

**Synthese und biologische Untersuchungen
von RGD- und ATP-Analoga
als potenzielle Angiogeneseinhibitoren**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
der
Universität Karlsruhe (TH)
angenommene

DISSERTATION

von
Diplom-Chemikerin
Elisabeth Addicks
aus
Aurich

Dekan: Prof. Dr. M. Metzler

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Giannis

2. Gutachter: Prof. Dr. J. Rétey

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.2002

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie der Universität Karlsruhe (TH) unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Giannis in der Zeit von März 1999 bis September 2002 angefertigt.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. A. Giannis für die interessante Themenstellung, seine engagierte wissenschaftliche Betreuung und die jederzeit freundliche Unterstützung bedanken.

Allen Arbeitskolleginnen und -kollegen danke ich für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Danken möchte ich Herrn Dr. H. Röttele, Herrn Dr. A. Rapp, Frau P. Lang und Frau A. Kuiper für die Messung der NMR-Spektren sowie Frau A. Kernert und Frau I. Roßnagel für die Messung der Massenspektren und die Anfertigung der Elementaranalysen.

Den Glasbläsermeistern des Institutes für Organische Chemie, Herrn H. Lagler und Herrn R. von Budberg, danke ich für die Herstellung und Reparatur zahlreicher Glasgeräte.

Den Auszubildenden Herrn T. Teutenberg und Frau J. Kehrer sowie allen Praktikantinnen und Praktikanten danke ich für ihre engagierte Mitarbeit.

Dem Land Baden-Württemberg danke ich für die Gewährung eines Promotionsstipendiums nach dem Landesgraduiertenförderungsgesetz.

Für die aufmerksame Durchsicht dieser Arbeit möchte ich mich bei Frau V. Feldmann, Herrn N. Sunder-Plasmann, Herrn M. Biel, Herrn A. Huwe und Herrn Dr. H. Köhnlein bedanken.

Schließlich gilt mein ganz besonderer Dank meiner Mutter für ihre Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion. Meinem Freund Harald möchte ich für seine unendliche Geduld und tagtägliche moralische Unterstützung danken.

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung.....	4
2.1	Tumorinduzierte Angiogenese.....	4
2.2	Der Angiogeneseprozess.....	6
2.3	Das Umschalten auf den angiogenen Phänotyp - Der „Angiogenic Switch“...	8
2.4	Hemmung der Tumorangiogenese	9
2.4.1	Indirekte Inhibitoren	9
2.4.2	Direkte Inhibitoren.....	10
2.4.3	Aufbau und Funktion des Integrins $\alpha_v\beta_3$	13
2.4.4	Inhibition des Integrins $\alpha_v\beta_3$	18
2.4.5	Aufbau und Funktion der Rezeptortyrosinkinasen.....	21
2.4.6	Inhibition der Rezeptortyrosinkinasen.....	26
3	Aufgabenstellung.....	27
4	Ergebnisse.....	30
4.1	Synthese der RGD-Analoga	30
4.2	Synthese der ATP-Analoga	38
4.3	Biologische Untersuchungen	41
4.3.1	Biologische Untersuchungen der synthetisierten RGD-Analoga	41
4.3.2	Biologische Untersuchungen der synthetisierten ATP-Analoga	48
5	Diskussion	53
5.1	Diskussion der Synthesen	53
5.1.1	RGD-Analoga.....	53
5.1.2	ATP-Analoga.....	56
5.2	Diskussion der Biologischen Untersuchungen	57
5.2.1	RGD-Analoga.....	57
5.2.2	ATP-Analoga.....	61
6	Ausblick	62
7	Experimenteller Teil	65
7.1	Chemischer Teil.....	65
7.1.1	Materialien und Geräte	65
7.1.2	Synthesevorschriften	67
7.2	Biologischer Teil	153
7.2.1	Material	153
7.2.2	Methoden	156
8	Literatur.....	161

Abkürzungsverzeichnis

Arg-Gly-Asp	Arginin-Glycin-Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	Bcl-x Aktivierendes Protein
Bcl-2	B-cell Lymphoma-2-Protein
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
ber.	berechnet
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	Rinderserum-Albumin
CAM	Chorioallantois-Membran
CDK	Cyclin-dependent Kinase
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DEAD	Azodicarbonsäure-diethylester
DIEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ECGM	Endothelial Cell Growth Medium
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N</i> '-ethyl-carbodiimid-hydrochlorid
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Eph	Erythropoietin-producing Hepatoma Amplified Sequence
ERK	Extracellular Signal-Ras-regulated Kinase
FAB	Fast Atom Bombardement
FAK	Focal Adhesion Kinase
FCS	Fetal Calf Serum
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
Grb2	Growth Factor binding protein 2
HBSS	Hepes Buffered Saline Solution
HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N</i> '-2-ethansulfonsäure
HOBT	Hydroxybenzotriazol
HR	hochauflösend
HRP	Horseradish Peroxydase
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
IBX	1-Hydroxy-1,2-benziodoxol-3-(1 <i>H</i>)-on-1-oxid
IGFR	Insulin-like Growth Factor Receptor
m.p.	Schmelzpunkt

Abkürzungsverzeichnis

MAP	Endothelial Cell Mitogen-Activated Protein
Mes	Mesyl
MIDAS	Metal Ion Dependent Adhesion Site
MMP	Matrix-Metalloprotease
MS	Massenspektrometrie
NMR	Kernresonanzspektroskopie
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween
PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PI3-K	Phosphoinositid-3-OH-Kinase
POD	Peroxidase
Raf	Rapid Fibrosarcoma
Ras	Rat Sarcoma
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat
r.t.	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SH	Sarcoma Homology
TBDMS	<i>tert.</i> -Butyldimethylsilyl
<i>tert.</i>	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TNS	Trypsin Neutralizing Solution
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

1 Zusammenfassung

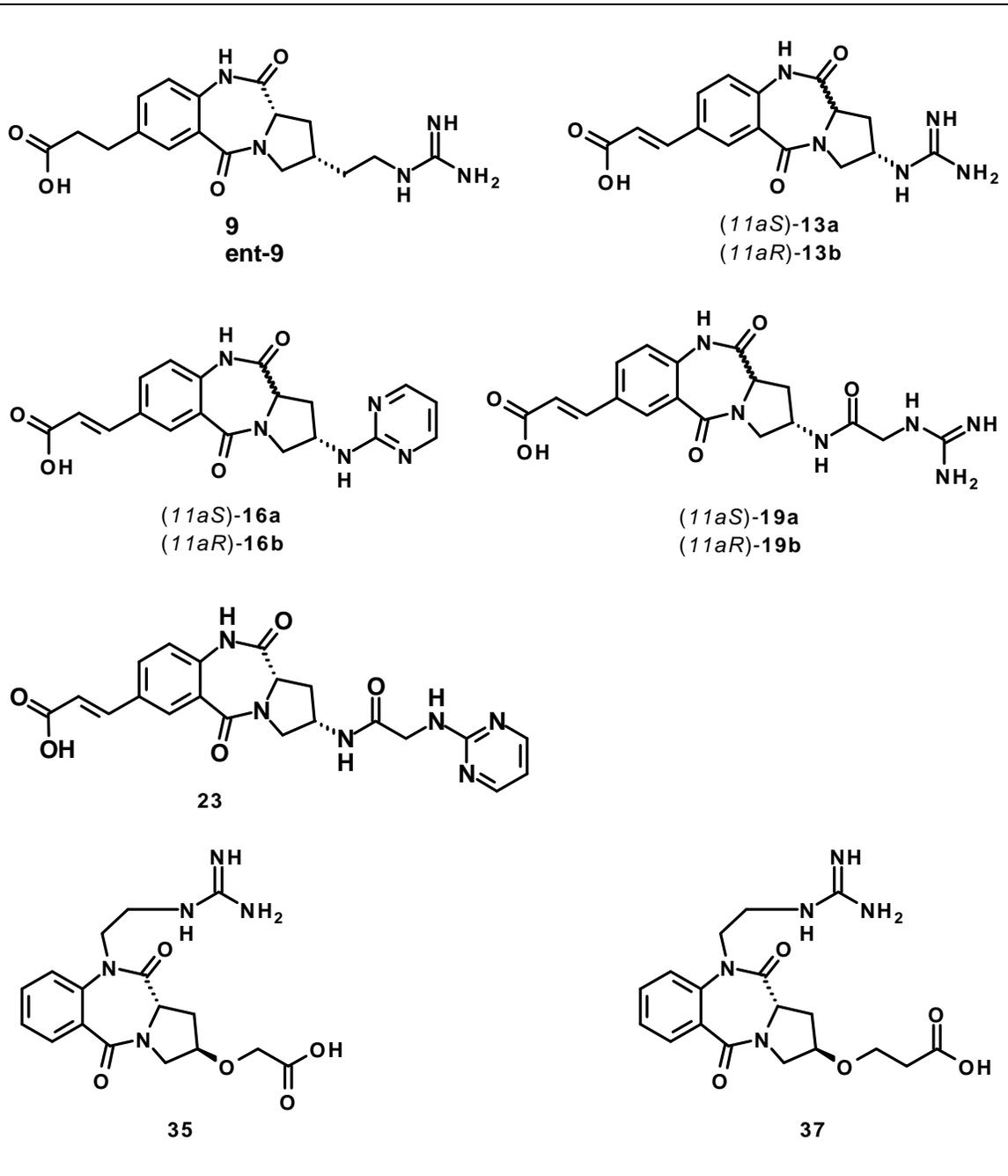
Als Angiogenese bezeichnet man den Prozess der Bildung neuer Blutgefäße ausgehend von bereits existierenden Gefäßen. Sie ist während der Embryonalentwicklung von großer Bedeutung, spielt aber auch in adulten Organismen eine entscheidende Rolle. Zu den angiogenen Vorgängen im Menschen zählen beispielsweise der weibliche Reproduktionszyklus oder die Wundheilung. Die Entdeckung einer Beteiligung der Angiogenese an verschiedenen Erkrankungen, wie z.B. der diabetischen Retinopathie, der rheumatoiden Arthritis und nicht zuletzt dem Tumorwachstum und der Metastasierung verdeutlicht dabei auch ihren Einfluss auf unterschiedliche pathologische Prozesse. Die Hemmung der Angiogenese eröffnet damit einen neuen, wichtigen Therapieansatz zur Bekämpfung dieser Erkrankungen. So ist die Behandlung von Tumoren mit Angiogeneseinhibitoren einer der Hoffnungsträger in der modernen Krebsmedizin.

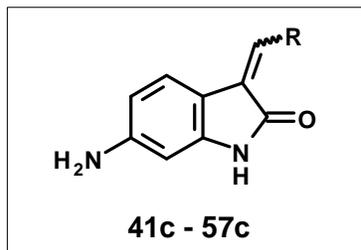
Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Benzodiazepindione **9**, **ent-9**, **13a**, **13b**, **16a**, **16b**, **19a**, **19b**, **23**, **35** und **37** synthetisiert. Hierbei handelt es sich um Analoga der Tripeptidsequenz RGD (Arg-Gly-Asp), die als Bestandteil vieler extrazellulärer Liganden an verschiedene Integrine bindet und damit eine entscheidende Rolle beim Prozess der Angiogenese spielt. Ein RGD-Analogon kann als Angiogeneseinhibitor wirken und liefert damit möglicherweise einen Ansatz für die Bekämpfung von Tumoren.

Die synthetisierten RGD-Analoga wurden in Bezug auf ihre biologische Wirksamkeit in verschiedenen Testsystemen untersucht.

Zum einen wurden sie in einem Festphasen-Assay bezüglich ihrer Fähigkeit untersucht, die Bindung von Fibrinogen, einem natürlichen Integrinliganden, an das Integrin $\alpha_{1b}\beta_3$ bzw. $\alpha_v\beta_3$ zu inhibieren. Dabei erwiesen sich die Verbindungen **9** und **ent-9** als die potentesten Inhibitoren.

Weiterhin wurden die Verbindungen in einem ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) auf ihre apoptoseinduzierenden Eigenschaften hin überprüft. Hierbei konnten bei den Verbindungen **9**, **ent-9**, **13a**, **35** und **37** apoptoseinduzierende Eigenschaften nachgewiesen werden.

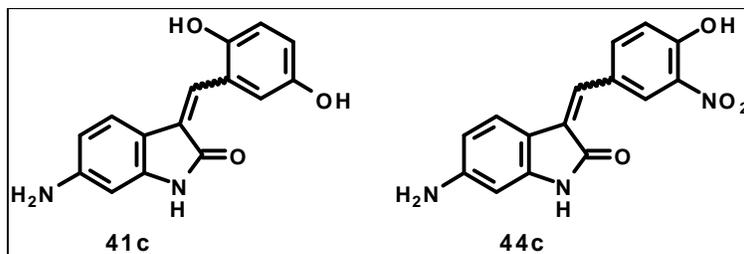




Weiterhin wurden die Aminooxindolderivate **41c** – **57c**, die als ATP-Analoga die Kinaseaktivität von Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) blockieren sollen, dargestellt (Abb. 11). Rezeptortyrosinkinasen sind von großer Bedeutung bei den im Verlauf der Angiogenese stattfindenden Signaltransduktionskaskaden. Ihre

Blockierung stellt somit eine weitere Möglichkeit für die Inhibition der Angiogenese dar.

Die ATP-Analoga wurden in einem nicht-radioaktiven Kinase-Assay in Bezug auf ihre inhibitorischen Eigenschaften gegenüber verschiedenen Rezeptortyrosinkinasen getestet. Dabei konnten die Verbindungen **41c** und **44c** als sehr potente Inhibitoren für die Kinasen KDR, Flt-4 und Tie-2 identifiziert werden.



2 Einleitung

Der menschliche Körper ist mit einem dichten, fein verästelten System von Blutgefäßen durchzogen. Aufgabe der Blutgefäße ist es, jede Zelle des Körpers mit Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen und den Abtransport von Stoffwechselprodukten zu garantieren.

Die Wände der Blutgefäße sind aus mehreren Schichten aufgebaut, die je nach Gefäßtyp unterschiedlich stark ausgeprägt sind. Die Innenseite ist mit einer Schicht Endothelzellen ausgekleidet, die die Blutgerinnung verhindert. Diese Endothelschicht ermöglicht über größere Poren den Wasser- und Stoffaustausch mit dem umliegenden Gewebe.

Die Neubildung von Blutgefäßen ausgehend von bereits bestehenden bezeichnet man als Angiogenese oder Neovaskularisation. Man kann diesen Prozess als Sprossung von Blutkapillaren verstehen. Die Angiogenese spielt eine wichtige Rolle bei der Embryonalentwicklung, Wundheilung und auch im weiblichen Reproduktionssystem beim Aufbau der Gebärmutter Schleimhaut. Pathologische Angiogenese tritt jedoch bei verschiedenen Krankheiten, z.B. diabetischer Retinopathie, Arthritis, Psoriasis und Krebs, auf.^[1] In der westlichen Welt sind jährlich ca. 500 Mio. Menschen von angiogeneseabhängigen Krankheiten betroffen.^[2] Die Auffindung sowohl pro- als auch antiangiogener Wirkstoffe ist deshalb von großem medizinischen Interesse.

2.1 Tumorinduzierte Angiogenese

Im Anfangsstadium liegen alle soliden Tumore als kleine Ansammlung transformierter Zellen vor, deren Wachstum durch ein Gleichgewicht zwischen Proliferation (Vermehrung der Zellen durch Zellteilung) und Apoptose (der programmierte Zelltod, ein von der Zelle selbst ausgelöster aktiver Prozess) gesteuert wird.^[3] Die Tumore sind in diesem frühen Entwicklungsstadium noch nicht an das Blutgefäßsystem angeschlossen, d.h. sie liegen avaskular vor.

Folglich findet die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung über Diffusionsprozesse statt. Da hierbei die Versorgung der Zellen mit wachsendem Abstand zum Gefäß schlechter wird (Abb. 1.), nimmt auch die Teilungsfähigkeit der Zellen ab. Somit kann der Tumor in dieser frühen Phase nur bis zu einem Maximaldurchmesser von ca. einem Millimeter anwachsen.

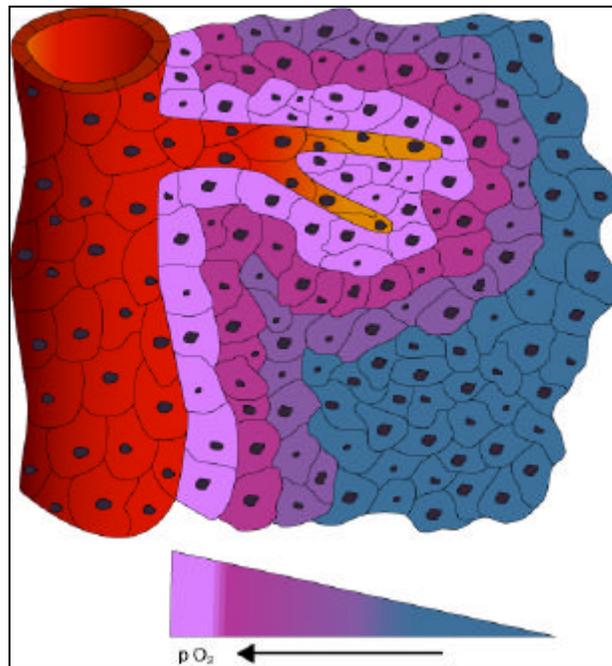


Abb. 1: Mit wachsendem Abstand zum Blutgefäß verschlechtert sich die Sauerstoffversorgung der Zellen. Der dadurch entstehende Sauerstoffmangel (Hypoxie) induziert die Tumorangiose.

Erst durch den Anschluss an das Blutgefäßsystem ist eine ausreichende Versorgung gewährleistet und damit auch ein ungehindertes Wachstum möglich. Hat ein Tumor eine eigene Blutversorgung aufgebaut, kann er zudem metastasieren, d.h. Krebszellen lösen sich vom Tumor ab, gelangen in das angrenzende Blutgefäß und werden vom Blutstrom in andere Körperregionen transportiert. Dort verlassen sie das Blutgefäßsystem wieder und bilden Tochtergeschwülste (Metastasen). Aufgrund dieser Beobachtung, dass für das Wachstum eines Tumors dessen Versorgung mit Blut von grundlegender Bedeutung ist, postulierte Folkman 1971, dass in der Angiogenesehemmung ein möglicher Ansatz für die Krebstherapie liegt.[4]

Konventionelle Behandlungsstrategien zielen unter Verwendung von Zytostatika auf die Bekämpfung der Tumorzellen selbst ab. Problematisch ist hierbei, dass nicht nur die Krebszellen, sondern alle Zellen, die eine hohe Proliferationsrate aufweisen, d.h. sich häufig teilen, angegriffen werden, wodurch es zum Auftreten von starken Nebenwirkungen kommt. Das Konzept der Angiogeneseinhibition hingegen richtet sich nur gegen die proliferierenden Endothelzellen, so dass nicht der gesamte Organismus betroffen ist. Da die Teilungsrate der Endothelzellen, außer bei den oben beschriebenen physiologischen und pathologischen Prozessen, sehr gering

ist, sollten Inhibitoren der Tumorangiogenese das bestehende Gefäßsystem nicht beeinträchtigen.

Darüber hinaus ist eine Resistenzgefahr gegenüber angiostatischen Medikamenten, wie sie bei herkömmlichen Chemotherapien aufgrund der hohen Mutationsrate der Tumorzellen auftritt, nicht wahrscheinlich, da der Angriffspunkt der Angiogeneseinhibitoren nicht die genetisch instabilen Tumorzellen selbst, sondern die mit einem stabilen Genom versehenen Endothelzellen der Blutgefäße sind.[5]

2.2 Der Angiogeneseprozess

Voraussetzung für die Entwicklung angiostatischer Agenzien ist das Verständnis der biochemischen Vorgänge, die sich im Verlaufe der tumorinduzierten Angiogenese abspielen.

Da die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung des avaskular vorliegenden Tumors über Diffusionsprozesse verläuft, werden die im Tumorrinneren liegenden Zellen am schlechtesten versorgt, wodurch es zum Auftreten von Sauerstoffmangel (Hypoxie) kommt. Diese Hypoxie induziert daraufhin die Ausschüttung von NO, NO-Synthase und Wachstumsfaktoren (Growth Factors, GFs) (Abb. 2A).[6] Bei Letzteren handelt es sich um peptidische Signalmoleküle, die als angiogene Stimuli wirken. Die Wachstumsfaktoren gelangen durch Diffusion zu den bereits bestehenden Blutgefäßen und binden dort an Rezeptoren mit Tyrosin-Kinase-Aktivität (RTKs),[7] die von den Endothelzellen exprimiert werden. Diese Wechselwirkung löst eine Signalkaskade aus, im Rahmen derer es unter anderem zu einer Expression von Matrix-Metalloproteasen (MMPs) kommt. Diese Enzyme sorgen für den proteolytischen Abbau der Basalmembran der Blutgefäße und die Remodellierung der Extrazellulären Matrix (ECM). Die Extrazelluläre Matrix ist ein dicht verflochtenes Netz von zahlreichen, unterschiedlichen Proteinfasern, das für ruhende Blutgefäße eine mechanische Stützfunktion innehat und im Rahmen der Angiogenese wichtige Wechselwirkungen mit den Endothelzellen eingeht. Mit Hilfe der Matrix-Metalloproteasen wird der Weg für die neu zu bildenden Blutkapillaren freigemacht. Die Zellen fangen an sich zu teilen (Proliferation) und wandern von dem vorhandenen Gefäß in das umgebende Bindegewebe in Richtung des angiogenen Stimulus (Migration) (Abb. 2B, 2C). Weiterhin kommt es zu einer sowohl durch NO induzierten als auch durch Wachstumsfaktoren stimulierten Expression von membranständigen Integrinen. Hierbei handelt es sich um Glykoproteine, die als

Vermittler der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion eine wichtige Rolle spielen.[8] Im Rahmen der Migration sorgen sie für den unbedingt notwendigen Kontakt zwischen den wandernden Zellen und Bestandteilen der Extrazellulären Matrix. Im letzten Schritt erfolgt die Ausbildung der neuen Kapillare. Dabei bilden sich Vakuolen in benachbarten Zellen, die zum neuen Kapillarlumen verschmelzen. Es bildet sich eine Basalmembran, und Perizyten sowie glatte Muskelzellen können sich, je nach Gefäßtyp, um das neue Gefäß formieren. Perizyten, deren Zellausläufer die Oberfläche der Blutkapillaren überziehen, sind für den Stoffaustausch zwischen Kapillarblut und Gewebe zuständig. Durch die Vereinigung zweier neu gebildeter Kapillaren (Anastomose) wird der Blutfluss ermöglicht (Abb. 2D).

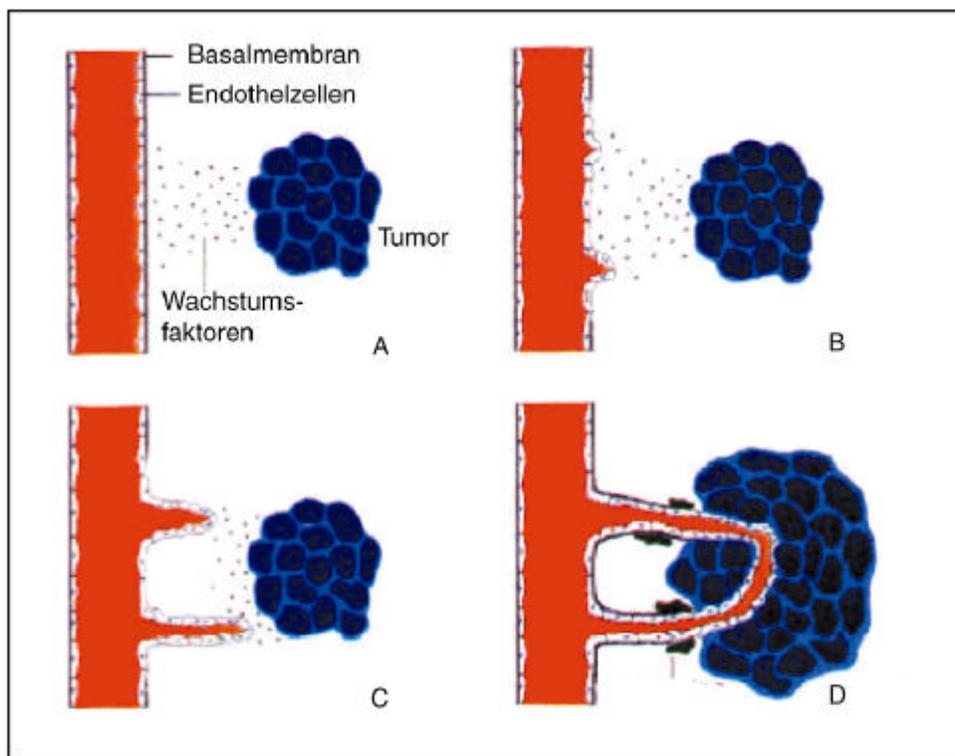


Abb. 2: Tumorinduzierte Angiogenese: A) Aktivierung von Endothelzellen durch Wachstumsfaktoren. B) Abbau der Basalmembran des Blutgefäßes durch Proteinasen. C) Migration und Proliferation von Endothelzellen in Richtung des angiogenen Stimulus. Für den Abbau der Extrazellulären Matrix werden Matrix-Metalloproteasen herangezogen. D) Bildung einer neuen Basalmembran rund um das unreife Gefäß und Vereinigung der vorderen Enden der neu entstandenen Gefäße (Anastomose). [9]

2.3 Das Umschalten auf den angiogenen Phänotyp - Der „Angiogenic Switch“

Das Umschalten auf einen angiogenen Phänotyp - der „Angiogenic Switch“ - wird durch Onkogene und Tumorsuppressorgene gesteuert. Mindestens 15 Onkogene sind bekannt, die die Expression proangiogener Proteine hochregulieren oder in manchen Fällen auch die Produktion endogener Angiogeneseinhibitoren reduzieren. Winzige Tumore mit einem Durchmesser, der weniger als einen Millimeter beträgt, können jahrelang irgendwo im Körper ruhen ohne zu wachsen, bevor sie dann unerwartet das Angiogeneseprogramm aktivieren. Damit dies stattfinden kann, ist es wichtig, dass der Tumor die proangiogenen Faktoren in solchem Maße ausschüttet, dass sie die Wirkung von endogenen, d.h. körpereigenen, Angiogeneseinhibitoren überdecken.^[10] Als erster endogener Angiogeneseinhibitor wurde Thrombospondin-1 (TBS-1) entdeckt, der von normalen, gesunden Zellen produziert wird, im Verlauf der malignen Progression jedoch verloren geht.^[11] Eine weitere interessante Beobachtung führte zu der Entdeckung von Endostatin und Angiostatin: Oft setzte bei Krebspatienten erst nach Entfernung des Primärtumors das Wachstum von Metastasen ein. Man folgerte daraus, dass der Primärtumor selbst Stoffe in die Blutbahn abgibt, die das Metastasenwachstum hemmen. [1, 3] Weitere endogene Angiogeneseinhibitoren sind Tumstatin, Vasostatin und Canstatin.^[12-14] Durch die im Verlaufe der malignen Progression verminderte Produktion dieser endogenen Inhibitoren, gekoppelt mit einer vermehrten Produktion von proangiogenen Faktoren, kommt es dann zum Umschalten auf den angiogenen Phänotyp. Ist das Angiogeneseprogramm aber einmal in Gang gesetzt, kann der Tumor exponentiell wachsen und in das umgebende Gewebe eindringen.

Aufgrund der Beobachtung, dass Tumore, deren Durchmesser weniger als einen halben Millimeter beträgt, nicht vaskularisiert sind, Tumore von einem Durchmesser von mehr als einem Millimeter jedoch an das Blutgefäßsystem angeschlossen sind, kommt man zu der Annahme, dass der „Angiogenic Switch“ in einem bestimmten Größenbereich stattfindet.

Holmgren konnte in Experimenten, in denen er diesen Umschaltmechanismus untersuchte, zeigen, dass Tumorzellen in der Lage sind, apoptotische Zellen in ihrer Umgebung durch Phagozytose zu entfernen.^[15] Aufgrund experimenteller Befunde kam man zu dem Schluss, dass hierbei aber die DNA der apoptotischen Zellen nicht wie normalerweise zerstört wird, sondern es zur Transfektion kommt, also die

Tumorzelle die DNA in ihr Genom einbaut. Auf diesem Wege können Onkogene (über die Aufnahme der apoptotischen Zellteile) horizontal transferiert werden. Dieser Mechanismus, mit dem genetische Information von einer Zelle zur nächsten übermittle wird, kann somit auch die häufig beobachtete genetische Instabilität von Krebszellen erklären. Es scheint also möglich, dass ein ruhender, nicht-angiogener Tumor durch Transfektion mit einem entsprechenden Onkogen auf den angiogenen Modus umgeschaltet wird.

2.4 Hemmung der Tumorangiogenese

Als erste angiogeneseinhibierende Substanz wurde von Folkman Interferon alpha 2a entdeckt. Mehrere Fälle erfolgreicher Behandlungen von bei Kindern auftretenden Tumoren sind beschrieben worden.[16, 17]

TNP-470 **58** (Abb. 3), der erste selektive Angiogeneseinhibitor, kam 1992 in die klinische Versuchsphase. Anfang 2002 waren es laut der „Angiogenesis Foundation“ bereits über 70 Substanzen, die sich in klinischer Phase befanden, davon 18 in Phase III.

Generell kann bei den Angiogeneseinhibitoren unterschieden werden zwischen indirekten und direkten Blockern.

2.4.1 Indirekte Inhibitoren

Die indirekten Inhibitoren richten sich gegen die Produkte von Tumorzellen, beispielsweise gegen die Produktion der für die Angiogenese relevanten Wachstumsfaktoren. Eine Schlüsselfigur stellt hierbei der Wachstumsfaktor VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) dar. Weitere in den Angiogeneseprozess involvierte Wachstumsfaktoren sind bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), PDGF (Platelet Derived Growth Factor) und EGF (Epidermal Growth Factor). Wirkstoffe wie Interferon alpha können die Produktion solcher angiogener Stimuli unterbinden. [18] Ein anderer Ansatz besteht in der Blockierung der Wachstumsfaktoren selbst, etwa durch monoklonale Antikörper oder durch synthetische, niedermolekulare Wirkstoffe, die an die Wachstumsfaktoren binden, wie z.B. Suramin **59** (Abb. 3).[19] Der Nachteil bei dieser Strategie ist, dass der Tumor diesem Angriff ausweichen kann: Durch die häufig auftretenden Mutationen kann es zur Ausschüttung anderer angiogener Stimulatoren kommen, die der eingesetzte Inhibitor dann nicht erkennt, d.h. auch hier trifft man wieder auf das Problem der Resistenzen.

2.4.2 Direkte Inhibitoren

Im Gegensatz dazu richten sich die direkten Inhibitoren gegen die angiogenen Endothelzellen. Dabei bieten sich verschiedene Angriffspunkte an.

Ein möglicher Ansatz ist die Blockierung der Rezeptoren mit Tyrosin-Kinase-Aktivität, die für das Auslösen der Signalkaskade, die zur Expression von Integrinen und Metalloproteasen führt, verantwortlich sind. Diese Blockierung kann durch spezifische Antagonisten erfolgen. Hierbei wird die Bindung der von dem Tumor ausgeschütteten Wachstumsfaktoren an den auf der Zelloberfläche exprimierten Rezeptoren verhindert. Dabei können monoklonale Antikörper verwendet werden [20]. Synthetische Inhibitoren, wie beispielsweise die Verbindung **60** oder das Phthalazinamin PTK 787 **61** (Abb. 3), inhibieren die RTKs, indem sie die Kinaseaktivität der Rezeptoren blockieren. Hierauf wird in Abschnitt 2.4.6. genauer eingegangen.

Eine nächste Möglichkeit besteht darin, die Expression der RTKs zu verhindern. Beispielsweise inhibiert das synthetische Ribozym Angiozyme die Expression der endothelspezifischen Rezeptortyrosinkinase VEGFR.

Wirkstoffe, zu denen TNP-470 **58**, Thalidomid **62** und Squalamin **63**[21] gehören (Abb. 3), inhibieren die Endothelzellproliferation, hindern also die Zellen daran sich zu vermehren, indem sie den Zellzyklus unterbrechen. Der genauere Wirkungsmechanismus ist bei allen drei Verbindungen nicht bekannt. Kürzlich wurde gezeigt, dass die beiden Inhibitoren der Methionin-Amino-peptidase-Typ-2 (MetAP-2) Fumagillin und TNP-470 die Expression des Transkriptionsfaktors Ets-1 in nanomolaren Konzentrationen blockieren.[9] Ets-1 spielt eine wichtige Rolle bei der Expression von Proteinase, die für die Angiogenese von Bedeutung sind. Thalidomid, das Medikament, das durch die Contergan-Katastrophe bekannt geworden ist, erlebt derzeit eine Renaissance und hat sich in der antiangiogenen Therapie des Multiplen Myeloms bewährt.[22, 23] Squalamin, ein aus einer Haifischart isoliertes Sterolderivat, das ursprünglich als Breitband-Antibiotikum identifiziert wurde, zeigte in weiteren Untersuchungen antiangiogene Eigenschaften.[21]

Ein anderer Ansatz besteht darin, die Matrix-Metalloproteasen (MMPs) zu inhibieren. Durch die Inaktivierung dieser Proteinase wird der Abbau der Basalmembran und des Bindegewebes und damit das Eindringen der Endothelzellen in die Extrazelluläre Matrix (ECM) verhindert. Aber auch die Tumorzellen sind auf die

MMPs angewiesen, um in die umliegende ECM einzudringen. Die Familie der MMPs umfasst mindestens 20 Enzyme, von denen MMP-2 und MMP-9 in die Angiogenese involviert sind.[8] Einige Wirkstoffe, die diese Enzyme blockieren, befinden sich in der klinischen Phase, wie z.B. Marimastat **64** (Abb. 3) und Neovastat. Zu erwähnen sind auch die Tetrazykline, eine lang bekannte Antibiotika-Klasse, die sich als potente Inhibitoren der MMPs erwiesen haben.[24] Col-3 (Metastat) **65** (Abb. 3), ein solches Tetrazyklin-Derivat, befindet sich in der klinischen Phase.[25, 26]

Des Weiteren kann versucht werden, die für die wandernden Zellen notwendigen Kontakte zu der Extrazellulären Matrix zu unterbinden. Dies ist durch Blockierung des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins möglich, das von den angiogenen Endothelzellen ausgeschüttet wird und das für die Zell-Matrix-Wechselwirkung wichtig ist.[27] Wird der Kontakt des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins zur ECM verhindert, wird die Wanderung (Migration) der Endothelzellen verhindert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin für das Überleben von Endothelzellen während der Angiogenese von Bedeutung ist.[28] Auf die Blockierung des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins wird in Abschnitt 2.4.4. genauer eingegangen.

Ein ganz neuer Ansatz ist die sogenannte metronomische Chemotherapie.[29] Im Gegensatz zur klassischen Chemotherapie, bei der im Abstand von etwa drei Wochen sehr große Dosen eines Zytostatikums gegeben werden, wird im Rahmen der metronomischen Chemotherapie dem Patienten täglich über einen langen Zeitraum hinweg eine geringe Dosis verabreicht. Das Ziel bei dieser metronomischen, niedrig dosierten Therapie liegt darin, ebenfalls die Endothelzellen anzugreifen. Bei der klassischen Chemotherapie, so berichtet Folkman, könne die Angiogenese nicht unterbunden werden, da die Endothelzellen zwischen den einzelnen Behandlungen zu viel Zeit hätten, um sich zu erholen und die Blutversorgung wiederherzustellen. Durch die tägliche Verabreichung einer niedrigen Dosis würde dieses Problem beseitigt. Besonders gute Erfolge erzielte man bei dieser Therapie, wenn parallel auch noch spezifische Angiogeneseinhibitoren eingesetzt würden.

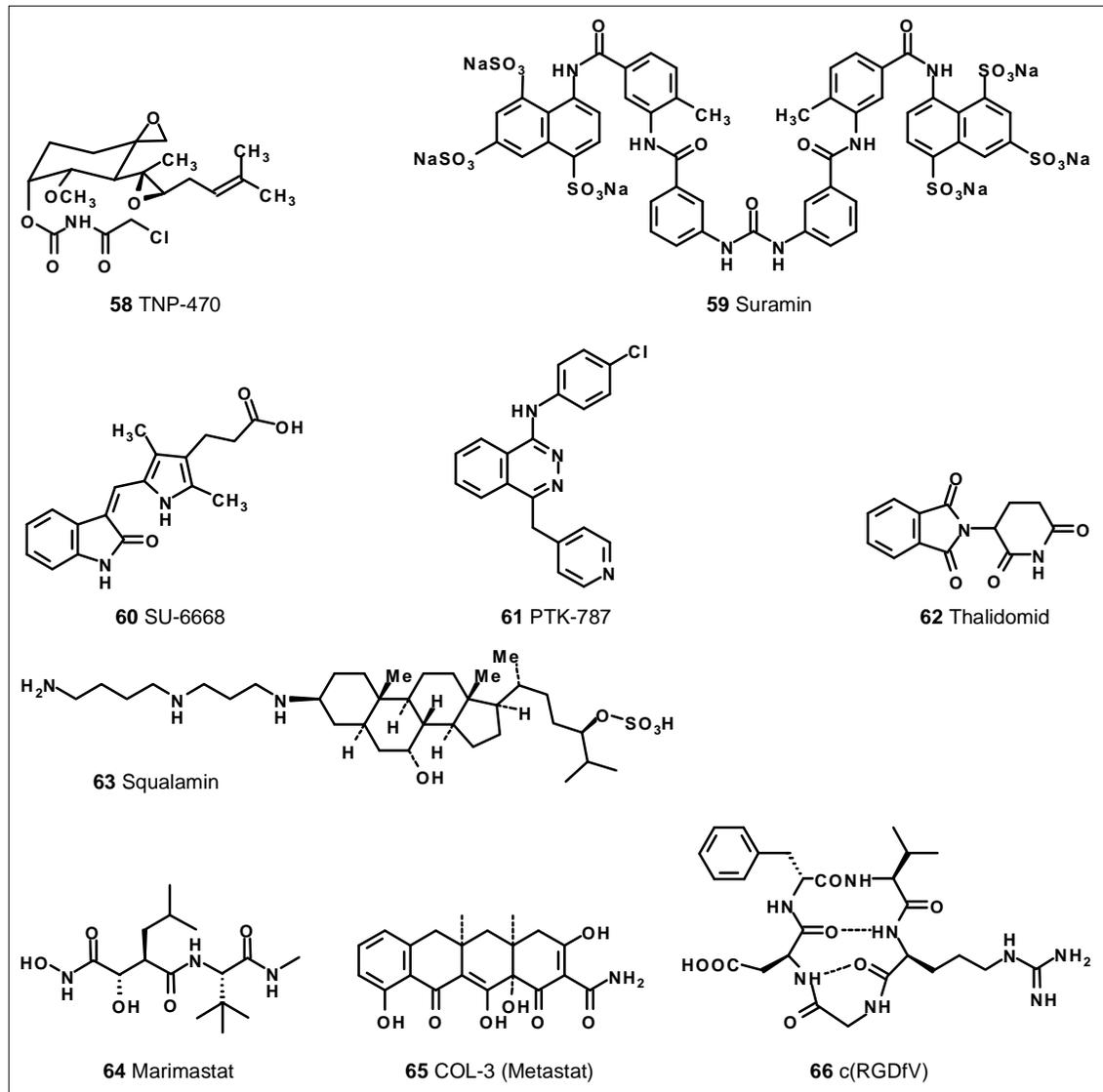


Abb. 3: Auswahl von in klinischen Studien befindlichen Angiogeneseinhibitoren.

2.4.3 Aufbau und Funktion des Integrins $\alpha_v\beta_3$

Integrine sind membranständige Glykoproteine, die als Vermittler der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion eine wichtige Rolle spielen.[30, 31] Sie sind aus einer α - und einer β -Untereinheit aufgebaut. Die Integrine unterscheiden sich in ihren α - und β -Untereinheiten, wobei bisher 18 verschiedene α - und 8 verschiedene β -Einheiten bekannt sind.[28] Durch unterschiedliche Kombination von α - und β -Einheiten der einzelnen Integrine wird die Spezifität und Affinität für die Bindung verschiedener Liganden bestimmt.

Integrine können durch die Zellmembran in beide Richtungen Signale geben. Die hohe Bindungsaffinität von Liganden an das Integrin ist im allgemeinen nicht von vornherein gegeben, sondern wird erst als Antwort auf Aktivierungssignale der Zelle erzeugt. Man spricht von „Inside-out Signaling“, wobei es zu Änderungen in der Tertiär- und Quartärstruktur der extrazellulären Region der Integrine kommt, die eine optimale Bindung des Liganden ermöglichen. Durch die Bindung des Liganden werden wiederum strukturelle Neuordnungen induziert, die das sogenannte „Outside-in Signaling“ auslösen, d.h. es werden Signale ins Zellinnere weitergeleitet. Die zytoplasmatische Domäne der Integrine ist im allgemeinen kurz und besitzt selbst keine enzymatische Aktivität, sondern leitet Signale durch Assoziation mit Adapterproteinen weiter, welche die Integrine mit dem Zytoskelett, zytoplasmatischen Kinasen und transmembranständigen Wachstumsfaktorrezeptoren verbinden.[32] Durch Bindung der Integrine an die Extrazelluläre Matrix bilden sich Integrincluster, wodurch es auf der zytoplasmatischen Seite zum Aufbau von Actinfasern kommt (Abb. 4). Diese Neuordnung von Actinfasern zu größeren Fasern verstärkt wiederum die Integrinclusterbildung, es handelt sich also um ein positives Feedback-System. Auf diese Weise bilden sich größere Aggregate aus ECM-Proteinen, Integrinen und Zytoskelettproteinen, d.h. die Integrine „integrieren“ die ECM und das Zytoskelett, worauf die Namensgebung dieser Klasse von Glykoproteinen beruht.

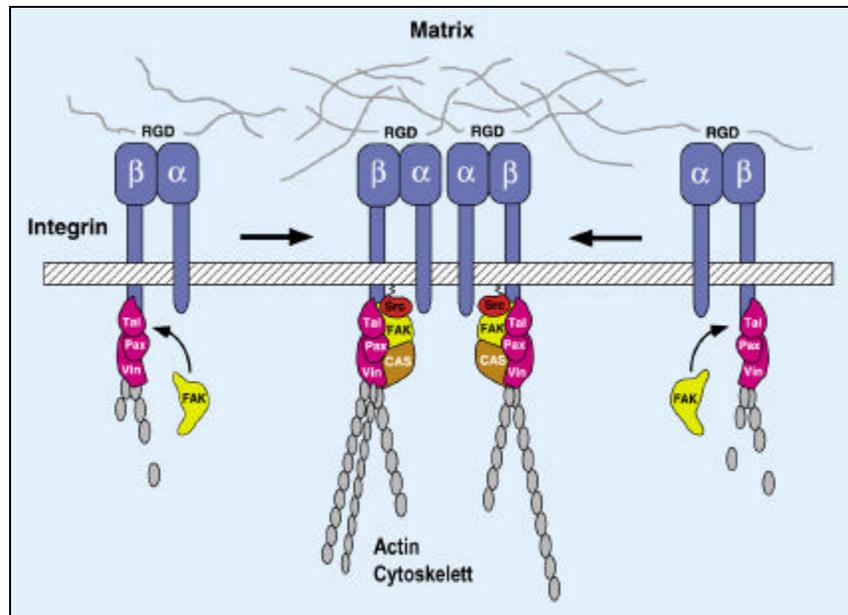


Abb. 4: Die Bindung der Integrine an die ECM unterstützt die Integrinclusterbildung und Verknüpfung mit dem Zytoskelett.[32]

Für die Angiogenese ist neben dem $\alpha_2\beta_1$ - und dem $\alpha_5\beta_1$ -Integrin besonders das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin (Vitronectin-Rezeptor) von Bedeutung.[33] Es wird von Endothelzellen, aber auch von Osteoclasten und glatten Muskelzellen exprimiert. Normalerweise wird es von Endothelzellen nur in sehr geringem Maße exprimiert, jedoch findet im Verlauf der Angiogenese eine verstärkte Expression statt.[34]

Es bindet an die Tripeptidsequenz RGD (Arg-Gly-Asp) von extrazellulären Liganden, wie z.B. Fibronectin, Vitronectin, Osteopontin und dem Von-Willebrand-Faktor,[35, 36] und ist an zahlreichen biologischen Prozessen wie Adhäsion von Osteoclasten an die Knochenmatrix, Migration von glatten Muskelzellen und Endothelzellen beteiligt. Des Weiteren tritt sie bei dem Blutprotein Fibrinogen, das eine entscheidende Rolle bei der Thrombusbildung spielt, auf. Die RGD-Gruppe dient verschiedenen Integrinen wie z.B. dem $\alpha_v\beta_3$ -, $\alpha_5\beta_1$ -, $\alpha_v\beta_1$ -, $\alpha_v\beta_6$ - und $\alpha_{11b}\beta_3$ -Integrin als Ligand. Die Spezifität der RGD-Integrin-Wechselwirkung ist zum einen durch Variation der RGD-Konformation in verschiedenen Proteinen und zum anderen durch Wechselwirkungen der Integrine mit Sequenzen in der Nähe der RGD-Bindungsstelle gewährleistet.[30]

Diese Bindung des auf den Endothelzellen exprimierten $\alpha_v\beta_3$ -Integrins an die RGD-Sequenz führt zu der Bildung von Integrinclustern.[37] Dadurch wird eine intrazelluläre Signalkaskade initiiert, die sowohl für die Proliferation der

Endothelzellen und deren Migration in Richtung des angiogenen Stimulus verantwortlich ist, als auch den programmierten Zelltod (Apoptose) verhindert, der automatisch einträte, wenn der Kontakt zu der spezifischen Matrix unterbunden werden würde.

Im Rahmen dieser Signalkaskade kommt es zur Phosphorylierung von der Kinase FAK (Fokal Adhesion Kinase) und zur Aktivierung der Kinase Src (Abb. 5). Über eine nachfolgende Interaktion mit dem Adaptermolekül Grb2 wird eine Verknüpfung zum RAS/ERK-Signalweg hergestellt. Verschiedene MAP(mitogen activated protein)-Kinasen (ERK, extracellular signal-Ras-regulated kinases) sind für das Überleben einer Zelle von Bedeutung. Cheresh et al. berichten, dass eine aufrecht erhaltene MAP-Kinase-Aktivität für die Angiogenese von Bedeutung sei.[38] Diese konnte selektiv durch Verabreichung von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Antagonisten blockiert werden.

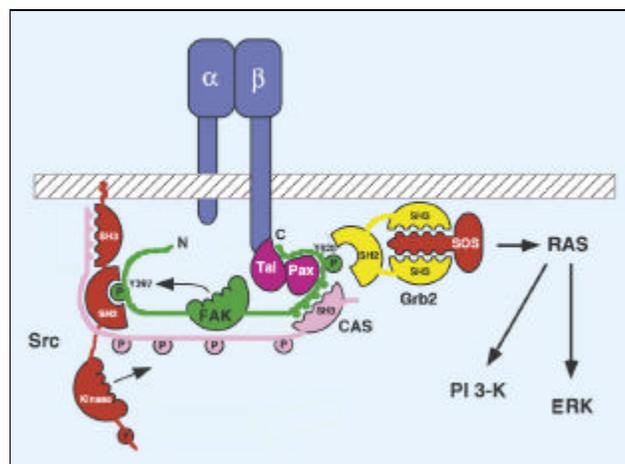


Abb. 5: $\alpha_v\beta_3$ -Integrin: Liganden-induzierte Signalkaskade.

Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass durch die Bindung des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins an Vitronectin die Transkription des *bcl-2*-Gens erhöht wird.[39] Diese integrinvermittelte Regulation von *bcl-2* verläuft über die Aktivierung von FAK und des Adapterproteins Shc, gefolgt von FAK-abhängiger Aktivierung vom Protein Ras über den Adapterkomplex Grb2/SOS. Anschließende Aktivierung des PI-3-K (Phosphoinositid-3-OH-Kinase)-Akt-Signaltransduktionsweges führt dann zu einer verstärkten *bcl-2*-Transkription. Das Bcl-2-Protein ist in der Lage mit dem apoptosefördernden Bax-Protein zu dimerisieren und es damit zu deaktivieren. Ein hohes Bcl-2/Bax-Verhältnis, wie es bei der Bindung der $\alpha_v\beta_3$ -vermittelten Bindung von Endothelzellen an den natürlichen Liganden auftritt, fördert somit das Überleben der Zelle.

Außerdem wechselwirkt das Integrin $\alpha_v\beta_3$ mit der Rezeptortyrosinkinase PDGFR + VEGFR2, wodurch es zum Auftreten von synergetischen Effekten in Bezug auf die Regulation zellulärer Funktionen kommt.[40, 41] Integrin-vermittelte Outside-in-Signale unterstützen die Aktivierung von VEGFR-2 und fördern damit die Zellproliferation und -migration.

Weitere Untersuchungen ergaben, dass das Integrin $\alpha_v\beta_3$ mit der Matrix-Metalloprotease MMP-2 wechselwirkt.[42] Dabei bindet MMP-2 in seiner proteolytisch aktiven Form das Integrin und ist somit direkt an der Oberfläche der migrierenden Endothelzellen lokalisiert. Auf diese Weise wird durch einen einzigen Rezeptor sowohl der Abbau der extrazellulären Matrix als auch die Wanderung der Zellen gesteuert.

Kürzlich konnte die Kristallstruktur der extrazellulären Domäne des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins im Komplex mit einem Arg-Gly-Asp-Liganden in Anwesenheit von Mn^{2+} -Ionen aufgeklärt werden. Dabei wurde das Zyklopentapeptid Arg-Gly-Asp-{D-Phe}-{N-methyl-Val} verwendet.[43]

Allgemein können Integrine in zwei verschiedene Klassen eingeteilt werden, wobei die eine Klasse eine extrazelluläre A-Typ-Domäne (αA) von ca. 180 Aminosäuren aufweist, die der anderen Klasse fehlt. Bei den neun αA -Integrinen ist diese αA -Domäne für die kationenabhängige Bindung physiologischer Liganden wichtig. Die Strukturaufklärung isolierter αA -Domänen sowohl mit als auch ohne gebundenen Liganden ergab, dass das zweiwertige Metallion durch ein konserviertes Motiv bestehend aus 5 Aminosäuren, das „metal ion dependent adhesion site“ (MIDAS), an der Ligandenbindungsstelle koordiniert ist. Bei Integrinen, die diese αA -Domäne nicht aufweisen, zu denen auch das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin gehört, erfordert die Bindung von Liganden stattdessen eine αA -ähnliche Domäne (βA), die in allen Integrin- β -Untereinheiten zu finden ist.

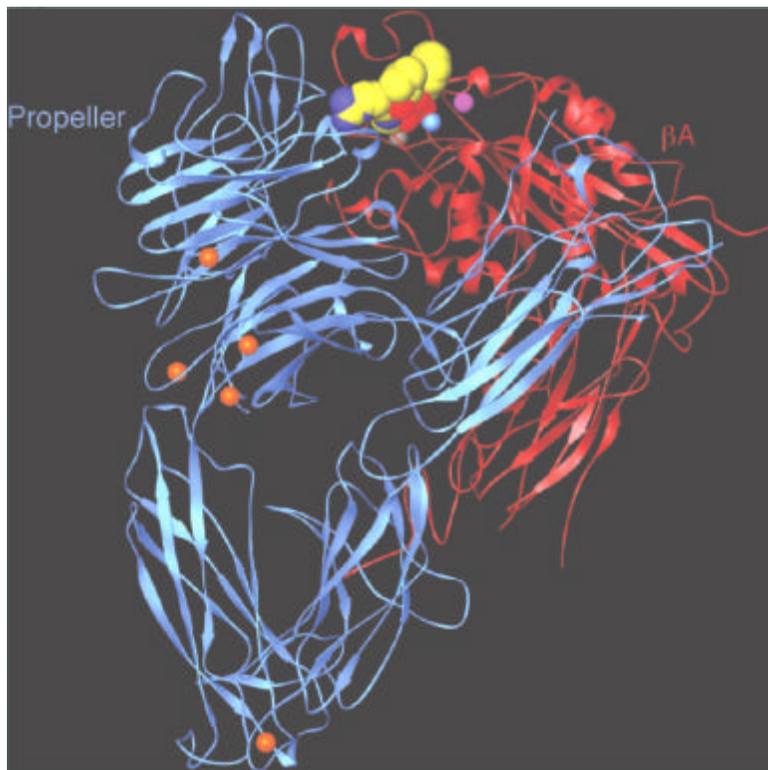
Der $\alpha_v\beta_3$ -RGD-Mn-Komplex zeigt das extrazelluläre Segment des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins im Komplex mit dem Zyklopentapeptid und acht Mn^{2+} -Ionen. Dabei befindet sich das pentagonale Peptid in einer Spalte zwischen einem aus sieben Flügeln bestehenden β -Propeller der α_v -Untereinheit und der βA -Domäne der β_3 -Untereinheit (Abb. 6). Die RGD-Einheit übernimmt hierbei den Hauptanteil der Bindung zum Integrin. Die Arg- und Asp-Seitenketten zeigen in entgegengesetzte Richtungen, wobei Arg ausschließlich mit dem Propeller und Asp ausschließlich mit der βA -Domäne wechselwirkt.

Die Arg-Seitenkette bindet in einer engen Furche an der Spitze der Propeller-Domäne. Dabei ist die Guanidinogruppe über eine zweizählige Salzbrücke an

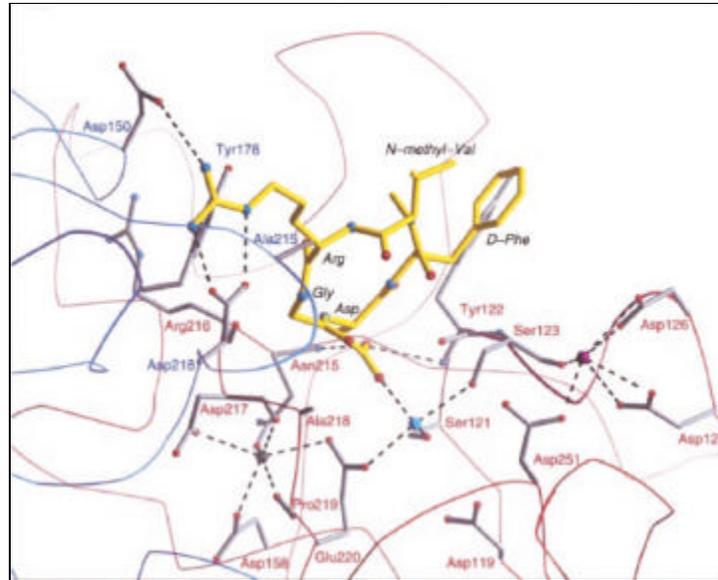
Asp²¹⁸ am Grunde der Furche und über eine weitere Salzbrücke dahinter an Asp¹⁵⁰ gebunden.

Asp bindet an das Integrin über die Carboxylatgruppe, die in die Spalte zwischen zwei Loops (A'- α 1 und C'- α 3) der β A-Einheit hineinragt. Eines der Carboxylat-Sauerstoffatome wechselwirkt dabei mit einem Mn²⁺-Ion am MIDAS, der andere Carboxyl-Sauerstoff bildet Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Amid-Rückgrat von Tyr¹²² und Asn²¹⁵. Weitere Kontakte ergeben sich durch den hydrophoben Teil der Asp-Seitenkette mit dem β -C von Asn²¹⁵. Gly liegt an der Verbindungsstelle zwischen der α - und β -Untereinheit. Es geht hydrophobe Wechselwirkungen mit der α_v -Untereinheit ein, wobei die größte Bedeutung dem Kontakt mit dem Carbonylsauerstoff von Arg²¹⁶ zukommt.

Abb. 6: Struktur der extrazellulären Domäne des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins im Komplex mit dem Zyklopentapeptid Arg-Gly-Asp-{D-Phe}-{N-methyl-Val} in Anwesenheit von Mn²⁺-Ionen. Kohlenstoff ist gelb, Stickstoff blau und Sauerstoff rot dargestellt.[43].



a) Gesamtübersicht: Die α_v -Untereinheit ist blau, die β_3 -Untereinheit ist rot dargestellt.



Ligand-Integrin-Bindungsstelle.

Wechselwirkungen zwischen dem Peptid (gelb) und dem Integrin.

Die α_v -Reste sind blau, die β_3 -Reste sind rot gekennzeichnet.

2.4.4 Inhibition des Integrins $\alpha_v\beta_3$

Aufgrund der Erkenntnis, dass das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin bei dem Prozess der Angiogenese eine entscheidende Rolle spielt, ist das Interesse an der Auffindung von potenten Antagonisten der auf den Endothelzellen exprimierten $\alpha_v\beta_3$ -Integrine stark gewachsen. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass eine Anwendung von Angiogeneseinhibitoren als Medikament nicht auf die Krebstherapie beschränkt ist, da die Angiogenese bei anderen Krankheiten, wie diabetischer Retinopathie und Arthritis ebenfalls von großer Bedeutung ist.

Strömblad et al. konnten zeigen,^[44] dass $\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten bei proliferierenden Endothelzellen Apoptose auslösen, indem sie das Tumorsuppressorgen *p53* aktivieren. *p53* induziert die Expression des Proteins $P21^{WAF1/CIP1}$, welches Cyclin/CDK-Komplexe bindet und inaktiviert; hierdurch wird der Zellzyklus in der G1-Phase angehalten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass $P21^{WAF1/CIP1}$ auch direkt die Apoptose fördert.^[45] Verabreichung von $\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten im Chorioallantoismembran (CAM)-Assay führte bei den angiogenen Endothelzellen zu einer verstärkten $p21^{WAF1/CIP1}$ -Expression. Diese Ergebnisse zeigen, dass proliferierende Endothelzellen von einem Integrin-vermittelten Überlebenssignal,

verbunden mit einer Inhibition der P53-Aktivität und damit verminderter Expression des Zellzyklussuppressors $p21^{WAF1/CIP1}$, abhängig sind.

P53 fördert die Apoptose zusätzlich dadurch, dass es die Transkription des *bcl-2*-Gens unterbindet, die des *bax*-Gens jedoch aktiviert.[46, 47] Bcl-2 ist in der Lage mit dem Apoptose-fördernden Bax-Protein zu dimerisieren und es damit zu deaktivieren. Ein hohes Bcl-2/Bax-Verhältnis, wie es bei der Bindung der $\alpha_v\beta_3$ -vermittelten Bindung von Endothelzellen an den natürlichen Liganden auftritt, fördert somit das Überleben der Zelle. Dahingegen beobachtet man nach Verabreichung von $\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten eine verminderte Expression von *bcl-2*.

Wird also durch spezifische Inhibitoren das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin blockiert, wird die Wanderung der proliferierenden Endothelzellen in Richtung Tumor unterbunden und zum anderen auch die Apoptose ausgelöst.[48] Als Inhibitoren können peptidanalogue Verbindungen, sogenannte Peptidmimetika, eingesetzt werden. Unter einem Peptidmimetikum versteht man eine Verbindung, die als Ligand eines Rezeptors den biologischen Effekt eines Peptids imitieren, wobei sie als Agonist bezeichnet wird, oder blockieren kann. In diesem Fall bezeichnet man sie als Antagonisten. Durch das Design peptidischer wie nicht-peptidischer RGD-Mimetika versucht man, das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin gezielt zu adressieren. Die Bindung löslicher monovalenter RGD-Liganden verhindert die Integrinclusterbildung und damit auch die dadurch initiierte Signalkaskade (Abb. 7).

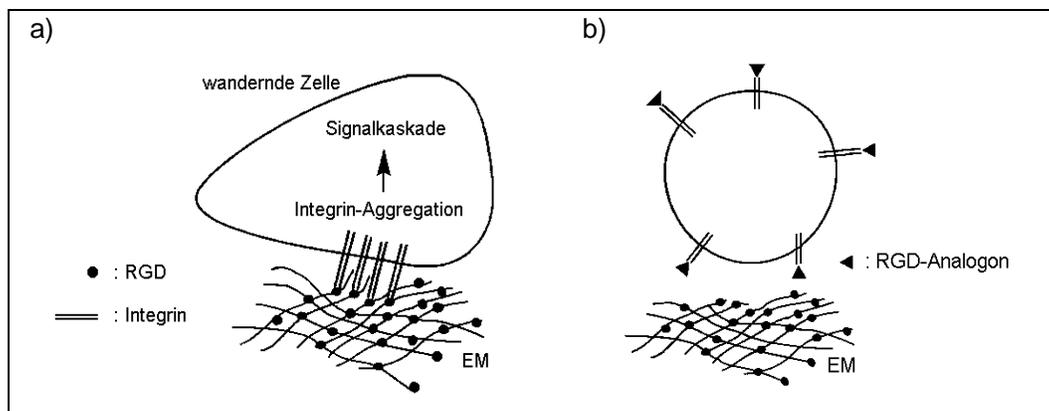


Abb. 7: a) Bildung von Integrinclustern durch Bindung der $\alpha_v\beta_3$ -Integrine an die extrazelluläre Matrix (EM),
b) Bindung der $\alpha_v\beta_3$ -Integrine an monovalente RGD-Analoga verhindert die Angiogenese.[49]

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass $\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten, d.h. Substanzen, die dieses Integrin blockieren, die Ausbildung des Blutgefäßsystems in Embryonen und die pathologische Angiogenese mit sehr geringen Effekten auf das bestehende Gefäßsystem unterbinden können. [50]

Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, ein weiteres Mitglied der Familie der Integrinrezeptoren, weist dieselbe β -Untereinheit wie das Integrin $\alpha_v\beta_3$ auf. Es wird von Blutplättchen exprimiert und bindet nach seiner Aktivierung an die RGD-Sequenz des Plasmaproteins Fibrinogen. Auf diese Weise ist es in den Prozess der Blutgerinnung involviert. Antagonisten des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ bieten eine neue, vielversprechende Möglichkeit für die Behandlung thrombotischer Erkrankungen.[51, 52]

Kessler et al. konnten mit Hilfe einer Bibliothek zyklischer stereoisomerer Pentapeptide, in welche die RGD-Sequenz eingebaut ist, zeigen, welche strukturellen Eigenschaften für die selektive Bindung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ bzw. $\alpha_v\beta_3$ notwendig sind.[53] Hierbei zeigte sich, dass das zyklische Pentapeptid c(RGDfV) ein sehr potenter und selektiver Inhibitor des Integrins $\alpha_v\beta_3$ ist.[54] Ein N-methyliertes Derivat dieser Verbindung (EMD121974) befindet sich derzeit in klinischen Studien.[55] Untersuchungen der Isomere von c(RGDfV) ergaben, dass nicht nur die Seitenketten sondern auch das Peptid-Rückgrat mit mindestens einer Wasserstoffbrücke an der Rezeptorbindung beteiligt ist.[27]

Es wurden eine große Anzahl nicht-peptidischer RGD-Mimetika mit einer hohen Affinität gegenüber dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ synthetisiert, die die verschiedensten Grundgerüste aufweisen (wie z.B. Indazol,[56] Benzol,[57] Isoxazolin,[58, 59] Benzodiazepin,[60-62] Hydantoin,[63] Übersichtsartikel: siehe[8]). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern zu blockieren.[64] Klinische Studien werden derzeit mit Vitaxin II, einem Vertreter dieser Klasse, vorgenommen.[65, 66]

Weil $\alpha_v\beta_3$ -Integrine nicht nur auf Endothelzellen, sondern auch auf durch Wachstumsfaktoren stimulierten Monozyten und T-Lymphozyten, Makrophagen, Osteoclasten, Fibroblasten, Blutplättchen und glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert werden,[67] ist z.B. auch eine Verwendung von $\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten bei der Behandlung von Restenosis und Osteoporose denkbar.

2.4.5 Aufbau und Funktion der Rezeptortyrosinkinasen

Die Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) sind Transmembranproteine, die zahlreiche fundamentale Prozesse, wie Zellzyklus, Migration, Stoffwechsel, Proliferation und Differenzierung regulieren. Sie sind aus drei Domänen aufgebaut: einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, die über eine transmembrane α -Helix mit einer zytosolischen Tyrosinkinase-Domäne verbunden ist. Fast alle RTKs liegen als Monomere in der Membran vor.[68] Nach Bindung ihres Liganden kommt es zur Dimerisierung zweier RTKs und anschließend zur Auto- bzw. Transphosphorylierung spezifischer Tyrosinreste innerhalb der zytosolischen Domäne der Rezeptoren. Diese Phosphotyrosine dienen als Anlagerungsstellen für Signalmoleküle bzw. Adapterproteine, die für die Aktivierung bzw. Rekrutierung unterschiedlicher weiterer Zielproteine verantwortlich sind.[68-70] Eine der zahlreichen von RTKs vermittelten Signalkaskaden stellt die MAP-Kinase-Kaskade dar (Abb. 8).[69]

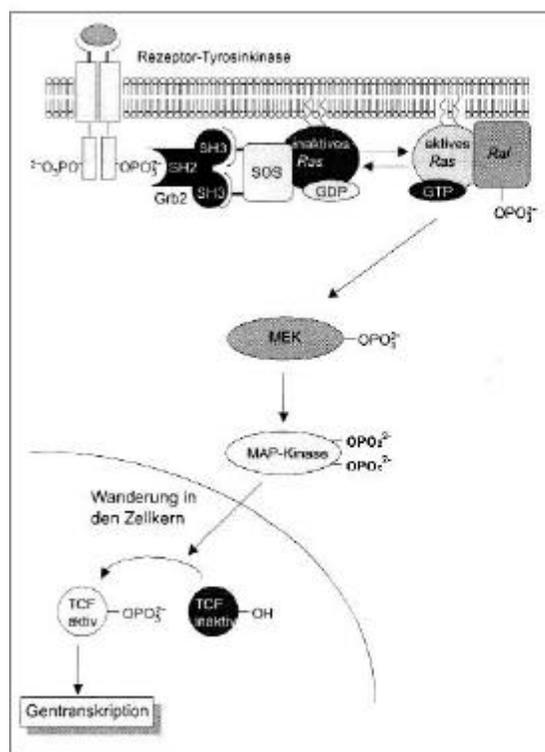


Abb. 8: MAP-Kinase-Kaskade. [71]

Sie wird z.B. durch die Bindung von Wachstumsfaktoren wie EGF (Epidermal Growth Factor) oder PDGF (Platelet-derived Growth Factor) an die extrazelluläre Domäne des entsprechenden Rezeptors ausgelöst. Nach ligandeninduzierter Dimerisierung und erfolgter Auto- bzw. Transphosphorylierung der RTKs lagert sich das Adapterprotein Grb2 mittels seiner SH2-Domäne an die Phosphotyrosine im zytoplasmatischen Bereich des Rezeptors an. Grb2 liegt im Komplex mit SOS vor, einem Faktor, der bei dem Protein Ras den Austausch von GDP gegen GTP ermöglicht bzw. erleichtert. Dadurch aktiviertes Ras wechselwirkt mit der zu den MAP-Kinasen (Mitogen Activated Protein Kinase) zählenden Serin/Threonin-Kinase Raf, was am Ende der Kaskade unter anderem zur Weiterleitung des Signals in den Zellkern führt. Dort kommt es zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, die die Expression der entsprechenden Gene auslösen.[68, 72, 73]

Man unterscheidet zwischen zwei Arten von Rezeptoren: Rezeptoren, die spezifisch von Endothelzellen exprimiert werden und solche, die auch auf anderen Zellarten zu finden sind.

2.4.5.1 Endothelspezifische Rezeptortyrosinkinasen

Zwei unterschiedliche Familien der endothelspezifischen Rezeptortyrosinkinasen und ihre Liganden spielen bei der Blutgefäßneubildung eine wichtige Rolle. Zu diesen Familien zählen zum einen die VEGF-Rezeptoren und zum anderen die Tie-Rezeptoren.[74]

VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor)

Die VEGF-Rezeptor-Familie besteht aus drei Mitgliedern: VEGFR-1/Flt-1 und VEGFR-2/KDR, die hauptsächlich im Blutendothel exprimiert werden, sowie VEGFR-3/Flt-4, ein Rezeptor, der ausschließlich im Lymphendothel zu finden ist.[75-77] Als Liganden dieser Rezeptoren fungieren die Mitglieder der VEGF-Familie, zu denen VEGF, PGF (Placenta Growth Factor), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und VEGF-E gehören, unterschiedliche Spleißvarianten des Wachstumsfaktors VEGF.[78]

VEGFR-2/KDR bindet VEGF, VEGF-C, VEGF-D und VEGF-E. Dabei ist das VEGF/VEGFR-2-System der Hauptübermittler der VEGF-induzierten Signale, wobei es zur Aktivierung des MAP-Kinase-Signaltransduktionsweges kommt (Abb. 8), die die Migration und Proliferation der Endothelzellen induziert. Als Hauptinitiator der

Vaskulogenese führt VEGF zum Aufbau von zunächst noch unreifen und instabilen Blutgefäßen.[79]

VEGFR-1 bindet VEGF sowie VEGF-B und PGF mit großer Affinität. Da es jedoch nachfolgend nur zu sehr geringer Signalaktivität kommt, wird angenommen, dass dieser Rezeptor als negativer Regulator fungiert, indem er VEGF abfängt und damit den Signaltransduktionsweg von VEGFR-2 blockiert.

VEGFR-3 bindet an VEGF-C und VEGF-D. Er wird zu Beginn in allen embryonalen Endothelzellen exprimiert, jedoch geht die Expression in den Blutgefäßen zurück, und der Rezeptor wird nur noch im lymphatischen Endothel exprimiert.

Tie-Rezeptoren

Die Familie der Tie-Rezeptoren besteht aus zwei Mitgliedern. Tie-1 und Tie-2 (TEK). Mit Hilfe dieser zweiten endothelspezifischen Rezeptortyrosinkinase-Familie und ihren entsprechenden Liganden, den Angiopoietinen, wird das Gefäßnetz moduliert und umstrukturiert.[80] Von den vier bekannten Liganden (Ang-1, Ang-2, Ang-3 und Ang-4), die alle vorwiegend an Tie-2 binden, sind bei der Gefäßbildung Ang-1 und Ang-2 von Bedeutung. Obwohl Embryonen, denen entweder Ang-1 oder Tie-2 fehlt, zunächst, anders als bei Embryonen, denen entweder VEGF oder VEGFR-2 fehlt, eine normale Gefäßbildung aufweisen, findet im weiteren Verlauf der Angiogenese keine weitere Umformung zu reifen Gefäßen statt.

Das Tie-2/Ang-System arbeitet im Verlaufe der Angiogenese eng mit dem VEGF-System zusammen und ist für die Reifung der Blutgefäße zuständig:[79] Hierbei erfüllen diese beiden Tie-Liganden gegensätzliche Aufgaben. Sie sorgen zum einen für die Reifung und Erhaltung der Gefäße, sind aber ebenso für deren Destabilisierung verantwortlich. Ang-1 vermittelt die Wechselwirkungen zwischen Endothelzellen und den umgebenden Zellen, wodurch es im Rahmen der Angiogenese zur Bildung einer starken und undurchlässigen Gefäßwand kommt. Im weiteren Verlauf stabilisiert und erhält Ang-1 das reife Gefäß. Ang-2 stellt einen natürlichen Antagonisten von Ang-1 dar.[81] Überexpression von Ang-2 im embryonalen Endothel zeigte letale Wirkung, wohingegen bei erwachsenen Mäusen im Verlauf der aktiven Umbildung von Blutgefäßen, z.B. bei der Tumorgenese, die Expression von Ang-2 notwendig ist. Durch Verschiebung des Gleichgewichtes der entsprechenden Ligandenkonzentrationen wird entweder die Stabilisierung der Gefäße oder deren Destabilisierung als vorbereitende Maßnahme im Zusammenspiel mit dem Wachstumsfaktor VEGF für nachfolgende Angiogenese-Prozesse favorisiert.[82]

2.4.5.2 Endothelunspezifische Rezeptortyrosinkinasen

Zu dieser Klasse zählen die Eph (Erythropoietin-producing hepatoma amplified sequence)-, EGF (Epidermal Growth Factor)-, FGF (Fibroblast Growth Factor Receptor)-, PDGF (Platelet-derived Growth Factor)- und IGF (Insulin-like Growth Factor)-Rezeptoren.

Ephrin (Erythropoietin-producing hepatoma amplified sequence)-Rezeptoren

Die Eph-Rezeptoren und ihre Liganden, die Ephrine, spielen wichtige Rollen in verschiedenen bei der Embryonalentwicklung ablaufenden Prozessen, die unter anderem die Angiogenese betreffen.^[83] Die Ephrin-Familie ist die größte Familie der Rezeptortyrosinkinasen. 14 Eph-Rezeptoren und 8 Ephrine konnten bisher identifiziert werden. Da die Liganden anders als die der anderen RTKs an die Zellmembran gebunden sein müssen, um den jeweiligen Rezeptor zu aktivieren, beschränkt sich die Signalweitergabe auf den direkten Kontakt zwischen zwei Zellen. Die RTK EphB4 wird in der frühen Phase der Gefäßentwicklung spezifisch auf dem venösen Endothel und sein Ligand Ephrin B2 wiederum spezifisch auf dem arteriellen Endothel exprimiert.^[84] Die Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor im Übergangsbereich zwischen venösen und arteriellen Kapillaren ist von entscheidender Bedeutung bei der Gefäßentwicklung, wie durch Knockout-Versuche belegt werden konnte.

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)

Zu den EGF-Rezeptoren gehören der ErbB1 (HER-1), ErbB2 (HER-2), ErbB3 (HER-3) und ErbB4 (HER-4).^[85, 86] Der Epidermal Growth Factor (EGF), der an den EGFR bindet, war einer der ersten Wachstumsfaktoren, die charakterisiert wurden. Der EGFR induziert nach Ligandenbindung sowohl Zellproliferation als auch Zelldifferenzierung. Neben EGF werden auch weitere Liganden, wie beispielsweise TGF- α (Transforming Growth Factor α), β -Cellulin (BTC) und HB-EGF (Heparin-binding EGF-like Growth Factor) an den EGFR gebunden.

Der EGF-Rezeptor wird auch von Tumorzellen exprimiert, und eine verstärkte Expression von EGFR-Liganden oder sowohl von Liganden als auch von dem Rezeptor kann zu unkontrollierten zellulären Prozessen führen.

FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor)

Die FGF-Familie besteht aus vielen verschiedenen Faktoren, die 30 – 70 % Sequenzhomologien aufweisen und potente Mitogene für eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen darstellen. Sie binden an vier strukturell verwandte FGF-Rezeptoren (FGFR-1 – 4) und lösen damit intrazelluläre Signalkaskaden aus, die im Rahmen der Angiogenese von Bedeutung sind. Beispielsweise kommt es zu Endothelzellproliferation, -migration und -differenzierung.

PDGFR (Platelet-derived Growth Factor Receptor)

Der PDGF, ein potenter Stimulator von Zellwachstum und Beweglichkeit unterschiedlicher Zelltypen (z.B. Fibroblasten, glatten Muskelzellen und kapillarischen Endothelzellen), ist ein dimeres Molekül, das aus zwei Polypeptidketten A und B aufgebaut ist. Dabei können sich Homodimere (AA oder BB) oder Heterodimere (AB) bilden. Sie binden an die strukturell ähnlichen PDGF-Rezeptoren α und β . Dabei kann ein PDGF-Molekül gleichzeitig an zwei Rezeptoren binden. Es kommt zu Zellantworten, die die Aktivierung verschiedener interagierender Signalkaskaden (z.B. des MAP-Kinase-Weges oder der Aktivierung der PI3-Kinase), welche Signale für die Neuordnung von Actinfasern, für die Zellproliferation und -migration und für die Hemmung der Apoptose vermitteln, umfassen.

IGFR (Insulin-like Growth Factor Receptor)

Zu dieser Familie gehören drei Rezeptoren (IGF-1R, IGF-2R, IR (Insulin-Rezeptor)), an die die Liganden IGF-I, IGF-II, Insulin und verschiedene proteinbindende Proteasen, sowie sieben IGFBPs (Insulin-like Growth Factor Binding Proteins) binden. Durch die Bindung kommt es zur Auslösung verschiedener Signaltransduktionswege, wie z.B. der Ras-Raf-Kaskade. Das IGF-I/IGF-1R-System wirkt zelltransformierend, mitogen und anti-apoptotisch, spielt jedoch weniger bei der tumorinduzierten Angiogenese eine Rolle, sondern eher bei der im Rahmen der diabetischen Retinopathie auftretenden Neovaskularisation.[87]

2.4.6 Inhibition der Rezeptortyrosinkinasen

Die Inhibition der Rezeptortyrosinkinasen bietet eine vielversprechende Möglichkeit die tumorinduzierte Angiogenese zu unterbinden.[7, 88-90]

Mit Hilfe spezifischer Antagonisten kann die Bindung der von dem Tumor ausgeschütteten Wachstumsfaktoren an den auf der Zelloberfläche exprimierten Rezeptoren verhindert werden, etwa durch Verwendung monoklonaler Antikörper.[20] Alternativ kann versucht werden, die Tyrosin-Kinase-Aktivität zu hemmen. Das kann mit Hilfe von ATP-Analoga erreicht werden, die in der adeninbindenden Tasche der Kinase binden sollen. Dies hat zur Folge, dass ATP nicht mehr zur Phosphorylierung genutzt werden kann, womit die Kinase-Aktivität gehemmt wird. Anfangs wurde diese Möglichkeit der Inhibition von Rezeptortyrosinkinasen als nicht vielversprechend gewertet, da die ATP-Bindungstasche der Proteinkinasen hochkonserviert ist, wodurch eine Selektivität potenzieller Inhibitoren für einzelne Kinasen unwahrscheinlich schien. Diese Annahme erwies sich jedoch als falsch: Für einige Proteinkinasen befinden sich hochselektive Inhibitoren derzeit in der klinischen Phase.[91-93] Kristallstrukturen der Kinasen bzw. der Kinase-Inhibitor-Komplexe und Molecular Modelling bilden eine Grundlage für das Design selektiver Inhibitoren.

Verschiedene Grundgerüste werden dabei verwendet, z.B. Quinazoline, Phenylamino-Pyrimidine, Pyrido[d]pyrimidine und Indolin-2-one.[88]

Einige dieser Verbindungen befinden sich in klinischen Studien, darunter die Verbindung SU-6668 **60** und das Phthalazinamin PTK-787 **61** (Abb. 3), das einen selektiven Inhibitor für KDR und Flt-1 darstellt.[94, 95]

3 Aufgabenstellung

Aufgrund der Beobachtung, dass die Angiogenese eine entscheidende Rolle bei verschiedenen pathologischen Prozessen, wie beispielsweise beim Tumorwachstum und nachfolgender Metastasierung, spielt, erhofft man sich durch die Angiogenesehemmung neue Ansätze für die Behandlung zahlreicher Krankheiten zu finden. Dabei bieten sich unterschiedliche Ansatzpunkte an:

Ein möglicher Ansatz ist die Blockierung der Rezeptoren mit Tyrosin-Kinase-Aktivität, die für das Auslösen der Signalkaskade, die zu Expression von Integrinen und Matrix-Metalloproteasen führt, verantwortlich sind. Diese Blockierung kann durch spezifische Antagonisten erfolgen, die die Bindung der von dem Tumor ausgeschütteten Wachstumsfaktoren an den auf der Zelloberfläche exprimierten Rezeptoren verhindern. Alternativ dazu kann versucht werden, die Tyrosin-Kinase-Aktivität zu hemmen.

Des Weiteren bietet sich die Möglichkeit, das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin zu blockieren. Dies kann mit peptidanalogen Verbindungen, sogenannten Peptidmimetika, erreicht werden. Durch das Design peptidischer wie nicht-peptidischer RGD-Mimetika versucht man, das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin gezielt zu adressieren. Die Bindung löslicher monovalenter RGD-Analoga verhindert die Integrinclusterbildung und damit auch die dadurch initiierte Signalkaskade. Im Folgenden wird sowohl die Migration der Endothelzellen verhindert als auch die Apoptose ausgelöst, wodurch der Prozess der Angiogenese unterbunden wird.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zum einen niedermolekulare Liganden für das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin und zum anderen ATP-Analoga als potenzielle Angiogeneseinhibitoren synthetisiert werden. Die dargestellten Verbindungen sollten auf ihre biologische Wirksamkeit hin getestet werden.

Zu den Anforderungen, die an einen $\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten gestellt werden, gehören eine hohe Affinität, aber auch Selektivität gegenüber dem Vitronectin-Rezeptor und günstige pharmakokinetische Eigenschaften wie gute Bioverfügbarkeit und metabolische Stabilität. Erstrebenswert sind Substanzen mit oraler Verfügbarkeit. Aus diesem Grund versucht man, Wirkstoffe auf nicht-peptidischer Basis zu entwickeln, da Peptide den Magen-Darm-Trakt nicht passieren können. Außerdem werden sie, selbst wenn sie den Wirkungsort erreichen, dort von Proteasen abgebaut.

Es wurde das trizyklische Benzodiazepindiongrundgerüst (Abb. 9) für die Entwicklung neuartiger $\alpha_v\beta_3$ -Inhibitoren gewählt.

Benzodiazepine wurden bereits öfter als Template für Peptidmimetika verwendet. Man findet diese Stoffklasse als Grundgerüst vieler pharmakologisch aktiver Verbindungen und Medikamente, wie z.B. Valium. Aus Konformationsstudien ging hervor, dass eine halbschalenförmige Konformation des Templatgrundgerüsts, wie sie bei Benzodiazepinen auftritt, für die Präsentation der pharmakophoren Gruppen des RGD-Mimetikums von Vorteil ist.[96] Dies entspricht der Nachahmung der Umgebung der natürlich vorkommenden RGD-Sequenz, die in einer Schleife lokalisiert ist.

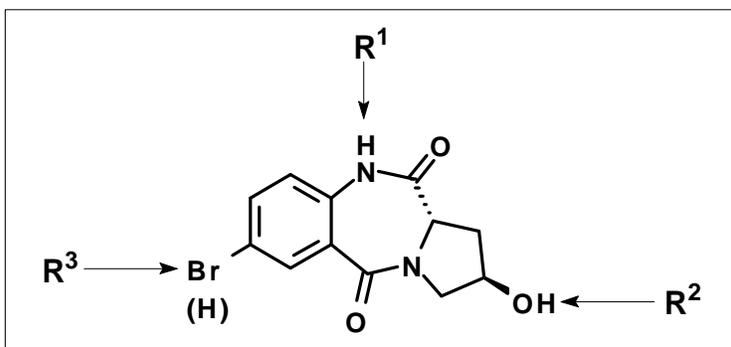


Abb. 9: Benzodiazepindiongrundgerüst.

Das hier gewählte trizyklische Benzodiazepindion bietet eine große Variationsmöglichkeit bezüglich der Art und Stellung der Substituenten.[97-99] Das Einführen der Seitenketten kann über Alkylierung am Amid-Stickstoff (R^1), an der

Hydroxylfunktion (R^2) oder über eine Heck-Reaktion am Brom-Atom des Aromaten (R^3) erfolgen.

Ein Festphasen-Rezeptor-Assay sollte anschließend durchgeführt werden, bei dem untersucht wird, inwieweit die synthetisierten Verbindungen die Bindung von Fibrinogen, einem natürlichen Liganden, an das Integrin $\alpha_v\beta_3$ - bzw. $\alpha_{11b}\beta_3$ verhindern können.[100]

Zusätzlich sollte die apoptoseinduzierende Wirkung der Substanzen bei HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) getestet werden. Hierbei sollte ein ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) verwendet werden.

Weiterhin sollten potenzielle Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren synthetisiert und in einem ELISA [100] getestet werden.

Dabei bieten sich verschiedene Grundgerüste an, z.B. Quinazoline, Phenylaminopyrimidine, Pyrido[d]pyrimidine und Indolin-2-one.[88] Im Rahmen dieser Arbeit wurde das in Abb. 10 gezeigte Aminooxindolgrundgerüst gewählt.

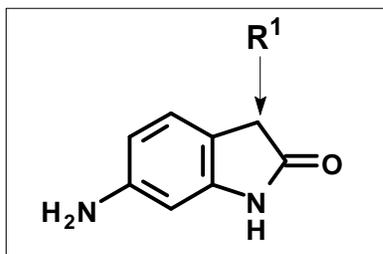


Abb. 10: Aminooxindolgrundgerüst.

Die Entwicklung von Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren auf Oxindolbasis geht auf Schlessinger et al. zurück.[68] Hierbei fungiert das Oxindol als ATP-Analogon, das in der adeninbindenden Tasche der Kinase binden soll. Dies hat zur Folge, dass ATP nicht mehr zur Phosphorylierung genutzt werden kann, womit die Kinase-Aktivität blockiert wird.

Das von Schlessinger verwendete Oxindolgrundgerüst sollte an Position 6 durch eine Aminofunktion erweitert werden, um damit möglicherweise die Bindungsaffinität zu erhöhen.

Durch Variation der Substituenten R^1 an Position 3 sollten ATP-Analoga synthetisiert werden, die spezifisch unterschiedliche Rezeptortyrosinkinasen inhibieren.

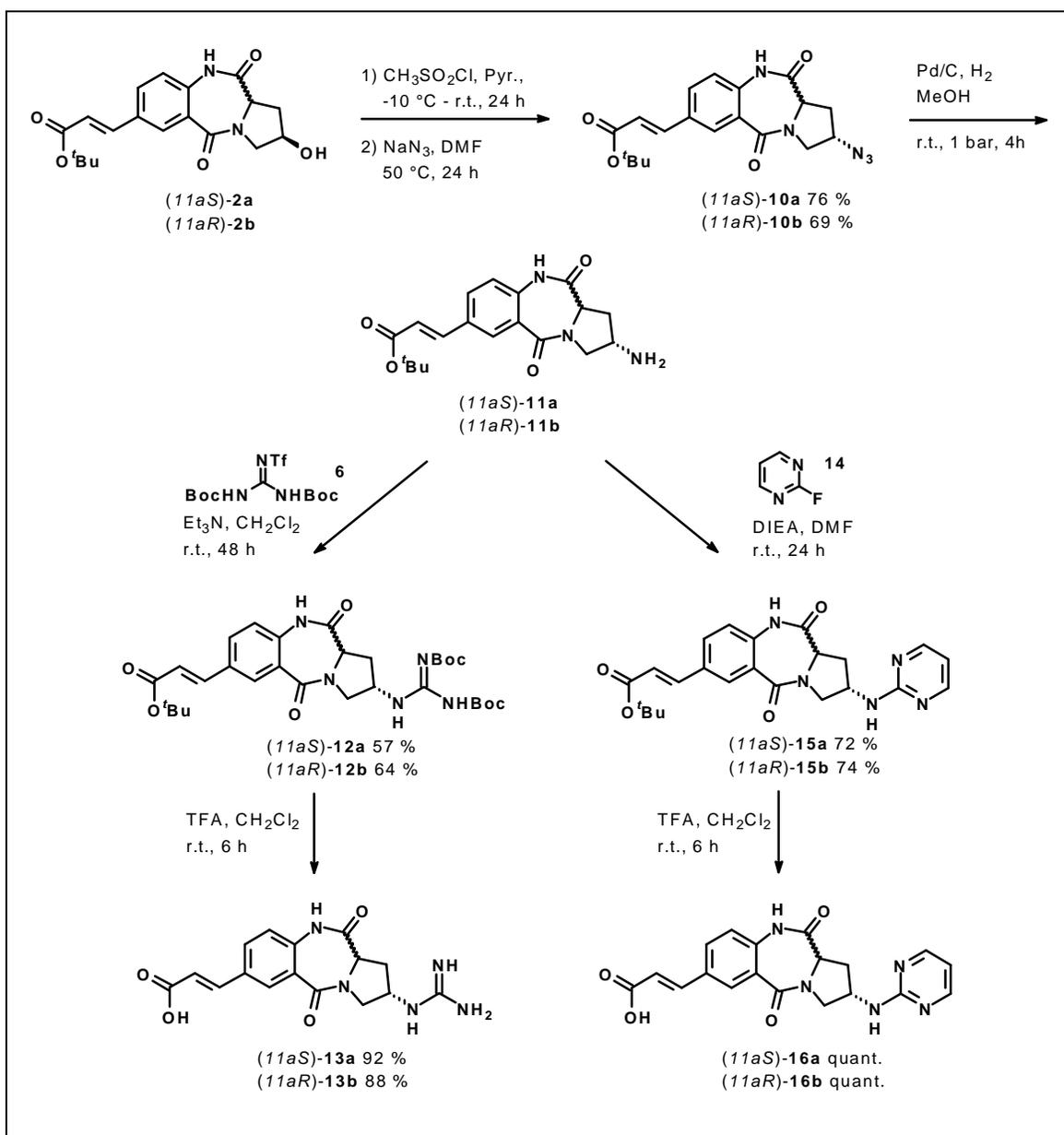
4 Ergebnisse

4.1 Synthese der RGD-Analoga

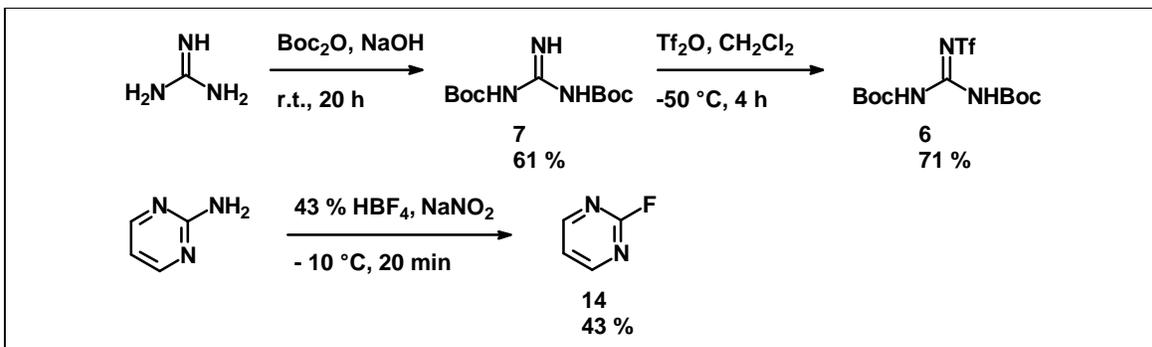
Die RGD-Mimetika **9** und **ent-9** wurden wie in Schema 1 gezeigt dargestellt. Im ersten Schritt erfolgte die Kondensation von 5-Bromisatosäureanhydrid mit (2S, 4R)-4-Hydroxypyrrolidin-2-carbonsäure in DMSO. Das hieraus resultierende Benzodiazepindion **1** wurde anschließend in einer Heck-Reaktion mit *tert.*-Butylacrylat in Acetonitril zu Verbindung **2** umgesetzt.[99] Man erhielt hierbei aufgrund partieller Epimerisierung ein Diastereomeregemisch, welches sich säulenchromatographisch trennen ließ. Alle weiteren Syntheseschritte wurden mit beiden Diastereomeren getrennt durchgeführt.

Oxidation des Alkohols **2a** zum entsprechenden Keton **3** wurde mit 1-Hydroxy-1,2-benziodoxol-3-(1*H*)-on-1-oxid (IBX) als Oxidationsmittel durchgeführt. Eine anschließende Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion des Ketons **3** mit Diethylcyanomethylphosphonat führte zum α,β -ungesättigten Nitril **4**. Nach Reduktion von Verbindung **4** mit $\text{CoCl}_2/\text{NaBH}_4$ [101] wurde das hieraus erhaltene Amin **5** durch Reaktion mit *N,N'*-Di-boc-*N''*-trifluormethansulfonylguanidin **6** in das di-boc-geschützte Guanidin **8** überführt. Das Guanidinylierungsreagenz **6** ließ sich in zwei Stufen ausgehend von Guanidin durch Einführung zweier Boc-Schutzgruppen mit Di-*tert.*-butylpyrocarbonat in THF und anschließender Umsetzung der daraus resultierenden Verbindung **7** mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid darstellen (Schema 3).[102] Durch Abspaltung der Schutzgruppen von Verbindung **8** mittels TFA wurde die Zielverbindung **9** erhalten. Auf gleiche Weise konnte ausgehend von Verbindung **2b** das Enantiomer **ent-9** dargestellt werden.

boc-*N'*-trifluormethansulfonylguanidin **6** führte zum di-boc-geschützten Guanidin **12a**. Durch Abspaltung der Schutzgruppen mit TFA erhielt man das Zielmolekül **13a**. Ausgehend von Alkohol **2b**, wurde das entsprechende Diastereomer **13b** dargestellt. Verbindung **15a**, die einen Aminopyrimidinrest als Guanidinomimetikum trägt,^[57] wurde durch Umsetzung von Amin **11a** mit 2-Fluoropyrimidin **14**, das sich in einem Schritt aus 2-Aminopyrimidin darstellen lässt, erhalten (Schema 3).^[103] Die Esterspaltung ergab das RGD-Analogen **16a**. Auf gleiche Weise wurde ausgehend von Amin **11b** die Zielverbindung **16b** dargestellt.

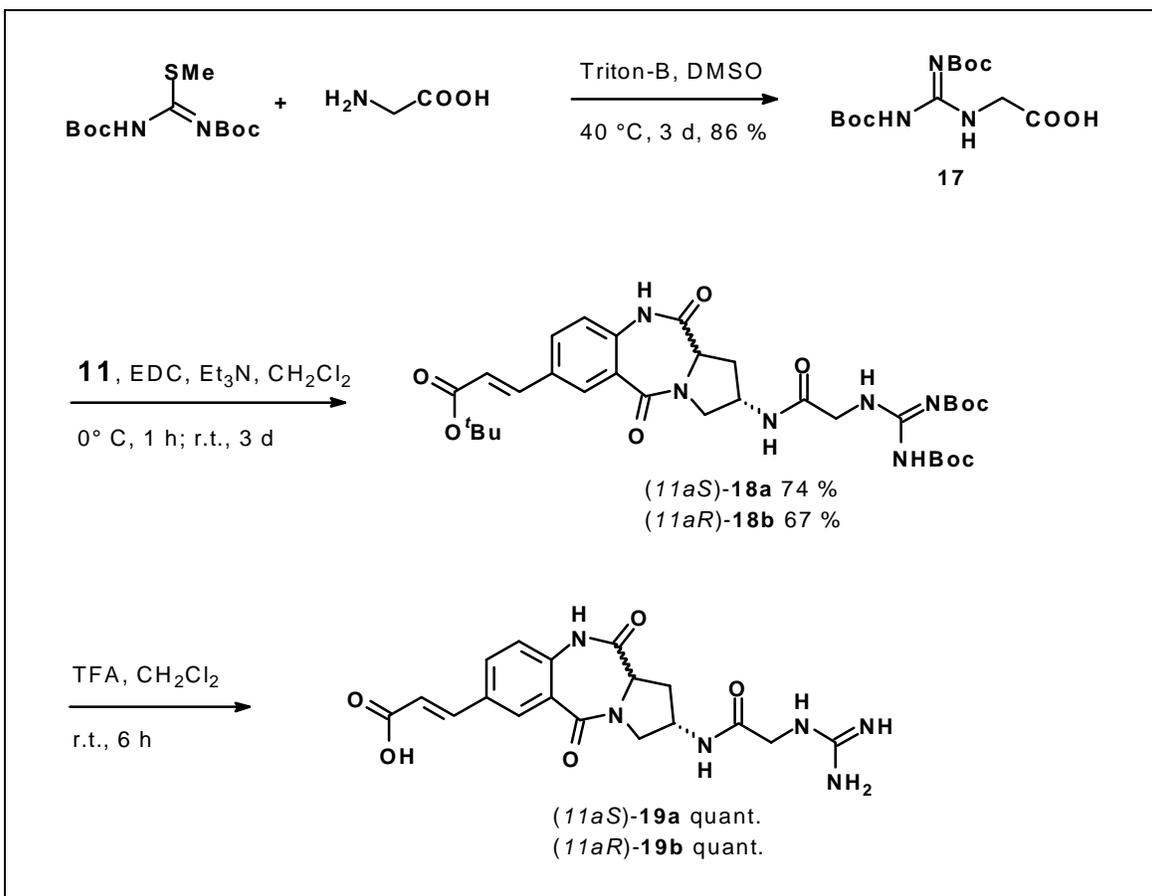


Schema 2: Synthese der RGD-Mimetika **13a**, **13b**, **16a** und **16b**.



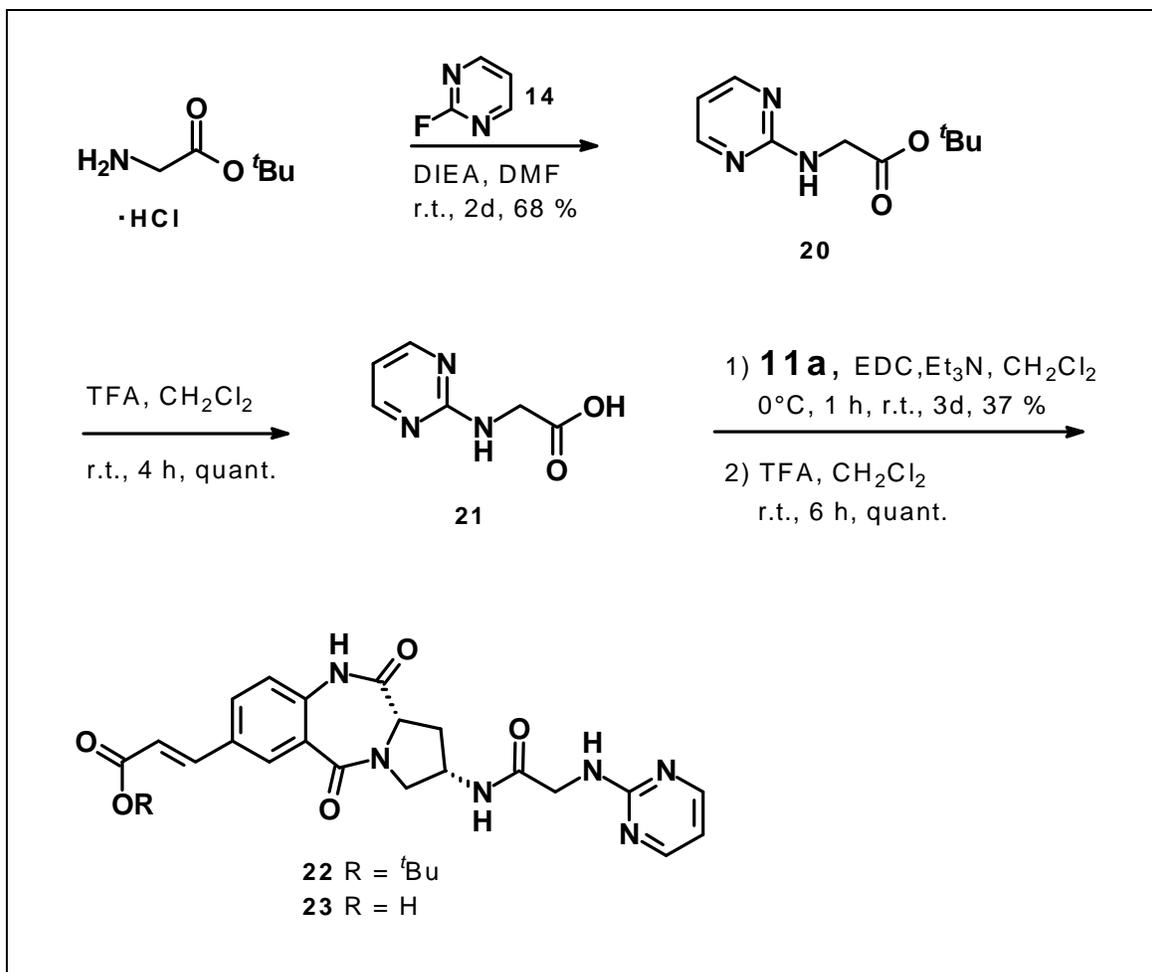
Scheme 3: Synthese der Guanidinylierungsreagenzien **6** und **14**.

In Schema 4 wird die Synthese der Verbindungen **19a** und **19b** gezeigt: Glycin wurde mit 1,3-Bis(*tert*-butoxycarbonyl)-2-methylthioisoharnstoff umgesetzt. Die hieraus erhaltene guanidinylierte Carbonsäure **17** wurde anschließend mit Amin **11a**, bzw. **11b** einer Peptidkopplung unterworfen. Durch Abspaltung der Schutzgruppen der Verbindungen **18a** bzw. **18b** wurde das RGD-Analogon **19a** bzw. **19b** erhalten.



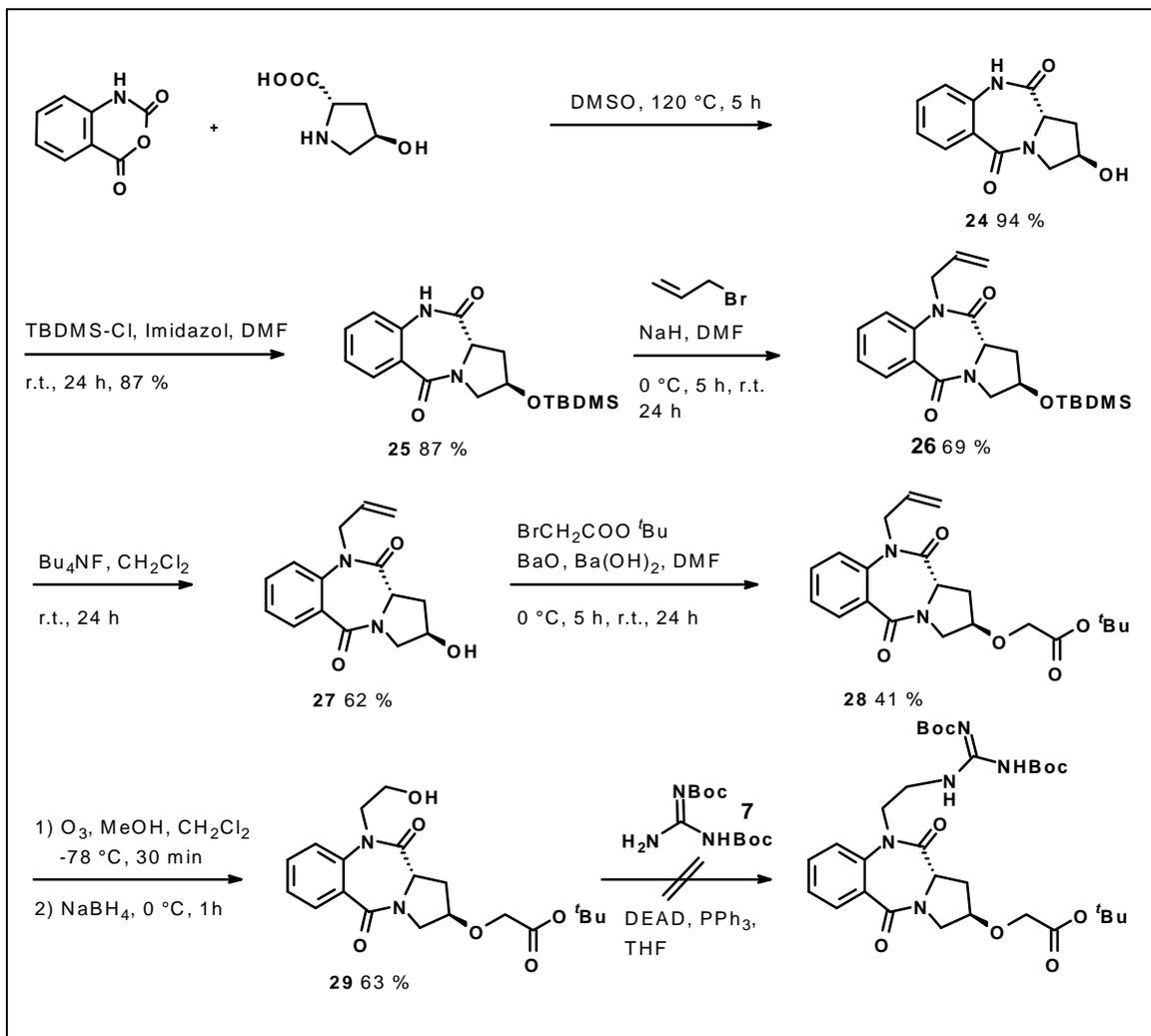
Schema 4: Synthese der RGD-Analoga **19a** und **19b**.

Schema 5 stellt die Synthese der Verbindung **23** dar: 2-Fluoropyrimidin **14** wurde mit Glycin-*tert*-butylester-hydrochlorid zu Verbindung **20** umgesetzt und anschließend einer Esterspaltung mit TFA unterworfen. Die freie Säure **21** wurde in einer Peptidkopplung mit Amin **11a** zu Verbindung **22** umgesetzt. Abspaltung der Ester-Schutzgruppe führte zu Zielverbindung **23**.

Schema 5: Synthese des RGD-Analogons **23**.

Analog zu der bromierten Verbindung **1** wurde das Benzodiazepindiongrundgerüst **24** aufgebaut (Schema 6).^[99] Nachfolgend wurde die Hydroxyfunktion mit einer *tert*-Butyldimethylsilylgruppe geschützt. Die geschützte Verbindung **25** wurde mit Allylbromid am Amidstickstoff alkyliert. Das hierbei entstandene Produkt **26** wurde durch Abspaltung der Silylschutzgruppe entschützt, wonach die Hydroxyfunktion des Alkohols **27** mit Bromessigsäure-*tert*-butylester umgesetzt wurde. Im folgenden wurde die Doppelbindung der Allylseitenkette von Verbindung **28** durch Ozonolyse

gespalten und das entstehende Ozonid reduktiv mit Natriumborhydrid aufgearbeitet, woraus man den Alkohol **29** erhielt. An der Hydroxyfunktion sollte anschließend durch eine Mitsunobu-Reaktion die Guanidinogruppe eingeführt werden. Die Mitsunobu-Reaktion ließ sich aber trotz vielfacher Variation der Methode nicht durchführen, so dass ein alternativer Syntheseweg eingeschlagen wurde.

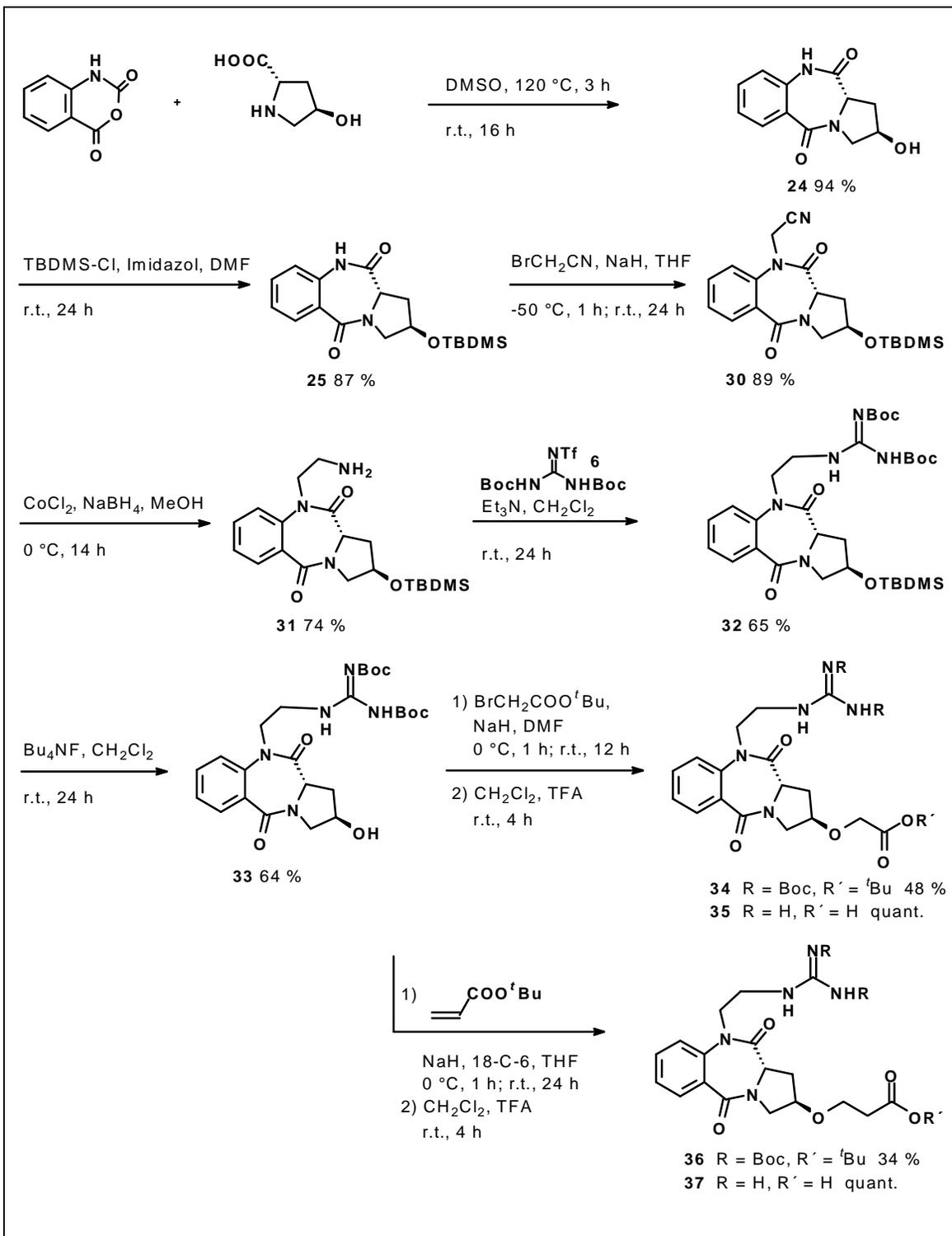


Schema 6: Synthese von Zwischenstufen des RGD-Analogs **35**.

Analog zu der in Schema 6 dargestellten Synthese wurde die Hydroxyfunktion des Benzodiazepindiongrundgerüsts **24** als *tert*-Butyldimethylsilylether geschützt (Schema 7). Die Verbindung **25** wurde daraufhin mit Bromacetonitril am Amidstickstoff alkyliert. Reduktion des Nitrils **30** mit CoCl₂/NaBH₄ ergab das Amin **31**. Die Einführung der Guanidinofunktion erfolgte durch Umsetzung von Amin **31** mit *N,N'*-Di-boc-*N''*-trifluormethansulfonylguanidin **6**. Die Abspaltung der TBDMS-

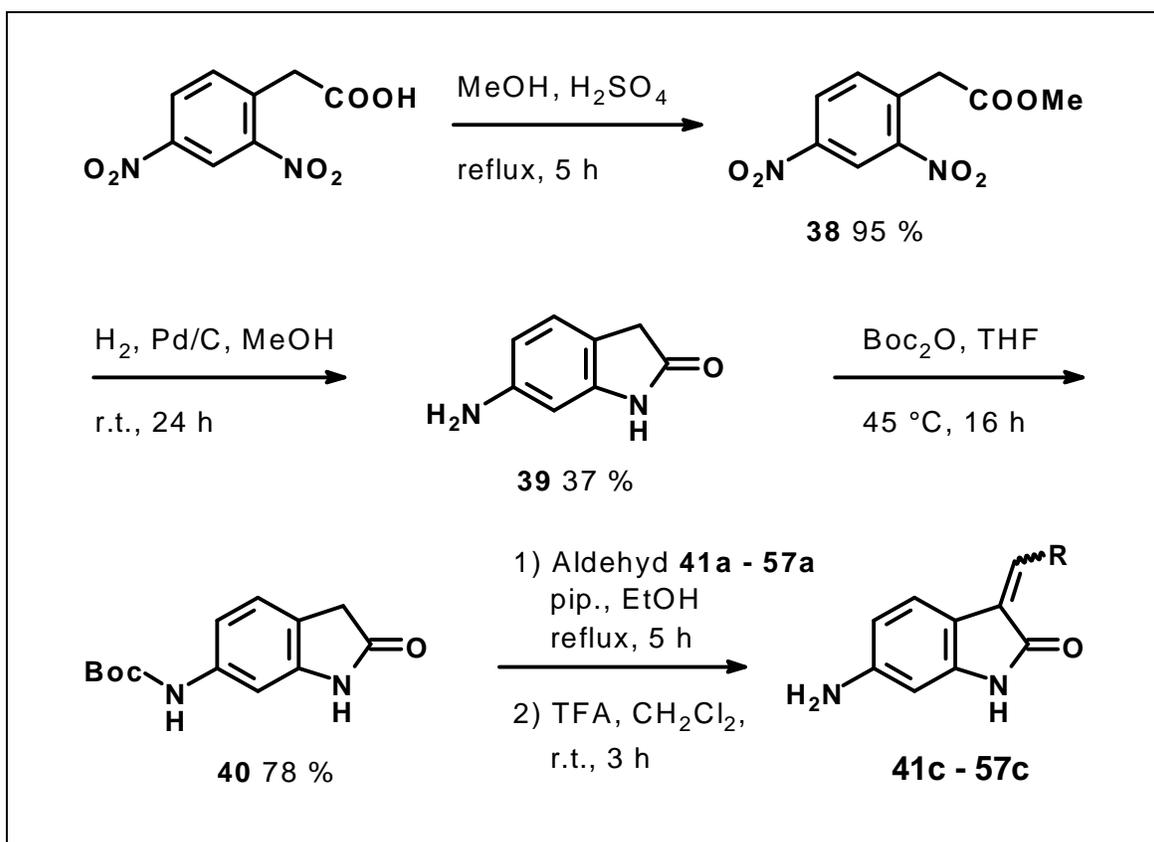
Schutzgruppe von Verbindung **32** mit Tetrabutylammoniumfluorid ergab den Alkohol **33**, der nachfolgend mit Bromessigsäure-*tert.*-butylester zu Verbindung **34** umgesetzt wurde. Durch Abspaltung der Schutzgruppen mit TFA erhielt man die Zielverbindung **35**.

Ausgehend von Alkohol **33**, konnte durch Umsetzung mit Acrylsäure-*tert.*-butylester Verbindung **36** dargestellt werden. Anschließende Abspaltung der Schutzgruppen mit TFA ergab das RGD-Analogon **37**.

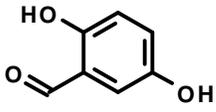
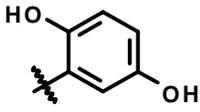
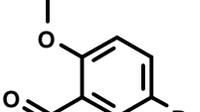
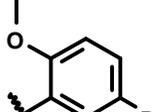
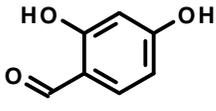
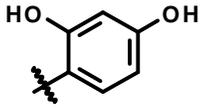
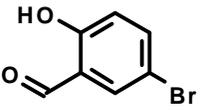
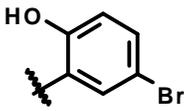
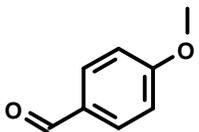
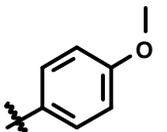
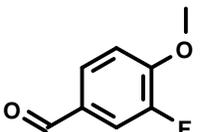
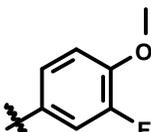
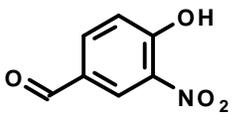
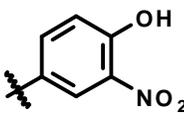
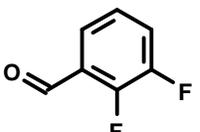
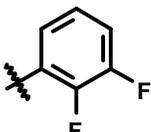
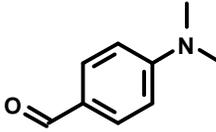
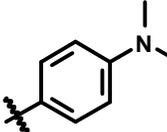
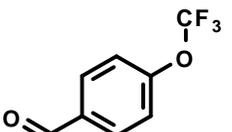
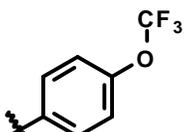
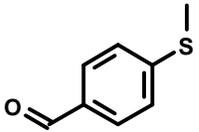
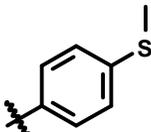
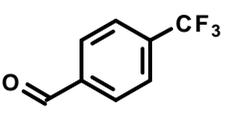
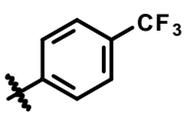
Schema 7: Synthese der RGD-Analoga **35** und **37**.

4.2 Synthese der ATP-Analoga

Das Oxindolgrundgerüst für die Synthese der ATP-Analoga **41c** – **57c** wurde wie in Schema 8 gezeigt dargestellt. Ausgehend von 2,4-Dinitrophenyl-essigsäure wurde die Carboxyfunktion in den Methylester **38** überführt. Anschließende Reduktion der Nitrogruppen mit H₂, Pd/C, gefolgt von einem intramolekularen Ringschluss, führte zu dem Aminooxindol **39**. Die Aminogruppe wurde danach als *tert.*-Butylcarbamat geschützt. Verbindung **40** wurde in einer aldolartigen Kondensationsreaktion mit den Aldehyden **41a** – **57a** (Abb. 11) zu den Derivaten **41b** – **57b** umgesetzt. Abspaltung der Schutzgruppe mit TFA im letzten Schritt ergab die ATP-Analoga **41c** – **57c** (Abb. 11).



Schema 8: Synthese der ATP-Analoga **41c** bis **57c**.

Aldehyd		Aldehyd	
 41a	 41c	 50a	 50c
 42a	 42c	 51a	 51c
 43a	 43c	 52a	 52c
 44a	 44c	 53a	 53c
 45a	 45c	 54a	 54c
 46a	 46c	 55a	 55c

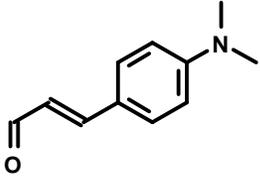
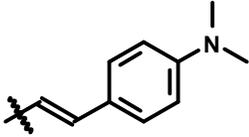
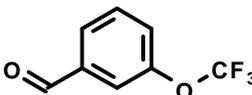
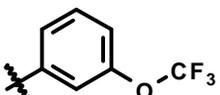
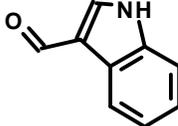
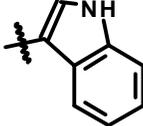
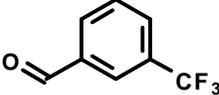
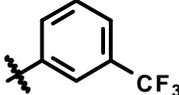
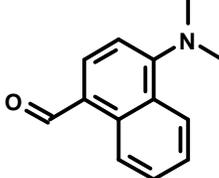
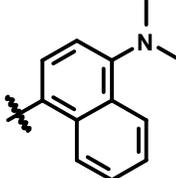
Aldehyd	 R	Aldehyd	 R
 47a	 47c	 56a	 56c
 48a	 48c	 57a	 57c
 49a	 49c		

Abb. 11: Bei der Synthese der ATP-Analoga eingesetzte Aldehyde **41a** – **57a** und entsprechende Kondensationsprodukte **41c** – **57c**.

4.3 Biologische Untersuchungen

4.3.1 Biologische Untersuchungen der synthetisierten RGD-Analoga

4.3.1.1 Festphasen-Rezeptor-Assay

Dieser Assay ermöglicht die Quantifizierung der inhibitorischen Wirkung verschiedener chemischer Verbindungen gegenüber dem Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ bzw. $\alpha_v\beta_3$ in einem in vitro-System. Dabei wird die Fähigkeit der RGD-Analoga, die Bindung von Fibrinogen, einem natürlichen Liganden, an das Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ bzw. $\alpha_v\beta_3$ zu inhibieren, untersucht.[100]

Bei diesem Assay wurden Mikrotiterplatten mit dem Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ bzw. $\alpha_v\beta_3$ beschichtet. Danach wurden die potenziellen Inhibitoren und das zuvor biotinylierte Fibrinogen zugegeben. Nach Inkubation wurden ungebundene Bestandteile entfernt und ein HRP-konjugierter Anti-Biotin-Antikörper zugegeben, der an das biotinylierte Fibrinogen bindet. Nach erneuter Inkubation und Entfernung ungebundener Bestandteile wurde ein Chemolumineszenzsubstrat zugegeben und die resultierende Lichtemission detektiert. Das detektierte Signal verhält sich proportional zu der Konzentration des an das Integrin gebundenen Fibrinogens und somit umgekehrt proportional zu der Menge des gebundenen Inhibitors.

Die synthetisierten RGD-Analoga **9**, **ent-9**, **13a/b**, **16a/b**, **19a/b**, **23**, **35** und **37** wurden in dem Assay getestet. Zusätzlich wurde das Zyklopentapeptid c(RGDfv), dessen stark antagonistische Wirkung bezüglich des Integrins $\alpha_v\beta_3$ belegt ist, als Referenzsubstanz getestet.

Die Messung erfolgte jeweils in Dreifachbestimmung. Zur Auswertung wurden Mittelwert und Standardabweichung der Messwerte ermittelt. Nach Abzug der Negativkontrolle wurden die Werte prozentual aufgetragen, wobei die mitgeführte Positivkontrolle als hundert Prozent gewertet wurde. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 12 und 13 aufgeführt.

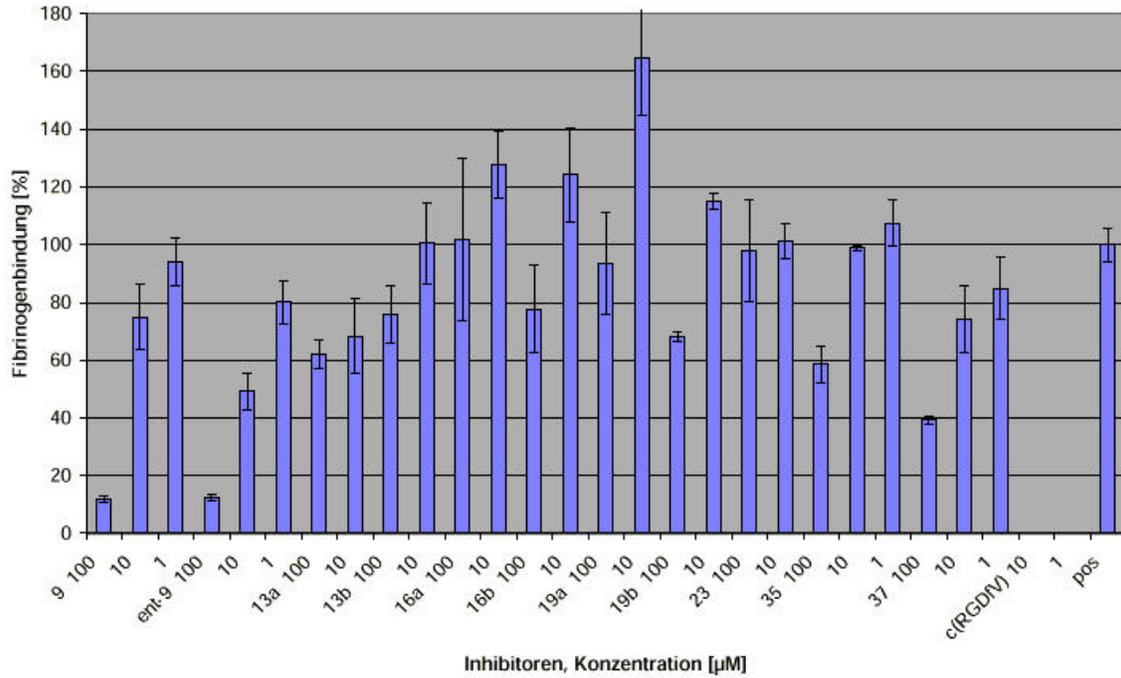


Abb. 12: Bindung von Fibrinogen an das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin (Vitronectinrezeptor) in Gegenwart der synthetisierten RGD-Analoga.

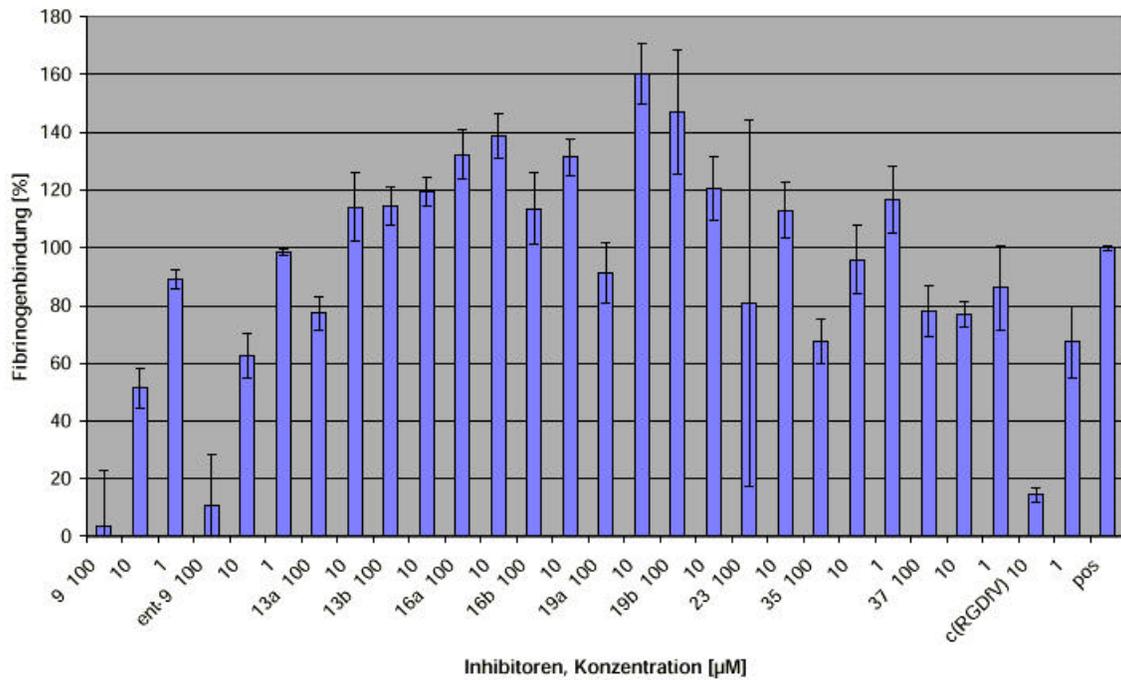


Abb. 13: Bindung von Fibrinogen an das $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin (Fibrinogenrezeptor) in Gegenwart der synthetisierten RGD-Analoga.

Für die sich in den Versuchen als sehr potent erwiesenen Substanzen **9** und **ent-9** wurde der IC_{50} -Wert bestimmt. Die Messkurven sind in den Abbildungen 14 und 15 dargestellt.

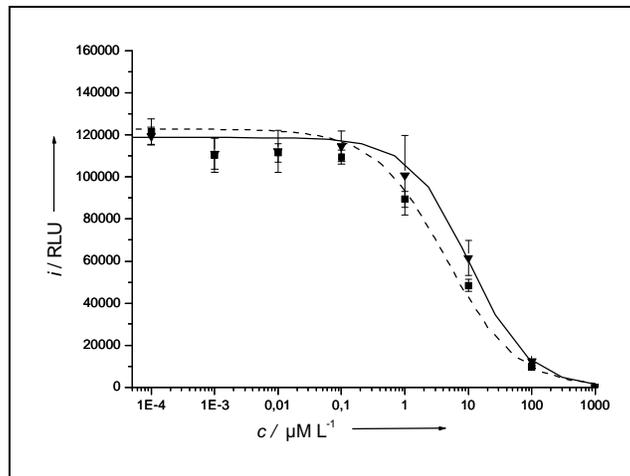


Abb. 14: Inhibition des Integrins $\alpha_v\beta_3$ (Vitronektinrezeptor):
Einfluss der Verbindungen **9** und **ent-9** auf die Wechselwirkung zwischen Fibrinogen und Integrin $\alpha_v\beta_3$: IC_{50} (**9**) $10 \mu\text{M}$ (∇), IC_{50} (**ent-9**) $4 \mu\text{M}$ (\blacksquare), i Intensität, RLU Relative Luminescence Unit.

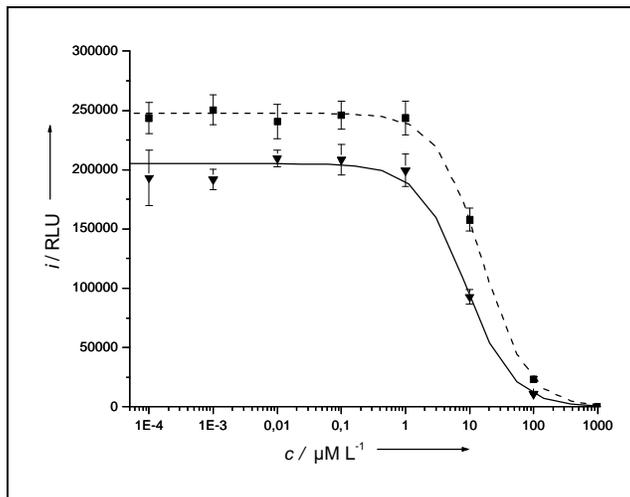


Abb.15: Inhibition des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Fibrinogenrezeptor):
Einfluss der Verbindungen **9** und **ent-9** auf die Wechselwirkung zwischen Fibrinogen und Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$: IC_{50} (**9**) $8 \mu\text{M}$ (∇), IC_{50} (**ent-9**) $16 \mu\text{M}$ (\blacksquare), i Intensität, RLU Relative Luminescence Unit.

4.3.1.2 Apoptose-Assay

Weiterhin wurde ein Testsystem zur Messung von Apoptose aufgebaut.

Es wurde ein photometrischer Enzym-Immuno-Assay (Cell Death Detection ELISA Plus, Roche) verwendet. Der Assay erlaubt eine Quantifizierung der apoptoseinduzierenden Wirkung der Testsubstanzen.

Im Rahmen der Apoptose in eukaryotischen Zellen spalten endogene Endonukleasen doppelsträngige DNA an der am besten zugänglichen internukleosomalen Linker-Region, wobei Mono- und Oligonukleosomen entstehen. Die DNA der Nukleosomen ist dicht mit den Core-Histonen H2A, H2B, H3 und H4 komplexiert und deshalb vor der Spaltung durch Endonukleasen geschützt. Die Anreicherung der Mono- und Oligonukleosomen ist dadurch bedingt, dass der Abbau der DNA bereits mehrere Stunden vor dem Zusammenbruch der Plasmamembran stattfindet. Das Testprinzip beruht auf einem quantitativen Sandwich-Enzym-Immuno-Assay, bei dem die Konzentration der Mono- und Oligonukleosomen in der Zytoplasma-Fraktion von Zell-Lysaten detektiert wird. Für den Assay wurden HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) verwendet.

Nach Inkubation der Testsubstanzen mit den Endothelzellen in Mikrotiterplatten (48 h bei 37 °C) wurde untersucht, in welchem Maße die Substanzen bei den Endothelzellen Apoptose ausgelöst haben. Der Zellüberstand wurde nach Zentrifugation abgetrennt und die Zellen lysiert. Das Zell-Lysat wurde zusammen mit zwei verschiedenen monoklonalen Maus-Antikörpern in mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatten inkubiert. Einer der Antikörper ist hierbei biotinkoppelt und richtet sich gegen Histone. Durch das Biotin wird dieser erste Antikörper an der festen Phase immobilisiert und bindet an die Histonkomponente der Nukleosomen. Der zweite Antikörper ist POD-gekoppelt und bindet an die DNA-Komponente der Nukleosomen. Nach Entfernung der nicht gebundenen Komponenten wurde die Nukleosomenmenge durch die im Immunokomplex zurückgehaltenen POD gemessen. Dabei wurde die POD photometrisch mit ABTS als Substrat bestimmt. Das dabei detektierte Signal ist proportional zur Menge der immobilisierten Nukleosomen.

Die synthetisierten RGD-Analoga **9**, **ent-9**, **13a/b**, **16a/b**, **19a/b**, **23**, **35** und **37** wurden in dem Assay getestet.

Dabei wurden verschiedene Versuchsbedingungen bei der Inkubation der Testsubstanzen mit den Endothelzellen gewählt:

- a) Die Mikrotiterplatten wurden mit Gelatine als Extrazelluläre Matrix beschichtet. Der Assay wurde mit serumhaltigem Wachstumsmedium durchgeführt. Es wurden 10^4 Zellen pro Well ausgesät.
- b) Die Mikrotiterplatten wurden mit Fibrinogen als Extrazelluläre Matrix beschichtet. Der Assay wurde mit serumhaltigem Wachstumsmedium durchgeführt. Es wurden $2.5 \cdot 10^3$ Zellen pro Well ausgesät.
- c) Die Mikrotiterplatten wurden mit Fibrinogen als Extrazelluläre Matrix beschichtet, und das Wachstumsmedium wurde zu Beginn der Inkubation mit den Testsubstanzen gegen serumfreies Medium ausgetauscht. Es wurden $5 \cdot 10^3$ Zellen pro Well ausgesät.

Die Messung erfolgte bei Methode a) und b) jeweils in Doppelbestimmung, bei Methode c) in Dreifachbestimmung. Zur Auswertung wurden Mittelwert und Standardabweichung der Messwerte ermittelt. Nach Abzug der Negativkontrolle wurden die Werte prozentual aufgetragen, wobei im Experiment a) als Positivkontrolle der in dem Assay-Kit mitgelieferte DNA-Histon-Komplex mitgeführt wurde. Bei Methode b) und c) wurde zusätzlich Camptothecin ($25 \mu\text{M}$, 24 h Inkubationszeit), dessen apoptoseauslösende Wirkung bekannt ist mitgeführt und als 100 % gewertet.^[104] Bei Methode b) und c) wurde weiterhin der sehr potente $\alpha_v\beta_3$ -Antagonist c(RGDfV) ($10 \mu\text{M}$) mitgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abb. 16a – 16c aufgeführt.

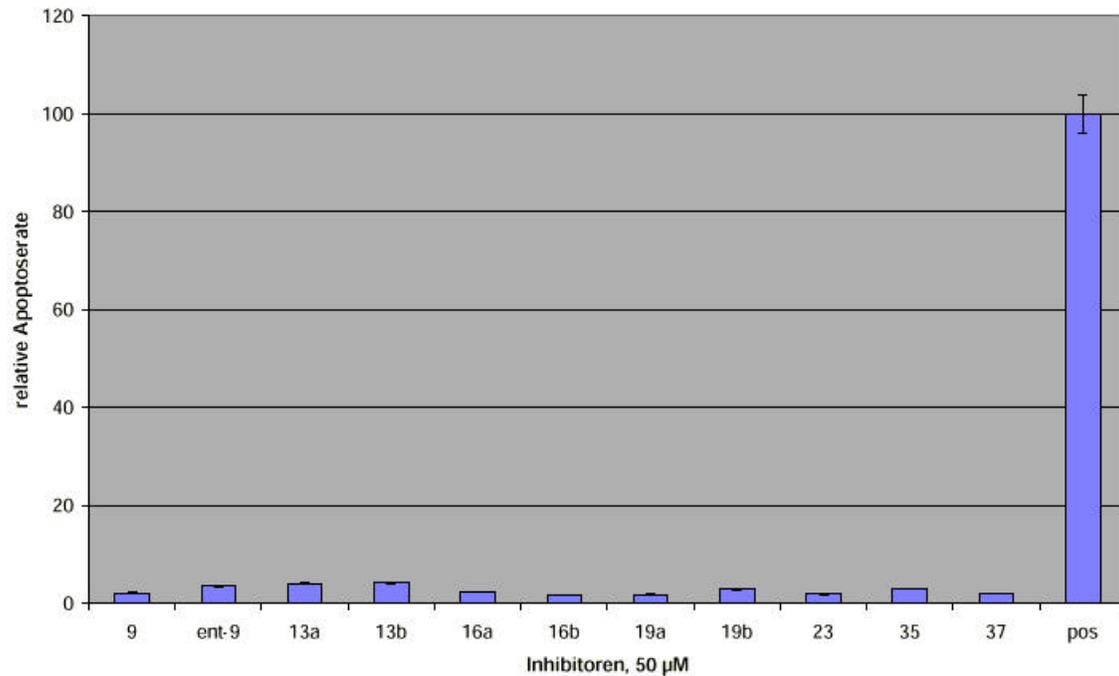


Abb. 16a: Apoptose-Assay: DNA-Fragmentierung nach Inkubation (48 h) der Endothelzellen mit den RGD-Mimetika, Mikrotiterplatten mit Gelatine beschichtet, serumhaltiges Wachstumsmedium.

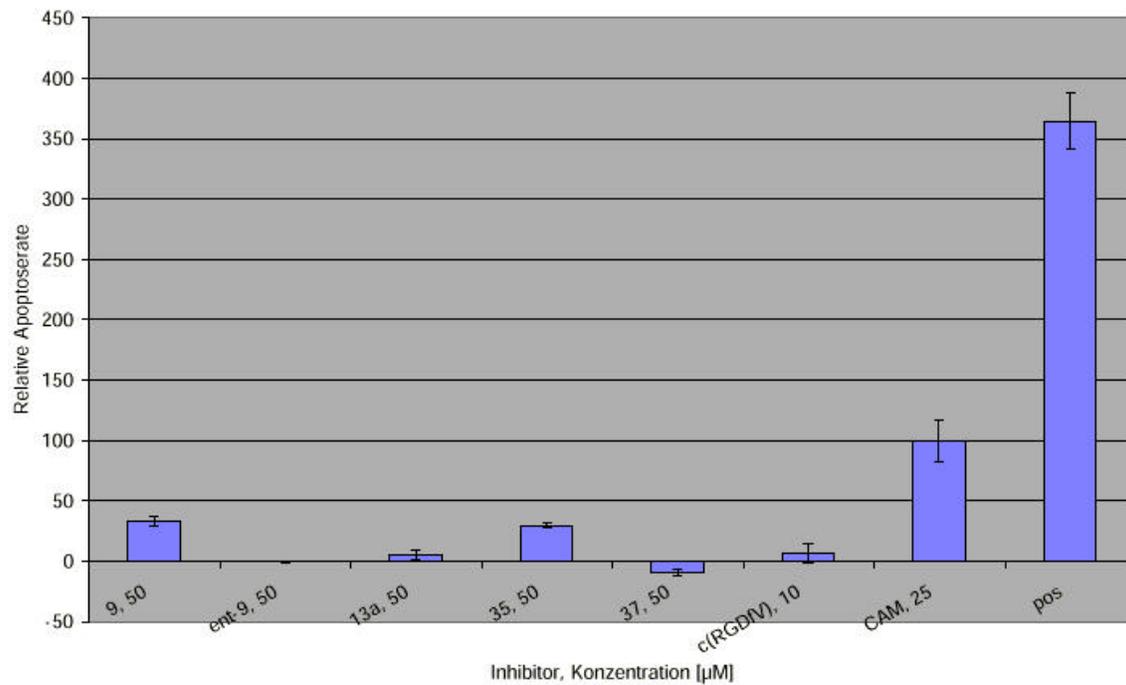


Abb. 16b: Apoptose-Assay: DNA-Fragmentierung nach Inkubation (48 h) der Endothelzellen mit den RGD-Mimetika, Mikrotiterplatten mit Fibrinogen beschichtet, serumhaltiges Wachstumsmedium.

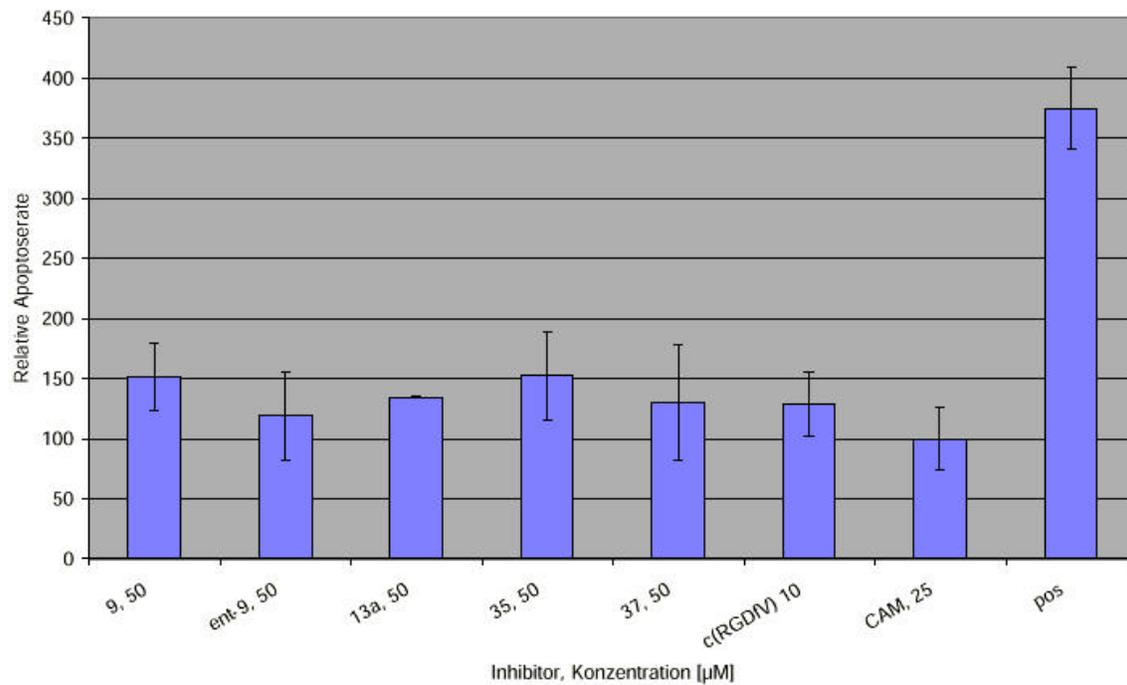


Abb. 16c: Apoptose-Assay: DNA-Fragmentierung nach Inkubation (48 h) der Endothelzellen mit den RGD-Mimetika, Mikrotiterplatten mit Fibrinogen beschichtet, serumfreies Medium.

4.3.2 Biologische Untersuchungen der synthetisierten ATP-Analoga

4.3.2.1 In vitro-Rezeptortyrosinkinase-Assay

Dieser nicht-radioaktive Assay ermöglicht eine Quantifizierung der inhibitorischen Wirkung verschiedener chemischer Verbindungen gegenüber Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) in einem in vitro-System.[100]

Dabei wird die Fähigkeit einer Verbindung, die Phosphorylierung eines geeigneten Substrates durch eine Kinase zu verhindern, mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) quantifiziert. Durch einen Peroxidase-gekoppelten Antikörper, welcher spezifisch das im Substrat vorhandene, von der Kinase phosphorylierte Tyrosin erkennt, kann die Phosphorylierungsrate und somit im Umkehrschluss die Inhibitionsrate durch eine chemoluminometrische Messung ermittelt werden. Die Peroxidase setzt H_2O_2 in Gegenwart von Luminol unter Lichtemission um, welche dann im Luminometer gemessen werden kann. Die Menge des emittierten Lichts ist linear vom Phosphorylierungsgrad des Substrates abhängig.

Der Assay wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt, die mit poly-Glutamat-Tyrosin im Verhältnis 4:1 als Substrat beschichtet wurden. Der Assay wurde mit folgenden Kinasen durchgeführt: KDR (VEGFR-2), Flt-4 (VEGFR-3), IGF1-R, EGF-R, ErbB2 (Her2-neu), Tie-2 und FGFR-1.

Der Inhibitor und die jeweilige Kinase wurden in den mit poly-Glutamat-Tyrosin beschichteten Mikrotiterplatten vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe von ATP gestartet.

Nach 30 Minuten wurde die Reaktion durch Entfernen der ungebundenen Bestandteile gestoppt. Nach Zugabe der Antikörper-Lösung wurde erneut inkubiert. Danach wurde die Peroxidase-Reaktion durch Zugabe von Chemolumineszenz-Substrat gestartet. Die Lichtemission wurde quantifiziert.

Die synthetisierten ATP-Analoga **41c** – **55c** wurden in dem Assay getestet.

Die Messung erfolgte jeweils in Dreifachbestimmung. Zur Auswertung wurden Mittelwert und Standardabweichung der Messwerte ermittelt. Nach Abzug der Negativkontrolle wurden die Werte prozentual aufgetragen, wobei die mitgeführte Positivkontrolle als 100 % gewertet wurde. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 17 - 23 aufgeführt.

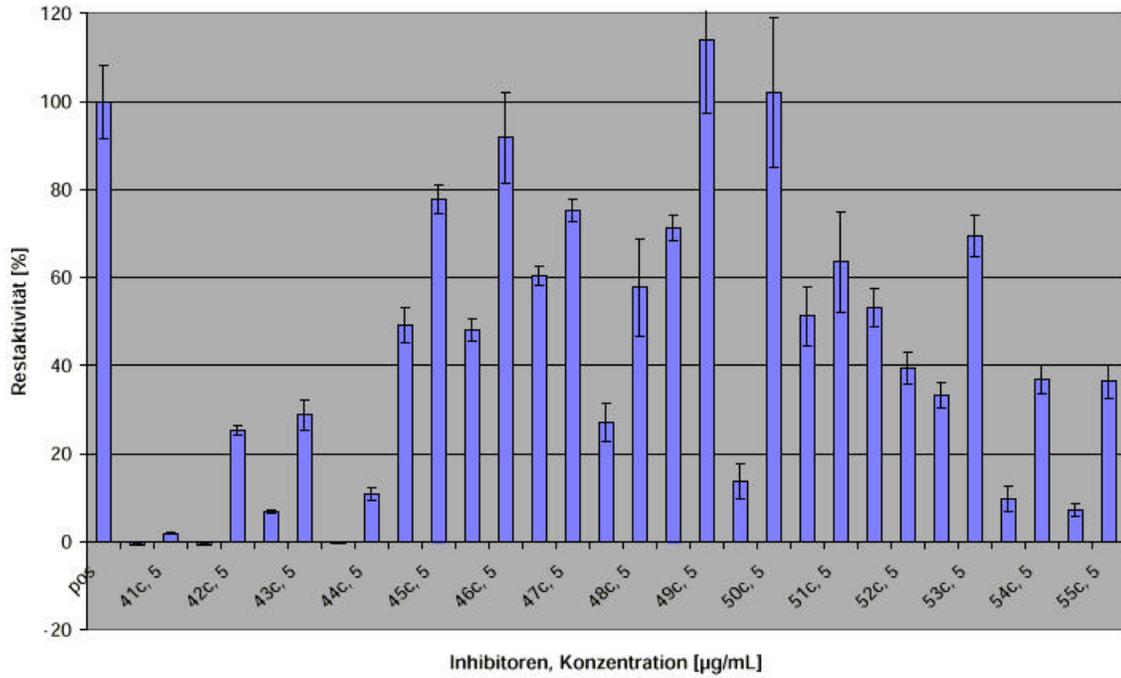


Abb. 17: Restaktivität der Kinase KDR nach Inkubation mit den Verbindungen 41c – 55c.

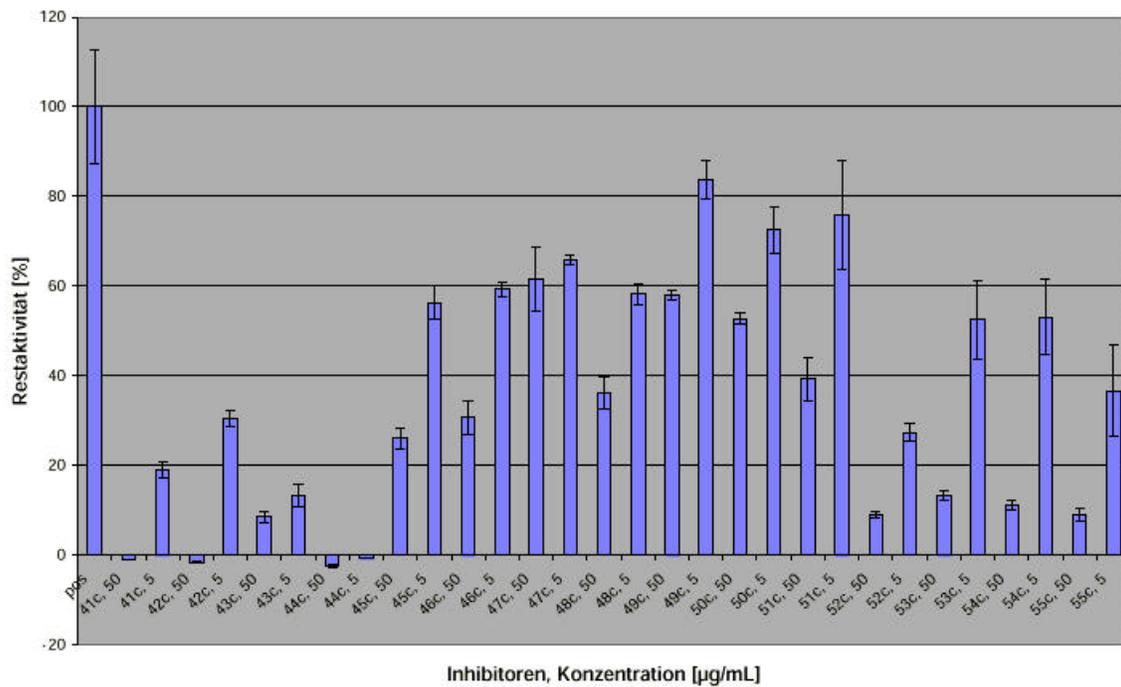


Abb. 18: Restaktivität der Kinase Flt-4 nach Inkubation mit den Verbindungen 41c – 55c.

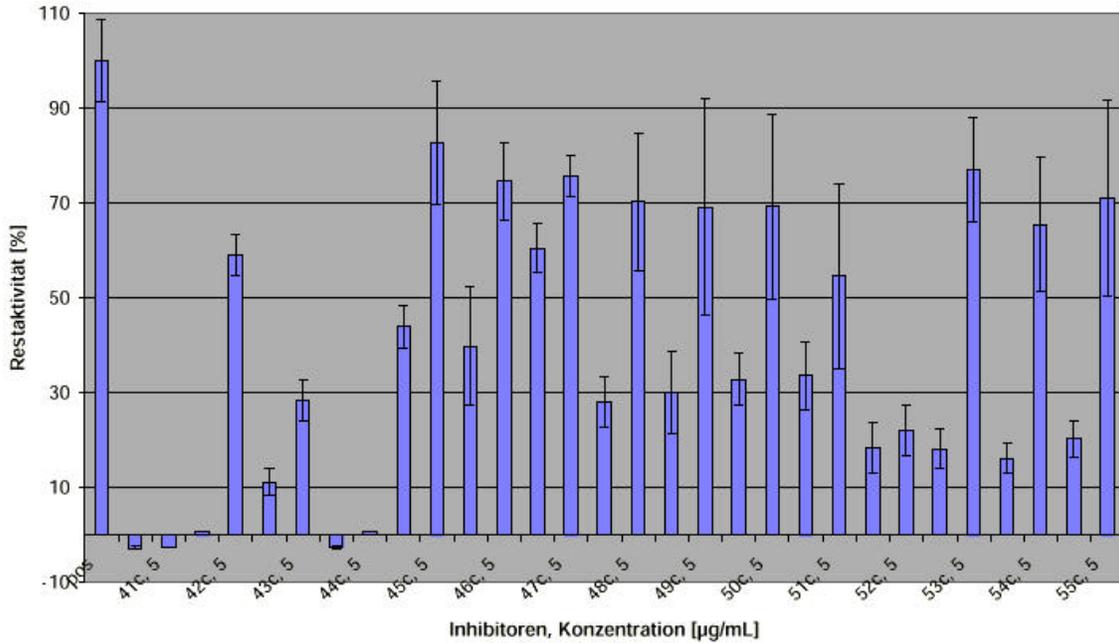


Abb. 19: Restaktivität der Kinase Tie-2 nach Inkubation mit den Verbindungen **41c** – **55c**.

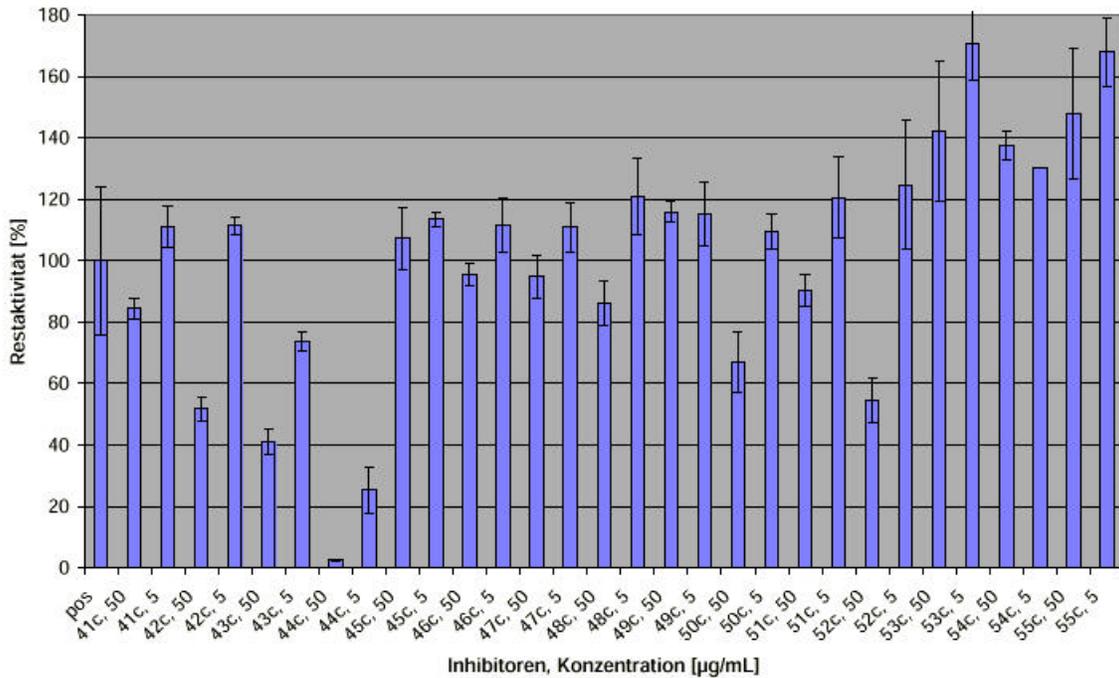


Abb. 20: Restaktivität der Kinase EGF nach Inkubation mit den Verbindungen **41c** – **55c**.

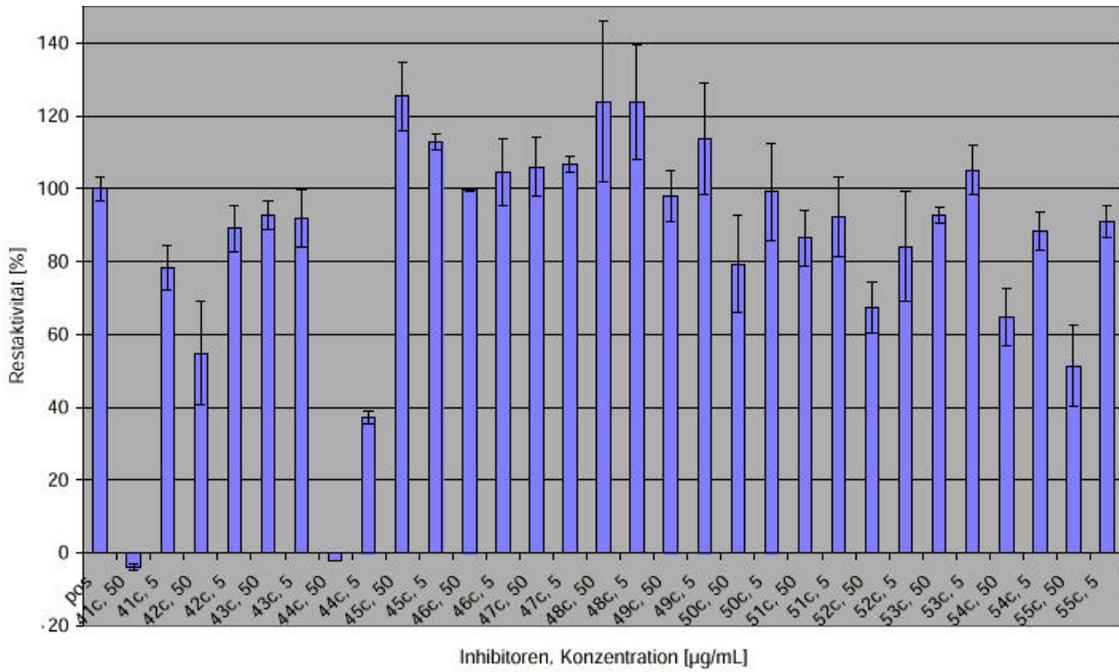


Abb. 21: Restaktivität der Kinase ErbB2 nach Inkubation mit den Verbindungen **41c – 55c**.

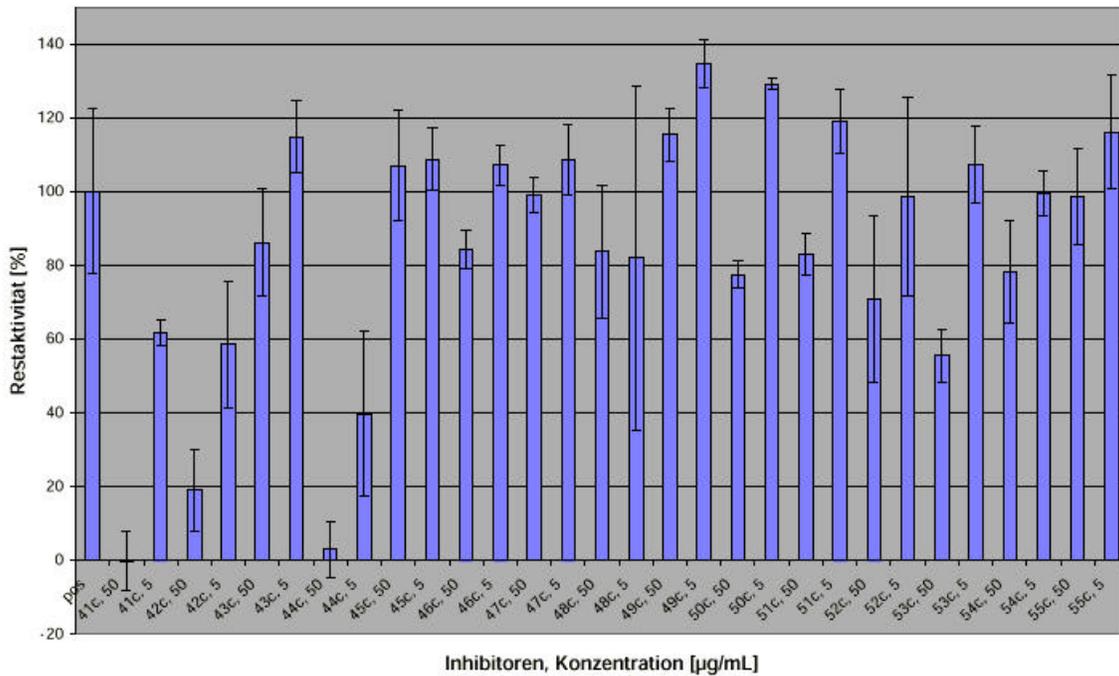


Abb. 22: Restaktivität der Kinase IGF1-R nach Inkubation mit den Verbindungen **41c – 55c**.

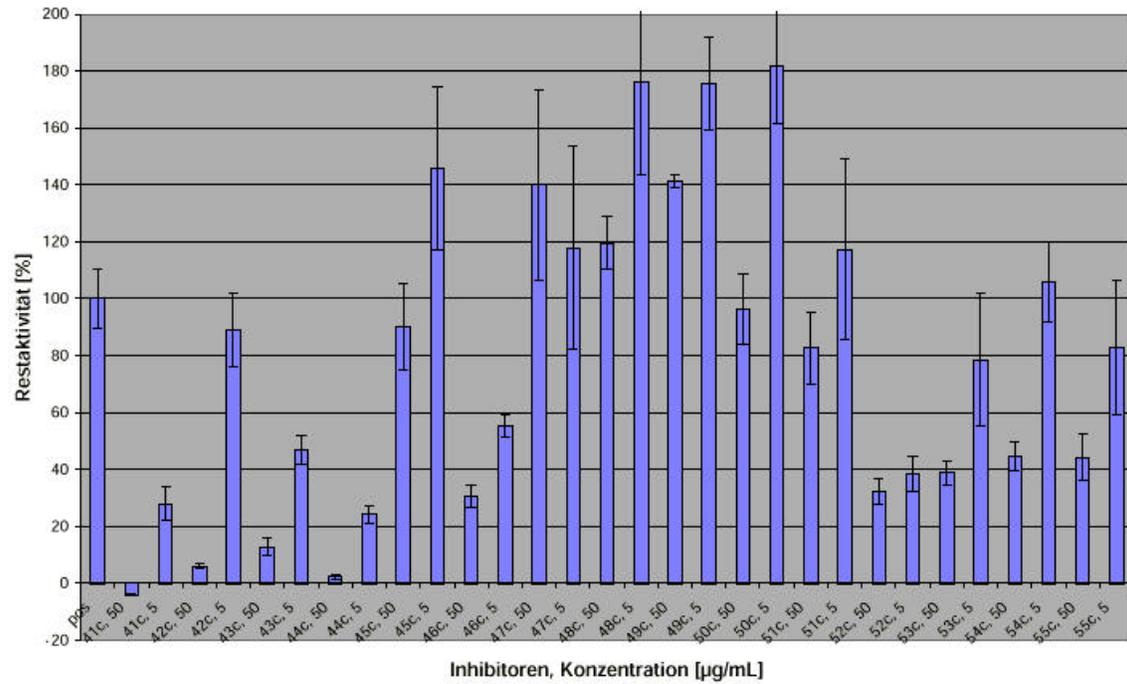


Abb. 23: Restaktivität der Kinase FGFR-1 nach Inkubation mit den Verbindungen **41c** – **55c**.

5 Diskussion

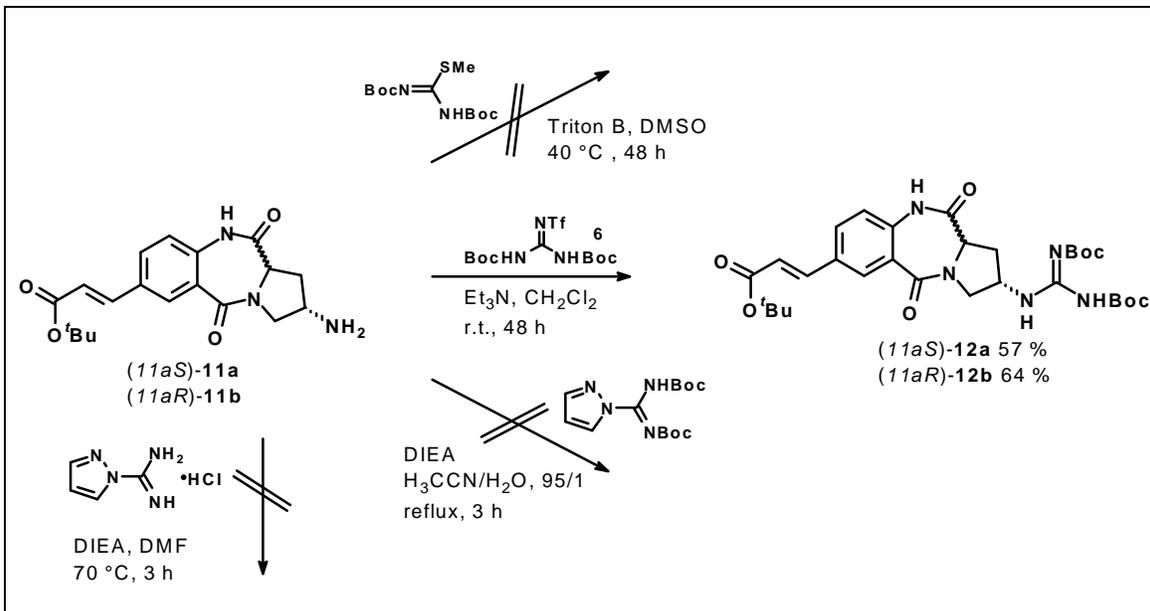
5.1 Diskussion der Synthesen

5.1.1 RGD-Analoga

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, neuartige trizyklische Benzodiazepindione zu synthetisieren.

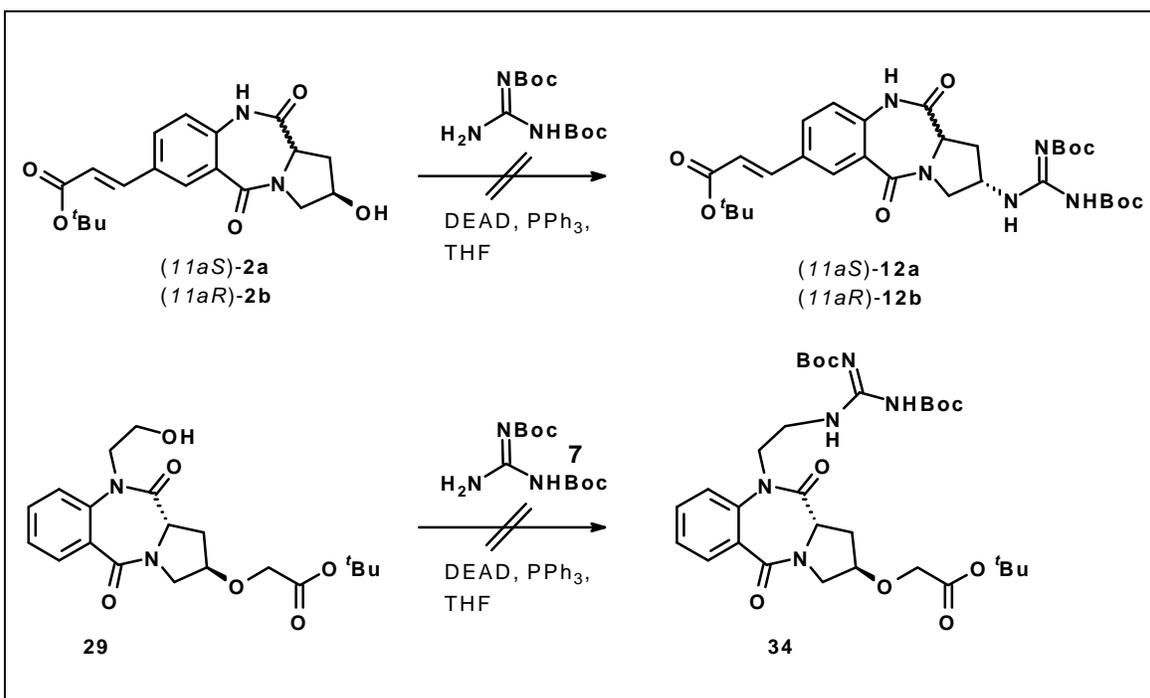
Die bei der Heck-Reaktion (Synthese von Verbindung **2**) zunächst nicht geplant auftretende Epimerisierung am Kohlenstoff C-11a konnte genutzt werden, da sich die Diastereomere trennen ließen. Auf diese Weise ließen sich jeweils beide Diastereomere bzw. Enantiomere der Endverbindungen synthetisieren. Die bei der Darstellung von Verbindung **3** bzw. **ent-3** verwendete Oxidationsmethode mit IBX erwies sich als sehr viel effektiver als die Oxidation nach Swern oder mit Jones-Reagenz. Die Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion zu Verbindung **4** bzw. **ent-4** ergab jeweils ein *cis/trans*-Isomerengemisch, das sich problemlos säulenchromatographisch trennen ließ. Dieser Trennschritt war jedoch nicht erforderlich, da im nächsten Schritt, der Reduktion zum Amin **5** bzw. **ent-5**, aus dem Isomerengemisch jeweils eine isomerenreine Verbindung entstand. Die Aufarbeitung desamins **5** bzw. **ent-5** erwies sich insoweit als problematisch, da laut Literaturvorschrift das bei der Reaktion entstehende Co₂B mit Salzsäure gelöst werden sollte. Unter stark sauren Bedingungen wird jedoch der *tert.*-Butylester des Produkts gespalten. Aus diesem Grunde wurde versucht, das Co₂B mit 10 %iger Zitronensäure zu lösen, was aber nur unvollständig gelang. Die weitere Aufarbeitung ergab jedoch das Produkt in guter Ausbeute.

Im Rahmen der Guanidinylierung sowohl von Verbindung **5** bzw. **ent-5** zu Verbindung **8** bzw. **ent-8**, als auch von Verbindung **11a** bzw. **11b** zu Verbindung **12a** bzw. **12b** erwies sich die Verwendung des Reagenzes **6** als effektivste Methode. Die Verwendung von 1,3-Bis-(*tert.*-butyloxycarbonyl)-2-methyl-2-thioharnstoff, Pyrazol-1-carbonsäureamidin-hydrochlorid oder Pyrazol-1-carbonsäure-*N,N'*-di-*tert.*-butoxycarbonyl-amidin als Guanidinylierungsreagenz ergab entweder gar keine oder nur minimal wenig Umsetzung (Schema 9).



Schema 9: Guanidinylierung der Verbindung **11a** bzw. **11b**.

Die ursprünglich geplante Guanidinylierung von Verbindung **2a** bzw. **2b** und Verbindung **29** nach der Mitsunobu-Methode ließ sich trotz vielfacher Variation der Versuchsbedingungen nicht erfolgreich durchführen (Schema 10), so dass ein alternativer Syntheseweg eingeschlagen wurde.

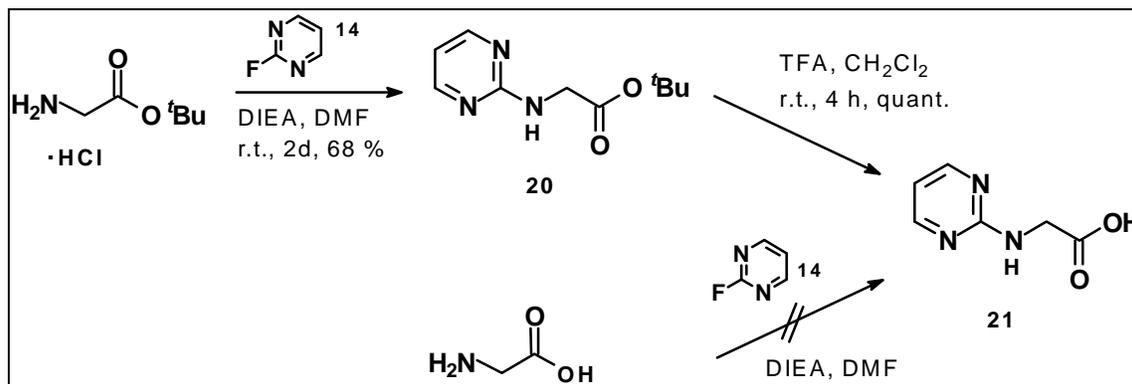


Schema 10: Guanidinylierung nach der Mitsunobu-Methode.

Die Darstellung des Amins **11a** bzw. **11b** wurde zunächst mittels Staudinger-Reaktion durchgeführt. Da die Ausbeuten jedoch sehr gering waren, wurde alternativ dazu das Azid zum Amin mit Palladium auf Kohlenstoff als Katalysator hydriert. Unter den angegebenen Versuchsbedingungen (r.t., 1 bar, 4 h) wurde dabei nicht die Doppelbindung der Carboxyseitenkette reduziert. Der Grund dafür liegt möglicherweise darin, dass diese Doppelbindung Teil eines konjugierten Systems und daher besonders stabil ist.

Bei der Peptidkopplung des Amins **11a** bzw. **11b** sowohl mit der guanidinylierten Essigsäure **17** als auch mit der Carbonsäure **21** ergaben sich bei der Verwendung von EDC höhere Ausbeuten als bei Verwendung von DCC/HOBt als Kopplungsreagenz. Die Reaktion mit Verbindung **21** verlief jedoch auch unter diesen Bedingungen mit relativ schlechter Ausbeute. Im Verlaufe der Reaktion trat innerhalb kurzer Zeit eine zunehmende Dunkelfärbung der Lösung auf. Ein großer Teil des Amins wurde nicht umgesetzt. Möglicherweise findet als Nebenreaktion eine Reaktion der Verbindung **21** mit sich selbst statt.

Bei der Darstellung der Carbonsäure **21** wurde zunächst versucht, Glycin direkt mit 2-Fluoropyrimidin umzusetzen. Dieses gelang jedoch nicht, so dass stattdessen Glycin-*tert.*-butylester-hydrochlorid verwendet wurde und anschließend die Estergruppe mit TFA wieder abgespalten wurde (Schema 11).



Schema 11: Darstellung der Carbonsäure **17**.

Bei der Umsetzung des Alkohols **33** mit Bromessigsäure-*tert.*-butylester zu Verbindung **34** bzw. mit Acrylsäure-*tert.*-butylester zu Verbindung **36** wurden verschiedene Reaktionsbedingungen getestet. Dabei erwies sich die Verwendung von NaH und 18-C-6 in THF als effektivste Methode. Bei Einsatz von NaH in DMF, NaH und 15-C-5 in THF oder *n*-Butyllithium in DMF fielen die Produktausbeuten sehr viel geringer aus.

Der letzte Syntheseschritt aller RGD-Analoga bestand in der Abspaltung der Schutzgruppen unter Verwendung von TFA. Da diese Reaktion immer quantitativ verlief, war keine weitere Aufreinigung der Produkte nötig. Traten Spuren von Verunreinigungen auf, so wurde die Endverbindung durch Waschen mit Ether gereinigt.

5.1.2 ATP-Analoga

Die Entwicklung von Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren auf Oxindolbasis geht auf Schlessinger et al. zurück.^[68] Ausgehend von diesen Arbeiten sollten weitere Oxindolderivate als potenzielle Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren synthetisiert werden. Dabei wurde das Grundgerüst durch eine Aminogruppe an Position 6 erweitert.

Der Aufbau des Aminooxindolgrundgerüsts erfolgte ausgehend von 2,4-Dinitrophenyl-essigsäure zunächst über den entsprechenden Ethylester. Da aber der im nächsten Schritt folgende Ringschluss, die intramolekulare Amidbildung, nur in sehr geringen Ausbeuten ablief, wurde alternativ die freie Säure in den Methylester überführt. Dieser ließ sich anschließend leichter durch die bei der Reduktion entstehende Aminogruppe spalten, so dass höhere Ausbeuten an Verbindung **39** erzielt wurden. Bei der Umsetzung der Verbindung **40** mit den verschiedenen Aldehyden entstand meist ein *cis/trans*-Gemisch des Aldolprodukts, wobei die Isomere nicht getrennt wurden.

Die boc-geschützten Produkte fielen nach Abkühlung der Reaktionsmischung auf 4 °C aus. Die teilweise niedrigen Ausbeuten lassen sich meist auf unvollständiges Auskristallisieren des Produktes zurückführen.

5.2 Diskussion der Biologischen Untersuchungen

5.2.1 RGD-Analoga

Die dargestellten RGD-Analoga wurden in einem Festphasen-Rezeptor-Assay bezüglich ihrer Fähigkeit, an das $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin zu binden, untersucht.[100]

Benzodiazepine wurden bereits häufiger als Template für Peptidmimetika verwendet, und viele pharmakologisch aktive Substanzen, z.B. Neuropeptidmimetika (Tifluadom, Devazepide), *ras*-Farnesyltransferase-Inhibitoren, Platelet-activating-factor-Antagonisten, HIV-Protease-Inhibitoren, Antitumor-Antibiotika, wie beispielsweise Anthramycin und Tomamycin, oder Benzodiazepine wie Diazepam (Valium), welche als Angst lösende Mittel wirken,[96, 105] besitzen ein BenzodiazepinGrundgerüst.

Die in dieser Arbeit präsentierten RGD-Analoga weisen ein starres Grundgerüst auf, das einen sogenannten hydrophoben Kollaps verhindert. Außerdem können mit diesem Grundgerüst in wässrigem Medium pharmakologisch inaktive Konformationen vermieden werden.[106] Die dargestellten Verbindungen unterscheiden sich sowohl bezüglich ihres Substitutionsmusters als auch in Bezug auf den Abstand zwischen der Carboxy- und Guanidinofunktion. Weiterhin wurde bei den Verbindungen **13a**, **13b** und **19a** die Guanidinofunktion durch 2-Aminopyrimidin ersetzt, um den Einfluss eines Argininmimetikums auf die biologische Wirksamkeit zu untersuchen.

Die Ergebnisse des Festphasen-Rezeptor-Assays zeigen den Einfluss der Spacer-Länge auf die Wirksamkeit der Peptidmimetika: Die Verbindungen **13a**, **13b**, **19a** und **19b** zeigten nur eine geringe bzw. gar keine Affinität gegenüber dem $\alpha_v\beta_3$ - bzw. $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin: Der IC_{50} -Wert wurde nicht bei der getesteten Maximalkonzentration (100 μ M) erreicht. Eine Substitution der Guanidinofunktion durch 2-Aminopyrimidin (Verbindungen **16a**, **16b** und **23**) ergab keine Verbesserung der Bindungseigenschaften.

Die Verbindungen **9** und **ent-9**, die einen mittleren Abstand zwischen der Guanidino- und Carboxyfunktion verglichen mit den zuvor genannten RGD-Analoga aufweisen, erwiesen sich dahingegen als gute Antagonisten sowohl für den Vitronectinrezeptor als auch für den Fibrinogenrezeptor. Wie aus den Abbildungen 14 und 15 ersichtlich, zeigen die beiden RGD-Mimetika nur eine sehr geringe Selektivität: Verbindung **9** inhibiert die Bindung von Fibrinogen an das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin mit einem

IC₅₀-Wert von 10 µM und die Bindung von Fibrinogen an das α_{11b}β₃-Integrin mit einem IC₅₀-Wert von 8 µM. Verbindung **ent-9** besitzt einen IC₅₀-Wert von 4 µM für das α_vβ₃-Integrin und einen IC₅₀-Wert von 16 µM für das α_{11b}β₃-Integrin. Somit stellt das Peptidmimetikum **ent-9** eine interessante Leitstruktur dar, die weiter bezüglich ihrer Bindungseigenschaften, sowohl der Affinität als auch der Selektivität, optimiert werden kann. Dabei bieten sich weitere Funktionalisierungen, z.B. Alkylierung am Stickstoff N-10 und Substitution der Guanidinogruppe durch analoge Funktionalitäten, an.

Bei den Verbindungen **35** und **37** wurde das Substitutionsmuster am Benzodiazepindiongrundgerüst variiert. Die beiden Verbindungen unterscheiden sich bezüglich des Abstandes zwischen Carboxy- und Guanidinofunktion. Obwohl beide Verbindungen nur eine mäßige Affinität gegenüber dem α_vβ₃-Integrin aufweisen (Abb. 12), zeigen die Testergebnisse des Festphasen-Rezeptor-Assays den Einfluss der Spacer-Länge auf die Wirksamkeit der Peptidmimetika. Verbindung **37**, bei der der Abstand zwischen den beiden funktionellen Gruppen gegenüber Verbindung **35** um eine CH₂-Gruppe verlängert ist, weist deutlich bessere Bindungseigenschaften auf. Interessant wäre es bei diesem Substitutionsmuster, die Kette um noch eine weitere CH₂-Einheit zu verlängern und zu prüfen, ob sich die Bindungsaffinität noch steigern lässt.

Die präsentierten Synthesen veranschaulichen die Vielfalt der Funktionalisierungsmöglichkeiten des verwendeten Benzodiazepindiongrundgerüsts. Somit stellt es eine interessante Ausgangsverbindung für die Entwicklung weiterer Peptidmimetika dar.

Des Weiteren wurden die dargestellten RGD-Analoga bezüglich ihrer apoptoseinduzierenden Wirkung getestet. Jedoch konnte nach der in Kapitel 4.3.1.2 unter a) beschriebenen Methode keine Apoptose beobachtet werden. Eine Fehlerquelle bei der Methode kann in der zu hohen Zellzahl, die pro Well ausgesät wurde, liegen. Möglicherweise proliferierten die Zellen nur noch in sehr geringem Ausmaß während der Inkubationszeit mit den Testsubstanzen. Falls der apoptoseauslösende Mechanismus jedoch nur bei proliferierenden Zellen wirkt, konnte in dem Fall keine Apoptose beobachtet werden. Deshalb wurde in einem weiteren Test (Methode b) die Zellzahl von 10⁴ auf 2.5·10³ Zellen verringert. Weiterhin wurden die Mikrotiterplatten anstatt mit Gelatine mit Fibrinogen, einem natürlichen Liganden für das α_vβ₃-Integrin, beschichtet. Auf diese Weise sollte

erreicht werden, dass die Zellen nahezu ausschließlich über das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin mit der „Extrazellulären Matrix“ wechselwirken.

Scatena et al. berichten hierzu,^[107] dass Zellen in serumfreiem Medium auf Platten, die mit Vitronectin, Fibronectin, Laminin oder Collagen Typ I beschichtet waren, kultiviert wurden (48 h). In allen Fällen trat dabei keine Apoptose ein. Aufgrund der Tatsache, dass Laminin und Collagen Typ I hauptsächlich mit β_1 -Integrinen wechselwirken, wird von den Autoren der Schluss gezogen, dass verschiedene Integrine in der Lage sind, das Überleben der Endothelzellen zu garantieren.

Aus dieser Schlussfolgerung ergibt sich die Frage, warum bei in vivo-Experimenten $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Antagonisten bei proliferierenden Endothelzellen Apoptose auslösen, da doch in diesem Fall noch andere Integrine der Zellen mit der Extrazellulären Matrix wechselwirken können. Eine mögliche Antwort darauf ist, dass die Konzentrationen an den einzelnen Integrin-Liganden im in vitro-Assay, also in diesem Fall Vitronectin, Fibronectin, Laminin oder Collagen Typ I, sehr viel höher ist als in vivo, so dass die Ergebnisse der in vitro-Experimente nicht auf den in vivo-Fall übertragbar sind.

Jedoch auch bei dem nach Methode b) durchgeführten Experiment konnte keine Apoptose detektiert werden, auch bei Verwendung des sehr potenten $\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten c(RGDfV). Eine weitere Erklärung für die negativen Versuchsergebnisse kann in der Verwendung des serumhaltigen Nährmediums liegen. Dieses ist mit Wachstumsfaktoren stark angereichert, deren apoptoseverhindernde Wirkung eventuell die apoptoseauslösende Wirkung der Testsubstanzen überdeckt. Gerade das negative Messergebnis von c(RGDfV) spricht für diese Möglichkeit.

Scatena et al. berichten diesbezüglich, dass Endothelzellen, die in unbeschichteten Wells in serumhaltigem Wachstumsmedium kultiviert werden, nach 48 h nicht apoptotisch sind, das bedeutet also, dass das Wachstumsmedium für das Überleben der Zellen ausreicht. Dieses Ergebnis konnte im Experiment bestätigt werden. Vermutlich reichen die in dem Medium vorhandenen Proteine für die Beschichtung der Wells aus, so dass es nachfolgend zur Adhäsion der Zellen kommen kann. Zellen, die in serumfreiem Medium auf unbeschichteten Platten kultiviert wurden, gingen hingegen innerhalb von 48 h apoptotische Prozesse ein.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden bei einem weiteren Versuch (Methode c) die Testsubstanzen in serumfreiem Medium gelöst und diese mit den Zellen inkubiert. In

diesem Fall konnte bei den getesteten Substanzen (**9**, **ent-9**, **13a**, **35** und **37**) eine starke apoptoseauslösende Wirkung festgestellt werden (Abb. 16c). Diese liegt in der gleichen Größenordnung wie die Apoptoserate von CAM (Camptothecin), einer stark apoptotisch wirkenden Substanz, bei einer Konzentration von 25 μM . Bei den unbehandelten Zellen (Negativkontrolle), die über das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin mit der RGD-Sequenz des Fibrinogens wechselwirken konnten, trat hingegen keine Apoptose auf. Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass die Apoptose auf die Blockierung des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins zurückzuführen ist.

Alle Substanzen wurden zusätzlich auf ihre nekroseauslösende Wirkung hin getestet. Dabei konnte bei keiner der Testsubstanzen Nekrose nachgewiesen werden. Aufgrund der Beobachtung, dass bei allen RGD-Mimetika, die nach der Methode c) gemessen wurden, eine gleichermaßen hohe Apoptoserate detektiert wurde, obwohl sich die Substanzen bezüglich ihrer Affinität gegenüber dem $\alpha_v\beta_3$ -Integrin stark unterscheiden, wird deutlich, dass die gewählte Inhibitorkonzentration (50 μM , bzw. 10 μM bei dem Zyklopentapeptid c(RGDfV)) so hoch lag, dass eine maximale Apoptoserate erzielt wurde. Insofern ist es sinnvoll, in weiteren Experimenten die Konzentrationsabhängigkeit der Inhibitoren in Bezug auf die Apoptoserate zu ermitteln.

5.2.2 ATP-Analoga

Die synthetisierten ATP-Analoga wurden in einem nicht-radioaktiven Kinase-Assay getestet.^[100] Dabei konnten Aussagen über ihre inhibitorische Wirkung gegenüber den Kinasen KDR (VEGFR-2), Flt-4 (VEGFR-3), IGF1-R, EGF-R, ErbB2 (Her2-neu), Tie-2 und FGFR-1 getroffen werden.

Der Rezeptor KDR (VEGFR-2) wurde in seiner Kinaseaktivität durch mehrere der getesteten Verbindungen beeinträchtigt. Den stärksten inhibitorischen Effekt übten dabei **41c** ($IC_{50} = 0.4 \mu\text{g/mL}$), **42c** ($IC_{50} = 2.8 \mu\text{g/mL}$), **43c** (29 % Restaktivität bei $5 \mu\text{g/mL}$) und **44c** (11 % Restaktivität bei $5 \mu\text{g/mL}$) aus.

Diese Verbindungen erwiesen sich auch als potenteste Inhibitoren gegenüber dem Rezeptor Flt-4.

Ähnliche Messergebnisse zeigten sich bei der Untersuchung des Tie-2-Rezeptors: Hier waren die Verbindungen **41c** ($IC_{50} = 1.1 \mu\text{g/mL}$), **43c** (28 % Restaktivität bei $5 \mu\text{g/mL}$) und **44c** ($IC_{50} = 3.9 \mu\text{g/mL}$) die stärksten Inhibitoren.

Gegenüber dem IGF1-R erwiesen sich die Verbindungen **41c** ($IC_{50} = 3.4 \mu\text{g/mL}$) und **44c** (40 % Restaktivität bei $5 \mu\text{g/mL}$) als gute Inhibitoren. Die anderen Verbindungen zeigten hier nur sehr geringe oder gar keine Inhibition.

Dem EGF-Rezeptor gegenüber zeigte nur die Verbindung **44c** einen starken inhibitorischen Effekt. Es wurde ein IC_{50} -Wert von $8 \mu\text{g/mL}$ ermittelt.

Die Kinaseaktivität von ErbB2 wurde am stärksten durch die Verbindungen **41c** und **44c** blockiert. Es wurden IC_{50} -Werte von $9.3 \mu\text{g/mL}$ bzw. $33 \mu\text{g/mL}$ ermittelt. Die übrigen Verbindungen beeinträchtigten die Kinaseaktivität kaum.

Bei der Untersuchung des Rezeptors FGFR-1 zeigten die Verbindungen **41c** ($IC_{50} = 4.5 \mu\text{g/mL}$), **43c** ($IC_{50} = 15 \mu\text{g/mL}$) und **44c** ($IC_{50} = 18 \mu\text{g/mL}$) die stärksten inhibitorischen Eigenschaften.

Insgesamt erwiesen sich die Verbindungen **41c** und **44c** als die potentesten Inhibitoren. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass die getesteten Substanzen meist keine spezifischen Inhibitoren einzelner Kinasen darstellen, sondern im Falle einer Aktivität mehrere Kinasen inhibieren.

Abschließend lässt sich sagen, dass die essenzielle Bedeutung der Oxindol-Leitstruktur für die inhibitorische Wirksamkeit gegenüber Rezeptortyrosinkinasen erneut bestätigt werden konnte. Die Tatsache, dass auch Verbindungen aus strukturell völlig unverwandten Substanzklassen inhibitorisches Potenzial besitzen, öffnet – auch im Hinblick auf die Synthese – zahlreiche neue Möglichkeiten.

6 Ausblick

Die Hemmung der Angiogenese bietet Therapieansätze für die Bekämpfung zahlreicher Erkrankungen, wie beispielsweise der diabetischen Retinopathie, der rheumatoiden Arthritis und Krebs. Neben der Synthese der potenziellen Angiogeneseinhibitoren ist es wichtig, schnelle und zuverlässige Assays zu besitzen, die es ermöglichen, eine qualitative und quantitative Aussage über die Wirkungsweise der synthetisierten Verbindungen treffen zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang die Darstellung von verschiedenen RGD-Analoga mit Benzodiazepindiongrundgerüst. Die Verbindungen **9** und **ent-9** erwiesen sich dabei im Festphasen-Rezeptor-Assay als die potentesten Inhibitoren des $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_{11b}\beta_3$ -Integrins. Somit stellen diese beiden Verbindungen interessante Leitstrukturen dar, die weiter bezüglich ihrer Bindungseigenschaften, sowohl der Affinität als auch der Selektivität, optimiert werden können. Dabei bieten sich weitere Funktionalisierungen, z.B. Alkylierung am Stickstoff N-10 und Substitution der Guanidinogruppe durch analoge Funktionalitäten, an. Den Einfluss eines Arginin-Mimetikums konnten Peyman et al. belegen.[63] Sie zeigten, dass durch die Substitution der Guanidinogruppe des RGD-Mimetikums **67** (Abb. 24) durch eine 2-

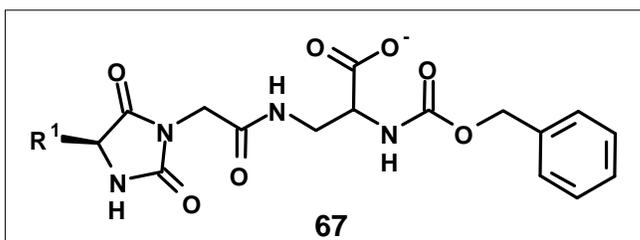
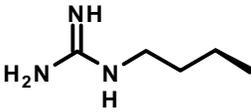
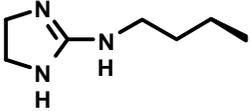
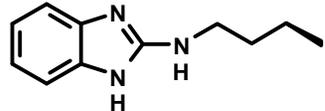
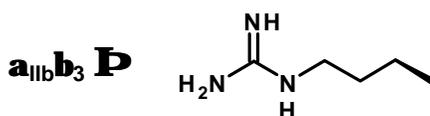


Abb. 24: RGD-Mimetikum

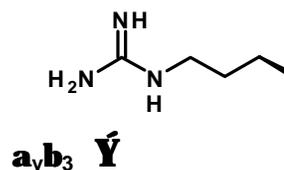
Aminobenzimidazolgruppe oder 2-Amino-4,5-Dihydroimidazolgruppe sowohl Affinität als auch Selektivität gegenüber dem $\alpha_v\beta_3$ -Integrin deutlich verbessert werden konnten (Abb. 25). Diese Resultate lassen vermuten, dass die Mimetika an das $\alpha_{11b}\beta_3$ -Integrin

über eine „end-on“-Wechselwirkung binden, wohingegen sie an das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin über einen „side-on“-Wechselwirkung binden.

R^1	$\alpha_{IIb}\beta_3$ IC ₅₀ [μ M)]	$\alpha_v\beta_3$ IC ₅₀ [μ M)]
	2.4	0.08
	> 10	0.02
	> 10	0.04



„end-on“-Wechselwirkung



„side-on“-Wechselwirkung

Abb. 25: Einfluss eines Arginin-Mimetikums auf die Affinität gegenüber dem $\alpha_v\beta_3$ - bzw. $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin.

Eine weitere Variation bezüglich des Abstandes zwischen Carboxy- und Guanidinofunktion ist ebenfalls interessant. Die RGD-Analoga **9** und **19** unterscheiden sich in ihrer Kettenlänge um zwei Atome. Insofern bietet sich die Synthese und biologische Untersuchung von einem RGD-Mimetikum mit der entsprechenden mittleren Kettenlänge an.

Auch bei dem Substitutionsmuster, das bei den Verbindungen **35** und **37** auftritt, könnte durch weitere Variation des Abstandes zwischen Carboxy- und Guanidinofunktion, d.h. Verlängerung der Kettenlänge um noch eine weitere Methyleneinheit, die Bindungsaffinität eventuell noch gesteigert werden.

Mit Hilfe des Festphasen-Rezeptor-Assays konnten Aussagen über die Wirkung der Integrinantagonisten am isolierten Rezeptor getroffen werden. Weiterhin konnte die apoptoseauslösende Wirkung der RGD-Mimetika **9**, **ent-9**, **13a**, **35** und **37** belegt werden. Zu klären bleibt die Frage, ob sich die Ergebnisse, die aus den Untersuchungen am isolierten Rezeptor erhalten wurden, in einem Migrations-Assay mit Endothelzellen, also einem weiteren zellulären Testsystem, bestätigen lassen. Ebenfalls sollten die dargestellten RGD-Analoga im CAM-Assay überprüft werden

um zu testen, inwieweit sich die Ergebnisse auf ein in vivo-System übertragen lassen.

Von den dargestellten ATP-Analoga erwiesen sich die Verbindungen **41c** und **44c** insgesamt als die potentesten Kinase-Inhibitoren. Jedoch blockieren sie unspezifisch mehrere der untersuchten Kinasen. Durch Veränderung des Substitutionsmusters könnte eine höhere Spezifität erreicht werden.

Zur besseren Charakterisierung der synthetisierten Substanzen sind im biologischen Bereich weitere Tests notwendig, da die im in vitro-Kinase-Assay gefundenen Aktivitäten bzw. Selektivitäten nicht zwangsläufig mit dem Verhalten dieser Verbindungen in zellulären Systemen korrelieren, so dass Tests auf zellulärer Ebene helfen, diese mögliche Diskrepanz aufzudecken. Beispielsweise ist die Ermittlung der Membrangängigkeit und auch zytotoxischer Effekte sinnvoll. Wie bei den Integrin-Antagonisten wären also Untersuchungen an zellulären Systemen und im CAM-Assay als einem in vivo-System interessant.

7 Experimenteller Teil

7.1 Chemischer Teil

7.1.1 Materialien und Geräte

Kernresonanzspektroskopie

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden mit folgenden Geräten aufgenommen:

250 MHz ^1H -NMR	Bruker AC 250
400 MHz ^1H -NMR	Bruker AM 400
100 MHz ^{13}C -NMR	
500 MHz ^1H -NMR	Bruker DRX 500
125 MHz ^{13}C -NMR	

Alle chemischen Verschiebungen δ in ppm beziehen sich auf das jeweils angegebene Lösungsmittel als internen Standard. Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz [Hz] angegeben. Die Signalmultiplizitäten werden wie folgt abgekürzt:

s: Singulett, d: Dublett, t: Triplett, q: Quartett, m: Multiplett, br: verbreitert.

Alle ^{13}C -NMR-Spektren wurden breitbandentkoppelt gemessen. Der Substitutionsgrad (CH_3 , CH_2 , CH , C) wurde durch DEPT-Experimente (135° , 90°) ermittelt.

Chromatographie

Für die analytische Dünnschichtchromatographie (DC) wurden DC-Folien der Firma Merck (Kieselgel 60 F_{254}) verwendet. Die Detektion wurde mit UV-Licht (254 nm) oder mit den folgenden Anfärbereagenzien durchgeführt:

- Seebach-Reagenz: 2.5 g Molybdätophosphorsäure, 1 g Cer(IV)-sulfat, 6 mL konz. Schwefelsäure und 94 mL H_2O
- 10 %ige ethanolische Ninhydrinlösung

Die Entwicklung erfolgte im Heißluftstrom.

Für die präparative Säulenchromatographie wurde Kieselgel der Korngröße 40 – 60 μm der Firma Merck verwendet. Die jeweils verwendeten Eluentien sind angegeben.

Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden an einem Finnigan „MAT 90“ Spektrometer bei einem Ionisierungspotenzial von 70 eV aufgenommen.

Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Büchi Schmelzpunktmessgerät 530 aufgenommen und sind nicht korrigiert.

Elementaranalysen

Die Elementaranalysen wurden mit einem „Elementaranalysator CHN-Rapid“ Verbrennungsautomaten der Firma Heraeus aufgenommen. Angegeben sind die berechneten und die ermittelten Prozentgehalte.

Drehwerte

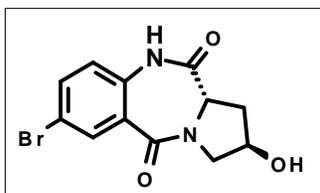
Die spezifischen Drehwerte $[\alpha]_D^{25}$ wurden mit einem „Perkin-Elmer 241“- Polarimeter bei 20 °C und der Wellenlänge $\lambda = 589$ nm (Na-D-Linie) bestimmt. Die Konzentration c bezieht sich auf g / 100 mL.

Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Aldrich (Taufkirchen), Fluka (Buchs, Schweiz), Acros (Niddenvau), Merck (Darmstadt) sowie Sigma (Taufkirchen) bezogen und wurden nach Standardmethoden getrocknet und destilliert.

7.1.2 Synthesevorschriften

7.1.2.1 (11a*S*)-7-Brom-(2*R*)-hydroxy-1,2,3,11a-tetrahydro-10*H*-benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-5,11-dion 1



5-Bromisatosäureanhydrid (10.0 g, 41.3 mmol) und (2*S*,4*R*)-4-Hydroxypyrrolidin-2-carbonsäure (6.5 g, 49.6 mmol) werden in 60 mL DMSO gelöst und 5 h unter Rühren auf 140 °C erhitzt. Das Reaktionsgemisch wird in 300 mL Wasser gegeben und die wässrige Phase mit

Essigester extrahiert (4 × 100 mL). Die vereinten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen (2 × 50 mL) und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt ohne weitere Aufreinigung für weitere Reaktionen eingesetzt.

Ausbeute: 12.1 g (39.0 mmol, 94 %), hellbrauner Feststoff;

m.p.: 143 °C;

[α]_D²⁵: +331.2 (c = 1.0, Methanol);

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄):

δ = 1.93 (m, 1 H; CH₂), 2.68 (dd, ³J(H,H) = 5.65 Hz, ²J = 13.34 Hz, 1 H; CH₂), 3.46 (dd, ³J(H,H) = 4.89 Hz, ²J(H,H) = 12.51 Hz, 1 H; CH₂), 3.64 (ddd, ³J(H,H) = 1.23 Hz, ³J(H,H) = 3.67 Hz, ²J(H,H) = 12.51 Hz, 1 H; CH₂), 4.15 (dd, ³J(H,H) = 6.10 Hz, ³J(H,H) = 7.93 Hz, 1 H; CH), 4.34 (m, 1 H; CH), 6.90 (d, ³J(H,H) = 8.55 Hz, 1 H; Ar-H), 7.51 (dd, ⁴J(H,H) = 2.45 Hz, ³J(H,H) = 8.85 Hz, 1 H; Ar-H), 7.83 (d, ⁴J(H,H) = 2.45 Hz, 1 H; Ar-H);

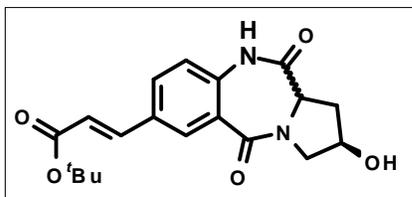
¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-*d*₄):

δ = 35.34 (CH₂), 55.25 (CH₂), 56.99 (CH), 69.41 (CH), 118.31 (C), 124.49 (CH), 128.95 (C), 134.13 (CH), 136.65 (CH), 136.85 (C), 166.75 (C), 171.71 (C);

HRMS (EI, 70 eV, C₁₂H₁₁BrN₂O₃ [M⁺]): berechnet (*m/z*): 309.9953, gemessen: 309.9935;

Elementaranalyse berechnet (%) für $C_{12}H_{11}BrN_2O_3 \cdot DMSO$: C 43.20, H 4.40, N 7.20; gemessen: C 43.05, H 4.11, N 6.70.

7.1.2.2 3-[(2*R*)-Hydroxy-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11*a*-hexahydro-1*H*-benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-7-yl]-acrylsäure-*tert*-butylester 2



Der Alkohol **1** (500 mg, 1.6 mmol) wird in 2 mL Acetonitril und 2 mL Triethylamin gelöst. Nach Zugabe von Triphenylphosphin (21 mg, 0.08 mmol), Palladium(II)-acetat (4 mg, 0.018 mmol) und *tert*-Butylacrylat (0.5 mL, 3.4 mmol) wird die Mischung

bei 90 °C gerührt. Nach 24 h werden erneut Triphenylphosphin (21 mg, 0.08 mmol), Palladium(II)-acetat (4 mg, 0.018 mmol) und *tert*-Butylacrylat (0.5 mL, 3.4 mmol) zugegeben und weitere 24 h bei 90 °C gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Eluent: Methylenchlorid/Methanol 10/1, $R_f = 0.26$).

Ausbeute: 527 mg (1.47 mmol, 92 %), hellgelber Feststoff;

Die Diastereomere werden durch weitere Säulenchromatographie an Kieselgel (Eluent : Essigester/Isopropanol 5/1, R_f (**2a**) = 0.67, R_f (**2b**) = 0.57) getrennt.

2a (11*aS*-Isomer)

Ausbeute: 388 mg (1.08 mmol);

m.p.: 133 °C;

[α] $_D^{25}$: +359.2 (c = 1.0, Methylenchlorid);

1H -NMR (500 MHz, Chloroform- d_1):

$\delta = 1.51$ (s, 9H; C(CH₃)₃), 2.19 (m, 1 H; CH₂), 2.88 (m, 1 H; CH₂), 3.62 (dd, 3J (H,H) = 4.37 Hz, 2J (H,H) = 12.71 Hz, 1 H; CH₂), 4.00 (d, 2J (H,H) = 13.11 Hz, 1 H; CH₂), 4.31 (m, 1 H; CH), 4.59 (m, 1 H; CH), 6.32 (d, 3J (H,H) = 15.90 Hz, 1 H; CH=CH), 7.06 (d, 3J (H,H) = 8.35 Hz, 1 H; Ar-H), 7.46 (d, 3J (H,H) = 15.89 Hz; CH=CH), 7.56 (dd, 4J (H,H) = 1.93, 3J (H,H) = 8.35, 1 H; Ar-H), 7.98 (d, 4J (H,H) = 1.93 Hz, 1 H; Ar-H), 9.14 (s, 1 H; NH);

¹³C-NMR (125 MHz, Chloroform-d₁):

δ = 28.14 (CH₃), 34.53 (CH₂), 54.58 (CH₂), 55.69 (CH), 68.63 (CH), 80.83 (C), 120.93 (CH), 121.85 (CH), 126.24 (C), 131.04 (CH), 131.47 (CH), 132.01 (C), 136.41 (C), 141.42 (CH), 165.80 (C), 166.06 (C), 170.58 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₁₉H₂₃N₂O₅ [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 359.1607, gemessen: 359.1627;

Elementaranalyse berechnet (%) für C₁₉H₂₂N₂O₅·0.25 (H₂O): C 62.89, H 6.25, N 7.72; gemessen: C 63.06, H 6.22, N 7.05.

2b (11*aR*-Isomer)

Ausbeute: 110 mg (0.31 mmol);

m.p.: 142 °C;

[α]_D²⁵: -274.8 (c = 1.0, Methylenchlorid);

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-d₁):

δ = 1.51 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 2.29 (m, 1 H; CH₂), 2.83 (d, ²*J* (H,H) = 12.93 Hz, 1 H; CH₂), 3.66 (dd, ³*J* (H,H) = 3.97 Hz, ²*J* (H,H) = 12.82 Hz, 1 H; CH₂), 3.86 (d, ²*J* (H,H) = 12.93 Hz, 1 H; CH₂), 4.20 (m, 1 H; CH), 4.55 (m, 1 H; CH), 6.34 (d, ³*J* (H,H) = 15.89 Hz, 1 H; CH=CH), 7.07 (d, ³*J* (H,H) = 8.35 Hz, 1 H; Ar-H), 7.53 (d, ³*J* (H,H) = 15.89 Hz, 1 H; CH=CH), 7.56 (dd, ⁴*J* (H,H) = 2.13 Hz, ³*J* (H,H) = 8.24 Hz, 1 H; Ar-H), 8.12 (d, ⁴*J* (H,H) = 1.93 Hz, 1 H; Ar-H), 9.26 (br, 1 H; NH);

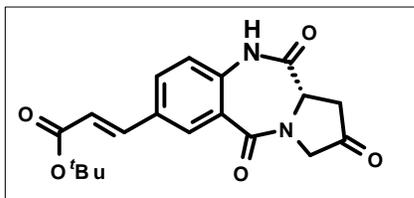
¹³C-NMR (125 MHz, Chloroform-d₁):

δ = 28.06 (CH₃), 34.04 (CH₂), 56.23 (CH₂), 56.52 (CH), 69.00 (CH), 80.96 (C), 121.11 (CH), 121.95 (CH), 126.86 (C), 130.97 (CH), 131.49 (CH), 131.68 (C), 136.50 (C), 141.41 (CH), 165.43 (C), 166.16 (C), 171.37 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₁₉H₂₃N₂O₅ [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 359.1607, gemessen: 359.1627;

Elementaranalyse berechnet (%) für C₁₉H₂₂N₂O₅·0.5 (H₂O): C 62.11, H 6.31, N 7.62; gemessen: C 62.63, H 6.25, N 7.52.

7.1.2.3 3-[(11a*S*)-2,5,11-Trioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1*H*-benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-7-yl]-acrylsäure-*tert*-butylester 3



Der Alkohol **2a** (780 mg, 2.18 mmol) wird in 10 mL DMSO vorgelegt. Nach Zugabe von IBX (793 mg, 2.83 mmol, 1.3 eq.) wird die Mischung 3 d bei Raumtemperatur gerührt und danach in 200 mL Wasser gegeben. Nachfolgend wird mit

Methylenchlorid (4 × 50 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden mit Wasser (50 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Danach wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel (Eluent: n-Hexan/Essigester 1/1, R_f = 0.35) gereinigt.

Ausbeute: 606 mg (1.70 mmol, 78 %), hellgelber Feststoff;

m.p.: 148 °C (Zersetzung);

[α]_D²⁵: +342.4 (c = 1.0, Methylenchlorid);

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*₁):

δ = 1.51 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 2.87 (dd, ³J (H,H) = 10.38 Hz, ²J (H,H) = 18.92 Hz, 1 H; CH₂), 3.60 (dd, ³J (H,H) = 3.66 Hz, ²J (H,H) = 19.53 Hz, 1 H; CH₂), 3.96 (d, ²J (H,H) = 20.14 Hz, 1 H; CH₂), 4.32 (d, ²J (H,H) = 20.15 Hz, 1 H; CH₂), 4.64 (dd, ³J (H,H) = 3.35 Hz, ³J (H,H) = 10.07 Hz, 1 H; CH), 6.40 (d, ³J (H,H) = 16.03 Hz, 1 H; CH=CH), 7.17 (d, ³J (H,H) = 8.24 Hz, 1 H; Ar-H), 7.55 (d, ³J (H,H) = 16.18 Hz, 1 H; CH=CH), 7.66 (dd, ⁴J (H,H) = 2.14 Hz, ³J (H,H) = 8.24 Hz, 1 H; Ar-H), 8.11 (d, ⁴J (H,H) = 1.83 Hz, 1 H; Ar-H) 9.36 (br, 1 H; NH);

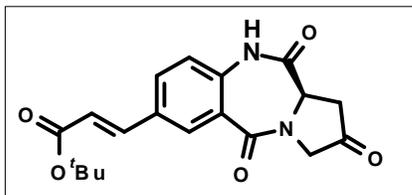
¹³C-NMR (125 MHz, Chloroform-*d*₁):

δ = 28.16 (CH₃), 36.58 (CH₂), 52.82 (CH₂), 54.08 (CH), 80.98 (C), 121.77 (CH), 121.98 (CH), 126.01 (C), 131.18 (CH), 132.00 (CH), 132.48 (C), 135.82 (C), 140.98 (CH), 165.61 (C), 165.85 (C), 169.55 (C), 206.24 (C);

MS (180 °C): *m/z* (%) = 356 (M⁺, 19), 300 (44), 283 (15), 256 (17), 41 (100);

HRMS (EI, 70 eV, C₁₉H₂₀N₂O₅ [M]⁺): berechnet (*m/z*): 356.1372, gemessen: 356.1375.

7.1.2.4 3-[(11aR)-2,5,11-Trioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl]-acrylsäure-*tert.*-butylester ent-3



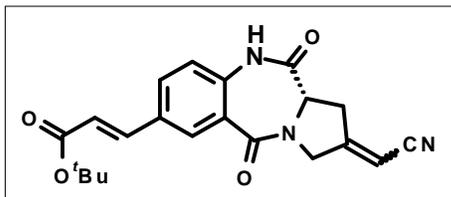
Das Enantiomer **ent-3** wird entsprechend der Vorschrift für das Keton **3** dargestellt.

Ausbeute: 465 mg (1.30 mmol, 57 %), hellgelber Feststoff;

[α]_D²⁵: -355.0 (c = 1.0, Methylenchlorid);

HRMS (FAB, 70 eV, C₁₉H₂₁N₂O₅ [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 357.1450, gemessen: 357.1483.

7.1.2.5 3-[(11aS)-2-Cyanomethylen-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl]-acrylsäure-*tert.*-butylester **4**



Diethylcyanomethylphosphonat (1.46 mL, 9.28 mmol) wird in 25 mL THF vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Innerhalb von 15 min. wird *n*-Butyllithium (5.8 mL, 1.6 M in *n*-Hexan, 9.28 mmol) zugetropft. Es wird 0.5 h bei 0 °C

gerührt und anschließend die Lösung auf -50 °C gekühlt. Eine Lösung von Keton **3** (1.50 g, 4.21 mmol) in 10 mL THF wird unter Rühren zugegeben. Innerhalb von 3 h wird die Lösung auf Raumtemperatur erwärmt und danach weitere 12 h gerührt.

Es werden 100 mL Wasser in die Reaktionslösung gegeben; danach wird mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird an Kieselgel (Eluent: *n*-Hexan/Essigester 1/2) gereinigt. Man erhält bei der Reaktion sowohl das *cis*- als auch das *trans*-Isomer (*R_f* = 0.71 (*trans*) bzw. 0.78 (*cis*)).

Ausbeute: 687 mg (1.81 mmol, 43 %), beide Isomere, farbloser Feststoff;

m.p.: 151 °C (*trans*-Isomer, Zersetzung);

[α]_D²⁵: +335.3 (*trans*-Isomer, $c = 1.0$, Methylenchlorid);

cis-Isomer:

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-d₁):

$\delta = 1.52$ (s, 9 H; C(CH₃)₃), 3.17 (dd, ³ J (H,H) = 9.53 Hz, ² J (H,H) = 18.67 Hz, 1 H; CH₂), 3.97 (d, ² J (H,H) = 18.68 Hz, 1 H; CH₂), 4.39 (d, ² J (H,H) = 18.68 Hz, 1 H; CH₂), 4.45 (dd, ³ J (H,H) = 3.18 Hz, ³ J (H,H) = 9.54 Hz, 1 H; CH), 4.68 (d, ² J (H,H) = 18.67 Hz, 1 H; CH₂), 5.48 (m, 1 H; CH-CN), 6.39 (d, ³ J (H,H) = 15.90 Hz, 1 H; CH=CH), 7.11 (d, ³ J (H,H) = 8.35 Hz, 1 H; Ar-H), 7.55 (d, ³ J (H,H) = 15.89 Hz, 1 H; CH=CH), 7.67 (dd, ⁴ J (H,H) = 1.99 Hz, ³ J (H,H) = 8.35 Hz, 1 H; Ar-H), 8.08 (d, ⁴ J (H,H) = 1.98 Hz, 1 H; Ar-H), 9.15 (s, 1 H; NH);

¹³C-NMR (125 MHz, Chloroform-d₁):

$\delta = 28.16$ (CH₃), 31.88 (CH₂), 51.80 (CH₂), 55.35 (CH), 80.92 (C), 94.23 (CH), 115.50 (C), 121.66 (CH), 122.00 (CH), 126.24 (C), 130.95 (CH), 131.92 (CH), 132.25 (C), 135.95 (C), 141.03 (CH), 160.09 (C), 164.79 (C), 165.85 (C), 169.42 (C);

trans-Isomer:

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-d₁):

$\delta = 1.53$ (s, 9 H; C(CH₃)₃), 2.96 (m, 1 H; CH₂), 3.26 (dd, ³ J (H,H) = 1.20 Hz, ² J (H,H) = 18.68 Hz, 1 H; CH₂), 3.34 (dd, ³ J (H,H) = 1.19 Hz, ² J (H,H) = 18.68 Hz, 1 H; CH₂), 3.65 (m, 1 H; CH₂), 4.61 (dd, ³ J (H,H) = 3.97 Hz, ³ J (H,H) = 11.13 Hz, 1 H; CH), 6.41 (d, ³ J (H,H) = 15.90 Hz, 1 H; CH=CH), 7.08 (m, 1 H; CH-CN), 7.11 (d, ³ J (H,H) = 8.34 Hz, 1 H; Ar-H), 7.56 (d, ³ J (H,H) = 15.90 Hz, 1 H; CH=CH), 7.65 (dd, ⁴ J (H,H) = 1.99 Hz, ³ J (H,H) = 8.34 Hz, 1 H; Ar-H), 8.14 (d, ⁴ J (H,H) = 1.99 Hz, 1 H; Ar-H), 9.10 (s, 1 H; NH);

¹³C-NMR (125 MHz, Chloroform-d₁):

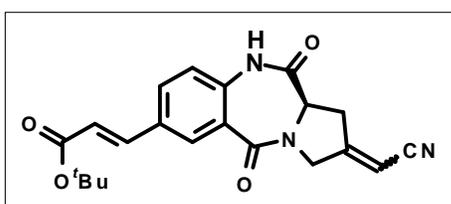
$\delta = 17.41$ (CH₂), 28.17 (CH₃), 32.64 (CH₂), 56.66 (CH), 80.93 (C), 115.55 (C), 115.83 (C), 121.72 (CH), 122.00 (CH), 126.00 (C), 126.30 (CH), 131.42 (CH), 131.88 (CH), 132.30 (C), 135.58 (C), 140.98 (CH), 161.58 (C), 165.83 (C), 168.52 (C);

MS (220 °C): m/z (%) = 379 (M⁺, 9), 323 (12), 279 (4), 57 (16), 56 (62), 44 (21), 41 (100);

HRMS (EI, 70 eV, $C_{21}H_{21}N_3O_4$ $[M]^+$): berechnet (m/z): 379.1532, gemessen: 379.1527;

Elementaranalyse berechnet (%) für $C_{21}H_{21}N_3O_4 \cdot (H_2O)$: C 63.47, H 5.83, N 10.57; gemessen: C 63.29, H 5.56, N 10.46.

7.1.2.6 3-[(11aR)-2-Cyanomethylen-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl]-acrylsäure-*tert.*-butylester ent-4



Entsprechend der Vorschrift für das Nitril **4** wird das Keton **ent-3** (608 mg, 1.71 mmol) unter Verwendung von 0.59 mL (3.75 mmol) Diethylcyanomethylphosphonat und 2.35 mL *n*-Butyllithium (1.6 M in *n*-Hexan, 3.75 mmol) in das enantiomere Nitril **ent-4** überführt.

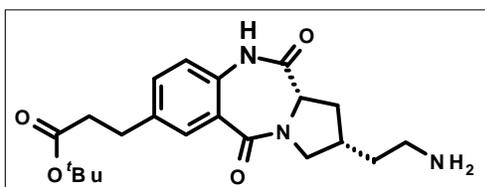
Ausbeute: 291 mg (0.77 mmol, 45 %), farbloser Feststoff;

$[\alpha]_D^{25}$: -343.6 ($c = 0.5$, Methylenchloridl);

HRMS (FAB, 70 eV, $C_{21}H_{22}N_3O_4$ $[M+H]^+$): berechnet (m/z): 380.1610, gemessen: 380.1599;

Elementaranalyse berechnet (%) für $C_{21}H_{21}N_3O_4 \cdot 0.6 (H_2O)$: C 64.64, H 5.73, N 10.77; gemessen: C 64.29, H 5.45, N 10.33.

7.1.2.7 3-[(11aS)-(2S)-(2-Amino-ethyl)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl]-propansäure-*tert.*-butylester **5**



Das Nitril **4** (200 mg, 0.53 mmol) wird in 10 mL Methanol vorgelegt. Nach Zugabe von $CoCl_2$ (137 mg, 1.05 mmol, 2 eq.) wird die Mischung auf 0 °C gekühlt. Danach wird $NaBH_4$ (195 mg, 5.27 mmol, 10 eq.) in kleinen Portionen unter

Rühren zugegeben, wobei sich Co_2B als schwarzer Feststoff abscheidet. Die Mischung wird innerhalb von 3 h auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend für weitere 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wird 10 %ige Zitronensäure zugegeben, um das Co_2B teilweise zu lösen. Danach wird mit 25 %iger NH_3 -Lösung $\text{pH} = 9 - 10$ eingestellt. Die wässrige Phase wird mit Essigester ($4 \times 30 \text{ mL}$) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit H_2O und gesättigter NaCl -Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das hierbei erhaltene Amin ($R_f = 0.50$ in Methylenchlorid/Methanol 5/1) wird ohne weitere Aufreinigung in folgenden Reaktionen eingesetzt.

Ausbeute: 120 mg (0.31 mmol, 59 %), hellgelbes Öl;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Methanol- d_4):

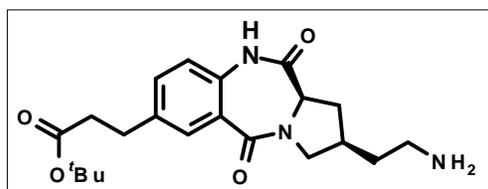
$\delta = 1.40$ (s, 9 H; $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.66 (m, 2 H), 2.28 (m, 2 H), 2.44 (m, 1 H), 2.55 (t, $^3J(\text{H,H}) = 7.15 \text{ Hz}$, 2 H; CH_2), 2.77 (m, 2 H), 2.91 (t, $^3J(\text{H,H}) = 7.15 \text{ Hz}$, 2 H; CH_2), 3.10 (m, 1 H), 4.14 (m, 2 H), 7.04 (d, $^3J(\text{H,H}) = 8.34 \text{ Hz}$, 1 H; Ar-H), 7.40 (dd, $^4J(\text{H,H}) = 1.99 \text{ Hz}$, $^3J(\text{H,H}) = 8.34 \text{ Hz}$, 1 H; Ar-H), 7.72 (d, $^4J(\text{H,H}) = 1.99 \text{ Hz}$, 1 H; Ar-H);

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Methanol- d_4):

$\delta = 26.92$ (CH_3), 29.84 (CH_2), 31.04 (CH_2), 34.36 (CH), 35.57 (CH_2), 36.24 (CH_2), 39.75 (CH_2), 52.07 (CH_2), 56.77 (CH), 80.37 (C), 121.19 (CH), 125.76 (C), 129.80 (CH), 132.71 (CH), 134.46 (C), 137.41 (C), 166.46 (C), 171.04 (C), 172.32 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$): berechnet (m/z): 388.2236, gemessen: 388.2252.

7.1.2.8 3-[(11aR)-(2R)-(2-Amino-ethyl)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl]-propansäure-tert.-butylester ent-5

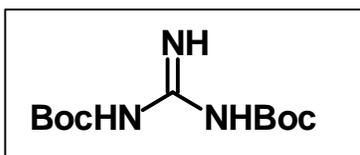


Das Nitril **ent-4** wird entsprechend der Vorschrift für das Amin **5** (284 mg, 0.75 mmol) mit CoCl_2 (194 mg, 1.50 mmol, 2 eq.) und NaBH_4 (277 mg, 7.49 mmol, 10 eq.) zum Amin **ent-5** reduziert.

Ausbeute: 162 mg (0.42 mmol, 56 %);

HRMS (FAB, 70 eV, $C_{21}H_{30}N_3O_4$ $[M+H]^+$): berechnet (m/z): 388.2236, gemessen: 388.2246.

7.1.2.9 *N',N''*-Bis-(*tert.*-butoxycarbonyl)-guanidin **7**



Zu einer Lösung von Guanidin-hydrochlorid (2.39 g, 5 mmol) und NaOH (4.0 g, 0.1 mmol) in Wasser (25 mL) wird Dioxan (50 mL) gegeben. Nachdem die Lösung auf 0 °C gekühlt ist, gibt man Di-*tert.*-butylpyrocarbonat (12.0 g, 55 mmol) hinzu. Die Reaktionsmischung wird innerhalb von 2 h auf Raumtemperatur erwärmt und im Anschluss noch weitere 20 h gerührt. Danach wird die Lösung unter vermindertem Druck auf ein Drittel des ursprünglichen Volumens eingeeengt. Man fügt 50 mL Wasser hinzu und extrahiert die Suspension mit Essigester (4 × 50 mL). Die vereinten organischen Phasen werden nacheinander mit 5 %iger Zitronensäure, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird der Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Eluent: Methylenchlorid/Methanol 97/3).

Ausbeute: 3.93 g (15 mmol, 61 %), farbloser Feststoff;

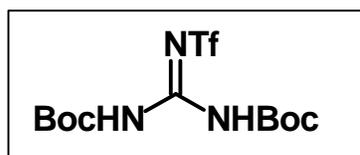
m.p.: 144 °C;

1H -NMR (500 MHz, Chloroform- d_1):

δ = 1.47 (s, 18 H; 2 × $C(CH_3)_3$);

HRMS (FAB, 70 eV, $C_{11}H_{22}N_3O_4$ $[M+H]^+$): berechnet (m/z): 260.1610, gemessen: 260.1620.

7.1.2.10 *N',N''*-Bis-(*tert.*-butoxycarbonyl)-*N''*-trifluormethansulfonylguanidin **6**



Eine Lösung von *N',N''*-Bis-(*tert.*-butoxycarbonyl)-guanidin **7** (2.78 g, 10.8 mmol) und Triethylamin

(1.55 mL) in Methylenchlorid (15 mL) wird auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Unter Rühren wird langsam Trifluormethansulfonsäureanhydrid (1.87 mL, 11.2 mmol) zugetropft, sodass die Temperatur nicht über $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ steigt. Anschließend wird die Lösung innerhalb von 4 h auf Raumtemperatur erwärmt. Danach wird die Lösung nacheinander mit 5 %iger Zitronensäure und Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird der Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Eluent: Methylenchlorid).

Ausbeute: 3.00 g (7.7 mmol, 71 %), farbloser Feststoff;

m.p.: $115\text{ }^{\circ}\text{C}$;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Chloroform- d_1):

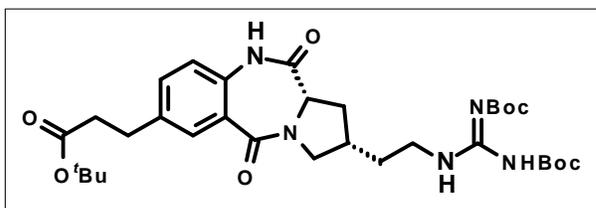
$\delta = 1.52$ (s, 18 H; $2 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$), 10.11 (br, 1 H; NH);

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Chloroform- d_1):

$\delta = 27.80$ ($2 \times \text{C}(\text{CH}_3)$), 85.98 ($2 \times \text{C}$), $114.46 - 124.00$ (q, $^2J(\text{C},\text{F}) = 320.44$ Hz, CF_3), 110.57 (C), 151.39 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{SN}_3\text{F}_3\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$): berechnet (m/z): 392.1103, gemessen: 392.1109.

7.1.2.11 3-[(11a*S*)-(2*S*)-(2-*N,N'*-Bis-(*tert*-butoxycarbonyl)-guanidino-ethyl)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1*H*-benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-7-yl]-propansäure-*tert*-butylester 8



Das Amin **5** (314 mg, 0.81 mmol) wird in Methylenchlorid (10 mL) vorgelegt und auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Nach Zugabe von *N,N'*-Di-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N,N'*-trifluormethansulfonylguanidin **6**

(382 mg, 0.98 mmol, 1.2 eq.) und Triethylamin (0.14 mL, 0.98 mmol, 1.2 eq.) wird die Lösung 1 h bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Eluent: n-Hexan/Essigester 1/1, $R_f = 0.55$).

Ausbeute: 369 mg (0.59 mmol, 73 %), farbloser Feststoff;

m.p.: 190 °C (Zersetzung);

[a]_D²⁵: +160.8 (c = 1.0, Methylenchlorid);

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-d₁):

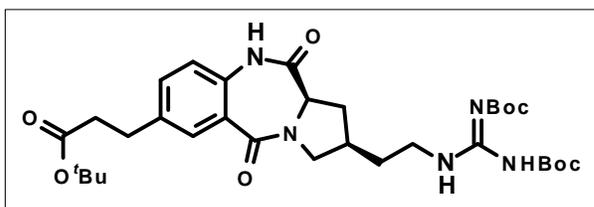
δ = 1.40 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 1.47 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 1.48 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 1.75 (m, 2 H; CH₂), 2.26 (m, 1 H; CH, 1 H; CH₂), 2.50-2.55 (m, 1 H; CH₂, m, 2 H; CH₂), 2.90 (m, 2 H; CH₂), 3.11 (dd, ³J (H,H) = 7.55 Hz, ²J (H,H) = 11.93 Hz, 1 H; CH₂), 3.48 (m, 2 H; CH₂), 4.06 (m, 1 H; CH), 4.22 (dd, ³J (H,H) = 7.55 Hz, ²J (H,H) = 11.92 Hz, 1 H; CH₂), 6.92 (d, ³J (H,H) = 8.34 Hz, 1 H; Ar-H), 7.31 (dd, ⁴J (H,H) = 1.99 Hz, ³J (H,H) = 7.95 Hz, 1 H; Ar-H), 7.79 (d, ⁴J (H,H) = 1.99 Hz, 1 H; Ar-H), 8.33 (m, 1 H; NH), 8.42 (s, 1 H; NH), 11.47 (s, 1 H; NH);

¹³C-NMR (125 MHz, Chloroform-d₁):

δ = 28.05 (CH₃), 28.26 (CH₃), 30.19 (CH₂), 31.48 (CH₂), 32.30 (CH₂), 34.60 (CH), 36.60 (CH₂), 39.47 (CH₂), 52.21 (CH₂), 56.61 (CH), 79.39 (C), 80.66 (C), 83.24 (C), 121.12 (CH), 126.26 (C), 130.76 (CH), 132.75 (CH), 133.22 (C), 138.03 (C), 153.30 (C), 156.18 (C), 163.48 (C), 165.55 (C), 170.89 (C), 171.93 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₃₂H₄₈N₅O₈ [M+H]⁺): berechnet (m/z): 630.3503, gemessen: 630.3479.

7.1.2.12 3-[(11aR)-(2R)-(2-N',N''-Bis-(tert.-butoxycarbonyl)-guanidino-ethyl)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl]-propansäure-tert.-butylester ent-8



Das Amin **ent-5** (170 mg, 0.44 mmol) wird entsprechend der Vorschrift für Verbindung **8** mit *N,N'*-Di-(*tert.*-butoxycarbonyl)-*N''*-trifluormethansulfonyl-guanidin **6** (207 mg,

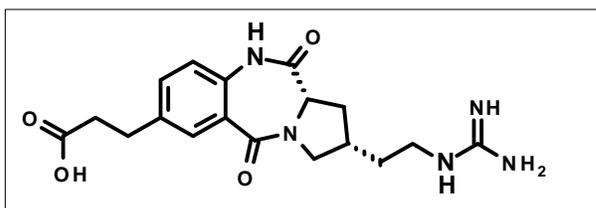
0.53 mmol, 1.2 eq.) und Triethylamin (0.08 mL, 0.53 mmol, 1.2 eq.) zum Guanidin **ent-8** umgesetzt.

Ausbeute: 224 mg (0.36 mmol, 81 %), farbloser Feststoff;

[a]_D²⁵: -152.8 (c = 0.5, Methylenchlorid);

HRMS (FAB, 70 eV, $C_{32}H_{48}N_5O_8$ $[M+H]^+$): berechnet (m/z): 630.3503, gemessen: 630.3478.

7.1.2.13 3-[(11a*S*)-(2*S*)-(2-Guanidino-ethyl)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1*H*-benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-7-yl]-propansäuretrifluoracetat 9



Zu einer Lösung des geschützten Guanidins **8** (200 mg, 0.32 mmol) in Methylenchlorid (5 mL) wird unter Rühren 1 mL TFA zugegeben. Die Lösung wird 4 h bei Raumtemperatur

gerührt, wonach das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt wird. Das Produkt wird durch Waschen mit Diethylether gereinigt.

Ausbeute: quantitativ, hellgelber Feststoff;

m.p.: 124 °C (Zersetzung);

$[\alpha]_D^{25}$: +185.0 ($c = 0.5$, Methanol);

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O):

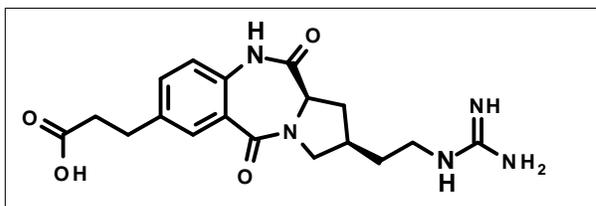
$\delta = 1.74$ (m, 2 H; CH_2), 2.28 (m, 1 H; CH_2), 2.37 (m, 1 H; CH, 1 H; CH_2), 2.71 (t, $^3J(H,H) = 7.29$ Hz, 2 H; CH_2), 2.95 (t, $^3J(H,H) = 7.35$ Hz, 2 H; CH_2), 3.21 (dd, $^3J(H,H) = 6.78$ Hz, $^2J(H,H) = 12.05$ Hz, 1 H; CH_2), 3.30 (m, 2 H; CH_2), 4.01 (dd, $^3J(H,H) = 6.60$, $^2J(H,H) = 12.05$ Hz, 1 H; CH_2), 4.19 (m, 1 H; CH), 7.10 (d, $^3J(H,H) = 8.29$ Hz, 1 H; Ar-H), 7.47 (dd, $^4J(H,H) = 2.26$ Hz, $^3J(H,H) = 8.29$ Hz, 1 H; Ar-H), 7.66 (d, $^4J(H,H) = 2.26$ Hz, 1 H; Ar-H);

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O):

$\delta = 30.64$ (CH_2), 31.41 (CH_2), 32.34 (CH_2), 35.04 (CH), 36.14 (CH_2), 41.05 (CH_2), 53.55 (CH_2), 58.17 (CH), 123.07 (CH), 126.55 (C), 130.56 (CH), 134.57 (CH), 134.81 (C), 139.10 (C), 157.96 (C), 168.72 (C), 173.79 (C), 178.69 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, $C_{18}H_{24}N_5O_4$ $[M+H]^+$): berechnet (m/z): 374.1828, gemessen: 374.1819.

7.1.2.14 3-[(11aR)-(2R)-(2-Guanidino-ethyl)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl]-propansäure-trifluoracetat ent-9



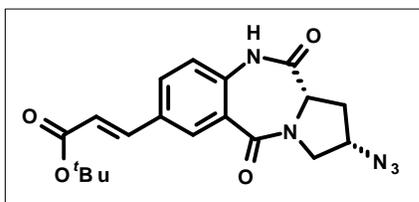
Entsprechend der Vorschrift für Verbindung **9** werden die Schutzgruppen von **ent-8** (150 mg, 0.24 mmol) mit TFA entfernt.

Ausbeute: quantitativ, hellgelber Feststoff;

[a]_D²⁵: -172.4 (c = 0.5, Methanol);

HRMS (FAB, 70 eV, C₁₈H₂₄N₅O₄ [M+H]⁺): berechnet (m/z): 374.1828, gemessen: 374.1816.

7.1.2.15 3-[(11aS)-(2S)-Azido-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl]-acrylsäure-tert.-butylester 10a



Verbindung **2a** (460 mg, 1.28 mmol) wird in Methylenechlorid (10 mL) vorgelegt. Nach Zugabe von Pyridin (3 mL) wird die Lösung auf -10 °C gekühlt. Methansulfonylchlorid (0.13 mL, 1.67 mmol) wird unter Rühren zugetropft. Die

Lösung wird 1 h bei 0 °C und 10 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit gesättigter NaHCO₃-Lösung (30 mL) gewaschen und die wässrige Phase mit Methylenechlorid (3 × 20 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden mit 10 %iger Zitronensäure und Wasser gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Danach wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das hierbei erhaltene Mesylat wird ohne weitere Aufreinigung zum Azid umgesetzt.

Das Mesylat wird in *N,N*-Dimethylformamid (6 mL) gelöst. Nach Zugabe von Natriumazid (1.25 g, 19.23 mmol) wird 48 h auf 60 °C erhitzt. Anschließend wird die Reaktionsmischung in Eiswasser (200 mL) gegeben und die wässrige Phase mit Methylenechlorid (3 × 50 mL) extrahiert. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand

wird an Kieselgel chromatographiert (Eluent: Methylenchlorid/Methanol 10/1, $R_f = 0.53$).

Ausbeute: 374 mg (0.98 mmol, 76 %), hellgelber Feststoff;

m.p.: 109 °C (Zersetzung);

$[\alpha]_D^{25}$: +391.2 (c = 1.0, Methylenchlorid);

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Chloroform- d_1):

$\delta = 1.52$ (s, 9 H; $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.38 (m, 1 H; CH_2), 3.10 (dd, $^3J(\text{H,H}) = 1.99$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 13.91$ Hz, 1 H; CH_2), 3.73 (m, 1 H; CH_2), 3.82 (dd, $^3J(\text{H,H}) = 5.14$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 12.98$ Hz, 1 H; CH_2), 4.20 (dd, $^3J(\text{H,H}) = 1.99$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 9.14$, 1 H; CH), 4.37 (m, 1 H; CH), 6.39 (d, $^3J(\text{H,H}) = 15.90$ Hz, 1 H; CH=CH), 7.10 (m, 1 H; Ar-H), 7.55 (d, $^3J(\text{H,H}) = 15.89$ Hz, 1 H; CH=CH), 7.62 (dd, $^4J(\text{H,H}) = 1.99$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 8.34$ Hz, 1 H; Ar-H), 8.13 (d, $^4J(\text{H,H}) = 1.99$ Hz, 1 H; Ar-H), 9.10 (br, 1 H; NH);

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Chloroform- d_1):

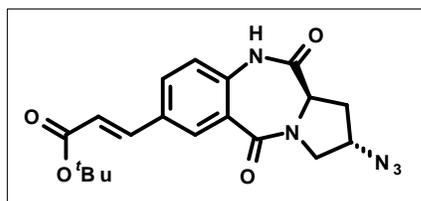
$\delta = 28.16$ (CH_3), 30.86 (CH_2), 52.88 (CH_2), 55.98 (CH), 57.82 (CH), 80.79 (C), 121.25 (CH), 121.72 (CH), 125.72 (C), 131.39 (CH), 131.68 (CH), 131.72 (C), 136.36 (C), 141.29 (CH), 165.27 (C), 165.94 (C), 170.76 (C);

MS (170 °C): m/z (%) = 383 (8, M^+), 283 (7), 57 (60), 41 (100);

HRMS (EI, 70 eV, $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_4$ $[\text{M}]^+$): berechnet (m/z): 383.1593, gemessen: 383.1595;

Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_4 \cdot 0.5(\text{H}_2\text{O})$: C 58.16, H 5.65; gemessen: C 58.30, H 5.88.

7.1.2.16 3-[(11aR)-(2S)-Azido-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl]-acrylsäure-*tert.*-butylester **10b**



Der Alkohol **2b** (300 mg, 0.84 mmol) wird in das Azid **10b** entsprechend der Vorschrift für Verbindung **10a** überführt ($R_f = 0.55$, Methylenchlorid/Methanol 10/1).

Ausbeute: 221 mg (0.58 mmol, 69 %), hellgelber Feststoff;

m.p.: 114 °C (Zersetzung);

[a]_D²⁵: -371.4 (c = 1.0, Methylenchlorid);

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*₁):

$\delta = 1.50$ (s, 9 H; C(CH₃)₃), 2.18 (m, 1 H; CH₂), 3.01 (m, 1 H; CH₂), 3.77 (dd, ³J (H,H) = 5.56 Hz, ²J (H,H) = 12.32 Hz, 1 H; CH₂), 3.86 (dd, ³J (H,H) = 4.77 Hz, ²J (H,H) = 12.32 Hz, 1 H; CH₂), 4.23 (dd, ³J (H,H) = 5.17 Hz, ³J (H,H) = 8.34 Hz, 1 H; CH), 4.30 (m, 1 H; CH), 6.37 (d, ³J (H,H) = 15.90 Hz, 1 H; CH=CH), 7.10 (dd, ³J (H,H) = 8.35 Hz, 1 H; Ar-H), 7.53 (d, ³J (H,H) = 15.93 Hz, 1 H; CH=CH), 7.59 (dd, ⁴J (H,H) = 1.99 Hz, ³J (H,H) = 8.35 Hz, 1 H; Ar-H), 8.11 (d, ⁴J (H,H) = 1.99 Hz, 1 H; Ar-H), 9.66 (br, 1 H; NH);

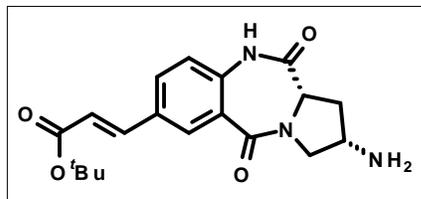
¹³C-NMR (125 MHz, Chloroform-*d*₁):

$\delta = 28.11$ (CH₃), 31.98 (CH₂), 51.38 (CH₂), 55.47 (CH), 58.03 (CH), 80.78 (C), 121.24 (CH), 121.89 (CH), 126.19 (C), 131.19 (CH), 131.56 (CH), 131.80 (C), 136.19 (C), 141.27 (CH), 165.12 (C), 165.94 (C), 170.09 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₁₉H₂₂N₅O₄ [M+H]⁺): berechnet (m/z): 384.1671, gemessen: 384.1680;

Elementaranalyse berechnet (%) für C₁₉H₂₁N₅O₄·0.5(H₂O): C 58.16, H 5.65; gemessen: C 57.74, H 5.65.

7.1.2.17 3-[(11a*S*)-(2*S*)-(Amino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1*H*-benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-7-yl]-acrylsäure-*tert.*-butylester 11a



Das Azid **10a** (1 g, 2.61 mmol) wird in Methanol (10 mL) vorgelegt. Das Lösungsmittel wird entgast und anschließend mit Argon gespült. Nach Zugabe katalytischer Mengen an Palladium auf Aktivkohle wird mit Wasserstoff gespült. Die

Reaktionsmischung wird 4 h unter Wasserstoffatmosphäre (1 bar) gerührt. Danach wird mit Argon gespült und der Katalysator durch Filtration abgetrennt. Das Lösungsmittel wird unter reduziertem Druck entfernt. Das hierbei erhaltene Produkt wird ohne weitere Reinigung in nachfolgenden Reaktionen eingesetzt ($R_f = 0.22$, Methylenchlorid/Methanol/Ammoniak (konz.) 5/1/0.01).

Ausbeute: 931 mg (2.61 mmol, quantitativ), gelber Feststoff;

m.p.: 151 °C;

[α]_D²⁵: +360.8 (c = 1.0, Methanol);

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄):

$\delta = 1.52$ (s, 9 H; C(CH₃)₃), 2.40 (m, 1 H; CH₂), 2.64 (m, 1 H; CH₂), 3.45 (dd, ³*J* = 3.78 Hz, ²*J* (H,H) = 12.12 Hz, 1 H; CH₂), 3.68 (m, 1 H; CH), 3.98 (dd, ³*J* (H,H) = 5.96 Hz, ²*J* (H,H) = 12.31 Hz, 1 H; CH₂), 4.29 (dd, ³*J* (H,H) = 3.98 Hz, ³*J* = 8.74 Hz, 1 H; CH), 6.43 (d, ³*J* (H,H) = 15.89 Hz, 1 H; CH=CH), 7.17 (d, ³*J* (H,H) = 8.35 Hz, 1 H; Ar-H), 7.56 (d, ³*J* (H,H) = 15.89 Hz, 1 H; CH=CH), 7.77 (dd, ⁴*J* (H,H) = 1.99 Hz, ³*J* (H,H) = 8.34 Hz, 1 H; Ar-H), 8.04 (d, ⁴*J* (H,H) = 1.99 Hz, 1 H; Ar-H);

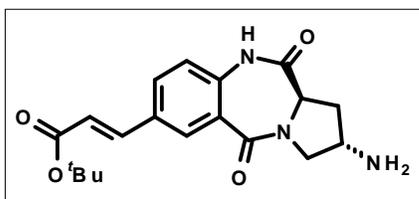
¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-*d*₄):

$\delta = 28.43$ (CH₃), 34.17 (CH₂), 50.40 (CH), 55.98 (CH₂), 57.91 (CH), 81.89 (C), 121.56 (CH), 123.20 (CH), 127.47 (C), 131.95 (CH), 132.32 (C), 132.70 (CH), 139.02 (C), 143.12 (CH), 167.50 (C), 167.67 (C), 172.24 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₁₉H₂₄N₃O₄ [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 358.1769, gemessen: 358.1746;

Elementaranalyse berechnet (%) für $C_{19}H_{23}N_3O_4 \cdot 0.67 (H_2O)$: C 61.78, H 6.64, N 11.37; gemessen: C 61.92, H 6.47, N 11.26.

7.1.2.18 3-[(11aR)-(2S)-(Amino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl]-acrylsäure-*tert.*-butylester 11b



Das Azid **10b** (500 mg, 1.30 mmol) wird zum Amin **11b** entsprechend der Vorschrift für Amin **11a** reduziert

($R_f = 0.24$, Methylenchlorid/Methanol/Ammoniak (konz.) 5/1/0.01).

Ausbeute: 463 mg (1.30 mmol, quantitativ), gelber Feststoff;

m.p.: 158 °C;

[α] $_D^{25}$: -352.5 ($c = 1.0$, Methanol);

1H -NMR (500 MHz, Methanol- d_4):

$\delta = 1.52$ (s, 9 H; $C(CH_3)_3$), 2.04 (m, 1 H; CH_2), 2.93 (m, 1 H; CH_2), 3.53 (dd, $^3J(H,H) = 7.15$ Hz, $^2J = 11.92$ Hz, 1 H; CH_2), 3.76 (m, 1 H; CH), 3.88 (dd, $^3J(H,H) = 6.75$ Hz, $^2J(H,H) = 11.92$ Hz, 1 H; CH_2), 4.34 (dd, $^3J(H,H) = 3.18$ Hz, $^3J = 8.35$ Hz, 1 H; CH), 6.41 (d, $^3J(H,H) = 16.29$ Hz, 1 H; CH=CH), 7.15 (d, $^3J(H,H) = 8.74$ Hz, 1 H; Ar-H), 7.55 (d, $^3J(H,H) = 15.89$ Hz, 1 H; CH=CH), 7.74 (dd, $^4J(H,H) = 1.99$ Hz, $^3J(H,H) = 8.34$, 1 H; Ar-H), 8.03 (d, $^4J(H,H) = 1.99$ Hz, 1 H; Ar-H);

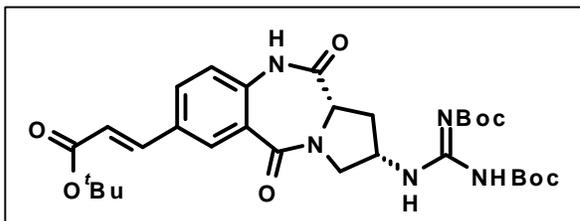
^{13}C -NMR (125 MHz, Methanol- d_4):

$\delta = 28.43$ (CH_3), 34.03 (CH_2), 49.85 (CH), 53.62 (CH_2), 57.25 (CH), 81.82 (C), 121.45 (CH), 123.05 (CH), 127.27 (C), 131.79 (CH), 132.16 (C), 132.58 (CH), 138.66 (C), 142.94 (CH), 167.14 (C), 167.54 (C), 171.38 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, $C_{19}H_{24}N_3O_4$ [$M+H$] $^+$): berechnet (m/z): 358.1769, gemessen: 358.1746;

Elementaranalyse berechnet (%) für $C_{19}H_{23}N_3O_4 \cdot (H_2O)$: C 60.79, H 6.71, N 11.19; gemessen: C 61.92, H 6.47, N 11.26.

7.1.2.19 3-[(11a*S*)-(2*S*)-(N',N''-Bis-(*tert*-butoxycarbonyl)-guanidino-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1*H*-benzo[*e*]-pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-7-yl]-acrylsäure-*tert*-butylester 12a



N,N'-Di-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N''*-trifluormethansulfonyl-guanidin **6**

(285 mg, 0.73 mmol, 1.3 eq.) wird zu einer Lösung von Amin **11a** (200 mg, 0.56 mmol) und Triethylamin (0.08 mL) in Methylenchlorid (5 mL) bei 0 °C

gegeben. Die Lösung wird 1 h bei 0 °C und 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Eluent: Methylenchlorid/Methanol 10/1, $R_f = 0.61$).

Ausbeute: 190 mg (0.32 mmol, 57 %) farbloser Feststoff;

m.p.: 149 °C (Zersetzung);

$[\alpha]_D^{25}$: +194.7 ($c = 1.0$, Methylenchlorid);

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Chloroform- d_1):

$\delta = 1.12$ (s, 9 H; C(CH₃)₃), 1.47 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 1.51 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 2.40 (m, 1 H; CH₂), 2.96 (d, 2J (H,H) = 14.04 Hz, 1 H; CH₂), 3.91 (m, 2 H; CH₂), 4.24 (dd, 3J (H,H) = 1.22 Hz, 3J (H,H) = 8.48 Hz, 1 H; CH), 4.75 (m, 1 H; CH), 6.38 (d, 3J (H,H) = 16.17 Hz, 1 H; CH=CH), 7.23 (d, 3J (H,H) = 8.55 Hz, 1 H; Ar-H), 7.55 (d, 3J (H,H) = 15.87 Hz, 1 H; CH=CH), 7.64 (dd, 3J (H,H) = 8.55 Hz, 4J (H,H) = 1.83 Hz, 1 H; Ar-H), 8.12 (d, 4J (H,H) = 1.83 Hz, 1 H; Ar-H), 8.73 (d, 3J (H,H) = 6.10 Hz, 1 H; NH), 10.62 (br, 1 H; NH), 11.32 (s, 1 H; NH);

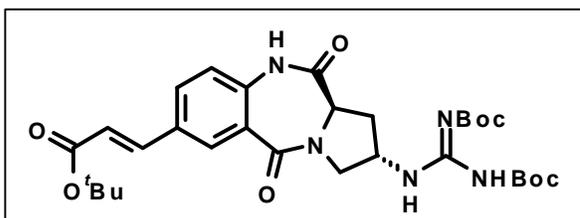
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Chloroform- d_1):

$\delta = 27.38$ (CH₃), 28.15 (CH₃), 28.27 (CH₃), 30.55 (CH₂), 49.18 (CH), 54.72 (CH₂), 56.69 (CH), 79.37 (C), 80.78 (C), 82.88 (C), 121.19 (CH), 122.27 (CH), 126.80 (C), 131.09 (CH), 131.56 (CH), 131.73 (C), 136.49 (C), 141.35 (CH), 152.35 (C), 155.51 (C), 163.16 (C), 165.07 (C), 165.94 (C), 172.20 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₃₀H₄₂N₅O₈ [M+H]⁺): berechnet (m/z): 600.3033, gemessen: 600.3020;

Elementaranalyse berechnet (%) für $C_{30}H_{41}N_5O_8 \cdot (H_2O)$: C 58.33, H 7.02, N 11.34; gemessen: C 58.71, H 6.69, N 11.21.

7.1.2.20 3-[(11aR)-(2S)-(N',N''-Bis-(tert.-butoxycarbonyl)-guanidino-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]-pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl]-acrylsäure-tert.-butylester 12b



Das Amin **11b** (150 mg, 0.42 mmol) wird entsprechend der Vorschrift für **12a** in das di-(tert.-butoxycarbonyl)-geschützte Guanidino-benzodiazepin **12b** überführt (Eluent:

Methylenchlorid/Methanol 10/1 $R_f = 0.63$).

Ausbeute: 161 mg (0.27 mmol, 64 %), farbloser Feststoff;

m.p.: 126 °C (Zersetzung);

[a]_D²⁵: -199.6 (c = 1.0, Methylenchlorid);

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-d₁):

δ = 1.47 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 1.48 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 1.51 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 2.08 (m, 1 H; CH₂), 3.05 (m, 1 H; CH₂), 3.52 (dd, ³J (H,H) = 7.33 Hz, ²J (H,H) = 12.21 Hz, 1 H; CH₂), 4.11 (dd, ³J (H,H) = 6.56 Hz, ²J (H,H) = 12.21 Hz, 1 H; CH₂), 4.20 (dd, ³J (H,H) = 2.75 Hz, ³J (H,H) = 8.24 Hz, 1 H; CH), 4.69 (m, 1 H; CH), 6.33 (d, ³J (H,H) = 16.18 Hz, 1 H; CH=CH), 7.10 (d, ³J (H,H) = 8.24 Hz, 1 H; Ar-H), 7.49 (d, ³J (H,H) = 16.18 Hz, 1 H; CH=CH), 7.60 (dd, ⁴J (H,H) = 2.04 Hz, ³J (H,H) = 8.24 Hz, 1 H; Ar-H), 8.06 (d, ⁴J (H,H) = 2.04 Hz, 1 H; Ar-H), 8.52 (d, ³J (H,H) = 6.72 Hz, 1 H; NH), 9.13 (br, 1 H; NH), 11.46 (s, 1 H; NH);

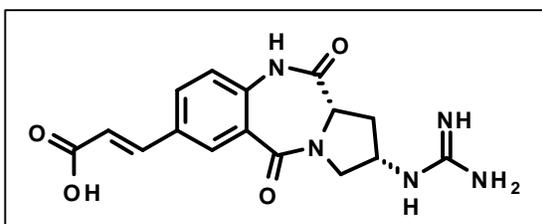
¹³C-NMR (125 MHz, Chloroform-d₁):

δ = 28.03 (CH₃), 28.16 (CH₃), 31.75 (CH₂), 47.96 (CH), 52.10 (CH₂), 55.50 (CH), 79.86 (C), 80.77 (C), 83.63 (C), 121.11 (CH), 121.78 (CH), 126.22 (C), 131.16 (CH), 131.66 (C), 131.70 (CH), 136.21 (C), 141.29 (CH), 153.24 (C), 156.00 (C), 163.14 (C), 165.07 (C), 165.98 (C), 169.87 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, $C_{30}H_{42}N_5O_8$ $[M+H]^+$): berechnet (m/z): 600.3033, gemessen: 600.3055;

Elementaranalyse berechnet (%) für $C_{30}H_{42}N_5O_8 \cdot (H_2O)$: C 58.33, H 7.02, N 11.34; gemessen: C 58.68, H 6.71, N 11.20.

7.1.2.21 3-[(11a*S*)-(2*S*)-Guanidino-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1*H*-benzo[e]-pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-7-yl]-acrylsäure-trifluoracetat **13a**



Verbindung **12a** (65 mg, 0.11 mmol) wird in Methylenchlorid (6 mL) vorgelegt. TFA (1.5 mL) wird langsam zugetropft und die Lösung im Anschluss 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird

das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde mit semipräparativer HPLC (1% B zu 20% B in 10 min, A: H_2O + 0.1 % TFA, B: Acetonitril + 0.1 % TFA) gereinigt.

Ausbeute: 46 mg (0.10 mmol, 92 %), farbloses Öl;

m.p.: 195 °C (Zersetzung);

[α]_D²⁵: +305.2 (c = 0.5, Methanol);

¹H-NMR (500 MHz, Methanol- d_4):

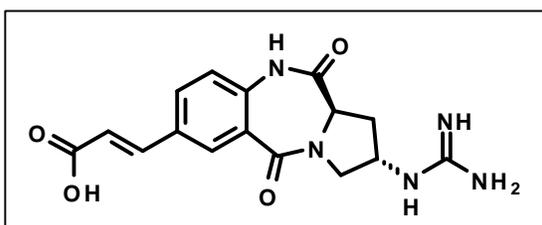
δ = 2.35 (m, 1 H; CH_2), 2.62 (m, 1 H; CH_2), 3.43 (d, 2J (H,H) = 12.36 Hz, 1 H; CH_2), 3.96 (dd, 2J (H,H) = 12.36 Hz, 3J (H,H) = 5.65 Hz, 1 H; CH_2), 4.16 (m, 1 H; CH), 4.29 (dd, 3J (H,H) = 3.53 Hz, 3J (H,H) = 8.83 Hz, 1 H; CH), 6.48 (d, 1 H; 3J = 15.89 Hz, CH=CH), 7.19 (d, 3J (H,H) = 8.47 Hz, 1 H; Ar-H), 7.55 (d, 3J (H,H) = 15.89 Hz, 1 H; CH=CH), 7.79 (br, 1H; NH), 7.89 (dd, 4J (H,H) = 1.77 Hz, 3J (H,H) = 8.48 Hz, 1 H; Ar-H), 7.97 (d, 4J (H,H) = 1.77 Hz, 1 H; Ar-H) 10.79 (br, 1H; NH);

¹³C-NMR (125 MHz, Methanol- d_4):

δ = 32.18 (CH_2), 51.13 (CH), 54.11 (CH_2), 57.72 (CH), 120.38 (CH), 123.41 (CH), 127.48 (C), 132.02 (CH), 132.49 (C), 132.95 (CH), 138.98 (C), 144.08 (CH), 158.04 (C), 167.43 (C), 170.04 (C), 172.14 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, $C_{16}H_{18}N_5O_4$ $[M+H]^+$): berechnet (m/z): 344.1359, gemessen: 344.1343.

7.1.2.22 3-[(11a*R*)-(2*S*)-Guanidino-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1*H*-benzo[e]-pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-7-yl]-acrylsäure-trifluoracetat 13b



Die Schutzgruppen der Verbindung **12b** (150 mg, 0.25 mmol) werden entsprechend der Vorschrift für **13a** entfernt.

Ausbeute: 99 mg (0.22 mmol, 88 %);

m.p.: 176 °C (Zersetzung);

[a]_D²⁵: -224.9 (c = 1.0, Methanol);

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄):

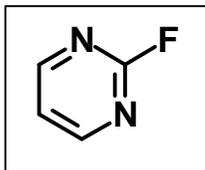
δ = 2.40 (m, 1 H; CH₂), 3.19 (m, 1 H; CH₂), 3.80 (dd, ³*J* (H,H) = 6.71 Hz, ²*J* (H,H) = 11.91 Hz, 1 H; CH₂), 4.20 (dd, ³*J* (H,H) = 6.41 Hz, ²*J* (H,H) = 11.91 Hz, 1 H; CH₂), 4.49 (m, 1 H; CH), 4.61 (m, 1 H; CH), 6.71 (d, ³*J* (H,H) = 16.17 Hz, 1 H; CH=CH), 7.39 (d, ³*J* (H,H) = 8.54 Hz, 1 H; Ar-H), 7.88 (d, ³*J* (H,H) = 15.87 Hz, 1 H; CH=CH), 8.02 (dd, ⁴*J* (H,H) = 2.13 Hz, ³*J* (H,H) = 8.54 Hz, 1 H; Ar-H), 8.27 (d, ⁴*J* (H,H) = 2.14 Hz, 1 H; Ar-H);

¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-*d*₄):

δ = 32.67 (CH₂), 50.45 (CH), 52.21 (CH₂), 56.91 (CH), 120.26 (CH), 123.34 (CH), 127.31 (C), 132.00 (CH), 132.50 (C), 132.97 (CH), 138.91 (C), 144.18 (CH), 158.50 (C), 167.34 (C), 169.97 (C), 171.43 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, $C_{16}H_{18}N_5O_4$ $[M+H]^+$): berechnet (m/z): 344.1359, gemessen: 344.1344.

7.1.2.23 Fluoropyrimidin 14



Das Aminopyrimidin (2.50 g, 26 mmol) wird in 50 %iger HBF_4 -Lösung (80 mL) vorgelegt und auf -10 bis -15 °C gekühlt. Unter Rühren gibt man innerhalb von 30 min das in Wasser (15 mL) gelöste NaNO_2 (3.80 g, 55 mmol) hinzu. Anschließend wird mit 10 M NaOH-Lösung ein pH-Wert von 6 - 7 eingestellt. Man lässt die Reaktionsmischung 20 min rühren und extrahiert danach mit Diethylether (4×50 mL). Die vereinten organischen Phasen werden mit 2 %iger K_2CO_3 -Lösung (10 mL) und Wasser (20 mL) gewaschen. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt durch Destillation gereinigt (bp.: 55 °C, 34 mbar).

Ausbeute: 1.10 g (11 mmol, 43 %), farblose Nadeln;

m.p.: 25 °C;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Chloroform- d_1):

$\delta = 7.26$ (dd, $^3J(\text{H,H}) = 4.58$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 4.58$ Hz, 1 H; Ar-H), 8.61 (dd, $^4J(\text{H,H}) = 1.83$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 4.88$ Hz, 2 H; Ar-H);

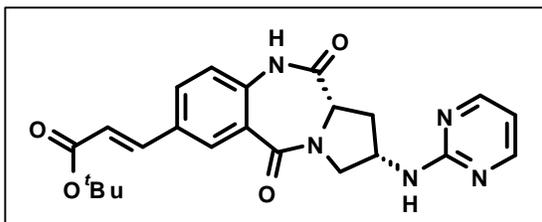
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Chloroform- d_1):

$\delta = 120.01$ (d, $^4J(\text{C,F}) = 4.66$ Hz, CH), 161.61 (d, $^3J(\text{C,F}) = 11.72$ Hz, CH), 163.47 (d, $^2J(\text{C,F}) = 219.4$ Hz, C);

MS (20 °C): m/z (%) = 98 (M^+ , 100), 71 (23), 58 (41), 43 (99);

HRMS (EI, 70 eV, $\text{C}_4\text{H}_3\text{FN}_2$ [M] $^+$): berechnet (m/z): 98.0280, gemessen: 98.0281.

7.1.2.24 3-[(11a*S*)-5,11-Dioxo-(2*S*)-(pyrimidin-2-ylamino)-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1*H*-benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-7-yl]-acrylsäure-*tert.*-butylester **15a**



Das Amin **11a** (180 mg, 0.50 mmol) und 2-Fluoropyrimidin **14** (200 mg, 2.0 mmol) werden in *N,N*-Dimethylformamid (5 mL) vorgelegt. Nach Zugabe von Diisopropylethylamin (0.36 mL, 2.0 mmol)

wird die Reaktionslösung 24 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in Wasser (150 mL) gegeben. Nach Extraktion mit Methylenchlorid (3 × 50 mL) wird die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet. Danach wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Eluent: Methylenchlorid/Methanol 10/1, R_f = 0.41).

Ausbeute: 158 mg (0.36 mmol, 72 %), farbloser Feststoff;

m.p.: 175 °C;

[α]_D²⁵: +304.1 (c = 1.0, Methylenchlorid);

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*₁):

δ = 1.48 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.39 (m, 1 H; CH₂), 2.86 (m, 1 H; CH₂), 3.82 (dd, ³J(H,H) = 4.75 Hz, ²J(H,H) = 12.72 Hz, 1 H; CH₂), 3.90 (d, ²J(H,H) = 12.81 Hz, 1 H; CH₂), 4.19 (d, ³J(H,H) = 8.46 Hz, 1 H; CH), 4.58 (m, 1 H; CH), 6.28 (d, ³J(H,H) = 15.89 Hz, 1 H; CH=CH), 6.37 (d, ³J(H,H) = 5.97 Hz, 1 H; NH), 6.51 (dd, ³J(H,H) = 4.76 Hz, ³J(H,H) = 4.76 Hz, 1 H; Ar-H), 7.00 (d, ³J(H,H) = 8.74 Hz, 1 H; Ar-H), 7.44 (d, ³J(H,H) = 15.89 Hz, 1 H, CH=CH), 7.53 (dd, ⁴J(H,H) = 1.99 Hz, ³J(H,H) = 8.34 Hz, 1 H; Ar-H), 7.99 (s, 1 H; NH), 8.00 (d, ⁴J(H,H) = 1.98 Hz, 1 H; Ar-H), 8.25 (d, ³J(H,H) = 4.77 Hz, 2 H; Ar-H), 10.08 (s, 1 H; NH);

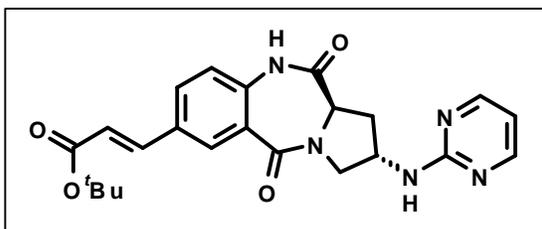
¹³C-NMR (125 MHz, Chloroform-*d*₁):

δ = 28.12 (CH₃), 31.11 (CH₂), 49.55 (CH), 54.51 (CH₂), 56.91 (CH), 80.62 (C), 110.86 (CH), 120.91 (CH), 121.90 (CH), 126.94 (C), 131.06 (CH), 131.39 (CH), 136.49 (C), 141.31 (CH), 157.91 (C), 161.01 (C), 162.59 (C), 165.51 (C), 165.89 (C), 170.73 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, $C_{23}H_{26}N_5O_4$ $[M+H]^+$): berechnet (m/z): 436.1984, gemessen: 436.1995;

Elementaranalyse berechnet (%) für $C_{23}H_{25}N_5O_4$: C 63.44, H 5.79, N 16.08; gemessen: C 63.16, H 5.82, N 16.10.

7.1.2.25 3-[(11aR)-5,11-Dioxo-(2S)-(pyrimidin-2-ylamino)-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl]-acrylsäure-tert.-butylester 15b



Das Amin **11b** (130 mg, 0.36 mmol) wird entsprechend der Vorschrift für **15a** in das Derivat **15b** überführt.

Ausbeute: 117 mg (0.27 mmol, 74 %), farbloser Feststoff;

m.p.: 181 °C;

$[\alpha]_D^{25}$: -281.8 ($c = 0.5$, Methylenchloridl);

1H -NMR (500 MHz, Chloroform- d_1):

$\delta = 1.51$ (s, 9 H, $C(CH_3)_3$), 2.12 (m, 1 H; CH_2), 2.95 (m, 1 H; CH_2), 3.65 (dd, $^3J(H,H) = 6.56$ Hz, $^2J(H,H) = 12.12$ Hz, 1 H; CH_2), 4.06 (dd, $^3J(H,H) = 6.36$ Hz, $^2J(H,H) = 11.92$ Hz, 1 H; CH_2), 4.30 (dd, $^3J(H,H) = 3.97$ Hz, $^3J(H,H) = 8.34$ Hz, 1 H; CH), 4.66 (m, 1 H; CH), 6.02 (d, $^3J(H,H) = 6.76$ Hz, 1 H; NH), 6.36 (d, $^3J(H,H) = 15.89$ Hz, 1 H; CH=CH), 6.58 (dd, $^3J(H,H) = 4.88$ Hz, $^3J(H,H) = 4.88$ Hz, 1 H; Ar-H), 7.00 (d, $^3J(H,H) = 8.34$ Hz, 1 H; Ar-H), 7.53 (d, $^3J(H,H) = 15.87$ Hz, 1 H; CH=CH), 7.60 (dd, $^4J(H,H) = 1.99$ Hz, $^3J(H,H) = 8.34$ Hz, 1 H; Ar-H), 8.11 (d, $^4J(H,H) = 1.99$ Hz, 1 H; Ar-H), 8.20 (d, $^3J(H,H) = 4.77$ Hz, 2 H; Ar-H), 9.56 (br, 1 H; NH);

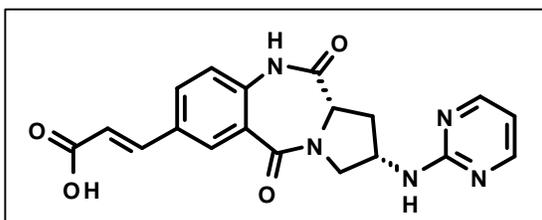
^{13}C -NMR (125 MHz, Chloroform- d_1):

$\delta = 28.16$ (CH_3), 31.95 (CH_2), 49.06 (CH), 52.33 (CH_2), 55.60 (CH), 80.80 (C), 111.34 (CH), 121.25 (CH), 121.60 (CH), 126.84 (C), 131.28 (CH), 131.45 (CH),

131.81 (C), 136.22 (C), 141.28 (CH), 158.07 (CH), 161.69 (C), 165.15 (C), 165.93 (C), 170.66(C);

HRMS (FAB, 70 eV, $C_{23}H_{26}N_5O_4$ $[M+H]^+$): berechnet (m/z): 436.1984, gemessen: 436.1964.

7.1.2.26 3-[(11a*S*)-5,11-Dioxo-(2*S*)-(pyrimidin-2-ylamino)-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1*H*-benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-7-yl]-acrylsäuretrifluoracetat 16a



Verbindung **15a** (100 mg, 0.23 mmol) wird in Methylenchlorid (5 mL) vorgelegt. Nach Zugabe von TFA (0.5 mL) wird die Reaktionslösung bis zur vollständigen Esterspaltung bei Raumtemperatur

gerührt. Danach wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird durch Waschen mit Diethylether gereinigt.

Ausbeute: quantitativ, hellgelber Feststoff;

m.p.: 133 °C (Zersetzung);

[α]_D²⁵: +364.0 (c = 0.5, DMSO);

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆):

δ = 2.38 (m, 1 H; CH₂), 2.62 (m, 1 H; CH₂), 3.40 (dd, ³*J*(H,H) = 4.38 Hz, ²*J*(H,H) = 11.93 Hz, 1 H; CH₂), 3.99 (dd, ³*J*(H,H) = 5.56 Hz, ²*J*(H,H) = 11.92 Hz, 1 H; CH₂), 4.32 (dd, ³*J*(H,H) = 3.97 Hz, ³*J*(H,H) = 8.34 Hz, 1 H; CH), 4.39 (m, 1 H; CH), 6.50 (d, ³*J*(H,H) = 15.89 Hz, 1 H; CH=CH), 6.66 (dd, ³*J*(H,H) = 4.76 Hz, ³*J*(H,H) = 4.76 Hz, 1 H; Ar-H), 7.00 (br, 1 H; NH), 7.18 (d, ³*J*(H,H) = 8.75 Hz, 1 H; Ar-H), 7.60 (d, ³*J*(H,H) = 15.89 Hz, 1 H, CH=CH), 7.89 (dd, ⁴*J*(H,H) = 1.99 Hz, ³*J*(H,H) = 8.35 Hz, 1 H; Ar-H), 8.00 (d, ⁴*J*(H,H) = 1.98 Hz, 1 H; Ar-H), 8.31 (d, ³*J*(H,H) = 4.45 Hz, 2 H; Ar-H), 10.84 (s, 1 H; NH);

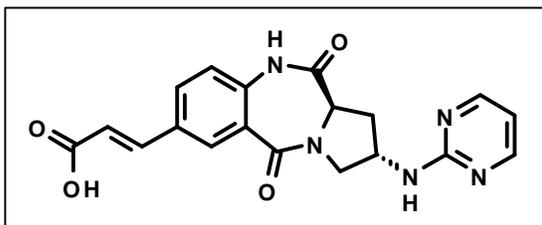
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆):

δ = 30.88 (CH₂), 49.13 (CH), 52.50 (CH₂), 56.13 (CH), 110.96 (CH), 119.41 (CH), 122.21 (CH), 126.35 (C), 130.27 (C), 131.17 (CH), 131.31 (CH), 137.66 (C), 142.65 (CH), 158.21 (CH), 161.13 (C), 164.76 (C), 167.66 (C), 171.06 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₁₉H₁₈N₅O₄ [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 380.1358, gemessen: 380.1341;

Elementaranalyse berechnet (%) für C₁₉H₁₇N₅O₄·2(TFA): C 46.24, H 3.72; gemessen: C 46.91, H 3.22.

7.1.2.27 3-[(11a*R*)-5,11-Dioxo-(2*S*)-(pyrimidin-2-ylamino)-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1*H*-benzo[*e*]-pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-7-yl]-acrylsäure-trifluoracetat 16b



Die Schutzgruppen der Verbindung **15b** (110 mg, 0.25 mmol) werden mit TFA entsprechend der Vorschrift für **16a** entfernt.

Ausbeute: quantitativ, hellgelber Feststoff;

[a]_D²⁵: -325.2 (c = 0.5, DMSO);

m.p.: 124 °C (Zersetzung);

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆):

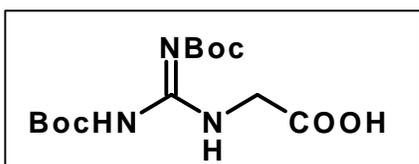
δ = 2.07 (m, 1 H; CH₂), 2.81 (m, 1 H; CH₂), 3.55 (dd, ³J (H,H) = 6.41 Hz, ²J (H,H) = 11.90 Hz, 1 H; CH₂), 3.79 (dd, ³J (H,H) = 6.26 Hz, ²J (H,H) = 11.60 Hz, 1 H; CH₂), 4.41 (dd, ³J (H,H) = 3.81 Hz, ³J (H,H) = 7.93 Hz, 1 H; CH), 4.50 (m, 1 H; CH), 6.51 (d, ³J (H,H) = 16.18 Hz, 1 H; CH=CH), 6.68 (dd, ³J (H,H) = 4.74 Hz, ³J (H,H) = 4.74 Hz, 1 H; Ar-H), 7.17 (d, ³J (H,H) = 8.54 Hz, 1 H; Ar-H), 7.61 (d, ³J (H,H) = 16.17 Hz, 1 H; CH=CH), 7.90 (dd, ⁴J (H,H) = 1.94 Hz, ³J (H,H) = 8.55 Hz, 1 H; Ar-H), 7.94 (br, 1 H; NH), 8.00 (d, ⁴J (H,H) = 2.13 Hz, 1 H; Ar-H), 8.36 (d, ³J (H,H) = 4.58 Hz, 2 H; Ar-H), 10.77 (s, 1 H; NH);

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆):

δ = 31.16 (CH₂), 48.55 (CH), 51.37 (CH₂), 55.43 (CH), 110.58 (CH), 119.21 (CH), 120.93 (CH), 121.91 (CH), 126.18 (C), 130.00 (C), 131.07 (CH), 137.65 (C), 142.48 (CH), 157.98 (CH), 161.03 (C), 164.46 (C), 167.48 (C), 170.28 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₁₉H₁₈N₅O₄ [M+H]⁺): berechnet (m/z): 380.1358, gemessen: 380.1362.

7.1.2.28 2-(Bis-*tert.*-butoxycarbonyl-guanidino)-essigsäure 17



1,3-Bis-(*tert.*-butoxycarbonyl)-2-methyl-2-thioharnstoff (3.0 g, 10.3 mmol, 0.95 eq.) und Triton B (4.8 mL, 10 mmol, 40 %ige methanolische Lösung) werden unter Rühren zu einer Lösung von Glycin (816 mg, 10.9 mmol) in Dimethylsulfoxid (10 mL) gegeben. Nachdem 3 d bei Raumtemperatur gerührt wurde, gibt man 5 %ige Zitronensäure (200 mL) zu der Reaktionsmischung und extrahiert danach die wässrige Phase mit Essigester (4 × 50 mL). Die vereinten organischen Phasen werden mit gesättigter NaCl-Lösung und Wasser gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt.

Ausbeute: 2.38 g (7.5 mmol, 69 %), farbloser Feststoff;

m.p.: 140 °C (Zersetzung);

¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-d₁):

δ = 1.47 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 1.49 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 4.18 (s, 2 H; CH₂), 8.92 (br, 1 H; NH), 9.80 (br, 1 H; NH), 11.35 (br, 1 H; NH);

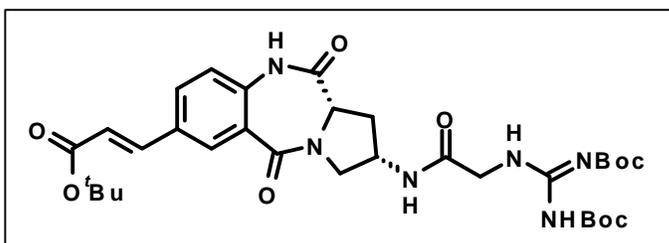
¹³C-NMR (100 MHz, Chloroform-d₁):

δ = 27.97 (CH₃), 28.07 (CH₃), 44.05 (CH₂), 80.94 (C), 84.27 (C), 152.62 (C), 156.38 (C), 161.28 (C), 171.17 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₁₃H₂₄N₃O₆ [M+H]⁺): berechnet (m/z): 318.1665, gemessen: 318.1651;

Elementaranalyse berechnet (%) für $C_{13}H_{23}N_3O_6$: C 49.20, H 7.31, N 13.24; gemessen: C 49.21, H 7.24, N 13.24.

7.1.2.29 3-[(11a*S*)-(2*S*)-(2-(*N,N'*-Di-*tert*-butoxycarbonyl)-guanidino)-acetylamino]-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1*H*-benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-7-yl]-acrylsäure-*tert*-butylester 18a



Das Amin **11a** (150 mg, 0.42 mmol) und 2-(Bis-*tert*-butoxycarbonyl-guanidino)-essigsäure **17** (160 mg, 0.50 mmol) werden in Methylenchlorid (10 mL)

vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Unter Rühren werden EDC (116 mg, 60 mmol) und Triethylamin (0.11 mL, 0.79 mmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wird 1 h bei 0 °C und 14 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Essigester aufgenommen. Die organische Phase wird mit Wasser, 5 %iger Zitronensäure und gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen und danach über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und der ölige Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Eluent: Methylenchlorid/Methanol 10/1, $R_f = 0.51$).

Ausbeute: 204 mg (0.31 mmol, 74 %), farbloser Feststoff;

m.p.: 145 °C (Zersetzung);

[α]_D²⁵: +240.2 (c = 1.0, Methylenchlorid);

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*₁):

$\delta = 1.36$ (s, 9 H; C(CH₃)₃), 1.48 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 1.50 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 2.34 (m, 1 H; CH₂), 2.72 (d, ²*J*(H,H) = 14.30 Hz, 1 H; CH₂), 3.76 (dd, ³*J*(H,H) = 5.17 Hz, ²*J*(H,H) = 13.12 Hz, 1 H; CH₂), 3.94-4.00 (m, 1 H; CH₂, 1 H; CH₂), 4.09 (dd, ³*J*(H,H) = 4.17 Hz, ²*J*(H,H) = 17.29 Hz, 1 H; CH₂), 4.19 (d, ³*J*(H,H) = 8.74 Hz, 1 H; CH), 4.53 (m, 1 H; CH), 6.37 (d, ³*J*(H,H) = 15.89 Hz, 1 H; CH=CH), 7.12 (d, ³*J*(H,H) = 8.35 Hz, 1 H; Ar-H), 7.27 (d, ³*J*(H,H) = 5.96 Hz, 1 H; NH), 7.53 (d, ³*J*(H,H) = 15.89 Hz, 1 H; CH=CH), 7.60 (dd, ⁴*J*(H,H) = 1.99 Hz, ³*J*(H,H) = 8.35 Hz, 1 H; Ar-H), 8.09 (d, ⁴*J*(H,H) = 1.99 Hz, 1 H; Ar-H), 9.10 (s, 1 H; NH), 9.52 (s, 1 H; NH), 11.37 (s, 1 H; NH);

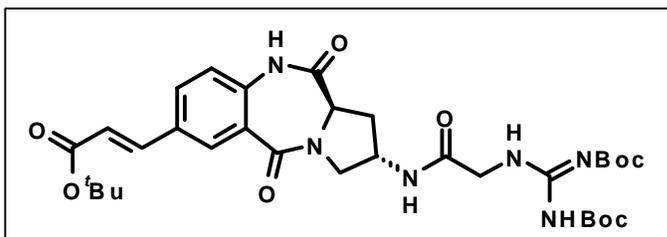
¹³C-NMR (125 MHz, Chloroform-d₁):

δ = 27.99 (CH₃), 28.07 (CH₃), 28.14 (CH₃), 30.72 (CH₂), 44.36 (CH₂), 48.51 (CH), 54.23 (CH₂), 56.72 (CH), 79.65 (C), 80.78 (C), 83.37 (C), 121.25 (CH), 122.38 (CH), 127.25 (C), 130.98 (CH), 131.44 (CH), 131.78 (C), 136.55 (C), 141.33 (CH), 152.68 (C), 155.83 (C), 162.93 (C), 165.19 (C), 165.95 (C), 167.64 (C), 170.77 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₃₂H₄₅N₆O₉ [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 657.3248, gemessen: 657.3232;

Elementaranalyse berechnet (%) für C₃₂H₄₄N₆O₉·2(H₂O): C 55.48, H 6.98, N 12.13; gemessen: C 54.63, H 6.23, N 12.23.

7.1.2.30 3-[(11aR)-(2S)-(2-(N',N''-Di-*tert*-butoxycarbonyl)-guanidino-acetylamino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl]-acrylsäure-*tert*-butylester 18b



Das Amin **11b** (200 mg, 0.56 mmol) wird in das di-*tert*-butoxycarbonyl-geschützte Guanidin **18b** entsprechend der Vorschrift für **18a** überführt.

Ausbeute: 246 mg (0.37 mmol, 67 %), farbloser Feststoff;

m.p.: 144 °C (Zersetzung);

[a]_D²⁵: -216.0 (c = 1.0, Methylenchlorid);

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-d₁):

δ = 1.42 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 1.46 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 1.49 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 2.12 (m, 1 H; CH₂), 3.00 (m, 1 H; CH₂), 3.62 (dd, ³J (H,H) = 6.41 Hz, ²J (H,H) = 12.21 Hz, 1 H; CH₂), 3.79 - 3.89 (m, 2 H; CH₂, 1 H; CH₂), 4.25 (dd, ³J (H,H) = 3.80 Hz, ³J (H,H) = 8.08 Hz, 1 H; CH), 4.49 (m, 1 H; CH), 6.33 (d, ³J (H,H) = 16.18 Hz, 1 H; CH=CH), 7.10 (d, ³J (H,H) = 8.56 Hz, 1 H; Ar-H), 7.50 (d, ³J (H,H) = 16.18 Hz, 1 H; CH=CH), 7.59 (dd, ⁴J (H,H) = 2.14 Hz, ³J (H,H) = 8.92 Hz, 1 H; Ar-H), 7.63 (d, ³J (H,H) = 6.71 Hz, 1 H; NH), 8.01 (d, ⁴J (H,H) = 2.14 Hz, 1 H; Ar-H), 8.92 (br, 1 H; NH), 9.40 (s, 1 H; NH), 11.27 (s, 1 H; NH);

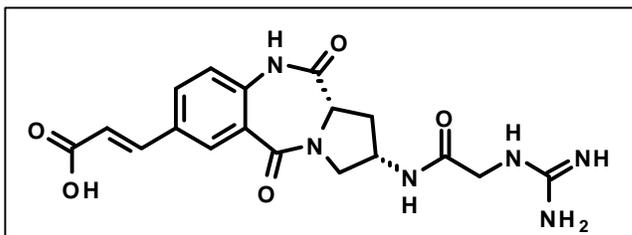
¹³C-NMR (125 MHz, Chloroform-d₁):

δ = 27.95 (CH₃), 28.12 (CH₃), 31.65 (CH₂), 44.73 (CH₂), 47.62 (CH), 51.54 (CH₂), 55.61 (CH), 80.26 (C), 80.75 (C), 83.85 (C), 121.10 (CH), 122.02 (CH), 126.50 (C), 130.98 (CH), 131.47 (CH), 131.58 (C), 136.42 (C), 141.32 (CH), 152.53 (C), 155.98 (C), 161.97 (C), 165.19 (C), 165.93 (C), 168.34 (C), 170.00 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₃₂H₄₅N₆O₉ [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 657.3248, gemessen: 657.3259;

Elementaranalyse berechnet (%) für C₃₂H₄₄N₆O₉·2(H₂O): C 55.48, H 6.98, N 12.13; gemessen: C 54.98, H 6.87, N 12.54.

7.1.2.31 3-[(11a*S*)-(2*S*)-(2-Guanidino-acetyl-amino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1*H*-benzo[e]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-7-yl]-acrylsäure-trifluoracetat 19a



Verbindung **18a** (150 mg, 0.23 mmol) wird in Methylenchlorid (5 mL) vorgelegt. TFA (0.7 mL) wird unter Rühren zugetropft. Danach wird die Reaktionslösung bis zur vollständigen Abspaltung der

Schutzgruppen (3 h) bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird durch Waschen mit Diethylether gereinigt.

Ausbeute: quantitativ, hellgelber Feststoff;

m.p.: 163 °C (Zersetzung);

[α]_D²⁵: +265.0 (c = 0.5, Methanol);

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄):

δ = 2.41 (m, 1 H; CH₂), 2.82 (dd, ³J (H,H) = 1.59 Hz, ²J (H,H) = 13.91 Hz, 1 H; CH₂), 3.74 (d, ²J (H,H) = 12.72 Hz, 1 H; CH₂), 3.89 (dd, ³J (H,H) = 5.56 Hz, ²J (H,H) = 13.11 Hz, 1 H; CH₂), 3.91 (d, ³J (H,H) = 3.58 Hz, 2 H; CH₂), 4.36 (dd, ³J (H,H) = 1.59 Hz, ³J (H,H) = 8.74 Hz, 1 H; CH), 4.46 (m, 1 H; CH), 6.52 (d,

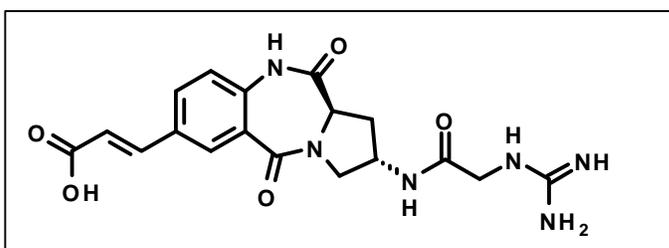
3J (H,H) = 15.89 Hz, 1 H; CH=CH), 7.21 (d, 3J (H,H) = 8.34 Hz, 1 H; Ar-H), 7.68 (d, 3J (H,H) = 15.90 Hz, 1 H, CH=CH), 7.83 (dd, 4J (H,H) = 1.99 Hz, 3J (H,H) = 8.35 Hz, 1 H; Ar-H), 8.10 (d, 4J (H,H) = 1.98 Hz, 1 H; Ar-H);

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Methanol- d_4):

δ = 1.79 (CH₂), 44.88 (CH₂), 49.80 (CH), 53.92 (CH₂), 57.86 (CH), 120.31 (CH), 123.35 (CH), 127.69 (C), 132.02 (CH), 132.53 (CH), 132.92 (C), 138.98 (C), 144.20 (CH), 159.45 (C), 167.45 (C), 169.54 (C), 169.97 (C), 172.55 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₁₈H₂₁N₆O₅ [M+H]⁺): berechnet (m/z): 401.1573, gemessen: 401.1590.

7.1.2.32 3-[(11aR)-(2S)-(2-Guanidino-acetyl-amino)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-7-yl]-acrylsäure-trifluoracetat 19b



Die Schutzgruppen der Verbindung **18b** (100 mg, 0.15 mmol) werden entsprechend der Vorschrift für Verbindung **19a** entfernt.

Ausbeute: quantitativ, hellgelber Feststoff;

m.p.: 168 °C (Zersetzung);

[a]_D²⁵: -255.6 (c = 0.5, Methanol);

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Methanol- d_4):

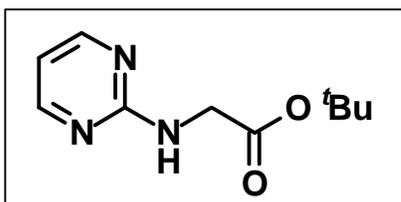
δ = 2.14 (m, 1 H; CH₂), 2.95 (m, 1 H; CH₂), 3.56 (dd, 3J (H,H) = 7.15 Hz, 2J (H,H) = 11.92 Hz, 1 H; CH₂), 3.94 (m, 2 H; CH₂, 1 H; CH₂), 4.37 (dd, 3J (H,H) = 3.17 Hz, 3J (H,H) = 8.30 Hz, 1 H; CH), 4.55 (m, 1 H; CH), 6.51 (d, 3J (H,H) = 16.12 Hz, 1 H; CH=CH), 7.18 (d, 3J (H,H) = 8.54 Hz, 1 H; Ar-H), 7.68 (d, 3J (H,H) = 16.11 Hz, 1 H; CH=CH), 7.82 (dd, 4J (H,H) = 2.07 Hz, 3J (H,H) = 8.42 Hz, 1 H; Ar-H), 8.07 (d, 4J (H,H) = 2.20 Hz, 1 H; Ar-H);

¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-d₄):

δ = 2.22 (CH₂), 44.62 (CH₂), 49.27 (CH), 52.36 (CH₂), 57.15 (CH), 120.21 (CH), 123.30 (CH), 127.46 (C), 131.94 (CH), 132.40 (C), 132.91 (CH), 139.10 (C), 144.23 (CH), 159.48 (C), 167.41 (C), 169.62 (C), 169.97 (C), 171.53 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₁₈H₂₁N₆O₅ [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 401.1573, gemessen: 401.1602.

7.1.2.33 (Pyrimidin-2-ylamino)-essigsäure-*tert*-butylester 20



2-Fluoropyrimidin **14** (200 mg, 2.04 mmol) und Diisopropylethylamin (0.71 mL, 4.08 mmol) werden zu einer Lösung von Glycin-*tert*-butylesterhydrochlorid (171 mg, 1.02 mmol) in *N,N*-Dimethylformamid (6 mL) gegeben. Die

Reaktionslösung wird 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von Wasser (50 mL) wird mit Methylenechlorid (3 × 20 mL) extrahiert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Eluent: Methylenechlorid/Methanol 10/1, R_f = 0.48).

Ausbeute: 145 mg (0.69 mmol, 68 %), farbloser Feststoff;

m.p.: 96 °C;

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-d₁):

δ = 1.42 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 4.04 (d, ³J (H,H) = 5.49 Hz, 2 H; CH₂), 5.84 (br, 1 H; NH), 6.52 (dd, ³J (H,H) = 4.73 Hz, ³J (H,H) = 4.73 Hz, 1 H; Ar-H), 8.25 (d, ³J (H,H) = 4.57 Hz, 2 H; Ar-H);

¹³C-NMR (125 MHz, Chloroform-d₁):

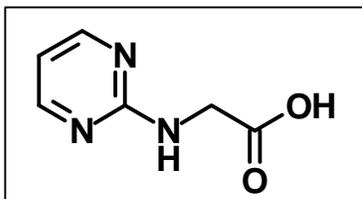
δ = 28.06 (CH₃), 44.18 (CH₂), 81.86 (C), 111.20 (CH), 157.85 (C), 161.54 (CH), 169.53 (C);

MS (35 °C): *m/z* (%) = 209 (M⁺, 11), 108 (100), 57 (33);

HRMS (EI, 70 eV, $C_{10}H_{15}N_3O_2$ $[M]^+$): berechnet (m/z): 209.1164, gemessen: 209.1169.

7.1.2.34 (Pyrimidin-2-ylamino)-essigsäure-trifluoracetat **21**

(Pyrimidin-2-ylamino)-essigsäure-*tert.*-butylester **20** (100 mg, 0.48 mmol) wird in TFA (10 %ig in Methylenchlorid, 5 mL) gelöst und bis zur vollständigen Spaltung des Esters (4 h) bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.



Ausbeute: quantitativ, farbloser Feststoff;

m.p.: 130 °C (Zersetzung);

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Methanol- d_4):

δ = 4.14 (s, 2 H; CH_2), 6.85 (dd, $^3J(\text{H,H}) = 5.19$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 5.19$ Hz, 1 H; Ar-H), 8.43 (br, 2 H; Ar-H);

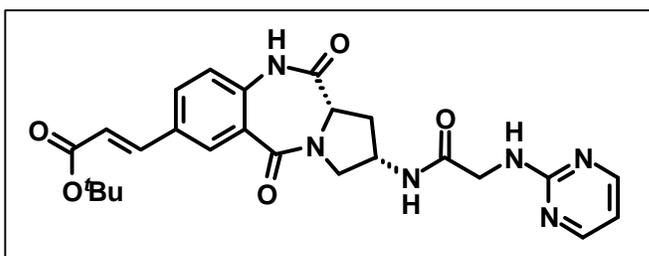
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Methanol- d_4):

δ = 42.22 (CH_2), 110.50 (CH), 158.77 (C), 171.73 (C);

MS (80 °C): m/z (%) = 153 (M^+ , 2), 108 (50), 45 (100);

HRMS (EI, 70 eV, $C_6H_7N_3O_2$ $[M]^+$): berechnet (m/z): 153.0538, gemessen: 153.0551.

7.1.2.35 3-[(11a*S*)-5,11-Dioxo-(2*S*)-[2-(pyrimidin-2-ylamino)-acetylamino]-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1*H*-benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-7-yl]-acrylsäure-*tert.*-butylester **22**



Das Amin **11a** (195 mg, 0.55 mmol) und (Pyrimidin-2-ylamino)-essigsäure-trifluoracetat **21** (145 mg, 0.55 mmol) werden in Methylenchlorid (10 mL) vorgelegt

und auf 0 °C gekühlt. Unter Rühren werden EDC (126 mg, 0.66 mmol) und Triethylamin (0.12 mL, 0.82 mmol) zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 1 h bei 0 °C und 14 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Essigester aufgenommen, die organische Phase nacheinander mit Wasser, 5 %iger Zitronensäure, gesättigter NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Eluent: Methylenchlorid/Methanol 10/1, R_f = 0.36).

Ausbeute: 99 mg (0.20 mmol, 37 %), farbloser Feststoff;

m.p.: 202 °C (Zersetzung);

[α]_D²⁵: +366.4 (c = 0.5, DMSO);

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-d₁):

δ = 1.40 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 2.22 (m, 1 H; CH₂), 2.59 (d, ²J(H,H) = 14.30 Hz, 1 H; CH₂), 3.63 (dd, ³J(H,H) = 4.96 Hz, ²J(H,H) = 12.92 Hz, 1 H; CH₂), 3.76 (d, ²J(H,H) = 12.71 Hz, 1 H; CH₂), 3.85 (d, ²J(H,H) = 17.09 Hz, 1 H; CH₂), 3.95 (d, ²J(H,H) = 17.09 Hz, 1 H; CH₂), 4.03 (d, ³J(H,H) = 8.35 Hz, 1 H; CH), 4.41 (m, 1 H; CH), 6.27 (d, ³J(H,H) = 15.89 Hz, 1 H; CH=CH), 6.43 (dd, ³J(H,H) = 4.97 Hz, ³J(H,H) = 4.97 Hz, 1 H; Ar-H), 6.93 (d, ³J(H,H) = 8.34 Hz, 1 H; Ar-H), 7.43 (d, ³J(H,H) = 15.89 Hz, 1 H; CH=CH), 7.51 (dd, ⁴J(H,H) = 1.99 Hz, ³J(H,H) = 8.35 Hz, 1 H; Ar-H), 7.63 (d, ³J(H,H) = 6.76 Hz, 1 H; NH), 7.95 (d, ⁴J(H,H) = 2.38 Hz, 1 H; Ar-H), 8.12 (d, ³J(H,H) = 4.76 Hz, 2 H; Ar-H);

¹³C-NMR (125 MHz, Chloroform-d₁):

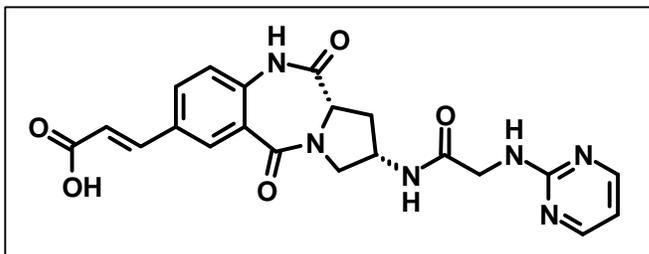
δ = 28.09 (CH₃), 30.50 (CH₂), 45.35 (CH₂), 48.17 (CH), 54.17 (CH₂), 56.67 (CH), 81.19 (C), 111.56 (CH), 121.15 (CH), 121.98 (CH), 126.79 (C), 131.01 (CH), 131.67 (C), 131.69 (CH), 136.68 (C), 141.61 (CH), 158.06 (CH), 161.44 (C), 165.42 (C), 166.42 (C), 170.88 (C), 171.18 (C);

MS (220 °C): *m/z* (%) = 492 (M⁺, 1), 255 (25), 254 (100);

HRMS (EI, 70 eV, C₂₅H₂₈N₆O₅ [M]⁺): berechnet (*m/z*): 492.2121, gemessen: 492.2117;

Elementaranalyse berechnet (%) für $C_{25}H_{28}N_6O_5 \cdot (H_2O)$: C 58.81, H 5.92; gemessen: C 59.04, H 5.51.

7.1.2.36 3-[(11a*S*)-5,11-Dioxo-(2*S*)-[2-(pyrimidin-2-ylamino)-acetylamino]-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1*H*-benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-7-yl]-acrylsäure-trifluoracetat 23



Verbindung **22** (35 mg, 0.07 mmol) wird in TFA (10 %ig in CH_2Cl_2 , 5 mL) bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Spaltung des Esters (6 h) gerührt. Danach wird das

Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird durch Waschen mit Diethylether gereinigt.

Ausbeute: quantitativ, hellgelber Feststoff;

m.p.: 158 °C (Zersetzung);

[α]_D²⁵: +365.0 (c = 0.5, DMSO);

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆):

δ = 2.24 (m, 1 H; CH_2), 2.50 (m, 1 H; CH_2), 3.33 (dd, ³*J*(H,H) = 4.17 Hz, ²*J*(H,H) = 12.12 Hz, 1 H; CH_2), 3.81-3.88 (m, 2 H; CH_2 , 1 H; CH_2), 4.24 (dd, ³*J*(H,H) = 3.98 Hz, ³*J*(H,H) = 8.75 Hz, 1 H; CH), 4.28 (m, 1 H; CH), 6.49 (d, ³*J*(H,H) = 15.89 Hz, 1 H; CH=CH), 6.67 (dd, ³*J*(H,H) = 4.77 Hz, ³*J*(H,H) = 4.77 Hz, 1 H; Ar-H), 7.15 (d, ³*J*(H,H) = 8.75 Hz, 1 H; Ar-H), 7.59 (d, ³*J*(H,H) = 16.30 Hz, 1 H; CH=CH), 7.88 (dd, ⁴*J*(H,H) = 1.99 Hz, ³*J*(H,H) = 8.74 Hz, 1 H; Ar-H), 7.90 (d, ³*J*(H,H) = 6.76 Hz, 1 H; NH), 7.98 (d, ⁴*J*(H,H) = 2.39 Hz, 1 H; Ar-H), 8.35 (d, ³*J*(H,H) = 4.77 Hz, 2 H; Ar-H), 10.73 (s, 1 H; NH);

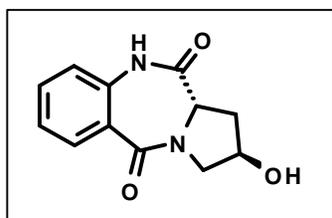
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆):

δ = 30.44 (CH_2), 44.42 (CH_2), 47.19 (CH), 52.03 (CH_2), 55.72 (CH), 110.62 (CH), 119.25 (CH), 121.93 (CH), 126.07 (C), 130.02 (C), 131.07 (CH), 131.12 (CH), 137.59 (C), 142.50 (CH), 160.28 (CH), 164.41 (C), 167.49 (C), 169.41 (C), 170.53 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, $C_{21}H_{21}N_6O_5$ $[M+H]^+$): berechnet (m/z): 437.1573, gemessen: 437.1592;

Elementaranalyse berechnet (%) für $C_{21}H_{20}N_6O_5 \cdot 0.9(TFA)$: C 52.53, H 4.04; gemessen: C 52.26, H 4.24.

7.1.2.37 (11aS)-(2R)-Hydroxy-1,2,3,11a-tetrahydro-10H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-5,11-dion 24



Isatosäureanhydrid (5,00 g, 31 mmol) und (2S,4R)-4-Hydroxypyrrolidin-2-carbonsäure (4.02 g, 31 mmol) werden in DMSO (30 mL) gelöst. Die Lösung wird für 5 h auf 120 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Lösung in Wasser (500 mL) gegeben. Das ausfallende Produkt wird abfiltriert und mit Wasser gewaschen.

Ausbeute: 6.68 g (29 mmol, 94 %), hellbrauner Feststoff;

m.p.: 223 °C;

[α]_D²⁵: +316.0 (c = 1.0, Methanol);

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆):

δ = 1.94 (m, 1 H; CH₂), 2.62 (m, 1 H; CH₂), 3.47 (dd, ³J (H,H) = 4.89 Hz, ²J (H,H) = 12.09 Hz, 1 H; CH₂), 3.61 (dd, ³J (H,H) = 2.88 Hz, ²J (H,H) = 12.09 Hz, 1 H; CH₂), 4.19 (dd, ³J (H,H) = 6.05 Hz, ³J (H,H) = 8.07 Hz, 1 H; CH), 4.31 (m, 1H; CH), 7.13 (d, ³J (H,H) = 8.35 Hz, 1 H; Ar-H), 7.23 (m, 1 H; Ar-H), 7.52 (m, 1 H; Ar-H), 7.79 (dd, ⁴J (H,H) = 1.44 Hz, ³J (H,H) = 7.78 Hz, 1 H; Ar-H), 10.55 (s, 1 H; NH);

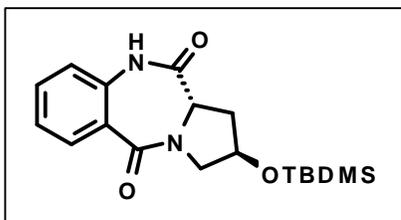
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆):

δ = 34.42 (CH₂), 54.05 (CH₂), 55.27 (CH), 67.44 (CH), 121.36 (CH), 124.03 (CH), 126.00 (C), 130.48 (CH), 132.23 (CH), 136.33 (C), 165.21 (C), 170.43 (C);

MS (100 °C): m/z (%) = 232 (M⁺, 76), 160 (43), 119 (46), 89 (100);

HRMS (EI, 70 eV, $C_{12}H_{12}N_2O_3$ $[M]^+$): berechnet (m/z): 232.0848, gemessen: 232.0843.

7.1.2.38 (11aS)-(2R)-(tert.-Butyldimethylsilyloxy)-1,2,3,11a-tetrahydro-10H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-5,11-dion 25



Der Alkohol **24** (1.50 g, 6.5 mmol) wird in DMF (10 mL) vorgelegt. Nach Zugabe von *tert.*-Butyldimethylsilylchlorid (1.17 g, 7.8 mmol, 1.2 eq.) und Imidazol (1.10 g, 16.1 mmol, 2.5 eq.) lässt man die Lösung 24 h bei Raumtemperatur rühren, gibt sie

anschließend in Wasser (200 mL) und extrahiert mit Methylenchlorid (3 × 70 mL). Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Eluent: Methylenchlorid/Methanol 10/1, R_f = 0.47).

Ausbeute: 1.95 g (5.6 mmol, 87 %), farbloser Feststoff;

m.p.: 185 °C;

[α]_D²⁵: +294.0 (c = 1.0, Methylenchlorid);

¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-d₁):

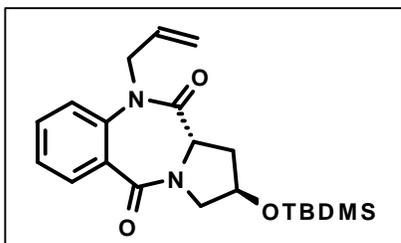
δ = 0.00 (s, 6 H; 2 × Si(CH₃)), 0.78 (s, 9 H; SiC(CH₃)₃), 1.98 (m, 1 H; CH₂), 2.75 (ddd, ³J(H,H) = 4.88 Hz, ³J(H,H) = 4.88 Hz, ²J(H,H) = 13.12 Hz, 1 H; CH₂), 3.55 - 3.69 (m, 2 H; CH, CH₂), 4.12 (dd, ³J(H,H) = 4.58 Hz, ²J(H,H) = 8.24 Hz, 1 H; CH₂), 4.44 (m, 1 H; CH), 6.92 (d, ³J(H,H) = 7.99 Hz, 1 H; Ar-H), 7.19 (dd, ³J(H,H) = 7.57 Hz, ³J(H,H) = 7.57 Hz, 1 H; Ar-H), 7.39 (ddd, ⁴J(H,H) = 1.52 Hz, ³J(H,H) = 7.63 Hz, ³J(H,H) = 7.63 Hz, 1 H; Ar-H), 7.91 (dd, ⁴J(H,H) = 1.50 Hz, ³J(H,H) = 7.93 Hz, 1 H; Ar-H), 8.34 (s, 1 H; NH);

¹³C-NMR (100 MHz, Chloroform-d₁):

δ = -4.18 Si(CH₃)₂, 18.68 (C), 26.39 (C(CH₃)₃), 35.87 (CH₂), 54.89 (CH₂), 56.20 (CH), 69.86 (CH), 121.67 (CH), 125.90 (CH), 127.20 (C), 131.99 (CH), 133.15 (CH), 135.79 (C), 166.52 (C), 171.81 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₁₈H₂₇SiN₂O₃ [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 347.1791, gemessen: 347.1808.

7.1.2.39 (11aS)-10-Allyl-(2R)-(tert.-butyldimethylsilyloxy)-1,2,3,11a-tetrahydro-10H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-5,11-dion 26



Verbindung **25** (953 mg, 2.7 mmol) wird in DMF (8 mL) vorgelegt. Die Lösung wird auf 0 °C gekühlt, wonach NaH (110 mg, 60 %ige Suspension in Öl, 1 eq.) zugegeben wird. Man lässt die Mischung 1 h bei 0 °C rühren und tropft danach Allylbromid (0.326 mL, 3.8 mmol, 1.4 eq.) zu. Im Anschluss rührt

man die Reaktionsmischung weitere 5 h bei 0 °C und 24 h bei Raumtemperatur. Die Mischung wird in Wasser (200 mL) gegeben und die wässrige Phase anschließend mit Methylchlorid (3 × 80 mL) extrahiert. Die organische Phase wird mit einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Eluent: Methylchlorid/Methanol 10/1, R_f = 0.66).

Ausbeute: 731 mg (1.9 mmol, 69 %), farbloses Öl;

[a]_D²⁵: +341.2 (c = 1.0, Methylchlorid);

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-d₁):

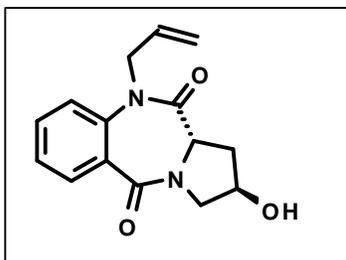
δ = 0.09 (s, 6 H; 2 × Si(CH₃)), 0.86 (s, 9 H; SiC(CH₃)₃), 2.02 (m, 1 H; CH₂), 2.88 (ddd, ³J(H,H) = 4.86 Hz, ³J(H,H) = 4.86 Hz, ²J(H,H) = 12.82 Hz, 1 H; CH₂), 3.56 (dd, ³J(H,H) = 5.35 Hz, ²J(H,H) = 12.05 Hz, 1 H; CH₂), 3.79 (dd, ³J(H,H) = 5.65 Hz, ²J(H,H) = 12.05 Hz, 1 H; CH₂), 4.22 (dd, ³J(H,H) = 3.97 Hz, ³J(H,H) = 7.94 Hz, 1 H; CH), 4.30 (dd, ³J(H,H) = 5.45 Hz, ²J(H,H) = 15.99 Hz, 1 H; CH₂), 2.56 – 2.64 (m, 2 H; CH, CH₂), 5.18 (d, ³J(H,H) = 9.77 Hz, 1 H; CH₂), 5.23 (d, ³J(H,H) = 1.52 Hz, 1 H; CH₂), 5.92 (m, 1 H; CH), 7.28- 7.36 (m, 2 H; 2 × Ar-H), 7.49 (ddd, ⁴J(H,H) = 1.67 Hz, ³J(H,H) = 7.50 Hz, ³J(H,H) = 8.52 Hz, 1 H; Ar-H), 7.91 (dd, ⁴J(H,H) = 1.52 Hz, ³J(H,H) = 7.72 Hz, 1 H; Ar-H);

¹³C-NMR (100 MHz, Chloroform-d₁):

δ = -4.86 (Si(CH₃)₂), 17.98 (C), 25.72 (C(CH₃)₃), 35.63 (CH₂), 51.94 (CH), 53.67 (CH), 56.17 (CH₂), 69.61 (CH₂), 117.24 (CH₂), 121.99 (CH), 126.01 (CH), 129.59 (C), 130.36 (CH), 132.07 (CH), 133.10 (CH), 139.89 (C), 165.65 (C), 168.75 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, $C_{21}H_{31}SiN_2O_3$ $[M+H]^+$): berechnet (m/z): 387.2104, gemessen: 387.2090.

7.1.2.40 (11a*S*)-10-Allyl-(2*R*)-hydroxy-1,2,3,11a-tetrahydro-10*H*-benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-5,11-dion 27



Verbindung **26** (372 mg, 0.96 mmol) wird in Methylenchlorid (5 mL) vorgelegt. Nach Zugabe von Tetrabutylammoniumfluorid (759 mg, 2.41 mmol, 2.5 eq.) lässt man die Lösung 24 h bei Raumtemperatur rühren. Im Anschluss daran wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Eluent: Methylenchlorid/Methanol 10/1, $R_f = 0.40$).

Ausbeute: 162 mg (0.60 mmol, 62 %), farbloses Öl;

$[\alpha]_D^{25}$: +323.1 ($c = 1.0$, Methylenchlorid);

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Methanol- d_4):

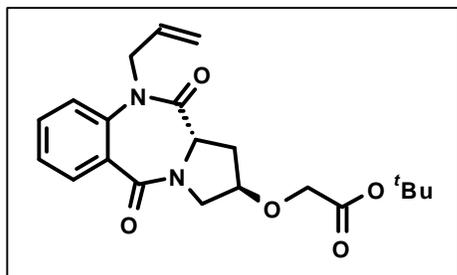
$\delta = 2.06$ (m, 1 H; CH_2), 2.89 (m, 1 H; CH_2), 3.61 (dd, $^3J(\text{H,H}) = 5.16$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 12.31$ Hz, 1 H; CH_2), 3.70 (ddd, $^3J(\text{H,H}) = 1.39$, $^3J(\text{H,H}) = 3.57$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 12.32$ Hz, 1 H; CH_2), 4.31 (dd, $^3J(\text{H,H}) = 5.65$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 7.95$ Hz, 1 H; CH), 4.51-4.58 (m, 3 H), 5.11-5.15 (m, 2 H), 5.80-5.86 (m, 1 H), 7.37 (ddd, $^4J(\text{H,H}) = 1.19$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 7.15$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 7.95$ Hz, 1 H; Ar-H), 7.51 (dd, $^4J(\text{H,H}) = 0.79$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 8.34$ Hz, 1 H; Ar-H), 7.60 (ddd, $^4J(\text{H,H}) = 1.59$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 7.55$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 8.35$ Hz, 1 H; Ar-H), 7.81 (dd, $^4J(\text{H,H}) = 1.59$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 7.95$ Hz, 1 H; Ar-H);

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Methanol- d_4):

$\delta = 34.35$ (CH_2), 50.76 (CH_2), 53.32 (CH_2), 56.15 (CH), 68.40 (CH), 116.16 (CH_2), 122.68 (CH), 125.76 (CH), 129.32 (C), 129.44 (CH), 132.31 (CH), 132.80 (CH), 139.72 (C), 166.50 (C), 168.83 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, $C_{15}H_{17}N_2O_3$ $[M+H]^+$): berechnet (m/z): 273.1239, gemessen: 273.1249.

7.1.2.41 [(11a*S*)-10-Allyl-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1*H*-benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-(2*R*)-yloxy]-essigsäure-*tert*-butylester 28



Der Alkohol **27** (1.27 g, 4.7 mmol) wird in DMF (8 mL) gelöst. Man kühlt die Lösung auf 0 °C und gibt BaO (1.43 g, 9.3 mmol, 2 eq.) und Ba(OH)₂·8H₂O (0.74 g, 2.3 mmol, 0.5 eq.) dazu. Man lässt 1 h bei 0 °C rühren und tropft anschließend Bromessigsäure-*tert*-butylester

(1.04 mL, 7.0 mmol, 1.5 eq.) zu. Die Reaktionsmischung wird 5 h bei 0 °C und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach gibt man Essigester (150 mL) dazu und trennt die festen Bestandteile durch Filtration ab. Das Filtrat wird mit Wasser gewaschen (3 × 30 mL). Danach wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt der Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Eluent: Methylenchlorid/Methanol 20/1, R_f = 0.45).

Ausbeute: 739 mg (1.9 mmol, 41 %), farbloses Öl;

[α]_D²⁵: +356.8 (c = 0.5, Methylenchlorid);

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄):

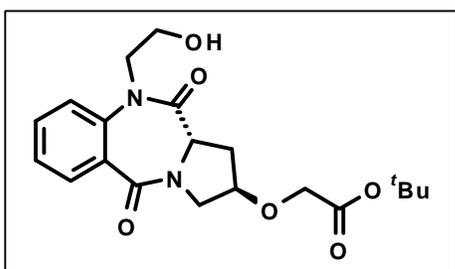
δ = 1.46 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 2.25 (m, 1 H; CH₂), 3.01 (ddd, ³J (H,H) = 5.56 Hz, ³J (H,H) = 5.56 Hz, ²J (H,H) = 13.91 Hz, 1 H; CH₂), 3.65 (dd, ³J (H,H) = 4.77 Hz, ²J (H,H) = 12.72 Hz, 1 H; CH₂), 4.00 (ddd, ³J (H,H) = 1.59 Hz, ³J (H,H) = 3.18 Hz, ²J (H,H) = 13.12 Hz, 1 H; CH₂), 4.25 (dd, ³J (H,H) = 5.76 Hz, ³J (H,H) = 7.95 Hz, 1 H; CH), 4.33 (dd, ³J (H,H) = 5.77 Hz, ²J (H,H) = 16.10 Hz, 1 H; CH₂), 4.37 (m, 1 H; CH), 4.55 (d, ³J (H,H) = 2.78 Hz, 2 H; CH₂), 4.57 (dd, ³J (H,H) = 5.17 Hz, ²J (H,H) = 16.19 Hz, 1 H; CH₂), 5.18 (dd, ²J (H,H) = 1.20 Hz, ³J (H,H) = 24.24 Hz, 1 H; CH₂), 5.19 (dd, ³J (H,H) = 1.30 Hz, ³J (H,H) = 2.98 Hz, 1 H; CH₂), 5.89 (m, 1 H; CH), 7.30 (ddd, ⁴J (H,H) = 0.80 Hz, ³J (H,H) = 7.55 Hz, ³J (H,H) = 7.55 Hz, 1 H; Ar-H), 7.34 (d, ³J (H,H) = 8.35 Hz, 1 H; Ar-H), 7.48 (ddd, ⁴J (H,H) = 1.59 Hz, ³J (H,H) = 7.15 Hz, ³J (H,H) = 8.34 Hz, 1 H; Ar-H), 7.91 (dd, ⁴J (H,H) = 1.59 Hz, ³J (H,H) = 7.94 Hz, 1 H; Ar-H);

¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-d₄):

δ = 28.00 (C(CH₃)₃), 32.65 (CH₂), 50.81 (CH₂), 52.04 (CH₂), 55.95 (CH), 61.32 (CH₂), 77.66 (CH), 82.80 (C), 117.36 (CH₂), 122.09 (CH), 126.05 (CH), 129.50 (C), 130.47 (CH), 132.16 (CH), 132.99 (CH), 139.77 (C), 165.59 (C), 166.27 (C), 168.34 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, $C_{21}H_{27}N_2O_5$ $[M+H]^+$): berechnet (m/z): 387.1920, gemessen: 387.1913.

7.1.2.42 [(11a*S*)-10-(2-Hydroxyethyl)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1*H*benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-(2*R*)-yloxy]-essigsäure-*tert*-butylester 29



Die Verbindung **28** (125 mg, 0.32 mmol) wird in Methylenchlorid/Methanol (3/1, 5 mL) gelöst. Es wird auf -78 °C gekühlt und 20 min Ozon in die Lösung eingeleitet. Im Anschluss wird das überschüssige Ozon mit Stickstoff ausgetrieben und die Lösung auf 0 °C erwärmt. Man gibt

$NaBH_4$ (49 mg, 1.3 mmol, 4 eq.) dazu und rührt die Lösung 1 h bei 0 °C. Danach wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand mit Wasser aufgenommen, mit gesättigter NH_4Cl -Lösung neutralisiert und mit Essigester (3×30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Eluent: Methylenchlorid/Methanol 15/1, $R_f = 0.47$).

Ausbeute: 80 mg (0.2 mmol, 63 %), farbloses Öl;

1H -NMR (500 MHz, Methanol- d_4):

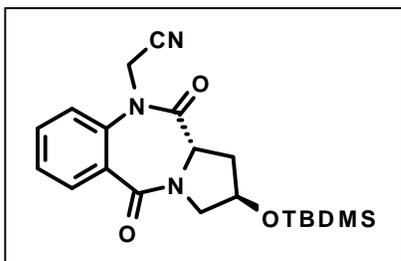
$\delta = 1.47$ (s, 9 H; $C(CH_3)_3$), 2.23 (m, 1 H; CH_2), 2.99 (ddd, $^3J(H,H) = 5.65$ Hz, $^3J(H,H) = 5.65$ Hz, $^2J(H,H) = 13.78$ Hz, 1 H; CH_2), 3.67 (dd, $^3J(H,H) = 4.94$ Hz, $^2J(H,H) = 12.71$ Hz, 1 H; CH_2), 3.83 – 4.09 (m, 7 H; CH_2 , CH_2 , CH_2 , CH_2), 4.25 (dd, $^3J(H,H) = 5.65$ Hz, $^3J(H,H) = 8.12$ Hz, 1 H; CH), 4.34 (m, 1 H; CH), 7.33 (ddd, $^4J(H,H) = 1.06$ Hz, $^3J(H,H) = 7.07$ Hz, $^3J(H,H) = 8.13$ Hz, 1 H; Ar-H), 7.42 (d, $^3J(H,H) = 8.15$ Hz, 1 H; Ar-H), 7.52 (ddd, $^4J(H,H) = 1.42$ Hz, $^3J(H,H) = 7.62$ Hz, $^3J(H,H) = 8.17$ Hz, 1 H; Ar-H), 7.90 (dd, $^4J(H,H) = 1.76$ Hz, $^3J(H,H) = 7.77$ Hz, 1 H; Ar-H);

^{13}C -NMR (125 MHz, Methanol- d_4):

$\delta = 28.01$ ($C(CH_3)_3$), 32.57 (CH_2), 50.65 (CH_2), 52.80 (CH_2), 56.02 (CH), 61.12 (CH_2), 67.13 (CH_2), 77.35 (CH), 81.94 (C), 123.12 (CH), 126.29 (CH), 129.83 (C), 130.33 (CH), 132.22 (CH), 139.72 (C), 165.48 (C), 169.08 (C), 169.67 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₂₀H₂₇N₂O₆ [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 391.1869, gemessen: 391.1827.

7.1.2.43 [(11*aS*)-(2*R*)-(tert.-Butyldimethylsilyloxy)-5,11-dioxo-2,3,11,11a-tetrahydro-1*H*-5*H*-benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-10-yl]-acetonitril
30



Die Verbindung **25** (8.85 g, 26 mmol) wird in THF (20 mL) vorgelegt. Die Lösung wird auf $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt, wonach NaH zugegeben wird (1.02 g, 26 mmol, 60 %ige Suspension in Öl, 1 eq.). Man lässt die Mischung 1 h bei $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ rühren und tropft danach Bromacetonitril (2.49 mL, 36 mmol, 1.4 eq.)

zu. Im Anschluss rührt man die Reaktionsmischung 1 h bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 24 h bei Raumtemperatur. Die Mischung wird Wasser (300 mL) gegeben und die wässrige Phase anschließend mit Methylenchlorid ($3 \times 100\text{ mL}$) extrahiert. Die organische Phase wird mit einer ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Eluent: Hexan/Essigester 2/1, R_f = 0.42).

Ausbeute: 8.75 g (23 mmol, 89 %), farbloser Feststoff;

m.p.: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Zersetzung);

[*a*]_D²⁵: +268.2 (*c* = 0.5, Methylenchlorid);

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*₁):

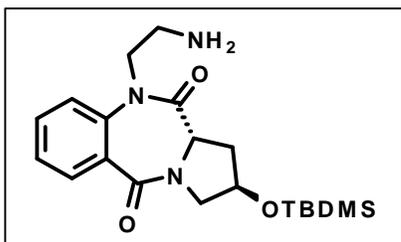
δ = 0.09 (s, 6 H; $2 \times \text{Si}(\text{CH}_3)$), 0.86 (s, 9 H; SiC(CH₃)₃), 2.08 (m, 1 H; CH₂), 2.85 (m, 1 H; CH₂), 3.61 (dd, ³*J* (H,H) = 4.71 Hz, ²*J* (H,H) = 11.99 Hz, 1 H; CH₂), 3.73 (dd, ³*J* (H,H) = 5.34 Hz, ²*J* (H,H) = 12.25 Hz, 1 H; CH₂), 4.24 (dd, ³*J* (H,H) = 4.39 Hz, ³*J* (H,H) = 7.85 Hz, 1 H; CH), 4.26 (d, ²*J* (H,H) = 17.29 Hz, 1 H; CH₂), 4.55 (m, 1 H; CH), 4.91 (dd, ³*J* (H,H) = 2.51 Hz, ²*J* (H,H) = 17.27 Hz, 1 H; CH₂), 7.39 - 7.43 (m, 2 H; $2 \times \text{Ar-H}$), 7.61 (m, 1 H; Ar-H), 7.94 (d, ³*J* (H,H) = 7.53 Hz, 1 H; Ar-H);

¹³ C-NMR (125 MHz, Chloroform-d₁):

δ = 28.01 (C(CH₃)₃), 32.57 (CH₂), 50.65 (CH₂), 52.80 (CH₂), 56.02 (CH), 61.12 (CH₂), 67.13 (CH₂), 77.35 (CH), 81.94 (C), 123.12 (CH), 126.29 (CH), 129.83 (C), 130.33 (CH), 132.22 (CH), 139.72 (C), 165.48 (C), 169.08 (C), 169.67 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₂₀H₂₈SiN₃O₃ [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 386.1881, gemessen: 386.1899.

7.1.2.44 (11aS)-10-(2-Aminoethyl)-(2R)-(tert.-Butyldimethylsilanyloxy)-1,2,3,11a-tetrahydro-10H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-5,11-dion 31



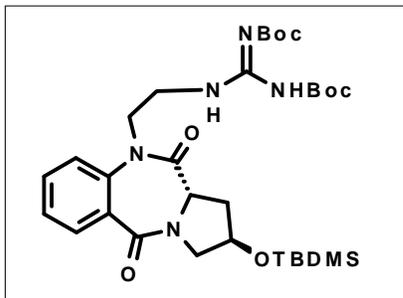
Das Nitril **30** (500 mg, 1.30 mmol) wird in Methanol (10 mL) vorgelegt. Nach Zugabe von CoCl₂ (337 mg, 2.60 mmol, 2 eq.) wird die Mischung auf 0 °C gekühlt. NaBH₄ (481 mg, 13 mmol, 10 eq.) wird in kleinen Portionen innerhalb einer Stunde zugegeben, wobei sich Co₂B als schwarzer Feststoff

abscheidet. Die Mischung wird innerhalb von 3 h auf Raumtemperatur erwärmt, und anschließend weitere 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wird 10 %ige Zitronensäure zugegeben, um das Co₂B teilweise zu lösen. Danach wird mit 25 %iger Ammoniaklösung pH = 9 - 10 eingestellt. Die wässrige Phase wird mit Essigester (4 × 30 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden mit Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt (R_f = 0.67, Methylenchlorid/Methanol/Ammoniak (konz.) 5/1/0.01) wird ohne weitere Aufreinigung in weiteren Reaktionen eingesetzt.

Ausbeute: 374 mg (0.96 mmol, 74 %), hellgelbes Öl;

HRMS (FAB, 70 eV, C₂₀H₃₂SiN₃O₃ [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 390.2213, gemessen: 390.2229.

7.1.2.45 *N,N'*-(Di-*tert*-butoxycarbonyl)-*N''*-{2[(11*aS*)-(2*R*)-(tert.-Butyldimethylsilylanoyloxy)-5,11-dioxo-2,3,11,11*a*-tetrahydro-1*H*5*H*-benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-10-yl]-ethyl}-guanidin **32**



Das Amin **31** (1.08 g, 2.78 mmol) wird in Methylenchlorid (10 mL) vorgelegt. Die Lösung wird auf 0 °C gekühlt, wonach Triethylamin (0.51 mL, 3.61 mmol, 1.3 eq.) und das Guanidinylierungsreagenz **6** (1.41 g, 3.61 mmol, 1.3 eq.) zugegeben werden. Man lässt die Lösung auf Raumtemperatur erwärmen und rührt danach

noch weitere 20 h. Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Eluent: Hexan/Essigester 1/1, $R_f = 0.43$).

Ausbeute: 1.14 g (1.80 mmol, 65 %), farbloser Feststoff;

m.p.: 83 °C;

$[\alpha]_D^{25}$: +163.0 ($c = 0.5$, Methylenchlorid);

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Chloroform- d_1):

$\delta = 0.08$ (s, 6 H; $2 \times \text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.85 (s, 9 H; $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 1.48 (s, 9 H; $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.52 (s, 9 H; $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.00 (m, 1 H; CH_2), 2.84 (ddd, $^3J(\text{H,H}) = 4.34$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 5.35$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 12.91$ Hz, 1 H; CH_2), 3.54 (dd, $^3J(\text{H,H}) = 5.16$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 11.92$ Hz, 1 H; CH_2), 3.67 (m, 2 H, CH_2), 3.77 (dd, $^3J(\text{H,H}) = 5.75$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 12.12$ Hz, 1 H; CH_2), 4.00 (dd, $^3J(\text{H,H}) = 6.96$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 13.91$ Hz, 1 H; CH_2), 4.10 (dd, $^3J(\text{H,H}) = 6.56$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 13.81$ Hz, 1 H; CH_2), 4.59 (m, 1 H, CH), 7.30 (ddd, $^4J(\text{H,H}) = 1.16$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 6.97$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 8.13$ Hz, 1 H; Ar-H), 7.55 (ddd, $^4J(\text{H,H}) = 1.59$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 7.16$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 8.54$ Hz, 1 H; Ar-H), 7.64 (d, $^3J(\text{H,H}) = 8.34$ Hz, 1 H; Ar-H), 7.87 (dd, $^4J(\text{H,H}) = 1.79$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 7.77$ Hz, 1 H; Ar-H), 8.42 (br, 1 H; NH);

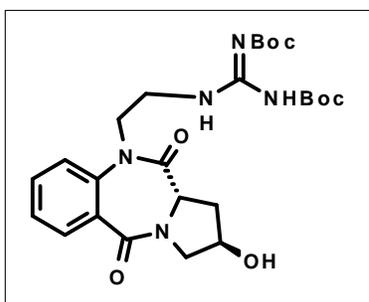
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Chloroform- d_1):

$\delta = -4.87$ ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), -4.84 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 17.98 (SiC), 25.72 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 28.05 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 28.32 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 35.59 (CH_2), 38.68 (CH_2), 47.85 (CH_2), 53.64 (CH_2), 56.11 (CH), 69.61 (CH), 79.28 (C), 83.27 (C), 122.60 (CH), 126.01 (CH), 129.37 (C), 130.41

(CH), 132.44 (CH), 139.38 (C), 152.95 (C), 156.36 (C), 163.29 (C), 165.51 (C), 169.30 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₃₁H₅₀SiN₅O₇ [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 632.3480, gemessen: 632.3492.

7.1.2.46 *N,N'*-(Di-*tert*-butoxycarbonyl)-*N''*-{2[(11*aS*)-(2*R*)-hydroxy-5,11-dioxo-2,3,11,11*a*-tetrahydro-1*H*5*H*-benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-10-yl]-ethyl}-guanidin **33**



172 mg (0.27 mmol) der TBDMS-geschützten Verbindung **32** werden in 5 mL Methylenchlorid vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Danach werden 215 mg (0.68 mmol, 2.5 eq.) Tetrabutylammoniumfluorid zugegeben. Man lässt die Lösung auf Raumtemperatur erwärmen und rührt danach noch weitere 20 h. Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Eluent: Methylenchlorid/Methanol 10/1, R_f = 0.44).

Ausbeute: 90 mg (0.17 mmol, 64 %), farbloser Feststoff;

m.p.: 91 °C;

[α]_D²⁵: +180.6 (c = 0.5, Methylenchlorid);

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*₁):

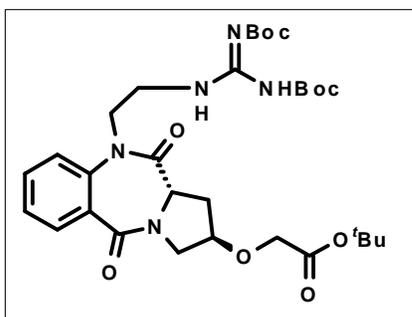
δ = 1.49 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 1.50 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 2.10 (m, 1 H; CH₂), 2.98 (ddd, ³J (H,H) = 5.26 Hz, ³J (H,H) = 5.76 Hz, ²J (H,H) = 13.51 Hz, 1 H; CH₂), 3.67 – 3.73 (m, 3 H; CH₂, CH₂), 3.84 (ddd, ³J (H,H) = 1.40 Hz, ³J (H,H) = 3.38 Hz, ²J (H,H) = 12.51 Hz, 1 H; CH₂), 4.02 (dd, ³J (H,H) = 7.55 Hz, ²J (H,H) = 13.91 Hz, 1 H; CH₂), 4.12 (dd, ³J (H,H) = 7.55 Hz, ²J (H,H) = 13.91 Hz, 1 H; CH₂), 4.23 (dd, ³J (H,H) = 5.57 Hz, ³J (H,H) = 7.95 Hz, 1 H; CH), 4.67 (m, 1 H; CH), 7.29 (ddd, ⁴J (H,H) = 0.88 Hz, ³J (H,H) = 7.30 Hz, ³J (H,H) = 8.07 Hz, 1 H; Ar-H), 7.55 (ddd, ⁴J (H,H) = 1.79 Hz, ³J (H,H) = 7.62 Hz, ³J (H,H) = 8.69 Hz, 1 H; Ar-H), 7.68 (d, ³J (H,H) = 8.35 Hz, 1 H; Ar-H), 7.87 (dd, ⁴J (H,H) = 1.58 Hz, ³J (H,H) = 7.94 Hz, 1 H; Ar-H), 8.43 (m, 1 H; NH), 11.35 (s, 1 H; NH);

¹³C-NMR (125 MHz, Chloroform-d₁):

δ = 28.06 (C(CH₃)₃), 28.34 (C(CH₃)₃), 35.03 (CH₂), 38.74 (CH₂), 47.93 (CH₂), 53.84 (CH₂), 55.98 (CH), 69.35 (CH), 79.20 (C), 83.24 (C), 122.72 (CH), 126.00 (CH), 129.31 (C), 130.49 (CH), 132.51 (CH), 139.40 (C), 152.98 (C), 156.34 (C), 163.32 (C), 165.58 (C), 169.03 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₂₅H₃₆N₅O₇ [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 518.2615, gemessen: 518.2598.

7.1.2.47 [(11a*S*)-10-(2-*N,N'*-(Di-*tert*-butoxycarbonyl)-guanidinoethyl)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1*H*benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-(2*R*)-yloxy]-essigsäure-*tert*-butylester 34



137 mg (0.26 mmol) des Alkohols **33** werden in 5 mL THF vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Danach werden 12 mg (0.29 mmol, 60 %ige Suspension in Öl, 1.1 eq.) NaH zugegeben. Die Lösung wird 1 h bei dieser Temperatur gerührt. Danach werden 35 mg (0.13 mmol, 0.5 eq.) 18-C-6 und anschließend 0.39 mL (2.6 mmol, 10 eq.)

Bromessigsäure-*tert*-butylester zugegeben. Man lässt die Lösung auf Raumtemperatur erwärmen und weitere 24 h rühren. Die Mischung wird in Wasser (100 mL) gegeben und die wässrige Phase anschließend mit Methylchlorid (3 × 40 mL) extrahiert. Die organische Phase wird mit einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Eluent: Hexan/Essigester 1/2, R_f = 0.39).

Ausbeute: 80 mg (0.13 mmol, 48 %), farbloses Öl;

[**a**]_D²⁵: +207.4 (c = 0.5, Methylchlorid);

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-d₁):

δ = 1.45 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 1.46 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 1.48 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 2.21 (m, 1 H; CH₂), 2.98 (ddd, ³J (H,H) = 5.26 Hz, ³J (H,H) = 5.76 Hz, ²J (H,H) = 13.91 Hz, 1 H; CH₂), 3.64 – 3.68 (m, 3 H; CH₂, CH₂), 3.91 – 4.02 (m, 4 H; CH₂, CH₂, CH₂), 4.09 (dd, ³J (H,H) = 7.15 Hz, ²J (H,H) = 14.31 Hz, 1 H; CH₂), 4.19 (dd, ³J (H,H) = 5.57 Hz,

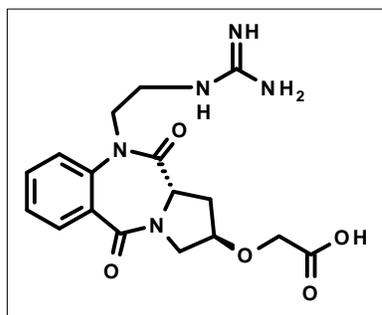
3J (H,H) = 7.95 Hz, 1 H; CH), 4.31 (m, 1 H; CH), 7.28 (ddd, 4J (H,H) = 0.80 Hz, 3J (H,H) = 7.15 Hz, 3J (H,H) = 7.95 Hz, 1 H; Ar-H), 7.53 (ddd, 4J (H,H) = 1.59 Hz, 3J (H,H) = 6.99 Hz, 3J (H,H) = 8.58 Hz, 1 H; Ar-H), 7.65 (d, 3J (H,H) = 8.35 Hz, 1 H; Ar-H), 7.87 (dd, 4J (H,H) = 1.59 Hz, 3J (H,H) = 7.55 Hz, 1 H; Ar-H), 8.40 (m, 1 H; NH), 11.33 (s, 1 H; NH);

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Chloroform- d_1):

δ = 28.06 (C(CH₃)₃), 28.32 (C(CH₃)₃), 32.66 (CH₂), 38.71 (CH₂), 47.88 (CH₂), 50.67 (CH₂), 55.89 (CH), 67.17 (CH₂), 77.37 (CH), 79.16 (C), 81.93 (C), 83.19 (C), 122.66 (CH), 125.97 (CH), 129.36 (C), 130.53 (CH), 132.44 (CH), 139.28 (C), 152.94 (C), 156.30 (C), 163.30 (C), 165.33 (C), 168.96 (C), 169.12 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₃₁H₄₆N₅O₉ [M+H]⁺): berechnet (m/z): 632.3296, gemessen: 632.3324.

7.1.2.48 [(11a*S*)-10-(2-guanidinoethyl)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1*H*-benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-(2*R*)-yloxy]-essigsäure **35**



73 mg (0.12 mmol) der geschützten Verbindung **34** werden in 3 mL Methylenchlorid vorgelegt. Nach Zugabe von 1 mL Trifluoressigsäure lässt man 4 h rühren und entfernt anschließend das Lösungsmittel unter reduziertem Druck.

Ausbeute: quantitativ, hellgelbes Öl;

$[\alpha]_D^{25}$: +186.6 (c = 0.5, Methanol);

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Methanol- d_4):

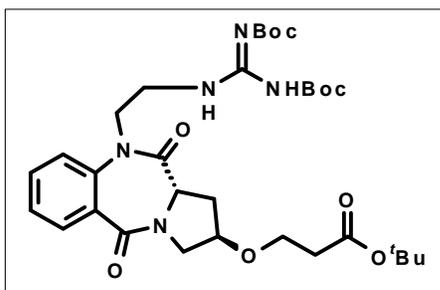
δ = 2.23 (m, 1 H; CH₂), 2.92 (m, 1 H; CH₂), 3.35 – 3.48 (m, 2 H, CH₂), 3.63 (dd, 3J (H,H) = 4.97 Hz, 2J (H,H) = 12.92 Hz, 1 H; CH₂), 3.90 – 3.97 (m, 2 H; CH₂, CH₂), 4.14 (s, 2 H; CH₂), 4.28 – 4.39 (m, 3 H; CH, CH, CH₂), 7.40 (dd, 3J (H,H) = 7.55 Hz, 3J (H,H) = 7.55 Hz, 1 H; Ar-H), 7.47 (d, 3J (H,H) = 8.34 Hz, 1 H; Ar-H), 7.65 (ddd, 4J (H,H) = 1.59 Hz, 3J (H,H) = 7.63 Hz, 3J (H,H) = 7.95 Hz, 1 H; Ar-H), 7.84 (dd, 4J (H,H) = 1.39 Hz, 3J (H,H) = 7.75 Hz, 1 H; Ar-H);

¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-d₄):

δ = 31.70 (CH₂), 39.00 (CH₂), 47.26 (CH₂), 50.77 (CH₂), 56.12 (CH), 65.69 (CH₂), 77.18 (CH), 122.88 (CH), 126.16 (CH), 129.45 (C), 129.72 (CH), 132.68 (CH), 139.22 (C), 157.38 (C), 166.25 (C), 169.80 (C), 172.45 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₁₇H₂₂N₅O₅ [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 376.1621, gemessen: 376.1610.

7.1.2.49 [(11a*S*)-10-(2-*N,N'*-(Di-*tert*.-butoxycarbonyl)-guanidinoethyl)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1*H*-benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-(2*R*)-yloxy]-propansäure-*tert*.-butylester 36



100 mg (0.19 mmol) des Alkohols **33** werden in 5 mL THF vorgelegt, und auf 0 °C gekühlt. Danach werden 9 mg (0.21 mmol, 60 %ige Suspension in Öl, 1.1 eq.) NaH zugegeben. Die Lösung wird 1 h bei dieser Temperatur gerührt. Danach werden 26 mg (0.10 mmol, 0.5 eq.) 18-C-6 und anschließend 0.28 mL (1.9 mmol,

10 eq.) Acrylsäure-*tert*.-butylester zugegeben. Man lässt die Lösung auf Raumtemperatur erwärmen und weitere 24 h rühren. Die Mischung wird in Wasser (100 mL) gegeben und die wässrige Phase anschließend mit Methylenchlorid (3 × 40 mL) extrahiert. Die organische Phase wird mit einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Eluent: Hexan/Essigester 1/2, R_f = 0.36).

Ausbeute: 42 mg (0.07 mmol, 34 %), farbloses Öl;

[**a**]_D²⁵: +157.4 (c = 0.5, Methylenchlorid);

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-d₁):

δ = 1.39 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 1.48 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 1.49 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 2.12 (m, 1 H; CH₂), 2.43 (dt, ⁴J (H,H) = 1.59 Hz, ³J (H,H) = 6.16 Hz, 2 H; CH₂), 2.93 (ddd, ³J (H,H) = 5.26 Hz, ³J (H,H) = 5.76 Hz, ²J (H,H) = 13.51 Hz, 1 H; CH₂), 3.64 – 3.70 (m, 5 H; CH₂, CH₂, CH₂), 3.85 (dd, ³J (H,H) = 3.26 Hz, ²J (H,H) = 12.37 Hz, 1 H; CH₂), 4.01 (dd, ³J (H,H) = 7.55 Hz, ²J (H,H) = 13.91 Hz, 1 H; CH₂), 4.11 (dd, ³J (H,H)

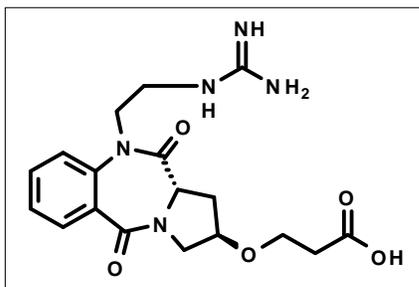
= 7.16 Hz, 2J (H,H) = 14.30 Hz, 1 H; CH₂), 4.15 (dd, 3J (H,H) = 5.36 Hz, 3J (H,H) = 8.14 Hz, 1 H; CH), 4.24 (m, 1 H; CH), 7.28 (ddd, 4J (H,H) = 0.80 Hz, 3J (H,H) = 7.10 Hz, 3J (H,H) = 7.90 Hz, 1 H; Ar-H), 7.53 (ddd, 4J (H,H) = 1.59 Hz, 3J (H,H) = 7.15 Hz, 3J (H,H) = 8.35 Hz, 1 H; Ar-H), 7.66 (d, 3J (H,H) = 8.35 Hz, 1 H; Ar-H), 7.88 (dd, 4J (H,H) = 1.79 Hz, 3J (H,H) = 7.75 Hz, 1 H; Ar-H), 8.42 (m, 1 H; NH), 11.34 (s, 1 H; NH);

¹³C-NMR (125 MHz, Chloroform-d₁):

δ = 28.04 (C(CH₃)₃), 28.06 (C(CH₃)₃), 28.33 (C(CH₃)₃), 32.42 (CH₂), 36.28 (CH₂), 38.72 (CH₂), 47.86 (CH₂), 50.97 (CH₂), 55.96 (CH), 64.97 (CH₂), 76.56 (CH), 79.18 (C), 80.64 (C), 83.21 (C), 122.65 (CH), 125.93 (CH), 129.41 (C), 130.48 (CH), 132.41 (CH), 139.31 (C), 152.95 (C), 156.33 (C), 163.31 (C), 165.36 (C), 169.07 (C), 170.61 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₃₂H₄₈N₅O₉ [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 646.3452, gemessen: 646.3474.

7.1.2.50 [(11a*S*)-10-(2-guanidinoethyl)-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahydro-1*H*-benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-(2*R*)-yloxy]-propansäure 37



100 mg (0.16 mmol) der geschützten Verbindung **36** werden in 3 mL Methylenchlorid vorgelegt. Nach Zugabe von 1 mL Trifluoressigsäure lässt man 4 h rühren und entfernt anschließend das Lösungsmittel unter reduziertem Druck.

Ausbeute: quantitativ, hellgelbes Öl;

[α]_D²⁵: +178.0 (c 0.1, Methanol);

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄):

δ = 2.18 (m, 1 H; CH₂), 2.52 (t, 3J (H,H) = 6.16 Hz, 2 H; CH₂), 2.89 (ddd, 3J (H,H) = 5.16 Hz, 3J (H,H) = 5.56 Hz, 2J (H,H) = 13.51 Hz, 1 H; CH₂), 3.34 – 3.39 (m, 1 H; CH₂), 3.42 – 3.48 (m, 1 H; CH₂), 3.63 (dd, 3J (H,H) = 5.17 Hz, 2J (H,H) = 12.72 Hz, 1 H; CH₂), 3.70 – 3.78 (m, 2 H; CH₂), 3.82 (ddd, 4J (H,H) = 1.19 Hz, 3J (H,H) = 3.58 Hz, 2J (H,H) = 12.72 Hz, 1 H; CH₂), 3.94 (td, 3J (H,H) = 5.96 Hz, 2J (H,H) =

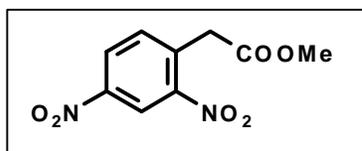
14.31 Hz, 1 H; CH₂), 4.25 (dd, ³J (H,H) = 5.36 Hz, ³J (H,H) = 8.14 Hz, 1 H; CH), 4.30 (m, 1 H; CH), 4.40 (td, ³J (H,H) = 6.56 Hz, ²J (H,H) = 14.71 Hz, 1 H; CH₂), 7.40 (ddd, ⁴J (H,H) = 0.79 Hz, ³J (H,H) = 7.18 Hz, ³J (H,H) = 7.97 Hz, 1 H; Ar-H), 7.47 (d, ³J (H,H) = 7.94 Hz, 1 H; Ar-H), 7.66 (ddd, ⁴J (H,H) = 1.59 Hz, ³J (H,H) = 7.55 Hz, ³J (H,H) = 8.34 Hz, 1 H; Ar-H), 7.85 (dd, ⁴J (H,H) = 1.59 Hz, ³J (H,H) = 7.95 Hz, 1 H; Ar-H);

¹³ C-NMR (125 MHz, Methanol-d₄):

δ = 31.64 (CH₂), 34.39 (CH₂), 39.03 (CH₂), 47.14 (CH₂), 50.77 (CH₂), 56.17 (CH), 64.48 (CH₂), 76.45 (CH), 122.86 (CH), 126.17 (CH), 129.51 (C), 129.69 (CH), 132.66 (CH), 139.20 (C), 157.35 (C), 166.25 (C), 169.89 (C), 173.78 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₁₈H₂₄N₅O₅ [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 390.1777, gemessen: 390.1769.

7.1.2.51 2,4-Dinitro-phenyl-essigsäure-methylester 38



2,4-Dinitrophenyl-essigsäure (10,00 g, 44 mmol) wird in Methanol (50 mL) vorgelegt. Nach Zugabe von konz. H₂SO₄ (5 mL) wird die Reaktionslösung 5 h unter Rückfluss erhitzt. Im Anschluss daran gibt man die Lösung in Wasser (400 mL) und extrahiert das Produkt mit Diethylether (3 × 100 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden mit NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Na₂SO₄ wird das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt (R_f = 0.39, Hexan/Essigester 1/1).

Ausbeute: 10.09 g (42 mmol, 95 %), farbloses Öl;

¹ H-NMR (500 MHz, Chloroform-d₁):

δ = 3.73 (s, 3 H; CH₃), 4.15 (s, 2 H; CH₂), 7.61 (d, ³J (H,H) = 8.34 Hz, 1 H; Ar-H), 8.44 (dd, ⁴J (H,H) = 2.39 Hz, ³J (H,H) = 8.35 Hz, 1 H; ArH), 8.95 (d, ⁴J (H,H) = 2.38 Hz, 1 H; Ar-H);

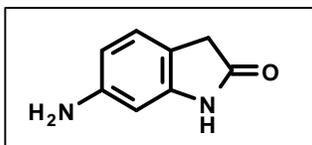
¹³ C-NMR (125 MHz, Chloroform-d₁):

δ = 39.43 (CH₂), 52.68 (CH₃), 120.78 (CH), 127.51 (CH), 134.67 (CH), 136.31 (C), 147.45 (C), 148.89 (C), 169.08 (C);

MS (80 °C): m/z (%) = 240 (M^+ , 1), 209 (15), 194 (100);

HRMS (EI, 70 eV, $C_9H_8N_2O_6 [M]^+$): berechnet (m/z): 240.0382, gemessen: 240.0375.

7.1.2.52 6-Amino-1,3-dihydroindol-2-on **39**



Der Methylester **38** (8.00 g, 33.3 mmol) wird in Methanol (50 mL) vorgelegt. Das Lösungsmittel wird entgast und anschließend mit Argon durchgespült. Nach Zugabe katalytischer Mengen an Palladium auf Aktivkohle wird mit Wasserstoff gespült. Die Reaktionsmischung wird 24 h unter Wasserstoffatmosphäre (1 bar) gerührt. Danach wird mit Argon gespült und der Katalysator durch Filtration abgetrennt. Das Lösungsmittel wird unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wird an Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt. (Eluent: Methylenchlorid/Methanol 10/1, $R_f = 0.47$).

Ausbeute: 1.83 g (0.12 mol, 37 %), brauner Feststoff;

m.p. 145 °C (Zersetzung);

1H -NMR (500 MHz, Methanol- d_4):

$\delta = 3.35$ (s, 2 H; CH_2), 6.31 (d, $^4J(H,H) = 1.59$ Hz, 1 H; Ar-H), 6.35 (dd, $^4J(H,H) = 1.98$ Hz, $^3J(H,H) = 7.95$ Hz, 1 H; Ar-H), 6.92 (d, $^3J(H,H) = 7.95$ Hz, 1 H; Ar-H);

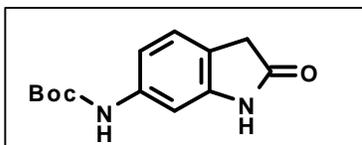
^{13}C -NMR (125 MHz, Methanol- d_4):

$\delta = 35.30$ (CH_2), 97.76 (CH), 108.90 (CH), 114.66 (C), 124.50 (CH), 143.83 (C), 147.30 (C), 179.56 (C);

MS (130 °C): m/z (%) = 148 (M^+ , 100), 120 (29);

HRMS (EI, 70 eV, $C_8H_8N_2O [M]^+$): berechnet (m/z): 148.0637, gemessen: 148.0638.

7.1.2.53 6-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-1,3-dihydroindol-2-on 40



Das Amin **39** (3.81 g, 25.7 mmol) wird in THF (10 mL) gelöst. Nach Zugabe von Di-*tert*-butyl-dicarbonat (6.18 g, 28.3 mmol, 1.1 eq.) wird die Reaktionslösung 16 h auf 45 °C erwärmt. Im Anschluss wird das

Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Essigester gelöst und die organische Phase mit 5 %iger Zitronensäure und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Eluent: Methylenchlorid/Methanol 10/1, $R_f = 0.66$).

Ausbeute: 4.98 g (20.1 mmol, 78 %), hellbrauner Feststoff;

m.p.: 210 °C (Zersetzung);

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*₁):

$\delta = 1.48$ (s, 9 H; CH₃), 3.40 (s, 2 H; CH₂), 6.85 (dd, 4J (H,H) = 1.59 Hz, 3J (H,H) = 7.95 Hz, 1 H; ArH), 7.04 (d, 3J (H,H) = 7.95 Hz, 1 H; ArH), 7.45 (s, 1 H; Ar-H);

¹³C-NMR (125 MHz, Chloroform-*d*₁):

$\delta = 27.93$ (CH₃), 35.73 (CH₂), 80.09 (C), 100.09 (CH), 112.20 (CH), 119.20 (C), 124.36 (CH), 138.68 (C), 143.34 (C), 153.58 (C), 178.84 (C);

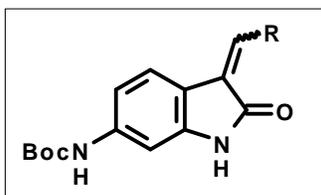
MS (130 °C): m/z (%) = 248 (M⁺, 28), 192 (100), 148 (26) 57 (64);

HRMS (EI, 70 eV, C₁₃H₁₆N₂O₃ [M]⁺): berechnet (m/z): 248.1161, gemessen: 248.1147.

7.1.2.54 Synthese der Verbindungen 41c – 57c

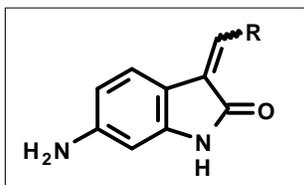
Allgemeine Vorschrift:

Aldolreaktion:



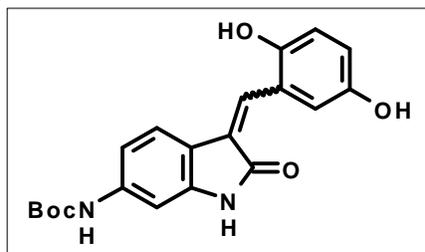
Es werden 1 eq. 6-Amino-1,3-dihydroindol-2-on **40** und 1 eq. des entsprechenden Aldehyds **41a – 57a** in Ethanol gelöst. Nach Zugabe von einigen Tropfen Piperidin wird die Reaktionsmischung 5 h unter Rühren auf 90 °C erwärmt. Anschließend lässt man die Lösung abkühlen, wobei das Produkt auskristallisiert. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit sehr wenig kaltem Ethanol gewaschen und im Hochvakuum getrocknet.

Abspaltung der Boc-Schutzgruppe:



Die Boc-geschützte Verbindung wird in TFA (10 % in Methylenchlorid) bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Abspaltung der Schutzgruppe gerührt. Das Lösungsmittel wird anschließend unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt mit Diethylether gewaschen.

7.1.2.54.1 6-N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-3-(2,5-dihydroxybenzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on **41b**



Ansatz:

Aminooxindol **40**:

250 mg (1.01 mmol)

2,5-Dihydroxybenzaldehyd **41a**:

139 mg (1.61 mmol);

Ausbeute: 108 mg (0.29 mmol, 29 %), ockergelber Feststoff;

m.p.: 178 °C (Zersetzung);

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄):

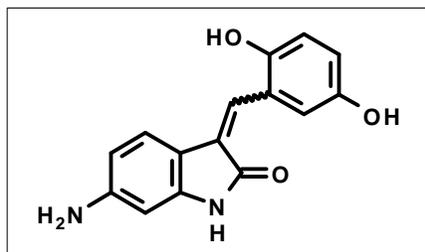
δ = 1.49 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 6.75 – 6.77 (m, 3 H; CH), 7.11 (m, 1 H; CH), 7.21 (s, 1 H; CH), 7.55 (d, ³J(H,H) = 8.34 Hz, 1 H; CH), 7.71 (s, 1 H; CH);

¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-d₄):

δ = 27.52 (CH₃), 79.86 (C), 100.43 (CH), 111.23 (CH), 115.14 (CH), 116.14 (C), 116.49 (CH), 118.31 (CH), 122.36 (C), 123.43 (CH), 126.42 (C), 131.27 (CH), 140.62 (C), 142.82 (C), 149.33 (C), 149.47 (C), 153.56 (C), 171.33 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₂₀H₂₁N₂O₅ [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 369.1450, gemessen: 369.1441;

7.1.2.54.2 6-Amino-3-(2,5-dihydroxybenzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on 41c



Ansatz:

6-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-3-(2,5-dihydroxybenzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on **41b** 90 mg (0.24 mmol);

Ausbeute: quantitativ, dunkelbrauner Feststoff;

m.p.: 159 °C (Zersetzung);

¹H-NMR (500 MHz, Dimethylsulfoxid-d₆):

δ = 6.22 (d, ³J(H,H) = 7.77 Hz, 1 H; CH), 6.27 (s, 1 H; CH), 6.66 (dd, ⁴J(H,H) = 2.64 Hz, ³J(H,H) = 8.65 Hz, 1 H; CH), 6.73 (d, ³J(H,H) = 8.48 Hz, 1 H; CH), 7.01 (d,

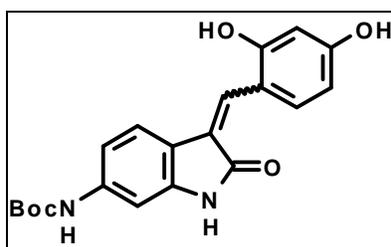
$^4J(\text{H,H}) = 2.82 \text{ Hz}$, 1 H; CH), 7.32 (s, 1 H; CH), 7.38 (d, $^3J(\text{H,H}) = 8.48 \text{ Hz}$, 1 H; CH), 10.32 (s, 1 H; NH);

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Dimethylsulfoxid- d_6):

$\delta = 98.10$ (CH), 108.87 (CH), 115.18 (CH), 117.02 (CH), 118.37 (CH), 122.68 (C), 124.23 (CH), 126.46 (C), 127.43 (CH), 144.55 (C), 149.52 (C), 149.79 (C), 158.58 (C), 153.85 (C), 170.31 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}]^+$): berechnet (m/z): 268.0848, gemessen: 268.0834.

7.1.2.54.3 6-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-3-(2,4-dihydroxybenzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on **42b**



Ansatz:

Aminooxindol 40 :	300 mg (1.21 mmol)
2,4-Dihydroxybenzaldehyd 42a :	167 mg (1.21 mmol);

Ausbeute: 138 mg, (0.38 mmol, 31 %), hellbrauner Feststoff;

m.p.: 180 °C (Zersetzung);

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Methanol- d_4):

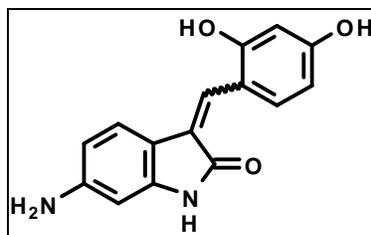
$\delta = 1.48$ (s, 9 H; $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 6.38 (m, 2 H; CH), 6.76 (dd, $^4J(\text{H,H}) = 1.99 \text{ Hz}$, $^3J(\text{H,H}) = 8.35 \text{ Hz}$, 1 H; CH), 7.10 (s, 1 H; CH), 7.54 – 7.57 (m, 2 H; CH), 7.78 (s, 1 H; CH);

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Methanol- d_4):

$\delta = 27.97$ (CH_3), 80.23 (C), 100.56 (CH), 102.48 (CH), 106.91 (CH), 111.31 (CH), 114.01 (C), 116.98 (C), 122.92 (CH), 123.74 (C), 130.94 (CH), 132.48 (CH), 139.60 (C), 142.09 (C), 153.55 (C), 158.33 (C), 160.58 (C), 171.83 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, $C_{20}H_{21}N_2O_5$ $[M+H]^+$): berechnet (m/z): 369.1450, gemessen: 369.1443.

7.1.2.54.4 6-Amino-3-(2,4-dihydroxybenzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on **42c**



Ansatz:

6-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-3-(2,4-dihydroxybenzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on **42b** : 100 mg (0.27 mmol);

Ausbeute: quantitativ, hellbrauner Feststoff;

m.p.: 158 °C (Zersetzung);

¹H-NMR (500 MHz, Methanol- d_4):

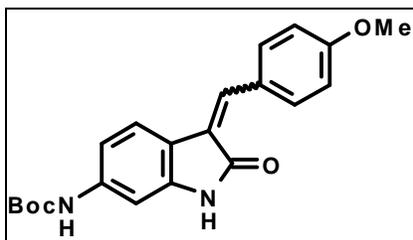
δ = 6.39 – 6.43 (m, 2 H; CH), 6.83 (dd, 4J (H,H) = 1.41 Hz, 3J (H,H) = 8.12 Hz, 1 H; CH), 6.86 (d, 4J (H,H) = 1.51 Hz, 1H; CH), 7.57 (d, 3J (H,H) = 8.83 Hz, 1H; CH), 7.77 (d, 3J (H,H) = 8.13 Hz, 1H; CH), 7.96 (s, 1 H; CH);

¹³C-NMR (125 MHz, Methanol- d_4):

δ = 102.17 (CH), 103.43 (CH), 106.91 (CH), 114.18 (CH), 122.01 (C), 122.99 (C), 123.10 (CH), 130.89 (CH), 134.56 (C), 135.54 (CH), 142.87 (C), 159.07 (C), 160.31 (C), 161.88 (C), 171.09 (C);

MS (190 °C): m/z (%) = 268 (M^+ , 3), 148 (100);

HRMS (EI, 70 eV, $C_{15}H_{12}N_2O_3$ $[M]^+$): berechnet (m/z): 268.0848, gemessen: 268.0851.

7.1.2.54.5 6-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-3-(4-methoxybenzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on 43b**Ansatz:**

Aminooxindol **40**: 300 mg (1.21 mmol)
4-Methoxybenzaldehyd **43a**: 165 mg (1.21 mmol);

Ausbeute: 323 mg (0.88 mmol, 73 %), gelber Feststoff;

m.p.: 234 °C (Zersetzung);

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄):

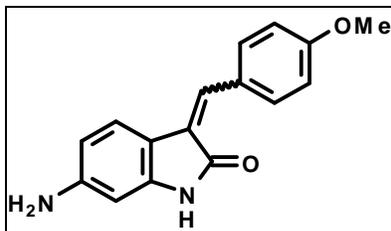
δ = 1.46 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 3.83 (s, 3 H; O(CH₃)), 6.71 (dd, ⁴*J*(H,H) = 1.99 Hz, ³*J*(H,H) = 8.35 Hz, 1 H; CH), 6.93 (m, 2 H; CH), 7.09 (s, 1 H; CH), 7.54 – 7.59 (m, 4 H; CH, CH);

¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-*d*₄):

δ = 28.12 (CH₃), 55.28 (CH₃), 100.55 (CH), 111.12 (CH), 113.99 (CH), 116.37 (C), 123.08 (CH), 125.48 (C), 127.34 (C), 131.32 (CH), 134.02 (C), 135.28 (CH), 140.05 (C), 142.64 (C), 153.14 (C), 160.66 (C), 171.34 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₂₁H₂₃N₂O₄ [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 367.1658, gemessen: 367.1648.

7.1.2.54.6 6-Amino-3-(4-methoxybenzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on **43c**



Ansatz:

6-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-3-(4-methoxybenzyliden)-
1,3-dihydroindol-2-on **43b**:
mmol);

300 mg (0.82

Ausbeute: quantitativ, brauner Feststoff;

m.p.: 152 °C (Zersetzung);

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄):

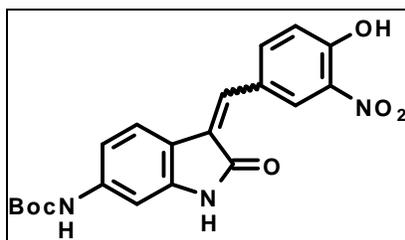
δ = 3.84 (s, 3 H; O(CH₃)), 6.78 (d, ⁴*J* (H,H) = 1.98 Hz, 1 H; CH), 6.93 (dd, ⁴*J* (H,H) = 2.39 Hz, ³*J* (H,H) = 9.14 Hz, 1 H; CH), 7.00 (dd, ⁴*J* (H,H) = 1.99 Hz, ³*J* (H,H) = 8.75 Hz, 2 H; CH), 7.59 – 7.69 (m, 4 H; CH, CH);

¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-*d*₄):

δ = 54.51 (CH₃), 54.54 (CH₃), 102.50 (CH), 102.52 (CH), 103.37 (CH), 113.34 (CH), 113.50 (C), 113.89 (CH), 115.76 (C), 119.17 (C), 119.69 (CH), 122.27 (C), 123.19 (CH), 124.55 (C), 126.68 (C), 126.79 (C), 131.33 (CH), 134.66 (CH), 136.45 (C), 136.91 (CH), 136.94 (CH), 139.09 (CH), 141.02 (C), 143.54 (C), 161.37 (C), 162.22 (C), 168.26 (C), 170.81 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₁₆H₁₅N₂O₂ [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 267.1134, gemessen: 267.1127.

7.1.2.54.7 6-*N*-(tert.-Butoxycarbonyl)-amino-3-(4-hydroxy-3-nitrobenzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on 44b



Ansatz:

Aminooxindol 40 :	400 mg (1.61 mmol)
4-Hydroxy-3-nitrobenzaldehyd 44a :	270 mg (1.61 mmol);

Ausbeute: 371 mg (0.93 mmol, 58 %), dunkelroter Feststoff;

m.p.: 207 °C (Zersetzung);

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄):

δ = 1.51 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 6.79 (dd, ⁴*J* (H,H) = 1.99 Hz, ³*J* (H,H) = 8.75 Hz, 1 H; CH), 6.83 (d, ³*J* (H,H) = 9.14 Hz, 1 H; CH), 7.30 (s, 1 H; CH), 7.44 (s, 1 H; CH), 7.59 (dd, ⁴*J* (H,H) = 2.58 Hz, ³*J* (H,H) = 8.94 Hz, 1 H; CH), 7.71 (d, ³*J* (H,H) = 8.75 Hz, 1 H; CH), 8.35 (d, ⁴*J* (H,H) = 2.38 Hz, 1 H; CH);

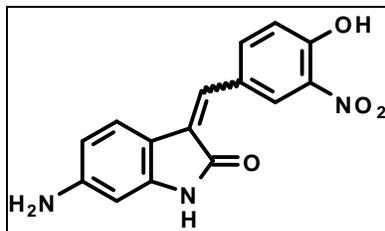
¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-*d*₄):

δ = 27.25 (CH₃), 27.29 (CH₃), 79.62 (C), 100.37 (CH), 111.05 (CH), 116.20 (C), 118.34 (C), 118.50 (CH), 119.60 (C), 120.61 (C), 121.22 (C), 122.54 (CH), 122.81 (C), 124.23 (CH), 124.46 (CH), 128.51 (CH), 131.39 (CH), 134.89 (CH), 135.76 (CH), 135.95 (CH), 137.34 (C), 137.50 (C), 138.34 (CH), 139.95 (C), 140.29 (C), 142.50 (C), 153.51 (C), 153.71 (C), 166.82 (C), 169.24 (C), 171.69 (C);

MS (180 °C): *m/z* (%) = 397 (M⁺, 4), 341 (29), 297 (7), 84 (100), 57 (59);

HRMS (EI, 70 eV, C₂₀H₁₉N₃O₆ [M]⁺): berechnet (*m/z*): 397.1274, gemessen: 397.1277.

7.1.2.54.8 6-Amino-3-(4-hydroxy-3-nitrobenzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on 44c



Ansatz:

6-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-3-(4-hydroxy-3-nitrobenzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on **44b**: 300 mg (0.75 mmol);

Ausbeute: quantitativ, dunkelbrauner Feststoff;

m.p.: 148 °C (Zersetzung);

¹H-NMR (500 MHz, Dimethylsulfoxid-*d*₆):

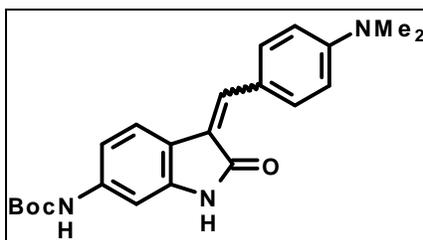
δ = 6.16 (dd, 4J (H,H) = 1.79 Hz, 3J (H,H) = 8.54 Hz, 1 H; CH), 6.22 (d, 4J (H,H) = 1.59 Hz, 1 H; CH), 6.42 (s, 1 H; CH), 6.51 (d, 3J (H,H) = 8.35 Hz, 1 H; CH), 7.14 (s, 1 H; CH), 7.16 (d, 3J (H,H) = 8.75 Hz, 1 H; CH), 7.22 (d, 3J (H,H) = 8.75 Hz, 1 H; CH), 7.33 (d, 3J (H,H) = 8.34 Hz, 1 H; CH), 7.49 (d, 3J (H,H) = 8.75 Hz, 1 H; CH), 7.53 (s, 1 H; CH), 7.80 (dd, 4J (H,H) = 1.79 Hz, 3J (H,H) = 8.54 Hz, 1 H; CH), 8.16 (d, 4J (H,H) = 1.59 Hz, 1 H; CH), 8.40 (dd, 4J (H,H) = 1.98 Hz, 3J (H,H) = 8.74 Hz, 1 H; CH), 9.15 (d, 4J (H,H) = 1.99 Hz, 1 H; CH), 10.37 (s, 1 H; NH), 10.58 (s, 1 H; NH);

¹³C-NMR (125 MHz, Dimethylsulfoxid-*d*₆):

δ = 97.40 (C), 99.68 (C), 108.25 (CH), 111.19 (CH), 115.45 (C), 117.79 (C), 119.10 (CH), 119.82 (CH), 121.23 (CH), 124.05 (CH), 126.21 (CH), 126.37 (C), 126.40 (C), 126.76 (C), 127.29 (CH), 127.85 (C), 128.71 (CH), 131.85 (CH), 136.29 (CH), 137.07 (C), 137.20 (C), 138.82 (CH), 142.32 (C), 145.14 (C), 152.79 (C), 153.53 (C), 158.75 (C), 159.03 (C), 168.33 (C), 170.11 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₁₅H₁₂N₃O₄ [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 298.0828, gemessen: 298.0821.

7.1.2.54.9 6-N-(tert.-Butoxycarbonyl)-amino-3-(4-dimethylamino-benzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on 45b



Ansatz:

Aminooxindol 40 :	300 mg (1.21 mmol)
4-Dimethylaminobenzaldehyd 45a :	180 mg (1.21 mmol);

Ausbeute: 353 mg (0.93 mmol, 77 %), gelber Feststoff;

m.p.: 210 °C (Zersetzung);

¹H-NMR (400 MHz, Dimethylsulfoxid-d₆):

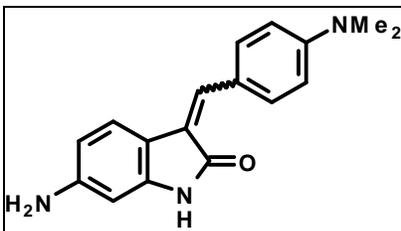
δ = 1.47 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 3.02 (s, 6 H; N(CH₃)₂), 6.80 (d, ³J (H,H) = 9.14 Hz, 2 H; CH), 6.85 (dd, ⁴J (H,H) = 1.99 Hz, ³J (H,H) = 8.35 Hz, 1 H; CH), 7.25 (s, 1 H; CH), 7.35 (s, 1 H; CH), 7.60 (d, ³J (H,H) = 8.74 Hz, 2 H; CH), 7.63 (d, ³J (H,H) = 8.35 Hz, 1 H; CH), 9.47 (s, 1 H; NH), 10.38 (s, 1 H; NH);

¹³C-NMR (100 MHz, Dimethylsulfoxid-d₆):

δ = 28.55 (CH₃), 40.12 (CH₃), 79.71 (C), 100.24 (CH), 110.69 (CH), 112.02 (CH), 116.18 (C), 121.97 (C), 122.62 (CH), 132.04 (CH), 134.91 (CH), 140.66 (C), 143.37 (C), 151.53 (C), 153.02 (C), 170.35 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₂₂H₂₆N₃O₃ [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 380.1974, gemessen: 380.1982.

7.1.2.54.10 6-Amino-3-(4-dimethylamino-benzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on 45c

**Ansatz:**

6-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-3-(4-dimethylamino-benzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on **45b**:

300 mg (0.79 mmol);

Ausbeute: quantitativ, dunkelbrauner Feststoff;

m.p.: 176 °C (Zersetzung);

¹H-NMR (500 MHz, Dimethylsulfoxid-*d*₆):

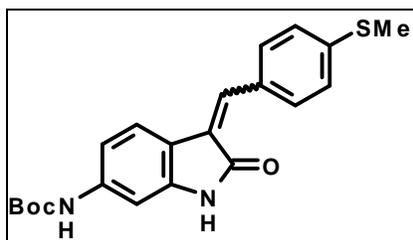
δ = 3.01 (s, 6 H; N(CH₃)₂), 6.51 (m, 1 H; CH), 6.76 (d, ³*J*(H,H) = 9.14 Hz, 1 H; CH), 6.81 (d, ³*J*(H,H) = 8.74 Hz, 2 H; CH), 7.35 (s, 1 H; CH), 7.59 (d, ³*J*(H,H) = 8.74 Hz, 2 H; CH), 7.66 (d, ³*J*(H,H) = 8.35 Hz, 1 H; CH), 10.43 (s, 1 H; NH);

¹³C-NMR (125 MHz, Dimethylsulfoxid-*d*₆):

δ = 40.21 (CH₃), 111.58 (CH), 112.16 (CH), 114.89 (C), 117.20 (C), 119.52 (C), 119.64 (CH), 123.21 (CH), 132.11 (CH), 135.33 (CH), 143.83 (C), 151.45 (C), 158.62 (C), 158.92 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₁₇H₁₈N₃O [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 280.1450, gemessen: 280.1439.

7.1.2.54.11 6-N-(tert.-Butoxycarbonyl)-amino-3-(4-methylsulfanyl-benzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on 46b



Ansatz:

Aminooxindol 40 :	300 mg (1.21 mmol)
4-Methylsulfanylbenzaldehyd 46a :	184 mg (0.16 mL, 1.21 mmol);

Ausbeute: 250 mg (0.65 mmol, 54 %), ockergelber Feststoff;

m.p.: 186 °C (Zersetzung);

¹H-NMR (400 MHz, Dimethylsulfoxid-d₆):

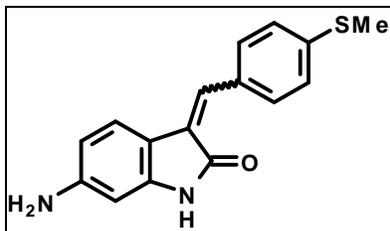
δ = 1.46 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.53 (s, 3 H; S(CH₃)), 6.83 (dd, ⁴J (H,H) = 1.84 Hz, ³J (H,H) = 8.55 Hz, 1 H; CH), 7.27 (m, 1 H; CH), 7.36 (d, ³J (H,H) = 8.54 Hz, 2 H; CH), 7.38 (s, 1 H; CH), 7.49 (d, ³J (H,H) = 8.55 Hz, 1 H; CH), 7.64 (d, ³J (H,H) = 8.24 Hz, 2 H; CH), 9.56 (s, 1 H; NH), 10.51 (s, 1 H; NH);

¹³C-NMR (100 MHz, Dimethylsulfoxid-d₆):

δ = 14.17 (CH₃), 28.07 (CH₃), 79.41 (C), 99.83 (CH), 110.40 (CH), 114.76 (C), 122.89 (CH), 125.42 (CH), 126.44 (C), 129.96 (CH), 130.84 (C), 132.41 (CH), 140.51 (C), 141.29 (C), 143.77 (C), 152.52 (C), 169.33 (C);

MS (220 °C): m/z (%) = 382 (M⁺, 22), 326 (100);

HRMS (EI, 70 eV, C₂₁H₂₂SN₂O₃ [M]⁺): berechnet (m/z): 382.1351, gemessen: 382.1359.

7.1.2.54.12 6-Amino-3-(4-methylsulfanyl-benzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on 46c**Ansatz:**

6-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-3-(4-methylsulfanyl-benzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on **46b**:

200 mg (0.52 mmol);

Ausbeute: quantitativ, brauner Feststoff;

m.p.: 148 °C (Zersetzung);

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄):

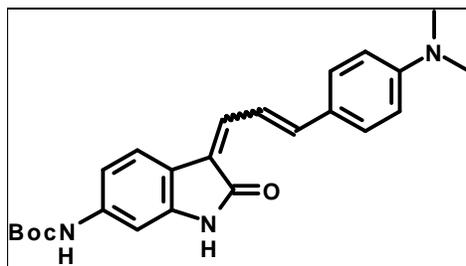
δ = 2.52 (s, 3 H; S(CH₃)), 6.64 (dd, ⁴*J* (H,H) = 2.12 Hz, ³*J* (H,H) = 8.48 Hz, 1 H; CH), 6.72 (d, ⁴*J* (H,H) = 1.77 Hz, 1 H; CH), 7.31 (d, ³*J* (H,H) = 8.12 Hz, 2 H; CH), 7.56 (d, ³*J* (H,H) = 8.24 Hz, 2 H; CH), 7.61 (s, 1 H; CH), 7.64 (d, ³*J* (H,H) = 8.48 Hz, 1 H; CH);

¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-*d*₄):

δ = 14.08 (CH₃), 102.32 (CH), 113.01 (CH), 123.71 (CH), 124.67 (C), 125.47 (CH), 125.96 (C), 129.77 (CH), 130.75 (C), 132.57 (C), 136.15 (CH), 142.08 (C), 143.78 (C), 170.76 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₁₆H₁₅SN₂O [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 283.0905, gemessen: 283.0914.

7.1.2.54.13 6-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-3-[3-(4-dimethylamino-phenyl)-allyliden]-1,3-dihydroindol-2-on 47b



Ansatz:

Aminooxindol 40 :	300 mg (1.21 mmol)
3-(4-Dimethylaminophenyl)propenal 47a :	212 mg (1.21 mmol);

Ausbeute: 152 mg (0.38 mmol, 31 %), roter Feststoff;

m.p.: 205 °C (Zersetzung);

¹H-NMR (500 MHz, Dimethylsulfoxid-d₆):

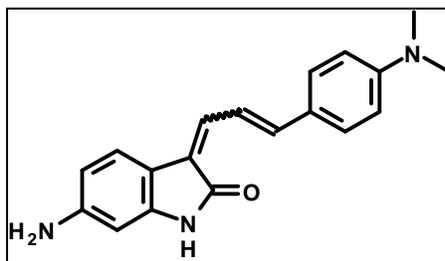
δ = 1.46 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 2.96 (s, 6 H; N(CH₃)₂), 6.73 (d, ³*J* (H,H) = 9.14 Hz, 2 H; CH), 6.91 (dd, ⁴*J* (H,H) = 1.99 Hz, ³*J* (H,H) = 8.35 Hz, 1 H; CH), 6.96 (d, ³*J* (H,H) = 15.50 Hz, 1 H; CH), 7.15 (s, 1 H; CH), 7.29 (d, ³*J* (H,H) = 11.92 Hz, 1 H; CH), 7.34 (d, ³*J* (H,H) = 8.34 Hz, 1 H; CH), 7.38 (d, ³*J* (H,H) = 8.74 Hz, 2 H; CH), 8.18 (dd, ³*J* (H,H) = 11.52 Hz, ³*J* (H,H) = 15.50 Hz, 1 H; CH), 9.40 (s, 1 H; NH), 10.32 (s, 1 H; NH);

¹³C-NMR (125 MHz, Dimethylsulfoxid-d₆):

δ = 28.58 (CH₃), 40.21 (CH₃), 79.61 (C), 99.99 (CH), 111.08 (CH), 112.61 (CH), 118.67 (C), 120.02 (CH), 122.62 (C), 124.51 (C), 129.27 (CH), 135.12 (CH), 140.12 (C), 141.46 (C), 142.71 (CH), 151.41 (C), 153.06 (C), 169.43 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₂₄H₂₈N₃O₃ [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 406.2131, gemessen: 406.2121.

7.1.2.54.14 6-Amino-3-[3-(4-dimethylamino-phenyl)-allyliden]-1,3-dihydroindol-2-on 47c



Ansatz:

6-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-3-[3(4-dimethylamino-phenyl)-allyliden]-1,3-dihydroindol-2-on **47b**:

140 mg (0.35 mmol);

Ausbeute: quantitativ, dunkelbrauner Feststoff;

m.p.: 212 °C (Zersetzung);

¹H-NMR (500 MHz, Dimethylsulfoxid-*d*₆):

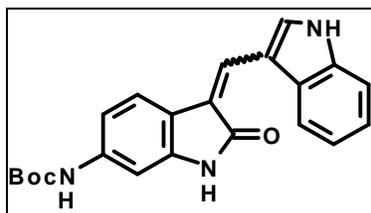
δ = 2.98 (s, 6 H; N(CH₃)₂), 6.68 (m, 1 H; CH), 7.04 (d, ³*J* (H,H) = 15.50 Hz, 1 H; CH), 7.15 (d, ³*J* (H,H) = 11.91 Hz, 1 H; CH), 7.41 (d, ³*J* (H,H) = 8.75 Hz, 2 H; CH), 7.48 (d, ³*J* (H,H) = 7.94 Hz, 1 H; CH), 7.60 (d, ³*J* (H,H) = 8.74 Hz, 2 H; CH), 7.83 (d, ³*J* (H,H) = 7.95 Hz, 1 H; CH), 8.19 (dd, ³*J* (H,H) = 11.72 Hz, ³*J* (H,H) = 15.30 Hz, 1 H; CH), 10.38 (s, 1 H; NH);

¹³C-NMR (125 MHz, Dimethylsulfoxid-*d*₆):

δ = 40.28 (CH₃), 101.46 (CH), 102.50 (CH), 112.54 (CH), 112.77 (CH), 113.64 (CH), 113.67 (CH), 114.89 (C), 117.20 (C), 119.06 (CH), 119.86 (CH), 120.52 (C), 121.67 (C), 122.52 (C), 124.44 (C), 124.53 (C), 124.78 (CH), 129.55 (CH), 130.13 (CH), 134.67 (CH), 137.03 (CH), 141.70 (C), 143.13 (C), 144.11 (CH), 145.54 (CH), 151.48 (C), 151.53 (C), 158.67 (C), 158.96 (C), 169.13 (C), 169.96 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₁₉H₂₀N₃O [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 306.1606, gemessen: 306.1624.

7.1.2.54.15 6-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-3-(1*H*-indol-3-ylmethyl)-1,3-dihydroindol-2-on 48b



Ansatz:

Aminooxindol **40**: 200 mg (0.81 mmol)
 Indol-3-aldehyd **48a**: 117 mg (0.81 mmol);

Ausbeute: 225 mg (0.60 mmol, 74 %), brauner Feststoff;

m.p.: 210 °C (Zersetzung);

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄):

δ = 1.48 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 6.91 (dd, ⁴*J* (H,H) = 1.79 Hz, ³*J* (H,H) = 8.15 Hz, 1 H; CH), 7.10 (s, 1 H; CH), 7.21 (m, 2 H; CH), 7.41 (s, 1 H; CH), 7.46 (d, ³*J* (H,H) = 8.35 Hz, 1 H; CH), 7.85 – 7.86 (m, 2 H; CH); 9.28 (s, 1 H, CH);

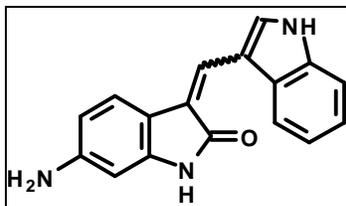
¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-*d*₄):

δ = 28.10 (CH₃), 80.24 (C), 100.41 (CH), 111.63 (C), 111.71 (CH), 111.97 (CH), 117.57 (CH), 118.23 (CH), 118.74 (C), 120.88 (CH), 120.94 (C), 122.53 (CH), 126.58 (CH), 128.32 (C), 133.34 (CH), 136.08 (C), 137.81 (C), 139.09 (C), 153.64 (C), 169.82 (C);

MS (220 °C): *m/z* (%) = 375 (M⁺, 1), 319 (3), 275 (100);

HRMS (EI, 70 eV, C₂₂H₂₁N₃O₃ [M]⁺): berechnet (*m/z*): 375.1583, gemessen: 375.1579.

7.1.2.54.16 6-Amino-3-(1*H*-indol-3-ylmethyl)-1,3-dihydroindol-2-on 48c



Ansatz:

6-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-3-(1*H*-indol-3-ylmethyl)-1,3-dihydroindol-2-on **48b**:

200 mg (0.53 mmol);

Ausbeute: quantitativ, rotbrauner Feststoff;

m.p.: 139 °C (Zersetzung);

¹H-NMR (500 MHz, Dimethylsulfoxid-*d*₆):

δ = 6.56 (s, 1 H; CH), 6.65 (d, ³*J* (H,H) = 8.13 Hz, 1 H; CH), 7.21 (m, 2 H; CH, CH), 7.48 (d, ³*J* (H,H) = 6.71 Hz, 1 H; CH), 7.76 (d, ³*J* (H,H) = 8.13 Hz, 1 H; CH), 8.00 (s, 1;H; CH), 8.10 (d, ³*J* (H,H) = 8.12 Hz, 1 H; CH), 9.35 (s, 1 H; CH), 10.52 (s, 1 H; NH);

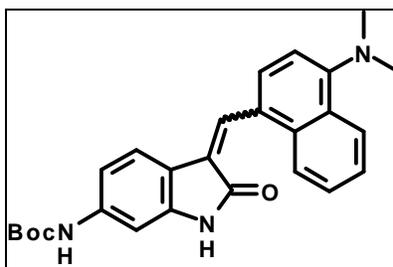
¹³C-NMR (125 MHz, Dimethylsulfoxid-*d*₆):

101.15 (CH), 111.76 (C), 112.37 (CH), 112.70 (CH), 118.80 (CH), 119.12 (C), 120.01 (CH), 121.14 (CH), 122.93 (CH), 126.46 (CH), 128.58 (C), 133.58 (CH), 136.29 (C), 140.52 (C), 158.49 (C), 158.76 (C), 168.82 (C);

MS (220 °C): *m/z* (%) = 276 ([M+H]⁺, 65), 275 (M⁺, 75), 69 (100);

HRMS (EI, 70 eV, C₁₇H₁₃N₃O [M]⁺): berechnet (*m/z*): 275.1059, gemessen: 275.1049.

7.1.2.54.17 6-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-3-(4-dimethylaminonaphthalin-1-ylmethylen)-1,3-dihydroindol-2-on 49b



Ansatz:

Aminoindol **40**: 200 mg (0.81 mmol)
 4-Dimethylamino-1-naphthalaldehyd **49a**: 161 mg (0.81 mmol);

Ausbeute: 80 mg (0.19 mmol, 23 %), orangefarbener Feststoff;

m.p.: 214 °C (Zersetzung);

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*₁):

δ = 1.46 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 2.94 (s, 6 H; N(CH₃)₂), 6.51 (dd, ⁴*J* (H,H) = 1.99 Hz, ³*J* (H,H) = 8.35 Hz, 1 H; CH), 7.95 (d, ³*J* (H,H) = 7.95 Hz, 1 H; CH), 7.17 (s, 1 H, CH), 7.22 (d, ³*J* (H,H) = 8.35 Hz, 1 H; CH), 7.47 – 7.51 (m, 2 H; CH), 7.76 (d, ³*J* (H,H) = 7.95 Hz, 1 H; CH), 7.98 (dd, ⁴*J* (H,H) = 1.59 Hz, ³*J* (H,H) = 7.55 Hz, 1 H; CH), 8.12 (s, 1 H; CH), 8.23 (dd, ⁴*J* (H,H) = 2.38 Hz, ³*J* (H,H) = 7.55 Hz, 1 H; CH);

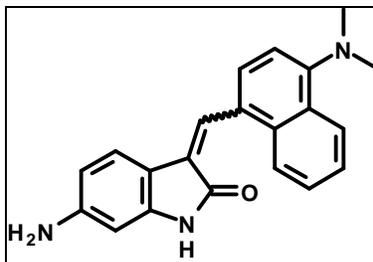
¹³C-NMR (125 MHz, Chloroform-*d*₁):

δ = 28.20 (CH₃), 44.97 (CH₃), 80.81 (C), 100.32 (CH), 110.99 (CH), 112.73 (CH), 116.69 (C), 123.51 (CH), 124.84 (CH), 125.22 (CH), 125.47 (CH), 126.15 (C), 126.62 (CH), 127.16 (C), 127.60 (CH), 128.37 (C), 132.99 (C), 133.61 (CH), 139.69 (C), 142.55 (C), 152.70 (C), 152.84 (C), 170.72 (C);

MS (220 °C): *m/z* (%) = 429 (M⁺, 28), 373 (48), 194 (41), 57 (100);

HRMS (EI, 70 eV, C₂₆H₂₇N₃O₃ [M]⁺): berechnet (*m/z*): 429.2052, gemessen: 429.2045.

7.1.2.54.18 6-Amino-3-(4-dimethylaminonaphthalin-1-ylmethyl)-1,3-dihydroindol-2-on 49c



Ansatz:

6-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-3-(4-dimethylamino-naphthalin-1-ylmethyl)-1,3-dihydroindol-2-on **49b**:

60 mg (0.14 mmol);

Ausbeute: quantitativ, rotbrauner Feststoff;

m.p.: 168 °C (Zersetzung);

¹H-NMR (400 MHz, Dimethylsulfoxid-*d*₆):

δ = 2.92 (s, 6 H; N(CH₃)₂), 6.13 (dd, ⁴*J* (H,H) = 1.98 Hz, ³*J* (H,H) = 8.34 Hz, 1 H; CH), 6.32 (d, ⁴*J* (H,H) = 1.98 Hz, 1 H; CH), 7.01 (d, ³*J* (H,H) = 8.35 Hz, 1 H; CH), 7.21 (d, ³*J* (H,H) = 7.94 Hz, 1 H; CH), 7.54 – 7.60 (m, 2 H; CH), 7.72 (s, 1 H; CH), 7.78 (d, ³*J* (H,H) = 7.95 Hz, 1 H; CH), 7.95 (d, ³*J* (H,H) = 7.55 Hz, 1 H; CH), 8.21 (d, ³*J* (H,H) = 7.55 Hz, 1 H; CH), 10.47 (s, 1 H; NH);

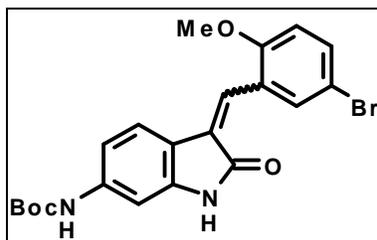
¹³C-NMR (100 MHz, Dimethylsulfoxid-*d*₆):

δ = 45.23 (CH₃), 98.55 (CH), 109.26 (CH), 113.84 (CH), 114.92 (C), 117.24 (C), 123.97 (CH), 125.03 (CH), 125.32 (CH), 126.11 (CH), 126.72 (C), 127.24 (CH), 127.82 (CH), 128.04 (C), 128.33 (CH), 132.78 (C), 144.75 (C), 151.60 (C), 158.60 (C), 169.91 (C);

MS (190 °C): *m/z* (%) = 330 ([M+H]⁺, 88), 329 (M⁺, 59), 69 (100);

HRMS (EI, 70 eV, C₂₁H₁₉N₃O [M]⁺): berechnet (*m/z*): 329.1528, gemessen: 329.1526.

7.1.2.54.19 6-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-3-(5-bromo-2-methoxybenzyl)-1,3-dihydroindol-2-on 50b



Ansatz:

Aminooxindol **40**: 300 mg (1.21 mmol)
 5-Bromo-ortho-anisaldehyd **50a**: 260 mg (1.21 mmol);

Ausbeute: 382 mg (0.86 mmol, 71 %), gelber Feststoff;

m.p.: 216 °C (Zersetzung);

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄):

δ = 1.48 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 3.83 (s, 3 H; O(CH₃)), 6.76 (dd, ⁴*J* (H,H) = 1.99 Hz, ³*J* (H,H) = 8.74 Hz, 1 H; CH), 6.87 (d, ³*J* (H,H) = 9.14 Hz, 1 H; CH), 7.12 (s, 1 H; CH), 7.34 (d, ³*J* (H,H) = 8.35 Hz, 1 H; CH), 7.46 (dd, ⁴*J* (H,H) = 2.38 Hz, ³*J* (H,H) = 8.74 Hz, 1 H; CH), 7.59 (s, 1 H; CH), 7.76 (d, ⁴*J* (H,H) = 2.39 Hz, 1 H; CH);

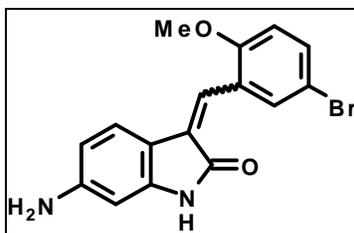
¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-*d*₄):

δ = 27.95 (CH₃), 55.54 (CH₃), 80.37 (C), 100.61 (CH), 111.37 (CH), 112.06 (C), 112.72 (CH), 115.75 (C), 123.25 (CH), 125.83 (C), 128.06 (C), 129.04 (CH), 131.93 (CH), 133.43 (CH), 140.93 (C), 143.16 (C), 153.41 (C), 157.09 (C), 170.84 (C);

MS (220 °C): *m/z* (%) = 446 (27), 444 (M⁺, 24), 390 (56), 388 (57), 57 (100);

HRMS (EI, 70 eV, C₂₁H₂₁BrN₂O₄ [M]⁺): berechnet (*m/z*): 444.0684, gemessen: 444.0710.

7.1.2.54.20 6-Amino-3-(5-bromo-2-methoxybenzyl)-1,3-dihydroindol-2-on 50c



Ansatz:

6-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-3-(5-bromo-2-methoxybenzyl)-1,3-dihydroindol-2-on **50b**: 300 mg (0.67 mmol);

Ausbeute: quantitativ, ockergelber Feststoff;

m.p.: 147 °C (Zersetzung);

¹H-NMR (500 MHz, Dimethylsulfoxid-*d*₆):

δ = 3.81 (s, 3 H; O(CH₃)), 6.11 (dd, ⁴*J* (H,H) = 1.59 Hz, ³*J* (H,H) = 8.30 Hz, 1 H; CH), 6.20 (d, ⁴*J* (H,H) = 1.37 Hz, 1 H; CH), 7.05 – 7.07 (m, 2 H; CH, CH), 7.13 (s, 1 H; CH), 7.54 (dd, ⁴*J* (H,H) = 2.12 Hz, ³*J* (H,H) = 8.83 Hz, 1 H; CH), 7.70 (s, 1 H; CH), 10.35 (s, 1 H; NH);

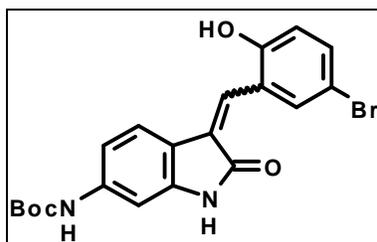
¹³C-NMR (125 MHz, Dimethylsulfoxid-*d*₆):

δ = 56.34 (CH₃), 97.27 (CH), 108.10 (CH), 110.61 (C), 111.82 (C), 114.18 (CH), 123.29 (CH), 123.83 (CH), 126.54 (C), 128.88 (C), 131.70 (CH), 133.15 (CH), 145.15 (C), 149.35 (C), 157.05 (C), 169.92 (C);

MS (180 °C): *m/z* (%) = 345 ([M+H]⁺, 43), 344 (M⁺, 61), 330 (39), 329 (38), 160 (77), 43 (100);

HRMS (EI, 70 eV, C₁₆H₁₃BrN₂O₂ [M]⁺): berechnet (*m/z*): 344.0161, gemessen: 344.0153.

7.1.2.54.21 6-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-3-(5-bromo-2-hydroxybenzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on 51b



Ansatz:

Aminooxindol 40 :	300 mg (1.21 mmol)
5-Bromo-2-hydroxybenzaldehyd 51a :	243 mg (1.21 mmol);

Ausbeute: 198 mg (0.46 mmol, 38 %), gelber Feststoff;

m.p.: 211 °C (Zersetzung);

¹H-NMR (400 MHz, Dimethylsulfoxid-d₆):

δ = 1.47 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 6.84 (m, 1 H, CH), 6.91 (d, ³*J* (H,H) = 8.55 Hz, 1 H; CH), 7.25 – 7.27 (m, 2 H; CH, CH), 7.38 (s, 1 H; CH), 7.43 (dd, ⁴*J* (H,H) = 2.44 Hz, ³*J* (H,H) = 8.54 Hz, 1 H; CH), 7.68 (d, ⁴*J* (H,H) = 2.14 Hz, 1 H; CH), 9.57 (s, 1 H; NH), 10.53 (s, 1 H; NH);

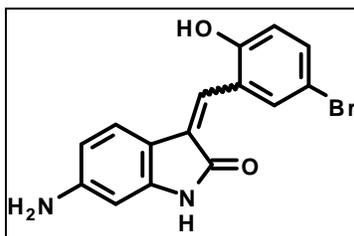
¹³C-NMR (100 MHz, Dimethylsulfoxid-d₆):

δ = 28.08 (CH₃), 99.92 (CH), 109.55 (C), 110.34 (CH), 114.77 (C), 118.12 (CH), 122.67 (CH), 124.00 (C), 127.33 (CH), 127.52 (C), 131.35 (CH), 133.29 (CH), 141.41 (C), 143.84 (C), 152.53 (C), 155.70 (C), 169.07 (C);

MS (180 °C): *m/z* (%) = 430 (M⁺, 2), 44 (100);

HRMS (EI, 70 eV, C₂₀H₁₉BrN₂O₄ [M]⁺): berechnet (*m/z*): 430.0528, gemessen: 430.0538.

**7.1.2.54.22 6-Amino-3-(5-bromo-2-hydroxybenzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on
51c**



Ansatz:

6-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-3-(5-bromo-2-hydroxybenzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on **51b**: 150 mg (0.35 mmol);

Ausbeute: quantitativ, dunkelbrauner Feststoff;

m.p.: 113 °C (Zersetzung);

¹H-NMR (400 MHz, Dimethylsulfoxid-*d*₆):

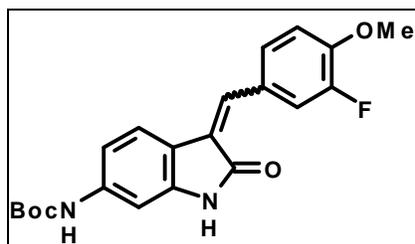
δ = 6.23 (d, ³*J* (H,H) = 8.24 Hz, 1 H; CH), 6.30 (d, ⁴*J* (H,H) = 1.22 Hz, 1 H; CH), 6.90 (d, ³*J* (H,H) = 8.55 Hz, 1 H; CH), 7.19 (d, ³*J* (H,H) = 8.24 Hz, 1 H; CH), 7.23 (s, 1 H; CH), 7.39 (dd, ⁴*J* (H,H) = 2.44 Hz, ³*J* (H,H) = 8.54 Hz, 1 H; CH), 7.66 (d, ⁴*J* (H,H) = 2.44 Hz, 1 H; CH), 10.40 (s, 1 H; NH);

¹³C-NMR (100 MHz, Dimethylsulfoxid-*d*₆):

δ = 97.84 (CH), 108.60 (CH), 109.60 (C), 117.98 (CH), 123.39 (CH), 124.46 (CH), 127.56 (C), 131.25 (CH), 132.77 (CH), 144.50 (C), 155.43 (C), 158.12 (C), 158.49 (C), 169.45 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₁₅H₁₂BrN₂O₂ [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 331.0082, gemessen: 331.0074.

7.1.2.54.23 6-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-3-(3-fluoro-4-methoxybenzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on 52b



Ansatz:

Aminooxindol 40 :	400 mg (1.61 mmol)
3-Fluoro-4-methoxybenzaldehyd 52a :	249 mg (1.61 mmol);

Ausbeute: 433 mg (1.13 mmol, 70 %), ockergelber Feststoff;

m.p.: 213 °C (Zersetzung);

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄):

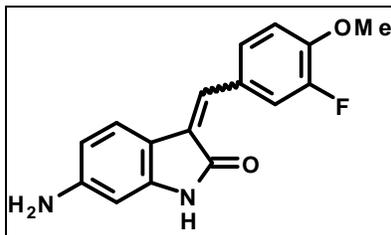
δ = 1.49 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 3.93 (s, 3 H; O(CH₃)), 6.77 (dd, ⁴*J* (H,H) = 1.98 Hz, ³*J* (H,H) = 8.34 Hz, 1 H; CH), 7.15 (s, 1 H; CH), 7.36 – 7.42 (m, 2 H; CH), 7.45 (s, 1 H; CH), 7.52 (s, 1 H; CH), 7.54 (d, ³*J* (H,H) = 8.34 Hz, 1 H; CH);

¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-*d*₄):

δ = 27.90 (CH₃), 55.94 (CH₃), 80.31 (C), 100.71 (CH), 111.34 (CH), 113.20 (CH), 115.73 (C), 116.71 (d, ²*J* (C,F) = 18.38 Hz, CH), 123.11 (CH), 126.33 (CH), 126.75 (C), 127.84 (C), 127.89 (C), 133.28 (CH), 140.85 - 143.11 (d, ¹*J* (C,F) = 285 Hz, C), 148.69 (d, ²*J* (C,F) = 11.42 Hz, C), 150.96 (C), 153.46 (C), 171.19 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₂₁H₂₂FN₂O₄ [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 385.1564, gemessen: 385.1550.

**7.1.2.54.24 6-Amino-3-(3-fluoro-4-methoxybenzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on
52c**



Ansatz:

6-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-3-(3-fluoro-4-methoxybenzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on **52b**: 400 mg (1.04 mmol);

Ausbeute: quantitativ, dunkelbrauner Feststoff;

m.p.: 151 °C (Zersetzung);

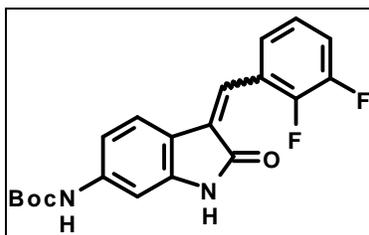
¹H-NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄):

δ = 3.93 (s, 3 H; O(CH₃)), 6.76 (s, 1 H; CH), 7.36 (m, 1 H; CH), 7.41 (d, ³*J* (H,H) = 12.01 Hz, 1 H; CH), 7.47 (d, ³*J* (H,H) = 8.48 Hz, 1 H; CH), 7.56 (s, 1 H; CH), 7.66 – 7.60 (m, 2 H; CH);

¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-*d*₄):

δ = 55.39 (CH₃), 102.25 (CH), 113.27 (CH), 116.52 (d, ²*J* (C,F) = 19.30 Hz, CH), 123.36 (CH), 123.56 (C), 125.87 (C), 126.37 (CH), 134.94 (CH), 137.79 (CH), 141.38 (C), 143.90 (C), 149.19 (d, ²*J* (C,F) = 10.67 Hz, C), 150.96 – 152.92 (d, ¹*J* (C,F) = 246 Hz, C), 168.10 (C), 170.53 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₁₆H₁₄FN₂O₂ [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 285.1039, gemessen: 285.1023.

7.1.2.54.25 6-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-3-(2,3-difluorbenzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on 53b**Ansatz:**

Aminoindol **40**: 300 mg (1.21 mmol)
2,3-Difluorobenzaldehyd **53a**: 172 mg (1.21 mmol);

Ausbeute: 311 mg (0.83 mmol, 69 %), gelber Feststoff;

m.p.: 203 °C (Zersetzung);

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄):

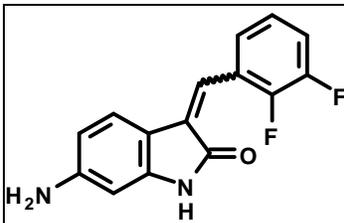
δ = 1.48 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 6.73 (d, ³*J* (H,H) = 8.35 Hz, 1 H; CH), 7.14 – 7.25 (m, 4 H; CH, CH), 7.43 (t, ³*J* (H,H) = 6.76 Hz, 1 H; CH), 7.48 (s, 1 H; CH);

¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-*d*₄):

δ = 27.94 (CH₃), 80.43 (C), 100.64 (CH), 111.39 (CH), 115.22 (C), 118.02 (d, ²*J* (C,F) = 17.24 Hz, CH), 123.69 (CH), 124.10 (CH), 124.64 (CH), 124.94 (CH), 125.39 (d, ²*J* (C,F) = 11.30 Hz, C), 130.29 (C), 141.52 (C), 143.65 (C), 148.44 (dd, ²*J* (C,F) = 11.87 Hz, ¹*J* (C,F) = 251.07 Hz, C), 150.85 (dd, ²*J* (C,F) = 12.07 Hz, ¹*J* (C,F) = 248.43 Hz, C), 153.35 (C), 170.33 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₂₀H₁₉F₂N₂O₃ [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 373.1364, gemessen: 373.1347.

7.1.2.54.26 6-Amino-3-(2,3-difluorbenzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on 53c

**Ansatz:**

6-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-3-(2,3-difluorbenzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on **53b**: 250 mg (0.67 mmol);

Ausbeute: quantitativ, grünbrauner Feststoff;

m.p.: 153 °C (Zersetzung);

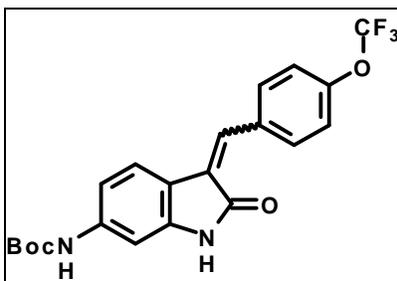
¹H-NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄):

δ = 6.54 (dd, ⁴*J* (H,H) = 2.18 Hz, ³*J* (H,H) = 8.15 Hz, 1 H; CH), 6.62 (s, 1 H; CH), 7.22 – 7.30 (m, 2 H; CH), 7.32 – 7.36 (m, 1 H; CH) 7.46 – 7.49 (m, 1 H; CH), 7.62 (s, 1 H; CH);

¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-*d*₄):

δ = 101.15 (CH), 112.03 (CH), 115.36 (C), 118.08 (d, ²*J* (C,F) = 16.54 Hz, CH), 124.16 (CH), 124.27 (CH), 124.53 (C), 124.98 (CH), 125.16 (d, ²*J* (C,F) = 11.41 Hz, C), 129.97 (CH), 144.51 (C), 148.13 (dd, ²*J* (C,F) = 18.69 Hz, ¹*J* (C,F) = 231. Hz, C), 149.22 (C), 150.84 (dd, ²*J* (C,F) = 10.39 Hz, ¹*J* (C,F) = 246 Hz, C), 169.95 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₁₅H₁₁F₂N₂O [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 273.0839, gemessen: 273.0829.

7.1.2.54.27 6-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-3-(4-trifluormethoxybenzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on 54b**Ansatz:**

Aminooxindol **40**: 300 mg (1.21 mmol)
4-Trifluormethoxybenzaldehyd **54a**: 230 mg (1.21 mmol);

Ausbeute: 335 mg (0.80 mmol, 66 %), gelber Feststoff;

m.p.: 224 °C (Zersetzung);

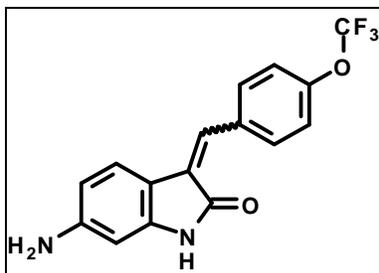
¹H-NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄):

δ = 1.50 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 6.74 (dd, ⁴*J* (H,H) = 2.07 Hz, ³*J* (H,H) = 8.42 Hz, 1 H; CH), 7.21 (d, ⁴*J* (H,H) = 1.71 Hz, 1 H; CH), 7.32 (d, ³*J* (H,H) = 8.05 Hz, 2 H; CH), 7.40 (d, ³*J* (H,H) = 8.54 Hz, 1 H; CH), 7.52 (s, 1 H; CH), 7.70 (d, ³*J* (H,H) = 8.30 Hz, 2 H; CH);

¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-*d*₄):

δ = 28.59 (CH₃), 54.21 (C), 81.01 (C), 101.58 (CH), 112.16 (CH), 116.20 (C), 121.68 (CH), 124.06 (CH), 129.30 (C), 131.70 (CH), 133.09 (CH), 134.80 (C), 142.30 (C), 144.41 (C), 150.34 (C), 154.36 (C), 171.72 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₂₁H₂₀F₃N₂O₄ [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 421.1375, gemessen: 421.1387.

7.1.2.54.28 6-Amino-3-(4-trifluormethoxybenzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on 54c**Ansatz:**

6-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-3-(4-trifluormethoxybenzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on **54b**:

300 mg (0.71 mmol);

Ausbeute: quantitativ, dunkelbrauner Feststoff;

m.p.: 121 °C (Zersetzung);

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄):

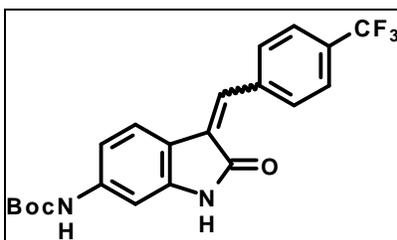
δ = 6.69 (s, 1 H; CH), 7.37 (d, ³*J* (H,H) = 8.79 Hz, 2 H; 2 × CH), 7.50 (m, 1 H; CH), 7.62 (s, 1 H; CH), 7.73 (d, ³*J* (H,H) = 8.79 Hz, 2 H; 2 × CH), 8.37 (d, ³*J* (H,H) = 7.22 Hz, 1 H; CH);

¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-*d*₄):

δ = 101.93 (CH), 120.88 (CH), 121.47 (C), 123.70 (CH), 126.20 (C), 127.80 (C), 130.87 (CH), 132.58 (C), 133.69 (CH), 133.75 (CH), 144.25 (C), 149.63 (C), 170.36 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₁₆H₁₂F₃N₂O₂ [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 321.0851, gemessen: 321.0862.

7.1.2.54.29 6-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-3-(4-trifluormethylbenzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on 55b



Ansatz:

Aminooxindol 40 :	300 mg (1.21 mmol)
4-Trifluormethylbenzaldehyd 55a :	211 mg (1.21 mmol);

Ausbeute: 298 mg (0.74 mmol, 61 %), gelber Feststoff;

m.p.: 228 °C (Zersetzung);

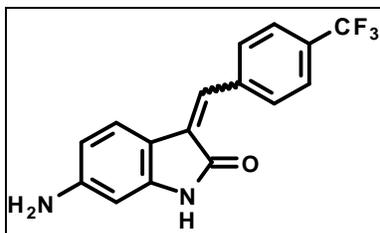
¹H-NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄):

δ = 1.48 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 6.70 (dd, ⁴*J* (H,H) = 1.99 Hz, ³*J* (H,H) = 8.34 Hz, 1 H; CH), 7.16 (s, 1H; CH), 7.33 (d, ³*J* (H,H) = 8.34 Hz, 1 H; CH), 7.47 (s, 1 H; CH), 7.68 (d, ³*J* (H,H) = 8.34 Hz, 2 H; CH), 7.72 (d, ³*J* (H,H) = 7.95 Hz, 2 H; CH);

¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-*d*₄):

δ = 27.96 (CH₃), 80.46 (C), 100.70 (CH), 111.33 (CH), 115.25 (C), 120.63-126.96 (q, ¹*J* (C,F) = 271 Hz, CF₃), 123.46 (CH), 125.43 (q, ³*J* (C,F) = 3.67 Hz, CH), 129.31 (C), 129.39 (CH), 130.56 – 130.84 (q, ²*J* (C,F) = 32.18 Hz, C), 131.94 (CH), 138.91 (C), 141.44 (C), 143.63 (C), 153.34 (C), 170.67 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₂₁H₂₀F₃N₂O₃ [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 405.1426, gemessen: 405.1451.

7.1.2.54.30 6-Amino-3-(4-trifluormethylbenzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on 55c**Ansatz:**

6-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-3-(4-trifluormethylbenzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on **55b**:

250 mg (0.62 mmol);

Ausbeute: quantitativ, dunkelbrauner Feststoff;

m.p.: 131 °C (Zersetzung);

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄):

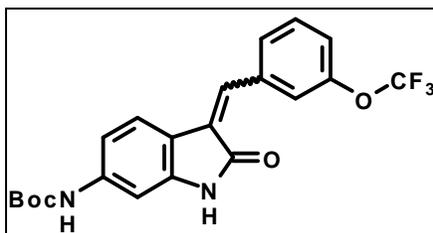
δ = 6.60 (s, 1 H; CH), 7.40 (s, 1H; CH), 7.59 (s, 1 H; CH), 7.65 (m, 1 H; CH), 7.73 (d, ³*J*(H,H) = 8.48 Hz, 2 H; CH), 7.76 (d, ³*J*(H,H) = 7.16 Hz, 2 H; CH);

¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-*d*₄):

δ = 101.15 (CH), 120.68-127.16 (q, ¹*J*(C,F) = 271 Hz, CF₃), 123.96 (CH), 124.07 (C), 124.70 (C), 125.39-125.48 (q, ³*J*(C,F) = 3.68 Hz, CH), 128.94 (C), 129.37 (CH), 130.34-131.11 (q, ²*J*(C,F) = 31.48 Hz, C), 131.75 (CH), 132.46 (CH), 138.87 (C), 144.44 (C), 170.41 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₁₆H₁₂F₃N₂O [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 305.0902, gemessen: 305.0893.

7.1.2.54.31 6-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-3-(3-trifluormethoxybenzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on 56b



Ansatz:

Aminooxindol **40**: 200 mg (0.81 mmol)
 3-Trifluormethoxybenzaldehyd **56a**: 153 mg (0.81 mmol);

Ausbeute: 311 mg (0.74 mmol, 92 %), gelbbrauner Feststoff;

m.p.: 216 °C (Zersetzung);

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄):

δ = 1.43 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 6.67 (dd, ⁴*J* (H,H) = 2.20 Hz, ³*J* (H,H) = 8.48 Hz, 1 H; CH), 7.13 (s, 1 H; CH), 7.20 (d, ³*J* (H,H) = 8.05 Hz, 1 H; CH), 7.31 (d, ³*J* (H,H) = 8.47 Hz, 1 H; CH), 7.42 – 7.51 (m, 4 H; CH);

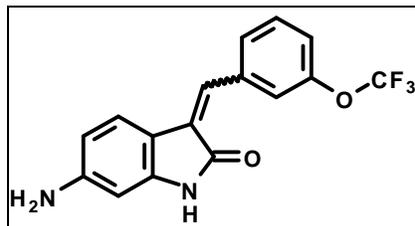
¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-*d*₄):

δ = 29.61 (CH₃), 82.03 (C), 102.55 (CH), 113.09 (CH), 117.01 (C), 123.00 (CH), 123.32 (CH), 125.16 (CH), 129.57 (CH), 130.79 (C), 132.06 (CH), 133.64 (CH), 139.07 (C), 143.41 (C), 145.49 (C), 151.09 (q, ³*J* (C,F) = 1.90 Hz, C), 155.31 (C), 172.59 (C);

MS (160 °C): *m/z* (%) = 420 (M⁺, 18), 364 (100), 320 (227), 57 (55);

HRMS (EI, 70 eV, C₂₁H₁₉F₃N₂O₄ [M]⁺): berechnet (*m/z*): 420.1297, gemessen: 420.1299.

7.1.2.54.32 6-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-amino-3-(3-trifluormethoxybenzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on 56c



Ansatz:

6-*N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-amino-3-(3-trifluormethoxybenzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on **56b**:

250 mg (0.60 mmol);

Ausbeute: quantitativ, rotbrauner Feststoff;

m.p.: 136 °C (Zersetzung);

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄):

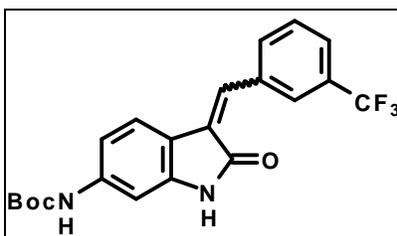
δ = 6.51 (dd, 4J (H,H) = 2.05 Hz, 3J (H,H) = 8.32 Hz, 1 H; CH), 6.61 (d, 4J (H,H) = 1.57 Hz, 1 H; CH), 7.35 (dd, 4J (H,H) = 0.78 Hz, 3J (H,H) = 8.01 Hz, 1 H; CH), 7.41 (d, 3J (H,H) = 8.48 Hz, 1 H; CH), 7.50 – 7.64 (m, 4 H; CH);

¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-*d*₄):

δ = 100.77 (CH), 102.75 (CH), 111.51 (CH), 114.32 (CH), 115.80 (C), 119.52 (C), 120.94 (CH), 121.06 (CH), 121.47 (CH), 122.43 (CH), 123.66 (CH), 123.76 (CH), 127.72 (CH), 128.54 (C), 129.41 (CH), 130.37 (CH), 130.74 (CH), 131.88 (CH), 135.69 (CH), 135.91 (C), 137.28 (C), 141.57 (C), 142.21 (C), 144.47 (C), 148.93 (C), 149.27 (C), 167.87 (C), 170.35 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₁₆H₁₂F₃N₂O₂ [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 321.0851, gemessen: 321.0859.

7.1.2.54.33 6-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-3-(3-trifluormethylbenzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on 57b



Ansatz:

Aminoindol 40 :	200 mg (0.81 mmol)
3-Trifluormethylbenzaldehyd 57a :	141 mg (0.81 mmol);

Ausbeute: 265 mg (0.66 mmol, 81 %), gelber Feststoff;

m.p.: 216 °C (Zersetzung);

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄):

δ = 1.43 (s, 9 H; C(CH₃)₃), 6.67 (dd, ⁴*J* (H,H) = 2.20 Hz, ³*J* (H,H) = 8.48 Hz, 1 H; CH), 7.14 (s, 1 H; CH), 7.25 (d, ³*J* (H,H) = 8.48 Hz, 1 H; CH), 7.48 (s, 1 H; CH), 7.53 – 7.60 (m, 2 H; CH), 7.75 (d, ³*J* (H,H) = 7.53 Hz, 1 H; CH), 7.82 (s, 1 H; CH);

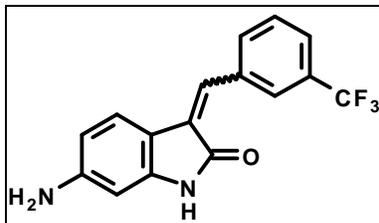
¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-*d*₄):

δ = 29.62 (CH₃), 82.06 (C), 102.60 (CH), 113.13 (CH), 116.99 (C), 124.99 (CH), 127.38 – 127.50 (m, 2 × CH), 131.01 (CH), 131.14 (C), 132.37 – 133.14 (q, ²*J* (H,H) = 32.42 Hz, C), 133.61 (CH), 134.29 (CH), 137.91 (C), 143.51 (C), 145.59 (C), 155.32 (C), 172.56 (C);

MS (170 °C): *m/z* (%) = 404 (M⁺, 17), 348 (100), 304 (22), 57 (42);

HRMS (EI, 70 eV, C₂₁H₁₉F₃N₂O₃ [M]⁺): berechnet (*m/z*): 404.1348, gemessen: 404.1343.

7.1.2.54.34 6-Amino-3-(3-trifluormethylbenzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on 57c



Ansatz:

6-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-3-(3-trifluormethylbenzyliden)-1,3-dihydroindol-2-on **57b**:

200 mg (0.50 mmol);

Ausbeute: quantitativ, dunkelbrauner Feststoff;

m.p.: 152 °C (Zersetzung);

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄):

δ = 6.59 (dd, 4J (H,H) = 1.89 Hz, 3J (H,H) = 8.17 Hz, 1 H; CH), 6.71 (d, 4J (H,H) = 2.20 Hz, 1 H; CH), 7.39 (t, 3J (H,H) = 4.24 Hz, 1 H; CH), 7.63 (s, 1 H; CH), 7.68 (d, 3J (H,H) = 7.85 Hz, 1 H; CH), 7.72 (m, 1 H; CH), 7.88 (m, 1 H; CH), 7.90 (s, 1 H; CH);

¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-*d*₄):

δ = 29.62 (CH₃), 82.06 (C), 102.60 (CH), 113.13 (CH), 116.99 (C), 124.99 (CH), 127.38 – 127.50 (m, 2 × CH), 131.01 (CH), 131.14 (C), 132.37 – 133.14 (q, 2J (H,H) = 32.42 Hz, C), 133.61 (CH), 134.29 (CH), 137.91 (C), 143.51 (C), 145.59 (C), 155.32 (C), 172.56 (C);

HRMS (FAB, 70 eV, C₁₆H₁₂F₃N₂O [M+H]⁺): berechnet (*m/z*): 305.0902, gemessen: 305.0920.

7.2 Biologischer Teil

7.2.1 Material

7.2.1.1 Bezugsquellen für Materialien, Reagenzien und Chemikalien

Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (PY20, Maus, HRP-gekoppelt)	Calbiochem, San Diego (USA)
ATP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Biotin- <i>N</i> -succinimidylester	Fluka, Buchs (Schweiz)
BM Chemilumineszens-Substrat (für ELISA)	Roche, Mannheim
BSA (Bovine Serum Albumin)	Calbiochem, San Diego (USA)
Cell Death Detection ELISA ^{PLUS}	Roche, Mannheim
ECGM (Endothelial Cell Growth Medium)	PromoCell, Heidelberg
FCS (Fetal Calf Serum)	PromoCell, Heidelberg
Fibrinogen	Calbiochem, San Diego (USA)
Gewebekulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
Gelatine	Gibco, Karlsruhe
HBSS (Hepes Buffered Saline Solution)	PromoCell, Heidelberg
HEPES	GERBU Biotechnik, Gailberg
HRP-gekoppelter Anti-Biotin-Antikörper	Calbiochem, San Diego (USA)
Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$	Calbiochem, San Diego (USA)
Integrin $\alpha_v\beta_3$	Chemicon, Hofheim
96-Well-Mikrotiterplatten (Lumitrac 600, flat bottom, weiß)	Greiner, Frickenhausen
96-Well-Mikrotiterplatten (steril, flat bottom, klar)	Greiner, Frickenhausen
PBS (Phosphat Buffered Solution)	Gibco, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rezeptortyrosinkinasen (KDR, Flt-4, IGF1-R, EGF-R, ErbB2, Tie2, FGFR-1)	Zentrum für Tumorbilogie, Freiburg
Substrat Poly-Glu-Tyr (4:1)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TNS (Trypsin Neutralizing Solution)	PromoCell, Heidelberg
Tris	Roth, Karlsruhe

Trypsin/EDTA	Gibco, Karlsruhe
Tween	Fluka, Buchs, Schweiz

7.2.1.2 Verwendete Zellstämme

HUVECs	PromoCell, Heidelberg
--------	-----------------------

7.2.1.3 Lösungen, Medien, Puffer

7.2.1.3.1 Festphasen-Rezeptor-Assay

Tris-Puffer	20 mM Tris; 150 mM NaCl; pH = 7.4
Tris+ -Puffer	20 mM Tris; 150 mM NaCl; 1 mM MnCl ₂ ; 1 mM CaCl ₂ ; 1 mM MgCl ₂ ; pH = 7.4
BSA-Lösung	1 % BSA in Tris+
TBST	0.1 % Tween in Tris+
Antikörper-Lösung	HRP-gekoppelter Anti-Biotin-Antikörper (1:1000 in TBST + 0,1% BSA)
Chemolumineszenz-Substrat	Lösung B wird 1:100 in Lösung A verdünnt

7.2.1.3.2 Kultivierung der HUVECs und Apoptose-Assay

Gelatine-Lösung	Aqua dest.; 1.5 % Gelatine; Lösung wird autoklaviert
Fibrinogen-Stammlösung	Fibrinogen (20 mg/mL) in 0.3 M NaCl-Lösung
Nährmedium	Endothelial Cell Growth Medium (ECGM); Supplement- Mix

Cell Death Detection ELISA^{PLUS}, bestehend aus:

Biotin-gekoppelter monoklonaler Anti-Histon-Maus-Antikörper (Anti-Histon-Biotin):
Lyophilisat in 450 µL bidest. Wasser rekonstituieren und
sorgfältig mischen

Peroxidase-konjugierter Anti-DNA-Maus-Antikörper (Anti-DNA-POD):
Lyophilisat in 450 µL bidest. Wasser rekonstituieren und
sorgfältig mischen

Positivkontrolle (DNA-Histon-Komplex):

Lyophilisat in 450 μL bidest. Wasser rekonstituieren und sorgfältig mischen

Inkubationspuffer

Lysis-Puffer

Substrat-Puffer mit ABTS (Substrat)

Immunoreagenz: Anti-Histon-Biotin/Anti-DNA-POD/Inkubationspuffer 1/1/18

Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten mit Abdeckfolie

7.2.1.3.3 in vitro-Rezeptortyrosinkinase-Assay

Kinase-Puffer	100 mM HEPES; 100 mM NaCl; 0.1 mM Na_3VO_4 , pH 7.4;
PBS w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} (10 x)	KCl (2 g/l); KH_2PO_4 (2 g/l); NaCl (80 g/l); Na_2HPO_4 (13,2 g/l)
PBST (10 x)	PBS (10 x) + 0,5 % Tween 20;
Substrat Poly-Glu-Tyr (4:1)	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in PBS
ATP-Stammlösung	10 mM in 40 mM MnCl_2
MnCl_2 -Lösung	40 mM in H_2O bidest.
DMSO-Lösung	3 % bzw. 5 % in H_2O bidest.
Antikörperpuffer	PBST + 0.2 % BSA
Anti-Phosphotyrosin-	
Antikörper (PY20)	Verdünnung von 1:10 000 in Antikörperpuffer
Chemolumineszenz-Substrat	Lösung B wird 1:100 in Lösung A verdünnt

7.2.2 Methoden

7.2.2.1 Festphasen-Rezeptor-Assay

1. Biotinylierung des Fibrinogen:

Das gefriergetrocknete Fibrinogen (100 mg) wird auf 30 °C erwärmt und anschließend in 5 mL 0.3 M NaCl-Lösung (30 °C) gelöst. 300 µL dieser Fibrinogen-Stammlösung werden mit 600 µl 1M NaHCO₃ (pH = 9.6), 5.1 mL H₂O bidest. und 2 mL Biotin (1 mg Biotin / 1 mL DMF) 90 min bei 30 °C inkubiert.

Anschließend wird die Lösung in den mit H₂O bidest. angefeuchteten Dialyseschlauch überführt und der Schlauch in 3 L Tris+ gehängt. Unter leichtem Rühren wird 3 h bei Raumtemperatur dialysiert. Danach werden ausgefallene Bestandteile durch Zentrifugation (5000 g, 5 min) abgetrennt. Der Überstand wird mit 0.005 % Tween 20 versetzt und lässt sich bis zu einer Woche bei 4 °C lagern.

Das nach dieser Methode biotinylierte Fibrinogen enthält ca. 200 - 250 µg Protein/mL, wie durch UV/Vis-Spektroskopie ermittelt wurde.

2. Beschichtung der Platten:

Die Integrine werden in Tris+ gelöst, so dass man folgende Konzentrationen erhält:

$\alpha_v\beta_3$: 0.2 µg/mL

$\alpha_{1b}\beta_3$: 1 µg/mL

Die Mikrotiterplatten werden über Nacht mit dem jeweiligen Integrin (100µL/Well) bei 4 °C beschichtet.

3. Versuchsdurchführung:

Das überschüssige Integrin wird durch Ausschütten entfernt und die freigebliebenen Bindungsstellen mit BSA-Lösung (200 µL/well) geblockt (1 h bei Raumtemperatur). Die BSA-Lösung wird durch Ausschütten entfernt und die Platte zweimal kurz mit TBST gewaschen.

Die Inhibitoren werden in der entsprechenden Konzentration (doppelte Endkonzentration) in Tris+ gelöst. Die Fibrinogen-Lösung wird 1:10 mit Tris+ verdünnt. 50 µL Inhibitor-Lösung und 50 µL der verdünnten Fibrinogen-Lösung werden in jedes Well pipettiert, wonach 2 h bei Raumtemperatur inkubiert wird. Als Positivkontrolle wird anstelle der Inhibitor-Lösung Tris+ zugegeben. Bei der

Negativkontrolle werden anstelle der Inhibitor- und Fibrinogen-Lösung 100 µL Tris+ in das Well gegeben.

Im Anschluss daran werden die Platten nach Entfernung der Lösung zweimal kurz mit TBST gewaschen. Es werden 100 µL/Well Antikörper-Lösung zugegeben, worauf 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wird. Die Lösung wird durch Ausschütten entfernt, gefolgt von dreimaligem Waschen mit TBST (je 5 min).

50 µL/Well Chemolumineszenz-Substrat werden anschließend zugegeben, und die resultierende Lichtemission wird im Luminometer gemessen. Die Werte jeder Inhibitorkonzentration werden dreifach bestimmt und zur Auswertung werden Mittelwert und Standardabweichung der Messwerte ermittelt. Positivkontrollen enthielten keinen Inhibitor und wurden als 100 % gewertet. Das Zyklopentapeptid c(RGDfV) wurde als interner Standard verwendet.

7.2.2.2 Anzucht und Kultivierung von HUVECs

2 – 4 sterile Gewebekulturflaschen werden mit jeweils 3 mL 1.5 %iger Gelatine-Lösung 1 h bei 37 °C beschichtet. Danach wird die überflüssige Gelatine-Lösung abgesaugt und die Flaschen werden mit 3 – 4 mL sterilem PBS gewaschen.

In flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen ($1 - 2 \times 10^6$ Zellen/mL) werden im Wasserbad bei 37 °C unter ständiger Bewegung aufgetaut, bis etwa 95 % der Zellsuspension geschmolzen sind und anschließend auf die beschichteten Flaschen aufgeteilt. Zuvor werden pro Flasche 3 mL ECG-Medium mit 2 % FCS (37 °C) vorgelegt. Die so ausgesäten Zellen werden durch leichtes Schwenken der Kulturflasche gleichmäßig verteilt und bis zum Medienwechsel am darauffolgenden Tag bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Weitere Medienwechsel erfolgen alle 2 – 3 Tage.

7.2.2.3 Subkultivierung (Passagieren) von HUVECs

Erreichen die Zellen eine 90 %ige Konfluenz, so müssen sie subkultiviert, d.h. auf mehrere neue Gewebekulturflaschen aufgeteilt werden. Alle dafür benötigten Lösungen und Medien werden zuvor im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

Die konfluenten HUVECs werden nach Absaugen des Mediums mit jeweils 3 mL HBSS gewaschen und anschließend mit Hilfe von 2 mL Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Flasche abgelöst. Der Vorgang des Trypsinierens wird dabei unter dem Mikroskop beobachtet und bei Abrundung bzw. Ablösung der Zellen vom Boden durch Zugabe von 3 mL TNS gestoppt. Der Ablösevorgang kann durch vorsichtiges

Klopfen an die Seite der Kulturflasche unterstützt werden. Die Zellsuspension wird danach in ein steriles Zentrifugenröhrchen (15 mL) überführt und 5 min bei 2400 rpm zentrifugiert. Das dadurch gebildete Zellpellet wird nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes in frischem Medium suspendiert und zu gleichen Teilen auf 3 - 5 der beschichteten, 3 mL frisches Medium enthaltenden Kulturflaschen aufgeteilt.

Am folgenden Tag wird das Medium nochmals gewechselt, um die bei der Subkultivierung abgestorbenen Zellen zu entfernen.

7.2.2.4 Apoptose-Assay

Die Mikrotiterplatten werden je nach Methode folgendermaßen beschichtet:

- a) 1.5 %ige Gelatine-Lösung, ca. 1 Stunde bei 37°C, 100 µl/Well
- b) 200 µg/mL Fibrinogen in PBS w/o Ca²⁺, Mg²⁺, 18 h bei 4 °C, 100 µl/Well
- c) 200 µg/mL Fibrinogen in PBS w/o Ca²⁺, Mg²⁺, 2 h bei 37 °C, 100 µl/Well

Nach Entfernen der Lösung werden die Platten mit 200 µL/Well sterilem PBS gewaschen. Die konfluenten HUVECs werden nach Absaugen des Mediums mit jeweils 3 mL HBSS gewaschen und anschließend mit Hilfe von 2 mL Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Flasche abgelöst. Der Vorgang des Trypsinierens wird dabei unter dem Mikroskop beobachtet und bei Abrundung bzw. Ablösung der Zellen vom Boden durch Zugabe von 3 mL TNS gestoppt. Der Ablösevorgang kann durch vorsichtiges Klopfen an die Seite der Kulturflasche unterstützt werden. Die Zellsuspension wird danach in ein steriles Zentrifugenröhrchen (15 ml) überführt und 5 min bei 2400 rpm zentrifugiert. Das dadurch gebildete Zellpellet wird nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes in frischem Medium suspendiert und je nach Methode auf eine der folgenden Konzentration verdünnt:

- a) 1×10^5 Zellen/mL
- b) 2.5×10^4 Zellen/mL
- c) 6×10^4 Zellen/mL

Man gibt in jedes Well der MTP 100 µL der Zellsuspension und inkubiert 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂.

Die Testsubstanzen werden im Nährmedium in der entsprechenden Konzentration gelöst. Bei Methode a) und b) wird serumhaltiges, bei Methode c) serumfreies Medium verwendet. Das Nährmedium der Zellen wird entfernt und durch das Medium mit den jeweiligen Inhibitoren ersetzt (100 µl/Well). Man inkubiert weitere 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Im Anschluss daran zentrifugiert man die MTB für 10 min bei 200 × g. Der Überstand wird entfernt und bei 4 °C aufbewahrt für den Fall, dass Nekrose analysiert werden soll. Das Zellpellet wird in 200 µL Lysis-Puffer

resuspendiert, wonach 30 min bei Raumtemperatur inkubiert wird. Das Lysat wird anschließend für 10 min bei $200 \times g$ zentrifugiert und 20 μL des Überstandes (=Zytoplasmafraktion) in die mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte überführt. Als Positivkontrolle wird ein im Test-Kit vorhandener DNA-Histon-Komplex verwendet. Als Negativkontrolle wird der Lysatüberstand unbehandelter Zellen verwendet.

In jedes Well werden 80 μL des Immunreagenzes zugegeben, wonach Inkubation auf einem MTP-Schüttler unter leichtem Schütteln (300 Upm) für 2 h erfolgt. Anschließend wird die Lösung abgesaugt und mit Inkubationspuffer ($3 \times 250 \mu\text{L}$) gewaschen. In jedes Well werden 100 μL ABTS-Lösung gegeben. Dann wird auf einem MTP-Schüttler unter leichtem Schütteln (300 Upm) inkubiert, bis die Farbentwicklung für eine photometrische Analyse (bei 405 nm) ausreicht (ca. 20 min).

7.2.2.5 in vitro Rezeptortyrosinkinase-Assay (RTK-Assay)

Für den Assay werden 96-Well-Mikrotiterplatten (Lumitrac 600) mit 120 μL Substrat (poly-Glutamat-Tyrosin, im Verhältnis 4:1) pro Well für 18 h bei 4 °C beschichtet. Die Inhibitoren werden in den entsprechenden Konzentrationen in einer 5 %igen DMSO-Lösung gelöst.

Insgesamt wird der Assay an folgenden Kinasen durchgeführt:

KDR (VEGFR-2), Flt-4 (VEGFR-3), IGF1-R, EGF-R, ErbB2 (Her2-neu), Tie2 und FGFR-1.

Die Kinasen werden in den in Tabelle 1 angegebenen Konzentrationen in dem Kinase-Puffer gelöst. Die Lösungen werden bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Der Anti-Phosphotyrosin-Antikörper PY wird in einer Verdünnung von 1:10 000 im Antikörperpuffer gelöst und bis zur Verwendung ebenfalls auf Eis gelagert. Das Chemolumineszenz-Substrat wird 15 – 30 min vor Gebrauch durch Verdünnung der Lösung B auf 1:100 in Lösung A hergestellt und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Zu Beginn wird das überschüssige Substrat durch Ausschütten entfernt und die Platten werden zweimal mit PBST (100 μL) gewaschen. Danach werden pro Well jeweils 50 μL der entsprechenden Kinase-Lösung und 25 μL der Inhibitor-Lösung vorgelegt. Durch Zugabe von 25 μL ATP-Lösung wird die Reaktion gestartet und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubiert. Pro Platte werden zusätzlich jeweils eine Positiv- sowie eine Negativ-Kontrolle mitgeführt. Die Positiv-Kontrolle setzt sich dabei aus 50 μL der jeweiligen Kinase-Lösung, 25 μL 5 %iger DMSO-Lösung (ohne Inhibitor) und 25 μL der ATP-Lösung pro Well zusammen und repräsentiert die

Phosphorylierungsrate der Kinase bei 0 % Hemmung. Die Negativ-Kontrolle enthält die gleichen Komponenten mit Ausnahme der ATP-Lösung, welche durch eine 40 mM MnCl_2 -Lösung ersetzt wird. Somit repräsentiert die Negativ-Kontrolle den Hintergrund und kann von den später erhaltenen Ergebnissen abgezogen werden.

Nach 30 min wird die Reaktion durch Ausschütten der Platten gestoppt. Dreimaliges kurzes Waschen mit PBST entfernt dabei letzte Reste des Reaktionsansatzes. Durch Zugabe von 100 μL Antikörper-Lösung pro Well und einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur können die Phosphotyrosin-Reste detektiert werden. Im Anschluss daran werden die Platten nochmals 3 x 5 min mit PBST gewaschen, danach wird die Peroxidase-Reaktion durch Zugabe von 50 μL Chemolumineszenz-Substrat pro Well gestartet. Die Emission von Licht kann nun im Luminometer quantifiziert werden.

Jede Inhibitorkonzentration wird dabei dreifach bestimmt, zur Erstellung der Grafik wird später der Mittelwert sowie die Standardabweichung herangezogen. Durch Vergleich mit der Positiv-Kontrolle (100%) kann die Inhibitionsrate der einzelnen Verbindungen ermittelt werden.

KDR	Flt-4	IGF-R	EGF-R	ErbB2	Tie2	FGF1-R
100 ng mL ⁻¹	400 ng mL ⁻¹	300 ng mL ⁻¹	100 ng mL ⁻¹	400 ng mL ⁻¹	400 ng mL ⁻¹	200 ng mL ⁻¹

Tabelle 1: Verwendete Kinase-Mengen im RTK-Assay

8 Literatur

- [1] J. Folkman, *Nat. Med.* 1 (1995) 27.
- [2] R. Casey, M. Jaffe, W. W. Li, V. W. Li, D. Tsakayannis, *The Angiogenesis Foundation, Cambridge* (1998) 7.
- [3] L. Holmgren, M. S. O'Reilly, J. Folkman, *Nat. Med.* 1 (1995) 149.
- [4] J. Folkman, *N. Engl. J. Med.* 285 (1971) 1182.
- [5] R. S. Kerbel, *Nature* 390 (1997) 335.
- [6] N. Ferrara, *J. Mol. Med.* 77 (1999) 527.
- [7] L. K. Shawver, K. E. Lipson, T. A. T. Fong, G. McMahon, G. D. Plowman, L. M. Strawn, *DDT* 2 (1997) 50.
- [8] R. Mazitschek, P. Baumhof, A. Giannis, *Mini-Rev. Med. Chem. in press* (2002).
- [9] N. Wernert, A. Stanjek, S. Kiriakidis, A. Hugel, H. C. Jha, R. Mazitschek, A. Giannis, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 38 (1999) 3228.
- [10] L. A. Liotta, P. S. Steeg, W. G. Stetler-Stevenson, *Cell* 64 (1991) 327.
- [11] F. Rastinejad, P. J. Polverini, N. P. Bouck, *Cell* 56 (1989) 345.
- [12] Y. Maeshima, U. L. Yerramalla, M. Dhanabal, K. A. Holthaus, S. Barbashov, S. Kharbanda, C. Reimer, M. Manfredi, W. M. Dickerson, R. Kalluri, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 31959.
- [13] G. D. Kamphaus, P. C. Colorado, D. J. Panka, H. Hopfer, R. Ramchandran, A. Torre, Y. Maeshima, J. W. Mier, V. P. Sukhatme, R. Kalluri, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 1209.
- [14] L. Yao, S. E. Pike, J. Setsuda, J. Parekh, G. Gupta, M. Raffeld, E. S. Jaffe, G. Tosato, *Blood* 96 (2000) 1900.
- [15] A. Bergsmedh, A. Szeles, M. Henriksson, A. Bratt, M. J. Folkman, A. L. Spetz, L. Holmgren, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98 (2001) 6407.
- [16] J. Folkman, *N Engl J Med* 320 (1989) 1211.
- [17] C. W. White, H. M. Sondheimer, E. C. Crouch, H. Wilson, L. L. Fan, *N. Engl. J. Med.* 320 (1989) 1197.
- [18] C. P. Dinney, D. R. Bielenberg, P. Perrotte, R. Reich, B. Y. Eve, C. D. Bucana, I. J. Fidler, *Cancer Res.* 58 (1998) 808.
- [19] S. Takano, S. Gately, M. E. Neville, W. F. Herblin, J. L. Gross, H. Engelhard, M. Perricone, K. Eidsvoog, S. Brem, *Cancer Res.* 54 (1994) 2654.
- [20] M. Prewett, J. Huber, Y. Li, A. Santiago, W. O'Connor, K. King, J. Overholser, A. Hooper, B. Pytowski, L. Witte, P. Bohlen, D. J. Hicklin, *Cancer Res.* 59 (1999) 5209.

- [21] R. S. Herbst, M. Hidalgo, A. S. Pierson, S. N. Holden, M. Bergen, S. G. Eckhardt, *Semin. Oncol.* 29 (2002) 66.
- [22] S. V. Rajkumar, *Expert Rev. Anticancer Ther.* 1 (2001) 20.
- [23] S. S. Ng, M. Brown, W. D. Figg, *Biomed. Pharmacother.* 56 (2002) 194.
- [24] A. Dove, *Nat. Med.* 8 (2002) 95.
- [25] M. Cianfrocca, T. P. Cooley, J. Y. Lee, M. A. Rudek, D. T. Scadden, L. Ratner, J. M. Pluda, W. D. Figg, S. E. Krown, B. J. Dezube, *J. Clin. Oncol.* 20 (2002) 153.
- [26] M. A. Rudek, W. D. Figg, V. Dyer, W. Dahut, M. L. Turner, S. M. Steinberg, D. J. Liewehr, D. R. Kohler, J. M. Pluda, E. Reed, *J. Clin. Oncol.* 19 (2001) 584.
- [27] R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 36 (1997) 1374.
- [28] P. A. Rupp, C. D. Little, *Circ. Res.* 89 (2001) 566.
- [29] T. Browder, C. E. Butterfield, B. M. Kraling, B. Shi, B. Marshall, M. S. O'Reilly, J. Folkman, *Cancer Res.* 60 (2000) 1878.
- [30] E. Ruoslahti, M. D. Pierschbacher, *Science* 238 (1987) 491.
- [31] R. O. Hynes, *Cell* 69 (1992) 11.
- [32] F. G. Giancotti, E. Ruoslahti, *Science* 285 (1999) 1028.
- [33] D. A. Cheresh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 6471.
- [34] N. T. Sepp, L. J. Li, E. J. Brown, S. W. Caughman, T. J. Lawley, R. A. Swerlick, *Journal of Investigative Dermatology* 103 (1994) 295.
- [35] R. I. Clyman, F. Mauray, R. H. Kramer, *Exp. Cell Res.* 200 (1992) 272.
- [36] S. J. Shattil, *Thromb. Hemostas* 74 (1995) 149.
- [37] K. M. Yamada, S. Miyamoto, S. K. Akiyama, *Science* 267 (1995) 883.
- [38] B. P. Eliceiri, R. Klemke, S. Stromblad, D. A. Cheresh, *J. Cell Biol.* 140 (1998) 1255.
- [39] M. L. Matter, E. Ruoslahti, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 27757.
- [40] R. Soldi, S. Mitola, M. Strasly, P. Defilippi, G. Tarone, F. Bussolino, *Embo J.* 18 (1999) 882.
- [41] A. S. Woodard, G. Garcia-Cardena, M. Leong, J. A. Madri, W. C. Sessa, L. R. Languino, *J. Cell. Sci.* 111 (1998) 469.
- [42] P. C. Brooks, S. Stromblad, L. C. Sanders, T. L. von Schalscha, R. T. Aimes, W. G. Stetler-Stevenson, J. P. Quigley, D. A. Cheresh, *Cell* 85 (1996) 683.
- [43] J. P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *Science* 296 (2002) 151.
- [44] S. Stromblad, J. C. Becker, M. Yebra, P. C. Brooks, D. A. Cheresh, *J. Clin. Invest.* 98 (1996) 426.

- [45] N. Boudreau, Z. Werb, M. J. Bissell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93 (1996) 3509.
- [46] T. Miyashita, M. Harigai, M. Hanada, J. C. Reed, *Cancer Res.* 54 (1994) 3131.
- [47] T. Miyashita, S. Krajewski, M. Krajewska, H. G. Wang, H. K. Lin, D. A. Liebermann, B. Hoffman, J. C. Reed, *Oncogene* 9 (1994) 1799.
- [48] T. Taga, A. Suzuki, I. Gonzalez-Gomez, F. H. Gilles, M. Stins, H. Shimada, L. Barsky, K. I. Weinberg, W. E. Laug, *Int. J. Cancer* 98 (2002) 690.
- [49] A. Giannis, F. Rübsam, *Angew. Chem.* 109 (1997) 606.
- [50] B. P. Eliceiri, D. A. Cheresh, *Curr. Opin. Cell Biol.* 13 (2001) 563.
- [51] S. A. Mousa, R. E. Olson, J. M. Bozarth, W. Lorelli, M. S. Forsythe, A. Racanelli, S. Gibbs, K. Schlingman, T. Bozarth, R. Kapil, J. Wityak, T. M. Sielecki, R. R. Wexler, M. J. Thoolen, A. Slee, T. M. Reilly, P. S. Anderson, P. A. Friedman, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 32 (1998) 169.
- [52] S. A. Mousa, *Drug Discov. Today* 4 (1999) 552.
- [53] H. Kessler, B. Diefenbach, D. Finsinger, A. Geyer, M. Gurrath, S. L. Godman, G. Hölzemann, R. Haubner, A. Jonczyk, G. Müller, E. Graf von Roedern, J. Wermuth, *Lett. Pept. Sci.* 2 (1995) 155.
- [54] M. T. Pfaff, K.; Müller, B.; Gurrath, M.; Müller, G.; Kessler, H., *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 20233 .
- [55] P. A. Burke, S. J. DeNardo, L. A. Miers, K. R. Lamborn, S. Matzku, G. L. DeNardo, *Cancer Res.* 62 (2002) 4263.
- [56] D. G. Batt, J. J. Petraitis, G. C. Houghton, D. P. Modi, G. A. Cain, M. H. Corjay, S. A. Mousa, P. J. Bouchard, M. S. Forsythe, P. P. Harlow, F. A. Barbera, S. M. Spitz, R. R. Wexler, P. K. Jadhav, *J. Med. Chem., Vol. 43* 2000, p. 41.
- [57] M. E. Duggan, L. T. Duong, J. E. Fisher, T. G. Hamill, W. F. Hoffman, J. R. Huff, N. C. Ihle, C. T. Leu, R. M. Nagy, J. J. Perkins, S. B. Rodan, G. Wesolowski, D. B. Whitman, A. E. Zartman, G. A. Rodan, G. D. Hartman, *J. Med. Chem.* 43 (2000) 3736.
- [58] W. J. Pitts, J. Wityak, J. M. Smallheer, A. E. Tobin, J. W. Jetter, J. S. Buynitsky, P. P. Harlow, K. A. Solomon, M. H. Corjay, S. A. Mousa, R. R. Wexler, P. K. Jadhav, *J. Med. Chem.* 43 (2000) 27.
- [59] A. L. Rockwell, M. Rafalski, W. J. Pitts, D. G. Batt, J. J. Petraitis, W. F. DeGrado, S. Mousa, P. K. Jadhav, *Bioorg. Med. Chem. Lett., Vol. 9* 1999, p. 937.

- [60] R. M. Keenan, W. H. Miller, C. Kwon, F. E. Alei, J. F. Callahan, R. R. Calvo, S.-M. Hwang, K. D. Kopple, C. E. Peishoff, J. M. Samanen, A. S. Wong, C.-K. Yuan, W. F. Huffman, *J. Med. Chem.* **40** (1997) 2289.
- [61] R. M. Keenan, W. H. Miller, L. S. Barton, W. E. Bondinell, R. D. Cousins, D. F. Eppley, S.-M. Hwang, C. Kwon, M. A. Lago, T. T. Nguyen, B. R. Smith, I. N. Uzinskas, C. C. K. Yuan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, Vol. 9 1999, p. 1801.
- [62] W. H. Miller, D. P. Alberts, P. K. Bhatnagar, W. E. Bondinell, J. F. Callahan, R. R. Calvo, R. D. Cousins, K. F. Erhard, D. A. Heerding, R. M. Keenan, C. Kwon, P. J. Manley, K. A. Newlander, S. T. Ross, J. M. Samanen, I. N. Uzinskas, J. W. Venslavsky, C. C. K. Yuan, R. C. Haltiwanger, M. Gowen, S.-M. Hwang, I. E. James, M. W. Lark, D. J. Rieman, G. B. Stroup, L. M. Azzarano, K. L. Salyers, B. R. Smith, K. W. Ward, K. O. Johanson, W. F. Huffman, *J. Med. Chem.*, Vol. 43 2000, p. 22.
- [63] A. Peyman, V. Wehner, J. Knolle, H. U. Stilz, G. Breipohl, K.-H. Scheunemann, D. Carniato, J.-M. Ruxer, J.-F. Gourvest, T. R. Gadek, S. Bodary, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, Vol. 10 2000, p. 179.
- [64] P. C. Brooks, A. M. Montgomery, M. Rosenfeld, R. A. Reisfeld, T. Hu, G. Klier, D. A. Cheresh, *Cell* **79** (1994) 1157.
- [65] J. C. Gutheil, T. N. Campbell, P. R. Pierce, J. D. Watkins, W. D. Huse, D. J. Bodkin, D. A. Cheresh, *Clinical Cancer Research* **6** (2000) 3056.
- [66] J. A. Posey, M. B. Khazaeli, A. DelGrosso, M. N. Saleh, C. Y. Lin, W. Huse, A. F. LoBuglio, *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* **16** (2001) 125.
- [67] S. S. Srivatsa, L. A. Fitzpatrick, P. W. Tsao, T. M. Reilly, D. R. Holmes Jr., R. S. Schwartz, S. A. Mousa, *Cardiovasc. Res.* **36** (1997) 408.
- [68] J. Schlessinger, *Cell* **103** (2000) 211 .
- [69] I. Galetic, M. Andjelkovic, R. Meier, D. Brodbeck, J. Park, B. A. Hemmings, *Pharmacol. Ther.* **82** (1999) 409 .
- [70] T. Pawson, P. Nash, *Genes & Development* **14** (2000) 1027 .
- [71] R. S. Kerbel, *Nature* **390** (1997) 335.
- [72] A. Wittinghofer, H. Waldmann, *Angewandte Chemie* **112** (2000) 4360 .
- [73] K. Hinterding, D. Alonso-Díaz, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **110** (1998) 716 .
- [74] B. Olofsson, M. Jeltsch, U. Eriksson, K. Alitalo, *Curr. Opin. Biotechnology* **10** (1999) 528 .
- [75] E. I. Korpelainen, K. Alitalo, *Curr. Opin. Cell Biol.* **10** (1998) 159 .
- [76] M. S. Pepper, *Clinical Cancer Research* **7** (2001) 462 .
- [77] G. Neufeld, T. Cohen, S. Gengrinovitch, Z. Poltorak, *Faseb J.* **13** (1999) 9 .
- [78] N. Ferrara, T. Davis-Smyth, *Endocrine Reviews* **18** (1997) 4 .

- [79] G. D. Yancopoulos, S. Davis, N. W. Gale, J. S. Rudge, S. J. Wiegand, J. Holash, *Nature* 407 (2000) 242 .
- [80] K. Teichert-Kuliszewska, P. C. Maisonpierre, N. Jones, A. I. Campbell, Z. Master, M. P. Bendeck, K. Alitalo, D. J. Dumont, G. D. Yancopoulos, D. J. Stewart, *Cardiovasc. Res.* 49 (2001) 659.
- [81] P. C. Maisonpierre, C. Suri, P. F. Jones, S. Bartunkova, S. J. Wiegand, C. Radziejewski, D. Compton, J. McClain, T. H. Aldrich, N. Papadopoulos, T. J. Daly, S. Davis, T. N. Sato, G. D. Yancopoulos, *Science* 277 (1997) 55.
- [82] D. Hanahan, *Science* 277 (1997) 48 .
- [83] Z. Wang, N. Miura, A. Bonelli, P. Mole, N. Carlesso, D. P. Olson, D. T. Scadden, *Blood* 99 (2002) 2740.
- [84] I. Kim, Y. S. Ryu, H. J. Kwak, S. Y. Ahn, J. L. Oh, G. D. Yancopoulos, N. W. Gale, G. Y. Koh, *Faseb J.* 16 (2002) 1126.
- [85] K. S. Spencer, D. Graus-Porta, J. Leng, N. E. Hynes, R. L. Klemke, *J. Cell. Biol.* 148 (2000) 385.
- [86] K. S. Russell, D. F. Stern, P. J. Polverini, J. R. Bender, *Am. J. Physiol.* 277 (1999) H2205.
- [87] R. S. Warren, H. Yuan, M. R. Matli, N. Ferrara, D. B. Donner, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 29483.
- [88] C. Garcia-Echeverria, P. Traxler, D. B. Evans, *Med. Res. Rev.* 20 (2000) 28.
- [89] J. M. Hamby, H. D. Showalter, *Pharmacol. Ther.* 82 (1999) 169.
- [90] G. McMahon, *Oncologist* 5 (2000) 3.
- [91] A. D. Laird, P. Vajkoczy, L. K. Shawver, A. Thurnher, C. Liang, M. Mohammadi, J. Schlessinger, A. Ullrich, S. R. Hubbard, R. A. Blake, T. A. Fong, L. M. Strawn, L. Sun, C. Tang, R. Hawtin, F. Tang, N. Shenoy, K. P. Hirth, G. McMahon, Cherrington, *Cancer Res.* 60 (2000) 4152.
- [92] D. W. Fry, A. J. Kraker, A. McMichael, L. A. Ambroso, J. M. Nelson, W. R. Leopold, R. W. Connors, A. J. Bridges, *Science* 265 (1994) 1093.
- [93] M. Carroll, S. Ohno-Jones, S. Tamura, E. Buchdunger, J. Zimmermann, N. B. Lydon, D. G. Gilliland, B. J. Druker, *Blood* 90 (1997) 4947.
- [94] K. Hoekman, *Cancer J.* 7 (2001) S134.
- [95] P. Traxler, G. Bold, E. Buchdunger, G. Caravatti, P. Furet, P. Manley, T. O'Reilly, J. Wood, J. Zimmermann, *Med. Res. Rev.* 21 (2001) 499.
- [96] R. S. McDowell, B. K. Blackburn, T. R. Gadek, L. R. McGee, T. Rawson, M. E. Reynolds, K. D. Robarge, T. C. Somers, E. D. Thorsett, M. Tischler, R. R. Webb, M. C. Venuti, *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 5077.
- [97] Y. Bi, P. G. Schultz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 6 (1996) 2299.
- [98] M. R. Pena, J. K. Stille, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 5417.

-
- [99] A. M. Stanjek, *Dissertation, Universität Bonn* (1999) .
- [100] R. Mazitschek, *Dissertation, Universität Leipzig* (2002) .
- [101] S. W. Heinzman, B. Ganem, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 6801.
- [102] K. Z. Feichtinger, C.; Sings, H. L.; Goodman, M., *J. Org. Chem* 63 (1998) 3804.
- [103] D. J. Brown, P. Waring, *J. Chem. Soc.; Perkin Trans. 2* (1974) 204.
- [104] J. Simak, K. Holada, J. G. Vostal, *BMC Cell Biol.* 3 (2002) 11.
- [105] A. Giannis, F. Rübsam, *Advances in Drug Research* (Eds.: B. Testa, U. A. Meyer) 29, (1997) 1.
- [106] R. A. Wiley, D. H. Rich, *Med. Res. Rev.* 13 (1993) 327.
- [107] M. Scatena, M. Almeida, M. L. Chaisson, N. Fausto, R. F. Nicosia, C. M. Giachelli, *J Cell Biol* 141 (1998) 1083.
