

**Rationales Design und Aufbau DNA- und Fluorophor-
markierter chemischer Sonden für G-Protein-gekoppelte
Rezeptoren**

DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Tim Alexander Klapschinski

aus Wolfenbüttel

Bonn 2020

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Promotionskommission

Erstgutachterin: Prof. Dr. Christa E. Müller

Zweitgutachter: Prof. Dr. Andreas Gansäuer

Tag der Promotion: 19.02.2021

Erscheinungsjahr: 2021

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom September 2017 bis Oktober 2020 am Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Prof. Dr. Christa E. Müller angefertigt.

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR)	1
1.2 Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine)	2
1.3 Agonisten, Antagonisten, Allosterie und Kooperativität.....	3
1.4 Proteinmonomere und Oligomere.....	4
1.4.1 Monomere oder Oligomere, was ist natürlich?.....	4
1.4.2 Vorteile der Oligomerisierung	7
1.4.2.1 Stabilität	7
1.4.2.2 Regulation.....	7
1.4.2.3 Effizienz	8
1.4.2.4 Kontrolle.....	8
1.5 Oligomerbildung	10
1.5.1 Domain swapping.....	10
1.5.2 Leucine zippers	12
1.6 Nachteile der Oligomerbildung	12
1.7 Experimentelle Methoden zur Oligomererkennung	15
1.8 G-Protein-gekoppelte Rezeptoroligomere (GPCR-Oligomere)	23
1.8.1 Historische Einführung	23
1.8.2 Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen (RRI).....	26
1.8.3 Prozesse im Rezeptormosaik (RM)	27
1.8.4 Das A _{2A} -D ₂ -Dimer	29
1.9 Der Proximity Ligation Assay.....	36
1.9.1 Allgemein	36
1.9.2 Entwicklung.....	36
1.9.3 Mechanismus	36
1.9.4 Sensitivitätsvergleich.....	40
1.9.5 Anwendungsbeispiel	41
1.9.6 Zusammenfassung.....	42
1.9.7 Das Problem des PLA.....	42

1.10	Computergestützte Berechnungs- und Simulationsmethoden	43
1.10.1	MODELLER	43
1.10.1.1	Modeling by Assembly of Rigid Bodies ²⁵⁷	45
1.10.1.2	Modeling by Segment Matching or Coordinate Reconstruction ²⁵⁷	46
1.10.1.3	Modeling by Satisfaction of Spatial Restraints ²⁵⁷	46
1.10.2	Molecular modeling – Protein-Liganden Docking.....	46
1.10.3	KNIME Workflow	48
2.	Ziel und Konzeption der Forschungsarbeit	52
2.1	Sonden für den PLA.....	52
2.1.1	Anforderungen	52
2.1.2	Konkrete Planung.....	53
2.2	Sonden-Synthese für die Untersuchung von GPCRs	56
3.	Ergebnisse	57
3.1	Synthese der Sonden für Proximity Ligation Assays.....	58
3.1.1	A ₁ AR-Antagonisten	58
3.1.1.1	Toponafylline (1) ²⁶²	58
3.1.2	A _{2A} AR-Antagonist.....	60
3.1.2.1	Preladenant-Derivat 3 ²⁶⁵	60
3.1.3	A _{2B} AR-Antagonisten.....	62
3.1.3.1	PSB-1901-Derivat 3	62
3.1.3.2	Alternatives PSB-1901-Derivat 33.....	63
3.1.3.3	Alternative Route zum PSB-1901-Derivat 33.....	66
3.1.4	A ₃ AR-Antagonist	69
3.1.5	Homologiemodell des A ₃ AR	69
3.1.6	Evaluation der generierten Modelle	71
3.1.7	Ergebnisse	78
3.1.7.1	Synthese des OT-7999-Derivats 48	82
3.1.8	Dopamin D ₂ -Rezeptor-Antagonisten.....	83
3.1.8.1	Synthese des Spiperonderivats 55 ²⁷³	83
3.1.8.2	Alternativer D ₂ -Antagonist ST-2335.....	84

3.1.9	Ergebnisse der Testung	85
3.1.10	Auswertung der Testergebnisse	88
3.1.11	Die Synthese der Linker für den PLA	90
3.1.11.1	Synthese des PEG-5 und PEG-4 Linkers	90
3.1.11.2	Synthese von PEG-5 und Verlängerung.....	91
3.1.12	Die Synthese der Linkeraddukte für den PLA.....	93
3.1.12.1	A ₁ AR-Antagonist-Linkeraddukte	93
3.1.12.2	A _{2A} AR-Antagonist-Linkeraddukte	94
3.1.12.3	A _{2B} AR-Antagonist-Linkeraddukte	94
3.1.12.4	A ₃ AR-Antagonist-Linkeraddukte	95
3.1.12.5	D ₂ DR-Antagonist-Linkeraddukt 129.....	95
3.1.12.6	D ₂ DR-Antagonist-Linkeraddukt 130.....	96
3.1.13	Ergebnisse der Testung	97
3.1.14	Auswertung der Testergebnisse	107
3.1.15	Sonden für den <i>Proof of Concept</i>	109
3.1.15.1	Die A ₁ AR-Antagonist-PEG-4-Nukleosid-Sonde.....	109
3.1.15.2	Die A _{2A} AR-Antagonist-PEG-4-Nukleosid-Sonde	110
3.1.15.3	Die A ₃ AR-Antagonist-PEG-4-Nukleosid-Sonde.....	110
3.1.15.4	Die D ₂ DR-Antagonist-PEG-4-Nukleosid-Sonde	111
3.1.16	Ergebnisse der Testung	112
3.1.17	Auswertung der Testergebnisse	118
3.1.18	Festphasensynthese der PLA-Sonden	119
3.1.19	Ergebnisse der Testung	123
3.1.20	Auswertung der Testergebnisse	129
3.2	Synthese von Fluorophor-markierten Liganden.....	130
3.2.1	Fluorophor-markierte Liganden für Adenosinrezeptoren.....	130
3.2.1.1	Synthese der BODIPYs ²⁷⁹	130
3.2.1.2	Die A ₁ AR-Antagonisten-PEG-4-Fluorophor-Sonden	131
3.2.1.3	Die A _{2A} AR-Antagonist-PEG-4-Fluorophor-Sonde.....	131
3.2.1.4	Die A ₃ AR-Antagonist-PEG-4-Fluorophor-Sonde	132

3.2.1.5	Die D ₂ DR-Antagonist-PEG-4-Fluorophor-Sonde.....	132
3.2.2	Ergebnisse der Testung	133
3.2.3	Auswertung der Testergebnisse	139
3.2.4	Synthese weiterer Fluoreszenz-markierter Liganden.....	140
3.2.4.1	Fluoreszenz-markierte A ₃ AR-Antagonisten mit langwelliger Emission....	140
3.2.5	Ergebnisse der Testung	142
3.2.6	Auswertung der Testergebnisse	145
3.3	Polymer-gebundene AR-Antagonisten zur Herstellung von Nanogelen	146
3.3.1	Synthese der Ligand-Linker-Addukte.....	146
3.3.2	Ergebnisse der Testung	148
3.3.3	Auswertung der Testergebnisse	150
3.4	Synthese eines A ₃ AR-Antagonisten für die Kristallstrukturanalyse	152
3.4.1	Vorläufige Ergebnisse der Testung	153
3.4.2	Auswertung der Testergebnisse	154
4.	Zusammenfassung und Ausblick.....	155
4.1	Der Proximity Ligation Assay.....	155
4.2	Der fehlende A _{2B} AR-Antagonist.....	159
4.3	Die Entwicklung des A ₃ AR-Liganden.....	160
4.4	Fluorophor-gebundene Sonden.....	161
4.5	Co-Kristallisationsexperimente	162
4.5.1	A _{2A} AR-Liganden für die A _{2A} -Rezeptor-Co-Kristallisationen	162
4.5.2	A ₃ AR-Liganden für die A ₃ -Rezeptor-Co-Kristallisation	162
4.6	Polymergebundene A _{2A} AR-Antagonisten	163
5.	Experimentalteil.....	164
5.1	Allgemeines.....	164
5.1.1	Absorptions- / Emissionsspektren.....	165
5.1.2	Festphasenreaktion.....	166
5.2	Synthese des Toponafylline-Derivats	167
5.3	Synthese des Preladenant-Derivats 3	187
5.4	Synthese des PSB-1901-Derivats 2	209

5.5	Synthese des A ₃ AR Antagonists 79.....	228
5.6	Synthese des A ₃ AR Antagonisten LJ-1888 ²⁸³	243
5.7	Synthese der Linker	249
5.7.1	Synthese der Sulfonate	251
5.7.2	Synthese der Azide	252
5.7.3	Synthese der Sulfite ²⁷⁷	252
5.7.4	Synthese der Sulfate ²⁷⁷	253
5.7.5	Synthese der Verlängerungsprodukte ^{277, 278}	254
5.7.6	Synthese der Ester ²⁷⁸	256
5.7.7	Synthese der Amine (Methode A).....	259
5.7.8	Synthese der Amine (Methode B) ²⁷⁸	260
5.7.9	Synthese der Fmoc-geschützten Amine ²⁷⁸	261
5.7.10	Synthese der Säuren ²⁷⁸	262
5.8	Synthese der BODIPY-Derivate (Jan Appelhaus) ²⁷⁹	263
5.9	Synthese der D ₂ -Antagonisten ^{273, 275}	265
5.10	Festphasensynthese	276
5.11	MODELLER	279
6.	Anhang I.....	281
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	284
8.	Literatur.....	289

1. Einleitung

1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR)

Membranproteine übernehmen eine essenzielle Rolle in unserem Körper. Hierbei muss zwischen peripheren (oberflächengebunden) und integralen (membrandurchdringenden) Proteinen unterschieden werden. Die größte Familie der integralen Membranproteine, mit über 800 Sequenzen im menschlichen Genom, stellen die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) dar.^{1,2} Diese sind durch sieben transmembranäre α -Helices, intrazellulär-extrazellulär alternierenden Konnektorloops sowie einem extrazellulären *N*- und einem intrazellulären *C*-Terminus gekennzeichnet. Sie können in fünf Familien eingeteilt werden: Glutamat (15 GPCRs), Rhodopsin (701 GPCRs), Adhesion (24 GPCRs), frizzled/taste2 (24 GPCRs) und Secretin (15 GPCRs).² Diese Vielzahl an Rezeptoren lässt sich durch ganz verschiedene chemische Moleküle oder sogar durch Ionen oder Photonen aktivieren. Beispiele dafür sind u.a. Calcium-Ionen³, Duftstoffe⁴, Amine⁵, Peptide⁶, Hormone⁷, Lipide⁸, Nucleotide, Nucleoside⁹ und Photonen¹⁰ (Abbildung 1).²

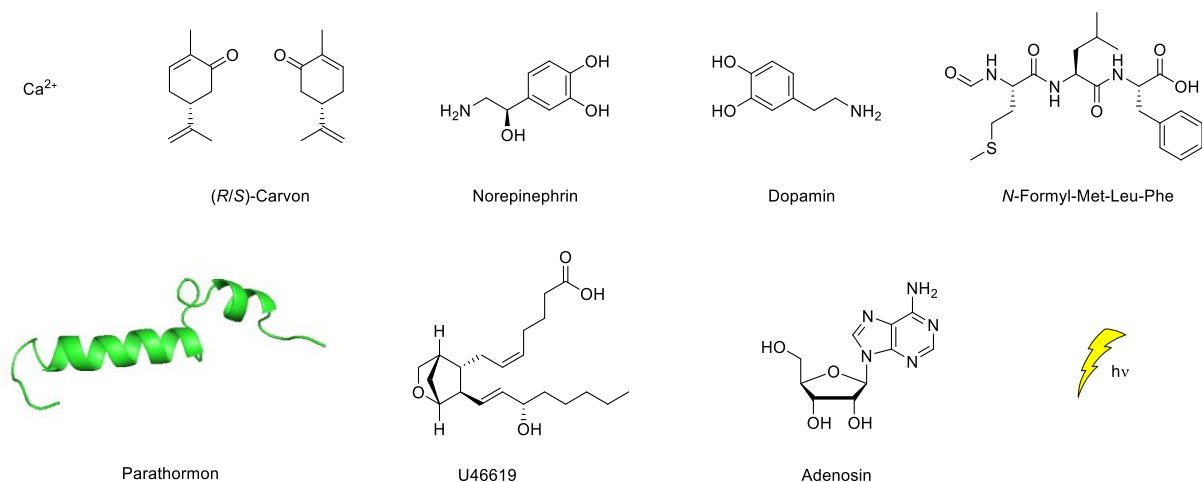


Abbildung 1: Agonisten von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Oben, links nach rechts: Ion: Ca²⁺, Duftstoffe: (R/S)-Carvon, Amine: Norepinephrin, Dopamin, Peptid: N-Formyl-Met-Leu-Phe; Unten, links nach rechts: Hormon: Parathormon, Lipid: U46619, Nucleosid: Adenosin, Quant.

Im menschlichen Körper kommt diese Art von Rezeptor im Gehirn (Dopamin-/5-HT-Rezeptoren^{11, 12}), beim Geschmack (*sweet taste*-Rezeptoren¹³), bei den Sinnesorganen (Rhodopsinrezeptoren¹⁴), im autonomen Nervensystem (Adrenergerezeptoren¹⁵), im Immunsystem (Histaminrezeptoren¹⁶), im Herzen (Adrenerge-/Angiotensin-/Adenosinrezeptoren¹⁷), gastrointestinal (Opioidrezeptoren¹⁸), im Hormonsystem (Muscarin-/Adrenergerezeptoren¹⁹), in den Fortpflanzungsorganen (Relaxinrezeptoren²⁰) und im Blutkreislauf (Vasopressinrezeptoren²¹) vor.²²

Im Folgenden soll auf die Klasse der Adenosinrezeptoren (AR) eingegangen werden, die eine Untergruppe der Rhodopsin-artigen Rezeptoren darstellen. Diese AR werden in vier Subtypen

unterteilt, A_1 , A_{2A} , A_{2B} und A_3 , welche alle durch Adenosin aktiviert werden.^{23, 24} Im Jahr 2008 konnte die erste Kristallstruktur eines AR, des A_{2A} ARs veröffentlicht werden.^{24, 25} Dabei ist auch eine Wechselwirkung der großen, synthetischen Liganden im extrazellulären Bereich des Rezeptors auszumachen.^{24, 25} Im Jahr 2016 konnte zudem der aktive A_{2A} - G_s Komplex kristallisiert werden, der tiefere Einblicke in der G-Proteinaktivierung zulässt.²⁶ Diese hochaufgelösten Strukturen stellen einen Meilenstein im Verständnis der GPCR dar.

Alles in allem stellt die Konformationsänderung vom inaktiven Rezeptor (stabilisiert durch inverse Agonisten, Antagonisten), über einen aktiven Zwischenzustand (Partialagonist, Agonist) bis hin zum vollaktiven Rezeptor (Agonist + G-Protein) einen komplexen Prozess dar, welcher Konformationsänderungen in der cytoplasmischen Hälfte des Rezeptors bewirkt.²⁷ Dies führt zur Signaltransduktion über die G-Proteine.

1.2 Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine)

Wird ein GPCR durch einen Agonisten aktiviert, bildet sich der aktive Zwischenzustand. In der Folge lagert sich das heterotrimere G-Protein, bestehend aus je einer α -, β - und γ -Untereinheit an den Rezeptor an und der aktive Rezeptor entsteht.²⁸ Durch diese Bindung ändert sich die Konformation der α -Untereinheit des G-Proteins, wodurch ein Guanosindiphosphat (GDP) durch ein Guanosintriphosphat (GTP) ausgetauscht wird. In Folge dessen dissoziiert das heterotrimere G-Protein in die α - und die $\beta\gamma$ -Untereinheiten, welche ihre jeweiligen Effektorsysteme beeinflussen (Abbildung 2).²⁷ Sowohl GPCRs als auch G-Proteine kommen in einer Vielzahl von Subtypen vor, die sich über Sequenzhomologien in Gruppen und Familien einteilen lassen. Insbesondere die α -Untereinheiten, mit über 20 verschiedenen Subtypen, kann in vier Familien unterteilt werden.²⁸ Die vier G_α -Familien sind G_{α_s} (Stimulation der Adenylatcyclase), G_{α_i} (Inhibition der Adenylatcyclase), G_{α_q} (Stimulation der Phospholipase C) und $G_{\alpha_{12/13}}$ (Aktivierung der Rho-Proteine).^{28, 29} Die $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit stimuliert ebenfalls die Phospholipase C, kann aber auch die Adenylatcyclase inhibieren.²⁹

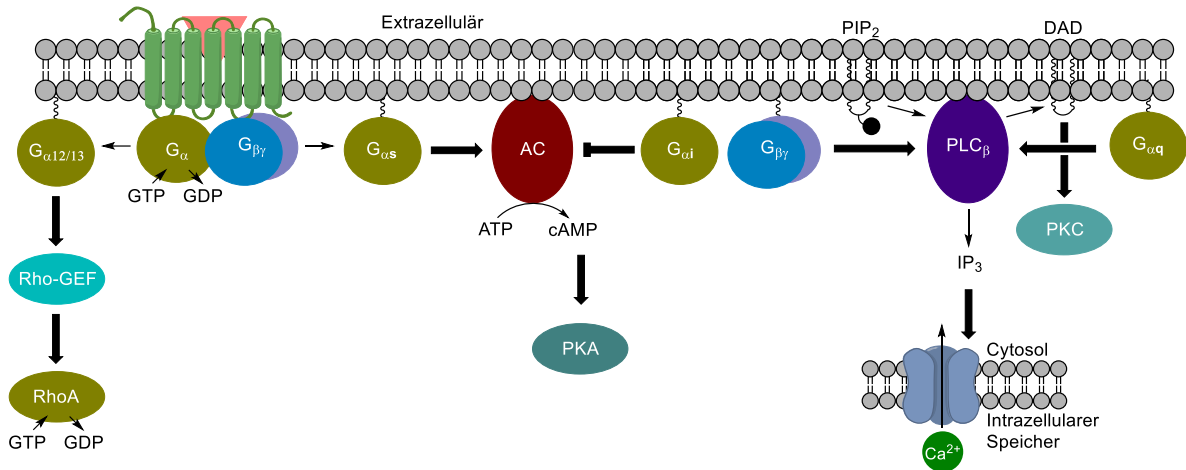


Abbildung 2: Haupteffektorsysteme der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). G_{α} und $G_{\beta\gamma}$ sind die Untereinheiten des heterotrimeren G-Proteins. (GTP = Guanosintri-phosphat, GDP = Guanosindiphosphat. AC = Adenylcyclase und PLC = Phospholipase C sind die Effektoren. DAG = Diacylglycerol, IP_3 = Inositoltrisphosphat und cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat sind die von den Effektoren beeinflussbaren *second messenger* Verbindungen. Ca^{2+} kann als *third messenger* Verbindungen betrachtet werden. PKC = Proteinkinase C und PKA = Proteinkinase A sind die *second messenger* abhängigen Enzyme. Rho-GEF = Rho-Protein Guaninnukleotid Austauschfaktor sorgt für Aktivierung des *small G*-Proteins RhoA. Blockpfeile = Aktivierung, *bar-headed* = Inhibition)

Soll der Effekt beendet werden, wirkt die α -Untereinheit als GTPase und hydrolysiert ein Phosphat. Diese intrinsische Hydrolasefunktion kann durch Regulatoren (RGS-Proteine) beeinflusst werden. Letztlich bildet sich aus der GDP-gebundenen α -Untereinheit das heterotrimere G-Protein zurück.²⁹

1.3 Agonisten, Antagonisten, Allosterie und Kooperativität

Agonisten und Antagonisten für AR spielen eine große Rolle in der Physiologie und insbesondere bei Krankheiten, A_1 -Agonisten, z.B. CCPA, und A_3 -Agonisten (z.B. CI-IB-MECA) sind analgetisch (schmerzstillend) (Abbildung 3). A_3 -Agonisten werden außerdem als neue Arzneistoffe gegen Leberkrebs entwickelt. A_{2A} -AR-Antagonisten wie Istradefyllin werden zur Behandlung von Morbus Parkinson eingesetzt und befinden sich in der klinischen Entwicklung zur Immunotherapie von Krebs.⁹ Aber nicht nur orthosterische Liganden finden in der Therapie Anwendung, auch positiv-allosterische Modulatoren (PAM), wie TRR469 (Abbildung 3), der die A_1 -Agonistenbindung verstärkt, haben ein großes Potential als zukünftige Arzneistoffe.⁹

Generell ist das strukturgebende Element der AR-Agonisten das Adenosin. Durch Substitutionen an N^6 , C2 und/oder 5' wird versucht, die kurze Halbwertszeit des Adenosins (~1 s), verursacht durch die Adenosindesaminase oder die Adenosinkinase, zu verlängern und somit die Konzentration am Rezeptor zu erhöhen (Abbildung 3).³⁰

Viele AR-Antagonisten sind durch das zentrale Strukturelement der Xanthine gekennzeichnet.³⁰ Typische Derivate sind das Koffein und das Theophyllin, welche beide, wenn auch schwach in der Affinität, antagonistisch an den verschiedenen AR-Subtypen

wirken. Substitutionen an den 1-, 3-, 7- und 8-Positionen sind typisch für optimierte AR-Antagonisten (Abbildung 3).³⁰

Modulatoren der AR können zum einen indirekt agieren, indem die Adenosindesaminase bzw. die Adenosinkinase inhibiert wird, sie können aber auch direkt durch allosterische Wechselwirkung agieren.^{30, 31} Als Beispiel ist ein allosterischer Modulator, das Thiophenderivat TRR469 gezeigt, dass an 2-, 3-, 4- und 5-Position substituiert ist (Abbildung 3).

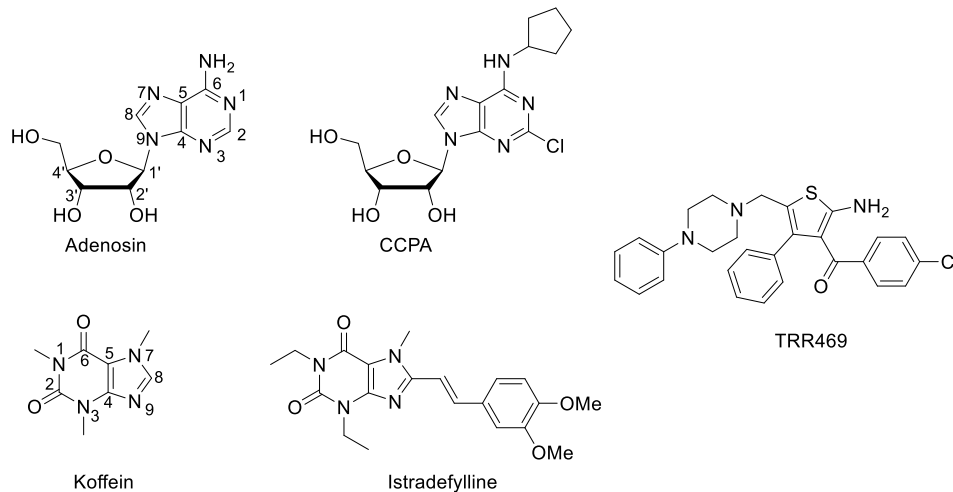


Abbildung 3: Adenosin und Koffein sowie weiterentwickelte, potente AR-Liganden: CCPA (A_1 -Agonist), Istradefyllin (A_{2A} -Antagonist) sowie das Thiophen-Derivat TRR469 (PAM).

1.4 Proteinmonomere und Oligomere

In den letzten Kapiteln wurde im Detail auf die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren eingegangen. Dabei wurde ein grundlegender Aspekt der Proteinstruktur im Allgemeinen vollkommen vernachlässigt. So wurde der Rezeptor, und somit das Protein, als Einzelgänger, als Monomer, betrachtet. Im Folgenden soll beleuchtet werden, dass Monomere eher die Ausnahme sind, als die Regel.

1.4.1 Monomere oder Oligomere, was ist natürlich?

Mit Hilfe der Datenbank UniProt (Universal Protein database, www.uniprot.org) wurden sämtliche bekannten Proteine des Menschen auf ihren Aufbau untersucht. Dabei wurden nur die Proteine angeschaut, die von der Datenbank geprüft („reviewed“) worden waren (Tabelle 1).

Wird zunächst die Zusammensetzung der Proteine angeschaut, fällt auf, dass ungefähr gleich viele Monomere wie Proteine höherer Ordnung zu finden sind. Problematisch bei dieser Auflistung ist, wie bereits Matthews *et al.* in einer vergleichbaren Auflistung feststellten, dass sich die Datenbank auf Kristallstrukturen bezieht und diese zumeist aus löslichen Proteinen erhalten werden.³² Darüber hinaus wird beim Kristallisationsprozess nur die enthalpische Komponente betrachtet, nicht aber die entropische. So können durch die Kristallisation andere

Bindungswechselwirkungen energetisch günstiger sein, als die natürliche, da sie einen größeren Beitrag zur Gitterenergie leisten.³² Rechnungen dazu sagen, dass für mindestens 20 % der Proteindimere in der PDB die Fehlinterpretationswahrscheinlichkeit bei über 50 % liegt.³³ Um mögliche Fehlinterpretationen zu vermeiden, wurden die Ergebnisse einer weiteren Datenbank verwendet, welche nicht auf Kristallisationsdaten beruht.

Tabelle 1: Auflistung der Proteinzusammensetzungen mit zugehöriger Anzahl und prozentuaem Anteil aus der Datenbank UniProt. Für die Suche wurde der Organismus „homo sapiens“ gewählt und unter Advanced search „Interaction >Subunit structure: Monomer, Dimer bis Oligomer“ ausgewählt. In fett der Unterschied zwischen Monomer und höheren Zusammensetzungen. Darunter die genaue Auflistung von Dimer bis Oligomer.

Proteinstruktur	Gesamt	Prozentualer Anteil
<i>Monomer</i>	582	54,5 %
<i>Dimer bis Oligomer</i>	485	45,5 %
<i>Dimer</i>	239	22,4 %
<i>Trimer</i>	35	3,3 %
<i>Tetramer</i>	64	6,0 %
<i>Pentamer</i>	28	2,6 %
<i>Hexamer</i>	31	2,9 %
<i>Heptamer</i>	1	0,1 %
<i>Octamer</i>	25	2,3 %
<i>9- bis 15-mer</i>	20	1,9 %
<i>Hexadecamer</i>	2	0,2 %
<i>Oligomer</i>	40	3,7 %

Die Datenbank BRENDA (BRaunschweiger ENzyme DAtabase, www.brenda-enzymes.org) bietet die Möglichkeit der Untersuchung von bekannten und annotierten Mono-, Di-, Oligo- und Multimerenzymen. Dabei ist zu beachten, dass die Klassifikation auf experimentellen Daten beruht, auf die in einem folgenden Kapitel eingegangen werden soll. Beispielhaft wurden die Enzyme des Menschen ausgewählt und mittels Datenbankfunktion durchsucht und manuell evaluiert (Tabelle 2).

Im Vergleich zu Tabelle 1 fällt auf, dass das Verhältnis von Enzymmonomer zu Di- oder Oligomeren deutlich unterschiedlich ist. So sind bei den Enzymen ungefähr 80 % Di- oder Oligomere und nur 20 % sind monomer vorliegend. Von den 80 % sind ungefähr 50 % Dimere und weitere 17 % Tetramere. Dies zeigt deutlich, dass das natürliche Vorliegen der Enzyme nicht der monomere Zustand ist. Darüber hinaus zeigt sich, dass geradzahlige Oligomere den ungeradzahligen bevorzugt gebildet werden.

EINLEITUNG

Tabelle 2: Auflistung der Enzymzusammensetzung mit zugehöriger Anzahl und prozentuellem Anteil aus der Datenbank BRENDA. Zusätzlich ist eine genauere Aufteilung in der Zusammensetzung angegeben. Hervorgehoben ist der Unterschied zwischen Monomer und höheren Zusammensetzungen. Darunter folgt die genaue Auflistung von Dimer bis Oligomer.

Proteinstruktur	Kein Präfix	Homo-	Hetero-	Mono- & Di-	Di- & Tri-	Gesamt	Prozentualer Anteil
<i>Monomer</i>	84	-	-	17	-	101	21,2 %
<i>Dimer bis Oligomer</i>	263	55	38	17	2	375	78,8 %
<i>Dimer</i>	156	38	23	17	1	235	49,4 %
<i>Trimer</i>	18	1	4	-	1	24	5,0 %
<i>Tetramer</i>	59	13	8	-	-	80	16,8 %
<i>Pentamer</i>	-	-	-	-	-	0	0,0 %
<i>Hexamer</i>	15	2	3	-	-	20	4,2 %
<i>Heptamer</i>	1	-	-	-	-	1	0,2 %
<i>Octamer</i>	3	1	-	-	-	4	0,8 %
<i>9- bis 15-mer</i>	-	-	-	-	-	0	0,0 %
<i>Hexadecamer</i>	1	-	-	-	-	1	0,2 %
<i>Oligomer</i>	10	-	-	-	-	10	2,1 %

Daraus resultieren die Fragen, wieso Dimere beziehungsweise Oligomere bevorzugt sind und warum dabei die Geradzahligen dominieren. Diese Fragestellung wird in Kapitel 1.4.2 untersucht.

1.4.2 Vorteile der Oligomerisierung

1.4.2.1 Stabilität

Ein Vorteil größerer Proteine, bzw. Proteinkomplexe ist die erhöhte Stabilität gegenüber Denaturierung. Als Beispiel soll die Triosephosphatisomerase (TIM) dienen. Hierbei zeigt sich, dass die Isomerase im Temperaturbereich von 15 – 80 °C als Dimer vorliegt, wobei die hyperthermophile Form aus dem Organismus *pyrococcus woesei*, der am besten bei 100 °C wächst, als Tetramer vorliegt.^{34, 35} Die Oligomerbildung führt zu einer Verkleinerung der Oberfläche und somit zur Ausbildung stabilerer Proteine.³⁶ Beispielhaft dafür kann das Insulin genannt werden, welches, wie der Vorläufer Proinsulin, zur Lagerung als Hexamer vorliegt (Abbildung 4). Diese Bedingungen schützen das Protein vor Proteasen und werden wiederum erst aufgelöst, wenn Insulin benötigt wird.³⁶

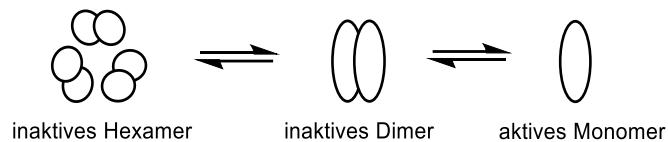


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Gleichgewichts von stabilem, inaktivem Hexamer und Dimer zum aktiven Monomer des Insulins. Neben der erhöhten Stabilität der Oligomere, zeigt dieses Beispiel auch eine weitere regulatorische Ebene.

1.4.2.2 Regulation

Die einfachste Form der Regulation verläuft über die Konzentration des Proteins (Abbildung 5a). Erreicht die Konzentration des Monomers die Schwelle zur Dimerbildung, wird das vorhandene Substrat durch das aktive Dimer umgesetzt. Es wird davon ausgegangen, dass gut ein Sechstel aller Enzyme ihr aktives Zentrum an der Dimerschnittstelle tragen (Abbildung 5a).³⁷ So zum Beispiel die HIV-1 Protease, die das katalytisch aktive Zentrum im Zwischenraum der Dimere bildet.^{38, 39} Eine weitere Möglichkeit ist die allosterische Regulation (Abbildung 5b). So können beispielsweise Cofaktoren an ursprünglich nichtbindenden Domänen gebunden werden.⁴⁰ Die Malatdehydrogenase, welche in menschlichen Mitochondrien zu finden ist, bildet ein Tetramer (Abbildung 5b). Die Dimerbildung verläuft dabei über Fumarat, welches sich an der Schnittstelle zwischen den Dimeren positioniert und als allosterischer Aktivator dient. Die Dimere werden wiederum durch ATP, welches in den Tetramerschnittstellen sitzt, aufgebaut.^{40, 41} In Schlangen (*Helicops modestus*) findet sich eine Mischung aus allosterischer und kooperativer Regulation in Hämoglobin (Abbildung 5c). Während die oxidierte Form als Dimer vorliegt, da sie eine höhere Affinität zu Sauerstoff aufweist, führt eine säure- sowie ATP-induzierte Tetramerbildung zur Abgabe des Sauerstoffs.^{40, 42}

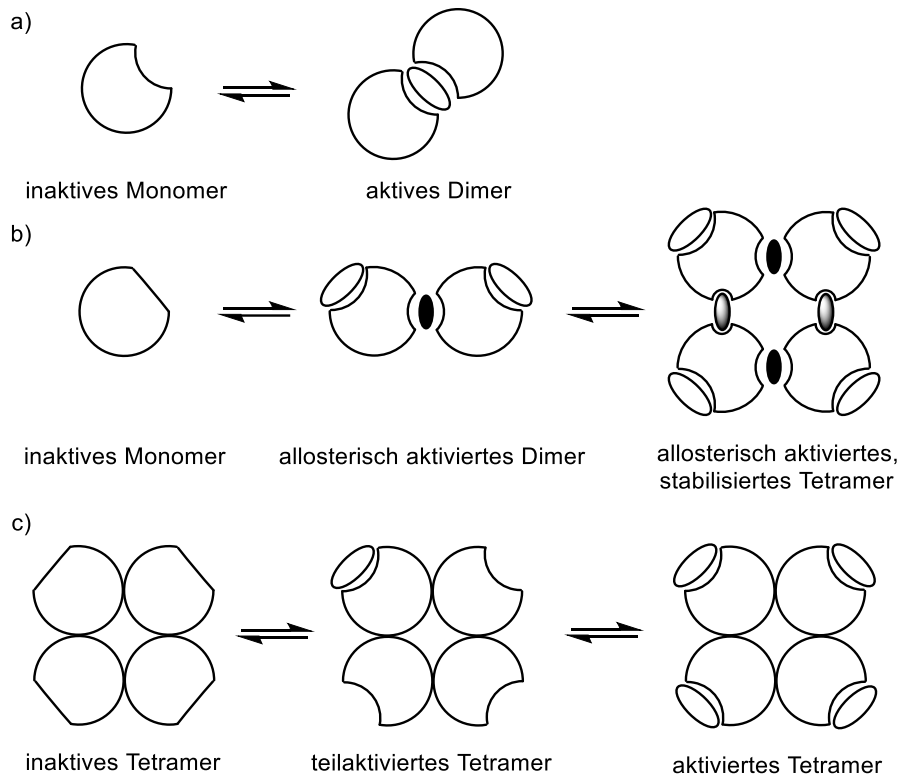


Abbildung 5: Zwei Möglichkeiten der Regulation mittels Oligomere. a) Das Monomer ist inaktiv, bis eine kritische Konzentration an Monomer erreicht ist und Dimere gebildet werden. Ab diesem Zeitpunkt wird das Dimer aktiv und setzt das Substrat um. b) Erst die allosterische Bindung eines Aktivators (schwarze Ellipse) führt zur Aktivität des Enzyms. Weitere Partner (graue Ellipsen) können zu höheren Oligomeren führen, die wiederum zur Stabilität beitragen. c) Bei der positiven Kooperativität werden durch die Anlagerung eines Substrats an eines der aktiven Zentren, die anderen Zentren sukzessive aktiviert.

1.4.2.3 Effizienz

Neben diesen strukturellen Vorteilen, bietet die Oligomerbildung zu komplexen, großen Strukturen die Möglichkeit die Genomgröße gering zu halten. In Anbetracht eines Virus, der aus bis zu 60 Untereinheiten bestehen kann (Poliovirus), wäre eine monomere Darstellung undenkbar. Zu diesem Schluss kamen auch *Watson* und *Crick*, die die schiere Menge an benötigter mRNA als Ausschlusskriterium anführten.^{36, 43}

1.4.2.4 Kontrolle

Letztlich bietet die Zusammensetzung aus Proteinmonomeren die Möglichkeit, fehlerhafte Einheiten aus Oligomeren auszuschließen bzw. zu kompensieren. *Goodsell* und *Olson* rechnen dabei vor, dass in eukaryotischen Zellen mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 0,05 % für eine ausgetauschte Aminosäure^{44, 45} nur eine von vier 500-Aminosäuren langen Proteinen fehlerhaft ist.³⁶ Würde dagegen ein 2000-Aminosäuren langes Protein aufgebaut werden, hätte dies mit hoher Wahrscheinlichkeit mindestens eine falsche Aminosäure. Ferner gehen die Autoren auf die Wahrscheinlichkeit einer fehlerhaften Translation ein. So liegt die Fehlerrate in eukaryotischen Zellen bei 0,03 % pro Codon,^{46, 47} dass ein Protein nicht vollständig translatiert, also vor Fertigstellung abgebrochen wird. So würde nur eins von sieben Proteinen, mit einer Länge von 500 Aminosäuren, vor dem Stoppcodon abgebrochen,

wohingegen ein 3000-Aminosäuren langes Protein mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht fertiggestellt werden würde.³⁶ Darüber hinaus ist die Faltung kleinerer Proteine schneller und weniger fehleranfällig.^{40, 48}

Bleibt die Frage, warum geradzahlige Oligomere (Tabelle 1, Tabelle 2, Einträge: Tetramere, Hexamere) bevorzugt gebildet werden. Die Gruppe um Teichmann *et al.* untersuchte dafür einen Datensatz von 5375 einzigartigen Oligomeren und kam zu einer nahezu identischen Verteilung wie in Tabelle 1 dargestellt (Abbildung 6).⁴⁹ Zusätzlich wurde die Geometrie jedes Oligomers identifiziert und in zwei unterschiedliche Symmetriegruppen eingeteilt. Zum einen die Drehgruppe (hier C_n) und zum anderen die Diedergruppe (hier D_n). Werden Oligomere mit ≥ 4 Einheiten betrachtet, dominiert die Diedergruppe im Vergleich zur Drehgruppe (22,6 % zu 3,2 %).

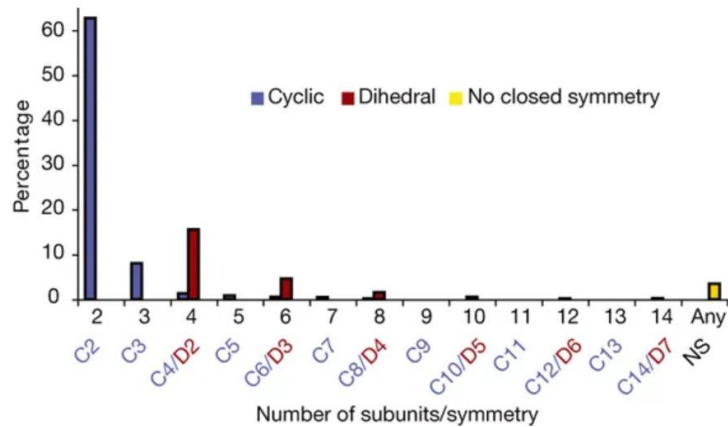
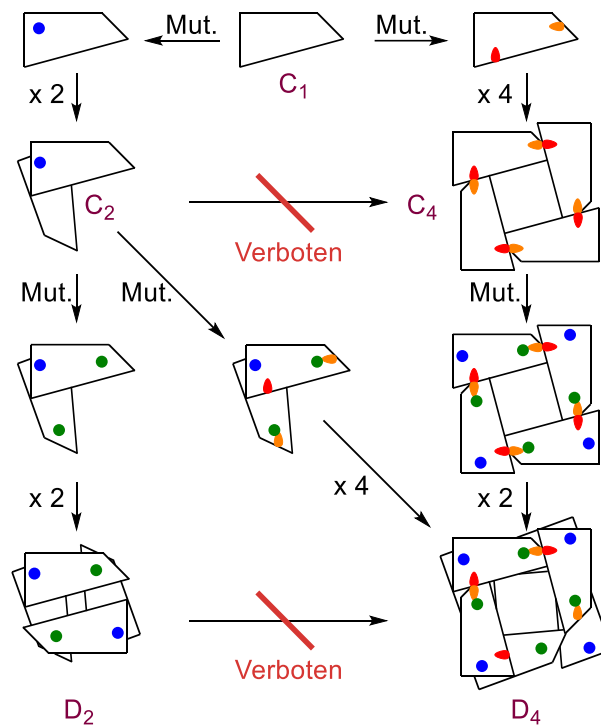


Abbildung 6: Balkendiagramm zur Darstellung der Zahl der Untereinheiten und deren Symmetrie in Abhängigkeit ihres relativen Vorkommens im Datensatz.⁴⁹ Blaue Balken repräsentieren die Drehgruppe, rote Balken die Diedergruppe. In gelber Farbe sind offene Symmetrien dargestellt, zu denen beispielsweise Tubulin zählt.

Die Autoren geben für diese Beobachtung zwei evolutionäre Erklärungen an. Dafür ist zu verstehen, dass Dieder-symmetrische Oligomere zumeist *face-to-face* oder *back-to-back* Kontakte zwischen den Monomeren aufweisen (Schema 1, D_2), wohingegen Oligomere zyklischer Symmetrie *face-to-back* Kontakte benötigen (Schema 1, C_4). Letztere werden mittels zufälliger Mutation weniger favorisiert gebildet.^{49, 50} Des Weiteren benötigen zyklische Oligomere zwei gleichzeitige Mutationen an unterschiedlichen Positionen des Monomers um zu entstehen (Schema 1, C_1 zu C_4). Dieder-symmetrische Oligomere hingegen verlaufen über eine Dimerzwischenstufe (Schema 1, C_2), bei der zunächst nur eine Mutation benötigt wird. Darauf folgend kann mit einer zweiten Mutation das Tetramer gebildet werden.⁴⁹



Schema 1: Vorgeschlagener evolutionärer Ablauf ausgehend vom Monomer (C₁) zu den Oligomeren mit Drehgruppensymmetrie (C_n) und Diedersymmetrie (D_n).⁴⁹ Kreise in blauer und grüner Farbe stellen *face-to-face* oder *back-to-back* Kontakte dar. Ellipsen in roter und oranger Farbe stellen *face-to-back* und *back-to-face* Kontakte dar. (Mut. = Mutation/en)

Diese evolutionäre Erklärung, basierend auf der Wahrscheinlichkeitsrechnung und experimentellen Daten, begründet zunächst den größeren Anteil an Tetrameren (Schema 1, C₁ zu C₂ zu D₂) gegenüber Trimeren (C₁ – C₃). Hexamere und höhere geradzahlige Oligomere können ebenfalls durch Dimere gebildet werden. Dies ist auf Grund der Verwandtschaft von Drehsymmetrie und Diedersymmetrie möglich. So kann ein Dieder entweder durch zwei n-Mere mit C_n-Symmetrie oder durch n Dimere mit C₂-Symmetrie aufgebaut werden (Schema 1, C₂ zu D₄). Letztlich führt somit ein Vielfaches von C₂ zu geradzahligen Oligomeren und erklärt so deren verhältnismäßig großes Vorkommen.⁴⁹

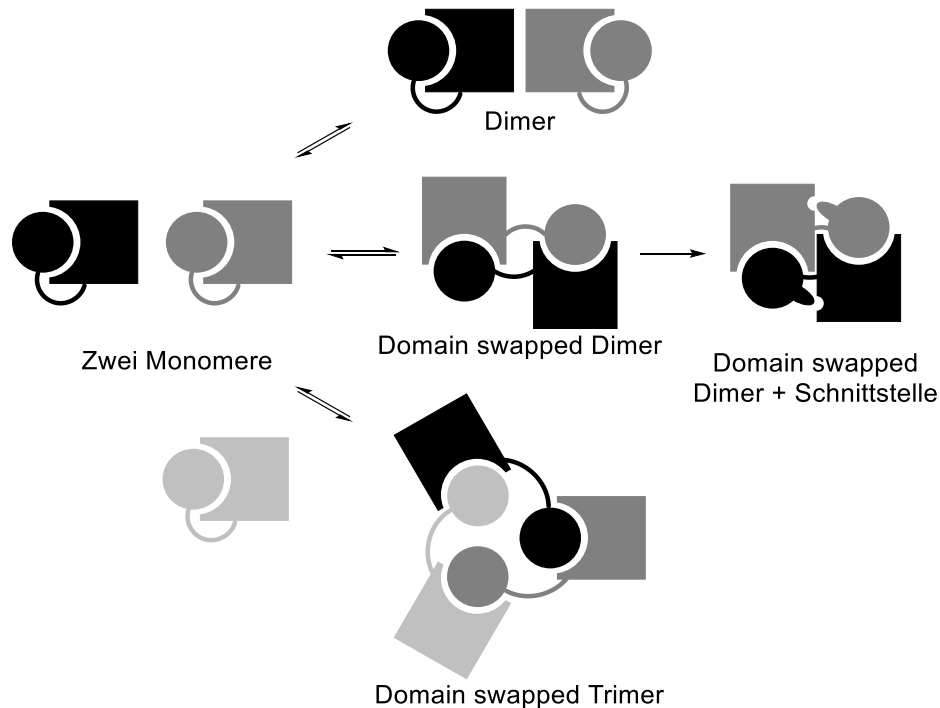
1.5 Oligomerbildung

Im letzten Abschnitt wurde bereits eine Möglichkeit besprochen, wie Proteinoligomere gebildet werden können. Diese umfasst die klassische Mutation, die zu Aminosäuresubstitution, -insertion und -deletion führt. Darüber hinaus sind auch andere Mechanismen bekannt, wie zum Beispiel das *domain swapping* und *leucin zippers*.

1.5.1 Domain swapping

Der Begriff „(3D) domain swapping“ wurde von Eisenberg *et al.* im Jahr 1994 eingeführt, als diese die Kristallstrukturen des Dimers und des Monomers von Diphtherietoxin kristallographisch untersuchten.⁵¹ Interessanterweise ist diese Publikation eine Art Korrigendum zur zwei Jahre zuvor erschienenen Publikation im Journal *Nature*, ebenfalls von

Eisenberg *et al.* in dem zum ersten Mal die Kristallstruktur des Diphtherietoxins kristallographisch dargestellt wurde.⁵² In der neueren Publikation konnten die Autoren mittels einer höheren Auflösung der Kristallstruktur zeigen, dass das Dimer nicht einfach zwei aneinandergelagerte Monomere sind (Schema 2, oben), sondern dass eine Domäne des Monomers den Platz der gleichen Domäne im anderen Monomer eingenommen hatte und *vice versa* (Schema 2, mitte). Um der Definition des *domain swappings* zu entsprechen, muss von den Proteinen sowohl das Monomer als auch das Dimer bekannt sein.



Schema 2: Aus zwei Monomeren, die aus zwei Untereinheiten aufgebaut sind (Beispielsweise Kreis: β -Faltblatt, Quadrat: α -Helix) kann zum einen ein Dimer entstehen (oben, α -Helix interagiert mit α -Helix) zum anderen können aber auch die Domänen vertauscht werden (Mitte, β -Faltblatt schwarz interagiert mit α -Helix grau und *vice versa*). Aus diesem Dimer kann in einer weiteren Mutation eine weitere Schnittstelle eingebracht werden, welche die Stabilität des Oligomers erhöht (mitte, rechts). Auch können drei Dimere im *domain swapping* involviert sein und ein Trimer bilden (unten). (Schema aus der Primärquelle übernommen und modifiziert⁵¹)

Das erste bekannte Beispiel, die Rinderpankreas-Ribonuclease (RNase A), wurde bereits 1962 von Crestfield *et al.* beschrieben. Diese konnten, ähnlich zu Eisenberg *et al.* beobachten, dass ein geringer pH-Wert, sowie Kühlen und Lyophilisieren zu stabilen Dimeren führte.^{51, 53} Darüber hinaus konnte auch das *domain swapped* Trimer der RNase A kristallographisch nachgewiesen werden (Schema 2, unten).⁵⁴ Bis 2016 waren 110 Proteine bekannt, bei denen nachgewiesen wurde, dass sie die Kriterien eines *domain swapped* Proteins erfüllen.^{55, 56}

1.5.2 Leucine zippers

Der Begriff *leucine zipper* wurde 1988 von Landschulz *et al.*⁵⁷ eingeführt und beschreibt die Interaktion von zwei oder mehreren α -Helices, die in einer *coiled coil*⁶⁸ Struktur ineinander verdreht sind (Abbildung 7, C). Charakteristisch für diese energetisch günstige Anordnung ist ein wiederkehrendes Strukturmotiv der Art: (a-b-c-d-e-f-g)_n wobei die Buchstaben a – g Aminosäuren repräsentieren (Abbildung 7, A, B). Die Namensgebung kommt von der Aminosäure Leucin, welche alle sieben Aminosäuren (Position a) auftaucht und die hydrophobe Hauptinteraktion ausmacht. Daneben kann die Position d von weiteren hydrophoben Aminosäuren besetzt werden, wie zum Beispiel Valin oder Isoleucin. An den Außenseiten halten ionische Wechselwirkungen (Positionen e und g), ausgehend von zum Beispiel Glutaminsäure und Lysin die *coiled coil* Struktur zusammen. Im Bereich der der Umgebung ausgesetzten Helix sind vor allem hydrophile Aminosäuren zu finden, welche die Oligomerisierung der α -Helices energetisch bevorzugen.⁵⁹

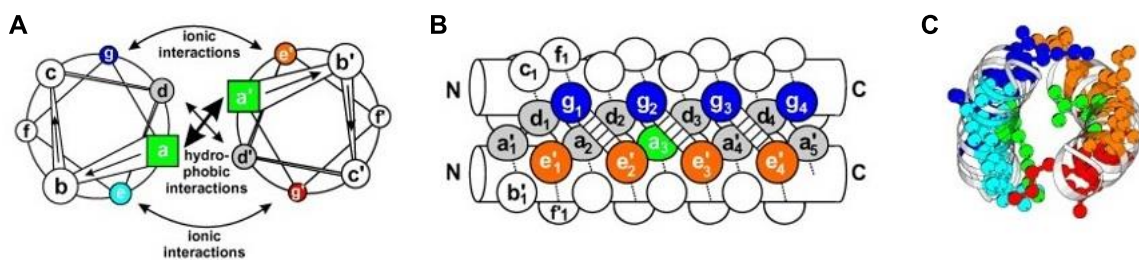


Abbildung 7: A) Schematische Darstellung der Interaktionen beider Helices mit Blick in Richtung des Helixverlaufs.⁵⁹ Die Buchstaben a, a' und d, d' stellen hydrophobe Aminosäuren wie Leucin und Valin dar. Die Buchstaben e, e' und g, g' symbolisieren ionische Aminosäuren wie Lysin und Glutaminsäure. Die Buchstaben b, b', c, c' und f, f' repräsentieren hydrophile Aminosäuren, die weniger konserviert sind als die vorherigen. B) Darstellung des Versatzes der beiden Helices mit derselben Beschriftung wie in A). Die gestrichelte Linie zwischen g₁₋₃ und e'₂₋₄ stellt die ionische Wechselwirkung dar. C) Dreidimensionale Darstellung der *coiled coil* mit farbigen Aminosäuren nach dem Schema aus A und B.

Da das *coiled coil* Motiv von 3 – 5 % aller Aminosäuren in Proteinen gebildet wird⁶⁰ und zudem höhere Oligomere (Tri- bis Pentamere^{61, 62}) durch Mutation einzelner Positionen entstehen können, ist der *leucine zipper* ein weiterer Baustein zur Oligomerisierung von Proteinen. Beispielhaft kann das bereits erwähnte G-Protein angeführt werden, bei dem β - und γ -Einheit über eine *coiled coil* Struktur verbunden sind.⁶³

1.6 Nachteile der Oligomerbildung

In den vorherigen Kapiteln wurden die Vorteile der Proteinoligomere und deren regulatorische Eigenschaften beleuchtet. Dabei können randomisierte Mutationen, Deletionen und *domain swapping* auch zu pathogenen Proteinoligomeren führen. Besonders Amyloidosen, wie Alzheimer, Parkinson oder auch Type II Diabetes hängen von Oligo- beziehungsweise Polymeren ab.

Tabelle 3: Neurodegenerative Erkrankungen die von oligomeren Proteinen verursacht werden.⁶⁴ (CJD = Creutzfeld-Jakob-Krankheit)

Krankheit	Beeinflusste Gehirnregion	Charakteristisches Krankheitsbild	Verursachendes Protein
<i>Alzheimer</i>	<i>Cortex, Hippocampus</i>	Senile Plaques, <i>neurofibrillary tangles</i> (NFTs)	A β Peptid und hyperphosphoryliertes Tau-Protein
<i>Parkinson</i>	<i>Substantia nigra, Cortex</i>	Lewy-Körperchen, Lewy Neuriten	α -Synuclein
<i>Prionenkrankheit (CJD)</i>	<i>Cortex, Thalamus</i>	Spongiforme Enzephalopathie	Prion
<i>Huntington</i>	<i>Striatum, Basalganglien</i>	Einschlusskörperchen (<i>inclusion bodies</i>)	Huntingtin mit PolyQ

In Tabelle 3 sind einige neurodegenerative Erkrankungen mit deren pathogenen Proteinen aufgezählt, so auch die Krankheit Alzheimer, welche das erste Mal 1906 von Alois Alzheimer beschrieben wurde. Deren auftretende Symptome sind voranschreitender Gedächtnisverlust und schwindende kognitive Fähigkeiten.⁶⁵ Bei der Obduktion der an Alzheimer erkrankten Patienten wurden intrazelluläre Fibrillen, sowie Plaques im Gehirn festgestellt, was zu der Hypothese führte, dass eben jene für die Symptome verantwortlich seien.^{65, 66} Neuere Studien zeigen hingegen, dass Vorläufer dieser Plaques, also lösliche Oligomere, bereits neurotoxisch wirken können.^{67, 68} Interessanterweise wurden diese Vorläufer bereits 1984 entdeckt, aber deren Funktion nicht in Betracht gezogen, sondern es wurde zunächst davon ausgegangen, dass es sich dabei um ein Abbauprodukt der Plaques handle.⁶⁹ Die Amyloid-(Kaskaden)-Hypothese, als Erklärung der Erkrankung gilt bis heute als am weitesten anerkannt.⁷⁰⁻⁷³ Sie beschreibt A β -Oligomere als Hauptfaktoren der neuronalen Schäden und die entstehenden Fibrillen und Plaques als Folge. Durch Punktmutationen im Genom können Proteine entstehen, die bevorzugt Oligomere mit einer *cross- β* Struktur bilden.⁷⁴ Diese Oligomere bewirken synaptische und neuritische Schäden, wodurch neuronale ionische Homöostase zu genereller Dysfunktion und somit zur Demenz führt.⁷⁵ Eine *cross- β* Struktur wird erreicht, wenn mehrere Proteine mit β -Faltblattstruktur gestapelt werden und die β -Faltblattstrukturen untereinander wechselwirken. Durch intermolekulare Salzbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen wird die oligomere Anordnung stabilisiert (Abbildung 8, links).

Neben dieser bei Amyloidosen auftretenden *cross- β* Struktur der Oligomere sind noch zwei weitere Formen der Oligomere in Krankheitsbildern zu finden. Bei der Krankheit Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) wird davon ausgegangen, dass durch Mutation und Oxidation der

Cu,Zn-Superoxiddismutase das natürlich auftretende Dimer verändert wird und in einer Art *end-to-end*-Anordnung Fibrillen bildet. Dabei wird nicht über die β -Faltblattstruktur das Oligomer gebildet, sondern über einen neuen Kontakt außerhalb der Struktur, der zu linearen Oligomeren führt (Abbildung 8, Mitte).^{40, 76, 77}

Als letzte Möglichkeit kann durch das bereits erwähnte *domain swapping* eine Bildung von Pathogenen ermöglicht werden. Dabei bilden sich nicht diskrete Di- oder Oligomere, sondern Polymere, welche durch einen *open-ended runaway swap* entstehen. Diese Form der Fibrillenbildung wird bei Prionenerkrankungen und der zerebralen Amyloidangiopathie angenommen.⁷⁸ So konnte bei Cystatin C gezeigt werden, dass das eigentliche Monomer auch in dimerer und tetramerer Form vorliegt und über diese in die Bildung des Polymers übergehen kann (Abbildung 8, rechts).⁷⁹⁻⁸¹

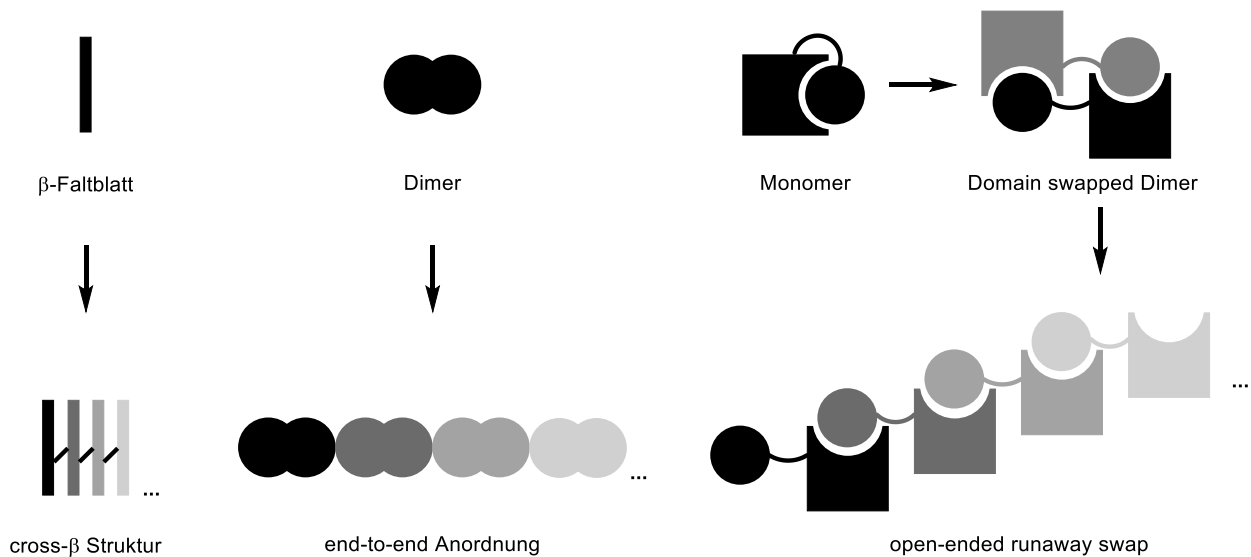


Abbildung 8: Drei Möglichkeiten der Polymerbildung. Links: Protein mit β -Faltblattstruktur stapelt zur cross- β Struktur. Diese wird durch intermolekulare Wechselwirkungen stabilisiert. Mitte: Natürliches Dimer kann in einer *end-to-end* Weise polymerisieren. Rechts: Über ein *domain swapped* Dimer kann ein Polymer entstehen, welches offene Enden aufweist.⁴⁰

1.7 Experimentelle Methoden zur Oligomererkennung

In den ersten Abschnitten wurde immer wieder die Wichtigkeit der Oligomere in biologischen Prozessen hervorgehoben. Damit wuchs auch der Bedarf nach experimentellen Methoden, um Oligomere *in vitro* und *in vivo* nachweisen zu können. Insbesondere die Beteiligung der Oligomere an Krankheiten, wie denen im letzten Abschnitt, zeigt die Wichtigkeit valider Methoden zur Oligomererkennung. Im Folgenden sollen unterschiedliche Methoden beleuchtet und deren Vor- und Nachteile abgewogen werden.

Grundlegend sind zwei Herangehensweisen möglich. Entweder das zu untersuchende Protein, beziehungsweise die zu untersuchende Proteinmischung wird außerhalb eines Organismus (*in vitro*) oder in einem lebenden Organismus (*in vivo*) getestet. Dementsprechend müssen auch die Methoden gewählt werden. In der folgenden Tabelle 4 ist ein Überblick über bekannte Methoden zur Erkennung von Proteinoligomeren gegeben, wobei zwischen *in vitro* und *in vivo* unterschieden wird. Zusätzlich ist in der Tabelle angegeben, welche physikalischen Werte (M_W = gewichtsgemittelte molare Masse, R_H = hydrodynamischer Radius, K_D = Dissoziationskonstante) und welche weiteren Interaktionen (Seite der Dimerbildung, Konformationsänderungen, räumliche Nähe) bestimmt werden können. Darüber hinaus kann abgelesen werden, ob mit der Methode das Dimer auch räumlich lokalisiert werden kann.

Zu jeder Methode wurde eine kurze Anmerkung verfasst, in der Besonderheiten oder der generelle Versuchsaufbau beschrieben und erläutert wird. Für ein in die Tiefe gehendes Verständnis der Techniken ist in den Referenzen jeweils ein *Review* angegeben.

EINLEITUNG

Tabelle 4: Die Tabelle ist eine Zusammenfassung aller relevanten Methoden zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen. Die jeweilige Technik ist in englischer Sprache genannt. Die Tabelle ist in *in vitro* und in *in vitro/in vivo* untergliedert. Zu jeder Methode ist der zu bestimmende Parameter aufgelistet (M_w = Molekulargewicht, R_H = Hydrodynamischer Radius, K_D = Bindungsaffinität, In. = Interaktion, Ort). Sofern Interaktion angemerkt ist, wird dies im Reiter „Anmerkungen“ erläutert. Ort bezieht sich auf die Lokalisation im Gewebe. Eingeklammerte (X) bedeuten eine ungefähre Bestimmung. Im Feld „Anmerkungen“ wird auf Besonderheiten hingewiesen oder eine grundlegende Erklärung für weniger bekannte Methoden geliefert. Für eine genauere Beschreibung sind Quellen angegeben.

Methode & Anmerkungen	M_w	R_H	K_D	In.	Ort	Ref.
<i>In vitro</i>						
Size Exclusion Chromatography (SEC) Die Bestimmung der molaren Masse ist nur möglich, wenn das Protein sphärische Ausmaße hat. Die Methode liefert getrennte Mono- und Dimere, die in Kombination mit anderen Methoden (LS) zu Massenbestimmungen verwendet werden können. Mittels <i>large zone</i> SEC kann ein K_D -Wert bestimmt werden.	(X)	(X)	X			82-84
Analytical Ultracentrifugation (AUS) Die molaren Massen der Oligomere können mit dieser Methode relativ einfach bestimmt werden. K_D bedarf eines aufwendigeren Systems, bei dem mehrere Konzentrationen und unterschiedliche Rotorgeschwindigkeiten experimentell untersucht werden müssen.	X		X			82, 85, 86
Light Scattering (LS)						
Single/ Static (S) Low angle (LA) Right angle (RA) Für Proteine müsste die Messung der emittierten Strahlung bei 0° erfolgen. Durch <i>Multi Angle</i> Messungen kann der Wert errechnet werden. Häufig werden SEC und MALLS kombiniert, um von den getrennten Proteinen die Massen zu bestimmen.	(X)					82, 87-89
Multi angle (MA)	X					
Dynamic (D) DLS beruht auf der Brownschen Molekularbewegung. Über diese kann der Diffusionskoeffizient D der Proteine bestimmt werden, welcher wiederum in der Stokes-Einstein-Gleichung den Partikelradius ergibt. Die Methode ist aber relativ ungenau. Zusätzlich können Konformationsänderungen von Proteinen detektiert werden.	(X)	X		X		82, 90
Small Angle X-ray Scattering (SAXS) Funktioniert physikalisch wie die LS Methodik, nur mit Röntgenstrahlung. Die Auflösung wird deutlich verbessert. Die Handhabung durch die Röntgenstrahlung aber erschwert.	X	X				82, 91, 92
Isothermal Titration Calorimetry (ITC) In ein Puffersystem wird eine konzentrierte Lösung des Proteins getropft. Sofern das Oligomer in den monomeren Zustand übergeht, wird Wärme aufgenommen oder freigesetzt. Neben K_D können auch Stöchiometrie und thermodynamische Parameter bestimmt werden.			X			82, 93
X-ray Klassische Methode zur Strukturbestimmung. Die Problematik bei der Bestimmung von Oligomeren besteht im Kristallisationsprozess. So können Dimere über bestimmte Grenzflächen kristallisieren, die normalerweise nicht in Kontakt kommen würden. Eine Aussage mittels kristallographischer Daten allein ist mangelhaft.	X	X	X	X		94-96

EINLEITUNG

Methoden & Anmerkungen	M_w	R_H	K_D	In.	Ort	Ref.
<p>Nuclear Magnetic Resonance (NMR)</p> <p>Die große Bandbreite an NMR-Methodiken (2D, 3D) ermöglicht die Bestimmungen des hydrodynamischen Radius (DOSY) und auch die Bestimmung der molaren Masse (TROSY, TRACT). Darüber hinaus kann, mittels NOE-Methode (NMR PRE) sogar K_D bestimmt werden. Eine weit verbreitete Methode, um den Ort der Interaktion festzustellen, ist die Verwendung des NOESY-Experiments, bei dem ein Protein des Dimers komplett ^{13}C-gelabelt wird und das andere natürlich (^{12}C) verbleibt. Durch eine bestimmte Pulsfolge werden nur NOESY-Signale zwischen ^{13}C-^1H und ^{12}C-^1H aufgenommen und somit intramolekulare Signale unterdrückt.</p>	X	X	X	X		97- 100
<p>Mass Spectrometry (MS)</p> <p>Zu den Standardmethoden zählen MALDI und ESI. Für nicht kovalente Proteinoligomere werden „sanfte“ Methoden benötigt. Dafür wurde nanoflow ESI entwickelt, welches durch eine dünnere Auslassspitze eine um den Faktor 1000 geringere Flussrate benötigt. Resultierend sind die „Tröpfchen“ um Faktor 100-1000 kleiner, welches eine bessere Ionisierung zulässt. Letztlich kann auf das Erhitzen der Apparatur verzichtet und bei Raumtemperatur (20 °C) gemessen werden. Mittels HRMS und MS/MS können sowohl die exakte Masse als auch die Zusammensetzung der Oligomere bestimmt werden.</p> <p>Neue Methoden ermöglichen die Bestimmung von K_D von Proteinoligomeren über den Vergleich der Intensitäten der Mono- und Dimere.</p> <p>Durch die Verwendung von <i>cross-linking</i> können auch Interaktionen von Proteinhetero- und homomeren erschlossen werden. Genauer dazu unter <i>Chemical cross-linking</i>.</p>	X		X	(X)		101- 105
<p>Surface Plasmon Resonance (SPR)</p> <p>Auf einem metallbeschichteten Chip wird das zu untersuchende Protein immobilisiert. Durch Zugabe eines weiteren Proteins ändert sich, bei Dimerbildung der Intensitätswinkel des eingestrahlt polarisierten Lichts. Aus dieser Änderung kann Assoziation, Dissoziation beziehungsweise letztlich K_D errechnet werden. Die Methode eignet sich gut für Hoch-Durchsatz Screenings.</p>			X			106, 107
<p>Interferometry</p>						
<p>Dual-polarization (DPI)</p> <p>Die Methode ermöglicht die Bestimmung der Schichtdicke des auf dem Träger immobilisierten Proteins sowie dessen Dichte. Daraus kann direkt die molare Masse bestimmt werden. Darüber hinaus ist es möglich, über den Massenzuwachs und die Konzentration des zugegebenen Proteins, K_D zu bestimmen. Die Methode bietet den Vorteil selbst Änderungen in der Konformation des Proteinmonomers und -dimers zu erkennen. Überdies konnte mit der Methode das Wachstum von Aβ, beschrieben in Abschnitt 1.6, belegt und beobachtet werden.</p>	X		X	(X)		108- 112

EINLEITUNG

Methoden & Anmerkungen	M_w	R_H	K_D	In.	Ort	Ref.
<p><i>Bio-Layer</i></p> <p>Eine optisch durchlässige Nadel, deren Spitze mit einem Polymer beschichtet ist, wird mit dem zu untersuchenden Protein funktionalisiert. Nach Eintauchen in eine Probelösung wird weißes Licht durch die Nadel geleitet und von der Oberfläche (Polymer/Oligomer) reflektiert. Findet eine Protein-Protein-Wechselwirkung statt, kommt es zur Interferenz und einer Verschiebung der Wellenlängenmaxima im Vergleich zur Referenz. Daraus kann die Kinetik und respektive K_D ermittelt werden. Vorteilhaft ist die direkte Anwendung in Lösung, da nicht-gebundene Proteine nicht mitgemessen werden.</p>			X			112- 115
<p><i>Microscale Thermophoresis (MST)</i></p> <p>MST bietet die Möglichkeit, K_D ohne Funktionalisierung an der Festphase (Interferometry) zu bestimmen. Für die Detektion wird ein Fluoreszenzlabel benötigt. Die Thermophorese beschreibt die Bewegung von Teilchen in einem Temperaturgradienten. Dafür wird lokal die Temperatur in einer Kapillare erhöht und die Bewegung der Proteine zu einer geringeren Temperatur mittels UV-Detektor aufgenommen. Entscheidend für die Diffusion ist die Größe, die Ladung und die Hydrathülle des migrierenden Teilchens. Durch Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen des Proteins A bei konstanter Proteinkonzentration B, kann aus dem Unterschied in der Diffusionsgeschwindigkeit, ausgedrückt im Fluoreszenzsignal, K_D bestimmt werden. Der große Vorteil der Methode ist die Nutzung von <i>in vivo</i> ähnlichen Bedingungen.</p>			X			116- 118
<p><i>Scintillation Proximity Assay (SPA)</i></p> <p>Die Methode beruht auf der Ausstrahlung von Lichtimpulsen durch einen Szintillator, sobald dieser durch β-Strahlung (^{35}S) angeregt wurde. Protein A wird mit dem Szintillator enthaltenen Perlen verknüpft, Protein B mit radioaktiv markierten Elementen. Bei Annäherung kommt es zur Lichtaussendung. Die Methode wird nur wenig in der Protein-Protein-Erkennung eingesetzt, vermutlich auf Grund der Handhabbarkeit (Radioaktivität).</p>			X			119, 120
<p><i>Thermal Shift Assay</i></p> <p>Durch ansteigende Temperatur löst sich die quartäre und tertiäre Struktur der Oligomere/Monomere auf („Schmelzen“), wodurch ein Farbstoff bindet und fluoresziert. Verschiebt sich die „Schmelztemperatur“ zu höheren Werten, kann von einer Stabilisierung durch Protein-Protein-Interaktion ausgegangen werden. Darüber kann K_D berechnet werden. Andersherum können so auch Verbindungen ermittelt werden, die oligomere Zustände auflösen.</p>				X		121, 122
<p><i>Fluorescence Anisotropy</i></p> <p>Die Methode benötigt eine Fluoreszenzmarkierung. Durch Einstrahlung polarisierten Lichts werden Fluorophore angeregt, deren Dipol parallel zur Polarisation liegen. Nach wenigen Nanosekunden wird die Fluoreszenz emittiert und deren Polarisation analysiert. Weicht diese stark ab, ist das Fluorophor frei beweglich, weicht sie wenig ab, ist die Rotation eingeschränkt, was für eine Wechselwirkung spricht. Durch konzentrationsabhängige Proteinzugabe kann über die Änderung der Anisotropie K_D ermittelt werden. Fluorophoranbindung kann zu gestörter Interaktion führen.</p>			X			82, 123, 124

EINLEITUNG

Methoden & Anmerkungen	M_w	R_H	K_D	In.	Ort	Ref.
<p>Phage-Display</p> <p>Mit dieser Methode kann eine große Bibliothek an möglichen Bindungspartnern untersucht werden. Bakteriophagen werden mit zu untersuchenden Proteingenen infiziert, welche diese auf ihrer Außenseite präsentieren (Display). Die Phagenbibliothek wird zu einem immobilisierten Protein gegeben. Der interagierende Phage wird anschließend zur Infektion eines Bakteriums genutzt und die Gensequenz des Proteins analysiert. Durch Genmutationen können so auch besser bindende Proteine in einem Selektionsprozess ermittelt werden. Die Technik wurde 2018 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet.</p>				X		125-129
Electrophoresis						
<p>Capillary Affinity (CAE)</p> <p>CAE ist eine Methode zum Trennen u. a. von Proteinen. Eine Fluoreszenzmarkierung erleichtert die Detektion, alternativ kann die UV-Aktivität des Proteins genutzt werden. Spezielle Säulen ermöglichen die Trennung von nicht-kovalenten Protein-Protein-Interaktionen. Durch <i>cross-linking</i> ist eine vereinfachte CAE möglich. Durch konzentrationsabhängige Zugabe eines Proteins kann K_D ermittelt werden. Die Methode erlaubt zusätzlich Hochdurchsatz-Screening.</p>			X			130-134
<p>Gel (PAGE)</p> <p>Basierend auf einem Polyacrylamid-Gel können unterschiedliche Ansätze (Native, SDS, Urea) zur Trennung eingesetzt werden. Bei nicht-kovalenten Protein-Protein-Interaktionen wird Native-PAGE eingesetzt, wobei die Interaktionen erhalten bleiben. Dabei wird der Unterschied im R_H bestimmt, nicht aber die M_w. Durch Detergenzien (SDS) werden die Proteinoligomere zerstört und eine kovalente Verknüpfung (<i>cross-linking</i>) ist nötig.</p>	X	X				133, 135
<p>Proteome Chips</p> <p>Die Methode ermöglicht die Untersuchung einer großen Bibliothek an Proteinen in einem Experiment. So kann ein komplettes Proteom exprimiert und gereinigt werden, bevor es auf dem Chip einzeln immobilisiert wird. Das zu untersuchende Protein wird mit dem Chip inkubiert und die Interaktion mittels Fluoreszenz untersucht. So können Protein-Protein-Interaktionen im Proteom untersucht und sämtliche Interaktionspartner bestimmt werden.</p>				X		136, 137
In vitro & in vivo						
Fluorescence Methods						
<p>Fluorescence correlation spectroscopy (FCS)</p> <p>Die Methode ermöglicht die <i>in vivo</i> Untersuchung von Proteininteraktionen. Hierfür muss ein Fluoreszenzmarker (GFP) mit dem Protein verbunden werden. In einem Volumen von 0,2 Femtolitern wird die Fluktuation der Fluoreszenz untersucht und daraus der R_H abgeleitet, ähnlich zu DLS. Problematisch ist die Unterscheidung von Homo- und Heteromeren, die aber mittels Fluoreszenzintensität getroffen werden kann. Unterscheidet sich die Diffusion von Monomer zu Dimer nicht erheblich, muss FCCS verwendet werden.</p>		X	X	X		82, 138-140

EINLEITUNG

Methoden & Anmerkungen	<i>M_w</i>	<i>R_H</i>	<i>K_D</i>	In.	Ort	Ref.
<p><i>Total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM)</i></p> <p>Die Methode benötigt ein fusioniertes Fluorophor. Im Gegensatz zur FCS wird das eingestrahlte Licht nicht direkt, sondern im Winkel der Totalreflektion auf den Objektträger geleitet. Dadurch klingt die Anregung in der Probe nach ≈ 100 nm ab, und ermöglicht die Untersuchung einzelner Membranschichten ohne Hintergrundeinflüsse.</p> <p>Verbunden mit</p> <p><i>Single particle tracking (SPT)</i></p> <p>Mittels zeitabhängiger Aufnahmen können Rezeptoren bei der Homomerbildung visualisiert werden. Durch die Verwendung zweier Fluoreszenzmarker und unterschiedlicher Detektorkanäle kann auch die Heteromerbildung untersucht werden.</p>			X	X		141-144
<p><i>Spatial intensity distribution analysis (SpIDA)</i></p> <p>Die Methode benötigt ein fusioniertes Fluorophor. Mittels Konfokalmikroskopie werden <i>Quantal Brightness</i> (QB) und Rezeptordichte über Super-Poissonsche Verteilungsfunktionen bestimmt. Als Referenz wird die QB des monomeren Rezeptors benötigt. Neben der Rezeptordichte kann dadurch das Vorliegen von Di- bzw. Oligomeren errechnet werden.</p>				X		145
<p><i>Fluorescence cross-correlation spectroscopy (FCCS)</i></p> <p>Dank einer zweiten Anregungswellenlänge können zwei unterschiedliche Fluorophore genutzt und ausgelesen werden. Dies ermöglicht die Korrelation beider Fluktuationen und somit die Bestimmung der konkreten Interaktion.</p>		X	X	X		82, 138, 146
<p><i>Förster Resonance energy transfer (FRET)</i></p> <p>Für die Methode werden zwei Fluorophore benötigt, die jeweils an die zu untersuchenden Proteine zu fusionieren sind. Durch Anregung des einen Fluorophores, wird das andere angeregt und emittiert in dessen charakteristischer Wellenlänge. Dies wird nur erreicht, wenn die Fluorophore in räumlicher Nähe (Dimerisierung) sind. Der benötigte Abstand sollte ≤ 10 nm sein, welcher zumeist durch die Proteine eingenommen wird. Linker können hier Abhilfe schaffen. Bei Homomeren ist darauf zu achten, dass es zur Signalreduktion kommt. Durch Fixieren der Zellen ist eine <i>in vivo</i> Anwendung und damit Lokation der Oligomere möglich.</p> <p>Mit der <i>Sensitized Emission</i> (SE) Methode wird die FRET Effizienz gemessen. Dafür wird sowohl die Donor als auch die Akzeptor Fluoreszenz aufgenommen und so das Verhältnis beider zueinander bestimmt.</p> <p>Durch <i>Acceptor Photobleaching</i> kann die Güte des FRET Signals bestimmt werden. Dafür wird der Akzeptorfarbstoff mittels <i>bleaching</i> gesättigt und kann keine Energie des Donors aufnehmen. Verglichen wird die Donoremission vor und nach dem <i>bleaching</i>.</p>				X	X	82, 147-150

EINLEITUNG

Methoden & Anmerkungen	M_w	R_H	K_D	In.	Ort	Ref.
<p>Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET)</p> <p>Die zu untersuchenden Proteine werden mit einer Luciferase und einem Akzeptorfluorophor fusioniert. Durch Zugabe eines Substrats (Coelenterazine, O₂) bioluminesziert die Luciferase und regt bei geringem Abstand zum Akzeptorfluorophor dieses an. NanoLuc (NLuc) ist die kleinste Luciferase und damit am besten für die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen geeignet. Vorteile gegenüber FRET sind: 1. Keine externe Anregung, ergo keine Akzeptorfluoreszenz, keine Autofluoreszenz, kein bleaching. 2. Höhere Sensitivität von BRET, ergo geringere Expression benötigt.</p>				X	X	151-154
Pulldown Assays						
<p>Co-Immuno-precipitation</p> <p>Ein Protein wird mittels Antikörper aus dem Zelllysate einer <i>in vivo</i> Probe „herausgezogen“. Der Antikörper befindet sich auf einem Makromolekül, welches leicht aus der Lösung entnommen werden kann. Kommt es zur Dimerbildung, kann nach Abspaltung, mittels PAGE und Western Blot die Masse des Oligomers bestimmt werden.</p>				X		155-157
<p>Strep-Protein Interaction Experiment (SPINE)</p> <p>Mittels Strep-Tag-Fusion an das zu untersuchende Protein, kann dieses leicht aus der <i>in vivo</i> Probe extrahiert werden. Um während des Extraktionsprozesses etwaige Protein-Protein-Interaktion nicht zu zerstören, wird zuvor durch Cross-linking (Formaldehyd) die Interaktion reversibel verknüpft. Nach Reinigung wird die Verbindung unterbrochen und der Bindungspartner kann mittels PAGE und Massenspektrometrie untersucht werden. Problematisch ist die Untersuchung von Homodimeren. Auch Multimeren können untersucht werden.</p>				X		158-161
<p>Chemical Cross-Linking</p> <p>Die Methode wird dazu genutzt, Oligomere kovalent zu binden. Die Analyse verläuft über andere Methoden, wie MS, SDS-PAGE oder Immunopräzipitation. Die Vernetzung kann über Formaldehyd aber auch über Maleimide, Succinimide, Senfgas oder oxidativ erfolgen. Außer für Formaldehyd, werden hierfür Thiole (Cystein) benötigt. Die Methode kann auch für Membranproteine angewendet werden. Moderne Methoden (XL-MS) quervernetzen zunächst die entstehenden Oligomere, verdauen diese und analysieren die Fragmente mittels MS und MS/MS. Computerprogramme errechnen darüber die Bindungsstellen der Oligomere. Durch Verwendung von Isotopenmarkierungen können so auch die Interaktionsstellen von Homomeren errechnet werden.</p>	X			X		105, 162-166
Complementation Assays						
<p>Bimolecular Fluorescence complementation (BiFC)</p> <p>Bei der Methode wird ein Fluoreszenzprotein (z. B. GFP) in zwei stabile Untereinheiten aufgeteilt, die jeweils an die zu untersuchenden Proteinen fusioniert werden. Kommt es zur Interaktion, „komplementiert“ sich das Protein und fluoresziert. So können selbst Interaktionen mit einem hohem K_D untersucht werden, da die Bildung des Fluorophors irreversibel ist. Die Methode erlaubt die Untersuchung direkt im Organismus. Diverse Fluoreszenzproteine können für diese Methode genutzt werden.</p>				X	X	82, 167-171

EINLEITUNG

Methoden & Anmerkungen	M_w	R_H	K_D	In.	Ort	Ref.
<p>Protein-fragment complementation assay (PCA)</p> <p>Neben dem Fluoreszenzsignal kann auch ein „Überlebensassay“ gewählt werden. Hierfür kann zum Beispiel die Dihydrofolatreduktase (DHFR) aufgespalten und jeweils an die zu untersuchenden Proteine fusioniert werden. Durch Komplementierung können Zellen (ohne DHFR) selektiert werden.</p>				X		170, 172, 173
<p>Isopeptag</p> <p>Der Tag wird genetisch mit dem zu untersuchenden Protein verbunden. Bei Homomer- oder Heteromerbildung interagiert der Tag mit einem Lysin des Partners zu einer kovalenten Bindung. Dies ermöglicht die Untersuchung selbst unter harschen Bedingungen.</p>				X		174, 175
<p>Proximity Ligation Assay (PLA)</p> <p>Der Assay beruht auf zwei Antikörpern oder Aptameren, die jeweils ein Oligonukleotid tragen. Die Antikörper binden die zu untersuchenden Proteine und die ssDNA-Fragmente kommen sich bei Protein-Protein-Interaktion räumlich nahe. Durch ein Konnektoroligonukleotid werden die DNA-Fragmente ligiert und können mittels RT-PCR ausgelesen werden. Die Amplifikation mittels PCR ermöglicht die Detektion kleinster Dimermengen und -konzentrationen. Weitere Methoden werden im Abschnitt 1.9 genauer erläutert.</p>				X	X	176- 180
<p>Yeast Two-Hybrid (Y2H)</p> <p>Die zu untersuchenden Proteine werden jeweils mit einem Teil des Hefetranskriptionsfaktors (GAL4) fusioniert. In der Hefe (<i>in vivo</i>) werden beide Proteine exprimiert. Kommt es zur Dimerisierung, wird ein Gen abgelesen, bei dem eine Bindestelle des Transkriptionsfaktors (GAL4) vorhanden ist. Diese Gene können entweder einen Farbumschlag hervorrufen oder dienen dem Überleben auf einem Mangelmedium. Die Methode kann auch im Hochdurchsatz-Screening verwendet werden.</p>				X		82, 181- 183

1.8 G-Protein-gekoppelte Rezeptoroligomere (GPCR-Oligomere)

In den vorherigen Kapiteln wurden die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und der Einfluss der Oligomerisierung von Proteinen erläutert. Der folgende Abschnitt soll einen Überblick über die Wirkweise von GPCR-Oligomeren geben.

1.8.1 Historische Einführung

In den 1970er Jahren kam das erste Mal die Überlegung auf, dass sich G-Protein-gekoppelte Rezeptoren gegenseitig beeinflussen könnten. Bei der Untersuchung des β -adrenergen Rezeptors wurde festgestellt, dass weitere Zugabe von (-)-Alprenolol zu negativer Kooperativität führte. Folgende Untersuchungen schlossen aus, dass diese von einer weiteren Bindungstasche kamen. Daraus wurde rekapituliert, dass die Kooperativität durch eine Anlagerung eines zweiten β -adrenergen Rezeptors (Bildung eines Homodimers) ausgelöst wurde.^{184, 185}

Anfang der 1980er Jahre wurde ein weiterer, aus heutiger Sicht logischer Schritt postuliert. So wurde von Rezeptormosaiken gesprochen, um zum Ausdruck zu bringen, dass auch heteromere Rezeptoroligomere entstehen können, die aufeinander Einfluss nehmen.¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass sowohl Neuropeptidrezeptoren als auch Glutamatrezeptoren die Wirkweise von Dopaminrezeptoren und 5-HT-Rezeptoren beeinflussen.¹⁸⁹

Zu Beginn der 1990er Jahre wurde eine Auflistung der möglichen Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen vorgestellt (Abbildung 9).¹⁹⁰ Durch Modulatoren kann die Affinität eines Rezeptors für einen zweiten Liganden verändert werden (Abbildung 9, Links). Diese Modulation ist auch für G-Protein-Rezeptor-Dimere möglich (Abbildung 9, Mitte). So kann die Rezeptorbindungstasche R_1T_1 die Rezeptorbindungstasche R_2T_1 sowie den Effekt (E_2) beeinflussen und *vice versa*. Letztlich ist eine solche Interaktion auch ohne physischen Kontakt möglich (Abbildung 9, Rechts). Dabei wird z. B. durch ein G-Protein die Rezeptorbindungstasche R_2T_1 oder auch der Effekt E_2 moduliert.

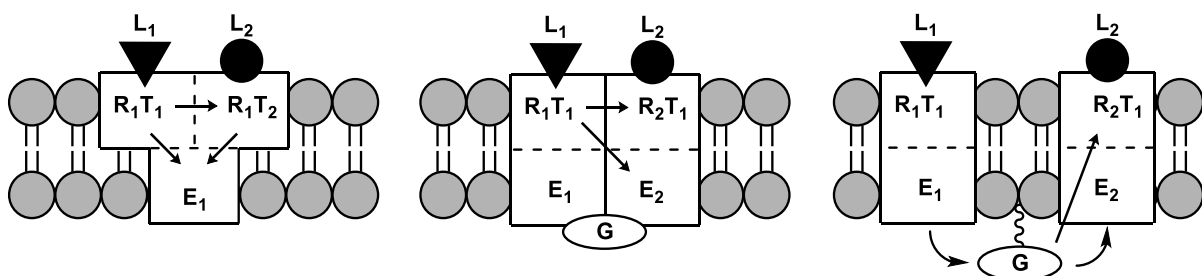
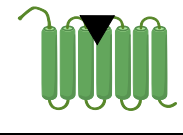
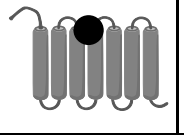
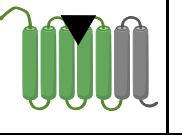
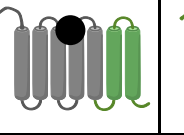
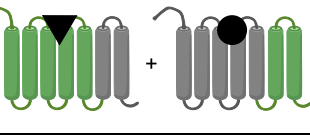


Abbildung 9: Ausschnitt aus der Darstellung unterschiedlicher Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen.¹⁹⁰ Links: Ein Rezeptor mit zwei unterschiedlichen Bindungstaschen ($R_1T_{1/2}$). Ligand 1 (L_1) beeinflusst durch Bindung an R_1T_1 den Effekt (E_1) und zusätzlich die Bindungstasche R_1T_2 . Wird L_2 dadurch mit einer höheren Affinität gebunden, wird von positiver Kooperativität gesprochen, wird die Bindungseigenschaft von L_2 verringert von negativer. Mitte: Zwei

unterschiedliche Rezeptoren bilden ein Dimer mit physischem Kontakt. Durch die Interaktion von Protomer R_1T_1 kann der Effekt E_2 und die Bindungstasche von Protomer R_2T_1 beeinflusst werden (positive und negative Kooperativität). Dies kann auch einen Einfluss auf die Wahl des G-Proteins (G) haben. Rechts: Eine Funktion, wie die zuvor beschrieben, ist auch möglich für zwei nicht im physischen Kontakt stehende Rezeptoren. Ein G-Protein kann R_2 beeinflussen.

Besondere Aufmerksamkeit erregte die Studie von Maggio *et al.*, in der chimäre Rezeptoren aus dem α_{2c} -adrenergen Rezeptor und dem m_3 -Muskarinrezeptor exprimiert wurden. Für beide war bekannt, dass eine Aufteilung des Rezeptorgens auf zwei Gene mit anschließender Expression zu aktiven Rezeptoren führte.¹⁹¹ In der Studie konnte gezeigt werden, dass ein Chimär alleine keine Bindungseigenschaften aufwies. Wurden allerdings beide Chimäre co-exprimiert, konnten die Ligandenbindungseigenschaften reproduziert werden. Dies verwies auf die Möglichkeit der Rezeptor-Rezeptor-Interaktion (Tabelle 5).¹⁹²

Tabelle 5: Darstellung über den Versuchsaufbau von Maggio *et al.*. (Grün: m_3 -Muskarinrezeptor, Grau: α_{2c} -adrenerger Rezeptor, Schwarzes Dreieck: N -[3H]Methylscopolamin, Schwarzer Kreis: [3H]Rauwolscin)

					
K_i [nM]	23	1.8	-	-	18 / 1.08

Der erste experimentelle Beweis gelang 1998 mit dem metabotropen $GABA_B$ -Rezeptor, der im zentralen Nervensystem zu finden ist und durch γ -Aminobuttersäure (GABA) aktiviert wird. Zuvor wurde beobachtet, dass $GABA_BR1$ in intrazellularen Membranen verweilte und somit keine Affinität zu GABA zeigte.¹⁹³ Im Hefe-2-Hybridansatz (Y2H, Tabelle 4) wurde $GABA_BR1$ eingesetzt, wobei das C-terminale Ende, mit einer angelegten *coiled coil* Struktur (1.5.2) als Köder benutzt wurde. Als Ergebnis wurde ein ähnlicher Rezeptor ($GABA_BR2$, 35 % identisch, 54 % gleich) identifiziert. Mittels Co-Immunopräzipitation (Tabelle 4) konnte eine direkte Interaktion der beiden Rezeptoren *in vivo* belegt werden (Abbildung 10). Weitere Studien zeigten, dass eine Co-Expression beider Rezeptoren zur Expression auf der Plasmamembran führte und eine Wiederherstellung der Aktivität erreicht wurde.¹⁹⁴

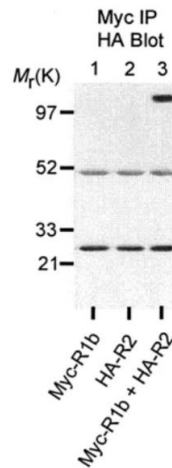


Abbildung 10: Western Blot der Co-Immunopräzipitation. Aufgetragen sind die Ergebnisse der Co-Immunopräzipitation von einzeltransfiziertem GABA_BR1 (mit myc-tag), einzeltransfiziertem GABA_BR2 (mit HA-tag) sowie doppeltransfiziertem GABA_BR1+ GABA_BR2. Mittels HA-Antikörper wurden die Ergebnisse sichtbar gemacht. Die Banden bei ~25 und ~50 kDa repräsentieren die leichte und schwere Kette des Antikörpers IgG, verwendet für die Präzipitation. Bei knapp über 100 kDa ist das interagierende Dimer abgebildet.¹⁹⁴

Knapp 30 Jahre nach der ersten Entdeckung von möglichen Homomeren durch Lefkowitz *et al.*, konnte von Jordan *et al.* das erste Mal nachgewiesen werden, dass zwei funktionale GPCRs Heteromere bilden können.¹⁹⁵ In der Studie wurden die drei δ -, κ -, und μ -Opioidrezeptoren untersucht und zunächst festgestellt, dass κ -Opioidrezeptoren und δ -Opioidrezeptoren Homomere bilden. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Stabilität der κ -Opioidrezeptordimere (Stabil in 10 % SDS) vermutlich von intermolekularen Disulfidbrücken stammt und Agonisten keinen Einfluss auf die Homomerbildung haben, wohingegen δ -Opioidrezeptordimere durch Agonisteninteraktion monomerisieren. Folgend wurden die Heterodimere mittels Co-Immunopräzipitation untersucht und das erste Mal ein Heteromer (κ - δ -Opioidrezeptordimer) nachgewiesen. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die Stabilität über intermolekulare Disulfidbrücken zustande kommen muss. Weitere Experimente zeigten, dass das Dimer nicht mittels Agonist internalisiert und deutlich unterschiedliche Ligandenbindungseigenschaften im Vergleich zu den zwei Monomeren aufwies. Interessanterweise konnte eine kombinatorische Zugabe zweier Agonisten, die alleine keine Bindung zum Dimer aufwies, die Bindungseigenschaften drastisch erhöhen, was den Schluss zulässt, dass eine synergistische Bindung, durch eine neue Bindungstasche erfolgt. Dies hatte auch Einfluss auf die *second messenger*, welche im Fall von cAMP reduziert und von MAPK erhöht wurden.¹⁹⁵

Diese experimentellen Funde sind ein starker Hinweis auf die Existenz von Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen, welche im nächsten Abschnitt weiter beleuchtet werden sollen.

1.8.2 Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen (RRI)

Wie bereits von Zoli *et al.* beschrieben (Abbildung 9), ist die Interaktion zweier Rezeptoren auch ohne physischen Kontakt möglich. Um die Beschreibung von Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen zu präzisieren, wurde 2010, während des internationalen Workshops anlässlich des Nobel Forums am Karolinska Instituts folgende Definition formuliert: „... *when the binding of a ligand to the orthosteric or allosteric sites of one receptor causes, via **direct** allosteric interactions, a change in the ligand recognition, decoding and trafficking processes of another receptor.*“¹⁹⁶ Übersetzt: „... wenn die Bindung eines Liganden an die orthosterischen oder allosterischen Stellen eines Rezeptors über **direkte** allosterische Interaktionen eine Änderung der Ligandenerkennungs-, -entschlüsselungs- und -wanderungsprozesse eines anderen Rezeptors bewirkt.“¹⁹⁶ Um dieser Definition gerecht zu werden, werden von nun an nur noch direkte Interaktionen als Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen betitelt (Abbildung 9, Mitte).¹⁹⁷

Allosterie bedeutet hierbei, dass durch die Anlagerung eines Proteins an ein anderes, dessen energetischer Zustand verändert wird. Das modulierte Protein unterscheidet sich dabei in der Konformation und den dynamischen Eigenschaften zum monomeren Protein.^{197, 198}

RRI können durch unterschiedliche Methoden untersucht werden. In Tabelle 6 sind unterschiedliche Techniken aufgelistet, die zur Identifikation von Homomer- und Heteromerinteraktionsflächen beigetragen haben. Dies ist nur ein Ausschnitt, aus den bekannten Homomeren und Heteromeren, sowie deren Interaktionen. Für ein komplettes Bild wird die folgende Literatur empfohlen:¹⁹⁹⁻²⁰³

Tabelle 6: Auflistung experimenteller Methoden zum Nachweis von RRI in GPCR-Homo- und Heteromeren.^{197, 204} (X-Y = Helix X und Helix Y von Protomer A₁ interagieren mit Helix Y und Helix X von Protomer A₂; X,Y = Helix X von Protomer A₁ interagiert mit Helix Y von Protomer A₂; X+Y,Z = Helix X und Y von Protomer A₁ interagieren mit Helix Z von Protomer A₂. Römische Zahlen geben transmembrane Helices an. ICL = Intracellular loop)

Technik	GPCR	Interaktionsflächen	Ref.
<i>Homodimere</i>			
X-Ray	Adenosin A ₁	IV-V	205
Cross-linking	Rhodopsin	I-II; IV-V	206
Gel filtration	Thromboxan A ₂	I	207
BRET	Angiotensin II Typ 1	I-IV; IV-V; VI-VII	208
FRET	β ₂ -AR	I,VIII	209
FCS	Dopamin D ₃	I+II,VII; IV-V	210
FCCS	CCR5	V	211
BiFC	Opsin	V	212
<i>Heterodimere</i>			
BRET	Adenosin A _{2A} / Dopamin D ₂	V+VI,III+IV	213
	Dopamin D ₁ / Dopamin D ₂	VIII,ICL3	214
<i>Homo- und Heterotrimere</i>			
FRET	Adenosin A _{2A} / Dopamin D ₂ Cannabinoid CB ₁	D ₂ :CB ₁ = V CB ₁ :A _{2A} = IV D ₂ :A _{2A} = VIII-ICL3	215
<i>Homo- und Heterotetramere</i>			
BRET, TIRFM	Adenosin A ₁ / Adenosin A _{2A}	A ₁ :A ₁ , A _{2A} :A _{2A} = IV-V A ₁ :A _{2A} = V-VI	216

In der Definition von RRI wird von „[...] direkten allosterischen Interaktionen [...]“ gesprochen, die „[...] eine Änderung der Ligandenerkennungs-, -entschlüsselungs- und -wanderungsprozesse eines anderen Rezeptors bewirk[en]“.¹⁹⁶ Im Folgenden soll ein Überblick gegeben werden, wie diese Prozesse aussehen.

1.8.3 Prozesse im Rezeptormosaik (RM)

In 1.8.1 wurde das erste Mal der Begriff des Rezeptormosaiks aufgegriffen. Dieser soll veranschaulichen, dass eine Zusammensetzung von unterschiedlichen „Mosaikteilchen“ zu unterschiedlichen „Bildern“ führen kann. Oder: Strukturell und funktionell unterschiedliche Rezeptoren bilden, je nach Anordnung, strukturell und funktionell unterschiedliche Rezeptoroligomere. Auf diese Anordnungen, sowie deren Funktionen soll folgend eingegangen werden.

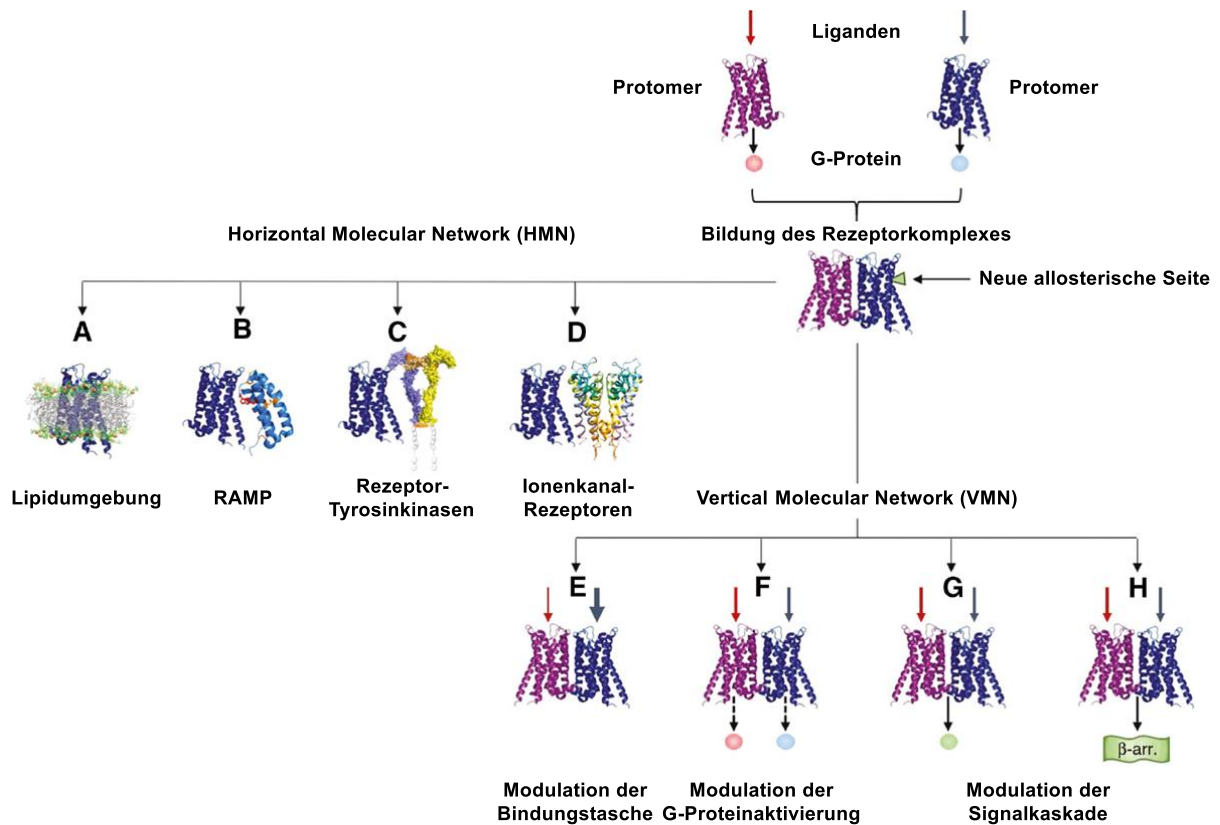


Abbildung 11: Übersicht der Prozesse in einem Rezeptormosaik.¹⁹⁷ Ausgehend von zwei Protomeren kann sich zunächst ein quartärer Komplex bilden, welcher zusätzlich eine allosterische Seite aufweist. Ausgehend davon sind zwei unterschiedliche Beteiligungen in Netzwerken möglich. Das *Horizontal Molecular Network* (HMN) (A–D) beschreibt die Wechselwirkung mit anderen, in der Membran befindlichen Partnern. Das *Vertical Molecular Network* (VMN) (E–H) beschreibt die Prozesse, die aus der Oligomerbildung resultieren können. (RAMP = *Receptor Activity-Modifying Membran Proteine*)

In Abbildung 11 ist ein Überblick über die Beteiligungen von GPCRs im Mosaik und die resultierenden Effekte gegeben. Grundsätzlich wird zwischen zwei Netzwerken unterschieden, in denen die GPCRs partizipieren. Das *Vertical Molecular Network* (VMN) beschreibt den Effekt der Oligomerisierung, das *Horizontal Molecular Network* (HMN) die Zusammensetzung. Letztlich hat jede Zusammensetzung Einfluss auf den Effekt, wobei von integriertem Output gesprochen wird.

Der erste Effekt im VMN ist die Modulation der Bindungstasche (Abbildung 11, E), dieser wurde bereits in 1.8.1 beschrieben. Ein weiteres Beispiel dafür ist das D₂-A_{2A}-Dimer, bei dem die Zugabe des A_{2A}-Agonisten CGS216980 zu verminderter Bindung des D₂-Agonisten Quinpirol führte.²¹⁷ Neben der Bindungstasche kann auch die G-Proteinaktivierung moduliert werden (Abbildung 11, F). Beispielhaft hierfür ist das D₁-H₃-Dimer, bei dem die Oligomerisierung den Wechsel vom G_s-Protein zum G_i-Protein (D₁-Rezeptor) zur Folge hatte.²¹⁸ Letztlich kann die Komplexbildung zur Folge haben, dass ein komplett anderes G-Protein oder anstelle eines G-Proteins β-Arrestin angelagert wird (Abbildung 11, G, H). So rekrutiert das D₁-D₂-Dimer, nicht wie für diese Rezeptorklasse üblich, G_{s/olf} oder G_{i/o}, sondern

$G_{q/11}$ ²¹⁹ und die Dimerisierung von Cannabinoidrezeptoren und δ -Opioidrezeptoren führt zur Rekrutierung von β -Arrestin anstelle von $G_{i/o}$.^{197, 220, 221}

Das HMN beschreibt weitere, neben den GPCRs vorliegende Partner zur Mosaikbildung. Zu diesen Partnern gehören Lipide (Abbildung 11, A), wie zum Beispiel Cholesterol, Glycosphingolipide, Phosphatidylglycerol und Phosphatidylethanolamin.^{222, 223} Generell bewegen sich Rezeptoren in sogenannten *lipid rafts* und Caveolae, also Membranbereichen, in denen Cholesterol und Sphingolipide verstärkt auftreten.²²⁴ Somit wundert es nicht, dass Cholesterol Einfluss auf z. B. μ -Opioidrezeptoren nimmt, indem höhere Konzentrationen des Lipids zu verstärkter Rekrutierung von β -Arrestin führen und Internalisierung anregen.²²² Daneben können Lipide auch direkten Einfluss auf die Bindungstasche haben. Während Phosphatidylglycerol zur Agonistenbindung führt, wird durch Phosphatidylethanolamin die Bindungstasche des β_2 -AR für den Antagonisten aufgespannt.²²³ Ein weiteres Mosaikteilchen sind die *Receptor Activity-Modifying* Membranproteine (RAMP, Abbildung 11, B). Diese aus einer transmembranen Helix bestehenden Proteine können durch Anlagerung sowohl die Pharmakologie eines Rezeptors aber auch dessen Signalkaskade ändern. Vor allem bei GPCRs der Klasse B sind sie sehr verbreitet.²²⁵ Daneben können Rezeptor-Tyrosinkinasen mit GPCRs wechselwirken (Abbildung 11, C). Insbesondere für die Fibroblasten-Wachstumsfaktorrezeptoren (FGFR) konnte nachgewiesen werden, dass sie mit 5-HT_{1A}-Rezeptoren oder mit M₁-Rezeptoren interagieren und so die Neuronendichte und strukturelle Plastizität erhöhen.^{226, 227} Letztlich sind Ionenkanäle mögliche Oligomerisierungspartner (Abbildung 11, D). Im Jahr 2000 konnte das erste Mal ein Dimer aus D₅-Rezeptor und GABA_A-Rezeptor nachgewiesen werden.²²⁸ Diese Konstellation ist von besonderem Interesse, da beide Rezeptortypen auf Synapsen vorkommen und so eine weitere Regulationseinheit aufweisen können.¹⁹⁷

Zum Abschluss dieses Kapitels sollen anhand eines Beispiels die modernen Methoden der Untersuchung von Rezeptoroligomeren aufgezeigt werden.

1.8.4 Das A_{2A}-D₂-Dimer

Das A_{2A}-D₂-Dimer ist eines der am besten untersuchten Rezeptorheteromere und kommt in hoher Dichte in den Basalganglien vor, welche für kognitive und motorische Funktionen zuständig sind. Dies macht das Rezeptorpaar besonders für die Forschung rund um die Parkinson'sche Krankheit interessant. Im Jahr 1991 wurde zunächst festgestellt, dass, bei Koexpression in der Plasmamembran, die Stimulation des A_{2A}-Rezeptors zu einer verminderten Affinität des D₂-Rezeptors führt.²²⁹ Neben dieser Modifikation der Bindungseigenschaften wird auch die G-Proteinaktivierung (Abbildung 11, E, F) und somit die *second messenger* Kaskade beeinflusst.

Im Normalzustand würde, bei Aktivierung des A_{2A} -Rezeptors, das G_s -Protein die Adenylylzyklase aktivieren und somit ATP in cAMP umsetzen. Dies wiederum würde zur Verstärkung eines Signals führen. Im Fall von Adenosin, einem Rezeptoragonisten, sollte die motorische Aktivität angeregt werden, wohingegen Koffein als Rezeptorantagonist zu niedriger motorischer Aktivität führen sollte. Allerdings wird das Gegenteil beobachtet.^{230, 231} Dies führte zu der Annahme, dass der D_2 -Rezeptor, welcher bei Aktivierung mit einem G_i -Protein die Adenylylzyklase hemmt, mit dem A_{2A} -Rezeptor in den Basalganglien in Wechselwirkung tritt. Diese reziproke antagonistische Interaktion, konnte in diversen Zelllinien beobachtet werden.²³² So wurde in SH-SY5Y Zellen gezeigt, dass nach Stimulation des A_{2A} -Rezeptors (hohes cAMP-Level) ein D_2 -Rezeptor Agonist zur Reduktion der cAMP-Konzentration führte, allein aber keinen Einfluss auf diese hatte (Abbildung 12).²³⁰ Neben dieser Beobachtung wurde festgestellt, dass der D_2DR auch ohne Ligand die Bindungstasche des $A_{2A}AR$ negativ allosterisch moduliert.²³³

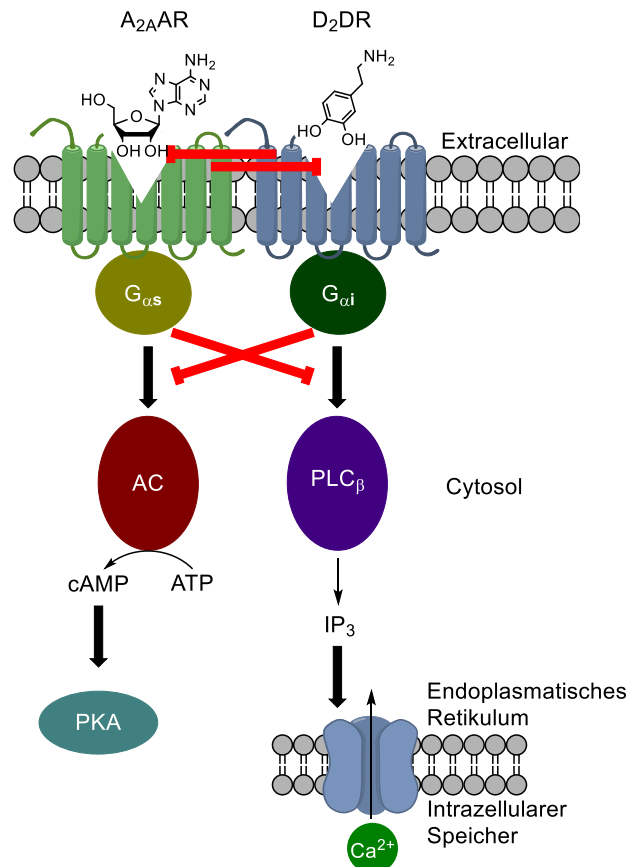


Abbildung 12: Bildung des A_{2A} - D_2DR -Rezeptordimers hat allosterischen Einfluss auf die Bindungstaschen aber auch auf die Signalkaskaden. Bindet ein Agonist in der Bindungstasche wird über eine allosterische Wechselwirkung die Affinität der jeweils anderen Bindungstasche verringert (Abbildung 11, E). Darüber hinaus kann durch gezielte Zugabe unterschiedlicher Liganden die Signalkaskade inhibiert und das *second messenger* Signal verändert werden.²³⁴

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass nachdem ein aktivierter $A_{2A}AR$ den D_2DR allosterisch sowie funktional blockiert, die Zugabe eines $A_{2A}AR$ Antagonisten zur Aufhebung dieser Modulation führt. Aus den gesammelten experimentellen Daten wurde die Hypothese

abgeleitet, dass ein Equilibrium aus $A_{2A}AR$ - und D_2DR -Homo- und Heteromeren vorliegt, welche wiederum ein Tetramer bilden können.^{235, 236} Da sich diese Annahme noch nicht endgültig bestätigen lässt, wird nicht näher darauf eingegangen.

Diese ersten Ergebnisse basierten auf klassischen Assaymethoden, wie Radioligandbindungsassays und cAMP-Akkumulationsexperimenten. Eine weitere Methode, mit der die Wechselwirkung der beiden Rezeptoren untersucht wurde, war die Co-Immunopräzipitation (Abbildung 13).

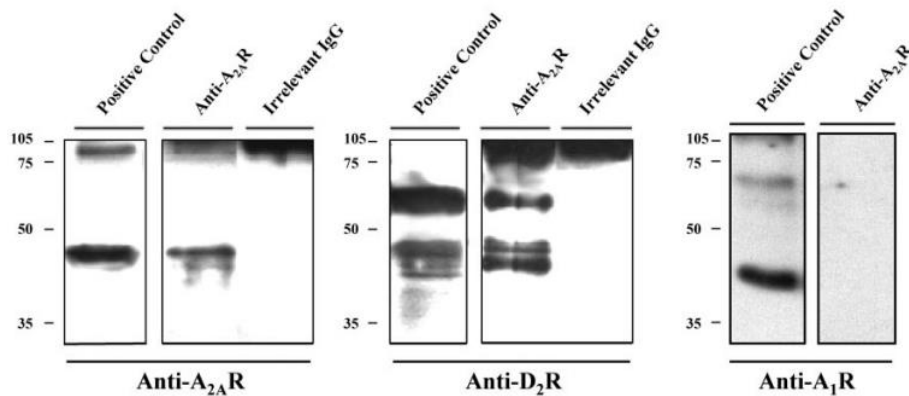


Abbildung 13: Co-Immunopräzipitation von $A_{2A}AR$ und D_2DR aus Membranpräparationen. Die Immunopräzipitation wurde mit $A_{2A}AR$ Antikörpern durchgeführt, die erhaltenen Proben mittels SDS-PAGE getrennt und mittels Western Blotting sichtbar gemacht. Als Positivkontrolle wurde direkt aus dem Zellysate aufgetrennt. Unter den drei Gelen ist der Antikörper für das Western Blotting benannt.²³⁰

Hierfür wurden Membranpräparationen von mit D_2DR transfizierten SH-SY5Y-Neuroblastomazellen mittels Co-Immunopräzipitation untersucht und mittels unterschiedlicher Antikörper das Auftreten von Rezeptordimeren überprüft. In Abbildung 13, Mitte, ist das Ergebnis dargestellt, welches unterschiedlich glykosylierte D_2DR (43, 47 und 63 kDa) zeigt.²³⁰ Nach diesem *in vitro* Nachweis, wurde versucht das Dimer zu visualisieren, um eine Kolokalisation *in vivo* zu zeigen. Erneut wurden die mit D_2DR transfizierten SH-SY5Y-Neuroblastomazellen verwendet, welche den A_2AR natürlich exprimieren. Mittels Immunofluoreszenz konnten die Rezeptoren auf den Zellen markiert und durch Konfokalmikroskopie visualisiert werden. Nach einer doppelten Markierung wurden die jeweils erhaltenen Bilder übereinandergelegt und aus der Mischung der Farben auf Kolokalisation geschlossen (Abbildung 14, c).

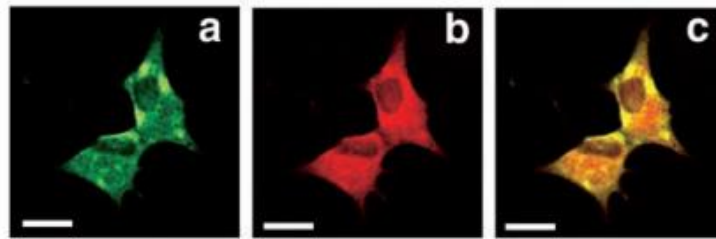


Abbildung 14: Färbung mittels Immunofluoreszenz mit anschließender Konfokalmikroskopie der D₂DR transfizierten SH-SY5Y Neuroblastomazellen. A) Fluorescein-verknüpfte Antikörper binden A_{2A}AR. B) Rhodamin-verknüpfte Antikörper binden D₂DR. C) Überlagerung der beiden Bilder führt zu gelben Bereichen, die Kolokalisation anzeigen.²³⁰

Diese Untersuchung wurde in natürlichem Gewebe wiederholt, wobei auf eine Transfektion des D₂DRs verzichtet werden konnte. Dies schließt den Faktor der Überexpression aus, welcher zu unnatürlich hoher Dichte und somit zufälliger Kolokalisation führen kann.

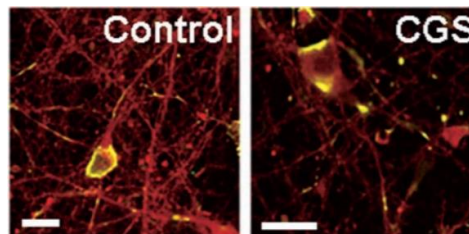


Abbildung 15: Doppelte Färbung mittels Immunofluoreszenz mit anschließender Konfokalmikroskopie striataler Neuronen. Für die Färbung wurden Fluorescein-verknüpfte A_{2A}AR Antikörper und Rhodamin-verknüpfte D₂DR Antikörper verwendet. Kolokalisation wird durch gelbe Bereiche angezeigt. Links ist das Kontrollexperiment, ohne Zugabe eines Agonisten dargestellt, rechts nach Zugabe von CGS-21680, einem A_{2A}AR Agonisten.²³⁰

Abbildung 15 zeigt striatale Neuronen eines Rattengehirns. Wie zuvor wurden zwei Antikörper unterschiedlicher Farbe verwendet, um die beiden Rezeptoren zu markieren. Mittels Konfokalmikroskopie wurden Bilder aufgenommen und festgestellt, dass es bereits ohne Behandlung durch einen Agonisten (Abbildung 15, Control) zu Kolokalisation kommt. Durch Zugabe des Agonisten CGS-21680 aggregieren die Rezeptoren stärker (Abbildung 15, CGS), was zu einer verringerten Verteilung der Rezeptoren im Gewebe führt. Diese Visualisierung war der erste „Beweis“ für das Auftreten des Rezeptorheteromers in natürlichem Gewebe. Der Nachteil der Methode liegt aber in der Genauigkeit. Das Auftreten der gelben Farbe bedeutet eine räumliche Nähe von 0,1 μm (Wert aus der Publikation; 0,2 – 0,3 μm in Literatur²³⁷). Ein GPCR hat aber einen Durchmesser von $\approx 40 \text{ \AA}$, für eine Dimererkennung wäre somit eine Auflösung von $\approx 40 \text{ \AA}$ von Mittelpunkt zu Mittelpunkt notwendig.²³⁸ Das entspricht einer Diskrepanz um den Faktor 25 – 75. Ob die beiden Rezeptoren im oben gezeigten Beispiel also tatsächlich ein Heterodimer bilden bleibt unklar und bedarf genauerer Methoden.

Auf diese ungenaue Methode folgte wenig später die Dimererkennung mittels FRET.²¹³ Dafür wurden HEK-Zellen mit Konstrukten von D₂DR-GFP2 und A_{2A}AR-YFP transfiziert und mittels zweier unterschiedlicher FRET-Varianten (SE, AB) untersucht. Beide, beschrieben in Tabelle

4, geben die FRET-Effizienz, aus der der Abstand der Rezeptoren zueinander berechnet werden kann (Abbildung 16).

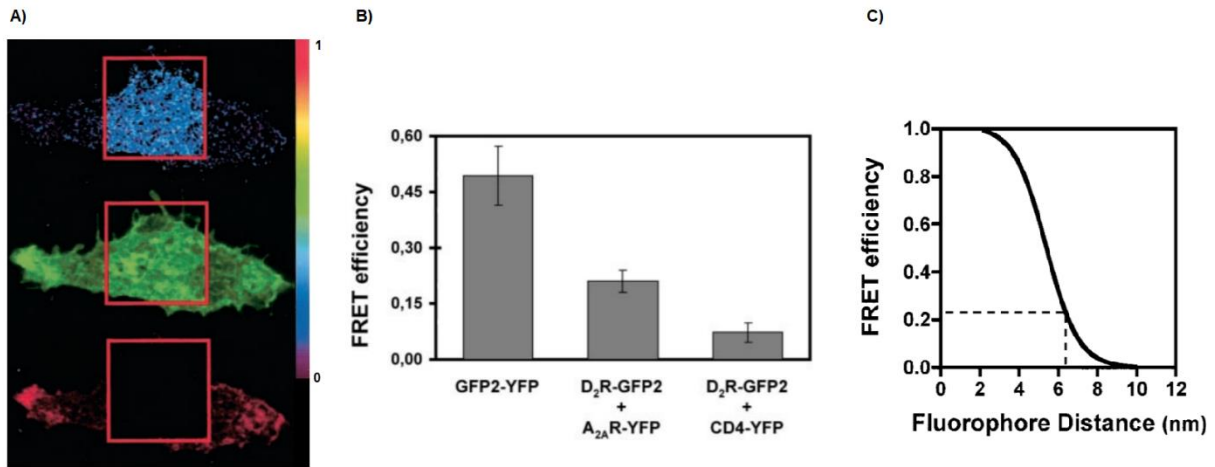


Abbildung 16: A) Effizienzbestimmung mittels FRET-Acceptor Bleaching. Im roten Viereck ist die Region of Interest (ROI) definiert. Unten: Komplettes Bleaching des YFPs der ROI, Mitte: Verstärkte GFP2 Fluoreszenz in ROI, Oben: Normalisierte FRET-Effizienz als Darstellung in Farbe. Skala an rechter Seite dargestellt von 0 = lila bis 1 = rot. B) Effizienzbestimmung mittels FRET-Sensitized Emission Methode. Links: Expression beider Farbstoffe auf einem Plasmid als Positivkontrolle, Mitte: Separate Expression beider Konstrukte, Rechts: Negativkontrolle mit einem unterschiedlichen Rezeptor. C) Graph über die Darstellung der FRET Effizienz in Abhängigkeit zum Fluorophorabstand.²¹³

Beide Methoden ergaben eine Effizienz von 23 – 25 %, was einem Abstand von 6 – 6,5 nm entspricht (Abbildung 16, C).²¹³ Dies wiederum stimmt mit dem theoretisch ermittelten Abstand von 40 Å sehr gut überein, wobei es sich um einen optimalen Abstandswert handelt, der die Fluktuationen der Fluorophore, sowie deren Anordnung nicht berücksichtigt.

Weiterhin wurde in der Veröffentlichung das erste Mal ein BRET-Experiment für das Dimer durchgeführt. Hierfür wurde an den A_{2A}AR Rluc und an den D₂DR YFP fusioniert. In einem Sättigungsexperiment wurde die A_{2A}AR Konzentration konstant gehalten, wobei die D₂DR Konzentration schrittweise erhöht wurde. Aus dieser Sättigungskurve (Abbildung 17) konnte BRET_{max} und BRET₅₀ abgelesen werden. Theoretisch wäre daraus eine Bestimmung der Anzahl gebildeter Heteromere (BRET_{max}) und der Affinität (BRET₅₀) zueinander denkbar. Dies ist leider nicht möglich, da beide Werte auch vom Abstand der beiden Fluorophore sowie deren Orientierung abhängen.²³⁹ Durchaus durchführbar ist aber die Bestimmung der n-Merbildung sowie der Vergleich der erhaltenen Werte. So ist es möglich, durch Zugabe eines Agonisten, den BRET₅₀ Wert zu verändern und daraus abzuleiten, ob eine vermehrte oder verminderte Tendenz zur Oligomerbildung besteht.²³⁹

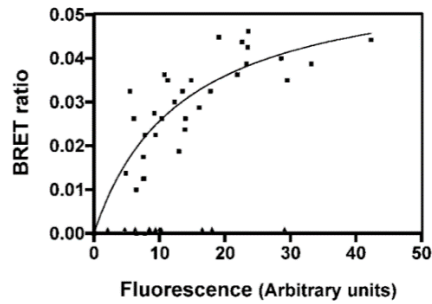


Abbildung 17: BRET-Sättigungskurve, wobei die RLuc Konzentration konstant gehalten wird und die Akzeptorkonzentration (YFP) sukzessive erhöht wird.²¹³

Nachdem mit diesen modernen Methoden die Existenz des Heterodimers weitestgehend belegt wurde, wurde nach der Interaktionsfläche der Rezeptoren geschaut. Um dies zu untersuchen wurde ein BRET-Kompetitionsassay durchgeführt, wobei die Konzentration der beiden Rezeptor-Fluorophor-Fusionsproteine konstant gehalten und die 7 transmembranalen Helixproteine einzeln, mit steigender Konzentration dazugegeben wurden (Abbildung 18).²⁴⁰

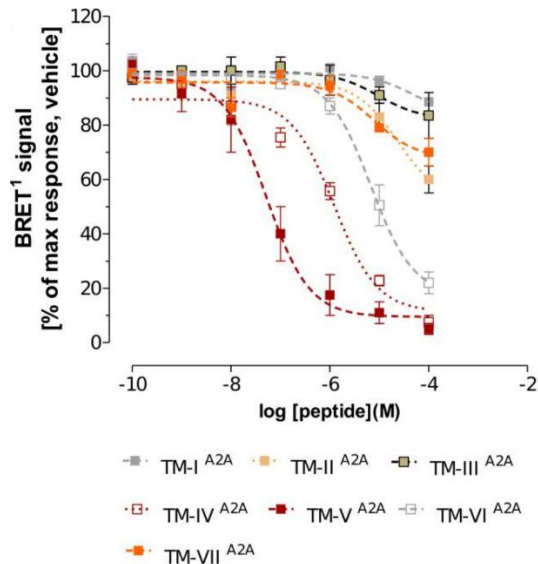


Abbildung 18: Intensität des BRET-Signals in Abhängigkeit des zugegebenen Peptids. Die A_{2A}R und D₂DR Rezeptor-Fluorophor-Fusionsproteine wurden konstant gehalten und die transmembranalen Helices I-VII des A_{2A}ARs zugegeben.²⁴⁰

Aus der Grafik lässt sich ableiten, dass die Helices IV-VI an der Dimerbildung beteiligt sind. Eine signifikante Wirkung auf die Dimerbildung scheint dabei die TM-V zu haben, welche das BRET-Signal bereits bei geringen Konzentrationen minimiert.

Nachdem die beteiligten Helices bestimmt wurden, konnten in einem letzten Experiment die beteiligten Aminosäuren bestimmt werden. Hierfür wurde erneut auf das BRET-basierte Sättigungsexperiment zurückgegriffen und BRET_{max} und BRET₅₀ von mutierten D₂-Dopaminrezeptoren mit dem Wildtyprezeptor verglichen (Abbildung 19).

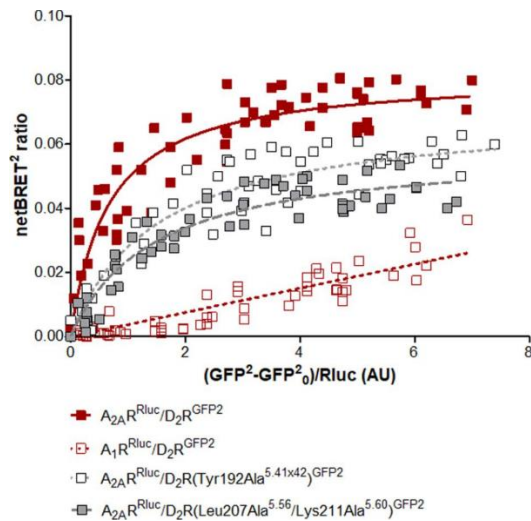


Abbildung 19: BRET-basiertes Sättigungsexperiment. Wie zuvor wird die Rluc-Konzentration konstant gehalten und die GFP2-Konzentration sukzessive erhöht.²⁴⁰

In Abbildung 19 ist der Vergleich der Sättigungskurven dargestellt. Die roten Vierecke repräsentieren die Ausgangskurve resultierend aus dem A_{2A}R-Rluc und D₂DR-GFP2 Konstrukt. Durch Mutation der Aminosäuren Tyr192 und Leu207 wird der BRET_{max}- sowie der BRET₅₀-Wert im Vergleich zum Wildtyprezeptor signifikant erniedrigt. Dies lässt auf die Beteiligung der beiden Aminosäuren bei der Rezeptorbildung schließen.²⁴⁰

Somit konnte durch moderne Methoden die Existenz des Dimers bestätigt und die Beteiligung der Helices sowie deren Aminosäuren aufgedeckt werden. Aber ein Kritikpunkt bleibt. Jegliche Untersuchungen basieren auf künstlich hergestellten Systemen. So müssen Fusionsproteine hergestellt und in Zellsystemen exprimiert werden. Dies kann zu fälschlich angenommenen Interaktionen führen. Um diesen letzten Punkt auszuschließen wurde ein Assay entwickelt, welcher in natürlichem Gewebe durchgeführt werden kann und keinerlei Modifikation des Rezeptors bedarf. Der *Proximity Ligation Assay*.

1.9 Der Proximity Ligation Assay

1.9.1 Allgemein

Der *Proximity Ligation Assay* ist eine Methode zur Proteindetektion, Proteinquantifizierung, Proteinlokalisierung sowie -Koklokalisierung. Zwei „proximity probes“, bestehend aus jeweils einem Proteinmarker und einem Oligonukleotid Einzelstrang, werden zum Zielprotein gegeben und binden selektiv mit dem Marker an diesem. Sind die Oligonukleotide in räumlicher Nähe, können sie durch ein Konnektoroligonukleotid ligiert werden. Die so entstandene doppelsträngige DNA kann mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert und fluorometrisch detektiert werden.

1.9.2 Entwicklung

Im Jahr 2002 stellte die Gruppe um Fredriksson *et al.* die neue Methode der Proteindetektion und Proteinquantifizierung, der *Proximity Ligation Assay* (PLA) vor.¹⁷⁶ Bereits vor der Entwicklung dieses Assays waren Methoden wie Western Blot, *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) oder *sandwich-ELISA* entwickelt worden, welche aber eine hohe Konzentration und Menge an Protein voraussetzten.¹⁷⁷ Der PLA basiert zwar auf diesen Methoden, kombiniert sie aber mit der Methode der DNA-Detektion, wie zum Beispiel *padlock probes*, welche lineare einzelsträngige DNA-Fragmente sind, die im Zielbereich mit der DNA ligiert und zur DNA-Detektion verwendet werden.²⁴¹ In den Folgejahren wurden verschiedene Methoden entwickelt, die sowohl Lokalisation als auch Koklokalisierung ermöglichen und damit Zugriff auf die Detektion von Heteromeren geben.¹⁷⁸

1.9.3 Mechanismus

Für die Detektion des Zielproteins werden mindestens zwei „proximity probes“ benötigt. Der generelle Aufbau dieser Proben ist wie folgt:

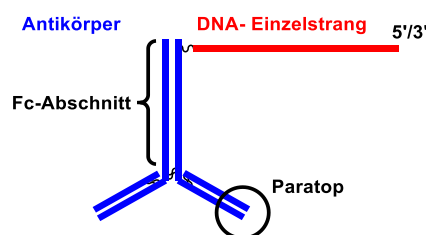


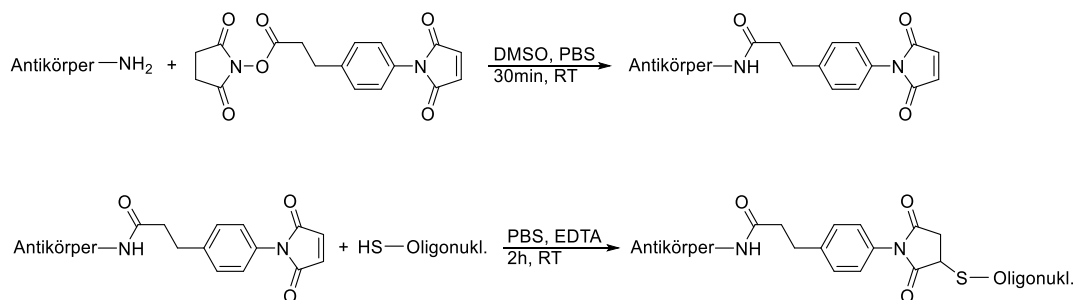
Abbildung 20: Aufbau einer *proximity probe* aus Antikörper (blau) und einzelsträngiger DNA (rot).

Das Grundgerüst bildet ein Antikörper (Abbildung 20, blau) dessen Paratop am Epitop des Zielproteins bindet. Der Fc-Abschnitt des Antikörpers ist mit einem DNA-Einzelstrang (Abbildung 20, rot) verknüpft, welcher entweder 5'- oder 3'-Orientierung aufweist.¹⁷⁷ Anstelle des Antikörpers kann auch ein Aptamer verwendet werden, diese Variante konnte sich aber nicht durchsetzen.¹⁷⁶

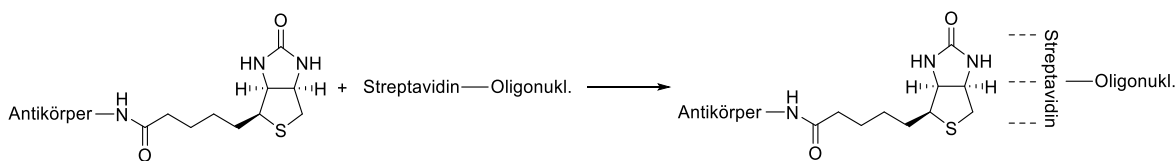
Der DNA-Einzelstrang besteht aus 30–40 Nukleotiden, wobei die genaue Länge keinen Einfluss auf die folgende Ligation aufweist.¹⁷⁶ Im Bereich des Antikörpers spielt die genaue Basensequenz keine Rolle, wodurch auch ein Poly-Adenin verwendet werden kann. Für den Assay werden zwei „proximity probes“ benötigt, deren DNA einmal auf das 5'-Ende und einmal auf das 3'-Ende endet. Die Basensequenz des Oligonukleotids ist frei zu wählen, wobei aber keine Hybridisierung der Enden möglich sein soll.¹⁷⁶

Für die Verbindung des Antikörpers mit dem Oligonukleotid haben sich mit der Zeit unterschiedliche Methoden entwickelt (Schema 3). Die erste Methode wurde im Jahr 2004 beschrieben. Hierbei wird das freie Amin des Antikörpers mit Succinimidyl-4-[*p*-maleimidophenyl]butyrat (SMPB) gekuppelt (Schema 3, A). Das Maleimid kann im weiteren Schritt mit einem terminalen Thiol an der DNA verbunden werden.²⁴² Eine andere Methode beschreibt die Biotinylierung des Antikörpers und die kovalante Bindung von Streptavidin an das 3'- beziehungsweise 5'-Ende der DNA (Schema 3, B). Durch die starke Interaktion von Biotin und Streptavidin werden der Antikörper und das Oligonukleotid verknüpft.²⁴²

A)

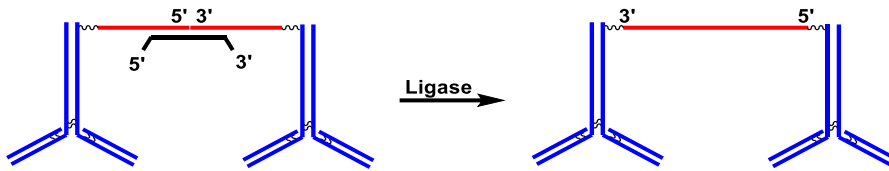


B)



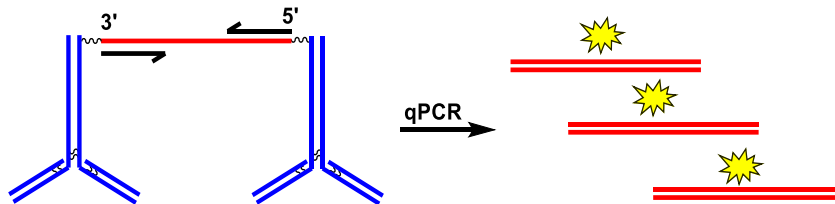
Schema 3: Vergleich der gängigsten Methoden der Antikörper-Oligonukleotid-Verbindung.^{242, 243} (DMSO = Dimethylsulfoxid, PBS = phosphatgepufferte Salzlösung, EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure)

Die vorbereiteten Proben werden auf die Lösung des zu untersuchenden Proteins gegeben und bis zu 2 h inkubiert. Daraufgehend wird eine Mischung aus Konnektoroligonukleotid, Ligase und Polymerase hinzugefügt. Im ersten Schritt binden die Antikörper der Probe an das ausgewählte Protein, im zweiten Schritt werden die räumlich nahen DNA-Oligomere der Probe unter Zuhilfenahme des Konnektoroligonukleotids ligiert (Schema 4). Das Konnektornukleotid besteht aus ≈ 25 Basen, wobei jeweils 10 Basen mit den Enden der Oligonukleotide paaren. Dieser kurze Überlapp garantiert hohe Selektivität und wenige falsche Amplifikate im folgenden Schritt.¹⁷⁶ Eine Ligase verbindet die Einzelstränge zu einem Strang.



Schema 4: Ligation der räumlich nahen Oligonukleotide mittels Ligase.¹⁷⁶

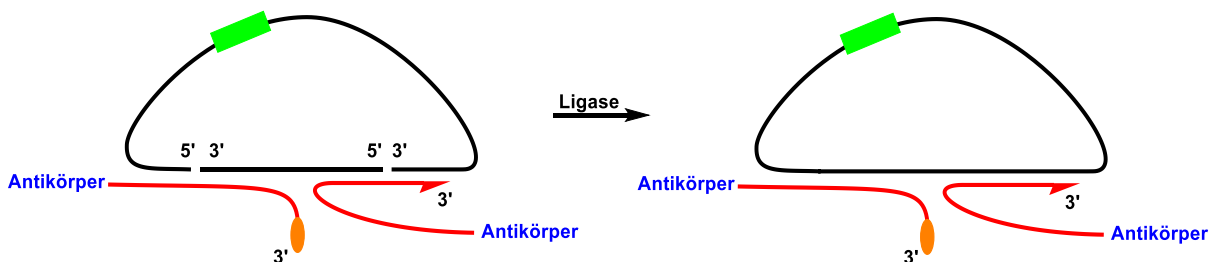
Im dritten Schritt wird das erzeugte DNA-Fragment mittels Primern und Polymerase amplifiziert. Dieses Amplifikat kann durch qPCR detektiert werden (Schema 5).



Schema 5: Ablesen des DNA-Strangs mittels PCR und anschließender fluorometrischer Detektion.¹⁷⁶

Diese beschriebene Variante dient vor allem der Quantifizierung von Proteinen, wohingegen eine Lokalisation des Proteins im Gewebe so nicht möglich ist. Im Jahr 2006 wurde die Lösung dieses Problems aufgezeigt, der *in situ* PLA.¹⁷⁸ Das Prinzip dahinter ist die Nutzung einer *rolling circle amplification* (RCA). Wie zuvor werden hoch affine Antikörper verwendet, deren angeknüpfte Oligonukleotide sich stark von denen im ursprünglichen Assay unterscheiden.

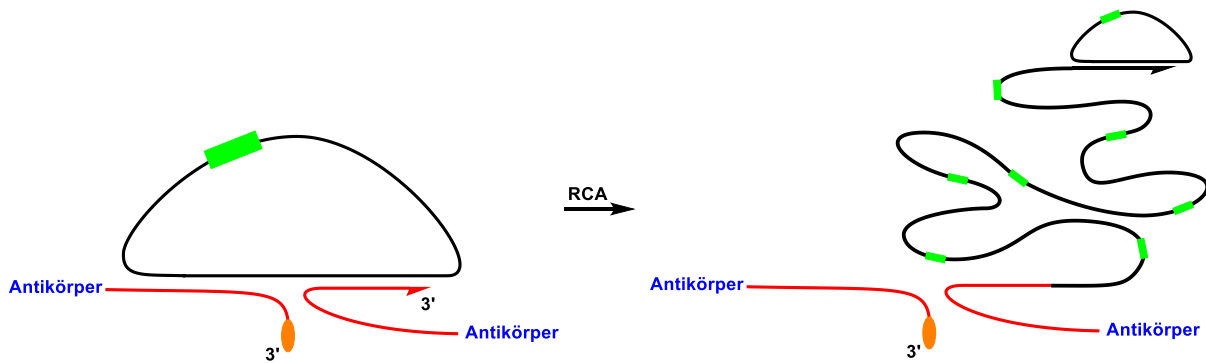
Für die RCA werden zwei Konnektoroligonukleotide benötigt, die komplementär zu den Proximity-Proben gebundenen Oligonukleotiden passen. Die gebundenen Oligonukleotide besitzen beide ein 3'-Ende, wobei ein Ende als Primer genutzt wird (Schema 6). Das andere Ende wird unpassend zum Konnektoroligonukleotid mit 2'-O-Methyl-RNA versehen (Schema 6, orange). Diese Modifikation wird zum Schutz vor Exonukleasen benötigt, verhindert aber auch die Anlagerung an das Konnektoroligonukleotid.¹⁷⁸



Schema 6: Aufbau der RCA aus zwei Konnektoroligonukleotiden und zwei antikörpergebundenen Oligonukleotiden mit anschließender Ligation.¹⁷⁸

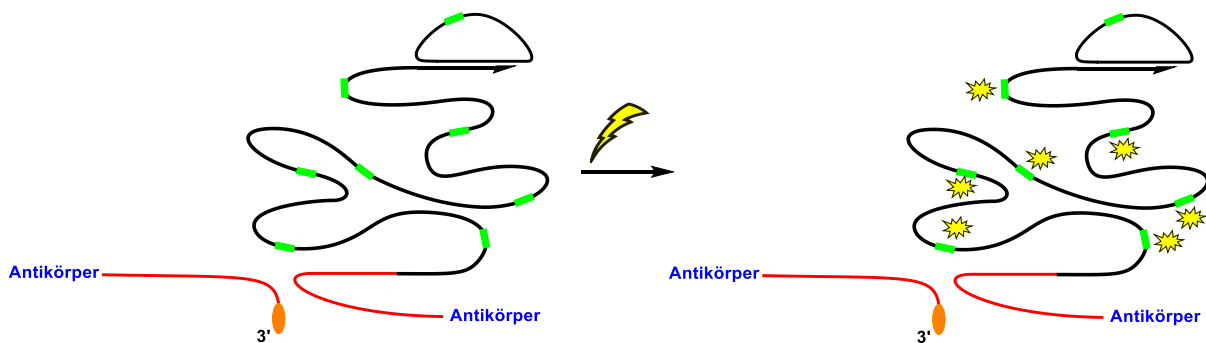
Mittels Ligase werden die Konnektoroligonukleotide zu einer zirkulären DNA verbunden (Schema 6). Im Folgenden wird die RCA begonnen, dabei dient ein Oligonucleotid als Primer für die Amplifikation des zirkulären DNA-Fragments (Schema 7). Nach einer Stunde wird das

bis zu 1000-fache, einzelsträngige Amplifikat der zirkulären DNA in der random coil Konformation am Antikörper erhalten.¹⁷⁸



Schema 7: RCA des zirkulären DNA-Fragments.¹⁷⁸

Im letzten Schritt kann durch den Einbau farbstoffgebundener dNTPs oder durch Hybridisierung fluoreszenzgelabelter Oligonukleotide der Assay ausgelesen werden (Schema 8).¹⁷⁸



Schema 8: Fluorometrische Messung der amplifizierten DNA.

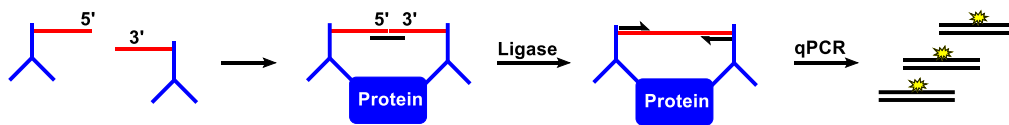
Mit dieser Technik kann der Ort eines spezifischen Proteins im Gewebe untersucht werden. Allerdings bringt diese Technik auch noch einen weiteren Vorteil. Bis zu diesem Punkt dient der Assay einzig der Quantifizierung (qPCR) und der Lokalisation eines Proteins (RCA). Allerdings ist gerade der Nachweis eines Proteindimers beziehungsweise -multimers im Gewebe, die Proteinkolokalisation, ein essenzieller Schritt im Verständnis der Wirkungsweise von Proteinen. Und diesen ermöglicht der PLA mit RCA Erweiterung mit einer Auflösung von $\approx 40 \text{ nm}$,¹⁷⁸ genau dem Wert, der für die Detektion von Rezeptordimeren benötigt wird.

Bis dato waren nur Systeme bekannt, die rekombinanter DNA-Techniken bedurften, wie zum Beispiel das Hefe-Zwei-Hybrid-System¹⁸¹ oder der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) mit fluoreszierenden Proteinen (BRET).²⁴⁴ Als einzige Methode kann die Co-Immunopräzipitation ohne rekombinante DNA-Techniken benutzt werden, weist aber Nachteile bei der Auswertung auf (Hitze, Detergenzien).²⁴⁵

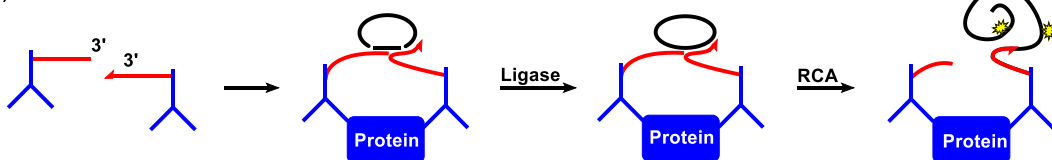
In Schema 9 ist eine Zusammenfassung des PLA am Proteinmonomer (Schema 9, A) sowie an Proteinmultimeren (Schema 9, B) dargestellt. Für beide kann die Quantifizierung durch qPCR durchgeführt werden (Schema 9, a), wodurch die Menge an einzelner Protein beziehungsweise Multimeren bestimmt werden kann. Durch die Erweiterung mittels der RCA kann die Lokalisation von Einzelproteinen (Schema 9, b), aber auch die Kolo-kalisation von Multimeren (Schema 9, c) erreicht werden. Diese breite Palette an Anwendungsmöglichkeiten lässt das PLA in die Liga von FRET, BRET und Western Blot aufsteigen. Aber weist der PLA auch Vorteile gegenüber diesen auf?

A) Proteinmonomer

a) Quantifizierung

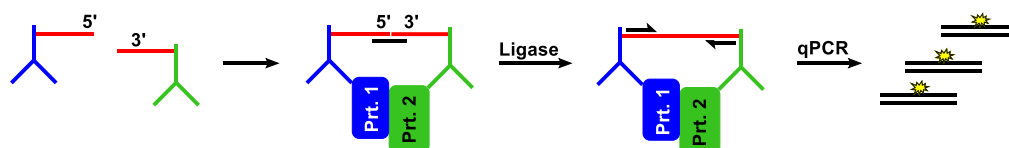


b) Lokalisation

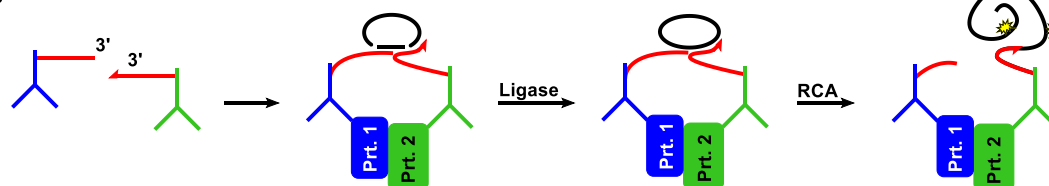


B) Proteindi- und multimeren

a) Quantifizierung



c) Kolo-kalisation



Schema 9: Zusammenfassung der PLA beziehungsweise RCA-PLA Technik am A) Proteinmonomer und an B) Proteindi- und multimeren mit den unterschiedlichen Methoden zur a) Quantifizierung, b) Lokalisation und c) Kolo-kalisation.

1.9.4 Sensitivitätsvergleich

Im Abschnitt 1.9.3 wurde bereits der Vorteil gegenüber anderen Methoden, wie dem Hefe-zwei-Hybrid System und FRET herausgestellt. Aber wobei liegt der Vorteil gegenüber klassischen Immunoassays, wie ELISA beziehungsweise Western-Blot?

Wie Abbildung 21 zeigt, liegt der Vorteil des PLA in der Sensitivität.

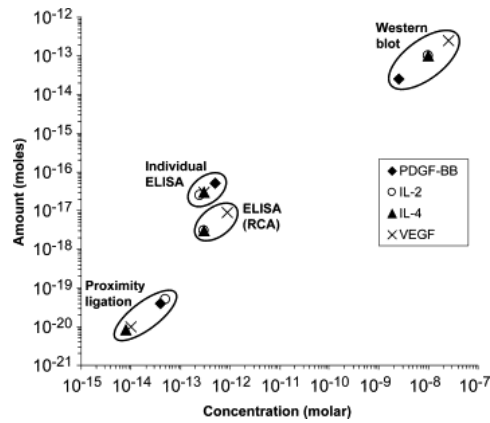


Abbildung 21: Vergleich der Detektionslimits von Proximity Ligation, ELISA, ELISA-RCA²⁴⁶ und Western Blot an *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-4 (IL-4) und am *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF).¹⁷⁷

Liegt der Western Blot bei der detektierbaren Menge im pikomolaren Bereich, kommen ELISA und ELISA-RCA schon in den niedrigen femtomolaren Bereich. Allein der *Proximity Ligation* Assay schafft niedrige attomolare Mengen der Proteine nachzuweisen. Im Vergleich der Konzentrationen bietet sich ein ähnliches Bild. Während das Enzym beim Western Blot in mikromolarer Konzentration vorliegen muss, detektieren ELISA und ELISA-RCA bei pikomolaren Konzentrationen. Nur der *Proximity Ligation* Assay schafft niedrige femtomolare Konzentrationen des Zielproteins zu detektieren.

Dies bietet den Vorteil, bereits geringe Mengen des Zielproteins in geringer Konzentration zu detektieren.

1.9.5 Anwendungsbeispiel

In Abschnitt 1.8.4 wurde das $A_{2A}AR$ - D_2DR -Heteromer genauer beleuchtet und eine Verbindung zum PLA hergestellt. Im Folgenden soll auf die Verwendung des PLA bei der Charakterisierung des Heteromers eingegangen werden.

Das erstes Beispiel der Untersuchung der Dimerbildung mittels PLA wurde von Trifilieff *et al.* vorgelegt.²⁴⁷ In der Forschungsarbeit wurde das A_{2A} - D_2 -Heteromer untersucht, welches von signifikanter Bedeutung bei der Parkinsonschen Krankheit ist.^{229, 248} Bis dato war die Dimerbeziehungsweise Oligomerbildung der A_{2A} - D_2 -Rezeptoren, auf Grund von fehlender Methoden, ein umstrittenes Feld.²⁴⁹ Zwar wurde mittels FRET Oligomerbildung nachgewiesen, wies dabei aber drastische Methoden zur Visualisierung auf.²⁵⁰ Als Nachweis sollte deshalb das sensitivere PLA-System verwendet werden. Die dafür genutzte Variante des PLA (Duolink) basiert auf insgesamt vier Antikörpern. Zwei dieser Antikörper binden jeweils den gewünschten Rezeptor, die anderen zwei binden jeweils den proteingebundenen Antikörper und tragen das Oligonukleotid. Sind die beiden Oligonukleotide, und somit die Proteine in räumlicher Nähe, kann die Ligation, Amplifikation und Visualisierung stattfinden. Der maximale Abstand liegt bei dieser Methode bei ≈ 16 nm.²⁴⁷ Zunächst wurde sowohl der D_2 -Rezeptor, als

auch der A_{2A} -Rezeptor im *dorsalen Striatum* der Maus, unabhängig voneinander, mittels PLA lokalisiert. Im nächsten Schritt konnte die Dimerbildung des A_{2A} - D_2 -Rezeptorpaars mittel PLA nachgewiesen werden (Abbildung 22).

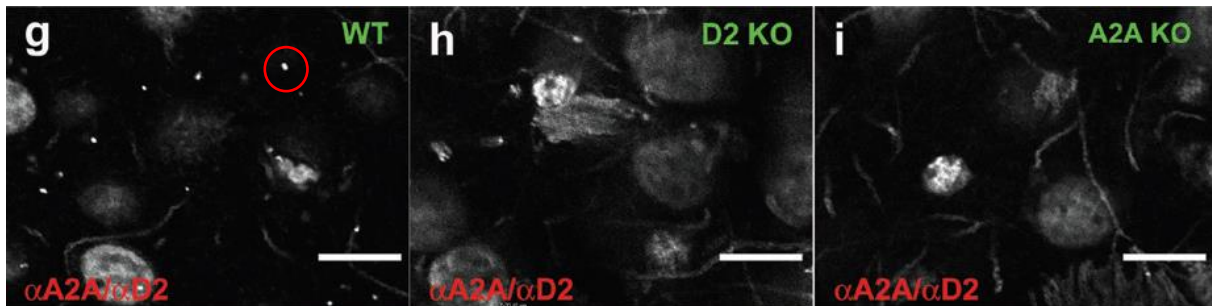


Abbildung 22: Ausschnitt aus *ex vivo* striatalen Scheiben einer Maus. Im Wildtyp (g) lokalisieren weiße Punkte A_{2A} - D_2 -Dimere (roter Kreis). In den beiden Knock out Mutanten (KO, h, i) sind keine weißen Punkte zu erkennen.²⁴⁷

Diese Ergebnisse konnten in den Folgejahren auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden, sodass heute kein Zweifel mehr an der Existenz der Heteromere besteht.²⁴⁰

1.9.6 Zusammenfassung

Alles in allem ist der *Proximity Ligation Assay* eine Methode zur Proteindetektion, -quantifizierung, -lokalisierung und -kolokalisierung. Die Vorteile liegen in der ausgedehnten Bandbreite an Anwendungsgebieten durch die Wahl der Antikörper, dem großen Konzentrationsbereich, in dem Proben nachgewiesen werden können und der daraus resultierenden Möglichkeit der Untersuchung natürlichen Gewebes. Dies wird durch den Verzicht von rekombinanten DNA-Techniken unterstützt. Somit bietet die Methode eine exakte Möglichkeit der Proteindimeruntersuchung in korrekter Auflösung (40 nm), mit hoher Sensitivität in natürlichem Gewebe.

Aber gibt es auch Nachteile?

1.9.7 Das Problem des PLA

Die hohe Sensitivität (Abbildung 21) des Assays kann nur gewährleistet werden, wenn selektive Antikörper vorhanden sind. Das Problem, selektive Antikörper zur Detektion spezifischer GPCRs zu erhalten, wird aber bereits in der Literatur diskutiert.²⁵¹ So mehren sich Beispiele, bei denen die Selektivität bestimmter Antikörper angezweifelt, beziehungsweise völlig in Frage gestellt wird.^{251, 252} Das Problem stellt dabei die hohe Homologie der GPCRs in ihren Subtypen dar.^{251, 253} Dies scheint aber nicht das einzige Problem zu sein, wie Studien mit Knockout-Mutanten zeigen.^{251, 254} Hierbei binden die Antikörper, obwohl der Rezeptor nicht exprimiert wird. Das bedeutet, dass sie sogar andere, von den Subtypen unabhängige GPCRs erkennen. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen, wäre die Fokussierung auf die *N*-beziehungsweise *C*-terminalen Enden des Rezeptors. Aber auch hier finden sich Beispiele,

bei denen eine Selektivität nicht vorhanden ist.²⁵⁵ Neben diesen Selektivitätsproblemen lässt sich die Abstandsbestimmung teilweise anzweifeln. Bedenkt man das Verhältnis von Antikörper + Oligonukleotid zu extrazellulärer Rezeptoroberfläche, kann es zu fehlerhaften, falsch positiven Ergebnissen führen. Dies verleitete den Autor einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung zu der Aussage, dass *in situ* PLA nicht besser sei als „[...] classical immunofluorescence co-localization.“²⁵⁶

Die Lösung dieses Problems bietet der Austausch der Antikörper gegen Agonisten oder Antagonisten, kurzum zu „small molecules“.

1.10 Computergestützte Berechnungs- und Simulationsmethoden

Der Austausch von Antikörpern zu „small molecules“ bringt neue Herausforderungen in der Sondenentwicklung. Wie später gezeigt wird, ist das Wissen über die Lage eines möglichen Liganden in der Bindungstasche essenziell. Um diese Herausforderungen zu meistern, werden Daten von computergestützten Berechnungsmethoden erhoben.

1.10.1 MODELLER

Das Programm MODELLER wurde entwickelt, um Homologiemodelle von Proteinen zu generieren, deren Strukturen noch nicht bekannt sind (zum Beispiel durch Kristallstrukturen). Um diese Homologiemodelle generieren zu können, wird zunächst eine Vorlage, ein sogenanntes „Templat“ benötigt. Dies ist eine experimentell erhaltene 3D Struktur, deren Aminosäuresequenz mit der der Zielsequenz weitestgehend übereinstimmt. Für das Beispiel des A₃AR bietet sich die Kristallstruktur des A₁AR an, da diese eine besonders hohe Sequenzidentität aufweisen. Insofern ein Templat gewählt wurde, müssen die beiden Sequenzen „aligned“, angeglichen werden. Die Software „EMBOSS Needle“ kann für das Alignment zweier Sequenzen verwendet werden. Diese wird auf der Internetseite des European Bioinformatics Institute angeboten und basiert auf dem Needleman-Wunsch Algorithmus. Weist das Alignment über 40 % Sequenzübereinstimmung auf, kann davon ausgegangen werden, dass es korrekt ist. Somit ergeben sich nur kleine Sequenzunterschiede, woraus nur kleine Unterschiede in der 3D Struktur resultieren. Dies ist der fundamentale Ansatz im komparativen Modelling.²⁵⁷

Auch wenn die Sequenzidentität über 40 % liegt, bietet es sich an, das Alignment genauer zu analysieren. Dabei wird wie folgt vorgegangen.²⁵⁸

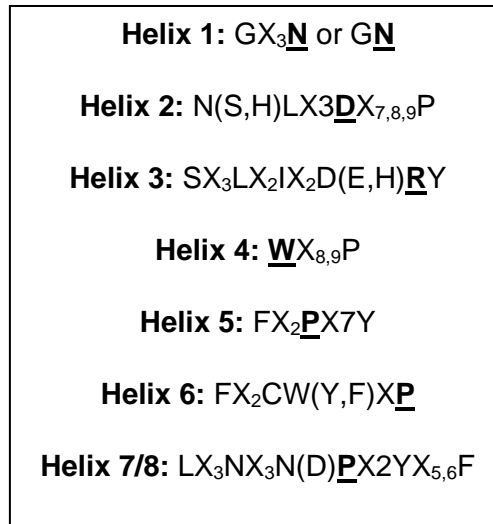


Abbildung 23: Auflistung der hochkonservierten Motive in GPCRs. Die unterstrichenen Aminosäuren sind nach Ballesteros und Weinstein als X.50 zu kennzeichnen (X = Helixnummer).

- Identifizieren der hochkonservierten Motive (Abbildung 23)
- Identifizieren der Helices
- Identifizieren der Disulfidbrücken
- Test auf Übereinstimmung der Templatsequenz und der Zielsequenz unter Berücksichtigung der genannten Punkte
- Überprüfung der Lage der Gaps in den intra- und extrazellulären Loops
- Mögliches Entfernen von großen Loopabschnitten aus der Sequenz

Eine derartige Analyse ist im Ergebnisteil gezeigt.

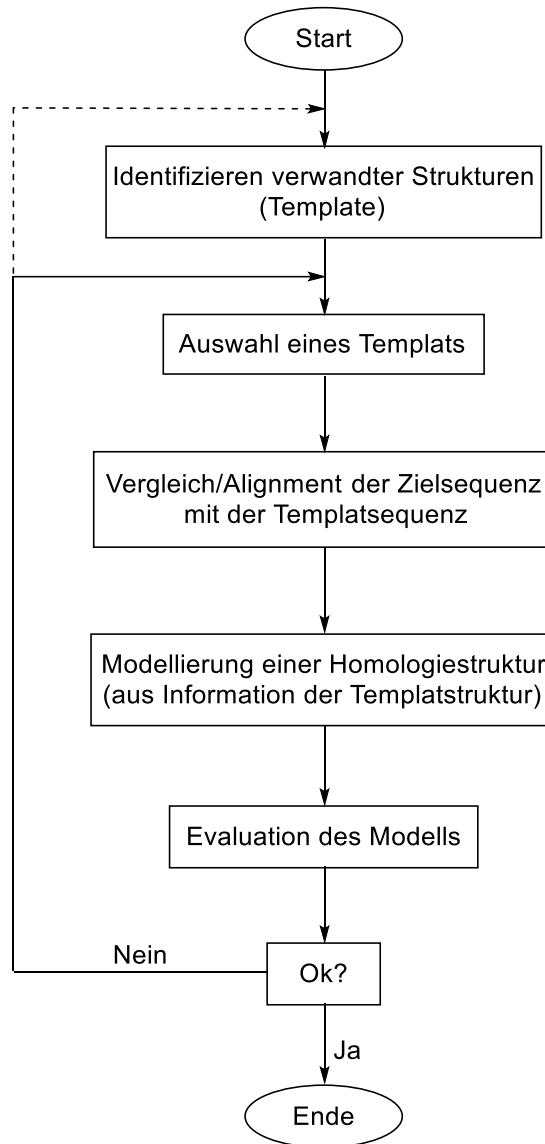


Abbildung 24: Allgemeiner Ablauf des Modellings.²⁵⁷

Der allgemeine Ablauf des Modellings ist in Abbildung 24 dargestellt. Nachdem das Templat ausgesucht und das Alignment durchgeführt wurden, kommt nun das eigentliche Modelling.

Für das Modelling können drei unterschiedliche Ansätze gewählt werden:

1.10.1.1 Modeling by Assembly of Rigid Bodies²⁵⁷

Hierbei wird zunächst das Templat auf strukturkonservierte α -Kohlenstoffe untersucht und deren Koordinaten als Rahmen festgelegt. Aus dem Alignment werden die übereinstimmenden Aminosäuren der Zielsequenz in diesen Rahmen gelegt und so ein Grundgerüst aufgebaut. Nachfolgend werden die Loops, Seitenketten sowie die Stereochemie modelliert und im letzten Schritt die Energie minimiert.

1.10.1.2 Modeling by Segment Matching or Coordinate Reconstruction²⁵⁷

Diese Methode basiert auf der Erkenntnis, dass Hexapeptidsegmente aus Proteinstrukturen in strukturelle Klassen eingeteilt werden können. Zunächst wird die Templatstruktur auf diese Weise eingeteilt, ebenso die konservierten Bereiche der Zielstruktur. Daraufhin werden, aus bekannten Proteinstrukturen, die kompletten Hexapeptidsegmente in die so eingeteilten Bereiche der Zielstruktur eingepasst. Konformationsänderungen können durch Energiefunktionen errechnet werden.

1.10.1.3 Modeling by Satisfaction of Spatial Restraints²⁵⁷

Diese, von dem Programm MODELLER verwendete Methode benutzt „constrains“, also Beschränkungen der zu generierenden 3D Struktur, die sich aus dem Alignment und dem Templat ergeben. Diese Beschränkungen werden aus dem Grundsatz abgeleitet, dass Bindungslängen und Winkel zwischen vergleichbaren Aminosäuren aus Templat und Zielstruktur gleich sind. Ergänzt werden diese Beschränkungen durch Diederwinkel und Atom-Atom-Wechselwirkungen, die aus Kraftfeldberechnungen resultieren. Die beste Homologiestruktur resultiert aus dem Modell, welches die meisten Beschränkungen erfüllt.

Das Programm MODELLER generiert zunächst Beschränkungen für Bindungslängen und Diederwinkel der Zielstruktur, die auf dem Alignment mit der Targetstruktur beruhen. Diese räumlichen Beschränkungen werden mit dem CHARMM22 Kraftfeld kombiniert. Die daraus resultierende Gleichung wird im kartesischen Koordinatensystem optimiert und eine Zielstruktur erhalten.²⁵⁷

Die Homologiemodelle werden nach ihrer Güte bewertet. Dies geschieht durch den „DOPE (Discrete Optimized Protein Energy) Score“, auf den nicht weiter eingegangen werden soll.²⁵⁹

Der gesamte Vorgang wird so häufig wiederholt, bis ein passendes Modell gefunden wurde.

Doch wozu der ganze Aufwand?

1.10.2 Molecular modeling – Protein-Liganden Docking

Ein Bestandteil des „molecular modelings“ ist das Protein-Liganden Docking. Dieses Verfahren beruht auf einer gegebenen Proteinstruktur und einem Satz an Liganden, welche in den Liganden gedockt und deren Wechselwirkungen bewertet werden, um den besten Liganden und dessen Position zu finden.

Im Folgenden wird das Programm Maestro von Schrödinger und dessen Methode, das „Glide (grid-based ligand docking with energetics) Docking“ betrachtet. Dieser hierarchisch aufgebaute Algorithmus filtert in mehreren Schritten die besten Bindungsposen heraus (Abbildung 25).²⁶⁰

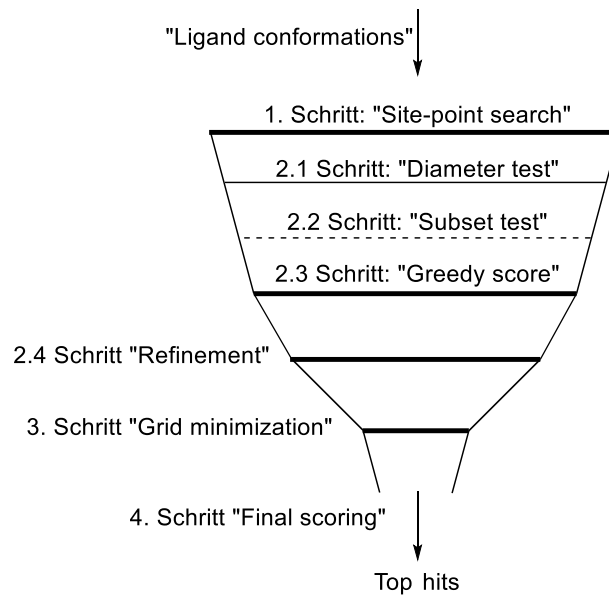


Abbildung 25: Der hierarchische Glide „Funnel“ Docking Mechanismus.²⁶⁰

Als Vorbereitung werden mehrere Ligandenkonformationen berechnet, die ein energetisches Minimum aufweisen. Im ersten Schritt des Glide Dockings wird ein 2 Å „Grid“, ein Gitter/Raster über die Substratbindungstasche gelegt, in dessen Feldern sogenannte „site-points“ bestimmt werden. Ausgehend von diesen wird in 1 Å Einheiten der Weg zur Rezeptoroberfläche gemessen.²⁶¹ Ebenso wird der Abstand des Ligandenmittelpunkts zur Ligandenoberfläche in 1 Å Einheiten gemessen. Anschließend werden diese Einheiten/Abstände verglichen und die besten Liganden gelangen in den zweiten Schritt. Im 2.1 Schritt wird eine Linie zwischen den beiden, am weitest entfernten Ligandenatomen gezogen, welche „ligand diameter“ genannt wird. Dies wird für sämtliche Orientierung des Liganden vollzogen. Ausgehend von diesen Linien wird in einem bestimmten Abstand nach Rezeptoratómen geschaut. Fallen diese in den vordefinierten Bereich, wird dieser Ligand/Orientierung des Liganden ausgeschlossen. Im 2.2 Schritt wird die Rotation des Liganden um den „ligand diameter“ mit einbezogen, und die Wasserstoffbrückenbindungswechselwirkungen sowie Ligand-Metall-Wechselwirkungen in einer „Scoring function“ bewertet. Ist der erhaltene Wert ausreichend, wird im Schritt 2.3 der Gesamtscore, bestehend aus allen möglichen Interaktionen des Liganden mit dem Rezeptor berechnet. Dieser „greedy score“ ist nicht besonders aussagekräftig, da sich die Position der Atome des Liganden auf die Positionen der „site-points“ beziehen, welche fix im Abstand von 1 Å zu finden sind. Um einen realistischen Wert zu erzielen, wird den Atomen erlaubt, sich um 1 Å in x-, y- und z-Richtung zu bewegen und erneut berechnet. Diese Stufe nennt sich „Refinement“.²⁶¹ Im 3. Schritt werden die gefundenen Anordnungen der Liganden mittels Energiefunktion „OPLS-AA force-field“ in Verbindung mit einem distanzabhängigen dielektrischen Modell minimiert. Diese minimierten Anordnungen der Liganden werden unter Zuhilfenahme einer Monte-Carlo-Rechnung bezüglich ihrer Torsionswinkel überprüft und minimiert, welches vor allem bei peripheren Ligandeneinheiten von Nutzen ist. Im letzten

Schritt werden für die besten Orientierungen „GlideScores“ berechnet. Diese leiten sich vom ChemScore ab. Im Folgenden ist die Gleichung für die Berechnung des GlideScores dargestellt.^{260, 261}

$$GScore = 0.05 \cdot E_{vdW} + 0.15 \cdot E_{Coul} + E_{Lipo} + E_{Hbond} + E_{Metal} + E_{Pen} + E_{RotB} + E_{Site}$$

Der *GScore* besteht aus der van-der-Waals Energie E_{vdW} , der Coulomb Energie E_{Coul} , einem Wert für lipophile Interaktionen E_{Lipo} , einem Wert für Wasserstoffbrückenbindungen E_{Hbond} , einem Wert für Metallbindungen E_{Metal} , einem generell Wert für Energiegewinn E_{Pen} , zum Beispiel durch hydrophobe Einschließungen und korrelierte Wasserstoffbindungen, einer Strafe für nichtdrehbare Einfachbindungen E_{RotB} und einem Wert für polare Interaktionen mit der Bindungstasche E_{Site} , die nicht auf Wasserstoffbrückenbindungen beruhen.^{260, 261}

Mit einer Kristallstruktur oder einem Homologiemodell kann eine beliebige Anzahl an Liganden gedockt und deren Orientierung im Rezeptor vorausgesagt werden. Diese redundante Technik kann zusätzlich noch automatisiert werden, um weitere Zeit zu sparen.

1.10.3 KNIME Workflow

Das Problem bei der Generierung von Homologiemodellen durch MODELLER ist die Bewertung der Güte der Systeme. Zwar gibt es gute Bewertungssysteme, wie den DOPE Score, doch bewerten diese einzig die Wahrscheinlichkeit der Stabilität des Proteins. Eine bessere Bewertungsmethode soll im Folgenden dargelegt werden.

In der Familie der Adenosinrezeptoren gibt es hohe Verwandtschaftsgrade untereinander. Nichtsdestotrotz sind Liganden bekannt, die selektiv an einem der vier Rezeptoren binden. Das bedeutet, dass durch wenige Unterschiede in der Sequenz, komplett unterschiedliche Verbindungen am Rezeptor binden. Um die Güte eines A₃AR-Homologiemodells zu belegen, welches aus der Templatstruktur des A₁AR erstellt wurde, sollten A₁AR-Liganden und A₃AR-Liganden an den Homologiemodellen gedockt werden. Das Homologiemodell, welches das beste Dockingergebnis mit A₃AR-Liganden zeigt, ist gleichzeitig das am besten generierte Homologiemodell. Somit kann die Güte generierter Modelle mittels wissenschaftlich erhaltener Daten untermauert werden. Diese Prozedur ist allerdings zeitintensiv und müsste automatisiert werden. Für solche Aufgaben wurde die Software KNIME entwickelt.

Die Software „KNIME“, der „Konstanz Information Miner“, ist eine in Java programmiertes System, welches das automatische Wiederholen redundanter Tätigkeiten durch ein modulares Pipeline-Konzept ermöglicht. Mit der Erweiterung auf Maestro Schrödinger können Dockings und andere in Maestro Schrödinger durchgeführte Berechnungen automatisiert werden.

Das Programm basiert auf einem Drag & Drop System, bei dem Module, sogenannte „Nodes“ mittels Linien verbunden werden. Diese Nodes repräsentieren spezielle Anwendungen, wie

zum Beispiel ein „Joiner“, welcher zwei Tabellen in eine kombiniert. Je nach Anordnung werden die Nodes Schritt für Schritt abgearbeitet. Im Folgenden soll eine kurze Veranschaulichung dargestellt werden.

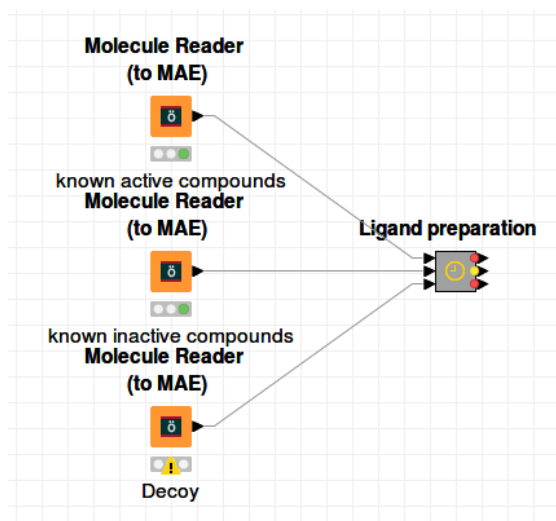


Abbildung 26: Drei „Molecule Reader“ Nodes von Schrödinger, die mit einer verpackten Node „Ligand preparation“ verbunden sind.

In Abbildung 26 sind von der Firma Schrödinger bereitgestellte Nodes dargestellt, deren Aufgabe das Einlesen von .mol2 Dateien sind. Vorab wird der Node das Verzeichnis der .mol2 Dateien gegeben. Daraufhin liest die Node das Verzeichnis ein und wandelt die .mol2 Dateien in .mae Dateien um. Im nächsten Schritt werden die eingelesenen Daten zum grauen Kasten „ligand preparation“ geleitet, dargestellt durch Linien. Die Ampel unter den orangenen Nodes dient als Statusmeldung, ob eine Node nicht angeschlossen (rot), bereit (gelb), erfolgreich (grün) ist/war oder ein Fehler vorliegt (gelbes Achtung-Zeichen).

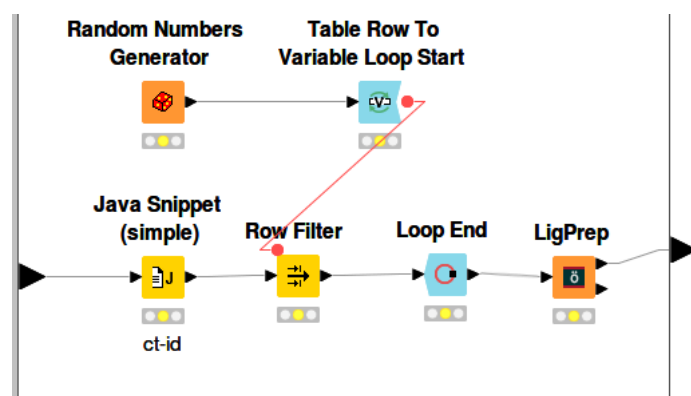


Abbildung 27: Teilweiser Inhalt des grauen Kastens „Ligand preparation“.

In Abbildung 27 ist der teilweise Inhalt des grauen Kastens aus Abbildung 26 dargestellt. Dabei handelt es sich um eine Zusammenfassung mehrerer Nodes in eine „Wrapped Node“. Ziel dieses Workflows ist die zufällige Auswahl von 100 Molekülen aus einer Sammlung von über 120000 Molekülen mit anschließender Verarbeitung.

Die Daten aus der Node „Molecule Reader“ werden als nächstes zur Node „Java Snippet, ct-id“ geleitet. Vor dieser Node sieht das Ergebnis wie folgt aus (Abbildung 28).

Row ID	CT
Row0	Molecule: ZINC00003015 #atoms: ...
Row1	Molecule: ZINC00003662 #atoms: ...
Row2	Molecule: ZINC00009202 #atoms: ...
Row3	Molecule: ZINC00031727 #atoms: ...
Row4	Molecule: ZINC00031891 #atoms: ...
Row5	Molecule: ZINC00033334 #atoms: ...
Row6	Molecule: ZINC00062435 #atoms: ...
Row7	Molecule: ZINC00062436 #atoms: ...
Row8	Molecule: ZINC00067498 #atoms: ...
Row9	Molecule: ZINC00067501 #atoms: ...
Row10	Molecule: ZINC00072422 #atoms: ...
Row11	Molecule: ZINC00082060 #atoms: ...
Row12	Molecule: ZINC00083818 #atoms: ...
Row13	Molecule: ZINC00086904 #atoms: ...
Row14	Molecule: ZINC00089825 #atoms: ...
Row15	Molecule: ZINC00089832 #atoms: ...
Row16	Molecule: ZINC00089874 #atoms: ...
Row17	Molecule: ZINC00089910 #atoms: ...
Row18	Molecule: ZINC00105410 #atoms: ...
Row19	Molecule: ZINC00107068 #atoms: ...
Row20	Molecule: ZINC00107874 #atoms: ...
Row21	Molecule: ZINC00168679 #atoms: ...
Row22	Molecule: ZINC00200607 #atoms: ...
Row23	Molecule: ZINC00202467 #atoms: ...
Row24	Molecule: ZINC00202471 #atoms: ...
Row25	Molecule: ZINC00213648 #atoms: ...
Row26	Molecule: ZINC00249594 #atoms: ...
Row27	Molecule: ZINC00249762 #atoms: ...
Row28	Molecule: ZINC00273529 #atoms: ...
Row29	Molecule: ZINC00313690 #atoms: ...
Row30	Molecule: ZINC00324189 #atoms: ...
Row31	Molecule: ZINC00326099 #atoms: ...
Row32	Molecule: ZINC00326157 #atoms: ...
Row33	Molecule: ZINC00326163 #atoms: ...
Row34	Molecule: ZINC00326170 #atoms: ...
Row35	Molecule: ZINC00326554 #atoms: ...

Abbildung 28: Die Tabelle gibt die Ergebnisse des „Molecule Reader“ an.

In der ersten Spalte ist die fortlaufende Nummer RowID lokalisiert. Die zweite Spalte beinhaltet die von Maestro lesbare Datei des Moleküls, mit Namen und Anzahl der Atome. Nachdem das Java Programm gelaufen ist, sieht die Tabelle wie folgt aus (Abbildung 29).

EINLEITUNG

Row ID	CT	1	iteratiort
Row0	Molecule: ZINC00003015 #atoms: ...	1	
Row1	Molecule: ZINC00003662 #atoms: ...	2	
Row2	Molecule: ZINC00009202 #atoms: ...	3	
Row3	Molecule: ZINC00031727 #atoms: ...	4	
Row4	Molecule: ZINC00031891 #atoms: ...	5	
Row5	Molecule: ZINC00033334 #atoms: ...	6	
Row6	Molecule: ZINC00062435 #atoms: ...	7	
Row7	Molecule: ZINC00062436 #atoms: ...	8	
Row8	Molecule: ZINC00067498 #atoms: ...	9	
Row9	Molecule: ZINC00067501 #atoms: ...	10	
Row10	Molecule: ZINC00072422 #atoms: ...	11	
Row11	Molecule: ZINC00082060 #atoms: ...	12	
Row12	Molecule: ZINC00083818 #atoms: ...	13	
Row13	Molecule: ZINC00086904 #atoms: ...	14	
Row14	Molecule: ZINC00089825 #atoms: ...	15	
Row15	Molecule: ZINC00089832 #atoms: ...	16	
Row16	Molecule: ZINC00089874 #atoms: ...	17	
Row17	Molecule: ZINC00089910 #atoms: ...	18	
Row18	Molecule: ZINC00105410 #atoms: ...	19	
Row19	Molecule: ZINC00107068 #atoms: ...	20	
Row20	Molecule: ZINC00107874 #atoms: ...	21	
Row21	Molecule: ZINC00168679 #atoms: ...	22	
Row22	Molecule: ZINC00200607 #atoms: ...	23	
Row23	Molecule: ZINC00202467 #atoms: ...	24	
Row24	Molecule: ZINC00202471 #atoms: ...	25	
Row25	Molecule: ZINC00213648 #atoms: ...	26	
Row26	Molecule: ZINC00249594 #atoms: ...	27	
Row27	Molecule: ZINC00249762 #atoms: ...	28	
Row28	Molecule: ZINC00273529 #atoms: ...	29	
Row29	Molecule: ZINC00313690 #atoms: ...	30	
Row30	Molecule: ZINC00324189 #atoms: ...	31	
Row31	Molecule: ZINC00326099 #atoms: ...	32	
Row32	Molecule: ZINC00326157 #atoms: ...	33	
Row33	Molecule: ZINC00326163 #atoms: ...	34	
Row34	Molecule: ZINC00326170 #atoms: ...	35	

Abbildung 29: Resultat der Node „Java Snippet, ct-id“.

Zu den bereits vorhandenen Spalten wurde eine weitere Spalte hinzugefügt, welche eine fortlaufende Zahl von 1–120000 beinhaltet.

Die Ergebnisse aus dieser Node werden zur nächsten Node, dem „Row Filter“ geleitet. Dieser Filter lässt nur definierte Zeilen durch. Die Definition wird über die Node „Random Numbers Generator“ geregelt. Diese Node ermittelt eine festgelegte Anzahl von zufälligen Nummern aus einem festgelegten Zahlenabschnitt. In diesem Fall 100 zufällige Nummern zwischen 0–120001. Diese 100 zufälligen Nummern werden in einer Schleife „Table Row to Variable Loop Start“ sukzessive als Definition für den „Row Filter“ verwendet. Als Ergebnis der Schleife „Loop End“ sind noch 100 Verbindungen, deren Wert in der Spalte Iteration mit der zufällig generierten Zahl übereinstimmt, in der Tabelle enthalten.

Zuletzt werden diese 100 Verbindungen mit der Node „LigPrep“ für ein folgendes Docking präpariert.

Dieser kurze Ausschnitt zeigt den großen Nutzen der Software, redundante und zeitaufwendige Abläufe automatisieren zu können.

2. Ziel und Konzeption der Forschungsarbeit

Hauptziel der Forschungsarbeit ist die Synthese von Wirkstoff-Sonden zur Etablierung von *Proximity Ligation Assays* (PLA) für G-Protein-gekoppelte Adenosin- und Dopamin-Rezeptoren, speziell für die Subtypen A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3 und D_2/D_3 , auf der Basis eines Baukasten-artigen Ansatzes (Abbildung 30). Dieser soll darüber hinaus für die Synthese von Fluorophor-verknüpften Wirkstoffen genutzt werden.

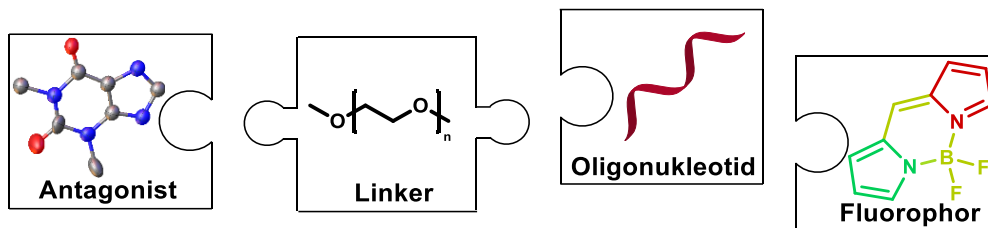


Abbildung 30: Schematische Darstellung des modularen Aufbaus der zu entwickelnden PLA- und Fluorophor-Sonden bestehend aus Molekül, Linker und Oligonukleotid bzw. Fluorophor.

2.1 Sonden für den PLA

Für die Synthese von Sonden für den PLA sollen die bisher verwendeten Antikörper (Ak) durch Rezeptor-Antagonisten ausgetauscht werden.

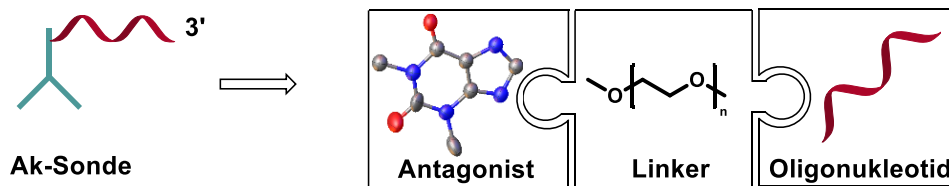


Abbildung 31: Austausch der Ak-basierten Sonde durch Antagonist-basierte Sonden.

2.1.1 Anforderungen

Bei dem Ersatz von Antikörpern durch „small molecules“ in PLA-Sonden müssen folgende Anforderungen erfüllt werden.

1. Affinität

Die Affinität beschreibt die Bindungsstärke des Liganden zum Rezeptor. Diese ist ausschlaggebend für die spätere Güte des Assays. Bindet ein Ligand nur mit geringer Affinität an den gewünschten Rezeptor, kann dieser Ligand schnell vom Rezeptor abdissoziiert oder verdrängt werden. Affinitätsstudien sind daher essenzieller Bestandteil der Sondenentwicklung.

2. Selektivität

Der Ligand muss eine hohe Selektivität zu einem Rezeptorsubtyp aufweisen, das heißt, er soll nur an einen Rezeptor binden. Jede Modifikation kann die Selektivität verändern und jedes Derivat muss daher auf Selektivität zum Target hin untersucht werden.

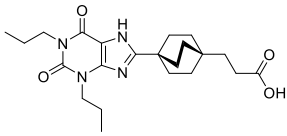
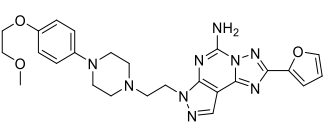
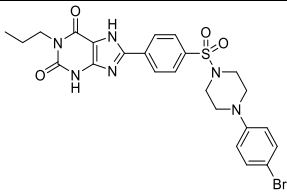
3. Orientierung des Liganden

Die ersten beiden Punkte heben Qualitätsmerkmale der Liganden hervor. Um diese schon zuvor abschätzen zu können, braucht es biologische Daten und Modelle. Aus einer Bibliothek bekannter Liganden können solche ausgewählt werden, die die oberen beiden Punkte erfüllen. Sobald jedoch Modifikationen am Liganden vorgenommen werden, können sich Affinität und Selektivität ändern. Daher ist es essenziell, die Orientierung des Liganden in der Bindungsstelle des Rezeptors zu kennen, um fundierte Aussagen über eine Toleranz gegenüber Modifikationen treffen zu können. Falls die Orientierung zunächst unklar ist, können durch computergestützte Berechnungsmodelle Hinweise erhalten werden.

2.1.2 Konkrete Planung

Zunächst wurden Antagonisten mit hoher Affinität zu den jeweiligen Adenosinrezeptoren (AR) ausgewählt. Der Fokus liegt dabei auf Antagonisten, da durch Agonisten aktivierte Rezeptoren internalisieren können und somit die spätere Detektion verhindert würde. Es sollen alle AR-Subtypen, A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3 , abgedeckt werden. Die Auswahl soll auf der Basis experimenteller Daten getroffen werden (Tabelle 7). Für den A_1 AR und den A_{2A} AR sind kristallographische Daten verfügbar, für den A_{2B} AR und den A_3 AR hingegen nicht. Für den A_1 AR wurde Toponafylline als Ausgangsstruktur ausgewählt, für den A_{2A} AR das hochselektive Preladenant. PSB-1901 wurde als A_{2B} AR-Antagonist ausgewählt, welches ebenfalls eine besonders hohe Selektivität aufweist.

Tabelle 7: Auswahl der Liganden zur Modifikation für den PLA.

Rezeptor		A₁AR	A_{2A}AR	A_{2B}AR
Struktur				
Name		Toponafylline ²⁶²	Preladenant ²⁶³	PSB-1901 ²⁶⁴
Affinität (humane Rezeptoren)	A₁	7,4 nM	> 1.000 nM	> 1.000 nM
	A_{2A}	6410 nM	0,9 nM	> 1.000 nM
	A_{2B}	90 nM	> 1.000 nM	0,084 nM
	A₃	> 10.000 nM	> 1.000 nM	> 1.000 nM
Selektivität		12-fach	> 1.000-fach	> 10.000-fach

Die Kriterien für die Auswahl dieser Liganden waren neben ihrer Affinität und Selektivität auch die Möglichkeit zur Modifikation. Da für A₁AR und A_{2A}AR Co-Kristallstrukturen vorhanden waren, konnte die aus dem Rezeptor weisende Seite leicht identifiziert werden. Für den A_{2B}AR war dies schwieriger; es wurde auf Erfahrungen aus der Arbeitsgruppe zurückgegriffen, in der auf der Basis von Struktur-Wirkungsbeziehungen Bindungsmodelle erstellt worden waren. Für den A₃AR musste ein neuartiger Ansatz entwickelt werden, um eine geeignete Struktur auswählen zu können.

Zusätzlich zu den AR sollte ein möglichst selektiver Dopamin-D₂-Rezeptor-Antagonist entwickelt werden. Mit diesem sollte eine Detektion des A_{2A}AR-D₂DR-Heteromers als *Proof of Concept* ermöglicht werden.

Bevor die Planungen für die Modifikation der Liganden beginnen konnten, musste zunächst die Art des Linkers und dessen funktionelle Gruppen festgelegt werden. Der Linker dient als Abstandhalter zwischen dem „small molecule“-Rezeptorliganden und dem Oligonukleotid. Er bietet die Möglichkeit, die Oligonukleotide mit dem Rezeptorliganden zu verknüpfen. Da der Linker aufgrund des wässrigen extrazellulären Milieus möglichst polar sein sollte, und um eine Interkalation in die Membran zu verhindern, soll ein Polyethylenglykol-Linker (PEG-Linker) verwendet werden. Auf der einen Seite soll eine Aminfunktion genutzt werden, auf der anderen Seite eine Carbonsäuregruppe (Abbildung 32). Dies ermöglicht die selektive Funktionalisierung des Linkers im späteren Verlauf der Synthesen. Die Bestimmung der jeweils optimalen Linkerlänge ist für jeden Liganden erforderlich. Dafür sollen zunächst bifunktionalisierte Polyethylenglykol-Derivate mit 4, 8, 12, 16 und 20 Einheiten hergestellt werden.

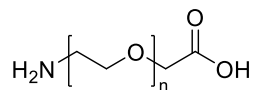


Abbildung 32: Darstellung des Linkers, wobei $n = 4, 8, 12, 16$ und 20 Einheiten betragen soll.

Anschließend wurde die Synthese der Liganden geplant. Die Grundidee basierte dabei auf dem Baukastenprinzip. Alle drei Bestandteile, „small molecule“, Linker und Oligonukleotid sollten durch endständige Säure- oder Aminogruppen funktionalisiert werden. Dies würde es im späteren Verlauf erlauben, auch andere Reportermoleküle, wie Fluorophore, mit den Liganden zu verknüpfen. In Abbildung 33 sind drei der geplanten Liganden dargestellt. Toponafylline (**1**) bedarf keiner Modifikation, da es bereits eine Carboxylatgruppe trägt. Bei Preladenant wird die Methoxyfunktion zur Säure umgewandelt. Aus der Kristallstruktur lässt sich dabei abschätzen, dass diese Seite des Moleküls extrazellulär orientiert ist. Für PSB-1901 wird das Bromatom in 4-Position des Phenylrings durch eine Säuregruppe ersetzt. Dies ist ein gewagter Versuch, da der Bromsubstituent für die selektive Bindung aufgrund seiner postulierten Halogenbindung an den Rezeptor wichtig sein könnte.

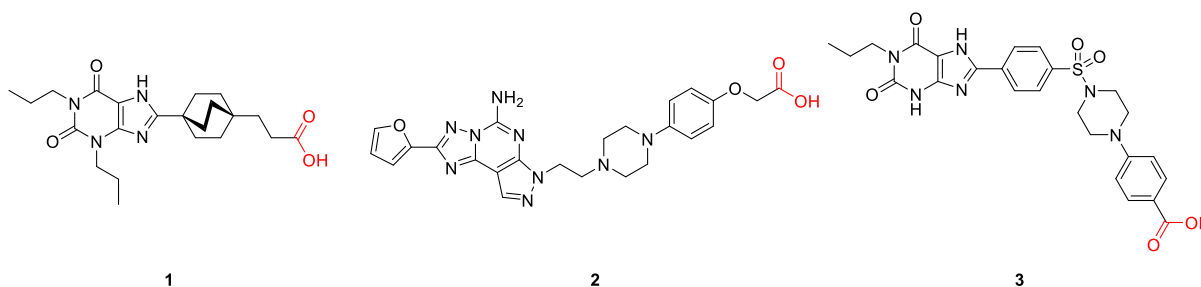
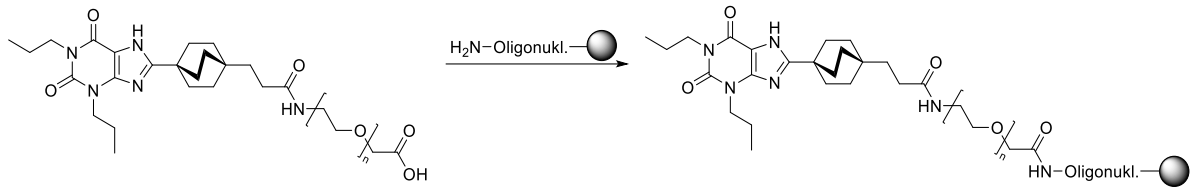


Abbildung 33: Auswahl der zu synthetisierenden Liganden: Toponafylline (**1**), ein A_1 -Antagonist, Preladenant-Derivat **2**, ein A_{2A} -Antagonist, und das PSB-1901-Derivat **3**, ein A_{2B} -Antagonist.

Als *Proof of Principle* sollen nachfolgend die Antagonisten **1**, **2**, und **3** sowie deren Linkeraddukte mit unterschiedlichen Linkerlängen auf ihre Rezeptor-Affinität und Selektivität geprüft werden. Als finaler Prototyp soll ein geschütztes Adenosinderivat als Modellsubstanz für das Oligonukleotid dienen; die Affinität sowie Selektivität des entsprechenden Addukts soll bestimmt werden, um abschätzen zu können, ob eine Substitution vom Rezeptor toleriert wird.

Fallen die Ergebnisse positiv aus, soll im Rahmen einer Kooperation mit PD Dr. Andreas Brunschweiger, TU Dortmund die festphasenunterstützte Synthese der Oligonukleotid-gebundenen Sonden erfolgen (Schema 10).



Schema 10: Beispiel einer festphasengebundenen Oligonukleotid-Linkerkupplung.

Der Plan sieht vor, die Synthese der Sonde vollständig an der Festphase durchzuführen. Mit Hilfe des zuvor etablierten modularen Aufbaus der Sonde aus „small molecule“, Linker und Oligonukleotid sollen diese, in umgekehrter Reihenfolge zur Synthese, mittels Merrifield-Peptidsynthese verknüpft werden.

Für den A₃AR wird eine alternative Strategie gewählt. Da keine Kristallstruktur vorhanden ist, wird zunächst aus dem A₁AR ein Homologiemodell des A₃AR generiert und anschließend die Orientierung möglicher A₃AR Antagonisten mittels Docking überprüft. Darauf aufbauend soll dann eine sinnvolle Synthese vorgeschlagen und die Sonde generiert werden.

2.2 Sonden-Synthese für die Untersuchung von GPCRs

Sofern sich die Idee des Baukasten-artigen Aufbaus der PLA-Sonden umsetzen lässt, sollen weitere Sonden hergestellt werden, insbesondere Fluoreszenz-markierte Rezeptorliganden. Des Weiteren soll die Synthese von geeigneten Wirkstoff-Molekülen für das „Drug Targeting“ sowie für Co-Kristallisationsexperimente (Abbildung 34) ins Auge gefasst werden.

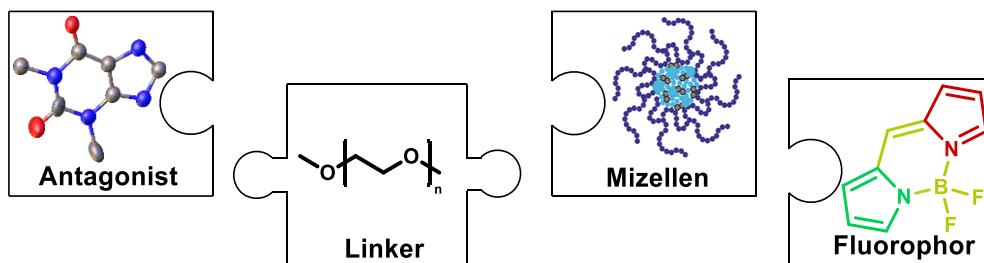


Abbildung 34: Der modulare Aufbau soll die Verwendung polymergebundener Wirkstoffe und Fluorophor-markierter Rezeptorliganden ermöglichen.

3. Ergebnisse

Im ersten Teil wird auf die in der Zielsetzung dargestellten Schritte zur Herstellung von PLA-Sonden eingegangen. Zunächst werden die Synthesen der Antagonisten und die Bestimmung ihrer AR-Affinitäten und Selektivitäten beschrieben. Anschließend werden die Linkersynthesen sowie die Herstellung der Ligand-Linker-Addukte dargelegt und die erhaltenen biologischen Daten diskutiert. Nachdem die beste Linkerlänge bestimmt wurde, wird der *Proof of Principle*, die Synthese und Testung der Ligand-Linker-Nukleosid-Sonden erörtert. Im letzten Teil wird die Synthese der vollständigen PLA-Sonden an der Festphase beschrieben.

Der zweite Teil befasst sich mit der Synthese von fluoreszenzmarkierten Sonden auf Basis des Toolbox-Ansatzes, der im ersten Teil entwickelt wurde. Die erhaltenen Ligand-Linker-Addukte werden mit einem BODIPY-Derivat verknüpft und die erhaltenen Fluoreszenzliganden bezüglich AR-Affinität und Selektivität untersucht. Der vielversprechendste Ligand wird mit weiteren Fluorophoren verknüpft, um ein möglichst breites Spektrum an Wellenlängen abzudecken.

Der dritte Teil umfasst die Synthese von Ligand-Linker-Addukten im Rahmen eines Kooperationsprojekts mit dem Ziel, ein „Drug Targeting“ zu erreichen. Ziel ist die Herstellung modifizierter Mizellen als Wirkstoffträger, welche in der Immuntherapie von Krebs Anwendung finden sollen.

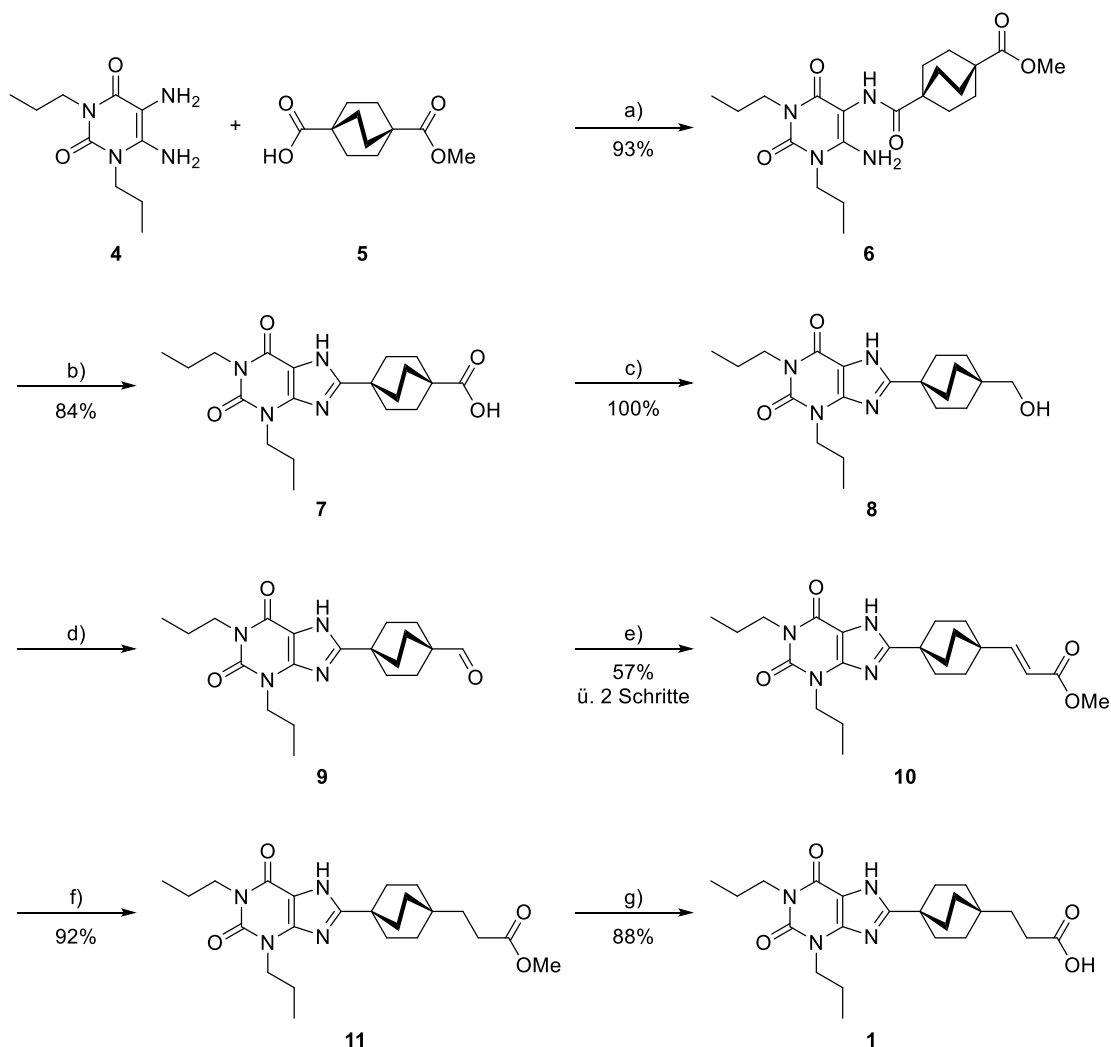
Im letzten Teil wird die Synthese eines A₃AR-Liganden für Co-Kristallisationsexperimente mit dem humanen, Ratten sowie Maus-A₃-Rezeptor beschrieben.

3.1 Synthese der Sonden für Proximity Ligation Assays

3.1.1 A₁AR-Antagonisten

Der A₁AR-Antagonist Toponafylline wurde wie folgt dargestellt.

3.1.1.1 Toponafylline (1)²⁶²



Schema 11: Reaktionssequenz zu Toponafylline (1) beginnend mit 5,6-Diamino-1,3-dipropylpyrimidin-2,4-dion (4).²⁶² Reaktionsbedingungen: a) NEt₃, HATU, CH₃CN, RT, 1 h. b) 1 n NaOH, *i*-Propanol, Reflux, 1 h. c) LiAlH₄, THF, 0 °C – RT, 2 h. d) DMP, CH₂Cl₂, RT, 1 h. e) TMPA, KHMDs, Toluol, 0 °C – RT, 18 h. f) 10 % Pd/C, H₂, MeOH, RT, 2 h. g) 1 n NaOH, Reflux, 1 h.

Die Synthese von Toponafylline (1) beginnt mit der Amidbildung aus Diaminouracil 4 und der Säure 5 unter Zuhilfenahme des Kupplungsreagenz O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorphosphat (HATU), mit einer Ausbeute von 93 % an Amid 6 (Schema 11). Verbindung 6 wird säulenchromatographisch vom Dimer des Diaminouracils abgetrennt, welches in der Folge Probleme bereitet. Amid 6 wird anschließend unter alkalischen Bedingungen zum Xanthin 7 zyklisiert wobei gleichzeitig der Ester hydrolysiert wird. Welche der beiden Reaktionen zuerst stattfindet, bleibt ungeklärt. Die entstandene Säure 7 ist ebenfalls von Interesse als AR-Antagonist. Die nächsten Schritte der Synthese dienen

der Verlängerung der Alkylkette zwischen Xanthin und Säurefunktion. Hierbei wird zunächst die Säure zum Alkohol **8** reduziert, der Alkohol wird dann mittels Dess-Martin-Periodinan zum Aldehyd **9** oxidiert und in einer anschließenden Horner-Wadsworth-Emmons Reaktion um eine Ethyleneinheit verlängert. Der entstandene α,β -ungesättigte Methylester **10** wird zum gesättigten Methylester **11** reduziert und schließlich die freie Säure, das Toponafylline (**1**), unter alkalischen Bedingungen erhalten.²⁶² Die siebenstufige Synthese liefert das Produkt mit einer Gesamtausbeute von 36 %.

Zusätzlich konnte eine Kristallstruktur der Verbindung **1** erhalten werden (Abbildung 35).

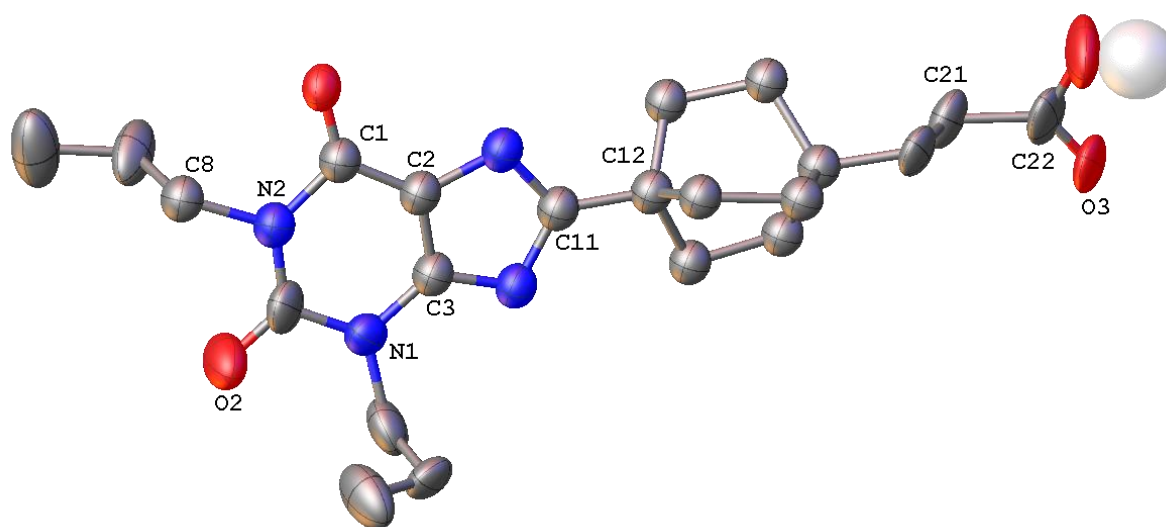


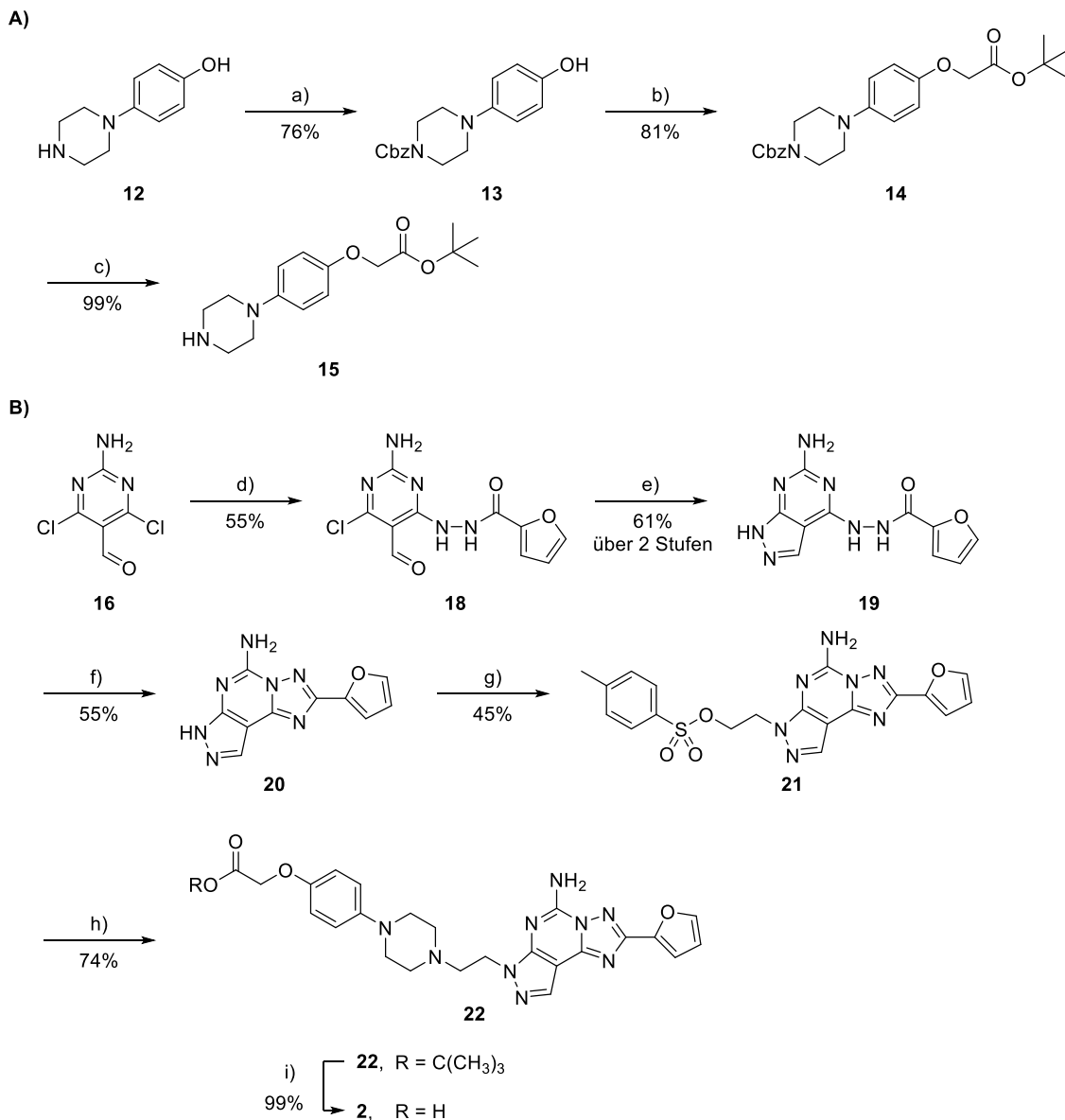
Abbildung 35: Kristallstruktur des Toponafyllines (**1**).

Der ORTEP-Plot des Toponafyllines bestätigt die angenommene Struktur. Im Kern ist das Bicyclo[2.2.2]octylxanthin-Grundgerüst dargestellt, welches an *N1* und *N2* mit *n*-Propyl-Resten substituiert ist.

3.1.2 A_{2A}AR-Antagonist

Im Folgenden wird die Synthese zum A_{2A}AR Antagonisten beschrieben.

3.1.2.1 Preladenant-Derivat **3**²⁶⁵



Schema 12: A) Synthese des Piperazinaddukts **15**. B) Synthese des Preladenant-Derivats **2**.²⁶⁵
 Reaktionsbedingungen: a) CbzCl, MeOH, RT, 12 h. b) *t*-Butylbromoacetat, K₂CO₃, Aceton, RT, 12 h. c) 10 % Pd/C, H₂, MeOH, RT, 2 h. d) Furan-2-carbonsäurehydrazid (**17**), NEt₃, DMSO, 120 °C, 18 h. e) N₂H₄, CH₃CN, 70 °C, 1 h. f) BSA, HMDS, 120 °C, 3 h. g) Ethylenglykolditosylat, NaH, DMF, RT, 4 h. h) **15**, DMF, 80 °C, 20 h. i) TFA, CH₂Cl₂, RT, 1 h.

Zunächst wird das Piperazinaddukt **15** hergestellt (Schema 12, A). Dafür wird zunächst das sekundäre Amin des Piperazins **12** Cbz-geschützt, wonach eine Veretherung am phenolischen Alkohol zu **14** erfolgt. Im letzten Schritt wird die Schutzgruppe reaktiv entfernt und **15** wird erhalten.

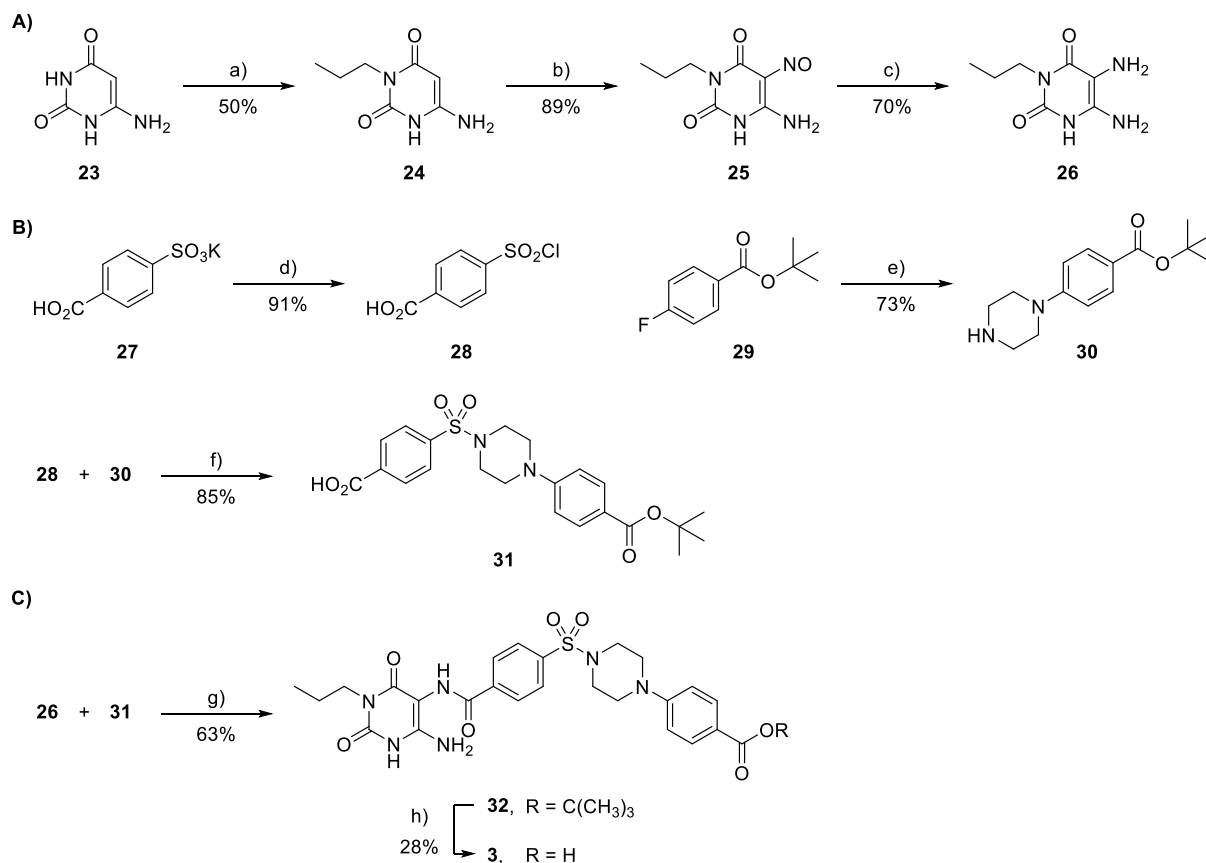
Angefangen mit 2-Amino-4,6-dichloropyrimidin-5-carbaldehyd (**16**) und Furan-2-carbonsäurehydrazid (**17**) wird das Grundgerüst des Preladenantanalogs **2** aufgebaut

(Schema 12, B). Im ersten Syntheseschritt wird **18** mit 55 % Ausbeute erhalten. Ausbeuteverluste sind beim Umkristallisieren zu verzeichnen. Die Verbindung lässt sich in keinem Lösemittelgemisch umkristallisieren, löst sich immer nur teilweise. Aufgrund dessen wurde in einem zweiten Versuch die Reinigung von **18** unterlassen und direkt zum Molekül **19** umgesetzt. Das entstandene Produkt ist unlöslicher als das Edukt, wodurch mit Acetonitril gewaschen werden kann, ohne dass Ausbeutenverluste zu erwarten sind. Die Ausbeute von 62 % über zwei Stufen ist zufriedenstellend. Das Produkt ist laut LC-MS sauber, zeigt im NMR-Spektrum aber keine Signale, die dem Produkt entsprechen. Einzig ein Lösungsmittelgemisch von DMSO- d_6 und 2 M DCl ergibt passende Signale, wodurch ein 2D-Datensatz aufgenommen werden konnte. Die erste Analyse zeigt ein Gemisch aus drei Tautomeren, welche nicht zugeordnet werden konnten. Das Grundgerüst des Preladenants **20**, wird mit *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid und Hexamethyldisilazan erhalten. In der Reaktion findet eine Dimroth-Umlagerung statt. Dies bestätigen die nicht vorhandenen NOE-Signale des Furanyls zum primären Amin. Zur Reinigung von **20** muss aus 80%iger Essigsäure umkristallisiert werden. Im nächsten Schritt wird mittels Natriumhydrid das sekundäre Amin deprotoniert, welches nukleophil am Ethylenglykolditosylat angreift. Die erhaltene Verbindung **21** wird anschließend mit dem sekundären Amin **15** (Schema 12, A) umgesetzt und durch Substitution des Tosylats wird der ⁴Butylester **22** erhalten aus erzeugten. Der ⁴Butylester wird mit TFA gespalten und das Produkt **2** mit 99 % Ausbeute erhalten. Die Gesamtausbeute der Reaktionssequenz liegt bei 13 % über sechs Stufen.

3.1.3 A_{2B}AR-Antagonisten

Für die Synthesen der A_{2B}AR-Antagonisten wurden drei verschiedene Synthesestrategien verfolgt.

3.1.3.1 PSB-1901-Derivat 3



Schema 13: Drei Reaktionssequenzen zum PSB-1901-Derivat (**3**).²⁶⁶⁻²⁶⁸ Reaktionsbedingungen: a) i) HMDS, (NH₄)₂SO₄, Reflux, 45 min, ii) *n*-Propyliodid. b) NaNO₂, H₂O/AcOH (42 %). c) Na₂S₂O₄, 25 % NH₄OH, 70 °C, 0.5 h. d) ClSO₃H, RT, 12 h. e) Piperazin, DMSO, 120 °C, 20 h. f) DIPEA, CH₂Cl₂, RT, 5 min. g) DIPEA, COMU, DMF, RT, 10 min. h) P₂O₅, DMF, 150 °C, 2 min.

Für **3** müssen zunächst die Verbindungen **26** und **31** erzeugt werden, welche am Ende zusammengefügt werden können (Schema 13).

Das *N*-3-alkylierte Diaminouracil **24** wird über eine Alkylierung mittels *n*-Propyliodid mit literaturbekannter Reaktionsfolge erzeugt (Schema 13, A).^{266, 267} Der Ausbeutenverlust ist auf übermäßiges Waschen zurückzuführen. Im nächsten Schritt wird zu **25** nitrosiert und im letzten Schritt zum alkylierten Diaminouracil **26** reduziert.

Der zweite Baustein wird aus dem Sulfonsäurechlorid **28** und dem Piperazinaddukt **30** unter Sulfonsäureamidbildung erhalten (Schema 13, B).²⁶⁸ Dieser modulare Aufbau vereinfacht die Synthese und verdrängt die Variante, in der 4-Nitrophenol austritt.²⁶⁹

Im letzten Schritt werden das Diaminouracil **26** und die Säure **31** in einer Kupplungsreaktion zum Carbonsäureamid **32** verbunden (Schema 13, C). Die anschließende Synthese des

Xanthins **3** stellte sich als schwierig dar, da nur unter Verwendung von P_2O_5 das Produkt erhalten wurde. Mittels LC-MS konnte der Reaktionsverlauf beobachtet werden, wobei zunächst der Carbonsäureester hydrolysiert und anschließend das Xanthin zyklisiert. Nach Reinigung mittels HPLC konnte das Produkt **3** mit 28% Ausbeute erhalten werden. Damit kann das Produkt mit einer Gesamtausbeute von 6 % über fünf Stufen synthetisiert werden.

Zusätzlich konnte eine Kristallstruktur der Endverbindung **3** erhalten werden (Abbildung 36).

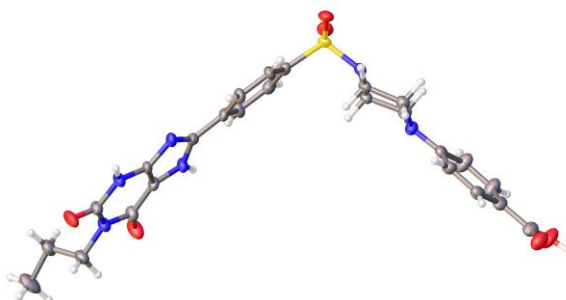
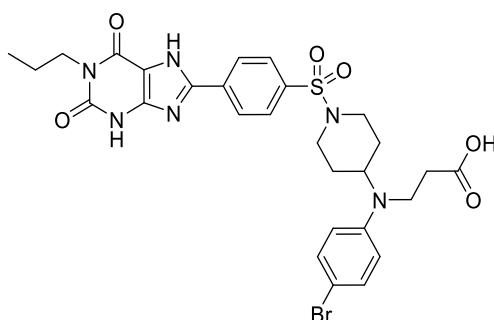


Abbildung 36: Kristallstruktur der Endverbindung **3**. Zusätzlich sind in der Elementarzelle zwei DMSO Moleküle vorhanden.

Der ORTEP-Plot zeigt die Xanthin-Grundstruktur, das Sulfonamid und den Piperazin-Ring. Durch die 3D-Darstellung ist der „Knick“ des Moleküls, verursacht durch das Sulfonamid gut zu erkennen.

3.1.3.2 Alternatives PSB-1901-Derivat **33**

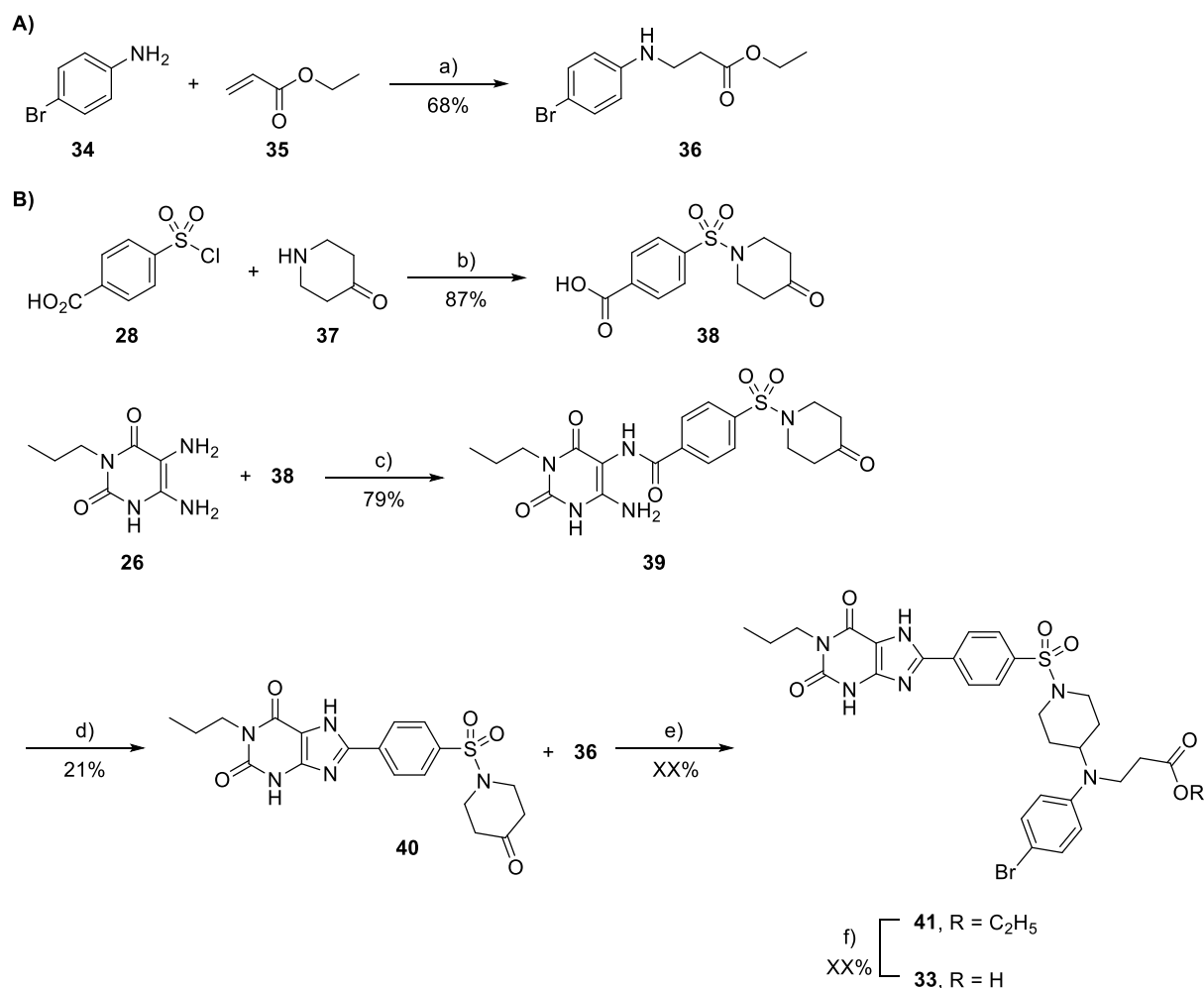
Der Bromsubstituent in PSB-1901 spielt eine wichtige Rolle für die Selektivität des Antagonisten und sollte möglichst nicht ausgetauscht werden. Alternativ wurde deshalb Verbindung **33** entworfen (Abbildung 37). Diese basiert auf der Struktur eines von Ahmed Temirak (AK Müller) synthetisierten Antagonisten (unveröffentlichte Ergebnisse)



33

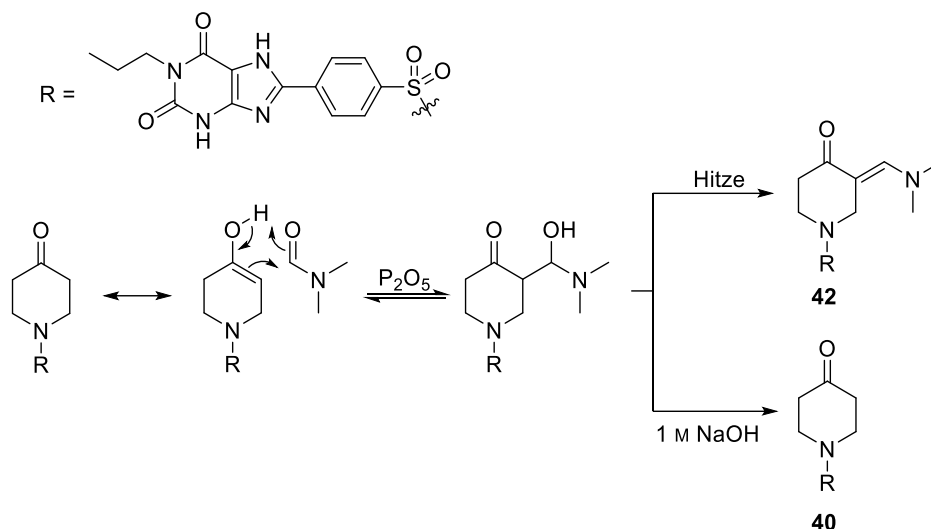
Abbildung 37: Vorschlag eines neuen $A_{2B}AR$ -Antagonisten **33** basierend auf internen Forschungsergebnissen.

Die erste Synthese wurde wie in Schema 14 gezeigt durchgeführt.



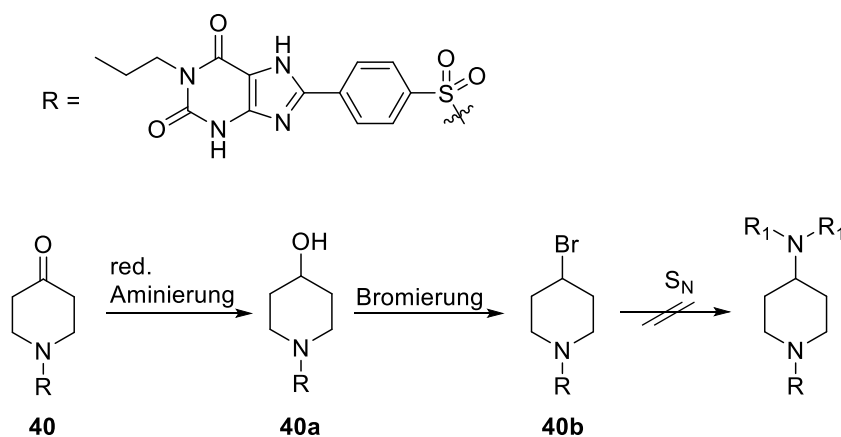
Schema 14: Alternative Route zum PSB-1901 Derivat **33**. Reaktionsbedingungen: a) Al_2O_3 , 115 °C, 5 h. b) K_2CO_3 , $H_2O/CHCl_3$, RT, 24 h. c) HATU, DIPEA, CH_2Cl_2 , RT, 24 h. d) i) P_2O_5 , DMF, RT, 5 h, ii) 1 M NaOH, RT, 10 min. e) i) HOAc, DMF, RT, 5 h, ii) $Na(OAc)_3BH$, DMF, RT, 24 h. f) 2 M NaOH.

Der Kern der Synthesepaltung war die Herstellung von Verbindung **40**, welche als Ausgangspunkt für eine Reihe von reduktiven Aminierungen genutzt werden kann (Schema 14). Im ersten Schritt wird 4-Bromanilin (**34**) mit dem Acrylsäureethylester (**35**) in einer Aza-Michaeladdition umgesetzt, um das sekundäre Amin **36** zu erhalten. Anschließend wird das Sulfonylchlorid **28** mit 4-Piperidinon (**37**) in einem Zweiphasengemisch zum Sulfonamid **38** umgesetzt. Die Säure reagiert in einer Kupplungsreaktion mit dem Diamin **26** zum Uracil **39**. Die Kondensation zum Schlüsselprodukt **40** wurde mit Phosphorpentoxid P_4O_{10} durchgeführt. Dabei musste die Standardreaktion abgewandelt werden.²⁶⁶ Im ersten Schritt entsteht zwar das gewünschte Xanthin, doch wird als Hauptprodukt das Aldolkondensationsprodukt **42** detektiert. Durch Zugabe von 1 M NaOH Lösung in die Reaktionslösung, wird die Aldoladdition umgekehrt und das Schlüsselprodukt **40** erhalten (Schema 15).



Schema 15: Wahrscheinlicher Mechanismus zu Schlüsselprodukt **40** und Nebenprodukt **42**.

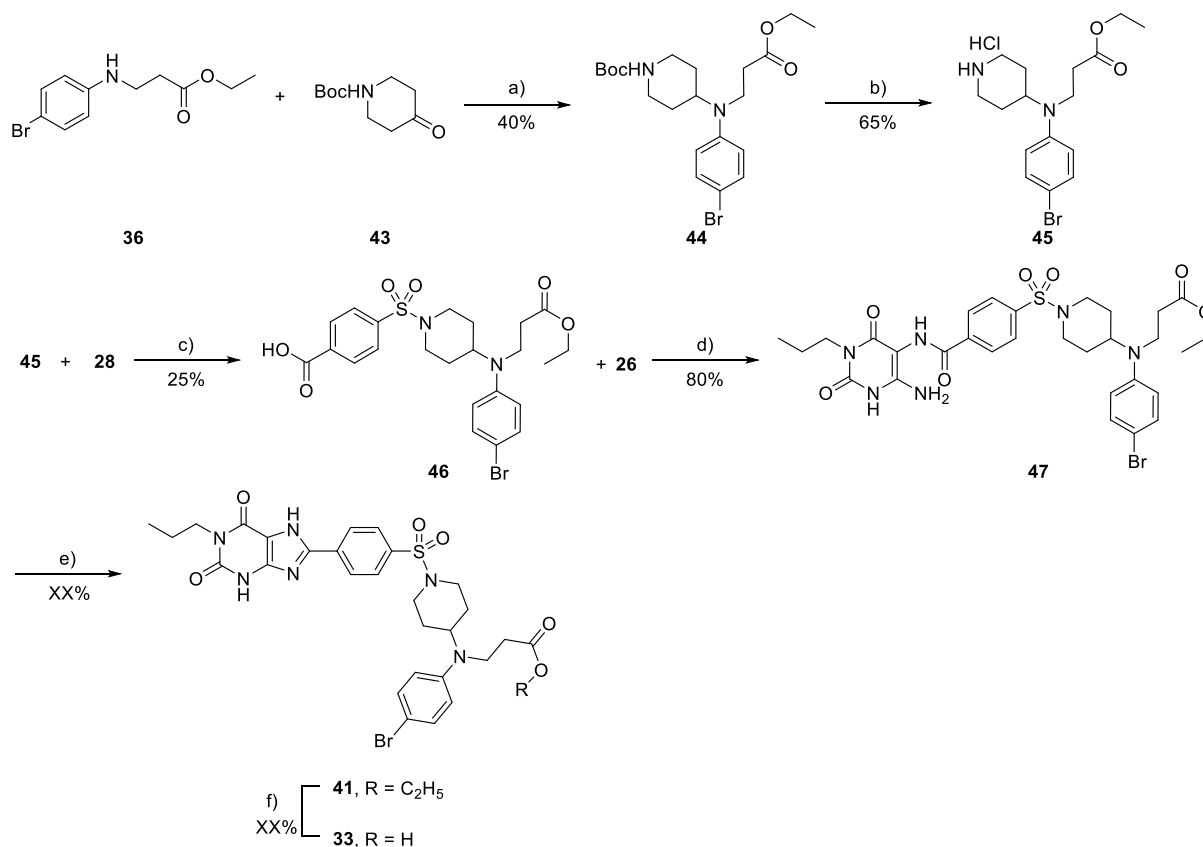
Leider konnte das Produkt **41** nicht erhalten werden, da die reduktive Aminierung nicht stattfand. Die Reaktion wurde mit unterschiedlichen Reduktionsmitteln in verschiedenen Lösemitteln durchgeführt, wobei das reduzierte Keton, der Alkohol **40a** erhalten wurde. Auch die Idee, diesen zum Brom umzuwandeln und eine nukleophile Substitution durchzuführen, scheiterte, da kein Produkt entstand (Schema 16).



Schema 16: Reaktionsverlauf nach fehlgeschlagener reduktive Aminierung.

3.1.3.3 Alternative Route zum PSB-1901-Derivat 33

In einer zweiten Synthese sollte der Baustein um das sekundäre Amin zuerst aufgebaut und davon ausgehend das Xanthin generiert werden.



Schema 17: Zweiter Ansatz zur Synthese des Derivats 33. Reaktionsbedingungen: a) InCl_3 , Et_3SiH , MeOH, RT, 24 h. b) 1 M HCl, EtOAc, CH_2Cl_2 . c) K_2CO_3 , $\text{H}_2\text{O}/\text{CHCl}_3$, RT, 24 h. d) HATU, DIPEA, CH_2Cl_2 , RT, 24 h. e) P_2O_5 , DMF, 60 °C, 5 h. f) 2 M HCl, RT, 8 h.

An dem in Schema 14 erhaltenen sekundärem Amin 36 wird die reduktive Aminierung mit dem Piperidinon 43 durchgeführt, wobei das zweifach alkylierte Anilin 44 entsteht. Im Folgenden wird dieses mittels HCl entschützt und das HCl-Salz der Verbindung 45 erhalten. Die Verbindung 45 wird mit dem aromatischen Säurechlorid 28 umgesetzt und das Sulfonsäureamid 46 entsteht. Die terminale Säure des Sulfonsäureamids 46 wird an das Diamin 26 unter Zuhilfenahme von HATU gekuppelt. Das Amid 47 wird mit P_2O_5 in einer Kondensationsreaktion in DMF umgesetzt. Bei dieser Reaktion entstehen zwei Produkte (Abbildung 38). Das Nebenprodukt der Synthese ist das gewünschte Produkt 41. Das Hauptprodukt 41a ist das DMF-Kondensat. Hierfür sprechen die Masse und die Beobachtung aus Schema 15.

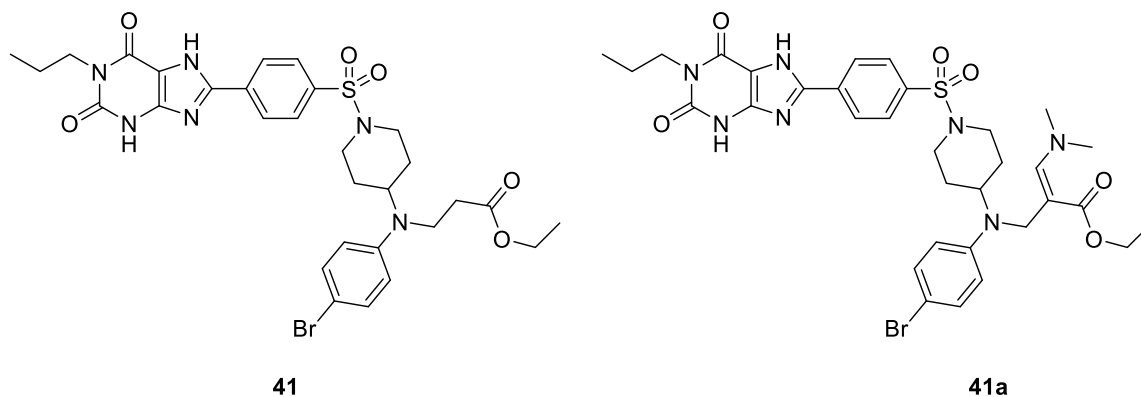
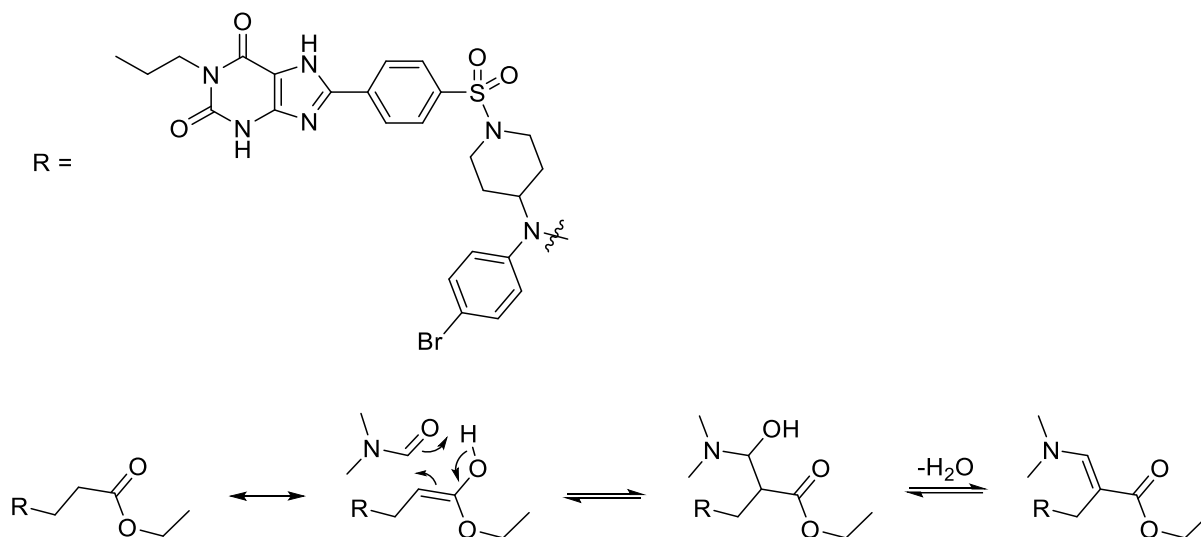


Abbildung 38: Das Nebenprodukt **41** der Kondensationsreaktion (Ringschluss) mit P_2O_5 und das Hauptprodukt, das DMF-Kondensat **41a**.

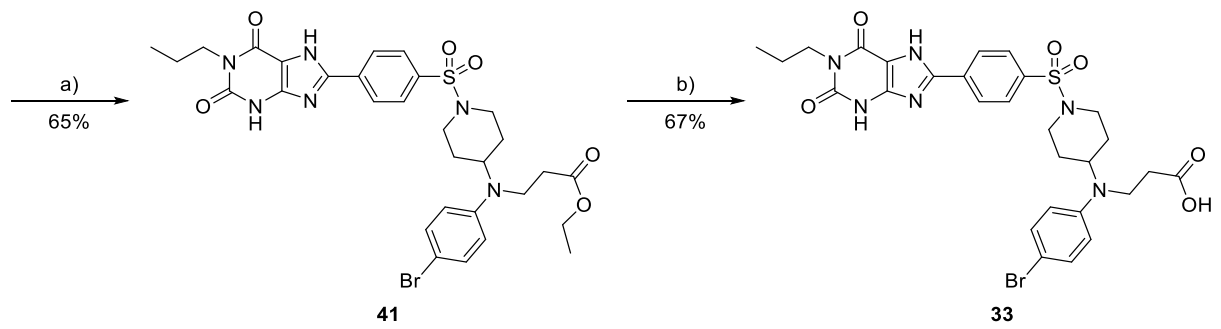
Der vermutliche Mechanismus ist in Schema 18 dargestellt. Im ersten Schritt kommt es zur Keto-Enol-Tautomerie des Esters, der aus der Enolform in einem sechsgliedrigen Übergangszustand, DMF an das Molekül addiert. Der Mechanismus entspricht dabei einer Aldoladdition. Inwiefern das P_2O_5 das DMF aktiviert, siehe Vilsmeier-Haack-Reaktion, ist dabei unklar. In einer Aldolkondensation entsteht das Produkt **41a**. Aus diesem vermuteten Reaktionsverlauf konnte geschlossen werden, dass die Reaktion reversibel verlaufen muss. Somit wurde die Folgereaktion aus Schema 15, wobei der Ester hydrolytisch gespalten wird, mit dem DMF-Kondensat **41a** durchgeführt und dabei das Produkt **41** erhalten.



Schema 18: Mechanismus zum DMF-Addukt.

Um direkt zum gewünschten Produkt **41** zu gelangen, wurde die Synthese alternativ mit PPSE, Trimethylsilylpolyphosphat, ohne DMF durchgeführt. Diese Reaktion führte direkt zum gewünschten Produkt, welches nachfolgend in die Säure **33** überführt wurde (Schema 19).

ERGEBNISSE



Schema 19: Alternative Synthese zu **33**. Reaktionsbedingungen: a) PPSE, 60 – 100 °C, 5 h. b) 2 M HCl, 55 °C, 2 d.

3.1.4 A₃AR-Antagonist

Der A₃AR stellt eine besondere Herausforderung dar. Zwar sind Antagonisten mit hoher Affinität und Selektivität zum A₃AR bekannt, doch ist die Ligandenorientierung in der Bindungstasche unklar. Dies liegt vor allem daran, dass noch keine Co-Kristallstruktur vorhanden ist. Um diese Problem zu lösen, soll ein Homologiemodell erstellt werden, mit dem die Orientierung der Liganden evaluiert werden kann. Das Homologiemodell soll ausgehend von der Kristallstruktur des A₁AR (PDB: 5N2S) angefertigt werden, da dieser Rezeptor am nächsten mit dem A₃AR verwandt ist. Nach der Identifizierung eines geeigneten Liganden soll dieser synthetisiert und biologisch getestet werden.

3.1.5 Homologiemodell des A₃AR

Als erster Schritt wurde die Aminosäuresequenz der Kristallstruktur des human A₁AR (PDB: 5N2S) mit der Aminosäuresequenz des humanen A₃AR (UniProt) verglichen. Das Alignment wurde auf der Internetseite des European Bioinformatics Institute mit der Software EMBOSS Needle durchgeführt. Dabei wird ein globales Alignment gewählt, welches sämtliche Aminosäuren mit einbezieht. Als Ergebnis wurde Abbildung 39 erhalten.

ERGEBNISSE

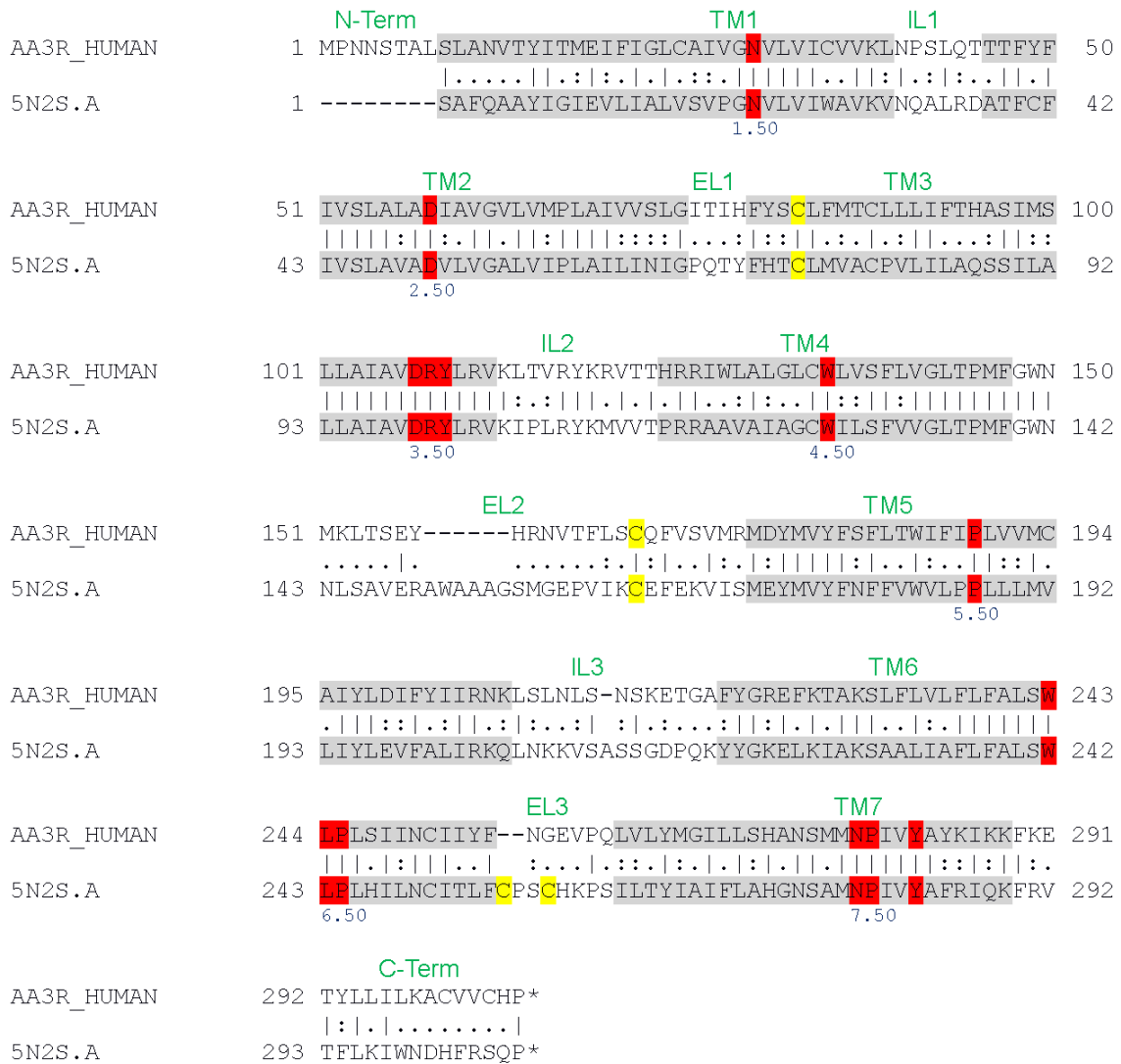


Abbildung 39: Ergebnis des EMBOSS Needle Alignments. In Grau unterlegt sind die transmembranären Helices dargestellt. In Rot sind die konservierten Motive markiert. In Gelb sind die Disulfidbrücken gekennzeichnet. Die Nummerierung bezieht sich auf die Ballesteros-Weinstein-Nomenklatur.²⁷⁰ (| = 100% Übereinstimmung, : = Funktion übereinstimmend, . = keine Übereinstimmung)

In Übereinstimmung mit der Aminosäuresequenz der Kristallstruktur 5N2S werden die transmembranen Helices (TM1-7, grau) bestimmt. Darauffolgend können die konservierten Motive N1.50; D2.50; D3.49, R3.50, Y3.51; W4.50; P5.50; W6.48, L6.49, P6.50; N7.49, P7.50 und Y7.53 (rot) evaluiert und das Alignment überprüft werden. Im letzten Schritt ist die Lage der Disulfidbrücken (gelb) zu kontrollieren. Besonders interessant ist dabei die Disulfidbrücke zwischen TM3 und EL2, welche zu einer Stabilisierung des Rezeptors führt. Aus der erhaltenen Grafik kann das modifizierte Alignment generiert werden (siehe Experimententeil).

Mit dem Programm MODELLER wurden aus dem Alignment und der A_{1A}R Kristallstruktur 1000 Homologiemodelle generiert. Mit Hilfe des DOPE scores (Discrete optimized protein energy) wurden die besten 10 Homologiemodelle ausgewählt. Um die Güte der Modelle zu testen war

das Docking der A₃AR-Antagonisten sowie der A₁AR-Antagonisten geplant. Da diese Aufgabe aber als redundant aufgefasst wurde, entstand die Idee, einen Workflow zu generieren, der automatisch die erstellten Modelle testet und selektiert.

3.1.6 Evaluation der generierten Modelle

Zur Automation wurde die Software „KNIME“, der „Konstanz Information Miner“ verwendet. Dieses in Java programmierte System ermöglicht das automatische Wiederholen redundanter Tätigkeiten durch ein modulares Pipeline-Konzept. Mit der Erweiterung auf Maestro Schrödinger können Dockings und andere in Maestro Schrödinger durchgeführte Berechnungen automatisiert werden.

Ziel der Erstellung des sogenannten Workflows war die wiederholte Verwendung des Glide Dockings mit den besten 10, durch MODELLER generierten Homologiemodellen, bezogen auf den DOPE-Score, und einem vorgegebenen Satz an A₁AR- beziehungsweise A₃AR-Antagonisten. Die erhaltenen Werte des Dockings sollten in einer ROC Kurve (Receiver Operating Characteristic) dargestellt und auf dessen Grundlage das beste Homologiemodell ausgewählt werden.

Die erste Version des Workflows ist nachfolgend dargestellt:

ERGEBNISSE

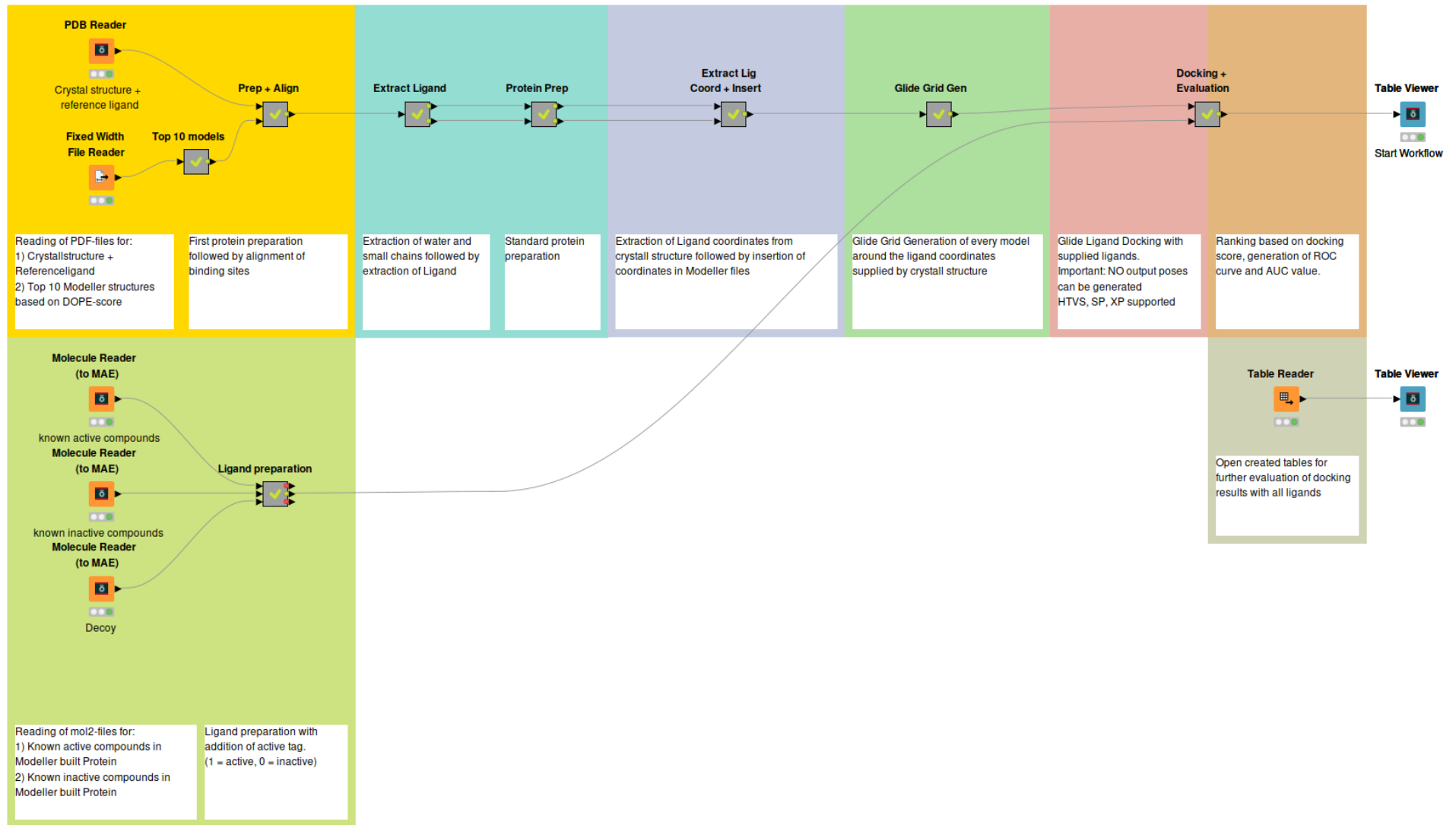


Abbildung 40: Generierter Knime Workflow. Die grauen Kästen sind Metanodes. In den Kästen unter den farbigen Boxen ist die jeweilige Erklärung der Funktion dargestellt.

Die zunächst beschriebenen Schritte sind für die Erstellung der GlideGrids notwendig. Im ersten Schritt wird die Referenzkristallstruktur mit Liganden eingelesen (Abbildung 40, gelb). In einem zweiten Schritt wird der aus MODELLER erhaltene .log file als .csv file eingelesen und die besten 10 Homologiemodelle, basierend auf dem DOPE score ausgewählt und ebenfalls eingelesen (Abbildung 41). Dabei dient ein kurzes Java Programm dazu die passenden .pdb files zu laden. Dies erspart die manuelle Auswahl der besten Modelle.

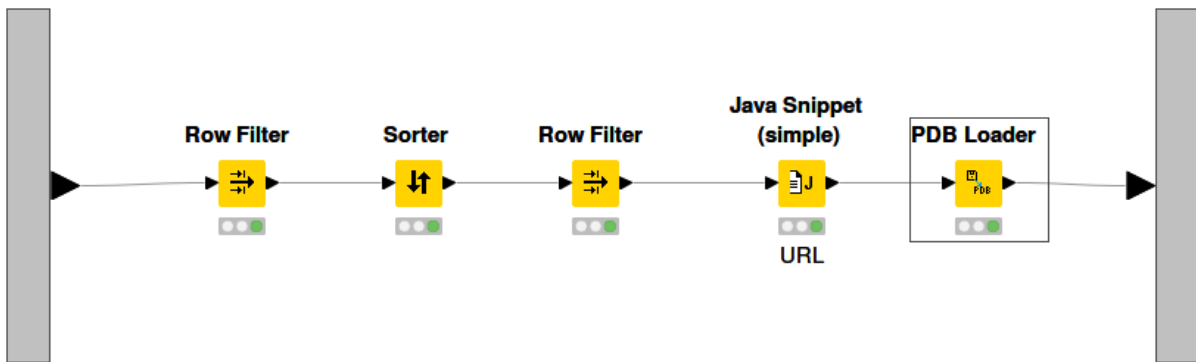


Abbildung 41: Geöffnete Metanode „Top 10 models“.

Im nächsten Schritt (Abbildung 42), dem „Prep + Align“, werden die Proteine aufbereitet und fehlende Wasserstoffe addiert. Darauffolgend werden die Bindungstaschen aller 11 Modelle übereinandergelegt.

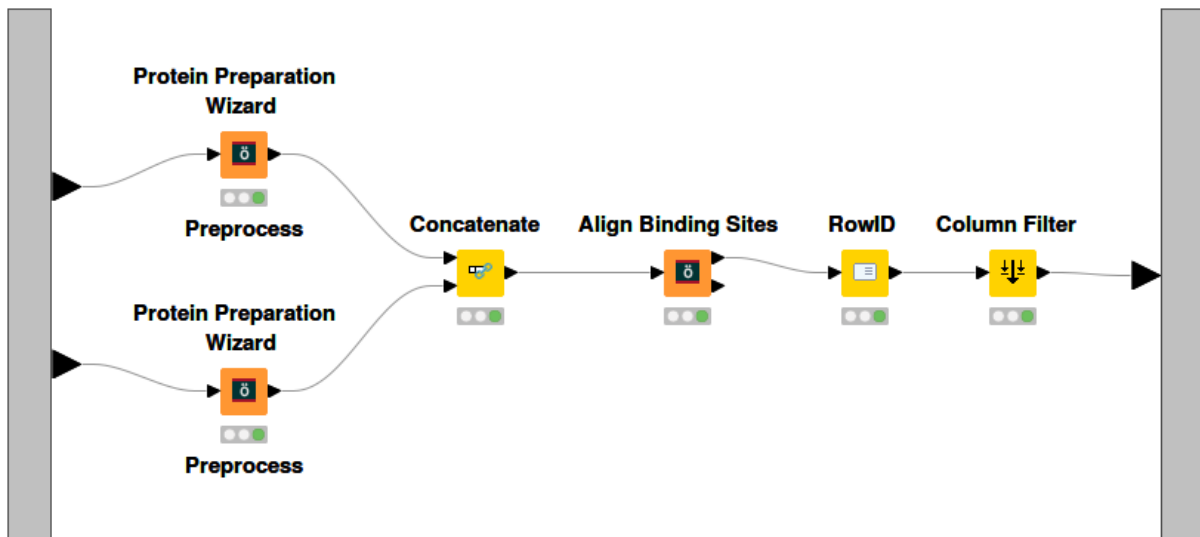


Abbildung 42: Geöffnete Metanode „Prep + Align“.

Das Alignment der Bindungstasche in ein gemeinsames Koordinatensystem ist für die folgenden Schritte essenziell.

In der Metanode „Extract Ligand“ wird der in der Kristallstruktur gebundene Ligand aus dem Protein entfernt und das Referenzprotein gelöscht (Abbildung 40, türkis; Abbildung 43). Dabei werden die Koordinaten des Liganden und der Modelle beibehalten.

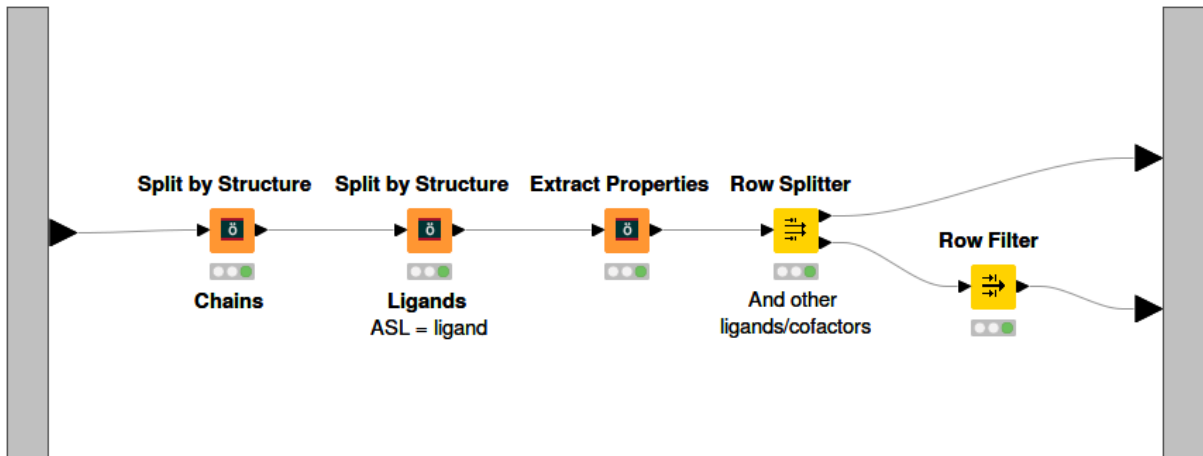


Abbildung 43: Geöffnete Metanode „Extract Ligand“.

Nachfolgend, in „Protein Prep“ werden aus den Modellen sämtliche Wasseratome gelöscht (Abbildung 40, türkis).

Der folgende Schritt ist essenziell für die GlideGrid-Erstellung. In „Extract Lig Coord + Insert“ werden zunächst die Koordinaten aller Atome des Liganden bestimmt und anschließend gemittelt. Die daraus erhaltenen Koordinaten stellen den Mittelpunkt des Liganden im Rezeptor dar. Diese werden in einer Schleife in die Top 10 MODELLER Homologiemodelle eingefügt (Abbildung 40, lila; Abbildung 44).

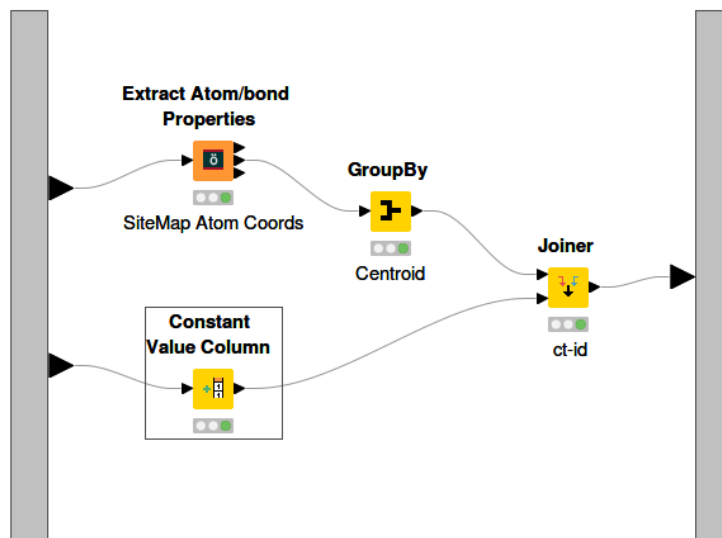


Abbildung 44: Geöffnete Metanode „Extract Lig Coord + Insert“.

Im nächsten Schritt, dem „GlideGrid“, wird in einer Schleife für jedes Modell ein Gitter um die Koordinaten des Mittelpunktes gelegt (Abbildung 40, dunkelgrün; Abbildung 45). Dieses Gitter wird für das anschließende Docking benötigt und beinhaltet die Koordinaten sämtlicher Aminosäuren im vorgegebenen Bereich. Mit der Größe des Gitters kann die Bindungstasche definiert werden. Für bereits bekannte Proteine können an dieser Stelle zusätzlich eine oder mehrere Aminosäuren angegeben werden, die mit dem Liganden interagieren. Im hier

gezeigten Fall wurden die Interaktion mit der Aminosäure Asparagin vorausgesetzt, da diese als konserviertes Motiv in den Adenosinrezeptoren auftaucht. Nachdem sämtliche Gitter generiert worden sind, können diese zum Glide Ligand Docking verwendet werden.

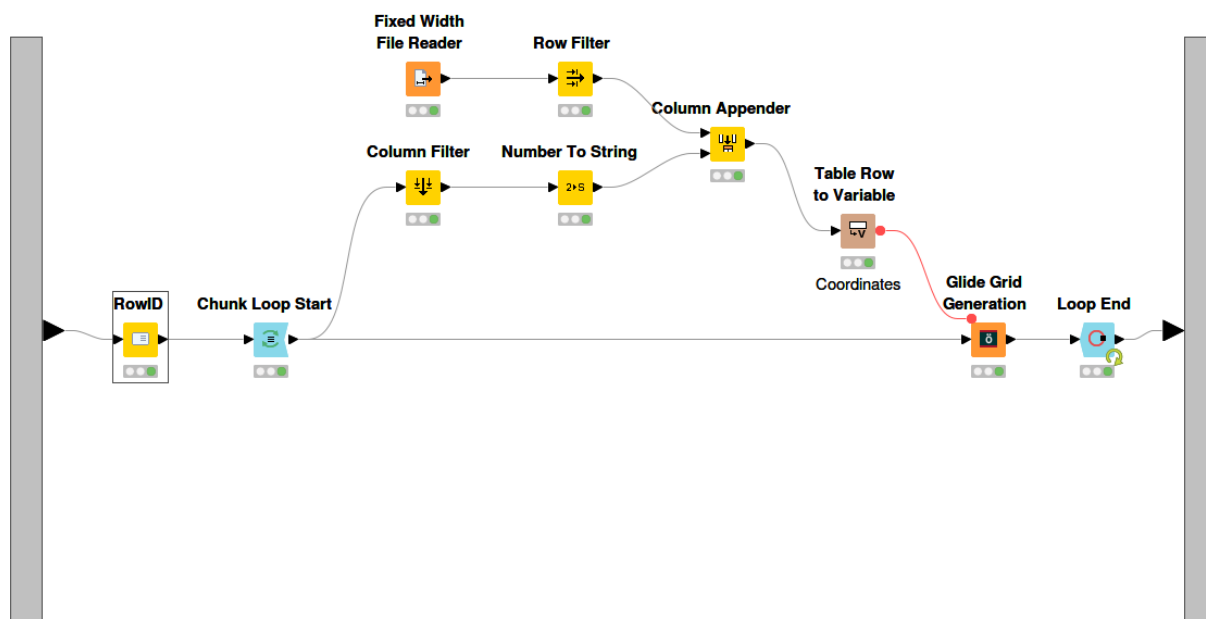


Abbildung 45: Geöffnete Metanode „Glide Grid Gen“.

Doch bevor gedockt werden kann, müssen zunächst die Liganden für das Docking vorbereitet werden. Hierfür werden aktive Verbindungen, inaktive Verbindungen und auf Wunsch ein Decoy eingelesen (Abbildung 40, hellgrün). Die aktiven Verbindungen basieren auf Testungen für den Rezeptor, ebenso die inaktiven. Bei den inaktiven Substanzen bietet es sich an, diese zu nehmen, die an dem Referenzprotein, also der Kristallstruktur selektiv binden. Damit wird die Güte der Modelle am besten evaluiert. Der Decoy ist optional und bildet eine Auswahl von 124412 Molekülen ab, die als Target zum Beispiel die Adenosindeaminase, die HIV Protease oder die Neuroamidase haben.

Im nächsten Schritt, dem „Ligand preparation“, wird den jeweiligen Molekülen eine 1 oder eine 0 zugeordnet, abhängig davon, ob sie aktiv oder inaktiv sind (Abbildung 40, hellgrün; Abbildung 46). Darüber hinaus werden die Liganden so präpariert, dass sie im pH-Wert von 7.0+-0.2 protoniert, beziehungsweise deprotoniert vorliegen. Des Weiteren werden mögliche Tautomere berechnet und ebenfalls als Liganden betrachtet. Der geladene Decoy wird mit einem Zufallsgenerator auf 100 Liganden verkleinert und diese ebenfalls präpariert. Die so präparierten Liganden werden zusammengefasst und sind fertig zum Docking.

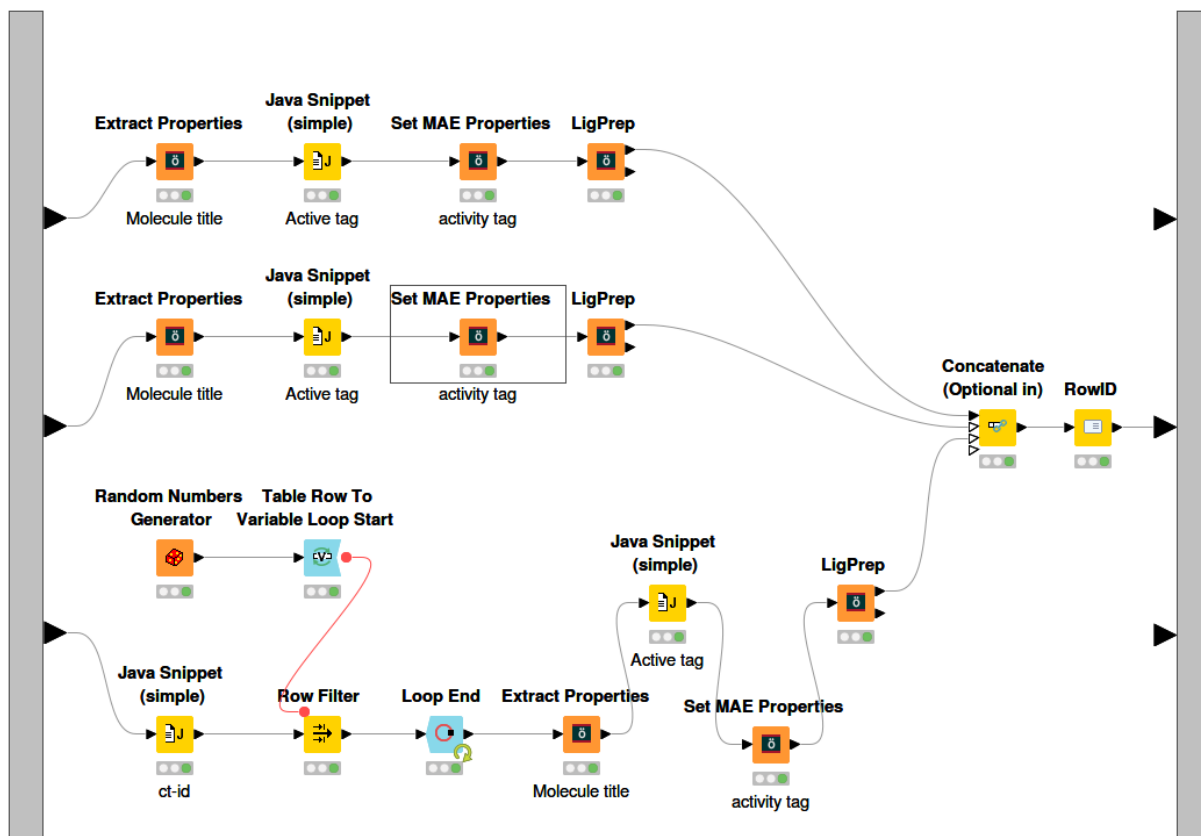


Abbildung 46: Geöffnete Metanode „Ligand preparation“.

In „Docking + Evaluation“ werden die generierten GlideGrids nacheinander, in einer Schleife, mit den präparierten Liganden mittels „Glide Ligand Docking“ gedockt. Anschließend wird mittels des „Glide scores“ ein Wert, der die Güte des Dockings angibt, sortiert. Nach diesem Sortieren kann eine ROC Kurve generiert werden. Zusätzlich wird der „AUC Score“ (Area under curve) aus der Fläche unter der Kurve bestimmt. Dieser ist das Maß für das beste Modell. Als Erweiterung wurde die „Ligand Interaction Map“ für die 10 besten Liganden an dem jeweiligen Modell eingefügt. Diese ermöglicht eine noch differenziertere Auswahl der besten Modelle (Abbildung 35, rot/orange; Abbildung 47).

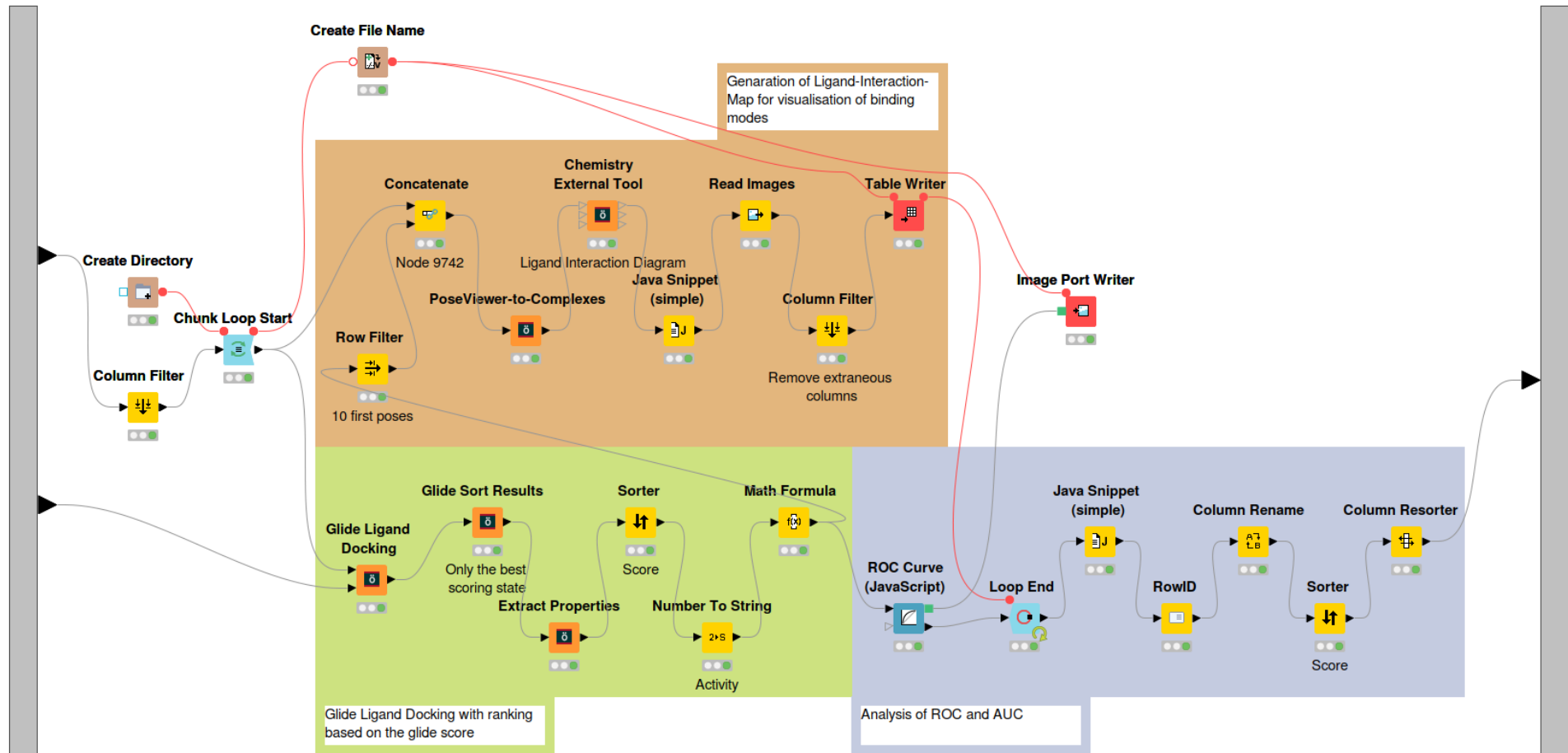


Abbildung 47: Node „Docking + Evaluation“, die sowohl für das Docking als auch die darauffolgende Auswertung genutzt wird.

3.1.7 Ergebnisse

Im Folgenden wurde der Workflow mit den 10 besten durch Modeller generierten A₃AR-Homologiemodellen getestet. Die getesteten Liganden sind nachfolgend dargestellt (Tabelle 8). Die Liste mit subtypselektiven Liganden umfasst 15 A₃AR selektive und 29 Liganden die selektiv an die anderen Rezeptoren binden (Strukturen in Anhang I). Daneben wurden 100 zufällig ausgewählte Liganden als *decoy* eingespeist.

Tabelle 8: Auflistung der selektiven Liganden aller ARs.

		Adenosinrezeptor					
		A ₁	A _{2A}	A _{2B}	A ₃		
Ligand	Agonist	Capadenoson	Apadenoson	BAY60-6583	32JM		
		CI-ENBA	Evodenon	-	CP-532,903		
		CVT3619	-	-	CP608,039		
		MRS7469	-	-	LJ-529		
		Neladenoson	-	-	MRS5698		
		-	-	-	MRS5980		
		-	-	-	Namodenoson		
	Antagonist	FK-453	CSC	4TM	KF26777		
		Naxifylline	Istradefylline	17TM	MRS1523		
		PSB-36	MSX2	20TM	MRS5127		
		Rolofylline	Preladenant	39TM	MRS5147		
		Toponafylline	SCH-442416	46TM	OT-7999		
		-	-	54TM	PSB-10		
		-	-	ISAM140	PSB-11		
		-	-	LAS101057	VUF-5574		
		-	-	PSB-1901	-		
		-	-	PSB-0788	-		
		-	-	PSB-1901	-		
		Subtotal		10	7	12	15
				29			15
Total		44					

Das Ergebnis des Workflows ist in Tabelle 9 dargestellt. Das Homologiemodell Nr. 5 ist das Modell mit dem besten AUC Wert. Darauffolgend sind, mit etwas Abstand, die Modelle 10 und 3 gelistet, die einen ähnlichen AUC Wert aufweisen.

Tabelle 9: Ergebnisse des Workflows. In Spalte 1 sind die Homologiemodelle aufgelistet. In Spalte 2 die „Area under Curve“ (AUC).

Top	Homologiemodell	AUC	Top Docking score
1	5	0.749	9.50
2	10	0.624	10.06
3	3	0.616	11.11
4	2	0.584	9.09
5	4	0.579	10.62
6	8	0.556	7.99
7	7	0.548	11.13
8	1	0.451	9.26
9	6	0.446	10.73
10	9	0.441	10.61

Im Workflows können zusätzlich die erstellten *Ligand Interaction Maps* direkt analysiert, und die Bindungsverhältnisse bewertet werden. Das Programm *Maestro* gibt zu jedem *Docking* einen *Docking Score* an, der bewertet, wie gut der Ligand in der Tasche positioniert ist. Dabei stellte sich heraus, dass der *Score* für das Modell 5 im Vergleich zu den anderen der Top 3 der schlechtesten ist (Tabelle 9). Die visuelle Auswertung der Bindungsverhältnisse der besten 10 Verbindungen in den Modellen 5, 10 und 3 zeigte, dass das Modell 3 nicht nur den besten *Score*, sondern auch das plausibelste Bindungsverhalten aufweist. Insbesondere mit den zuvor eingeführten, notwendigen Interaktionen (Interaktion mit der Aminosäure Asn242) zeigt Modell 3 das beste Ergebnis.

Bei der Analyse der gedockten Verbindungen sticht besonders OT-7999 heraus. Diese ist in beiden Modellen (10 und 3) unter den Top 3 der Liganden, die in den Modellen am besten binden. Darüber hinaus ist aus der Literatur bekannt, dass die Verbindung in Selektivitätsstudien einzig am humanen A₃AR mit einem $K_i = 0.95$ nM bindet.³⁰

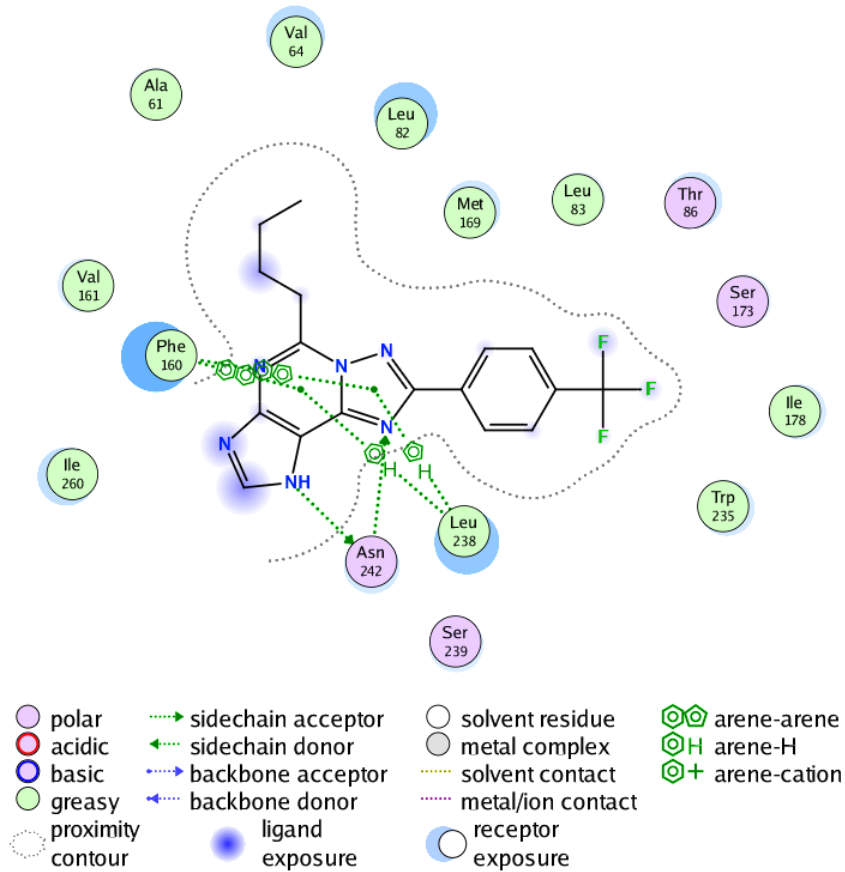


Abbildung 48: Ligand Interaction Map des Moleküls OT-7999 und dem A₃AR-Homologiemodell 3 in Maestro gedockt und in MOE geöffnet.

Nachdem OT-7999 als potentiell geeigneter Antagonist ausgemacht werden konnte, wurde dessen Positionierung im Protein untersucht (Abbildung 48). Der Phenylring zeigt in den Rezeptor hinein und die Trifluormethylgruppe füllt den restlichen Bereich aus. Der *n*-Butylrest befindet sich in einer lipophilen Tasche, wodurch das gesamte Molekül stabilisiert wird. Der Kern des OT-7999 Moleküls wird über π - π -Wechselwirkungen und π -Aren-Wechselwirkungen in der Bindungstasche gehalten. Das essentielle N6.55 (Asn242) fixiert den Liganden über Wasserstoffbrückenbindungen. Der Kohlenstoff in Position 8 zeigt aus dem Rezeptor hinaus. Durch die Darstellung der Verbindung in der Rezeptortasche (Abbildung 49) wird die mögliche extrazellulär orientierte Molekülseite bestätigt. Somit ist ein geeigneter A₃AR-Antagonist gefunden und dessen Positionierung im Rezeptor bestimmt, sodass die Funktionalisierung an geeigneter Stelle erfolgen kann.

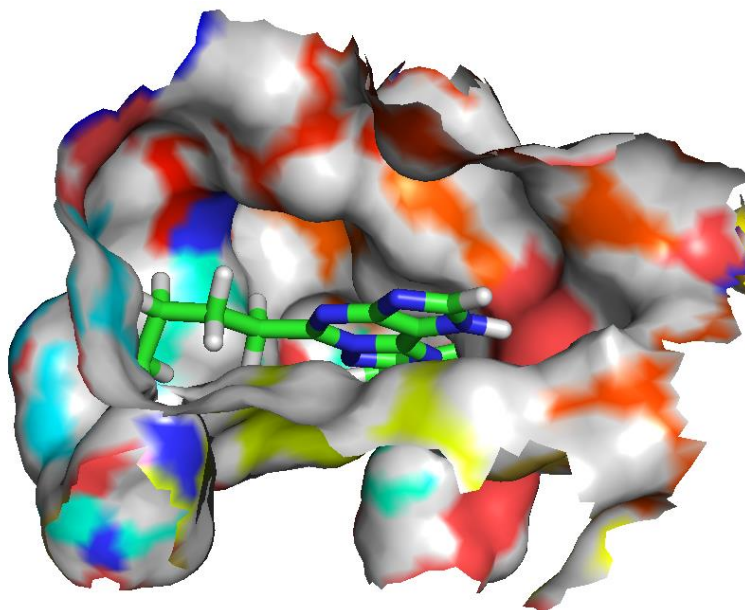
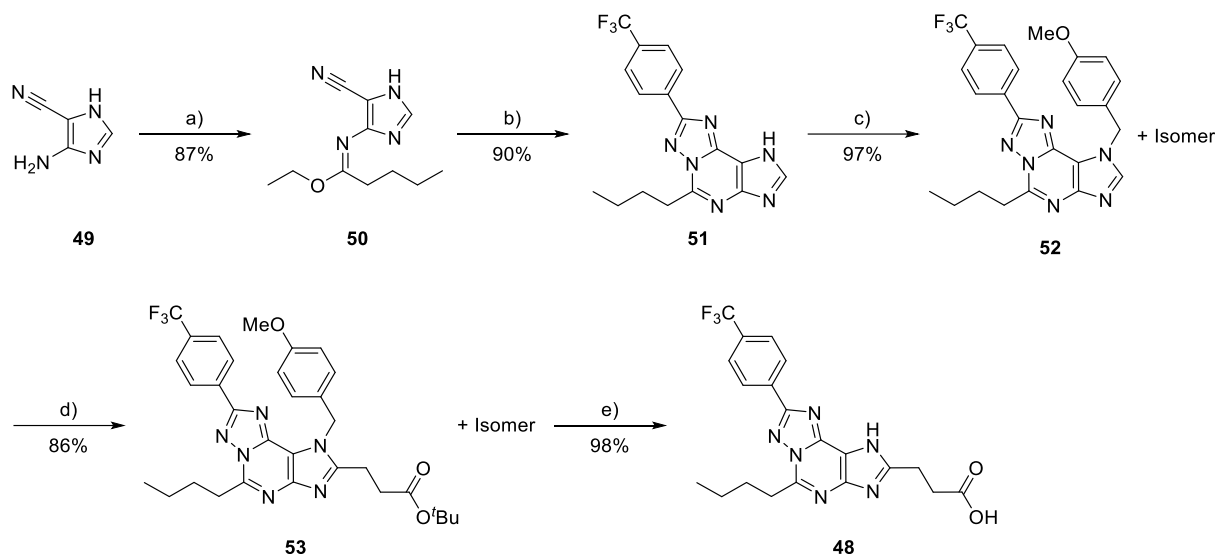


Abbildung 49: Darstellung der Bindungstasche des A₃AR-Homologiemodells mit dem Liganden OT-7999 in PyMOL.

3.1.7.1 Synthese des OT-7999-Derivats 48

Im Folgenden ist die Synthese zu OT-7999 (**51**) und dessen Derivat **48** dargestellt.



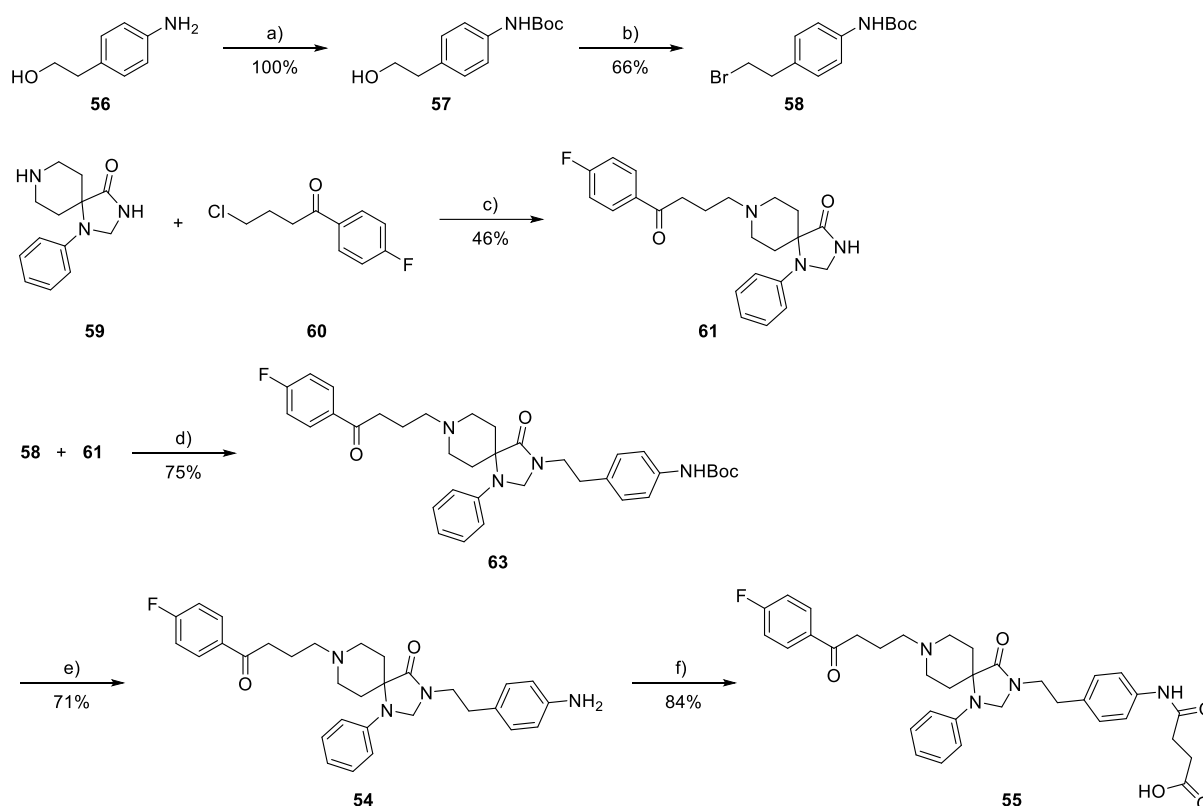
Schema 20: Synthese zum Derivat **48**.²⁷¹ Reaktionsbedingungen: a) 1,1,1-Triethoxy-pentan, DMF, 80 °C, 24 h. b) 4-(Trifluoromethyl)benzhydrazid, DMF, 160 °C, 24 h. c) PMBCl, K₂CO₃, DMF, 80 °C, 24 h. d) [Rh(COD)Cl]₂, DPPE, CsOAc, ^tButylacrylat, Toluol, 120 °C, 24 h. e) TFA, Reflux, 6 h.

Im ersten Syntheseschritt wurde durch zweimalige Eliminierung von Ethanol mit einer Ausbeute von 87 % aus **49** das Imidat **50** erhalten. Im nächsten Schritt greift das Hydrazid am Imidatkohlenstoff und am Cyanidkohlenstoff an und baut dabei unter Eliminierung von Wasser und Ethanol das Ringsystem **51** auf. Darauffolgend wird mit *p*-Methoxybenzylchlorid das sekundäre Amin geschützt. Dabei kann, neben dem geschützten Produkt **52** auch dessen Konstitutionsisomer isoliert werden. Die Funktionalisierung der C8-Position durch Brom führte zunächst in eine Sackgasse. Als Alternative wurde die CH-Aktivierung mittel Rh-Katalysator eingeführt.²⁷² Diese ermöglicht die Funktionalisierung ohne vorherige Präparation des Kohlenstoffs in einer Ausbeute von 86 %. Im letzten Schritt wurden die beiden Schutzgruppen, *p*-Methoxybenzyl und der ^tButylester entfernt und das finale Produkt **48** der Synthese mit 98 % Ausbeute und 64 % Ausbeute über 5 Stufen erhalten.

3.1.8 Dopamin D₂-Rezeptor-Antagonisten

3.1.8.1 Synthese des Spiperonderivats 55²⁷³

Nachfolgend ist die Synthese zu Spiperon (**54**) und dem Spiperonderivat **55** dargestellt.



Schema 21: Synthese des D₂-Antagonisten Spiperon (**54**) und dessen Linkeraddukt **55**.²⁷³ Reaktionsbedingungen: a) Boc₂O, EtOAc, RT, 16 h. b) PPh₃, NBS, CH₂Cl₂, 0 °C, 2 h. c) NEt₃, KI, MeCN, Reflux, 20 h. d) i) KOH, K₂CO₃, TBAB, Toluol, 90 °C, 30 min, ii) Toluol, 90 °C, 2 d. e) 2 M HCl/Dioxan, RT, 3 h. f) Bernsteinsäureanhydrid, MeCN, RT, 16 h.

Wie bereits im einleitenden Teil erwähnt, wurden Dimere aus A₂A- und D₂-Rezeptoren nachgewiesen. Deswegen ist es sinnvoll, D₂-Antagonisten zu synthetisieren, um mit diesen im späteren Verlauf einen *Proof of Concept* durchzuführen. Aus der Literatur wurde der als selektiv beschriebene Ligand **54** gewählt und synthetisiert.²⁷³ Im ersten Schritt wird das Anilin **56** mittels Boc₂O geschützt. Der Alkohol am geschützte Anilin **57** wird anschließend zum Brom umgewandelt. In einer separaten Reaktionsfolge wird zunächst der Kern des Spiperons **61** aufgebaut. Dafür wird **59** mit dem Chlor-substituierten Keton **60** zu **61** umgesetzt. Dann wird das in der ersten Reaktionsfolge synthetisierte **58** an **61** addiert und das Boc-geschützte Spiperon **63** wird erhalten. Nach saurer Entschützung entsteht Spiperon **54**. Dieses wird in einer letzten Reaktion zum modifizierten Spiperonderivat **55** umgesetzt. Dieses wird mit einer Ausbeute von 30% über 5 Stufen erhalten.

3.1.8.2 Alternativer D₂-Antagonist ST-2335

Alternativ wurde ein von Prof. H. Stark (Universität Düsseldorf) zu Verfügung gestellter D₂-Rezeptorantagonist **64** in Betracht gezogen (Abbildung 50).

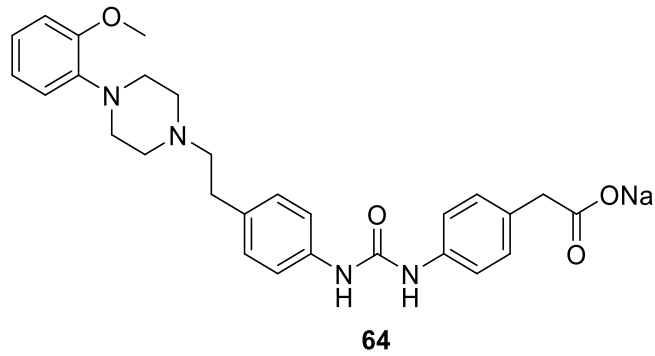
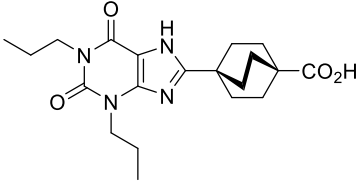
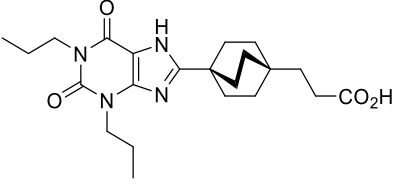


Abbildung 50: Strukturformel von ST-2335.

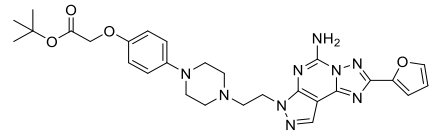
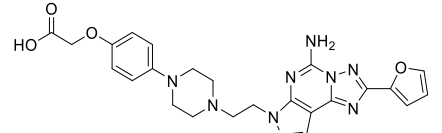
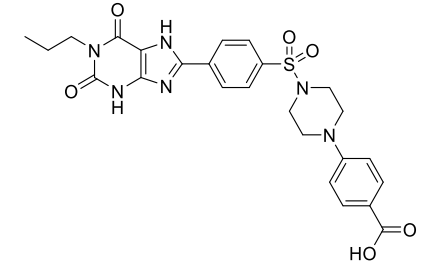
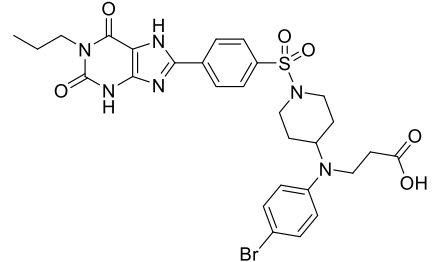
ERGEBNISSE

3.1.9 Ergebnisse der Testung

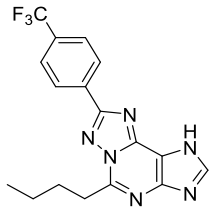
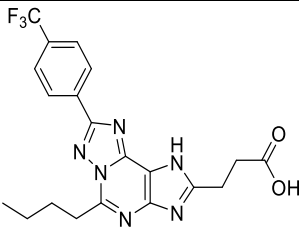
Tabelle 10: K_i -Werte und % Inhibition der Testsubstanzen an den human A_{1-} , A_{2A-} , A_{2B-} und A_{3AR} .¹ (n = 3 sofern nicht anders vermerkt)

VERBINDUNG	A₁AR (Human rekombinant) [³H]CCPA	A_{2A}AR (Humane Rekombinante) [³H]MSX-2	A_{2B}AR (Humane Rekombinante) [³H]PSB-1901	A₃AR (Humane Rekombinante) [³H]PSB-11	SELEKTIVITÄT	
						K_i ± SEM [nM] (oder % Inhibition ± SEM bei 1 µM)
A₁-Liganden						
7 TK-TO-006		28.0 ± 7.1	664 ± 114	>1000 (45 ± 5)	>1000 (10 ± 7)	23-fach
1 TK-TO-011		4.07 ± 0.90	661 ± 188	289 ± 94	>1000 (13 ± 7)	71-fach

ERGEBNISSE

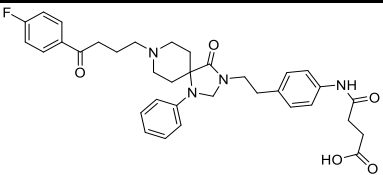
A _{2A} -Liganden						
22 TK-PT-010		420 ± 36	1.93 ± 0.75	>1000 (15 ± 10)	>1000 (25 ± 2)	218-fach
2 TK-PT-011		>1000 (18 ± 4)	200 ± 16	>1000 (2 ± 11)	>1000 (12 ± 10)	>5-fach
A _{2B} -Liganden						
3 TK-P6-013		>1000 (21 ± 4)	935 ± 257	129 ± 36	>1000 (7 ± 7)	7-fach
33 TK-P6-066		>1000 (-16 ± 10, n=3)	>1000 (-15 ± 13, n=3)	>1000 (35 ± 1, n=2)	>1000 (16 ± 3, n=2)	-

ERGEBNISSE

A ₃ -Liganden						
51 TK-OT-008		>1000 (28 ± 4, n=2)	>1000 (-11 ± 5, n=2)	>1000 (-4 ± 5, n=2)	0.399 ± 0.126	>1.000-fach
48 TK-OT-018		>1000 (11 ± 6, n=2)	>1000 (3 ± 8 at 0.1µM, n=4)	>1000 (8 ± 8, n=2)	2.81 ± 0.48	>356-fach

i Andreas Brockmann, Sonja Hinz, Christin Vielmuth

Tabelle 11: Potenzbestimmung des D₂DR-Antagonisten Spiperon an den Dopaminrezeptoren D₂ und D₃.ⁱ (Die Potenzen wurden in β-Arrestin-Assays an humanen D₂DR und D₃DR bestimmt, die in den CHO-Zellen exprimiert wurden; Die Hemmung der Dopamin-induzierten Aktivierung wurde bestimmt; EC₈₀ D₂DR: 460 nM, D₃DR 20 nM)

VERBINDUNG	D ₂ DR (human rekombinant)	D ₃ DR (human rekombinant)	
	IC ₅₀ ± SEM [nM]	IC ₅₀ ± SEM [nM]	
55 TK-SP-006		0.78 ± 0.32	1.04 ± 0.64

i Beatriz Büschbell

3.1.10 Auswertung der Testergebnisse

In Tabelle 10 und Tabelle 11 sind die Ergebnisse der Testung der synthetisierten Verbindungen dargestellt. Für die Adenosinrezeptorantagonisten (Tabelle 10) wurden jeweils die Affinitäten zu den 4 Subtypen bestimmt, aus denen sich die Selektivität bestimmen lässt. Der D₂DR Rezeptor wurde in funktionellen Assays untersucht (Tabelle 11).

A₁AR

Als A₁AR-Antagonisten wurden Toponafylline **1** und dessen Vorläufer **7** an den vier AR-Subtypen getestet. Während Toponafylline mit einer niedrigen nanomolaren Affinität bindet, ist **7** um den Faktor 7 weniger affin. Wird die Selektivität verglichen, ist **1** mit dem Faktor 71 ebenfalls deutlich besser als **7**. Problematisch ist aber die Affinität zum A_{2B}AR, welche **1** aufweist, **7** aber nicht. Auf Grund dieses Befundes werden beide Liganden im Folgenden mit den Linkern verbunden.

A_{2A}AR

Für den A_{2A}AR wurde das Preladenant-Derivat **2** ausgewählt. Zusätzlich wurde die Vorstufe **22** getestet, um abschätzen zu können, welche Auswirkungen eine voluminöse Einheit am extrazellulär orientierten Ende hat. Während **22** eine Affinität von ungefähr 2 nM aufweist, scheint die Säure in **2** deutlich zu stören. So nimmt der K_i-Wert um den Faktor 105 auf 200 nM zu. Daraus lässt sich zum einen ableiten, dass auch sterisch anspruchsvolle Gruppe toleriert werden, zum anderen, dass vermutlich die Glutaminsäure, beteiligt an der Ligandbindung, wie in diversen Kristallstrukturen ersichtlich, mit der Säure negativ wechselwirkt und dies zur verminderten Affinität von **2** führt.^{25, 274} Im Vergleich der Selektivitäten ist **22** deutlich besser, allerdings ist auch eine gewisse Affinität zum A₁AR zu beobachten.

A_{2B}AR

Für den A_{2B}AR wurde zunächst **3** synthetisiert. Wie aufgrund theoretischer Überlegungen bereits befürchtet, wurde nur eine mäßige Affinität zum A_{2B}AR beobachtet. Darüber hinaus ist die Selektivität mangelhaft. Die Verbindung wurde trotzdem für die Kupplungsreaktion verwendet, da sich durch die Amidbildung eine veränderte elektronische Struktur ergibt. Als aufwendigste Verbindung und größter Hoffnungsträger wurde **33** getestet, wies aber leider die schlechtesten Werte auf. Auch hier wurde vermutet, dass die Säure möglicherweise einen Einfluss auf die Bindungseigenschaften hat, weshalb **33** für die nachfolgende Linkerkupplung eingesetzt wurde.

A₃AR

Nachdem ein großer Aufwand in die Auswahl und Synthese von Verbindung **48** für den A₃AR gesteckt wurde, konnte eine hervorragende Affinität von ungefähr 3 nM festgestellt werden.

Dies validiert die Ergebnisse des Dockings. Überdies ist die Selektivität hervorragend, da so gut wie keine Affinität zu den anderen Rezeptoren beobachtet wird. Die Verbindung wird für nachfolgende Reaktionen verwendet.

D₂/D₃DR

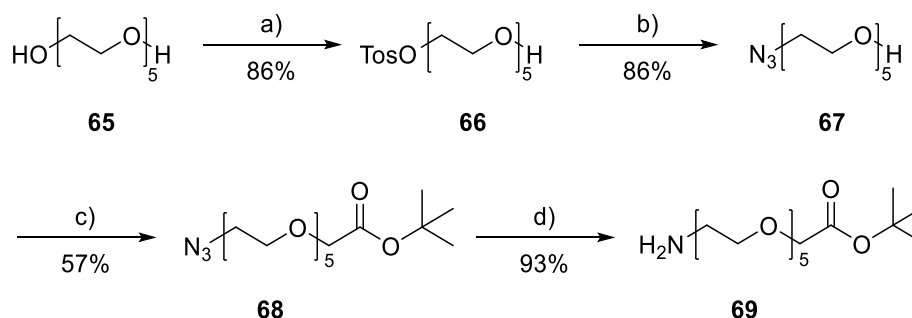
Spiperon (**55**) wurde in der Literatur als selektiver D₂-Antagonist charakterisiert.²⁷⁵ Wie die Testung aber zeigt, sind die Wirksamkeiten am D₂DR und am D₃DR nahezu identisch. Somit ist zurzeit noch kein selektiver D₂DR Antagonist verfügbar. Die Verbindung wurde dennoch für weitere Reaktionen verwendet, da für den *Proof of Concept* ein D₂DR-Ligand benötigt wird und eine Differenzierung zwischen D₂- und D₃DR zunächst nicht unbedingt erforderlich ist.

3.1.11 Die Synthese der Linker für den PLA

Im Folgenden werden unterschiedliche Ansätze zur Linkersynthese beschrieben.

3.1.11.1 Synthese des PEG-5 und PEG-4 Linkers

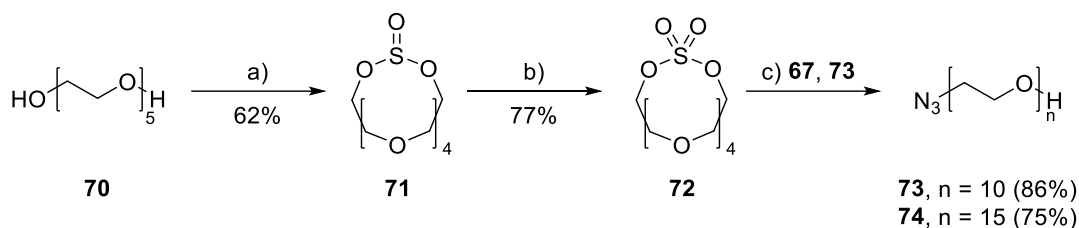
Wie bereits dargestellt, müssen Linker mit unterschiedlichen Längen an die Moleküle angeknüpft werden, um deren Einfluss auf die Affinität zu testen. Dafür wurde die folgende Synthese begonnen.



Schema 22: Synthese des ^tButyl-geschützten Linkers **69**. Reaktionsbedingungen: a) TosCl, Ag₂O, KI, CH₂Cl₂, RT, 20 h. b) NaN₃, DMF, 140 °C, 20 h. c) NaH, ^tButylbromoacetat, THF, RT, 18 h. d) 10 % Pd/C, H₂, MeOH, RT, 2 h.

Zunächst wurde Pentaethylenglykol (**65**) käuflich erworben und mit Tosylchlorid einfachgeschützt (Schema 22). Die hohe Ausbeute der Schützung ist auf das Silberoxid zurückzuführen, welches das Glykol um sich herum anlagert und somit nur einen Alkohol deprotoniert.²⁷⁶ Im nächsten Schritt wird das tosylierte Glykol **66** mit NaN₃ umgesetzt und das Azid **67** erhalten. Dieses erweist sich als äußerst stabil gegenüber hohen Temperaturen. Im nächsten Schritt wird verethert und der ^tButylester **68** erhalten. Die Ausbeute ist im Gegensatz zum phenolischem Alkohol geringer, welches auf die geringere Nukleophilie zurückzuführen ist. Der letzte Schritt ist die Reduktion des Azids zum Amin. Nach mehreren Versuchen konnte das primäre Amin **69** in sauberer Form erhalten werden. Dies war durch die Zugabe von Ammoniak in das Laufmittel der säulenchromatographischen Reinigung möglich. Der Testlinker konnte mit einer Ausbeute von 39 % über vier Synthesestufen erhalten werden. Dabei wurde die Beobachtung gemacht, dass Verunreinigungen durch eine oder zwei Einheiten PEG auftreten. Dies ist auf die Verunreinigung des Startmaterials zurückzuführen, welches nur zu 95 % rein ist.

3.1.11.2 Synthese von PEG-5 und Verlängerung



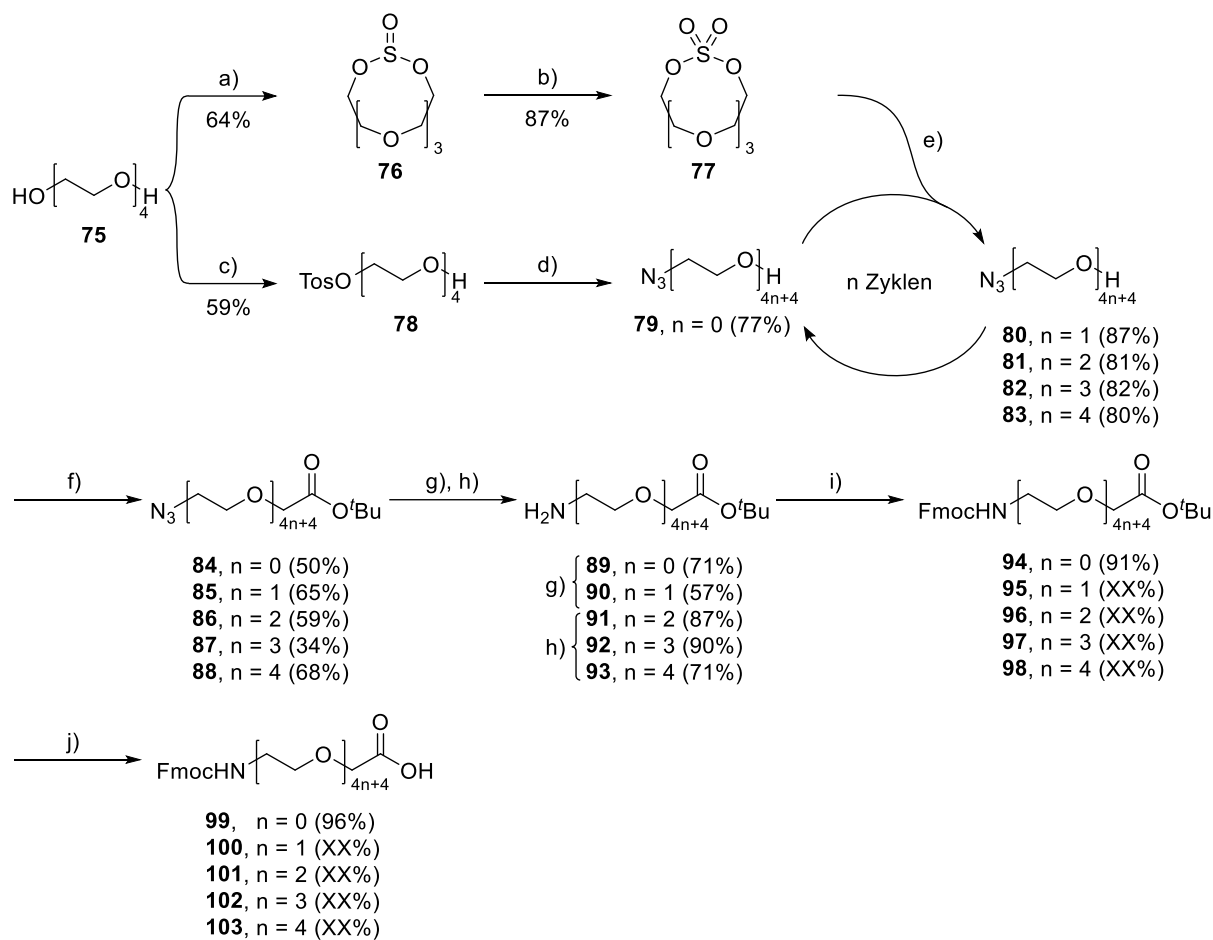
Schema 23: Synthese unterschiedlicher Linkerlängen mittels zyklischer Sulfate.²⁷⁷ Reaktionsbedingungen: a) SOCl_2 , DIPEA, DMAP, CH_2Cl_2 , 0 °C, 2 h. b) NaIO_4 , $\text{RuCl}_3 \times \text{H}_2\text{O}$, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CCl}_4/\text{H}_2\text{O}$, RT, 2 h. c) i) NaH , THF, 0 °C – RT, 12 h, ii) H_2SO_4 , H_2O , Reflux, 1 h.

Um weitere Linkerlängen zu erhalten, wird Pentaethylglykol (**70**) mit Thionylchlorid mit 62 % Ausbeute zum zyklischen Sulfid **71** umgesetzt (Schema 23). Die Lagerung des Sulfids **71** ist nicht für lange Zeit möglich, sodass die Oxidation des Sulfids zum Sulfat **72** mittels *in situ* gebildetem Rutheniumperoxid erforderlich ist. Dieses wurde mit 77 % Ausbeute erhalten. Folgend wurde das Azid **67** zu den Aziden **73** und **74** verlängert. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt eine Reinheit von 96%. Die Verunreinigungen sind aus der 95%igen Reinheit des Pentaethylglykols **70** entstanden. Somit sind Nonaethylglykol und Octaethylglykol Nebenprodukte der Synthese.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde die Synthese mit Tetraethylglykol (**75**) begonnen (Schema 24). Dieses ist mit einer Reinheit von 99 % zu erwerben. Ausgehend davon wird das zyklische Sulfat **77** über das zyklische Sulfid **76** synthetisiert (Schema 24). Die Ausbeuten konnten dabei geringfügig verbessert werden. Ebenfalls ausgehend von Tetraethylglykol wurde die Synthese zu **79** durchgeführt. Die Ausbeuten aus Schema 22 konnten dabei nicht reproduziert werden. In vier weiteren Zyklen wurden die verlängerten Azide **80** – **83** mit einer Ausbeute von durchschnittlich 83 % erhalten. Diese wurden mit t -Butylbromoacetat umgesetzt, um eine geschützte Säurefunktion zu integrieren. Die Ausbeute zu diesen Produkten **84** – **88** ist, bis auf einen Ausreißer konstant bei ungefähr 60 %. Der letzte Schritt ist die Reduktion der terminalen Aminfunktion. Als erste Methode wurde elementarer Wasserstoff über Palladium genutzt. Dieser führt jedoch zur Dimerisierung der Produkte **89** und **90**. Als Alternative wurde die Staudinger-Reaktion gewählt, welche in hervorragenden Ausbeuten zu den Produkten **91**, **92** und **93** führt.

Darüber hinaus wurde in einem Testansatz damit begonnen, den Linker **89** in den für die Festphasenreaktion benötigte Form umzuwandeln. Dafür wurde dieser zunächst mit FmocCl geschützt und **94** mit 91 % Ausbeute erhalten. Anschließend wurde der t -Butylrest zu **99** abgespalten. Weitere Reaktionen wurden nicht durchgeführt, da zunächst die korrekte Linkerlänge festgelegt werden muss.

ERGEBNISSE

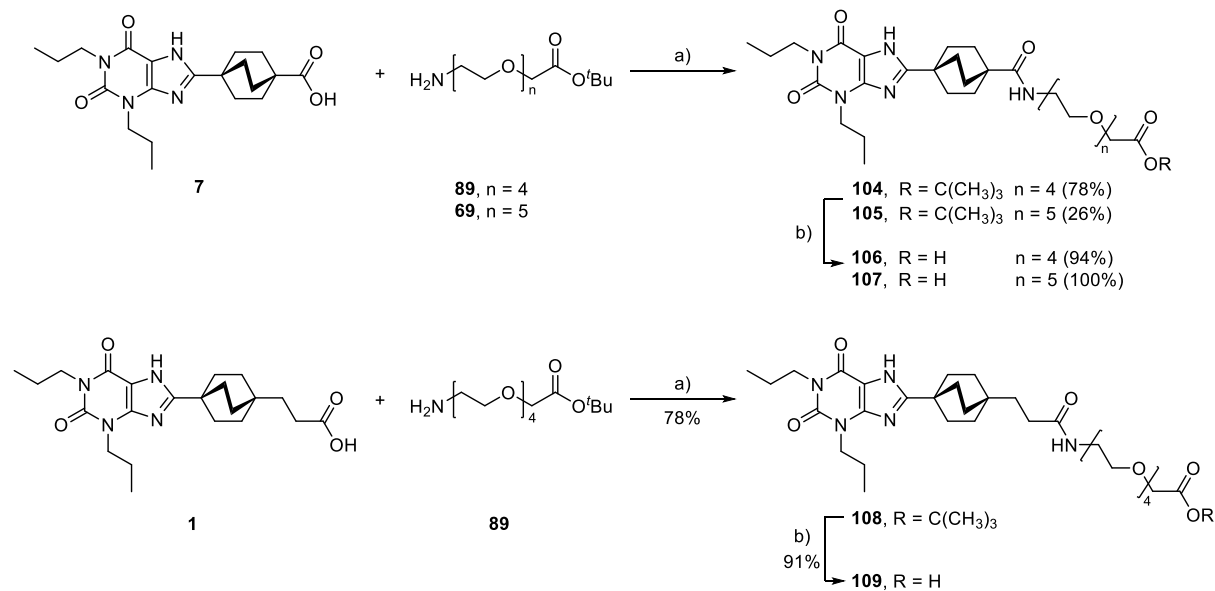


Schema 24: Syntheschema zu den Linkern.²⁷⁸ Reaktionsbedingungen: a) SOCl_2 , DIPEA, DMAP, CH_2Cl_2 , 0°C , 2 h. b) NaIO_4 , $\text{RuCl}_3 \times \text{H}_2\text{O}$, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CCl}_4/\text{H}_2\text{O}$, RT, 2 h. c) TosCl , Ag_2O , KI, CH_2Cl_2 , RT, 20 h. d) NaN_3 , DMF, 140°C , 20 h. e) i) NaH, THF, $0^\circ\text{C} - \text{RT}$, 12 h, ii) H_2SO_4 , H_2O , Reflux, 1 h. f) NaH, t -Butylbromoacetat, THF, RT, 18 h. g) 10 % Pd/C, H_2 , MeOH, RT, 2 h. h) i) PPh_3 , THF, RT, 24 h, ii) H_2O , RT, 3 h. i) FmocCl, NaHCO_3 , THF, H_2O , RT, 4 h. j) TFA, Anisol, CH_2Cl_2 , RT, 24 h.

3.1.12 Die Synthese der Linkeraddukte für den PLA

Im Folgenden wird die Synthese der Linkeraddukte beschrieben.

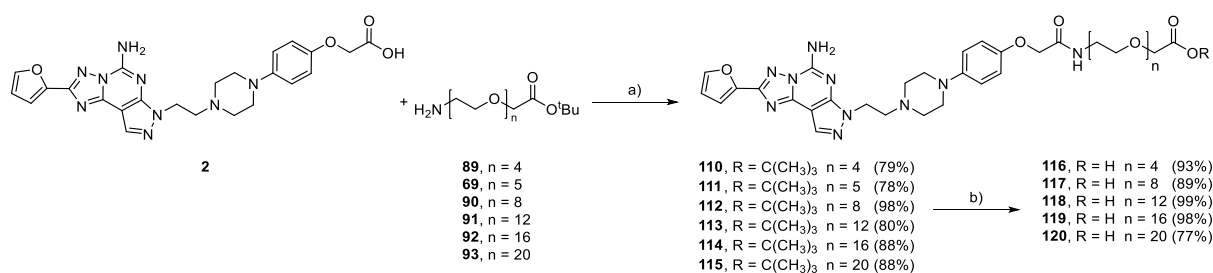
3.1.12.1 A₁AR-Antagonist-Linkeraddukte



Schema 25: Die Kupplungsreaktionen der Derivate **7**, und **1** mit den Linkern **89** und **69** zu den Linkeraddukten **104**, **105** und **108** mit darauffolgender Entschützung zu den Säuren **106**, **107** und **109**. Reaktionsbedingungen: a) HATU, DIPEA, CH₂Cl₂, RT, 24 h. b) TFA, TIPS, CH₂Cl₂, RT, 24 h.

Als A₁AR-Antagonisten wurden die Verbindungen **7** und **1** gewählt und mit den PEG-Linkern **89** und **69** gekuppelt. Darauffolgend wurden die ^tButylester **104**, **105** und **108** gespalten und die Säuren **106**, **107** und **109** erhalten. Die Kupplungsreaktionen verliefen mit zufriedenstellender Ausbeute, ebenso die Entschützungen.

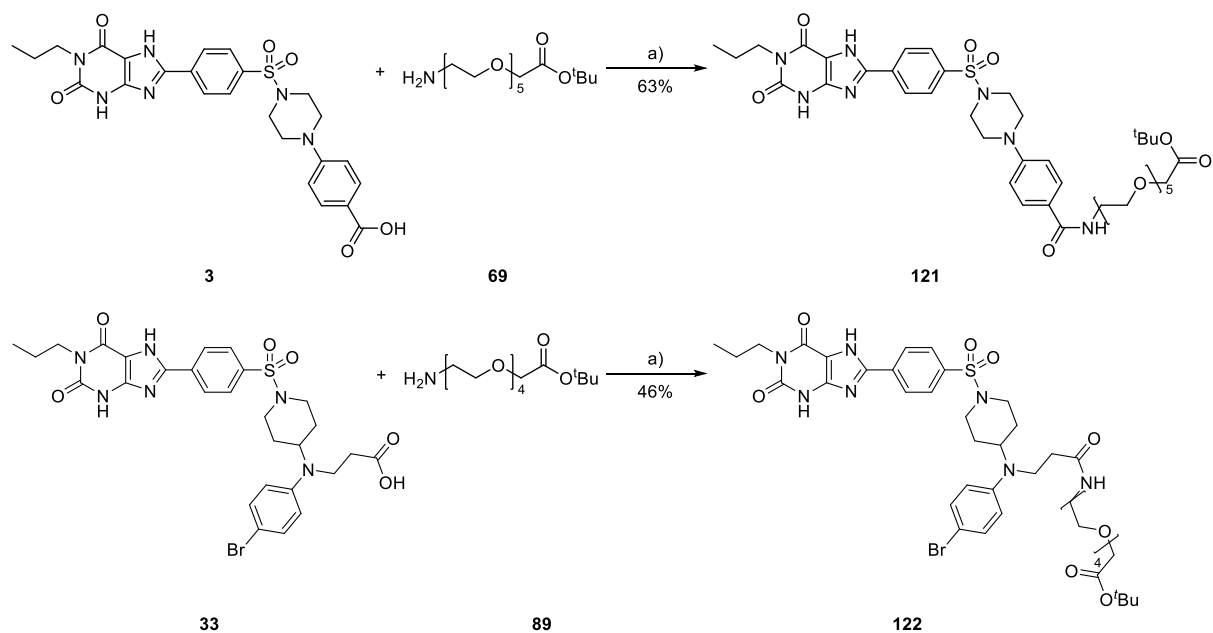
3.1.12.2 A_{2A}AR-Antagonist-Linkeraddukte



Schema 26: Synthese der Linkeraddukte **110** – **115** aus dem säuremodifizierten Antagonist **2** und den Linkern **69** bzw. **89** – **93**. Anschließende Entschützung zu den Säuren **116** – **120**. Reaktionsbedingungen: a) HATU, DIPEA, CH₂Cl₂, RT, 24 h. b) TFA, TIPS, CH₂Cl₂, RT, 24 h.

Die Kupplungsreaktionen verlaufen bei allen Linkerlängen mit hoher Ausbeute und sind reproduzierbar. Durch saure Spaltung des Esters konnten die Säuren **116** – **120** erhalten werden, die für weitere Kupplungsreaktionen verwendet werden können.

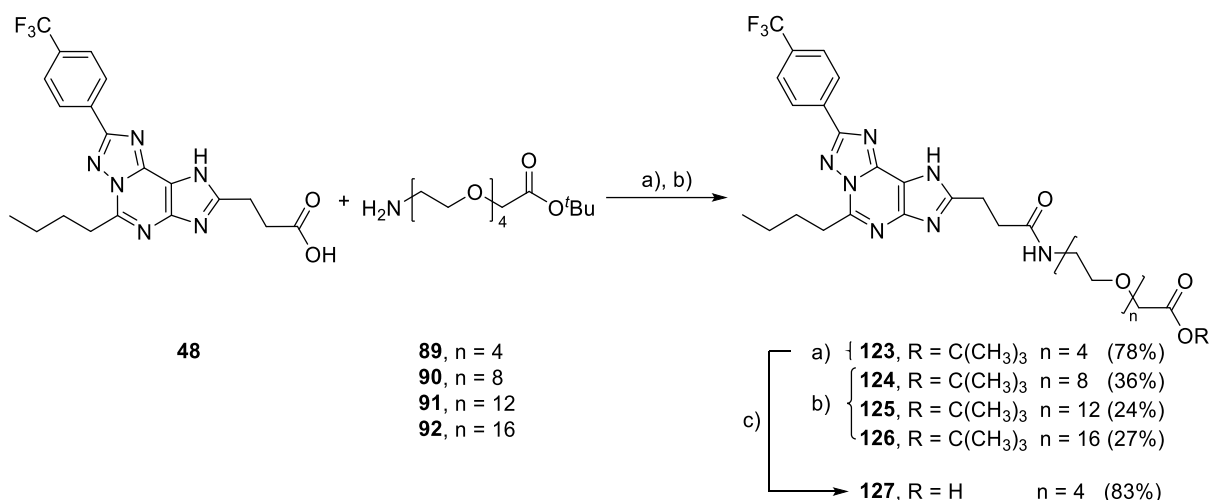
3.1.12.3 A_{2B}AR-Antagonist-Linkeraddukte



Schema 27: Synthese der Antagonist-Linkeraddukte **121** und **122** aus den Antagonisten **3** und **33** und den Linkern **69** und **89**. Reaktionsbedingungen: a) COMU, DIPEA, DMF, RT, 24 h. b) HATU, DIPEA, CH₂Cl₂, RT, 24 h.

Die Kupplung der Ausgangsverbindungen **3** und **69** wurde mit akzeptabler Ausbeute durchgeführt. Das Produkt **121** wurde aber nicht weiterbearbeitet, da keine vielversprechenden biologischen Daten erhalten werden konnte. Weiteres dazu in 3.1.16.. Die Kupplung zu **122** verlief mit schlechterer Ausbeute, welches nicht auf die Kupplungsbedingungen zurückzuführen ist, sondern auf die Bildung eines Nebenprodukts. Nach Betrachtung der Masse des Nebenprodukts, kann darauf geschlossen werden, dass **33** mit einem weiteren Molekül **33** in einer Amidknüpfung an der 3-Position dimerisiert und zusätzlich mit dem Linker verbunden wird.

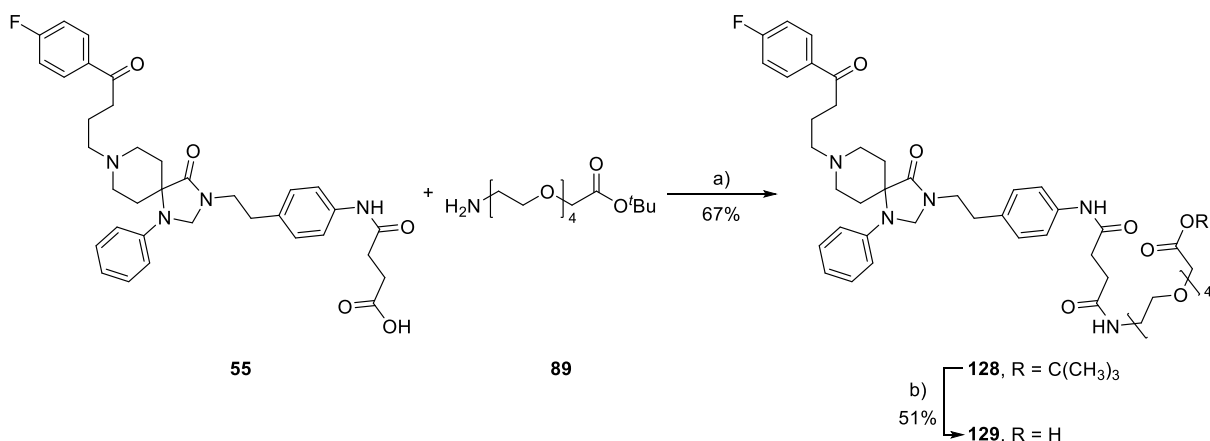
3.1.12.4 A₃AR-Antagonist-Linkeraddukte



Schema 28: Synthese des Antagonist-Linkeraddukts **127** aus dem modifizierten Antagonisten **48** und dem Linker **89**. Reaktionsbedingungen: a) COMU, DIPEA, DMF, RT, 24 h. b) HATU, DIPEA, CH₂Cl₂, RT, 24 h. c) TFA, TIPS, CH₂Cl₂, RT, 24 h.

Die Kupplungsreaktion der Säure **48** mit dem Linker **89** verläuft mit guter Ausbeute, mit den Längen 8, 12 und 16 deutlich schlechter. Verantwortlich dafür scheinen die Kupplungsbedingungen zu sein, die für die längeren Linker auf HATU und Dichlormethan umgestellt worden sind. Zunächst wurde nur **123** zu **127** entschützt, um die Affinitätsbestimmung abzuwarten.

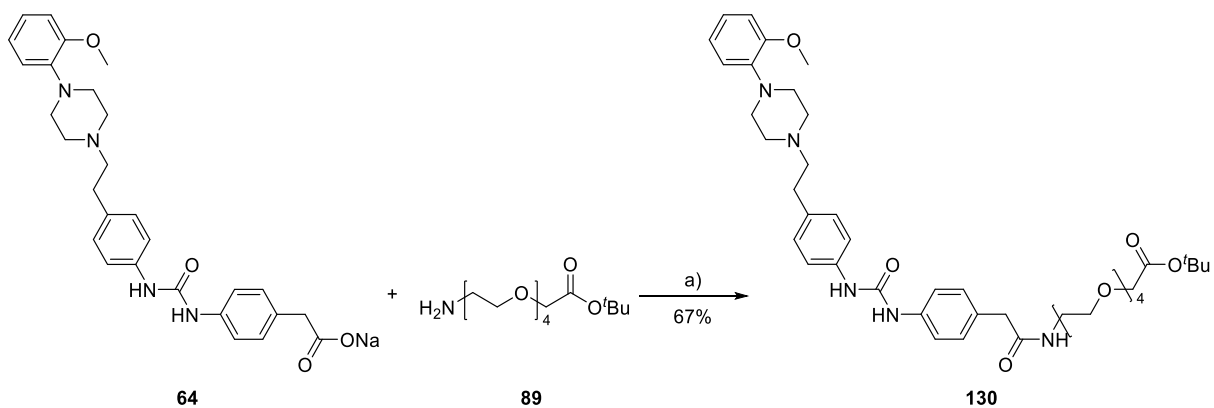
3.1.12.5 D₂DR-Antagonist-Linkeraddukt **129**



Schema 29: Synthese zum Linkeraddukt **129**. Reaktionsbedingungen: a) HATU, DIPEA, CH₂Cl₂, RT, 24 h. b) TFA, TIPS, CH₂Cl₂, RT, 24 h.

Das in Schema 21 synthetisierte Spiperonderivat **55** wird zunächst mit dem Linker **89** verbunden und anschließend der Ester **128** zur Säure **129** umgewandelt.

3.1.12.6 D₂DR-Antagonist-Linkeraddukt **130**



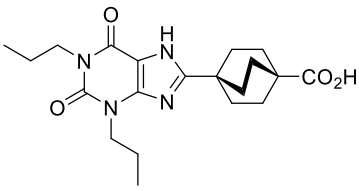
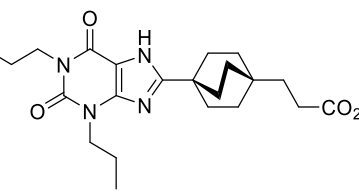
Schema 30: Kupplungsreaktion von ST-2335 (**64**) mit dem Linker **89**. Reaktionsbedingungen: a) HATU, DIPEA, CH₂Cl₂, RT, 24 h.

Die aus der Gruppe von Prof. Stark erhaltene Verbindung wurde zunächst mit dem Linker **89** gekuppelt und das Produkt **130** erhalten. Dieses wird zunächst biologisch getestet.

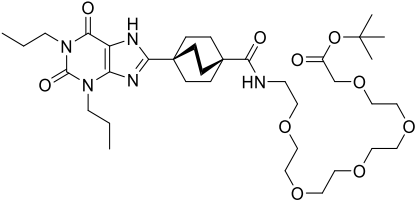
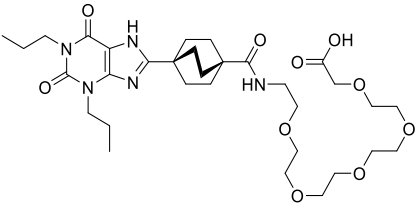
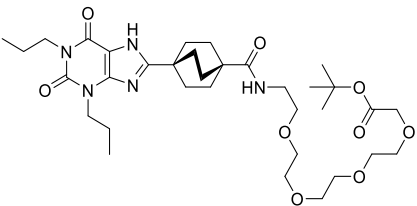
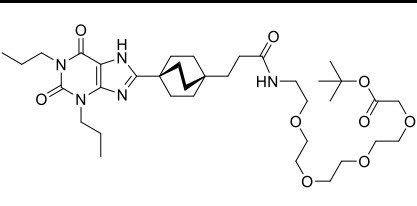
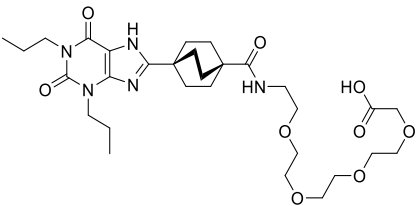
ERGEBNISSE

3.1.13 Ergebnisse der Testung

Tabelle 12: K_i -Werte und % Inhibition der Testsubstanzen an den human A_{1-} , A_{2A-} , A_{2B-} und A_{3AR} .¹ (n = 3 sofern nicht anders vermerkt)

VERBINDUNG	A₁AR (human rekombinant) [³H]CCPA	A_{2A}AR (Humane Rekombinante) [³H]MSX-2	A_{2B}AR (Humane Rekombinante) [³H]PSB-1901	A₃AR (Humane Rekombinante) [³H]PSB-11	SELEKTIVITÄT	
	$K_i \pm$ SEM [nM] (oder % Inhibition \pm SEM bei 1 μ M)	$K_i \pm$ SEM [nM] (oder % Inhibition \pm SEM bei 1 μ M)	$K_i \pm$ SEM [nM] (oder % Inhibition \pm SEM bei 1 μ M)	$K_i \pm$ SEM [nM] (oder % Inhibition \pm SEM bei 1 μ M)		
A₁-Liganden						
7 TK-TO-006		28.0 \pm 7.1	664 \pm 114	>1000 (45 \pm 5)	>1000 (10 \pm 7)	23-fach
1 TK-TO-011		4.07 \pm 0.90	661 \pm 188	289 \pm 94	>1000 (13 \pm 7)	71-fach

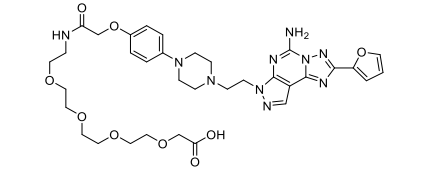
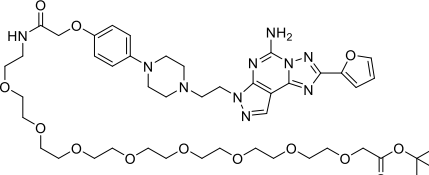
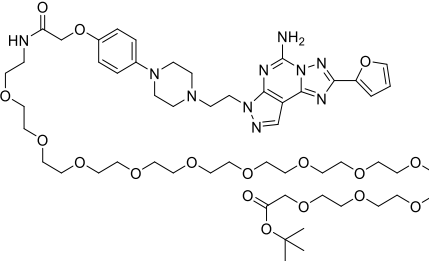
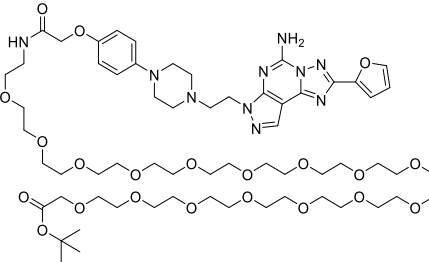
ERGEBNISSE

<p>105 TK-TO-012</p>		<p>12.7 ± 4.2</p>	<p>324 ± 123</p>	<p>821 ± 173</p>	<p>>1000 (18 ± 1)</p>	<p>26-fach</p>
<p>107 TK-TO-013</p>		<p>45.2 ± 6.0</p>	<p>>1000 (25 ± 2)</p>	<p>>1000 (19 ± 8)</p>	<p>>1000 (19 ± 3)</p>	<p>>22-fach</p>
<p>104 TK-TO-014</p>		<p>7.44 ± 0.64</p>	<p>345 ± 69 (n=4)</p>	<p>172 ± 18</p>	<p>>1000 (47 ± 5, n=4)</p>	<p>23-fach</p>
<p>108 TK-TO-015</p>		<p>2.12 ± 0.82 (n=4)</p>	<p>169 ± 55 (n=4)</p>	<p>161 ± 52</p>	<p>231 ± 34</p>	<p>76-fach</p>
<p>106 TK-TO-016</p>		<p>23.6 ± 2.3</p>	<p>>1000 (33 ± 2, n=2)</p>	<p>>1000 (31 ± 6, n=2)</p>	<p>>1000 (-4 ± 3, n=2)</p>	<p>>41-fach</p>

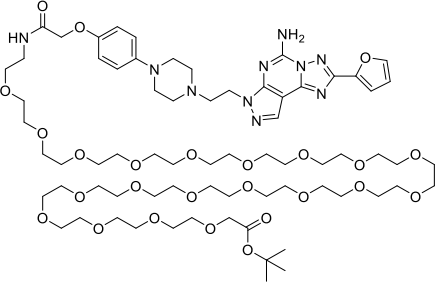
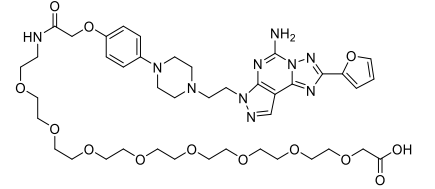
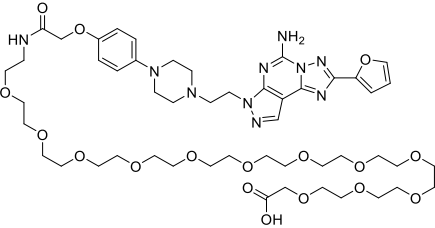
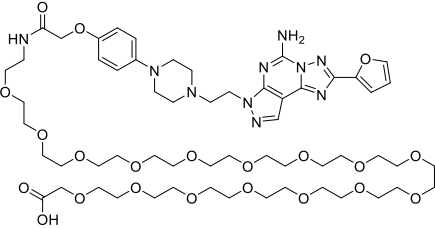
ERGEBNISSE

109 TK-TO-017		9.73 ± 0.20	>1000 (35 ± 4 , n=2)	515 ± 54	>1000 (6 ± 6 , n=2)	53-fach
A_{2A}-Liganden						
22 TK-PT-010		420 ± 36	1.93 ± 0.75	>1000 (15 ± 10)	>1000 (25 ± 2)	218-fach
2 TK-PT-011		>1000 (18 ± 4)	200 ± 16	>1000 (2 ± 11)	>1000 (12 ± 10)	>5-fach
111 TK-PT-012		>1000 (28 ± 1)	9.39 ± 1.39	>1000 (24 ± 1)	>1000 (8 ± 5)	>106-fach
110 TK-PT-013		>1000 (38 ± 9 , n=2)	2.28 ± 0.41	>1000 (9 ± 1 , n=2)	>1000 (34 ± 4 , n=2)	>439-fach

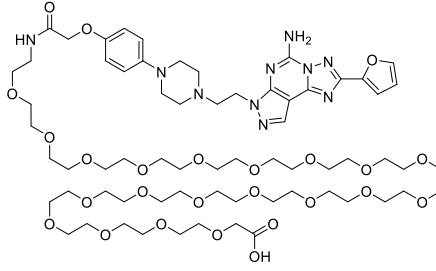
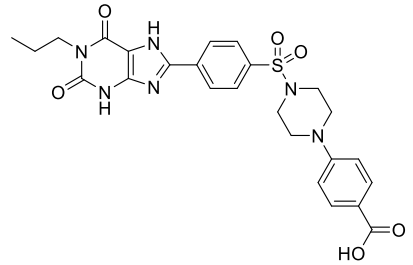
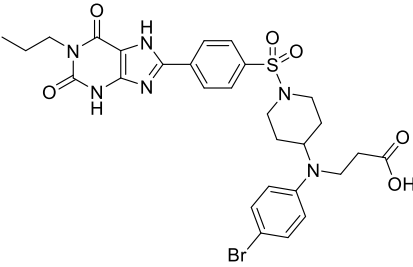
ERGEBNISSE

<p>116 TK-PT-014</p>		<p>>1000 (6 ± 5, n=2)</p>	<p>8.84 ± 0.64</p>	<p>>1000 (17 ± 9, n=2)</p>	<p>>1000 (13 ± 1, n=2)</p>	<p>>113-fach</p>
<p>112 TK-PT-016</p>		<p>>1000 (1 ± 6, n=2)</p>	<p>10.3 ± 2.1</p>	<p>>1000 (0 ± 3, n=2)</p>	<p>>1000 (26 ± 4, n=2)</p>	<p>>97-fach</p>
<p>113 TK-PT-017</p>		<p>>1000 (23 ± 9, n=2)</p>	<p>8.92 ± 4.05</p>	<p>>1000 (8 ± 3, n=2)</p>	<p>>1000 (14 ± 5, n=2)</p>	<p>>112-fach</p>
<p>114 TK-PT-018</p>		<p>>1000 (2 ± 2, n=2)</p>	<p>30.3 ± 7.9</p>	<p>>1000 (5 ± 2, n=2)</p>	<p>>1000 (2 ± 0, n=2)</p>	<p>>33-fach</p>

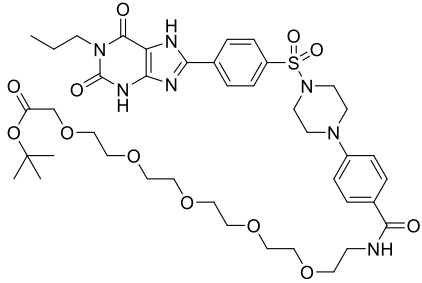
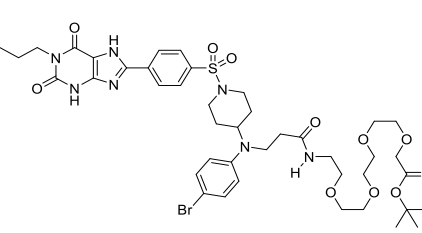
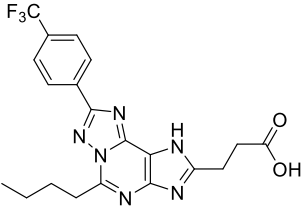
ERGEBNISSE

<p>115 TK-PT-019</p>		<p>>1000 (0 ± 12, n=3)</p>	<p>45.5 ± 12.3</p>	<p>>1000 (-8 ± 2, n=2)</p>	<p>>1000 (2 ± 5, n=2)</p>	<p>>22-fach</p>
<p>117 TK-PT-020</p>		<p>>1000 (14 ± 8, n=2)</p>	<p>89.3 ± 28.4</p>	<p>>1000 (4 ± 10, n=2)</p>	<p>>1000 (-8 ± 1, n=2)</p>	<p>>11-fach</p>
<p>118 TK-PT-021</p>		<p>>1000 (9 ± 8, n=2)</p>	<p>56.9 ± 19.6</p>	<p>>1000 (1 ± 0, n=2)</p>	<p>>1000 (11 ± 1, n=2)</p>	<p>>18-fach</p>
<p>119 TK-PT-022</p>		<p>>1000 (-1 ± 14, n=2)</p>	<p>129 ± 26</p>	<p>>1000 (-3 ± 4, n=2)</p>	<p>>1000 (-7 ± 3, n=2)</p>	<p>>8-fach</p>

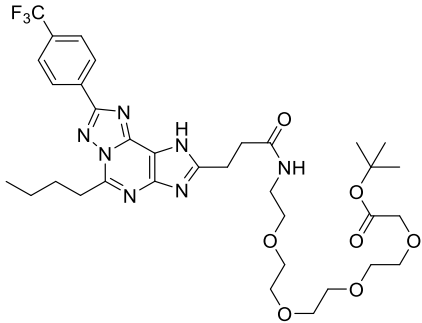
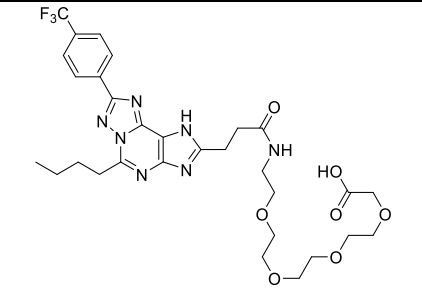
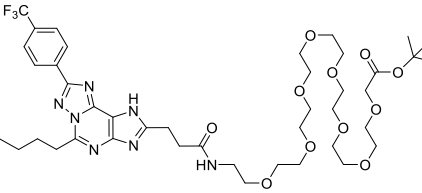
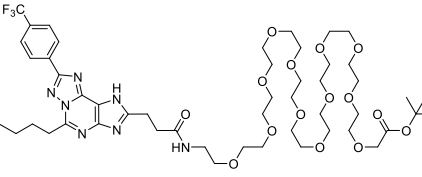
ERGEBNISSE

<p>120 TK-PT-023</p>		<p>>1000 (3 ± 2, n=2)</p>	<p>109 ± 45</p>	<p>>1000 (-1 ± 3, n=2)</p>	<p>>1000 (8 ± 6, n=2)</p>	<p>>9-fach</p>
<p>A_{2B}-Liganden</p>						
<p>3 TK-P6-013</p>		<p>>1000 (21 ± 4)</p>	<p>935 ± 257</p>	<p>129 ± 36</p>	<p>>1000 (7 ± 7)</p>	<p>7-fach</p>
<p>33 TK-P6-066</p>		<p>>1000 (-16 ± 10, n=3)</p>	<p>>1000 (-15 ± 13, n=3)</p>	<p>>1000 (35 ± 1, n=2)</p>	<p>>1000 (16 ± 3, n=2)</p>	<p>-</p>

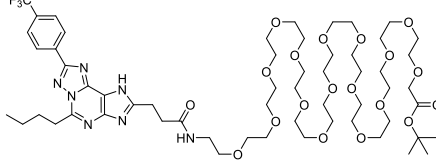
ERGEBNISSE

<p>121 TK-P6-017</p>		<p>>1000 (30 ± 9)</p>	<p>708 ± 152</p>	<p>78.4 ± 3.6</p>	<p>>1000 (21 ± 1)</p>	<p>9-fach</p>
<p>122 TK-P6-067</p>		<p>>1000 (8, n=1)</p>	<p>>1000 (13 ± 8, n=2)</p>	<p>>1000 (32 ± 13, n=2)</p>	<p>>1000 (14 ± 6, n=2)</p>	<p>-</p>
<p>A₃-Liganden</p>						
<p>48 TK-OT-018</p>		<p>>1000 (11 ± 6, n=2)</p>	<p>>1000 (3 ± 8 at 0.1µM, n=4)</p>	<p>>1000 (8 ± 8, n=2)</p>	<p>2.81 ± 0.48</p>	<p>>356-fach</p>

ERGEBNISSE

<p>123 TK-OT-019</p>		<p>>1000 (19 ± 10, n=2)</p>	<p>>1000 (11 ± 7, n=2)</p>	<p>>1000 (21 ± 2 at 0.1 μM, n=2)</p>	<p>2.82 ± 0.33</p>	<p>>356-fach</p>
<p>127 TK-OT-020</p>		<p>>1000 (-6 ± 4, n=3)</p>	<p>>1000 (-3 ± 5, n=2)</p>	<p>>1000 (4 ± 1, n=2)</p>	<p>8.62 ± 0.81</p>	<p>>116-fach</p>
<p>124 TK-OT-021</p>		<p>>1000 (10 ± 10, n=2)</p>	<p>>1000 (13 ± 5, n=2)</p>	<p>>1000 (-2 ± 12, n=2)</p>	<p>3.21 ± 0.71</p>	<p>>311-fach</p>
<p>125 TK-OT-022</p>		<p>>1000 (-6 ± 5, n=2)</p>	<p>>1000 (14 ± 2, n=2)</p>	<p>>1000 (-8 ± 7, n=2)</p>	<p>8.57 ± 1.37</p>	<p>>116-fach</p>

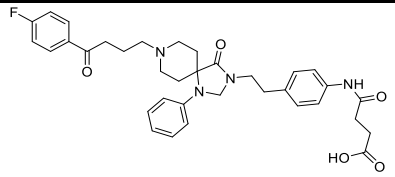
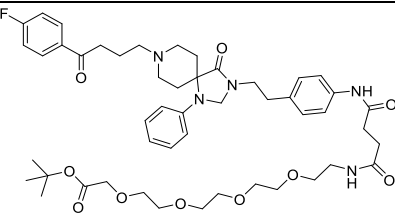
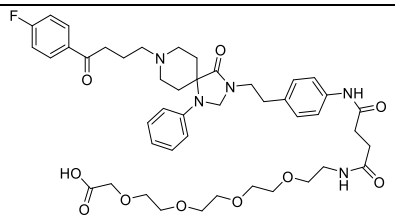
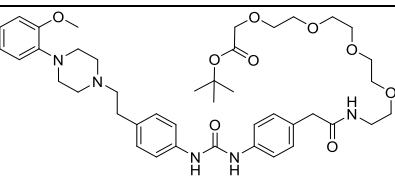
ERGEBNISSE

<p>126 TK-OT-023</p>		<p>>1000 (-3 ± 9, n=2)</p>	<p>>1000 (2 ± 6, n=3)</p>	<p>>1000 (-9 ± 12, n=2)</p>	<p>6.72 ± 2.28</p>	<p>>149-fach</p>
--	---	-----------------------------------	----------------------------------	------------------------------------	---------------------------	----------------------------

i Andreas Brockmann, Sonja Hinz, Christin Vielmuth

ERGEBNISSE

Tabelle 13: Potenzbestimmung der D₂DR-Antagonisten an den Dopaminrezeptoren D₂ und D₃.ⁱ (Die Potenzen wurden in β-Arrestin-Assays an humanen D₂DR und D₃DR bestimmt, die in den CHO-Zellen exprimiert wurden; Die Hemmung der Dopamin-induzierten Aktivierung wurde bestimmt; EC₈₀ D₂DR: 460 nM, D₃DR 20 nM)

VERBINDUNG	D ₂ DR (human rekombinant)	D ₃ DR (human rekombinant)
	IC ₅₀ ± SEM [nM]	IC ₅₀ ± SEM [nM]
55 TK-SP-006 	0.78 ± 0.32	1.04 ± 0.64
128 TK-SP-007 	1.81 ± 0.76	0.60 ± 0.36
129 TK-SP-008 	4.43 ± 2.87	0.98 ± 0.46
130 TK-ST-001 	19.4 ± 6.18	15.2 ± 11

ⁱ Beatriz Büschbell

3.1.14 Auswertung der Testergebnisse

A₁AR

Zunächst wurde die Toponafyllinevorstufe **7** mit dem geschützten PEG-5-Linker verknüpft und das resultierende Amid **105** auf AR-Aktivität getestet. Im Vergleich zur Säure **7** ist die Affinität um den Faktor 2 besser. Allerdings steigt auch die Affinität zum A_{2A}AR um den Faktor 2, wodurch praktisch kein Unterschied in der Selektivität zu vermerken ist. Wird das Addukt **105** zu **107** entschützt, sinkt die Affinität zum A₁AR, was auf ungünstige Wechselwirkungen mit der Carboxygruppe schließen lässt. Gleichzeitig bleibt die Selektivität im gleichen Rahmen wie bei **7** und **105**, da auch geringere Affinitäten zu den anderen Rezeptorsubtypen beobachtet werden. Dies macht die Verbindung attraktiver. Anschließend wurde der PEG-4-Linker an **7** addiert und das Produkt **104** erhalten. Dessen Affinitäten zu den Adenosinrezeptorsubtypen A_{2A}, A_{2B} und A₃ ist vergleichbar mit denen von **105**. Die Affinität von **104** zum A₁AR ist im Vergleich zum PEG-5-Linker-Derivat **105** doppelt so hoch, woraus zu schließen ist, dass ein kürzerer Linker vorteilhafter ist. Die Entschützung des Esters **104** zu **106** zeigt ein ähnliches Ergebnis wie zuvor die Hydrolyse von **105** zu **107**. Wieder zeigt der kürzere Linker eine höhere Affinität (ungefähr Faktor 2), was die Annahme bestätigt, dass kürzere Linker besser geeignet sind. Letztlich wurde an Toponafylline der PEG-4-Linker angeknüpft und so die Verbindung **108** erhalten. Diese ist hochaffin zum A₁AR, aber auch moderat affin zu den anderen drei Subtypen. Die Selektivität ist dennoch sehr gut (76-fach). Nach Spaltung des Esters zu **109** wird eine leicht verminderte Selektivität ($K_i = 9.73$ nM) zum A₁AR festgestellt, welche aber noch akzeptabel ist (53-fach gegen A_{2B}AR). Wie zuvor bei Toponafylline wird eine Affinität zum A_{2B}AR ($K_i = 515$ nM) ermittelt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass kürzere Linker besser toleriert werden als längere. Daher wird mit dem PEG-4-Linker weitergearbeitet. In der Säureform sind die Ligand-(**7**)-Linker-Addukte selektiver, aber nicht affiner, während die Toponafylline-Addukte affiner aber nicht unbedingt selektiver sind.

A_{2A}AR

An das Preladenant-Derivat **2** wurden die Linkerlängen 4, 5, 8, 12, 16 und 20 geknüpft. Generell lässt sich sagen, dass das PEG-4-Linker-Addukt **111** mit einer Affinität von 2 nM und einer 439-fachen Selektivität das Beste der Reihe ist. Die Linkerlängen 5, 8 und 12 sind mit einer Affinität um 8 nM und einer ungefähr 110-fachen Selektivität aber nahezu identisch. Ab einer Länge von 16 PEG-Einheiten wird die Affinität schwächer (30 nM) und ist bei 20 Einheiten am schwächsten (45.5 nM). Daraus lässt sich schließen, dass die Linkerlänge von 4-PEG-Einheiten für den A_{2A}AR am besten ist. Nach der Esterspaltung zeigt sich ein ähnlicher Trend, nämlich dass mit zunehmenden Linkerlängen die Affinität abnimmt. Wie schon beim A₁AR ist die PEG-4-Linkerlänge, mit einer Affinität von 8,84 nM und einer 113-fachen Selektivität am besten. Daneben wird erneut deutlich, dass eine Säurefunktion im Molekül zur Reduktion der

Affinität führt. Bei keinem der A_{2A} AR-Antagonisten sind signifikante Affinitäten zu anderen Subtypen ermittelt worden.

A_{2B} AR

Für den A_{2B} AR zeigt sich das folgende, ungünstige Bild. Das Linkeraddukt **121** ist unselektiv und wird deshalb in weiteren Experimenten nicht mehr berücksichtigt. Das Addukt **122** weist am A_{2B} AR keine signifikante Affinität auf und wird deshalb verworfen.

A_3 AR

Für den A_3 AR wurde **48** mit den Linkern PEG-4, -8, -12 und -16 gekuppelt. Die Addukte **123** und **124**, mit den Linkerlängen 4 und 8, weisen nahezu gleiche Affinitäten (2,82 nM und 3,21 nM) sowie Selektivitäten (356-fach und 311-fach) auf. Gleiches gilt für die Addukte mit den Linkerlängen 12 und 16. Bei beiden liegt die Affinität zum A_3 AR bei ungefähr 8 nM. Grundsätzlich lässt sich sagen, dass beim A_3 AR kürzere Linkerlängen bevorzugt werden. Somit wurde nur das PEG-4-Addukt **123** zur Säure **127** umgewandelt. Die Affinität der Säure **127** zum A_3 AR sinkt leicht (2,82 nM auf 8,62 nM), welches den zuvor ermittelten Trend bestätigt.

D_2/D_3 DR

Auch die DR-Antagonisten **55** und **64** wurden mit dem PEG-4-Linker gekuppelt. Das Linkeraddukt **128** zeigte keine Veränderung in der Potenz im Vergleich zum Antagonisten **55**. Auch die Spaltung des Esters zu **129** ergab keine signifikante Änderung. Die Verbindung **130** war deutlich schwächer wirksam und wird nicht weiter berücksichtigt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass für die Rezeptoren A_1 , A_{2A} und A_3 selektive Antagonist-Linker-Addukte gefunden wurden, die für die nächsten Reaktionsschritte geeignet sind. Dabei ist festzuhalten, dass PEG-4-Linker-Ligand-Addukte die höchsten Affinitäten und Selektivitäten aufweisen und daher mit diesen weitergearbeitet wird.

3.1.15 Sonden für den *Proof of Concept*

Für den *Proof of Concept* wurde 2',3'-geschütztes Adenosin an den Linker gekuppelt, um die Sonde bestmöglich nachzuahmen. Die Ketalschutzgruppe ist dabei von großer Bedeutung, andernfalls würde Adenosin eventuell an die Adenosinrezeptoren binden. Im Gegensatz dazu ist das Oligonukleotid, welches für die späteren Festphasenreaktionen verwendet wird, an der 5'-Position mit einer *n*-Hexylgruppe funktionalisiert (Abbildung 51). Diese Modifikation kann zunächst nicht getestet werden, sollte auf die späteren Bindungseigenschaften aber auch keinen Einfluss haben, da sie weit außerhalb des Rezeptors liegt. Die Versuche sollen einen Einblick in die Bindungseigenschaften geben und Aufschluss über mögliche Affinitätsverluste liefern.

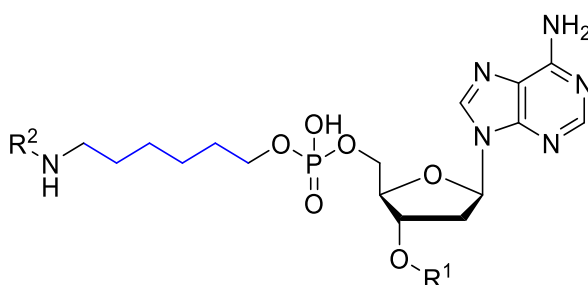
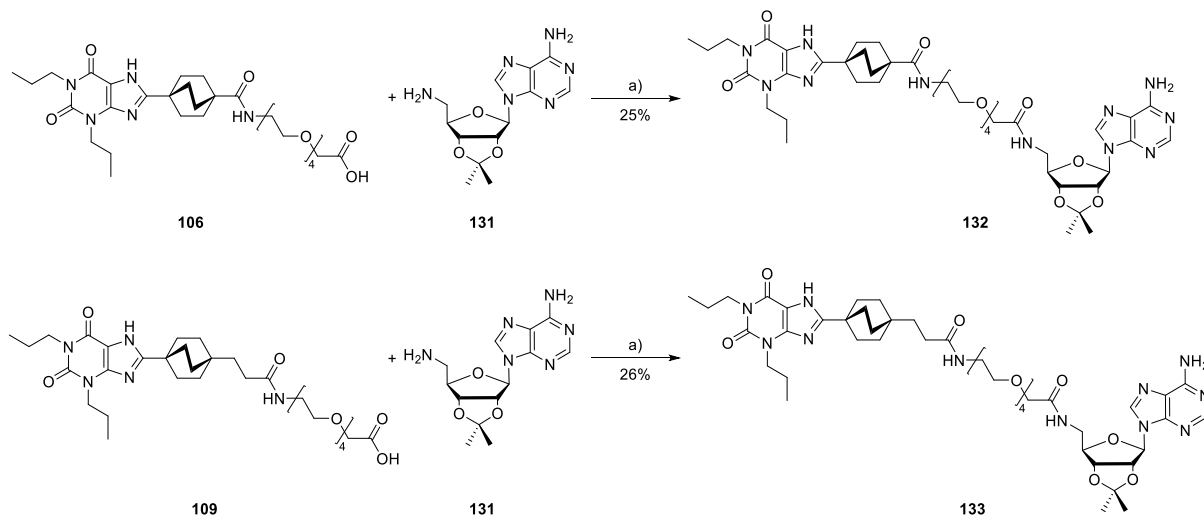


Abbildung 51: Der Hexyllinker (blau) zwischen dem Ligand-Linker Addukt (R^2) und dem Oligonukleotid (R^1) als zusätzlicher Abstandshalter.

3.1.15.1 Die A_1AR -Antagonist-PEG-4-Nukleosid-Sonde



Schema 31: Synthese zu den Zielstrukturen **132** und **133** für den *Proof of Concept*. Reaktionsbedingungen: a) HATU, DIPEA, CH_2Cl_2 , RT, 24 h.

Die Ausbeuten der Kupplungsreaktion mit dem 5'-aminomodifizierten Adenosin sind moderat. Dies liegt vor allem an der auftretenden Nebenreaktion, bei der die Säure des Antagonist-Linker-Addukts mit dem an 6-Position des Adenosin positionierten Amins reagiert. Dabei werden die in Abbildung 52 dargestellten Produkte erhalten.

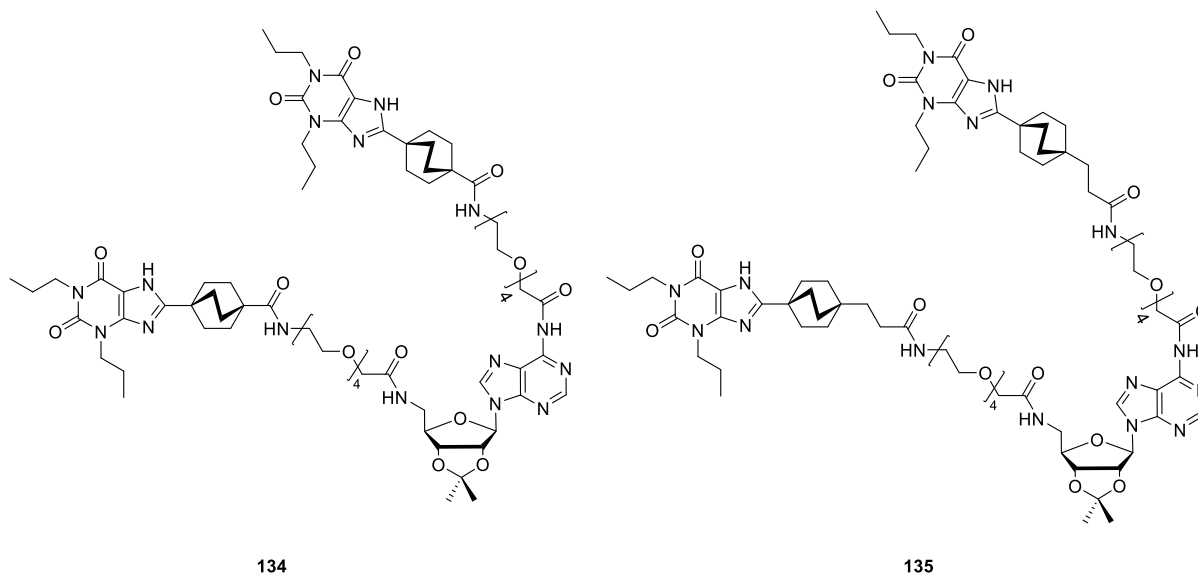
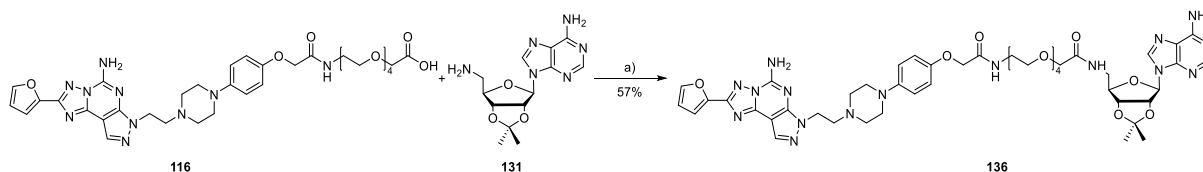


Abbildung 52: Nebenprodukte **134** und **135** der Kupplungsreaktionen aus Schema 31.

Für die geplanten Reaktionen an der Festphase stellen die Nebenprodukte kein Problem dar, da sämtliche Nukleotide aufgrund der Schutzgruppen unreaktiv sind.

3.1.15.2 Die A_{2A}AR-Antagonist-PEG-4-Nukleosid-Sonde

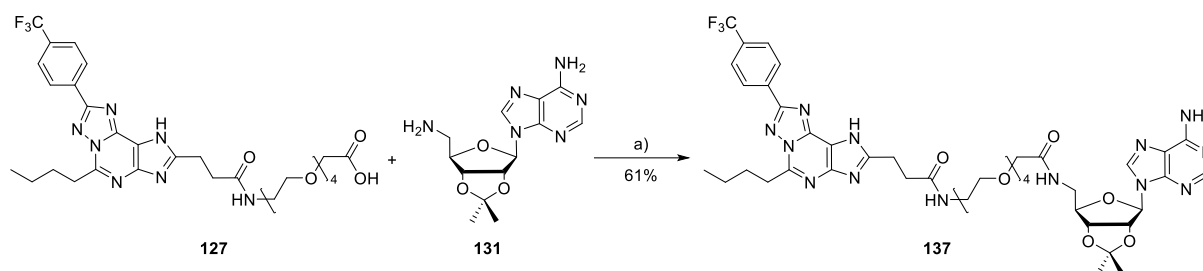


Schema 32: Synthese von **136**, die für den *Proof of Concept* benötigt wird. Reaktionsbedingungen: a) HATU, DIPEA, CH₂Cl₂, RT, 24 h.

Die Ausbeute der Kupplungsreaktion mit dem geschützten Adenosin ist im Vergleich zu den A₁AR-Addukten hoch (57 % vs. 25-26 %), da keine Bildung des Dimers nachgewiesen werden konnte. Inwieweit das Dimer trotzdem als Nebenprodukt anfällt kann somit nicht abgeschätzt werden.

3.1.15.3 Die A₃AR-Antagonist-PEG-4-Nukleosid-Sonde

Die Kupplungsreaktion zum Addukt **137** läuft mit akzeptabler Ausbeute.



Schema 33: Synthese zu der Verbindung **137**, die für den *Proof of Concept* benötigt wird. Reaktionsbedingungen: a) HATU, DIPEA, CH₂Cl₂, RT, 24 h.

Auch diese Kupplungsreaktion verläuft mit den Standardkupplungsreagenzien mit akzeptabler Ausbeute und bedarf keiner Optimierung. Bei dieser Reaktion wird ebenfalls die Bildung eines Nebenproduktes beobachtet (Abbildung 53).

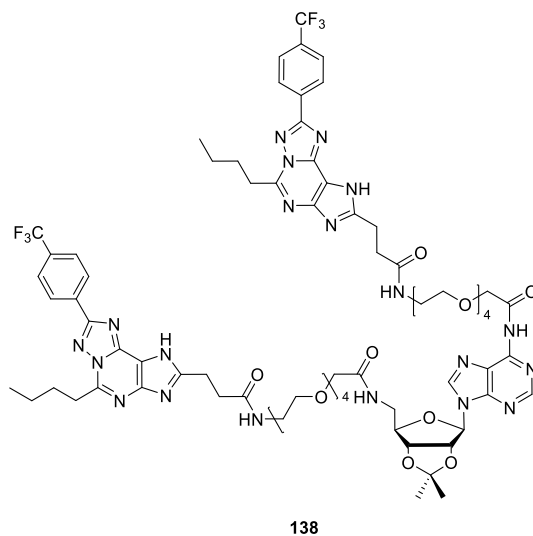
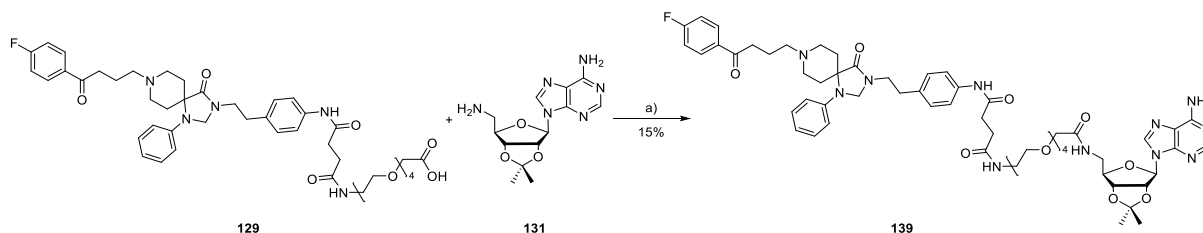


Abbildung 53: Nebenprodukt **138** der Kupplungsreaktion aus Schema 33.

3.1.15.4 Die D₂DR-Antagonist-PEG-4-Nukleosid-Sonde



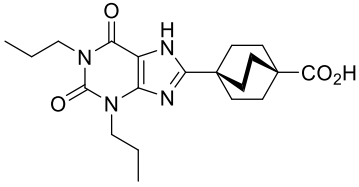
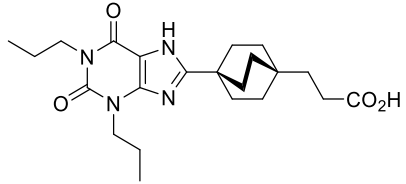
Schema 34: Synthese zu **139**, die für den *Proof of Concept* benötigt wird. Reaktionsbedingungen: a) HATU, DIPEA, CH₂Cl₂, RT, 24 h.

Die Kupplung von **129** mit dem geschützten Adenosin **131** verlief akzeptabel, allerdings wurde während der Reinigung mittels HPLC eine große Fraktion an Nebenprodukten erhalten, die nicht weiter gereinigt werden konnte. Dies ist der Grund für die schlechte Ausbeute dieser Kupplungsreaktion (15%). Bei der Reaktion wird jedoch nicht die Bildung des dimeren Nebenproduktes beobachtet.

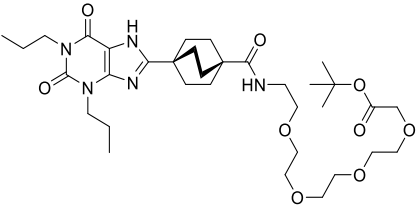
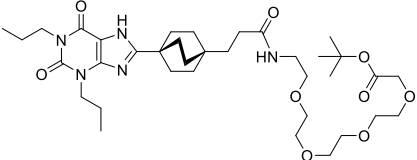
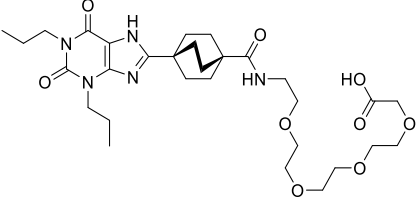
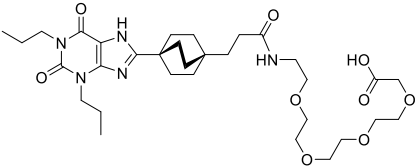
ERGEBNISSE

3.1.16 Ergebnisse der Testung

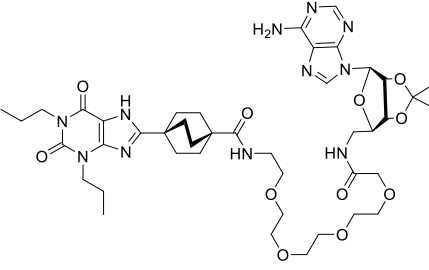
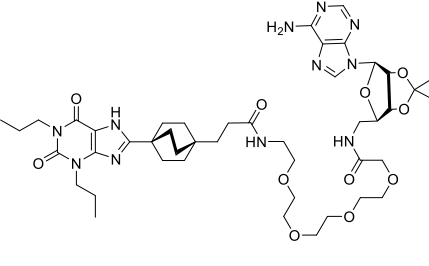
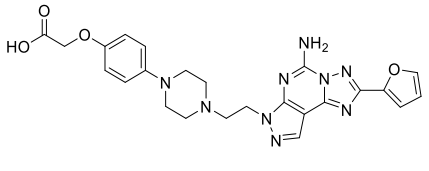
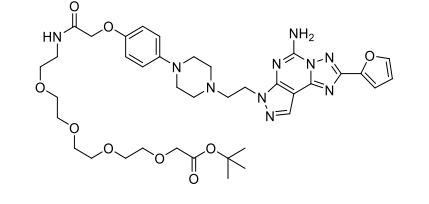
Tabelle 14: K_i -Werte und % Inhibition der Testsubstanzen an den human A_{1-} , A_{2A-} , A_{2B-} und A_{3AR} .¹ (n = 3 sofern nicht anders vermerkt)

VERBINDUNG		A₁AR (human rekombinant) [³H]CCPA	A_{2A}AR (human rekombinant) [³H]MSX-2	A_{2B}AR (human rekombinant) [³H]PSB-1901	A₃AR (human rekombinant) [³H]PSB-11	SELEKTIVITÄT
		K_i ± SEM [nM] (oder % Inhibition ± SEM bei 1 µM)	K_i ± SEM [nM] (oder % Inhibition ± SEM bei 1 µM)	K_i ± SEM [nM] (oder % Inhibition ± SEM bei 1 µM)	K_i ± SEM [nM] (oder % Inhibition ± SEM bei 1 µM)	
A₁-Liganden						
7 TK-TO-006		28.0 ± 7.1	664 ± 114	>1000 (45 ± 5)	>1000 (10 ± 7)	23-fach
1 TK-TO-011		4.07 ± 0.90	661 ± 188	289 ± 94	>1000 (13 ± 7)	71-fach

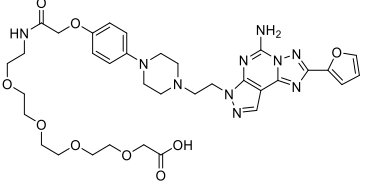
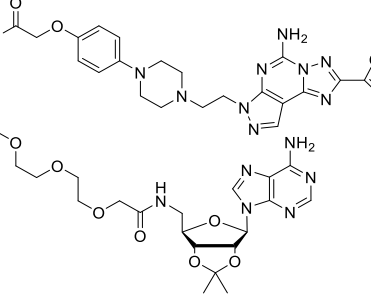
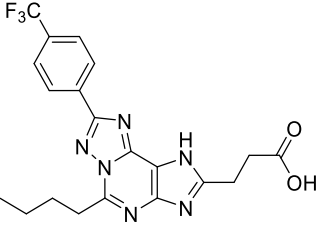
ERGEBNISSE

<p>104 TK-TO-014</p>		<p>7.44 ± 0.64</p>	<p>345 ± 69 (n=4)</p>	<p>172 ± 18</p>	<p>>1000 (47 ± 5, n=4)</p>	<p>23-fach</p>
<p>108 TK-TO-015</p>		<p>2.12 ± 0.82 (n=4)</p>	<p>169 ± 55 (n=4)</p>	<p>161 ± 52</p>	<p>231 ± 34</p>	<p>76-fach</p>
<p>106 TK-TO-016</p>		<p>23.6 ± 2.3</p>	<p>>1000 (33 ± 2, n=2)</p>	<p>>1000 (31 ± 6, n=2)</p>	<p>>1000 (-4 ± 3, n=2)</p>	<p>>41-fach</p>
<p>109 TK-TO-017</p>		<p>9.73 ± 0.20</p>	<p>>1000 (35 ± 4, n=2)</p>	<p>515 ± 54</p>	<p>>1000 (6 ± 6, n=2)</p>	<p>53-fach</p>

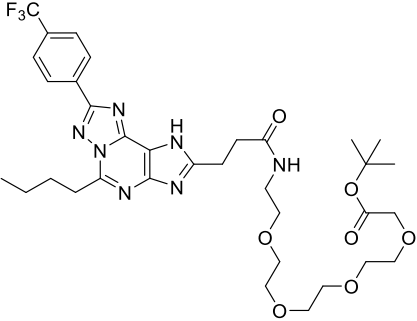
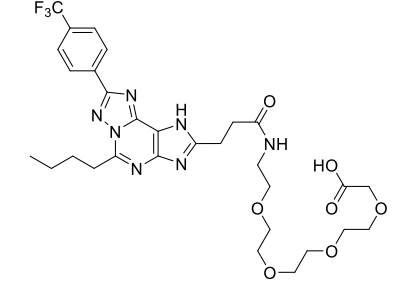
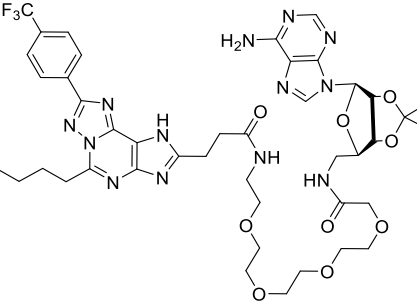
ERGEBNISSE

<p>132 TK-TO-020</p>		<p>21.6 ± 5.5</p>	<p>>1000 (34 ± 8, n=2)</p>	<p>>1000 (36 ± 1, n=2)</p>	<p>>1000 (30 ± 13, n=4)</p>	<p>>46-fach</p>
<p>133 TK-TO-021</p>		<p>5.56 ± 1.11</p>	<p>641 ± 155</p>	<p>260 ± 67</p>	<p>510 ± 174 (n=2)</p>	<p>47-fach</p>
<p>A_{2A}-Liganden</p>						
<p>2 TK-PT-011</p>		<p>>1000 (18 ± 4)</p>	<p>200 ± 16</p>	<p>>1000 (2 ± 11)</p>	<p>>1000 (12 ± 10)</p>	<p>>5-fach</p>
<p>110 TK-PT-013</p>		<p>>1000 (38 ± 9, n=2)</p>	<p>2.28 ± 0.41</p>	<p>>1000 (9 ± 1, n=2)</p>	<p>>1000 (34 ± 4, n=2)</p>	<p>>439-fach</p>

ERGEBNISSE

<p>116 TK-PT-014</p>		<p>>1000 (6 ± 5, n=2)</p>	<p>8.84 ± 0.64</p>	<p>>1000 (17 ± 9, n=2)</p>	<p>>1000 (13 ± 1, n=2)</p>	<p>>113-fach</p>
<p>136 TK-PT-027</p>		<p>>1000 (22 ± 13, n=3)</p>	<p>7.21 ± 1.72</p>	<p>>1000 (10 ± 5, n=2)</p>	<p>>1000 (13 ± 9, n=2)</p>	<p>>139-fach</p>
<p>A₃-Liganden</p>						
<p>48 TK-OT-018</p>		<p>>1000 (11 ± 6, n=2)</p>	<p>>1000 (3 ± 8 at 0.1 μM, n=4)</p>	<p>>1000 (8 ± 8, n=2)</p>	<p>2.81 ± 0.48</p>	<p>>356-fach</p>

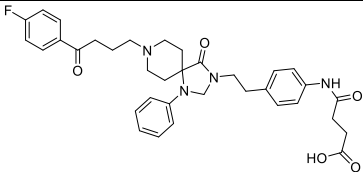
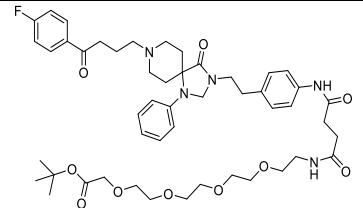
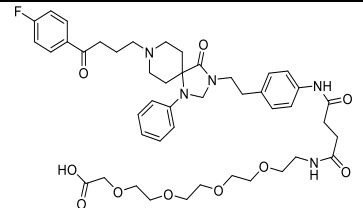
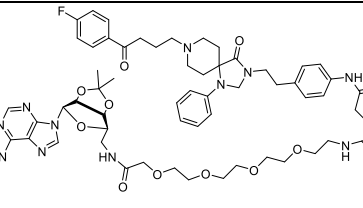
ERGEBNISSE

<p>123 TK-OT-019</p>		<p>>1000 (19 ± 10, n=2)</p>	<p>>1000 (11 ± 7, n=2)</p>	<p>>1000 (21 ± 2 at 0.1 μM, n=2)</p>	<p>2.82 ± 0.33</p>	<p>>356-fach</p>
<p>127 TK-OT-020</p>		<p>>1000 (-6 ± 4, n=3)</p>	<p>>1000 (-3 ± 5, n=2)</p>	<p>>1000 (4 ± 1, n=2)</p>	<p>8.62 ± 0.81</p>	<p>>116-fach</p>
<p>137 TK-OT-025</p>		<p>>1000 (1 ± 2, n=2)</p>	<p>>1000 (-14 ± 9, n=2)</p>	<p>>1000 (-10 ± 15, n=2)</p>	<p>15.3 ± 5.8</p>	<p>>65-fach</p>

i Andreas Brockmann, Sonja Hinz, Christin Vielmuth

ERGEBNISSE

Tabelle 15: Potenzbestimmung der D₂DR-Antagonisten an den Dopaminrezeptoren D₂ und D₃.ⁱ (Die Potenzen wurden in β -Arrestin-Assays an humanen D₂DR und D₃DR bestimmt, die in den CHO-Zellen exprimiert wurden; Die Hemmung der Dopamin-induzierten Aktivierung wurde bestimmt; EC₈₀ D₂DR: 460 nM, D₃DR 20 nM)

VERBINDUNG	D ₂ DR (human rekombinant)	D ₃ DR (human rekombinant)
	IC ₅₀ ± SEM [nM]	IC ₅₀ ± SEM [nM]
55 TK-SP-006 	0.78 ± 0.32	1.04 ± 0.64
128 TK-SP-007 	1.81 ± 0.76	0.60 ± 0.36
129 TK-SP-008 	4.43 ± 2.87	0.98 ± 0.46
139 TK-SP-010 	1.27 ± 0.30	3.91 ± 3.21

ⁱ Beatriz Büschbell

3.1.17 Auswertung der Testergebnisse

Für den ersten *Proof of Concept* wurden die Liganden-Linker-Addukte mit dem 2',3'-geschützten Adenosin verknüpft.

A₁AR

Für den A₁AR wurden die beiden Ligand-Linker-Addukte **106** und **109** mit dem geschützten Adenosin verbunden. Während **132** eine Affinität von 21,6 nM aufweist, ist die von **133** um den Faktor 4 besser (5.56 nM). Dies spiegelt die Ergebnisse aus den zuvor erhalten Testungen ohne angeknüpftes Nukleosid wider. Wird allein die Selektivität betrachtet, ist diese bei beiden Verbindungen gleich, woraus abzuleiten ist, dass **133** auch an die anderen Subtypen bindet und somit nicht optimal ist. Insbesondere zum A_{2B}AR weist die Verbindung eine relativ hohe Affinität von 260 nM auf. Dieser Trend zeigte sich bereits bei **109**. Für eine gute Sonde ist hohe Selektivität wichtig. Folglich wurde beschlossen den Liganden **7** für die späteren PLA-Sonden zu verwenden.

A_{2A}AR

Für den A_{2A}AR wurde **116** mit dem geschützten Adenosin gekuppelt. Das Ergebnis ist äußerst vielversprechend. So weist **136** eine Affinität von 7.21 nM bei einer Selektivität von Faktor 139 auf. Diese Ergebnisse machen das Preladenant-Derivat **2** zum optimalen Liganden für die späteren Sonden.

A₃AR

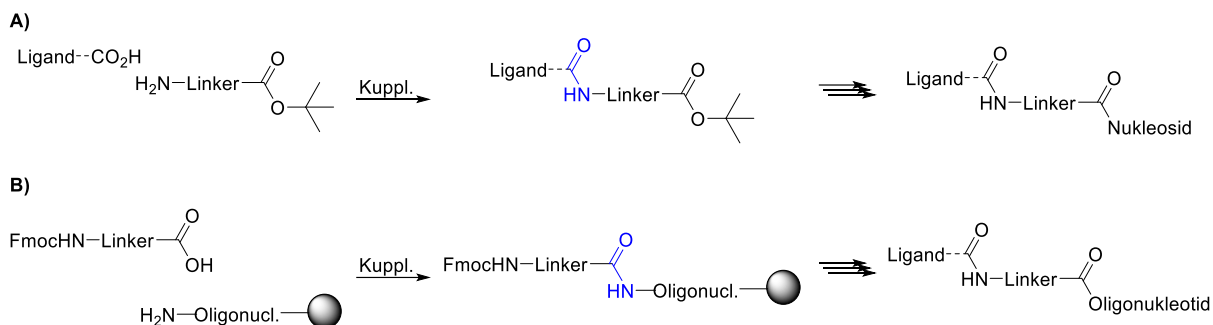
Für den A₃AR wurde, wie zuvor erwähnt, verfahren. Die Affinität von **137** zum A₃AR liegt bei 15.3 nM, zu den anderen Rezeptorsubtypen wird keine Affinität gemessen. Somit ist **48** für die nachfolgende Kupplung mit Nukleotiden geeignet.

D₂/D₃DR

Für das D₂DR-Antagonist-Linker-Nukleosid-Addukt **139** bleibt die Wirksamkeit im selben Rahmen wie für die Addukte **129**, **128** und **55**. Somit wird Spiperon für die nachfolgende Derivatisierung verwendet. Die Sonde kann für den *Proof of Concept* dienen, auch wenn keine D₂/D₃-Selektivität besteht, wobei in einem Testsystem D₂DR und A_{2A}AR exprimiert und lokalisiert werden.

3.1.18 Festphasensynthese der PLA-Sonden

Bereits zuvor wurden die Synthesen der Sonden ausgehend vom Liganden, über das Ligand-Linker-Addukt, hin zum Liganden-Linker-Nukleosid-Addukt beschrieben (Schema 35, A). An der Festphase soll die Synthese in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt werden. Das Oligonukleotid wird zunächst festphasengebunden mit dem Linker gekuppelt, anschließend wird der Linker entschützt und im letzten Schritt der jeweilige Ligand angeknüpft (Schema 35, B).



Schema 35: Vergleich des Aufbaus der Sonden, entweder A) Synthese ausgehend vom Liganden oder B) festphasengebundene Synthese.

Nach Erhalt der biologischen Testergebnissen (Tabelle 14, Tabelle 15) wurden die vielversprechendsten Liganden ausgewählt (Abbildung 54).

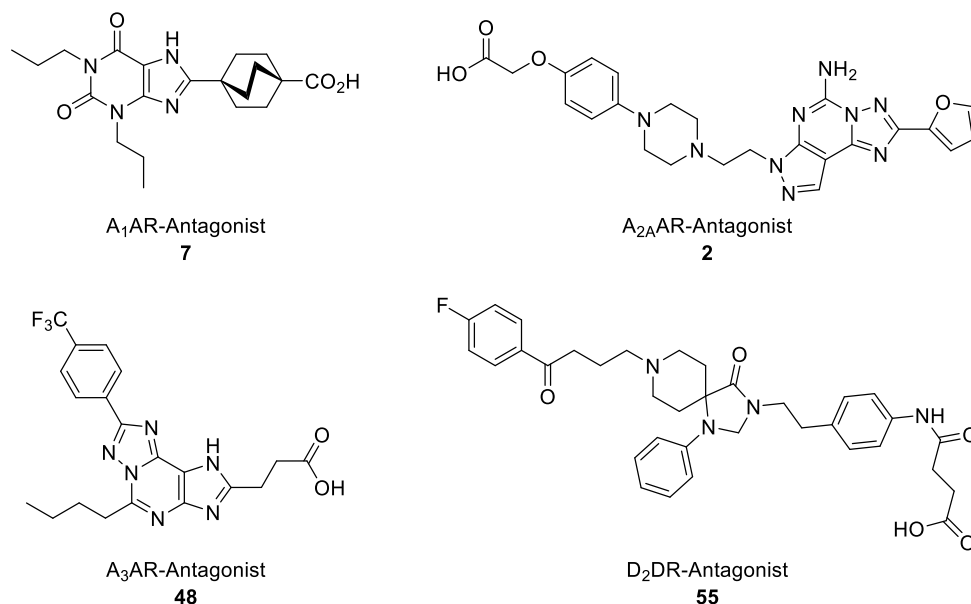


Abbildung 54: Ausgewählte Liganden für die Festphasensynthese an der TU Dortmund.

Als Linker sollte der selbstsynthetisierte PEG-4-Linker genutzt werden (Abbildung 55, **99**). Allerdings wurde nach dem Transport die Zersetzung des Linkers festgestellt und daher auf eine leicht modifizierte Variante zurückgegriffen (Abbildung 55, **140**).

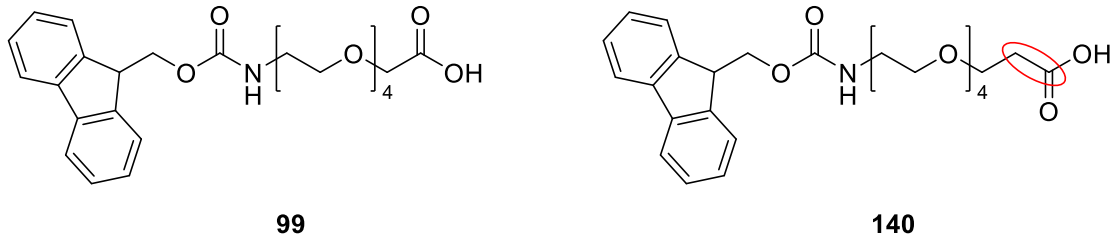


Abbildung 55: Vergleich des selbstsynthetisierten Linkers **99** und des kommerziell erworbenen Linkers **140**.

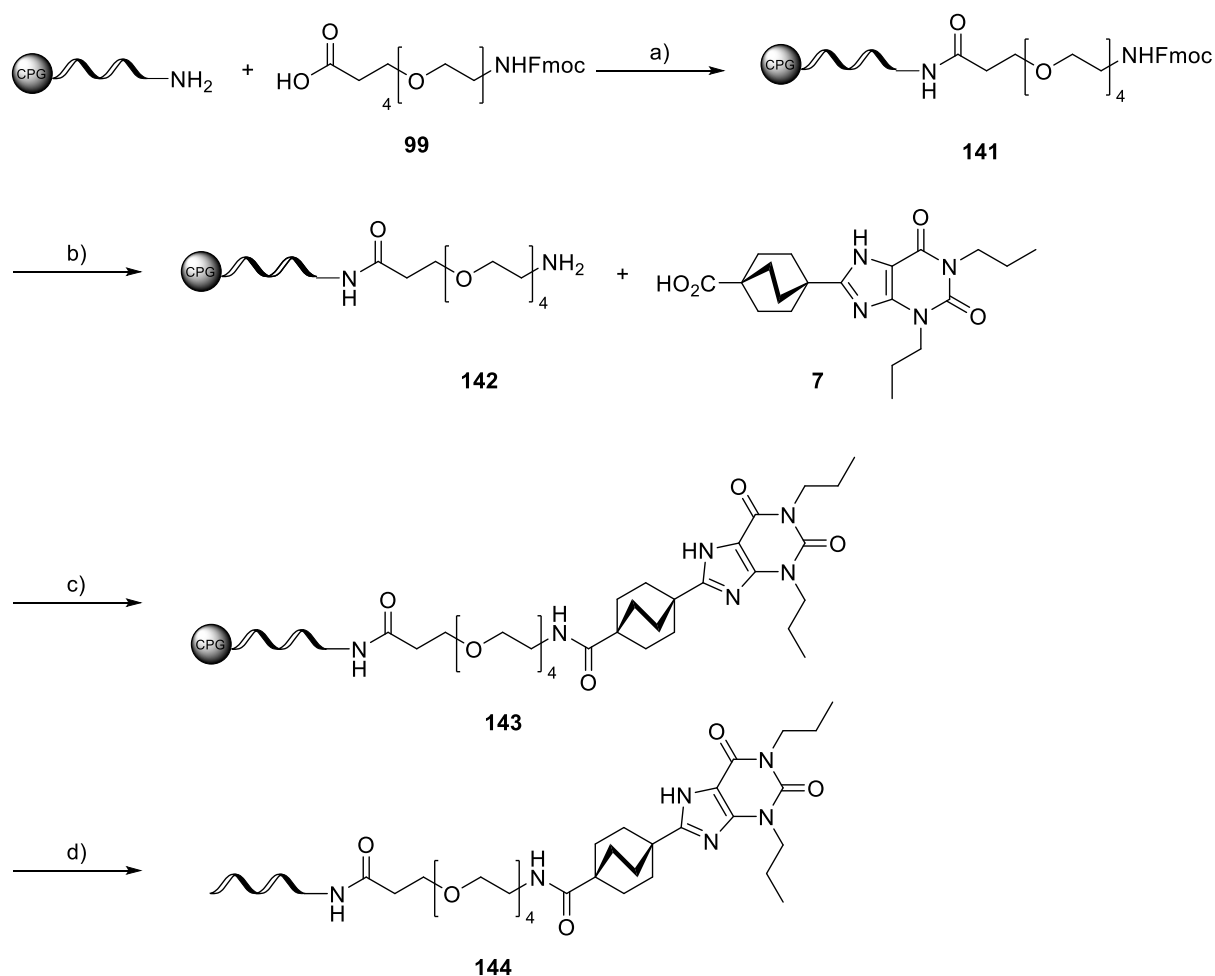
Die Modifikation des Linkers um eine Methyleneinheit sollte keinen Einfluss auf die zuvor erhaltenen Testergebnisse haben, da die Modifikation nicht direkt im Rezeptor, sondern außerhalb, am Oligonukleotid lokalisiert ist.

Die festphasengebundenen Oligonukleotide waren kommerziell erhältlich (Tabelle 16).

Tabelle 16: Benötigte Sequenzen für die Herstellung der PLA-Sonden sowie die Konnektoren und der Oligonukleotid-gebundene Fluorophor zur Detektion.

Name	Sequenz	Länge
<i>P-PLA</i>	5'-Amino-AAAAAAAAAATATGACAGAACTAGACACTCTT-CPG-gebunden	38
<i>NP-PLA</i>	5'-Amino-AAAAAAAAAAGACGCTAATAGTTAAGACGCTToUoUoU-CPG-gebunden	32
<i>Con1</i>	5'-P-CTATTAGCGTCCAGTGAATGCGAGTCCGTCTAAGAGAGTAGTACAGCAGCCGTCAAGAGTGTCTA	65
<i>Con2r</i>	5'-P-GTTCTGTCATA TTTAAGCGTCTTAA	25
<i>Fluoro</i>	5'-ATTO550-CAGTGAATGCGAGTCCGTCT	20

Beide Sonden sind für folgende Kupplungsreaktionen am 5'-Ende aminomodifiziert. Außerdem sind die Oligonukleotide auf CPG = *Controlled Porous Glass* immobilisiert. Die Oligonukleotide *Con1*, *Con2* und *Fluoro* werden für den biologischen Teil des PLA-Assays benötigt.



Schema 36: Vereinfachtes Schema der Sondensynthese an der Festphase. Reaktionsbedingungen: a) 1) HATU, DIPEA, DMF, RT, 2 h, 2) HATU, DIPEA, DMF, RT, 2 h. b) 20 % Piperidin, DMF, RT, 5 min. c) HATU, DIPEA, DMF, RT, 2 h. d) 30 % aq. NH_4 / 40 % CH_3NH_2 (1/1), 37 °C, 4 h.

In Schema 36 ist die Festphasensynthese vereinfacht dargestellt. Im ersten Schritt wird das CPG-gebundene Oligonukleotid mit dem Linker **99** gekuppelt. Um das Kupplungsprodukt **141** in möglichst großer Ausbeute zu erhalten, wird die Reaktion zweimal für zwei Stunden durchgeführt. Im nächsten Schritt werden nicht gekuppelte Amine mittels Essigsäureanhydrid, Methylimidazol und Pyridin gecapped und sind somit unreaktiv für nachfolgende Reaktionen. Die entstehenden Methanamide sind im Schema nicht dargestellt. Die Fmoc-Schutzgruppe wird basisch abgespalten und das entstehende Amid **142** ist bereit für die Reaktion mit den Liganden. Beispielhaft wurde hier Verbindung **7** gewählt. Da die Liganden nicht in sehr großer Menge synthetisiert wurden (ca. 50 – 100 mg), konnte der Kupplungsschritt nur einmal durchgeführt werden. Letztlich wird das Oligonukleotid basisch, mit Ammoniak und Methylamin, von der Festphase abgespalten und gleichzeitig werden die Schutzgruppen entfernt. Das erhaltene Produkt **144** wird mittels HPLC aufgereinigt und lyophilisiert.

Der Vorteil der Festphase ist die Möglichkeit des einfachen Waschens der Produkte nach jedem Reaktionsschritt. Problematisch ist die Kontrolle des Umsatzes bei jeder Reaktion. So

ERGEBNISSE

muss nach jedem Schritt eine Testabspaltung erfolgen, um abschätzen zu können, ob die Reaktion wiederholt werden muss.

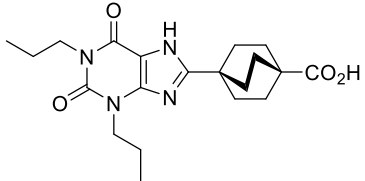
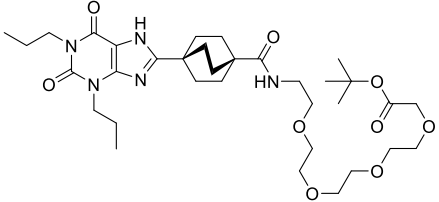
Für die Synthese der Sonden wurden zunächst die ersten beiden Reaktionen aus Schema 36 mit beiden Oligonukleotiden *P-PLA* und *NP-PLA* aus Tabelle 16 durchgeführt. Ausgehend davon wurden die Liganden aus Abbildung 54 mit beiden Oligonukleotid-Linker-Addukten gekuppelt. Somit wurden 8 Sonden erhalten (Tabelle 17).

Tabelle 17: Übersicht über die erhaltenen Sonden für den PLA. (Die theoretische und gefundene mittlere Masse $[M+H]^+$ wurden mittels Bruker Compass DataAnalysis 4.4 und MALDI bestimmt; Die Ausbeute bezieht sich auf die Gesamtausbeute aller Schritte, wie dargestellt in Schema 36. Zur Bestimmung der Ausbeute wurde die molare Masse der Sonden + die molare Masse der Gegenionen (NEt_3) verwendet.

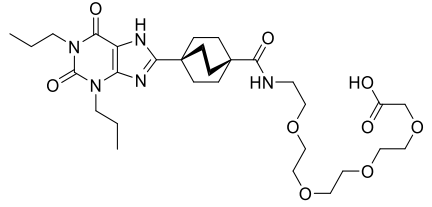
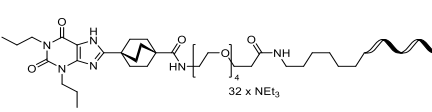
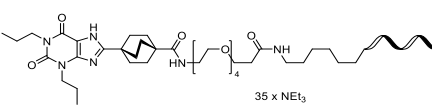
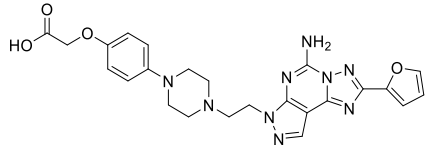
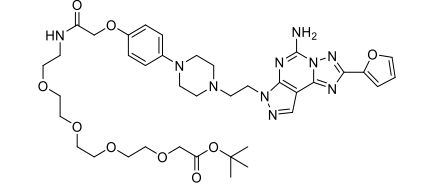
Name	Oligo.	Linker	Ligand	M (theor.) [g/mol]	M (gefun.) [g/mol]	Masse [mg]	Ausbeute [%]
144 <i>PL4TO</i>	P-PLA	99 L4	7	10631.8	10632.3	1.87	13
145 <i>PL4PT</i>			2	10746.8	10746.5	1.77	13
146 <i>PL4OT</i>			48	10675.7	10675.4	1.06	8
147 <i>PL4SP</i>			55	10858.1	10857.3	1.05	7
148 <i>NPL4TO</i>	NP-PLA		7	11648.3	11648.2	2.01	13
149 <i>NPL4PT</i>			2	11763.5	11762.9	2.25	15
150 <i>NPL4OT</i>			48	11692.3	11692.6	1.50	10
151 <i>NPL4SP</i>			55	11874.6	11874.2	1.33	9

3.1.19 Ergebnisse der Testung

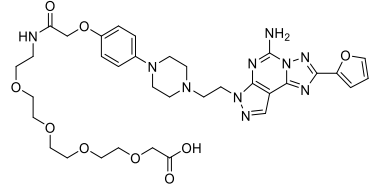
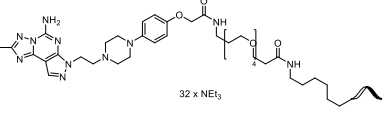
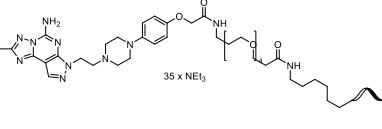
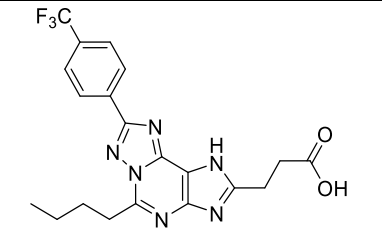
Tabelle 18: K_i -Werte und % Inhibition der Testsubstanzen an den human A_{1-} , A_{2A-} , A_{2B-} und A_{3AR} .¹ (n = 3 sofern nicht anders vermerkt)

VERBINDUNG	A₁AR (human rekombinant) [³H]CCPA	A_{2A}AR (human rekombinant) [³H]MSX-2	A_{2B}AR (human rekombinant) [³H]PSB-1901	A₃AR (human rekombinant) [³H]PSB-11	SELEKTIVITÄT	
	K_i ± SEM [nM] (oder % Inhibition ± SEM bei 1 µM)	K_i ± SEM [nM] (oder % Inhibition ± SEM bei 1 µM)	K_i ± SEM [nM] (oder % Inhibition ± SEM bei 1 µM)	K_i ± SEM [nM] (oder % Inhibition ± SEM bei 1 µM)		
A₁-Liganden						
7 TK-TO-006		28.0 ± 7.1	664 ± 114	>1000 (45 ± 5)	>1000 (10 ± 7)	23-fach
104 TK-TO-014		7.44 ± 0.64	345 ± 69 (n=4)	172 ± 18	>1000 (47 ± 5, n=4)	23-fach

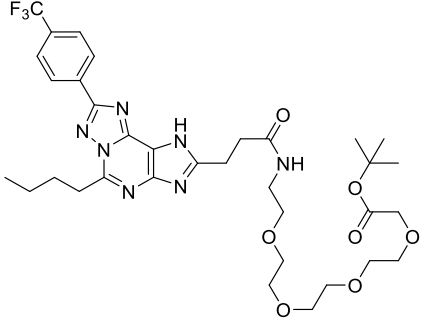
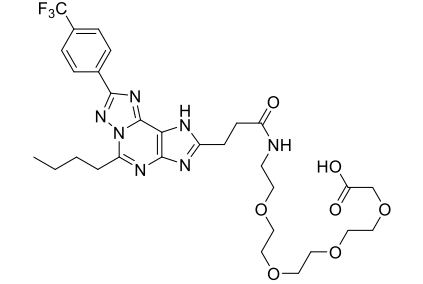
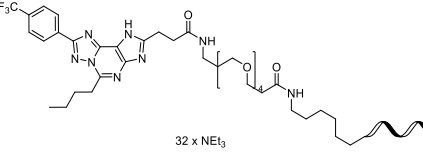
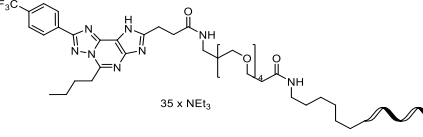
ERGEBNISSE

<p>106 TK-TO-016</p>		<p>23.6 ± 2.3</p>	<p>>1000 (33 ± 2, n=2)</p>	<p>>1000 (31 ± 6, n=2)</p>	<p>>1000 (-4 ± 3, n=2)</p>	<p>>41-fach</p>
<p>144 TK-P+L4+TO</p>						
<p>148 TK-NP+L4+TO</p>						
<p>A_{2A}-Liganden</p>						
<p>2 TK-PT-011</p>		<p>>1000 (18 ± 4)</p>	<p>200 ± 16</p>	<p>>1000 (2 ± 11)</p>	<p>>1000 (12 ± 10)</p>	<p>>5-fach</p>
<p>110 TK-PT-013</p>		<p>>1000 (38 ± 9, n=2)</p>	<p>2.28 ± 0.41</p>	<p>>1000 (9 ± 1, n=2)</p>	<p>>1000 (34 ± 4, n=2)</p>	<p>>439-fach</p>

ERGEBNISSE

<p>116 TK-PT-014</p>		<p>>1000 (6 ± 5, n=2)</p>	<p>8.84 ± 0.64</p>	<p>>1000 (17 ± 9, n=2)</p>	<p>>1000 (13 ± 1, n=2)</p>	<p>>113-fach</p>
<p>145 TK- P+L4+PT</p>	 <p>32 x NEt₃</p>					
<p>149 TK- NP+L4+PT</p>	 <p>35 x NEt₃</p>					
<p>A₃-Liganden</p>						
<p>48 TK-OT-018</p>		<p>>1000 (11 ± 6, n=2)</p>	<p>>1000 (3 ± 8 at 0.1 μM, n=4)</p>	<p>>1000 (8 ± 8, n=2)</p>	<p>2.81 ± 0.48</p>	<p>>356-fach</p>

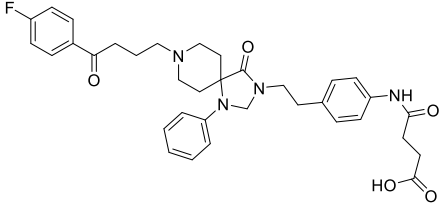
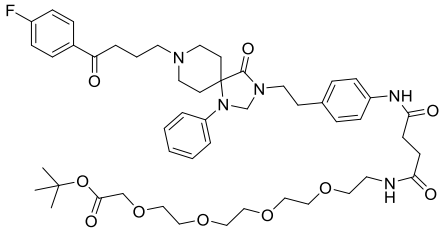
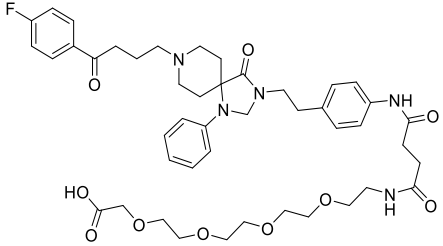
ERGEBNISSE

<p>123 TK-OT-019</p>		<p>>1000 (19 ± 10, n=2)</p>	<p>>1000 (11 ± 7, n=2)</p>	<p>>1000 (21 ± 2 at 0.1 μM, n=2)</p>	<p>2.82 ± 0.33</p>	<p>>356-fach</p>
<p>127 TK-OT-020</p>		<p>>1000 (-6 ± 4, n=3)</p>	<p>>1000 (-3 ± 5, n=2)</p>	<p>>1000 (4 ± 1, n=2)</p>	<p>8.62 ± 0.81</p>	<p>>116-fach</p>
<p>146 TK- P+L4+OT</p>	 <p>32 x NEt₃</p>					
<p>150 TK- NP+L4+OT</p>	 <p>35 x NEt₃</p>					

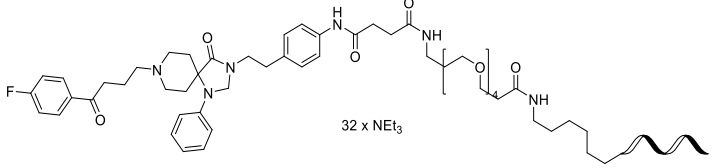
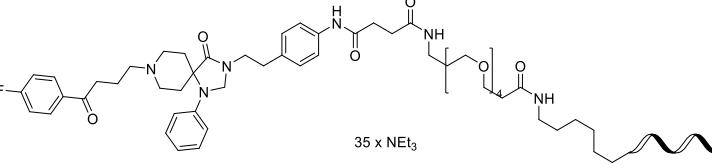
i Andreas Brockmann, Sonja Hinz, Christin Vielmuth

ERGEBNISSE

Tabelle 19: Potenzbestimmung der D₂DR-Antagonisten an den Dopaminrezeptoren D₂ und D₃.ⁱ (Die Potenzen wurden in β-Arrestin-Assays an humanen D₂DR und D₃DR bestimmt, die in den CHO-Zellen exprimiert wurden; Die Hemmung der Dopamin-induzierten Aktivierung wurde bestimmt; D₂DR: 460 nM, D₃DR 20 nM)

VERBINDUNG		D ₂ DR (human rekombinant)	D ₃ DR (human rekombinant)
		IC ₅₀ ± SEM [nM]	IC ₅₀ ± SEM [nM]
55 TK-SP-006		0.78 ± 0.32	1.04 ± 0.64
128 TK-SP-007		1.81 ± 0.76	0.60 ± 0.36
129 TK-SP-008		4.43 ± 2.87	0.98 ± 0.46

ERGEBNISSE

<p>147 TK- P+L4+SP</p>	 <p>32 x NEt₃</p>		
<p>151 TK- NP+L4+SP</p>	 <p>35 x NEt₃</p>		

i Beatriz Büschbell

3.1.20 Auswertung der Testergebnisse

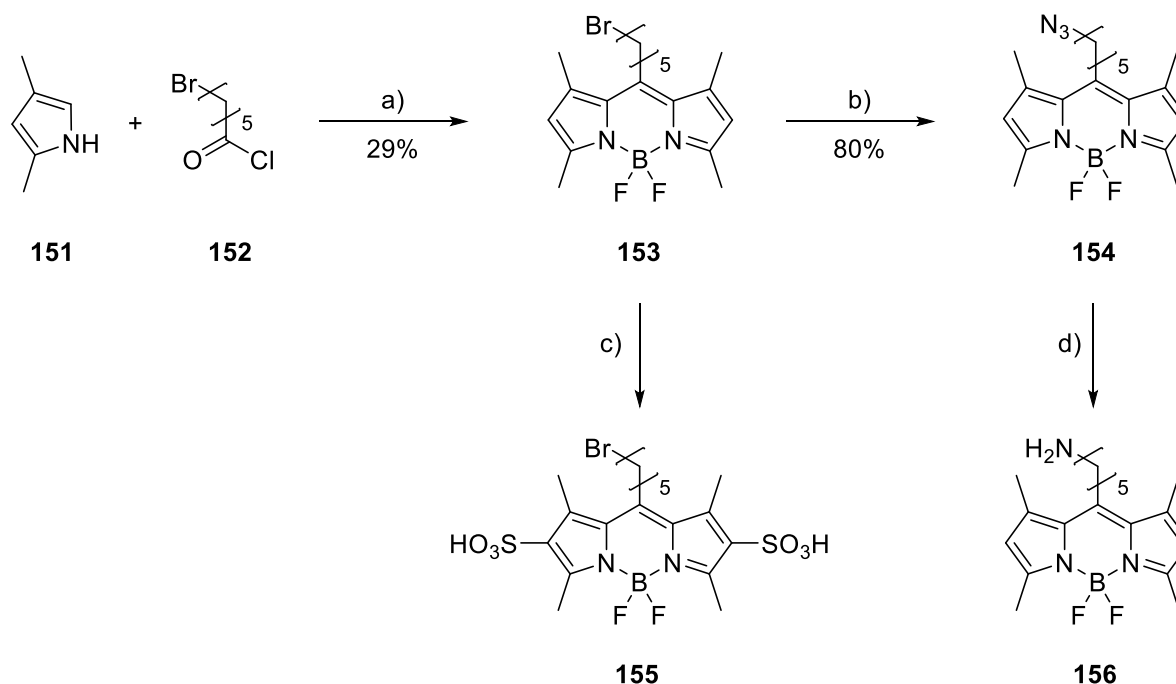
Noch wurden keine Daten erhalten.

3.2 Synthese von Fluorophor-markierten Liganden

Neben der Möglichkeit, Oligonukleotide an die Linker-Addukte zu knüpfen, bietet der modulare Aufbau der Sonden die Möglichkeit, auch andere funktionelle Einheiten, wie zum Beispiel Fluorophore anzuknüpfen. Diese stellen wichtige Tool-Verbindungen für *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen der Rezeptoren dar.

3.2.1 Fluorophor-markierte Liganden für Adenosinrezeptoren

3.2.1.1 Synthese der BODIPYs²⁷⁹



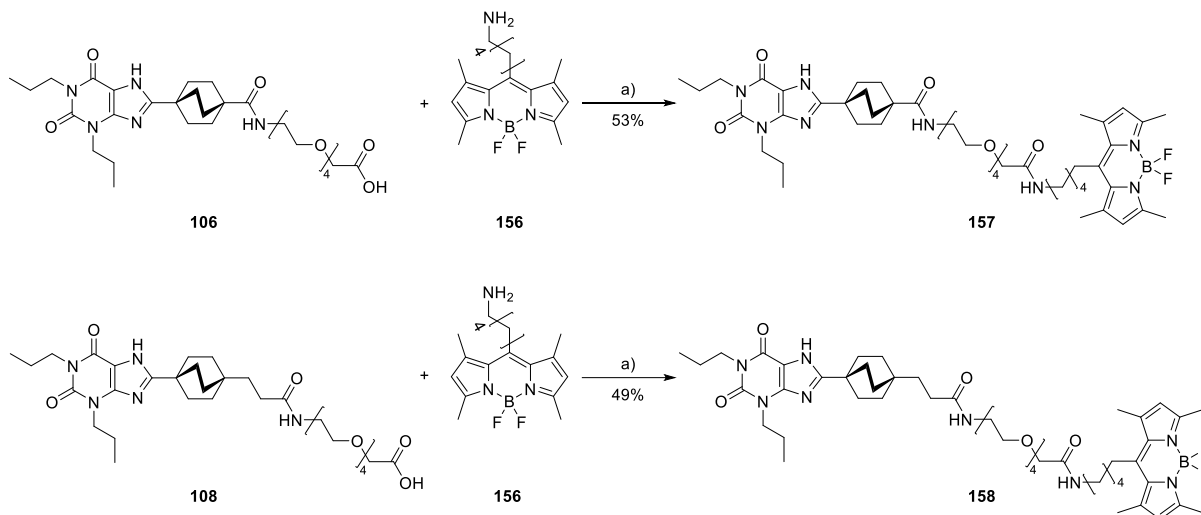
Schema 37: Synthese der BODIPY-Derivate, die für die Synthese der Fluoreszenzmarker benötigt werden.²⁷⁹ Reaktionsbedingungen: a) i) CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C}$ – RT, 3.5 h, ii) NEt_3 , $0\text{ }^\circ\text{C}$, 30 min, iii) $\text{BF}_3 \times \text{Et}_2\text{O}$, RT, 1 h. b) NaN_3 , DMF, $50\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h. c) HSO_3Cl , CH_2Cl_2 , $-20\text{ }^\circ\text{C}$, 30 min. d) i) PPh_3 , THF, RT, 24 h, ii) H_2O , RT, 3 h.

Das BODIPY-Derivat mit der Linkerlänge 5 (**153**) wurde zunächst synthetisiert. Dabei wird über eine elektrophile aromatische Substitution der 4-Position des Pyrrols **151** das Carbonsäurechlorid **152** angelagert und HCl eliminiert. In einer zweiten elektrophilen Addition wird unter Kondensation das zweite Pyrrol angelagert, bevor BF_3 koordiniert. Diese Reaktionssequenz verläuft mit einer Ausbeute von 29 %, was unter Berücksichtigung der möglichen Nebenreaktionen akzeptabel ist. In der Literatur wird als isolierte Ausbeute 33 % angegeben.²⁷⁹ Für mögliche Click-Reaktionen wurde das Azid **154** hergestellt, in dem in einer $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion das Brom gegen ein Azid ausgetauscht wurde. Diese Verbindung soll unter anderem für Reaktionen mit CD73-Rezeptor-Inhibitoren verwendet werden.

Des Weiteren wurde versucht, das BODIPY-Derivat hydrophiler zu machen. Dafür wurde die Synthese von Heisig *et al.* herangezogen. Mittels Chlorsulfonsäure wurde unter HCl-Freisetzung die Disulfonsäure synthetisiert.²⁷⁹ Bei der Synthese ist besonders auf die

Verwendung von frischer Chlorsulfonsäure zu achten, da die Reaktion sonst nicht abläuft. Auch bereitet die Reinigung des Produkts Schwierigkeiten, da Reste von Triethylamin (verwendet als Zusatz bei der säulenchromatographischen Reinigung) im Endprodukt enthalten sind. Das verwendete Amin **156** wurde nicht erneut synthetisiert, da es im Arbeitskreis noch hinreichend vorhanden war.

3.2.1.2 Die A₁AR-Antagonisten-PEG-4-Fluorophor-Sonden

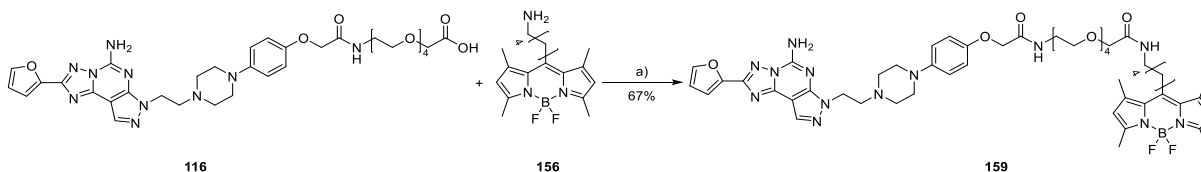


Schema 38: Synthese der Fluoreszenzliganden **157** und **158** aus den Linkeraddukten **106** und **108** und BODIPY 493/503 (**156**). Reaktionsbedingungen: a) HATU, DIPEA, CH₂Cl₂, RT, 24 h.

Die Kupplungsreaktion mit HATU lief zufriedenstellend, wobei die beiden fluoreszenzmarkierten Sonden **157** und **158** erhalten werden konnten.

3.2.1.3 Die A_{2A}AR-Antagonist-PEG-4-Fluorophor-Sonde

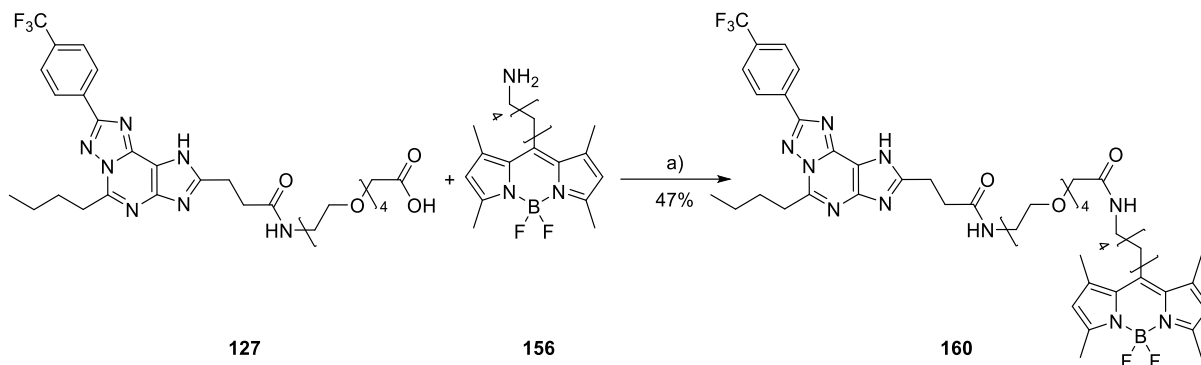
Die Verbindung **116** (3.1.12.2) wurde mit dem BODIPY 493/503 gekuppelt, wobei der Fluoreszenzligand **159** mit einer Ausbeute von 67 % erhalten wurde (Schema 39).



Schema 39: Synthese des Fluoreszenzliganden **159** aus dem Linkeraddukt **116** und dem BODIPY 493/503 (**156**). Reaktionsbedingungen: a) HATU, DIPEA, CH₂Cl₂, RT, 24 h.

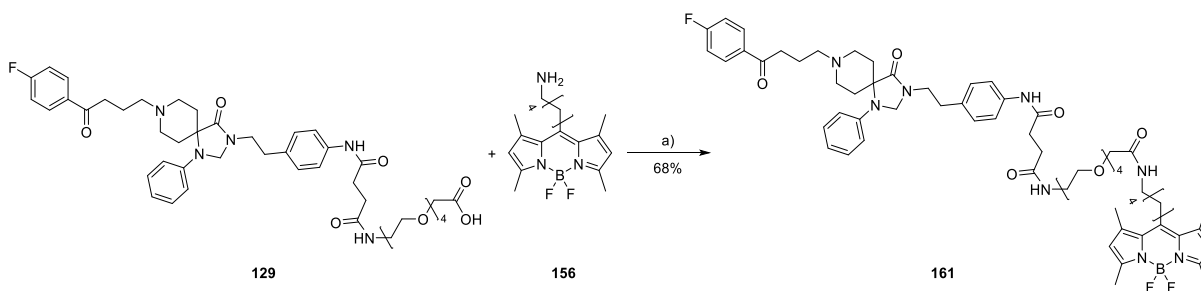
3.2.1.4 Die A₃AR-Antagonist-PEG-4-Fluorophor-Sonde

Auch der A₃AR-Antagonist **48** wurde für die Fluoreszenzmarkierung genutzt. Die Ausbeute lag bei knapp 50 %.



Schema 40: Synthese des Fluoreszenzliganden **160** aus dem Linkeraddukt **127** und BODIPY 493/503 (**156**).
Reaktionsbedingungen: a) HATU, DIPEA, CH₂Cl₂, RT, 24 h.

3.2.1.5 Die D₂DR-Antagonist-PEG-4-Fluorophor-Sonde



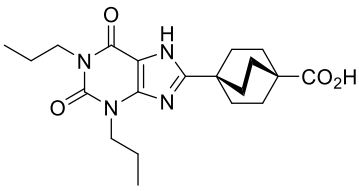
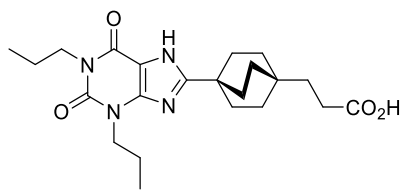
Schema 41: Synthese des Fluoreszenzliganden **161** aus dem Linkeraddukt **129** und BODIPY 493/503 (**156**).
Reaktionsbedingungen: a) HATU, DIPEA, CH₂Cl₂, RT, 24 h.

Der D₂DR-Antagonist **55** konnte in guter Ausbeute mit dem Fluorophor verknüpft werden.

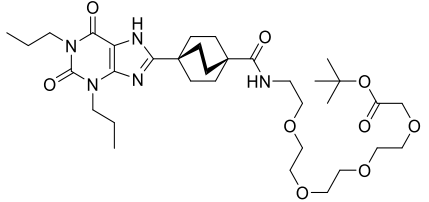
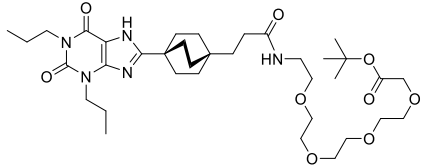
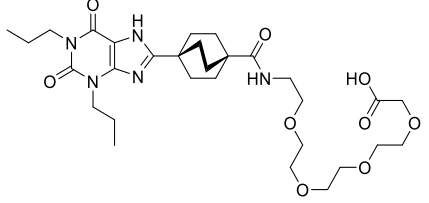
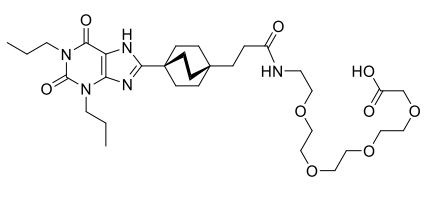
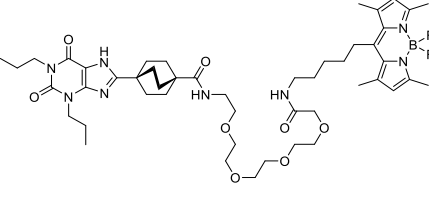
ERGEBNISSE

3.2.2 Ergebnisse der Testung

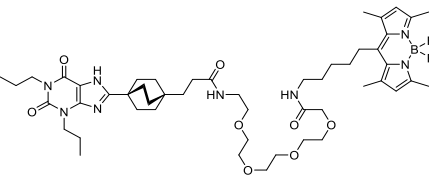
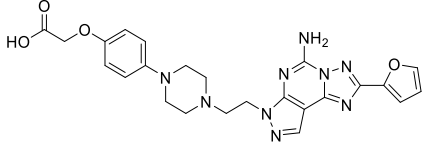
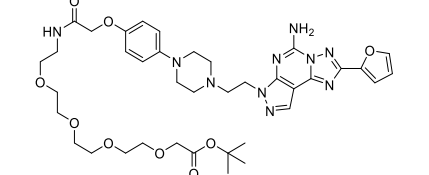
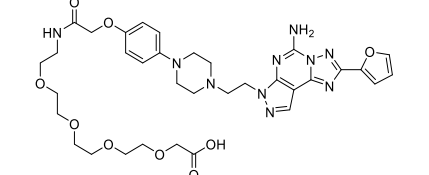
Tabelle 20: K_i -Werte und % Inhibition der Testsubstanzen an den human A_{1-} , A_{2A-} , A_{2B-} und A_{3AR} .¹ (n = 3 sofern nicht anders vermerkt)

VERBINDUNG		A₁AR (human rekombinant) [³H]CCPA	A_{2A}AR (human rekombinant) [³H]MSX-2	A_{2B}AR (human rekombinant) [³H]PSB-1901	A₃AR (human rekombinant) [³H]PSB-11	SELEKTIVITÄT
		$K_i \pm$ SEM [nM] (oder % Inhibition \pm SEM bei 1 μ M)	$K_i \pm$ SEM [nM] (oder % Inhibition \pm SEM bei 1 μ M)	$K_i \pm$ SEM [nM] (oder % Inhibition \pm SEM bei 1 μ M)	$K_i \pm$ SEM [nM] (oder % Inhibition \pm SEM bei 1 μ M)	
A₁-Liganden						
7 TK-TO-006		28.0 \pm 7.1	664 \pm 114	>1000 (45 \pm 5)	>1000 (10 \pm 7)	23-fach
1 TK-TO-011		4.07 \pm 0.90	661 \pm 188	289 \pm 94	>1000 (13 \pm 7)	71-fach

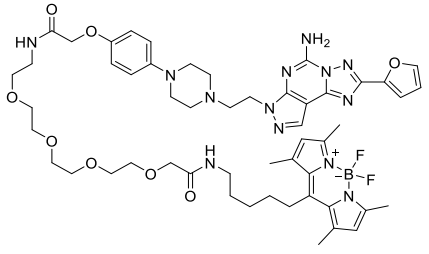
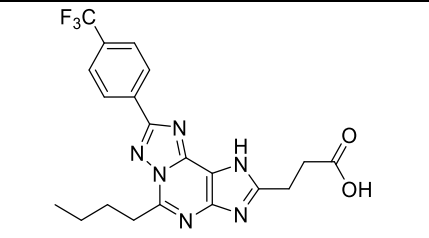
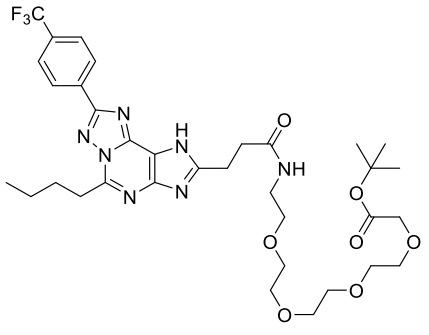
ERGEBNISSE

<p>104 TK-TO-014</p>		<p>7.44 ± 0.64</p>	<p>345 ± 69 (n=4)</p>	<p>172 ± 18</p>	<p>>1000 (47 ± 5, n=4)</p>	<p>23-fach</p>
<p>108 TK-TO-015</p>		<p>2.12 ± 0.82 (n=4)</p>	<p>169 ± 55 (n=4)</p>	<p>161 ± 52</p>	<p>231 ± 34</p>	<p>76-fach</p>
<p>106 TK-TO-016</p>		<p>23.6 ± 2.3</p>	<p>>1000 (33 ± 2, n=2)</p>	<p>>1000 (31 ± 6, n=2)</p>	<p>>1000 (-4 ± 3, n=2)</p>	<p>>41-fach</p>
<p>109 TK-TO-017</p>		<p>9.73 ± 0.20</p>	<p>>1000 (35 ± 4, n=2)</p>	<p>515 ± 54</p>	<p>>1000 (6 ± 6, n=2)</p>	<p>53-fach</p>
<p>157 TK-TO-018</p>		<p>4.50 ± 0.59</p>	<p>305 ± 67</p>	<p>29.3 ± 7.5</p>	<p>462 ± 53</p>	<p>7-fach</p>

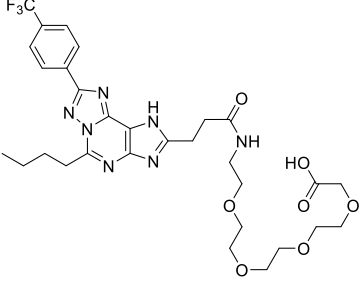
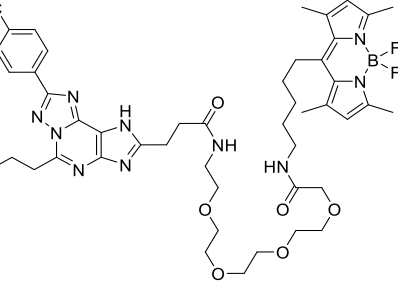
ERGEBNISSE

<p>158 TK-TO-019</p>		<p>2.02 ± 0.49</p>	<p>106 ± 17</p>	<p>34.8 ± 9.4</p>	<p>211 ± 58</p>	<p>17-fach</p>
<p>A_{2A}-Liganden</p>						
<p>2 TK-PT-011</p>		<p>>1000 (18 ± 4)</p>	<p>200 ± 16</p>	<p>>1000 (2 ± 11)</p>	<p>>1000 (12 ± 10)</p>	<p>>5-fach</p>
<p>110 TK-PT-013</p>		<p>>1000 (38 ± 9, n=2)</p>	<p>2.28 ± 0.41</p>	<p>>1000 (9 ± 1, n=2)</p>	<p>>1000 (34 ± 4, n=2)</p>	<p>>439-fach</p>
<p>116 TK-PT-014</p>		<p>>1000 (6 ± 5, n=2)</p>	<p>8.84 ± 0.64</p>	<p>>1000 (17 ± 9, n=2)</p>	<p>>1000 (13 ± 1, n=2)</p>	<p>>113-fach</p>

ERGEBNISSE

<p>159 TK-PT-015</p>		<p>165 ± 20</p>	<p>3.47 ± 0.23</p>	<p>>1000 (32 ± 9, n=2)</p>	<p>>1000 (39 ± 6)</p>	<p>48-fach</p>
<p>A₃-Liganden</p>						
<p>48 TK-OT-018</p>		<p>>1000 (11 ± 6, n=2)</p>	<p>>1000 (3 ± 8 at 0.1 μM, n=4)</p>	<p>>1000 (8 ± 8, n=2)</p>	<p>2.81 ± 0.48</p>	<p>>356-fach</p>
<p>123 TK-OT-019</p>		<p>>1000 (19 ± 10, n=2)</p>	<p>>1000 (11 ± 7, n=2)</p>	<p>>1000 (21 ± 2 at 0.1 μM, n=2)</p>	<p>2.82 ± 0.33</p>	<p>>356-fach</p>

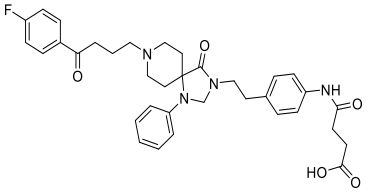
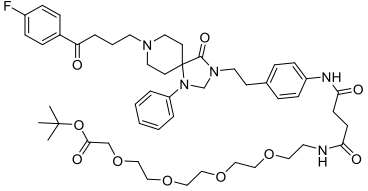
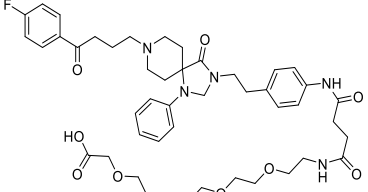
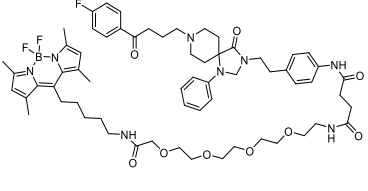
ERGEBNISSE

<p>127 TK-OT-020</p>		<p>>1000 (-6 ± 4, n=3)</p>	<p>>1000 (-3 ± 5, n=2)</p>	<p>>1000 (4 ± 1, n=2)</p>	<p>8.62 ± 0.81</p>	<p>>116-fach</p>
<p>160 TK-OT-024</p>		<p>>1000 (-4 ± 6, n=3)</p>	<p>>1000 (30 ± 3, n=2)</p>	<p>>1000 (0 ± 12, n=2)</p>	<p>19.0 ± 3.0</p>	<p>>53-fach</p>

i Andreas Brockmann, Sonja Hinz, Christin Vielmuth

ERGEBNISSE

Tabelle 21: Potenzbestimmung der D₂DR-Antagonisten an den Dopaminrezeptoren D₂ und D₃.ⁱ (Die Potenzen wurden in β-Arrestin-Assays an humanen D₂DR und D₃DR bestimmt, die in den CHO-Zellen exprimiert wurden; Die Hemmung der Dopamin-induzierten Aktivierung wurde bestimmt; EC₈₀ D₂DR: 460 nM, D₃DR 20 nM)

VERBINDUNG	D ₂ DR (human rekombinant)	D ₃ DR (human rekombinant)
	IC ₅₀ ± SEM [nM]	IC ₅₀ ± SEM [nM]
55 TK-SP-006 	0.78 ± 0.32	1.04 ± 0.64
128 TK-SP-007 	1.81 ± 0.76	0.60 ± 0.36
129 TK-SP-008 	4.43 ± 2.87	0.98 ± 0.46
161 TK-SP-009 	7.91 ± 5.16	1.21 ± 0.06

ⁱ Beatriz Büschbell

3.2.3 Auswertung der Testergebnisse

A₁AR

Für den A₁AR wurde die optimierte Linkerlänge von 4 PEG-Einheiten verwendet und es wurde der Fluorophor **156** an die Verbindungen **106** und **109** gekuppelt. Beide Fluorophor-markierten Liganden, **157** und **158**, zeigen eine deutlich bessere Affinität zum A₁AR im Vergleich zu den Säuren, die als Ausgangsverbindungen eingesetzt wurden. So ist die Affinität von **156** im Vergleich zur Säure **106** um den Faktor 5 höher (**106** $K_i = 23.6$ nM, **157** $K_i = 4.5$ nM). Auch die zweite, ethylenverbrückte Verbindung **158** weist eine um den Faktor 5 verbesserte Affinität im Vergleich zur Säure **109** auf (**158** $K_i = 9.7$ nM, **109** $K_i = 2.0$ nM). Allerdings ist die Selektivität der Fluorophor-markierten Liganden deutlich geringer, da beide Verbindungen mit einer ähnlichen Affinität ($K_i = 30.0$ nM) an den A_{2B}AR binden. Dennoch sollten sich die Fluoreszenzliganden hervorragend für Anwendungen eignen, bei denen keine oder nur geringe Rezeptorexpression vorhanden ist. Auch für NanoBRET-Assays ist eine Selektivität nicht erforderlich.

A_{2A}AR

A_{2A}-Fluoreszenzligand **159** weist einen K_i -Wert von 3.47 nM auf. Der Wert ist sehr gut und liegt im Bereich des Esters **110**. Es wird aber auch eine moderate Affinität zum A₁AR beobachtet. Die 48-fache Selektivität für den A_{2A}AR sollte dennoch für ein selektives Labeling ausreichend sein.

A₃AR

Fluoreszenzligand **160** zeigt einen K_i -Wert von 19.0 nM, wobei kaum Affinität zu den anderen Rezeptoren beobachtet wurde. Diese Verbindung sollte sich also hervorragend für die spezifische Fluoreszenzmarkierung von A₃AR eignen. Darüber hinaus wurde überlegt, weitere in der Arbeitsgruppe synthetisierte Fluorophore an die Verbindung zu koppeln und die Produkte ebenfalls zu untersuchen. Auf diesen Ansatz wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

D₂/D₃DR

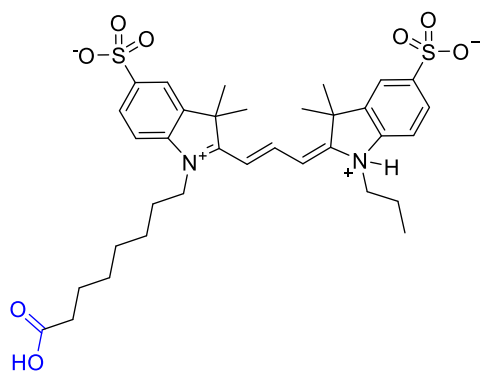
Auch an das Spiperonderivat **129** wurde das BODIPY angeknüpft. Der Fluorophor-markierte Ligand **161** erreicht dabei einen IC₅₀-Wert von 7.9 nM am D₂DR und von 1.2 nM am D₃DR. Wie zuvor wird keine Selektivität für einen der beiden Rezeptoren beobachtet. Die Selektivität gegenüber den anderen Dopaminrezeptor-Subtypen soll zukünftig untersucht werden.

3.2.4 Synthese weiterer Fluoreszenz-markierter Liganden

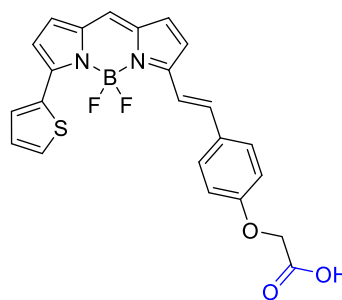
Nachdem der synthetisierte Fluoreszenzligand **160** gute Affinitätswerte und eine herausragende Selektivität gegenüber den anderen Rezeptorsubtypen aufwies, sollten weitere in der Arbeitsgruppe synthetisierte Fluorophore, die bei höherer Wellenlänge emittieren an den A₃AR Antagonisten **48** gekuppelt werden.

3.2.4.1 Fluoreszenz-markierte A₃AR-Antagonisten mit langwelliger

Emission



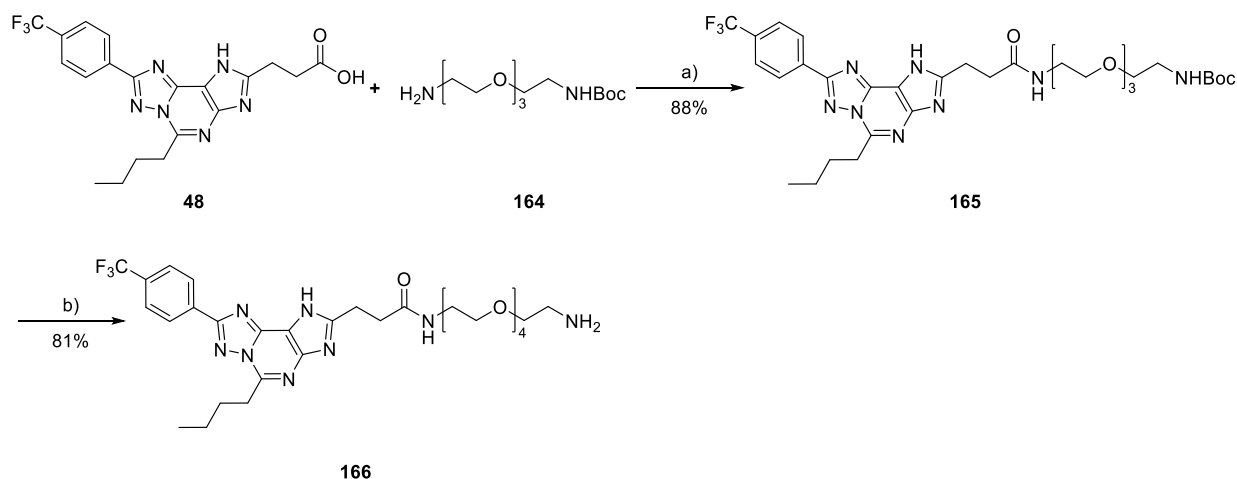
162
Cy3-Derivat
(synthetisiert von Tim Harms)



163
BODIPY 630/650
(synthetisiert von Ahmed Atef Ali)

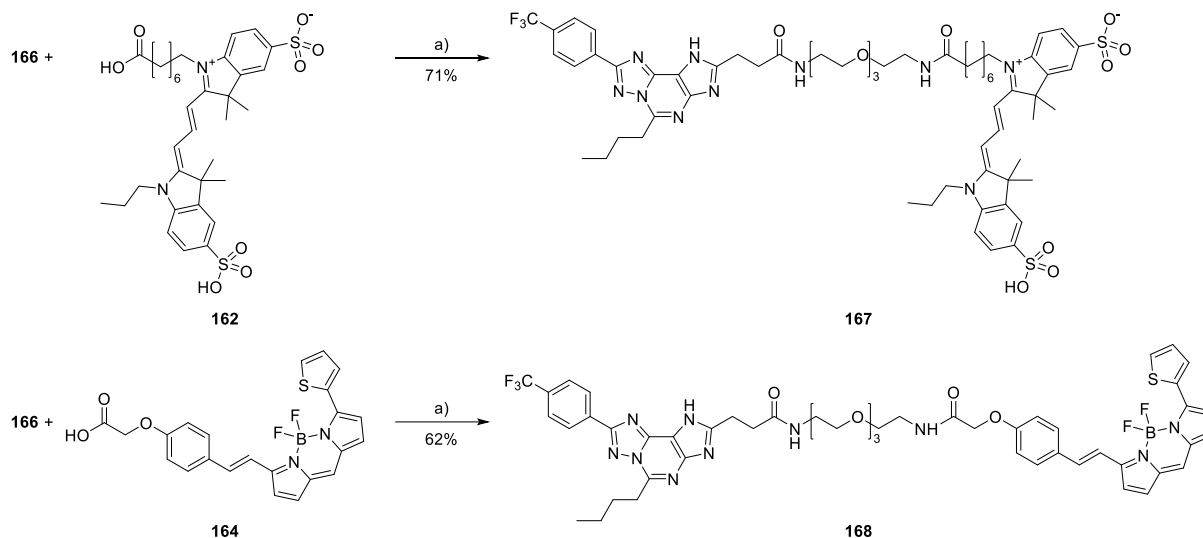
Abbildung 56: Fluorophore mit langwelliger Emission für die Synthese von Fluoreszenzliganden.^{280, 281}

Die beiden Fluorophore tragen eine terminale Säurefunktion, weshalb eine direkte Kupplung mit der synthetisierten Verbindung **127** nicht möglich war. Um eine größere Variabilität zu erreichen und auch Säuren anbinden zu können, wurde der Antagonist **48** mit einem Diaminolinker **164** gekuppelt (Schema 42).



Schema 42: Synthese des Ligand-Linker-Addukts **166** ausgehend von **48**. Reaktionsbedingungen: a) HATU, DIPEA, CH₂Cl₂, RT, 24 h. b) TFA, CH₂Cl₂, RT, 2 h.

Wie bereits zuvor wurde eine typische Kupplungsreaktion mittels HATU durchgeführt, die zum Amid **165** in einer Ausbeute von 88 % führte. Entschützung durch TFA ergab das Amin **166** in einer Ausbeute von 81 %.



Schema 43: Synthese der Fluoreszenz-markierten Liganden **167** und **168**. Reaktionsbedingungen: a) HATU, DIPEA, DMF, RT, 3 h.

Die Kupplungsreaktionen zu den beiden Fluoreszenz-markierten Liganden **167** und **168** wurden mit akzeptabler Ausbeute durchgeführt (Schema 43). In Abbildung 57 sind die Absorptions- und Emissionsspektren der drei Fluoreszenzliganden dargestellt. Dabei wird ein Wellenlängenbereich von 450 nm bis 700 nm abgedeckt. Somit konnte eine Toolbox bereitgestellt werden, die hervorragende Möglichkeiten zur Untersuchung des A₃AR liefert.

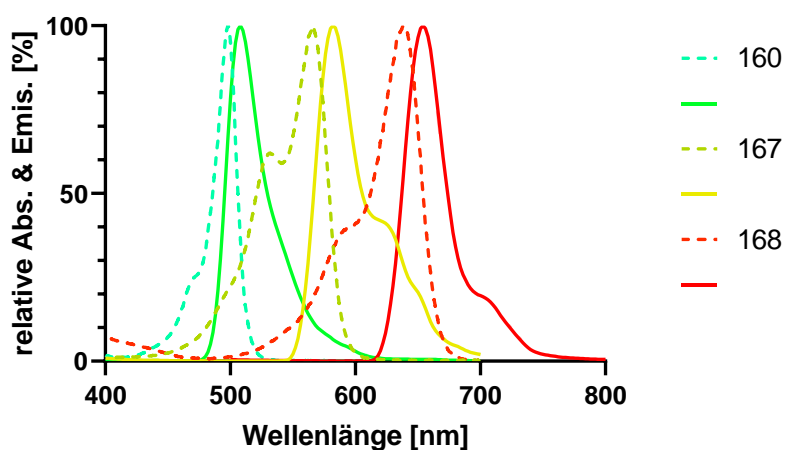
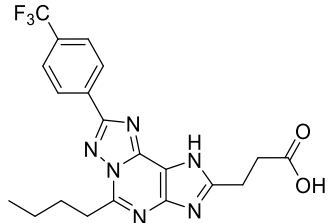
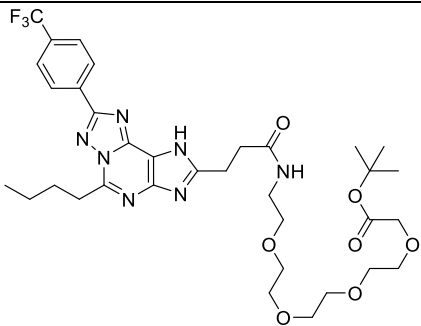


Abbildung 57: Absorptions- und Emissionsspektren der drei Fluoreszenzliganden **160**, **167** und **168**. Die relative Absorption (gestrichelt) bzw. Emission ist in Abhängigkeit von der Wellenlänge dargestellt. Die Farbe der Spektren gibt das jeweilige Wellenlängenmaximum wieder.

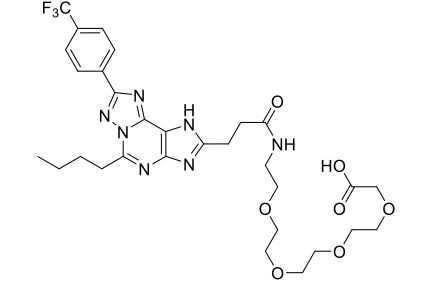
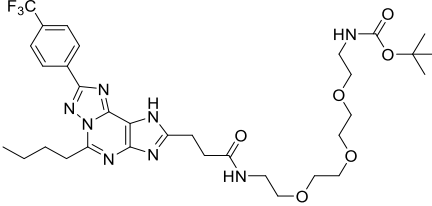
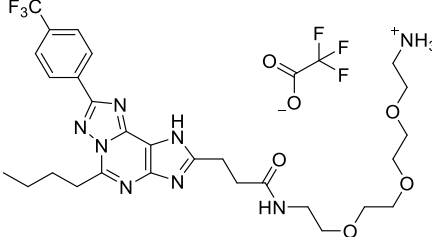
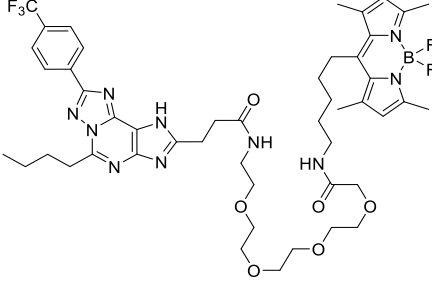
ERGEBNISSE

3.2.5 Ergebnisse der Testung

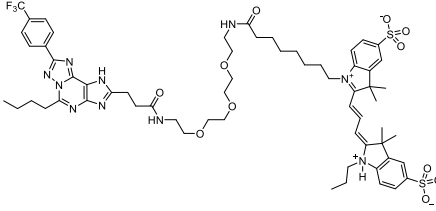
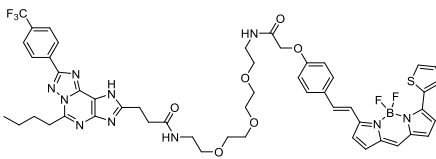
Tabelle 22: K_i -Werte und % Inhibition der Testsubstanzen an den human A_1 -, A_2A -, A_2B - und A_3AR .¹ (n = 3 sofern nicht anders vermerkt)

VERBINDUNG	A_1AR (human rekombinant) [³H]CCPA	A_2AAR (human rekombinant) [³H]MSX-2	A_2BAR (human rekombinant) [³H]PSB-1901	A_3AR (human rekombinant) [³H]PSB-11	SELEKTIVITÄT	
	$K_i \pm SEM$ [nM] (oder % Inhibition $\pm SEM$ bei 1 μM)	$K_i \pm SEM$ [nM] (oder % Inhibition $\pm SEM$ bei 1 μM)	$K_i \pm SEM$ [nM] (oder % Inhibition $\pm SEM$ bei 1 μM)	$K_i \pm SEM$ [nM] (oder % Inhibition $\pm SEM$ bei 1 μM)		
A_3-Liganden						
48 TK-OT-018		>1000 (11 \pm 6, n=2)	>1000 (3 \pm 8 at 0.1 μM , n=4)	>1000 (8 \pm 8, n=2)	2.81 \pm 0.48	>356-fach
123 TK-OT-019		>1000 (19 \pm 10, n=2)	>1000 (11 \pm 7, n=2)	>1000 (21 \pm 2 at 0.1 μM , n=2)	2.82 \pm 0.33	>356-fach

ERGEBNISSE

<p>127 TK-OT-020</p>		<p>>1000 (-6 ± 4, n=3)</p>	<p>>1000 (-3 ± 5, n=2)</p>	<p>>1000 (4 ± 1, n=2)</p>	<p>8.62 ± 0.81</p>	<p>>116-fach</p>
<p>165 TK-OT-026</p>		<p>>1000 (3 ± 5, n=2)</p>	<p>>1000 (19 ± 11, n=2)</p>	<p>>1000 (1 ± 2, n=2)</p>	<p>4.25 ± 0.74</p>	<p>>235-fach</p>
<p>166 TK-OT-027</p>		<p>>1000 (17 ± 7, n=2)</p>	<p>>1000 (20 ± 3, n=2)</p>	<p>>1000 (7 ± 0, n=2)</p>	<p>0.976 ± 0.294</p>	<p>>1025-fach</p>
<p>160 TK-OT-024</p>		<p>>1000 (-4 ± 6, n=3)</p>	<p>>1000 (30 ± 3, n=2)</p>	<p>>1000 (0 ± 12, n=2)</p>	<p>19.0 ± 3.0</p>	<p>>53-fach</p>

ERGEBNISSE

<p>167 TK-OT-028</p>		<p>>1000 (0 ± 5, n=2)</p>	<p>>1000 (9 ± 4, n=2)</p>	<p>>1000 (13 ± 2, n=2)</p>	<p>45.6 ± 6.8</p>	<p>>22-fach</p>
<p>168 TK-OT-029</p>		<p>>1000 (11 ± 15, n=2)</p>	<p>>1000 (8 ± 3, n=2)</p>	<p>>1000 (3 ± 13 at 0.1 µM, n=2)</p>	<p>15.5 ± 4.6</p>	<p>>65-fach</p>

i Christin Vielmuth

3.2.6 Auswertung der Testergebnisse

Das Ligand-Linker-Addukt **165** weist, wie alle Verbindungen mit dem Triazolopurin-Grundgerüst eine hohe Affinität und Selektivität zum A₃AR auf (K_i 4.25 nM). Im Vergleich zu Verbindung **123**, dem *t*-butylgeschützten Ligand-Linker-Addukt ist die Affinität nicht signifikant geringer.

Verbindung **166**, das entschützte Amin des Ligand-Linker-Addukts **165** ist um den Faktor 4 affiner als **165** (K_i 0.976 nM). Somit weist diese Verbindung auch die höchste Selektivität im Vergleich zu allen anderen getesteten Verbindungen auf (>1025-fach). Vermutlich interagiert das terminale Amin des Linkers mit dem Rezeptor und sorgt damit für eine hohe Affinität.

Zusätzlich zur Verbindung **160**, dem BODIPY-493/503-Derivat wurden die Fluorophor-markierten Verbindungen **167** und **168** getestet. Verbindung **167**, das Cy3-Derivat weist im Vergleich zur Verbindung **160** eine etwas verminderte Affinität zum A₃AR auf (**160**; K_i 19.0 nM; **167**, K_i 45.6 nM). Die Fluorophor-markierte Verbindung **168** ist die höchst affine und somit auch selektivste Verbindung mit einem K_i -Wert von 15.5 nM und 65-facher Selektivität gegenüber den anderen AR.

Die drei Fluorophor-markierten Verbindungen **160**, **167** und **168** sind hoch affine und hoch selektive Sonden für die Untersuchung des A₃AR und decken dabei den Wellenlängenbereich von 450 nm bis 700 nm ab.

Aufgrund des modularen Aufbaus der Synthese lassen sich zukünftig beliebige weitere Fluorophore anknüpfen, die zu hochaffinen und –selektiven A₃AR-Fluoreszenzliganden führen sollten.

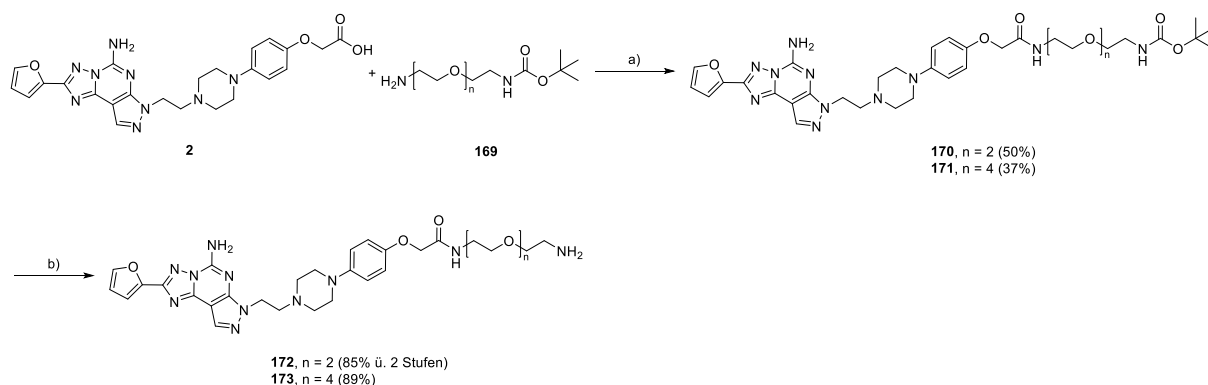
3.3 Polymer-gebundene AR-Antagonisten zur Herstellung von Nanogelen

Ein wichtiger Ansatzpunkt bei der Immuntherapie von Krebs ist der A_{2A}AR. Dieser, auf der Oberfläche des Immunsystems angehöriger Zellen (T-Zellen, Dendritischen Zellen und Natürlichen Killerzellen) exprimierte Rezeptor wird durch Tumor-generiertes Adenosin aktiviert und führt dabei zur Inaktivierung der Immunantwort. Durch die Blockade des Rezeptors mittels A_{2A}AR-Antagonisten kann die Immunantwort aufrechterhalten werden und so der Krebs behandelt werden.

In Kooperation mit Dr. Lutz Nuhn, Max Planck Institute for Polymer Research, Mainz, soll die Synthese von abbaubaren Nanogelen durchgeführt werden.²⁸² Ziel ist die Anbindung eines A_{2A}-Antagonisten an ein Nanogel, welches als Mizelle vorliegt und den Antagonisten im Kern trägt. Nach der Anbindung wird das Nanogel in die Peripherie eines Tumors injiziert. Dort soll sich die Mizelle auflösen (saurer pH-Wert, Ketalspaltung) und der Wirkstoff freigesetzt werden. Diese als „Drug Targeting“ bekannte Methode verhindert die systemische Verteilung des Wirkstoffs.

3.3.1 Synthese der Ligand-Linker-Addukte

Der beste A_{2A}-Antagonist, Verbindung **2**, sollte mit unterschiedlich langen Linkern versehen werden, welche eine endständige Aminfunktion tragen. Diese ist wichtig, um den Linker an das Nanogel binden zu können. In Schema 44 ist die Synthese zu den Antagonist-Linker-Addukten **172** und **173** gezeigt. Im ersten Schritt werden über eine klassische Kupplungsreaktion die Amide **170** und **171** gebildet. Im Anschluss wird sauer entschützt, wodurch die gewünschten Amino-funktionalisierten Produkte **172** und **173** erhalten werden.




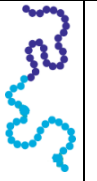
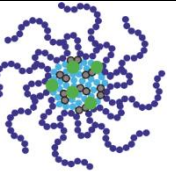
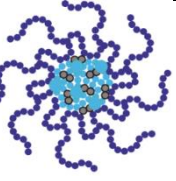
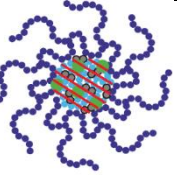
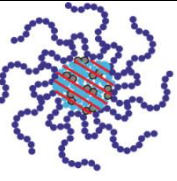
Schema 44: Synthese der A_{2A}AR-Antagonist-Linker-Addukte **172** und **173**. Reaktionsbedingungen: a) HATU, DIPEA, CH₂Cl₂, RT, 24 h. b) TFA, TIPS, CH₂Cl₂, RT, 24 h.

Beide Verbindungen wurden der AG Nuhn zur Verfügung gestellt und von Judith Stickdorn an Nanogel-bildende Polymere geknüpft. Mittels *self-assembly* bilden die Nanogele Mizellen, welche anschließend von Christin Vielmuth (AK Müller) getestet wurden. Insgesamt wurden

ERGEBNISSE

drei unterschiedliche Polymere hergestellt, die als Positivprobe mit dem Antagonisten verknüpft waren.

Tabelle 23: Übersicht über die hergestellten Polymere mit und ohne Anbindung des Antagonisten sowie Information bezüglich der Labilität des Mizellenkerns. (+ = aktiv/positiv, - = inaktiv/negativ, / = keine Aussage)

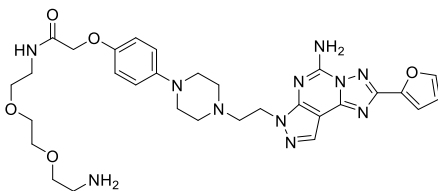
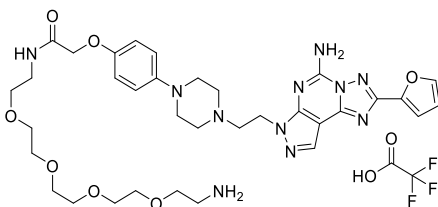
Struktur						
	174	175	176	177	178	179
Antagonist	+	-	+	-	+	-
Säurelabil	/	/	+	+	-	-

In Tabelle 23 sind die sechs unterschiedlichen Polymer-Präparate dargestellt. Die Polymere **174** und **175** sind lösliche Ketten, die keine Mizellen gebildet haben. Polymer **174** trägt dabei den Antagonisten, **175** nicht. Die Mizellen **176** und **177** sind im Kern mit Ketalbrücken kovalent verknüpft, wobei **176** den Antagonisten trägt und **177** nicht. Die Mizellen **178** und **179** sind im Kern mit Etherbrücken kovalent verknüpft, wobei **178** den Antagonisten trägt, **179** nicht. Polymer **174** dient als Positivprobe und sollte die beste Affinität zum A_{2A}AR aufweisen. Als Negativprobe dienen **175** und **179**, welche keine Affinität zum Rezeptor zeigen sollten. Entsprechend der Arbeitshypothese würde die Mizelle **176** im neutralen Medium keine Affinität zum Rezeptor zeigen, da kein Ligand an der Außenseite lokalisiert ist. Nach saurer Ketalsspaltung würde die Mizelle in die Form von **174** übergehen und infolgedessen maximale Affinität aufweisen. Die Mizelle **177** hingegen würde in die Form **175** übergehen und keine Affinität würde detektiert. Die restlichen etherverbrückten Polymere **178** und **179** sind säurestabil und sollten in beiden Fällen keine Affinität zeigen. Die Radioligandbindungsstudien werden bei neutralem und saurem pH-Wert durchgeführt.



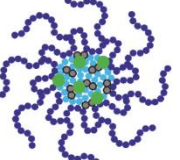
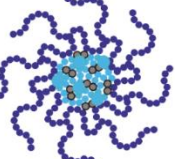
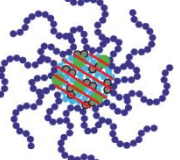
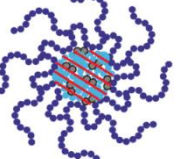
ERGEBNISSE

3.3.2 Ergebnisse der Testung

Tabelle 24: K_i -Werte und % Inhibition der Testsubstanzen an dem human $A_{2A}AR$.¹ (n = 3 sofern nicht anders vermerkt)

VERBINDUNG	A ₁ AR (human rekombinant) [³ H]CCPA	A _{2A} AR (human rekombinant) [³ H]MSX-2	A _{2B} AR (human rekombinant) [³ H]PSB-1901	A ₃ AR (human rekombinant) [³ H]PSB-11	SELEKTIVITÄT	
	$K_i \pm SEM$ [nM] (oder % Inhibition $\pm SEM$ bei 1 μM)	$K_i \pm SEM$ [nM] (oder % Inhibition $\pm SEM$ bei 1 μM)	$K_i \pm SEM$ [nM] (oder % Inhibition $\pm SEM$ bei 1 μM)	$K_i \pm SEM$ [nM] (oder % Inhibition $\pm SEM$ bei 1 μM)		
A_{2A}-Liganden						
172 TK-PT-026		165 ± 31	9.28 ± 4.44	≥1000 (47 ± 2, n=2)	≥1000 (51 ± 2, n=2)	18-fach
173 TK-PT-030		>1000 (29 ± 4, n=2)	(86, n=1)	>1000 (25 ± 2, n=2)	>1000 (37, n=1)	

ERGEBNISSE

174 Sol. Chain PT-026		pH = 7.4	-	1610 ± 436	-	-	-
		pH = 5.0		779 ± 165			
175 Sol. Chain		pH = 7.4	-	> 10000	-	-	-
		pH = 5.0		n.d.			
176 Ketal PT-026		pH = 7.4	-	785 ± 101	-	-	-
		pH = 5.0		272 ± 18			
177 Ketal		pH = 7.4	-	> 10000	-	-	-
		pH = 5.0		n.d.			
178 Ether PT-026		pH = 7.4	-	1060 ± 176	-	-	-
		pH = 5.0		1710 ± 540			
179 Ether		pH = 7.4	-	> 10000	-	-	-
		pH = 5.0		n.d.			

3.3.3 Auswertung der Testergebnisse

Verbindung **172**, ein Preladenant-(**2**)-Derivat mit einem PEG-3-Linker, weist eine akzeptable Affinität zum A_{2A} AR auf. Allerdings führt die Kürze des Linkers sowie die Einführung einer Aminofunktion als endständige funktionelle Gruppe zu erheblicher zusätzlicher Affinität zum A_1 AR. Im Vergleich zum PEG-4-Linker-Addukt **116** fällt die Selektivität von 113-fach auf 18-fach. Dies bestätigt die Wahl der PEG-4-Linkerlänge für die zuvor synthetisierten Derivate (3.1.12.2). Generell ist zu vermerken, dass die Polymere, die keinen Antagonisten tragen, keine Affinität zum A_{2A} AR zeigen. Somit ist die Integrität des Assays bestätigt und der Radioligand wird nicht von den Mizellen aufgenommen, wodurch eine Verdrängung vom Rezeptor vorgetäuscht werden könnte.

Die Antagonist-tragende Kette **174** weist eine um den Faktor 173 niedrigere Affinität als der Antagonist selbst auf. Damit ist der Affinitätswert der Positivprobe mit einem K_i -Wert von 1610 nM nicht optimal. Eine Modifikation der Linkerlänge könnte den Wert verbessern. Interessanterweise bewegen sich sämtliche Affinitätswerte der Antagonist-gebundenen Polymere **176** und **178** im selben Bereich. Dies bedeutet, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen Kette und kernverbundener Mizelle gibt, was mittels T-Test bestätigt wurde (Abbildung 58). Dieses Ergebnis legt nahe, dass entweder der Antagonist aus der Mizelle herausragt, oder die Mizelle ihre Integrität verloren hat.

Bei einem pH-Wert von 5.0 scheint die Affinität der Antagonist-tragenden polymeren Kette **174** etwas höher zu sein als bei einem pH-Wert von 7.4. Der T-Test zeigt aber, dass zwischen den gemessenen K_i -Werten kein signifikanter Unterschied besteht ($P = 0.06$). Diese Feststellung steht im Einklang mit dem erwarteten Ergebnis. Die mit Säure behandelte Mizelle **176** weist eine um den Faktor 2.8 verbesserte Affinität im Vergleich zur unbehandelten Mizelle **176** auf. Laut T-Test wäre dies eine signifikante Verbesserung ($P = 0.01$), die durch die Säurebehandlung erreicht wurde. Das Ergebnis würde der Erwartung entsprechen, dass die Mizelle im neutralen Milieu geschlossen vorliegt sich aber im sauren Milieu öffnet. Wird allerdings der K_i -Wert der mit Säure behandelten Mizelle **176** mit dem K_i -Wert der geöffneten Kette **174** bei pH 5 verglichen, wird ein signifikanter Unterschied der beiden Werte zueinander festgestellt ($P = 0.03$).

Die Ergebnisse legen nahe, dass der Ligand dauerhaft an der Außenseite der Mizelle lokalisiert ist, was der Ausgangshypothese entgegensteht.

Die Synthese eines Liganden mit längerem Linker wurde erfolgreich durchgeführt und die Mizellen befinden sich zurzeit in der biologischen Testung.

ERGEBNISSE

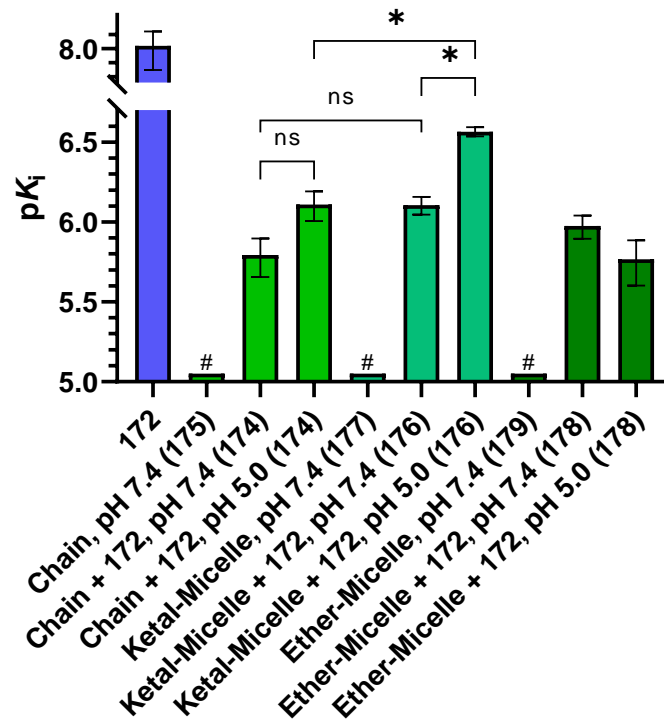
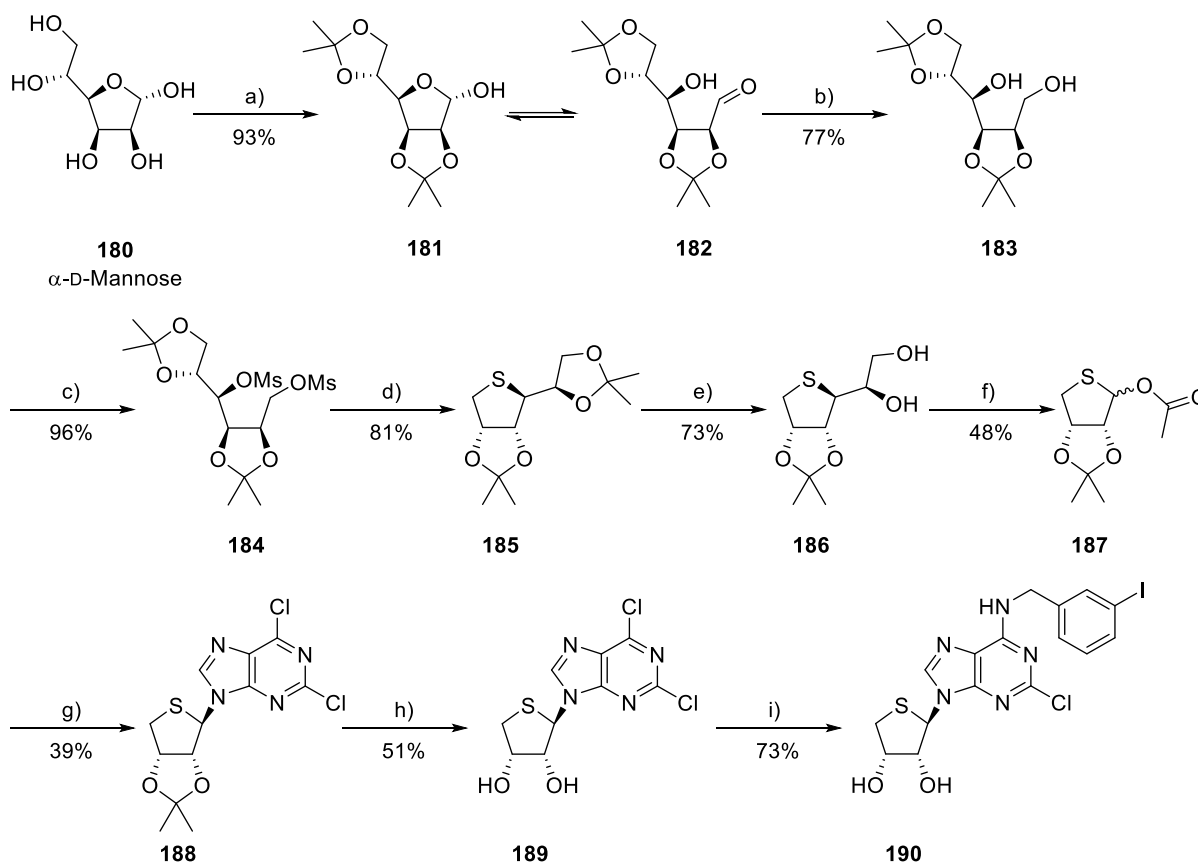


Abbildung 58: Darstellung der pK_i-Werte des funktionalisierten A_{2A}AR-Antagonisten **172** sowie der polymergebundenen Präparate. Die Signifikanz wurde mit dem ungepaarten Welch's T-Test bestimmt. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (SEM) aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen (* P < 0.05). # markieren pK_i-Werte < 5.0.

3.4 Synthese eines A₃AR-Antagonisten für die Kristallstrukturanalyse

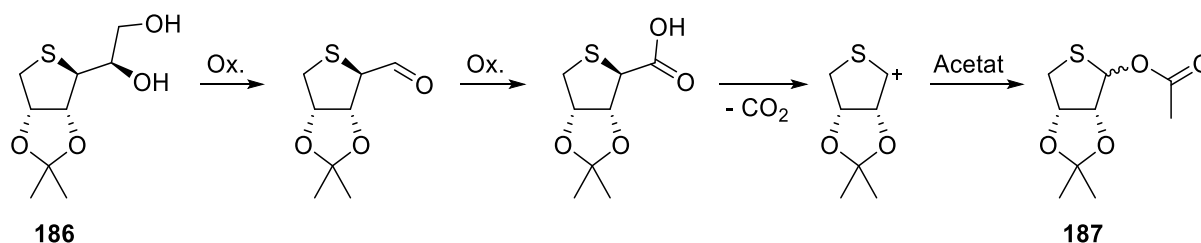
Als weiteres Projekt wurde die Synthese des A₃AR-Antagonisten LJ-1888 (**180**) angestrengt.²⁸³ Ziel ist die Verwendung der Verbindung als A₃AR-Antagonist für Co-Kristallisationsexperimente. Zunächst wurde dafür Verbindung **48** eingesetzt (3.1.7.1). Der Vorteil von LJ-1888 ist aber dessen hohe Affinität zum humanen A₃AR ($K_i = 4.16$ nM) bei gleichzeitig hoher Affinität zum Ratten-A₃AR ($K_i = 3.89$ nM), während **48** nur zum humanen Rezeptor hohe Affinität aufweist. Mit LJ-1888 sollte sich also auch der Nagetier-Rezeptor co-kristallisieren lassen. Dadurch ließe sich möglicherweise eine Erklärung für die hohen Speziesunterschiede vieler A₃-Antagonisten finden.



Schema 45: Synthese von LJ-1888 (**190**) ausgehend von α -D-Mannose (**180**). Reaktionsbedingungen: a) 2,2-DMP, CSA, Aceton, RT, 24 h, b) NaBH₄, EtOH, RT, 3 h. c) MsCl, NEt₃, DMAP, CH₂Cl₂, RT, 1 h. d) Na₂S, DMF, 18 °C, 24 h. e) 3 x 60 % AcOH, RT, 2 h. f) Pb(OAc)₄, EtOAc, RT, 24 h. g) i) 2,6-Dichloropurin, (NH₄)₂SO₄, HMDS, 170 °C, 15 h, ii) TMSOTf, DCE, RT – 80 °C, 3 h. h) 2 N HCl, THF, RT, 15 h. i) 3-Chlorobenzylamin, Et₃N, EtOH, 80 °C, 2 h.

Ausgehend von α -D-Mannose (**180**) werden zunächst die Diole mittels säurekatalytischer Ketalbildung geschützt. Da Monosaccharide in Lösung sowohl als Furanose, Pyranose und in offenkettiger Form vorliegen, kann im folgenden Schritt der Aldehyd der offenkettigen Form mit NaBH₄ reduziert werden, sodass das Diol **183** entsteht. Als Vorbereitung auf die Thiolanbildung werden die Diole mesyliert und **184** erhalten. Dies erleichtert das Einführen des Schwefels im nächsten Schritt. Bei der Substitutionsreaktion wird einzig das Diastereomer **185** erhalten, was auf ein S_N2-Reaktion schließen lässt. Die Abspaltung der Schutzgruppe an 5',6'-

Position zu **186** wird unter milden Bedingungen, dreimal hintereinander durchgeführt, um möglichst wenig doppelt entschütztes Nebenprodukt zu generieren. Die nachfolgende Criegee-Oxidation sollte eigentlich zu einem Aldehyd führen; falls der Reaktionsansatz aber lange genug gerührt wird, wird der Aldehyd durch die Pb(IV)-Verbindung zur Säure oxidiert, gefolgt von einer Decarboxylierung und das Acetat greift nukleophil an (Schema 46). Die erhaltene Verbindung **187** kann für die Hilbert-Johnson-Reaktion verwendet werden.



Schema 46: Mögliche Reaktionssequenz zur Verbindung **187**.

Dabei wird zunächst das Purin mit HMDS silyliert, wonach TMSOTf und **187** zugegeben werden. Bei Raumtemperatur entsteht dabei eine Mischung aus an 7- und 9-Position substituierten Purin, welches in Hitze zum stabileren Produkt **188** umgesetzt wird. Nach der Abspaltung der Diolschutzgruppe zu **189** wird im letzten Schritt das Produkt LJ-1888 mittels S_NAr -Reaktion durch Umsatz mit -Chlorbenzylamin erhalten.

3.4.1 Vorläufige Ergebnisse der Testung

Tabelle 25: K_i -Werte und % Inhibition der Testsubstanz **190** an dem humanen, mouse und rat A_3AR .ⁱ (n = 3 sofern nicht anders vermerkt)

VERBINDUNG	A_3AR (human rekombinant) [³H]NECA	A_3AR (mouse rekombinant) [³H]NECA	A_3AR (rat rekombinant) [³H]NECA
	$K_i \pm SEM$ [nM] (oder % Inhibition $\pm SEM$ bei 1 μM)	$K_i \pm SEM$ [nM] (oder % Inhibition $\pm SEM$ bei 1 μM)	$K_i \pm SEM$ [nM] (oder % Inhibition $\pm SEM$ bei 1 μM)
190 	(101 at 1 μM , n=1) Lit.: 4.16 ± 0.27^{283}	(82 at 1 μM , n=1)	1.01 ± 0.27 Lit.: 3.9 ± 1.1^{283}

ⁱ Christin Vielmuth

3.4.2 Auswertung der Testergebnisse

Die Verbindung **190** wurde als speziesunabhängiger Ligand publiziert.²⁸³ Zur Verwendung von **190** in Co-Kristallisationsexperimenten sollte die Affinität an den drei A₃AR (Mensch, Maus, Ratte) untersucht und bestätigt werden.

Die Testergebnisse für den humanen A₃AR stehen noch aus. In einer ersten Studie wurde eine Inhibition von 100 % bei einer Konzentration von 1 µM gemessen, was auf einen nanomolaren K_i-Wert hindeutet. Dies wäre in Übereinstimmung mit dem Literaturwert (K_i = 4.16 nM).

Am Maus-Rezeptor konnte noch kein K_i-Wert ermittelt werden. Die 82%ige Inhibition bei 1 µM lässt ebenfalls auf eine hohe Affinität schließen.

Für den Ratten A₃AR wurde ein K_i-Wert von 1.01 nM bestimmt. Dieser Wert liegt in einem ähnlichen Rahmen, wie der Literaturwert (K_i = 3.9 nM) und ermöglicht somit die Nutzung des Liganden für zukünftige Co-Kristallisationsexperimente.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Dissertation umfasst die Synthese von Wirkstoff-Molekülen sowie Oligonukleotid-gebundenen und fluoreszenzmarkierten Sonden zur Untersuchung von Adenosinrezeptoren (AR) und Dopaminrezeptoren (DR), zweier wichtiger Familien von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR).

4.1 Der Proximity Ligation Assay

Hauptziel der Forschungsarbeit ist die Synthese von Wirkstoff-Sonden zur Etablierung von *Proximity Ligation Assays* (PLA) für G-Protein-gekoppelte Adenosin- und Dopamin-Rezeptoren, speziell für die Subtypen A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃ und D₂/D₃.

Der klassische, antikörperbasierte PLA ermöglicht die Detektion und Lokalisation von Proteinen und Protein-Protein-Interaktionen in natürlichem Gewebe. Neben dem Antikörper enthält die Sonde ein Oligonukleotid, welches für die Detektion essenziell ist (Abbildung 59).

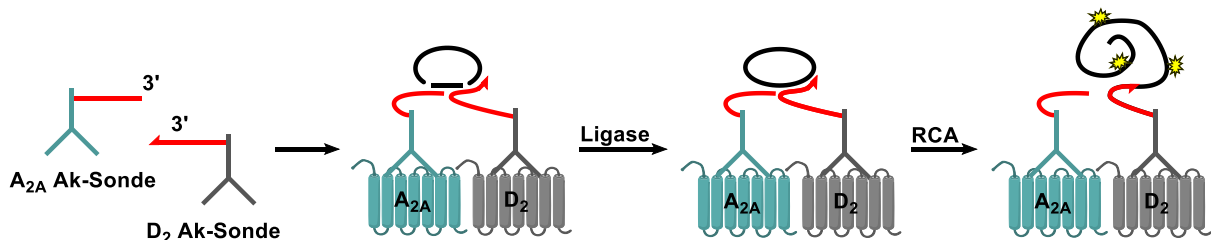


Abbildung 59: Schematischer Überblick über die experimentelle Anwendung des PLA. Im ersten Schritt werden die aus Antikörper und Oligonukleotid (roter Strang) bestehenden Sonden zu den zu untersuchenden Rezeptoren gegeben. Bilden diese Dimere, sind die Oligonukleotide in räumlicher Nähe und dienen als Templat für zwei Konnektoroligonukleotide (schwarze Stränge), die nachfolgend durch eine Ligase verbunden werden. In einer *Rolling Circle Amplification* (RCA) wird eines der Oligonukleotide (roter Strang mit Pfeil) als Primer verwendet und ein polymerer DNA-Strang erzeugt, der durch ein Fluorophor-gebundenes Oligonukleotid illuminiert werden kann.

Selektivitätsprobleme der Antikörper zu den Rezeptoren sowie der verhältnismäßig große Antikörper im Vergleich zum Rezeptor (ungefähr 3x größer) führen zu Schwierigkeiten bei der Anwendung des Assays. Mein Ziel war es deshalb, einen PLA zu entwickeln, der anstelle von Antikörpern auf „small molecules“ basiert. Um die Optimierung der Sonden zu gewährleisten, wurde ein Baukasten-artiges Konzept gewählt. Dieses besteht aus drei Teilen, dem Liganden, dem Linker und dem Oligonukleotid (Abbildung 60).

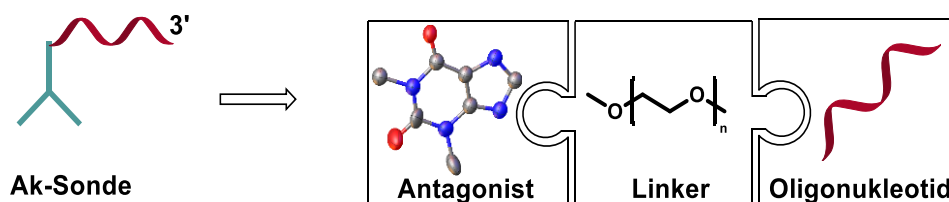


Abbildung 60: Die Antikörper-basierte Sonde soll in einem Baukasten-artigen Ansatz aus Antagonist, Linker und Oligonukleotid dargestellt werden.

Im ersten Schritt wurde für jeden AR- und DR-Subtyp ein Antagonist ausgewählt und modifiziert, um die Anknüpfung des Linkers zu ermöglichen (Abbildung 61, A). Nach Überprüfung der Bindungseigenschaften am jeweiligen Rezeptor wurde die Linkerlänge optimiert. Im letzten Schritt des *Proof of Principle* wurde ein Nukleosid angebunden, um einen Modell-Liganden zu erhalten. Die für die Rezeptoren (A_1AR , $A_{2A}AR$, A_3AR und D_2/D_3 -Rezeptoren) hergestellten Testsonden zeigten hohe Affinitäten und Selektivitäten (Abbildung 61, B).

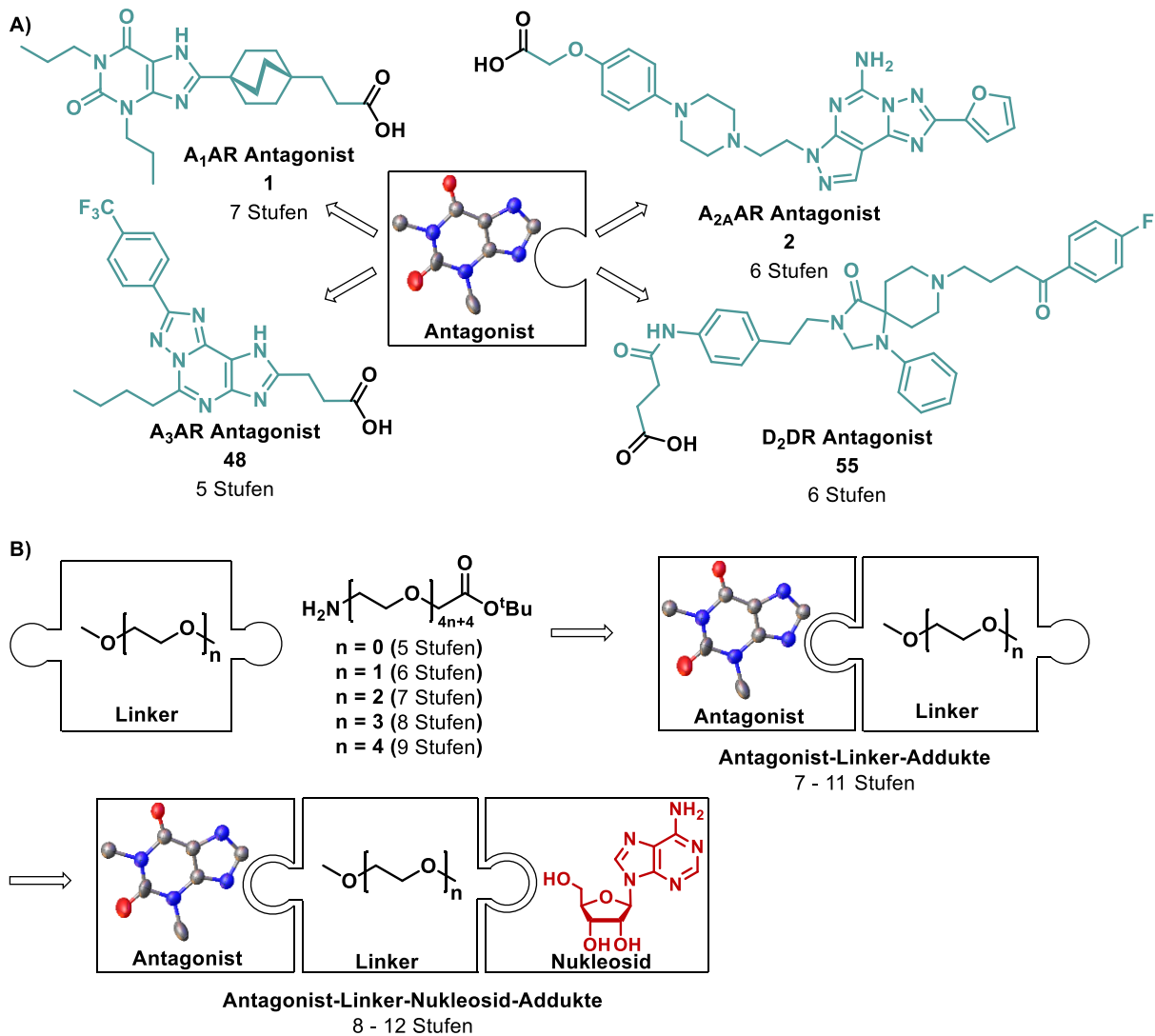


Abbildung 61: Vorgehensweise zum Erhalt der Sonden für den *Proof of Principle*. A) Insgesamt wurden 4 Antagonisten für die AR- und DR-Subtypen synthetisiert. B) Zur Linkeroptimierung wurden bifunktionalisierte PEG-Linker mit 4-20 Einheiten hergestellt und mit den Antagonisten verknüpft. Nachdem die optimale Linkerlänge basierend auf den biologischen Testergebnissen ermittelt worden war, konnte ein Nukleosid angeknüpft werden.

Die Synthese der finalen Sonden wurde an der Festphase durchgeführt. Hierfür wurde die festphasengebundene DNA zunächst mit dem optimierten Linker gekuppelt bevor die Antagonisten angebunden wurden. Die biologische Testung der erhaltenen Sonden steht noch aus.

Nachdem die Affinität der erhaltenen Sonden zu den Rezeptoren nachgewiesen wurde, folgen zwei weitere Schritte. Im ersten Schritt sollen zunächst eine Antagonist-basierte Sonde und eine Antikörper-Sonde für die Detektion von Rezeptordimeren eingesetzt werden (Abbildung 62 A). Im nachfolgenden Schritt soll mit zwei Antagonist-basierten Sonden gearbeitet werden (Abbildung 62 B).

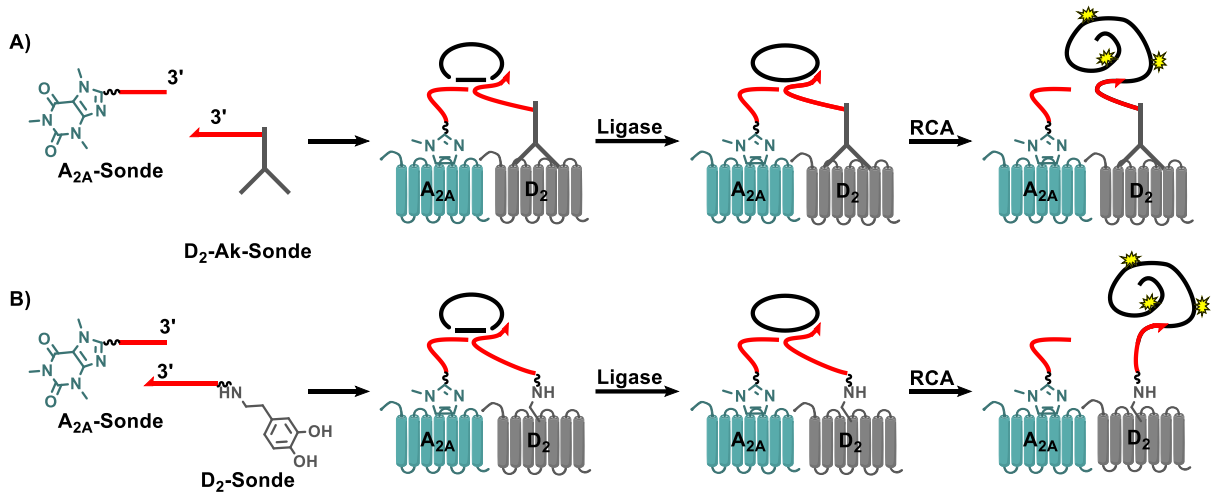


Abbildung 62: Darstellung der Dimererkennung am heteromeren Rezeptorpaar A_{2A}AR-D₂DR. A) Als erstes soll ein Hybridansatz aus Antagonist-basierter Sonde und Antikörper-basierter Sonde getestet werden. B) Im weiteren Verlauf sollen rein Antagonist-basierte Sonden verwendet werden (RCA = Rolling Circle Amplification).

Der Aufbau des Assays ist in Abbildung 63 schematisch dargestellt. Die beiden Sonden interagieren mit dem jeweiligen Rezeptor, wodurch sich die Oligonukleotide in räumlicher Nähe befinden. Eines der beiden ist dabei das *priming*-Oligonukleotid (Abbildung 63, blau), welches den Primer für die Polymerasekettenreaktion darstellt. Durch Zugabe der *connector*-Oligonukleotide (Abbildung 63, schwarz und grün) kann mittels Ligase der Kreis geschlossen werden, der im Folgenden für die *Rolling Circle Amplification* benötigt wird. Durch die Amplifikation des Templates entsteht ein DNA-Polymer. Durch einen Reporter, hier den Farbstoff ATTO-550, gebunden an eine DNA-Sequenz, deren Sequenz wiederum komplementär zur amplifizierten DNA ist, kann das Dimer visualisiert werden (Abbildung 63).

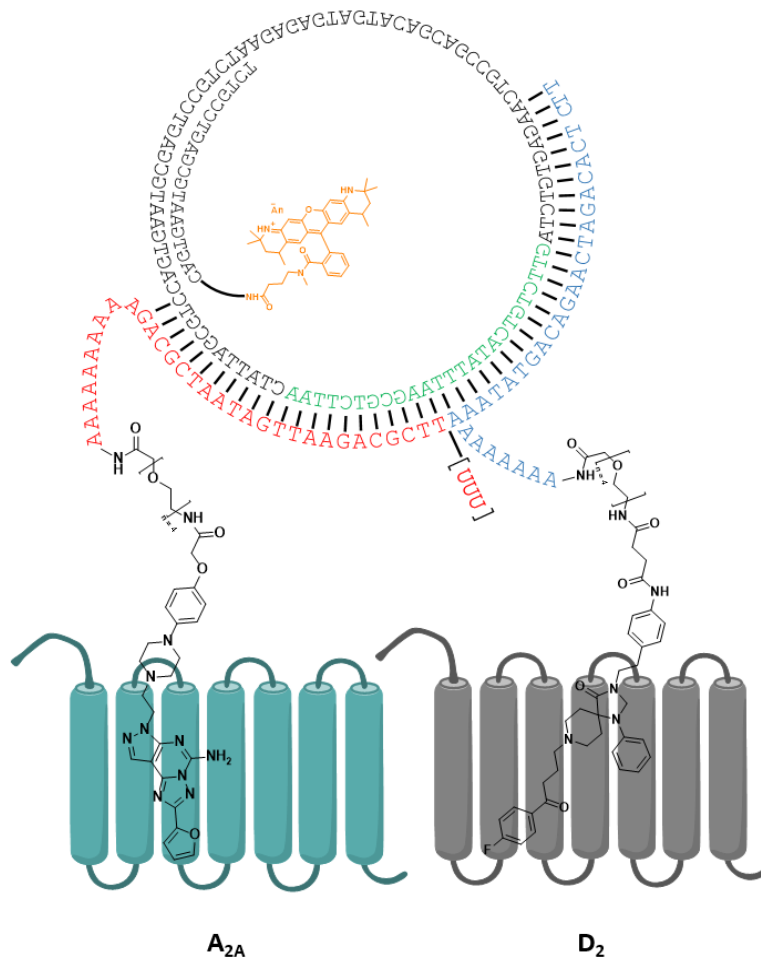


Abbildung 63: Vereinfachte Darstellung der Rezeptordimerdetektion am Beispiel des heteromeren A_{2A}AR–D₂DR Rezeptors. In rot ist das *non-priming*-Oligonucleotid, in blau das *priming*-Oligonucleotid dargestellt. In grün und schwarz lagern sich die *connector*-Oligonucleotide an. Im letzten Schritt kann das entstandene DNA-Polymer mittels Farbstoff (ATTO-550) visualisiert werden.

Nachdem der *Proof of Concept* in einem rekombinanten System erbracht wurde, soll natives Gewebe, wie z. B. Hirngewebe, untersucht werden.

Als weitere Experimente sind Nachweise von bekannten oder auch unbekanntem Rezeptor-Dimeren/Oligomeren und weiteren Protein-Protein-Interaktionen möglich (Tabelle 26).

Tabelle 26: Auswahl bekannter Rezeptorhomo- und heteromere, die mit den synthetisierten Sonden detektiert werden sollen.

	Rezeptoren	Literatur
Homomere	A ₁ AR – A ₁ AR	284
	A _{2A} AR – A _{2A} AR	285
	A ₃ AR – A ₃ AR	286
Dimere	A ₁ AR – A _{2A} AR	287
	A _{2A} AR – A _{2B} AR	288
	A _{2A} AR – D ₂ DR	213

4.2 Der fehlende A_{2B}AR-Antagonist

Im Zuge der Synthese der PLA-Sonden wurden auch Antagonisten für den A_{2B}AR synthetisiert. Der erste Antagonist basierte auf PSB-1901, bei dem der Brom-Substituent durch eine Carbonsäure ersetzt wurde (Abbildung 64). In einem zweiten Ansatz wurde ein A_{2B}AR-Antagonist modifiziert (unveröffentlichte Ergebnisse).

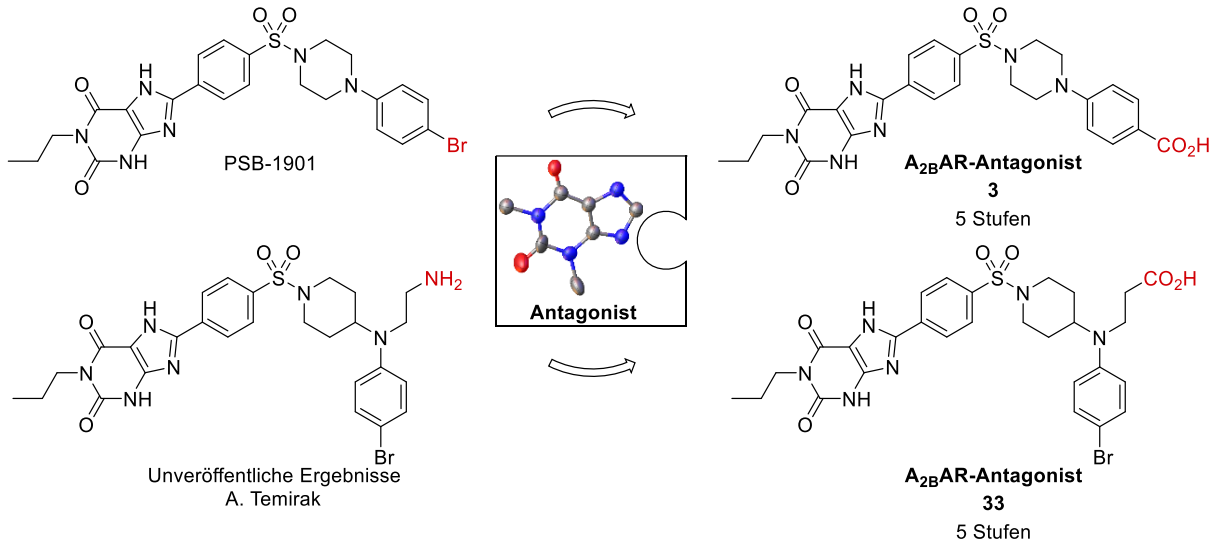


Abbildung 64: Die Vorlagen für die A_{2B}AR-Antagonisten und die davon abgeleiteten Strukturen.

Die Testergebnisse zeigen eine nur moderate Affinität der Verbindungen zum A_{2B}AR. Daraus ist abzuleiten, dass eine Carboxylatgruppe in diesen Positionen nicht toleriert wird. Durch Amidknüpfung an dieser Position wurde eine Carboxamidgruppe erzeugt, welche ebenfalls geringe Affinität aufwies. Diese Erkenntnisse leisten einen Beitrag zum Verständnis der Strukturwirkungsbeziehung des A_{2B}AR. Für die Entwicklung eines PLA-Liganden könnte zukünftig erneut auf Verbindung PSB-1901 als Ausgangsverbindung zurückgegriffen werden. Durch Einführung einer *o*- oder *m*-ständigen Carbonsäure-Funktion könnte der Bromsubstituent und damit die Affinität und Selektivität erhalten bleiben (Abbildung 65).

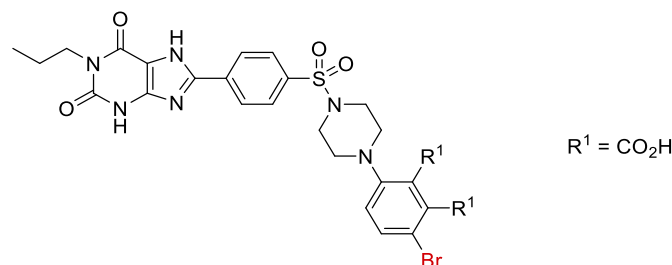


Abbildung 65: Der PSB-1901-Grundkörper mit möglichen Ansatzpunkten zur Derivatisierung.

4.3 Die Entwicklung des A₃AR-Liganden

Die Entwicklung des Liganden für den A₃AR beruht auf einem computerchemischen Ansatz, bei dem zunächst Rezeptormodelle erstellt und anschließend automatisiert bewertet wurden (Abbildung 66). Dies war erforderlich, da keine Kristallstruktur des A₃AR vorhanden ist und somit keine fundierten Aussagen über Bindungseigenschaften sowie Orientierungen der Liganden getroffen werden konnten. Der in KNIME²⁸⁹ programmierte Workflow dockt automatisch eine Bibliothek an Liganden in die generierten Homologiemodelle und bewertet anhand eines Scores die Güte der Modelle. Zusätzlich liefert er mittels einer *Ligand-Interaction-Map* einen Einblick in die Orientierung der Liganden im Rezeptor, wodurch eine Stelle für die Anknüpfung eines Linkers vorhergesagt werden kann.

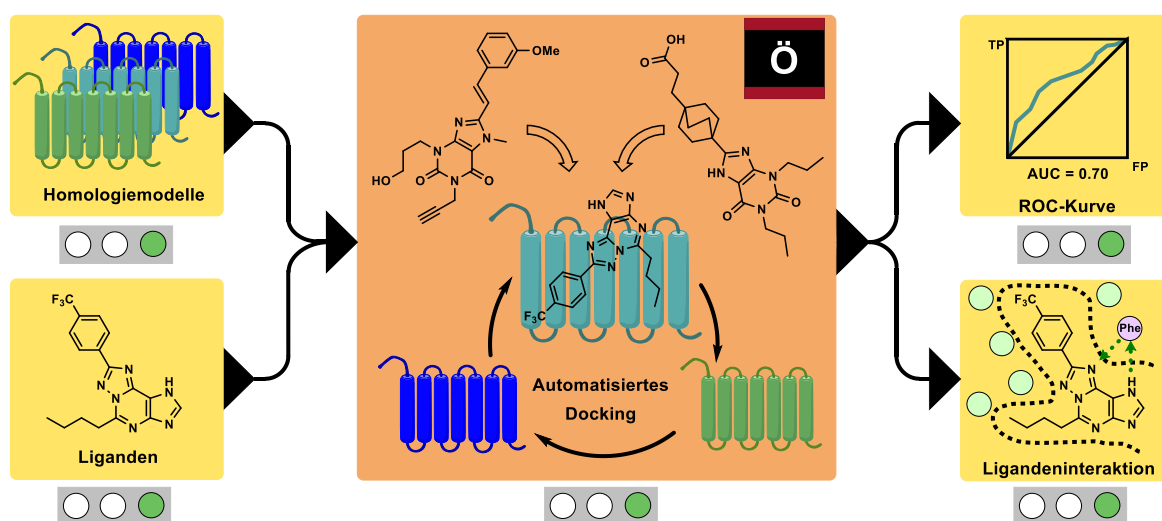


Abbildung 66: Schematische Darstellung des in KNIME entwickelten Workflows. Die gelben Quadrate symbolisieren Programme innerhalb des Workflows. Im „Homologiemodelle“-Quadrat werden die zuvor generierten Modelle eingelesen und verarbeitet, um sie in KNIME verwenden zu können. Unter „Liganden“ wird eine Bibliothek an selektiven und unselektiven Liganden eingelesen. Im Quadrat „ROC-Kurve“ wird das Ergebnis des Dockings bewertet, wobei der Area Under Curve (AUC)-Wert die Güte angibt. Unter „Ligandeninteraktion“ wird automatisiert die Interaktion des gedockten Liganden mit dem Rezeptor dargestellt, woraus ein Einblick in die Bindungseigenschaften und die Orientierung erhalten werden kann. Das orange Quadrat stellt den Prozess des Dockings dar, welcher mit dem bioinformatischen Programm „Schrödinger“ durchgeführt wurde. Dabei wird eine Bibliothek an Liganden in die Rezeptor-Modelle gedockt.

Ein modifizierter Ligand konnte in einer 5-stufigen, effizienten Synthese erhalten werden (Abbildung 67). Bei dieser Reaktionssequenz ist besonders die Rh-katalysierte CH-Aktivierung hervorzuheben, welche an diesem Scaffold zuvor noch nicht durchgeführt worden war und Ausbeuten von >80 % lieferte.

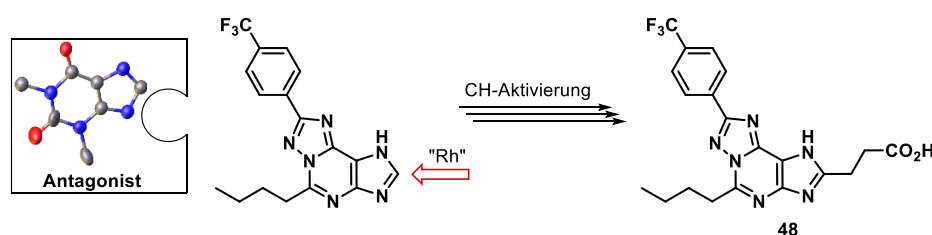


Abbildung 67: Darstellung des A₃AR-Antagonisten über eine Rh-katalysierte CH-Aktivierung.

4.4 Fluorophor-gebundene Sonden

Der Baukasten-artige Aufbau der Sonden für den PLA bot den Vorteil, auch weitere funktionelle Einheiten und Reporter-moleküle, wie Fluorophore, mit den Antagonisten zu verknüpfen (Abbildung 68). Insbesondere der für den A₃AR neu entwickelte Ligand wurde hierfür bereits genutzt. Dieser wurde mit verschiedenen Fluorophoren verknüpft, die einen großen Wellenlängenbereich von 450 nm – 700 nm abdecken. Alle hergestellten Fluorophor-markierten Liganden zeigten hohe Affinität und Selektivität zum Rezeptor.

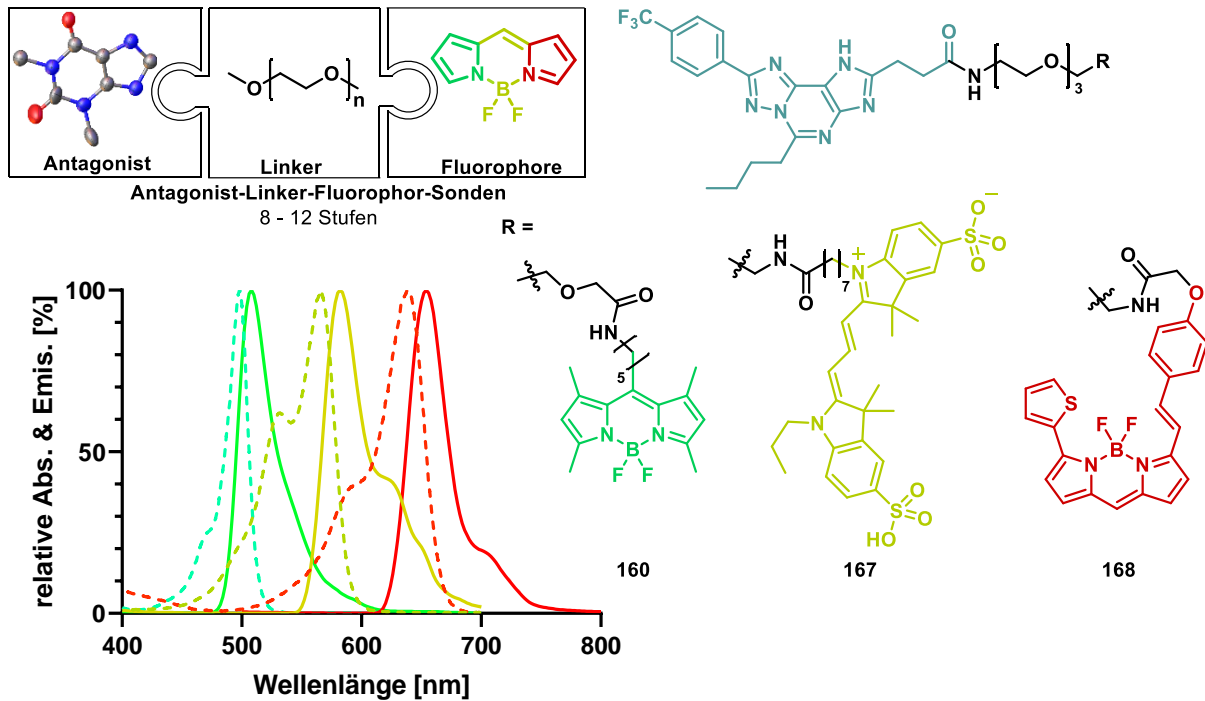


Abbildung 68: Das A₃AR-Linker-Addukt wurde mit BODIPY- und Cyanin-basierten Fluorophoren verknüpft. Damit wurden Fluorophor-gebundene Sonden für den Wellenlängenbereich von 450 nm – 700 nm erhalten.

4.5 Co-Kristallisationsexperimente

Die für den PLA synthetisierten Liganden wurden, neben ihrer Verwendung als Bausteine für Rezeptor-Sonden, auch für Rezeptor-Co-Kristallisationsexperimente genutzt.

4.5.1 A_{2A}AR-Liganden für die A_{2A}-Rezeptor-Co-Kristallisationen

Eines der hergestellten A_{2A}AR-Antagonisten-Linker-Addukte (**110**) zeigte sowohl in der Testung, als auch in Vorversuchen zu Co-Kristallisationsexperimenten herausragende Eigenschaften (Abbildung 69). Die Kristallisation des Rezeptors wurden von T. Claff, AK Müller, durchgeführt und in Kooperation mit Prof. Dr. J Labahn am DESY in Hamburg vermessen. Eine erste Auswertung der Röntgenstruktur zeigt die Kernstruktur des Antagonisten in der Bindungstasche des Rezeptors. Für den flexiblen PEG-Linker lässt sich keine diskrete Positionierung angeben.

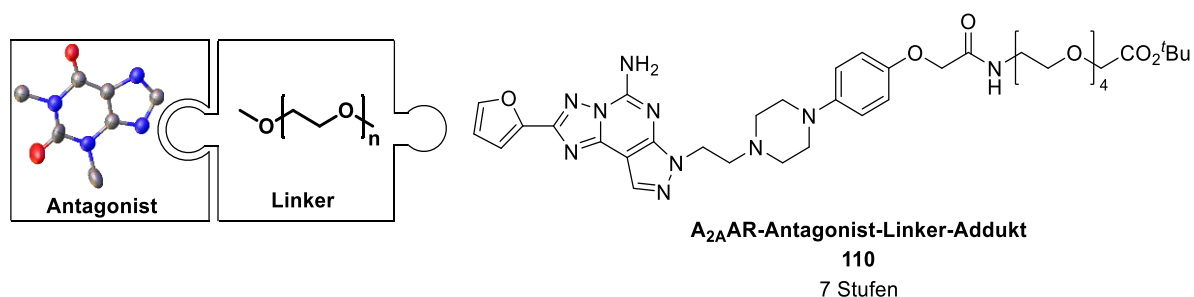


Abbildung 69: Darstellung des A_{2A}AR-Linker-Addukts für Co-Kristallisationsexperimente.

4.5.2 A₃AR-Liganden für die A₃-Rezeptor-Co-Kristallisation

Neben seiner Verwendung in PLA-Sonden und Fluoreszenzmarkern, findet der funktionalisierte neue A₃AR-Antagonist auch Anwendung in Rezeptor-Co-Kristallisationsexperimenten. Das hierfür durchgeführte Upscaling lieferte 350 mg der Verbindung bei 60 % Ausbeute über 5 Stufen. Zusätzlich wurde ein weiterer, speziesunabhängiger A₃-Ligand hergestellt, der für die Proteinkristallisationen des humanen und des Nagetier-A₃AR zur Verfügung steht und u. a. zur Aufklärung der Gründe für die hohe Speziesselektivität der meisten A₃AR-Antagonisten beitragen soll (Abbildung 70).

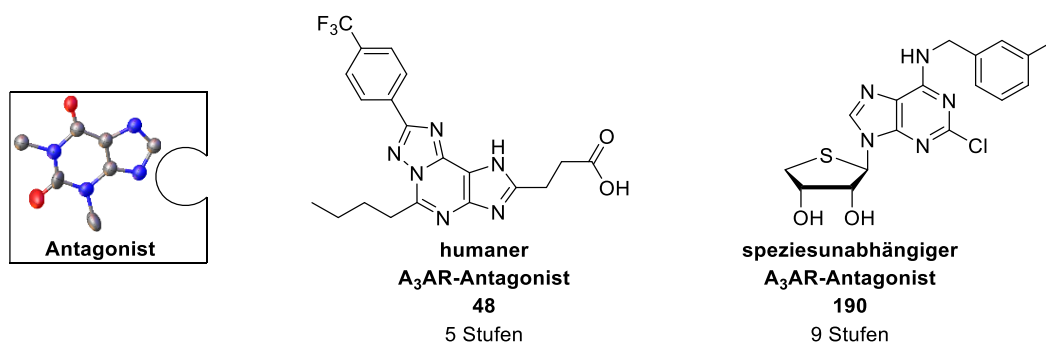


Abbildung 70: Antagonisten für den A₃AR, die für Rezeptor-Co-Kristallisationsexperimente synthetisiert wurden.

4.6 Polymergebundene A_{2A}AR-Antagonisten

Der Baukasten-artige Aufbau der Sonden wurde noch für ein weiteres Projekt, in Kooperation mit dem AK Nuhn, MPI für Polymerforschung in Mainz, genutzt. Der A_{2A}AR-Antagonist wurde an Polymere gebunden, aus denen Mizellen hergestellt werden (Abbildung 71, A). Diese Modifikation soll ein „Drug Targeting“ ermöglichen, also die Anreicherung des jeweiligen Wirkstoffs am Wirkort, um systemische Nebenwirkungen zu reduzieren oder zu verhindern. Die Mizellen sollen in die Peripherie von Krebszellen appliziert werden, wo sie durch den sauren pH-Wert in diesem Gewebe in Einzelstränge zerfallen und den Polymer-gebundenen Wirkstoff präsentieren (Abbildung 71, B). Durch die Bindung des Liganden an die Polymere wird dieser nicht im Körper verteilt, sondern verbleibt am gewünschten Zielort. Die Affinität des Polymer-gebundenen Liganden zum A_{2A}AR wird zurzeit noch untersucht und biologische Tierexperimente sind daraufhin geplant.

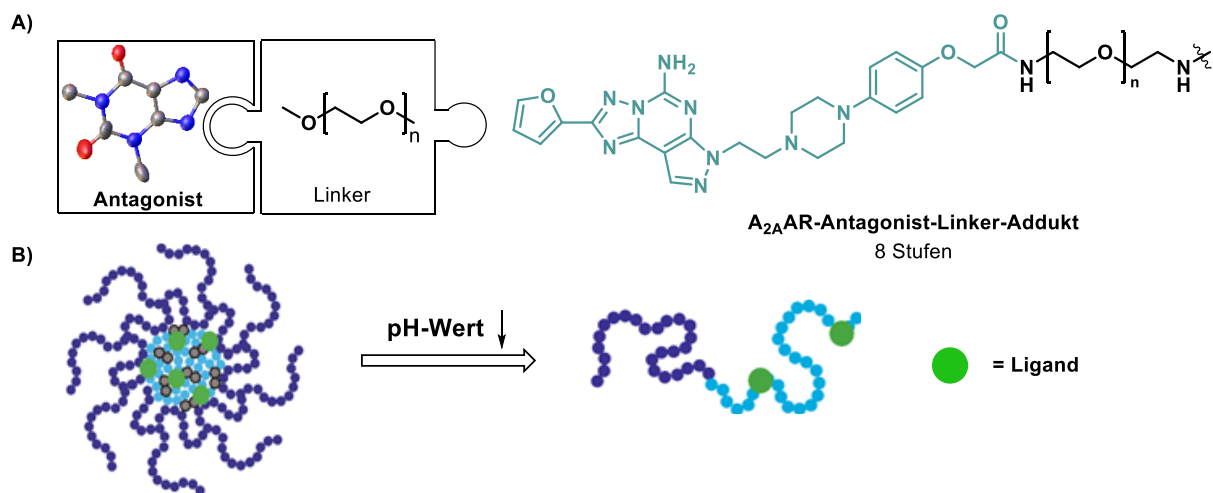


Abbildung 71: A) Darstellung des Liganden-Linker-Addukts in 8 Stufen. B) Die Mizelle zerfällt bei niedrigem pH-Wert zu einem Einzelstrang, an dem der Wirkstoff hängt.

5. Experimentalteil

5.1 Allgemeines

Die Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland), ABCR (Karlsruhe, Deutschland), oder TCI (Eschborn, Deutschland) erworben.

Die Lösungsmittel hatten HPLC-Qualität, trockene Lösemittel wurden von Acros Organics (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) erworben.

Die Dünnschichtchromatographie wurde mit vorbeschichteten Kieselgelplatten F₂₅₄ (Dicke 0,25 mm) oder mit Umkehrphasen-Kieselgelplatten 60 RP-18 F-254 von Merck durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels UV-Bestrahlung (254 nm, 366 nm) oder Anfärben (KMnO₄, Ninhydrin)

Für die Reaktionskontrolle wurde die Molmasse auf einem Advion Expression L APCI- oder ESI-MS-Gerät in Verbindung mit einer TLC-Schnittstelle gemessen.

Die Säulenchromatographie wurde auf Kieselgel 60 (35 – 70 µm) oder mit dem automatisierten Flash-Chromatographie-System Combiflash Rf 200 (Teledyne ISCO, Nebraska, USA) durchgeführt.

Die Endverbindungen wurden mit einem *reversed phase* HPLC-System von Knauer (Säule: C18ec, Länge x Innendurchmesser 250 x 20 mm, Nucleodur 100-5) gereinigt.

LCMS-System: Spektren wurden auf dem API2000 Massenspektrometer (ESI-Quelle, ABSciex, Darmstadt, Deutschland) verbunden mit dem Agilent HPLC HP1100 System (Säule: EC50/2 Nucleodur C18 Gravity 3 µm [Macherey-Nagel, Düren, Deutschland], CA, USA) bei einer Ofentemperatur von 25 °C aufgenommen. Als Lösemittel wurden Wasser (2 mM Ammoniumacetat, A) und Methanol oder Acetonitril (2 mM Ammoniumacetat in Methanol, B) verwendet. Der Gradient startet bei 90 % A und verläuft über 10 min zu 100 % B. Weitere 10 min wird mit 100 % B gespült. Die Flussrate liegt bei 0,3 mL/min. Die Proben wurden in Methanol (2 mM Ammoniumacetat) oder Acetonitril mit einer Endkonzentration von 1 mg/mL gelöst und 8 µL injiziert. Der *Total Ion Current* (TIC, positiv) wurden für den benötigten Bereich aufgenommen, standardmäßig im Bereich von 150 – 800 *m/z*. Die UV-Absorption wurde im Bereich von 190 – 900 nm mittels *Diode Array Detector* (DAD) detektiert, die Reinheit im Bereich von 220 – 400 nm bestimmt.

LCMS-QTOF: Spektren wurden auf dem micrOTOF-Q Massenspektrometer (ESI-Quelle, Bruker, Billerica, MA, USA) verbunden mit dem Dionex Ultimate 3000 HPLC System (Säule: EC50/2 Nucleodur C18 Gravity 3 µm [Macherey-Nagel, Düren, Deutschland] Thermo Fisher Scientific, MA, USA) bei einer Ofentemperatur von 25 °C aufgenommen. Als Lösemittel

wurden Wasser (2 mM Ammoniumacetat, A) und Acetonitril (B) verwendet. Der Gradient startet bei 90 % A für 1 min und verläuft über 9 min zu 100 % B. Weitere 5 min wird mit 100 % B gespült. Die Flussrate liegt bei 0,3 mL/min. Die Proben wurden in Methanol (2 mM Ammoniumacetat) oder Acetonitril mit einer Endkonzentration von 0,6 mg/mL gelöst und 1 μ L injiziert. Der *Total Ion Current* (TIC, positiv/negativ) wurden für den benötigten Bereich aufgenommen, standardmäßig im Bereich von 50 – 1000 *m/z*. Die UV-Absorption wurde im Bereich von 190 – 900 nm mittels *Diode Array Detector* (DAD) detektiert, die Reinheit im Bereich von 220 – 400 nm bestimmt. Das *Time of Flight* System ermöglicht die Aufnahme hochaufgelöster Massen.

^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden in CDCl_3 oder DMSO-d_6 auf einem Bruker Ascend 600 MHz NMR-Spektrometer (Bruker, Billerica, MA, USA) aufgenommen, das bei 600,18 MHz (^1H) bzw. 150,93 MHz (^{13}C) arbeitete. Die chemischen Verschiebungen (δ) werden in ppm angegeben und beziehen sich auf die chemischen Verschiebungen der restlichen Lösungsmittelprotonen, die in CDCl_3 (7,26 ppm für die ^1H -NMR-Spektren und 77,16 ppm für die ^{13}C -NMR-Spektren), in DMSO-d_6 (2,50 ppm für die ^1H -NMR-Spektren und 39,52 ppm für die ^{13}C -NMR-Spektren) vorhanden sind. Multiplizität: s, Singulett; d, Dublett; q, Quartett; p, Pentet; sext, Sextett, m, Multipllett. Kopplungskonstanten (J) sind in Hertz (Hz) angegeben.

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Büchi-545-Schmelzpunktgerät bestimmt.

5.1.1 Absorptions- / Emissionsspektren

Die UV-Spektren wurden mit einem Varian/Cary 50 Bio-Gerät (Agilent Technologies, USA) aufgenommen. Die Absorption wurde im Vergleich zu einem Leerwert von 300 bis 800 nm gemessen. Fluoreszenzspektren wurden auf einem Flx-Monaco-Spektrofluorometer (Monaco, Monaco) unter Verwendung einer Xenon-Lampe bei mittlerer Empfindlichkeit aufgenommen. Die eingestellten Bandbreiten betragen 5 nm für die Anregungs- und Emissionswellenlänge, die Emission wurde von 300 bis 800 nm aufgezeichnet. Die Anregungswellenlänge wurde entsprechend den Absorptionsmaxima der entsprechenden Verbindung eingestellt. Eine 10 mM oder 0,1 mM Stammlösung wurde in DMSO hergestellt. In eine Küvette, die 990 μ L Lösungsmittel (H_2O , CH_2Cl_2 , MeOH) und 9 μ L DMSO enthielt, wurde 1 μ L Stammlösung pipettiert und gemessen. Die endgültige DMSO-Konzentration betrug 1%, und die endgültige Substanzkonzentration betrug 10 μM für die UV-Bestimmung und 0,1 μM für Fluoreszenzspektren.

5.1.2 Festphasenreaktion

Die 5'-aminomodifizierte DNA Oligonukleotide, gebunden an *Controlled Porous Glass* (CPG, 500 Å) wurden von der Firma ELLA Biotech GmbH (Martinsried, Deutschland) hergestellt.

Das Waschen der Proben wurde mit Säulen in Verbindung mit der Einheit Vac-Man (Promega, Walldorf, Deutschland) durchgeführt.

Die analytische HPLC-Analyse wurde mit dem Agilent Chromatographen Serie 1100 durchgeführt, der mit einer 1100 Quaternärpumpe (G1311A), einem 1100 Multi-Wellenlängen-Detektor (G1365B) und einer Agilent Eclipse Plus C18(4,6 x 100 mm, 3,5 µm) Säule ausgestattet ist. Der Umsatz und die Reinheit von DNA-Konjugaten wurden durch Integration von Peaks bestimmt, die bei einer Wellenlänge von 254 nm aufgezeichnet wurden. Methode: Gradient von 10 % bis 70 % B innerhalb von 10 min, dann 70 % bis 100 % B innerhalb von 2 min gefolgt von 100 % B für 2 min unter Verwendung von 10 mM wässrigem Triethylammoniumacetat Puffer (pH = 8,0, Eluent A) und MeOH (Eluent B) bei einer Flussrate von 0,6 mL/min.

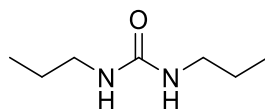
Semipräparative RP-HPLC: Die Reinigung der Verbindung wurde am Shimadzu Prominenz HPLC-System, das mit einer stationären C18-Phase ausgestattet ist (Phenomenex, Gemini, 5 µm, C18, 110 Å, 100 x 4,6 mm) durchgeführt. Laufmittel: 100 mM wässriger Triethylammoniumacetat Puffer (pH = 8,0, Eluent A) und MeOH (Eluent B) wurden bei einer Flussrate von 5 mL/min verwendet. Methode: Gradient von 20 % bis 70 % B innerhalb von 13 min, dann 70 % bis 100 % B innerhalb von 1 min, gefolgt von 100 % B für 3 min. Fraktionen, die das gewünschte Produkt enthielten, wurden vereint und mittels Lyophilisation konzentriert.

Reinheitsbestimmung: Spektren wurden mit dem Agilent 1260 Infinity II HPLC System (Säule: Polaris C18, 150 x 30 mm, 3 µm [MetaChem Technologies Inc., CA, USA], CA, USA) bei einer Ofentemperatur von 25 °C aufgenommen. Als Lösemittel wurden 10 mM wässriger Triethylammoniumacetat Puffer (pH = 8,0, A) und Methanol (B) verwendet. Der Gradient startet bei 90 % A für 1 min und verläuft über 9 min zu 70 % B. Über 2 min wird auf 100 % B gespült und für 8 min gehalten. Die Flussrate liegt bei 0,6 mL/min. Die Proben wurden in Wasser mit einer Endkonzentration von 1 mg/mL gelöst und 3 µL injiziert. Die UV-Absorption wurde im Bereich von 190 – 900 nm mittels *Diode Array Detector* (DAD) detektiert, die Reinheit im Bereich von 190 – 400 nm bestimmt.

Die MALDI-Spektren wurden am MALDI ultrafleXtreme TOF/TOF Flugzeitspektrometer der Firma Bruker Daltonik (Bremen) unter Verwendung der 2',4',6'-Trihydroxyacetophenon Matrix (Lösung 1 = THAP: 9 mg in Methanol: 100 µL; Lösung 2 = Ammoniumcitrat dibasisch: 11,3 mg in Wasser: 100 µL; Lösung 1 + Lösung 2: 100 µL + 40 µL)

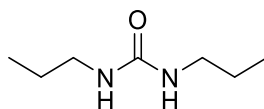
5.2 Synthese des Toponafylline-Derivats

Synthese von *N,N*-Dipropylharnstoff (I)²⁹⁰



Zu einer Lösung aus 1,3-Dioxolan-2-on (5.00 g, 56.8 mmol, 1.0 Äq.) und Propylamin (6.70 g, 113.3 mmol, 2.0 Äq.) wird Cs_2CO_3 (370 mg, 1.1 mmol, 0.02 Äq.) addiert und für 8 h auf 90 °C erhitzt. Die erhaltene Flüssigkeit wird in Wasser (50 mL) aufgenommen, mit CH_2Cl_2 (3x 50 mL) extrahiert, über MgSO_4 getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach Umkristallisieren aus Acetonitril wird kein Produkt erhalten.

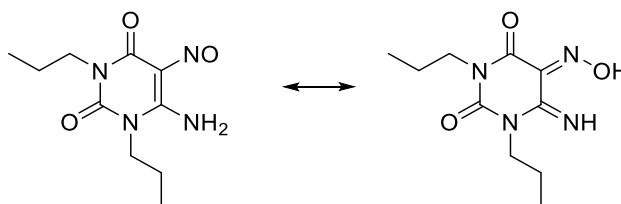
Synthese von *N,N*-Dipropylharnstoff (II)²⁹¹



Unter Schutzgas (Ar) wird Propylamin (1.09 g, 18.5 mmol, 5.5 Äq.) in CH_2Cl_2 (30 mL) gelöst und Triethylamin (2.0 g, 20.2 mmol, 6.0 Äq.) addiert. Das Reaktionsgemisch wird auf 0 °C gekühlt und Triphosgen (1.0 g, 3.36 mmol, 1.0 Äq.) in CH_2Cl_2 (12 mL) langsam zugetropft. Nach 12 h bei RT wird mit 1N HCl neutralisiert. Die Lösung wird mit Wasser (30 mL) gewaschen und die wässrige Phase mit CH_2Cl_2 (3 x 30 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der entstehende weiße Feststoff wird mit Acetonitril umkristallisiert. Das Produkt wird mit 313.0 g, 2.2 mmol, 63% erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 4.76 (s, 2H, NH), 3.11 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.5$ Hz, 4H, 2x NHCH_2), 1.50 (tq, $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz, 4H, 2x CH_2CH_3), 0.91 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 6H, 2x CH_2CH_3).
¹³C-NMR (151 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 158.9 (C_q , $\text{C}_{\text{Harnst.}}$), 42.4 (2x CH_2 , NHCH_2), 23.6 (2x CH_2 , NHCH_2CH_2), 11.5 (2x CH_3 , CH_2CH_3). **LC-MS:** positiv [m/z] = 144.8 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). **Reinheit:** 94%.

Synthese von 6-Amino-5-nitroso-1,3-dipropylpyrimidin-2,4-dion²⁶⁶

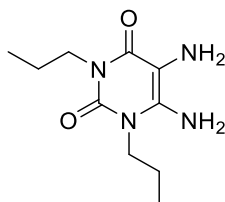


Eine Lösung aus 6-Amino-1,3-dipropylpyrimidin-2,4-dion (2 g, 9.5 mmol, 1.0 Äq.) in Essigsäure/Wasser (50% v/v, 25 mL) wird auf 55 °C erhitzt und NaNO_2 (819.6 mg, 11.9 mmol, 1.25 Äq.) portionsweise dazu gegeben. Die Reaktionslösung wird für 20 min bei 55 °C gerührt,

unter vermindertem Druck konzentriert und filtriert. Der pinke Feststoff wird mit Wasser (3 x 10 mL) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Produkt wird mit 2.15 g, 9.0 mmol und 94% (Lit.: 72%)²⁶⁶ erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 13.20 (s, 1H, OH), 9.09 (s, 1H, NH), 3.90–3.83 (m, 2H, NCH₂), 3.82–3.75 (m, 2H, NCH₂), 1.65–1.57 (m, 2H, CH₂CH₃), 1.58–1.49 (m, 2H, CH₂CH₃), 0.89 (q, ³J_{H,H} = 7.52 Hz, 6H, CH₂CH₃). **¹³C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 159.8 (C_q, C6), 149.0 (C_q, C4), 145.4 (C_q, C2), 138.9 (C_q, C5), 42.5 (CH₂, NCH₂), 42.4 (CH₂, NCH₂), 20.6 (CH₂, CH₂CH₃), 19.6 (CH₂, CH₂CH₃), 11.1 (CH₃, CH₂CH₃), 10.6 (CH₃, CH₂CH₃). **LC-MS**: positiv [*m/z*] = 240.9 ([M+H]⁺). **Reinheit**: 99% (LC-MS).

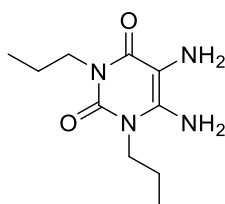
Synthese von 5,6-Diamino-1,3-dipropylpyrimidin-2,4-dion (I)²⁶⁶



Eine Lösung aus 6-Amino-5-nitroso-1,3-dipropylpyrimidin-2,4-dion (2 g, 8.3 mmol, 1.0 Äq.) in wässriger NH₄OH-Lösung (12.5 %, 23 mL) wird auf 70 °C erhitzt und Na₂S₂O₄ (3,2 g, 18.3 mmol, 2.2 Äq.) portionsweise zugegeben. Nach dem Farbwechsel der Reaktionslösung wird das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand auf 4 °C gekühlt. Der Rückstand wird filtriert und mit kaltem Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen unter vermindertem Druck wird das Produkt mit 840 mg, 3.7 mmol, 45% (Lit.: 67%)²⁶⁶ erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 6.14 (s, 2H, C6-NH₂), 3.83–3.76 (m, 2H, NCH₂), 3.75–3.70 (m, 2H, NCH₂), 2.88 (s, 2H, C5-NH₂), 1.59–1.50 (m, 2H, CH₂CH₃), 1.53–1.45 (m, 2H, CH₂CH₃), 0.85 (t, ³J_{H,H} = 7.41 Hz, 3H, CH₂CH₃), 0.81 (t, ³J_{H,H} = 7.46 Hz, 3H, CH₂CH₃). **¹³C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 158.8 (C_q, C4), 149.4 (C_q, C2), 144.2 (C_q, C6), 95.8 (C_q, C5), 43.5 (CH₂, NCH₂), 41.8 (CH₂, NCH₂), 20.9 (CH₂, CH₂CH₃), 20.8 (CH₂, CH₂CH₃), 11.1 (CH₃, CH₂CH₃), 10.7 (CH₃, CH₂CH₃). **LC-MS**: positiv [*m/z*] = 227.4 ([M+H]⁺). **Reinheit**: 89% (LC-MS).

Synthese von 5,6-Diamino-1,3-dipropylpyrimidin-2,4-dion (II)²⁶⁶

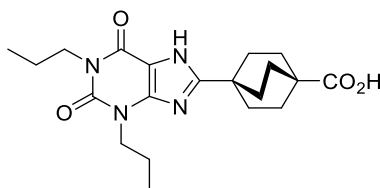


Zu einer stark gerührten Lösung aus 6-Amin-5-nitroso-1,3-dipropylpyrimidin-2,4-dion (2.11 g, 8.78 mmol, 1.0 Äq.) in Ethylacetat/Wasser (2:1, 40 mL) wird Na₂S₂O₄ (8.7 g, 50.4 mmol,

5.7 Äq.) portionsweise addiert, bis die Farbe von pink auf gelb umschlägt. Die Reaktionslösung wird mit Wasser (20 mL) versetzt und die wässrige Phase mit Ethylacetat (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel und vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wird mit 1.95 g, 8.6 mmol, 98% (Lit.: 67%)²⁶⁶ erhalten.

LC-MS: positiv [*m/z*] = 227.3 ([M+H]⁺). **Reinheit:** 80% (LC-MS).

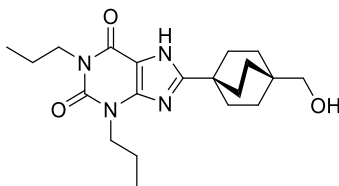
Synthese von 4-(2,6-Dioxo-1,3-dipropyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*-purin-8-yl)-bicyclo[2.2.2]octane-1-carbonsäure²⁶²



Unter Schutzgas (Ar) wird Bicyclo[2.2.2]octan-1,4-dicarboxylsäure (1.47 g, 6.9 mmol, 1.0 Äq.) und HATU (2.89 g, 7.6 mmol, 1.1 Äq.) in Acetonitril (10 mL) gelöst und 5 min gerührt. Separat werden 5,6-Diamino-1,3-dipropylpyrimidin-2,4-dion (2.00 g, 7.6 mmol, 1.1 Äq.) und Triethylamin (3.00 g, 29.7 mmol, 4.3 Äq.) in Acetonitril (20 mL) gelöst und nach 5-minütigem Rühren zu der aktivierten Säure gegeben. Nach 1 h bei RT wird das Lösemittel entfernt und der Rückstand in Ethylacetat/10% Zitronensäure (1:1, 80 mL) aufgenommen. Die wässrige Phase wird mit Ethylacetat (3x 20 mL) extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit ges. NaHCO₃-Lösung (100 mL) gewaschen. Das Lösemittel wird unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Feststoff säulenchromatographisch an SiO₂ (Dichlormethan:MeOH 98:2) gereinigt. Dabei werden 2.70 g, 6.4 mmol, 93% des Amids erhalten. Dieses wird in 1N NaOH (30 mL) aufgenommen. Nach 1 h unter Reflux wird das Reaktionsgemisch abgekühlt und mit konz. HCl versetzt, bis ein weißer Niederschlag entsteht. Der Feststoff wird filtriert und mit Wasser gewaschen. Das Produkt wird mit 2.10 g, 5.4 mmol, 84% bzw. 78% (Lit.: 87%)²⁶² über zwei Schritte erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 12.91 (s, 1H, NH), 12.07 (s, 1H, COOH), 3.95–3.90 (m, 2H, CH₂), 3.86–3.79 (m, 2H, CH₂), 1.92–1.84 (m, 6H, 3x CH₂), 1.80–1.73 (m, 6H, 3x CH₂), 1.72–1.62 (m, 2H, CH₂), 1.60–1.49 (m, 2H, CH₂), 0.88–0.82 (m, 6H, 2x CH₃). **¹³C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 178.4 (C_q, C_{Säure}), 160.2 (C_q, C8), 153.9 (C_q, C4), 150.6 (C_q, C2), 147.3 (C_q, C6), 106.4 (C_q, C5), 44.2 (NCH₂), 41.9 (NCH₂), 37.7 (C_q), 33.2 (C_q), 29.4 (3x CH₂), 27.6 (3x CH₂), 20.8 (CH₂CH₃), 20.8 (CH₂CH₃), 11.1 (CH₃), 10.9 (CH₃). **Schmelzpunkt:** >300 °C. **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 389.1 ([M+H]⁺). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₂₀H₂₇N₄O₄ [M-H]⁻: 387.2038; gefunden: 387.2039. **Reinheit:** 99% (LC-MS).

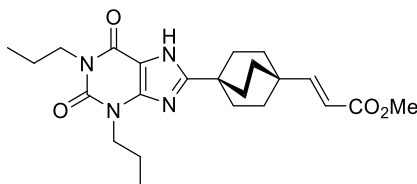
Synthese von 8-(4-Hydroxymethyl-bicyclo[2.2.2]oct-1-yl)-1,3-dipropyl-3,7-dihydropurin-2,6-dion²⁶²



Unter Schutzgas (Ar) wird 4-(2,6-Dioxo-1,3-dipropyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*-purin-8-yl)-bicyclo[2.2.2]octane-1-carbonsäure (500 mg, 1.29 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem THF (15 mL) gelöst und auf -78°C gekühlt. Folgend wird LiAlH₄ (107 mg, 2.83 mmol, 2.2 Äq.) addiert für 1h bei 0 °C und anschließend auf RT erwärmt. Nach 2 h wird mit 1M HCl die Reaktion unterbrochen und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach Extraktion mit Ethylacetat (3x 20 mL) werden die vereinten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wird mit 483 mg, 1.29 mmol, 100% erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 12.83 (s, 1H, NH), 4.34 (t, ³J_{H,H} = 5.40 Hz, 1H, OH), 3.95–3.90 (m, 2H, NCH₂), 3.85–3.80 (m, 2H, NCH₂), 3.07 (d, ³J_{H,H} = 5.39 Hz, 2H, CH₂OH), 1.88–1.81 (m, 6H, 3x CH₂), 1.71–1.63 (m, 2H, CH₂CH₃), 1.59–1.50 (m, 2H, CH₂CH₃), 1.45–1.38 (m, 6H, 3x CH₂), 0.88–0.82 (m, 6H, 2x CH₃). **¹³C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 160.9 (C_q, C8), 153.9 (C_q, C4), 150.6 (C_q, C2), 147.4 (C_q, C6), 106.3 (C_q, C5), 69.3 (CH₂OH), 44.2 (NCH₂), 41.9 (NCH₂), 33.7 (C_q), 32.8 (C_q), 29.8 (3xCH₂), 27.5 (3xCH₂), 20.8 (CH₂CH₃), 20.8 (CH₂CH₃), 11.1 (CH₃), 11.0 (CH₃). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 375.2 ([M+H]⁺). **Reinheit:** 99% (LC-MS).

Synthese von 4-(*E*)-3-[4-(2,6-Dioxo-1,3-dipropyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*-purin-8-yl)-bicyclo[2.2.2]oct-1-yl]-acrylsäuremethylester²⁶²

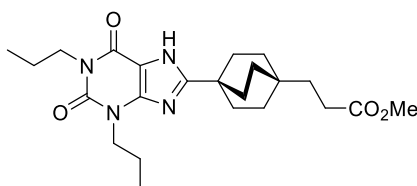


Das Edukt 8-(4-Hydroxymethyl-bicyclo[2.2.2]oct-1-yl)-1,3-dipropyl-3,7-dihydropurin-2,6-dion (458 mg, 1.23 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (27 mL) gelöst und Dess-Martin-Periodinan (625 mg, 1.47 mmol, 1.2 Äq.) addiert. Nach einer Stunde wird ein weiteres Äquivalent DMP dazu gegeben und für weitere 30 min gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit ges. NaHCO₃-Lösung (50 mL) gewaschen und die wässrige Phase mit Dichlormethan (3x 20 mL) extrahiert. Nach Trocknen über MgSO₄ wird das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt.

Unter Schutzgas (Ar) werden Trimethylphosphonoacetat (492 mg, 2.7 mmol, 2.2 Äq.) und Kaliumhexamethyldisilazan (0.5M Lösung in Toluol, 10.8 mL, 5.4 mmol, 4.4 Äq.) für 30 min bei 0 °C gerührt. Folgend wird der Aldehyd (1.23 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben und für 18 h bei RT gerührt. Das Toluol wird unter vermindertem Druck entfernt und mittels säulenchromatographischer Reinigung an SiO₂ (Dichlormethan:Methanol 100:0 zu 98:2) das Produkt mit 300 mg, 0.7 mmol, 57% (Lit.: 57%)²⁶² erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 12.93 (bs, 1H, NH), 6.84 (d, ³J_{H,H} = 16.0 Hz, 1H, COCH), 5.71 (d, ³J_{H,H} = 16.0 Hz, 1H, COCHCH), 3.95–3.90 (m, 2H, NCH₂), 3.85–3.80 (m, 2H, NCH₂), 3.65 (s, 3H, COOCH₃), 1.93–1.87 (m, 6H, 3x CH₂), 1.71–1.63 (m, 2H, CH₂CH₃), 1.63–1.58 (m, 6H, 3x CH₂), 1.58–1.49 (m, 2H, CH₂CH₃), 0.85 (m, 6H, 2x CH₂CH₃). **¹³C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 166.5 (C_q, COOCH₃) 160.3 (C_q, C8), 156.9 (CH, COCHCH), 153.9 (C_q, C4), 150.7 (C_q, C2), 147.4 (C_q, C6), 117.2 (CH₂, COCHCH) 106.4 (C_q, C5), 51.3 (COOCH₃), 44.2 (NCH₂), 42.0 (NCH₂), 33.6 (C_q), 33.5 (C_q), 29.6 (3xCH₂), 29.5 (3xCH₂), 20.9 (CH₂CH₃), 20.8 (CH₂CH₃), 11.1 (CH₃), 11.0 (CH₃). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 429.0 ([M+H]⁺). **Reinheit:** 94% (LC-MS).

Synthese von 3-[4-(2,6-Dioxo-1,3-dipropyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*-purin-8-yl)-bicyclo[2.2.2]oct-1-yl]-propionsäuremethylester²⁶²

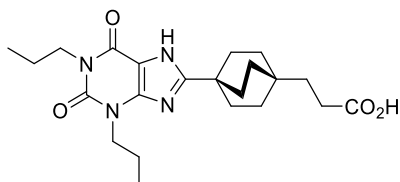


Unter Schutzgas (Ar) wird 4-(*E*)-3-[4-(2,6-Dioxo-1,3-dipropyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*-purin-8-yl)-bicyclo[2.2.2]oct-1-yl]-acrylsäuremethylester (300 mg, 0.7 mmol, 1.0 Äq.) in Methanol (30 mL) gelöst und 10% Pd/C (30 mg) addiert. Die Atmosphäre wird von Ar auf H₂ gewechselt und 3 h bei RT stark gerührt. Die Reaktionsmischung wird über Celite filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wird mit 376 mg, 0.64 mmol, 92% (Lit.: 74%)²⁶² erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 12.86 (bs, 1H, NH), 3.94–3.90 (m, 2H, NCH₂), 3.85–3.79 (m, 2H, NCH₂), 3.58 (s, 3H, COOCH₃), 2.26–2.20 (m, 2H, COCH₂CH₂) 1.87–1.81 (m, 6H, 3x CH₂), 1.70–1.63 (m, 2H, CH₂CH₃), 1.63–1.58 (m, 6H, 3x CH₂), 1.59–1.49 (m, 2H, CH₂CH₃), 1.43–1.37 (m, 8H, 3x CH₂ + COCH₂CH₂), 0.85 (m, 6H, 2x CH₂CH₃). **¹³C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 173.8 (C_q, COOCH₃), 160.8 (C_q, C8), 154.0 (C_q, C4), 150.6 (C_q, C2), 147.4 (C_q, C6), 106.4 (C_q, C5), 51.3 (CH₃, COOCH₃), 44.2 (CH₂, NCH₂), 41.9 (CH₂, NCH₂), 35.6 (CH₂, COCH₂CH₂), 33.3 (C_q), 30.1 (3x CH₂), 29.9 (C_q), 29.8 (3x CH₂), 28.4 (CH₂,

COCH₂CH₂), 20.8 (CH₂, 2x CH₂CH₃), 11.1 (CH₃, CH₂CH₃), 11.0 (CH₃, CH₂CH₃). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 431.1 ([M+H]⁺). **Reinheit:** 94% (LC-MS).

Synthese von 3-[4-(2,6-Dioxo-1,3-dipropyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*-purin-8-yl)-bicyclo[2.2.2]oct-1-yl]-propionsäure²⁶²



Der vorangegangene Methylester (276 mg, 0.64 mmol, 1.0 Äq.) wird in 2M NaOH (20 mL) gelöst und für bei 100 °C erhitzt. Der Reaktionslösung wird konz. HCl hinzugegeben, bis kein weiterer Niederschlag gebildet wird. Nach Filtration und Trocknen über Hochvakuum wird das Produkt mit 234 mg, 0.56 mmol, 88% (Lit.: 74%)²⁶² erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 12.86 (bs, 1H, NH), 11.98 (s, 1H, COOH), 3.94–3.90 (m, 2H, NCH₂), 3.85–3.80 (m, 2H, NCH₂), 2.16–2.10 (m, 2H, COCH₂CH₂) 1.87–1.81 (m, 6H, 3x CH₂), 1.71–1.63 (m, 2H, CH₂CH₃), 1.63–1.58 (m, 6H, 3x CH₂), 1.58–1.50 (m, 2H, CH₂CH₃), 1.43–1.35 (m, 8H, 3x CH₂ + CH₂, COCH₂CH₂), 0.85 (m, 6H, 2x CH₂CH₃). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 175.0 (C_q, COOH), 160.7 (C_q, C8), 153.9 (C_q, C4), 150.6 (C_q, C2), 147.4 (C_q, C6), 106.3 (C_q, C5), 51.3 (CH₃, COOCH₃), 44.2 (CH₂, NCH₂), 41.9 (CH₂, NCH₂), 35.7 (CH₂, COCH₂CH₂), 33.3 (C_q), 30.1 (3x CH₂), 29.9 (C_q), 29.8 (3x CH₂), 28.7 (CH₂, COCH₂CH₂), 20.8 (CH₂, CH₂CH₃), 20.8 (CH₂, CH₂CH₃), 11.1 (CH₃, CH₂CH₃), 11.0 (CH₃, CH₂CH₃). **Schmelzpunkt:** 272.1–275.8 °C. **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 417.0 ([M+H]⁺). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₂₂H₃₁N₄O₄ [M-H]⁻: 415.2351; gefunden: 415.2353. **Reinheit:** 97% (LC-MS).

Röntgeneinkristallstrukturanalyse von Toponafylline

Table 1 Crystal data and structure refinement for cu_5694f_pl.	
Identification code	GPHARM72, TK-TO-011 // GXraycu_5694f_pl
Crystal Habitus	clear colourless needle
Device Type	Bruker D8-Venture
Empirical formula	C ₂₂ H ₃₂ N ₄ O ₄
Moiety formula	C ₂₂ H ₃₂ N ₄ O ₄
Formula weight	416.51
Temperature/K	150
Crystal system	monoclinic
Space group	P2 ₁ /c
a/Å	16.840(3)
b/Å	19.207(3)
c/Å	13.741(3)
α/°	90

EXPERIMENTALTEIL

$\beta/^\circ$	99.281(12)
$\gamma/^\circ$	90
Volume/ \AA^3	4386.3(14)
Z	8
$\rho_{\text{calc}}/\text{g/cm}^3$	1.261
μ/mm^{-1}	0.713
F(000)	1792.0
Crystal size/ mm^3	$0.3 \times 0.06 \times 0.03$
Absorption correction	empirical
Tmin; Tmax	0.4043; 0.7536
Radiation	CuK α ($\lambda = 1.54178$)
2 Θ range for data collection/ $^\circ$	5.318 to 135.48 $^\circ$
Completeness to theta	0.982
Index ranges	$-19 \leq h \leq 20, -22 \leq k \leq 22, -16 \leq l \leq 16$
Reflections collected	39481
Independent reflections	7805 [$R_{\text{int}} = 0.5911, R_{\text{sigma}} = 0.3236$]
Data/restraints/parameters	7805/301/547
Goodness-of-fit on F^2	1.433
Final R indexes [$I \geq 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.2169, wR_2 = 0.4940$
Final R indexes [all data]	$R_1 = 0.3937, wR_2 = 0.5836$
Largest diff. peak/hole / $e \text{\AA}^{-3}$	0.72/-0.58

Table 2 Bond Lengths for cu_5694f_pl.

Atom	Atom	Length/ \AA	Atom	Atom	Length/ \AA
O3	C22	1.129 (16)	O1'	C1'	1.257 (14)
O1	C1	1.215 (14)	O4'	C22'	1.328 (18)
O4	C22	1.3797 (11)	O2'	C4'	1.205 (14)
O2	C4	1.232 (17)	O3'	C22'	1.213 (18)
N1	C3	1.377 (16)	N3'	C11'	1.370 (15)
N1	C4	1.359 (17)	N3'	C2'	1.381 (15)
N1	C5	1.498 (17)	N4'	C11'	1.347 (15)
N4	C11	1.350 (15)	N4'	C3'	1.378 (14)
N4	C3	1.351 (15)	N2'	C1'	1.402 (15)
N2	C1	1.408 (16)	N2'	C8'	1.467 (15)
N2	C4	1.346 (18)	N2'	C4'	1.390 (16)
N2	C8	1.508 (15)	N1'	C3'	1.375 (15)
N3	C11	1.359 (15)	N1'	C5'	1.458 (16)
N3	C2	1.431 (16)	N1'	C4'	1.414 (15)
C10	C9	1.52 (2)	C11'	C12'	1.514 (17)
C11	C12	1.470 (17)	C1'	C2'	1.390 (17)
C2	C1	1.390 (17)	C2'	C3'	1.345 (17)
C2	C3	1.358 (17)	C12'	C16'	1.507 (17)
C22	C21	1.516 (19)	C12'	C18'	1.545 (18)

EXPERIMENTALTEIL

C13	C12	1.528 (18)	C12'	C13'	1.507 (19)
C13	C14	1.563 (16)	C16'	C17'	1.508 (17)
C12	C17	1.561 (18)	C5'	C6'	1.467 (19)
C12	C19	1.499 (17)	C7'	C6'	1.505 (18)
C21	C20	1.57 (2)	C21'	C22'	1.530 (18)
C15	C20	1.520 (17)	C21'	C20'	1.50 (2)
C15	C18	1.518 (19)	C19'	C15'	1.533 (19)
C15	C14	1.549 (17)	C19'	C18'	1.555 (17)
C15	C16	1.513 (17)	C17'	C15'	1.501 (19)
C9	C8	1.563 (19)	C8'	C9'	1.468 (17)
C18	C19	1.575 (16)	C14'	C15'	1.527 (18)
C7	C6	1.57 (2)	C14'	C13'	1.515 (17)
C16	C17	1.524 (17)	C20'	C15'	1.557 (18)
C5	C6	1.46 (2)	C10'	C9'	1.542 (17)

Table 3 Bond Angles for cu_5694f_pl.

Atom	Atom	Atom	Angle/°	Atom	Atom	Atom	Angle/°
C3	N1	C5	117.4 (10)	C11'	N3'	C2'	107.5 (10)
C4	N1	C3	118.4 (12)	C11'	N4'	C3'	103.1 (10)
C4	N1	C5	124.1 (12)	C1'	N2'	C8'	118.8 (10)
C11	N4	C3	106.9 (10)	C4'	N2'	C1'	125.9 (11)
C1	N2	C8	117.7 (11)	C4'	N2'	C8'	115.2 (10)
C4	N2	C1	125.4 (11)	C3'	N1'	C5'	121.9 (10)
C4	N2	C8	116.7 (11)	C3'	N1'	C4'	118.3 (11)
C11	N3	C2	108.4 (11)	C4'	N1'	C5'	119.8 (10)
N4	C11	N3	109.0 (11)	N3'	C11'	C12'	125.3 (12)
N4	C11	C12	126.3 (11)	N4'	C11'	N3'	111.3 (11)
N3	C11	C12	124.2 (12)	N4'	C11'	C12'	123.4 (11)
C1	C2	N3	131.1 (12)	O1'	C1'	N2'	118.8 (11)
C3	C2	N3	103.1 (11)	O1'	C1'	C2'	127.9 (12)
C3	C2	C1	124.9 (12)	C2'	C1'	N2'	113.3 (11)
O3	C22	O4	120.2 (13)	N3'	C2'	C1'	131.9 (12)
O3	C22	C21	128.5 (12)	C3'	C2'	N3'	104.7 (10)
O4	C22	C21	110.8 (12)	C3'	C2'	C1'	123.3 (12)
C12	C13	C14	108.1 (10)	N1'	C3'	N4'	124.1 (12)
C11	C12	C13	111.2 (10)	C2'	C3'	N4'	113.4 (11)
C11	C12	C17	110.2 (11)	C2'	C3'	N1'	122.5 (11)
C11	C12	C19	109.4 (11)	C11'	C12'	C18'	108.5 (11)
C13	C12	C17	108.3 (11)	C16'	C12'	C11'	109.6 (11)
C19	C12	C13	109.1 (11)	C16'	C12'	C18'	108.2 (11)
C19	C12	C17	108.6 (10)	C16'	C12'	C13'	110.5 (11)
C22	C21	C20	113.9 (11)	C13'	C12'	C11'	109.9 (10)
C20	C15	C14	111.6 (11)	C13'	C12'	C18'	110.1 (11)

EXPERIMENTALTEIL

C18	C15	C20	107.2 (10)	C12'	C16'	C17'	110.1 (11)
C18	C15	C14	106.5 (11)	N1'	C5'	C6'	112.3 (11)
C16	C15	C20	114.9 (11)	C20'	C21'	C22'	109.2 (12)
C16	C15	C18	108.1 (11)	O4'	C22'	C21'	113.6 (15)
C16	C15	C14	108.3 (10)	O3'	C22'	O4'	121.0 (13)
C10	C9	C8	110.2 (14)	O3'	C22'	C21'	125.4 (16)
C15	C20	C21	114.2 (10)	C15'	C19'	C18'	112.9 (10)
O1	C1	N2	119.4 (11)	C15'	C17'	C16'	112.4 (11)
O1	C1	C2	129.3 (13)	N2'	C8'	C9'	113.9 (11)
C2	C1	N2	111.2 (12)	C13'	C14'	C15'	113.3 (11)
C15	C18	C19	109.6 (10)	C21'	C20'	C15'	113.6 (12)
C15	C14	C13	109.8 (10)	C19'	C15'	C20'	113.9 (11)
C15	C16	C17	111.7 (11)	C17'	C15'	C19'	105.0 (11)
N4	C3	N1	127.9 (12)	C17'	C15'	C14'	108.3 (11)
N4	C3	C2	112.4 (12)	C17'	C15'	C20'	109.3 (11)
C2	C3	N1	119.5 (12)	C14'	C15'	C19'	107.2 (11)
C16	C17	C12	108.2 (10)	C14'	C15'	C20'	112.8 (12)
O2	C4	N1	117.5 (14)	O2'	C4'	N2'	123.7 (12)
O2	C4	N2	122.5 (13)	O2'	C4'	N1'	119.6 (12)
N2	C4	N1	119.9 (13)	N2'	C4'	N1'	116.6 (11)
C12	C19	C18	109.1 (10)	C5'	C6'	C7'	111.6 (13)
N2	C8	C9	111.8 (11)	C8'	C9'	C10'	109.5 (11)
C6	C5	N1	114.3 (13)	C12'	C18'	C19'	106.7 (11)
C5	C6	C7	113.6 (13)	C12'	C13'	C14'	108.5 (11)

Table 4 Torsion Angles for cu_5694f_pl.

A	B	C	D	Angle/°	A	B	C	D	Angle/°
O3	C22	C21	C20	103 (2)	O1'	C1'	C2'	N3'	-4 (2)
O4	C22	C21	C20	-67.8 (18)	O1'	C1'	C2'	C3'	-178.1 (14)
N1	C5	C6	C7	67.3 (16)	N3'	C11'	C12'	C16'	-168.2 (12)
N4	C11	C12	C13	142.3 (13)	N3'	C11'	C12'	C18'	-50.2 (17)
N4	C11	C12	C17	22.3 (19)	N3'	C11'	C12'	C13'	70.1 (16)
N4	C11	C12	C19	-97.1 (16)	N3'	C2'	C3'	N4'	0.3 (15)
N3	C11	C12	C13	-46.5 (17)	N3'	C2'	C3'	N1'	179.4 (12)
N3	C11	C12	C17	-166.5 (12)	N4'	C11'	C12'	C16'	14.1 (18)
N3	C11	C12	C19	74.1 (16)	N4'	C11'	C12'	C18'	132.1 (13)
N3	C2	C1	O1	-9 (3)	N4'	C11'	C12'	C13'	-107.5 (14)
N3	C2	C1	N2	173.2 (13)	N2'	C1'	C2'	N3'	177.5 (13)
N3	C2	C3	N1	-179.2 (11)	N2'	C1'	C2'	C3'	3.1 (19)
N3	C2	C3	N4	4.6 (15)	N2'	C8'	C9'	C10'	-176.6 (10)
C10	C9	C8	N2	165.6 (13)	N1'	C5'	C6'	C7'	-177.3 (12)
C11	N4	C3	N1	179.5 (13)	C11'	N3'	C2'	C1'	-175.7 (14)
C11	N4	C3	C2	-4.7 (16)	C11'	N3'	C2'	C3'	-0.6 (14)

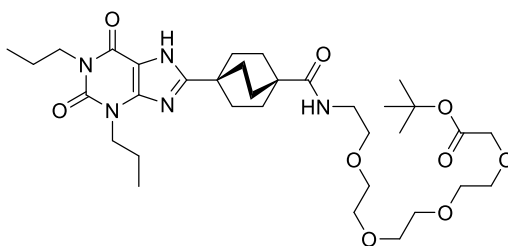
EXPERIMENTALTEIL

C11	N3	C2	C1	-171.8 (14)	C11'	N4'	C3'	N1'	-179.0 (12)
C11	N3	C2	C3	-2.9 (14)	C11'	N4'	C3'	C2'	0.1 (15)
C11	C12	C17	C16	171.0 (11)	C11'	C12'	C16'	C17'	179.8 (11)
C11	C12	C19	C18	168.3 (10)	C11'	C12'	C18'	C19'	-177.5 (10)
C2	N3	C11	N4	0.2 (14)	C11'	C12'	C13'	C14'	179.7 (11)
C2	N3	C11	C12	-172.3 (12)	C1'	N2'	C8'	C9'	-86.9 (14)
C22	C21	C20	C15	-171.5 (11)	C1'	N2'	C4'	O2'	178.9 (12)
C13	C12	C17	C16	49.2 (13)	C1'	N2'	C4'	N1'	-0.2 (18)
C13	C12	C19	C18	-69.8 (13)	C1'	C2'	C3'	N4'	176.0 (12)
C12	C13	C14	C15	19.9 (15)	C1'	C2'	C3'	N1'	-5 (2)
C15	C18	C19	C12	17.5 (14)	C2'	N3'	C11'	N4'	0.7 (15)
C15	C16	C17	C12	18.2 (15)	C2'	N3'	C11'	C12'	-177.2 (12)
C20	C15	C18	C19	167.9 (10)	C3'	N4'	C11'	N3'	-0.5 (14)
C20	C15	C14	C13	173.0 (11)	C3'	N4'	C11'	C12'	177.5 (12)
C20	C15	C16	C17	166.4 (11)	C3'	N1'	C5'	C6'	-85.8 (15)
C1	N2	C4	O2	179.6 (14)	C3'	N1'	C4'	O2'	179.5 (12)
C1	N2	C4	N1	4 (2)	C3'	N1'	C4'	N2'	-1.3 (17)
C1	N2	C8	C9	81.6 (15)	C12'	C16'	C17'	C15'	-0.2 (16)
C1	C2	C3	N1	-9 (2)	C16'	C12'	C18'	C19'	-58.6 (14)
C1	C2	C3	N4	174.5 (12)	C16'	C12'	C13'	C14'	58.6 (14)
C18	C15	C20	C21	179.1 (12)	C16'	C17'	C15'	C19'	-58.9 (14)
C18	C15	C14	C13	-70.4 (13)	C16'	C17'	C15'	C14'	55.3 (15)
C18	C15	C16	C17	46.8 (13)	C16'	C17'	C15'	C20'	178.5 (12)
C14	C13	C12	C11	168.6 (11)	C5'	N1'	C3'	N4'	0.6 (19)
C14	C13	C12	C17	-70.2 (13)	C5'	N1'	C3'	C2'	-178.4 (13)
C14	C13	C12	C19	47.9 (13)	C5'	N1'	C4'	O2'	1.8 (18)
C14	C15	C20	C21	-64.7 (16)	C5'	N1'	C4'	N2'	-179.1 (11)
C14	C15	C18	C19	48.4 (13)	C21'	C20'	C15'	C19'	66.8 (18)
C14	C15	C16	C17	-68.1 (14)	C21'	C20'	C15'	C17'	-176.2 (14)
C16	C15	C20	C21	59.0 (16)	C21'	C20'	C15'	C14'	-55.7 (18)
C16	C15	C18	C19	-67.7 (13)	C22'	C21'	C20'	C15'	-171.2 (14)
C16	C15	C14	C13	45.6 (14)	C8'	N2'	C1'	O1'	-1.9 (17)
C3	N1	C4	O2	177.9 (14)	C8'	N2'	C1'	C2'	177.0 (11)
C3	N1	C4	N2	-6 (2)	C8'	N2'	C4'	O2'	1.3 (18)
C3	N1	C5	C6	79.6 (16)	C8'	N2'	C4'	N1'	-177.8 (10)
C3	N4	C11	N3	2.6 (14)	C20'	C21'	C22'	O4'	157.4 (15)
C3	N4	C11	C12	174.9 (13)	C20'	C21'	C22'	O3'	-26 (3)
C3	C2	C1	O1	-175.9 (14)	C15'	C19'	C18'	C12'	-2.4 (15)
C3	C2	C1	N2	6 (2)	C15'	C14'	C13'	C12'	-0.9 (16)
C17	C12	C19	C18	48.0 (14)	C4'	N2'	C1'	O1'	-179.5 (12)
C4	N1	C3	N4	-175.9 (13)	C4'	N2'	C1'	C2'	-0.6 (18)
C4	N1	C3	C2	9 (2)	C4'	N2'	C8'	C9'	91.0 (14)
C4	N1	C5	C6	-98.5 (15)	C4'	N1'	C3'	N4'	-177.2 (12)
C4	N2	C1	O1	178.6 (13)	C4'	N1'	C3'	C2'	3.9 (19)
C4	N2	C1	C2	-3.4 (19)	C4'	N1'	C5'	C6'	91.9 (14)

EXPERIMENTALTEIL

C4	N2	C8	C9	-93.2 (14)	C18'	C12'	C16'	C17'	61.6 (14)
C19	C12	C17	C16	-69.2 (14)	C18'	C12'	C13'	C14'	-60.9 (14)
C8	N2	C1	O1	4.2 (18)	C18'	C19'	C15'	C17'	60.3 (14)
C8	N2	C1	C2	-177.8 (11)	C18'	C19'	C15'	C14'	-54.7 (14)
C8	N2	C4	O2	-6 (2)	C18'	C19'	C15'	C20'	179.8 (11)
C8	N2	C4	N1	178.0 (12)	C13'	C12'	C16'	C17'	-58.9 (14)
C5	N1	C3	N4	6 (2)	C13'	C12'	C18'	C19'	62.2 (13)
C5	N1	C3	C2	-169.7 (12)	C13'	C14'	C15'	C19'	57.5 (15)
C5	N1	C4	O2	-4 (2)	C13'	C14'	C15'	C17'	-55.2 (15)
C5	N1	C4	N2	172.3 (13)	C13'	C14'	C15'	C20'	-176.3 (12)

Synthese von *tert*-Butyl 1-(4-(2,6-dioxo-1,3-dipropyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*-purin-8-yl)bicyclo[2.2.2]octan-1-yl)-1-oxo-5,8,11,14-tetraoxa-2-azahexadecan-16-oat

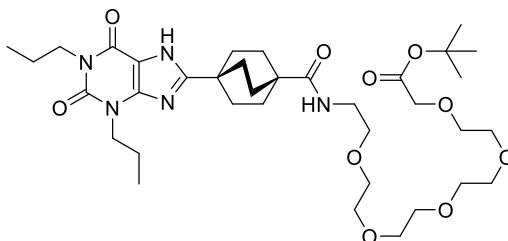


Das Edukt 4-(2,6-Dioxo-1,3-dipropyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*-purin-8-yl)-bicyclo[2.2.2]octane-1-carbonsäure (20 mg, 0.050 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (0.2 mL) gelöst und HATU (24 mg, 0.6 mmol, 1.2 Äq.) hinzugefügt. In einem separaten Gefäß wird *tert*-Butyl-14-amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoat (17 mg, 0.056 mmol, 1.1 Äq.) in Dichlormethan (0.2 mL) gelöst und Hünigbase (13 mg, 0.1 mmol, 2.0 Äq.) addiert. Nach 5 min wird das Amin zur aktivierten Säure gegeben und für 12 h bei RT gerührt. Reinigung mittels HPLC ergibt 26.5 mg, 0.04 mmol, 78%.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 12.90 (bs, 1H, NH), 7.39 (t, ³*J*_{H,H} = 5.70 Hz, 1H, CONH), 3.97 (s, 2H, CO₂CH₂), 3.95–3.90 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 3.85–3.80 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 3.58–3.55 (m, 2H, CH₂), 3.55–3.48 (m, 10H, 8x CH₂), 3.39 (t, ³*J*_{H,H} = 6.29 Hz, 2H, NHCH₂CH₂O), 3.19 (dt, ³*J*_{H,H} = 6.02 Hz, ³*J*_{H,H} = 6.02 Hz, 2H, NHCH₂CH₂O), 1.89–1.84 (m, 6H, 3x CH₂), 1.76–1.70 (m, 6H, 3x CH₂), 1.67 (sext, ³*J*_{H,H} = 7.57 Hz, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 1.58–1.50 (sext, ³*J*_{H,H} = 7.59 Hz, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 1.41 (s, 9H, 3 x CH₃), 0.85 (t, ³*J*_{H,H} = 7.41 Hz, 3H, NCH₂CH₂CH₃), 0.85 (t, ³*J*_{H,H} = 7.41 Hz, 3H, NCH₂CH₂CH₃). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 176.5 (C_q, C_{Amid}), 169.3 (C_q, C_{Ester}), 160.4 (C_q, C8), 153.9 (C_q, C4), 150.7 (C_q, C2), 147.4 (C_q, C6), 106.5 (C_q, C5), 80.6 (C_q, C(CH₃)₃), 69.9 (CH₂), 69.8 (CH₂), 69.8 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.6 (CH₂), 68.9 (CH₂), 68.1 (CH₂), 44.2 (CH₂, NCH₂), 42.0 (CH₂, NCH₂), 38.6 (CH₂, NCH₂), 38.1 (C_q), 33.2 (C_q), 29.6 (3x CH₂), 27.8 (3x CH₂), 27.7 (CH₃, 3x CH₃), 20.8 (CH₂, CH₂CH₃), 20.8 (CH₂, CH₂CH₃), 11.1 (CH₃, CH₂CH₃), 11.0 (CH₃, CH₂CH₃).

Schmelzpunkt: 194.4–169.3 °C. **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für $C_{34}H_{55}N_5O_9$ $[M+H]^+$: 678.4073; gefunden: 678.4063. **Reinheit:** 98%.

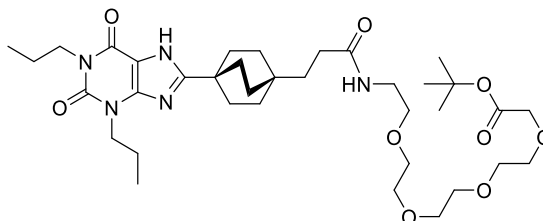
Synthese von *tert*-Butyl-1-(4-(2,6-dioxo-1,3-dipropyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*-purin-8-yl)bicyclo[2.2.2]octan-1-yl)-1-oxo-5,8,11,14,17-pentaoxa-2-azanonadecan-19-oat



Das Edukt 4-(2,6-Dioxo-1,3-dipropyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*-purin-8-yl)-bicyclo[2.2.2]octane-1-carbonsäure (100 mg, 0.26 mmol, 1.0 Äq.) wird in Acetonitril (1 mL) gelöst und HATU (108 mg, 0.28 mmol, 1.1 Äq.) hinzugefügt. In einem separaten Gefäß wird *tert*-Butyl-17-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecanoat (98 mg, 0.28 mmol, 1.1 Äq.) in Acetonitril (1 mL) gelöst und Triethylamin (28 mg, 0.28 mmol, 1.1 Äq.) addiert. Nach 5 min wird das Amin zur aktivierten Säure gegeben und für 12 h bei RT gerührt. Säulenchromatographische Reinigung an SiO_2 (Dichlormethan:Methanol 95:5) gibt das Produkt mit 53 mg, 73.4 μ mol, 26%.

1H -NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ [ppm] = 12.88 (bs, 1H, NH), 7.38 (t, $^3J_{H,H} = 5.68$ Hz, 1H, CONH), 3.97 (s, 2H, $COOCH_2$), 3.95–3.90 (m, 2H, $NCH_2CH_2CH_3$), 3.86–3.80 (m, 2H, $NCH_2CH_2CH_3$), 3.59–3.47 (m, 16H, 8x CH_2), 3.39 (t, $^3J_{H,H} = 6.29$ Hz, 2H, $NHCH_2CH_2O$), 3.19 (dt, $^3J_{H,H} = 5.96$ Hz, $^3J_{H,H} = 5.95$ Hz, 2H, $NHCH_2CH_2O$), 1.91–1.84 (m, 6H, 3x CH_2), 1.76–1.71 (m, 6H, 3x CH_2), 1.71–1.63 (m, 2H, $NCH_2CH_2CH_3$), 1.59–1.50 (m, 2H, $NCH_2CH_2CH_3$), 1.41 (s, 9H, 3x CH_3), 0.86 (t, $^3J_{H,H} = 7.39$ Hz, 3H, $NCH_2CH_2CH_3$), 0.85 (t, $^3J_{H,H} = 7.47$ Hz, 3H, $NCH_2CH_2CH_3$). **^{13}C -NMR** (126 MHz, $DMSO-d_6$) δ [ppm] = 176.5 (C_q , C_{Amid}), 169.3 (C_q , C_{Ester}), 160.3 (C_q , C8), 153.9 (C_q , C4), 150.6 (C_q , C2), 147.3 (C_q , C6), 106.4 (C_q , C5), 80.6 (C_q , $C(CH_3)_3$), 69.8 (CH_2), 69.8 (3x CH_2), 69.7 (CH_2), 69.7 (CH_2), 69.7 (CH_2), 69.6 (CH_2), 68.9 (CH_2), 68.1 (CH_2), 44.2 (CH_2 , NCH_2), 41.9 (CH_2 , NCH_2), 38.6 (CH_2), 38.1 (C_q), 33.2 (C_q), 29.6 (3x CH_2), 27.8 (3x CH_2), 27.7 (CH_3 , 3x CH_3), 20.8 (CH_2 , CH_2CH_3), 20.8 (CH_2 , CH_2CH_3), 11.1 (CH_3 , CH_2CH_3), 10.9 (CH_3 , CH_2CH_3). **LC-MS:** positiv $[m/z] = 722.2$ ($[M+H]^+$), 739.5 ($[M+NH_4]^+$). **Reinheit:** 99% (LC-MS).

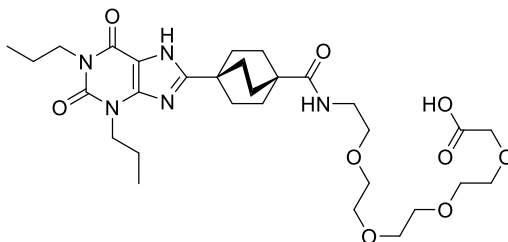
Synthese von *tert*-Butyl-18-(4-(2,6-dioxo-1,3-dipropyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*-purin-8-yl)bicyclo[2.2.2]octan-1-yl)-16-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-15-azaoctadecanoat



Das Edukt 3-[4-(2,6-Dioxo-1,3-dipropyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*-purin-8-yl)-bicyclo[2.2.2]oct-1-yl]-propionsäure (20 mg, 0.050 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (0.2 mL) gelöst und HATU (24 mg, 0.06 mmol, 1.2 Äq.) hinzugefügt. In einem separaten Gefäß wird *tert*-Butyl-14-amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoat (17 mg, 0.056 mmol, 1.1 Äq.) in Dichlormethan (0.2 mL) gelöst und Hünigbase (13 mg, 0.1 mmol, 2.0 Äq.) addiert. Nach 5 min wird das Amin zur aktivierten Säure gegeben und für 12 h bei RT gerührt. Reinigung mittels HPLC ergibt 28.1 mg, 0.04 mmol, 80%.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 12.86 (bs, 1H, NH), 7.82 (t, ³*J*_{H,H} = 5.68 Hz, 1H, CONH), 3.97 (s, 2H, COOCH₂), 3.95–3.89 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 3.85–3.79 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 3.58–3.54 (m, 2H, CH₂), 3.54–3.48 (m, 10H, 8x CH₂), 3.39 (t, ³*J*_{H,H} = 5.89 Hz, 2H, NHCH₂CH₂O), 3.17 (dt, ³*J*_{H,H} = 5.82 Hz, ³*J*_{H,H} = 5.82 Hz, 2H, NHCH₂CH₂O), 2.02–1.97 (m, 2H, CH₂, COCH₂CH₂), 1.87–1.79 (m, 6H, 3x CH₂), 1.67 (sext, ³*J*_{H,H} = 7.21 Hz, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 1.54 (sext, ³*J*_{H,H} = 7.21 Hz, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 1.41 (s, 9H, 3x CH₃), 1.41–1.37 (m, 6H, 3 x CH₂), 1.37–1.33 (m, 2H, CH₂, COCH₂CH₂), 0.85 (t, ³*J*_{H,H} = 7.45 Hz, 3H, NCH₂CH₂CH₃), 0.85 (t, ³*J*_{H,H} = 7.45 Hz, 3H, NCH₂CH₂CH₃). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 172.7 (C_q, C_{Amid}), 169.3 (C_q, C_{Ester}), 160.9 (C_q, C8), 153.9 (C_q, C4), 150.7 (C_q, C2), 147.4 (C_q, C6), 106.4 (C_q, C5), 80.6 (C_q, C(CH₃)₃), 69.9 (CH₂), 69.8 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.6 (CH₂), 69.1 (CH₂), 68.1 (CH₂), 44.2 (CH₂, NCH₂), 41.9 (CH₂, NCH₂), 38.5 (CH₂), 36.6 (CH₂, COCH₂CH₂), 33.3 (C_q), 30.3 (CH₂, COCH₂CH₂), 30.1 (3x CH₂), 30.1 (C_q), 30.0 (3x CH₂), 27.7 (CH₃, 3x CH₃), 20.8 (CH₂, CH₂CH₃), 20.8 (CH₂, CH₂CH₃), 11.1 (CH₃, CH₂CH₃), 11.0 (CH₃, CH₂CH₃). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₃₆H₅₉N₅O₉ [M+H]⁺: 706.4386; gefunden: 706.4366. **Reinheit**: 98%.

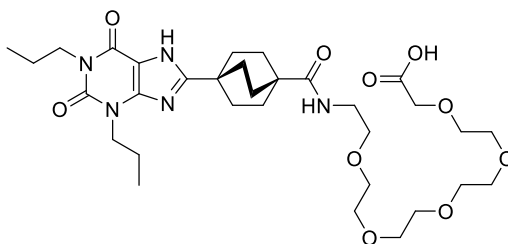
Synthese von 1-(4-(2,6-Dioxo-1,3-dipropyl-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)bicyclo[2.2.2]octan-1-yl)-1-oxo-5,8,11,14-tetraoxa-2-azahexadecan-16-säure



Das Edukt *tert*-Butyl-1-(4-(2,6-dioxo-1,3-dipropyl-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)bicyclo[2.2.2]octan-1-yl)-1-oxo-5,8,11,14-tetraoxa-2-azahexadecan-16-oat (12 mg, 0.024 mmol, 1.0 Äq.) wird in Trifluoressigsäure:Dichlormethan (6:4) gelöst und TIPS (25 μ L) addiert. Nach 2 h bei RT wird das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC gereinigt. Das Produkt wird mit 14.9 mg, 0.0225 mmol, 94% erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 12.79 (bs, 1H, NH), 7.42 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.67$ Hz, 1H, CONH), 3.96 (s, 2H, COOCH₂), 3.95–3.89 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 3.85–3.79 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 3.59–3.47 (m, 12H, 6 x CH₂), 3.39 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.20$ Hz, 2H, NHCH₂CH₂O), 3.19 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 6.02$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.02$ Hz, 2H, NHCH₂CH₂O), 1.89–1.84 (m, 6H, 3x CH₂), 1.76–1.71 (m, 6H, 3x CH₂), 1.67 (sext, $^3J_{\text{H,H}} = 7.60$ Hz, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 1.54 (sext, $^3J_{\text{H,H}} = 7.47$ Hz, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 0.85 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.34$ Hz, 3H, NCH₂CH₂CH₃), 0.85 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.46$ Hz, 3H, NCH₂CH₂CH₃). **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 176.5 (C_q, C_{Amid}), 171.7 (C_q, C_{Säure}), 160.3 (C_q, C8), 153.9 (C_q, C4), 150.6 (C_q, C2), 147.3 (C_q, C6), 106.5 (C_q, C5), 69.7 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.7 (2 x CH₂), 69.7 (CH₂), 69.6 (CH₂), 68.9 (CH₂), 68.0 (CH₂), 44.2 (CH₂, NCH₂), 42.0 (CH₂, NCH₂), 38.6 (CH₂), 38.1 (C_q), 33.2 (C_q), 29.6 (3x CH₂), 27.8 (3x CH₂), 20.8 (CH₂, CH₂CH₃), 20.8 (CH₂, CH₂CH₃), 11.1 (CH₃, CH₂CH₃), 11.0 (CH₃, CH₂CH₃). **Schmelzpunkt:** hygroscopisch. **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₃₀H₄₇N₅O₉ [M+H]⁺: 622.3447; gefunden: 622.3333. **Reinheit:** 99%.

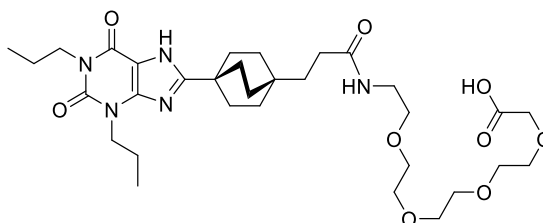
Synthese von 1-(4-(2,6-Dioxo-1,3-dipropyl-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)bicyclo[2.2.2]octan-1-yl)-1-oxo-5,8,11,14,17-pentaoxa-2-azanonadecan-19-säure



Die Substanz *tert*-Butyl-1-(4-(2,6-dioxo-1,3-dipropyl-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)bicyclo[2.2.2]octan-1-yl)-1-oxo-5,8,11,14,17-pentaoxa-2-azanonadecan-19-oat (39 mg, 54.0 μmol , 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (10 mL) gelöst und Trifluoressigsäure (1.2 mL) unter Eiskühlung zugetropft. Nach der Zugabe wird das Eisbad entfernt und Wasser (zwei Tropfen) addiert. Nach 24 h bei Raumtemperatur wird das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC gereinigt. Das Produkt wird mit 40 mg, 054 μmol , 100% erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm] = 12.92 (bs, 1H, NH), 7.40 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.67$ Hz, 1H, CONH), 4.00 (s, 2H, COOCH_2), 3.95–3.90 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.85–3.79 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.59–3.47 (m, 16H, 8x CH_2), 3.38 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.24$ Hz, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.19 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 6.06$ Hz, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.89–1.83 (m, 6H, 3x CH_2), 1.76–1.70 (m, 6H, 3x CH_2), 1.67 (tq, $^3J_{\text{H,H}} = 7.48$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 7.36$ Hz, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.54 (tq, $^3J_{\text{H,H}} = 7.36$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 7.34$ Hz, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.85 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.41$ Hz, 3H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.85 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.34$ Hz, 3H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$). **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm] = 176.6 (C_q , C_{Amid}), 171.6 (C_q , $\text{C}_{\text{Säure}}$), 160.4 (C_q , C8), 153.9 (C_q , C4), 150.7 (C_q , C2), 147.4 (C_q , C6), 106.5 (C_q , C5), 69.8 (CH_2), 69.8 (2x CH_2), 69.8 (CH_2), 69.7 (CH_2), 69.7 (CH_2), 69.7 (CH_2), 69.6 (CH_2), 68.9 (CH_2), 67.6 (CH_2), 44.2 (CH_2 , NCH_2), 42.0 (CH_2 , NCH_2), 38.6 (CH_2), 38.1 (C_q), 33.2 (C_q), 29.7 (3x CH_2), 27.8 (3x CH_2), 20.9 (CH_2 , CH_2CH_3), 20.8 (CH_2 , CH_2CH_3), 11.1 (CH_3 , CH_2CH_3), 11.0 (CH_3 , CH_2CH_3). **Schmelzpunkt:** >300 °C, **LC-MS:** positiv [m/z] = 666.6 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). **Reinheit:** 99%.

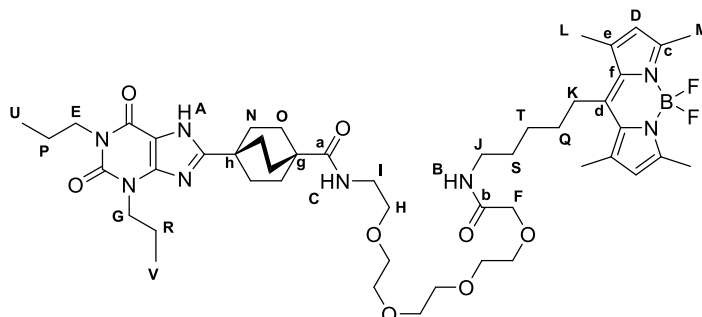
Synthese von 18-(4-(2,6-Dioxo-1,3-dipropyl-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)bicyclo[2.2.2]octan-1-yl)-16-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-15-azaoctadecansäure



Das Edukt *tert*-Butyl-18-(4-(2,6-dioxo-1,3-dipropyl-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)bicyclo[2.2.2]octan-1-yl)-16-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-15-azaoctadecanoat (19 mg, 0.027 mmol, 1.0 Äq.) wird in Trifluoressigsäure:Dichlormethan (6:4) gelöst und TIPS (25 μ L) addiert. Nach 2 h bei RT wird das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC gereinigt. Das Produkt wird mit 16.1 mg, 0.0247 mmol, 91% erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 12.74 (bs, 1H, NH), 7.85 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.71$ Hz, 1H, CONH), 3.96 (s, 2H, COOCH₂), 3.94–3.90 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 3.84–3.80 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 3.59–3.55 (m, 2H, CH₂), 3.54–3.48 (m, 10H, 5 x CH₂), 3.39 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.92$ Hz, 2H, NHCH₂CH₂O), 3.17 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 5.81$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.81$ Hz, 2H, NHCH₂CH₂O), 2.03–1.97 (m, 2H, CH₂, COCH₂CH₂), 1.87–1.80 (m, 6H, 3x CH₂), 1.67 (sext, $^3J_{\text{H,H}} = 7.46$ Hz, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 1.54 (sext, $^3J_{\text{H,H}} = 7.50$ Hz, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 1.43–1.37 (m, 6H, 3x CH₂), 1.37–1.32 (m, 2H, CH₂, COCH₂CH₂), 0.85 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.43$ Hz, 3H, NCH₂CH₂CH₃), 0.84 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.43$ Hz, 3H, NCH₂CH₂CH₃). **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 172.7 (C_q, C_{Amid}), 171.7 (C_q, C_{Säure}), 160.8 (C_q, C8), 153.9 (C_q, C4), 150.7 (C_q, C2), 147.3 (C_q, C6), 106.4 (C_q, C5), 69.8 (CH₂), 69.7 (2 x CH₂), 69.7 (2 x CH₂), 69.6 (CH₂), 69.1 (CH₂), 68.0 (CH₂), 44.2 (CH₂, NCH₂), 42.0 (CH₂, NCH₂), 38.5 (CH₂), 36.6 (CH₂, COCH₂CH₂), 33.3 (C_q), 30.3 (CH₂, COCH₂CH₂), 30.1 (3x CH₂), 30.1 (C_q), 29.9 (3x CH₂), 27.7 (CH₃, 3x CH₃), 20.8 (CH₂, CH₂CH₃), 20.8 (CH₂, CH₂CH₃), 11.1 (CH₃, CH₂CH₃), 11.0 (CH₃, CH₂CH₃). **Schmelzpunkt:** hygroskopisch. **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₃₂H₅₂N₅O₉ [M+H]⁺: 650.3760; gefunden: 650.3723. **Reinheit:** 99%.

Synthese von *N*-(5-(5,5-Difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5*H*-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-10-yl)pentyl)-14-(4-(2,6-dioxo-1,3-dipropyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*-purin-8-yl)bicyclo[2.2.2]octan-1-carboxamido)-3,6,9,12-tetraoxatetradecanamid



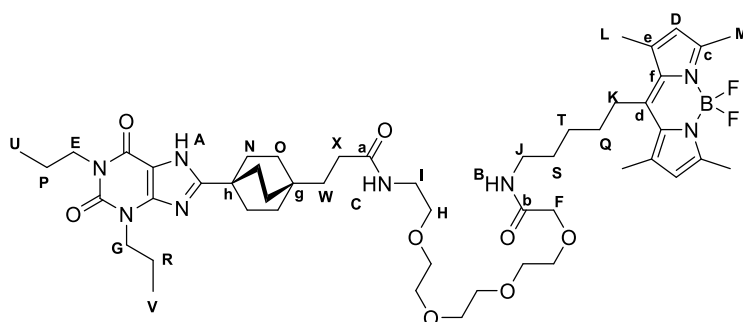
Das Edukt 1-(4-(2,6-Dioxo-1,3-dipropyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*-purin-8-yl)bicyclo[2.2.2]octan-1-yl)-1-oxo-5,8,11,14,17-pentaoxa-2-azanonadecan-19-säure (20 mg, 0.032 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (0.25 mL) gelöst und HATU (14.6 mg, 0.038 mmol, 1.2 Äq.) hinzugefügt. In einem separaten Gefäß wird 5-(5,5-Difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5*H*-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-10-yl)pentan-1-amin (11.7 mg, 0.035 mmol, 1.1 Äq.) in Dichlormethan (0.25 mL) gelöst und Hünigbase (8.2 mg, 0.064 mmol, 2.0 Äq.) addiert. Nach 5 min wird das Amin zur aktivierten Säure gegeben und für 12 h bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels unter vermindertem Druck erfolgt die Reinigung mittels HPLC (Acetonitril:Wasser 70:30) wobei 15.8 mg, 0.017 mmol, 53% Produkt erhalten werden.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 12.91 (s, 1H, A), 7.65 (t, $^3J_{H,H}$ = 5.97 Hz, 1H, B), 7.39 (t, $^3J_{H,H}$ = 5.69 Hz, 1H, C), 6.22 (s, 2H, D), 3.94–3.90 (m, 2H, E), 3.86 (s, 2H, F), 3.85–3.80 (m, 2H, G), 3.56 (s, 4H, 2 x CH₂), 3.53 (s, 4H, 2 x CH₂), 3.52–3.47 (m, 4H, 2 x CH₂), 3.38 (t, $^3J_{H,H}$ = 6.25 Hz, 2H, H), 3.18 (dt, $^3J_{H,H}$ = 6.09 Hz, $^3J_{H,H}$ = 6.09 Hz, 2H, I), 3.13 (dt, $^3J_{H,H}$ = 6.60 Hz, $^3J_{H,H}$ = 6.60 Hz, 2H, J), 2.95–2.90 (m, 2H, K), 2.40 (s, 6H, L), 2.39 (s, 6H, M), 1.89–1.83 (m, 6H, N), 1.75–1.70 (m, 6H, O), 1.67 (sext, $^3J_{H,H}$ = 7.41 Hz, 2H, P), 1.60–1.54 (m, 2H, Q), 1.54 (sext, $^3J_{H,H}$ = 7.38 Hz, 2H, R), 1.53–1.48 (m, 2H, S), 1.48–1.42 (m, 2H, T), 0.85 (t, $^3J_{H,H}$ = 7.40 Hz, 3H, U), 0.85 (t, $^3J_{H,H}$ = 7.40 Hz, 3H, V). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 176.5 (C_q, a), 169.0 (C_q, b), 160.3 (C_q, C8), 153.9 (C_q, C4), 153.0 (2 x C_q, c), 150.6 (C_q, C2), 147.3 (C_q, C6), 146.7 (C_q, d), 140.7 (2 x C_q, e), 130.7 (2 x C_q, f), 121.6 (2 x CH, D), 106.4 (C_q, C5), 70.2 (CH₂), 69.9 (CH₂, F), 69.8 (CH₂), 69.8 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.6 (CH₂), 69.5 (CH₂), 68.9 (CH₂), 44.2 (CH₂, E), 41.9 (CH₂, G), 38.6 (CH₂, I), 38.1 (C_q, g), 37.8 (CH₂, J), 33.2 (C_q, h), 31.1 (CH₂, Q), 29.6 (3 x CH₂, N), 28.8 (CH₂, S), 27.8 (3 x CH₂, O), 27.7 (CH₂, K), 27.0 (CH₂, T), 20.8 (CH₂, P/R), 20.8 (CH₂, P/R), 15.8 (2 x CH₃, L), 14.0 (2 x CH₃, M), 11.1 (CH₃, U/V), 11.0 (CH₃, U/V). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 938.0 ([M+H]⁺). **Schmelzpunkt:** 73.8–83.5 °C. **HRMS** (ESI-

QTOF) berechnet für $C_{48}H_{71}BF_2N_8O_8$ $[M+Na]^+$: 958.5385; gefunden: 958.5388. **Reinheit**: 99%.

Absorption/Emission: 498 nm / 508 nm.

Synthese von *N*-(5-(5,5-Difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5*H*-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-10-yl)pentyl)-14-(3-(4-(2,6-dioxo-1,3-dipropyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*-purin-8-yl)bicyclo[2.2.2]octan-1-yl)propanamido)-3,6,9,12-tetraoxatetradecanamid

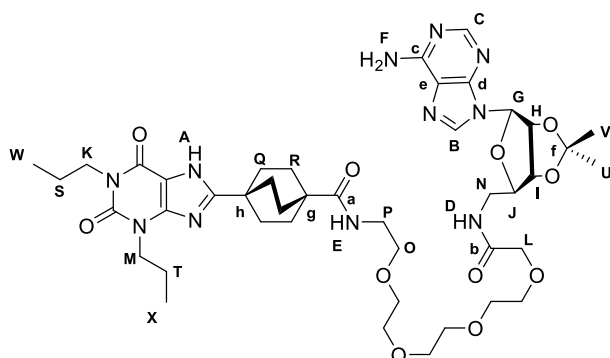


Das Edukt 18-(4-(2,6-Dioxo-1,3-dipropyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*-purin-8-yl)bicyclo[2.2.2]octan-1-yl)-16-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-15-azaoctadecansäure (20 mg, 0.031 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (0.25 mL) gelöst und HATU (14.1 mg, 0.037 mmol, 1.2 Äq.) hinzugefügt. In einem separaten Gefäß wird 5-(5,5-Difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5*H*-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-10-yl)pentan-1-amin (11.4 mg, 0.034 mmol, 1.1 Äq.) in Dichlormethan (0.25 mL) gelöst und Hünigbase (8.0 mg, 0.062 mmol, 2.0 Äq.) addiert. Nach 5 min wird das Amin zur aktivierten Säure gegeben und für 12 h bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels unter vermindertem Druck erfolgt die Reinigung mittels HPLC (Acetonitril:Wasser 70:30) wobei 14.6 mg, 0.015 mmol, 49% Produkt erhalten werden.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 12.85 (s, 1H, A), 7.81 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.66$ Hz, 1H, B), 7.65 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.93$ Hz, 1H, C), 6.22 (s, 2H, D), 3.94–3.89 (m, 2H, E), 3.86 (s, 2H, F), 3.85–3.80 (m, 2H, G), 3.56 (s, 4H, 2 x CH₂), 3.52 (s, 4H, 2 x CH₂), 3.52–3.47 (m, 4H, 2 x CH₂), 3.38 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.93$ Hz, 2H, H), 3.18 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 5.80$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.80$ Hz, 2H, I), 3.13 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 6.60$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.60$ Hz, 2H, J), 2.96–2.90 (m, 2H, K), 2.41 (s, 6H, L), 2.40 (s, 6H, M), 2.02–1.97 (m, 2H, X) 1.86–1.80 (m, 6H, N), 1.67 (sext, $^3J_{\text{H,H}} = 7.40$ Hz, 2H, P), 1.60–1.54 (m, 2H, Q), 1.54 (sext, $^3J_{\text{H,H}} = 7.39$ Hz, 2H, R), 1.53–1.48 (m, 2H, S), 1.48–1.42 (m, 2H, T), 1.42–1.36 (m, 6H, O), 1.36–1.32 (m, 2H, W), 0.85 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.40$ Hz, 3H, U), 0.85 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.40$ Hz, 3H, V). **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 172.7 (C_q, a), 169.0 (C_q, b), 160.8 (C_q, C8), 153.9 (C_q, C4), 153.0 (2 x C_q, c), 150.6 (C_q, C2), 147.4 (C_q, C6), 146.7 (C_q, d), 140.7 (2 x C_q, e), 130.7 (2 x C_q, f), 121.6 (2 x CH, D), 106.3 (C_q, C5), 70.2 (CH₂), 69.9 (CH₂, F), 69.8 (CH₂), 69.8 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.5 (CH₂), 69.5 (CH₂), 69.1 (CH₂), 44.2 (CH₂, E), 41.9 (CH₂, G), 38.5 (CH₂, I), 37.8 (CH₂, J), 36.5 (CH₂, X) 33.3 (C_q, h), 31.1 (CH₂, Q), 30.2 (CH₂, W), 30.1 (3 x CH₂, N), 30.0 (C_q, g), 29.9 (3 x CH₂, O), 28.8 (CH₂, S), 27.7 (CH₂, K), 27.0 (CH₂, T), 20.8 (CH₂, P/R), 20.8

(CH₂, P/R), 15.8 (2 x CH₃, L), 14.0 (2 x CH₃, M), 11.1 (CH₃, U/V), 11.0 (CH₃, U/V). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 966.2 ([M+H]⁺). **Schmelzpunkt:** 69.8–78.5 °C. **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₅₀H₇₅BF₂N₈O₈ [M+Na]⁺: 986.5698; gefunden: 986.5696. **Reinheit:** 99%. **Absorption/Emission:** 498 nm / 508 nm.

Synthese von *N*-(((3*aS*,4*R*,6*R*,6*aS*)-6-(6-Amino-9*H*-purin-9-yl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-*d*][1,3]dioxol-4-yl)methyl)-14-(4-(2,6-dioxo-1,3-dipropyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*-purin-8-yl)bicyclo[2.2.2]octan-1-carboxamido)-3,6,9,12-tetraoxatetradecanamid

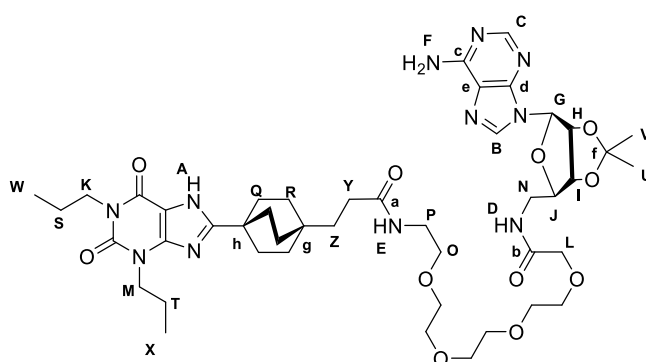


Das Edukt 1-(4-(2,6-Dioxo-1,3-dipropyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*-purin-8-yl)bicyclo[2.2.2]octan-1-yl)-1-oxo-5,8,11,14,17-pentaoxa-2-azanonadecan-19-säure (20 mg, 0.032 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (0.25 mL) gelöst und HATU (14.8 mg, 0.039 mmol, 1.2 Äq.) hinzugefügt. In einem separaten Gefäß wird 9-(((3*aS*,4*R*,6*R*,6*aS*)-6-(Aminomethyl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-*d*][1,3]dioxol-4-yl)-9*H*-purin-6-amin (10.7 mg, 0.035 mmol, 1.1 Äq.) in Dichlormethan (0.25 mL) gelöst und Hünigbase (8.3 mg, 0.064 mmol, 2.0 Äq.) addiert. Nach 5 min wird das Amin zur aktivierten Säure gegeben und für 12 h bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels unter vermindertem Druck erfolgt die Reinigung mittels HPLC (Acetonitril) wobei 7.3 mg, 0.008 mmol, 25% Produkt erhalten werden.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 12.91 (s, 1H, A), 8.32 (s, 1H, B), 8.18 (s, 1H, C), 7.89 (t, ³*J*_{H,H} = 6.03 Hz, 1H, D), 7.39 (t, ³*J*_{H,H} = 5.70 Hz, 1H, E), 7.37 (bs, 2H, F), 6.13 (d, ³*J*_{H,H} = 2.71 Hz, 1H, G), 5.44 (dd, ³*J*_{H,H} = 6.29 Hz, ³*J*_{H,H} = 2.75 Hz, 1H, H), 4.96 (dd, ³*J*_{H,H} = 6.28 Hz, ³*J*_{H,H} = 3.35 Hz, 1H, I), 4.20 (td, ³*J*_{H,H} = 6.25 Hz, ³*J*_{H,H} = 3.35 Hz, 1H, J), 3.95–3.90 (m, 2H, K), 3.89 (s, 2H, L), 3.85–3.77 (m, 2H, M), 3.58–3.50 (m, 4H, 2 x CH₂), 3.47 (s, 8H, 4 x CH₂), 3.44–3.39 (m, 1H, N), 3.39–3.34 (m, 2H, O), 3.34–3.30 (m, 1H, N), 3.18 (dt, ³*J*_{H,H} = 5.96 Hz, ³*J*_{H,H} = 5.96 Hz, 1H, P), 1.89–1.84 (m, 6H, Q), 1.75–1.70 (m, 6H, R), 1.67 (sext, ³*J*_{H,H} = 7.33 Hz, 2H, S), 1.55 (sext, ³*J*_{H,H} = 7.38 Hz, 2H, T), 1.52 (s, 3H, U), 1.31 (s, 3H, V), 0.85 (t, ³*J*_{H,H} = 7.39 Hz, 3H, W), 0.85 (t, ³*J*_{H,H} = 7.43 Hz, 3H, X). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 176.5 (C_q, a), 169.6 (C_q, b), 160.3 (C_q, C8), 155.9 (C_q, c), 153.9 (C_q, C4), 152.2 (C_q, C), 150.6 (C_q, C2), 148.8 (C_q, d), 147.3 (C_q, C6), 140.0 (C_q, B), 119.2 (C_q, e), 113.4 (C_q, f), 106.4 (C_q, C5), 88.8

(CH, G), 84.1 (CH, J), 82.9 (CH, H), 81.7 (CH, I), 70.1 (CH₂), 69.9 (CH₂, L), 69.7 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.5 (CH₂), 69.5 (CH₂), 68.9 (CH₂), 44.2 (CH₂, K), 41.9 (CH₂, M), 40.3 (CH₂, N), 38.6 (CH₂, P), 38.1 (C_q, g), 33.2 (C_q, h), 29.6 (3 x CH₂, R), 27.8 (3 x CH₂, Q), 27.0 (CH₃, U), 25.2 (CH₃, V), 20.8 (CH₂, T/S), 20.8 (CH₂, T/S), 11.1 (CH₃, W/X), 11.0 (CH₃, W/X). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 910.7 ([M+H]⁺). **Schmelzpunkt:** 106.4–112.1 °C. **HRMS (ESI-QTOF)** berechnet für C₄₃H₆₃N₁₁O₁₁ [M+Na]⁺: 932.4601; gefunden: 932.4603. **Reinheit:** 98%.

Synthese von *N*-(((3*aS*,4*R*,6*R*,6*aS*)-6-(6-Amino-9*H*-purin-9-yl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-*d*][1,3]dioxol-4-yl)methyl)-14-(3-(4-(2,6-dioxo-1,3-dipropyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*-purin-8-yl)bicyclo[2.2.2]octan-1-yl)propanamido)-3,6,9,12-tetraoxatetradecanamid



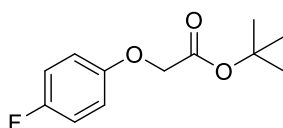
Das Edukt 18-(4-(2,6-Dioxo-1,3-dipropyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*-purin-8-yl)bicyclo[2.2.2]octan-1-yl)-16-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-15-azaooctadecansäure (20 mg, 0.031 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (0.25 mL) gelöst und HATU (14.1 mg, 0.037 mmol, 1.2 Äq.) hinzugefügt. In einem separaten Gefäß wird 9-((3*aS*,4*R*,6*R*,6*aS*)-6-(Aminomethyl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-*d*][1,3]dioxol-4-yl)-9*H*-purin-6-amin (10.4 mg, 0.034 mmol, 1.1 Äq.) in Dichlormethan (0.25 mL) gelöst und Hünigbase (8.0 mg, 0.062 mmol, 2.0 Äq.) addiert. Nach 5 min wird das Amin zur aktivierten Säure gegeben und für 12 h bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels unter vermindertem Druck erfolgt die Reinigung mittels HPLC (Acetonitril) wobei 7.7 mg, 0.008 mmol, 26% Produkt erhalten werden.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 12.85 (s, 1H, A), 8.31 (s, 1H, B), 8.17 (s, 1H, C), 7.89 (t, ³*J*_{H,H} = 6.01 Hz, 1H, D), 7.81 (t, ³*J*_{H,H} = 5.66 Hz, 1H, E), 7.32 (bs, 2H, F), 6.12 (d, ³*J*_{H,H} = 2.72 Hz, 1H, G), 5.44 (dd, ³*J*_{H,H} = 6.34 Hz, ³*J*_{H,H} = 2.74 Hz, 1H, H), 4.96 (dd, ³*J*_{H,H} = 6.37 Hz, ³*J*_{H,H} = 3.32 Hz, 1H, I), 4.20 (td, ³*J*_{H,H} = 6.23 Hz, ³*J*_{H,H} = 3.34 Hz, 1H, J), 3.94–3.90 (m, 2H, K), 3.89 (s, 2H, L), 3.85–3.80 (m, 2H, M), 3.57–3.50 (m, 4H, 2 x CH₂), 3.49–3.45 (m, 8H, 4 x CH₂), 3.44–3.39 (m, 1H, N), 3.39–3.36 (m, 2H, O), 3.37–3.32 (m, 1H, N) 3.17 (dt, ³*J*_{H,H} = 5.81 Hz, ³*J*_{H,H} = 5.88 Hz, 1H, P), 2.02–1.97 (m, 2H, Y), 1.87–1.81 (m, 6H, Q), 1.67 (sext, ³*J*_{H,H} = 7.43 Hz, 2H, S), 1.54 (sext, ³*J*_{H,H} = 7.44 Hz, 2H, T), 1.52 (s, 3H, U), 1.42–1.36 (m, 6H, R), 1.36–1.32 (m, 2H, Z), 1.31 (s, 3H, V), , 0.85 (t, ³*J*_{H,H} = 7.35 Hz, 3H, W), 0.85 (t, ³*J*_{H,H} = 7.45 Hz, 3H, X). **¹³C-**

NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 172.7 (C_q, a), 169.6 (C_q, b), 160.8 (C_q, C8), 156.1 (C_q, c), 153.9 (C_q, C4), 152.7 (C_q, C), 150.6 (C_q, C2), 148.8 (C_q, d), 147.4 (C_q, C6), 139.9 (C_q, B), 119.2 (C_q, e), 113.4 (C_q, f), 106.3 (C_q, C5), 88.8 (CH, G), 84.1 (CH, J), 82.9 (CH, H), 81.7 (CH, I), 70.1 (CH₂), 69.9 (CH₂, L), 69.7 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.5 (CH₂), 69.5 (CH₂), 69.1 (CH₂), 44.2 (CH₂, K), 41.9 (CH₂, M), 40.3 (CH₂, N), 38.5 (CH₂, P), 36.5 (CH₂, Y), 33.3 (C_q, h), 30.2 (CH₂, Y), 30.1 (3 x CH₂, Q), 30.0 (C_q, g), 29.9 (3 x CH₂, R), 27.0 (CH₃, U), 25.2 (CH₃, V), 20.8 (CH₂, T/S), 20.8 (CH₂, T/S), 11.1 (CH₃, W/X), 11.0 (CH₃, W/X). **LC-MS**: positiv [m/z] = 938.9 ([M+H]⁺). **Schmelzpunkt**: 105.5–110.5 °C. **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₄₅H₆₇N₁₁O₁₁ [M+Na]⁺: 960.4914; gefunden: 960.4912. **Reinheit**: 98%.

5.3 Synthese des Preladenant-Derivats 3

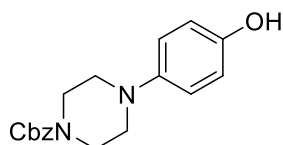
Synthese von 2-(4-Fluorophenoxy)essigsäure-*tert*-butylester



Unter Schutzgas (Ar) wird 4-Fluorophenol (2g, 10.25 mmol, 1.0 Äq.) in DMF (15 mL) vorgelegt und NaOH (410 mg, 10.25 mmol, 1.0 Äq.) dazugegeben. Nachdem sich das NaOH gelöst hat, wird *tert*-Butyl-2-bromoacetat (1.15 g, 10.25 mmol, 1.0 Äq.) zugetropft und für 24 h bei RT gerührt. Folgend wird Wasser (20 mL) addiert und mit Ethylacetat (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden mit Wasser (3 x 20 mL) gewaschen und die organische Phase über MgSO₄ getrocknet. Säulenchromatographische Reinigung an SiO₂ (Cyclohexan:Ethylacetat 5:1) gibt das Produkt mit 2.26 g, 10.03 mmol und 98%.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 6.99–6.95 (m, 2H, H_{arom.}), 6.86–6.83 (m, 2H, H_{arom.}), 4.48 (s, 2H, CH₂), 1.48 (s, 9H, 3x CH₃). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 168.1 (C_q, CO), 157.8 (C_q, ¹J_{C,F} = 238.97 Hz, CF), 154.2 (C_q, ⁴J_{C,F} = 2.30 Hz, C_{arom.}), 116.0 (2x CH, ²J_{C,F} = 23.21 Hz, C_{arom.}), 115.9 (2x CH, ³J_{C,F} = 7.88 Hz, C_{arom.}), 82.6 (C_q, C(CH₃)₃), 66.5 (CH₂), 28.2 (CH₃). **LC-MS**: nicht möglich. **Reinheit**: 92%.

Synthese von Benzyl-4-(4-hydroxyphenyl)piperazin-1-carboxylat

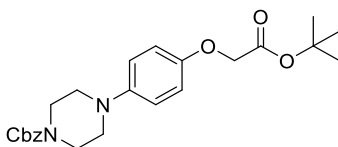


Unter Schutzgas (Ar) wird 4-(Piperazin-1-yl)phenol (500 mg, 2.8 mmol, 1.0 Äq.) in Methanol (2.8 mL) gelöst und Benzylchloroformiat (402 μ L, 2.8 mmol, 1.0 Äq.) langsam zugetropft. Nach 12 h bei RT wird das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in ges. NaHCO₃-Lösung (50 mL) aufgenommen. Nach Extraktion mit Ethylacetat (3x 50 mL) werden

die vereinten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an SiO_2 (Dichlormethan: Methanol 95:5) wird das Produkt mit 661 mg, 2.1 mmol, 76% erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm] = 8.85 (s, 1H, OH), 7.42–7.28 (m, 5H, H_{Cbz}), 6.85–6.75 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6.70–6.61 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 5.10 (s, 2H, H_{Cbz}), 3.59–3.45 (m, 4H, $\text{H}_{\text{Piperazin}}$), 2.94–2.89 (m, 4H, $\text{H}_{\text{Piperazin}}$). **$^{13}\text{C NMR}$** (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm] = 154.4 (C_q , CO), 151.4 (C_q , COH), 144.0 (C_q , NC), 136.9 (C_q , C_{Cbz}), 128.4 (2x CH, C_{Cbz}), 127.8 (C_q , C_{Cbz}), 127.5 (2x CH, C_{Cbz}), 118.5 (C_q , $\text{C}_{\text{arom.}}$), 115.5 (C_q , $\text{C}_{\text{arom.}}$), 66.2 (CH_2 , C_{Cbz}), 50.2 (2x CH_2 , $\text{C}_{\text{Piperazin}}$), 43.6 (2x CH_2 , $\text{C}_{\text{Piperazin}}$). **LC-MS:** 313.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). **Reinheit:** 95%.

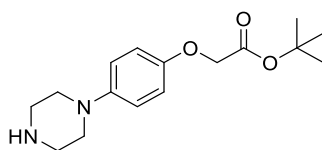
Synthese von Benzyl-4-(4-(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethoxy)phenyl)piperazin-1-carboxylat



Unter Schutzgas (Ar) wird Benzyl-4-(4-hydroxyphenyl)piperazin-1-carboxylat (100 mg, 0.32 mmol, 1.0 Äq.) in Aceton (500 μL) gelöst, K_2CO_3 (49 mg, 0.35 mmol, 1.1 Äq.) und *tert*-Butylbromoacetat (62 mg, 0.32 mmol, 1.0 Äq.) addiert. Nach 12 h bei RT wird das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt, in Wasser (5 mL) aufgenommen und mit Ethylacetat (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung an SiO_2 (Dichlormethan:MeOH 97:3) ergibt das Produkt mit 110 mg, 2.6 mmol, 81%.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm] = 7.40–7.30 (m, 5H, H_{Cbz}), 6.93–6.87 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6.84–6.76 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 5.10 (s, 2H, H_{Cbz}), 4.54 (s, 2H, CH_2), 3.58–3.48 (m, 4H, $\text{H}_{\text{Piperazin}}$), 3.02–2.95 (m, 4H, $\text{H}_{\text{Piperazin}}$), 1.42 (s, 9H, 3x CH_3). **$^{13}\text{C NMR}$** (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm] = 168.1 (C_q , $\text{CO}_{\text{t-Butylester}}$), 154.4 (C_q , CO_{Cbz}), 151.7 (C_q , C_{Ether}), 145.6 (C_q , CN), 136.8 (C_q , C_{Cbz}), 128.4 (2x CH, C_{Cbz}), 127.8 (C_q , C_{Cbz}), 127.5 (2x CH, C_{Cbz}), 117.8 (C_q , $\text{C}_{\text{arom.}}$), 115.0 (C_q , $\text{C}_{\text{arom.}}$), 81.2 (C_q , $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 66.2 (CH_2 , C_{Cbz}), 65.5 (CH_2), 49.6 (2x CH_2 , $\text{C}_{\text{Piperazin}}$), 43.4 (2x CH_2 , $\text{C}_{\text{Piperazin}}$), 27.7 (3x CH_3). **LC-MS:** 427.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). **Reinheit:** 98%.

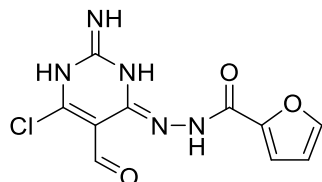
Synthese von *tert*-Butyl-2-(4-(piperazin-1-yl)phenoxy)acetat



Unter Schutzgas (Ar) wird Benzyl-4-(4-(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethoxy)phenyl)piperazin-1-carboxylat (100 mg, 0.23 mmol, 1.0 Äq.) in Methanol (1 mL) gelöst und 10% Pd/C (10 mg) addiert. Die Atmosphäre wird von Ar auf H₂ gewechselt und die Reaktionslösung für 2 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird über Celite filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wird mit 67 mg, 0.23 mmol, 99% erhalten.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 6.88–6.82 (m, 2H, H_{arom.}), 6.80–6.75 (m, 2H, H_{arom.}), 4.53 (s, 2H), 2.95–2.91 (m, 4H, H_{Piperazin}), 2.86–2.81 (m, 4H, H_{Piperazin}), 1.42 (s, 9H, 3x CH₃). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 168.2 (C_q, CO_{t-Butylester}), 151.1 (C_q, C_{Ether}), 146.4 (C_q, CN), 117.1 (C_q, C_{arom.}), 115.0 (C_q, C_{arom.}), 81.2 (C_q, C(CH₃)₃), 65.5 (CH₂), 50.3 (2x CH₂, C_{Piperazin}), 45.5 (2x CH₂, C_{Piperazin}), 27.7 (3x CH₃). **LC-MS**: 293.0 ([M+H]⁺). **Reinheit**: 97%.

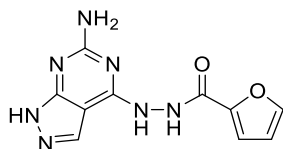
Synthese von (*E/Z*)-*N'*-(6-Chloro-5-formyl-2-imino-2,3-dihydropyrimidin-4(1*H*)-yliden)furan-2-carbohydrazid^{292, 293}



Unter Schutzgas (Ar) wird der 2-Amino-4,6-dichloropyrimidin-5-carbaldehyd (1 g, 5.2 mmol, 1.0 Äq.) in THF (40 mL) gelöst und Furan-2-carbonsäurehydrazid (730 mg, 5.72 mmol, 1.1 Äq.) sowie Triethylamin (526 mg, 5.2 mmol, 1.0 Äq.) addiert. Nach 2 h unter reflux wird die Reaktionsmischung unter vermindertem Druck von Lösemittel befreit, mit Wasser gewaschen und die wässrige Phase mit EtOAc (5 x 20 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Feststoff wird aus Methanol:Et₂O (8:1) umkristallisiert und das Produkt mit 811 mg, 2.9 mmol und 55% (Lit.: 82%)²⁹³ erhalten.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.64 (s, 1H), 10.38 (s, 1H), 9.97 (s, 1H, H_{Aldehyd}), 7.92–7.90 (m, 1H, H_{Furan}), 7.88 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.25 (d, ³J_{H,H} = 3.54 Hz, 1H, H_{Furan}), 6.67 (dd, ³J_{H,H} = 1.76 Hz, ³J_{H,H} = 3.48 Hz, 1H, H_{Furan}). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 187.5 (CH, C_{Aldehyd}), 165.0 (C_q), 163.0 (C_q), 162.5 (C_q), 156.5 (C_q), 146.0 (C_q), 145.7 (CH, C_{Furan}), 114.9 (CH, C_{Furan}), 111.9 (CH, C_{Furan}), 100.8 (C_q). **LC-MS**: positiv [*m/z*] = 282.1 ([M+H]⁺). **Reinheit**: 98%.

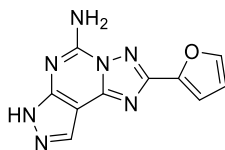
Synthese von *N*-(6-Amino-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-yl)furan-2-carbohydrazid



Zu einer Lösung aus (*E/Z*)-*N*-(6-Chloro-5-formyl-2-imino-2,3-dihydropyrimidin-4(1*H*)-yliden)furan-2-carbohydrazid (0.5 g, 1.7 mmol, 1.0 Äq.) in Acetonitril (25 mL) wird Hydrazin (80% in Wasser, 323 mg, 5.1 mmol, 3.0 Äq.) bei 70 °C addiert. Nach 1 h unter Reflux wird der Feststoff filtriert und der Rückstand mit Acetonitril gewaschen. Das Produkt wird mit 250 mg, 0.96 mmol und 57% (Lit.: 83%)²⁹³ erhalten.

¹H NMR/¹³C NMR in 2M DCl/DMSO-*d*₆ gibt 3 Tautomere, die nicht zuzuordnen sind. **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 260.2 ([M+H]⁺). **Reinheit:** 99%.

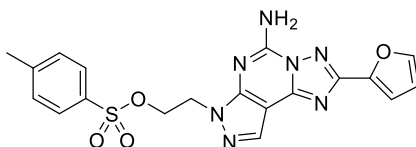
Synthese von 2-(Furan-2-yl)-7*H*-pyrazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pyrimidin-5-amin



Unter Schutzgas (Ar) wird *N*-(6-Amino-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-yl)furan-2-carbohydrazid (200 mg, 0.77 mmol, 1.0 Äq.) mit *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid (1.08 g, 5.3 mmol, 6.8 Äq.) und Hexamethyldisilazan (2.85 g, 17.7 mmol, 23 Äq.) versetzt und für 3 h bei 120 °C gerührt. Der Rückstand wird in heißem Wasser aufgenommen und filtriert. Der Rückstand wird mit 80% Essigsäure umkristallisiert. Und das Produkt mit 94 mg, 0.4 mmol, 51% (Lit.: 67%)²⁹³ erhalten.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 13.37 (bs, 1H, NH), 8.14 (bs, 1H, NCH), 7.94–7.93 (m, 1H, H_{Furan}), 7.92 (bs, 2H, NH₂) 7.22 (d, ³J_{H,H} = 3.31 Hz, 1H, H_{Furan}), 6.73 (dd, ³J_{H,H} = 1.73, ³J_{H,H} = 3.38 Hz, 1H, H_{Furan}). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 155.2 (C_q), 150.2 (C_q), 148.7 (C_q), 146.2 (C_q), 145.6 (CH, C_{Furan}), 145.0 (CH, C_{Furan}), 132.4 (CH, NCH), 112.1 (CH, C_{Furan}), 112.1 (CH, C_{Furan}), 95.4 (C_q). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 242.1 ([M+H]⁺). **Reinheit:** 99%.

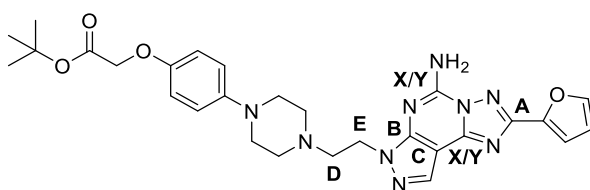
Synthese von 2-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)-ethyl-4-methylbenzenesulfonat²⁹²



Unter Schutzgas (Ar) wird 2-(Furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-5-amin (50 mg, 0.21 mmol, 1.0 Äq.) in Dimethylformamid (252 μ L) gelöst und NaH (10 mg, 0.25 mmol, 1.2 Äq.) addiert. Folgend wird Ethylendi(*para*-toluensulfonat) (95,5 mg, 0.25 mmol, 1.2 Äq.) dazugegeben und die Reaktionsmischung für 4 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wird entfernt und der Feststoff mittels säulenchromatographischer Reinigung an der Flash mit 42 mg, 0.1 mmol, 45% erhalten.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.11–8.00 (bs, 2H, NH₂), 8.04 (s, 1H, NCH), 7.97–7.94 (m, 1H, H_{Furan}), 7.43–7.38 (m, 2H, H_{arom.}), 7.25 (d, ³J_{H,H} = 3.36 Hz, 1H, H_{Furan}), 7.11–7.07 (m, 2H, H_{arom.}), 6.74 (dd, ³J_{H,H} = 1.77 Hz, ³J_{H,H} = 3.38 Hz, 1H, H_{Furan}), 4.55–4.52 (m, 2H, OCH₂), 4.51–4.47 (m, 2H, NCH₂), 2.13 (s, 3H, CH₃). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 155.4 (C_q), 148.6 (C_q), 148.5 (C_q), 146.2 (C_q), 145.5 (C_q, C_{Furan}), 145.2 (CH, C_{Furan}), 144.5 (C_q, C_{Tos}), 131.7 (CH, NCH), 131.7 (C_q, C_{Tos}), 129.4 (2x CH₂, C_{arom.}), 127.1 (2x CH₂, C_{arom.}), 112.3 (CH, C_{Furan}), 112.1 (CH, C_{Furan}), 95.9 (C_q), 68.1 (CH₂, OCH₂), 46.0 (CH₂, NCH₂), 20.8 (CH₃, C_{Methyl}). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 440.2 ([M+H]⁺). **Reinheit:** 98%.

Synthese von *tert*-Butyl-2-(4-(4-(2-(5-amino-2-furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)acetat

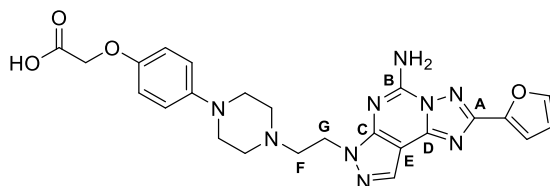


Unter Schutzgas (Ar) wird 2-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)-ethyl-4-methylbenzenesulfonat (39 mg, 0.09 mmol, 1.0 Äq.) in Dimethylformamid (504 μ L) gelöst und *tert*-Butyl-2-(4-piperazin-1-yl)phenoxy)acetat (52 mg, 0.18 mmol, 2.0 Äq.) addiert. Nach 20 h bei 80 °C wird das Lösemittel entfernt und das Rohprodukt mittels Flashchromatographie gereinigt. Das Produkt wird mit 24 mg, 0.04 mmol, 48% erhalten.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.16 (s, 1H, NCH), 8.05 (bs, 2H, NH₂), 7.96–7.90 (m, 1H, H_{Furan}), 7.22 (d, ³J_{H,H} = 3.39 Hz, 1H, H_{Furan}), 6.87–6.82 (m, 2H, 2x CH_{arom.}), 6.80–6.74 (m, 2H, 2x CH_{arom.}), 6.73 (dd, ³J_{H,H} = 1.76 Hz, ³J_{H,H} = 3.34 Hz, 1H, H_{Furan}), 4.52 (s, 2H, CO₂CH₂),

4.42 (t, $^3J_{H,H} = 6.89$ Hz, 2H, NCH₂), 3.02–2.90 (m, 4H, 2x CH₂Piperazin), 2.83 (t, $^3J_{H,H} = 6.94$ Hz, 2H, N_{Piperazin}CH₂), 2.65–2.54 (m, 4H, 2x CH₂Piperazin), 1.41 (s, 9H, 3x CH₃). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 168.1 (C_q, CO_t-Butylester), 155.3 (C_q, A), 151.2 (C_q, C_{Ether}), 148.7 (C_q, X/Y), 148.6 (C_q, B), 146.2 (C_q, X/Y), 145.8 (C_q, CN_{Piperazin}), 145.5 (C_q, C_{Furan}), 145.1 (CH, C_{Furan}), 131.4 (CH, NCH), 117.0 (C_q, C_{arom.}), 115.0 (C_q, C_{arom.}), 112.2 (CH, C_{Furan}), 112.1 (CH, C_{Furan}), 95.6 (C_q, C), 81.1 (C_q, C(CH₃)₃), 65.5 (CH₂, CO₂CH₂), 56.5 (CH₂, D), 52.6 (2x CH₂, C_{Piperazin}), 49.3 (2x CH₂, C_{Piperazin}), 44.4 (CH₂, E), 27.7 (3x CH₃). **Schmelzpunkt:** 192.9–196.8 °C. **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 560.1 ([M+H]⁺). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₂₈H₃₃N₉O₄ [M+H]⁺: 560.2728; gefunden: 560.2725. **Reinheit:** 97%.

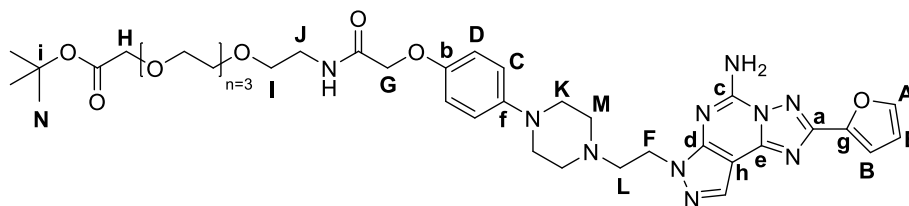
Synthese von 2-(4-(4-(2-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)essigsäure



In einem Rundkolben wird *tert*-Butyl-2-(4-(4-(2-(5-amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin)-1-yl)phenoxy)acetat (21 mg, 0.038 mmol, 1.0 Äq.) in Dichlormethan (10 mL) gelöst und Trifluoressigsäure (1.2 mL) unter Eiskühlung zugetropft. Nach der Zugabe wird das Eisbad entfernt und Wasser (zwei Tropfen) addiert. Nach 24 h bei Raumtemperatur wird das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC gereinigt. Das Produkt wird mit 19 mg, 0.038 mmol, 100% erhalten.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.16 (s, 1H, NCH), 8.05 (bs, 2H, NH₂), 7.93 (d, $^3J_{H,H} = 1.6$ Hz, 1H, H_{Furan}), 7.22 (d, $^3J_{H,H} = 3.37$ Hz, 1H, H_{Furan}), 6.88–6.81 (m, 2H, 2x CH_{arom.}), 6.79–6.75 (m, 2H, 2x CH_{arom.}), 6.73 (dd, $^3J_{H,H} = 1.76$ Hz, $^3J_{H,H} = 3.37$ Hz, 1H, H_{Furan}), 4.52 (s, 2H, CO₂CH₂), 4.42 (t, $^3J_{H,H} = 6.85$ Hz, 2H, NCH₂), 2.99–2.92 (m, 4H, 2x CH₂Piperazin), 2.84 (t, $^3J_{H,H} = 6.85$ Hz, 2H, N_{Piperazin}CH₂), 2.64–2.57 (m, 4H, 2x CH₂Piperazin). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 170.5 (C_q, COOH), 155.4 (C_q, A), 153.0 (C_q, C_{Ether}), 148.7 (C_q, B), 148.6 (C_q, C), 146.3 (C_q, D), 145.5 (C_q, CN_{Piperazin}), 145.5 (C_q, C_{Furan}), 145.1 (CH, C_{Furan}), 131.4 (CH, NCH), 117.2 (C_q, C_{arom.}), 114.8 (C_q, C_{arom.}), 112.3 (CH, C_{Furan}), 112.2 (CH, C_{Furan}), 95.7 (C_q, E), 68.3 (CH₂, CO₂CH₂), 56.6 (CH₂, F), 52.8 (2x CH₂, C_{Piperazin}), 49.9 (2x CH₂, C_{Piperazin}), 44.4 (CH₂, G). **Schmelzpunkt:** >300 °C. **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 504.2 ([M+H]⁺). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₂₄H₂₅N₉O₄ [M+H]⁺: 502.1950; gefunden: 502.1943. **Reinheit:** 98%.

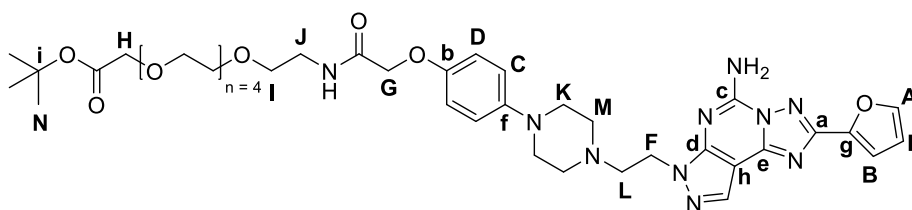
Synthese von *tert*-Butyl-1-(4-(4-(2-(5-amino-2-(furan-2-yl)-7*H*-pyrazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)-2-oxo-6,9,12,15-tetraoxa-3-azaheptadecan-17-oat



Das Edukt 2-(4-(4-(2-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-7*H*-pyrazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)essigsäure (20 mg, 0.04 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (500 μ L) gelöst und HATU (17.9 mg, 0.07 mmol, 1.2 Äq.) hinzugefügt. In einem separaten Gefäß wird *tert*-Butyl-14-amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoat (13.5 mg, 0.044 mmol, 1.1 Äq.) in Dichlormethan (500 μ L) gelöst und Hünigbase (10.3 mg, 0.08 mmol, 2.0 Äq.) addiert. Nach 5 min wird das Amin zur aktivierten Säure gegeben und für 24 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wird entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC gereinigt. Dabei werden 25.1 mg, 0.032 mmol, 79% des Produktes erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 8.16 (s, 1H, NCH), 8.05 (bs, 2H, NH₂), 7.95 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 5.73 Hz, 1H, NH), 7.94–7.93 (m, 1H, A), 7.22 (dd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 3.32 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 0.85 Hz 1H, B), 6.88–6.80 (m, 4H, C, D), 6.73 (dd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 1.77 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 3.41 Hz, 1H, E), 4.42 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.79 Hz 2H, F), 4.36 (s, 2H, G), 3.96 (s, 2H, H), 3.56–3.54 (m, 2H, CH₂), 3.52–3.48 (m, 10H, 5 x CH₂), 3.44 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 5.96 Hz, I), 3.30–3.25 (m, 2H, J), 2.98–2.93 (m, 4H, K), 2.83 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.81 Hz, 2H, L), 2.61–2.58 (m, 4H, M), 1.40 (s, 9H, N). **$^{13}\text{C NMR}$** (126 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 169.3 (C_q, C_{Ester}), 168.0 (C_q, C_{Amid}), 155.4 (C_q, a), 151.2 (C_q, b), 148.7 (C_q, c), 148.6 (C_q, d), 146.2 (C_q, e), 146.0 (C_q, f), 145.5 (C_q, g), 145.1 (CH, A), 131.4 (CH, NCH), 117.1 (2 x CH, C, D), 115.3 (2 x CH, C, D), 112.3 (CH, B), 112.1 (CH, B), 95.7 (C_q, h), 80.6 (C_q, i), 69.9 (CH₂), 69.8 (CH₂), 69.7 (2 x CH₂), 69.7 (CH₂), 69.5 (CH₂), 68.8 (CH₂), 68.1 (CH₂), 67.6 (CH₂), 56.5 (CH₂, L), 52.6 (2x CH₂, M), 49.4 (2x CH₂, K), 44.4 (CH₂, F), 38.2 (CH₂, J), 27.7 (3x CH₃, N). **Schmelzpunkt:** 115.9–117.6 °C. **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₃₈H₅₂N₁₀O₉ [M+H]⁺: 793.3991; gefunden: 793.3850. **Reinheit:** 99%.

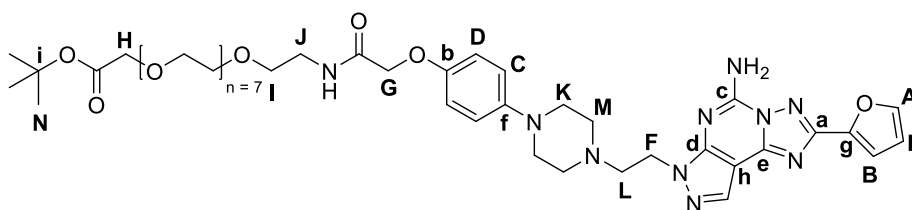
Synthese von *tert*-Butyl-1-(4-(4-(2-(5-amino-2-(furan-2-yl)-7*H*-pyrazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)-2-oxo-6,9,12,15,18-pentaoxa-3-azaicosan-20-oat



Das Edukt 2-(4-(4-(2-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-7*H*-pyrazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)essigsäure (2.8 mg, 5.5 μmol , 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (500 μL) gelöst und HATU (2.5 mg, 6.6 μmol , 1.2 Äq.) hinzugefügt. In einem separaten Gefäß wird *tert*-Butyl-17-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecanoat (2.1 mg, 6.1 μmol , 1.1 Äq.) in Dichlormethan (500 μL) gelöst und Hünigbase (2.0 μL , 11.0 μmol , 2.0 Äq.) addiert. Nach 5 min wird das Amin zur aktivierten Säure gegeben und für 24 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wird entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC gereinigt. Dabei werden 3.6 mg, 4.3 μmol , 78% des Produktes erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm] = 8.16 (s, 1H, NCH), 8.05 (bs, 2H, NH_2), 7.95 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.75$ Hz, 1H, NH), 7.94–7.93 (m, 1H, A), 7.22 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 3.32$ Hz, 1H, B), 6.87–6.84 (m, 2H, C), 6.84–6.81 (m, 2H, D), 6.73 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 1.71$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.45$ Hz, 1H, E), 4.42 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.83$ Hz, 2H, F), 4.36 (s, 2H, G), 3.97 (s, 2H, H), 3.58–3.47 (m, 16H, PEG), 3.44 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.96$ Hz, I), 3.30–3.26 (m, 2H, J), 2.99–2.92 (m, 4H, K), 2.83 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.85$ Hz, 2H, L), 2.62–2.57 (m, 4H, M), 1.41 (s, 9H, N). **$^{13}\text{C NMR}$** (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm] = 169.3 (C_q , C_{Ester}), 168.0 (C_q , C_{Amid}), 155.4 (C_q , a), 151.2 (C_q , b), 148.7 (C_q , c), 148.6 (C_q , d), 146.2 (C_q , e), 146.0 (C_q , f), 145.5 (C_q , g), 145.1 (CH, A), 131.4 (CH, NCH), 117.0 (2 x CH, C, D), 115.3 (2 x CH, C, D), 112.2 (CH, B), 112.1 (CH, E), 95.6 (C_q , h), 80.6 (C_q , i), 69.8 (CH_2 , PEG), 69.8 (CH_2 , PEG), 69.8 (CH_2 , PEG), 69.7 (CH_2 , PEG), 69.7 (CH_2 , PEG), 69.7 (CH_2 , PEG), 69.7 (CH_2 , PEG), 69.5 (CH_2 , PEG), 68.8 (CH_2 , I), 68.1 (CH_2 , H), 67.6 (CH_2 , G), 56.5 (CH_2 , L), 52.6 (2x CH_2 , M), 49.4 (2x CH_2 , K), 44.4 (CH_2 , F), 38.2 (CH_2 , J), 27.7 (3x CH_3 , N). **Schmelzpunkt:** 295 – >300 °C. **LC-MS:** positiv [m/z] = 837.5 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{N}_{10}\text{O}_{10}$ [$\text{M}+\text{Na}]^+$: 859.4073; gefunden: 859.4074. **Reinheit:** 96%.

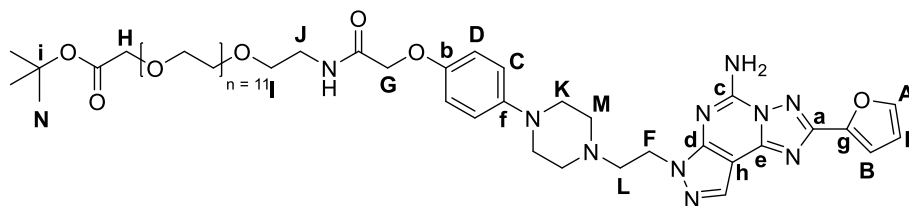
Synthese von *tert*-Butyl 1-(4-(4-(2-(5-amino-2-(furan-2-yl)-7*H*-pyrazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)-2-oxo-6,9,12,15,18,21,24,27-octaoxa-3-azanonacosan-29-oat



Das Edukt 2-(4-(4-(2-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-7*H*-pyrazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)essigsäure (20 mg, 0.04 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (500 μ L) gelöst und HATU (17.9 mg, 0.07 mmol, 1.2 Äq.) hinzugefügt. In einem separaten Gefäß wird *tert*-Butyl-26-amino-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxahexacosanoat (21.3 mg, 0.044 mmol, 1.1 Äq.) in Dichlormethan (500 μ L) gelöst und Hünigbase (10.3 mg, 0.08 mmol, 2.0 Äq.) addiert. Nach 5 min wird das Amin zur aktivierten Säure gegeben und für 24 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wird entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC (70%-100% MeOH/H₂O, 15min) gereinigt. Dabei werden 37.9 mg, 0.039 mmol, 98% des Produktes erhalten.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.16 (s, 1H, NCH), 8.05 (bs, 2H, NH₂), 7.95 (t, ³*J*_{H,H} = 5.75 Hz, 1H, NH), 7.94–7.93 (m, 1H, A), 7.22 (d, ³*J*_{H,H} = 3.30 Hz, 1H, B), 6.87–6.81 (m, 4H, C+D), 6.73 (dd, ³*J*_{H,H} = 1.74 Hz, ³*J*_{H,H} = 3.39 Hz, 1H, E), 4.42 (t, ³*J*_{H,H} = 6.81 Hz, 2H, F), 4.36 (s, 2H, G), 3.97 (s, 2H, H), 3.57–3.54 (m, 2H, CH₂), 3.53–3.51 (m, 2H, CH₂), 3.51–3.47 (m, 24H, 12 x CH₂), 3.44 (t, ³*J*_{H,H} = 5.96 Hz, I), 3.28 (q, ³*J*_{H,H} = 5.92 Hz, 2H, J), 2.99–2.93 (m, 4H, K), 2.83 (t, ³*J*_{H,H} = 6.80 Hz, 2H, L), 2.62–2.57 (m, 4H, M), 1.41 (s, 9H, N). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 169.3 (C_q, C_{Ester}), 168.0 (C_q, C_{Amid}), 155.3 (C_q, a), 151.2 (C_q, b), 148.7 (C_q, c), 148.6 (C_q, d), 146.2 (C_q, e), 146.0 (C_q, f), 145.5 (C_q, g), 145.1 (CH, A), 131.4 (CH, NCH), 117.0 (2 x CH, C, D), 115.3 (2 x CH, C, D), 112.2 (CH, B), 112.1 (CH, E), 95.6 (C_q, h), 80.6 (C_q, i), 69.8 (CH₂, PEG), 69.8 (9 x CH₂, PEG), 69.7 (2 x CH₂, PEG), 69.7 (CH₂, PEG), 69.5 (CH₂, PEG), 68.8 (CH₂, I), 68.1 (CH₂, H), 67.6 (CH₂, G), 56.5 (CH₂, L), 52.6 (2x CH₂, M), 49.3 (2x CH₂, K), 44.4 (CH₂, F), 38.2 (CH₂, J), 27.7 (3x CH₃, N). **Schmelzpunkt:** hygroskopisch. **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₄₆H₆₉N₁₀O₁₃ [M+H]⁺: 969.5040; gefunden: 969.5027. **Reinheit:** 98%.

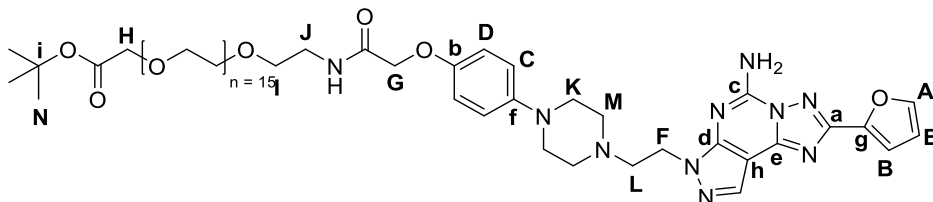
Synthese von *tert*-Butyl 1-(4-(4-(2-(5-amino-2-(furan-2-yl)-7*H*-pyrazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)-2-oxo-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39-dodecaoxa-3-azahentetracontan-41-oat



Das Edukt 2-(4-(4-(2-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-7*H*-pyrazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)essigsäure (20 mg, 0.04 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (500 μ L) gelöst und HATU (17.9 mg, 0.07 mmol, 1.2 Äq.) hinzugefügt. In einem separaten Gefäß wird *tert*-Butyl-38-amino-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36-dodecaoxaooctatriacontanoat (29.0 mg, 0.044 mmol, 1.1 Äq.) in Dichlormethan (500 μ L) gelöst und Hünigbase (10.3 mg, 0.08 mmol, 2.0 Äq.) addiert. Nach 5 min wird das Amin zur aktivierten Säure gegeben und für 24 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wird entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC (70%-100% MeOH/H₂O, 15min) gereinigt. Dabei werden 36.6 mg, 0.032 mmol, 80% des Produktes erhalten.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.16 (s, 1H, NCH), 8.05 (bs, 2H, NH₂), 7.95 (t, ³*J*_{H,H} = 5.73 Hz, 1H, NH), 7.94–7.93 (m, 1H, A), 7.22 (d, ³*J*_{H,H} = 3.35 Hz, 1H, B), 6.87–6.81 (m, 4H, C+D), 6.73 (dd, ³*J*_{H,H} = 1.73 Hz, ³*J*_{H,H} = 3.51 Hz, 1H, E), 4.42 (t, ³*J*_{H,H} = 6.78 Hz, 2H, F), 4.36 (s, 2H, G), 3.97 (s, 2H, H), 3.58–3.54 (m, 2H, CH₂), 3.53–3.51 (m, 2H, CH₂), 3.51–3.47 (m, 40H, 20 x CH₂), 3.44 (t, ³*J*_{H,H} = 5.96 Hz, I), 3.28 (q, ³*J*_{H,H} = 5.87 Hz, 2H, J), 2.99–2.93 (m, 4H, K), 2.83 (t, ³*J*_{H,H} = 6.80 Hz, 2H, L), 2.61–2.57 (m, 4H, M), 1.41 (s, 9H, N). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 169.4 (C_q, C_{Ester}), 168.0 (C_q, C_{Amid}), 155.4 (C_q, a), 151.2 (C_q, b), 148.7 (C_q, c), 148.6 (C_q, d), 146.2 (C_q, e), 146.0 (C_q, f), 145.5 (C_q, g), 145.1 (CH, A), 131.4 (CH, NCH), 117.0 (2 x CH, C, D), 115.3 (2 x CH, C, D), 112.3 (CH, B), 112.1 (CH, E), 95.7 (C_q, h), 80.6 (C_q, i), 69.9 (CH₂, PEG), 69.8 (17 x CH₂, PEG), 69.7 (CH₂, PEG), 69.7 (CH₂, PEG), 69.7 (CH₂, PEG), 69.5 (CH₂, PEG), 68.8 (CH₂, I), 68.1 (CH₂, H), 67.6 (CH₂, G), 56.5 (CH₂, L), 52.6 (2x CH₂, M), 49.4 (2x CH₂, K), 44.4 (CH₂, F), 38.2 (CH₂, J), 27.7 (3x CH₃, N). **Schmelzpunkt:** hygroskopisch. **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₅₄H₈₄N₁₀O₁₇ [M+H]⁺: 1145.6089; gefunden: 1145.6064. **Reinheit:** 98%.

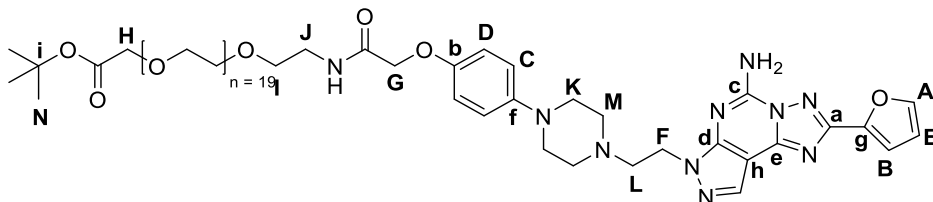
Synthese von *tert*-Butyl 1-(4-(4-(2-(5-amino-2-(furan-2-yl)-7*H*-pyrazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)-2-oxo-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51-hexadeca-3-azatripentacontan-53-*oat*



Das Edukt 2-(4-(4-(2-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-7*H*-pyrazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)essigsäure (20 mg, 0.04 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (500 µL) gelöst und HATU (17.9 mg, 0.07 mmol, 1.2 Äq.) hinzugefügt. In einem separaten Gefäß wird *tert*-Butyl-50-amino-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48-hexadeca-3-azatripentacontanoat (36.8 mg, 0.044 mmol, 1.1 Äq.) in Dichlormethan (500 µL) gelöst und Hünigbase (10.3 mg, 0.08 mmol, 2.0 Äq.) addiert. Nach 5 min wird das Amin zur aktivierten Säure gegeben und für 24 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wird entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC (70%-100% MeOH/H₂O, 15min) gereinigt. Dabei werden 46.4 mg, 0.035 mmol, 88% des Produktes erhalten.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.16 (s, 1H, NCH), 8.05 (bs, 2H, NH₂), 7.95 (t, ³J_{H,H} = 5.71 Hz, 1H, NH), 7.94–7.93 (m, 1H, A), 7.22 (d, ³J_{H,H} = 3.36 Hz, 1H, B), 6.87–6.81 (m, 4H, C+D), 6.73 (dd, ³J_{H,H} = 1.75 Hz, ³J_{H,H} = 3.40 Hz, 1H, E), 4.42 (t, ³J_{H,H} = 6.81 Hz, 2H, F), 4.36 (s, 2H, G), 3.97 (s, 2H, H), 3.58–3.55 (m, 2H, CH₂), 3.54–3.51 (m, 2H, CH₂), 3.52–3.48 (m, 56H, 28 x CH₂), 3.44 (t, ³J_{H,H} = 5.96 Hz, I), 3.28 (q, ³J_{H,H} = 5.86 Hz, 2H, J), 2.99–2.93 (m, 4H, K), 2.83 (t, ³J_{H,H} = 6.81 Hz, 2H, L), 2.63–2.57 (m, 4H, M), 1.41 (s, 9H, N). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 169.3 (C_q, C_{Ester}), 168.0 (C_q, C_{Amid}), 155.4 (C_q, a), 151.2 (C_q, b), 148.7 (C_q, c), 148.6 (C_q, d), 146.2 (C_q, e), 146.0 (C_q, f), 145.5 (C_q, g), 145.1 (CH, A), 131.4 (CH, NCH), 117.0 (2 x CH, C, D), 115.3 (2 x CH, C, D), 112.2 (CH, B), 112.1 (CH, E), 95.6 (C_q, h), 80.6 (C_q, i), 69.8 (CH₂, PEG), 69.8 (25 x CH₂, PEG), 69.7 (CH₂, PEG), 69.7 (CH₂, PEG), 69.7 (CH₂, PEG), 69.5 (CH₂, PEG), 68.8 (CH₂, I), 68.1 (CH₂, H), 67.6 (CH₂, G), 56.5 (CH₂, L), 52.6 (2x CH₂, M), 49.3 (2x CH₂, K), 44.4 (CH₂, F), 38.2 (CH₂, J), 27.7 (3x CH₃, N). **Schmelzpunkt:** hygroskopisch. **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₆₂H₁₀₀N₁₀O₂₁ [M+H]⁺: 1321.7086; gefunden: 1321.7137. **Reinheit:** 98%.

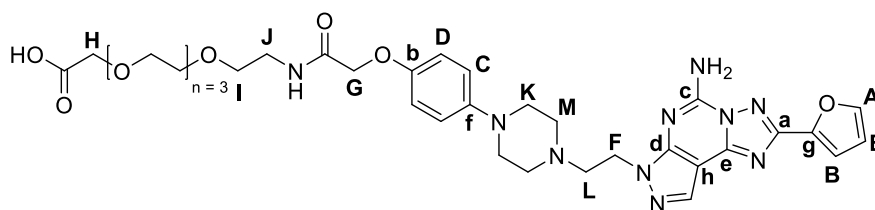
Synthese von *tert*-Butyl 1-(4-(4-(2-(5-amino-2-(furan-2-yl)-7*H*-pyrazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)-2-oxo-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63-icosaoxa-3-azapentahexacontan-65-oat



Das Edukt 2-(4-(4-(2-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-7*H*-pyrazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)essigsäure (20 mg, 0.04 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (500 µL) gelöst und HATU (17.9 mg, 0.07 mmol, 1.2 Äq.) hinzugefügt. In einem separaten Gefäß wird *tert*-Butyl-62-amino-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60-icosaoxadohexacontanoat (44.5 mg, 0.044 mmol, 1.1 Äq.) in Dichlormethan (500 µL) gelöst und Hünigbase (10.3 mg, 0.08 mmol, 2.0 Äq.) addiert. Nach 5 min wird das Amin zur aktivierten Säure gegeben und für 24 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wird entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC (70%-100% MeOH/H₂O, 15min) gereinigt. Dabei werden 52.7 mg, 0.035 mmol, 88% des Produktes erhalten.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.16 (s, 1H, NCH), 8.05 (bs, 2H, NH₂), 7.95 (t, ³J_{H,H} = 5.82 Hz, 1H, NH), 7.93 (dd, ³J_{H,H} = 1.78 Hz, ³J_{H,H} = 0.77 Hz, 1H, A), 7.22 (dd, ³J_{H,H} = 3.43 Hz, ³J_{H,H} = 0.77 Hz, 1H, B), 6.87–6.81 (m, 4H, C+D), 6.73 (dd, ³J_{H,H} = 1.76 Hz, ³J_{H,H} = 3.41 Hz, 1H, E), 4.42 (t, ³J_{H,H} = 6.81 Hz, 2H, F), 4.36 (s, 2H, G), 3.97 (s, 2H, H), 3.58–3.55 (m, 2H, CH₂), 3.54–3.51 (m, 2H, CH₂), 3.51–3.48 (m, 72H, 28 x CH₂), 3.44 (t, ³J_{H,H} = 5.96 Hz, I), 3.28 (q, ³J_{H,H} = 5.88 Hz, 2H, J), 2.98–2.94 (m, 4H, K), 2.83 (t, ³J_{H,H} = 6.79 Hz, 2H, L), 2.61–2.57 (m, 4H, M), 1.42 (s, 9H, N). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 169.3 (C_q, C_{Ester}), 168.0 (C_q, C_{Amid}), 155.4 (C_q, a), 151.2 (C_q, b), 148.7 (C_q, c), 148.6 (C_q, d), 146.2 (C_q, e), 146.0 (C_q, f), 145.5 (C_q, g), 145.1 (CH, A), 131.4 (CH, NCH), 117.0 (2 x CH, C, D), 115.3 (2 x CH, C, D), 112.2 (CH, B), 112.1 (CH, E), 95.6 (C_q, h), 80.6 (C_q, i), 69.8 (CH₂, PEG), 69.8 (33 x CH₂, PEG), 69.7 (CH₂, PEG), 69.7 (CH₂, PEG), 69.7 (CH₂, PEG), 69.5 (CH₂, PEG), 68.8 (CH₂, I), 68.1 (CH₂, H), 67.6 (CH₂, G), 56.5 (CH₂, L), 52.6 (2x CH₂, M), 49.3 (2x CH₂, K), 44.4 (CH₂, F), 38.2 (CH₂, J), 27.7 (3x CH₃, N). **Schmelzpunkt:** hygroscopisch. **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₇₀H₁₁₆N₁₀O₂₅ [M+H]⁺: 1497.8139; gefunden: 1497.8186. **Reinheit:** 96%.

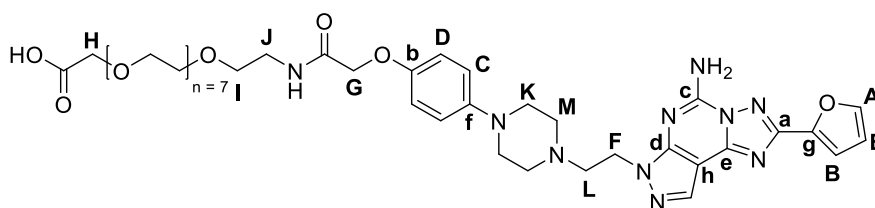
Synthese von 1-(4-(4-(2-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)-2-oxo-6,9,12,15-tetraoxa-3-azaheptadecan-17-säure



Das Edukt *tert*-Butyl-1-(4-(4-(2-(5-amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)-2-oxo-6,9,12,15-tetraoxa-3-azaheptadecan-17-olat (8.7 mg, 0.01 mmol, 1.0 Äq.) wird in Trifluoressigsäure:Dichlormethan (6:4) gelöst und TIPS (25 µL) addiert. Nach 2 h bei RT wird das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC gereinigt. Das Produkt wird mit 6.9 mg, 0.0093 mmol, 93% erhalten.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.64 (t, ³*J*_{H,H} = 5.85 Hz, NH), 8.16 (s, 1H, NCH), 8.08 (bs, 2H, NH₂), 7.95–7.91 (m, 1H, A), 7.22 (d, ³*J*_{H,H} = 3.37 Hz, 1H, B), 6.84–6.82 (m, 4H, C, D), 6.73 (dd, ³*J*_{H,H} = 1.77 Hz, ³*J*_{H,H} = 3.43 Hz, 1H, E), 4.42 (s, 2H, G), 4.42 (t, ³*J*_{H,H} = 6.72 Hz 2H, F), 3.55 (s, 2H, H), 3.53–3.49 (m, 12H, 6 x CH₂), 3.47 (t, ³*J*_{H,H} = 5.61 Hz, I), 3.31–3.26 (m, 2H, J), 2.98–2.93 (m, 4H, K), 2.83 (t, ³*J*_{H,H} = 6.81 Hz, 2H, L), 2.62–2.57 (m, 4H, M). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 171.8 (C_q, C_{Säure}), 168.0 (C_q, C_{Amid}), 155.3 (C_q, a), 151.2 (C_q, b), 148.7 (C_q, c), 148.6 (C_q, d), 146.2 (C_q, e), 145.9 (C_q, f), 145.5 (C_q, g), 145.1 (CH, A), 131.4 (CH, NCH), 117.0 (2 x CH, C, D), 115.3 (2 x CH, C, D), 112.2 (CH, B), 112.1 (CH, E), 95.6 (C_q, h), 69.7 (2 x CH₂), 69.7 (CH₂), 69.6 (CH₂), 69.5 (2 x CH₂), 68.8 (CH₂), 68.4 (CH₂), 67.5 (CH₂, G), 56.5 (CH₂, L), 52.6 (2x CH₂, M), 49.3 (2x CH₂, K), 44.4 (CH₂, F), 38.2 (CH₂, J). **Schmelzpunkt:** 183.2–183.3°C. **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₃₄H₄₅N₁₀O₉ [M+H]⁺: 737.3365; gefunden: 737.3360. **Reinheit:** 99%.

Synthese von 1-(4-(4-(2-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)-2-oxo-6,9,12,15,18,21,24,27-octaoxa-3-azanonacosan-29-säure

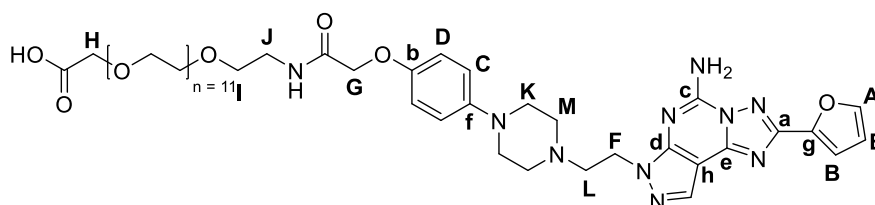


Das Edukt *tert*-Butyl 1-(4-(4-(2-(5-amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)-2-oxo-6,9,12,15,18,21,24,27-octaoxa-3-

azanonacosan-29-olat (29.8 mg, 0.03 mmol, 1.0 Äq.) wird in Trifluoressigsäure:Dichlormethan (6:4, $V_{\text{Ges}} = 400 \mu\text{L}$) gelöst und TIPS (25 μL) addiert. Nach 2 h bei RT wird das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt, in 1 M NaOH Lösung gelöst und das Rohprodukt mittels HPLC gereinigt. Das Produkt wird mit 24.3 mg, 0.027 mmol, 89% erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm] = 8.16 (s, 1H, NCH), 8.06 (bs, 2H, NH_2), 8.01 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.83 \text{ Hz}$, NH), 7.93 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 1.38 \text{ Hz}$, 1H, A), 7.22 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 3.35 \text{ Hz}$, 1H, B), 6.88–6.80 (m, 4H, C+D), 6.73 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 1.77 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H,H}} = 3.30 \text{ Hz}$, 1H, E), 4.42 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.78 \text{ Hz}$, 2H, F), 4.36 (s, 2H, G), 3.78 (s, 2H, H), 3.55–3.52 (m, 2H, CH_2), 3.52–3.48 (m, 26H, 13 x CH_2), 3.44 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.00 \text{ Hz}$, I), 3.28 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 5.96 \text{ Hz}$, 2H, J), 2.98–2.93 (m, 4H, K), 2.83 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.80 \text{ Hz}$, 2H, L), 2.62–2.57 (m, 4H, M). **$^{13}\text{C NMR}$** (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm] = 171.8 (C_q , $\text{C}_{\text{Säure}}$), 168.0 (C_q , C_{Amid}), 155.4 (C_q , a), 151.2 (C_q , b), 148.7 (C_q , c), 148.6 (C_q , d), 146.2 (C_q , e), 145.9 (C_q , f), 145.5 (C_q , g), 145.1 (CH, A), 131.4 (CH, NCH), 117.0 (2 x CH, C, D), 115.3 (2 x CH, C, D), 112.2 (CH, B), 112.1 (CH, E), 95.6 (C_q , h), 69.7 (4 x CH_2), 69.7 (3 x CH_2), 69.7 (3 x CH_2), 69.7 (CH_2), 69.6 (CH_2), 69.5 (CH_2), 69.3 (CH_2), 69.2 (br, CH_2), 68.8 (CH_2), 67.5 (CH_2 , G), 56.5 (CH_2 , L), 52.6 (2x CH_2 , M), 49.3 (2x CH_2 , K), 44.4 (CH_2 , F), 38.2 (CH_2 , J). **Schmelzpunkt:** 106.7–108.0°C. **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für $\text{C}_{42}\text{H}_{60}\text{N}_{10}\text{O}_{13}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 913.4414; gefunden: 913.4427. **Reinheit:** 98%.

Synthese von 1-(4-(4-(2-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)-2-oxo-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39-dodecaoxa-3-azahentetracontan-41-säure

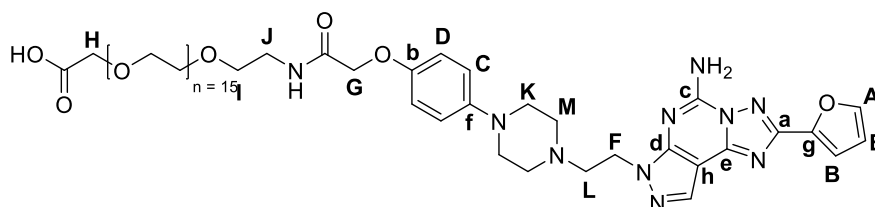


Das Edukt *tert*-Butyl 1-(4-(4-(2-(5-amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)-2-oxo-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39-dodecaoxa-3-azahentetracontan-41-olat (30.0 mg, 0.026 mmol, 1.0 Äq.) wird in Trifluoressigsäure:Dichlormethan (6:4, $V_{\text{Ges}} = 400 \mu\text{L}$) gelöst und TIPS (25 μL) addiert. Nach 2 h bei RT wird das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt, in 1 M NaOH Lösung gelöst und das Rohprodukt mittels HPLC gereinigt. Das Produkt wird mit 27.2 mg, 0.025 mmol, 99% erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm] = 8.16 (s, 1H, NCH), 8.06 (bs, 2H, NH_2), 8.01 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.80 \text{ Hz}$, NH), 7.94–7.93 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 1.30 \text{ Hz}$, 1H, A), 7.22 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 3.37 \text{ Hz}$, 1H, B), 6.88–6.80 (m, 4H, C+D), 6.73 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 1.72 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H,H}} = 3.38 \text{ Hz}$, 1H, E), 4.42 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.78 \text{ Hz}$, 2H, F), 4.36 (s, 2H, G), 3.79 (s, 2H, H), 3.56–3.52 (m, 2H, CH_2), 3.52–3.48 (m, 42H, 21 x CH_2),

3.44 (t, $^3J_{H,H} = 5.98$ Hz, l), 3.28 (q, $^3J_{H,H} = 5.97$ Hz, 2H, J), 2.98–2.93 (m, 4H, K), 2.83 (t, $^3J_{H,H} = 6.79$ Hz, 2H, L), 2.61–2.57 (m, 4H, M). $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 171.8 (C_q, C_{Säure}), 168.0 C_q, C_{Amid}), 155.4 (C_q, a), 151.2 (C_q, b), 148.7 (C_q, c), 148.6 (C_q, d), 146.2 (C_q, e), 145.9 (C_q, f), 145.5 (C_q, g), 145.1 (CH, A), 131.4 (CH, NCH), 117.0 (2 x CH, C, D), 115.3 (2 x CH, C, D), 112.2 (CH, B), 112.1 (CH, E), 95.6 (C_q, h), 69.8 (14 x CH₂), 69.7 (4 x CH₂), 69.7 (CH₂), 69.6 (CH₂), 69.5 (CH₂), 69.3 (CH₂), 69.1 (br, CH₂), 68.8 (CH₂), 67.6 (CH₂, G), 56.5 (CH₂, L), 52.6 (2x CH₂, M), 49.3 (2x CH₂, K), 44.4 (CH₂, F), 38.2 (CH₂, J). **Schmelzpunkt:** hygroskopisch. **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₅₀H₇₆N₁₀O₁₇ [M+H]⁺: 1089.5463; gefunden: 1089.5471. **Reinheit:** 98%.

Synthese von 1-(4-(4-(2-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)-2-oxo-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51-hexadeca-3-azatripentacontan-53-säure

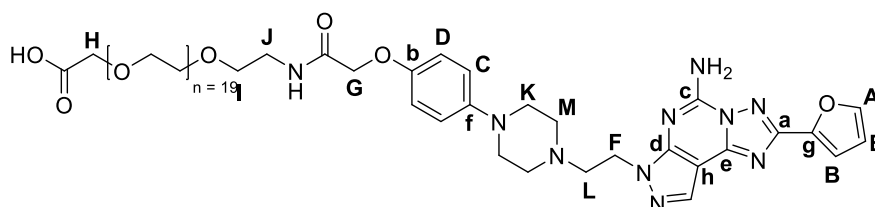


Das Edukt *tert*-Butyl 1-(4-(4-(2-(5-amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)-2-oxo-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51-hexadeca-3-azatripentacontan-53-olat (39.0 mg, 0.03 mmol, 1.0 Äq.) wird in Trifluoressigsäure:Dichlormethan (6:4, V_{Ges} = 400 μL) gelöst und TIPS (25 μL) addiert. Nach 2 h bei RT wird das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt, in 1 M NaOH Lösung gelöst und das Rohprodukt mittels HPLC gereinigt. Das Produkt wird mit 37.1 mg, 0.029 mmol, 98% erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 8.16 (s, 1H, NCH), 8.05 (bs, 2H, NH₂), 7.98 (t, $^3J_{H,H} = 5.80$ Hz, NH), 7.93 (d, $^3J_{H,H} = 1.35$ Hz, 1H, A), 7.22 (d, $^3J_{H,H} = 3.34$ Hz, 1H, B), 6.87–6.81 (m, 4H, C+D), 6.73 (dd, $^3J_{H,H} = 1.73$ Hz, $^3J_{H,H} = 3.38$ Hz, 1H, E), 4.42 (t, $^3J_{H,H} = 6.80$ Hz, 2H, F), 4.36 (s, 2H, G), 3.73 (s, 2H, H), 3.54–3.52 (m, 2H, CH₂), 3.52–3.47 (m, 58H, 29 x CH₂), 3.44 (t, $^3J_{H,H} = 5.98$ Hz, l), 3.28 (q, $^3J_{H,H} = 5.97$ Hz, 2H, J), 2.98–2.94 (m, 4H, K), 2.83 (t, $^3J_{H,H} = 6.79$ Hz, 2H, L), 2.61–2.58 (m, 4H, M). $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 171.8 (C_q, C_{Säure}), 168.0 C_q, C_{Amid}), 155.4 (C_q, a), 151.2 (C_q, b), 148.7 (C_q, c), 148.6 (C_q, d), 146.2 (C_q, e), 145.9 (C_q, f), 145.5 (C_q, g), 145.1 (CH, A), 131.4 (CH, NCH), 117.0 (2 x CH, C, D), 115.3 (2 x CH, C, D), 112.2 (CH, B), 112.1 (CH, E), 95.6 (C_q, h), 69.8 (24 x CH₂), 69.7 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.6 (CH₂), 69.5 (br, CH₂), 69.5 (CH₂), 69.2 (CH₂), 68.8 (CH₂), 67.6 (CH₂, G), 56.5 (CH₂, L), 52.6 (2x CH₂, M), 49.3 (2x CH₂, K), 44.4 (CH₂, F), 38.2 (CH₂, J). **Schmelzpunkt:**

hygroskopisch. **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für $C_{58}H_{92}N_{10}O_{21}$ $[M+H]^+$: 1265.6511; gefunden: 1265.6592. **Reinheit**: 98%.

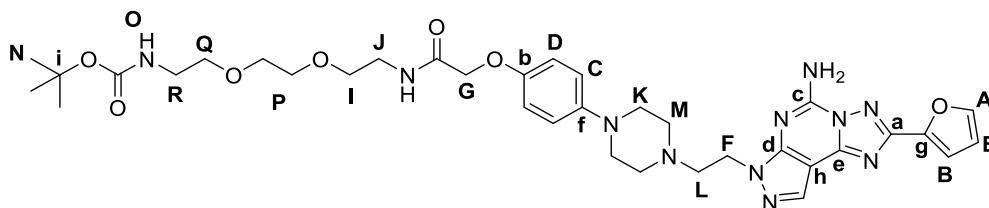
Synthese von 1-(4-(4-(2-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)-2-oxo-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63-icosaoxa-3-azapentaconta-65-säure



Das Edukt *tert*-Butyl 1-(4-(4-(2-(5-amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)-2-oxo-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63-icosaoxa-3-azapentaconta-65-oate (43.5 mg, 0.03 mmol, 1.0 Äq.) wird in Trifluoressigsäure:Dichlormethan (6:4, V_{Ges} = 400 μ L) gelöst und TIPS (25 μ L) addiert. Nach 2 h bei RT wird das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt, in 1 M NaOH Lösung gelöst und das Rohprodukt mittels HPLC gereinigt. Das Produkt wird mit 33.5 mg, 0.023 mmol, 77% erhalten.

1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 8.16 (s, 1H, NCH), 8.05 (bs, 2H, NH₂), 7.95 (t, $^3J_{H,H}$ = 5.87 Hz, NH), 7.93 (d, $^3J_{H,H}$ = 1.40 Hz, 1H, A), 7.22 (d, $^3J_{H,H}$ = 3.34 Hz, 1H, B), 6.87–6.81 (m, 4H, C+D), 6.73 (dd, $^3J_{H,H}$ = 1.75 Hz, $^3J_{H,H}$ = 3.46 Hz, 1H, E), 4.42 (t, $^3J_{H,H}$ = 6.78 Hz, 2H, F), 4.36 (s, 2H, G), 3.88 (s, 2H, H), 3.57–3.54 (m, 2H, CH₂), 3.52–3.47 (m, 74H, 37 x CH₂), 3.44 (t, $^3J_{H,H}$ = 5.97 Hz, I), 3.28 (q, $^3J_{H,H}$ = 5.93 Hz, 2H, J), 2.98–2.94 (m, 4H, K), 2.83 (t, $^3J_{H,H}$ = 6.76 Hz, 2H, L), 2.61–2.58 (m, 4H, M). **^{13}C NMR** (151 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 171.4 (C_q, C_{Säure}), 168.0 C_q, C_{Amid}), 155.4 (C_q, a), 151.2 (C_q, b), 148.7 (C_q, c), 148.6 (C_q, d), 146.2 (C_q, e), 146.0 (C_q, f), 145.5 (C_q, g), 145.1 (CH, A), 131.4 (CH, NCH), 117.0 (2 x CH, C, D), 115.3 (2 x CH, C, D), 112.2 (CH, B), 112.1 (CH, E), 95.6 (C_q, h), 69.8 (31 x CH₂), 69.7 (2 x CH₂), 69.7 (CH₂), 69.5 (CH₂), 69.5 (CH₂), 68.7 (CH₂), 68.5 (br, CH₂), 67.6 (CH₂, G), 56.5 (CH₂, L), 52.6 (2x CH₂, M), 49.3 (2x CH₂, K), 44.4 (CH₂, F), 38.2 (CH₂, J). **Schmelzpunkt**: hygroskopisch. **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für $C_{66}H_{108}N_{10}O_{25}$ $[M+H]^+$: 1441.7560; gefunden: 1441.7658. **Reinheit**: 97%.

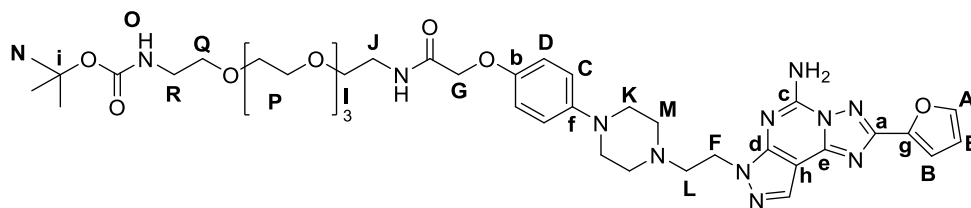
Synthese von *tert*-Butyl-(2-(2-(2-(2-(4-(4-(2-(5-amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)acetamido)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbammat



Das Edukt 2-(4-(4-(2-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)essigsäure (20 mg, 0.04 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (500 µL) gelöst und HATU (17.9 mg, 0.07 mmol, 1.2 Äq.) hinzugefügt. In einem separaten Gefäß wird *tert*-Butyl-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethyl)carbammat (10.8 mg, 0.044 mmol, 1.1 Äq.) in Dichlormethan (500 µL) gelöst und Hünigbase (10.3 mg, 0.08 mmol, 2.0 Äq.) addiert. Nach 5 min wird das Amin zur aktivierten Säure gegeben und für 24 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit 1 M NaOH Lösung versetzt und mit Dichlormethan (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung an SiO₂ (Dichlormethan/MeOH 93/7) ergibt das Produkt mit 15.0 mg, 0.02 mmol, 50%.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.16 (s, 1H, NCH), 8.05 (bs, 2H, NH₂), 7.95 (t, ³J_{H,H} = 5.86 Hz, 1H, NH), 7.93 (dd, ³J_{H,H} = 1.68 Hz, ³J_{H,H} = 0.72 Hz, 1H, A), 7.22 (dd, ³J_{H,H} = 3.45 Hz, ³J_{H,H} = 0.80 Hz, 1H, B), 6.87–6.81 (m, 4H, C+D), 6.73 (dd, ³J_{H,H} = 1.82 Hz, ³J_{H,H} = 3.42 Hz, 1H, E), 6.72 (t, Signal unter 6.73 Hz, 1H, O), 4.42 (t, ³J_{H,H} = 6.81 Hz, 2H, F), 4.36 (s, 2H, G), 3.50–3.46 (m, 4H, 2 x CH₂, P), 3.43 (t, ³J_{H,H} = 6.00 Hz, 2H, CH₂, I), 3.36 (t, ³J_{H,H} = 6.12 Hz, 2H, CH₂, Q), 3.28 (dt, ³J_{H,H} = 5.86 Hz, ³J_{H,H} = 6.01 Hz, J), 3.05 (q, ³J_{H,H} = 6.03 Hz, 2H, R), 2.98–2.94 (m, 4H, K), 2.83 (t, ³J_{H,H} = 6.81 Hz, 2H, L), 2.62–2.57 (m, 4H, M), 1.36 (s, 9H, N). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 168.0 (C_q, C_{Amid}), 155.6 (C_q, C_{Carbammat}), 155.3 (C_q, a), 151.2 (C_q, b), 148.7 (C_q, c), 148.6 (C_q, d), 146.2 (C_q, e), 146.0 (C_q, f), 145.5 (C_q, g), 145.1 (CH, A), 131.4 (CH, NCH), 117.0 (2 x CH, C, D), 115.3 (2 x CH, C, D), 112.2 (CH, B), 112.1 (CH, E), 95.6 (C_q, h), 77.6 (C_q, i), 69.5 (CH₂, PEG), 69.4 (CH₂, PEG), 69.1 (CH₂, PEG), 68.8 (CH₂, I), 67.6 (CH₂, G), 56.5 (CH₂, L), 52.6 (2x CH₂, M), 49.3 (2x CH₂, K), 44.4 (CH₂, F), 39.7 (CH₂, R), 38.2 (CH₂, J), 28.2 (3x CH₃, N). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 734.5 ([M+H]⁺). **Reinheit:** 98%.

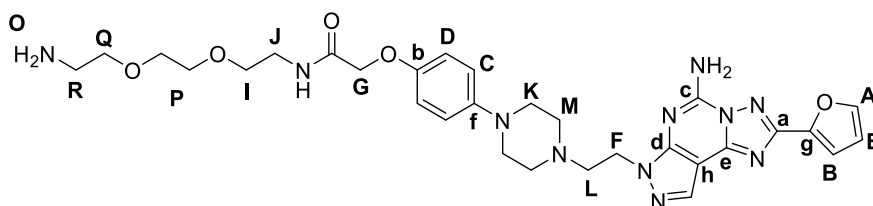
Synthese von *tert*-Butyl-(1-(4-(4-(2-(5-amino-2-(furan-2-yl)-7*H*-pyrazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)-2-oxo-6,9,12,15-tetraoxa-3-azaheptadecan-17-yl)carbamat



Das Edukt 2-(4-(4-(2-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-7*H*-pyrazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)essigsäure (20 mg, 0.04 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (500 µL) gelöst und HATU (17.9 mg, 0.07 mmol, 1.2 Äq.) hinzugefügt. In einem separaten Gefäß wird *tert*-Butyl-(14-amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecyl)carbamat (14.6 mg, 0.044 mmol, 1.1 Äq.) in Dichlormethan (500 µL) gelöst und Hünigbase (10.3 mg, 0.08 mmol, 2.0 Äq.) addiert. Nach 5 min wird das Amin zur aktivierten Säure gegeben und für 24 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit 1 M NaOH Lösung versetzt und mit Dichlormethan (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung an SiO₂ (Dichlormethan/MeOH 93/7) ergibt das Produkt mit 12.1 mg, 0.015 mmol, 37%.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.16 (s, 1H, NCH), 8.05 (bs, 2H, NH₂), 7.95 (t, ³J_{H,H} = 5.71 Hz, 1H, NH), 7.94–7.93 (m, 1H, A), 7.22 (dd, ³J_{H,H} = 3.40 Hz, ³J_{H,H} = 0.80 Hz, 1H, B), 6.87–6.81 (m, 4H, C+D), 6.73 (dd, ³J_{H,H} = 1.75 Hz, ³J_{H,H} = 3.39 Hz, 1H, E), 6.72 (t, Signal unter 6.73 Hz, 1H, O) 4.42 (t, ³J_{H,H} = 6.74 Hz, 2H, F), 4.36 (s, 2H, G), 3.50–3.46 (m, 12H, 6 x CH₂, P), 3.44 (t, ³J_{H,H} = 5.99 Hz, 2H, CH₂, I), 3.36 (t, ³J_{H,H} = 6.10 Hz, 2H, CH₂, Q), 3.28 (m, 2H, J), 3.05 (q, ³J_{H,H} = 5.89 Hz, 2H, R) 2.98–2.94 (m, 4H, K), 2.84 (t, ³J_{H,H} = 6.77 Hz, 2H, L), 2.62–2.57 (m, 4H, M), 1.36 (s, 9H, N). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 168.0 (C_q, C_{Amid}), 155.5 (C_q, C_{Carbamat}), 155.3 (C_q, a), 151.2 (C_q, b), 148.7 (C_q, c), 148.6 (C_q, d), 146.2 (C_q, e), 145.9 (C_q, f), 145.5 (C_q, g), 145.1 (CH, A), 131.4 (CH, NCH), 117.0 (2 x CH, C, D), 115.3 (2 x CH, C, D), 112.2 (CH, B), 112.1 (CH, E), 95.6 (C_q, h), 77.5 (C_q, i), 69.7 (2 x CH₂, PEG), 69.7 (2 x CH₂, PEG), 69.5 (CH₂, PEG), 69.5 (CH₂, PEG), 69.1 (CH₂, PEG), 68.8 (CH₂, I), 67.6 (CH₂, G), 56.5 (CH₂, L), 52.6 (2x CH₂, M), 49.3 (2x CH₂, K), 44.4 (CH₂, F), 39.7 (CH₂, R), 38.2 (CH₂, J), 28.2 (3x CH₃, N). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 822.6 ([M+H]⁺). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₃₉H₅₅N₁₁O₉ [M+Na]⁺: 844.4076; gefunden: 844.4087 **Reinheit:** 95%.

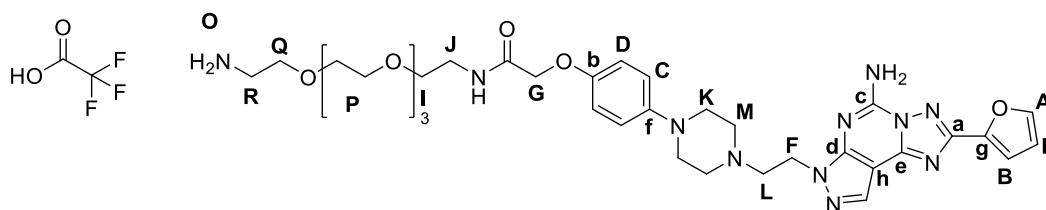
Synthese von 2-(4-(4-(2-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)-N-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethyl)acetamid



Das Rohprodukt aus der Reaktion zu *tert*-Butyl-(2-(2-(2-(2-(4-(4-(2-(5-amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)acetamido)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbammat (58 mg) wird in Dichlormethan (5 mL) gelöst und TIPS (0.220 mL) sowie Trifluoressigsäure (0.5 mL) addiert. Nach 4 h bei RT wird das Lösemittel entfernt das Rohprodukt in 1 M HCl Lösung gelöst und mittels HPLC (5% Acetonitril auf 100% Acetonitril) gereinigt. Das erhaltene Salz wird in 1 M NaOH Lösung gegeben und diese mit Dichlormethan extrahiert. Nach Entfernen des Lösemittels unter vermindertem Druck wird das Produkt mit 21.5 mg, 0.034 mmol, 85% über zwei Schritte erhalten.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.16 (s, 1H, NCH), 8.05 (bs, 2H, NH₂), 7.97 (t, ³*J*_{H,H} = 5.79 Hz, 1H, NH), 7.93 (dd, ³*J*_{H,H} = 1.57 Hz, ³*J*_{H,H} = 0.72 Hz, 1H, A), 7.22 (dd, ³*J*_{H,H} = 3.41 Hz, ³*J*_{H,H} = 0.72 Hz, 1H, B), 6.87–6.80 (m, 4H, C+D), 6.73 (dd, ³*J*_{H,H} = 1.77 Hz, ³*J*_{H,H} = 3.38 Hz, 1H, E), 4.42 (t, ³*J*_{H,H} = 6.80 Hz, 2H, F), 4.36 (s, 2H, G), 3.50–3.46 (m, 4H, 2 x CH₂, P), 3.43 (t, ³*J*_{H,H} = 5.99 Hz, 2H, CH₂, I), 3.36 (t, ³*J*_{H,H} = 5.81 Hz, 2H, CH₂, Q), 3.28 (dt, ³*J*_{H,H} = 6.01 Hz, ³*J*_{H,H} = 5.80 Hz, J, R), 2.98–2.93 (m, 4H, K), 2.83 (t, ³*J*_{H,H} = 6.81 Hz, 2H, L), 2.64 (t, ³*J*_{H,H} = 5.78 Hz, 2H, O), 2.61–2.57 (m, 4H, M). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 168.4 (C_q, C_{Amid}), 155.5 (C_q, a), 151.3 (C_q, b), 148.9 (C_q, c), 148.8 (C_q, d), 146.4 (C_q, e), 146.1 (C_q, f), 145.5 (C_q, g), 145.3 (CH, A), 131.6 (CH, NCH), 117.3 (2 x CH, C, D), 115.5 (2 x CH, C, D), 112.5 (CH, B), 112.1 (CH, E), 95.8 (C_q, h), 72.5 (CH₂, Q), 69.7 (2 x CH₂, PEG), 68.9 (CH₂, I), 67.6 (CH₂, G), 56.6 (CH₂, L), 52.7 (2x CH₂, M), 49.5 (2x CH₂, K), 44.5 (CH₂, F), 41.2 (CH₂, R) 38.4 (CH₂, J). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₃₀H₃₉N₁₁O₅ [M+H]⁺: 634.3208; gefunden: 634.3207. **Reinheit:** 97%.

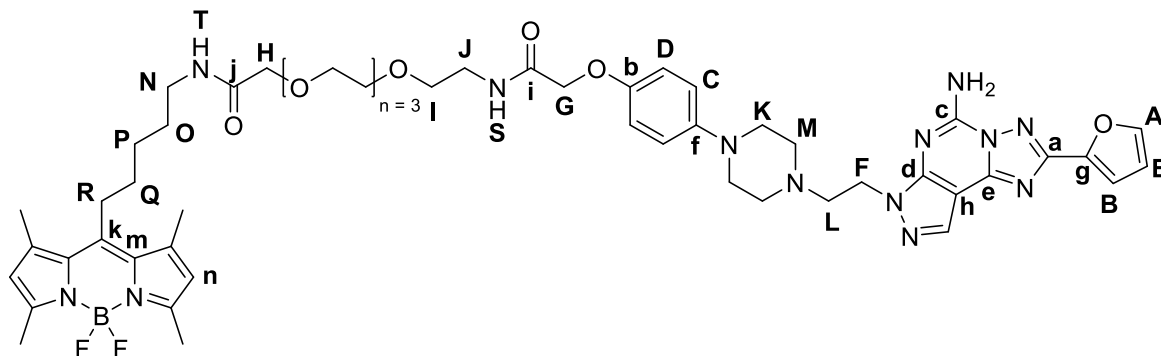
Synthese von 2-(4-(4-(2-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)-N-(14-amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecyl)acetamid



Das Rohprodukt aus der Reaktion zu *tert*-Butyl-(1-(4-(4-(2-(5-amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)-2-oxo-6,9,12,15-tetraoxa-3-azaheptadecan-17-yl)carbammat (12.1 mg, 14.7 μ mol, 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (5 mL) gelöst und TIPS (0.220 mL) sowie Trifluoressigsäure (0.5 mL) addiert. Nach 4 h bei RT wird das Lösemittel entfernt das Rohprodukt mittels HPLC (5% Acetonitril auf 100% Acetonitril) gereinigt. Das Produkt wird mit 11.0 mg, 13.0 μ mol, 89% erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 8.25 (s, 1H, NCH), 8.14 (bs, 2H, NH₂), 7.97 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 5.57 Hz, 1H, NH), 7.93 (dd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 1.56 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 0.51 Hz, 1H, A), 7.22 (dd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 3.45 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 0.51 Hz, 1H, B), 6.94–6.85 (m, 4H, C+D), 6.74 (dd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 1.73 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 3.37 Hz, 1H, E), 4.61 (bs, 2H, F), 4.39 (s, 2H, G), 3.59 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 4.99 Hz, 2H, CH₂, Q), 3.57–3.49 (m, 12H, 6 x CH₂, P), 3.43 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.10 Hz, 2H, CH₂, I), 3.28 (dt, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.01 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 5.80 Hz, J), 2.98–2.93 (m, 4H, K). **$^{13}\text{C NMR}$** (151 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 168.0 (C_q, C_{Amid}), 155.5 (C_q, a), 151.7 (C_q, b), 148.9 (C_q, c), 148.7 (C_q, d), 146.4 (C_q, e), 145.5 (C_q, g), 145.2 (CH, A), 144.9 (C_q, f), 132.1 (CH, NCH), 117.5 (2 x CH, C, D), 115.4 (2 x CH, C, D), 112.3 (CH, B), 112.1 (CH, E), 95.9 (C_q, h), 69.7 (CH₂, PEG), 69.7 (CH₂, PEG), 69.7 (CH₂, PEG), 69.6 (CH₂, PEG), 69.6 (CH₂, PEG), 69.5 (CH₂, PEG), 68.9 (CH₂, I), 67.6 (CH₂, G), 66.6 (CH₂, PEG), 55.0 (CH₂, L), 51.8 (2x CH₂, M), 47.5 (2x CH₂, K), 42.4 (CH₂, F), 38.6 (CH₂, R) 38.1 (CH₂, J). **LC-MS:** positiv [m/z] = 722.3 ([M+H]⁺). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₃₄H₄₇N₁₁O₇ [M+Na]⁺: 744.3552; gefunden: 744.3576. **Reinheit:** 95%.

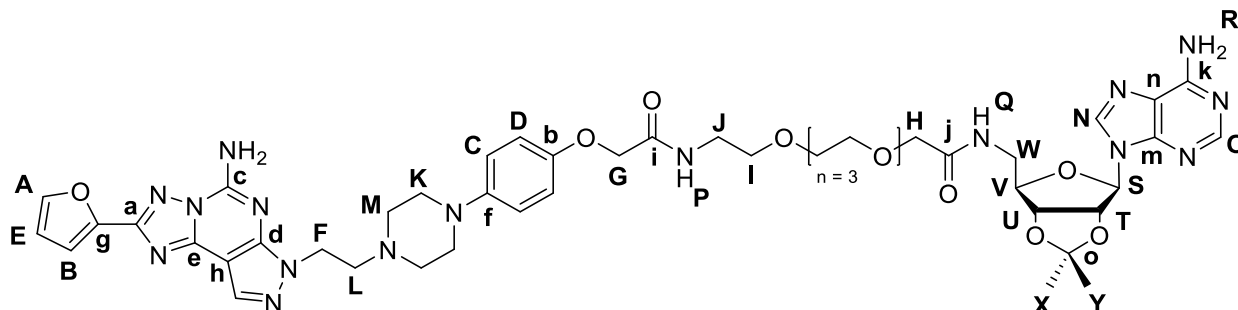
Synthese von 14-(2-(4-(4-(2-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)acetamido)-N-(5-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5H-4/4,5/4-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-yl)pentyl)-3,6,9,12-tetraoxatetradecanamid



Das Edukt 1-(4-(4-(2-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)-2-oxo-6,9,12,15-tetraoxa-3-azaheptadecan-17-säure (7.4 mg, 0.01 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (0.2 mL) gelöst und HATU (4.6 mg, 0.012 mmol, 1.2 Äq.) hinzugefügt. In einem separaten Gefäß wird das BODIPY-amin (5 mg, 0.015 mmol, 1.1 Äq.) in Dichlormethan (0.2 mL) gelöst und Hünigbase (2.6 mg, 0.02 mmol, 2.0 Äq.) addiert. Nach 5 min wird das Amin zur aktivierten Säure gegeben und für 12 h bei RT gerührt. Reinigung mittels HPLC ergibt 7.1 mg, 0.007 mmol, 67%.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.16 (s, 1H, NCH), 8.05 (bs, 2H, NH₂), 7.94 (t, ³J_{H,H} = 4.59 Hz, 1H, S), 7.95–7.91 (m, 1H, A), 7.64 (t, ³J_{H,H} = 5.76 Hz, 1H, T), 7.22 (d, ³J_{H,H} = 3.31 Hz, 1H, B), 6.87–6.80 (m, 4H, C, D), 6.72 (dd, ³J_{H,H} = 1.80 Hz, ³J_{H,H} = 3.43 Hz, 1H, E), 6.21 (s, 2H, n), 4.41 (t, ³J_{H,H} = 6.72 Hz, 2H, F), 4.35 (s, 2H, G), 3.85 (s, 2H, H), 3.57–3.45 (m, 12H, 6 x CH₂), 3.42 (t, ³J_{H,H} = 6.01 Hz, I), 3.27 (dt, ³J_{H,H} = 6.01 Hz, ³J_{H,H} = 6.01 Hz, 2H, J), 3.12 (dt, ³J_{H,H} = 6.58 Hz, ³J_{H,H} = 6.58 Hz, 2H, N), 2.98–2.93 (m, 4H, K), 2.94–2.89 (m, 2H, R), 2.86–2.80 (m, 2H, L), 2.62–2.56 (m, 4H, M), 2.39 (s, 6H, 2 x CH₃), 2.39 (s, 6H, 2 x CH₃), 1.59–1.52 (m, 2H, Q), 1.52–1.47 (m, 2H, O), 1.47–1.41 (m, 2H, P). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 169.1 (C_q, j), 168.0 (C_q, i), 155.4 (C_q, a), 153.0 (2 x C_q, C_{BODIPY}), 151.2 (C_q, b), 148.7 (C_q, e), 148.6 (C_q, d), 146.7 (C_q, k), 146.3 (C_q, c), 146.0 (C_q, f), 145.5 (C_q, g), 145.1 (CH, A), 140.8 (2 x C_q, C_{BODIPY}), 131.4 (CH, NCH), 130.7 (2 x C_q, m), 121.7 (2 x CH, n), 117.1 (2 x CH, C, D), 115.3 (2 x CH, C, D), 112.3 (CH, B), 112.1 (CH, E), 95.7 (C_q, h), 70.2 (CH₂), 70.0 (CH₂, H), 69.8 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.5 (CH₂), 68.8 (CH₂, I), 67.6 (CH₂, G), 56.5 (CH₂, L), 52.6 (2 x CH₂, M), 49.3 (2 x CH₂, K), 44.4 (CH₂, F), 38.2 (CH₂, J), 37.8 (CH₂, N), 31.1 (CH₂, Q), 28.8 (CH₂, O), 27.8 (CH₂, R), 27.0 (CH₂, P), 15.8 (2 x CH₃), 14.1 (2 x CH₃). **Schmelzpunkt:** Zersetzung ab 171°C **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₅₂H₆₈BF₂N₁₃O₈ [M+H]⁺: 1052.5456; gefunden: 1052.5324. **Reinheit:** 95%. **Absorption/Emission:** 498 nm / 508 nm.

Synthese von 2-(4-(4-(2-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)-N-(2-(2-(2-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(6-amino-9H-purin-9-yl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)methyl)amino)-2-oxoethoxy)ethoxy)ethyl)acetamid



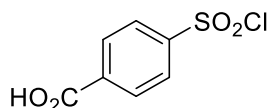
Das Edukt 1-(4-(4-(2-(5-Amino-2-(furan-2-yl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-7-yl)ethyl)piperazin-1-yl)phenoxy)-2-oxo-6,9,12,15-tetraoxa-3-azaheptadecan-17-säure (20.0 mg, 0.027 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (0.5 mL) gelöst und HATU (12.5 mg, 0.033 mmol, 1.2 Äq.) hinzugefügt. In einem separaten Gefäß wird 9-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(Aminomethyl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)-9H-purin-6-amin (9.1 mg, 0.0297 mmol, 1.1 Äq.) in Dichlormethan (0.5 mL) gelöst und Hünigbase (7.0 mg, 0.054 mmol, 2.0 Äq.) addiert. Nach 5 min wird das Amin zur aktivierten Säure gegeben und für 12 h bei RT gerührt. Reinigung mittels HPLC (MeOH) ergibt 14.4 mg, 0.015 mmol, 57% des Produktes.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.30 (s, 1H, N), 8.17 (s, 1H, O), 8.16 (s, 1H, NCH), 8.03 (bs, 2H, NH₂), 7.95 (t, ³J_{H,H} = 5.83 Hz, 1H, P), 7.92 (dd, ³J_{H,H} = 0.81 Hz, ³J_{H,H} = 1.65 Hz, 1H, A), 7.89 (t, ³J_{H,H} = 6.05 Hz, 1H, Q), 7.29 (s, 2H, R), 7.22 (dd, ³J_{H,H} = 3.45 Hz, ³J_{H,H} = 0.80 Hz, 1H, B), 6.86–6.78 (m, 4H, C, D), 6.72 (dd, ³J_{H,H} = 1.76 Hz, ³J_{H,H} = 3.42 Hz, 1H, E), 6.11 (d, ³J_{H,H} = 2.75 Hz, 1H, S), 5.42 (dd, ³J_{H,H} = 2.80 Hz, ³J_{H,H} = 6.38 Hz, 1H, T), 4.94 (dd, ³J_{H,H} = 3.31 Hz, ³J_{H,H} = 6.34 Hz, 1H, U), 4.42 (t, ³J_{H,H} = 6.72 Hz, 2H, F), 4.35 (s, 2H, G), 4.19 (td, ³J_{H,H} = 3.40 Hz, ³J_{H,H} = 6.20 Hz, 1H, V), 3.87 (s, 2H, H), 3.54–3.52 (m, 2H, CH₂), 3.52–3.49 (m, 2H, CH₂), 3.47–3.44 (m, 8H, 2 x CH₂, PEG, under water peak), 3.42 (t, ³J_{H,H} = 5.96 Hz, I), 3.42–3.38 (m, 1H, W), 3.37–3.32 (m, 1H, W), 3.27 (q, ³J_{H,H} = 5.90 Hz, 2H, J), 2.99–2.90 (m, 4H, K), 2.87–2.80 (m, 2H, L), 2.64–2.55 (m, 4H, M), 1.51 (s, 3H, X), 1.29 (s, 3H, Y). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 169.9 (C_q, j), 168.2 (C_q, i), 156.2 (C_q, k), 155.5 (C_q, a), 152.9 (C_q, O), 151.3 (C_q, b), 148.9 (C_q, m), 148.8 (C_q, e), 148.7 (C_q, d), 146.3 (C_q, c), 146.0 (C_q, f), 145.5 (C_q, g), 145.2 (CH, A), 140.1 (CH, N), 131.5 (CH, NCH), 119.3 (C_q, n), 117.2 (2 x CH, C, D), 115.4 (2 x CH, C, D), 113.6 (C_q, o), 112.4 (CH, B), 112.3 (CH, E), 95.8 (C_q, h), 89.0 (CH, S), 84.2 (CH, V), 83.0 (CH, T), 81.8 (CH, U), 70.3 (CH₂), 69.9 (CH₂, H), 69.9 (CH₂), 69.9 (CH₂), 69.6 (CH₂), 69.6 (CH₂), 68.8 (CH₂, I), 67.6 (CH₂, G), 56.5 (CH₂, L), 52.7 (2 x CH₂, M), 49.4 (2 x CH₂, K), 44.4 (CH₂, F), 40.4 (CH₂, W), 38.3 (CH₂, J), 27.1 (CH₃, X), 25.3 (CH₃, Y). **Schmelzpunkt:** 106.9–

115.4 °C. **LC-MS:** positiv $[m/z] = 1025.7$ ($[M+H]^+$). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für $C_{47}H_{60}N_{16}O_{11}$ $[M+Na]^+$: 1047.4520; gefunden: 1047.4520. **Reinheit:** 98%.

5.4 Synthese des PSB-1901-Derivats 2

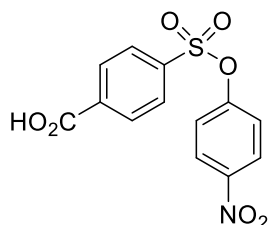
Synthese von 4-(Chlorosulfonyl)benzoesäure



Zu Kalium-4-sulfobenzoatesäure (5.00 g, 20.8 mmol, 1.0 Äq.) wird Chlorsulfonsäure (50.0 mL, 750.9 mmol, 36.1 Äq) unter Eiskühlung addiert. Nach 12 h bei RT wird Eis zur Reaktionsmischung gegeben und der Rückstand filtriert. Dieser wird mit kaltem Wasser gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Das Produkt wird mit 4.2 g, 19 mmol, 91% erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, Aceton- d_6) δ [ppm] = 8.41–8.37 (m, 2H, $H_{\text{arom.}}$), 8.31–8.27 (m, 2H, $H_{\text{arom.}}$). **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, Aceton- d_6) δ [ppm] = 165.8 (C_{q} , COOH) 148.0 (C_{q} , $C_{\text{arom.}}$), 137.9 (C_{q} , $C_{\text{arom.}}$), 132.2 (2 CH, $C_{\text{arom.}}$), 128.2 (2 CH, $C_{\text{arom.}}$). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für $C_7H_4ClO_4S$ $[M-H]^-$: 218.9519; gefunden: 218.9527. **Reinheit:** 83%.

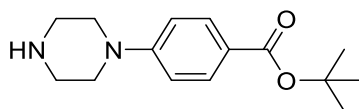
Synthese von 4-((4-Nitrophenoxy)sulfonyl)benzoesäure



Zu einer Lösung aus *para*-Nitrophenol (1.99 g, 14 mmol, 1.0 Äq.) in THF (50 mL,) und Tris-HCl Puffer (50 mm, pH 9.0, 50 mL) wird 4-(Chlorosulfonyl)benzoesäure (3.4 g, 14.0 mmol, 1.0 Äq.) gegeben. Der pH-Wert wird mit 1N NaOH zwischen 8 und 9 gehalten. Nach kompletter Reaktion des *para*-Nitrophenols wird mit 1N HCl auf pH 7 eingestellt und das THF unter vermindertem Druck entfernt. Nach Ansäuern mit 1N HCl auf pH 1 wird der Rückstand filtriert und aus Aceton/Cyclohexan umkristallisiert. Das Produkt wird mit 4.1 g, 12.4 mmol, 89% erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, Aceton- d_6) δ [ppm] = 8.33–8.26 (m, 4H, $H_{\text{arom.}}$), 8.09–8.04 (m, 2H, $H_{\text{arom.}}$), 7.43–7.36 (m, 2H, $H_{\text{arom.}}$). **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, Aceton- d_6) δ [ppm] = 166.0 (C_{q} , COOH), 154.5 (C_{q} , $C_{\text{arom.}}$), 147.6 (C_{q} , $C_{\text{arom.}}$), 139.2 (C_{q} , $C_{\text{arom.}}$), 137.2 (C_{q} , $C_{\text{arom.}}$), 131.7 (2 CH, $C_{\text{arom.}}$), 129.7 (2 CH, $C_{\text{arom.}}$), 126.5 (2 CH, $C_{\text{arom.}}$), 124.4 (2 CH, $C_{\text{arom.}}$). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für $C_{13}H_8NO_7S$ $[M-H]^-$: 322.0022; gefunden: 322.0045. **Reinheit:** 96%.

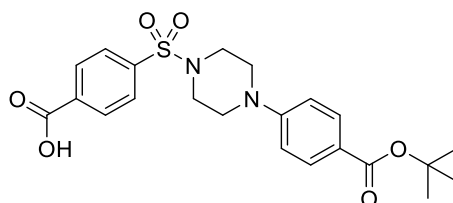
Synthese von *tert*-Butyl-4-(piperazin-1-yl)benzoat



Unter Schutzgas (Ar) wird Piperazin (2.58 g, 30 mmol, 3.0 Äq.) in DMSO (10 mL) gelöst und *tert*-Butyl-4-fluorobenzoat (1.96 g, 10 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wird für 18 h bei 120 °C gerührt und nach Reaktionsende mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird mit Ethylacetat (3 x 20 mL) extrahiert und die vereinten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet. Säulenchromatographische Reinigung an SiO₂ (CH₂Cl₂:MeOH 9:1) ergibt das Produkt mit 1.37 g, 5.2 mmol und 73%.

R_f (CH₂Cl₂:MeOH 9:1) = 0.23. **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.90–7.84 (m, 2H, H_{arom.}), 6.88–6.82 (m, 2H, H_{arom.}), 3.29–3.25 (m, 4H, NCH₂CH₂NH), 3.05–3.01 (m, 4H, NCH₂CH₂NH), 2.05 (s, 1H, NH), 1.57 (s, 9H, 3x CH₃). **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 166.1 (C_q, C_{Ester}), 154.4 (C_q, C_{arom.}), 131.1 (2 CH, C_{arom.}), 122.1 (C_q, C_{arom.}), 113.9 (2 CH, C_{arom.}), 80.2 (C_q, OC(CH₃)₃), 48.9 (2 CH₂, NCH₂), 45.9 (2 CH₂, NHCH₂), 28.4 (3 CH₃, OC(CH₃)₃). **LC-MS**: positiv [m/z] = 262.9 ([M+H]⁺). **Reinheit**: 97%.

Synthese von 4-((4-(4-(*tert*-Butoxycarbonyl)phenyl)piperazin-1-yl)sulfonyl)benzoesäure

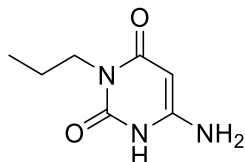


Unter Schutzgas (Ar) wird 4-(Chlorosulfonyl)benzoesäure (100 mg, 0.45 mmol, 1.0 Äq.) und *tert*-Butyl-4-(piperazin-1-yl)benzoat (118 mg, 0.45 mmol, 1.0 Äq.) in Dichlormethan (1 mL) vorgelegt und Hünig-Base (58 mg, 0.45 mmol, 1.0 Äq.) addiert. Nach 2 min wird die Reaktion mit Wasser versetzt und die Reaktionsmischung mit Ethylacetat (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck von Lösemittel befreit. Nach säulenchromatographischer Reinigung an SiO₂ (Dichlormethan:Methanol 95:5) wird das Produkt mit 170.8 mg, 38 mmol, 85% erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.19–8.14 (m, 2H, H_{arom.}), 7.90–7.86 (m, 2H, H_{arom.}), 7.72–7.66 (m, 2H, H_{arom.}), 6.94–6.89 (m, 2H, H_{arom.}), 3.41–3.35 (m, 4H, H_{Piperazin}), 3.08–3.02 (m, 4H, H_{Piperazin}), 1.49 (s, 9H, 3x CH₃). **¹³C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 166.1 (C_q, C_{Säure}), 164.8 (C_q, C_{Ester}), 152.9 (C_q, C_{arom.}), 138.4 (C_q, C_{arom.}), 135.2 (C_q, C_{arom.}), 130.5 (2x CH, C_{arom.}), 130.2 (2x CH, C_{arom.}), 127.8 (2x CH, C_{arom.}), 121.0 (C_q, C_{arom.}), 114.0 (2x CH, C_{arom.}), 79.6 (C_q,

$C(CH_3)_3$, 46.4 (2x CH_2 , $C_{\text{Piperazin}}$), 45.4 (2x CH_2 , $C_{\text{Piperazin}}$), 27.9 (3x CH_3 , $C(CH_3)_3$). **LC-MS:** positiv [m/z] = 447.1 ($[M+H]^+$). **Reinheit:** 99%.

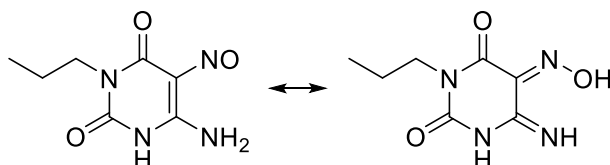
Synthese von 6-Amino-3-propyl-(1*H*,5*H*)-pyrimidin-2,4-dion



Unter Schutzgas (Ar) wird 6-Amino-(1*H*,5*H*)-pyrimidin-2,4-dion (2.5 g, 20 mmol, 1.0 Äq.) und Ammoniumsulfat (64 mg, kat.) in HMDS (7.2 mL, 34.4 mmol, 1.7 Äq.) gelöst und für 1 h bei 190 °C gerührt. Die farblose Reaktionsmischung wird abgekühlt und das 1-Iodpropan (5.85 g, 34.4 mmol, 1.7 Äq.) in Toluol (5 mL) zugegeben. Die Lösung wird für 4h bei 120 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird ges. $NaHCO_3$ -Lösung addiert und der entstandene Feststoff filtriert. Nach waschen mit Wasser (300 mL) und Entfernen des Lösemittels werden 1.69 g, 10 mmol, 50% Produkt erhalten.

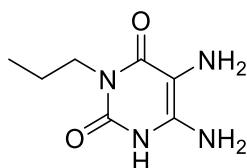
1H NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ [ppm] = 10.29 (s, 1H, N1-H), 6.15 (s, 2H, NH_2), 4.54 (d, $^4J_{H,H}$ = 2.12 Hz, 1H, C5-H), 3.64–3.58 (m, 2H, NCH_2), 1.50–1.42 (m, 2H, NCH_2CH_2), 0.81 (t, $^3J_{H,H}$ = 7.46 Hz, 3H, CH_3). **^{13}C NMR** (151 MHz, $DMSO-d_6$) δ [ppm] = 163.0 (C_q , C4), 153.5 (C_q , C6), 150.9 (C_q , C3), 74.1 (CH, C5), 40.2 (CH_2 , NCH_2), 20.9 (CH_2 , NCH_2CH_2), 11.1 (CH_3 , CH_3). **LC-MS:** positiv [m/z] = 170.0 ($[M+H]^+$). **Reinheit:** 95%.

Synthese von 6-Amino-5-nitroso-3-propyl-(1*H*)-pyrimidin-2,4-dion



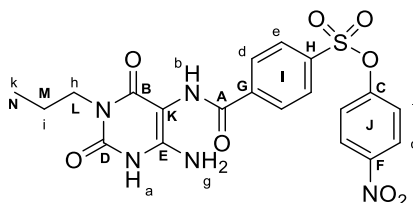
Eine Lösung aus 6-Amino-3-propyl-(1*H*)-pyrimidin-2,4-dion (1 g, 5.9 mmol, 1.0 Äq.) in Essigsäure/Wasser (50% v/v, 15 mL) wird auf 55 °C erhitzt und $NaNO_2$ (509.2 mg, 7.39 mmol, 1.25 Äq.) portionsweise dazu gegeben. Die Reaktionslösung wird für 20 min bei 55 °C gerührt, unter vermindertem Druck konzentriert und filtriert. Der orange Feststoff wird mit Wasser (3 x 10 mL) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Produkt wird mit 1.04 g, 5.2 mmol und 89% erhalten.

1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ [ppm] = 11.43 (bs, 1H, OH), 7.93 (s, 1H, N1-H), 3.85–3.76 (m, 2H, NCH_2), 3.32 (Signal überlagert von H_2O , 1H, NH), 1.65–1.56 (m, 2H, NCH_2CH_2), 0.90 (t, $^3J_{H,H}$ = 7.46 Hz, 3H, CH_3). **^{13}C NMR** (126 MHz, $DMSO-d_6$) δ [ppm] = 161.0 (C_q , C6), 149.0 (C_q , C4), 144.2 (C_q , C2), 139.7 (C_q , C5), 41.3 (CH_2 , NCH_2), 20.7 (CH_2 , NCH_2CH_2), 11.1 (CH_3 , CH_2CH_3). **LC-MS:** positiv [m/z] = 199.2 ($[M+H]^+$). **Reinheit:** 99%.

Synthese von 5,6-Diamino-3-propyl-(1*H*)-pyrimidin-2,4-dion


Zu 6-Amino-5-nitroso-3-propyl-(1*H*)-pyrimidin-2,4-dion (0.8 g, 4.0 mmol, 1.0 Äq.) in wässriger NH₄OH-Lösung (12.5 %, 11 mL) wird bei 70 °C Na₂S₂O₄ (1.53 g, 8.8 mmol, 2.2 Äq.) portionsweise gegeben. Nach dem Farbumschlag wird das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und der Feststoff in wenig Wasser aufgenommen. Der Feststoff wird filtriert und mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen im Hochvakuum wird das Produkt mit 515 mg, 2.8 mmol und 70% erhalten.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 12.55 (s, Rest NH), 5.57 (s, 2H, C6-NH₂), 3.68–3.63 (m, 2H, NCH₂), 3.32 (Signal überlagert von H₂O, 2H, NH₂), 1.52–1.45 (m, 2H, NCH₂CH₂), 0.82 (t, ³J_{H,H} = 7.47 Hz, 3H). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 160.2 (C_q, C6), 149.1 (C_q, C4), 142.2 (C_q, C2), 95.4 (C_q, C5), 40.9 (CH₂, NCH₂), 20.9 (CH₂, NCH₂CH₂), 11.2 (CH₃, CH₂CH₃). **LC-MS**: positiv [*m/z*] = 185.3 ([M+H]⁺) und 183.2. **Reinheit**: 92% (addiert 1:1).

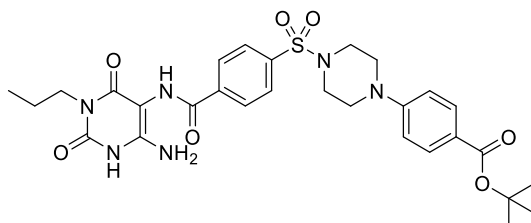
Synthese von 4-Nitrophenyl-4-((6-amino-2,4-dioxo-3-propyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)carbamoyl)benzoesulfonat


Zu einer Lösung aus 4-((4-Nitrophenoxy)sulfonyl)benzoesäure (797 mg, 2.5 mmol, 1.0 Äq.) in DMF (10 mL) wird COMU (1.16 g, 2.7 mmol, 1.1 Äq.) addiert. Separiert davon wird 5,6-Diamino-3-propyl-(1*H*)-pyrimidin-2,4-dion (500 mg, 2.7 mmol, 1.1 Äq.) und Hünigbase (351 mg, 2.7 mmol, 1.1 Äq.) in DMF (10 mL) gelöst. Die Lösung des Diamins wird zum Kopplungsreagenz getropft und ein Farbumschlag von rot nach violett beobachtet. Nach 12 h bei RT wird die Reaktionslösung mit Wasser versetzt und der entstehende Feststoff abfiltriert. Der Feststoff wird mit Wasser gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Das Produkt wird mit 1.1 g, 2.2 mmol und 89% erhalten.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.53 (s, 1H, a), 9.21 (s, 1H, b), 8.28 (d, ³J_{H,H} = 9.03 Hz, 2H, c), 8.19 (d, *J* = 8.31 Hz, 2H, d), 8.04 (d, *J* = 8.49 Hz, 2H, e), 7.40 (d, *J* = 9.07 Hz, 2H, f), 6.22 (s, 2H, g), 3.71–3.61 (m, 2H, h), 1.56–1.45 (m, 2H, i), 0.84 (t, ³J_{H,H} = 7.40 Hz, 3H, k). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 164.8 (C_q, A), 160.5 (C_q, B), 153.0 (C_q, C), 150.5 (C_q,

D), 149.9 (C_q, E), 146.2 (C_q, F), 140.6 (C_q, G), 135.6 (C_q, H), 129.4 (CH, I), 128.2 (CH, I), 125.9 (CH, J), 123.3 (CH, J), 86.4 (C_q, K), 40.9 (CH₂, L), 20.9 (CH₂, M), 11.1 (CH₃, N). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 490.3 ([M+H]⁺) und 183.2. **Reinheit:** 84%.

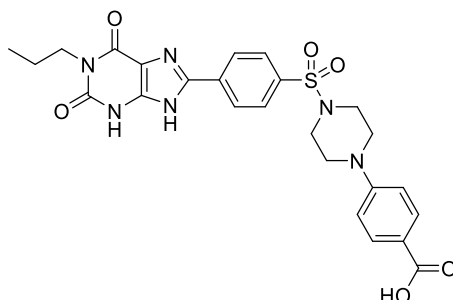
Synthese von *tert*-Butyl-4-(4-((4-((6-amino-2,4-dioxo-3-propyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)carbamoyl)phenyl)sulfonyl)piperazin-1-yl)benzoat



Zu einer Lösung aus 4-((4-((4-*tert*-Butoxycarbonyl)phenyl)piperazin-1-yl)sulfonyl)benzoesäure (110 mg, 0.25 mmol, 1.0 Äq.) in DMF (1 mL) wird COMU (116 mg, 0.27 mmol, 1.1 Äq.) addiert. Separiert davon wird 5,6-Diamino-3-propyl-(1*H*)-pyrimidin-2,4-dion (50 mg, 0.27 mmol, 1.1 Äq.) und Hünigbase (35 mg, 0.27 mmol, 1.1 Äq.) in DMF (1 mL) gelöst. Die Lösung des Diamins wird zum Kopplungsreagenz getropft. Nach 0.5 h bei RT wird die Reaktionslösung mit Wasser versetzt und der entstehende Feststoff filtriert. Der Feststoff wird mit Wasser gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Das Produkt wird mit 96 mg, 0.1 mmol und 63% erhalten.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.48 (s, 1H, NH), 9.13 (s, 1H, CONH), 8.21–8.15 (m, 2H, H_{arom.}), 7.8–7.84 (m, 2H, H_{arom.}), 7.72–7.66 (m, 2H, H_{arom.}), 6.95–6.89 (m, 2H, H_{arom.}), 6.16 (s, 2H, NH₂), 3.69–3.61 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 3.45–3.39 (m, 4H, H_{Piperazin}), 3.06–3.01 (m, 4H, H_{Piperazin}), 1.55–1.44 (m, 11H, 3x CH₃ + CH₂ NCH₂CH₂CH₃), 0.86–0.80 (m, 3H, NCH₂CH₂CH₃). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 166.1 (C_q, C_{Amid}), 164.8 (C_q, C_{Ester}), 160.5 (C_q), 152.8 (C_q, C_{arom.}), 150.4 (C_q), 149.9 (C_q), 138.9 (C_q), 136.7 (C_q), 130.5 (2x CH, C_{arom.}), 128.9 (2x CH, C_{arom.}), 127.3 (2x CH, C_{arom.}), 120.9 (C_q, C_{arom.}), 114.0 (2x CH, C_{arom.}), 86.5 (C_q, C5), 79.6 (C_q, C(CH₃)₃), 46.5 (2x CH₂, C_{Piperazin}), 45.4 (2x CH₂, C_{Piperazin}), 40.9 (CH₂, NCH₂CH₂CH₃), 27.9 (3x CH₃, C(CH₃)₃), 20.9 (CH₂, NCH₂CH₂CH₃), 11.2 (CH₃, NCH₂CH₂CH₃). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 613.5 ([M+H]⁺). **Reinheit:** 94%.

Synthese von 4-(4-((4-(2,6-Dioxo-1-propyl-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)phenyl)sulfonyl)piperazin-1-yl)benzoesäure



In DMF (1 mL) wird *tert*-Butyl-4-(4-((4-(6-amino-2,4-dioxo-3-propyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)carbamoyl)phenyl)sulfonyl)piperazin-1-yl)benzoat (100 mg, 0.16 mmol, 1.0 Äq.) gelöst und P₂O₅ (100 mg, 0.65 mmol, 4.0 Äq.) addiert. Die Reaktionsmischung wird zum Sieden erhitzt, bis sich die Farbe auf braun-orange ändert. Zur abgekühlten Reaktionslösung wird Wasser gegeben, bis kein weiterer Niederschlag entsteht. Nach Filtration wird der Feststoff mittels HPLC gereinigt. Das Produkt wird mit 24.1 mg, 0.04 mmol und 28% erhalten

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.34–8.31 (m, 2H, H_{arom.}), 7.89–7.85 (m, 2H, H_{arom.}), 7.75–7.72 (m, 2H, H_{arom.}), 6.95–6.91 (m, 2H, H_{arom.}), 3.84–3.79 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 3.42–3.37 (m, 4H, H_{Piperazin}), 3.09–3.04 (m, 4H, H_{Piperazin}), 1.61–1.52 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 0.87 (t, ³J_{H,H} = 7.42 Hz, 3H, NCH₂CH₂CH₃). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 167.1 (C_q, C_{Säure}), 155.2 (C_q), 153.0 (C_q), 151.0 (C_q), 148.4 (C_q), 147.7 (C_q), 135.1 (C_q), 133.9 (C_q), 130.8 (2x CH, C_{arom.}), 128.2 (2x CH, C_{arom.}), 126.8 (2x CH, C_{arom.}), 120.3 (C_q, C_{arom.}), 114.0 (2x CH, C_{arom.}), 109.4 (C_q), 46.5 (2x CH₂, C_{Piperazin}), 45.5 (2x CH₂, C_{Piperazin}), 41.4 (CH₂, NCH₂CH₂CH₃), 20.9 (CH₂, NCH₂CH₂CH₃), 11.2 (CH₃, NCH₂CH₂CH₃). **Schmelzpunkt:** >300 °C. **LC-MS:** positiv [m/z] = 539.3 ([M+H]⁺). **Reinheit:** 99%.

Röntgeneinkristallstrukturanalyse von 4-(4-((4-(2,6-Dioxo-1-propyl-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)phenyl)sulfonyl)piperazin-1-yl)benzoesäure (2)

Table 1 Crystal data and structure refinement for cu_5757f.	
Identification code	GPHARM73, TKP6013.9 // GXraycu_5757f
Crystal Habitus	clear colourless needle
Device Type	Bruker D8-Venture
Empirical formula	C ₂₉ H ₃₈ N ₆ O ₈ S ₃
Moiety formula	C ₂₅ H ₂₆ N ₆ O ₆ S, 2(C ₂ H ₆ O S)
Formula weight	694.83
Temperature/K	150.0
Crystal system	triclinic
Space group	P-1

EXPERIMENTALTEIL

a/Å	5.28770(10)
b/Å	15.2045(4)
c/Å	23.9866(7)
α /°	107.942(2)
β /°	93.447(2)
γ /°	95.952(2)
Volume/Å ³	1816.11(8)
Z	2
$\rho_{\text{calc}}/\text{cm}^3$	1.271
μ/mm^{-1}	2.314
F(000)	732.0
Crystal size/mm ³	0.12 × 0.05 × 0.03
Absorption correction	empirical
Tmin; Tmax	0.4434; 0.7536
Radiation	CuK α ($\lambda = 1.54178$)
2 Θ range for data collection/°	6.158 to 135.476°
Completeness to theta	0.996
Index ranges	-6 ≤ h ≤ 6, -18 ≤ k ≤ 18, -28 ≤ l ≤ 28
Reflections collected	40112
Independent reflections	6566 [R _{int} = 0.1005, R _{sigma} = 0.0759]
Data/restraints/parameters	6566/0/421
Goodness-of-fit on F ²	1.050
Final R indexes [I ≥ 2 σ (I)]	R ₁ = 0.0689, wR ₂ = 0.1693
Final R indexes [all data]	R ₁ = 0.1069, wR ₂ = 0.1914
Largest diff. peak/hole / e Å ⁻³	0.41/-0.61

Table 2 Bond Lengths for cu_5757f.

Atom	Atom	Length/Å	Atom	Atom	Length/Å
S1	O1	1.425 (3)	C5	C6	1.401 (6)
S1	O2	1.440 (3)	C5	C10	1.407 (6)
S1	N1	1.629 (4)	C6	C7	1.380 (6)
S1	C12	1.756 (4)	C7	C8	1.402 (6)
O3	C11	1.335 (6)	C8	C9	1.377 (7)
O4	C11	1.213 (6)	C8	C11	1.467 (7)
O5	C21	1.234 (5)	C9	C10	1.373 (7)
O6	C22	1.211 (5)	C12	C13	1.397 (6)
N1	C1	1.480 (5)	C12	C18	1.389 (6)
N1	C4	1.484 (5)	C13	C14	1.389 (6)
N2	C2	1.471 (5)	C14	C15	1.394 (6)
N2	C3	1.459 (5)	C15	C16	1.450 (6)
N2	C5	1.385 (6)	C15	C17	1.396 (6)
N3	C16	1.358 (5)	C17	C18	1.382 (6)
N3	C19	1.359 (5)	C19	C20	1.365 (6)

EXPERIMENTALTEIL

N4	C16	1.355 (5)	C20	C21	1.426 (6)
N4	C20	1.362 (5)	C23	C24	1.510 (7)
N5	C19	1.368 (5)	C24	C25	1.533 (6)
N5	C22	1.367 (5)	S2	O7	1.498 (3)
N6	C21	1.402 (6)	S2	C26	1.768 (5)
N6	C22	1.409 (5)	S2	C27	1.773 (5)
N6	C23	1.474 (5)	S3	O8	1.517 (3)
C1	C2	1.500 (6)	S3	C28	1.788 (5)
C3	C4	1.504 (6)	S3	C29	1.782 (5)

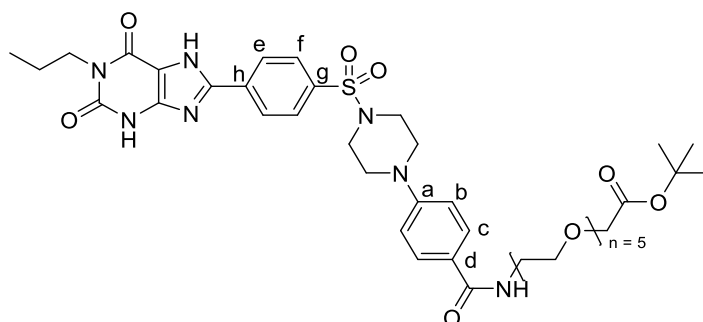
Table 3 Bond Angles for cu_5757f.

Atom	Atom	Atom	Angle/°	Atom	Atom	Atom	Angle/°
O1	S1	O2	120.21 (19)	O4	C11	C8	124.4 (5)
O1	S1	N1	107.10 (19)	C13	C12	S1	119.9 (3)
O1	S1	C12	108.1 (2)	C18	C12	S1	119.8 (3)
O2	S1	N1	106.50 (19)	C18	C12	C13	120.3 (4)
O2	S1	C12	106.85 (19)	C14	C13	C12	119.4 (4)
N1	S1	C12	107.46 (19)	C13	C14	C15	120.6 (4)
C1	N1	S1	116.3 (3)	C14	C15	C16	121.5 (4)
C1	N1	C4	110.1 (3)	C14	C15	C17	119.1 (4)
C4	N1	S1	116.6 (3)	C17	C15	C16	119.4 (4)
C3	N2	C2	112.2 (3)	N3	C16	C15	125.8 (4)
C5	N2	C2	118.1 (4)	N4	C16	N3	112.0 (4)
C5	N2	C3	119.1 (4)	N4	C16	C15	122.1 (4)
C16	N3	C19	103.5 (3)	C18	C17	C15	120.7 (4)
C16	N4	C20	106.5 (4)	C17	C18	C12	119.8 (4)
C22	N5	C19	121.4 (4)	N3	C19	N5	127.4 (4)
C21	N6	C22	126.1 (4)	N3	C19	C20	111.5 (4)
C21	N6	C23	116.8 (4)	C20	C19	N5	121.1 (4)
C22	N6	C23	117.0 (4)	N4	C20	C19	106.4 (4)
N1	C1	C2	109.6 (3)	N4	C20	C21	130.9 (4)
N2	C2	C1	112.4 (4)	C19	C20	C21	122.6 (4)
N2	C3	C4	111.3 (4)	O5	C21	N6	121.2 (4)
N1	C4	C3	108.9 (3)	O5	C21	C20	126.3 (4)
N2	C5	C6	121.2 (4)	N6	C21	C20	112.5 (4)
N2	C5	C10	122.2 (4)	O6	C22	N5	123.2 (4)
C6	C5	C10	116.6 (4)	O6	C22	N6	120.6 (4)
C7	C6	C5	121.3 (4)	N5	C22	N6	116.2 (4)
C6	C7	C8	121.5 (5)	N6	C23	C24	113.4 (4)
C7	C8	C11	119.0 (4)	C23	C24	C25	109.6 (4)
C9	C8	C7	116.9 (4)	O7	S2	C26	106.6 (2)
C9	C8	C11	124.1 (4)	O7	S2	C27	106.6 (2)
C10	C9	C8	122.5 (5)	C26	S2	C27	97.0 (3)

EXPERIMENTALTEIL

C9	C10	C5	121.3 (5)	O8	S3	C28	105.3 (2)
O3	C11	C8	114.0 (4)	O8	S3	C29	105.2 (2)
O4	C11	O3	121.6 (5)	C29	S3	C28	98.5 (3)

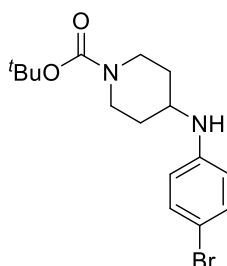
Synthese von *tert*-Butyl-1-(4-(4-((4-(2,6-dioxo-1-propyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*-purin-8-yl)phenyl)sulfonyl)piperazin-1-yl)phenyl)-1-oxo-5,8,11,14,17-pentaoxa-2-azanonadecan-19-oat



Das Edukt *tert*-Butyl-4-(4-((4-((6-amino-2,4-dioxo-3-propyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)carbamoyl)phenyl)sulfonyl)piperazin-1-yl)benzoat (5.0 mg, 9.0 μ mol, 1.0 Äq.) wird in Dimethylformamid (200 μ L) gelöst und COMU (4.3 mg, 10.0 μ mol, 1.1 Äq.) hinzugefügt. In einem separaten Gefäß wird *tert*-Butyl-17-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecanoat (3.5 mg, 10.0 μ mol, 1.1 Äq.) in Dimethylformamid (200 μ L) gelöst und Hünigbase (1.75 μ L, 10.0 μ mol, 1.1 Äq.) addiert. Nach 5 min wird das Amin zur aktivierten Säure gegeben und für 12 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wird entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC gereinigt. Dabei werden 5.0 mg, 5.7 μ mol, 63% des Produktes erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 8.31–8.26 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 8.19 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.68$ Hz, 1H, NH) 7.84–7.79 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7.72–7.66 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6.94–6.89 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 3.96 (s, 2H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.83–3.77 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.57–3.44 (m, 20H, 10x CH_2 , PEG-5) 3.36–3.30 (unter HDO, durch 2D-NMR bestätigt, m, 4H, $\text{H}_{\text{Piperazin}}$), 3.09–3.02 (m, 4H, $\text{H}_{\text{Piperazin}}$), 1.60–1.51 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.40 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.87 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.44$ Hz, 3H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$). **$^{13}\text{C NMR}$** (151 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 169.4 (C_q , C_{Ester}), 165.8 (C_q , C_{Amid}), 165.5 (C_q), 156.0 (C_q , $\text{CO}_{\text{xanthin}}$) 152.0 (C_q , d), 151.2 (C_q , $\text{CO}_{\text{xanthin}}$), 148.2 (C_q , C8), 146.1 (C_q), 133.08 (C_q , h), 128.4 (CH, c), 128.1 (C_q , g), 128.1 (CH, f), 126.4 (CH, e), 124.5 (C_q , a), 114.3 (CH, b), 80.6 (C_q , $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 69.8 (CH_2 , C_{Linker}), 69.8 (CH_2 , C_{Linker}), 69.8 (CH_2 , C_{Linker}), 69.7 (CH_2 , C_{Linker}), 69.7 (CH_2 , C_{Linker}), 69.7 (CH_2 , C_{Linker}), 69.7 (CH_2 , C_{Linker}), 69.6 (CH_2 , C_{Linker}), 69.0 (CH_2 , C_{Linker}), 68.1 (CH_2 , C_{Linker}), 46.9 (2x CH_2 , $\text{CN}(\text{CH}_2)_2$), 45.6 (2x CH_2 , $\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2$), 41.3 (CH_2 , $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 27.8 (3x CH_3 , $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 21.0 (CH_2 , $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 11.2 (CH_3 , $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$). **Schmelzpunkt:** >300 °C. **LC-MS:** positiv [m/z] = 872.3 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). **Reinheit:** 96%.

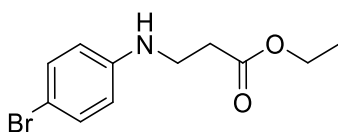
Synthese von *tert*-Butyl-4-((4-bromophenyl)amino)piperidin-1-carboxylat



Unter Schutzgas (Ar) wird 4-Bromanilin (1.72 g, 10.0 mmol, 1.0 Äq.) und *tert*-Butyl-4-oxopiperidin-1-carboxylat (1.99 g, 10.0 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem Toluol (100 mL) gelöst und für 24 h bei RT gerührt. Folgend wird Na(AcO)₃BH (2.54 g, 12.0 mmol, 1.2 Äq.) addiert und weitere 24 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird mit ges. NaHCO₃-Lösung (50 mL) neutral gewaschen und mit Ethylacetat (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an SiO₂ (Cyclohexan:Ethylacetat 1:1) wird das Produkt mit 2.62 g, 7.37 mmol, 74% erhalten.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.29–7.06 (m, 2H, H_{arom.}), 6.63–6.46 (m, 2H, H_{arom.}), 5.68 (d, ³J_{H,H} = 8.16 Hz, 1H, NH), 3.90–3.80 (m, 2H, CH₂), 3.42–3.23 (m, 1H, CH), 3.00–2.82 (m, 2H, CH₂), 1.89–1.80 (m, 2H, CH₂), 1.40 (s, 9H, 3 x CH₃), 1.20 (m, 2H, CH₂). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 153.9 (C_q, C_{Carbonyl}), 146.9 (C_q, C_{NH}), 131.4 (2 x CH₂, C_{arom.}), 114.3 (2 x CH₂, C_{arom.}), 106.0 (C_q, C_{Br}), 78.6 (C_q, C(CH₃)₃), 48.6 (CH), 42.1 (br, 2 x CH₂, NCH₂), 31.3 (br, 2 x CH₂, CH₂), 28.1 (3 x CH₃). **LC-MS:** positiv [m/z] = 355.1 ([M+H]⁺). **Reinheit:** 97%.

Synthese von Methyl-4-((4-bromophenyl)amino)butanoat

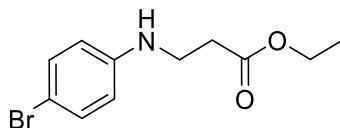


In Triethylamin (97 μ L) wird 4-Bromoanilin (100 mg, 0.58 mmol, 1.0 Äq.) und Methyl-4-bromobutanoat (126.3 mg, 0.69 mmol, 1.2 Äq.) gelöst und für 24 h bei RT gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird Wasser (5 mL) addiert und mit Dichlormethan (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an SiO₂ (Cyclohexan:Ethylacetat 8:1) werden 71.8 mg, 0.26 mmol, 45% Produkt erhalten.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.24–7.12 (m, 2H, H_{arom.}), 6.60–6.41 (m, 2H, H_{arom.}), 5.82 (t, ³J_{H,H} = 5.59 Hz, 1H, NH), 3.59 (s, 3H, CH₃), 2.99 (td, ³J_{H,H} = 6.98 Hz, ³J_{H,H} = 5.68 Hz, 2H, NHCH₂), 2.40 (t, ³J_{H,H} = 7.39 Hz, 2H, CH₂CO₂), 1.77 (p, ³J_{H,H} = 7.24 Hz, 2H, NHCH₂CH₂). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 173.2 (C_q, C_{Carboxyl}), 148.0 (C_q, CNH), 131.3 (2 x CH,

$C_{\text{arom.}}$), 113.8 (2 x CH, $C_{\text{arom.}}$), 106.0 (C_{q} , CBr), 51.2 (CH_3), 41.9 (CH_2 , NHCH_2), 30.8 (CH_2 , CH_2CO_2), 23.8 (CH_2 , NHCH_2CH_2). **LC-MS:** positiv [m/z] = 271.8 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). **Reinheit:** 96%.

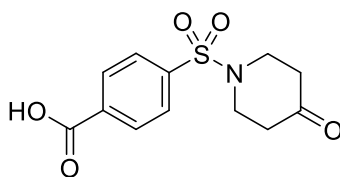
Synthese von Ethyl-3-((4-bromophenyl)amino)propanoat



4-Bromoanilin (100 mg, 0.58 mmol, 1.5 Äq.) wird zu Ethylacrylat (38.7 mg, 0.39 mmol, 1.0 Äq.) gegeben und Al_2O_3 (80 mg, 0.78 mmol, 2.0 Äq.) addiert. Die Reaktionsmischung wird für 5 h auf 115 °C geheizt und der Feststoff filtriert. Der Rückstand wird mit Ethylacetat gewaschen und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an SiO_2 (Cyclohexan:Ethylacetat 8:1) wird das Produkt mit 72 mg, 0.27 mmol, 68% erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ [ppm] = 7.23–7.16 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6.56–6.49 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 5.82 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.86$ Hz, 1H, NH), 4.07 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.12$ Hz, 2H, OCH_2), 3.25 (td, $^3J_{\text{H,H}} = 6.74$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.82$ Hz, 2H, NHCH_2), 2.53 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.74$ Hz, 2H, CH_2CO_2), 1.18 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.12$ Hz, 3H, CH_3). **$^{13}\text{C NMR}$** (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ [ppm] = 171.5 (C_{q} , C_{Carboxyl}), 147.7 (C_{q} , CNH), 131.4 (2 x CH, $C_{\text{arom.}}$), 114.0 (2 x CH, $C_{\text{arom.}}$), 106.4 (C_{q} , CBr), 59.9 (CH_2 , $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 38.6 (CH_2 , NHCH_2), 33.5 (CH_2 , CH_2CO_2), 14.1 (CH_3). **LC-MS:** positiv [m/z] = 271.8 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). **Reinheit:** 95%.

Synthese von 4-((4-Oxopiperidin-1-yl)sulfonyl)benzoesäure

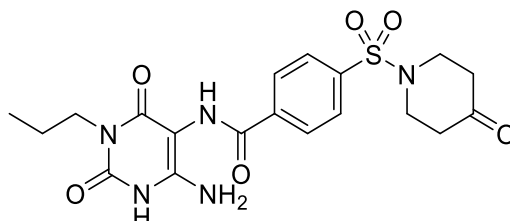


In einem Zweiphasengemisch aus Wasser/Chloroform (1:1, 9 mL:9 mL) wird 4-Aminopiperidon (1.0 g, 6.5 mmol, 1.0 Äq.) gelöst und folgend K_2CO_3 (3.2 g, 23 mmol, 3.5 Äq.) addiert. Anschließend wird 4-(Chlorosulfonyl)benzoesäure (2.15 g, 9.8 mmol, 1.5 Äq.) dazugegeben und die Reaktionsmischung für 24 h bei RT gerührt. Chloroform wird aus der Reaktionsmischung unter vermindertem Druck entfernt und konz. HCl dazu getropft, bis kein Produkt mehr ausfällt. Das filtrierte Produkt wird mit Wasser gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Dabei werden 1.6 g, 5.6 mmol, 87% Produkt erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ [ppm] = 8.19–8.12 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7.95–7.89 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 3.36 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.19$ Hz, 4H, 2 x NCH_2), 2.42 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.17$ Hz, 4H, 2 x CH_2). **$^{13}\text{C NMR}$** (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ [ppm] = 205.3 (C_{q} , CO), 166.1 (C_{q} , CO_2H), 139.9 (C_{q} , CSO_2), 134.9 (C_{q} ,

CCO₂H), 130.3 (2 x CH, C_{arom.}), 127.6 (2 x CH, C_{arom.}), 44.9 (2 x CH₂, NCH₂), 39.9 (2 x CH₂). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 284.0 ([M+H]⁺). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₁₂H₁₃NSO₅ [M+H]⁺ : 284.0587; gefunden: 284.0586. **Reinheit:** 91%.

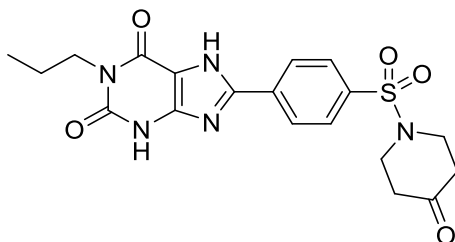
Synthese von *N*-(6-Aamino-2,4-dioxo-3-propyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)-4-((4-oxopiperidin-1-yl)sulfonyl)benzamid



Zu einer Lösung aus 4-((4-Oxopiperidin-1-yl)sulfonyl)benzoesäure (385 mg, 1.36 mmol, 1.0 Äq.) in Dichlormethan (1 mL) wird HATU (619 mg, 1.63 mmol, 1.2 Äq.) addiert. Separiert davon wird 5,6-Diamino-3-propyl-(1*H*)-pyrimidin-2,4-dion (275 mg, 1.49 mmol, 1.1 Äq.) und Hünigbase (349 mg, 2.70 mmol, 2.0 Äq.) in Dichlormethan (1 mL) gelöst. Die Lösung des Diamins wird zum Kopplungsreagenz getropft. Nach 24 h bei RT wird die Reaktionslösung unter vermindertem Druck von Lösemittel befreit und das Rohprodukt säulenchromatographisch an SiO₂ (Dichlormethan:Methanol 95:5) gereinigt. Das Produkt wird mit 537.3 mg, 1.06 mmol, 79% erhalten.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.49 (s, 1H, NH), 9.13 (s, 1H, CONH), 8.20–8.14 (m, 2H, CH_{arom.}), 7.94–7.87 (m, 2H, CH_{arom.}), 6.17 (s, 2H, NH₂), 3.74–3.60 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 3.37 (t, ³J_{H,H} = 6.17 Hz, 4H, 2 x NCH₂), 2.42 (t, ³J_{H,H} = 6.21 Hz, 4H, 2 x NCH₂), 1.57–1.43 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 0.84 (t, ³J_{H,H} = 7.44 Hz, 3H, NCH₂CH₂CH₃). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 205.3 (C_q, CO), 165.1 (C_q, C_{Amid}), 160.5 (C_q), 150.5 (C_q), 149.9 (C_q), 138.7 (C_q), 138.4 (C_q), 129.0 (2 x CH, C_{arom.}), 127.0 (2 x CH, C_{arom.}), 86.5 (C_q, C5), 45.0 (2 x CH₂, NCH₂), 40.9 (CH₂, NCH₂CH₂CH₃), 39.8 (2 x CH₂), 20.9 (CH₂, NCH₂CH₂CH₃), 11.2 (CH₃, NCH₂CH₂CH₃). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 450.2 ([M+H]⁺). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₁₉H₂₃SN₅O₆ [M+H]⁺ : 450.1442; gefunden: 450.1420. **Reinheit:** 97%.

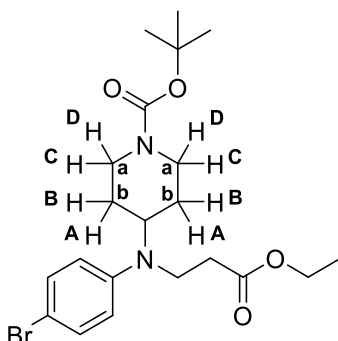
Synthese von 8-(4-((4-Oxopiperidin-1-yl)sulfonyl)phenyl)-1-propyl-3,7-dihydro-1H-purin-2,6-dion



Das Amid *N*-(6-Amino-2,4-dioxo-3-propyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)-4-((4-oxopiperidin-1-yl)sulfonyl)benzamid (100 mg, 0.2 mmol, 1.0 Äq.) wird in DMF gelöst und P₂O₅ (142 mg, 1.0 mmol, 5.0 Äq.) addiert. Nach 5 h bei RT wird die Reaktionslösung mit 1 N NaOH Lösung versetzt und für weitere 30 min gerührt. Folgend wird die Reaktionslösung mittels Dichlormethan (6 x 20 mL) extrahiert, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung an SiO₂ (Dichlormethan:Methanol 96:4) ergibt das Produkt mit 20 mg, 0.046 mmol, 21%.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.24–8.17 (m, 2H, H_{arom.}), 8.03–7.96 (m, 2H, H_{arom.}), 7.90 (s, 1H, NH), 7.78 (s, 1H, NH), 3.97–3.89 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 3.39 (t, ³J_{H,H} = 6.21 Hz, 4H, 2 x NCH₂), 2.43 (t, ³J_{H,H} = 6.16 Hz, 4H, 2 x CH₂), 1.78–1.69 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 0.92 (t, ³J_{H,H} = 7.42 Hz, 3H, NCH₂CH₂CH₃). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 205.2 (C_q, CO), 157.2 (C_q), 156.7 (C_q), 153.3 (C_q), 152.8 (C_q), 137.7 (C_q), 130.0 (C_q), 128.3 (CH, C_{arom.}), 126.7 (CH, C_{arom.}), 108.2 (C_q), 44.9 (2 x CH₂, NCH₂), 44.6 (CH₂, NCH₂CH₂CH₃), 39.8 (2 x CH₂, CH₂), 21.0 (CH₂, NCH₂CH₂CH₃), 11.0 (CH₃, NCH₂CH₂CH₃). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 432.1 ([M+H]⁺). **Reinheit:** 98%.

Synthese von *tert*-Butyl-4-((4-bromophenyl)(3-ethoxy-3-oxopropyl)amino)piperidin-1-carboxylat²⁹⁴

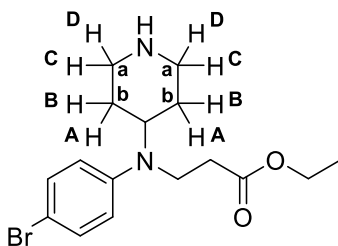


Das Edukt *tert*-Butyl-4-oxopiperidine-1-carboxylat (313.0 mg, 1.57 mmol, 1.0 Äq.) wird in Methanol (3.14 mL) gelöst und Ethyl-3-((4-bromophenyl)amino)propanoat (426.7 mg, 1.57 mmol, 1.0 Äq.) dazu gegeben. Nach 2 h bei RT werden Et₃SiH (365 mg, 3.14 mmol, 2.0 Äq.) und InCl₃ (104 mg, 0.47 mmol, 0.3 Äq.) addiert und die Reaktionslösung für 24 h bei

RT gerührt. Die Reaktionsmischung wird in NaHCO₃-Lösung (20 mL) gegeben und mit Ethylacetat (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Produkt mittels Flash-Chromatographie gereinigt. Das Produkt wird mit 285.5 mg, 0.63 mmol, 40% erhalten.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.32–7.27 (m, 2H, H_{arom.}), 6.77–6.73 (m, 2H, H_{arom.}), 4.06 (q, ³J_{H,H} = 7.11 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 4.06–3.97 (m, 2H, D), 3.74 (tt, ³J_{H,H} = 3.52 Hz, ³J_{H,H} = 11.60 Hz, 1H, NCH), 3.42 (dd, ³J_{H,H} = 6.81 Hz, ³J_{H,H} = 7.93 Hz, 2H, NCH₂CH₂), 2.82 (bs, 2H, C), 2.45 (dd, ³J_{H,H} = 6.83 Hz, ³J_{H,H} = 7.86 Hz, 2H, NCH₂CH₂), 1.67–1.61 (m, 2H, B), 1.47 (qd, ³J_{H,H} = 4.35 Hz, ³J_{H,H} = 12.43 Hz, 2H, A), 1.40 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.18 (t, ³J_{H,H} = 7.11 Hz, 3H, OCH₂CH₃). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 171.3 (C_q, C_{Ester}), 153.7 (C_q, C_{Carbamat}), 146.8 (C_q, C_{arom.}), 131.6 (CH, C_{arom.}), 115.4 (CH, C_{arom.}), 107.6 (C_q, C_{arom.}), 78.6 (C_q, C(CH₃)₃), 59.9 (CH₂, OCH₂CH₃), 55.3 (CH, NCH), 43.0 (bs, 2 x CH₂, a), 40.1 (CH₂, NCH₂CH₂), 33.4 (CH₂, NCH₂CH₂) 29.0 (bs, 2 x CH₂, b), 28.1 (CH₃, C(CH₃)₃), 14.0 (CH₃, OCH₂CH₃). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 455.1 ([M+H]⁺). **Reinheit:** 92%.

Synthese von Ethyl-3-((4-bromophenyl)(piperidin-4-yl)amino)propanoat



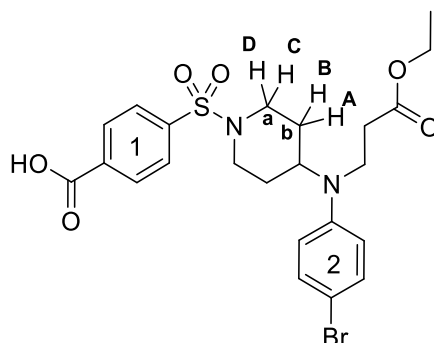
Das Edukt *tert*-Butyl-4-((4-bromophenyl)(3-ethoxy-3-oxopropyl)amino)piperidin-1-carboxylat (285.5 mg, 0.63 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (6.3 mL) gelöst und unter Eiskühlung HCl (1 M in EtOAc, 0.94 mL, 0.94 mmol, 1.5 Äq.) zugetropft, nach 6 h bei RT wird die selbe Menge HCl erneut addiert und die Reaktionslösung weitere 12 h rühren gelassen. Das Produkt fällt als weißer Niederschlag aus, wird filtriert unter Hochvakuum getrocknet und mit 160.8 mg, 0.41 mmol, 65% erhalten.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 9.08 (bs, 1H, NH), 8.80 (bs, 1H, NH), 7.35 (bs, 2H, H_{arom.}), 6.87 (bs, 2H, H_{arom.}), 4.06 (q, ³J_{H,H} = 7.09 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 3.91 (tt, ³J_{H,H} = 3.60 Hz, ³J_{H,H} = 11.49 Hz, 1H, NCH), 3.51–3.40 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.30 (d, ³J_{H,H} = 12.48 Hz, 2H, D), 2.98 (q, ³J_{H,H} = 12.20 Hz, 2H, C), 2.50–2.46 (m, 2H, NCH₂CH₂, Signal unter DMSO), 1.91 (qd, ³J_{H,H} = 4.04 Hz, ³J_{H,H} = 12.83 Hz, 2H, B), 1.84–1.75 (m, 2H, A), 1.18 (t, ³J_{H,H} = 7.08 Hz, 1H).

Das ¹³C-NMR zeigt auf Grund der positiven Ladung kaum Signale und wird deswegen nicht ausgewertet.

LC-MS: positiv [*m/z*] = 355.1 ([M+H]⁺). **Reinheit:** 93%.

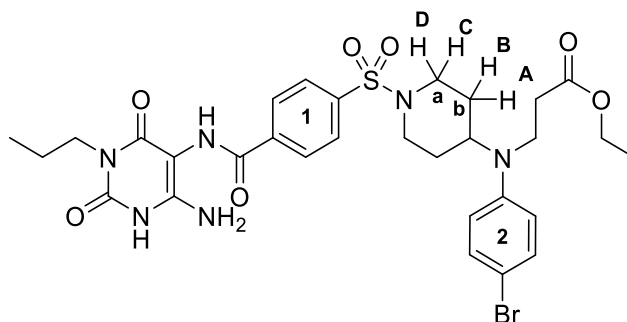
Synthese von 4-((4-((4-Bromophenyl)(3-ethoxy-3-oxopropyl)amino)piperidin-1-yl)sulfonyl)benzoesäure



Die Edukte Ethyl-3-((4-bromophenyl)(piperidin-4-yl)amino)propanoat (133 mg, 0.34 mmol, 1.0 Äq.) und 4-(Chlorosulfonyl)benzoesäure (113 mg, 0.51 mg, 1.5 Äq.) werden in Wasser/Chloroform (1.3 mL/1.3 mL) gelöst und K_2CO_3 (188 mg, 1.36 mg, 4.0 Äq.) addiert. Nach 24 h bei RT wird die Reaktionslösung in ges. NH_4Cl -Lösung (20 mL) aufgenommen, mit Dichlormethan (3 x 50 mL) und Ethylacetat (3 x 50 mL) extrahiert, über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung mittel Flash (TK-P6-063.12g) ergibt das Produkt mit 45.9 mg, 0.085 mmol, 25%.

1H NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ [ppm] = 8.19–8.14 (m, 2H, $H_{arom.1}$), 7.89–7.84 (m, 2H, $H_{arom.1}$), 7.26–7.20 (m, 2H, $H_{arom.2}$), 6.72–6.67 (m, 2H, $H_{arom.2}$), 4.07 (q, $^3J_{H,H} = 7.12$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 3.77–3.71 (m, 2H, D), 3.61 (tt, $^3J_{H,H} = 4.17$ Hz, $^3J_{H,H} = 10.90$ Hz, 1H, NCH), 3.39 (dd, $^3J_{H,H} = 6.86$ Hz, $^3J_{H,H} = 7.96$ Hz, 2H, NCH_2CH_2), 2.49–2.44 (m, 2H, C), 2.42 (dd, $^3J_{H,H} = 6.90$ Hz, $^3J_{H,H} = 7.99$ Hz, 2H, NCH_2CH_2), 1.72–1.62 (m, 2H, B), 1.70–1.67 (m, 2H, A), 1.19 (t, $^3J_{H,H} = 7.13$ Hz, 3H, OCH_2CH_3). **^{13}C NMR** (151 MHz, $DMSO-d_6$) δ [ppm] = 171.2 (C_q , C_{Ester}), 166.2 (C_q , $C_{Säure}$), 146.7 (C_q , $C_{arom.2}$), 139.0 (C_q , $C_{arom.1}$), 135.5 (C_q , $C_{arom.1}$), 131.5 (2 x CH, $C_{arom.2}$), 130.2 (2 x CH, $C_{arom.1}$), 127.6 (2 x CH, $C_{arom.1}$), 115.4 (2 x CH, $C_{arom.2}$), 107.7 (C_q , $C_{arom.2}$), 60.0 (CH_2 , OCH_2CH_3), 53.9 (CH, NCH), 45.7 (2 x CH_2 , a), 40.1 (CH_2 , NCH_2CH_2), 33.3 (CH_2 , NCH_2CH_2), 28.2 (2 x CH_2 , b), 14.0 (CH_3 , OCH_2CH_3). **LC-MS:** positiv [m/z] = 339.5 ($[M+H]^+$). **Reinheit:** 97%.

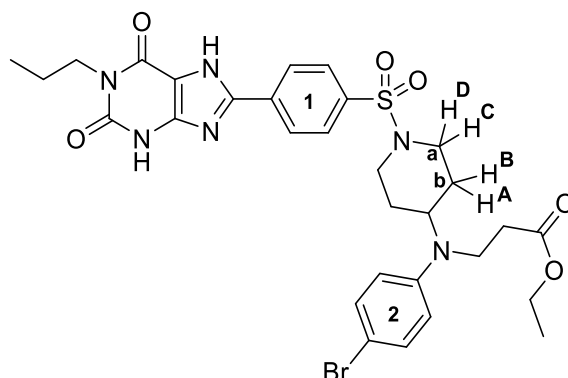
Synthese von Ethyl-3-((1-((4-((6-Amino-2,4-dioxo-3-propyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)carbamoyl)phenyl)sulfonyl)piperidin-4-yl)(4-bromophenyl)amino)propanoat



Zu einer Lösung aus 4-((4-((4-Bromophenyl)(3-ethoxy-3-oxopropyl)amino)piperidin-1-yl)sulfonyl)benzoesäure (46 mg, 0.085 mmol, 1.0 Äq.) in Dichlormethan (0.5 mL) wird HATU (38 mg, 0.1 mmol, 1.2 Äq.) addiert. Separiert davon wird 5,6-Diamino-3-propyl-(1*H*)-pyrimidin-2,4-dion (17.3 mg, 0.094 mmol, 1.1 Äq.) und Hünigbase (23 mg, 0.17 mmol, 2.0 Äq.) in Dichlormethan (0.5 mL) gelöst. Die Lösung des Diamins wird zum Kopplungsreagenz getropft. Nach 24 h bei RT wird die Reaktionslösung mit NaCl-Lösung (20 mL) gewaschen und mit Dichlormethan (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über MgSO₄, getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung mittels Flash (TK-P6-064) wird das Produkt mit 48.1 mg, 0.068 mmol, 80% erhalten.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.50 (s, 1H, N1H), 9.14 (s, 1H, H_{Amid}), 8.22–8.19 (m, 2H, H_{arom.1}), 7.87–7.84 (m, 2H, H_{arom.1}), 7.26–7.22 (m, 2H, H_{arom.2}), 6.72–6.68 (m, 2H, H_{arom.2}), 6.17 (s, 2H, NH₂), 4.07 (q, ³J_{H,H} = 7.10 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 3.78–3.72 (m, 2H, D), 3.69–3.65 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 3.61–3.54 (m, 1H, CNH), 3.42 (dd, ³J_{H,H} = 6.82 Hz, ³J_{H,H} = 7.85 Hz, 2H, NCH₂CH₂), 2.45 (dd, ³J_{H,H} = 6.79 Hz, ³J_{H,H} = 7.95 Hz, 2H, NCH₂CH₂), 2.42–2.36 (m, 2H, C), 1.75–1.66 (m, 2H, B), 1.72–1.70 (m, 2H, A), 1.51 (sext, ³J_{H,H} = 7.45 Hz, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 1.19 (t, ³J_{H,H} = 7.11 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 0.84 (t, ³J_{H,H} = 7.40 Hz, 3H, NCH₂CH₂CH₃). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 171.3 (C_q, C_{Ester}), 165.2 (C_q, C_{Amid}), 160.5 (C_q, C₄), 150.5 (C_q, C₂), 149.9 (C_q, C₆), 146.7 (C_q, C_{arom.2}), 138.6 (C_q, C_{arom.1}), 137.4 (C_q, C_{arom.1}), 131.5 (2 x CH, C_{arom.2}), 128.9 (2 x CH, C_{arom.1}), 127.2 (2 x CH, C_{arom.1}), 115.4 (2 x CH, C_{arom.2}), 107.7 (C_q, C_{arom.2}), 86.6 (C_q, C₅), 60.0 (CH₂, OCH₂CH₃), 54.1 (CH, NCH), 45.8 (2 x CH₂, a), 40.9 (CH₂, NCH₂CH₂CH₃), 40.1 (CH₂, NCH₂CH₂), 33.4 (CH₂, NCH₂CH₂), 28.3 (2 x CH₂, b), 20.9 (CH₂, NCH₂CH₂CH₃), 14.1 (CH₃, OCH₂CH₃), 11.2 (CH₂, NCH₂CH₂CH₃). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 705.3 ([M+H]⁺). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₃₀H₃₇BrN₆O₇S [M+Na]⁺: 727.1520; gefunden: 727.1425. **Reinheit:** 93%.

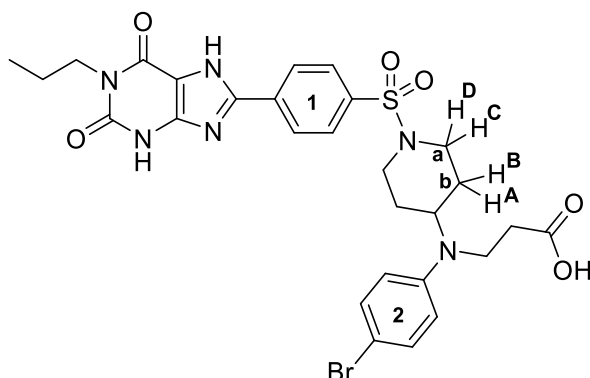
Synthesis von Ethyl-3-((4-bromophenyl)(1-((4-(2,6-dioxo-1-propyl-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)phenyl)sulfonyl)piperidin-4-yl)amino)propanoat



Das Edukt Ethyl-3-((1-((4-((6-Amino-2,4-dioxo-3-propyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)carbamoyl)phenyl)sulfonyl)piperidin-4-yl)(4-bromophenyl)amino)propanoat (107.6 mg, 0.152 mmol, 1.0 Äq.) wird mit PPSE (2 mL) überschichtet und die Reaktionsmischung über 20 min auf 100 °C erhitzt. Sobald das Startmaterial verbraucht ist, wird mit NaHCO₃ Lösung gequench und die Reaktionsmischung mit Dichlormethan (3 x 20 mL) extrahiert. Nach dem Trocknen mit MgSO₄ wird das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Flash-Chromatographie gereinigt. Das Produkt wird mit 68.1 mg, 0.099 mmol, 65% erhalten.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.25–8.19 (m, 2H, H_{arom.1}), 7.98–7.94 (m, 2H, H_{arom.1}), 7.93 (s, 1H, NH), 7.80 (s, 1H, NH), 7.26–7.19 (m, 2H, H_{arom.2}), 6.74–6.65 (m, 2H, H_{arom.2}), 4.04 (q, ³J_{H,H} = 7.03 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 3.94 (t, ³J_{H,H} = 6.83 Hz, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 3.80–3.73 (m, 2H, D), 3.65–3.57 (m, 1H, CNH), 3.44–3.35 (m, 2H, NCH₂CH₂), 2.55–2.51 (m, 2H, C), 2.44–2.40 (m, 2H, NCH₂CH₂), 1.77–1.71 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 1.72–1.61 (m, 4H, A, B), 1.17 (t, ³J_{H,H} = 7.05 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 0.93 (t, ³J_{H,H} = 7.33 Hz, 3H, NCH₂CH₂CH₃). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 171.2 (C_q, C_{Ester}), 157.2 (C_q), 156.8 (C_q, C_{Carbonyl}), 153.3 (C_q, C_{Carbonyl}), 152.9 (C_q, C₈), 146.6 (C_q, C_{arom.2}), 137.3 (C_q, C_{arom.1}), 131.5 (2 x CH, C_{arom.2}), 129.9 (C_q, C_{arom.1}), 128.5 (2 x CH, C_{arom.1}), 126.6 (2 x CH, C_{arom.1}), 115.4 (2 x CH, C_{arom.2}), 108.2 (C_q), 107.7 (C_q, C_{arom.2}), 59.9 (CH₂, OCH₂CH₃), 54.0 (CH, NCH), 45.7 (2 x CH₂, a), 44.6 (CH₂, NCH₂CH₂CH₃), 40.1 (CH₂, NCH₂CH₂), 33.3 (CH₂, NCH₂CH₂), 28.1 (2 x CH₂, b), 21.1 (CH₂, NCH₂CH₂CH₃), 14.0 (CH₃, OCH₂CH₃), 11.1 (CH₂, NCH₂CH₂CH₃). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 687.1 ([M+H]⁺). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₃₀H₃₅BrN₆O₆S [M+Na]⁺: 709.1414; gefunden: 709.1328. **Reinheit:** 96%.

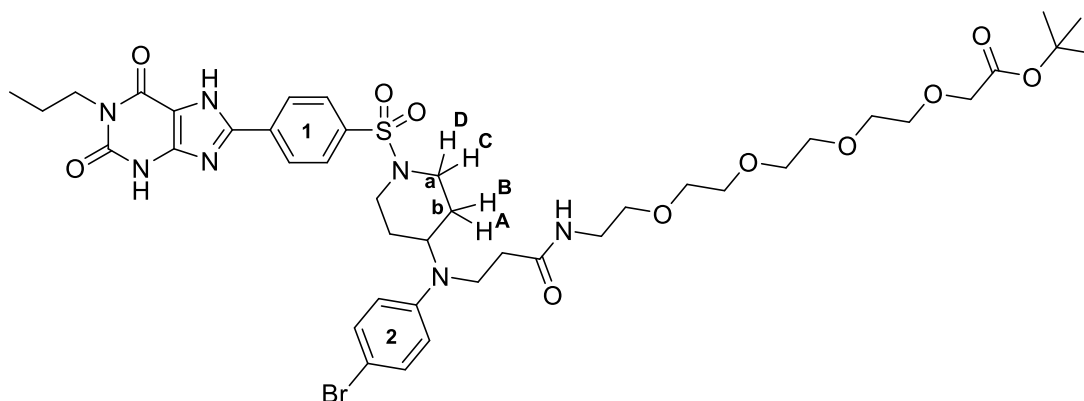
Synthese von 3-((4-Bromophenyl)(1-((4-(2,6-dioxo-1-propyl-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)phenyl)sulfonyl)piperidin-4-yl)amino)propansäure



Das Edukt Ethyl-3-((4-bromophenyl)(1-((4-(2,6-dioxo-1-propyl-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)phenyl)sulfonyl)piperidin-4-yl)amino)propanoat (62.7 mg, 0.091 mmol, 1.0 Äq.) wird mit 2 M HCl Lösung (2 mL) versetzt und für 48 h bei 55 °C gerührt. Das Lösemittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC gereinigt. Das Produkt wird mit 40.2 mg, 0.061 mmol, 67% erhalten.

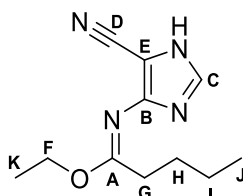
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 12.13 (s, 1H, COOH), 8.24–8.20 (m, 2H, H_{arom.1}), 7.98–7.94 (m, 2H, H_{arom.1}), 7.93 (s, 1H, NH), 7.80 (s, 1H, NH), 7.24–7.20 (m, 2H, H_{arom.2}), 6.70–6.66 (m, 2H, H_{arom.2}), 3.94 (t, ³J_{H,H} = 6.33 Hz, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 3.80–3.73 (m, 2H, D), 3.66–3.59 (m, 1H, CNH), 3.40–3.34 (m, 2H, NCH₂CH₂), 2.55–2.51 (m, 2H, C), 2.37–2.33 (m, 2H, NCH₂CH₂), 1.77–1.71 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 1.72–1.64 (m, 4H, A, B), 0.93 (t, ³J_{H,H} = 7.72 Hz, 3H, NCH₂CH₂CH₃). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 172.8 (C_q, C_{Säure}), 157.2 (C_q), 156.8 (C_q, C_{Carbonyl}), 153.4 (C_q, C_{Carbonyl}), 152.8 (C_q, C₈), 146.6 (C_q, C_{arom.2}), 137.2 (C_q, C_{arom.1}), 131.5 (2 x CH, C_{arom.2}), 129.9 (C_q, C_{arom.1}), 128.5 (2 x CH, C_{arom.1}), 126.6 (2 x CH, C_{arom.1}), 115.1 (2 x CH, C_{arom.2}), 108.2 (C_q), 107.4 (C_q, C_{arom.2}), 53.7 (CH, NCH), 45.7 (2 x CH₂, a), 44.6 (CH₂, NCH₂CH₂CH₃), 40.2 (CH₂, NCH₂CH₂), 33.5 (CH₂, NCH₂CH₂), 28.2 (2 x CH₂, b), 21.1 (CH₂, NCH₂CH₂CH₃), 11.1 (CH₂, NCH₂CH₂CH₃). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 666.1 ([M+H]⁺). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₂₈H₃₁BrN₆O₆S [M+Na]⁺: 681.1101; gefunden: 681.1018. **Reinheit:** 97%.

Synthese von *tert*-Butyl-18-((4-bromophenyl)(1-((4-(2,6-dioxo-1-propyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*-purin-8-yl)phenyl)sulfonyl)piperidin-4-yl)amino)-16-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-15-azaoctadecanoat



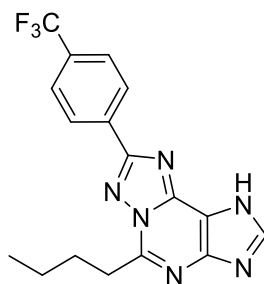
Die 3-((4-Bromophenyl)(1-((4-(2,6-dioxo-1-propyl-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*-purin-8-yl)phenyl)sulfonyl)piperidin-4-yl)amino)propansäure (39.5 mg, 0.06 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (500 μ L) gelöst und HATU (27.3 mg, 0.07 mmol, 1.2 Äq.) hinzugefügt. In einem separaten Gefäß wird *tert*-Butyl-14-amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoat (20.3 mg, 0.066 mmol, 1.1 Äq.) in Dichlormethan (500 μ L) gelöst und Hünigbase (15.5 mg, 0.12 mmol, 2.0 Äq.) addiert. Nach 5 min wird das Amin zur aktivierten Säure gegeben und für 24 h bei RT gerührt. Nach 24 h bei RT wird das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC gereinigt. Das Produkt wird mit 26 mg, 0.027 mmol, 46% erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 8.25–8.20 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.1}}$), 7.98 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.60$ Hz, 1H, H_{Amid}), 7.97–7.94 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.1}}$), 7.93 (s, 1H, NH), 7.80 (s, 1H, NH), 7.25–7.19 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.2}}$), 6.73–6.67 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.2}}$), 3.97 (s, 2H, CH_2CO_2), 3.94 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.13$ Hz, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.79–3.73 (m, 2H, D), 3.65–3.59 (m, 1H, CNH), 3.57–3.55 (m, 2H, CH_2), 3.53–3.49 (m, 10H, 5 x CH_2), 3.40 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.84$ Hz, 2H, CH_2), 3.36–3.32 (m, 2H, NCH_2CH_2), 3.19 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.73$ Hz, 2H, CH_2), 2.51–2.49 (unter DMSO, m, 2H, C), 2.27–2.22 (m, 2H, NCH_2CH_2), 1.78–1.72 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.72–1.64 (m, 4H, A, B), 1.41 (s, 9H, 3x CH_3), 0.93 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.43$ Hz, 3H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$). **$^{13}\text{C NMR}$** (151 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 170.4 (C_q , C_{Ester}), 169.3 (C_q , C_{Amid}), 157.2 (C_q), 156.8 (C_q , $\text{C}_{\text{Carbonyl}}$), 153.3 (C_q , $\text{C}_{\text{Carbonyl}}$), 152.9 (C_q , C8), 146.7 (C_q , $\text{C}_{\text{arom.2}}$), 137.0 (C_q , $\text{C}_{\text{arom.1}}$), 131.4 (2 x CH, $\text{C}_{\text{arom.2}}$), 129.9 (C_q , $\text{C}_{\text{arom.1}}$), 128.5 (2 x CH, $\text{C}_{\text{arom.1}}$), 126.6 (2 x CH, $\text{C}_{\text{arom.1}}$), 114.8 (2 x CH, $\text{C}_{\text{arom.2}}$), 108.2 (C_q), 107.1 (C_q , $\text{C}_{\text{arom.2}}$), 80.6 (C_q , $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 69.8 (CH_2 , PEG), 69.8 (CH_2 , PEG), 69.7 (CH_2 , PEG), 69.7 (CH_2 , PEG), 69.7 (CH_2 , PEG), 69.6 (CH_2 , PEG), 69.1 (CH_2 , PEG), 68.1 (CH_2 , PEG), 69.7 (CH_2 , PEG), 53.5 (CH, NCH), 45.8 (2 x CH_2 , a), 44.6 (CH_2 , $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 41.0 (CH_2 , NCH_2CH_2), 38.5 (CH_2 , PEG), 35.1 (CH_2 , NCH_2CH_2), 28.2 (2 x CH_2 , b), 27.7 (3 x CH_3 , $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 21.1 (CH_2 , $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 11.1 (CH_2 , $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$). **LC-MS**: positiv [m/z] = 948.8 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für $\text{C}_{42}\text{H}_{58}\text{BrN}_7\text{O}_{11}\text{S}$ [$\text{M}+\text{Na}]^+$: 970.2991; gefunden: 970.2964. **Reinheit**: 97%.

5.5 Synthese des A₃AR Antagonists 79Synthese von Ethyl-(*E*)-*N*-(4-cyano-1*H*-imidazol-5-yl)pentanimidat²⁷¹

Unter Schutzgas (Ar) wird 4-Amino-1*H*-imidazol-5-carbonitril (100 mg, 0.93 mmol, 1.0 Äq.) in DMF (231 µL) gelöst und 1,1,1-Triethoxypentan (283.5 mg, 1.39 mmol, 1.5 Äq.) addiert. Nach 24 h bei 90 °C wird das Lösemittel entfernt und die Substanz mittels säulenchromatographischer Reinigung an SiO₂ (Dichlormethan:Methanol 97:3) gereinigt. Das Produkt wird mit 177 mg, 0.8 mmol, 87% erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.63 (s, 1H, CH), 4.23 (q, ³J_{H,H} = 7.06 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 2.31 (t, ³J_{H,H} = 7.56 Hz, 2H, CCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.53–1.44 (m, 2H, CCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.28 (t, ³J_{H,H} = 7.07 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 1.23 (sext, ³J_{H,H} = 7.36 Hz, 2H, CCH₂CH₂CH₂CH₃), 0.80 (t, ³J_{H,H} = 7.34 Hz, 3H, CCH₂CH₂CH₂CH₃). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 168.8 (C_q, A), 147.7 (C_q, B), 135.0 (CH, C), 115.5 (C_q, D), 97.1 (C_q, E), 62.4 (CH₂, F), 30.1 (CH₂, G), 27.4 (CH₂, H), 21.6 (CH₂, I), 13.8 (CH₃, J), 13.4 (CH₃, K). LC-MS: positiv [*m/z*] = 220.8 ([M+H]⁺). Reinheit: 95%.

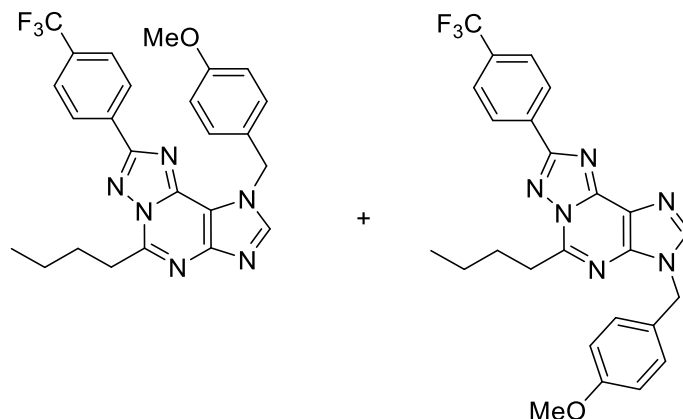
Synthese von 5-Butyl-8-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-[1,2,4]triazolo[5,1-*l*]purin²⁷¹

Unter Schutzgas (Ar) wird Ethyl-(*E*)-*N*-(4-cyano-1*H*-imidazol-5-yl)pentanimidat (1.00 g, 4.54 mmol, 1.0 Äq.) in Dimethylformamid (9.1 mL) gelöst und 4-(Trifluoromethyl)benzohydrazid (1.02 g, 5.0 mmol, 1.1 Äq.) addiert. Nach 24 h bei 160 °C wird das Lösemittel entfernt und das Rohprodukt aus Ethanol:Wasser (1:1) umkristallisiert. Das Produkt wird mit 1.48 g, 4.1 mmol, 90% erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 13.84 (s, 1H, NH), 8.47 (m, 2H, H_{arom.}), 8.43 (s, 1H, CH), 7.94 (m, 2H, H_{arom.}), 3.37 (t, ³J_{H,H} = 7.59 Hz, 2H, CCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.94 (p, ³J_{H,H} = 7.50 Hz, 2H, CCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.48 (sext, ³J_{H,H} = 7.45 Hz, 2H, CCH₂CH₂CH₂CH₃), 0.98 (t,

$^3J_{H,H} = 7.36$ Hz, 3H, CCH₂CH₂CH₂CH₃). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 161.4 (C_q), 148.8 (C_q), 141.6 (CH), 134.1 (C_q), 130.4 (q, $^2J_{C,F} = 32.00$ Hz, C_q), 127.8 (2x CH₂), 126.0 (q, $^3J_{C,F} = 3.45$ Hz, 2x CH₂), 124.1 (q, $^1J_{C,F} = 271.68$ Hz, C_q), 31.8 (CCH₂CH₂CH₂CH₃), 27.3 (CH₂, CCH₂CH₂CH₂CH₃), 21.7 (CH₂, CCH₂CH₂CH₂CH₃), 13.8 (CH₃, CCH₂CH₂CH₂CH₃). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 360.9 ([M+H]⁺). **Reinheit:** 98%.

Synthese von 5-Butyl-1-(4-methoxybenzyl)-8-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-[1,2,4]triazolo[5,1-*l*]purin und Isomer

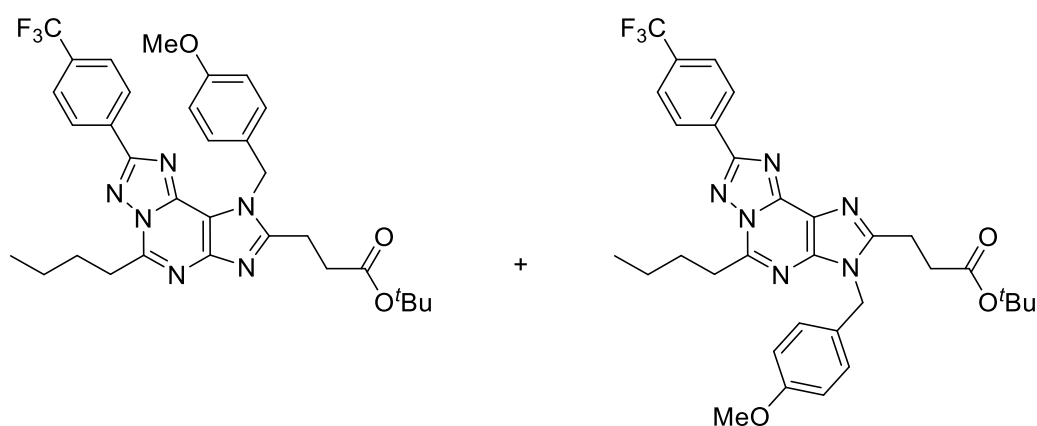


Das 5-Butyl-8-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-[1,2,4]triazolo[5,1-*l*]purin (500 mg, 1.39 mmol, 1.0 Äq.) wird in DMF (2 mL) gelöst und *p*-Methoxybenzylchlorid (239.3 mg, 1.53 mmol, 1.1 Äq.) sowie K₂CO₃ (289 mg, 2.09 mmol, 1.5 Äq.) addiert. Nach 24 h bei RT wird das Lösemittel entfernt und das Rohprodukt mittel automatischer Flashchromatographie (2 min Dichlormethan:Methanol 100:0, 15 min Dichlormethan:Methanol 5:95, 5 min Dichlormethan:Methanol 10:90) gereinigt. Das Produkt wird mit 645 mg, 1.34 mmol, 97% erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.66 (s, 1H, CH), 8.56 (s, 1H, CH), 8.48 (d, $^3J_{H,H} = 8.10$ Hz, 2H, H_{CFarom.}), 8.46 (d, $^3J_{H,H} = 8.16$ Hz, 2H, H_{CFarom.}), 7.96 (d, $^3J_{H,H} = 8.21$ Hz, 2H, H_{CFarom.}), 7.92 (d, $^3J_{H,H} = 8.21$ Hz, 2H, H_{CFarom.}), 7.58–7.52 (m, 2H, H_{arom.}), 7.43–7.36 (m, 2H, H_{arom.}), 6.92–6.88 (m, 4H, H_{arom.}), 5.70 (s, 2H, NCH₂), 5.47 (s, 2H, NCH₂), 3.71 (s, 3H, CH₃), 3.68 (s, 3H, CH₃), 3.37 (t, $^3J_{H,H} = 7.41$, 2H, CCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.95 (p, $^3J_{H,H} = 7.40$ Hz, 2H, CCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.91 (p, $^3J_{H,H} = 7.54$ Hz, 2H, CCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.46 (sext, $^3J_{H,H} = 7.56$ Hz, 2H, CCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.46 (sext, $^3J_{H,H} = 7.40$ Hz, 2H, CCH₂CH₂CH₂CH₃), 0.98 (t, $^3J_{H,H} = 7.36$ Hz, 2H, CCH₂CH₂CH₂CH₃), 0.96 (t, $^3J_{H,H} = 7.45$ Hz, 2H, CCH₂CH₂CH₂CH₃). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 161.6 (C_q), 161.4 (C_q), 159.2 (C_q, C_{PMBarom.}), 159.0 (C_q, C_{PMBarom.}), 150.5 (C_q), 149.4 (C_q, CCH₂CH₂CH₂CH₃), 148.7 (C_q), 148.6 (C_q, CCH₂CH₂CH₂CH₃), 144.7 (C_q), 144.0 (CH), 142.6 (CH), 141.6 (C_q), 134.0 (C_q, C_{CF3arom.}), 133.8 (C_q, C_{CF3arom.}), 130.6 (q, $^2J_{C,F} = 31.91$ Hz, C_q), 130.4 (q, $^2J_{C,F} = 32.03$ Hz, C_q), 129.7 (2x CH₂, C_{arom.}), 129.5 (2x CH₂, C_{arom.}), 128.5 (C_q, C_{PMBarom.}), 128.5 (C_q, C_{PMBarom.}), 127.9 (2x CH₂, C_{CF3arom.}), 127.8 (2x CH₂,

$C_{CF_3\text{arom.}}$, 126.1 (q, $^3J_{C,F} = 3.56$ Hz, 2x CH₂), 126.0 (q, $^3J_{C,F} = 3.67$ Hz, 2x CH₂), 124.1 (q, $^1J_{C,F} = 272.31$ Hz, C_q), 124.1 (q, $^1J_{C,F} = 272.31$ Hz, C_q), 120.3 (C_q), 114.1 (2x CH₂, C_{arom.}), 114.1 (2x CH₂, C_{arom.}), 111.6 (C_q), 55.1 (CH₃, OCH₃), 55.1 (CH₃, OCH₃), 49.5 (CH₂, C_{Benzyl}), 46.6 (CH₂, C_{Benzyl}), 31.8 (CH₂, CCH₂CH₂CH₂CH₃), 31.8 (CH₂, CCH₂CH₂CH₂CH₃), 27.3 (CH₂, CCH₂CH₂CH₂CH₃), 27.1 (CH₂, CCH₂CH₂CH₂CH₃), 21.7 (CH₂, CCH₂CH₂CH₂CH₃), 21.7 (CH₂, CCH₂CH₂CH₂CH₃), 13.8 (CH₃, CCH₂CH₂CH₂CH₃), 13.7 (CH₃, CCH₂CH₂CH₂CH₃). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 481.0 ([M+H]⁺). **Reinheit:** 98%.

Synthese von *tert*-Butyl-3-(5-butyl-1-(4-methoxybenzyl)-8-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-[1,2,4]triazolo[5,1-*l*]purin-2-yl)propanoat und Isomer²⁷²

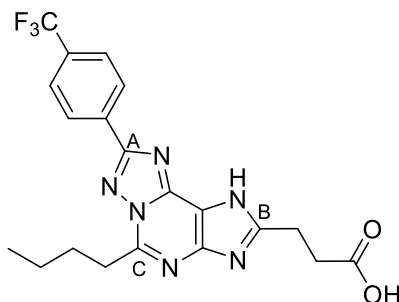


Unter Schutzgas (Ar) wird 5-Butyl-1-(4-methoxybenzyl)-8-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-[1,2,4]triazolo[5,1-*l*]purin (315 mg, 0.66 mmol, 1.0 Äq.), {[Rh(COD)Cl]₂} (6.6 mg, 0.0132 mmol, 2 mol%), 1,2-Bis(diphenylphosphino)ethan (13.2 mg, 0.033 mmol, 5 mol%) und CsOAc (31.68 mg, 0.165 mmol, 25 mol%) in einen Schlenkcolben gewogen und folgend Toluol (1.3 mL) und *tert*-Butylacrylat (170 mg, 1.3 mmol, 2.0 Äq.) addiert. Die Reaktion wird für 24 h bei 120 °C gerührt. Folgend wird die Reaktionsmischung über Celite filtriert, das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt über SiO₂ (Dichlormethan:Methanol 95:5) gereinigt. Das Produkt wird mit 112 mg, 0.18 mmol, 28% erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.55–8.42 (m, 4H, 4 x CH, H_{arom.}), 7.96–7.95 (m, 2H, 2 x CH, H_{arom.}), 7.96–7.93 (m, 2H, 2 x CH, H_{arom.}), 7.38–7.34 (m, 2H, 2 x CH, H_{arom.}), 7.28–7.24 (m, 2H, 2 x CH, H_{arom.}), 6.92–6.90 (m, 4H, 2 x CH, H_{arom.}), 6.90–6.87 (m, 4H, 2 x CH, H_{arom.}), 5.79 (s, 2H, NCH₂), 5.51 (s, 2H, NCH₂), 3.71 (s, 3H, CH₃), 3.69 (s, 3H, CH₃), 3.40 (t, $^3J_{H,H} = 7.51$, 2H, CCH₂CH₂CH₂CH₃), 3.35 (t, $^3J_{H,H} = 7.51$, 2H, CCH₂CH₂CH₂CH₃), 3.10 (t, $^3J_{H,H} = 6.85$, 2H, CO₂CH₂CH₂), 3.08 (t, $^3J_{H,H} = 6.82$, 2H, CO₂CH₂CH₂), 2.80 (t, $^3J_{H,H} = 6.83$, 2H, CO₂CH₂CH₂), 2.77 (t, $^3J_{H,H} = 6.88$, 2H, CO₂CH₂CH₂), 1.96 (p, $^3J_{H,H} = 7.45$ Hz, 2H, CCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.93 (p, $^3J_{H,H} = 7.57$ Hz, 2H, CCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.47 (sext, $^3J_{H,H} = 7.58$ Hz, 2H, CCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.47 (sext, $^3J_{H,H} = 7.51$ Hz, 2H, CCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.37 (s, 9H, 3

$\times \text{CH}_3$, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.37 (s, 9H, 3 $\times \text{CH}_3$, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.97 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.40$ Hz, 2H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.97 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.40$ Hz, 2H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ [ppm] = 171.1 (C_q , $\text{C}_{\text{Carbonyl}}$), 171.0 (C_q , $\text{C}_{\text{Carbonyl}}$), 161.7 (C_q), 161.4 (C_q), 159.0 (C_q , $\text{C}_{\text{PMBBarom.}}$), 158.9 (C_q , $\text{C}_{\text{PMBBarom.}}$), 154.7 (C_q), 152.9 (C_q), 149.1 (C_q), 148.9 (C_q), 148.3 (C_q), 148.2 (C_q), 144.5 (C_q), 142.8 (C_q), 134.1 (q, $^4J_{\text{C,F}} = 0.97$ Hz, C_q), 133.9 (q, $^4J_{\text{C,F}} = 0.91$ Hz, C_q), 130.5 (q, $^2J_{\text{C,F}} = 32.03$ Hz, C_q), 130.4 (q, $^2J_{\text{C,F}} = 31.79$ Hz, C_q), 129.0 (C_q , $\text{C}_{\text{PMBBarom.}}$), 128.8 (C_q , $\text{C}_{\text{PMBBarom.}}$), 128.1 (2 $\times \text{CH}_2$, $\text{C}_{\text{CF3arom.}}$), 127.9 (2 $\times \text{CH}_2$, $\text{C}_{\text{CF3arom.}}$), 126.0 (q, $^3J_{\text{C,F}} = 4.71$ Hz, 2 $\times \text{CH}_2$), 126.0 (q, $^3J_{\text{C,F}} = 3.54$ Hz, 2 $\times \text{CH}_2$), 124.1 (q, $^1J_{\text{C,F}} = 272.31$ Hz, C_q), 124.1 (q, $^1J_{\text{C,F}} = 272.31$ Hz, C_q), 119.0 (C_q), 114.2 (2 $\times \text{CH}_2$, $\text{C}_{\text{arom.}}$), 114.2 (2 $\times \text{CH}_2$, $\text{C}_{\text{arom.}}$), 112.7 (C_q), 79.9 (C_q , $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 79.9 (C_q , $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 55.1 (CH_3 , OCH_3), 55.1 (CH_3 , OCH_3), 47.8 (CH_2 , C_{Benzyl}), 44.9 (CH_2 , C_{Benzyl}), 31.8 (CH_2 , $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 31.8 (CH_2 , $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 31.5 (CH_2 , $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 31.2 (CH_2 , $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 27.7 (3 $\times \text{CH}_3$, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27.7 (3 $\times \text{CH}_3$, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27.3 (CH_2 , $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 27.2 (CH_2 , $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 22.5 (CH_2 , $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 22.1 (CH_2 , $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 21.7 (CH_2 , $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 21.7 (CH_2 , $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 13.7 (CH_3 , $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 13.7 (CH_3 , $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für $\text{C}_{32}\text{H}_{35}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 609.2796; gefunden: 609.2788. **Reinheit**: 93%.

Synthese von 3-(5-Butyl-8-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-[1,2,4]triazolo[5,1- η]purin-2-yl)propansäure

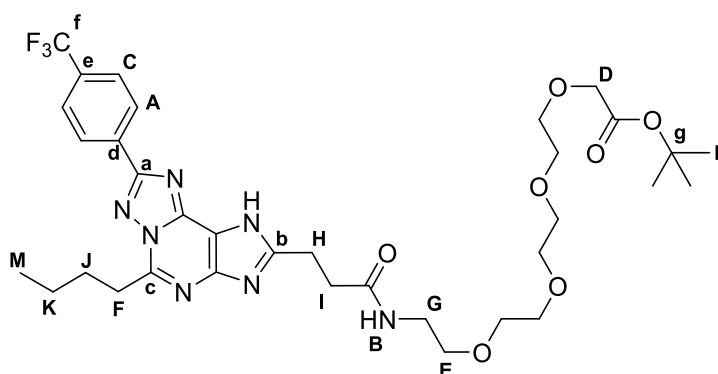


Der *tert*-Butyl-3-(5-butyl-1-(4-methoxybenzyl)-8-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-[1,2,4]triazolo[5,1- η]purin-2-yl)propansäureester (106 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (300 μL) gelöst und Trifluoressigsäure (2.7 mL) tropfenweise addiert. Nach 5 d bei 70 $^\circ\text{C}$ im Überdruckgefäß, wird das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC gereinigt. Dabei werden 29.5 mg, 0.068 mmol, 40% Produkt erhalten.

^1H -NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ [ppm] = 8.50–8.46 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7.98–7.93 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 3.33 (Signal unter HDO, t, 2H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.11 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.14$ Hz, 2H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.85 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.15$ Hz, 2H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.93 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.53$ Hz, 2H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.47 (sext, $^3J_{\text{H,H}} = 7.37$ Hz, 2H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.97 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.35$ Hz, 3H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$). ^{13}C -NMR (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ [ppm] = 173.3 (C_q , $\text{C}_{\text{Carbonyl}}$), 161.4 (C_q , A), 153.3 (C_q , B),

148.2 (C_q, C), 143.2 (C_q), 134.2 (C_q), 130.4 (q, ²J_{C,F} = 31.95 Hz, C_q), 127.8 (2x CH₂, C_{CF₃arom.}), 126.0 (q, ³J_{C,F} = 3.35 Hz, 2x CH₂), 124.1 (q, ¹J_{C,F} = 272.51 Hz, C_q), 119.7 (C_q), 31.7 (CH₂, CCH₂CH₂CH₂CH₃), 31.0 (CH₂, CO₂CH₂CH₂), 27.4 (CH₂, CCH₂CH₂CH₂CH₃), 23.9 (CH₂, CO₂CH₂CH₂), 21.7 (CH₂, CCH₂CH₂CH₂CH₃), 13.8 (CH₃, CCH₂CH₂CH₂CH₃). **Schmelzpunkt:** Zersetzung ab 274 °C. **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₂₀H₁₉F₃N₆O₂ [M+H]⁺: 433.1594; gefunden: 433.1590. **Reinheit:** 99%.

Synthese von tert-Butyl-18-(5-butyl-8-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-[1,2,4]triazolo[5,1-*l*]purin-2-yl)-16-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-15-azaoctadecanoat

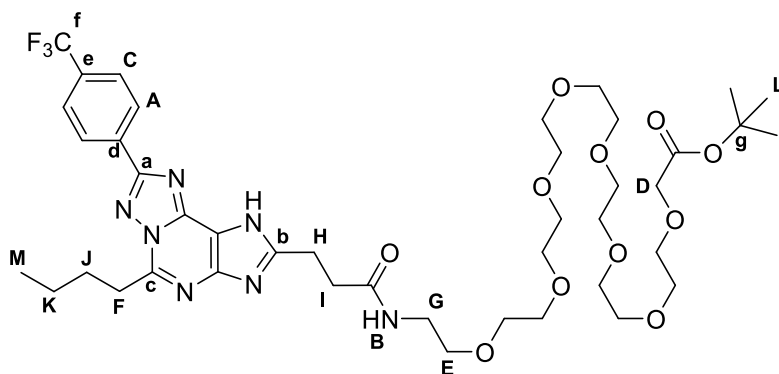


Die 3-(5-Butyl-8-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-[1,2,4]triazolo[5,1-*l*]purin-2-yl)propansäure (10 mg, 0.023 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dimethylformamid (100 µL) gelöst und COMU (10.7 mg, 25 µmol, 1.1 Äq.) hinzugefügt. In einem separaten Gefäß wird tert-Butyl-14-amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoat (7.8 mg, 25 µmol, 1.1 Äq.) in Dimethylformamid (300 µL) gelöst und Hünigbase (4.5 µL, 25 µmol, 1.1 Äq.) addiert. Nach 5 min wird das Amin zur aktivierten Säure gegeben und für 24 h bei RT gerührt. Darauffolgend wird Wasser (5 mL) addiert und die Reaktionslösung mittels Ethylacetat (3 x 50 mL) extrahiert. Nach Waschen mit 5% LiCl-Lsg. wird über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wird nach Reinigung mittels HPLC mit 13 mg, 18 µmmol, 78% erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.50–8.45 (m, 2H, A), 8.03 (t, ³J_{H,H} = 5.77 Hz, 1H, B), 7.98–7.93 (m, 2H, C), 3.96 (s, 2H, D), 3.56–3.53 (m, 2H, CH₂), 3.52–3.45 (m, 10H, 5 x CH₂), 3.40 (t, ³J_{H,H} = 5.83 Hz, 2H, E), 3.36 (t, ³J_{H,H} = 7.50 Hz, 2H, F), 3.21 (dt, ³J_{H,H} = 5.73 Hz, ³J_{H,H} = 5.73 Hz, 2H, G), 3.10 (t, ³J_{H,H} = 7.53 Hz, 2H, H), 2.70 (t, ³J_{H,H} = 7.53 Hz, 2H, I), 1.93 (p, ³J_{H,H} = 7.49 Hz, 2H, J), 1.47 (sext, ³J_{H,H} = 7.50 Hz, 2H, K), 1.40 (s, 9H, L), 0.97 (t, ³J_{H,H} = 7.35 Hz, 3H, M). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 170.8 (C_q, C_{Amid}), 169.4 (C_q, C_{Ester}), 161.4 (C_q, a), 154.1 (C_q, b), 148.2 (C_q, c), 134.2 (C_q, d), 130.4 (q, ²J_{C,F} = 31.92 Hz, C_q, e), 127.8 (2 x CH₂, A), 126.0 (q, ³J_{C,F} = 3.27 Hz, 2 x CH₂, C), 124.1 (q, ¹J_{C,F} = 272.58 Hz, C_q, f), 80.6 (C_q, g), 69.9 (CH₂, PEG), 69.8 (CH₂, PEG), 69.7 (CH₂, PEG), 69.7 (CH₂, PEG), 69.7 (CH₂, PEG), 69.6 (CH₂, PEG), 69.1 (CH₂, PEG), 68.1 (CH₂, E), 38.7 (CH₂, G), 32.5 (CH₂, I), 31.8 (CH₂, F), 27.7 (3 x CH₃, L), 27.4 (CH₂, J), 24.4 (CH₂, H), 21.7 (CH₂, K), 13.8 (CH₃, M). **Schmelzpunkt:**

81.5–82.4 °C. **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für $C_{34}H_{46}F_3N_7O_7$ $[M+H]^+$: 722.3484; gefunden: 722.3417. **Reinheit**: 97%.

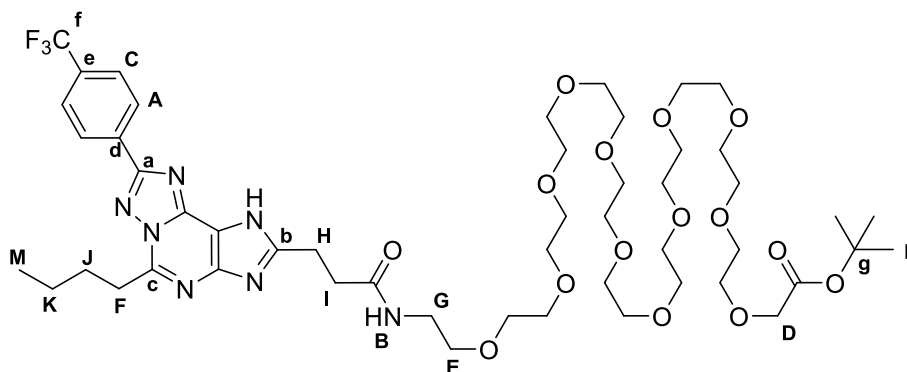
Synthese von *tert*-Butyl 30-(5-butyl-8-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-[1,2,4]triazolo[5,1- λ]purin-2-yl)-28-oxo-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxa-27-azatriacontanoat



Die 3-(5-Butyl-8-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-[1,2,4]triazolo[5,1- λ]purin-2-yl)propansäure (20 mg, 0.046 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (500 μ L) gelöst und HATU (20.9 mg, 0.055 mmol, 1.2 Äq.) hinzugefügt. In einem separaten Gefäß wird *tert*-Butyl-26-amino-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxahexacosanoat (24.7 mg, 0.051 mmol, 1.1 Äq.) in Dichlormethan (500 μ L) gelöst und Hünigbase (11.9 mg, 0.092 mmol, 2.0 Äq.) addiert. Nach 5 min wird das Amin zur aktivierten Säure gegeben und für 24 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC (Acetonitril) gereinigt. Das Produkt wird mit 14.9 mg, 0.017 mmol, 36% erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm] = 13.53 (s, 1H, NH), 8.49–8.43 (m, 2H, A), 8.03 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 5.56 Hz, 1H, B), 7.97–7.92 (m, 2H, C), 3.96 (s, 2H, D), 3.57–3.53 (m, 2H, CH_2), 3.53–3.50 (m, 2H, CH_2), 3.52–3.45 (m, 24H, 12 x CH_2), 3.40 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 5.88 Hz, 2H, E), 3.35 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.57 Hz, 2H, F), 3.21 (q, $^3J_{\text{H,H}}$ = 5.80 Hz, 2H, G), 3.10 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.53 Hz, 2H, H), 2.70 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.61 Hz, 2H, I), 1.92 (p, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.54 Hz, 2H, J), 1.47 (sext, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.41 Hz, 2H, K), 1.40 (s, 9H, L), 0.97 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.34 Hz, 3H, M). **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm] = 170.7 (C_q , C_{Amid}), 169.3 (C_q , C_{Ester}), 161.3 (C_q , a), 154.0 (C_q , b), 148.0 (C_q , c), 134.2 (C_q , d), 130.4 (q, $^2J_{\text{C,F}}$ = 31.92 Hz, C_q , e), 127.7 (2x CH_2 , A), 126.0 (q, $^3J_{\text{C,F}}$ = 3.62 Hz, 2 x CH_2 , C), 124.1 (q, $^1J_{\text{C,F}}$ = 272.03 Hz, C_q , f), 80.6 (C_q , g), 69.8 (2 x CH_2 , PEG), 69.7 (8 x CH_2 , PEG), 69.7 (CH_2 , PEG), 69.7 (2 x CH_2 , PEG), 69.6 (CH_2 , PEG), 69.1 (CH_2 , PEG), 68.1 (CH_2 , E), 38.6 (CH_2 , G), 32.5 (CH_2 , I), 31.7 (CH_2 , F), 27.7 (3 x CH_3 , L), 27.3 (CH_2 , J), 24.4 (CH_2 , H), 21.7 (CH_2 , K), 13.7 (CH_3 , M). **Schmelzpunkt**: hygroskopisch. **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für $C_{42}H_{62}F_3N_7O_{11}$ $[M+H]^+$: 898.4532; gefunden: 898.4577. **Reinheit**: 98%

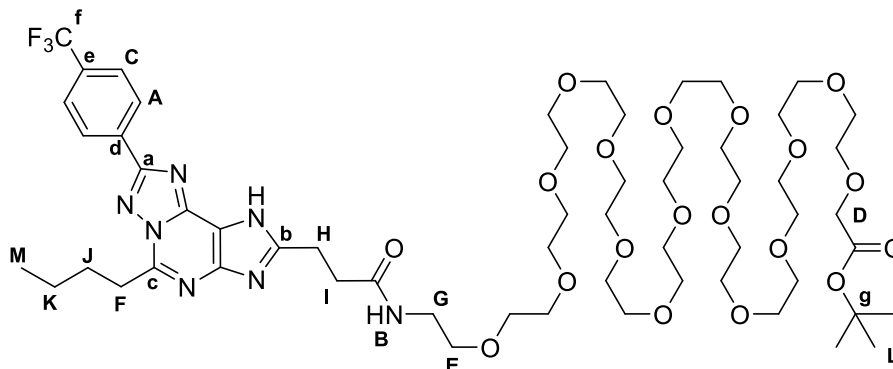
Synthese von *tert*-Butyl 42-(5-butyl-8-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-[1,2,4]triazolo[5,1-*l*]purin-2-yl)-40-oxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36-dodecaoxa-39-azadotetracontanoat



Die 3-(5-Butyl-8-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-[1,2,4]triazolo[5,1-*l*]purin-2-yl)propansäure (20 mg, 0.046 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (500 μ L) gelöst und HATU (20.9 mg, 0.055 mmol, 1.2 Äq.) hinzugefügt. In einem separaten Gefäß wird *tert*-Butyl-38-amino-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36-dodecaoxaoctatriacontanoat (33.7 mg, 0.051 mmol, 1.1 Äq.) in Dichlormethan (500 μ L) gelöst und Hünigbase (11.9 mg, 0.092 mmol, 2.0 Äq.) addiert. Nach 5 min wird das Amin zur aktivierten Säure gegeben und für 24 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC (Acetonitril) gereinigt. Das Produkt wird mit 11.8 mg, 0.011 mmol, 24% erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 13.53 (s, 1H, NH), 8.49–8.45 (m, 2H, A), 8.03 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 5.64 Hz, 1H, B), 7.99–7.93 (m, 2H, C), 3.97 (s, 2H, D), 3.58–3.54 (m, 2H, CH₂), 3.53–3.51 (m, 2H, CH₂), 3.52–3.45 (m, 40H, 20 x CH₂), 3.40 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 5.87 Hz, 2H, E), 3.36 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.54 Hz, 2H, F), 3.21 (q, $^3J_{\text{H,H}}$ = 5.78 Hz, 2H, G), 3.10 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.52 Hz, 2H, H), 2.70 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.56 Hz, 2H, I), 1.93 (p, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.53 Hz, 2H, J), 1.47 (sext, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.43 Hz, 2H, K), 1.41 (s, 9H, L), 0.97 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.35 Hz, 3H, M). **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 170.8 (C_q, C_{Amid}), 169.3 (C_q, C_{Ester}), 161.3 (C_q, a), 154.0 (C_q, b), 148.0 (C_q, c), 134.2 (C_q, d), 130.4 (q, $^2J_{\text{C,F}}$ = 31.99 Hz, C_q, e), 127.8 (2x CH₂, A), 126.0 (q, $^3J_{\text{C,F}}$ = 3.53 Hz, 2 x CH₂, C), 124.1 (q, $^1J_{\text{C,F}}$ = 272.22 Hz, C_q, f), 80.6 (C_q, g), 69.8 (2 x CH₂, PEG), 69.7 (15 x CH₂, PEG), 69.7 (2 x CH₂, PEG), 69.7 (2 x CH₂, PEG), 69.6 (CH₂, PEG), 69.1 (CH₂, PEG), 68.1 (CH₂, E), 38.6 (CH₂, G), 32.5 (CH₂, I), 31.7 (CH₂, F), 27.7 (3 x CH₃, L), 27.4 (CH₂, J), 24.5 (CH₂, H), 21.7 (CH₂, K), 13.7 (CH₃, M). **Schmelzpunkt:** hygroscopisch. **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₅₀H₇₈F₃N₇O₁₅ [M+H]⁺: 1074.5581; gefunden: 1074.5583. **Reinheit:** 99%

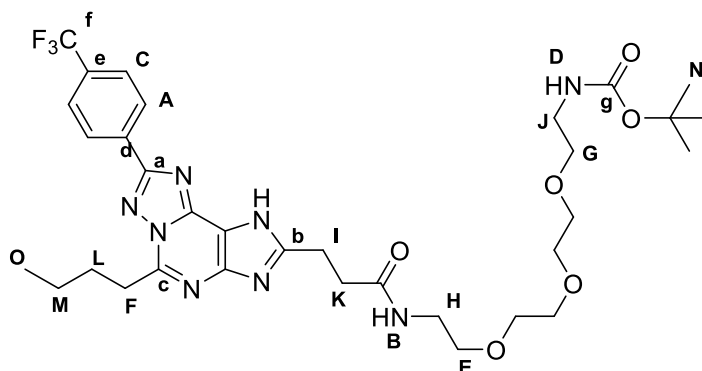
Synthese von *tert*-Butyl-54-(5-butyl-8-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-[1,2,4]triazolo[5,1-*i*]purin-2-yl)-52-oxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48-hexadeca-oxa-51-azatetrapentacontanoat



Die 3-(5-Butyl-8-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-[1,2,4]triazolo[5,1-*i*]purin-2-yl)propansäure (20 mg, 0.046 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (500 μ L) gelöst und HATU (20.9 mg, 0.055 mmol, 1.2 Äq.) hinzugefügt. In einem separaten Gefäß wird *tert*-Butyl-50-amino-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48-hexadeca-oxapentacontanoat (42.6 mg, 0.051 mmol, 1.1 Äq.) in Dichlormethan (500 μ L) gelöst und Hünigbase (11.9 mg, 0.092 mmol, 2.0 Äq.) addiert. Nach 5 min wird das Amin zur aktivierten Säure gegeben und für 24 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC (Acetonitril) gereinigt. Das Produkt wird mit 21.1 mg, 0.017 mmol, 27% erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 13.53 (s, 1H, NH), 8.49–8.46 (m, 2H, A), 8.03 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 5.64 Hz, 1H, B), 7.97–7.94 (m, 2H, C), 3.97 (s, 2H, D), 3.58–3.54 (m, 2H, CH₂), 3.55–3.51 (m, 2H, CH₂), 3.51–3.46 (m, 56H, 28 x CH₂), 3.40 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 5.88 Hz, 2H, E), 3.36 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.54 Hz, 2H, F), 3.21 (q, $^3J_{\text{H,H}}$ = 5.82 Hz, 2H, G), 3.10 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.54 Hz, 2H, H), 2.70 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.42 Hz, 2H, I), 1.93 (p, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.50 Hz, 2H, J), 1.47 (sext, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.43 Hz, 2H, K), 1.41 (s, 9H, L), 0.97 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.33 Hz, 3H, M). **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 170.8 (C_q, C_{Amid}), 169.3 (C_q, C_{Ester}), 161.3 (C_q, a), 153.6 (C_q, b), 148.0 (C_q, c), 134.2 (C_q, d), 130.4 (q, $^2J_{\text{C,F}}$ = 32.08 Hz, C_q, e), 127.8 (2x CH₂, A), 126.0 (q, $^3J_{\text{C,F}}$ = 3.30 Hz, 2 x CH₂, C), 124.1 (q, $^1J_{\text{C,F}}$ = 272.10 Hz, C_q, f), 80.6 (C_q, g), 69.8 (2 x CH₂, PEG), 69.7 (23 x CH₂, PEG), 69.7 (2 x CH₂, PEG), 69.7 (2 x CH₂, PEG), 69.6 (CH₂, PEG), 69.1 (CH₂, PEG), 68.1 (CH₂, E), 38.6 (CH₂, G), 32.5 (CH₂, I), 31.7 (CH₂, F), 27.7 (3 x CH₃, L), 27.4 (CH₂, J), 24.5 (CH₂, H), 21.7 (CH₂, K), 13.7 (CH₃, M). **Schmelzpunkt:** hygroskopisch. **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₅₈H₉₄F₃N₇O₁₉ [M+H]⁺: 1250.6629; gefunden: 1250.6665. **Reinheit:** 98%

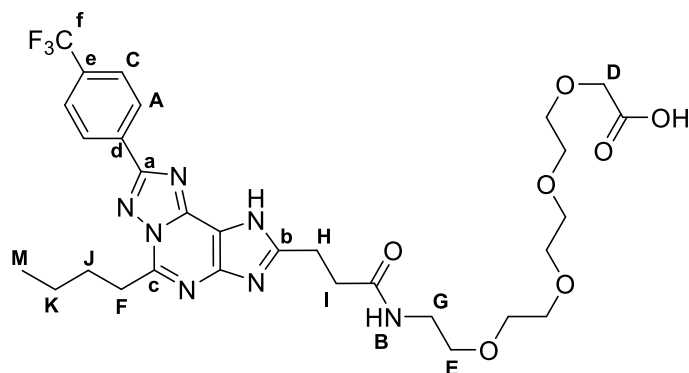
Synthese von *tert*-Butyl (15-(5-butyl-8-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-[1,2,4]triazolo[5,1-*l*]purin-2-yl)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azapentadecyl)carbamate



Die 3-(5-Butyl-8-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-[1,2,4]triazolo[5,1-*l*]purin-2-yl)propansäure (100 mg, 0.23 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (1.0 mL) gelöst und HATU (106 mg, 0.28 mmol, 1.2 Äq.) hinzugefügt. In einem separaten Gefäß wird *tert*-Butyl-(2-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate (73 mg, 0.25 mmol, 1.1 Äq.) in Dichlormethan (1.0 mL) gelöst und Hünigbase (60 mg, 0.46 mmol, 2.0 Äq.) addiert. Nach 5 min wird das Amin zur aktivierten Säure gegeben und für 24 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von Wasser (2 mL) wird mit CH₂Cl₂ (3 x 5 mL) extrahiert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Flash gereinigt. Das Produkt wird mit 142 mg, 0.2 mmol, 88% erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 13.49 (s, 1H, NH), 8.49–8.45 (m, 2H, A), 8.03 (t, ³*J*_{H,H} = 5.64 Hz, 1H, B), 7.96–7.93 (m, 2H, C), 6.71 (t, ³*J*_{H,H} = 5.73 Hz, 1H, D), 3.48–3.46 (m, 8H, 4 x CH₂, PEG), 3.40 (t, ³*J*_{H,H} = 5.88 Hz, 2H, E), 3.36 (t, ³*J*_{H,H} = 7.62 Hz, 2H, F), 3.35 (t, ³*J*_{H,H} = 6.06 Hz, 2H, G), 3.21 (q, ³*J*_{H,H} = 5.73 Hz, 2H, H), 3.10 (t, ³*J*_{H,H} = 7.59 Hz, 2H, I), 3.04 (q, ³*J*_{H,H} = 5.99 Hz, 2H, J), 2.70 (t, ³*J*_{H,H} = 7.55 Hz, 2H, K), 1.93 (p, ³*J*_{H,H} = 7.46 Hz, 2H, L), 1.47 (sext, ³*J*_{H,H} = 7.40 Hz, 2H, M), 1.35 (s, 9H, N), 0.97 (t, ³*J*_{H,H} = 7.35 Hz, 3H, O). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 170.7 (C_q, C_{amid}), 161.3 (C_q, a), 155.5 (C_q, C_{Carba}), 153.6 (C_q, b), 148.1 (C_q, c), 134.2 (C_q, d), 130.4 (q, ²*J*_{C,F} = 31.74 Hz, C_q, e), 127.8 (2x CH₂, A), 126.0 (q, ³*J*_{C,F} = 3.32 Hz, 2 x CH₂, C), 124.1 (q, ¹*J*_{C,F} = 272.24 Hz, C_q, f), 77.5 (C_q, g), 69.7 (2 x CH₂, PEG), 69.5 (CH₂, PEG), 69.5 (CH₂, PEG), 69.1 (CH₂, PEG), 69.1 (CH₂, PEG), 39.4 (CH₂, J), 38.6 (CH₂, H), 32.5 (CH₂, K), 31.7 (CH₂, F), 28.2 (3 x CH₃, N), 27.3 (CH₂, L), 24.5 (CH₂, I), 21.7 (CH₂, M), 13.7 (CH₃, O). **Schmelzpunkt:** 96.7–100.1 °C. **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₃₃H₄₅F₃N₈O₆ [M+Na]⁺: 729.3306; gefunden: 729.3230. **Reinheit** (LCMS): 96%.

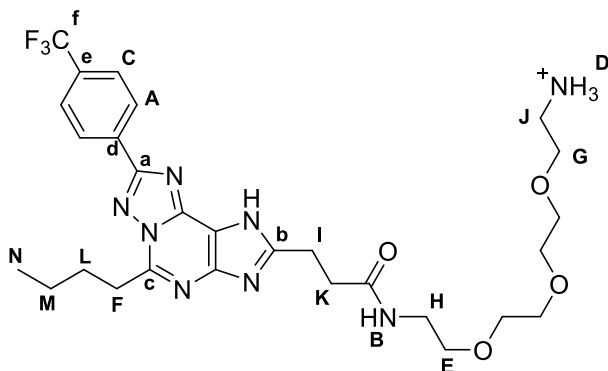
Synthese von 18-(5-Butyl-8-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-[1,2,4]triazolo[5,1-*l*]purin-2-yl)-16-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-15-azaoctadecansäure



Das Edukt *tert*-Butyl-18-(5-butyl-8-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-[1,2,4]triazolo[5,1-*l*]purin-2-yl)-16-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-15-azaoctadecanoat (87.3 mg, 0.121 mmol, 1.0 Äq.) wird in Trifluoressigsäure:Dichlormethan (6:4, $V_{\text{Ges}} = 1.21$ mL) gelöst und TIPS (30 μL) addiert. Nach 2 h bei RT wird das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC (Acetonitril) gereinigt. Das Produkt wird mit 66.8 mg, 0.100 mmol, 83% erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm] = 8.49–8.43 (m, 2H, A), 8.19 (bs, 1H, B), 7.97–7.93 (m, 2H, C), 3.86 (s, 2H, D), 3.62–3.58 (m, 2H, CH₂), 3.55–3.52 (m, 2H, CH₂), 3.51–3.47 (m, 8H, 4 x CH₂), 3.41 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.88$ Hz, 2H, E), 3.36 (unter HDO, 2H, F), 3.20 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 5.85$ Hz, 2H, G), 3.11 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.65$ Hz, 2H, H), 2.71 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.63$ Hz, 2H, I), 1.92 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.53$ Hz, 2H, J), 1.46 (sext, $^3J_{\text{H,H}} = 7.42$ Hz, 2H, K), 0.97 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.34$ Hz, 3H, M). **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm] = 172.6 (C_q, C_{Säure}), 170.9 (C_q, C_{Amid}), 161.3 (C_q, a), 154.4 (C_q, b), 147.9 (C_q, c), 134.2 (C_q, d), 130.4 (q, $^2J_{\text{C,F}} = 31.58$ Hz, C_q, e), 127.8 (2x CH₂, A), 126.0 (q, $^3J_{\text{C,F}} = 3.41$ Hz, 2 x CH₂, C), 124.1 (q, $^1J_{\text{C,F}} = 272.64$ Hz, C_q, f), 69. (3 x CH₂, PEG), 69.6 (CH₂, PEG), 69.6 (CH₂, PEG), 69.5 (CH₂, PEG), 69.2 (2 x CH₂, PEG), 38.7 (CH₂, G), 32.9 (CH₂, I), 31.8 (CH₂, F), 27.4 (CH₂, J), 24.7 (CH₂, H), 21.7 (CH₂, K), 13.8 (CH₃, M). **Schmelzpunkt:** 104.9–108.8 °C. **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₃₀H₃₈F₃N₇O₇ [M+H]⁺: 666.2861; gefunden: 666.2858. **Reinheit:** 97%

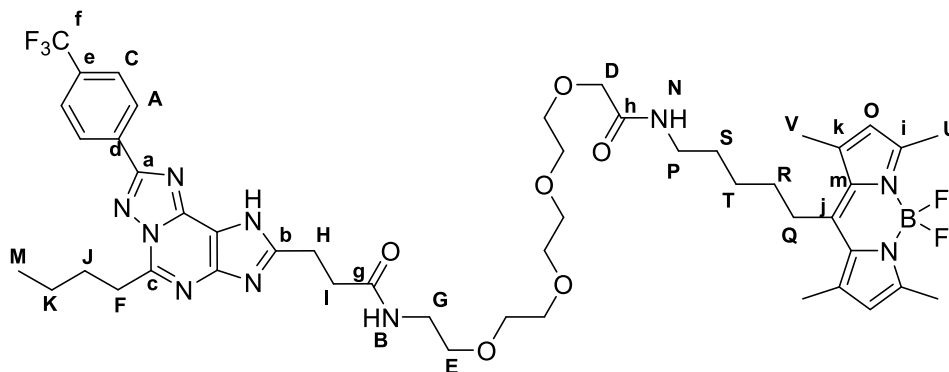
Synthese von *N*-(2-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-3-(5-butyl-8-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-[1,2,4]triazolo[5,1-*l*]purin-2-yl)propanamid



Das Edukt 18-(5-Butyl-8-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-[1,2,4]triazolo[5,1-*l*]purin-2-yl)-16-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-15-azaoctadecansäure (100 mg, 0.14 mmol, 1.0 Äq.) wird in Trifluoressigsäure:Dichlormethan (10:1, $V_{\text{Ges}} = 5.5$ mL) gelöst und TIPS (165 μL) addiert. Nach 1 h bei RT wird das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC (Acetonitril) gereinigt. Das Produkt wird mit 93.8 mg, 0.13 mmol, 81% erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm] = 13.46 (s, 1H, NH), 8.50–8.44 (m, 2H, A), 8.03 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.69$ Hz, 1H, B), 7.97–7.93 (m, 2H, C), 7.77 (bs, 3H, D, protoniert), 3.58 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.26$ Hz, 2H, G), 3.57–3.51 (m, 4H, 2 x CH_2 , PEG), 3.50 (s, 4H, 2 x CH_2 , PEG), 3.41 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.97$ Hz, 2H, E), 3.36 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.51$ Hz, 2H, F), 3.22 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 5.87$ Hz, 2H, H), 3.10 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.50$ Hz, 2H, I), 3.04 (tq, $^3J_{\text{H,H}} = 5.47$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.47$ Hz, 2H, J), 2.71 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.54$ Hz, 2H, K), 1.93 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.52$ Hz, 2H, L), 1.47 (sext, $^3J_{\text{H,H}} = 7.39$ Hz, 2H, M), 0.97 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.37$ Hz, 3H, N). **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm] = 170.8 (C_q , C_{Amid}), 161.4 (C_q , a), 154.1 (C_q , b), 148.1 (C_q , c), 134.2 (C_q , d), 130.4 (q, $^2J_{\text{C,F}} = 31.96$ Hz, C_q , e), 127.8 (2x CH_2 , A), 126.0 (q, $^3J_{\text{C,F}} = 3.48$ Hz, 2 x CH_2 , C), 124.1 (q, $^1J_{\text{C,F}} = 272.14$ Hz, C_q , f), 69.7 (CH_2 , PEG), 69.6 (CH_2 , PEG), 69.6 (CH_2 , PEG), 69.5 (CH_2 , PEG), 69.1 (CH_2 , PEG), 66.6 (CH_2 , PEG), 38.6 (CH_2 , PEG), 38.6 (CH_2 , PEG), 32.4 (CH_2 , K), 31.7 (CH_2 , F), 27.3 (CH_2 , L), 24.4 (CH_2 , I), 21.7 (CH_2 , M), 13.7 (CH_3 , N). **Schmelzpunkt:** hygroskopisch. **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für $\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{F}_3\text{N}_8\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 629.2782; gefunden: 629.2726. **Reinheit:** (LCMS): 98%.

Synthese von 14-(3-(5-Butyl-8-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-[1,2,4]triazolo[5,1-*l*]purin-2-yl)propanamido)-*N*-(5-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5*H*-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-10-yl)pentyl)-3,6,9,12-tetraoxatetradecanamid



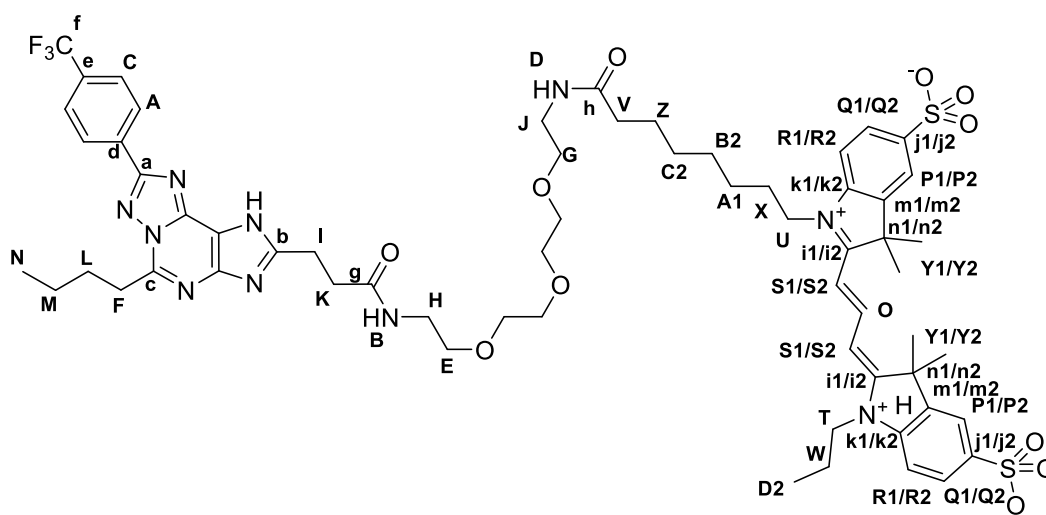
Das Edukt 18-(5-Butyl-8-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-[1,2,4]triazolo[5,1-*l*]purin-2-yl)-16-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-15-azaocetadecansäure (20 mg, 0.03 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (0.4 mL) gelöst und HATU (13.7 mg, 0.036 mmol, 1.2 Äq.) hinzugefügt. In einem separaten Gefäß wird das BODIPY-amin (11 mg, 0.033 mmol, 1.1 Äq.) in Dichlormethan (0.4 mL) gelöst und Hünigbase (7.8 mg, 0.06 mmol, 2.0 Äq.) addiert. Nach 5 min wird das Amin zur aktivierten Säure gegeben und für 12 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wird unter vermindertem Druck entfernt und Reinigung mittels HPLC ergibt 13.9 mg, 0.014 mmol, 47%.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 13.48 (s, 1H, NH), 8.48–8.44 (m, 2H, A), 8.02 (t, ³*J*_{H,H} = 5.63 Hz, 1H, B), 7.96–7.92 (m, 2H, C), 7.64 (t, ³*J*_{H,H} = 5.96 Hz, 1H, N), 6.18 (s, 2H, O), 3.85 (s, 2H, D), 3.57–3.53 (m, 4H, 2 x CH₂), 3.53–3.48 (m, 4H, 2 x CH₂), 3.48–3.46 (m, 4H, 2 x CH₂), 3.39 (t, ³*J*_{H,H} = 5.88 Hz, 2H, E), 3.34 (t, ³*J*_{H,H} = 7.57 Hz, 2H, F), 3.20 (q, ³*J*_{H,H} = 5.80 Hz, 2H, G), 3.11 (q, ³*J*_{H,H} = 6.53 Hz, 2H, P), 3.10 (t, ³*J*_{H,H} = 7.71 Hz, 2H, H), 2.90–2.84 (m, 2H, Q), 2.70 (t, ³*J*_{H,H} = 7.56 Hz, 2H, I), 2.38 (s, 6H, U), 2.37 (s, 6H, V), 1.93 (p, ³*J*_{H,H} = 7.54 Hz, 2H, J), 1.57–1.51 (m, 2H, R), 1.51–1.46 (m, 2H, S), 1.46–1.39 (m, 2H, T), 1.46 (sext, ³*J*_{H,H} = 7.44 Hz, 2H, K), 0.97 (t, ³*J*_{H,H} = 7.35 Hz, 3H, M). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 170.7 (C_q, g), 169.0 (C_q, h), 161.3 (C_q, a), 153.7 (C_q, b), 152.9 (2 x C_q, i), 148.0 (C_q, c), 146.6 (C_q, j), 140.7 (2 x C_q, k), 134.2 (C_q, d), 130.6 (2 x C_q, m), 130.3 (q, ²*J*_{C,F} = 32.44 Hz, C_q, e), 127.8 (2 x CH₂, A), 125.9 (q, ³*J*_{C,F} = 3.94 Hz, 2 x CH₂, C), 124.1 (q, ¹*J*_{C,F} = 272.77 Hz, C_q, f), 121.6 (CH, 2 x CH, O), 70.2 (CH₂, PEG), 69.9 (CH₂, PEG), 69.7 (2 x CH₂, PEG), 69.7 (CH₂, PEG), 69.5 (CH₂, PEG), 69.5 (CH₂, PEG), 69.1 (CH₂, PEG), 38.6 (CH₂, G), 37.8 (CH₂, P), 32.5 (CH₂, I), 31.7 (CH₂, F), 31.0 (CH₂, R), 28.8 (CH₂, S), 27.7 (CH₂, Q), 27.3 (CH₂, J), 26.9 (CH₂, T), 24.4 (CH₂, H), 21.7 (CH₂, K), 15.8 (2 x CH₃, U), 14.0 (2 x CH₃, V), 13.7 (CH₃, M). **LC-MS**: positiv [*m/z*] = 982.1 ([*M*+*H*]⁺). **Schmelzpunkt**: 69.2–78.4 °C. **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für

$C_{48}H_{62}BF_5N_{10}O_6$ $[M+Na]^+$: 1003.4759; gefunden: 1033.4741. **Reinheit:** 96%.

Absorption/Emission: 498 nm / 508 nm.

Synthese von 1-(1-(5-Butyl-8-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-[1,2,4]triazolo[5,1- β]purin-2-yl)-3,17-dioxo-7,10,13-trioxa-4,16-diazatetracosan-24-yl)-2-((*E*)-3-((*E*)-3,3-dimethyl-1-propyl-5-sulfoindolin-2-ylidene)prop-1-en-1-yl)-3,3-dimethyl-3*H*-indol-1-ium-5-sulfonat

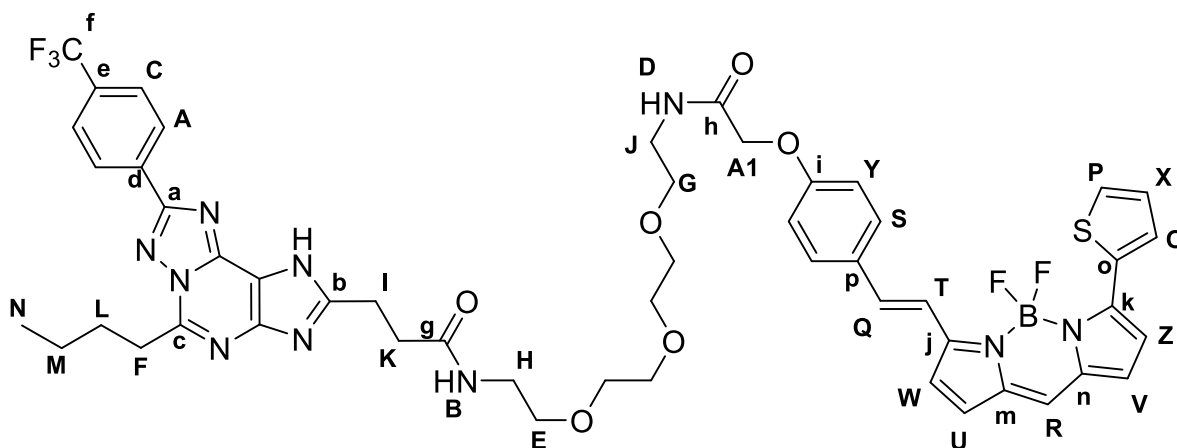


Das Cyanin (9.0 mg, 0.013 mmol, 1.0 Äq.) wird in DMF (0.75 mL) gelöst und HATU (6.1 mg, 0.016 mmol, 1.2 Äq.) hinzugefügt. In einem separaten Gefäß wird *N*-(2-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-3-(5-butyl-8-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-[1,2,4]triazolo[5,1- β]purin-2-yl)propanamid (9.1 mg, 0.015 mmol, 1.1 Äq.) in DMF (0.75 mL) gelöst und Hünigbase (3.4 mg, 0.026 mmol, 2.0 Äq.) addiert. Nach 5 min wird das Amin zur aktivierten Säure gegeben und für 3 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wird unter vermindertem Druck entfernt und Reinigung mittels HPLC ergibt 11.7 mg, 0.009 mmol, 71%.

1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 13.44 (s, 1H, NH), 8.51–8.44 (m, 2H, A), 8.35 (t, $^3J_{H,H}$ = 13.43 Hz, 1H, O), 8.03 (t, $^3J_{H,H}$ = 5.59 Hz, 1H, B), 7.98–7.93 (m, 2H, C), 7.82–7.80 (m, 2H, P1/P2), 7.76 (t, $^3J_{H,H}$ = 5.58 Hz, 1H, D), 7.69–7.66 (m, 2H, Q1/Q2), 7.41 (d, $^3J_{H,H}$ = 8.32 Hz, 1H, R1/R2), 7.38 (d, $^3J_{H,H}$ = 8.32 Hz, 1H, R1/R2), 6.52 (d, $^3J_{H,H}$ = 13.28 Hz, 1H, S1/S2), 6.50 (d, $^3J_{H,H}$ = 13.28 Hz, 1H, S1/S2), 4.13–4.06 (m, 2H, U/T), 4.13–4.06 (m, 2H, U/T), 3.48–3.44 (m, 8H, 4 x CH₂), 3.39 (t, $^3J_{H,H}$ = 5.97 Hz, 2H, E), 3.36 (t, $^3J_{H,H}$ = 7.57 Hz, 2H, F), 3.35 (t, $^3J_{H,H}$ = 5.85 Hz, 2H, G), 3.20 (q, $^3J_{H,H}$ = 5.68 Hz, 2H, H), 3.15 (q, $^3J_{H,H}$ = 5.53 Hz, 2H, J), 3.10 (t, $^3J_{H,H}$ = 7.53 Hz, 2H, I), 2.70 (t, $^3J_{H,H}$ = 7.55 Hz, 2H, K), 2.02 (t, $^3J_{H,H}$ = 7.38 Hz, 2H, V), 1.92 (p, $^3J_{H,H}$ = 7.55 Hz, 2H, L), 1.77 (sext, $^3J_{H,H}$ = 7.33 Hz, 2H, W), 1.74–1.69 (m, 2H, X), 1.70 (s, 6H, Y1/Y2), 1.69 (s, 6H, Y1/Y2), 1.48–1.42 (m, 2H, Z), 1.46 (sext, $^3J_{H,H}$ = 7.40 Hz, 2H, M), 1.40–1.33 (m, 2H, A1), 1.33–1.27 (m, 2H, B2), 1.24–1.18 (m, 2H, C2), 0.97 (t, $^3J_{H,H}$ = 7.33 Hz, 3H, N), 0.97 (t, $^3J_{H,H}$ = 7.33 Hz, 3H, D2). **^{13}C -NMR** (151 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 174.3 (C_q, i1/i2), 174.2

(C_q, i1/i2), 172.1 (C_q, h), 170.8 (C_q, g), 161.4 (C_q, a), 154.2 (C_q, b), 149.9 (CH, O), 148.2 (C_q, c), 145.9 (C_q, j1/j2), 145.9 (C_q, j1/j2), 141.9 (C_q, k1/k2), 141.8 (C_q, k1/k2), 140.1 (C_q, m1/m2), 134.2 (C_q, d), 130.3 (q, ²J_{C,F} = 31.90 Hz, C_q, e), 127.8 (2 x CH₂, A), 126.2 (CH, Q1/Q2), 126.2 (CH, Q1/Q2), 126.0 (q, ³J_{C,F} = 3.66 Hz, 2 x CH₂, C), 124.1 (q, ¹J_{C,F} = 272.42 Hz, C_q, f), 119.9 (CH, P1/P2), 119.9 (CH, P1/P2), 110.7 (CH, R1/R2), 110.6 (CH, R1/R2), 69.7 (2 x CH₂, PEG), 69.5 (CH₂, PEG), 69.5 (CH₂, PEG), 69.1 (CH₂, G), 69.1 (CH₂, E), 48.9 (C_q, n1/n2), 45.2 (T), 43.9 (U), 38.6 (CH₂, H), 38.4 (CH₂, J), 35.2 (CH₂, V), 32.5 (CH₂, K), 31.7 (CH₂, F), 28.5 (CH₂, B2/C2), 28.5 (CH₂, B2/C2), 27.4 (CH₃, Y1/Y2), 27.4 (CH₃, Y1/Y2), 27.3 (CH₂, L), 26.9 (CH₂, X), 26.0 (CH₂, A1), 25.1 (CH₂, Z), 24.4 (CH₂, I), 21.7 (CH₂, M), 20.4 (CH₂, W), 13.7 (CH₃, N), 10.9 (CH₃, D2). **LC-MS:** positive [*m/z*] = 631.5 ([M+H]²⁺). **Schmelzpunkt:** Zersetzung bei 165.1 °C. **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₆₂H₇₈F₃N₁₀O₁₁S₂Na [M+Na]⁺: 1305.5035; gefunden: 1305.5072. **Reinheit** (LC/MS): 97%. **Absorption/Emission:** 566 nm / 582 nm.

Synthese von (E)-3-(5-Butyl-8-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-[1,2,4]triazolo[5,1-*l*]purin-2-yl)-*N*-(1-(4-(2-(5,5-difluoro-7-(thiophen-2-yl)-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-3-yl)vinyl)phenoxy)-2-oxo-6,9,12-trioxa-3-azatetradecan-14-yl)propanamid

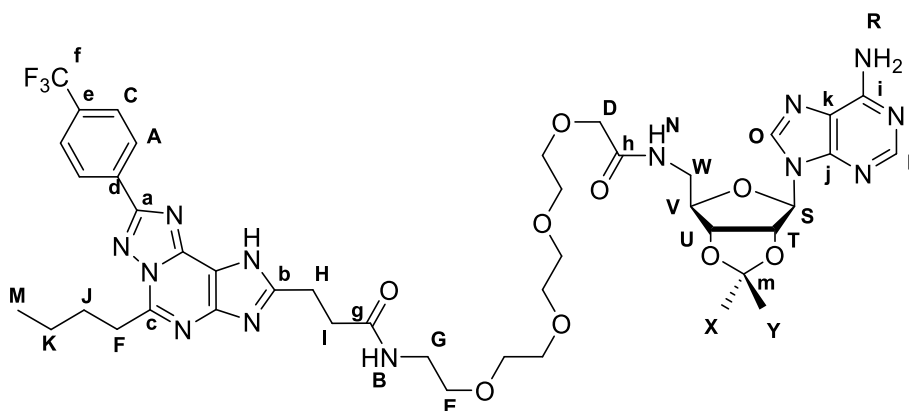


Das BODIPY (13.5 mg, 0.03 mmol, 1.0 Äq.) wird in DMF (0.75 mL) gelöst und HATU (6.1 mg, 0.016 mmol, 1.2 Äq.) hinzugefügt. In einem separaten Gefäß wird *N*-(2-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-3-(5-butyl-8-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-[1,2,4]triazolo[5,1-*l*]purin-2-yl)propanamid (20.0 mg, 0.033 mmol, 1.1 Äq.) in DMF (0.75 mL) gelöst und Hünigbase (7.8 mg, 0.06 mmol, 2.0 Äq.) addiert. Nach 5 min wird das Amin zur aktivierten Säure gegeben und für 3 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wird unter vermindertem Druck entfernt und Reinigung mittels HPLC ergibt 21.5 mg, 0.021 mmol, 62%

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 13.45 (s, 1H, NH), 8.51–8.41 (m, 2H, A), 8.12 (t, ³J_{H,H} = 5.81 Hz, 1H, D), 8.03 (d, ³J_{H,H} = 4.02 Hz, 1H, O), 8.02 (t, ³J_{H,H} = 5.62 Hz, 1H, B), 7.96–7.92 (m, 2H, C), 7.81 (d, ³J_{H,H} = 4.98 Hz, 1H, P), 7.70 (d, ³J_{H,H} = 16.26 Hz, 1H, Q), 7.59 (s, 1H, R),

7.58–7.56 (m, 2H, S), 7.38 (d, $^3J_{H,H} = 16.42$ Hz, 1H, T), 7.35 (d, $^3J_{H,H} = 4.61$ Hz, 1H, U), 7.27–7.26 (m, 1H, V), 7.27–7.26 (m, 1H, W), 7.27–7.25 (m, 1H, X), 7.06–7.03 (m, 2H, Y), 6.94 (d, $^3J_{H,H} = 4.17$ Hz, 1H, Z), 4.54 (s, 2H, A1), 3.51–3.47 (m, 8H, 4 x CH₂), 3.45 (t, $^3J_{H,H} = 6.04$ Hz, 2H, G), 3.40 (t, $^3J_{H,H} = 5.88$ Hz, 2H, E), 3.35 (t, $^3J_{H,H} = 7.57$ Hz, 2H, F), 3.29 (unter HDO, J), 3.20 (q, $^3J_{H,H} = 5.80$ Hz, 2H, H), 3.09 (t, $^3J_{H,H} = 7.49$ Hz, 2H, I), 2.70 (t, $^3J_{H,H} = 7.55$ Hz, 2H, K), 1.92 (p, $^3J_{H,H} = 7.55$ Hz, 2H, L), 1.46 (sext, $^3J_{H,H} = 7.40$ Hz, 2H, M), 0.96 (t, $^3J_{H,H} = 7.35$ Hz, 3H, N). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 170.8 (C_q, g), 167.3 (C_q, h), 161.4 (C_q, a), 159.1 (C_q, i), 156.4 (C_q, j), 153.6 (C_q, b), 148.2 (C_q, c), 147.6 (C_q, k), 138.7 (CH, Q), 136.5 (C_q, m), 136.3 (C_q, n), 134.2 (C_q, d), 133.7 (C_q, o), 131.2 (CH, U), 130.3 (q, $^2J_{C,F} = 32.34$ Hz, C_q, e), 130.2 (CH, O), 130.1 (CH, P), 129.6 (CH, V), 129.1 (C_q, p), 129.0 (2 x CH, S), 128.9 (CH, X), 127.8 (2 x CH₂, A), 125.9 (q, $^3J_{C,F} = 3.10$ Hz, 2 x CH₂, C), 125.1 (CH, R), 124.1 (q, $^1J_{C,F} = 271.91$ Hz, C_q, f), 119.4 (CH, Z), 118.2 (CH, W), 115.9 (CH, T), 115.5 (2 x CH, Y), 69.7 (2 x CH₂, PEG), 69.5 (CH₂, PEG), 69.5 (CH₂, PEG), 69.1 (CH₂, E), 68.8 (CH₂, G), 66.9 (CH₂, A1), 38.6 (CH₂, H), 38.3 (CH₂, J), 32.5 (CH₂, K), 31.7 (CH₂, F), 27.3 (CH₂, L), 24.4 (CH₂, I), 21.7 (CH₂, M), 13.7 (CH₃, N). **LC-MS**: positive [*m/z*] = 1039.5 ([M+H]⁺). **Schmelzpunkt**: 154.7–156.4 °C. **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₅₁H₅₂BF₅N₁₀O₆S [M+Na]⁺: 1061.3697; gefunden: 1061.3695. **Reinheit** (LC/MS): 96%. **Absorption/Emission**: 638 nm / 654 nm.

Synthese von *N*-(((3*aR*,4*R*,6*R*,6*aR*)-6-(6-Amino-9*H*-purin-9-yl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-*d*][1,3]dioxol-4-yl)methyl)-14-(3-(5-butyl-8-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-[1,2,4]triazolo[5,1-*l*]purin-2-yl)propanamido)-3,6,9,12-tetraoxatetradecanamid



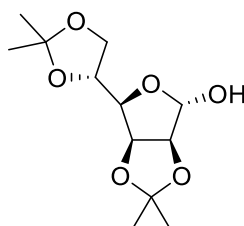
Das Edukt 18-(5-Butyl-8-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-[1,2,4]triazolo[5,1-*l*]purin-2-yl)-16-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-15-azaoctadecansäure (20 mg, 0.03 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (0.4 mL) gelöst und HATU (13.7 mg, 0.036 mmol, 1.2 Äq.) hinzugefügt. In einem separaten Gefäß wird das 9-(((3*aR*,4*R*,6*R*,6*aR*)-6-(Aminomethyl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-*d*][1,3]dioxol-4-yl)-9*H*-purin-6-amin (10.1 mg, 0.033 mmol, 1.1 Äq.) in Dichlormethan (0.4 mL) gelöst und Hünigbase (7.8 mg, 0.06 mmol, 2.0 Äq.) addiert. Nach 5 min wird das Amin zur

aktivierten Säure gegeben und für 12 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wird unter vermindertem Druck entfernt und Reinigung mittels HPLC ergibt 17.6 mg, 0.018 mmol, 61%.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 13.49 (s, 1H, NH), 8.50–8.46 (m, 2H, A), 8.30 (s, 1H, O), 8.17 (s, 1H, P), 8.02 (t, ³*J*_{H,H} = 5.64 Hz, 1H, B), 7.97–7.93 (m, 2H, C), 7.88 (t, ³*J*_{H,H} = 6.05 Hz, 1H, N), 7.31 (s, 2H, R), 6.12 (d, ³*J*_{H,H} = 2.73 Hz, 1H, S), 5.43 (dd, ³*J*_{H,H} = 2.79 Hz, ³*J*_{H,H} = 6.31 Hz, 1H, T), 4.95 (dd, ³*J*_{H,H} = 3.33 Hz, ³*J*_{H,H} = 6.40 Hz, 1H, U), 4.19 (td, ³*J*_{H,H} = 3.33 Hz, ³*J*_{H,H} = 6.25 Hz, 1H, V), 3.88 (s, 2H, D), 3.55–3.52 (m, 2H, CH₂), 3.52–3.49 (m, 2H, CH₂), 3.47–3.42 (m, 8H, 4 x CH₂), 3.41–3.36 (m, 1H, W), 3.36–3.31 (m, 1H, W), 3.39 (t, ³*J*_{H,H} = 6.15 Hz, 2H, E), 3.35 (t, ³*J*_{H,H} = 7.50 Hz, 2H, F), 3.20 (q, ³*J*_{H,H} = 5.82 Hz, 2H, G), 3.10 (t, ³*J*_{H,H} = 7.57 Hz, 2H, H), 2.70 (t, ³*J*_{H,H} = 7.57 Hz, 2H, I), 1.93 (p, ³*J*_{H,H} = 7.56 Hz, 2H, J), 1.51 (s, 3H, X), 1.46 (sext, ³*J*_{H,H} = 7.42 Hz, 2H, K), 1.30 (s, 3H, Y), 0.97 (t, ³*J*_{H,H} = 7.35 Hz, 3H, M). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 170.8 (C_q, g), 169.7 (C_q, h), 161.4 (C_q, a), 156.1 (C_q, i), 154.3 (C_q, b), 152.8 (CH, P), 148.8 (C_q, j), 148.0 (C_q, c), 139.9 (CH, O), 134.2 (C_q, d), 130.4 (q, ²*J*_{C,F} = 31.88 Hz, C_q, e), 127.8 (2 x CH₂, A), 126.0 (q, ³*J*_{C,F} = 3.59 Hz, 2 x CH₂, C), 124.1 (q, ¹*J*_{C,F} = 272.16 Hz, C_q, f), 119.2 (C_q, k), 113.5 (C_q, m), 88.9 (CH, S), 84.1 (CH, V), 82.9 (CH, T), 81.7 (CH, U), 70.1 (CH₂, PEG), 69.9 (CH₂, PEG), 69.7 (2 x CH₂, PEG), 69.7 (CH₂, PEG), 69.5 (CH₂, PEG), 69.5 (CH₂, PEG), 69.1 (CH₂, E), 40.3 (CH₂, W), 38.6 (CH₂, G), 32.5 (CH₂, I), 31.7 (CH₂, F), 27.4 (CH₂, J), 27.0 (CH₃, X), 25.2 (CH₃, Y), 24.5 (CH₂, H), 21.7 (CH₂, K), 13.8 (CH₃, M). **Schmelzpunkt:** 114.5–118.5 °C. **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 954.8 ([M+H]⁺). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₄₃H₅₄F₃N₁₃O₉ [M+Na]⁺: 976.4012; gefunden: 976.3986. **Reinheit:** 97%

5.6 Synthese des A₃AR Antagonisten LJ-1888²⁸³

Synthese von (3a*S*,4*S*,6*R*,6a*S*)-6-((*R*)-2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-*d*][1,3]dioxol-4-ol

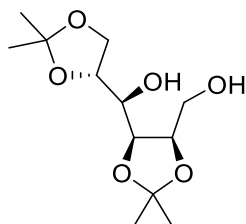


Die *a-d*-Mannose (10 g, 55.5 mmol, 1.0 Äq.) und 2,2-Dimethoxypropan (17.3 g, 166.5 mmol, 3.0 Äq.) werden in Aceton (425 mL) vorgelegt und bei 0 °C Camphersulfonsäure (3.8 g, 16.6 mmol, 0.3 Äq.) addiert. Nach 24 h bei RT wird mit NEt₃ neutralisiert und das Lösemittel entfernt. Säulenchromatographische Reinigung an SiO₂ (Cyclohexan:Ethylacetat 1:1) ergibt das Produkt mit 13.5 g, 51.8 mmol, 93% (Lit.: 95%).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 6.44–6.41 (m, 1H), 5.14–5.12 (m, 1H), 4.71 (dd, ³*J*_{H,H} = 5.88 Hz, ³*J*_{H,H} = 3.59 Hz, 1H), 4.45 (d, ³*J*_{H,H} = 5.88 Hz, 1H), 4.24 (q, ³*J*_{H,H} = 6.25 Hz, 1H), 4.01

(dd, $^3J_{H,H} = 6.48$ Hz, $^3J_{H,H} = 3.60$ Hz, 1H), 3.98 (dd, $^3J_{H,H} = 8.34$ Hz, $^3J_{H,H} = 6.45$ Hz, 1H), 3.82 (dd, $^3J_{H,H} = 8.34$ Hz, $^3J_{H,H} = 5.79$ Hz, 1H), 1.34 (s, 3H), 1.33 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.23 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 111.3 (C_q), 107.8 (C_q), 100.3 (CH), 85.4 (CH), 79.3 (CH), 79.1 (CH), 72.8 (CH), 65.8 (CH₂), 26.6 (CH₃), 25.7 (CH₃), 25.2 (CH₃), 24.3 (CH₃). **LC-MS**: positiv [m/z] = 260.9 ([M+H]⁺). **Reinheit**: >90% (NMR).

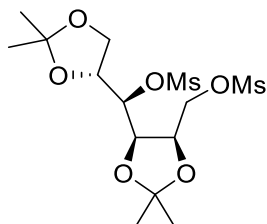
Synthese von (R)-((R)-2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)((4S,5R)-5-(hydroxymethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methanol



Zu einer Lösung aus (3a*S*,4*S*,6*R*,6a*S*)-6-((*R*)-2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-*d*][1,3]dioxol-4-ol (5.0 g, 19.2 mmol, 1.0 Äq.) in Ethanol (83.3 mL) wird NaBH₄ (1.45 g, 38.4 mmol, 2.0 Äq.) bei 0 °C addiert. Nach 3 h wird mit Essigsäure neutralisiert und die Reaktionslösung mit EtOAc (3 x 50 mL) extrahiert. Nach Trocknen mit MgSO₄ wird das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung an SiO₂ (Cyclohexan:Ethylacetat 1:1) ergibt das Produkt mit 4.4 g, 16.8 mmol, 87% (Lit.: 92%).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 4.88 (dd, $^3J_{H,H} = 5.78$ Hz, $^3J_{H,H} = 5.96$ Hz, 1H), 4.64 (d, $^3J_{H,H} = 6.83$ Hz, 1H), 4.20–4.13 (m, 2H), 3.99–3.92 (m, 2H), 3.86–3.80 (m, 1H), 3.72–3.64 (m, 2H), 3.49–3.43 (m, 1H), 1.39 (s, 3H), 1.30 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.25 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 108.2 (C_q), 107.2 (C_q), 77.4 (CH), 75.8 (CH), 75.7 (CH), 69.3 (CH), 66.5 (CH₂), 59.7 (CH₂), 26.7 (CH₃), 26.5 (CH₃), 25.3 (CH₃), 25.2 (CH₃). **LC-MS**: positiv [m/z] = 262.9 ([M+H]⁺). **Reinheit**: >90% (NMR).

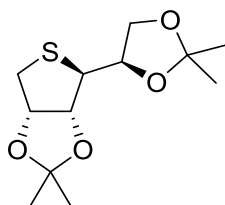
Synthese von (R)-((R)-2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)((4R,5R)-2,2-dimethyl-5-(((methylsulfonyl)oxy)methyl)-1,3-dioxolan-4-yl)methyl methanesulfonat



Das Diol (R)-((R)-2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)((4S,5R)-5-(hydroxymethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methanol (3.0 g, 11.4 mmol, 1.0 Äq.) wird in CH₂Cl₂ (23.2 mL) gelöst und DMAP (415 mg, 3.4 mmol, 0.3 Äq.) und Triethylamin (9.2 g, 91.2 mmol, 8.0 Äq.) addiert. Mesylchlorid (5.22 g, 45.6 mmol, 4.0 Äq.) wird bei 0 °C tropfenweise zugegeben und die Reaktionslösung für 1 h bei RT gerührt. Nach Extraktion mit CH₂Cl₂ (3 x 20 mL) und Waschen mit NaHCO₃-Lsg (150 mL) wird mit MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung an SiO₂ (Cyclohexan:Ethylacetat 1:1) ergibt das Produkt mit 4.6 g, 11.0 mmol, 96% (Lit.: 94%).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 4.80 (dd, ³J_{H,H} = 7.20 Hz, ³J_{H,H} = 5.09 Hz, 1H), 4.47–4.41 (m, 2H), 4.38 (dd, ³J_{H,H} = 7.20 Hz, ³J_{H,H} = 5.76 Hz, 1H), 4.32 (dd, ³J_{H,H} = 11.28 Hz, ³J_{H,H} = 8.29 Hz, 1H), 4.23 (td, ³J_{H,H} = 6.78 Hz, ³J_{H,H} = 5.11 Hz, 1H), 4.08 (dd, ³J_{H,H} = 8.50 Hz, ³J_{H,H} = 6.50 Hz, 1H), 3.88 (dd, ³J_{H,H} = 8.49 Hz, ³J_{H,H} = 7.07 Hz, 1H), 3.23 (s, 3H), 3.21 (s, 3H), 1.44 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.33 (s, 3H), 1.29 (s, 3H). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 109.1 (C_q), 108.8 (C_q), 77.9 (CH), 75.4 (CH), 74.3 (CH), 74.1 (CH), 68.5 (CH₂), 65.1 (CH₂), 39.1 (CH₃), 36.7 (CH₃), 26.9 (CH₃), 25.7 (CH₃), 25.5 (CH₃), 25.0 (CH₃). **LC-MS**: positiv [*m/z*] = 419.2 ([M+H]⁺). **Reinheit**: >90% (NMR).

Synthese von (3aR,4S,6aS)-4-((R)-2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-2,2-dimethyltetrahydrothieno[3,4-*d*][1,3]dioxol

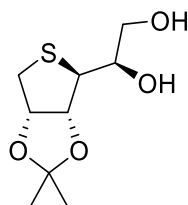


Das (R)-((R)-2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)((4R,5R)-2,2-dimethyl-5-(((methylsulfonyl)oxy)methyl)-1,3-dioxolan-4-yl)methylmethanesulfonat (3.56 g, 8.5 mmol, 1.0 Äq.) wird in DMF (178 mL) gelöst und Na₂S (1.33 g, 17.0 mmol, 2.0 Äq.) addiert. Nach 24 h bei 80 °C wird das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und mit EtOAc (3 x 30 mL) extrahiert. Nach Trocknen mit MgSO₄ wird das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt.

Säulenchromatographische Reinigung an SiO₂ (Cyclohexan:Ethylacetat 4:1) ergibt das Produkt mit 1.80 mg, 6.9 mmol, 81% (Lit.: 78%).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 4.88 (td, ³J_{H,H} = 5.45 Hz, ³J_{H,H} = 1.68 Hz, 1H), 4.67 (dd, ³J_{H,H} = 5.74 Hz, ³J_{H,H} = 1.85 Hz, 1H), 4.23 (ddd, ³J_{H,H} = 7.31 Hz, ³J_{H,H} = 6.21 Hz, ³J_{H,H} = 4.80 Hz, 1H), 4.02 (dd, ³J_{H,H} = 8.16 Hz, ³J_{H,H} = 6.23 Hz, 1H), 3.60 (dd, ³J_{H,H} = 8.15 Hz, ³J_{H,H} = 7.28 Hz, 1H), 3.31 (dd, ³J_{H,H} = 4.83 Hz, ³J_{H,H} = 1.83 Hz, 1H), 3.11 (dd, ³J_{H,H} = 12.35 Hz, ³J_{H,H} = 5.12 Hz, 1H), 2.74 (dd, ³J_{H,H} = 12.36 Hz, ³J_{H,H} = 1.69 Hz, 1H), 1.40 (s, 3H), 1.34 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.25 (s, 3H). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 110.2 (C_q), 108.6 (C_q), 86.1 (CH), 83.2 (CH), 77.2 (CH), 67.4 (CH₂), 55.7 (CH), 37.5 (CH₂), 26.5 (CH₃), 26.1 (CH₃), 25.5 (CH₃), 24.5 (CH₃). **LC-MS**: positiv [*m/z*] = 261.1 ([M+H]⁺). **Reinheit**: >90% (NMR).

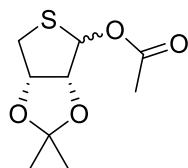
Synthese von (R)-1-((3aR,4S,6aS)-2,2-Dimethyltetrahydrothieno[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)ethane-1,2-diol



Das (3aR,4S,6aS)-4-((R)-2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-2,2-dimethyltetrahydrothieno[3,4-d][1,3]dioxol (2.0 g, 7.68 mmol, 1.0 Äq.) wird in AcOH/H₂O (60%, 23 mL) für 2 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wird unter vermindertem Druck entfernt und säulenchromatographische Reinigung an SiO₂ (Cyclohexan:Ethylacetat 1:2) ergibt das Produkt. Die Sequenz wird weitere 2 Mal durchgeführt und insgesamt 1.24 g, 5.6 mmol, 73% (Lit.: 81%) Produkt erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 4.85 (td, ³J_{H,H} = 5.64 Hz, ³J_{H,H} = 1.36 Hz, 1H), 4.79 (d, ³J_{H,H} = 5.04 Hz, 1H), 4.75 (dd, ³J_{H,H} = 5.84 Hz, ³J_{H,H} = 1.35 Hz, 1H), 4.56 (t, ³J_{H,H} = 5.56 Hz, 1H), 3.72–3.68 (m, 1H), 3.36 (t, ³J_{H,H} = 5.97 Hz, 2H), 3.33 (dd, ³J_{H,H} = 3.31 Hz, ³J_{H,H} = 1.26 Hz, 1H), 3.13 (dd, ³J_{H,H} = 12.02 Hz, ³J_{H,H} = 5.08 Hz, 1H), 2.62 (d, ³J_{H,H} = 3.31 Hz, 1H) 1.39 (s, 3H), 1.24 (s, 3H). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 109.6 (C_q), 87.4 (CH), 83.6 (CH), 73.5 (CH), 63.6 (CH₂), 56.7 (CH), 38.5 (CH₂), 26.5 (CH₃), 24.5 (CH₃). **LC-MS**: positiv [*m/z*] = 221.0 ([M+H]⁺). **Reinheit**: >90% (NMR).

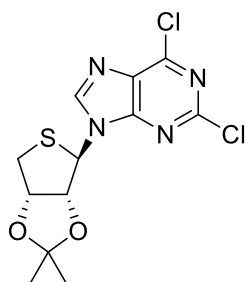
Synthese von (3a*R*,6a*S*)-2,2-Dimethyltetrahydrothieno[3,4-*d*][1,3]dioxol-4-ylacetat



Das (*R*)-1-((3a*R*,4*S*,6a*S*)-2,2-Dimethyltetrahydrothieno[3,4-*d*][1,3]dioxol-4-yl)ethane-1,2-diol (500 mg, 2.27 mmol, 1.0 Äq.) wird in Ethylacetat (10 mL) gelöst und Pb(OAc)₄ (5.2 g, 11.3 mmol, 5.0 Äq.) addiert. Nach 24 h bei RT wird die Reaktionsmischung über Celite filtriert, das Filtrat mit NaHCO₃-Lösung gewaschen und mit Ethylacetat (3 x 20 mL) extrahiert. Nach Trocknen mit MgSO₄ wird das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an SiO₂ (Cyclohexan:Ethylacetat 8:1) gereinigt. Nach zweimaliger Durchführung werden 236.6 mg, 1.08 mmol, 48% (Lit.: 60%) Produkt erhalten.

LC-MS: positiv [*m/z*] = 219.0 ([M+H]⁺). **Reinheit:** 90% (NMR).

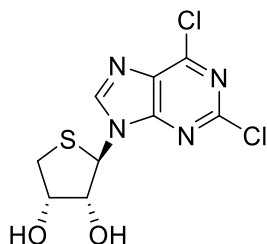
Synthese von 2,6-Dichloro-9-((3a*R*,4*R*,6a*S*)-2,2-dimethyltetrahydrothieno[3,4-*d*][1,3]dioxol-4-yl)-9*H*-purin



Das 2,6-Dichloropurin (658 mg, 3.48 mmol) wird mit (NH₄)₂SO₄ (69.0 mg, 0.52 mmol) in HMDS (4 mL) unter Schutzgas (Ar) vorgelegt und für 18 h bei 135 °C gerührt. Das Lösemittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt in Dichlorethan (3.15 mL) aufgenommen. Von der Lösung werden 1.97 mL auf 0 °C gekühlt und (3a*R*,6a*S*)-2,2-Dimethyltetrahydrothieno[3,4-*d*][1,3]dioxol-4-ylacetat (236.6 mg, 1.09 mmol, 1.0 Äq.) in Dichlorethan (2 mL) addiert. Folgend wird TMSOTf (485 mg, 2.18 mmol, 2.0 Äq.) zugetropft und die Lösung für 30 min bei 0 °C gerührt. Nach 1 h bei RT und 2 h bei 80 °C wird die Reaktionsmischung in Dichlormethan aufgenommen, mit NaHCO₃-Lösung gewaschen und mit Dichlormethan (3 x 20 mL) extrahiert. Nach Trocknen mit MgSO₄ wird das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Flash gereinigt. Das Produkt wird mit 150 mg, 0.43 mmol, 39% (Lit.: 79%) erhalten. Das entschützte Produkt wird mit 50 mg, 0.16 mmol, 15% erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.81 (s, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.26–5.20 (m, 2H), 3.73 (dd, ³*J*_{H,H} = 13.10 Hz, ³*J*_{H,H} = 3.74 Hz, 1H), 3.19 (d, ³*J*_{H,H} = 13.07 Hz, 1H), 1.49 (s, 3H), 1.29 (s, 3H). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 152.6 (C_q), 150.9 (C_q), 149.8 (C_q), 147.1 (CH), 131.1 (C_q), 110.5 (C_q), 88.8 (CH), 83.9 (CH), 69.0 (CH), 39.5 (CH₂), 26.2 (CH₃), 24.4 (CH₃). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 347.0 ([M+H]⁺). **Reinheit:** 97%.

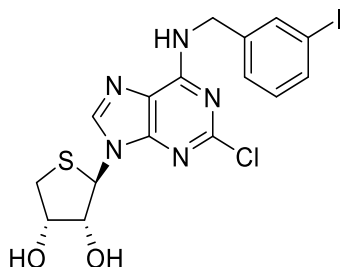
Synthese von (2*R*,3*R*,4*S*)-2-(2,6-Dichloro-9*H*-purin-9-yl)tetrahydrothiophene-3,4-diol



Das 2,6-Dichloro-9-((3*aR*,6*aS*)-2,2-dimethyltetrahydrothieno[3,4-*d*][1,3]dioxol-4-yl)-9*H*-purin (100 mg, 0.29 mmol, 1.0 Äq.) wird in THF (1 mL) gelöst und mit 2 M HCl (0.6 mL) versetzt. Nach 15 h bei RT wird das Lösemittel entfernt und das Rohprodukt mittels Flash gereinigt. Das Produkt wird mit 45 mg, 0.15 mmol, 51% (Lit.: 96%) erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 9.07 (s, 1H), 5.92 (d, ³*J*_{H,H} = 7.15 Hz, 1H), 5.63 (d, ³*J*_{H,H} = 5.86 Hz, 1H), 5.42 (d, ³*J*_{H,H} = 4.12 Hz, 1H), 4.61 (ddd, ³*J*_{H,H} = 7.22 Hz, ³*J*_{H,H} = 5.85 Hz, ³*J*_{H,H} = 3.22 Hz, 1H), 4.36 (p, ³*J*_{H,H} = 3.71 Hz, 1H), 3.45 (dd, ³*J*_{H,H} = 10.86 Hz, ³*J*_{H,H} = 4.09 Hz, 1H), 2.83 (dd, ³*J*_{H,H} = 10.87 Hz, ³*J*_{H,H} = 2.94 Hz, 1H). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 153.6 (C_q), 151.0 (C_q), 149.7 (C_q), 147.5 (CH), 130.9 (C_q), 78.9 (CH), 72.1 (CH), 62.4 (CH), 34.7 (CH₂). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 307.1 ([M+H]⁺). **Reinheit:** 97%.

Synthese von (2*R*,3*R*,4*S*)-2-(2-Chloro-6-((3-iodobenzyl)amino)-9*H*-purin-9-yl)tetrahydrothiophen-3,4-diol

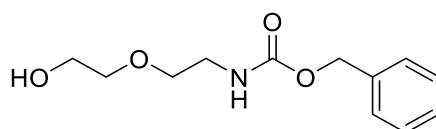


Das (2*R*,3*R*,4*S*)-2-(2,6-Dichloro-9*H*-purin-9-yl)tetrahydrothiophene-3,4-diol (20 mg, 0.0654 mmol, 1.0 Äq.) wird mit 3-Iodobenzylamin x HCl (26.2 mg, 0.098 mmol, 1.5 Äq.) in Ethanol (650 μ L) versetzt. Nach Zugabe von Triethylamin (13.15 mg, 0.13 mmol, 2.0 Äq.) wird auf 80 °C für 2 h erhitzt, das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Flash gereinigt. Das Produkt wird mit 24 mg, 0.048 mmol, 73% (Lit.: 84%) erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.88 (t, ³*J*_{H,H} = 6.09 Hz, 1H), 8.50 (s, 1H), 7.74 (t, ³*J*_{H,H} = 1.60 Hz, 1H), 7.60 (dt, ³*J*_{H,H} = 7.88 Hz, ³*J*_{H,H} = 1.32 Hz, 1H), 7.35 (d, ³*J*_{H,H} = 7.74 Hz, 1H), 7.13 (t, ³*J*_{H,H} = 7.72 Hz, 1H), 5.81 (d, ³*J*_{H,H} = 7.24 Hz, 1H), 5.55 (d, ³*J*_{H,H} = 5.91 Hz, 1H), 5.36 (d, ³*J*_{H,H} = 4.04 Hz, 1H), 4.64–4.55 (m, 3H), 4.36–4.32 (m, 1H), 3.41 (dd, ³*J*_{H,H} = 10.86 Hz, ³*J*_{H,H} = 4.14 Hz, 1H), 2.80 (dd, ³*J*_{H,H} = 10.93 Hz, ³*J*_{H,H} = 2.92 Hz, 1H). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 154.8 (C_q), 153.0 (C_q), 150.3 (C_q), 141.9 (C_q), 140.6 (CH), 136.0 (CH), 135.6 (CH), 130.5 (CH), 126.8 (CH), 118.4 (C_q), 94.7 (C_q), 78.6 (CH), 72.1 (CH), 61.5 (CH), 42.5 (CH₂), 34.4 (CH₂). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 504.0 ([M+H]⁺). **Reinheit:** 95%.

5.7 Synthese der Linker

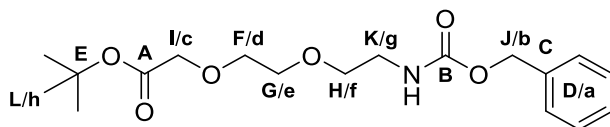
Synthese von *N*-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethyl)-2-phenylacetamid²⁹⁵



Unter Schutzgas (Ar) wird 2-(2-Aminoethoxy)ethan-1-ol (2.63 g, 25.0 mmol, 1.0 Äq.) in CH₂Cl₂ (23 mL) gelöst und Triethylamin (2.56 g, 25.0 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben. Unter Eiskühlung wird Chlorameisensäurebenzylester (4.26 g, 25.0 mmol, 1.0 Äq.) in CH₂Cl₂ (20 mL) tropfenweise addiert. Nach 18h bei RT wird die Lösung mit ges. NaHCO₃-Lsg gewaschen und die wässrige Phase mit EtOAc (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung an SiO₂ (CH: EtOAc 1:2) ergibt das Produkt mit 4.34 g, 19.4 mmol, 78% (Lit.: 97%)²⁹⁵.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.40–7.27 (m, 5H, H_{arom.}), 7.23 (t, ³*J*_{H,H} = 5.90 Hz, 1H, NH), 5.02 (s, 2H, COOCH₂), 4.54 (t, ³*J*_{H,H} = 5.51 Hz, 1H, OH), 3.48 (dt, ³*J*_{H,H} = 5.52 Hz, ³*J*_{H,H} = 5.52 Hz, 2H, CH₂OH), 3.41 (t, ³*J*_{H,H} = 5.90 Hz, 2H, NHCH₂CH₂), 3.40 (t, ³*J*_{H,H} = 5.48 Hz, 2H, CH₂CH₂OH), 3.16 (dt, ³*J*_{H,H} = 5.88 Hz, ³*J*_{H,H} = 5.88 Hz, 2H, NHCH₂). **¹³C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 156.1 (C_q, C_{Amid}), 137.2 (C_q, C_{arom.}), 128.3 (CH, C_{arom.}), 127.7 (CH, C_{arom.}), 127.7 (CH, C_{arom.}), 72.1 (CH₂, CH₂CH₂OH), 69.1 (CH₂, NHCH₂CH₂), 65.2 (CH₂, COOCH₂), 60.2 (CH₂, CH₂OH), 40.2 (CH₂, NHCH₂). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 239.9 ([M+H]⁺), 257.0 ([M+NH₄]⁺). **Reinheit:** 94%.

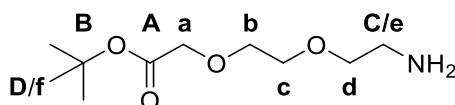
Synthese von *N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetat-*tert*-butylester²⁹⁵



Unter Schutzgas (Ar) wird *N*-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethyl)-2-phenylacetamid (2g, 8.36 mmol, 1.0 Äq.) in THF (32 mL) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Folgend wird Natrium-*tert*-butanolat (1 M in THF, 938 mg, 8.36 mmol, 1.0 Äq.) zugetropft und für 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wird *t*-Butyl-2-bromoacetat (1.8 g, 9.19 mmol, 1.1 Äq.) zugetropft und für 24 h bei RT gerührt. Die Reaktion wird durch Wasserzugabe beendet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird in Ethylacetat aufgenommen und die wässrige Phase mit Ethylacetat (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an SiO₂ (CH:EE 5:1 → 2:1) wird das Produkt mit 1.43 g, 4 mmol und 48% (Lit.: 63%)²⁹⁵ erhalten.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.38–7.28 (m, 5H, a), 5.10 (s, 2H, b), 5.38 (bs, 1H, NH), 3.99 (s, 2H, c), 3.70–3.66 (m, 2H, d), 3.66–3.63 (m, 2H, e), 3.61–3.55 (m, 2H, f), 3.43–3.38 (m, 2H, g), 1.46 (s, 9H, h). ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 169.7 (C_q, A), 156.6 (C_q, B), 136.8 (C_q, C), 128.6 (CH, D), 128.2 (CH, D), 128.2 (CH, D), 81.9 (C_q, E), 70.9 (CH₂, F), 70.4 (CH₂, G), 70.3 (CH₂, H), 69.1 (CH₂, I), 66.8 (CH₂, J), 41.0 (CH₂, K), 28.2 (CH₃, L). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 354.2 ([M+H]⁺), 257.0 ([M+NH₄]⁺). **Reinheit:** 94%.

Synthese von *tert*-Butyl-2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetat



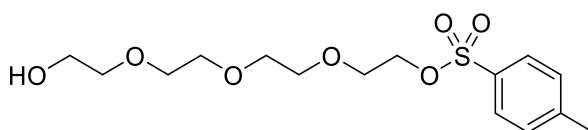
Unter Schutzgas (Ar) wird *N*-(Benzyloxycarbonyl)-2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetat-*tert*-butylester (200 mg, 0.56 mmol, 1.0 Äq.) in Methanol (2.0 mL) gelöst und 10% Pd/C (20 mg) addiert. Die Atmosphäre wird von Ar auf H₂ getauscht und für 8 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wird über Celite filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wird mit 122.0 mg, 0.55 mmol, 100% (Lit.: ²⁹⁵95%) erhalten.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 3.98 (s, 2H, a), 3.59–3.55 (m, 2H, b), 3.53–3.49 (m, 2H, c), 3.37–3.34 (m, 2H, d), 2.66–2.62 (m, 2H, e), 1.42 (s, 9H, f). ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 169.4 (C_q, A), 80.6 (C_q, B), 73.0 (CH₂), 69.9 (CH₂), 69.5 (CH₂), 68.1 (CH₂), 41.3 (CH₂, C), 27.7 (CH₃, D). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 220.2 ([M+H]⁺) **Reinheit:** nicht bestimmbar.

5.7.1 Synthese der Sulfonate

Unter Schutzgas (Ar) wird das Glycol (1.0 Äq.) in Dichlormethan (0.1 M) gelöst und Tosylchlorid (1.0 Äq.), Ag₂O (1.2 Äq.) und KI (0.1 Äq.) addiert. Nach 20 h bei RT wird die Reaktionslösung über Celite filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an SiO₂ (Dichlormethan:Methanol XX:XX) wird das Produkt erhalten.

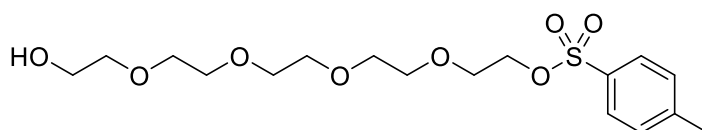
Synthese von 2-(2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-4-methylbenzenesulfonat



Tetraethylenglycol (10.0 g, 51.5 mmol, 1.0 Äq.); Dichlormethan:Methanol 95:5; Ausbeute: 10.6 g, 30.4 mmol, 59%.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.81–7.76 (m, 2H, H_{Tos}), 7.50–7.47 (m, 2H, H_{Tos}), 4.54 (t, ³J_{H,H} = 5.51 Hz, 1H, OH), 4.14–4.09 (m, 2H, SOCH₂), 3.60–3.55 (m, 2H, HOCH₂), 3.52–3.46 (m, 6H, 3x CH₂), 3.45 (s, 4H, 2x CH₂), 3.41 (t, ³J_{H,H} = 5.27 Hz, 2H, CH₂), 2.42 (s, 3H, H_{Tos}). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 144.9 (C_q, C_{Tos}), 132.4 (C_q, C_{Tos}), 130.1 (2x CH, CH_{Tos}), 127.6 (2x CH, CH_{Tos}), 72.3 (CH₂), 70.0 (CH₂), 69.8 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.6 (CH₂), 67.9 (CH₂), 60.2 (CH₂, HOCH₂), 21.1 (CH₃, CH_{3Tos}). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 348.9 ([M+H]⁺), 366.0 ([M+NH₄]⁺). **Reinheit:** 98%.

Synthese von 14-Hydroxy-3,6,9,12-tetraoxatetradecyl-4-methylbenzenesulfonat



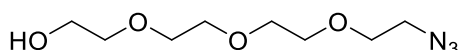
Pentaethylenglycol (200 mg, 0.84 mmol, 1.0 Äq.); Dichlormethan:Methanol 95:5; Ausbeute: 283 mg, 0.72 mmol, 86%.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.81–7.76 (m, 2H, H_{Tos}), 7.51–7.46 (m, 2H, H_{Tos}), 4.54 (t, ³J_{H,H} = 5.50 Hz, 1H, OH), 4.13–4.09 (m, 2H, SOCH₂), 3.60–3.55 (m, 2H, HOCH₂), 3.52–3.38 (m, 16H, 8x CH₂), 2.42 (s, 3H, H_{Tos}). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 144.9 (C_q, C_{Tos}), 132.4 (C_q, C_{Tos}), 130.1 (2x CH, CH_{Tos}), 127.6 (2x CH, CH_{Tos}), 72.3 (CH₂), 70.0 (CH₂), 69.8 (CH₂), 69.8 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.7 (2x CH₂), 69.6 (CH₂), 67.9 (CH₂), 60.2 (CH₂, HOCH₂), 21.1 (CH₃, CH_{3Tos}). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 392.9 ([M+H]⁺), 410.1 ([M+NH₄]⁺). **Reinheit:** 99%.

5.7.2 Synthese der Azide

Unter Schutzgas (Ar) wird das Sulfonat (1.0 Äq.) in Dimethylformamid (0.5 M) gelöst und NaN_3 (1.1 Äq.) addiert. Nach 20 h bei 140 °C wird das Lösemittel verdampft und der Rückstand mit Dichlormethan (4x 50 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an SiO_2 (Dichlormethan:Methanol XX:XX) wird das Produkt erhalten.

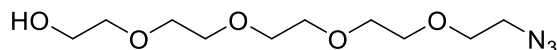
Synthese von 2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethanol



2-(2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-4-methylbenzenesulfonat (9 g, 25.9 mmol, 1.0 Äq.); Dichlormethan:Methanol 95:5; 4.34 g, 19.8 mmol, 77%.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm] = 4.55 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.37$ Hz, 1H, OH), 3.62–3.45 (m, 12H, 6x CH_2), 3.44–3.36 (m, 4H, 2x CH_2). **$^{13}\text{C-NMR}$** (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm] = 72.3 (CH_2), 69.8 (CH_2), 69.8 (CH_2), 69.7 (CH_2), 69.7 (CH_2), 69.2 (CH_2), 60.2 (CH_2 , HOCH_2), 50.0 (CH_2 , N_3CH_2). **LC-MS:** positiv [m/z] = 220.0 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). **Reinheit:** mittels NMR 95%.

Synthese von 14-Azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecan-1-ol



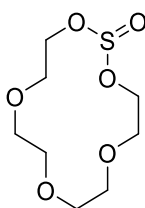
14-Hydroxy-3,6,9,12-tetraoxatetradecyl-4-methylbenzenesulfonat (2 g, 5.1 mmol, 1.0 Äq.); Dichlormethan:Methanol 95:5; Ausbeute: 1.16 g, 4.4 mmol, 86%.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm] = 4.53 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.39$ Hz, 1H, OH), 3.63–3.45 (m, 16H, 8x CH_2), 3.45–3.36 (m, 4H, 2x CH_2). **$^{13}\text{C-NMR}$** (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm] = 72.3 (CH_2), 69.8 (CH_2), 69.8 (CH_2), 69.8 (CH_2), 69.7 (CH_2), 69.7 (CH_2), 69.7 (CH_2), 69.2 (CH_2), 60.2 (CH_2 , HOCH_2), 50.0 (CH_2 , N_3CH_2). **LC-MS:** positiv [m/z] = 264.0 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). **Reinheit:** mittels NMR 95%.

5.7.3 Synthese der Sulfite²⁷⁷

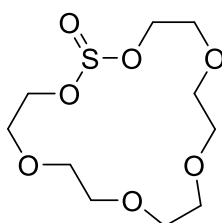
Unter Schutzgas (Ar) wird das Glycol (1.0 Äq.) in Dichlormethan (0.035 M) gelöst und Diisopropylamin (4.8 Äq.) und DMAP (0.05 Äq.) addiert. Die Reaktionslösung wird auf 0 °C gekühlt und Thionylchlorid (2.0 Äq.) in Dichlormethan (0.42 M) über 1 h hinzugegeben. Nach 1 h bei 0 °C wird mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen und mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung an SiO_2 (XX) ergibt das Produkt.

Synthese von 1,3,6,9,12-Pentaoxa-2-thiacyclotetradecan 2-oxid



Tetraethylenglycol (1.01 g, 5.15 mmol, 1.0 Äq.); Cyclohexan:Ethylacetat 1:1; Ausbeute: 746 mg, 3.31 mmol, 64% (Lit.: 84%)²⁷⁷.

Synthese von 1,3,6,9,12,15-Hexaoxa-2-thiacycloheptadecan-2-oxid



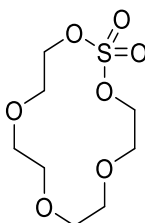
Pentaethylenglycol (1 g, 4.2 mmol, 1.0 Äq.)

LC-MS: positiv [m/z] = 284.9 ($[M+H]^+$), 302.0 ($[M+NH_4]^+$). **Reinheit:** nicht bestimmbar.

5.7.4 Synthese der Sulfate²⁷⁷

Das Sulfit (1.0 Äq) wird in Acetonitril/Tetrachlorkohlenstoff/Wasser (2/2/3, 0.1 m, 0.1 m, 0.07 m) gelöst und bei 0 °C Natriumperodat (1.2 Äq.) und $RuCl_3 \cdot x H_2O$ (0.005 Äq.) addiert. Nach 1 h bei RT wird solange Natriumperodat hinzugegeben, bis kein Startmaterial mehr vorhanden ist. Die wässrige Phase wird abgetrennt und mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung an SiO_2 (XX) ergibt das Produkt.

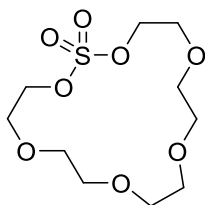
Synthese von 1,3,6,9,12-Pentaoxa-2-thiacyclotetradecan 2-oxid



1,3,6,9,12-Pentaoxa-2-thiacyclotetradecan 2-oxid (746 g, 3.31 mmol, 1.0 Äq.); Cyclohexan/Ethylacetat 1:1; Ausbeute 739 mg, 2.9 mmol, 87% (Lit.: 87%)²⁷⁷.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 4.50–4.45 (m, 4H, 2x SOCH₂), 3.87–3.82 (m, 4H, 2x CH₂), 3.71–3.66 (m, 4H, 2x CH₂), 3.68–3.63 (m, 4H, 2x CH₂). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 72.3 (2x CH₂), 70.9 (2x CH₂), 70.8 (2x CH₂), 68.6 (2x CH₂). **LC-MS**: positiv [*m/z*] = 256.9 ([M+H]⁺, 274.0 [M+NH₄]⁺). **Reinheit**: aus NMR >90%.

Synthese von 1,3,6,9,12,15-Hexaoxa-2-thiacycloheptadecan-2,2-dioxid



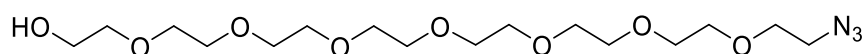
1,3,6,9,12,15-Hexaoxa-2-thiacycloheptadecan-2-oxid (2.8 g, 9.9 mmol, 1.0 Äq.); Ethylacetat.

LC-MS: positiv [*m/z*] = 300.9 ([M+H]⁺, 317.8 [M+NH₄]⁺). **Reinheit**: nicht bestimmbar.

5.7.5 Synthese der Verlängerungsprodukte^{277, 278}

Unter Schutzgas (Ar) wird das Azid (1.0 Äq.) und NaH (1.2 Äq.) in THF (0.075 M) gelöst und für 20 min bei 0 °C gerührt. Folgend wird das zyklische Sulfat (1.2 Äq.) in THF (0.4 M) addiert und für 24 h bei RT gerührt. Nach DC-Kontrolle wird Wasser und konz H₂SO₄ addiert und bis zum vollständigen Umsatz refluxiert. Die Reaktionslösung wird mit ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen und mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an SiO₂ (Dichlormethan:Methanol XX:XX) wird das Produkt erhalten.

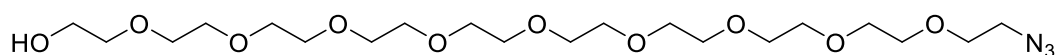
Synthese von 23-Azido-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosan-1-ol



2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethan-1-ol (500 mg, 2.3 mmol, 1.0 Äq.); Dichlormethan:Methanol 95:5; Ausbeute: 791 mg, 2.0 mmol, 87% (Lit.: 88%)²⁷⁸.

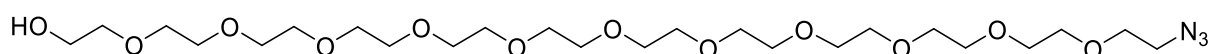
¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 4.55 (t, ³J_{H,H} = 5.45 Hz, 1H, OH), 3.61–3.59 (m, 2H, CH₂), 3.57–3.46 (m, 26H, 13 x CH₂), 3.42–3.40 (m, 2H, CH₂), 3.40–3.38 (m, 2H, CH₂). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 72.5 (CH₂), 70.0 (CH₂), 70.0 (CH₂), 69.9 (8 x CH₂), 69.9 (CH₂), 69.9 (CH₂), 69.4 (CH₂), 60.4 (CH₂), 50.2 (CH₂). **LC-MS**: positiv [*m/z*] = 396.0 ([M+H]⁺, 413.0 ([M+NH₄]⁺). **Reinheit**: mittels NMR >95%.

Synthese von 29-Azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxanonacosan-1-ol



¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 4.54 (t, ³J_{H,H} = 5.30 Hz, 1H, OH), 3.60 (t, ³J_{H,H} = 5.00 Hz, 2H, N₃CH₂CH₂), 3.57–3.46 (m, 34H, 17x CH₂), 3.41 (t, ³J_{H,H} = 5.30 Hz, 2H, HOCH₂), 3.39 (t, ³J_{H,H} = 5.00 Hz, 2H, N₃CH₂). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 72.3 (CH₂), 69.8 (2x CH₂), 69.8 (13x CH₂), 69.7 (CH₂), 69.2 (CH₂), 60.2 (HOCH₂), 50.0 (N₃CH₂). **LC-MS**: positiv [m/z] = 484.4 ([M+H]⁺), 501.3 ([M+NH₄]⁺). **Reinheit**: mittels NMR 96%.

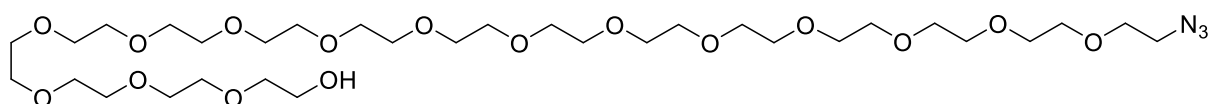
Synthese von 35-Azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-undecaoxapentatriacontan-1-ol



23-Azido-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosan-1-ol (591 mg, 1.5 mmol, 1.0 Äq.); Dichlormethan:Methanol 92:8; Ausbeute: 694 mg, 1.2 mmol, 81% (Lit.: 81%)²⁷⁸.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 4.54 (t, ³J_{H,H} = 5.46 Hz, 1H, OH), 3.62–3.58 (m, 2H, CH₂), 3.58–3.46 (m, 42H, 21 x CH₂), 3.43–3.34 (m, 4H, 2 x CH₂). **¹³C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 72.3 (CH₂), 69.8 (2 x CH₂), 69.8 (17 x CH₂), 69.7 (CH₂), 69.2 (CH₂), 60.2 (CH₂), 50.0 (CH₂). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₂₄H₄₉N₃O₁₂ [M+H]⁺: 572.3389; gefunden: 572.3389. **Reinheit**: mittels NMR >95%.

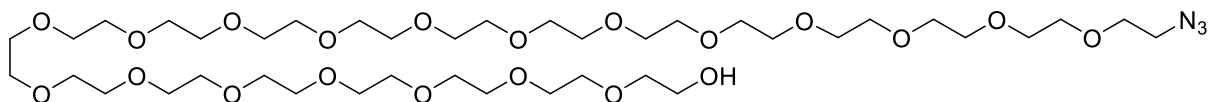
Synthese von 47-Azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45-pentadecaohaheptatetracontan-1-ol



35-azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-undecaoxapentatriacontan-1-ol (494 mg, 0.86 mmol, 1.0 Äq.); Dichlormethan:Methanol 92:8; Ausbeute: 529 mg, 0.71 mmol, 82% (Lit.: 83%)²⁷⁸.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 4.53 (t, ³J_{H,H} = 5.49 Hz, 1H, OH), 3.63–3.57 (m, 2H, CH₂), 3.57–3.45 (m, 58H, 29 x CH₂), 3.45–3.33 (m, 4H, 2 x CH₂). **¹³C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 72.3 (CH₂), 69.8 (2 x CH₂), 69.8 (24 x CH₂), 69.7 (CH₂), 69.2 (CH₂), 60.2 (CH₂), 50.0 (CH₂), 39.5 (CH₂). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₃₂H₆₅N₃O₁₆ [M+H]⁺: 748.4438; gefunden: 748.4426. **Reinheit**: mittels NMR >95%.

Synthese von 59-Azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57-nonadecaoxanonapentacontan-1-ol



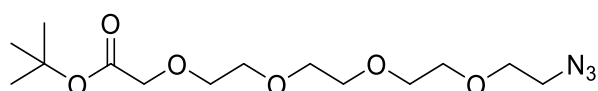
47-Azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45-pentadecaoxaheptatetracontan-1-ol (279 mg, 0.37 mmol, 1.0 Äq.), Dichlormethan:Methanol 95:5; Ausbeute: 273 mg, 0.30 mmol, 80% (Lit.: 87%)²⁷⁸.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 4.55 (t, ³J_{H,H} = 5.49 Hz, 1H, OH) 3.60 (m, 2H, CH₂), 3.57–3.46 (m, 74H, 37 x CH₂), 3.43–3.37 (m, 4H, 2 x CH₂). ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 72.3 (CH₂), 69.8 (CH₂), 69.8 (CH₂), 69.8 (CH₂), 69.7 (33 x CH₂), 69.2 (CH₂), 60.2 (CH₂), 50.0 (CH₂). HRMS (ESI-QTOF) berechnet für C₄₀H₈₁N₃O₂₀ [M+NH₄]⁺: 941.5752; gefunden: 941.5742. **Reinheit:** mittels NMR >95%.

5.7.6 Synthese der Ester²⁷⁸

Unter Schutzgas (Ar) wird das Azid (1.0 Äq.) in Tetrahydrofuran (1 M) und bei 0 °C NaH (1.5 Äq.) addiert. Nach 20 min wird *tert*-Butylbromoacetat (2.0 Äq.) zugetropft. Nach 18 h bei RT wird die Reaktionslösung mit Wasser versetzt und mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung an SiO₂ (Dichlormethan:Methanol XX:XX) ergibt das Produkt.

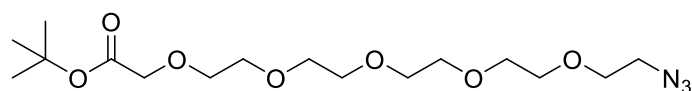
Synthese von *tert*-Butyl-14-azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoat



2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethan-1-ol (1.0 g, 4.6 mmol, 1.0 Äq.); Dichlormethan:Methanol 95:5; Ausbeute: 760 mg, 2.3 mmol, 50% (Lit.: 53%)²⁷⁸.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 3.98 (s, 2H, COOCH₂), 3.63–3.50 (m, 14H, 7x CH₂), 3.40–3.37 (m, 2H, N₃CH₂), 1.42 (s, 9H, 3x CH₃). ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 169.3 (C_q, CO), 80.6 (C_q, C-*t*-Butyl), 69.8 (CH₂), 69.8 (CH₂), 69.8 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.2 (CH₂), 68.1 (CH₂), 50.0 (CH₂, N₃CH₂), 27.8 (CH₃, 3x CH₃). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 351.0 ([M+NH₄]⁺). **Reinheit:** mittels NMR 96%.

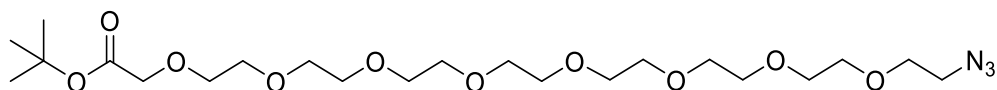
Synthese von *tert*-Butyl-17-azido-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecanoat



14-Azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecan-1-ol (436 mg, 1.66 mmol, 1.0 Äq.);
Dichlormethan:Methanol 95:5; Ausbeute: 359 mg, 0.95 mmol, 57%.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 3.98 (s, 2H, COOCH₂), 3.62–3.49 (m, 18H, 9x CH₂), 3.40–3.37 (m, 2H, CH₂), 1.42 (s, 9H, 3 x CH₃). **¹³C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 169.3 (C_q, CO), 80.6 (C_q, C-*t*-Butyl), 69.8 (CH₂), 69.8 (CH₂), 69.8 (CH₂), 69.7 (2x CH₂), 69.7 (CH₂), 69.7 (2x CH₂), 69.2 (CH₂), 68.1 (CH₂), 50.0 (CH₂, N₃CH₂), 27.7 (CH₃, 3x CH₃). **LC-MS**: positiv [*m/z*] = 395.1 ([M+NH₄]⁺). **Reinheit**: mittels NMR 96%.

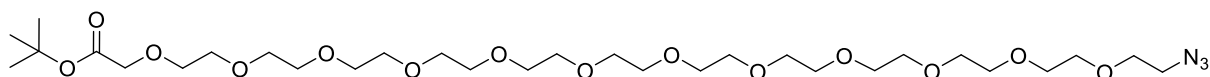
Synthese von *tert*-Butyl-26-azido-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxahexacosanoat



23-Azido-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosan-1-ol (200 mg, 0.51 mmol, 1.0 Äq.),
Dichlormethan:Methanol 95:5; Ausbeute: 170 mg, 0.33 mmol, 65% (Lit.: 64%)²⁷⁸.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 3.98 (s, 2H, CO₂CH₂), 3.62–3.50 (m, 30H, 15 x CH₂), 3.41–3.37 (m, 2H, CH₂), 1.42 (s, 9H, 3 x CH₃). **¹³C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 169.5 (C_q, C_{Carbonyl}), 80.8 (C_q, C(CH₃)₃), 70.0 (CH₂), 70.0 (CH₂), 69.9 (9 x CH₂), 69.9 (CH₂), 69.8 (2 x CH₂), 69.4 (CH₂), 68.3 (CH₂), 50.2 (CH₂), 27.9 (3 x CH₃, C(CH₃)₃). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₂₂H₄₃N₃O₁₀ [M+NH₄]⁺: 527.3287; gefunden: 527.3267. **Reinheit**: mittels NMR >95%.

Synthese von *tert*-Butyl-38-azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36-dodecaoxaoctatriacontanoat

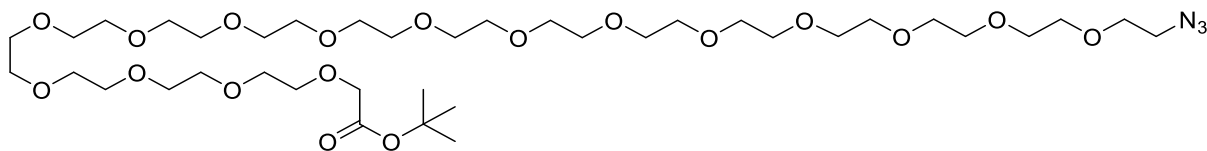


35-Azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-undecaoxapentatriacontan-1-ol (200 mg, 0.35 mmol, 1.0 Äq.); Dichlormethan:Methanol 96:4; Ausbeute: 141 mg, 0.21 mmol, 59% (Lit.: 67%)²⁷⁸.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 3.98 (s, 2H, CO₂CH₂), 3.62–3.58 (m, 2H, CH₂), 3.58–3.54 (m, 4H, 2 x CH₂), 3.54–3.49 (m, 40H, 20 x CH₂), 3.40–3.37 (m, 2 x CH₂), 1.42 (s, 9H, 3 x CH₃). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 169.3 (C_q, C_{Carbonyl}), 80.6 (C_q, C(CH₃)₃), 69.8 (CH₂), 69.8 (CH₂), 69.8 (17 x CH₂), 69.7 (CH₂), 69.7 (2 x CH₂), 69.2 (CH₂), 68.1 (CH₂), 50.0

(CH₂), 27.7 (3 x CH₃, C(CH₃)₃). **LC-MS**: positiv [*m/z*] = 703.1 ([M+NH₄]⁺). **Reinheit**: mittels NMR 95%.

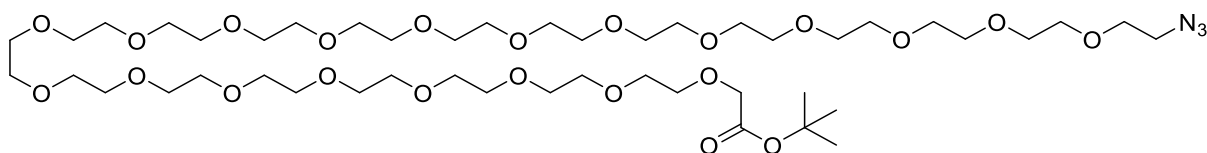
Synthese von *tert*-Butyl-50-azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48-hexadecaoxapentacontanoat



47-Azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45-pentadecaoxaheptatetracontan-1-ol (250 mg, 0.33 mmol, 1.0 Äq.); Dichlormethan:Methanol 95:5; Ausbeute: 96 mg, 0.11 mmol, 34% (Lit.: 65%)²⁷⁸.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 3.98 (s, 2H, CO₂CH₂), 3.61–3.59 (m, 2H, CH₂), 3.58–3.54 (m, 4H, 2 x CH₂), 3.55–3.49 (m, 56H, 28 x CH₂), 3.40–3.37 (m, 2H, 2 x CH₂), 1.42 (s, 9H, 3 x CH₃). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 169.3 (C_q, C_{Carbonyl}), 80.6 (C_q, C(CH₃)₃), 69.8 (CH₂), 69.8 (CH₂), 69.8 (25 x CH₂), 69.7 (CH₂), 69.7 (2 x CH₂), 69.2 (CH₂), 68.1 (CH₂), 50.0 (CH₂), 27.7 (3 x CH₃, C(CH₃)₃). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₃₈H₇₅N₃O₁₈ [M+NH₄]⁺: 879.5384; gefunden: 879.5390. **Reinheit**: mittels NMR 95%.

Synthese von *tert*-Butyl-62-azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60-icosaoxadohexacontanoat



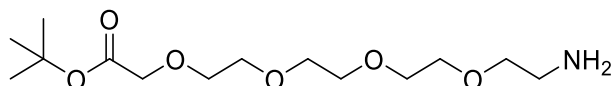
59-Azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57-nonadecaoxanonapentacontan-1-ol (273 mg, 0.3 mmol, 1.0 Äq.); Dichlormethan:Methanol 95:5; Ausbeute: 212 mg, 0.20 mmol, 68%.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 3.97 (s, 2H, CO₂CH₂), 3.61–3.58 (m, 2H, CH₂), 3.58–3.54 (m, 4H, 2 x CH₂), 3.54–3.49 (m, 72 H, 36 x CH₂), 3.40–3.37 (m, 2H, CH₂), 1.42 (s, 9H, 3 x CH₃). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 169.4 (C_q, C_{Carbonyl}), 80.6 (C_q, C(CH₃)₃), 69.9 (CH₂), 69.8 (CH₂), 69.8 (33 x CH₂), 69.7 (CH₂), 69.7 (2 x CH₂), 69.2 (CH₂), 68.1 (CH₂), 50.0 (CH₂), 27.8 (3 x CH₃, C(CH₃)₃). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₄₆H₉₁N₃O₂₂ [M+NH₄]⁺: 1055.6432; gefunden: 1055.6221. **Reinheit**: mittels NMR 95%.

5.7.7 Synthese der Amine (Methode A)

Unter Schutzgas (Ar) wird der Ester (1.0 Äq.) in Dichlormethan (1 mL/100 mg Edukt) gelöst und 10% Pd/C (10 mg/100 mg Edukt) addiert. Die Atmosphäre wird von Ar auf H₂ getauscht und für 8 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wird über Celite filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung an SiO₂ (7 N NH₃ in Methanol:Dichlormethan XX:XX) ergibt das Produkt.

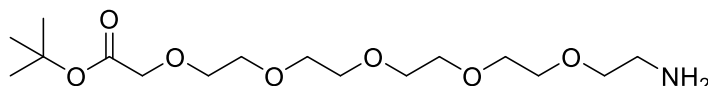
Synthese von *tert*-Butyl-14-amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoat



tert-Butyl-14-amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoat (400 mg, 1.2 mmol, 1.0 Äq.); 7 N NH₃ in Methanol:Dichlormethan 5:95; Ausbeute: 240 mg, 0.78 mmol, 71%.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 3.98 (s, 2H, CO₂CH₂), 3.58–3.55 (m, 2H, CH₂), 3.55–3.47 (m, 12H, 6 x CH₂), 3.36–3.33 (t, ³J_{H,H} = 5.85 Hz, 2H, CH₂), 2.63 (t, ³J_{H,H} = 5.83 Hz, 2H, NH₂), 1.42 (s, 9H, 3 x CH₃). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 169.4 (C_q, C_{Carbonyl}), 80.7 (C_q, C(CH₃)₃), 73.0 (CH₂), 69.9 (CH₂), 69.8 (CH₂), 69.8 (CH₂), 69.8 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.6 (CH₂), 68.1 (CH₂), 41.3 (CH₂), 27.8 (3 x CH₃, C(CH₃)₃). **LC-MS**: positiv [*m/z*] = 308.1 ([M+H]⁺). **Reinheit**: mittels NMR 95%.

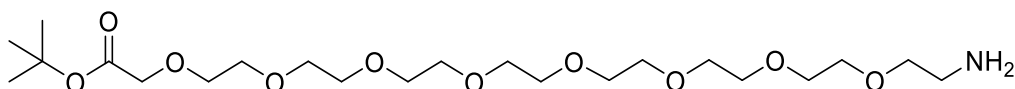
Synthese von *tert*-Butyl-17-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecanoat



tert-Butyl-17-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecanoat (100 mg, 0.26 mmol, 1.0 Äq.). Keine Reinigung, da bis zu dem Zeitpunkt noch keine Methode gefunden wurde.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 3.98 (s, 2H, COOCH₂), 3.58–3.48 (m, 18H, 9x CH₂), 3.37–3.33 (m, 2H, CH₂), 2.64 (t, ³J_{H,H} = 5.82 Hz, NH₂) 1.42 (s, 9H, 3x CH₃). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 169.3 (C_q, CO), 80.6 (C_q, C_{*t*-Butyl}), 73.0 (CH₂, CO₂CH₂O), 69.8 (CH₂), 69.8 (CH₂), 69.8 (CH₂), 69.8 (CH₂), 69.8 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.6 (CH₂), 68.1 (CH₂) 41.3 (CH₂, NH₂CH₂), 27.8 (CH₃, 3x CH₃). **LC-MS**: positiv [*m/z*] = 351.8 ([M+H]⁺). **Reinheit**: aus NMR >90%.

Synthese von *tert*-Butyl-26-amino-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacosanoat



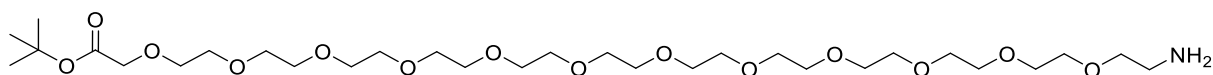
tert-Butyl-26-amino-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacosanoat (170 mg, 0.33 mmol, 1.0 Äq.); 7 N NH₃ in Methanol:Dichlormethan 5:95; Ausbeute: 90.8 mg, 0.19 mmol, 57%.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 3.98 (s, 2H, CO₂CH₂), 3.59–3.54 (m, 2H, CH₂), 3.55–3.46 (m, 28H, 14 x CH₂), 3.35 (t, ³J_{H,H} = 5.81 Hz, 2H, CH₂), 2.64 (t, ³J_{H,H} = 5.79 Hz, 2H, NH₂), 1.42 (s, 9H, 3 x CH₃). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 169.3 (C_q, C_{Carbonyl}), 80.6 (C_q, C(CH₃)₃), 73.0 (CH₂), 69.8 (CH₂), 69.8 (CH₂), 69.8 (9 x CH₂), 69.7 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.6 (CH₂), 68.1 (CH₂), 41.3 (CH₂), 27.7 (3 x CH₃, C(CH₃)₃). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₂₂H₄₅NO₁₀ [M+H]⁺: 484.3116; gefunden: 484.3106. **Reinheit**: mittels NMR 95%.

5.7.8 Synthese der Amine (Methode B)²⁷⁸

Unter Schutzgas (Ar) wird der Ester (1.0 Äq.) in Tetrahydrofuran (0.04 M) gelöst und Triphenylphosphan (2.0 Äq.) addiert. Nach 24 h bei RT wird Wasser (5.0 Äq.) dazugegeben und für 3 h bei RT gerührt. Folgend wird das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels säulenchromatographischer Reinigung an SiO₂ (7 N NH₃ in MeOH:Dichlormethan XX:XX) gereinigt.

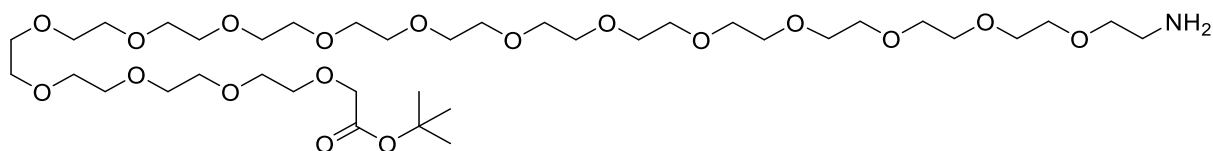
Synthese von *tert*-Butyl-38-amino-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36-dodecaoxaoctriacontanoat



tert-Butyl-38-amino-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36-dodecaoxaoctriacontanoat (313 mg, 0.19 mmol, 1.0 Äq.); 7 N NH₃ in Methanol:Dichlormethan 7:93; Ausbeute: 109.1 mg, 0.17 mmol, 87%.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 3.97 (s, 2H, CO₂CH₂), 3.58–3.55 (m, 2H, CH₂), 3.54–3.48 (m, 44H, 22 x CH₂), 3.35 (t, ³J_{H,H} = 5.80 Hz, 2H, CH₂), 2.64 (t, ³J_{H,H} = 5.77 Hz, 2H, NH₂), 1.42 (s, 9H, 3 x CH₃). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 169.4 (C_q, C_{Carbonyl}), 80.7 (C_q, C(CH₃)₃), 72.9 (CH₂), 69.9 (CH₂), 69.8 (2 x CH₂), 69.8 (16 x CH₂), 69.8 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.6 (CH₂), 68.1 (CH₂), 41.3 (CH₂), 27.8 (3 x CH₃, C(CH₃)₃). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₃₀H₆₁NO₁₄ [M+H]⁺: 660,4165; gefunden: 660,4129. **Reinheit**: mittels NMR 93%.

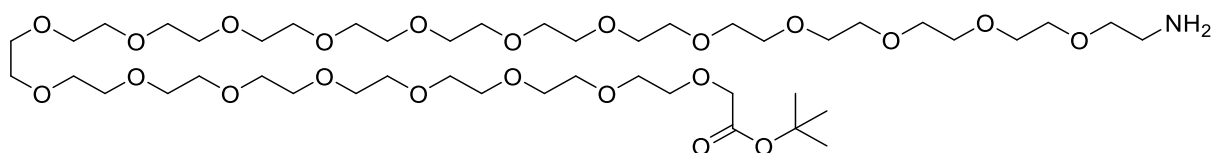
Synthese von *tert*-Butyl-50-amino-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48-hexadecaoxapentacontanoat



tert-Butyl-50-amino-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48-hexadecaoxapentacontanoat (89.1 mg, 0.103 mmol, 1.0 Äq.); 7 N NH₃ in Methanol:Dichlormethan 10:90; Ausbeute: 77.7 mg, 0.093 mmol, 90%.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 3.98 (s, 2H, CH₂), 3.58–3.55 (m, 2H, CH₂), 3.54–3.48 (m, 60H, 30 x CH₂), 3.36 (t, ³*J*_{H,H} = 5.80 Hz, 2H, CH₂), 2.65 (t, ³*J*_{H,H} = 5.77 Hz, 2H, NH₂), 1.42 (s, 9H, 3 x CH₃). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 169.3 (C_q, C_{Carbonyl}), 80.6 (C_q, C(CH₃)₃), 72.9 (CH₂), 69.8 (CH₂), 69.8 (26 x CH₂), 69.7 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.6 (CH₂), 68.1 (CH₂), 41.3 (CH₂), 27.7 (3 x CH₃, C(CH₃)₃). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₃₈H₇₇NO₁₈ [M+H]⁺: 836.5213; gefunden: 836.5193. **Reinheit**: mittels NMR 95%.

Synthese von ***tert*-Butyl-62-amino-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60-icosaoxadohexacontanoat**

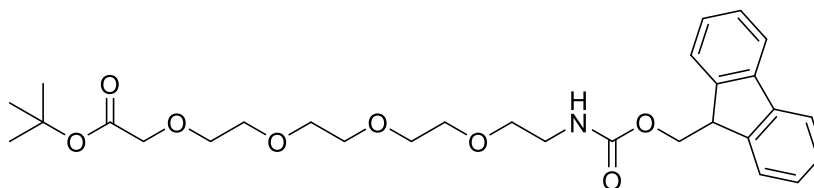


tert-Butyl-62-azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60-icosaoxadohexacontanoat (200 mg, 0.19 mmol, 1.0 Äq.); 7 N NH₃ in Methanol:Dichlormethan 8:92; Ausbeute: 140.2 mg, 0.14 mmol, 71%.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 3.98 (s, 2H, CH₂), 3.58–3.55 (m, 2H, CH₂), 3.55–3.48 (m, 76H, 38 x CH₂), 3.36 (t, ³*J*_{H,H} = 5.79 Hz, 2H, CH₂), 2.65 (t, ³*J*_{H,H} = 5.79 Hz, 2H, NH₂), 1.42 (s, 9H, 3 x CH₃). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 169.3 (C_q, C_{Carbonyl}), 80.6 (C_q, C(CH₃)₃), 72.9 (CH₂), 69.8 (CH₂), 69.8 (2 x CH₂), 69.8 (32 x CH₂), 69.7 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.6 (CH₂), 68.1 (CH₂), 41.3 (CH₂), 27.7 (3 x CH₃, C(CH₃)₃). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₄₆H₉₃NO₂₂ [M+H]⁺: 1012.6262; gefunden: 1012.6239. **Reinheit**: mittels NMR 93%.

5.7.9 Synthese der Fmoc-geschützten Amine²⁷⁸

Das Amin (1.0 Äq) wird in THF (0.1 M) gelöst und Fmoc-Cl (1.5 Äq.) sowie gesättigte NaHCO₃-Lösung (2.0 Äq, 1.2 M in H₂O) bei 0 °C addiert. Nach 4 h bei RT wird gesättigte NaCl-Lösung addiert und mit EtOAc dreimal extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an SiO₂ (Dichlormethan:Methanol XX:XX) wird das Produkt erhalten.

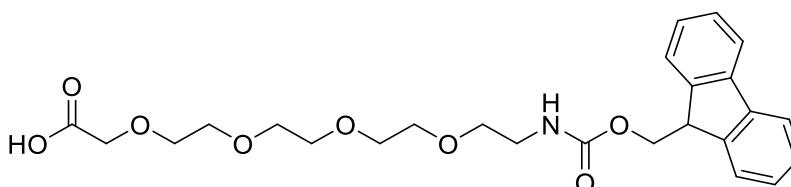
***tert*-Butyl 1-(9*H*-fluoren-9-yl)-3-oxo-2,7,10,13,16-pentaoxa-4-azaoctadecan-18-oat**

tert-Butyl-14-amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoat (20 mg, 0.065 mmol, 1.0 Äq.); Fmoc-Cl (25 mg, 0.097 mmol, 1.5 Äq.); NaHCO₃ (11 mg in 0.112 mL, 0.13 mmol, 2.0 Äq.); Dichlormethan:Methanol 96:4; Ausbeute: 31.5 mg, 0.059 mmol, 91% (Lit.: 70%)²⁷⁸.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.78–7.74 (m, 2H, H_{arom.}), 7.63–6.58 (m, 2H, H_{arom.}), 7.41–7.37 (m, 2H, H_{arom.}), 7.33–7.29 (m, 2H, H_{arom.}), 4.40 (d, ³J_{H,H} = 6.93 Hz, 2H, CHCH₂), 4.22 (t, ³J_{H,H} = 6.93 Hz, 1H, CHCH₂), 3.99 (s, 2H, COOCH₂), 3.71–3.60 (m, 12H, 6x CH₂), 3.60–3.52 (m, 2H, CH₂), 3.43–3.43 (m, 2H, CH₂), 1.42 (s, 9H, 3x CH₃). ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 169.3 (C_q, C_{Ester}), 156.7 (C_q, C_{Carbamat}), 144.2 (2 x C_q, C_{arom.}), 141.4 (2 x C_q, C_{arom.}), 127.8 (2 x CH, C_{arom.}), 127.2 (2 x CH, C_{arom.}), 125.2 (2 x CH, C_{arom.}), 120.1 (2 x CH, C_{arom.}), 81.7 (C_q, C-*t*-Butyl), 70.8 (CH₂), 70.7 (CH₂), 70.7 (3 x CH₂), 70.5 (CH₂), 70.2 (CH₂), 69.1 (CH₂), 66.7 (CH₂), 47.4 (CH, CHCH₂), 41.1 (CH₂, NHCH₂), 28.2 (CH₃, 3x CH₃). LC-MS: positiv [*m/z*] = 530.5 ([M+H]⁺). Reinheit: 94% (Aceton im NMR).

5.7.10 Synthese der Säuren²⁷⁸

Die geschützte Säure (1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (0.86 M) gelöst und Anisol (2.0 Äq.) und Trifluoressigsäure (0.8 M) addiert. Nach 24 h bei RT wird mit Dichlormethan (3x) und die vereinten organischen Phasen unter vermindertem Druck von Lösemittel befreit. Nach Trocknung unter Hochvakuum wird das Produkt erhalten.

Synthese von 1-(9*H*-Fluoren-9-yl)-3-oxo-2,7,10,13,16-pentaoxa-4-azaoctadecan-18-säure

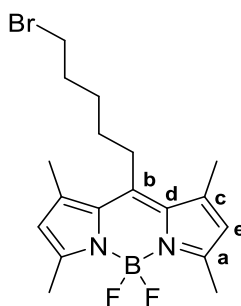
tert-Butyl 1-(9*H*-fluoren-9-yl)-3-oxo-2,7,10,13,16-pentaoxa-4-azaoctadecan-18-oat (9.1 mg, 0.017 mmol, 1.0 Äq.); Anisol (3.7 mg, 0.034 mmol, 2.0 Äq.); TFA (21 μ L); DCM (196 μ L); Ausbeute: 7,7 mg, 0.0163 mmol, 96%.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.90–7.87 (m, 2H, H_{arom.}), 7.71–6.67 (m, 2H, H_{arom.}), 7.43–7.39 (m, 2H, H_{arom.}), 7.35–7.31 (m, 2H, H_{arom.}), 7.30 (t, ³J_{H,H} = 5.79 Hz, 1H, NH), 4.29 (d,

$^3J_{H,H} = 6.95$ Hz, 2H, CHCH₂), 4.21 (t, $^3J_{H,H} = 6.93$ Hz, 1H, CHCH₂), 3.96 (s, 2H, COOCH₂), 3.59–3.56 (m, 2H, CH₂), 3.53–3.51 (m, 2H, CH₂), 3.52–3.48 (m, 8H, 4 x CH₂), 3.40 (t, $^3J_{H,H} = 6.00$ Hz, 2H, NHCH₂CH₂), 3.13 (q, $^3J_{H,H} = 5.93$ Hz, 2H, NHCH₂CH₂). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 171.7 (C_q, C_{Säure}), 156.1 (C_q, C_{Carbamat}), 143.8 (2 x C_q, C_{arom.}), 140.7 (2 x C_q, C_{arom.}), 127.6 (2 x CH, C_{arom.}), 127.0 (2 x CH, C_{arom.}), 125.1 (2 x CH, C_{arom.}), 120.1 (2 x CH, C_{arom.}), 69.7 (CH₂), 69.7 (3 x CH₂), 69.6 (2 x CH₂), 69.5 (CH₂), 69.1 (CH₂), 65.3 (CH₂), 46.7 (CH, CHCH₂), 40.1 (CH₂, NHCH₂).). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 474.4 ([M+H]⁺). **Reinheit:** 94%.

5.8 Synthese der BODIPY-Derivate (Jan Appelhaus)²⁷⁹

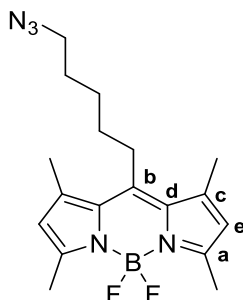
Synthese von 10-(5-Bromopentyl)-5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin



Unter Schutzgas (Ar) wird 6-Bromhexansäurechlorid (88.1 mg, 0.41 mmol, 1.0 Äq.) in Dichlormethan (4.1 mL, 0.1 M) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Daraufgehend wird 2,4-Dimethylpyrrol (78.5 mg, 0.83 mmol, 2.0 Äq.) in Dichlormethan (1.6 mL, 0.5 M) über 30 min zugetropft. Die Reaktionsmischung wird für 3.5 h bei RT gerührt und erneut auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von Triethylamin (166.9 mg, 1.65 mmol, 4.0 Äq.) wird für 30 min gerührt, bevor BF₃ x Et₂O (117.2 mg, 0.83 mmol, 2.0 Äq.) addiert wird. Nach 1 h bei RT wird das Lösemittel entfernt und das Produkt mittels säulenchromatographischer Reinigung an SiO₂ (Petrolether:Ethylacetat 85:15) mit 47.3 mg, 0.12 mmol, 29% (Lit.: 33%)²⁷⁹ erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 6.06 (s, 2H, 2 x CH), 3.43 (t, $^3J_{H,H} = 6.56$ Hz, 2H, CH₂), 3.00–2.93 (m, 2H, CH₂), 2.51 (s, 6H, 2 x CH₃), 2.42 (s, 6H, 2 x CH₃), 1.96–1.89 (m, 2H, CH₂), 1.69–1.63 (m, 4H, 2 x CH₂). **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 154.1 (C_q, a), 146.0 (C_q, b), 140.4 (C_q, c), 131.5 (d), 121.8 (2 x CH, e), 33.5 (CH₂), 32.3 (CH₂), 31.1 (CH₂), 28.7 (CH₂), 28.4 (CH₂), 16.6 (2 x CH₃), 14.6 (2 x CH₃). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 474.4 ([M+H]⁺). **Reinheit:** 91%.

Synthese von 10-(5-Azidopentyl)-5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5*H*-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin

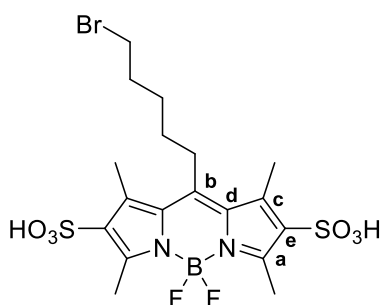


Unter Schutzgas (Ar) wird 10-(5-Bromopentyl)-5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5*H*-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin (20 mg, 0.05 mmol, 1.0 Äq.) in DMF (0.4 mL, 0.13 M) gelöst und NaN₃ (19.5 mg, 0.3 mmol, 6.0 Äq.) addiert. Nach 2 h bei 50 °C wird das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung an SiO₂ (Cyclohexan:Dichlormethan 1:1) ergibt das Produkt mit 14.4 mg, 0.04 mmol, 80%.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 6.06 (s, 2H, 2 x CH), 3.32 (t, ³J_{H,H} = 6.59 Hz, 2H CH₂), 2.99–2.92 (m, 2H, CH₂), 2.51 (s, 6H, 2 x CH₃), 2.41 (s, 6H, 2 x CH₃), 1.70–1.63 (m, 4H, 2 x CH₂), 1.62–1.54 (m, 2H, CH₂). **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 154.1 (C_q, a), 146.0 (C_q, b), 140.3 (C_q, c), 131.5 (C_q, d), 121.8 (2 x CH, e), 51.3 (CH₂, N₃CH₂), 31.5 (CH₂), 28.8 (CH₂), 28.4 (CH₂), 27.5 (CH₂), 16.6 (2 x CH₃), 14.6 (2 x CH₃). **LC-MS**: positiv [*m/z*] = 339.2 ([M-F]⁺).

Reinheit: 95%.

Synthese von 10-(5-Bromopentyl)-5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5*H*-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinine-2,8-disulfonsäure

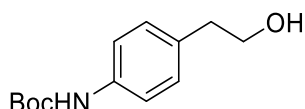


Das Edukt 10-(5-Bromopentyl)-5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5*H*-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin (10 mg, 0.025 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (240 μ L) gelöst und auf -20 °C gekühlt. Folgend wird HSO₃Cl (5.8 mg, 0.05 mmol, 2.0 Äq.) addiert und für 30 min gerührt. Die Reaktionslösung wird mit ges. NaHCO₃-Lösung (3 x 10 mL) extrahiert und die vereinten anorganischen Phasen lyophilisiert. Säulenchromatographische Reinigung an SiO₂ (Dichlormethan:Methanol 9:2 + 2% NEt₃) ergibt 10.5 mg. Ausbeute auf Grund von NEt₃ im Produkt nicht bestimmbar.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 3.57 (t, ³*J*_{H,H} = 6.59 Hz, 2H CH₂), 3.00–2.93 (unter H₂O-Peak, CH₂), 2.67 (s, 6H, 2 x CH₃), 2.60 (s, 6H, 2 x CH₃), 1.92–1.86 (m, 2H, CH₂), 1.65–1.53 (m, 4H, 2 x CH₂). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 152.5 (C_q, a), 148.4 (C_q, b), 137.7 (C_q), 137.6 (C_q), 129.7 (C_q, d), 34.9 (CH₂), 31.7 (CH₂), 30.2 (CH₂), 27.9 (CH₂), 27.6 (CH₂), 13.7 (2 x CH₃), 13.6 (2 x CH₃). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 557.2 ([M+H]⁺). **Reinheit:** 98%.

5.9 Synthese der D₂-Antagonisten^{273, 275}

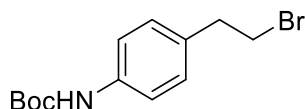
Synthese von *tert*-Butyl-(4-(2-hydroxyethyl)phenyl)carbammat



Das Edukt 2-(4-Aminophenyl)ethan-1-ol (2.15 g, 15.7 mmol, 1.0 Äq.) wird in Ethylacetat (30 mL) gelöst und Boc₂O (3.79 g, 17.4 mmol, 1.1 Äq.) in Ethylacetat (10 mL) addiert. Nach 16 h bei RT wird Wasser (50 mL) dazu gegeben und die Reaktionslösung mit Ethylacetat (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird unter Hochvakuum getrocknet und ohne weitere Reinigung in der nächsten Reaktion verwendet.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 9.16 (s, 1H, NH), 7.36–7.29 (m, 2H, H_{arom.}), 7.09–7.04 (m, 2H, H_{arom.}), 4.54 (t, ³*J*_{H,H} = 4.98 Hz, 1H, OH), 3.54 (td, ³*J*_{H,H} = 6.59 Hz, ³*J*_{H,H} = 6.70 Hz, 2H, CH₂CH₂OH), 2.64 (t, ³*J*_{H,H} = 7.15 Hz, 2H), 1.46 (s, 9H, C(CH₃)₃). **¹³C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 152.8 (C_q, C_{Carbamat}), 137.3 (C_q, C_{arom.}), 133.0 (C_q, C_{arom.}), 128.9 (2 x CH, C_{arom.}), 118.1 (2 x CH, C_{arom.}), 78.7 (C_q, C(CH₃)₃), 62.3 (CH₂, CH₂CH₂OH), 38.4 (CH₂, CH₂CH₂OH), 28.1 (CH₃, C(CH₃)₃). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 237.9 ([M+H]⁺). **Reinheit:** 97%.

Synthese von *tert*-Butyl-(4-(2-bromoethyl)phenyl)carbammat

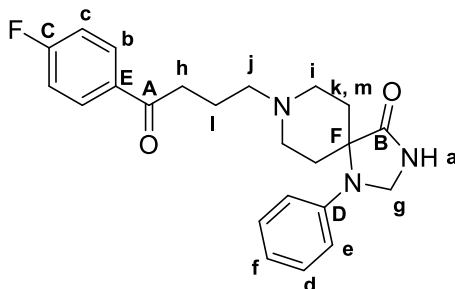


Das Edukt *tert*-Butyl-(4-(2-hydroxyethyl)phenyl)carbammat (2.0 g, 8.4 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (25 mL) gelöst und PPh₃ (3.32 g, 12.6 mmol, 1.5 Äq.) sowie *N*-Bromsuccinimid (2.24 g, 12.6 mmol, 1.5 Äq.) bei 0 °C addiert. Nach 4 h wird das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und säulenchromatographische Reinigung an SiO₂ (Dichlormethan) ergibt 1.67 g, 5.57 mmol, 66% Lit.: 62%)²⁷³ des Produkts.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 9.23 (s, 1H, NH), 7.39–7.35 (m, 2H, H_{arom.}), 7.16–7.12 (m, 2H, H_{arom.}), 3.66 (t, ³*J*_{H,H} = 7.30 Hz, 2H, CH₂CH₂Br), 3.03 (t, ³*J*_{H,H} = 7.28 Hz, 2H, CH₂CH₂Br), 1.47 (s, 9H). **¹³C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 152.7 (C_q, C_{Carbamat}), 138.0

(C_q, C_{arom.}), 132.4 (C_q, C_{arom.}), 128.8 (2 x CH, C_{arom.}), 118.1 (2 x CH, C_{arom.}), 78.9 (C_q, C(CH₃)₃), 37.8 (CH₂, CH₂CH₂Br), 34.6 (CH₂, CH₂CH₂Br), 28.1 (CH₃, C(CH₃)₃). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 300.0 ([M+H]⁺). **Reinheit:** 97%.

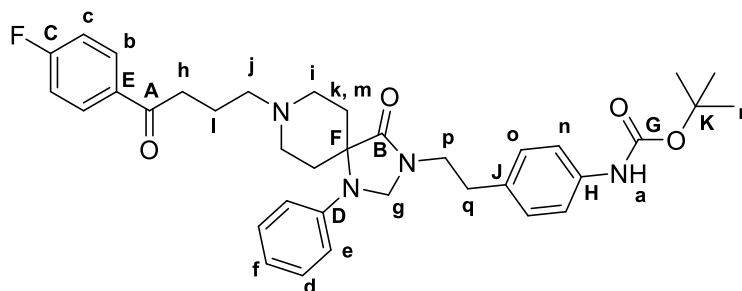
Synthese von 8-(4-(4-Fluorphenyl)-4-oxobutyl)-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-on



Unter Schutzgas (Ar) wird 1-Phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-on (1 g, 4.32 mmol, 1.0 Äq.), 4-Chloro-1-(4-fluorophenyl)butan-1-on (0.65 mL, 3.95 mmol, 1.0 Äq.), KI (718 mg, 4.32 mmol, 1.1 Äq.) und Triethylamin (0.66 ml, 4.73 mmol, 1.2 Äq.) in Acetonitril (8 mL) gelöst und für 20 h bei 80 °C gerührt. Das Lösemittel wird unter vermindertem Druck entfernt und säulenchromatographische Reinigung an SiO₂ (Dichlormethan:Methanol 96:4) ergibt 719.6 mg, 1.82 mmol, 46% (Lit.: 63%)²⁷³.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.57 (s, 1H, a), 8.09–8.03 (m, 2H, b), 7.37–7.31 (m, 2H, c), 7.20–7.15 (m, 2H, d), 6.81–6.77 (m, 2H, e), 6.74 (t, ³J_{H,H} = 7.30 Hz, 1H, f), 4.55 (s, 2H, g), 3.03 (t, ³J_{H,H} = 6.88 Hz, 2H, h), 2.82–2.62 (bs, 4H, i), 2.50–2.42 (m, 2H, j), 2.44–2.34 (m, 2H, k), 1.83 (p, ³J_{H,H} = 6.98 Hz, 2H, l), 1.60–1.50 (m, 2H, m). **¹³C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 198.5 (C_q, A), 176.1 (C_q, B), 164.8 (d, ¹J_{C,F} = 215.15 Hz, C_q, C), 143.3 (C_q, D), 133.8 (d, ⁴J_{C,F} = 1.99 Hz, C_q, E), 130.8 (d, ³J_{C,F} = 9.37 Hz, 2 x CH, b), 128.9 (2 x CH, d), 117.6 (CH, f), 115.6 (d, ²J_{C,F} = 21.73 Hz, CH, c), 114.3 (2 x CH, e), 58.6 (CH₂, g), 58.2 (C_q, F), 57.0 (CH₂, j), 49.1 (2 x CH₂, i), 35.8 (CH₂, h), 28.3 (2 x CH₂, m, k), 21.5 (CH₂, l). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 396.0 ([M+H]⁺). **Reinheit:** 98%.

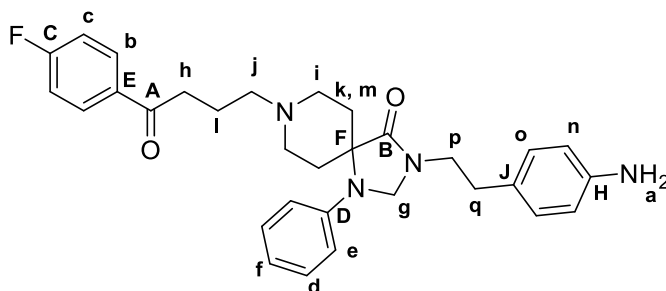
Synthese von *tert*-Butyl-(4-(2-(8-(4-(4-fluorophenyl)-4-oxobutyl)-4-oxo-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-3-yl)ethyl)phenyl)carbamate



Unter Schutzgas (Ar) werden 8-(4-(4-Fluorophenyl)-4-oxobutyl)-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-on (500 mg, 1.26 mmol, 1.0 Äq.), KOH (353 mg, 0.63 mmol, 0.5 Äq.), K₂CO₃ (697 mg, 5.04 mmol, 4.0 Äq.) und Tetrabutylammoniumbisulfat (129 mg, 0.38 mmol, 0.3 Äq.) in Toluol (26.6 mL) suspendiert und bei 90 °C für 30 min gerührt. Daraufgehend wird *tert*-Butyl-(4-(2-bromoethyl)phenyl)carbamate (759 mg, 2.52 mmol, 2.0 Äq.) in Toluol (3.18 mL) zugetropft. Die Reaktionslösung wird für 2 Tage bei 90 °C gerührt, mit NaCl-Lösung gewaschen, mit Dichlormethan (3 x 50 mL) extrahiert, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung mittels Flash ergibt das Produkt mit 581.7 mg, 0.946 mmol, 75% (Lit.: 65%)²⁷³.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 9.21 (s, 1H, a), 8.07–8.03 (m, 2H, b), 7.37–7.31 (m, 2H, 2 x CH, c), 7.35–7.33 (m, 2H, 2 x CH, n), 7.20–7.16 (m, 2H, 2 x CH, d), 7.13–7.10 (m, 2H, o), 6.78–6.75 (m, 1H, f), 6.77–6.73 (m, 2H, e), 4.56 (s, 2H, g), 3.53 (t, ³J_{H,H} = 7.21 Hz, 2H, p), 3.02 (t, ³J_{H,H} = 6.83 Hz, 2H, h), 2.81 (t, ³J_{H,H} = 7.21 Hz, 2H, q), 2.75–2.57 (m, 4H, i), 2.45–2.36 (m, 2H, j), 2.38–2.29 (m, 2H, k), 1.86–1.77 (m, 2H, l), 1.45 (s, 9H, r), 1.42–1.35 (m, 2H, m). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 198.5 (C_q, A), 173.1 (C_q, B), 164.9 (d, ¹J_{C,F} = 251.24 Hz, C_q, C), 152.8 (C_q, G), 143.0 (C_q, D), 137.8 (C_q, H), 133.8 (C_q, E), 132.0 (C_q, J), 130.8 (d, ³J_{C,F} = 9.17 Hz, 2 x CH, b), 129.0 (2 x CH, d), 128.8 (2 x CH, o), 118.2 (2 x CH, n), 118.0 (CH, f), 115.6 (d, ²J_{C,F} = 21.81 Hz, CH, c), 114.7 (2 x CH, e), 78.9 (C_q, K), 62.8 (CH₂, g), 59.5 (C_q, F), 57.0 (CH₂, j), 49.0 (2 x CH₂, i), 41.3 (CH₂, p), 35.8 (CH₂, h), 32.0 (CH₂, q), 28.5 (2 x CH₂, m, k), 28.1 (3 x CH₃, r), 21.5 (CH₂, l). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 615.3 ([M+H]⁺). **Reinheit:** 91%.

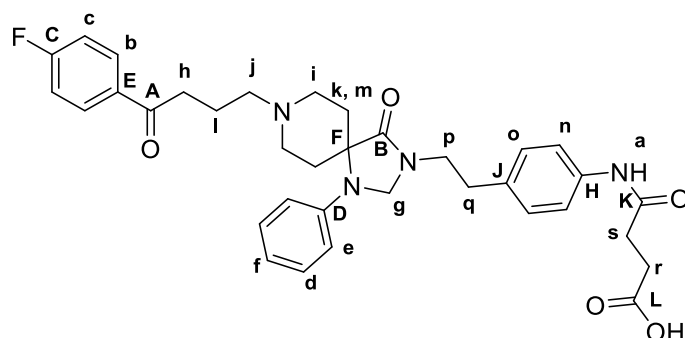
Synthese von *tert*-Butyl-(4-(2-(8-(4-(4-fluorophenyl)-4-oxobutyl)-4-oxo-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-3-yl)ethyl)phenyl)carbamate



Das Edukt *tert*-Butyl-(4-(2-(8-(4-(4-fluorophenyl)-4-oxobutyl)-4-oxo-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-3-yl)ethyl)phenyl)carbamate (460mg, 0.75 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dioxan (2.6 mL) gelöst und 4 M HCl in Dioxan (2.6 mL) addiert. Nach 4 h bei RT wird das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird in NaHCO₃-Lösung aufgenommen, mit Dichlormethan (3 x 20 mL) extrahiert und die vereinten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet. Säulenchromatographische Reinigung mittels Flash ergibt das Produkt mit 273 mg, 0.53 mmol, 71% (Lit.: 66%)²⁷³.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.11–7.99 (m, 2H, b), 7.37–7.29 (m, 2H, 2 x CH, c), 7.19–7.14 (m, 2H, 2 x CH, d), 6.90–6.84 (m, 2H, o), 6.77–6.74 (m, 1H, f), 6.76–6.73 (m, 2H, e), 6.51–6.45 (m, 2H, 2 x CH, n), 4.83 (bs, 2H, a), 4.53 (s, 2H, g), 3.47 (t, ³J_{H,H} = 7.20 Hz, 2H, p), 3.02 (t, ³J_{H,H} = 6.90 Hz, 2H, h), 2.70 (t, ³J_{H,H} = 7.28 Hz, 2H, q), 2.72–2.59 (m, 4H, i), 2.42–2.35 (m, 2H, j), 2.40–2.31 (m, 2H, k), 1.86–1.77 (m, 2H, l), 1.45–1.36 (m, 2H, m). **¹³C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 198.6 (C_q, A), 173.1 (C_q, B), 164.8 (d, ¹J_{C,F} = 250.88 Hz, C_q, C), 146.9 (C_q, H), 143.0 (C_q, D), 133.8 (C_q, E), 130.8 (d, ³J_{C,F} = 9.36 Hz, 2 x CH, b), 129.0 (2 x CH, d), 129.0 (2 x CH, o), 125.3 (C_q, J), 117.9 (CH, f), 115.6 (d, ²J_{C,F} = 21.85 Hz, CH, c), 114.6 (2 x CH, e), 113.9 (2 x CH, n), 62.9 (CH₂, g), 59.6 (C_q, F), 57.1 (CH₂, j), 49.0 (2 x CH₂, i), 41.7 (CH₂, p), 35.9 (CH₂, h), 31.9 (CH₂, q), 28.5 (2 x CH₂, m, k), 21.5 (CH₂, l). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 515.3 ([M+H]⁺). **Reinheit:** 96%.

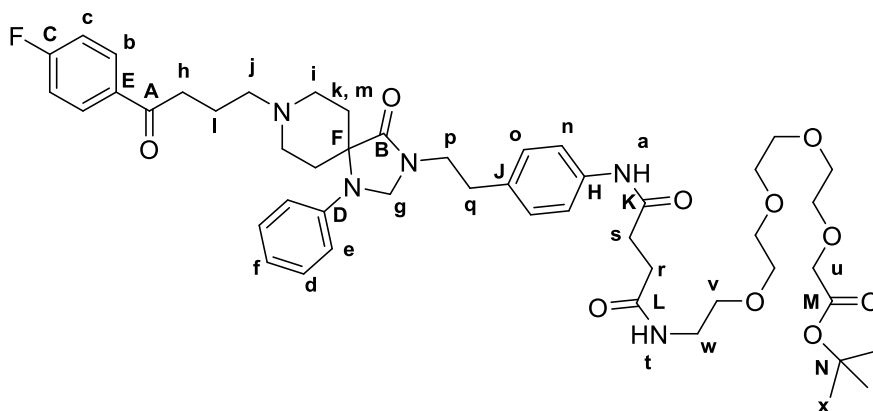
Synthese von 4-((4-(2-(8-(4-(4-Fluorophenyl)-4-oxobutyl)-4-oxo-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-3-yl)ethyl)phenyl)amino)-4-oxobutansäure



Das Edukt *tert*-Butyl-(4-(2-(8-(4-(4-fluorophenyl)-4-oxobutyl)-4-oxo-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-3-yl)ethyl)phenyl)carbamate (100 mg, 0.19 mmol, 1.0 Äq.) wird in Acetonitril (5.6 mL) gelöst und Bernsteinsäureanhydrid (23.3 mg, 0.23 mmol, 1.2 Äq.) addiert. Nach 16 h bei RT wird erneut Bernsteinsäureanhydrid (23.3 mg, 0.23 mmol, 1.2 Äq.) zugefügt. Nach weiteren 24 h bei RT wird das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt, in Dichlormethan (10 mL) und 1 M HCl Lösung (15 mL) aufgenommen, mit Dichlormethan (3 x 20 mL) extrahiert, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wird aus Ethylacetat ausgefällt und mittels HPLC gereinigt, wobei 98.3 mg, 0.16 mmol, 84% (Lit.: 90%)²⁷³ erhalten werden.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 9.87 (s, 1H, a), 8.08–8.03 (m, 2H, b), 7.50–7.46 (m, 2H, 2 x CH, n), 7.37–7.31 (m, 2H, 2 x CH, c), 7.19–7.16 (m, 2H, 2 x CH, d), 7.17–7.14 (m, 2H, o), 6.77–6.75 (m, 1H, f), 6.76–6.73 (m, 2H, e), 4.56 (s, 2H, g), 3.54 (t, ³J_{H,H} = 7.20 Hz, 2H, p), 3.02 (t, ³J_{H,H} = 6.87 Hz, 2H, h), 2.83 (t, ³J_{H,H} = 7.18 Hz, 2H, q), 2.73–2.60 (m, 4H, i), 2.55–2.51 (m, 2H, r), 2.40–2.36 (m, 2H, j), 2.39 (t, ³J_{H,H} = 7.13 Hz, 2H, s), 2.36–2.33 (m, 2H, k), 1.81 (p, ³J_{H,H} = 6.96 Hz, 2H, l), 1.43–1.36 (m, 2H, m). ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 198.5 (C_q, A), 173.8 (C_q, K), 173.1 (C_q, B), 169.9 (C_q, L), 164.8 (d, ¹J_{C,F} = 252.11 Hz, C_q, C), 143.0 (C_q, D), 137.6 (C_q, H), 133.8 (C_q, E), 133.0 (C_q, J), 130.8 (d, ³J_{C,F} = 9.28 Hz, 2 x CH, b), 129.0 (2 x CH, d), 128.8 (2 x CH, o), 118.9 (2 x CH, n), 118.0 (CH, f), 115.6 (d, ²J_{C,F} = 21.82 Hz, CH, c), 114.6 (2 x CH, e), 62.8 (CH₂, g), 59.5 (C_q, F), 57.0 (CH₂, j), 49.0 (2 x CH₂, i), 41.2 (CH₂, p), 35.9 (CH₂, h), 32.0 (CH₂, q), 31.0 (CH₂, r), 28.8 (CH₂, s), 28.4 (2 x CH₂, m, k), 21.4 (CH₂, l). **Schmelzpunkt:** Zersetzung >199 °C. **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 615.4 ([M+H]⁺). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₃₅H₃₉FN₄O₅ [M+H]⁺: 615.2977; gefunden: 615.2990. **Reinheit:** 96%.

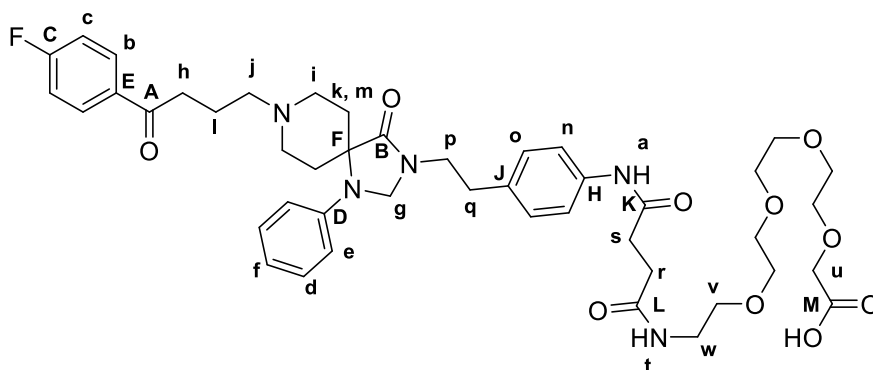
Synthese von *tert*-Butyl-19-((4-(2-(8-(4-(4-fluorophenyl)-4-oxobutyl)-4-oxo-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-3-yl)ethyl)phenyl)amino)-16,19-dioxo-3,6,9,12-tetraoxa-15-azanonadecanoat



Zu einer Lösung aus 4-((4-(2-(8-(4-(4-Fluorophenyl)-4-oxobutyl)-4-oxo-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-3-yl)ethyl)phenyl)amino)-4-oxobutansäure (50 mg, 0.081 mmol, 1.0 Äq.) in Dichlormethan (0.5 mL) wird HATU (37 mg, 0.1 mmol, 1.2 Äq.) addiert. Separiert davon wird *tert*-Butyl-14-amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoat (27.8 mg, 0.090 mmol, 1.1 Äq.) und Hünigbase (21 mg, 0.11 mmol, 2.0 Äq.) in Dichlormethan (0.5 mL) gelöst. Die Lösung des Amins wird zum Kopplungsreagenz getropft. Nach 24 h bei RT wird das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und Reinigung mittels HPLC ergibt das Produkt mit 68.1 mg, 0.075 mmol, 93%.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 9.85 (s, 1H, a), 8.08–8.03 (m, 2H, b), 7.89 (t, ³J_{H,H} = 5.67 Hz, 1H, t), 7.50–7.46 (m, 2H, 2 x CH, n), 7.36–7.31 (m, 2H, 2 x CH, c), 7.19–7.15 (m, 2H, 2 x CH, d), 7.16–7.13 (m, 2H, o), 6.77–6.74 (m, 1H, f), 6.76–6.73 (m, 2H, e), 4.56 (s, 2H, g), 3.97 (s, 2H, u), 3.57–3.55 (m, 2H, CH₂), 3.55–3.53 (m, 2H, p), 3.53–3.51 (m, 2H, CH₂), 3.51–3.49 (m, 8H, 4 x CH₂), 3.39 (t, ³J_{H,H} = 5.93 Hz, 2H, v), 3.21–3.16 (m, 2H, w), 3.01 (t, ³J_{H,H} = 6.87 Hz, 2H, h), 2.83 (t, ³J_{H,H} = 7.20 Hz, 2H, q), 2.69–2.64 (m, 2H, i), 2.64–2.58 (m, 2H, i), 2.53–2.50 (m, 2H, r), 2.39 (t, ³J_{H,H} = 7.21 Hz, 2H, s), 2.38–2.35 (m, 2H, j), 2.36–2.31 (m, 2H, k), 1.81 (p, ³J_{H,H} = 7.04 Hz, 2H, l), 1.41 (s, 9H, x), 1.40–1.36 (m, 2H, m). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 198.6 (C_q, A), 173.1 (C_q, B), 171.3 (C_q, L), 170.2 (C_q, K), 169.3 (C_q, M), 164.8 (d, ¹J_{C,F} = 252.96 Hz, C_q, C), 143.0 (C_q, D), 137.6 (C_q, H), 133.8 (d, ⁴J_{C,F} = 2.93 Hz, C_q, E), 132.9 (C_q, J), 130.8 (d, ³J_{C,F} = 9.07 Hz, 2 x CH, b), 129.0 (2 x CH, d), 128.8 (2 x CH, o), 118.9 (2 x CH, n), 117.9 (CH, f), 115.6 (d, ²J_{C,F} = 21.95 Hz, CH, c), 114.6 (2 x CH, e), 80.6 (C_q, N), 69.8 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.6 (CH₂), 69.1 (CH₂), 68.1 (CH₂), 62.8 (CH₂, g), 59.6 (C_q, F), 57.1 (CH₂, j), 49.0 (2 x CH₂, i), 41.2 (CH₂, p), 38.6 (CH₂, w), 35.9 (CH₂, h), 32.0 (CH₂, q), 31.6 (CH₂, r), 30.2 (CH₂, s), 28.5 (2 x CH₂, m, k), 27.7 (3 x CH₃, x), 21.6 (CH₂, l). **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 904.7 ([M+H]⁺). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₄₉H₆₆FN₅O₁₀ [M+H]⁺: 904.4866; gefunden: 904.4875. **Reinheit:** 97%.

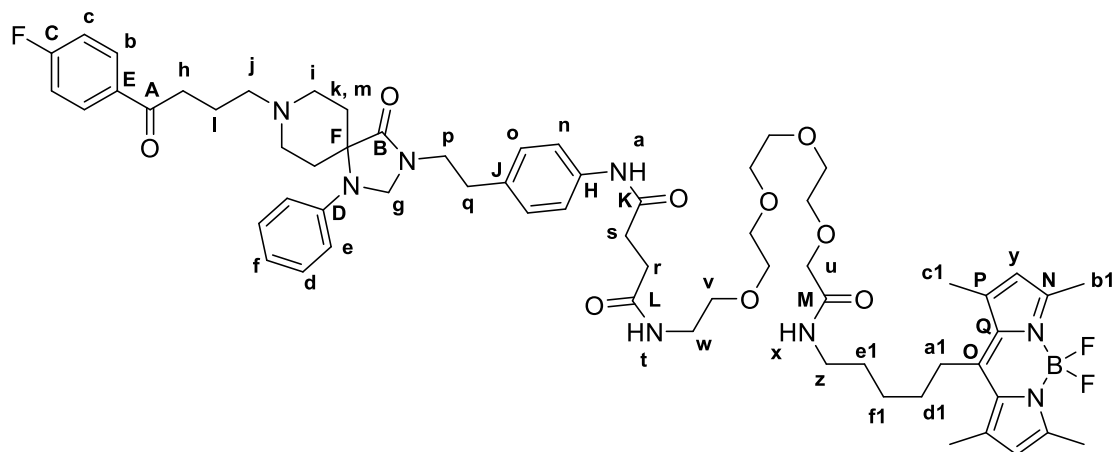
Synthese von 19-((4-(2-(8-(4-(4-Fluorophenyl)-4-oxobutyl)-4-oxo-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-3-yl)ethyl)phenyl)amino)-16,19-dioxo-3,6,9,12-tetraoxa-15-azanonadecansäure



Das Edukt *tert*-Butyl-19-((4-(2-(8-(4-(4-fluorophenyl)-4-oxobutyl)-4-oxo-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-3-yl)ethyl)phenyl)amino)-16,19-dioxo-3,6,9,12-tetraoxa-15-azanonadecanoat (55.9 mg, 61.8 μmol , 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (247 μL) gelöst und TIPS (15.4 μL) addiert. Folgend wird Trifluoressigsäure (371 μL) zugetropft und die Reaktionslösung für 3 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC gereinigt. Das Produkt wird mit 24.3 mg, 28.6 μmol , 51% erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm] = 9.96 (s, 1H, a), 8.08–8.03 (m, 2H, b), 8.00 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.73$ Hz, 1H, t), 7.50–7.46 (m, 2H, 2 x CH, n), 7.37–7.31 (m, 2H, 2 x CH, c), 7.19–7.15 (m, 2H, 2 x CH, d), 7.16–7.14 (m, 2H, o), 6.77–6.75 (m, 2H, e), 6.76–6.74 (m, 1H, f), 4.56 (s, 2H, g), 3.90 (s, 2H, u), 3.57–3.54 (m, 2H, CH_2), 3.57–3.54 (m, 2H, p), 3.53–3.48 (m, 10H, 5 x CH_2), 3.39 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.85$ Hz, 2H, v), 3.19 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 5.78$ Hz, 2H, w), 3.03 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.91$ Hz, 2H, h), 2.83 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.20$ Hz, 2H, q), 2.77–2.72 (m, 2H, i), 2.72–2.66 (m, 2H, i), 2.53–2.50 (m, 2H, r), 2.43 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.21$ Hz, 2H, s), 2.42–2.39 (m, 2H, j), 2.40–2.39 (m, 2H, k), 1.82 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.03$ Hz, 2H, l), 1.40–1.35 (m, 2H, m). **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm] = 198.4 (C_q , A), 173.0 (C_q , B), 172.0 (C_q , M), 171.3 (C_q , L), 170.3 (C_q , K), 164.8 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 251.08$ Hz, C_q , C), 143.0 (C_q , D), 137.7 (C_q , H), 133.7 (d, $^4J_{\text{C,F}} = 2.28$ Hz, C_q , E), 132.8 (C_q , J), 130.8 (d, $^3J_{\text{C,F}} = 9.33$ Hz, 2 x CH, b), 129.0 (2 x CH, d), 128.8 (2 x CH, o), 118.9 (2 x CH, n), 117.9 (CH, f), 115.6 (d, $^2J_{\text{C,F}} = 21.74$ Hz, CH, c), 114.5 (2 x CH, e), 69.7 (CH_2), 69.7 (CH_2), 69.7 (CH_2), 69.6 (CH_2), 69.5 (CH_2), 69.5 (CH_2), 69.2 (CH_2), 68.5 (CH_2), 62.8 (CH_2 , g), 59.4 (C_q , F), 56.8 (CH_2 , j), 48.8 (2 x CH_2 , i), 41.1 (CH_2 , p), 38.6 (CH_2 , w), 35.8 (CH_2 , h), 32.0 (CH_2 , q), 31.8 (CH_2 , r), 30.4 (CH_2 , s), 28.2 (2 x CH_2 , m, k), 21.1 (CH_2 , l). **Schmelzpunkt:** hygroskopisch. **LC-MS:** positiv [m/z] = 848.4 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für $\text{C}_{45}\text{H}_{58}\text{FN}_5\text{O}_{10}$ [$\text{M}+\text{H}]^+$: 848.4240; gefunden: 848.4257. **Reinheit:** 96%.

Synthese von *N'*-(20-(5,5-Difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5*H*-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-10-yl)-14-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-15-azaicosyl)-*N'*-(4-(2-(8-(4-(4-fluorophenyl)-4-oxobutyl)-4-oxo-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-3-yl)ethyl)phenyl)succinamid

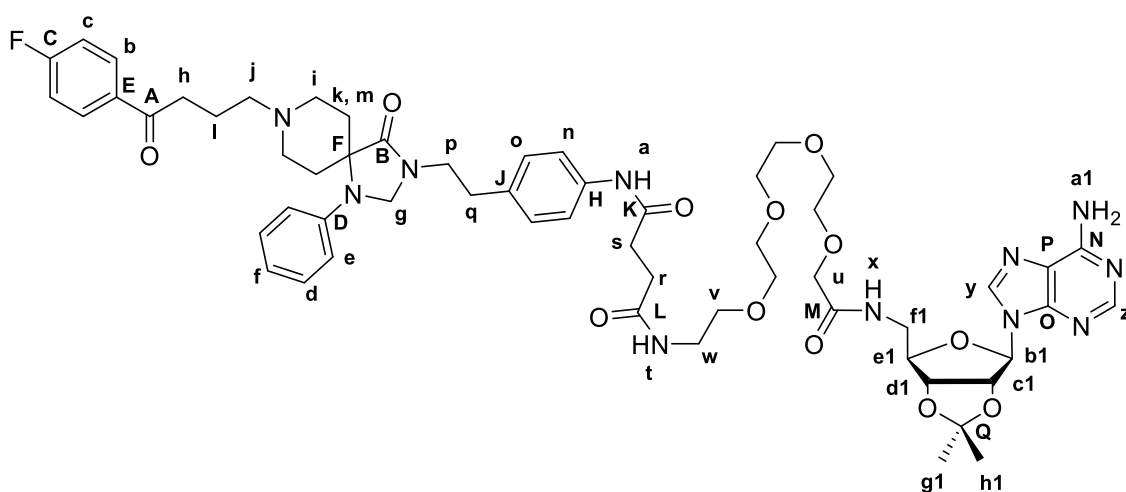


Das Edukt 19-((4-(2-(8-(4-(4-Fluorophenyl)-4-oxobutyl)-4-oxo-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-3-yl)ethyl)phenyl)amino)-16,19-dioxo-3,6,9,12-tetraoxa-15-azanonadecansäure (10 mg, 11.7 μmol , 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (0.4 mL) gelöst und HATU (5.3 mg, 14.0 μmol , 1.2 Äq.) hinzugefügt. In einem separaten Gefäß wird das BODIPY-amin (4.2 mg, 12.7 μmol , 1.1 Äq.) in Dichlormethan (0.4 mL) gelöst und Hünigbase (3.0 mg, 23.4 μmol , 2.0 Äq.) addiert. Nach 5 min wird das Amin zur aktivierten Säure gegeben und für 12 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wird unter vermindertem Druck entfernt und Reinigung mittels HPLC ergibt 9.4 mg, 8 μmol , 68%.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm] = 9.84 (s, 1H, a), 8.08–8.03 (m, 2H, b), 7.88 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.58$ Hz, 1H, t), 7.65 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.97$ Hz, 1H, x), 7.50–7.46 (m, 2H, 2 x CH, n), 7.37–7.31 (m, 2H, 2 x CH, c), 7.19–7.15 (m, 2H, 2 x CH, d), 7.16–7.13 (m, 2H, o), 6.77–6.74 (m, 2H, e), 6.75–6.72 (m, 1H, f), 6.22 (s, 2H, y), 4.56 (s, 2H, g), 3.86 (s, 2H, u), 3.58–3.45 (m, 12H, 6 x CH_2), 3.55–3.52 (m, 2H, p), 3.38 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.99$ Hz, 2H, v), 3.18 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 5.78$ Hz, 2H, w), 3.13 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 6.55$ Hz, 2H, z), 3.01 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.92$ Hz, 2H, h), 2.95–2.90 (m, 2H, a1), 2.82 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.35$ Hz, 2H, q), 2.69–2.64 (m, 2H, i), 2.64–2.57 (m, 2H, i), 2.52–2.51 (m, 2H, r), 2.40 (s, 6H, b1), 2.39 (s, 6H, c1), 2.40–2.36 (m, 2H, s), 2.38–2.34 (m, 2H, j), 2.35–2.31 (m, 2H, k), 1.80 (p, $^3J_{\text{H,H}} = 7.19$ Hz, 2H, l), 1.60–1.53 (m, 2H, d1), 1.53–1.48 (m, 2H, e1), 1.48–1.43 (m, 2H, f1), 1.41–1.35 (m, 2H, m). **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm] = 198.6 (C_q , A), 173.1 (C_q , B), 171.3 (C_q , L), 170.2 (C_q , K), 169.0 (C_q , M), 164.8 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 251.47$ Hz, C_q , C), 153.0 (2 x C_q , N), 146.7 (C_q , O), 143.0 (C_q , D), 140.8 (2 x C_q , P), 137.6 (C_q , H), 133.8 (d, $^4J_{\text{C,F}} = 2.30$ Hz, C_q , E), 132.9 (C_q , J), 130.8 (d, $^3J_{\text{C,F}} = 9.31$ Hz, 2 x CH, b), 130.7 (2 x C_q , Q), 129.0 (2 x CH, d), 128.8 (2 x CH, o), 121.6 (2 x CH, y), 118.9 (2 x CH, n), 117.9 (CH, f), 115.6 (d, $^2J_{\text{C,F}} = 21.51$ Hz, CH, c), 114.6 (2 x CH, e), 70.2 (CH_2), 69.9 (CH_2), 69.8 (2 x CH_2), 69.7 (CH_2), 69.5 (CH_2), 69.5

(CH₂), 69.1 (CH₂, v), 62.8 (CH₂, g), 59.6 (C_q, F), 57.1 (CH₂, j), 49.0 (2 x CH₂, i), 41.2 (CH₂, p), 38.5 (CH₂, w), 37.8 (CH₂, z), 35.9 (CH₂, h), 32.0 (CH₂, q), 31.6 (CH₂, r), 31.1 (CH₂, d1), 30.2 (CH₂, s), 28.8 (CH₂, e1), 28.5 (2 x CH₂, m, k), 27.7 (CH₂, a1), 27.0 (CH₂, f1), 21.6 (CH₂, l), 15.8 (2 x CH₃, b1), 14.0 (2 x CH₃, c1). **Schmelzpunkt:** 73.1–83.5 °C. **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 1164.1 ([M+H]⁺). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₆₃H₈₂BF₃N₈O₉ [M+Na]⁺: 1185.6142; gefunden: 1185.6110. **Reinheit:** 97%. **Absorption/Emission:** 498 nm / 506 nm.

Synthese von N¹-(1-((3*aR*,4*R*,6*R*,6*aR*)-6-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-*d*][1,3]dioxol-4-yl)-3-oxo-5,8,11,14-tetraoxa-2-azahexadecan-16-yl)-N⁴-(4-(2-(8-(4-(4-fluorophenyl)-4-oxobutyl)-4-oxo-1-phenyl)-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-3-yl)ethyl)phenyl)succinamid

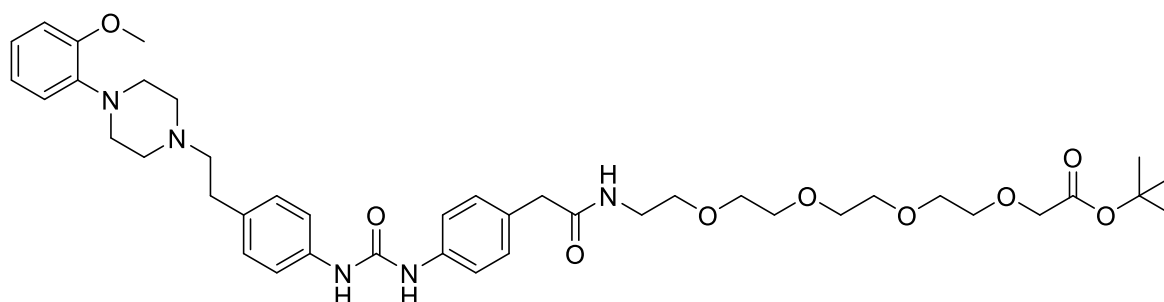


Das Edukt 19-((4-(2-(8-(4-(4-Fluorophenyl)-4-oxobutyl)-4-oxo-1-phenyl)-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-3-yl)ethyl)phenyl)amino)-16,19-dioxo-3,6,9,12-tetraoxa-15-azanonadecansäure (12.8 mg, 0.024 mmol, 1.0 Äq.) wird in Dichlormethan (0.4 mL) gelöst und HATU (6.8 mg, 0.028 mmol, 1.2 Äq.) hinzugefügt. In einem separaten Gefäß wird das 9-((3*aR*,4*R*,6*R*,6*aR*)-6-(Aminomethyl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-*d*][1,3]dioxol-4-yl)-9*H*-purin-6-amin (5.1 mg, 0.026 mmol, 1.1 Äq.) in Dichlormethan (0.4 mL) gelöst und Hünigbase (6.0 mg, 0.049 mmol, 2.0 Äq.) addiert. Nach 5 min wird das Amin zur aktivierten Säure gegeben und für 12 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wird unter vermindertem Druck entfernt und Reinigung mittels HPLC ergibt 4.0 mg, 0.0035 mmol, 15%.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 9.84 (s, 1H, a), 8.31 (s, 1H, y), 8.17 (s, 1H, z), 8.08–8.03 (m, 2H, b), 7.89 (t, ³J_{H,H} = 5.96 Hz, 1H, x), 7.88 (t, ³J_{H,H} = 5.51 Hz, 1H, t), 7.49–7.46 (m, 2H, 2 x CH, n), 7.36–7.32 (m, 2H, 2 x CH, c), 7.32 (s, 2H, a1), 7.20–7.16 (m, 2H, 2 x CH, d), 7.16–7.13 (m, 2H, o), 6.78–6.75 (m, 1H, f), 6.77–6.74 (m, 2H, e), 6.12 (d, ³J_{H,H} = 2.75 Hz, 1H, b1), 5.44 (dd, ³J_{H,H} = 2.79 Hz, ³J_{H,H} = 6.41 Hz, 1H, c1), 4.96 (dd, ³J_{H,H} = 3.36 Hz, ³J_{H,H} = 6.44 Hz, 1H, d1), 4.57 (s, 2H, g), 4.20 (td, ³J_{H,H} = 3.42 Hz, ³J_{H,H} = 6.33 Hz, 1H, e1), 3.89 (s, 2H, u), 3.56–3.53 (m, 2H, CH₂), 3.55–3.53 (m, 2H, p), 3.53–3.51 (m, 2H, CH₂), 3.48–3.46 (m, 8H, 4 x CH₂),

3.44–3.39 (m, 1H, f1), 3.38 (t, $^3J_{H,H} = 5.92$ Hz, 2H, v), 3.36–3.32 (m, 1H, f1), 3.18 (q, $^3J_{H,H} = 5.92$ Hz, 2H, w), 3.02 (t, $^3J_{H,H} = 6.55$ Hz, 2H, h), 2.83 (t, $^3J_{H,H} = 7.24$ Hz, 2H, q), 2.77–2.57 (bs, 4H, i), 2.53–2.50 (m, 2H, r), 2.39 (t, $^3J_{H,H} = 7.12$ Hz, 2H, s), 2.38–2.35 (m, 2H, j), 2.36–2.30 (m, 2H, k), 1.85–1.77 (m, 2H, l), 1.52 (s, 3H, g1), 1.40 1.44–1.36 (m, 2H, m), 1.31 (s, 3H, h1). $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 198.5 (C_q, A), 173.0 (C_q, B), 171.3 (C_q, L), 170.2 (C_q, K), 169.6 (C_q, M), 164.8 (d, $^1J_{C,F} = 251.23$ Hz, C_q, C), 156.1 (C_q, N), 152.7 (CH, z), 148.8 (C_q, O), 143.0 (C_q, D), 139.9 (CH, y), 137.6 (C_q, H), 133.8 (C_q, E), 132.9 (C_q, J), 130.8 (d, $^3J_{C,F} = 9.27$ Hz, 2 x CH, b), 129.0 (2 x CH, d), 128.8 (2 x CH, o), 119.2 (C_q, P), 118.9 (2 x CH, n), 118.0 (CH, f), 115.6 (d, $^2J_{C,F} = 21.62$ Hz, CH, c), 114.6 (2 x CH, e), 113.4 (C_q, Q), 88.8 (CH, b1), 84.1 (CH, e1), 82.9 (CH, c1), 81.7 (CH, d1), 70.1 (CH₂), 69.8 (CH₂), 69.7 (2 x CH₂), 69.6 (CH₂), 69.5 (CH₂), 69.5 (CH₂), 69.1 (CH₂, v), 62.8 (CH₂, g), 59.5 (C_q, F), 57.0 (C_q, F), 49.0 (2 x CH₂, i), 41.2 (CH₂, p), 40.3 (CH₂, f1), 38.5 (CH₂, w), 35.8 (CH₂, h), 32.0 (CH₂, q), 31.6 (CH₂, r), 30.2 (CH₂, s), 28.5 (2 x CH₂, m, k), 27.0 (CH₃, g1), 25.2 (CH₃, h1), 21.5 (CH₂, l). **Schmelzpunkt:** 93.2–97.5 °C. **LC-MS:** positiv [m/z] = 1136.8 ([M+H]⁺). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₅₈H₇₄FN₁₁O₁₂ [M+Na]⁺: 1158.5395; gefunden: 1158.5394. **Reinheit:** 96%.

Synthese von *tert*-Butyl-1-(4-(3-(4-(2-(4-(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)ethyl)phenyl)ureido)phenyl)-2-oxo-6,9,12,15-tetraoxa-3-azaheptadecan-17-olat



Zu einer Lösung aus Natrium-2-(4-(3-(4-(2-(4-(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)ethyl)phenyl)ureido)phenyl)acetate (20 mg, 0.039 mmol, 1.0 Äq.) in Dichlormethan (0.5 mL) wird HATU (17.9 mg, 0.047 mmol, 1.2 Äq.) addiert. Separiert davon wird *tert*-Butyl-14-amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoat (13.2 mg, 0.043 mmol, 1.1 Äq.) und Hünigbase (10.1 mg, 0.078 mmol, 2.0 Äq.) in Dichlormethan (0.5 mL) gelöst. Die Lösung des Amins wird zum Kopplungsreagenz getropft. Nach 24 h bei RT wird das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und Reinigung mittels Flash ergibt das Produkt mit 20.5 mg, 0.026 mmol, 67%.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 8.54 (s, 1H, H_{Harnstoff}), 8.52 (s, 1H, H_{Harnstoff}), 8.01 (t, $^3J_{H,H} = 5.66$ Hz, 1H, H_{Amid}), 7.38–7.32 (m, 4H, H_{arom.}), 7.17–7.13 (m, 4H, H_{arom.}), 6.98–6.84 (m, 4H, H_{arom.}), 3.97 (s, 2H, CO₂CH₂), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 3.58–3.55 (m, 2H, CH₂), 3.54–3.52 (m, 2H, CH₂), 3.51 (s, 8H, 4 x CH₂), 3.41 (t, $^3J_{H,H} = 5.82$ Hz, 2H, NHCH₂CH₂), 3.34 (s, CH₂, NHCOCH₂), 3.20 (q, $^3J_{H,H} = 5.79$ Hz, 2H, NHCH₂CH₂), 2.97 (bs, 4H, 2 x CH₂), 2.78–2.51 (m,

8H, 3 x CH₂), 1.41 (s, 9H, C(CH₃)₃). **Schmelzpunkt:** 122.9–125.7 °C. **LC-MS:** positiv [*m/z*] = 778.7 ([M+H]⁺). **HRMS** (ESI-QTOF) berechnet für C₄₂H₅₉N₅O₉ [M+Na]⁺: 800.4205; gefunden: 800.4172. **Reinheit:** 96%.

5.10 Festphasensynthese

Die Oligonukleotide von der Firma EllaBiotech wurden zunächst mittels DMF, MeOH, ACN und CH_2Cl_2 gewaschen und deren Masse bestimmt.

Im nächsten Schritt wurden eine Testabspaltung der Oligonukleotide von der Festphase mittels AMA-Lösung (30 % aq. Ammoniak / 40 % aq. Methylamin, 1 : 1, vol. / vol.) durchgeführt. Hierfür werden 20 nmol des gebundenen Oligonukleotids mit AMA-Lösung (250 μL) versetzt und für 4 h bei 37 °C dispergiert. Folgend wird TRIS-Puffer (1 M, pH = 5.0, 20 μL) addiert und die Lösung in der SpeedVac getrocknet. Der erhaltene Rückstand wird in Wasser (200 μL) aufgenommen, filtriert und mittels HPLC evaluiert. Die Retentionszeit dient als Referenz.

Die erste Kupplungsreaktion mit beiden festphasengebundenen Oligonukleotiden (P-PLA und NP-PLA) wird in jeweils 18 x 250 nmol Einzelgefäße durchgeführt (Pro Oligonukleotid: 4.5 μmol). Folgend sind die Startmaterialien für einen 250 nmol Ansatz aufgelistet:

Tabelle 27: Auflistung der Reagenzien mit Masse (m), Stoffmenge (n), Äquivalente (Äq.) und Volumen (V). (P-PLA = Festphasengebundenen Priming Oligonukleotid, NP-PLA = Festphasengebundenen Non-Priming Oligonukleotid)

Name	m	n	Äq.	V
P-PLA	8.2 mg	250 nmol	1.0	
NP-PLA	6.8 mg	250 nmol	1.0	
HATU	9.5 mg	25.0 μmol	100	
DIPEA		62.5 μmol	250	10.9 μL
L4	12.2 mg	25.0 μmol	100	
DMF				225 μL

Die Oligonukleotide, HATU und der Linker werden im Vorfeld für 15 min unter Vakuum getrocknet. Von allen Reagenzien werden Stammlösungen mit abs. DMF angesetzt. Für den in Tabelle 27 dargestellten Ansatz wird zunächst HATU in DMF (75 μL) gelöst und zum Linker L4 in DMF (75 μL) gegeben. Folgend wird DIPEA addiert und die Säure für 10 min bei RT aktiviert. In der Zwischenzeit wird das Oligonukleotid in DMF (75 μL) resuspendiert und die aktivierte Säure hinzugegeben. Nach 2 h Dispersion bei RT wird das Lösemittel mittels Säule entfernt und die Festphase je 3 x mit 200 μL DMF, MeOH, ACN und CH_2Cl_2 gewaschen. Nach der Trocknung im Vakuum wird die Reaktion wiederholt. Nach Abschluss der Reaktion wird eine Testabspaltung (siehe oben) durchgeführt. Neben der HPLC-Probe werden 100 μL für eine Massenbestimmung mittels MALDI vorbereitet. Dafür werden die Proben mittels ZipTip-Protokoll (Millipore Corporation) entsalzt.

EXPERIMENTALTEIL

Tabelle 28: Auswertung der Massen mittels MALDI. (theoretische mittlere Masse $[M+H]^+$ = Bestimmung mittels Bruker Compass DataAnalysis 4.4, P = Priming Oligonukleotid ohne Schutzgruppen, NP = Non-Priming Oligonukleotid ohne Schutzgruppen, PL4 = Priming Oligonukleotid mit PEG-4 Linker ohne Schutzgruppen, NPL4 = Non-Priming Oligonukleotid mit PEG-4 Linker ohne Schutzgruppen)

Name	M (theor.) [g/mol]	M (gefun.) [g/mol]
P	10014.0	10014.3
NP	11030.7	11026.3
PL4	10261.2	10261.8
NPL4	11277.9	11275.2

Freie Amine werden mittels Capping inaktiviert. Dafür wird die Capping-Lösung (THF/Methylimidazol 1:1; THF/Pyridin/Essigsäureanhydrid 8:1:1) zusammengeführt und mit 3 x 200 μ L für je 30 s inkubiert. Anschließend wird die Festphase je 3 x mit 200 μ L DMF, MeOH, ACN und CH_2Cl_2 gewaschen. Folgend wird die Fmoc-Schutzgruppe mittels Piperidin (20 % in DMF) bei RT für 5 min abgespalten. Anschließend wird die Festphase je 3 x mit 200 μ L DMF, MeOH, ACN und CH_2Cl_2 gewaschen.

Die Kupplungen mit den Säuren werden im Maßstab von 750 nmol Ansätzen durchgeführt. Wieder werden diese auf 250 nmol Ansätze aufgeteilt. Insgesamt werden 8 750 nmol Ansätze also 24 250 nmol Ansätze gleichzeitig durchgeführt.

Tabelle 29: Auflistung der Reagenzien mit Masse (m), Stoffmenge (n), Äquivalente (Äq.) und Volumen (V). (PL4 = Festphasengebundenes Priming Oligonukleotid mit L4, NPL4 = Festphasengebundenes Non-Priming Oligonukleotid mit L4)

Name	m	n	Äq.	V
PL4	8.2 mg	250 nmol	1.0	
NPL4	6.8 mg	250 nmol	1.0	
HATU	9.5 mg	25.0 μ mol	100	
DIPEA		62.5 μ mol	250	10.9 μ L
7 TO	29.0 mg	25.0 μ mol	100	
2 PT	38.0	25.0 μ mol	100	
48 OT	32.0	25.0 μ mol	100	
55 SP	46.0	25.0 μ mol	100	
DMF				225 μ L

EXPERIMENTALTEIL

Die Kupplungsreaktionen werden wie in Tabelle 29 beschrieben durchgeführt. Abweichend von der zuvor beschriebenen Synthese wird die Kupplung einmal für 4 h bei RT durchgeführt, da nicht genug Startmaterial zur Verfügung stand. Nach Ende der Reaktion werden die 3 Einzelreaktionen kombiniert und 8 AMA-Abspaltungen (je 1 mL) angesetzt. Nach Entfernen der Lösung werden die Rohprodukte über semiprep-HPLC gereinigt und das Laufmittel mittels Lyophilisation entfernt.

Tabelle 30: Experimentelle Auswertung der finalen Sonden **144** – **151** mit Reinheit, theoretischer und experimenteller mittlerer Masse $[M+H]^+$, Masse und Ausbeute über zwei Schritte. (Reinheit = Bestimmung der Reinheit mittels HPLC; theoretische mittlere Masse $[M+H]^+$ = Bestimmung mittels Bruker Compass DataAnalysis 4.4; gefundene mittlere Masse $[M+H]^+$ = Bestimmung mittels MALDI; Ausbeute = Ausbeute über zwei Schritte bezogen auf das eingesetzte Oligonukleotid)

Name	Reinheit [%]	M (theor.) [g/mol]	M (gefun.) [g/mol]	Masse [mg]	Ausbeute [%]
144 PL4TO	92	10631.8	10632.3	1.87	13
145 PL4PT	96	10746.8	10746.5	1.77	13
146 PL4OT	98	10675.7	10675.4	1.06	8
147 PL4SP	99	10858.1	10857.3	1.05	7
148 NPL4TO	99	11648.3	11648.2	2.01	13
149 NPL4PT	98	11763.5	11762.9	2.25	15
150 NPL4OT	99	11692.3	11692.6	1.50	10
151 NPL4SP	96	11874.6	11874.2	1.33	9

5.11 MODELLER

Python Script:

```
# Comparative modeling by the automodel class
from modeller import *          # Load standard Modeller classes
from modeller.automodel import * # Load the automodel class

log.verbose()    # request verbose output
env = environ()  # create a new MODELLER environment to build this model in

# directories for input atom files
env.io.atom_files_directory = ['.', '../atom_files']

a = automodel(env,
              alnfile = 'Alignment1.ali',    # alignment filename
               knowns  = '5N2S',            # codes of the templates
               sequence = 'A3seq')           # code of the target
a.starting_model= 1                        # index of the first model
a.ending_model  = 1000                      # index of the last model
# (determines how many models to calculate)
a.make()                                     # do the actual comparative modeling

import sys

log.verbose()
env = environ()

env.io.atom_files_directory = ['.', '../atom_files']

# Build 3 models, and assess with both DOPE and GA341
a = automodel(env, alnfile = 'Alignment1.ali', knowns = '5N2S',
               sequence = 'A3seq', assess_methods=(assess.DOPE, assess.GA341))
a.starting_model= 1
a.ending_model  = 1000
a.make()

# Get a list of all successfully built models from a.outputs
ok_models = [x for x in a.outputs if x['failure'] is None]

# Rank the models by DOPE score
key = 'DOPE score'
if sys.version_info[:2] == (2,3):
    # Python 2.3's sort doesn't have a 'key' argument
    ok_models.sort(lambda a,b: cmp(a[key], b[key]))
else:
    ok_models.sort(key=lambda a: a[key])

# Get top model
m = ok_models[0]
print("Top model: %s (DOPE score %.3f)" % (m['name'], m[key]))
```

Alignment:

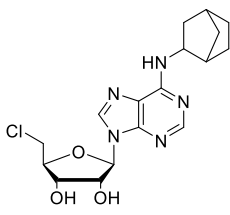
```

>P1;5N2S
structureX:5N2S:1:A:280:A:A1:human:3.30:0.28
-----SAFQAAYIGIEVLIALVSVPGNVLVIWAVKVNQALRDATFCF
IVSLAVADVLVGALVIPLAILINIGPQTYFHTCLMVACPVLILAQSSILA
LLAIAVDRLRVKIPLRYKMVVTPRRAAVAIAGCWILSFVVGLTPMFGWN
NLSAVERAWAAAGSMGEPVIKCEFEKVISMEYMVYFNFFVWVLPPLLLMV
LIYLEVFALIRKQL-----PQKYGKELKIAKSAALIAFLFALSW
LPLHILNCITLFCPSCHKPSILTYIAIFLAHGNSAMNPIVYAFRIQKF*

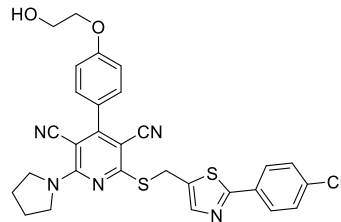
>P1;A3seq
sequence:A3:1::282::A3:human::
-----SLANVTYITMEIFIGLCAIVGNVLVICVVKLNPSLQTTTFYF
IVSLALADIAGVLMPLAIVVSLGITIHFYSCLEFMTCLLLIFTHASIMS
LLAIAVDRLRVKLTVRYKRVTTTHRRIWLAALGLCWLVSFVGLTPMFGWN
MKLTSEY-----HRNVTFLSCQFVSVMRMDYMVYFSFLTWIFIPLVVMC
AIYLDIFYIIRNKLSLNLNSKETGAFYGREFKTAKSLFLVLFALSW
LPLSIINCIYF--NGEVPQLVLYMGILLSHANSMMNPIVYAYKIKKF*
    
```

6. Anhang I

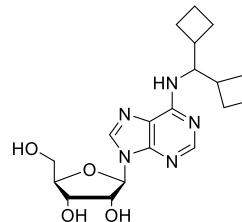
A₁AR Agonisten



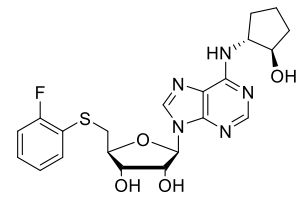
Cl-ENBA



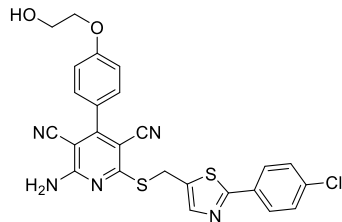
Neladenoson



MRS7469

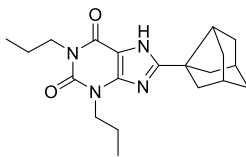


CVT-3619

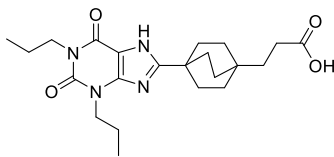


Capadenoson

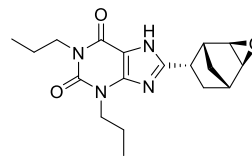
A₁AR Antagonisten



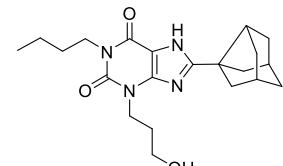
Rolofylline



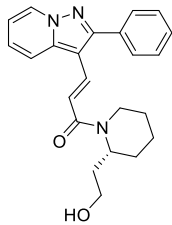
Toponafylline



Naxifylline

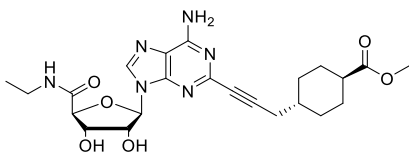


PSB-36

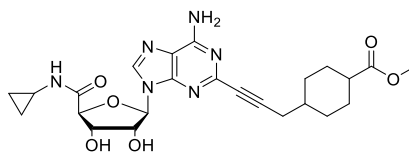


FK-453

A_{2A}AR Agonisten

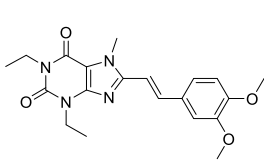


Apadenoson

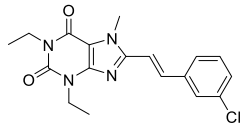


Evodenon

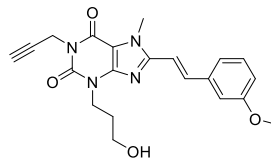
A_{2A}AR Antagonisten



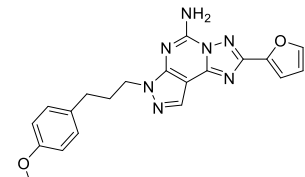
Istradefylline



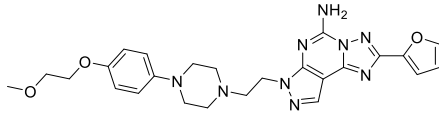
CSC



MSX2

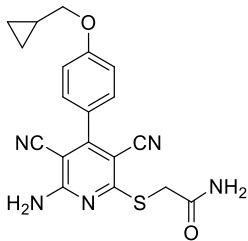


SCH-442416



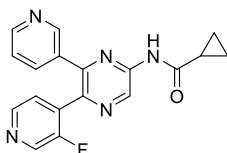
Preladenant

A_{2B}AR Agonist

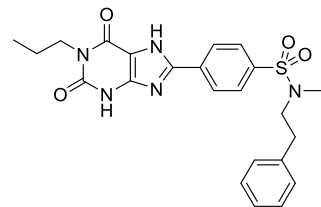


BAY 60-6583

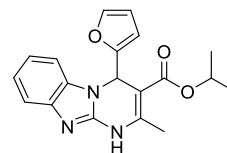
A_{2B}AR Antagonisten



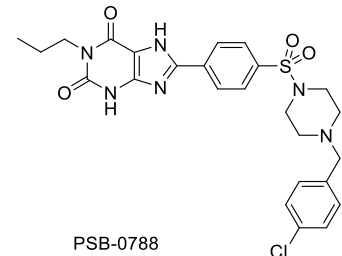
LAS101057



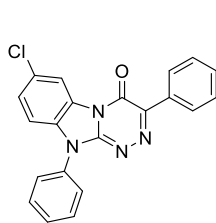
54TM



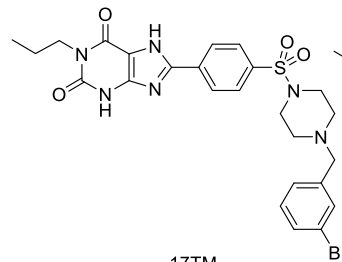
ISAM140



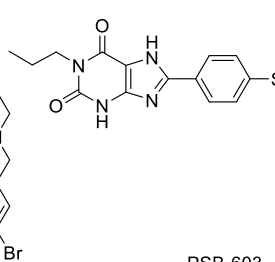
PSB-0788



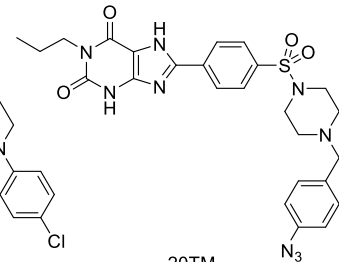
4



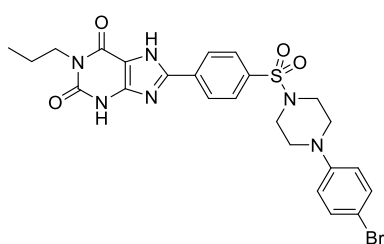
17TM



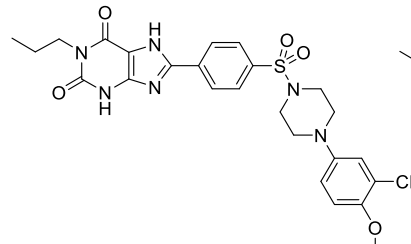
PSB-603



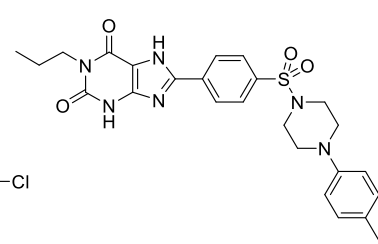
20TM



PSB-1901

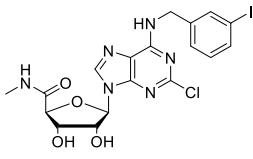


46TM

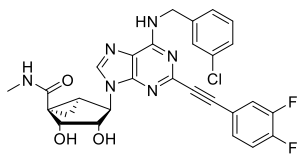


39TM

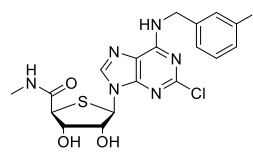
A₃AR Agonisten



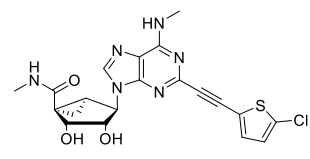
Namodenoson



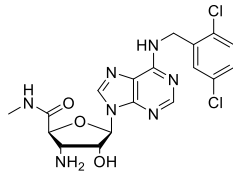
MRS5698



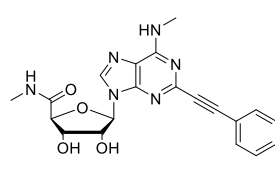
LJ-529



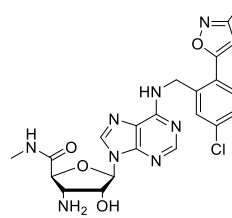
MRS5980



CP-532,903

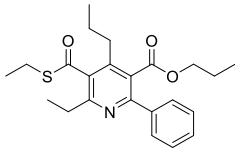


32JM

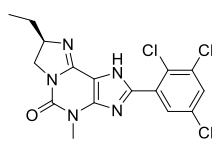


CP-608,039

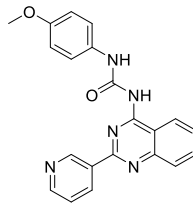
A₃AR Antagonisten



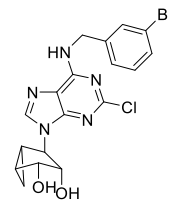
MRS1523



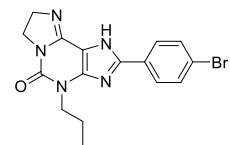
PSB-10



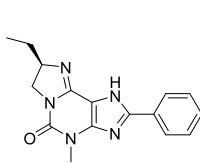
VUF-5574



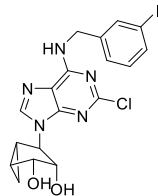
MRS5147



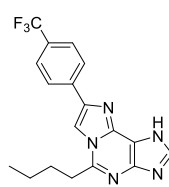
KF26777



PSB-11



MRS5127



OT-7999

7. Abkürzungsverzeichnis

[{Rh(COD)Cl}₂] = 1,5-Cyclooctadienrhodium(I)chlorid Dimer

2,2-DMP = 2,2-Dimethoxypropan

AC = Adenylylcyclase

AR = Adenosinrezeptor

ATP = Adenosintri-phosphat

AUS = *Analytical Ultracentrifugation*

BiFC = *Biomolecular Fluorescence Complementation Assay*

Boc₂O = Di-^tButyldicarbonat

BODIPY = 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen

BRENDA = BRAunschweiger ENzyme Database

BRET = *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*

BSA = *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid

CAE = *Capillary Affinity Electrophoresis*

cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat

CB = Cannabinoid

CbzCl = Chlorameisensäuremethylester

CCPA = 2-Chloro-*N*⁶-cyclopentyladenosin

Cl-IB-MECA = 1-[2-Chloro-6-[[[(3-iodophenyl)methyl]amino]-9*H*-purin-9-yl]-1-deoxy-*N*-methyl-β-D-ribofuranuronamid

COMU = (1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)dimethylamino-morpholino-carbenium-hexafluorophosphat

CSA = Camphersulfonsäure

DAG = Diacylglycerol

DCE = Dichlorethan

DIPEA = Diisopropylethylamin

DLS = *Dynamic Light Scattering*

DMAP = 4-(Dimethylamino)pyridin

DMF = *N,N*-Dimethylformamid

DMP = Dess-Martin-Periodinan

DMSO = Dimethylsulfoxid

DNA = Desoxyribonukleinsäure

dNTP = Nukleosidtriphosphat

DOPE = *Discrete Optimized Protein Energy*

DOSY = *Diffusion Ordered Spectroscopy*
 DPI = *Dual-polarization Interferometry*
 DPPE = 1,2-Bis(diphenylphosphino)ethan
 DR = Dopaminrezeptoren
 EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure
 ELISA = *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*
 ESI = *Electron Spray Ionization*
 FCCS = *Fluorescence Cross-correlation Spectroscopy*
 FCS = *Fluorescence Correlation Spectroscopy*
 FGFR = Fibroblasten-Wachstumsfaktoren
 FmocCl = Fluorenylmethyloxycarbonylchlorid
 FRET = *Förster Resonance Energy Transfer*
 GABA = Gamma-Aminobuttersäure
 GDP = Guanosindiphosphat
 GFP = *Green Fluorescent Protein*
 GLIDE = *Grid-based Ligand Docking with Energetics*
 GPCR = G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
 G-Protein = Guanosintriphosphat-bindendes Protein
 GTP = Guanosintriphosphat
 HATU = *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorphosphat
 HEK = *Human Embryonic Kidney*
 HIV = Humane Immundefizienz-Virus
 HMDS = Hexamethyldisilazan
 HMN = *Horizontal Molecular Network*
 HRMS = *High-resolution Mass Spectrometry*
 HT = 5-Hydroxytryptamin
 IP₃ = Inositoltriphosphat
 ITC = *Isothermal Titration Calorimetry*
 K_D = Dissoziationskonstante
 KHMDS = Kaliumhexamethyldisilazid
 KNIME = Konstanz Information Miner
 LALS = *Low Angle Light Scattering*
 LS = *Light Scattering*

- MALDI = *Matrix-assisted Laser Desorption Ionization*
- MALS = *Multi Angle Light Scattering*
- MAPK = *Mitrogen-activated Protein Kinase*
- M-Rezeptoren = Muskarinische Rezeptoren
- MS = Massenspektrometrie
- MS/MS = *Tandem Mass Spectrometry*
- MsCl = Mesylchlorid
- MST = *Microscale Thermophoresis*
- M_w = gewichtsgemittelte molare Masse
- NBS = *N*-Bromsuccinimid,
- NMR = *Nuclear Magnetic Resonance*
- NMR PRE = *Nuclear Magnetic Resonance Paramagnetic Relaxation Enhancement*
- PAGE = *Polyacrylamid-Gelelektrophoresis*
- PAM = Positiv-allosterischer Modulator
- PBS = phosphatgepufferte Salzlösung
- PCA = *Proteinfragment Complementation Assay*
- PCR = Polymerasekettenreaktion
- PDB = *Protein Data Bank*
- PEG = Polyethylenglykol
- PKA = Proteinkinase A
- PKC = Proteinkinase C
- PLA = *Proximity Ligation Assay*
- PLC = Phospholipase C
- PMBCl = *p*-Methoxybenzylchlorid
- PPSE = Trimethylsilylpolyphosphat
- PSB = *Pharmaceutical Science Bonn*
- qPCR = *Quantifying PCR*
- RALS = *Right Angle Light Scattering*
- RAMP = *Receptor Activity-modifying Membrane Protein*
- RCA = *Rolling Circle Amplification*
- RGS-Protein = *Regulator of G Protein Signaling*
- R_H = hydrodynamischer Radius
- Rho-GEF = Rho-Protein Guaninnukleotid Austauschfaktor

RM = Rezeptormosaik
RNA = Ribonukleinsäure
RNase = Ribonuklease
RT = Raumtemperatur
SAXS = *Small Angle X-ray Scattering*
SDS = *Sodium Dodecyl Sulfate*
SEC = *Size Exclusion Chromatography*
SLS = *Single Light Scattering*
SMPB = Succinimidyl-4-[*p*-maleimidophenyl]butyrat
SPA = *Scintillation Proximity Assay*
SpIDA = *Spatial Intensity Distribution Analysis*
SPINE = *Strep-Protein Interaction Experiment*
SPR = *Surface Plasmon Resonance*
SPT = *Single Particle Tracking*
TBAB = Tetrabutylammoniumbromid
TFA = Trifluoressigsäure
THF = Tetrahydrofuran
TIM = Triosephosphatisomerase
TIPS = Triisopropylsilan
TIRFM = *Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy*
TMPA = Trimethylphosphonsäure
TMSOTf = Trimethylsilyltrifluormethansulfonat,
TosCl = Tosylchlorid
TRACT = *TROSY for Rotational Correlation Times*
TROSY = *Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy*
UV = Ultraviolett
VMN = *Vertical Molecular Network*
Y2H = *Yeast Two-Hybrid*
YFP = *Yellow Fluorescent Protein*

8. Literatur

1. Dorsam, R. T.; Gutkind, J. S. G protein-coupled receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 79–94.
2. Fredriksson, R.; Lagerström, M. C.; Lundin, L.-G.; Schiöth, H. B. The G protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 1256–1272.
3. Kubo, Y.; Miyashita, T.; Murata, Y. Structural basis for a Ca²⁺-sensing function of the metabotropic glutamate receptors. *Science* **1998**, *279*, 1722–1725.
4. Dunkel, A.; Steinhaus, M.; Kotthoff, M.; Nowak, B.; Krautwurst, D.; Schieberle, P.; Hofmann, T. Nature's chemical signatures in human olfaction: a foodborne perspective for future biotechnology. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 7124–7143.
5. Strader, C. D.; Fong, T. M.; Tota, M. R.; Underwood, D.; Dixon, R. A. F. Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, *63*, 101–132.
6. Fay, S. P.; Domalewski, M. D.; Sklar, L. A. Evidence for protonation in the human neutrophil formyl peptide receptor binding pocket. *Biochemistry* **1993**, *32*, 1627–1631.
7. Jüppner, H. Molecular cloning and characterization of a parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor: a member of an ancient family of G protein-coupled receptors. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **1994**, *3*, 371–378.
8. Funk, C. D.; Furci, L.; Moran, N.; Fitzgerald, G. A. Point mutation in the seventh hydrophobic domain of the human thromboxane A₂ receptor allows discrimination between agonist and antagonist binding sites. *Mol. Pharmacol.* **1993**, *44*, 934–939.
9. Jacobson, K. A.; Müller, C. E. Medicinal chemistry of adenosine, P₂Y and P₂X receptors. *Neuropharmacology* **2016**, *104*, 31–49.
10. Kandori, H.; Shichida, Y.; Yoshizawa, T. Photoisomerization in rhodopsin. *Biochemistry* **2001**, *66*, 1197–1209.
11. Barnes, N. M.; Sharp, T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* **1999**, *38*, 1083–1152.
12. Mishra, A.; Singh, S.; Shukla, S. Physiological and functional basis of dopamine receptors and their role in neurogenesis: possible implication for Parkinson's disease. *J. Exp. Neurosci.* **2018**, *12*.
13. Nelson, G.; Hoon, M. A.; Chandrashekar, J.; Zhang, Y.; Ryba, N. J. P.; Zuker, C. S. Mammalian sweet taste receptors. *Cell* **2001**, *106*, 381–390.
14. Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C. A.; Motoshima, H.; Fox, B. A.; Trong, I. L.; Teller, D. C.; Okada, T.; Stenkamp, R. E.; Yamamoto, M.; Miyano, M. Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science* **2000**, *289*, 739–745.
15. Strosberg, A. D. Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. *Protein Sci.* **1993**, *2*, 1198–1209.
16. Parsons, M. E.; Ganellin, C. R. Histamine and its receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *147*, 127–135.
17. Salazar, N. C.; Chen, J.; Rockman, H. A. Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 1006–1018.
18. Galligan, J. J.; Sternini, C. Insights into the role of opioid receptors in the GI tract: experimental evidence and therapeutic relevance. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2017**, *239*, 363–378.
19. Tse, L. H.; Wong, Y. H. GPCRs in autocrine and paracrine regulations. *Front. Endocrinol.* **2019**, *10*.
20. Ivell, R.; Kotula-Balak, M.; Glynn, D.; Heng, K.; Anand-Ivell, R. Relaxin family peptides in the male reproductive system—a critical appraisal. *Mol. Human Reprod.* **2010**, *17*, 71–84.
21. Holmes, C. L.; Landry, D. W.; Granton, J. T. Science review: vasopressin and the cardiovascular system part 1-receptor physiology. *Crit. Care* **2003**, *7*, 427–434.
22. Foster, S. R.; Hauser, A. S.; Vedel, L.; Strachan, R. T.; Huang, X.-P.; Gavin, A. C.; Shah, S. D.; Nayak, A. P.; Haugaard-Kedström, L. M.; Penn, R. B.; Roth, B. L.; Bräuner-Osborne, H.; Gloriam, D. E. Discovery of human signaling systems: pairing peptides to G protein-coupled receptors. *Cell* **2019**, *179*, 895–908.

23. Fredholm, B. B.; IJzerman, A. P.; Jacobson, K. A.; Klotz, K.-N.; Linden, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 527–552.
24. Fredholm, B. B.; IJzerman, A. P.; Jacobson, K. A.; Linden, J.; Müller, C. E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors—an update. *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63*, 1–34.
25. Jaakola, V.-P.; Griffith, M. T.; Hanson, M. A.; Cherezov, V.; Chien, E. Y. T.; Lane, J. R.; IJzerman, A. P.; Stevens, R. C. The 2.6 angstrom crystal structure of a human A_{2A} adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* **2008**, *322*, 1211–1217.
26. Carpenter, B.; Nehmé, R.; Warne, T.; Leslie, A. G. W.; Tate, C. G. Structure of the adenosine A_{2A} receptor bound to an engineered G protein. *Nature* **2016**, *536*, 104–107.
27. Rasmussen, S. G. F.; DeVree, B. T.; Zou, Y.; Kruse, A. C.; Chung, K. Y.; Kobilka, T. S.; Thian, F. S.; Chae, P. S.; Pardon, E.; Calinski, D. Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor–G_s protein complex. *Nature* **2011**, *477*, 549–555.
28. Neves, S. R.; Ram, P. T.; Iyengar, R. G protein pathways. *Science* **2002**, *296*, 1636–1639.
29. Milligan, G.; Kostenis, E. Heterotrimeric G proteins: a short history. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *147*, 46–55.
30. Müller, C. E.; Jacobson, K. A. Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs. *Biochim. Biophys. Acta.* **2011**, *1808*, 1290–1308.
31. Hill, S. J.; May, L. T.; Kellam, B.; Woolard, J. Allosteric interactions at adenosine A₁ and A₃ receptors: new insights into the role of small molecules and receptor dimerization. *Br. J. Pharmacol.* **2014**, *171*, 1102–1113.
32. Matthews, J. M.; Sunde, M. Dimers, oligomers, everywhere. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2012**, *747*, 1–18.
33. Krissinel, E. Macromolecular complexes in crystals and solutions. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2011**, *67*, 376–385.
34. Maes, D.; Zeelen, J. P.; Thanki, N.; Beaucamp, N.; Alvarez, M.; Thi, M. H.; Backmann, J.; Martial, J. A.; Wyns, L.; Jaenicke, R.; Wierenga, R. K. The crystal structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *thermotoga maritima*: a comparative thermostability structural analysis of ten different TIM structures. *Proteins* **1999**, *37*, 441–453.
35. Walden, H.; Bell, G. S.; Russell, R. J.; Siebers, B.; Hensel, R.; Taylor, G. L. Tiny TIM: a small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* **2001**, *306*, 745–757.
36. Goodsell, D. S.; Olson, A. J. Structural symmetry and protein function. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29*, 105–153.
37. Ali, M. H.; Imperiali, B. Protein oligomerization: how and why. *Biorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5013–5020.
38. Wlodawer, A.; Miller, M.; Jaskolski, M.; Sathyanarayana, B.; Baldwin, E.; Weber, I.; Selk, L.; Clawson, L.; Schneider, J.; Kent, S. Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease. *Science* **1989**, *245*, 616–621.
39. Garratt, R. C.; Valadares, N. F.; Bachega, J. F. R. Oligomeric Proteins. In *Encyclopedia of Biophysics*, Roberts, G. C. K., Ed. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2013**; 1781–1789.
40. Marianayagam, N. J.; Sunde, M.; Matthews, J. M. The power of two: protein dimerization in biology. *Trends Biochem. Sci.* **2004**, *29*, 618–625.
41. Yang, Z.; Lanks, C. W.; Tong, L. Molecular mechanism for the regulation of human mitochondrial NAD(P)⁺-dependent malic enzyme by ATP and fumarate. *Structure* **2002**, *10*, 951–960.
42. Bonafe, C. F.; Matsukuma, A. Y.; Matsuura, M. S. ATP-induced tetramerization and cooperativity in hemoglobin of lower vertebrates. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 1196–1198.
43. Crick, F. H. C.; Watson, J. D. Structure of small viruses. *Nature* **1956**, *177*, 473–475.
44. Ellis, N.; Gallant, J. An estimate of the global error frequency in translation. *Mol. Gen. Genet.* **1982**, *188*, 169–172.
45. Parker, J. Errors and alternatives in reading the universal genetic code. *Microbiol. Rev.* **1989**, *53*, 273–298.

46. Manley, J. L. Synthesis and degradation of termination and premature-termination fragments of β -galactosidase *in vitro* and *in vivo*. *J. Mol. Biol.* **1978**, *125*, 407–432.
47. Kurland, C. Reading frame errors on ribosomes. *Nonsense Mutations and tRNA suppressors* **1979**, 97–108.
48. Finkelstein, A. V.; Bogatyreva, N. S.; Garbuzynskiy, S. O. Restrictions to protein folding determined by the protein size. *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 1884–1890.
49. Levy, E. D.; Erba, E. B.; Robinson, C. V.; Teichmann, S. A. Assembly reflects evolution of protein complexes. *Nature* **2008**, *453*, 1262–1265.
50. Monod, J.; Wyman, J.; Changeux, J.-P. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.* **1965**, *12*, 88–118.
51. Bennett, M. J.; Choe, S.; Eisenberg, D. Domain swapping: entangling alliances between proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 3127–3131.
52. Choe, S.; Bennett, M. J.; Fujii, G.; Curmi, P. M. G.; Kantardjieff, K. A.; Collier, R. J.; Eisenberg, D. The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature* **1992**, *357*, 216–222.
53. Crestfield, A. M.; Stein, W. H.; Moore, S. On the aggregation of bovine pancreatic ribonuclease. *Arch. Biochem. Biophys.* **1962**, 217–222.
54. Liu, Y.; Gotte, G.; Libonati, M.; Eisenberg, D. Structures of the two 3D domain-swapped RNase A trimers. *Protein Sci.* **2002**, *11*, 371–380.
55. Baiesi, M.; Orlandini, E.; Trovato, A.; Seno, F. Linking in domain-swapped protein dimers. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 33872.
56. Liu, Y.; Eisenberg, D. 3D domain swapping: as domains continue to swap. *Protein Sci.* **2002**, *11*, 1285–1299.
57. Landschulz, W. H.; Johnson, P. F.; McKnight, S. L. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **1988**, *240*, 1759–1764.
58. Crick, F. The packing of α -helices: simple coiled-coils. *Acta Crystallogr.* **1953**, *6*, 689–697.
59. Mason, J. M.; Arndt, K. M. Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 170–176.
60. Wolf, E.; Kim, P. S.; Berger, B. MultiCoil: a program for predicting two- and three-stranded coiled coils. *Protein Sci.* **1997**, *6*, 1179–1189.
61. Kammerer, R. A. α -Helical coiled-coil oligomerization domains in extracellular proteins. *Matrix Biol.* **1997**, *15*, 555–565.
62. Gonzalez, L.; Brown, R. A.; Richardson, D.; Alber, T. Crystal structures of a single coiled-coil peptide in two oligomeric states reveal the basis for structural polymorphism. *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 1002–1010.
63. Garritsen, A.; van Galen, P. J.; Simonds, W. F. The N-terminal coiled-coil domain of β is essential for γ association: a model for G protein $\beta\gamma$ subunit interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 7706–7710.
64. Ross, C. A.; Poirier, M. A. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 10–17.
65. Alzheimer, A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde [About a peculiar disease of the cerebral cortex]. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtlich Medizin* **1907**, *64*, 146–148.
66. Choi, M. L.; Gandhi, S. Crucial role of protein oligomerization in the pathogenesis of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *FEBS J.* **2018**, *285*, 3631–3644.
67. Lue, L. F.; Kuo, Y. M.; Roher, A. E.; Brachova, L.; Shen, Y.; Sue, L.; Beach, T.; Kurth, J. H.; Rydel, R. E.; Rogers, J. Soluble amyloid β peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **1999**, *155*, 853–862.
68. McLean, C. A.; Cherny, R. A.; Fraser, F. W.; Fuller, S. J.; Smith, M. J.; Konrad, V.; Bush, A. I.; Masters, C. L. Soluble pool of A β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **1999**, *46*, 860–866.
69. Glenner, G. G.; Wong, C. W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, *120*, 885–890.
70. Haass, C.; Selkoe, D. J. Cellular processing of β -amyloid precursor protein and the genesis of amyloid β -peptide. *Cell* **1993**, *75*, 1039–1042.

71. Chen, G.-f.; Xu, T.-h.; Yan, Y.; Zhou, Y.-r.; Jiang, Y.; Melcher, K.; Xu, H. E. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol. Sin.* **2017**, *38*, 1205–1235.
72. Hardy, J. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* **1997**, *20*, 154–159.
73. Hardy, J. A.; Higgins, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **1992**, *256*, 184–185.
74. Kassler, K.; Horn, A. H. C.; Sticht, H. Effect of pathogenic mutations on the structure and dynamics of Alzheimer's A β ₄₂-amyloid oligomers. *J. Mol. Model.* **2010**, *16*, 1011–1020.
75. Hardy, J.; Selkoe, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **2002**, *297*, 353–356.
76. Elam, J. S.; Taylor, A. B.; Strange, R.; Antonyuk, S.; Doucette, P. A.; Rodriguez, J. A.; Hasnain, S. S.; Hayward, L. J.; Valentine, J. S.; Yeates, T. O.; Hart, P. J. Amyloid-like filaments and water-filled nanotubes formed by SOD1 mutant proteins linked to familial ALS. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2003**, *10*, 461–467.
77. DiDonato, M.; Craig, L.; Huff, M. E.; Thayer, M. M.; Cardoso, R. M. F.; Kassmann, C. J.; Lo, T. P.; Bruns, C. K.; Powers, E. T.; Kelly, J. W.; Getzoff, E. D.; Tainer, J. A. ALS mutants of human superoxide dismutase form fibrous aggregates via framework destabilization. *J. Mol. Biol.* **2003**, *332*, 601–615.
78. Lee, S.; Eisenberg, D. Seeded conversion of recombinant prion protein to a disulfide-bonded oligomer by a reduction-oxidation process. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2003**, *10*, 725–730.
79. Janowski, R.; Kozak, M.; Jankowska, E.; Grzonka, Z.; Grubb, A.; Abrahamson, M.; Jaskolski, M. Human cystatin C, an amyloidogenic protein, dimerizes through three-dimensional domain swapping. *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 316–320.
80. Nilsson, M.; Wang, X.; Rodziewicz-Motowidlo, S.; Janowski, R.; Lindstrom, V.; Onnerfjord, P.; Westermark, G.; Grzonka, Z.; Jaskolski, M.; Grubb, A. Prevention of domain swapping inhibits dimerization and amyloid fibril formation of cystatin C: use of engineered disulfide bridges, antibodies, and carboxymethylpapain to stabilize the monomeric form of cystatin C. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 24236–24245.
81. Sanders, A.; Jeremy Craven, C.; Higgins, L. D.; Giannini, S.; Conroy, M. J.; Hounslow, A. M.; Waltho, J. P.; Staniforth, R. A. Cystatin forms a tetramer through structural rearrangement of domain-swapped dimers prior to amyloidogenesis. *J. Mol. Biol.* **2004**, *336*, 165–178.
82. Gell, D. A.; Grant, R. P.; Mackay, J. P. The detection and quantitation of protein oligomerization. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2012**, *747*, 19–41.
83. Valdes, R., Jr.; Ackers, G. K. Study of protein subunit association equilibria by elution gel chromatography. *Meth. Enzymol.* **1979**, *61*, 125–142.
84. Hong, P.; Koza, S.; Bouvier, E. S. Size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2012**, *35*, 292–2950.
85. Donald K. McRorie, P. J. V. *Self-associating systems in the analytical ultracentrifuge*. Beckman Instruments: Fullerton, CA, **1993**.
86. Lebowitz, J.; Lewis, M. S.; Schuck, P. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: a tutorial review. *Protein Sci.* **2002**, *11*, 2067–2079.
87. Wyatt, P. J. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Anal. Chim. Acta* **1993**, *272*, 1–40.
88. Mishchenko, M. I.; Travis, L. D.; Mackowski, D. W. T-matrix computations of light scattering by nonspherical particles: a review. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* **1996**, *55*, 535–575.
89. Price, C. P.; Spencer, K.; Whicher, J. Light-scattering immunoassay of specific proteins: a review. *Ann. Clin. Biochem.* **1983**, *20*, 1–14.
90. Philo, J. S. Is any measurement method optimal for all aggregate sizes and types? *AAPS J.* **2006**, *8*, 564–571.
91. Janosi, A. The exponential-distribution in small-angle X-ray-scattering - theory and practice. *Monatsh. Chem.* **1993**, *124*, 815–826.

92. Boldon, L.; Laliberte, F.; Liu, L. Review of the fundamental theories behind small angle X-ray scattering, molecular dynamics simulations, and relevant integrated application. *Nano Rev.* **2015**, *6*, 25661.
93. Jelesarov, I.; Bosshard, H. R. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J. Mol. Recognit.* **1999**, *12*, 3–18.
94. Morizumi, T.; Ou, W. L.; Van Eps, N.; Inoue, K.; Kandori, H.; Brown, L. S.; Ernst, O. P. X-ray crystallographic structure and oligomerization of gloeobacter rhodopsin. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 11283.
95. Spencer, R. K.; Kreutzer, A. G.; Salveson, P. J.; Li, H.; Nowick, J. S. X-ray crystallographic structures of oligomers of peptides derived from β_2 -microglobulin. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 6304–6311.
96. Parker, M. W. Protein structure from x-ray diffraction. *J. Biol. Phys.* **2003**, *29*, 341–362.
97. Lee, D.; Hilty, C.; Wider, G.; Wüthrich, K. Effective rotational correlation times of proteins from NMR relaxation interference. *J. Magn. Reson.* **2006**, *178*, 72–76.
98. Otting, G.; Wüthrich, K. Extended heteronuclear editing of 2D ^1H NMR spectra of isotope-labeled proteins, using the X(ω_1 , ω_2) double half filter. *J. Magn. Reson.* **1989**, *85*, 586–594.
99. Yang, Y.; Ramelot, T. A.; Ni, S.; McCarrick, R. M.; Kennedy, M. A. Measurement of rate constants for homodimer subunit exchange using double electron-electron resonance and paramagnetic relaxation enhancements. *J. Biomol. NMR* **2013**, *55*, 47–58.
100. Jaiswal, N.; Raikwal, N.; Pandey, H.; Agarwal, N.; Arora, A.; Poluri, K. M.; Kumar, D. NMR elucidation of monomer-dimer transition and conformational heterogeneity in histone-like DNA binding protein of helicobacter pylori. *Magn. Reson. Chem.* **2018**, *56*, 285–299.
101. Hernández, H.; Robinson, C. V. Determining the stoichiometry and interactions of macromolecular assemblies from mass spectrometry. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 715–726.
102. Kang, Y.; Schneider, B. B.; Bedford, L.; Covey, T. R. Design characteristics to eliminate the need for parameter optimization in nanoflow ESI-MS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2019**, *30*, 2347–2357.
103. Song, F. A study of noncovalent protein complexes by matrix-assisted laser desorption/ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 1286–1290.
104. Niu, S.; Kim, B. C.; Fierke, C. A.; Ruotolo, B. T. Ion mobility-mass spectrometry reveals evidence of specific complex formation between human histone deacetylase 8 and poly-r(C)-binding protein 1. *Int. J. Mass spectrom.* **2017**, *420*, 9–15.
105. Lima, D. B.; Melchior, J. T.; Morris, J.; Barbosa, V. C.; Chamot-Rooke, J.; Fioramonte, M.; Souza, T. A. C. B.; Fischer, J. S. G.; Gozzo, F. C.; Carvalho, P. C.; Davidson, W. S. Characterization of homodimer interfaces with cross-linking mass spectrometry and isotopically labeled proteins. *Nat. Protoc.* **2018**, *13*, 431–458.
106. Xie, Z.; Schendel, S.; Matsuyama, S.; Reed, J. C. Acidic pH promotes dimerization of Bcl-2 family proteins. *Biochemistry* **1998**, *37*, 6410–6418.
107. Hoa, X. D.; Kirk, A. G.; Tabrizian, M. Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: a review of recent progress. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *23*, 151–160.
108. Thibault, G.; Houry, W. A. Role of the N-terminal domain of the chaperone ClpX in the recognition and degradation of λ phage protein O. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 6717–6724.
109. Escorihuela, J.; Gonzalez-Martinez, M. A.; Lopez-Paz, J. L.; Puchades, R.; Maquieira, A.; Gimenez-Romero, D. Dual-polarization interferometry: a novel technique to light up the nanomolecular world. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 265–294.
110. Swann, M. J.; Peel, L. L.; Carrington, S.; Freeman, N. J. Dual-polarization interferometry: an analytical technique to measure changes in protein structure in real time, to determine the stoichiometry of binding events, and to differentiate between specific and nonspecific interactions. *Anal. Biochem.* **2004**, *329*, 190–198.
111. Zhai, J.; Lee, T.-H.; Small, D. H.; Aguilar, M.-I. Characterization of early stage intermediates in the nucleation phase of A β aggregation. *Biochemistry* **2012**, *51*, 1070–1078.
112. Daghestani, H. N.; Day, B. W. Theory and applications of surface plasmon resonance, resonant mirror, resonant waveguide grating, and dual polarization interferometry biosensors. *Sensors* **2010**, *10*, 9630–9646.

113. Peltomaa, R.; Glahn-Martinez, B.; Benito-Pena, E.; Moreno-Bondi, M. C. Optical biosensors for label-free detection of small molecules. *Sensors* **2018**, *18*.
114. Gao, S.; Zheng, X.; Hu, B.; Sun, M.; Wu, J.; Jiao, B.; Wang, L. Enzyme-linked, aptamer-based, competitive bilayer interferometry biosensor for palytoxin. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *89*, 952–958.
115. Prisci, F.; Konarev, P. V.; Iannuzzi, C.; Pastore, C.; Adinolfi, S.; Martin, S. R.; Svergun, D. I.; Pastore, A. Structural bases for the interaction of frataxin with the central components of iron-sulphur cluster assembly. *Nat. Commun.* **2010**, *1*, 95.
116. Seidel, S. A. I.; Dijkman, P. M.; Lea, W. A.; van den Bogaart, G.; Jerabek-Willemsen, M.; Lazic, A.; Joseph, J. S.; Srinivasan, P.; Baaske, P.; Simeonov, A.; Katritch, I.; Melo, F. A.; Ladbury, J. E.; Schreiber, G.; Watts, A.; Braun, D.; Duhr, S. Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. *Methods* **2013**, *59*, 301–315.
117. Jerabek-Willemsen, M.; André, T.; Wanner, R.; Roth, H. M.; Duhr, S.; Baaske, P.; Breitsprecher, D. MicroScale thermophoresis: interaction analysis and beyond. *J. Mol. Struct.* **2014**, *1077*, 101–113.
118. Jerabek-Willemsen, M.; Wienken, C. J.; Braun, D.; Baaske, P.; Duhr, S. Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. *Assay Drug Dev. Technol.* **2011**, *9*, 342–353.
119. Whitfield, J.; Harada, K.; Bardelle, C.; Staddon, J. M. High-throughput methods to detect dimerization of Bcl-2 family proteins. *Anal. Biochem.* **2003**, *322*, 170–178.
120. Bosworth, N.; Towers, P. Scintillation proximity assay. *Nature* **1989**, *341*, 167–168.
121. Layton, C. J.; Hellinga, H. W. Quantitation of protein-protein interactions by thermal stability shift analysis. *Protein Sci.* **2011**, *20*, 1439–1450.
122. Seetoh, W.-G.; Abell, C. Disrupting the constitutive, homodimeric protein-protein interface in CK2 β using a biophysical fragment-based approach. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 14303–14311.
123. Gautier, I.; Tramier, M.; Durieux, C.; Coppey, J.; Pansu, R. B.; Nicolas, J. C.; Kemnitz, K.; Coppey-Moisan, M. Homo-FRET microscopy in living cells to measure monomer-dimer transition of GFP-tagged proteins. *Biophys. J.* **2001**, *80*, 3000–3008.
124. Jameson, D. M.; Seifried, S. E. Quantification of protein-protein interactions using fluorescence polarization. *Methods* **1999**, *19*, 222–233.
125. Smith, G. P. Phage display: simple evolution in a petri dish (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 14428–14437.
126. Rebar, E. J.; Pabo, C. O. Zinc finger phage: affinity selection of fingers with new DNA-binding specificities. *Science* **1994**, *263*, 671–673.
127. Wolfe, S. A.; Ramm, E. I.; Pabo, C. O. Combining structure-based design with phage display to create new Cys₂His₂ zinc finger dimers. *Structure* **2000**, *8*, 739–750.
128. Lai, J. R.; Fisk, J. D.; Weisblum, B.; Gellman, S. H. Hydrophobic core repacking in a coiled-coil dimer via phage display: insights into plasticity and specificity at a protein-protein interface. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10514–10515.
129. Petrenko, V. A.; Vodyanoy, V. J. Phage display for detection of biological threat agents. *J. Microbiol. Methods* **2003**, *53*, 253–262.
130. Rauch, J. N.; Nie, J.; Buchholz, T. J.; Gestwicki, J. E.; Kennedy, R. T. Development of a capillary electrophoresis platform for identifying inhibitors of protein-protein interactions. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 9824–9831.
131. Shimura, K.; Waki, T.; Okada, M.; Toda, T.; Kimoto, I.; Kasai, K.-i. Analysis of protein-protein interactions with a multi-capillary electrophoresis instrument. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 1886–1894.
132. Ouimet, C. M.; Shao, H.; Rauch, J. N.; Dawod, M.; Nordhues, B.; Dickey, C. A.; Gestwicki, J. E.; Kennedy, R. T. Protein cross-linking capillary electrophoresis for protein-protein interaction analysis. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 8272–8278.
133. Kinoshita, E.; Kinoshita-Kikuta, E.; Koike, T. The cutting edge of affinity electrophoresis technology. *Proteomes* **2015**, *3*, 42–55.

134. Heegaard, N. H.; Kennedy, R. T. Identification, quantitation, and characterization of biomolecules by capillary electrophoretic analysis of binding interactions. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 3122–3133.
135. Aguirre, C.; Goto, Y.; Costas, M. Thermal and chemical unfolding pathways of PaSdsA1 sulfatase, a homo-dimer with topologically interlinked chains. *FEBS Lett.* **2016**, *590*, 202–214.
136. Zhu, H.; Bilgin, M.; Bangham, R.; Hall, D.; Casamayor, A.; Bertone, P.; Lan, N.; Jansen, R.; Bidlingmaier, S.; Houfek, T.; Mitchell, T.; Miller, P.; Dean, R. A.; Gerstein, M.; Snyder, M. Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* **2001**, *293*, 2101–2105.
137. Kung, L. A.; Snyder, M. Proteome chips for whole-organism assays. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 617–622.
138. Bacia, K.; Kim, S. A.; Schwille, P. Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells. *Nat. Methods* **2006**, *3*, 83–89.
139. Hess, S. T.; Huang, S.; Heikal, A. A.; Webb, W. W. Biological and chemical applications of fluorescence correlation spectroscopy: a review. *Biochemistry* **2002**, *41*, 697–705.
140. Tian, Y.; Martinez, M. M.; Pappas, D. Fluorescence correlation spectroscopy: a review of biochemical and microfluidic applications. *Appl. Spectrosc.* **2011**, *65*, 115–124.
141. Tabor, A.; Möller, D.; Hübner, H.; Kornhuber, J.; Gmeiner, P. Visualization of ligand-induced dopamine D_{2S} and D_{2L} receptor internalization by TIRF microscopy. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 10894.
142. Reck-Peterson, S. L.; Derr, N. D.; Stuurman, N. Imaging single molecules using total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM). *Cold Spring Harb. Protoc.* **2010**, 2010.
143. Hern, J. A.; Baig, A. H.; Mashanov, G. I.; Birdsall, B.; Corrie, J. E.; Lazareno, S.; Molloy, J. E.; Birdsall, N. J. Formation and dissociation of M₁ muscarinic receptor dimers seen by total internal reflection fluorescence imaging of single molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 2693–2698.
144. Kasai, R. S.; Ito, S. V.; Awane, R. M.; Fujiwara, T. K.; Kusumi, A. The class-A GPCR dopamine D₂ receptor forms transient dimers stabilized by agonists: detection by single-molecule tracking. *Cell Biochem. Biophys.* **2018**, *76*, 29–37.
145. Padiani, J. D.; Ward, R. J.; Marsango, S.; Milligan, G. Spatial intensity distribution analysis: studies of G protein-coupled receptor oligomerisation. *Trends Pharmacol. Sci.* **2018**, *39*, 175–186.
146. Kim, S. A.; Heinze, K. G.; Waxham, M. N.; Schwille, P. Intracellular calmodulin availability accessed with two-photon cross-correlation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 105–110.
147. Förster, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* **1948**, *437*, 55–75.
148. Sapsford, K. E.; Berti, L.; Medintz, I. L. Materials for fluorescence resonance energy transfer analysis: beyond traditional donor–acceptor combinations. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4562–4589.
149. Clapp, A. R.; Medintz, I. L.; Mattoussi, H. Förster resonance energy transfer investigations using quantum-dot fluorophores. *Chemphyschem* **2006**, *7*, 47–57.
150. Van Munster, E. B.; Kremers, G. J.; Adjobo-Hermans, M. J.; Gadella, T. W., Jr. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) measurement by gradual acceptor photobleaching. *J. Microsc.* **2005**, *218*, 253–262.
151. Mo, X.-L.; Fu, H. BRET: NanoLuc-based bioluminescence resonance energy transfer platform to monitor protein-protein interactions in live cells. In *High Throughput Screening: Methods and Protocols*, Janzen, W. P., Ed. Springer New York: New York, NY, **2016**; 263–271.
152. Bacart, J.; Corbel, C.; Jockers, R.; Bach, S.; Couturier, C. The BRET technology and its application to screening assays. *Biotechnol. J.* **2008**, *3*, 311–324.
153. Couturier, C.; Jockers, R. Activation of the leptin receptor by a ligand-induced conformational change of constitutive receptor dimers. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 26604–26611.
154. Pflieger, K. D. G.; Eidne, K. A. Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nat. Methods* **2006**, *3*, 165–174.

155. Carrillo, J. J.; Padiani, J.; Milligan, G. Dimers of class A G protein-coupled receptors function via agonist-mediated trans-activation of associated G proteins. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 42578–42587.
156. Huang, Z. J.; Edery, I.; Rosbash, M. PAS is a dimerization domain common to drosophila period and several transcription factors. *Nature* **1993**, *364*, 259–262.
157. Free, R. B.; Hazelwood, L. A.; Sibley, D. R. Identifying novel protein-protein interactions using co-immunoprecipitation and mass spectroscopy. *Curr. Protoc. Neurosci.* **2009**, Chapter 5.
158. Herzberg, C.; Weidinger, L. A.; Dorrbecker, B.; Hubner, S.; Stulke, J.; Commichau, F. M. SPINE: a method for the rapid detection and analysis of protein-protein interactions *in vivo*. *Proteomics* **2007**, *7*, 4032–4035.
159. Schmidt, T. G. M.; Skerra, A. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 1528–1535.
160. Vasilescu, J.; Guo, X.; Kast, J. Identification of protein-protein interactions using *in vivo* cross-linking and mass spectrometry. *Proteomics* **2004**, *4*, 3845–3854.
161. Berggård, T.; Linse, S.; James, P. Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics* **2007**, *7*, 2833–2842.
162. Byrne, M. P.; Stites, W. E. Chemically crosslinked protein dimers: stability and denaturation effects. *Protein Sci.* **1995**, *4*, 2545–2558.
163. Milligan, D. L.; Koshland, D. E. Site-directed cross-linking. Establishing the dimeric structure of the aspartate receptor of bacterial chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 6268–6275.
164. Falke, J. J.; Koshland, D. E., Jr. Global flexibility in a sensory receptor: a site-directed cross-linking approach. *Science* **1987**, *237*, 1596–1600.
165. Kluger, R.; Alagic, A. Chemical cross-linking and protein-protein interactions—a review with illustrative protocols. *Bioorg. Chem.* **2004**, *32*, 451–472.
166. Peters, K.; Richards, F. M. Chemical cross-linking: reagents and problems in studies of membrane structure. *Annu. Rev. Biochem.* **1977**, *46*, 523–551.
167. Ghosh, I.; Hamilton, A. D.; Regan, L. Antiparallel leucine zipper-directed protein reassembly: application to the green fluorescent protein. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5658–5659.
168. Magliery, T. J.; Wilson, C. G. M.; Pan, W.; Mishler, D.; Ghosh, I.; Hamilton, A. D.; Regan, L. Detecting protein-protein interactions with a green fluorescent protein fragment reassembly trap: scope and mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 146–157.
169. Shyu, Y. J.; Hiatt, S. M.; Duren, H. M.; Ellis, R. E.; Kerppola, T. K.; Hu, C.-D. Visualization of protein interactions in living caenorhabditis elegans using bimolecular fluorescence complementation analysis. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 588–596.
170. Villalobos, V.; Naik, S.; Piwnica-Worms, D. Current state of imaging protein-protein interactions *in vivo* with genetically encoded reporters. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2007**, *9*, 321–349.
171. Kerppola, T. K. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37*, 465–487.
172. Remy, I.; Michnick, S. W. Clonal selection and *in vivo* quantitation of protein interactions with protein-fragment complementation assays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 5394–5399.
173. Michnick, S. W.; Ear, P. H.; Manderson, E. N.; Remy, I.; Stefan, E. Universal strategies in research and drug discovery based on protein-fragment complementation assays. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 569–582.
174. Zakeri, B.; Howarth, M. Spontaneous intermolecular amide bond formation between side chains for irreversible peptide targeting. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4526–4527.
175. Zakeri, B. Synthetic biology: a new tool for the trade. *ChemBioChem* **2015**, *16*, 2277–2282.
176. Fredriksson, S.; Gullberg, M.; Jarvius, J.; Olsson, C.; Pietras, K.; Gústafsdóttir, S. M.; Östman, A.; Landegren, U. Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 473–477.

177. Gustafsdottir, S. M.; Schallmeiner, E.; Fredriksson, S.; Gullberg, M.; Söderberg, O.; Jarvius, M.; Jarvius, J.; Howell, M.; Landegren, U. Proximity ligation assays for sensitive and specific protein analyses. *Anal. Biochem.* **2005**, *345*, 2–9.
178. Söderberg, O.; Gullberg, M.; Jarvius, M.; Ridderstråle, K.; Leuchowius, K.-J.; Jarvius, J.; Wester, K.; Hydring, P.; Bahram, F.; Larsson, L.-G. Direct observation of individual endogenous protein complexes *in situ* by proximity ligation. *Nat. Methods* **2006**, *3*, 995–1000.
179. Weibrecht, I.; Leuchowius, K. J.; Claesson, C. M.; Conze, T.; Jarvius, M.; Howell, W. M.; Kamali-Moghaddam, M.; Soderberg, O. Proximity ligation assays: a recent addition to the proteomics toolbox. *Expert Rev. Proteomics* **2010**, *7*, 401–409.
180. Söderberg, O.; Leuchowius, K.-J.; Gullberg, M.; Jarvius, M.; Weibrecht, I.; Larsson, L.-G.; Landegren, U. Characterizing proteins and their interactions in cells and tissues using the *in situ* proximity ligation assay. *Methods* **2008**, *45*, 227–232.
181. Fields, S.; Song, O.-k. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **1989**, *340*, 245–246.
182. Rajagopala, S. V.; Uetz, P. Analysis of Protein-Protein Interactions Using High-Throughput Yeast Two-Hybrid Screens. In *Network Biology: Methods and Applications*, Cagney, G.; Emili, A., Eds. Humana Press: Totowa, NJ, **2011**; 1–29.
183. Brückner, A.; Polge, C.; Lentze, N.; Auerbach, D.; Schlattner, U. Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, *10*, 2763–2788.
184. Limbird, L. E.; Lefkowitz, R. Negative cooperativity among β -adrenergic receptors in frog erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 5007–5014.
185. Limbird, L. E.; Meyts, P. D.; Lefkowitz, R. J. β -adrenergic receptors: evidence for negative cooperativity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, *64*, 1160–1168.
186. Agnati, L. F.; Fuxe, K.; Zini, I.; Lenzi, P.; Hökfelt, T. Aspects on receptor regulation and isoreceptor identification. *Med. Biol.* **1980**, *58*, 182–187.
187. Agnati, L. F.; Fuxe, K.; Zoli, M.; Rondanini, C.; Ogren, S. O. New vistas on synaptic plasticity: the receptor mosaic hypothesis of the engram. *Med. Biol.* **1982**, *60*, 183–190.
188. Fuxe, K.; Agnati, L. F.; Benfenati, F.; Cimmino, M.; Algeri, S.; Hokfelt, T.; Mutt, V. Modulation by cholecystokinins of ^3H -spiperidol binding in rat striatum: evidence for increased affinity and reduction in the number of binding sites. *Acta Physiol. Scand.* **1981**, *113*, 567–569.
189. Fuxe, K.; Agnati, L. F.; Benfenati, F.; Celani, M.; Zini, I.; Zoli, M.; Mutt, V. In *Evidence for the existence of receptor-receptor interactions in the central nervous system. Studies on the regulation of monoamine receptors by neuropeptides*, Basic Aspects of Receptor Biochemistry, Vienna, 1983//, 1983; Goldstein, M.; Jellinger, K.; Riederer, P., Eds. Springer Vienna: Vienna, **1983**; 165–179.
190. Zoli, M.; Agnati, L. F.; Hedlund, P. B.; Li, X. M.; Ferré, S.; Fuxe, K. Receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in nerve cells. *Mol. Neurobiol.* **1993**, *7*, 293–334.
191. Maggio, R.; Vogel, Z.; Wess, J. Reconstitution of functional muscarinic receptors by co-expression of amino- and carboxyl-terminal receptor fragments. *FEBS Lett.* **1993**, *319*, 195–200.
192. Maggio, R.; Vogel, Z.; Wess, J. Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular "cross-talk" between G protein-linked receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 3103–3107.
193. Kaupmann, K.; Huggel, K.; Heid, J.; Flor, P. J.; Bischoff, S.; Mickel, S. J.; McMaster, G.; Angst, C.; Bittiger, H.; Froestl, W. Expression cloning of GABA B receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* **1997**, *386*, 239–246.
194. White, J. H.; Wise, A.; Main, M. J.; Green, A.; Fraser, N. J.; Disney, G. H.; Barnes, A. A.; Emson, P.; Foord, S. M.; Marshall, F. H. Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA_B receptor. *Nature* **1998**, *396*, 679–682.
195. Jordan, B. A.; Devi, L. A. G protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* **1999**, *399*, 697–700.
196. Kenakin, T.; Agnati, L. F.; Caron, M.; Fredholm, B.; Guidoli, D.; Kobilka, B.; Lefkowitz, R. W.; Lohse, M.; Woods, A.; Fuxe, K. International Workshop at the Nobel Forum, Karolinska Institutet on G protein-coupled receptors: finding the words to describe monomers, oligomers,

- and their molecular mechanisms and defining their meaning. Can a consensus be reached? *J. Recept. Signal Transduct.* **2010**, *30*, 284–286.
197. Guidolin, D.; Marcoli, M.; Tortorella, C.; Maura, G.; Agnati, L. F. G protein-coupled receptor-receptor interactions give integrative dynamics to intercellular communication. *Rev. Neurosci.* **2018**, *29*, 703–726.
198. Liu, J.; Nussinov, R. Energetic redistribution in allostery to execute protein function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114*, 7480–7482.
199. Rios, C. D.; Jordan, B. A.; Gomes, I.; Devi, L. A. G protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function. *Pharmacol. Ther.* **2001**, *92*, 71–87.
200. Wouters, E.; Vasudevan, L.; Crans, R. A. J.; Saini, D. K.; Stove, C. P. Luminescence- and fluorescence-based complementation assays to screen for GPCR oligomerization: current state of the art. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2958.
201. Angers, S.; Salahpour, A.; Bouvier, M. Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2002**, *42*, 409–435.
202. George, S. R.; O'Dowd, B. F.; Lee, S. P. G protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 808–820.
203. Wang, W.; Qiao, Y.; Li, Z. New insights into modes of GPCR activation. *Trends Pharmacol. Sci.* **2018**, *39*, 367–386.
204. Milligan, G.; Ward, R. J.; Marsango, S. GPCR homo-oligomerization. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2019**, *57*, 40–47.
205. Glukhova, A.; Thal, D. M.; Nguyen, A. T.; Vecchio, E. A.; Jörg, M.; Scammells, P. J.; May, L. T.; Sexton, P. M.; Christopoulos, A. Structure of the adenosine A₁ receptor reveals the basis for subtype selectivity. *Cell* **2017**, *168*, 867–877.
206. Jastrzebska, B.; Chen, Y.; Orban, T.; Jin, H.; Hofmann, L.; Palczewski, K. Disruption of rhodopsin dimerization with synthetic peptides targeting an interaction interface. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 25728–25744.
207. Capra, V.; Mauri, M.; Guzzi, F.; Busnelli, M.; Accomazzo, M. R.; Gaussem, P.; Nisar, S. P.; Mundell, S. J.; Parenti, M.; Rovati, G. E. Impaired thromboxane receptor dimerization reduces signaling efficiency: a potential mechanism for reduced platelet function *in vivo*. *Biochem. Pharmacol.* **2017**, *124*, 43–56.
208. Young, B. M.; Nguyen, E.; Chedrawe, M. A.; Rainey, J. K.; Dupré, D. J. Differential contribution of transmembrane domains IV, V, VI, and VII to human angiotensin II type 1 receptor homomer formation. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 3341–3350.
209. Parmar, V. K.; Grinde, E.; Mazurkiewicz, J. E.; Herrick-Davis, K. Beta₂-adrenergic receptor homodimers: role of transmembrane domain 1 and helix 8 in dimerization and cell surface expression. *Biochim. Biophys. Acta* **2017**, *1859*, 1445–1455.
210. Marsango, S.; Caltabiano, G.; Pou, C.; Varela Liste, M. J.; Milligan, G. Analysis of human dopamine D₃ receptor quaternary structure. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 15146–15162.
211. Jin, J.; Momboisse, F.; Boncompain, G.; Koensgen, F.; Zhou, Z.; Cordeiro, N.; Arenzana-Seisdedos, F.; Perez, F.; Lagane, B.; Kellenberger, E.; Brelot, A. CCR5 adopts three homodimeric conformations that control cell surface delivery. *Sci. Signal.* **2018**, *11*.
212. Jastrzebska, B.; Comar, W. D.; Kaliszewski, M. J.; Skinner, K. C.; Torcasio, M. H.; Esway, A. S.; Jin, H.; Palczewski, K.; Smith, A. W. A G protein-coupled receptor dimerization interface in human cone opsins. *Biochemistry* **2017**, *56*, 61–72.
213. Canals, M.; Marcellino, D.; Fanelli, F.; Ciruela, F.; de Benedetti, P.; Goldberg, S. R.; Neve, K.; Fuxe, K.; Agnati, L. F.; Woods, A. S.; Ferré, S.; Lluís, C.; Bouvier, M.; Franco, R. Adenosine A_{2A}-dopamine D₂ receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 46741–46749.
214. Hasbi, A.; Perreault, M. L.; Shen, M. Y.; Zhang, L.; To, R.; Fan, T.; Nguyen, T.; Ji, X.; O'Dowd, B. F.; George, S. R. A peptide targeting an interaction interface disrupts the dopamine D₁-D₂ receptor heteromer to block signaling and function *in vitro* and *in vivo*: effective selective antagonism. *FASEB J.* **2014**, *28*, 4806–4820.
215. Navarro, G.; Ferré, S.; Cordomi, A.; Moreno, E.; Mallol, J.; Casadó, V.; Cortés, A.; Hoffmann, H.; Ortiz, J.; Canela, E. I.; Lluís, C.; Pardo, L.; Franco, R.; Woods, A. S. Interactions

- between intracellular domains as key determinants of the quaternary structure and function of receptor heteromers. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 27346–27359.
216. Navarro, G.; Cordoní, A.; Zelman-Femiak, M.; Brugarolas, M.; Moreno, E.; Aguinaga, D.; Perez-Benito, L.; Cortés, A.; Casadó, V.; Mallol, J.; Canela, E. I.; Lluís, C.; Pardo, L.; García-Sáez, A. J.; McCormick, P. J.; Franco, R. Quaternary structure of a G protein-coupled receptor heterotetramer in complex with G_i and G_s. *BMC Biol.* **2016**, *14*, 26.
217. Fuxe, K.; Ferré, S.; Zoli, M.; Agnati, L. F. Integrated events in central dopamine transmission as analyzed at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine A_{2A}/dopamine D₂ and adenosine A₁/dopamine D₁ receptor interactions in the basal ganglia. *Brain Res. Rev.* **1998**, *26*, 258–273.
218. Ferrada, C.; Moreno, E.; Casadó, V.; Bongers, G.; Cortés, A.; Mallol, J.; Canela, E. I.; Leurs, R.; Ferré, S.; Lluís, C.; Franco, R. Marked changes in signal transduction upon heteromerization of dopamine D₁ and histamine H₃ receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *157*, 64–75.
219. Rashid, A. J.; So, C. H.; Kong, M. M.; Furtak, T.; El-Ghundi, M.; Cheng, R.; O'Dowd, B. F.; George, S. R. D₁-D₂ dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of G_{q/11} in the striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 654–659.
220. Rozenfeld, R.; Bushlin, I.; Gomes, I.; Tzavaras, N.; Gupta, A.; Neves, S.; Battini, L.; Gusella, G. L.; Lachmann, A.; Ma'ayan, A.; Blitzer, R. D.; Devi, L. A. Receptor heteromerization expands the repertoire of cannabinoid signaling in rodent neurons. *PLoS One* **2012**, *7*.
221. Rozenfeld, R.; Devi, L. A. Receptor heterodimerization leads to a switch in signaling: β -arrestin2-mediated ERK activation by μ - δ opioid receptor heterodimers. *FASEB J.* **2007**, *21*, 2455–2465.
222. Qiu, Y.; Wang, Y.; Law, P.-Y.; Chen, H.-Z.; Loh, H. H. Cholesterol regulates μ -opioid receptor-induced β -arrestin 2 translocation to membrane lipid rafts. *Mol. Pharmacol.* **2011**, *80*, 210–218.
223. Dawaliby, R.; Trubbia, C.; Delporte, C.; Masureel, M.; Van Antwerpen, P.; Kobilka, B. K.; Govaerts, C. Allosteric regulation of G protein-coupled receptor activity by phospholipids. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 35–39.
224. Insel, P. A.; Head, B. P.; Patel, H. H.; Roth, D. M.; Bunday, R. A.; Swaney, J. S. Compartmentation of G protein-coupled receptors and their signalling components in lipid rafts and caveolae. *Biochem. Soc. Trans.* **2005**, *33*, 1131–1134.
225. Hay, D. L.; Pioszak, A. A. Receptor activity-modifying proteins (RAMPs): new insights and roles. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2016**, *56*, 469–487.
226. Di Liberto, V.; Borroto-Escuela, D. O.; Frinchi, M.; Verdi, V.; Fuxe, K.; Belluardo, N.; Mudo, G. Existence of muscarinic acetylcholine receptor (mAChR) and fibroblast growth factor receptor (FGFR) heteroreceptor complexes and their enhancement of neurite outgrowth in neural hippocampal cultures. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2017**, *1861*, 235–245.
227. Borroto-Escuela, D. O.; Romero-Fernandez, W.; Mudó, G.; Pérez-Alea, M.; Ciruela, F.; Tarakanov, A. O.; Narvaez, M.; Di Liberto, V.; Agnati, L. F.; Belluardo, N.; Fuxe, K. Fibroblast growth factor receptor 1-5-hydroxytryptamine 1A heteroreceptor complexes and their enhancement of hippocampal plasticity. *Biol. Psychiatry* **2012**, *71*, 84–91.
228. Liu, F.; Wan, Q.; Pristupa, Z. B.; Yu, X.-M.; Wang, Y. T.; Niznik, H. B. Direct protein-protein coupling enables cross-talk between dopamine D₅ and γ -aminobutyric acid A receptors. *Nature* **2000**, *403*, 274–280.
229. Ferre, S.; Voneuler, G.; Johansson, B.; Fredholm, B. B.; Fuxe, K. Stimulation of high-affinity adenosine-A₂ receptors decreases the affinity of dopamine D₂ receptors in rat striatal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 7238–7241.
230. Hillion, J.; Canals, M.; Torvinen, M.; Casadó, V.; Scott, R.; Terasmaa, A.; Hansson, A.; Watson, S.; Olah, M. E.; Mallol, J.; Canela, E. I.; Zoli, M.; Agnati, L. F.; Ibáñez, C. F.; Lluís, C.; Franco, R.; Ferré, S.; Fuxe, K. Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A_{2A} receptors and dopamine D₂ receptors. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 18091–18097.
231. Ferré, S.; Fredholm, B. B.; Morelli, M.; Popoli, P.; Fuxe, K. Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci.* **1997**, *20*, 482–487.

232. Ferré, S.; Quiroz, C.; Woods, A. S.; Cunha, R.; Popoli, P.; Ciruela, F.; Lluís, C.; Franco, R.; Azdad, K.; Schiffmann, S. N. An update on adenosine A_{2A} -dopamine D_2 receptor interactions: implications for the function of G protein-coupled receptors. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14*, 1468–1474.
233. Orru, M.; Bakešová, J.; Brugarolas, M.; Quiroz, C.; Beaumont, V.; Goldberg, S. R.; Lluís, C.; Cortés, A.; Franco, R.; Casadó, V.; Canela, E. I.; Ferré, S. Striatal pre- and postsynaptic profile of adenosine A_{2A} receptor antagonists. *PLoS One* **2011**, *6*, e16088.
234. Fernandez-Duenas, V.; Ferré, S.; Ciruela, F. Adenosine A_{2A} -dopamine D_2 receptor heteromers operate striatal function: impact on Parkinson's disease pharmacotherapeutics. *Neural. Regen. Res.* **2018**, *13*, 241–243.
235. Ferré, S.; Bonaventura, J.; Tomasi, D.; Navarro, G.; Moreno, E.; Cortés, A.; Lluís, C.; Casadó, V.; Volkow, N. D. Allosteric mechanisms within the adenosine A_{2A} -dopamine D_2 receptor heterotetramer. *Neuropharmacology* **2016**, *104*, 154–160.
236. Bonaventura, J.; Navarro, G.; Casado-Anguera, V.; Azdad, K.; Rea, W.; Moreno, E.; Brugarolas, M.; Mallol, J.; Canela, E. I.; Lluís, C.; Cortes, A.; Volkow, N. D.; Schiffmann, S. N.; Ferré, S.; Casado, V. Allosteric interactions between agonists and antagonists within the adenosine A_{2A} receptor-dopamine D_2 receptor heterotetramer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112*, 3609–3618.
237. Sierra, S.; Toneatti, R.; González-Maeso, J. Chapter 8 - Class A GPCR oligomerization: reasons of controversy. In *GPCRs*, Jastrzebska, B.; Park, P. S. H., Eds. Academic Press: **2020**; 121–140.
238. Gurevich, V. V.; Gurevich, E. V. GPCR monomers and oligomers: it takes all kinds. *Trends Neurosci.* **2008**, *31*, 74–81.
239. Borroto-Escuela, D. O.; Flajolet, M.; Agnati, L. F.; Greengard, P.; Fuxe, K. Bioluminescence resonance energy transfer methods to study G protein-coupled receptor-receptor tyrosine kinase heteroreceptor complexes. *Methods Cell Biol.* **2013**, *117*, 141–164.
240. Borroto-Escuela, D. O.; Rodriguez, D.; Romero-Fernandez, W.; Kapla, J.; Jaiteh, M.; Ranganathan, A.; Lazarova, T.; Fuxe, K.; Carlsson, J. Mapping the interface of a GPCR dimer: a structural model of the A_{2A} adenosine and D_2 dopamine receptor heteromer. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*.
241. Nilsson, M.; Malmgren, H.; Samiotaki, M.; Kwiatkowski, M.; Chowdhary, B. P.; Landegren, U. Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localized DNA detection. *Science* **1994**, *265*, 2085–2088.
242. Gullberg, M.; Gustafsdottir, S. M.; Schallmeiner, E.; Jarvius, J.; Bjarnegard, M.; Betsholtz, C.; Landegren, U.; Fredriksson, S. Cytokine detection by antibody-based proximity ligation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 8420–8424.
243. Greenwood, C.; Ruff, D.; Kirvell, S.; Johnson, G.; Dhillon, H. S.; Bustin, S. A. Proximity assays for sensitive quantification of proteins. *Biomol. Detect. Quantif.* **2015**, *4*, 10–16.
244. Szidonya, L.; Cserző, M.; Hunyady, L. Dimerization and oligomerization of G protein-coupled receptors: debated structures with established and emerging functions. *J. Endocrinol.* **2008**, *196*, 435–453.
245. Chandrasekera, P. C.; Wan, T. C.; Gizewski, E. T.; Auchampach, J. A.; Lasley, R. D. Adenosine A_1 receptors heterodimerize with β_1 - and β_2 -adrenergic receptors creating novel receptor complexes with altered G protein coupling and signaling. *Cell. Signal.* **2013**, *25*, 736–742.
246. Schweitzer, B.; Roberts, S.; Grimwade, B.; Shao, W.; Wang, M.; Fu, Q.; Shu, Q.; Laroche, I.; Zhou, Z.; Tchernev, V. T. Multiplexed protein profiling on microarrays by rolling-circle amplification. *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 359–365.
247. Trifilieff, P.; Rives, M.-L.; Urizar, E.; Piskowski, R. A.; Vishwasrao, H. D.; Castrillon, J.; Schmauss, C.; Slättman, M.; Gullberg, M.; Javitch, J. A. Detection of antigen interactions *ex vivo* by proximity ligation assay: endogenous dopamine D_2 -adenosine A_{2A} receptor complexes in the striatum. *BioTechniques* **2011**, *51*, 111–118.
248. Beggiato, S.; Antonelli, T.; C Tomasini, M.; C Borelli, A.; F Agnati, L.; Tanganelli, S.; Fuxe, K.; Ferraro, L. Adenosine A_{2A} - D_2 receptor-receptor interactions in putative heteromers in the regulation of the striato-pallidal gaba pathway: possible relevance for Parkinson's disease and its treatment. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2014**, *15*, 673–680.

249. Pin, J.-P.; Neubig, R.; Bouvier, M.; Devi, L.; Filizola, M.; Javitch, J. A.; Lohse, M. J.; Milligan, G.; Palczewski, K.; Parmentier, M.; Spedding, M. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXVII. Recommendations for the recognition and nomenclature of G protein-coupled receptor heteromultimers. *Pharmacol. Rev.* **2007**, *59*, 5–13.
250. Albizu, L.; Cottet, M.; Kralikova, M.; Stoev, S.; Seyer, R.; Brabet, I.; Roux, T.; Bazin, H.; Bourrier, E.; Lamarque, L.; Breton, C.; Rives, M.-L.; Newman, A.; Javitch, J.; Trinquet, E.; Manning, M.; Pin, J.-P.; Mouillac, B.; Durrux, T. Time-resolved FRET between GPCR ligands reveals oligomers in native tissues. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 587–594.
251. Michel, M. C.; Wieland, T.; Tsujimoto, G. How reliable are G protein-coupled receptor antibodies? *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2009**, *379*, 385–388.
252. O'Connell, T. D.; Swigart, P. M.; Rodrigo, M. C.; Ishizaka, S.; Joho, S.; Turnbull, L.; Tecott, L. H.; Baker, A. J.; Foster, E.; Grossman, W.; Simpson, P. C. α 1-Adrenergic receptors prevent a maladaptive cardiac response to pressure overload. *J. Clin. Investig.* **2006**, *116*, 1005–1015.
253. Pradidarcheep, W.; Stallen, J.; Labruyère, W. T.; Dabhoiwala, N. F.; Michel, M. C.; Lamers, W. H. Lack of specificity of commercially available antisera against muscarinic and adrenergic receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2009**, *379*, 397–402.
254. Jongsma, M.; Florczyk, U. M.; Hendriks-Balk, M. C.; Michel, M. C.; Peters, S. L. M.; Alewijnse, A. E. Validation of a rapid, non-radioactive method to quantify internalisation of G protein-coupled receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2007**, *375*, 329–336.
255. Jensen, B. C.; Swigart, P. M.; Simpson, P. C. Ten commercial antibodies for α 1-adrenergic receptor subtypes are nonspecific. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2008**, *379*, 409–412.
256. Alsemarz, A.; Lasko, P.; Fagotto, F. Limited significance of the *in situ* proximity ligation assay. *bioRxiv* **2018**, 411355.
257. Martí-Renom, M. A.; Stuart, A. C.; Fiser, A.; Sánchez, R.; Melo, F.; Šali, A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29*, 291–325.
258. Costanzi, S. Homology modeling of class A G protein-coupled receptors. *Methods Mol. Biol.* **2012**, *857*, 259–279.
259. Shen, M.-y.; Sali, A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Sci.* **2009**, *15*, 2507–2524.
260. Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shelley, M.; Perry, J. K. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1739–1749.
261. Schrödinger. Glide 6.7 User Manual. In New York, NY, 2015; pp 7–11.
262. Kiesman, W. F.; Zhao, J.; Conlon, P. R.; Dowling, J. E.; Petter, R. C.; Lutterodt, F.; Jin, X.; Smits, G.; Fure, M.; Jayaraj, A.; Kim, J.; Sullivan, G.; Linden, J. Potent and orally bioavailable 8-bicyclo[2.2.2]octylxanthines as adenosine A₁ receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7119–7131.
263. Müller, C. E.; Ferre, S. Blocking striatal adenosine A_{2A} receptors: a new strategy for basal ganglia disorders. *Recent Pat. CNS Drug Discov.* **2007**, *2*, 1–21.
264. Jiang, J.; Seel, C. J.; Temirak, A.; Namasivayam, V.; Arridu, A.; Schabikowski, J.; Baqi, Y.; Hinz, S.; Hockemeyer, J.; Müller, C. E. A_{2B} adenosine receptor antagonists with picomolar potency. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 4032–4055.
265. Neustadt, B. R.; Hao, J.; Lindo, N.; Greenlee, W. J.; Stamford, A. W.; Tulshian, D.; Ongini, E.; Hunter, J.; Monopoli, A.; Bertorelli, R.; Foster, C.; Arik, L.; Lachowicz, J.; Ng, K.; Feng, K.-I. Potent, selective, and orally active adenosine A_{2A} receptor antagonists: arylpiperazine derivatives of pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 1376–1380.
266. Hockemeyer, J.; Burbiel, J. C.; Müller, C. E. Multigram-scale syntheses, stability, and photoreactions of A_{2A} adenosine receptor antagonists with 8-styrylxanthine structure: potential drugs for Parkinson's disease. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3308–3318.
267. Müller, C. E. Synthesis of 3-substituted 6-aminouracils. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 6539–6540.

268. Wang, G.; Zhang, H.; Zhou, J.; Ha, C.; Pei, D.; Ding, K. An efficient synthesis of ABT-263, a novel inhibitor of antiapoptotic Bcl-2 proteins. *Synthesis* **2008**, *2008*, 2398–2404.
269. Borrmann, T.; Hinz, S.; Bertarelli, D. C. G.; Li, W.; Florin, N. C.; Scheiff, A. B.; Müller, C. E. 1-Alkyl-8-(piperazine-1-sulfonyl)phenylxanthines: development and characterization of adenosine A_{2B} receptor antagonists and a new radioligand with subnanomolar affinity and subtype specificity. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3994–4006.
270. Ballesteros, J. A.; Weinstein, H. Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. In *Methods in Neurosciences*, Sealfon, S. C., Ed. Academic Press: **1995**; Vol. 25, 366–428.
271. Okamura, T.; Kurogi, Y.; Nishikawa, H.; Hashimoto, K.; Fujiwara, H.; Nagao, Y. 1,2,4-Triazolo[5,1-*f*]purine derivatives as highly potent and selective human adenosine A₃ receptor ligands. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3703–3708.
272. Ryu, J.; Cho, S. H.; Chang, S. A versatile rhodium(I) catalyst system for the addition of heteroarenes to both alkenes and alkynes by a C-H bond activation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3677–3681.
273. Pulido, D.; Casadó-Anguera, V.; Pérez-Benito, L.; Moreno, E.; Cordoní, A.; López, L.; Cortés, A.; Ferré, S.; Pardo, L.; Casadó, V.; Royo, M. Design of a true bivalent ligand with picomolar binding affinity for a G protein-coupled receptor homodimer. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 9335–9346.
274. Liu, W.; Chun, E.; Thompson, A. A.; Chubukov, P.; Xu, F.; Katritch, V.; Han, G. W.; Roth, C. B.; Heitman, L. H.; IJzerman, A. P.; Cherezov, V.; Stevens, R. C. Structural basis for allosteric regulation of GPCRs by sodium ions. *Science* **2012**, *337*, 232–236.
275. Jin, C.; Mayer, L. D.; Lewin, A. H.; Rehder, K. S.; Brine, G. A. Practical synthesis of *p*-aminophenethylpiperone (NAPS), a high-affinity, selective D₂-dopamine receptor antagonist. *Synth. Commun.* **2008**, *38*, 816–823.
276. Bouzide, A.; Sauvé, G. Highly selective silver(I) oxide mediated monoprotection of symmetrical diols. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5945–5948.
277. Zhang, H.; Li, X.; Shi, Q.; Li, Y.; Xia, G.; Chen, L.; Yang, Z.; Jiang, Z.-X. Highly efficient synthesis of monodisperse poly(ethylene glycols) and derivatives through macrocyclization of oligo(ethylene glycols). *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *127*, 3834–3838.
278. Wan, Z.; Li, Y.; Bo, S.; Gao, M.; Wang, X.; Zeng, K.; Tao, X.; Li, X.; Yang, Z.; Jiang, Z.-X. Amide bond-containing monodisperse polyethylene glycols beyond 10 000 Da. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 7912–7919.
279. Heisig, F.; Gollos, S.; Freudenthal, S. J.; El-Tayeb, A.; Iqbal, J.; Müller, C. E. Synthesis of BODIPY derivatives substituted with various bioconjugatable linker groups: a construction kit for fluorescent labeling of receptor ligands. *J. Fluoresc.* **2014**, *24*, 213–230.
280. Park, J. W.; Kim, Y.; Lee, K. J.; Kim, D. J. Novel cyanine dyes with vinylsulfone group for labeling biomolecules. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23*, 350–362.
281. Dale, C. L.; Hill, S. J.; Kellam, B. New potent, short-linker BODIPY-630/650TM labelled fluorescent adenosine receptor agonists. *Med. Chem. Commun.* **2012**, *3*, 333–338.
282. Nuhn, L.; Vanparijs, N.; De Beuckelaer, A.; Lybaert, L.; Verstraete, G.; Deswarte, K.; Lienenklaus, S.; Shukla, N. M.; Salyer, A. C. D.; Lambrecht, B. N.; Grooten, J.; David, S. A.; De Koker, S.; De Geest, B. G. pH-degradable imidazoquinoline-ligated nanogels for lymph node-focused immune activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, 8098–8103.
283. Jeong, L. S.; Choe, S. A.; Gunaga, P.; Kim, H. O.; Lee, H. W.; Lee, S. K.; Tosh, D. K.; Patel, A.; Palaniappan, K. K.; Gao, Z.-G.; Jacobson, K. A.; Moon, H. R. Discovery of a new nucleoside template for human A₃ adenosine receptor ligands: D-4'-thioadenosine derivatives without 4'-hydroxymethyl group as highly potent and selective antagonists. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3159–3162.
284. Briddon, S. J.; Gandía, J.; Amaral, O. B.; Ferré, S.; Lluís, C.; Franco, R.; Hill, S. J.; Ciruela, F. Plasma membrane diffusion of G protein-coupled receptor oligomers. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1783*, 2262–2268.
285. Canals, M.; Burgueño, J.; Marcellino, D.; Cabello, N.; Canela, E. I.; Mallol, J.; Agnati, L.; Ferré, S.; Bouvier, M.; Fuxe, K.; Ciruela, F.; Lluís, C.; Franco, R. Homodimerization of

- adenosine A_{2A} receptors: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J. Neurochem.* **2004**, *88*, 726–734.
286. May, L. T.; Bridge, L. J.; Stoddart, L. A.; Briddon, S. J.; Hill, S. J. Allosteric interactions across native adenosine-A₃ receptor homodimers: quantification using single-cell ligand-binding kinetics. *FASEB J.* **2011**, *25*, 3465–3476.
287. Ferre, S.; Ciruela, F.; Borycz, J.; Solinas, M.; Quarta, D.; Antoniou, K.; Quiroz, C.; Justinova, Z.; Lluís, C.; Franco, R.; Goldberg, S. R. Adenosine A₁-A_{2A} receptor heteromers: new targets for caffeine in the brain. *Front. Biosci.* **2008**, *13*, 2391–2399.
288. Hinz, S.; Navarro, G.; Borroto-Escuela, D.; Seibt, B. F.; Ammon, Y.-C.; de Filippo, E.; Danish, A.; Lacher, S. K.; Červinková, B.; Rafehi, M. Adenosine A_{2A} receptor ligand recognition and signaling is blocked by A_{2B} receptors. *Oncotarget* **2018**, *9*, 13593–13611.
289. Berthold, M. R.; Cebon, N.; Dill, F.; Gabriel, T. R.; Kötter, T.; Meinl, T.; Ohl, P.; Sieb, C.; Thiel, K.; Wiswedel, B. In *KNIME: The Konstanz Information Miner*, Berlin, Heidelberg, 2008; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2008**; 319–326.
290. Jagtap, S. R.; Patil, Y. P.; Panda, A. G.; Bhanage, B. M. Synthesis of 1,3-disubstituted symmetrical/unsymmetrical ureas via Cs₂CO₃-catalyzed transamination of ethylene carbonate and primary amines. *Synth. Commun.* **2009**, *39*, 2093–2100.
291. Lortie, F.; Boileau, S.; Bouteiller, L. *N,N'*-Disubstituted ureas: influence of substituents on the formation of supramolecular polymers. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 3008–3014.
292. Neustadt, B. R.; Lindo, N. A.; Greenlee, W. J.; Tulshian, D.; Silverman, L. S.; Xia, Y.; Boyle, C. D.; Chackala-Mannil, S. Adenosine A_{2A} receptor antagonists. WO 01/92264 A1, **2001**.
293. Baraldi, P. G.; Bovero, A.; Fruttarolo, F.; Romagnoli, R.; Tabrizi, M. A.; Preti, D.; Varani, K.; Borea, P. A.; Moorman, A. R. New strategies for the synthesis of A₃ adenosine receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 4161–4169.
294. Lee, O.-Y.; Law, K.-L.; Ho, C.-Y.; Yang, D. Highly chemoselective reductive amination of carbonyl compounds promoted by InCl₃/Et₃SiH/MeOH system. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 8829–8837.
295. Kohl, F.; Schmitz, J.; Furtmann, N.; Schulz-Fincke, A.-C.; Mertens, M. D.; Küppers, J.; Benkhoff, M.; Tobiasch, E.; Bartz, U.; Bajorath, J.; Stirnberg, M.; Gütschow, M. Design, characterization and cellular uptake studies of fluorescence-labeled prototypic cathepsin inhibitors. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 10310–10323.

Dankssagungen

Zunächst gilt mein Dank meiner Doktormutter Frau Prof. Müller. Ich könnte jetzt das übliche: „Vielen Dank für das spannende Thema und die Möglichkeit meine Arbeit in Deinem Arbeitskreis anfertigen zu dürfen“ schreiben, aber ich möchte Dir vor allem dafür danken, dass Du mich ohne Vorurteile aufgenommen hast. Dass Du stets spät abends für eine Diskussion bereit warst und deine Meinung offen und ehrlich kommuniziert hast. Das imponiert mir sehr.

Sehr geehrter Herr Prof. Gansäuer, auch wenn Sie mir das ein ums andere Mal zu verstehen gegeben haben, wie zuwider Ihnen diese förmliche Anrede ist, bleibt mir keine andere Wahl als mich bei Ihnen in dieser Form zu bedanken. Sie hatten in turbulenten Zeiten ein offenes Ohr und die richtigen Ratschläge. Vielen Dank, dass Sie für uns da waren!

Sehr geehrter Herr Prof. Höger, vielen Dank für die Übernahme des Koreferats und die ein oder andere Karnevalsfeierlichkeit.

Sehr geehrter Herr Prof. Manthey, vielen Dank, dass Sie Teil meiner Prüfungskommission sind.

Ein gesonderter Dank geht an meinen Labor- und Bürokollegen Daniel Marx, der mir den Einstieg in die Arbeitsgruppe erleichtert hat und mit dem ich über drei Jahre hinweg die ein oder andere fachliche, aber auch persönliche Angelegenheit besprechen konnte. In Deutschland wird gerne der Kollege vom Freund getrennt. Diese Grenze sehe ich bei uns deutlich verschwommener.

Darüber hinaus geht mein Dank an meine Labor- und Bürokollegen Dr. Ahmed Elgokha, Dr. Nader Boshta und Sophie Clemens. Ihr habt meinen Laboralltag sehr bereichert.

Gesondert möchte ich auch Christin Vielmuth für Ihre stets zügige und vertrauenswürdige Testung meiner Substanzen danken. Es war mir eine Freude mit Dir zu arbeiten!

Bedanken möchte ich mich auch bei Andreas Brockmann, Sonja Hinz und Beatriz Büschbell für die weiteren biologischen Untersuchungen.

Liebe Marion, danke, dass du stets ein offenes Ohr für persönliches, aber auch fachliches hattest. Und selbst, wenn sich ein Gerät widerspenstig wehrte und das andere zu bestücken war, hast du dir geduldig meine Sonderwünsche angehört. Danke dafür!

Daneben geht mein Dank ebenfalls an Sabine Terhart-Krabbe und Anette Reiner.

Thank you Vignesh for helping me with modeling and docking, and for always having new ideas.

Danke Beate, dass du immer da warst, auch wenn es mal wieder knapp wurde und du dich trotzdem drum gekümmert hast.

Ein entfernter Dank geht an die Kollegen des AK Braunschweigers, insbesondere Verena Kunig, die mir mit der Festphasensynthese geholfen und mich für zwei Wochen betreut hat.

Liebe Familie, auch wenn ihr nie wirklich verstanden habt, was ich eigentlich mache, habt ihr mich immer emotional und finanziell unterstützt. Ich kann mich immer auf euch verlassen. Danke!

Meine liebe Frau, wir haben zusammen angefangen, wir haben zusammen gearbeitet, wir haben zusammen gewechselt und jetzt werden wir bald wieder zusammen sein. Danke, dass du immer hinter meinen Entscheidungen gestanden und mich ertragen hast. Du hast mich zu einem besseren Menschen gemacht, Danke!