), 927 (w), 895 (m), 838 (m), 812 (m), 738 (s), 697 (w), 655 (w), 618 (w)

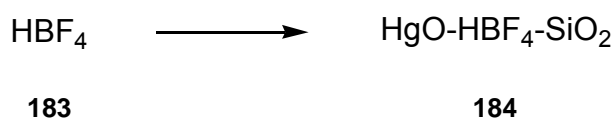
¹H-NMR: (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d₆)

8.25 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H-C(3)), 8.12 (dd, J₁ = 8.4 Hz, J₂ = 2.5 Hz, 1H, H-C(5)), 7.69 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-C(6)), 5.47 (m, 2H, OH, austauschbar mit D₂O), 4.59 (s, br, 4H, CH₂)

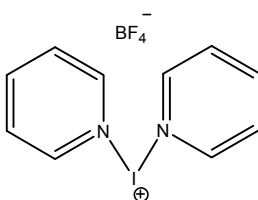
Elementaranalyse: (%) für C₈H₉NO₄(183.16)

ber.: C 52.46 H 4.95 N 7.65

gef.: C 52.39 H 4.91 N 7.51

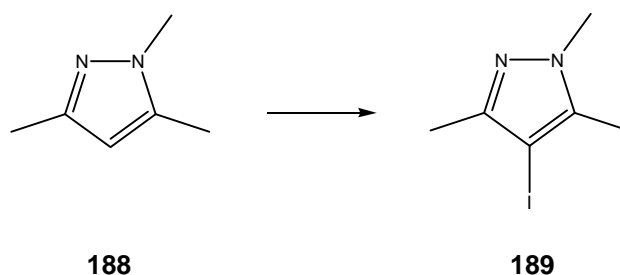
9.3.71 Synthese von Bis(pyridin)iodonium(I)tetrafluoroborat**a) Herstellung des Quecksilber(II)oxid-HBF₄-Kieselgel-Komplexes**

Zu 3.9 ml (5.0 g; 20.0 mmol,) einer 32 %igen Borfluorwasserstoffsäure-Lösung **183** gab man 2.16 g (10.0 mmol) Quecksilber(II)-oxid. Diese gelbe Lösung wurde an 2.16 g Kiesegel 60 (Merck) adsorbiert. Der so entstandene gelbe Feststoff **184** wurde im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

b) Synthese von Bis(pyridin)iodonium(I)tetrafluoroborat**185**

Zu einer Mischung aus 30 ml Methylenchlorid, 3.2 ml (40.00 mmol) Pyridin und 6.10 g (20 mmol) **184** gab man innerhalb einer Stunde 5.10 g (20 mmol) Jod. Man ließ die dunkelbraune Lösung eine Stunde Rühren, filtrierte dann von dem ausgefallenen Feststoff ab und wusch den Filterkuchen jeweils 3 Mal mit 50 ml Methylenchlorid. Das Filtrat wurde bis zur Hälfte des Volumens eingeeengt und das Produkt dann durch Zugabe von Diethylether zur Kristallisation gebracht. Das Rohprodukt wurde abfiltriert, erneut in CH₂Cl₂ gelöst und mit Diethylether gefällt. Diesen Vorgang wiederholte man so oft, bis der Test auf Hg²⁺-Ionen negativ war. Der farblose Feststoff **185** wurde im Ölpumpenvakuum in Dunkelheit getrocknet.

9.3.73 Synthese von 4-Iod-1,3,5-trimethyl-1H-pyrazol



250 mg (2.3 mmol) des trimethylierten Pyrazols **188** wurden in 5 ml DMSO gelöst. Zu dieser schwach gelben Lösung gab man unter Rühren 0.93 g (1.1 eq., 2.5 mmol) **185**. Die Lösung verfärbte sich rötlich-braun. Die Mischung wurde für 2 Stunden bei RT gerührt. Anschließend entfernte man das Lösungsmittel im Vakuum am Kugelrohr. Der verbliebene braune Rückstand wurde chromatographisch (Eluent: AcOEt/n-Hexan 1:2) aufgereinigt. Das so erhaltene noch leicht verunreinigte Rohprodukt wurde zur vollständigen Reinigung aus EtOH umkristallisiert. So konnten 360 mg des Produktes **189** in Form eines hellgelben Pulvers erhalten werden.

Ausbeute: 360 mg (67%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:5; $R_f = 0.27$

Schmelzpunkt: 70-71 °C (EtOH)

Lit.: 71-72 °C^[96]

IR (KBr): 3424 (w), 2922 (m), 1644 (w), 1529 (s), 1482 (w), 1456 (m), 1408 (m), 1375 (s), 1356 (m), 1278 (s), 1173 (m), 1063 (s), 1032 (m), 1005 (w), 979 (m), 889 (w), 820 (s), 800 (w), 658 (s), 590 (m)

¹H-NMR: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

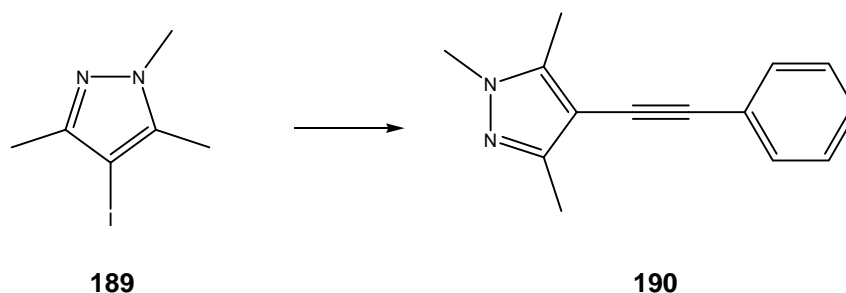
3.71 (s, 3H, N-CH₃), 2.20 (s, 3H, CH₃ an C(3) oder C(5)), 2.05 (s, 3H, CH₃ an C(5) oder C(3))

Elementaranalyse: (%) für C₆H₉IN₂ (236.05)

ber.: C 30.53 H 3.84 N 11.87

gef.: C 30.62 H 3.86 N 11.92

9.3.74 Synthese von 1,3,5-Trimethyl-4-phenylethynyl-1H-pyrazol



In einem 100 ml Dreihalskolben wurden 236 mg (1.0 mmol) **189** mit 181.1 mg (1.10 eq., 1.10 mmol) **187** in 10 ml Pyridin suspendiert. Die grüngelbe Suspension wurde nun unter Argon-Atmosphäre über einen Zeitraum von 8 Stunden zum Rückfluß erhitzt. Nach dem Erkalten gab man 50 ml dest. Wasser dazu und filtrierte den ausgefallenen Niederschlag ab. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt. (Eluent: Toluol). Das erhaltene Rohprodukt wurde aus wenig n-Hexan umkristallisiert. Es konnten 94 mg des Produktes **190** als gelblicher, kristalliner Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 94 mg (41%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:2; $R_f = 0.45$

Schmelzpunkt: 45- 47 °C (n-Hexan)

Lit.: 53-54 °C^[97]

IR (KBr): 2922 (m), 2210 (s), 1958 (w), 1890 (w), 1764 (w), 1597 (w), 1550 (s), 1492 (s), 1440 (m), 1382 (m), 1367 (w), 1309 (m), 1262 (w), 1173 (w), 1131 (w), 1105 (w), 1068 (w), 1026 (w), 995 (w), 916 (w), 859 (w), 801 (w), 759 (s), 691 (s), 634 (w), 587 (w), 555 (w)

¹H-NMR: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

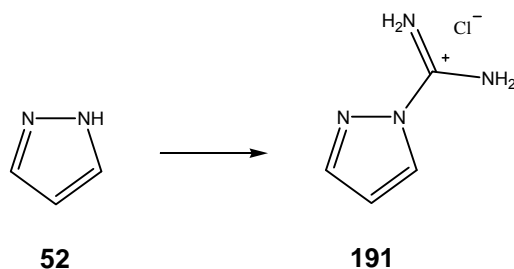
7.50-7.45 (m, 2H, Aromaten-H-Atome), 7.36-7.27 (m, 3H, Aromaten-H-Atome), 3.72 (s, 3H, N-CH₃), 2.34 (s, 3H, CH₃ an C(5)), 2.31 (s, 3H, CH₃ an C(3))

Elementaranalyse: (%) für C₁₄H₁₄N₂ (210.27)

ber.: C 79.97 H 6.71 N 13.32

gef.: C 80.00 H 6.82 N 13.32

9.3.75 Synthese von 1H-Pyrazol-1-carboxamidin, Salz mit Salzsäure



4.0 g (59 mmol) Pyrazol **52** und 2.46 g (1.0 eq., 59 mmol) Cyanamid wurden in 50 ml 1,4-Dioxan gelöst. Nach Zugabe von 5.8 ml (1.0 eq., 59 mmol, 2.14 g) konz. HCl wurde die nun trübe Lösung für 3 Stunden unter Argonatmosphäre auf 60-70 °C erwärmt. Man ließ auf RT abkühlen und engte den Ansatz auf etwa die Hälfte des Volumens ein. Dabei kristallisierte das Produkt langsam aus. Zur Vervollständigung der Kristallisation wurde der Ansatz über Nacht kalt gestellt. Der farblose Feststoff **191** wurde abgesaugt, mehrmals gründlich mit wasserfreiem Ether gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 6.90 g (80%)

DC: AcOEt/MeOH 1:1; $R_f = 0.45$

Schmelzpunkt: 166-168 °C (1,4-Dioxan/Ether) Lit.:167-168 °C^[98]

IR (KBr): 3322 (s), 3071 (w), 2767 (w), 1844 (w), 1803 (w), 1698 (s), 1666 (s), 1556 (s), 1410 (m), 1305 (m), 1216 (s), 1122 (m), 1101 (w), 1049 (m), 949 (s), 907 (m), 776 (s), 735 (w), 677 (w), 658 (s), 635 (s)

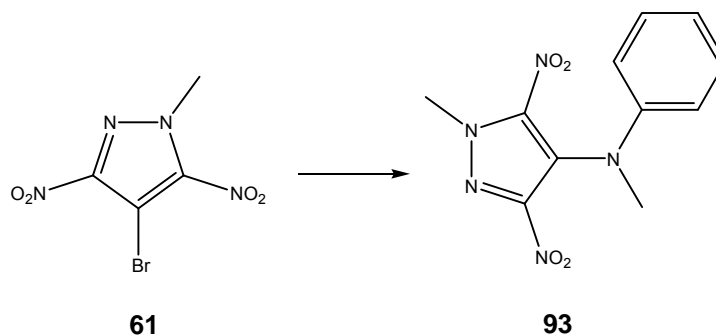
¹H-NMR: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

9.63 (s, br, 4H, NH, austauschbar mit D₂O), 8.93 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, H-C(5)), 8.10 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, H-C(3)), 6.80 (dd, $J_1 = 3$ Hz, $J_2 = 1.7$ Hz, 1H, H-C(4))

Elementaranalyse: (%) für C₄H₇ClN₄ (146.58)

ber.: C 32.78 H 4.81 N 38.22

gef.: C 32.50 H 4.68 N 38.06

9.3.76 Synthese von Methyl-(1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol-4-yl)-phenylamin

4.0 g (16 mmol) **61** wurden in 5 ml DMSO gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde auf 50-60 °C erwärmt. Bei dieser Temperatur tropfte man 5.1 ml (3.0 eq., 5.0 g 48.8 mmol) N-Methylanilin dazu. Die Reaktionslösung verfärbte sich dunkelrot-bräunlich. Nun erwärmte man den Ansatz für 5 Stunden auf 100 °C. Nach beendeter Reaktion entfernte man das Lösungsmittel im Vakuum am Kugelrohr und kristallisierte den Rückstand mehrmals aus EtOH um. Als Produkt konnten rote Kristalle von **93** gewonnen werden.

Ausbeute: 2.86 g (65%)

DC: AcOEt/n-Hexan 1:5; $R_f = 0.25$

Schmelzpunkt: 158-160 °C (EtOH)

IR (KBr): 3023 (w), 2960 (w), 2908 (w), 2751 (w), 1580 (w), 1532 (w), 1511 (m), 1491 (s), 1443 (m), 1422 (m), 1375 (m), 1318 (s), 1292 (m), 1234 (w), 1182 (w), 1140 (m), 1108 (m), 1093 (w), 1067 (w), 1046 (w), 1025 (w), 993 (w), 899 (s), 852 (s), 815 (w), 698 (m), 677 (w)

$^1\text{H-NMR}$: (δ [ppm], 250 MHz, DMSO- d_6)

7.21-7.15 (m, 2H, aromatische H-Atome, H-C(3) und H-C(5)), 6.83-6.76 (m, 3H, aromatische H-Atome, H-C(2), H-C(4) und H-C(6)), 4.28 (s, 3H, N-CH₃ (Pyrazolring)), 3.23 (s, 3H, N-CH₃)

Elementaranalyse: (%) für C₁₁H₁₁N₅O₄ (277.24)

ber.: C 47.66 H 4.00 N 25.26

gef.: C 47.70 H 3.95 N 24.99

10 Anhang

10.1 Abkürzungsverzeichnis

AcOEt	Essigsäureethylester
AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EP	externes Glycoprotein
eq.	Äquivalente
ESI-MS	Elektronensprayionisations-Massenspektrometrie
FRET	Fluoreszenz-Resonanz Energie Transfer
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
gp	Glycoprotein
HAART	High active antiretrovirale therapy
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IC ₅₀	half inhibition concentration
IN	Integrase
IR	Infrarot
LTR	long terminal repeats
MA	matrix
min.	mindestens
max.	maximal
NMR	nuklear magnetic resonance
nm	Nanometer
Nef	negative factor
PR	Protease
RFU	relative fluorescence units
RNA	Ribonukleinsäure
RRE	Rev responsive element
Rev	regulator of virion gene expression
R _f	Ratio of front

RT	Reverse Transkriptase, Raumtemperatur
TAR	Trans-Activation Responsive
THF	Tetrahydrofuran
TP	transmembranes Protein
Triton-X	Alkylphenylpolyethylenglycol
UV	Ultraviolett

10.2 FRET-Messungen

10.2.1 Experimentelle Bedingungen

Gerät: Tecan-Safire² (Microplate Reader)

Mikrotiterplatte: Corning 6860, black, non binding surface, 96-well,

Temperatur: 37°C

Puffer: TK Puffer (50 mM Tris-HCl, 20 mM KCl, 0.01% Triton-X 100)

pH: 7.4

Verstärkungsfaktor: 2.5 (min.) bis 2.7 (max.)

Gesamtvolumen im well: 100 µl

Absorptionswellenlänge: 489 nm

Emissionswellenlänge: 490 nm

Material: es wurde Nuklease-freies Material beim Umgang mit RNA verwendet

TAR-RNA: Firma Biospring, Frankfurt, Germany

Tat49-57-Peptid, dye-labelled: Firma Thermo Electron Corporation, Ulm, Germany

(Sequenz: Fluorescein-AAARKKRRQRRRAAAC-Rhodamin)

Schütteln: automatisch vor jeder Messung

Der Rückgang der Fluoreszenz, der mit dem Ersatz des Tat-Peptides durch einen Liganden einhergeht, wurde folgendermaßen bestimmt:

$$\frac{\text{Fluoreszenz}_{\text{Pot. Inhibitor}} - \text{Fluoreszenz}_{\text{Tat-Peptid}}}{\text{Fluoreszenz}_{\text{Tat-TAR-complex}} - \text{Fluoreszenz}_{\text{Tat-Peptid}}}$$

10.2.2 Graphiken der vermessenen Verbindungen

Endwert der Titration: 16931

Tat-TAR: 40698

RFU: $(40698+16931)/2 = 28815$

IC₅₀: ca. **400-600** μM

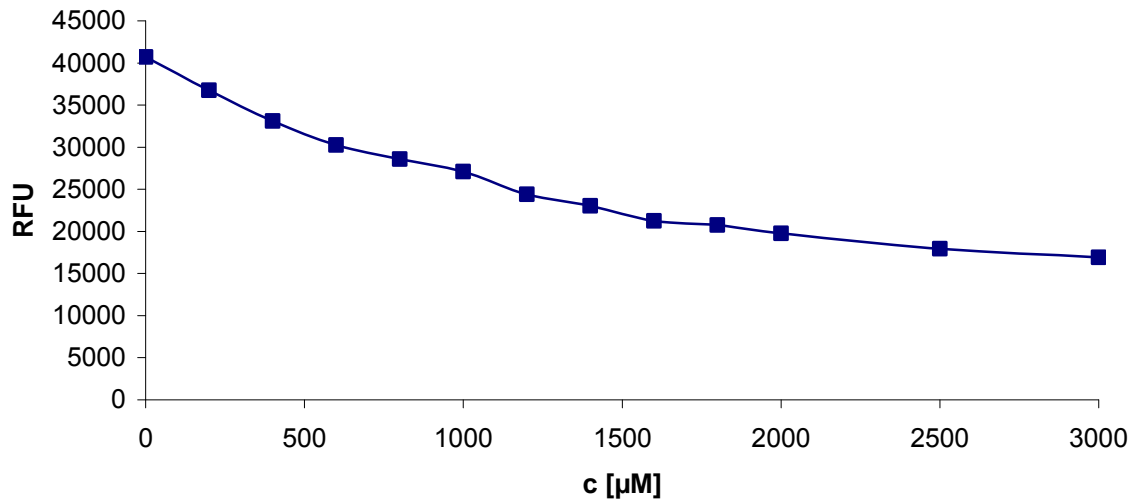


Abbildung 89: Fluoreszenztitration von Verbindung 98

Endwert der Titration: 20403

Tat-TAR: 40787

RFU: $(40787+20403)/2 = 30595$

IC₅₀: **8000** μM

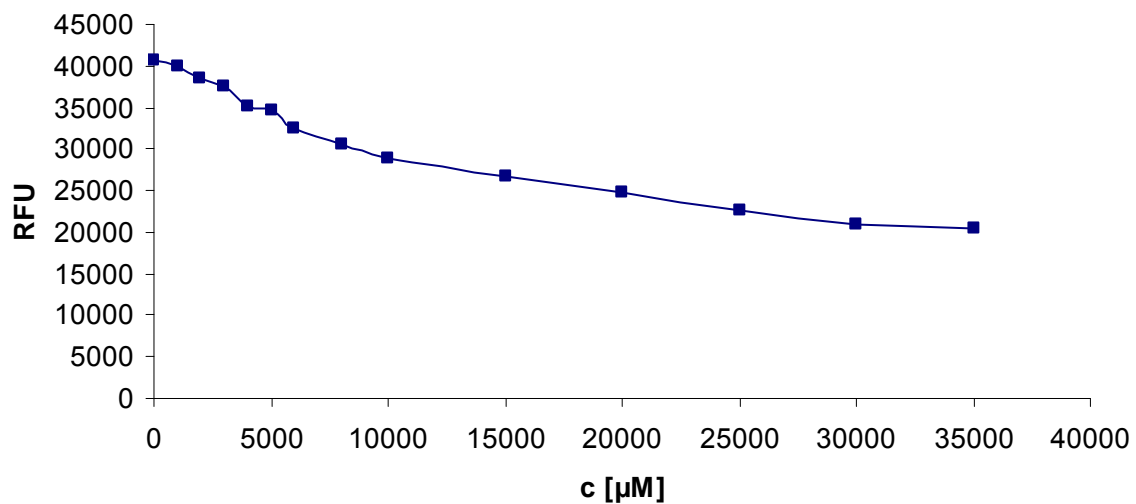


Abbildung 90: Fluoreszenztitration von Verbindung 58

Endwert der Titration: 26993
Tat-TAR: 42069
RFU: $(42069+26993)/2 = 34531$
IC₅₀: **600-700** μM

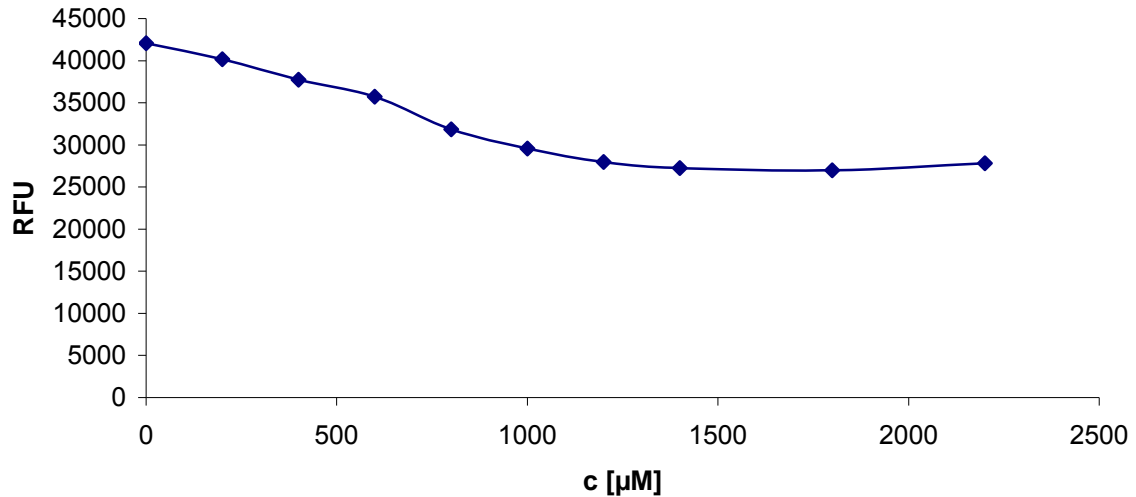


Abbildung 91: Fluoreszenztitration von Verbindung 151

Endwert der Titration: 31984
Tat-TAR: 44300
RFU: $(44300+31984)/2 = 38142$
IC₅₀: **700-800** μM (extrapoliert)

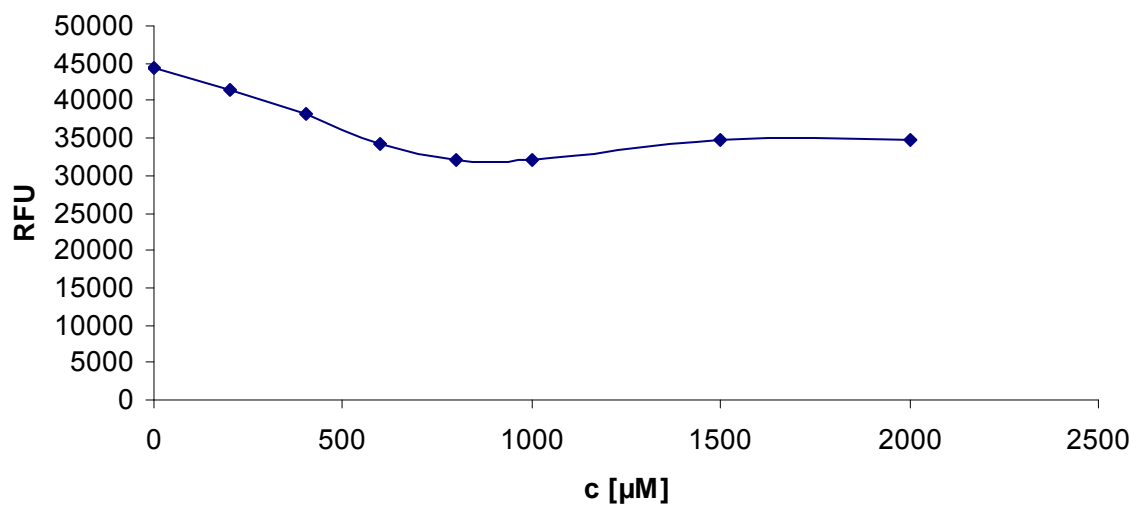


Abbildung 92: Fluoreszenztitration von Verbindung 147

10.3 UV-Spektren des Reoxidationsprozesses der Phenazine

Jede Reihe in der jeweils abgebildeten Legende rechts zeigt das Reoxidationsverhalten der reduzierten Phenazine. Dabei wurde für das jeweils durchgeführte Experiment ein Zeitfenster von bis zu 180 Minuten betrachtet. Die Messküvetten waren luftdicht verschlossen.

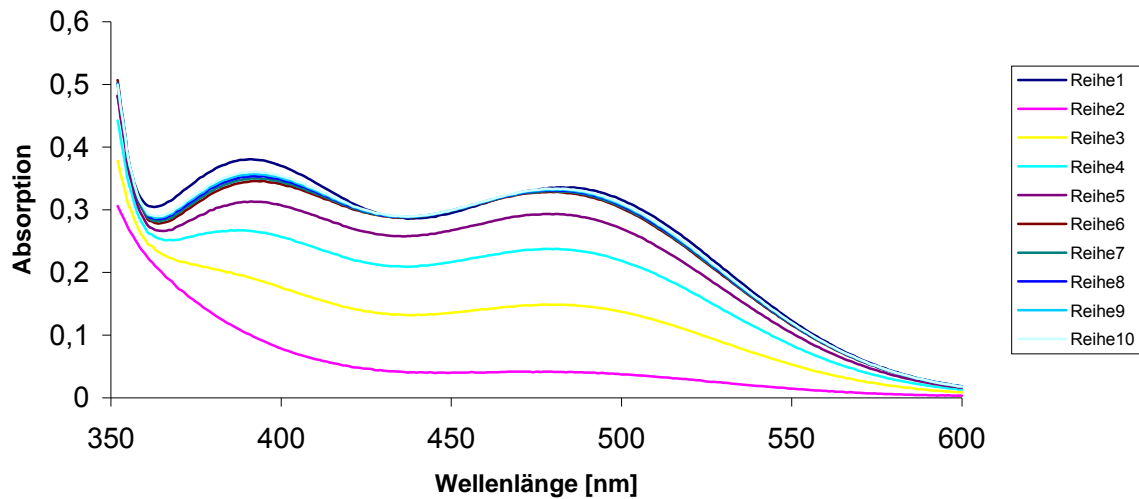


Abbildung 93: Gemessenes UV-Spektrum von Verbindung 96

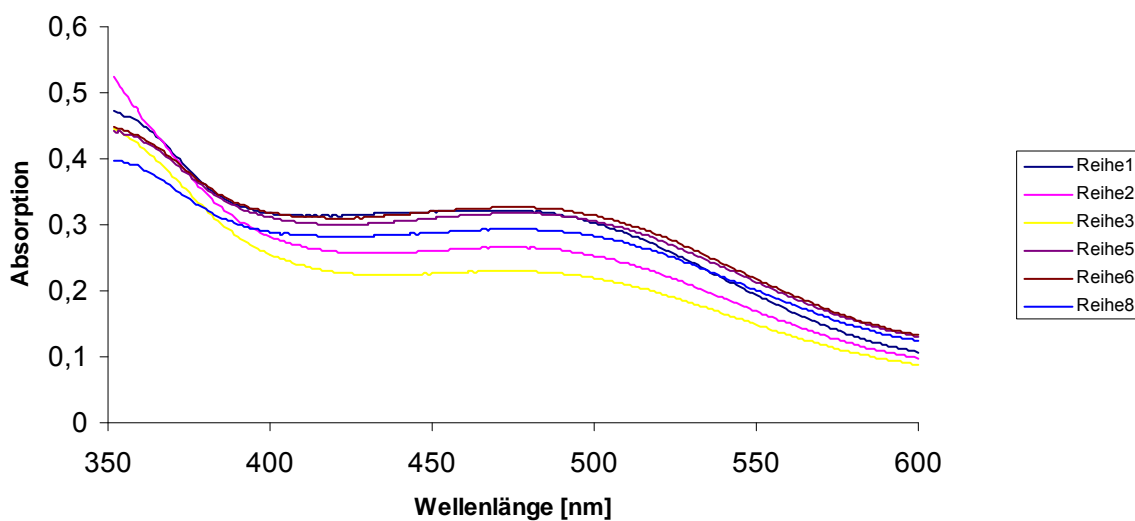


Abbildung 94: gemessenes UV-Spektrum von Verbindung 134

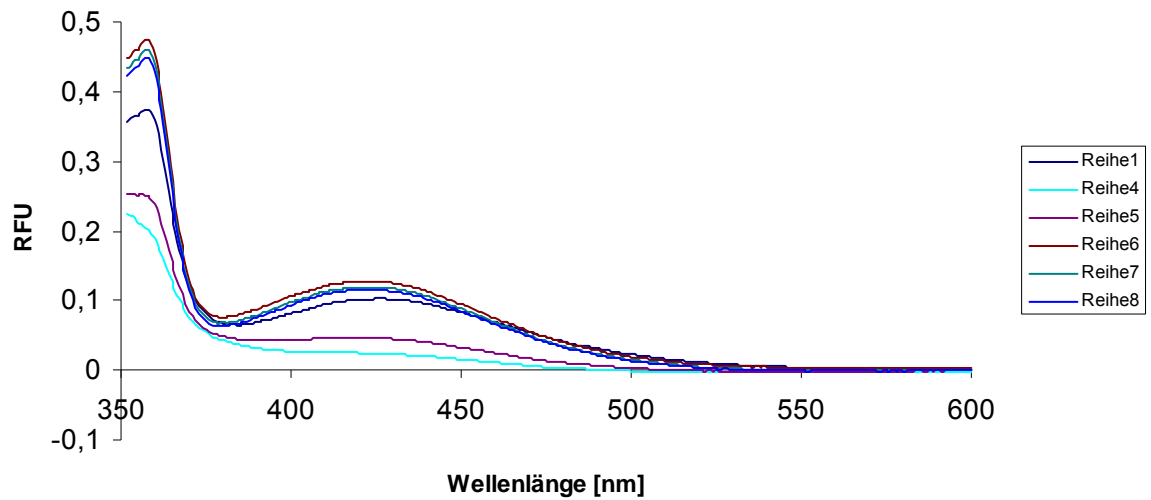


Abbildung 95: gemessenes UV-Spektrum von Verbindung 135

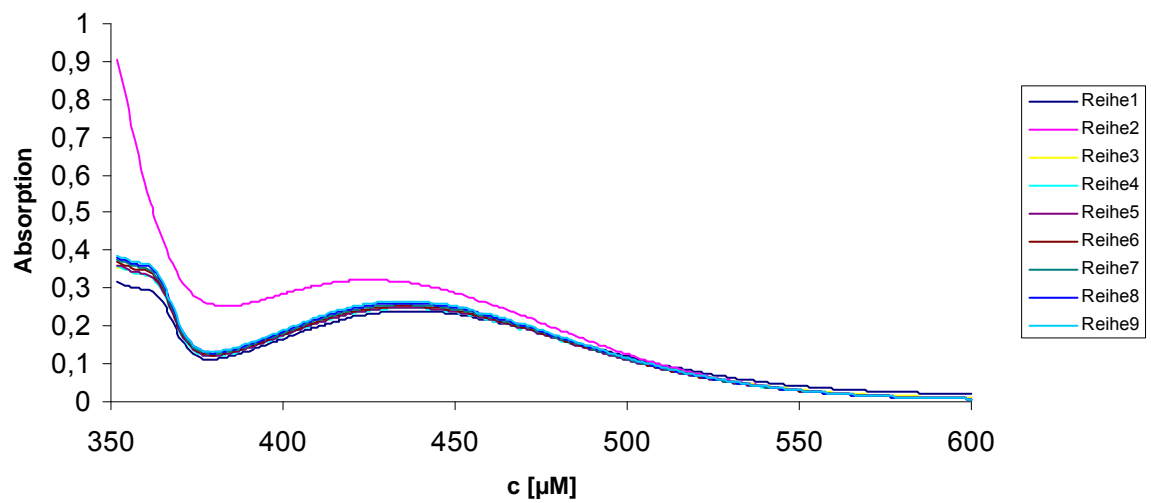


Abbildung 96: gemessenes UV-Spektrum von Verbindung 147

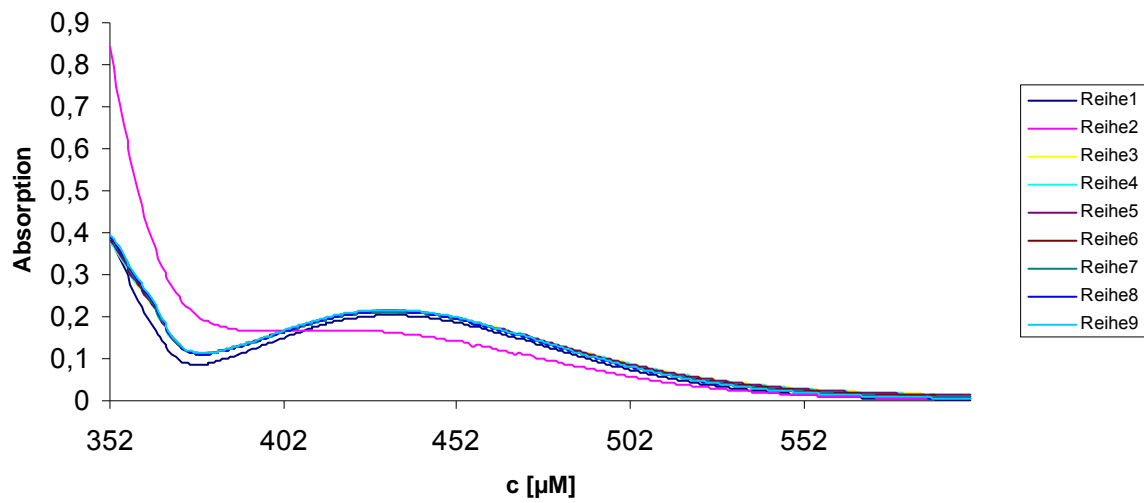


Abbildung 97: gemessenes UV-Spektrum von 151

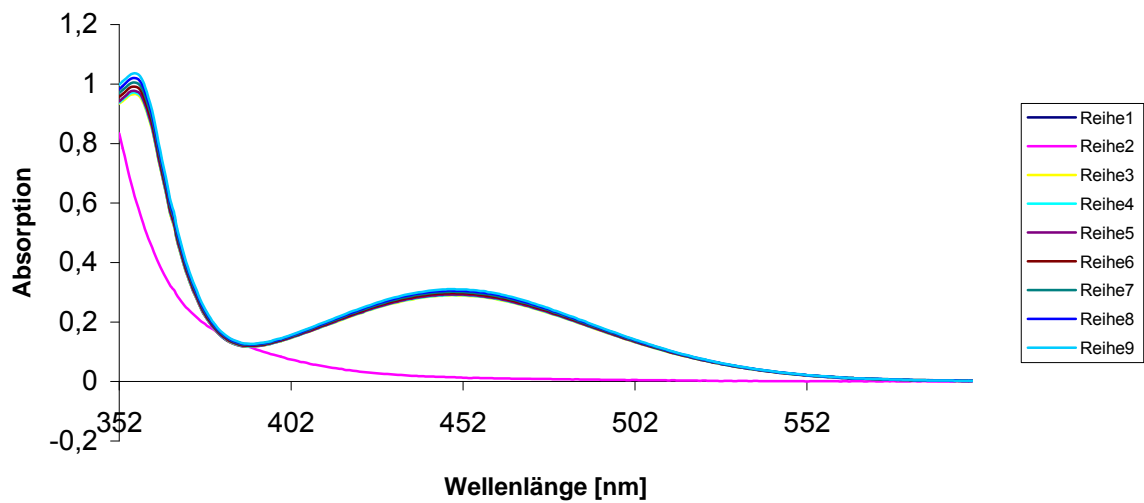


Abbildung 98: gemessenes UV-Spektrum von 99

10.4 Zellkulturuntersuchungen

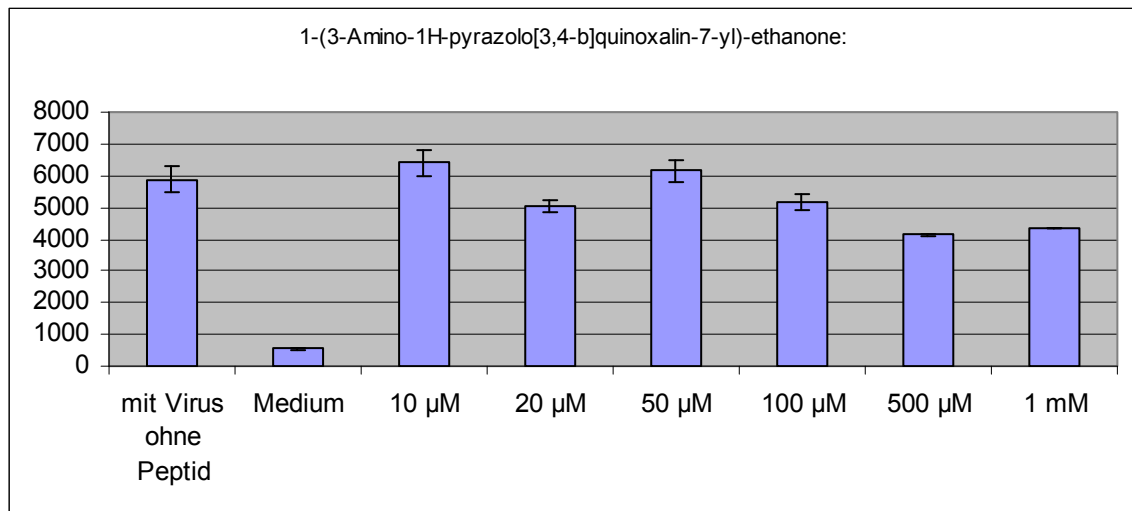


Abbildung 99: Hemmeffekte bedingt durch Verbindung 151

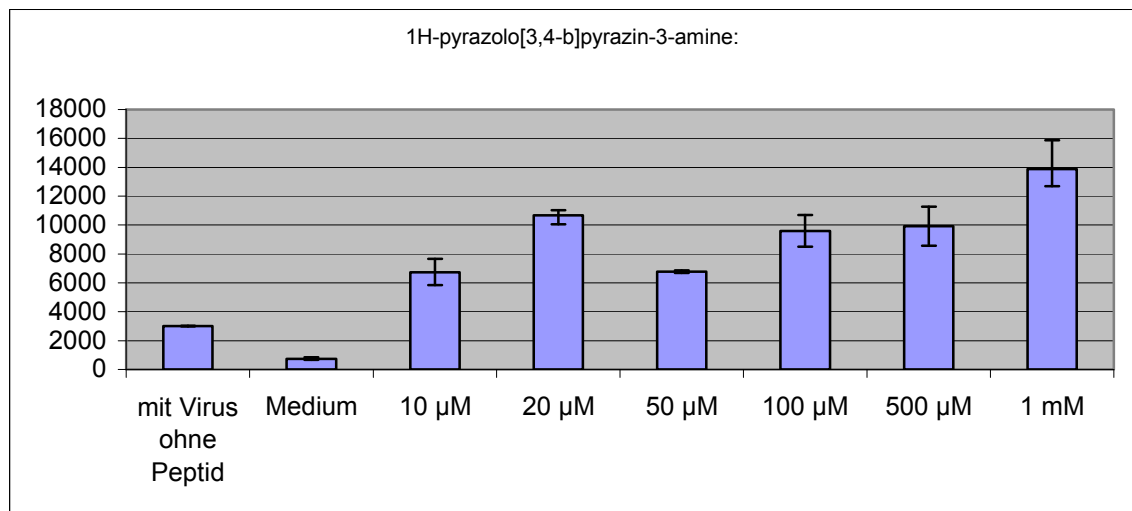


Abbildung 100: Hemmeffekte bedingt durch Verbindung 76

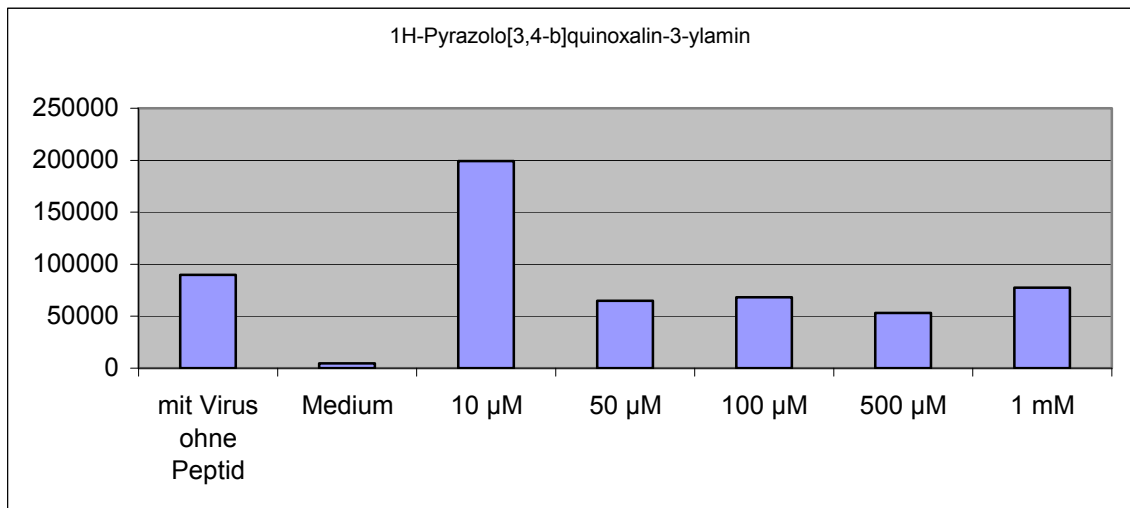


Abbildung 101: Hemmeffekte bedingt durch Verbindung 112

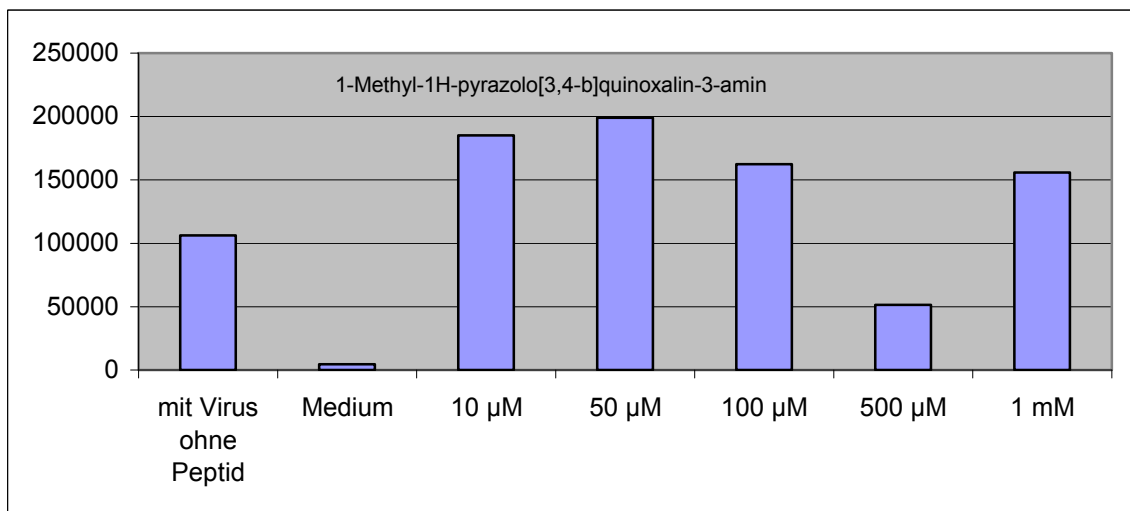


Abbildung 102: Hemmeffekte bedingt durch Verbindung 98

10.5 Literaturverzeichnis

- [1] www.rki.de
- [2] www.unaids.org/en/
- [3] www.hiv-info.de
- [4] www.kompetenznetz-hiv.de/./media/KompNet_Bilanz_2006.pdf
- [5] www.rki.de/cln_048/nn_196014/DE/Content/InfAZ/H/HIVAIDS/hiv_aids_wat.html
- [6] www.hiv.net
- [7] W. M. Esterl, *Biochemie-Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, Spektrum Akademischer Verlag, **2004**, 169
- [8] S. Richter, Y.-H. Ping, T. M. Rana, *PNAS* **2002**, 99, 7928-7933
- [9] B. Davis, M. Afsar, G. Varani, A. I. H. Murchie, J. Karn, G. Lentzen, M. Drysdale, J. Bower, A. J. Potter, I. D. Starkey, T. Swarbrick, F. Aboul-ela, *J. Mol. Biol.* **2004**, 336, 343-356
- [10] J. D. Puglisi, R. Tan, B. J. Calnan, A. D. Frankel, J. R. Williamson, *Science* **1992**, 257, 76-81
- [11] D. Puglisi, L. Chen., A. D. Frankel, J. R. Williamson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 3680-3684
- [12] B. J. Calnan, B. Tidor, S. Biancalana, D. Hudson, A. D. Frankel, *Science* **1991**, 252, 1167-1171
- [13] J. D. Puglisi, R. Tan, B. J. Calnan, A. D. Frankel, J. R. Williamson, *Science* **1992**, 257, 76-81
- [14] F. Aboul-ela, J. Karn, G. Varani, *J. Mol. Biol.* **1995**, 253, 313
- [15] www.hiv-info.de/index.jsp?nodeid=01_2
- [16] www.techfreep.com/images/hiv.jpg
- [17] S. Modrow, D. Falke, U. Truyen, *Molekulare Virologie*, Spektrum Akademischer Verlag, **2003**, 1-734
- [18] www.dkfz.de/de/f020/images/bosch/web_fig_1.jpg

- [19] S. Hwang, N. Tamilarasu, K. Kibler, H. Cao, A. Ali, Y.-H. Ping, K.-T. Jeang, T. M. Rana, *The Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 39092-39103
- [20] W. Preiser, H. F. Rabenau, H. W. Doerr, *Viren-Viruserkrankungen*, Zett-Verlag, Steinen, **2002**, 48
- [21] R. Nifosi, C. M. Reyes, P. A. Kollman, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 4944-4955
- [22] F. Aboul-ela, J. Karn, G. Varani, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 3974-3981
- [23] H.-Y. Mei, D. P. Mack, A. A. Galan, N. S. Halim, A. Heldsinger, J. A. Loo, D. W. Moreland, K. A. Sannes-Lowery, L. Sharmeen, H. N. Truong, A. W. Czarnik, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 1173-1184
- [24] M. Froeyen, P. Herdewijn, *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2002**, *2*, 1123-1145
- [25] A. S. Brodsky, J. R. Williamson, *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 624-639
- [26] C. Bailly, P. Colson, C. Houssier, F. Hamy, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 1460-1464
- [27] L. Dassonneville, F. Hamy, P. Colson, C. Houssier, C. Bailly, **1997**, *25*, 4487-4492
- [28] C. Mischiati, K.-T. Jeang, G. Feriotto, L. Breda, M. Borgatti, N. Bianchi, R. Gambari, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2001**, 209-217
- [29] A.V.Filikov, V.Mohan, T.A.Vickers, R.H.Griffey, P.D.Cook, R.A.Abagyan, T.L.James, *J.Comput.-Aided Mol.Des.* **2000**, *14*, 593-610
- [30] Z.Du, K.E.Lind, T.L.James, *Chem.Biol.* **2002**, *9*, 707-712
- [31] C. Parolin, B. Gatto, C. D. Vecchio, T. Pecere, E. Tramontano, V. Cecchetti, A. Fravolini, S. Masiero, M. Palumbo, G. Palu, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2003**, *47*, 889-896
- [32] A. Krebs, V. Ludwig, O. Boden, M. W. Göbel, *ChemBIOChem* **2003**, *10*, 972-978
- [33] H. Y. Mei, A. A. Galan, N. S. Halim, D. P. Mack, D. W. Moreland, K. B. Sanders, H. N. Truong, A. W. Czarnik, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2755-2760
- [34] A. Litovchick, A. G. Evokimov, A. Lapidot, *Biochemistry* **2000**, *39*, 2838-2852
- [35] A. Litovchick, A. G. Evdokimov, A. Lapidot, *FEBS Lett.* **1999**, *445*, 73-79
- [36] T. Hermann, E. Westhof, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1250-1261
- [37] C. Faber, H. Sticht, K. Schweimer, P. Rösch, *J. Biol. Chem.* **2000**, *27*, 20660-20666

- [38] E. Riguet, S. Tripathi, B. Chaubey, J. Desire, V. N. Pandey, J.-L. Decout, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4806-4809
- [39] F. Hamy, E. R. Felder, G. Heizmann, J. Lazdins, F. Aboul-Ela, G. Varani, J. Karn, T. Klimkait, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 3548-3553
- [40] I. Huq, Y. Ping, N. Tamilarasu, T. M. Rana, *Biochemistry* **1999**, *38*, 5172-5177
- [41] A. Garbesi, F. Hamy, M. Maffini, G. Albrecht, T. Klimkait, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 2886-2890
- [42] X. Wang, I. Huq, T. M. Rana, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6444-6445
- [43] N. Tamilarasu, I. Huq, T. M. Rana, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1597-1598
- [44] V. Kesavan, N. Tamilarasu, H. Cao, T. M. Rana, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 1171-1175
- [45] S. Hwang, N. Tamilarasu, K. Ryan, I. Huq, S. Richter, W. C. Still, T. M. Rana, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 12997-13002
- [46] N. Tamilarasu, I. Huq, T. M. Rana, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 971-974
- [47] O. Boden, Dissertation thesis, Goethe Universität Frankfurt am Main **2006**
- [48] J. A. Settepani, J. B. Stokes, *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 2606
- [49] M. K. Ehlert, S. J. Rettig, A. Storr, R. C. Thompson, J. Trotter, *Can. J. Chem.* **1991**, *69*, 432-439
- [50] T. Rosenau, A. Hofinger, A. Potthast, P. Kosma, *Organic Letters* **2004**, *6*, 541-544
- [51] R. Hüttel, F. Büchele, *Chem. Ber.* **1955**, *88*, 1586-1589
- [52] P. F. Pagoria, A. R. Mitchell, R. D. Schmidt, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2934-2935
- [53] M. Kocevar, B. Vercek, B. Stanovnik, M. Tisler, *Monatshefte für Chemie* **1982**, *113*, 731-744
- [54] A. I. Meyers, M. J. McKennon, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3568-3571
- [55] F. Avemaria, S. Vanderheiden, S. Bräse, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 6785-6796
- [56] M. G. Swanwick, W. A. Waters, *J. Am. Chem. Soc. D*, **1970**, *1*, 63-63
- [57] S. R. Challand, R. B. Herbert, F. G. Holliman, *J. Chem. Soc. D*, **1970**, 1423
- [58] G. W. Rewcastle, W. A. Denny, B. C. Baguley, *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 843-851

- [59] G. Englert, H. Prinzbach, *Zeitschrift für Naturforschung* **1962**, *17b*, 4-6
- [60] F. B. Mallory, S. L. Manatt, C. S. Wood, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 5433-5438
- [61] A. Monge, J. A. Palop, A. Pinol, F. J. Martinez-Crespo, S. Narro, M. Gonzalez, Y. Sainz, A. L. d. Cerain, *J. Heterocycl. Chem.* **1994**, *31*, 1135-1139
- [62] A. Monge, F. J. Martinez-Crespo, A. L. d. Cerain, J. A. Palop, S. Narro, V. Senador, A. Marin, Y. Sainz, M. Gonzalez, E. Hamilton, A. J. Barker, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4488-4494
- [63] C. Matsumoto, K. Hamasaki, H. Mihara, A. Ueno, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2000**, *10*, 1857-1861
- [64] H. Haken, H. C. Wolf, *Molekülphysik und Quantenchemie*, 4. ed., Springer Verlag, Heidelberg, **2002**,
- [65] M. Zeiger, Diplom thesis, Frankfurt am Main **2007**
- [66] A. V. Ivachtchenko, D. V. Kravchenko, V. I. Zheludeva, D. G. Pershin, *J. Heterocycl. Chem.* **2004**, *41*, 931-940
- [67] V. P. Perevalov, Y. A. Manaev, M. A. Andreeva, B. I. Stepanov, *J. Gen. Chem. USSR (Engl. Transl.)* **1985**, *55*, 787-789
- [68] C. H. Roeder, A. R. Day, *J. Org. Chem.* **1941**, *6*, 25-28
- [69] E.M.Essassi, M.Salem, P.Viallefont, *Bull.Soc.Chim.Fr.* **1987**, *5*, 890-892
- [70] Coburn, *J. Heterocycl. Chem.* **1971**, *8*, 153
- [71] Y. Kei, O. Hirota, *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 3361-3365
- [72] R. L. Clark, A. A. Pessolano, T. Y. Shen, D. P. Jacobus, H. Jones, *J. Med. Chem.* **1978**, *21*, 965-978
- [73] M. Kocevar, M. Tisler, B. Stanovnik, **1982**, *19*, 339-342
- [74] J. W. A. M. Janssen, H. J. Koeners, C. G. Kruse, C. L. Habraken, *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 1777-1782
- [75] R. D. Schmidt, G. S. Lee, P. F. Pagoria, A. R. Mitchell, *J. Heterocycl. Chem.* **2001**, 1227-1230
- [76] P. B. Ghosh, M. W. Whitehouse, *J. Med. Chem.* **1968**, *11*, 305-311

- [77] H. Dusouqui, *J. Chem. Soc. B* **1966**, 374
- [78] F. H. Case, S. Catino, F. Scholnik, *J. Org. Chem.* **1954**, *19*, 34-35
- [79] Blanksma, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.* **1902**, *21*, 421
- [80] A. J. Boulton, A. C. G. Gray, A. R. Katritzky, *J. Chem. Soc. B* **1967**, 909-911
- [81] A. Monge, J. A. Palop, A. L. d. Cerain, V. Senador, F. J. Martinez-Crespo, Y. Sainz, S. Narro, E. Garcia, C. d. Miguel, M. Gonzalez, E. Hamilton, A. J. Barker, E. D. Clarke, D. T. Greenhow, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1786-1792
- [82] F. Seng, K. Ley, *Angew. Chem.* **1972**, *84*, 1060-1062
- [83] M. A. Ortega, M. E. Montoya, B. Zarranz, A. Jaso, I. Aldana, S. Leclerc, L. Meijer, A. Monge, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2177-2184
- [84] U. Suminori, K. Kazuo, T. Kunihiko, N. Hideyo, O. Takashi, *Chem. Pharm. Bull.* **1969**, *17*, 596-604
- [85] J. P. Dirlam, J. E. Presslitz, *J. Med. Chem.* **1978**, *21*, 483-485
- [86] L. F. Levy, H. Stephen, *J. Chem. Soc.* **1931**, 79-82
- [87] E. H. White, K. Matsuo, *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 1921-1926
- [88] J. G. Young, W. Onyebuagu, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 2155-2159
- [89] Tamura, Yamagata, *Chem. Abstr.* **1964**, *61*, 14574
- [90] J. H. Billmann, R. V. Cash, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 2499-2501
- [91] Flitsch, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 2494-2499
- [92] S. M. McElvain, J. P. Schroeder, *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, *71*, 40-47
- [93] E.-G. Kleinschmidt, H. Braeuninger, *Phamazie* **1969**, *24*, 29-32
- [94] J. Barluenga, M. A. Rodriguez, P. J. Campos, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3104-3106
- [95] R. D. Stephens, C. E. Castro, *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 3313-3315
- [96] H. A. Stefani, C. M. P. Pereira, R. B. Almeida, R. C. Braga, K. P. Guzen, R. Cella, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 6833-6837
- [97] M. S. Yusubov, G. A. Zholobova, S. F. Vasilevsky, E. V. Tretyakov, D. W. Knight, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 1607-1610
- [98] M. S. Bernatowicz, Y. Wu, G. R. Matsueda, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2497-2502

10.6 Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Gunther Seifert

geboren am 18.06.1974 in Frankenthal (Pfalz)

ledig

SCHULAUSBILDUNG

07/1981-07/1985 Grundschule Mörsch

09/1985-06/1994 Staatliches Karolinen-Gymnasium Frankenthal
(Allgemeine Hochschulreife)

ZIVILDIENT

08/1994-10/1995 Zivildienst im Rettungsdienst und Krankentransport
Rettungswache Frankenthal

STUDIUM UND BERUFSAUFBILDUNG

10/1995-10/1998 Diplomchemiker-Vorprüfung

09/2002 Diplomchemiker-Hauptprüfung
Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. M. Göbel am Institut
für Organische Chemie und Chemische Biologie der J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main
Thema der Diplomarbeit:
„Molekulare Rezeptoren mit Benzimidazol-Grundgerüst“

seit 10/2002-2007 Promotion in Chemie bei Prof. Dr. M. Göbel am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main
Thema der Dissertation: „Synthese und Charakterisierung substituierter Pyrazole und Chinoxalinderivate als potenzielle Inhibitoren des Tat-TAR-Komplexes von HIV-1“

10.7 Publikationsverzeichnis

POSTER UND PUBLIKATIONEN

Poster G. Seifert, O. Boden, M. W. Göbel „Design heterozyklischer TAR-Liganden“

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Zuhilfenahme der genannten Literatur und der erwähnten Hilfsmittel angefertigt habe.

Frankfurt am Main, den.....

.....

(Gunther Seifert)