

Synthese und Entwicklung von α -Helixmimetika mit antiplasmodialer Aktivität

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Hendrik Pols
aus Bocholt

Düsseldorf, April 2025

Aus dem Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Thomas Kurz
2. Prof. Dr. Holger Gohlke

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2025

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ angefertigt und in der hier vorliegenden oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht habe. Bisher wurden von mir keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den _____

Hendrik Pols

Meiner Familie und Freunden gewidmet.

Danksagung

Für die Möglichkeit, mich in die Arbeitsgruppe aufzunehmen und diese Forschungsarbeit anfertigen zu dürfen, bedanke ich mich zunächst bei Prof. Dr. Thomas Kurz. Neben der initialen Idee des Projektes waren viele anregende gemeinsame Diskussionen sehr hilfreich, das Projekt mit der Freiheit eigene Ideen einzubringen, weiterentwickeln zu können.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Prof. Dr. Holger Gohlke für die Übernahme des Korreferats und Rolle des Mentors. Ein großer Dank gilt Dr. Christoph Gertzen, der durch das intensive Cluster- und Ligandendocking von PfHsp90 die antiplasmodialen Aktivitäten der Wirkstoffe erklären und wegweisende Ideen zur Entwicklung der Oligopyrimidonamide einbringen konnte.

Für die *in vitro* Studien bedanke ich mich bei Dr. Jana Held sowie Dr. Lais Pessanha de Carvalho vom *Universitätsklinikum Tübingen* und der Arbeitsgruppe um Dr. Sanil Bhatia vom *Universitätsklinikum Düsseldorf*.

Für die Untersuchung der Wirkstoffe im Mausmodell danke ich PD Dr. Sergio Wittlin vom *Swiss Tropical and Public Health Institute*.

Für die Aufnahme der massenspektrometrischen und NMR-spektroskopischen Daten danke ich dem CeMSA@HHU (**C**enter for **M**olecular and **S**tructural **A**alytics an der **H**einrich-**H**eine-**U**niversität Düsseldorf), insbesondere PD Dr. Klaus Schaper, Mohanad Aian, Tanja Muth, Dr. Peter Tommes und Ralf Bürgel.

Für die fachgerechte, akribische Beschaffung und Entsorgung von Chemikalien bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des zentralen Chemikalienlagers.

Ein besonderer Dank gilt den Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die mich als (Wirtschafts-)Chemiker im pharmazeutischen Umfeld aufgenommen haben. Insbesondere hervorzuheben sind meine Laborkollegen Dr. Fabian Fischer und Stefan Höfmann, mit denen zusammen stets der flache Humor des Labor 35 gehalten werden konnte. Beate Lungerich war jederzeit für Fragen zu sämtlichen Geräten der Arbeitsgruppe und Synthesen zum Hsp90-Projekt zu erreichen und hat sich selbst bei kleinsten Problemen viel Zeit für mich und die Arbeitsgruppe genommen!

Wenn die gute Laune an den Laboralltagen aufgrund von fehlenden Kaffeebohnen so manches Mal zu kippen drohte, konnte Saskia Klein jederzeit für gute Laune sorgen – ihr danke ich nicht nur für die Zeit während der Promotion, sondern auch für die viele Zeit im Hörsaal und den Laborpraktika während des Bachelor- und Masterstudiums!

Die Frühstücksrunde an Labortagen mit Dr. Talea Knak und viel Kaffee sowie guten Diskussionen (wobei wir uns oft gemeinsam über das gleiche aufgeregt haben) waren immer ein guter Start in den Tag!

Nicht weniger danke ich Franziska Kinnen, Christian Anzenhofer, Petra Stahlke, Dr. Mona Mahmoud, Dr. Oliver Michel, Dr. Leandro Alves-Avelar und Dr. Maximilian Barth aus der Arbeitsgruppe, sowie auch die Mitglieder der benachbarten Arbeitsgruppen Stark und Cramer.

Nicht zu vergessen sind die Studierenden aus Wahlpflicht- oder freiwilligen Praktika. Noemi Wladarz danke ich, dass ich sie während ihrer Masterarbeit betreuen durfte.

Zuletzt danke ich meiner Familie und Freunden, die während des Studiums und der Promotion hinter mir standen und mich in schwierigen Zeiten aufgemuntert haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Malaria	1
1.1.1	Infektion und Transmission	1
1.1.2	Prävention und (Chemo-)Prophylaxe	4
1.1.3	Malaria-Therapie.....	6
1.1.4	Entwicklung von antiplasmodialen Wirkstoffen	11
1.2	Hitzeschockprotein 90 als Drug- <i>Target</i>	17
1.2.1	Aufbau und Funktionen von <i>Pf</i> Hsp90.....	19
1.2.2	Hsp90-Inhibitoren	22
1.2.2.1	N-terminale <i>h</i> Hsp90- und <i>Pf</i> Hsp90-Inhibitoren	22
1.2.2.2	M- und C-terminale <i>h</i> Hsp90- und <i>Pf</i> Hsp90-Inhibitoren	25
1.3	Protein-Protein-Interaktionen.....	28
1.4	Peptidomimetika	30
1.5	α -Helix-Mimetika.....	32
2	Literaturübersicht und Vorarbeiten	37
2.1	Molekulardynamiksimulationen und <i>Cluster Docking</i>	37
2.2	Vorarbeiten zur Darstellung von Tripyrimidonamiden	47
2.2.1	Darstellung von Pyrimidon-Monomeren	48
2.2.2	Darstellung von Oligopyrimidonamiden.....	52
3	Zielsetzung	55
4	Ergebnisse und Diskussion	59
4.1	Synthese von Tripyrimidonamiden mit strukturell diverser Seitenkette.....	59
4.2	Biologische Evaluation der Tripyrimidonamide mit strukturell diverser oberer Seitenkette...	74
4.3	Synthese von Tripyrimidonamiden mit vergrößerten Kopfgruppen	79
4.4	Antiplasmodiale <i>in vitro</i> Aktivitäten von Tripyrimidonamiden mit vergrößerten Kopfgruppen	82
4.5	<i>In vitro</i> PRR-Assay	84
4.6	<i>in vivo</i> Untersuchungen	87
4.7	Entwicklung von Bipyrimidonamiden mit antiplasmodialer Aktivität	90
4.8	Synthese von Bipyrimidonamiden mit Benzoylkopfgruppe	92
4.9	Biologische Evaluation der Bipyrimidonamide mit Benzoylkopfgruppe	95

INHALTSVERZEICHNIS

4.10	Synthese von Bipyrimidonamiden mit modifizierter Kopfgruppe	98
4.11	Biologische Evaluation der Bipyrimidonamide mit modifizierter Kopfgruppe	104
5	Zusammenfassung	107
6	Ausblick	111
7	Experimenteller Teil	113
7.1	Allgemeine Versuchs- und Analyseangaben	113
7.2	Allgemeine Versuchsvorschriften	116
7.3	Übersicht der synthetisierten Substanzen	121
7.4	Konkordanz	197
8	Literaturverzeichnis	198
9	Abbildungsverzeichnis	211
10	Schemaverzeichnis	216
11	Tabellenverzeichnis	220

Abkürzungsverzeichnis

A

Å	Ångström (10^{-10} m)
abs.	Absolut
Äq.	Äquivalent
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>Area under the curve</i> (Fläche unter der Kurve)
AVV	Allgemeine Versuchsvorschrift

B

ber.	Berechnet
BINAP	Bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Bz	Benzoyl-Schutzgruppe

C

CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
COMU®	1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)dimethylamino-morpholino-carbenium-hexafluorophosphat
CTD	C-terminale Domäne

D

δ	Chemische Verschiebung [ppm]
<i>d</i>	Deutero
d	Dublett
D	Asparaginsäure
Da	Dalton (Gewichtseinheit)
DC	Dünnschichtchromatographie
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid

E

<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
Et	Ethyl
EtOH	Ethanol
ESI	Elektrospray-Ionisation

F

-

G

GA	Geldanamycin
ges.	Gesättigt
Gl.	Gleichung
Glu	Glutaminsäure

H

h	Stunde(n)
H	Histidin
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HepG2	Leberzellkarzinomzelllinie
hept	Heptett
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR-MS	Hochauflösende Massenspektrometrie
Hsp90	Hitzeshockprotein 90
<i>hHsp90</i>	<i>human heat shock protein 90</i>
Hz	Hertz

I

I	Isoleucin
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
<i>i</i> PrOH	Isopropanol

J

<i>J</i>	Kopplungskonstante [Hz]
----------	-------------------------

K

kat.	Katalytisch
konz.	Konzentriert
KOtBu	Kaliumtertbutanolat

L

L	Leucin
Lsg.	Lösung
Lit.	Literatur
Lys	Lysin

M

MeOH	Methanol
m	Multipllett
<i>m</i>	<i>meta</i> (chemischer Deskriptor)
M	Molare Masse
MD	Mittlere Domäne
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
min	Minuten
mol	Mol
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
μM	Mikromolar [10^{-6} mol/L]

N

nm	Nanometer
nM	Nanomolar [10^{-9} mol/L]
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidin
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanzspektroskopie)
NTD	N-terminale Domäne

O

<i>o</i>	<i>ortho</i> (chemischer Deskriptor)
----------	--------------------------------------

P

<i>p</i>	<i>para</i> (chemischer Deskriptor)
Pd ₂ (dba) ₃	Bisdibenzylidenacetonepalladium(0)
PDB	Protein Data Bank
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>PfHsp90</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> heat shock protein 90
Phe	Phenylalanin
PPI	Protein-Protein-Interaktionen
ppm	Parts per Million
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration

Q

q	Quartett
quint.	Quintett

R

RT	Raumtemperatur
----	----------------

S

s	Singulett
SI	Selektivitätsindex

T

t	Triplett
T	Threonin
<i>tert.</i>	Tertiär
TCFH	Chlor- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethylformamidinium-hexafluorophosphat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran

U

UV	Ultraviolett
----	--------------

V

Val	Valin
-----	-------

W

-

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

X

-

Y

Y	Tyrosin
yHsp90	<i>yeast heat shock protein 90</i>

Z

-

V

1 Einleitung

1.1 Malaria

1.1.1 Infektion und Transmission

Malaria zählt weltweit mit rund 263 Mio. Krankheitsfällen und ca. 597.000 Todesfällen im Jahr 2023 in 83 endemischen Ländern zu den häufigsten Infektionskrankheiten der Welt, bei der ca. 94 % der Krankheitsfälle auf den Kontinent Afrika und ca. 74 % der Todesfälle auf Kinder mit einem Alter von unter fünf Jahren entfallen. Die Krankheit wird durch einzellige Parasiten, die *Plasmodien spp.* ausgelöst, von denen ca. 200 Arten, darunter fünf humanpathogene Spezies bekannt sind: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* und *Plasmodium knowlesi*. *P. falciparum* löst die Malaria tropica aus. Etwa 95 % der weltweiten Krankheitsfälle können auf die Spezies *P. falciparum* und *P. vivax* zurückgeführt werden.^[1]

Der Lebenszyklus der Plasmodien lässt sich nach den beteiligten Wirten, dem Menschen und der weiblichen *Anopheles*-Stechmücke, oder auch der asexuellen und sexuellen Phase unterteilen (**Abb. 1** und **Abb. 2**).

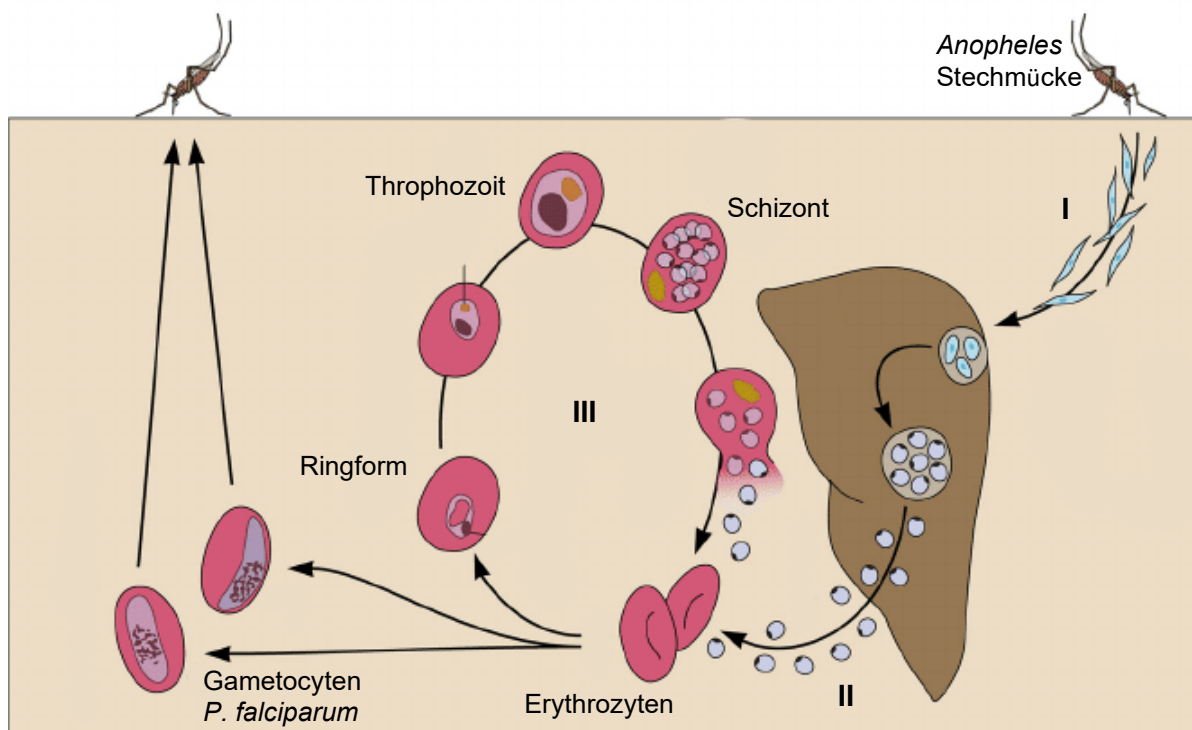


Abb. 1 Lebenszyklus der Plasmodien und Entwicklung der Sporozoiten zu Gametozyten im Menschen. Abbildung modifiziert nach LEE *et al.*^[2]

Die Übertragung der Plasmodien erfolgt über eine Blutmahlzeit der weiblichen *Anopheles* Stechmücke, bei der Sporozoiten aus dem Speichel der *Anopheles* über die Haut in die Blut- und Lymphbahn des Menschen übertragen werden, von wo aus diese innerhalb kurzer Zeit die Hepatozyten befallen (I).

Während der exoerythrozytären Schizogenie entwickeln sich in den Leberzellen aus den Sporozoiten die Schizonten. Innerhalb von 5 – 18 Tagen entstehen je nach Plasmodienart ca. 2000 Merozoiten (*P. malariae*) oder bis zu 30.000 Merozoiten (*P. falciparum*) aus den Schizonten, welche nach Ruptur in die Blutbahn gelangen (II).^[3]

Bei einer Infektion mit *P. vivax* oder *P. ovale* können aus den Merozoiten Hypnozoiten gebildet werden, die mehrere Monate oder auch Jahre und ohne bemerkbare Symptome des Menschen in den Hepatozyten ruhen können. Die Hypnozoiten können jederzeit zu Schizonten heranreifen und so die *Malaria tertiana* verzögert auslösen.^[4]

Merozoiten dringen in einem komplexen, mehrstufigen Prozess in Erythrozyten ein und verwandeln sich über eine Ringform und Trophozoiten zu Blutschizonten (III). Die für die ungeschlechtliche Vermehrung der Merozoiten benötigten Aminosäuren können dem Parasiten durch gezielten Abbau von Hämoglobin der Erythrozyten mit proteolytischen Enzymen über die parasitophore Vakuole bereitgestellt werden. Beim Abbau von Hämoglobin entsteht das Nebenprodukt Häm, und kann von Plasmodien aufgrund fehlender Hämoxxygenase-Aktivität nicht degradiert werden. Häm wirkt auf die Parasiten und den Wirt toxisch und wird entsprechend in den parasitophoren Vakuolen durch das Häm-Detoxifikationsprotein PfHDP (engl. *heme detoxification protein*) in das kristalline und für den Parasiten nicht mehr toxische Malaria-Pigment Hämozoin umgewandelt.^{[5],[6]}

Die in den Erythrozyten gereiften Schizonten enthalten rund 20 Merozoiten, welche nach Auflösen der Zelle weitere Erythrozyten befallen und eine erneute intraerythrozytäre Entwicklung von Blutschizonten initiieren können.

Klinische Symptome einer Malariainfektion, insbesondere (periodische) Fieberschübe, sind während der intraerythrozytären Phase durch die Ruptur der Blutschizonten und folglich der (zyklischen) Freisetzung der Merozoiten beobachtbar. Das Leberstadium verursacht keine Malaria-spezifischen Symptome und verläuft asymptomatisch, in seltenen Fällen können unspezifische Symptome auftreten.^[7]

Mit steigender Anzahl an Merozoiten in der Blutbahn wächst die Wahrscheinlichkeit der Bildung von weiblichen Makrogametozyten und männlichen Mikrogametozyten, den sexuellen Formen des Parasiten. Es konnte gezeigt werden, dass die Gametozytogenese u.a. vom

Transkriptionsfaktor AP2-G reguliert wird. Durch die Blutmahlzeit werden die Gametozyten auf die *Anopheles* Stechmücke übertragen (**Abb. 2**).^[8]

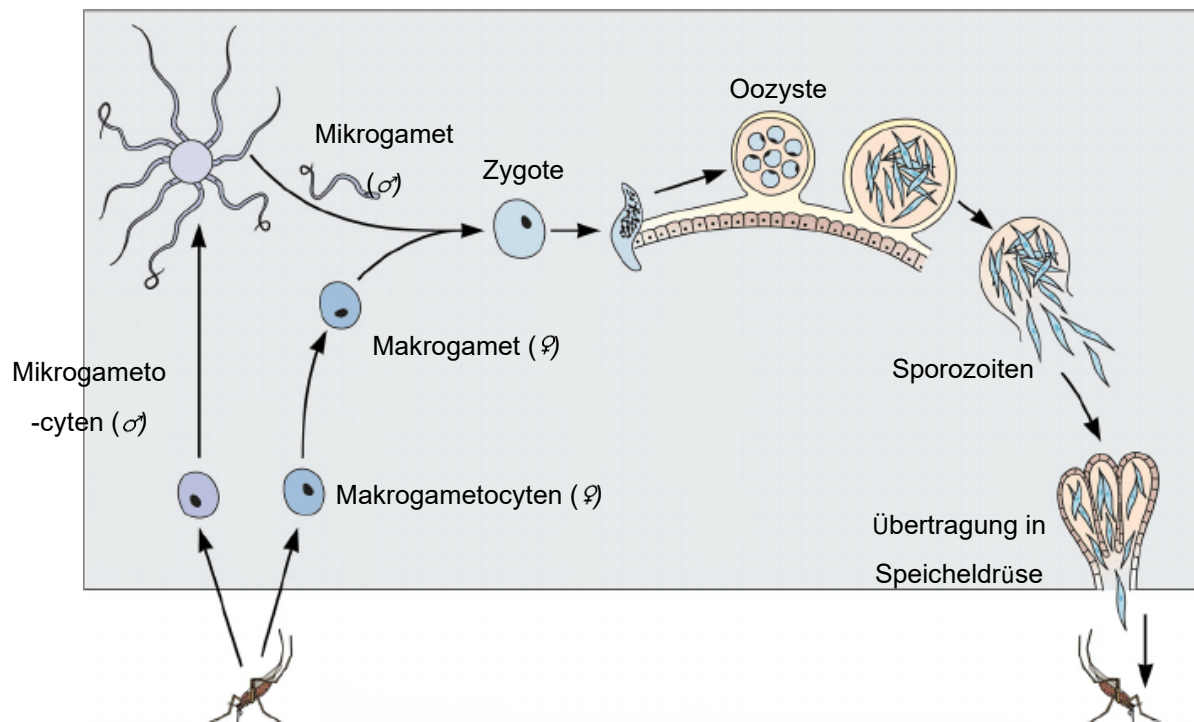


Abb. 2 Geschlechtliche Entwicklung von Sporozoiten aus Mikro- und Makrogametozyten in in der weiblichen *Anopheles* Stechmücke. Abbildung modifiziert nach LEE *et al.*^[2]

Die Umwandlung der Gametozyten in Mikrogameten und Makrogameten wird u.a. durch Xanthurensäure oder auch Temperatur- und pH-Änderung durch Wechsel des Wirts initiiert und findet im Darm des Vektors statt. Dabei entstehen aus einem Mikrogameten durch dreifache Mitose acht Mikrogameten. Die weibliche Makrogametozyte reift zu einer Makrogamete heran.^[9]

Die männlichen Mikrogameten streben nach den Makrogameten und sind durch ihre Flagellen recht beweglich. Nach Befruchtung der Makrogamete bildet sich eine Zygote, die sich zu der länglichen Oozyste weiterentwickelt und sich an der Darmschleimhaut anlagert. In der Oozyste wachsen ca. 10.000 Sporozoiten heran, welche nach Aufbrechen der Oozyste in die Speicheldrüsen der Stechmücke wandern und wenige hundert dieser durch eine Blutmahlzeit auf den Menschen übertragen werden können, sodass ein erneuter Parasitenkreislauf initiiert wird.

1.1.2 Prävention und (Chemo-)Prophylaxe

Der komplexe Lebenszyklus der Plasmodien mit einer ungeschlechtlichen und geschlechtlichen Vermehrung und Wechsel zwischen Vektor und Wirt erlaubt eine Vielzahl von Ansätzen, die Krankheits- und Todesfälle langfristig zu reduzieren. Dabei kann zwischen Prävention, (Chemo-)Prophylaxe und Therapie differenziert werden.

Mit der Übertragung von Sporozoiten durch eine Blutmahlzeit der Stechmücke auf den Menschen und umgekehrt die Transmission von Gametozyten auf die Stechmücke bleibt der Lebenszyklus der Plasmodien bestehen.

Die Expositionsprophylaxe, darunter hautdeckende Kleidung, Insektenschutznetze oder auch Repellenzien tragen zum Schutz bei, Mückenstiche zu verhindern. Repellenzien, wie z.B. Diethyltoluamid (DEET) oder auch Icaridin (**Abb. 3**) werden auf der Haut aufgetragen, können von den Geruchs- und Geschmacksrezeptoren der Insekten aufgenommen werden und für diese unangenehm sein, sodass von Stichen bzw. Blutmahlzeiten abgehalten werden kann.^[10]

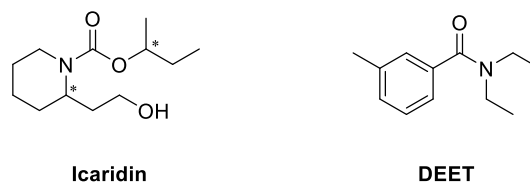


Abb. 3 Struktur der Repellenzien Icaridin und DEET.

Reisenden und auch Einheimische werden zur Reduzierung des Erkrankungsrisikos daher bei Aufenthalt in endemischen Gebieten mit erhöhter Malariagefahr Prophylaxe-Arzneimittel, wie z.B. Atovaquon-Proguanil, Mefloquin oder auch das Breitbandantibiotikum Doxycyclin, empfohlen einzunehmen (**Abb. 4**). Letzteres ist für Schwangere und Kinder nicht geeignet.^[11]

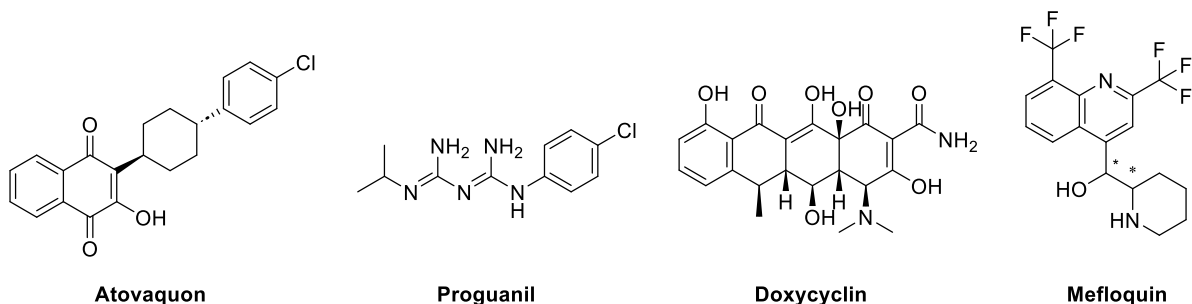


Abb. 4 Struktur von Atovaquon, Proguanil, Mefloquin und Doxycyclin.

Das Prodrug Proguanil wird in der Leber zum aktiven Cycloguanil metabolisiert und kann die Enzymaktivität der Dihydrofolatreduktase in den Leberstadien des Parasiten hemmen.

Zusammen mit Atovaquon kann Proguanil (*Malarone*®) nicht nur als Chemoprophylaxe, sondern auch zur Behandlung einer akuten Malariainfektion eingesetzt werden. *Malarone*® ist sowohl für Erwachsene als auch Kinder (mit verringerter Dosis) in Deutschland zugelassen und soll 1 – 2 Tage vor und bis zu sieben Tagen nach Aufenthalt in einem Malariagebiet täglich eingenommen werden. Aufgrund unzureichender Daten ist *Malarone*® für Schwangere und Stillende nicht empfohlen. In der Frühschwangerschaft (1. Trimenon) kann die Einnahme von Doxycyclin in Erwägung gezogen werden.^[12]

Eine rezidive Malariainfektion durch *P. ovale* und *P. vivax* kann Monate oder gar Jahre nach der Blutmahlzeit durch die in den Leberzellen ruhenden Hypnozoiten ausgelöst werden. Zur Therapie einer rezidiven Infektion können die 8-Aminochinoline Primaquin oder dessen Weiterentwicklung Tafenoquin eingesetzt werden. Aufgrund von gastrointestinalen Nebenwirkungen und einer möglichen hämolytischen Anämie bei einem Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel, sind diese Arzneistoffe nicht in allen Ländern zugelassen oder können nur unter bestimmten Bedingungen verabreicht werden.^[13]

Eine Impfung gegen die humanpathogenen Plasmodienstämme stellt derzeit eine neue Möglichkeit dar, Infektions- und Todeszahlen zu minimieren, indem ein langfristiger Schutz und Immunität aufgebaut wird und die Impfstoffe einfach zugänglich und kostengünstig angeboten werden können.

Der erste zugelassene Impfstoff *RTS,S/AS01* (Mosquirix®) adressiert das in der Entwicklungsphase der Sporozoiten wichtige Circumsporozoitenoberflächenprotein von *P. falciparum* und wurde bereits in den 1980er Jahren entwickelt und fortan optimiert.^{[14],[15]} Im Jahre 2015 wurde Mosquirix® von der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) und im Jahre 2021 von der WHO für Kinder ab einem Alter von 5 Monaten empfohlen.

Der Impfstoff zeigte bei Kindern zwischen fünf und sieben Jahren in klinischen Studien der Phase III mit vier Impfdosen eine Immunisierung gegen Malaria von 36% nach vier Jahren. Trotz der geringen Wirksamkeit konnte mit *RTS,S/AS01* die Inzidenz sowie die Hospitalisierungsrate von Malaria und demnach auch die Mittel für die Behandlung der Infektion in endemischen Ländern stark reduziert werden.^[16]

Das Vakzin *R21/Matrix-M* ist die Weiterentwicklung von *RTS,S/AS01* und adressiert ebenfalls das Circumsporozoitenprotein (CSP). Durch den erhöhten Anteil an CSP-Antigenen weist *R21/Matrix-M* eine Wirksamkeit von 72% über 18 Monate bei vier Impfdosen in klinischen Studien der Phase 3 auf. *R21/Matrix-M* wurde im Oktober 2023 von der WHO empfohlen und ist seit Mitte 2024 (*R21/Matrix-M*) als Impfstoff insbesondere für Risikogruppen (Kleinkinder, Schwangere und Stillende) verfügbar.^{[17],[18]}

Für die weitere Entwicklung von Malariainpfstoffen wurde der Blick auf die mRNA-Technologie gerichtet, die erfolgreich bei den COVID-Impfstoffen angewendet werden konnte. Mit dieser Art von Impfstoff können so in den Zellen Circumsporozoitenproteine oder auch weitere Zielproteine produziert werden, welche eine Immunantwort hervorrufen und Immunität gegenüber den Plasmodien aufbauen können.^[19]

1.1.3 Malaria-Therapie

Die korrekte und frühzeitige Diagnostik einer Malariainfektion ist für die richtige Auswahl der Malariatherapie unabdingbar.

Eine unkomplizierte Malariainfektion zeichnet sich in den meisten Fällen durch (un-)regelmäßige Fieberschübe, Kopf- und Gliederschmerzen aus, ist demnach zu den Symptomen einer Grippe ähnlich und kann somit nicht eindeutig von anderen Infektionen unterschieden werden. Die Intensität und das zeitliche Auftreten dieser klinischen Symptome unterscheidet sich je nach Plasmodienart, dem Grad der Immunität des Infizierten, dem Vorhandensein einer Komorbidität und der medikamentösen Prophylaxe.

Die lichtmikroskopische Untersuchung eines Blutabstrichs („*Dicker Tropfen*“) stellt die einfachste Malariadiagnostik dar, eine Infektion sowie die Parasitendichte festzustellen. Zwischen den Plasmodien-Arten kann mit einer Giesma-Färbung eines dünnen Blutaussstriches Aufschluss unterschieden werden.

Immuno-chromatographische Schnelltests zum Nachweis von Plasmodien-Antigenen oder auch Nukleinsäureamplifikationstechniken (PCR, LAMP) zum Nachweis von Nukleinsäuren (DNA) können ebenfalls als sensitive und spezifische Testverfahren genutzt werden, wobei falsch negative Ergebnisse insbesondere bei niedriger Parasitämie auftreten können.^[20]

Neben der „unkomplizierten Malaria“ wird zwischen einer „schweren Malaria“ differenziert, die sich neben den oben beschriebenen Symptomen einer unkomplizierten Malariainfektion durch weitere Symptome, darunter Bewusstseinsstörungen, Blutungen und Organkomplikationen oder auch Hyperparasitämie von über 10 % unterscheidet.

Die Therapie der Malaria richtet sich neben den klinischen und labordiagnostischen Kriterien nach der Art der Plasmodien-Spezies und länderspezifischen Vorgaben aufgrund von Resistenzen. Zudem zählen u.a. Schwangere und stillende Mütter sowie (Klein-)kinder und Personen mit weiteren Erkrankungen zu den Risikogruppen, bei denen eine Nutzen-Risiko-Abwägung vor der Gabe von Antimalariamitteln durchgeführt werden sollte.^[11]

Die WHO empfiehlt zwar weiterhin eine Verabreichung von Monopräparaten für spezielle Patientengruppen, jedoch zählt die Artemisinin-basierte Kombinationstherapie (Abkürzung *ACT*, engl. „*Artemisinin-combination-therapies*“), d.h. die Kombination von zwei oder mehr Arzneistoffen derzeit zum Goldstandard, um hohe Heilungsraten zu gewährleisten und um mögliche Resistenzen zu minimieren.^{[1],[11]}

Für Infektionen der unkomplizierten Malaria mit *P. falciparum* werden die Kombinationspräparate Artemether-Lumefantrin (A-L), Artesunat-Amodiaquin (AS-AQ), Dihydroartemisinin-Piperaquin (DHA-PPQ), Artesunat-Mefloquin (AS-MQ), Artesunat-Sulfadoxin-Pyrimethamin (AS-SP) und seit 2022 Artesunat-Pyronaridin (ASPY) für Kinder und Erwachsene empfohlen. (**Abb. 5**) Schwangere und stillende Mütter sollen auf die Kombination von Chinin und Clindamycin ausweichen, da Artemisinin eine mögliche teratogene Wirkung in präklinischen Tierstudien zeigte.^[21]

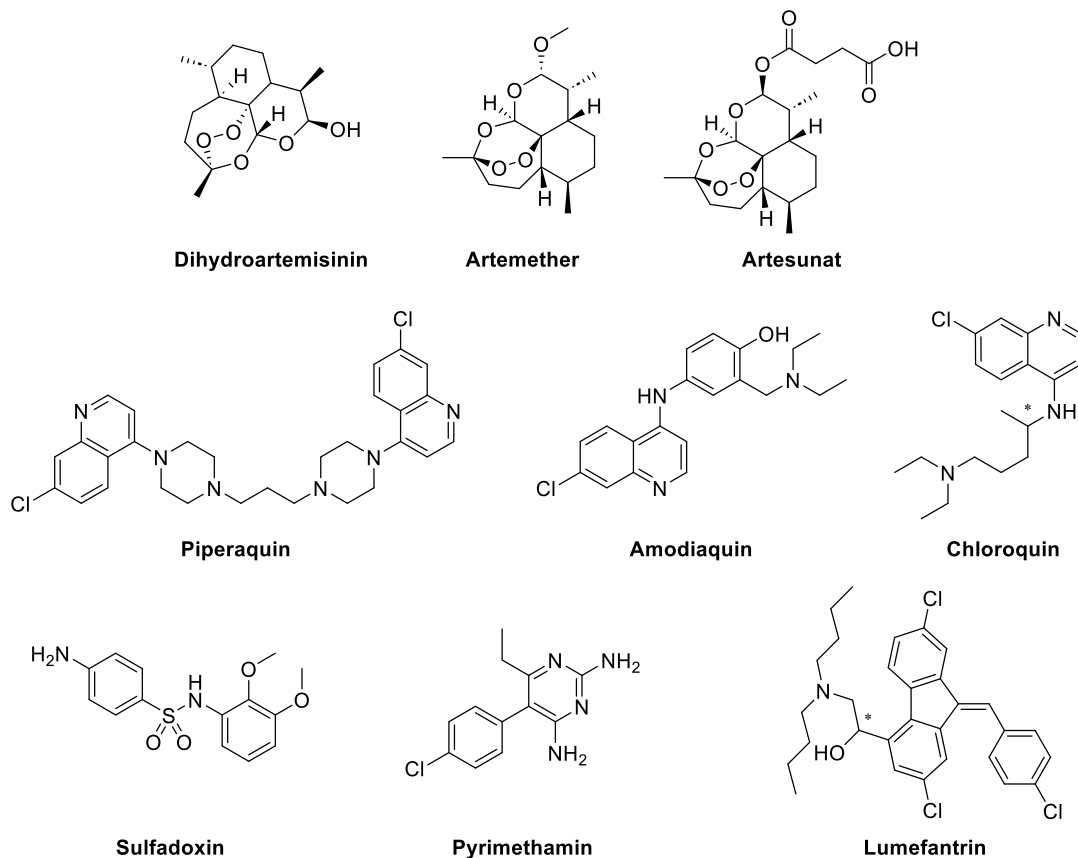


Abb. 5 Struktur der Malariaarzneimittel Dihydroartemisinin, Artemether, Artesunat, Piperaquin, Amodiaquin, Chloroquin, Sulfadoxin, Pyrimethamin und Lumefantrin.

Die Entwicklung der Arzneistoffe, die in einer Artemisinin-basierten Kombinationstherapie eingesetzt werden, hat den Ursprung beim einjährigen Beifuß *Artemisia annua* und der Rinde des *Cinchona succirubra*, die bereits seit dem 16. Jahrhundert als Heilmittel gegen Malaria in China und Peru verwendet werden. Erst im Jahr 1820 wurde das gegen Malaria aktive Chinin

von französischen Chemikern und im Jahr 1970 der Naturstoff Artemisinin von chinesischen Wissenschaftlern aus diesen Pflanzen isoliert (**Abb. 6**). Die beiden Naturstoffe bilden seither Grundkörper für die Entwicklung von Malariawirkstoffen.^[22]

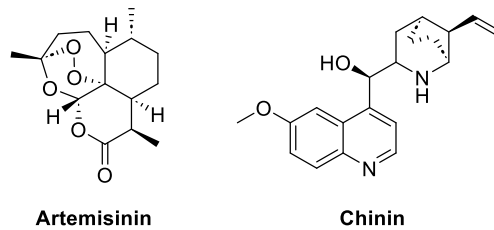


Abb. 6 Struktur von Artemisinin und Chinin.

Artemisinin und Chinin wirken während der erythryotären Entwicklung des Parasiten. Die Endoperoxidbrücke des Artemisins wird mithilfe von Eisenionen des Hämoglobins reduktiv gespalten. Die daraus entstehenden Radikale sind für den Parasiten toxisch, sodass Proteine und Fette alkyliert oder auch das Proteasom inhibiert werden könnte, woraus oxidativer Stress und Zellschaden resultiert.^{[23],[24]}

Die Entgiftung des Nebenproduktes Häm durch den Parasiten kann mit Chinin unterbrochen werden. Freies, für die Plasmodien toxisches Häm lagert sich in der Vakuole an und kann aufgrund der Redox-Aktivität des zentralen Eisenions ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) und der dadurch gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies des Häms ebenfalls zum Zelltod führen.

Zwar bietet der komplexe Lebenszyklus der Plasmodien ein breites Spektrum an möglichen Zielen für die Inhibitorentwicklung, jedoch zugleich auch ein hohes Potential an Resistenzen gegenüber Wirkstoffen.

Zur Steigerung der Aktivität gegenüber den Plasmodien, zur Verbesserung von pharmakokinetischen Eigenschaften und Verringerung der Resistenzentwicklung, wurden die Leitstrukturen Artemisinin und Chinin stets weiterentwickelt (**Abb. 5**).

Bereits 1910 wurde die erste Chinin-Resistenz festgestellt. Auch gegen Chloroquin, einem von Chinin abgeleiteten 4-Aminochinolin, traten im Laufe der 1950er Jahre Resistenzen in Kolumbien und Thailand auf. Ab den 1970er Jahren war die Chloroquin-Resistenz größtenteils über die Kontinente Afrika, Südamerika und Asien verteilt.^[22]

Werden die Parasiten bei einer Behandlung mit antiplasmodialen Wirkstoffen nicht vollständig abgetötet, können Resistenzen entstehen. Aufgrund der globalen Resistenz von *P. falciparum* gegenüber Chloroquin empfiehlt die WHO Artemisinin-basierte Präparate.^[25] Die Therapie

besteht aus einem Artemisinin(-Derivat), welches eine hohe Eliminierungsrate, d.h. eine hohe Anzahl der Parasiten innerhalb kürzester Zeit vernichtet, und einem zweiten Antimalaria-Wirkstoff, welcher die restlichen Parasiten über einen längeren Zeitraum eliminieren kann.

Die Auswahl des zweiten Wirkstoffs hängt von der Plasmodium-Spezies und der Resistenzprävalenz gegenüber den beiden Wirkstoffen in den betroffenen Regionen ab.^[26]

Die erweiterte Mekong Subregion im südöstlichen Asien nutzte als erste Region Artemisinin-basierte Kombinationspräparate, nachdem die Plasmodienstämme resistent gegenüber Chloroquin und auch weitere Chinin-basierte Arzneistoffe wurden. So nutzten Thailand ab den 1990er Jahren und Kambodscha ab dem Jahr 2000 das Kombinationspräparat bestehend aus Artesunat und Mefloquin (AS-MQ). Vietnam folgte im Jahr 2003 mit Dihydroartemisinin und Piperaquin (DHA-PPQ).^[27]

Im Jahr 2008 fielen im Westen von Kambodscha erste Resistenzen gegen Artemisinin-basierte Monopräparate auf, die durch eine verlangsamte Reduzierung der Parasitämie beobachtet wurden. In den kommenden Jahren wurden ähnliche Beobachtungen in weiteren Teilen von Kambodscha sowie Myanmar, Laos, Thailand und Vietnam gemacht.^{[28],[29]}

Eine Resistenz gegenüber DHA-PPQ wurde im Jahr 2013 in Teilen von Kambodscha beobachtet, die dazu führte, dass das Kombinationspräparat AS-MQ ab dem Jahr 2017 wieder als erste Malariatherapie empfohlen wurde.

Das Kombinationspräparat *Pyramax*[®], bestehend aus Artesunat und Pyronaridin (AS-PY), wird seit dem Jahr 2022 zusätzlich eingesetzt und ist in 28 Ländern zugelassen.^[30]

Obwohl die Kombinationspräparate aus Artemisinin und einem weiteren Wirkstoff, je nach Region an die Resistenzen angepasst, weiterhin effektiv als Malariatherapie eingesetzt werden können, wird der Einsatz von Dreifach-Kombinationspräparaten in der erweiterten Mekong Subregion diskutiert.^[31]

Eine Artemisinin-Resistenz, die durch eine verringerte Clearance der Parasiten beobachtet wurde, konnte u.a. auf eine Mutation des Kelch-13-Proteins (*Pfkelch13*) zurückgeführt werden. Der Parasit ist durch die Mutation weniger anfällig gegenüber proteotoxischem Stress und hat verbesserte Verteidigungsmechanismen.^[32]

Eine Amplifikation der Gene *plasmepsin-2* und *plasmepsin-3* auf dem Chromosom 14 konnte als Ursache für eine geringere Anfälligkeit gegenüber Piperaquin und eine verringerte Behandlungswirksamkeit von DHA-PPQ in Fällen der unkomplizierten Malaria durch *P. falciparum* gefunden werden.^[33]

Die in Südostasien beobachtete Resistenz gegenüber DHA-PPQ konnte durch eine Mutation der Transportergene *PfCRT* (*plasmodium falciparum chloroquine resistant transporter*) *Pfmdr* (*plasmodium falciparum multi drug resistance*), *Pfnhe* (*plasmodium falciparum Na⁺/H⁺ exchanger*) erklärt werden. Eine Mutation von Transportergenen kann u.a. dafür sorgen, dass Piperaquin von dem Häm-Target aus der Nahrungsvakuole heraustransportiert wird.^{[34]–[38]}

Auch wenn die Kombination aus Dihydroartemisinin und Piperaquin weiterhin eine hohe Wirksamkeit in afrikanischen Ländern aufweist, so wurden *Pfkelch13*-Mutationen ebenfalls bei Patienten in den ostafrikanischen Ländern Rwanda, Uganda und Eritrea beobachtet, die zu einer möglichen Resistenz gegenüber DHA-PPQ führen könnten.^[39]

1.1.4 Entwicklung von antiplasmodialen Wirkstoffen

Die meisten zugelassenen Antimalariawirkstoffe wurden von den Naturstoffen Artemisinin und Chinin abgeleitet und hinsichtlich pharmakodynamischer und -kinetischer Parameter weiterentwickelt.^[40]

Durch das Auftreten der Resistenzen in afrikanischen Ländern und der erweiterten Mekong Subregion gegen Artesiminin-Kombinationspräparate, die derzeit den Goldstandard in der Antimalaria-Therapie darstellen, sowie einer globalen Chinin-Resistenz, wird der Fokus auf die Entdeckung und intensive Entwicklung von Wirkstoffen mit neuartigem Wirkmechanismus statt der Entwicklung von Artemisinin- und Chinin-basierten Wirkstoffen gelegt.

Eine Strategie in der Antimalariaforschung ist die *Target*-basierte Entwicklung von Wirkstoffen. Hierfür ist bereits ein Zielprotein (*Target*) identifiziert, welches essenziellen Einfluss auf zelluläre Prozesse und biologische Funktionen im Parasiten hat. Das *Target* kann mit hoher Bindungsaffinität von kleinen Molekülen oder Proteinen über Protein-Protein-Interaktionen selektiv adressiert werden. Idealerweise werden alle Lebensstadien der Plasmodien durch das *Target* beeinflusst.^[41]

Trotz der vollständigen Sequenzierung des *P. falciparum*-Genoms im Jahr 2002 werden weiterhin neue potenzielle *Targets* identifiziert.^[42]

In Kontrast zur *Target*-basierten Entwicklung stehen phänotypische, Zell-basierte Untersuchungen, bei denen nicht das (fokussierte) *Target*, sondern die ganzheitliche Sicht im Vordergrund steht und pharmakokinetische sowie physikochemische Parameter einen Einfluss auf die untersuchte Aktivität haben. Die pharmakokinetischen Parameter können im Anschluss an ein *Target*-basiertes Verfahren untersucht, respektiv das *Target* in Zell-basierten Untersuchungen identifiziert und validiert werden (**Abb. 7**).^{[43],[44]}

Target-basiertes Screening



Zell-basiertes Screening

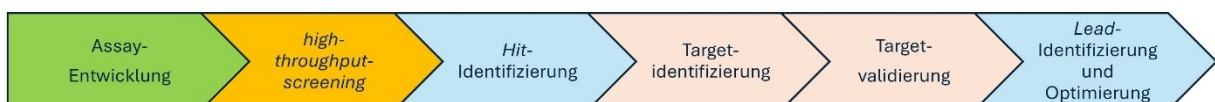


Abb. 7 Prozessschritte im *Target*-basierten und Zell-basierten Screening.^{[43],[44]}

Zentraler Schritt in beiden Entwicklungsstrategien ist das automatisierte Hochdurchsatz-Screening (engl. *high-throughput-screening*, *HTS*) einer Substanzbibliothek in dem entwickelten Assay, bei dem *hits* identifiziert werden, die eine nachweisbare und reproduzierbare biologische Aktivität zeigen. *Hits* sind Ausgangspunkte in der Arzneimittellentdeckung (engl. *Drug Discovery*) und zeichnen sich idealerweise durch eine einfache und optimierbare molekulare Struktur sowie erster Hinweise auf eine Selektivität und niedriger Toxizität aus.^{[43],[44]}

In der *Hit-to-Lead*-Optimierung werden *Hits* hinsichtlich der physikochemischen Parameter, biologischen Aktivität, Selektivität, pharmakokinetischen Parameter (Absorption, Verteilung, Metabolismus, Exkretion) und Toxizität in einem iterativen Prozess aus rationalem (*in silico*) Design, Synthese und biologischer Testung optimiert, um diese in einen *Lead*-Kandidaten zu überführen. *Leads* können in weiteren Schritten ferner chemisch modifiziert und hinsichtlich der Zielp Parameter optimiert werden und schließlich in präklinischen und klinischen Studien intensiv untersucht werden. Nach erfolgreichem Abschluss der klinischen Studien (Phase III) kann eine Zulassung des Arzneimittels bei den Regulierungsbehörden (FDA, EMA) beantragt werden, woraufhin die Pharmakovigilanz die Sicherheit des Arzneimittels fortlaufend überwacht und potenzielle Risiken frühzeitig bewertet.^[45]

„Medicines for Malaria Venture“ (MMV) ist eine Organisation, die seit 1999 die Entwicklung und Distribution von Medikamenten zur Behandlung von Malaria unterstützt. Im Jahr 2013 wurde eine Leitlinie vom MMV vorgestellt und im Jahr 2017 von BURROWS *et al.* überarbeitet, nach der neue potente Wirkstoffe klassifiziert werden können, die einen einheitlichen strukturierten Überblick über den Stand der Wirkstoffentwicklung ermöglichen.

Die *target candidate profiles* (TCP's) unterscheiden zwischen der Wirkung gegen asexuelle Blutstadien (TCP 1), Wirkung gegen Hypnozoiten (TCP 3), Wirkung gegen Leberstadien (TCP 4) und den transmissionsblockierenden Eigenschaften (TCP 5&6).

Target product profiles (TPP's) klassifizieren die Wirkstoffe nach Verwendung in der Behandlung einer aktiven Malariainfektion (TPP 1) oder die Chemoprotektion (TPP2) (**Abb. 8**).^[46]

Neben der TCP- und TPP-Klassifizierung können Wirkstoffe als potente *Lead*-Kandidaten gruppiert werden. Das MMV sieht für *early leads* eine initiale hohe *in-vitro*-Aktivität (IC₅₀) von < 100 nM gegen den relevanten Zielorganismus sowie eine Selektivität von > 100 gegenüber dem relevanten Wirt-*Target* vor, welche in den präklinischen Kandidatenkriterien definiert sind. Ein IC₅₀ von > 100 nM ist dabei nicht zwangsläufig ein Ausschlusskriterium bei der Bewertung eines *lead*-Kandidaten, sofern Faktoren wie Dosisvorhersage, Sicherheitsprofil und pharmakokinetische Eigenschaften vielversprechend sind.

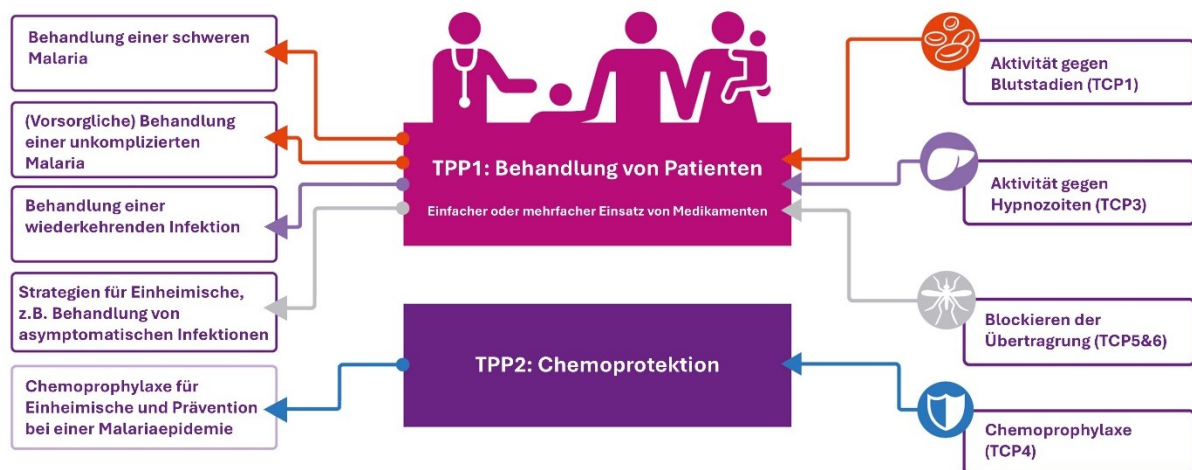


Abb. 8 Zusammenhang zwischen *target candidate profiles* (TCPs) und *target product profiles* (TPPs) nach BURROWS *et al.* Abbildung modifiziert vom MMV.^[46]

MMV stellt eine Plattform dar, neue Wirkstoffe sowohl im pharmazeutisch-industriellen als auch akademischen Umfeld mit kleineren Arbeitsgruppen zu identifizieren, bis zur Zulassung zu verfolgen und Entwicklungen voranzubringen (**Abb. 9**).^[47]

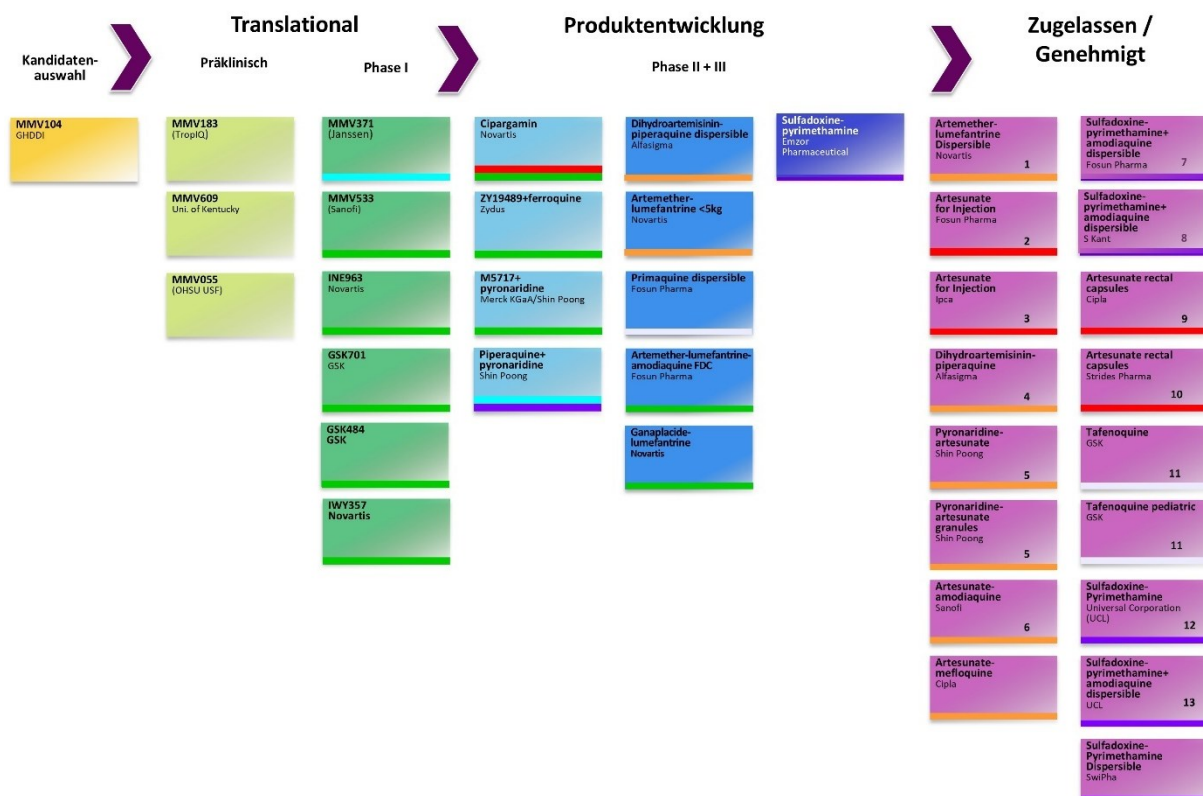


Abb. 9 Portfolio der MMV-unterstützten Projekte (Stand September 2024).^[47]

Die bisher zugelassenen Wirkstoffe und jene in Phase II und III sind mehrheitlich Artemisinin-basierte Kombinationspräparate.

MMV plant bis zum Jahr 2030 die Genehmigung und Distribution von vier neuen Arzneistoffen in endemischen Ländern vorantreiben zu können, welche nicht Artemisinin-basiert sind und gegenüber wirkstoffresistenten Stämmen aktiv sind, darunter je ein Wirkstoff für Schwangere im ersten Trimester und eine für Kinder verträgliche Darreichungsform von Primaquin. Ferner sollen bis zu 30 verschiedene Wirkstoffe in der Entwicklung stark vorangetrieben werden, darunter Kombinationspräparate aus drei verschiedenen Wirkstoffen, welche in einer Einzeldosis verabreicht werden und so einer Resistenz entgegenwirken sollen.

Neben der Minimierung von Resistenzen liegt der Fokus des MMV ebenfalls auf der Chemoprotektion, der Sicherheit sowie Verträglichkeit von Wirkstoffen, insbesondere von Schwangeren, Kindern, Jugendlichen und weiteren Risikogruppen. Zwei Wirkstoffe auf Basis von monoklonalen Antikörpern sollen so für den Einsatz als langwirkende Chemoprophylaxe evaluiert werden.^[48]

Neben MMV war bis zum Jahr 2015 die Organisation „*Drugs for Neglected Diseases Initiative*“ (DNDi) an der Entwicklung von Malariawirkstoffen beteiligt, die sich in den Folgejahren jedoch auf andere vernachlässigte Krankheiten, darunter die Chagas-Krankheit oder auch die Kryptokokkose, fokussierten.^[49] Die „*Bill and Melinda Gates Foundation*“ setzt seit 1999 den Schwerpunkt auf die Bekämpfung von Malaria und Poliomyelitis.

Einige Wirkstoffe befinden sich in klinischer Phase II und zeichnen sich durch eine zu Artemisinin unterschiedliche chemische Struktur oder neuartige Wirkweise im Parasiten aus (**Abb. 10**).^[50]

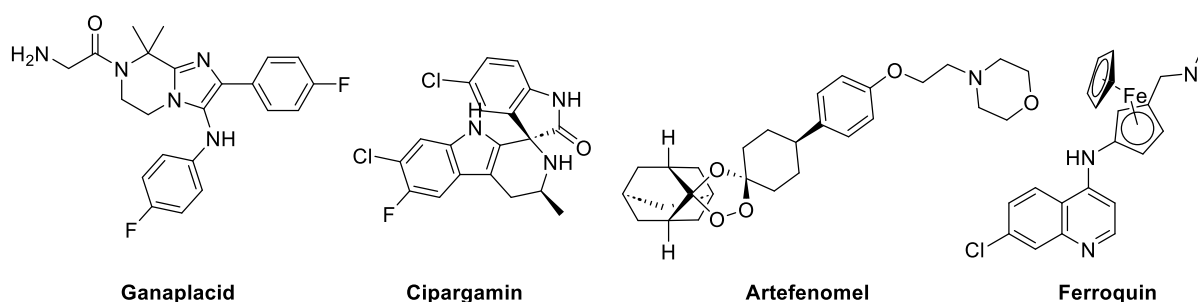


Abb. 10 Strukturen von ausgewählten MMV-unterstützten Wirkstoffen in klinischer Phase II.^[50]

Ganaplacid mit Imidazolopiperazin-Grundgerüst wurde in einem phänotypischen Screening von NAGLE *et al.* als Wirkstoff identifiziert und zeigt eine Aktivität gegen Leber-, Blut- und frühen Gametozytenstadien von *P. falciparum* und *P. vivax*. Der genaue Wirkmechanismus ist derzeit noch ungeklärt, könnte aber in Zusammenhang mit Membrantransportern im endoplasmatischen Retikulum stehen.^{[51],[52]}

Das Spiroindolon-Strukturelement des Wirkstoffs Cipargamin wurde insbesondere aufgrund einer wachsenden Artemisinin-Resistenz in der südostasiatischen Region entwickelt. Eine (1*R*,3*S*)-Konfiguration der beiden Stereozentren ist essenziell für die hohe antiplasmodiale Aktivität gegen *P. falciparum* sowohl in den asexuellen Blut- als auch sexuellen Gametozytenstadien, was die Übertragung der Parasiten reduzieren könnte. Cipargamin zeichnet sich durch eine schnelle Parasitenbeseitigung (*rapid parasite clearance*) und starke Fiebersenkung innerhalb von 8 h in Anwendung als Monotherapie aus. Präklinische Studien deuten auf eine Inhibierung des ATPase-Kationentransporters *Pf*ATP4 hin, was zu einer Perturbation der Na⁺-Homöostase sowie Erhöhung des pH-Wertes im Parasiten und zu einer Eryptose führen kann. [53]–[56] Neben Cipargamin zeigt das Dihydroisochinolion (+)-SJ733 ebenfalls inhibitorische Aktivität gegen *Pf*ATP4. [57]

Das 1,2,4-Trioxolan Artefenomel ist ein Ozonid mit verbesserter antiplasmodialen Aktivität, chemischen Stabilität und Bioverfügbarkeit im Vergleich zu Artemisinin und dem Vorgänger Arteloran. [58]–[60] Artefenomel weist einen Wirkmechanismus ähnlich zu Artemisinin in den asexuellen Blutstadien in *P. falciparum* auf und zeigt trotz des ähnlichen Pharmakophors eine Wirksamkeit gegenüber Artemisinsin-resistenten Parasiten mit *Pfkelch13*-Mutation. [61], [62] Ferner wurde eine gametocytocidale Aktivität gegen *P. vivax*, jedoch nicht *P. falciparum* Gametozyten beobachtet. [63], [64] Mit einer langen Plasmahalbwertszeit von etwa 30 Stunden im Menschen, einer niedrigen *in vivo* Toxizität und einem möglichen Einsatz als Monotherapie könnte Artefenomel als Substitut für Artemisinin in Kombination mit weiteren Wirkstoffen verwendet werden. [65], [66]

Das metallorganische Ferroquin ist ein 4-Aminochinolin Chloroquin-Derivat und zeigt eine Wirksamkeit in den asexuellen Blutstadien gegen Chloroquin-resistente *P. falciparum* Stämme. [67], [68] Der Wirkmechanismus ist bisher nicht vollständig bekannt.

BIOT *et al.* konnten zeigen, dass die intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen der 4-Amino- mit der terminalen tertiären Aminogruppe mitunter essenziell für die höhere Aktivität von Ferroquin im Vergleich zu Chloroquin sind. Ferroquin könnte durch die höhere Lipophilie und geringere Basizität eine erhöhte Membranpermeabilität aufweisen. DUBAR *et al.* beobachteten, dass das zentrale Fe(II)-Atom der Ferroceneinheit in Zusammenhang mit der Bildung von Hydroxylradikalen steht, welche die Membranen der Gastriole beschädigen und so zum Zelltod des Parasiten führen können. [69]–[72]

Die klinischen Wirkstoffe erzeugen Hoffnung, dass die Herausforderungen in der Entwicklung von Antimalaria-Arzneistoffen bezwungen werden können. Die weitere Entdeckung von potenten Wirkstoffen und die Verbesserung dieser ist durch das Auftreten von Resistenzen dennoch unabdingbar. Resistenzen können durch optimal ausgewählte Malariatherapien mit richtiger Dosierung und gezielter Anwendung von Arzneimitteln, die zuletzt vor Allem bei

Risikogruppen sicher und verträglich sind, sowie die Entdeckung von neuen Wirkmechanismen reduziert oder gar vermieden werden. Zur Verhinderung einer Transmission können zudem neue Arzneimittel mit langer Halbwertszeit eingesetzt werden.

1.2 Hitzeschockprotein 90 als Drug-Target

Die Homöostase beschreibt ein dynamisches Gleichgewicht und das Aufrechterhalten aller Funktionen in einer Zelle von Organismen. Durch äußere Einflüsse wie Temperaturänderung, Azidose, Toxine, metabolischen und oxidativen Stress, kommt es zu Fehlfaltungen und Mutationen in Proteinen, durch die ein gesundes Gleichgewicht der Zelle nicht mehr gewährleistet ist. Damit eine Homöostase wieder erreicht werden kann, werden Chaperone (Hilfsproteine) vermehrt exprimiert, die mit einer Vielzahl von Klienten bzw. Substraten (Proteinen) interagieren können.^[73]

Das Hitzeschockprotein 90 (Hsp90) ist ein 90 kDa schweres, ATP-abhängiges Chaperon, welches unter normalen Bedingungen im Menschen ca. 1 – 2 % des gesamten Proteoms ausmacht und bei Zellstress überexprimiert vorliegt (4 – 6 %).^[74]

Mit etwa 400 Klientproteinen ist Hsp90 im Menschen (*hHsp90*) neben der korrekten Faltung von Proteinen in ihre funktionelle Konformation für diverse weitere Bereiche verantwortlich, darunter Signalkaskaden, Reparatur von DNA-Schäden, Aktivierung von Rezeptoren und Bindung von Liganden an diese (z.B. Steroidhormone) oder auch das Zusammensetzen von Multiproteinkomplexen.^{[75],[76]}

Hsp90 und andere Hitzeschockproteine, die nach ihrem Molekulargewicht klassifiziert werden, bilden zusammen mit weiteren (Co-)Chaperonen ein Netzwerk, welches maßgeblich zur Proteostase und so zu einem gesunden Zellzustand beiträgt. Der vollständige Funktionsumfang des Chaperonnetzwerkes um *hHsp90* sowie die beteiligten Co-Chaperone und Klienten sind noch nicht vollständig entschlüsselt, sodass Hsp90 weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung ist.

In Krebszellen, bei der malignen Transformation und Entwicklung von diversen Tumoren, liegt Hsp90 überexprimiert vor. Durch proteotoxischen Stress, darunter Hitze, Azidose und Hypoxie, ist ebenfalls eine Überexprimierung von Hsp90 in Krebszellen beobachtbar, welche eine unverzichtbare und überlebenswichtige Abhängigkeit der onkogenen Klientproteine von Hsp90 zeigt.^{[77],[78]} Hsp90 stellt aufgrund der zentralen Rolle in der Stabilisierung, Proliferation, Zellinvasion und -migration von diversen Krebszellen sowie der Abhängigkeit der vielen Klientproteine daher ein geeignetes *Target* dar.^[79]

Das Hitzeschockprotein 90 ist ebenfalls in *P. falciparum* vorzufinden. Insbesondere während der metabolisch aktiven Phase der Trophozoitenbildung (**Abb. 1**) oder auch bei Fieberschüben, die während einer Malariainfektion auftreten können, ist eine Überexprimierung von *PfHsp90* beobachtbar.^[80]

In *P. falciparum* liegen vier paraloge Hsp90-Isoformen (*PfHsp90*) vor, im Zytosol, im Mitochondrium, im endoplasmatischen Retikulum und im Apicoplast (**Abb. 11**).^[81]

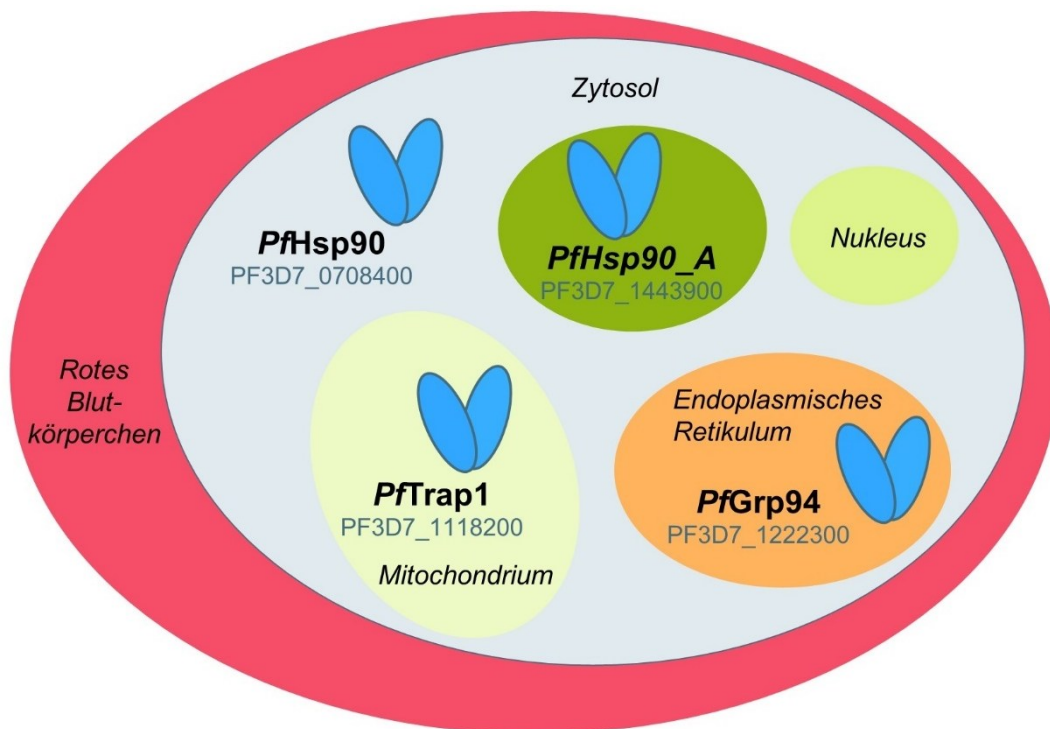


Abb. 11 Illustration eines von *P. falciparum* befallenen Erythrozyten sowie die Orte der vier Hsp90-Isoformen (blaue Objekte). Grau hinterlegt sind jeweils die *PlasmoDB*-Datenbanknummern (<https://plasmodb.org>).

Die Chaperone haben einen Anteil von ca. 2 % des gesamten Proteoms von *P. falciparum*. Die genauen Funktionen und Beteiligten des Chaperon-Netzwerkes in *P. falciparum* sind im Vergleich zu den humanen Chaperonen weniger bekannt.^[82] Der komplexe Lebenszyklus des Parasiten, die vielen strukturellen Veränderungen sowie die fremde Umgebung in Vektor und Wirt, lässt eine Abhängigkeit von dem Chaperonnetzwerk vermuten, welches maßgeblich zur Homöo- und Proteostase beiträgt und somit essenziell für das Überleben des Parasiten ist.

PfHsp90 übernimmt nicht nur während der intraerythrozytären Phase, sondern auch in den Leber- und frühen Gametozytenstadien eine essenzielle Rolle, sodass *PfHsp90* ein geeignetes *Target* in der Entwicklung von antiplasmodialen Wirkstoffen darstellt.^{[83]–[87]}

1.2.1 Aufbau und Funktionen von *Pf*Hsp90

Die Aminosäuresequenzen des zytoplasmischen humanen und zytosolischen plasmodialen Hsp90 sind hochkonserviert und zeigen eine Übereinstimmung von 64 %. Der Aufbau und die Funktionen der beiden homologen Proteine sind daher ähnlich und unterscheiden sich maßgeblich in den Co-Chaperonen und Client-Proteinen. Während eine Kristallstruktur des vollständigen humanen Hsp90 verfügbar ist (PDB: 3Q6M), konnte die Struktur des gesamten zytosolischen plasmodialen Hsp90 bisher nur in Lösung untersucht werden.^{[88],[89]}

Strukturstudien zeigen, dass es sich bei *Pf*Hsp90 um ein flexibles, im Vergleich zu *h*Hsp90 verlängertes Homodimer, handelt. *Pf*Hsp90 kann in einzelne charakteristische Funktionsbereiche eingeteilt werden, die mit denen von *h*Hsp90 vergleichbar sind (**Abb. 12**).

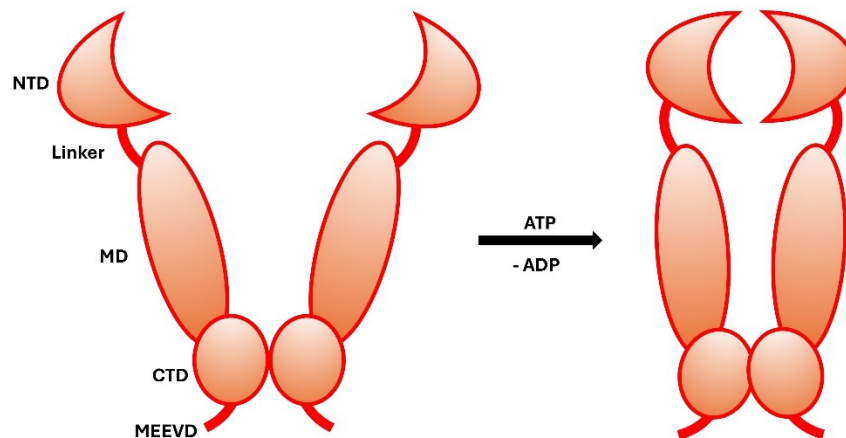


Abb. 12 Schematischer Aufbau von *Pf*Hsp90.

*Pf*Hsp90 besteht aus einer N-terminalen Domäne (NTD), einem Linker, der die NTD und mittlere Domäne (MD) verbindet sowie einer C-terminalen Domäne (CTD) und einem daran gebundenen endständigen MEEVD-Pentapeptid.

In der N-terminalen Domäne findet hauptsächlich die Hydrolyse von ATP zu ADP statt, welche die Energie des Konformationswechsels von dem offenen V-förmigen Ruhezustand in den geschlossenen aktiven Zustand liefert (**Abb. 12**). Die über 200 Clientproteine werden überwiegend an der MD gebunden. Die CTD ist der Homodimerisierungsbereich von *Pf*Hsp90. Weitere Co-Chaperone können an dem MEEVD-Motiv an *Pf*Hsp90 binden. Die Dimerisierung von *Pf*Hsp90 ist essenziell für die Chaperon-Aktivität.

Zusammen mit verschiedenen Hitzeschockproteinen und Co-Chaperonen, die bei spezifischen Konformationen von *Pf*Hsp90 gleichzeitig, konkurrierend oder auch

nacheinander an *Pf*Hsp90 binden, können Clientproteine rekrutiert und der Zyklus in Hsp90 durchlaufen werden, mit dem die aktive Form der Clientproteine erreicht werden kann (**Abb. 13**).^[90] Welche Co-Chaperone an dem Zyklus beteiligt sind, hängt maßgeblich von dem Clientprotein und der jeweiligen Hsp90-Isoform ab.

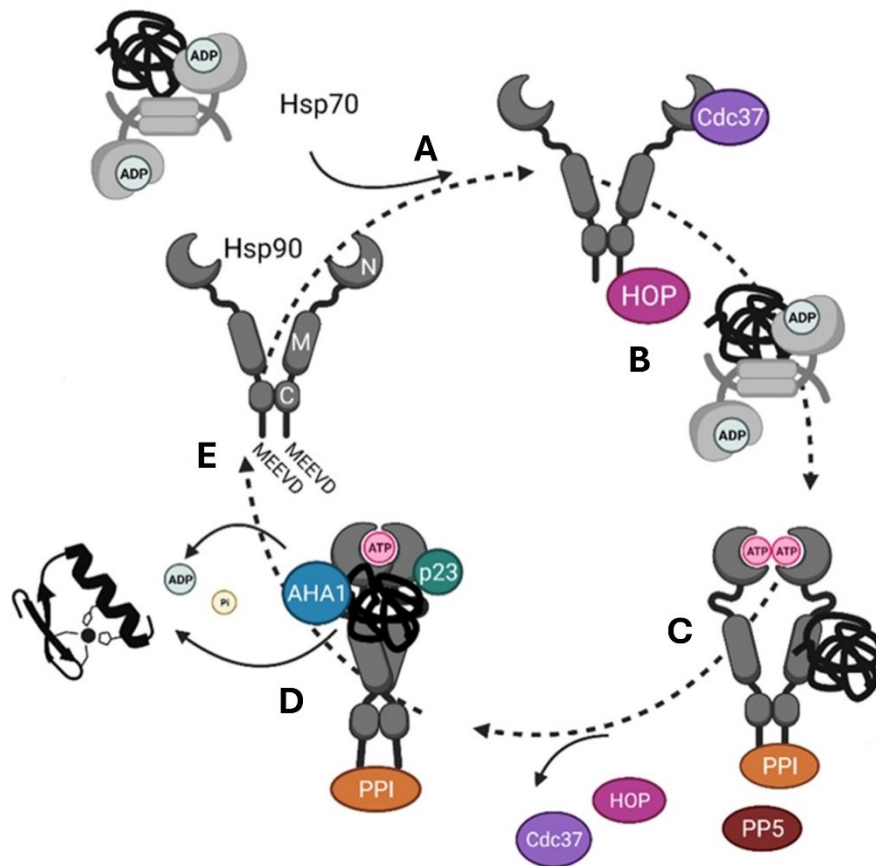


Abb. 13 Schematische Darstellung der korrekten Faltung eines Clientproteins durch einen Komplex aus Hsp90 und Co-Chaperonen. (Abbildung modifiziert nach DUTTA, SINGH, EDIKINS, BLATCH *et al.*)^[91]

Die Annäherung der Clientproteine an *Pf*Hsp90 wird durch verschiedene Co-Chaperone unterstützt (**Abb. 13, A**). Insbesondere Kinasen werden so vom Co-Chaperon Cdc37 zum humanen Hsp90 rekrutiert, welches bisher jedoch nicht in *P. falciparum* identifiziert werden konnte.

Das Hitzeschockprotein *Pf*Hsp70 kann ebenfalls fehlgefaltete Clientproteine rekrutieren, neu falten und sie anschließend an *Pf*Hsp90 weiterreichen, an welchem die vollständige Faltung sowie Reifung der Proteinfunktionen abläuft. Das Weiterreichen der Clientproteine von *Pf*Hsp70 an *Pf*Hsp90 wird dabei vom Co-Chaperon *Pf*Hop unterstützt, welches über eine TPR-Domäne (*Tetracopeptide repeat*) verfügt. Die TPR-Domäne kann gleichzeitig eine Bindung zu den beiden MEEVD-Aminosäuresequenzen von *Pf*Hsp70 und *Pf*Hsp90 aufbauen, aus dem der Hsp70-Hsp90-Komplex entsteht (**Abb. 13, B**).

In der N-terminalen Domäne (NTD) von *Pf*Hsp90 befindet sich die ATP-Bindetasche, die der von *h*Hsp90 strukturell ähnlich ist, aber leichte Veränderungen in der Hydrophobie und Volumen sowie polareren Resten am Taschenrand aufweist. In biochemischen Studien wurde zudem eine um 30% erhöhte Bindungsaffinität von ATP zur Bindetasche und daraus resultierende sechsfach höhere ATPase-Aktivität von *Pf*Hsp90 beobachtet. Die ATP-Bindungstasche besteht aus neun antiparallelen β -Faltblättern mit sieben α -Helices, die zusammen Teil der konservierten GHKL-Proteinfamilie (Gyrase, Hsp90, Histidinkinase, MutL) sind.^{[92],[93]}

Die NTD der beiden Hsp90-Monomere enthalten ein *lid*-Segment an der ATP-Bindetasche, welches in der N-terminalen Dimerisierung von einer offenen Konformation nach ATP-Bindung in eine geschlossene Form übergeht. Gleichzeitig wird das Clientprotein von dem Co-Chaperon *Pf*Hsp70 auf die MD von *Pf*Hsp90 unter Verlassen der Co-Chaperone (*Pf*Hop) auf *Pf*Hsp90 übertragen. Die Co-Chaperone *Pf*Cyp40 und *Pf*FKBP35 zählen zur Klasse der *Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerasen* und können ebenso wie das Co-Chaperon PP5 (*Protein-Phosphatase 5*) die posttranslationale Modifizierung regulieren und Reifung bzw. Bildung des asymmetrischen Hsp90-Komplexes unterstützen. (**Abb. 13, C**).^{[94]–[96]}

Der flexible Linker zwischen NTD und mittlerer Domäne (MD) von *Pf*Hsp90 zeigte die größten Unterschiede im Vergleich zu *h*Hsp90. Der Linker zeichnet sich durch eine längere und stärker negativ geladene Aminosäuresequenz aus. Dieser Linker kann mit dem γ -Phosphat von ATP besser interagieren und so zu einer verbesserten ATPase-Aktivität beitragen. Der Einfluss des Linkers auf die Chaperonaktivität wurde von TSUTSUMI *et al.* untersucht. Im Hsp90 des Eukaroyten *Saccharomyces cerevisiae* (*y*Hsp90) wurde der Linker durch den von zytosolischem *Pf*Hsp90 und auch zytoplasmischem *h*Hsp90 ersetzt. In beiden chimären *y*Hsp90 mit plasmodialem oder humanem Linker konnte eine Verringerung der ATPase-Aktivität (*Pf*Hsp90: < 10% im Vergleich zum *y*Hsp90-Wildtyp) beobachtet werden. Ferner wurde das *y*Hsp90 Clientprotein Ste11 Δ N vom *y*Hsp90-Wildtyp und *y*Hsp90 mit humanem Linker, jedoch nicht von *y*Hsp90 mit plasmodialem Linker erfolgreich exprimiert.^[97]

Zusammen mit dem flexiblen Linker untergehen die NTD und MD nach Bindung des ATPs eine Konformationsänderung, mit der das γ -Phosphat des ATP in räumliche Nähe zu essenziellen Aminosäuren in der MD gebracht wird, welche die Hydrolyse von ATP unterstützen können.^[98] Das an der MD bindende Co-Chaperon *Pf*Aha1 leitet maßgeblich die die ATPase ein und konkurriert mit dem Co-Chaperon p23, welches die ATPase-Aktivität durch inhibitorische Eigenschaften steuert. Dadurch können Clientproteine länger am Hsp90-Komplex gebunden bleiben, bis die aktive Konformation oder die Reife des Clientproteins erreicht ist (**Abb. 13, D**).^[99] Nach der Hydrolyse von ATP zu ADP und erfolgreicher Faltung und Reifung

der Clientproteine kehrt das PfHsp90 in die offene Konformation zurück und steht für weitere Clientproteine zur Verfügung.

1.2.2 Hsp90-Inhibitoren

Der komplexe Zyklus von PfHsp90 (**Abb. 13**) ermöglicht eine Vielzahl von Angriffspunkten an dem Homodimer, die Chaperonaktivität zu inhibieren um die Homöo- und Proteostase, sowohl in den Leber-, asexuellen Blut- und Gametozytenstadien des Parasiten, zu destabilisieren.^[87] Die Aggregation von ungefalteten Proteinen führt zu einer erhöhten Zelltoxizität und daraus resultierenden Zelltod des Parasiten.

Mit einer Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von 64% des zytoplasmischen humanen und zytosolischen plasmodialen Hsp90 wurden hHsp90-Inhibitoren mit antiproliferativen Eigenschaften zunächst als Grundlage für die Erforschung von antiplasmodialen Hsp90-Inhibitoren genutzt.^[88] Die Unterschiede in den Aminosäuresequenzen können sodann gezielt genutzt werden, um die Selektivität und Affinität gegenüber PfHsp90 zu erhöhen.^[88]

Die meisten der in diesem Kapitel dargestellten Wirkstoffe zeigen sowohl eine Wirksamkeit gegen hHsp90 als auch PfHsp90.

1.2.2.1 N-terminale hHsp90- und PfHsp90-Inhibitoren

Bei der Entwicklung von humanen und plasmodialen Hsp90-Inhibitoren wurde der Fokus zunächst auf die ATP-Bindetasche in der NTD gelegt. Die entwickelten Inhibitoren sollen so mit dieser Bindetasche wechselwirken und eine Bindung von ATP inhibieren.

Der Naturstoff Geldanamycin (**GA**) ist ein hHsp90-Inhibitor mit antionkogenen Eigenschaften, welcher zunächst als Kinaseinhibitor-Antibiotikum klassifiziert wurde. Weitere Studien zeigten, dass **GA** spezifisch an die ATP-Bindetasche von hHsp90 bindet.^[100] Auch bei *P. falciparum* konnte *in vitro* eine zweistellig-nanomolare Wachstumsinhibierung beobachtet werden, die vergleichbar mit der von Chloroquin ist (**Abb. 14**).^[85]

Trotz der potenten antiplasmodialen Eigenschaften scheiterte eine Genehmigung von klinischen Studien mit **GA** als Antimalariawirkstoff an einer hohen Hepatotoxizität und schlechten Wasserlöslichkeit.^[101] Die Hepatotoxizität von **GA** konnte durch einen geringen

Unterschied in der Bindungsaffinität von **GA** zu *Pf*Hsp90 und *h*Hsp90 und demnach geringer plasmodialer Selektivität erklärt werden.^[101]

Zur Verbesserung des Toxizitätsprofils und pharmakokinetischen Eigenschaften wurde **GA** zu den beiden Derivaten **17-AAG** und **17-DMAG** weiterentwickelt, die sich durch ihre funktionelle Gruppe am C17-Kohlenstoffatom unterscheiden (**Abb. 14**).

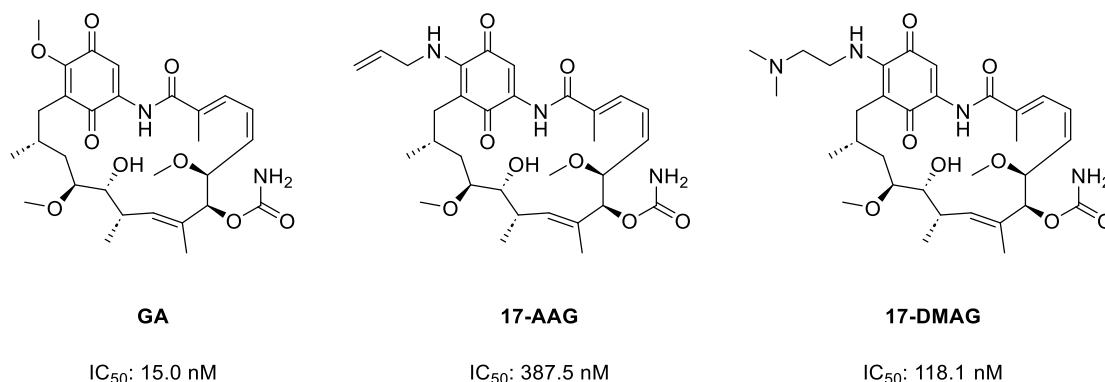


Abb. 14 Struktur und Wachstumsinhibition (IC₅₀) in *P. falciparum* von Geldanamycin (**GA**) sowie die Geldanamycin-Derivate **17-AAG** und **17-DMAG**.^[85]

Das Derivat **17-AAG** zeigte vielversprechende Ergebnisse in klinischen Phase-2 Studien gegen Brustkrebs (HER-2). Allerdings war in präklinischen Studien von **17-AAG** und **17-DMAG** als mögliche plasmodiale Inhibitoren keine Selektivität gegenüber dem plasmodialen Hsp90 beobachtbar.^{[86],[102]}

Mithilfe von hochaufgelösten Kristallstrukturen der NTD von *h*Hsp90 mit gebundenem Geldanamycin konnten Wechselwirkungen von Inhibitor und Protein identifiziert und daraus potente Inhibitoren mittels *high-throughput-screenings* (HTS) entwickelt werden.^[103]

Vielversprechend ist das Alkaloid **Harmin** (**HA**, **Abb. 15**), welches eine potente Wachstumsinhibition von *P. falciparum* (IC₅₀: 50.3 nM) aufweist. Die Wechselwirkung mit Arg98 in *Pf*Hsp90 (Lys90 in *h*Hsp90) erhöht die Selektivität gegenüber *Pf*Hsp90. Durch *N*- oder *O*-Substitution der Harmin-Leitstruktur wurde die antiplasmodiale Aktivität gegen den Chloroquin-sensitiven Stamm *Pf*3D7 und Chloroquin-resistenten Stamm *Pf*Dd2 verbessert (**HA-7h** und **HA-27a**, **Abb. 15**). Ein Selektivitätsindex (SI) von 1105 gegenüber der humanen Leberkrebszelllinie HepG2 konnte insbesondere mit einer Substitution der Triazol-Gruppe (**HA-7h**) durch die bioisostere Amidfunktionalität und einer *meta*-Trifluormethylgruppe an dem Zinnamoylrest erreicht werden. Die Trifluormethylgruppe wechselwirkt dabei mit den Aminosäuren Arg98, Asn37 und Phe124 der ATP-Bindungs tasche in *Pf*Hsp90.^{[100],[104],[105]}

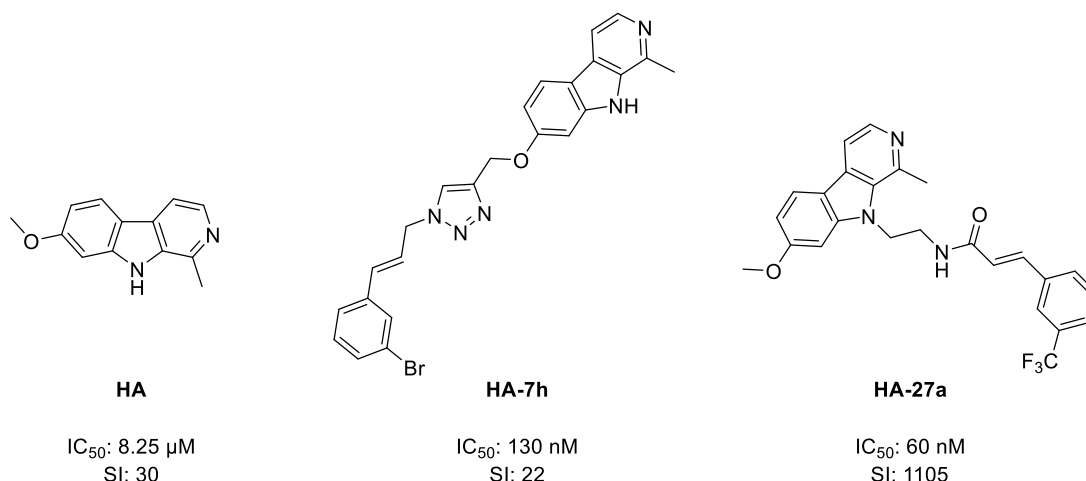


Abb. 15 Struktur, Wachstumsinhibierung (IC₅₀) in *P. falciparum* (Pf3D7) und Selektivitätsindices gegenüber HepG2 von Harmin (**HA**) sowie die Harmin-Derivate **HA-7h** und **HA-27a**.^{[104],[105]}

Die Harmin-Derivate **HA-7h** und **HA-27a** weisen neben inhibitorischen Eigenschaften in dem erythrozytären Stadium des Parasiten eine Reduzierung der Parasitämie um ca. 52 % im Infektionsmausmodell *P. berghei* bei drei täglichen Injektionen an sieben Tagen mit einer Dosierung von 100 mg/kg sowie eine verlängerte Lebenszeit der Mäuse auf.^[106]

Auch wenn die Harmin-Derivate eine potente antiplasmodiale Aktivität gegen den Chloroquin-sensitiven Stamm Pf3D7 aufweisen, so ist eine verringerte Aktivität im Chloroquin-resistenten Stamm PfDd2 beobachtbar. Eine Harmin-Resistenz konnte auf das Protein Cg4 zurückgeführt werden, welches ebenfalls mit PfHsp90 interagieren kann. Der Zusammenhang zwischen PfHsp90, Cg4 und der Entwicklung von Resistenzmechanismen muss jedoch noch genau untersucht werden.^[80]

Weitere Strukturklassen mit Bindungsaffinität zur ATP-Bindungstasche konnten durch *in silico* Untersuchungen mithilfe der Kristallstruktur der zytosolischen NTD von PfHps90 identifiziert werden. Purin-Derivate (**PU-H71**), *N*-Cbz-Derivate (**5B**) und das Antibiotikum Radicicol (**RA**) weisen eine antiplasmodiale Aktivität und plasmodiale Selektivität im Vergleich zu humanen Zelllinien auf (**Abb. 16**).^{[107],[108]}

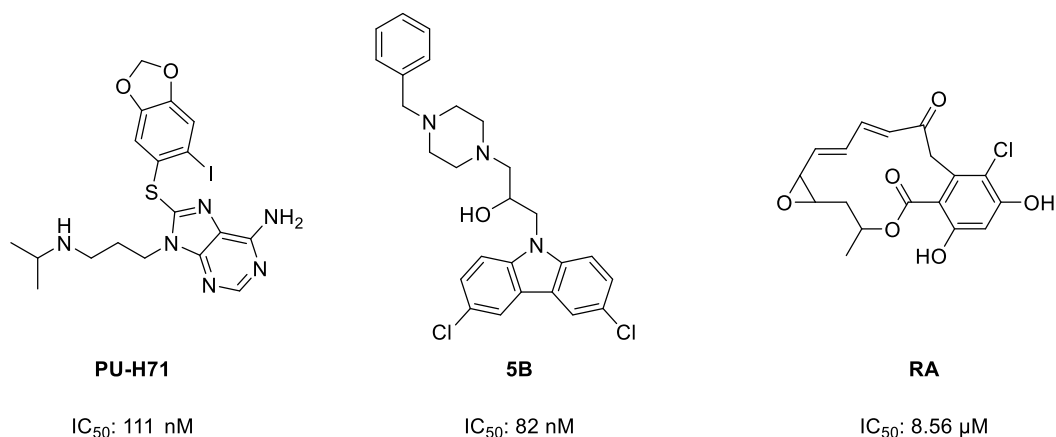


Abb. 16 Struktur und Wachstumsinhibierung (IC₅₀) in *P. falciparum* von **PU-H71**, **5B** und **RA**.^[108]

Die Derivate (**Abb. 16**) wechselwirken wie die **GA**- oder **HA**-basierten Inhibitoren mit spezifischen Bereichen der N-terminalen ATP-Bindetasche in *Pf*Hsp90. Je nach Substitutionsmuster zeigen einzelne Purin- oder Radicol-Derivate eine höhere Affinität zu paralogen *Pf*Hsp90-Isoformen im endoplasmatischen Retikulum (*Pf*Grp94) und Mitochondrium (*Pf*Trap1) gegenüber dem zytosolischen *Pf*Hsp90. Die genauen Funktionen der einzelnen *Pf*Hsp90-Isoformen im Parasiten müssen weiterhin aufgeschlüsselt werden, um Wirkmechanismen der *Pf*Hsp90-Inhibitoren erklären zu können.^[109]

Bei humanem Hsp90 können Hitzeschockproteine (darunter auch Hsp27 und Hsp70) stark hochreguliert (engl. *heat-shock-response*, HSR) werden, sodass die Zelle vor weiterem Stress und der Apoptose geschützt ist. Der HSR wird insbesondere durch N-terminale Hsp90-Inhibitoren induziert, woraus eine verringerte therapeutische Wirksamkeit der Inhibitoren beim Menschen resultiert.^[110] Zusätzlich aufgrund von Nebenwirkungen bei humanen N-terminalen Inhibitoren, darunter gastrointestinale Toxizität als auch Neutropenie, wird der Blick daher vermehrt auf mögliche Ansätze zur Adressierung der MD und CTD bei humanem Hsp90 gerichtet.

1.2.2.2 M- und C-terminale *h*Hsp90- und *Pf*Hsp90-Inhibitoren

Die MD und CTD als Drug-*Targets* haben durch den Fokus auf die NTD und die erfolgreiche Synthese von *Pf*Hsp90-selektiven Inhibitoren bislang weniger Aufmerksamkeit bekommen. Zudem sind von keinem *Pf*Hsp90-Paralog Kristallstrukturen in voller Proteidlänge bekannt, mit denen M- oder C-terminale Inhibitoren entwickelt werden könnten. Mit einer Strukturanalyse von *Pf*Hsp90 in Lösung (Kap. 1.2.1) können jedoch mögliche Ziele identifiziert werden.^[88]

Bislang wurden keine Inhibitoren entdeckt, welche selektiv die mittlere Domäne von *Pf*Hsp90 adressieren. Das Naturprodukt Gamboginsäure (**GBA**), das Derivat **DAP-19** sowie das Diterpen Triptolid (**TL**) zeigen inhibitorische Eigenschaften gegenüber dem humanen zytosolischen β Hsp90, indem diese selektiv an eine Bindetasche in der MD binden (**Abb. 17**).^{[111],[112]}

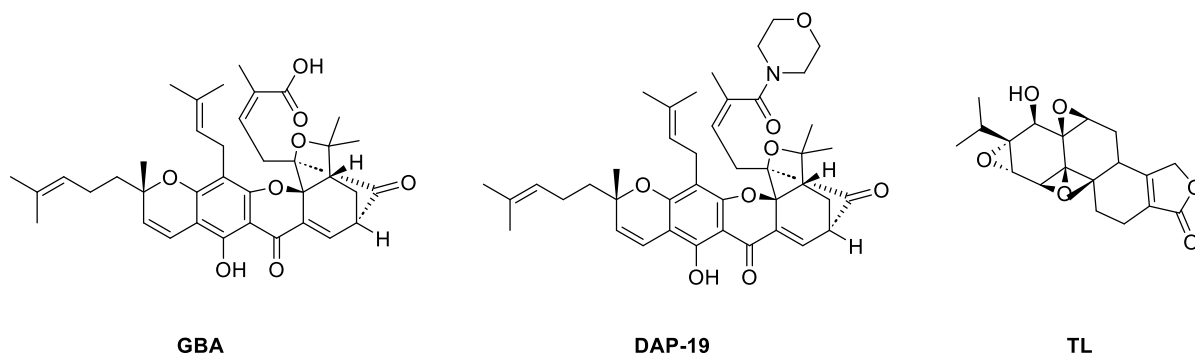


Abb. 17 Struktur von **GBA**, **DAP-19** und **TL**.^{[111],[112]}

Die hydrophoben Seitenketten von Gamboginsäure **GBA** und **DAP-19** interagieren mit den Aminosäuren Ile353, Ser365, Leu369 und Ile370 in der Bindetasche der MD. Weiterhin kann **GBA** Wasserstoffbrückenbindungen zu Glu372, Asn436, Asn375 und Asn351 aufbauen, welche die selektive Bindung zum humanen β Hsp90 weiter stabilisieren. Eine Bindung an die orthologen humanen Isoformen Hsp90 α , GRP94 und TRAP-1 wurde nicht beobachtet.^[111]

Das Antibiotikum **Novobiocin** wurde als erster C-terminaler *h*Hsp90-Inhibitor entdeckt. Aufgrund einer geringen Bindungsaffinität zur CTD wurde **Novobiocin** u.a. zu **A4** und **NB-10c** weiterentwickelt. Als weiterer CTD-Inhibitor wurde **DHPM** mit 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-on-Gerüst entdeckt (**Abb. 18**).^{[113]–[115]}

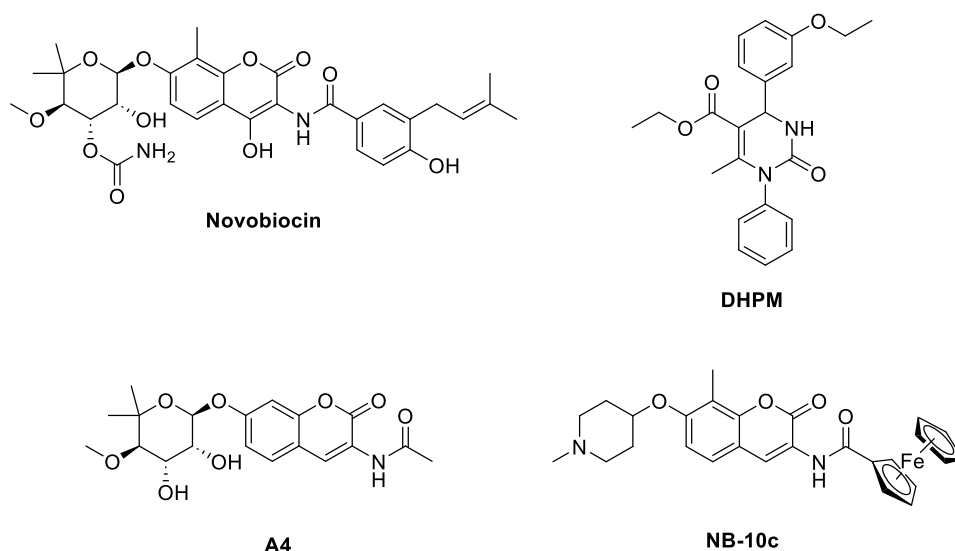


Abb. 18 Struktur von **Novobiocin** und den Derivaten **A4**, **NB-10c** sowie **DHPM**.^{[113]–[115]}

Novobiocin und **NB-10c** wurden in Wachstumsinhibierungs-Assays gegen die humane Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 und *P. falciparum* Pf3D7 untersucht. **NB-10c** wies dabei eine antiplasmodiale Aktivität im submikrolaren Bereich und plasmodiale Selektivität auf. **Novobiocin** war nicht antiplasmodial aktiv. Eine Zytotoxizität bei **NB-10c** gegen eine Zervixkarzinom-Zelllinie war nur in geringem, fast vernachlässigbarem Maße beobachtbar. Ferner untersuchten MBABA *et al.*, inwiefern die beobachtete antiplasmodiale Aktivität der Ferrocenoyl-Derivate (**NB-10c**) auf eine Inhibierung von PfHsp90 zurückgeführt werden kann. Dafür wurden Hefestämme modifiziert, welche entweder das humane β Hsp90 oder das plasmodiale PfHsp90 exprimieren. Die Hefestämme wurden mit **Novobiocin**, **NB-10c**-Analoga, DMSO als Negativ- und **GA** als Positivkontrolle versetzt und das Wachstum der Hefestämme verfolgt. Eine Wachstumshemmung wurde bei **GA**, jedoch nicht bei den Novobiocin-Derivaten (**NB-10c**-Analogon) beobachtet. Dass die Ferrocenoyl-Derivate nicht PfHsp90, sondern andere *Targets* in *P. falciparum* adressieren könnten, wurde mit der Ferrocen-Gruppe begründet, da Novobiocin, das Grundgerüst der Ferrocenoyl-Derivate, antiproliferative Eigenschaften durch Inhibierung von hHsp90 aufweist.^[115]

Zusammengefasst bieten die NTD, MD und CTD von PfHsp90 viel Potenzial für die Entwicklung von PfHsp90-Inhibitoren. Die bisherigen Erkenntnisse aus der Entwicklung von humanen Hsp90-Inhibitoren können als Grundlage genutzt werden und PfHsp90-selektive Inhibitoren entwickelt werden.

Durch den Fokus auf die NTD in der Entwicklung von Hsp90-Inhibitoren sowohl bei hHsp90 als auch PfHsp90 wurden die MD und CTD als Target in PfHsp90 weniger adressiert.

1.3 Protein-Protein-Interaktionen

Damit diverse zelluläre Prozesse ablaufen können, müssen Proteine miteinander wechselwirken. Das Interaktom beschreibt die Gesamtheit dieser molekularen Wechselwirkungen eines Organismus und besteht in *P. falciparum* aus derzeit mehr als 20.000, im Menschen sogar aus bis zu 650.000 verschiedenen Interaktionen. Das Interaktom des Parasiten wurde noch nicht vollständig entschlüsselt.^{[116],[117]}

Im vorherigen Kapitel wurden Beispiele für *Pf*Hsp90-Inhibitoren aufgeführt, bei denen Interaktionen von kleinen niedermolekularen Liganden mit dem Protein stattfinden. Die Liganden wechselwirken dabei mit stark konservierten, tiefen Bindetaschen eines Proteins mit einer Kontaktfläche von ca. 300 – 1000 Å².^[118]

In Kontrast dazu stehen die Protein-Protein-Interaktionen (PPI), deren Wechselwirkung zweier Proteine sich meist durch größere und flachere Kontaktflächen von 1000 – 4000 Å² auszeichnet.^[118]

Die Bindungsenergie ist bei PPI über die gesamte Kontaktfläche energetisch diskontinuierlich verteilt. Essenzielle Aminosäuren auf der Kontaktfläche von Proteinen, bei denen sich die freie Bindungsenergie im Vergleich zur Mutation dieser Aminosäure zu Alanin erhöht ($\Delta\Delta G > 2 \text{ kcal mol}^{-1}$), werden *hot-spots* genannt. Trotz der oftmals kleinen *hot-spot*-Fläche tragen diese maßgeblich zur Gesamtbindungsenergie der PPI bei.^[119] Mehrere räumlich nahe *hot-spot*-Aminosäuren können als *hot-spot*-Bereich bezeichnet werden (**Abb. 19**).

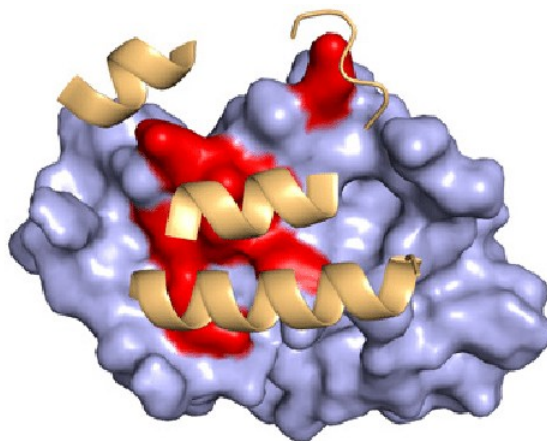


Abb. 19 Ausschnitte aus der Oberflächendarstellung des Proteins TFF3 und der Tertiärstruktur von Protein PP3. *Hot-spot*-Bereiche von TFF3 sind rot markiert. TFF3 und PP3 bilden durch PPI einen TFF3-PP3-Komplex.^[120]

In *hot-spots* werden vermehrt die Aminosäuren Tryptophan, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin oder Tyrosin vorgefunden, sodass sich PPI insbesondere durch hydrophobe Wechselwirkungen, π - π -Interaktionen oder Wasserstoffbrückenbindungen auszeichnen.^[121]

Mithilfe der hydrophoben Eigenschaften der *hot-spot*-Aminosäuren werden so Wassermoleküle (das Solvenz) abgeschirmt und eine bessere Interaktion der beiden komplementären Kontaktflächen der Proteine ermöglicht. Weitere Aminosäurereste, welche um den *hot-spot* herum angeordnet sind, können die Abschirmung des *hot-spots* weiter erhöhen (*O-ring-theory*). Die umliegenden *non-hot-spot*-Aminosäuren tragen dabei selbst nur einen geringen Beitrag zur freien Bindungsenergie des *hot-spots* bei. ^[121]

1.4 Peptidomimetika

PPI können als „*Drug-Targets*“ genutzt werden, indem *hot-spot*-Bereiche durch Peptide nachgeahmt werden.^[122]

Durch die große Kontaktfläche und diskontinuierliche Verteilung der Bindungsenergie ist eine Adressierung der *hot-spots* mit niedermolekularen Wirkstoffen durch eine geringe Bindungsaffinität erschwert.

Herausforderungen von Peptiden als PPI-Inhibitoren sind u.a. ein hohes Molekulargewicht (abhängig von der Anzahl nachzuahmender Aminosäuren) und der damit oftmals verbundenen schlechten Absorption und Membranpermeabilität. Ferner können die Amidbindungen der Peptide durch Peptidasen abgebaut werden. Daraus resultiert eine geringere metabolische Stabilität und auch geringere Halbwertszeit z.B. nach oraler Applikation des Wirkstoffes.^[123]

Aufgrund der Rotationsfreiheiten der Amidbindung ist das Grundgerüst der Peptide flexibel und kann mit mehreren Kontaktflächen interagieren, woraus sich eine verringerte Selektivität gegenüber dem Target-Protein ergeben kann. Durch die geringe Selektivität kann es zu unerwarteten Immunantworten oder auch erhöhter Toxizität kommen.^[124]

In der Entwicklung von Peptidomimetika wird daher der Fokus auf die Verbesserung der Parameter wie die metabolische Stabilität, die Bioverfügbarkeit sowie die Bindungsaffinität und Selektivität zum Zielprotein gelegt. So entwickelten HIRSCHMANN und NICOLAOU ein **Somatostatin-14-Mimetikum** des menschlichen Hormons **Somatostatin-14**, welches auf einem β -D-Glucose-Grundgerüst basiert und durch die Aminosäureseitenketten Tryptophan, Lysin und Phenylalanin die gleichen Protein-Protein-Interaktionen wie das natürliche Peptid zeigt (**Abb. 20**). Bei dem Peptidomimetikum wurden mit **Somatostatin-14** vergleichbare Inhibitionseigenschaften sowie gleichzeitig verbesserte Stabilität gegenüber Proteolyse und Selektivität gegenüber dem Zielprotein beobachtet.^[125]

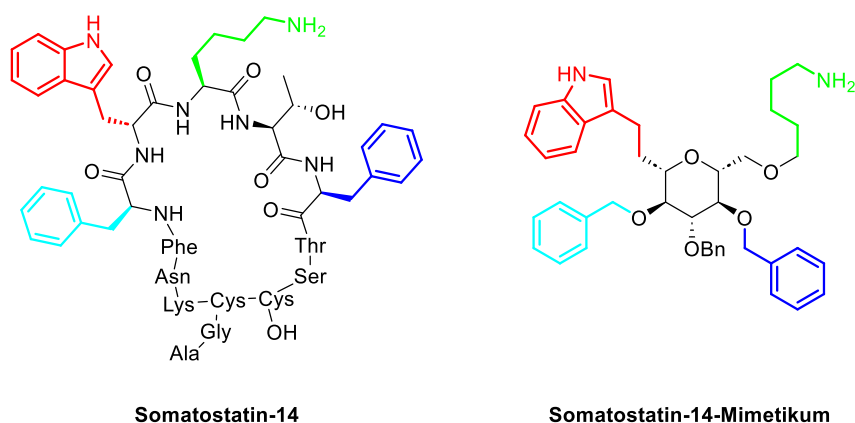


Abb. 20 Struktur des Hormons **Somatostatin-14** sowie das von HIRSCHMANN und NICOLAOU entwickelte **Somatostatin-14-Mimetikum**.^[125]

Peptidomimetika können in vier Klassen **A – D** nach GROSSMANN *et al.* hinsichtlich ihrem Grad des Peptidcharakters eingeteilt werden (**Abb. 21**).^[126]

Peptidomimetika	
Peptide	Natürliche Peptidsequenzen
Klasse A – modifizierte Peptide	Natürliche Peptidstruktur weitestgehend erhalten; wenige Modifikationen zur Stabilisierung der Konformation
Klasse B – modifizierte Peptide / Foldamere	Teilweise modifiziertes Rückgrat; nichtnatürliche Aminosäuren oder <u>Peptoide</u>
Klasse C – Strukturmimetika	Nicht-peptidisches Gerüst mit ähnlicher Seitenkettentopologie aus niedermolekularen Verbindungen
Klasse D – mechanistische Mimetika	Niedermolekulare Verbindungen ohne Peptidgerüst; funktionelle Nachahmung der Peptidwirkung

peptidartig
 niedermolekular

Abb. 21 Schematische Übersicht der vier Peptidomimetikaklassen nach GROSSMANN *et al.*^[126]

Die Klassen **A** und **B** umfassen hochmolekulare Peptidomimetika, welche die höchste Ähnlichkeit mit dem natürlichen Peptid haben. Mimetika, welche geringfügige Modifizierungen in der Aminosäureseitenkette aufweisen, werden mit Klasse **A** und Mimetika, welche zusätzlich am Rückgrat verändert wurden, mit **B** klassifiziert. Die Aminosäureseitenketten können dabei auch nicht-natürliche Aminosäuren enthalten sowie das Rückgrat des Peptidomimetikums um kleine funktionelle Gruppen oder Reste ergänzt werden.

In den Klassen **C** und **D** sind eher niedermolekulare Peptidomimetika gruppiert. Mimetika mit einem substituierten Rückgrat können der Klasse **C** und Mimetika, welche die biologische Wirkungsweise des natürlichen Peptids nachahmen, der Klasse **D** zugeordnet werden.

1.5 α -Helix-Mimetika

Mit einem Anteil von ca. 30 % gehört die Helix zu den am häufigsten vorkommenden Sekundärstrukturen von Proteinen.^[127] Die sequenziell aufgebauten Helices werden dabei von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert und unterscheiden sich in der Anzahl an Aminosäureseitenketten in einer Helixwindung. Über 90 % der Helices lassen sich der α -Helix zuordnen, bei der jede Helixwindung 3,6 Aminosäuren enthält.^[128]

Eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung wird dabei vom Carbonylsauerstoffatom in i -Position und dem Amidproton in $i+4$ -Position aufgebaut. Die Peptidbindung bildet dabei das rigide Grundgerüst und die Aminosäureseitenketten zeigen jeweils nach außen (**Abb. 22**).

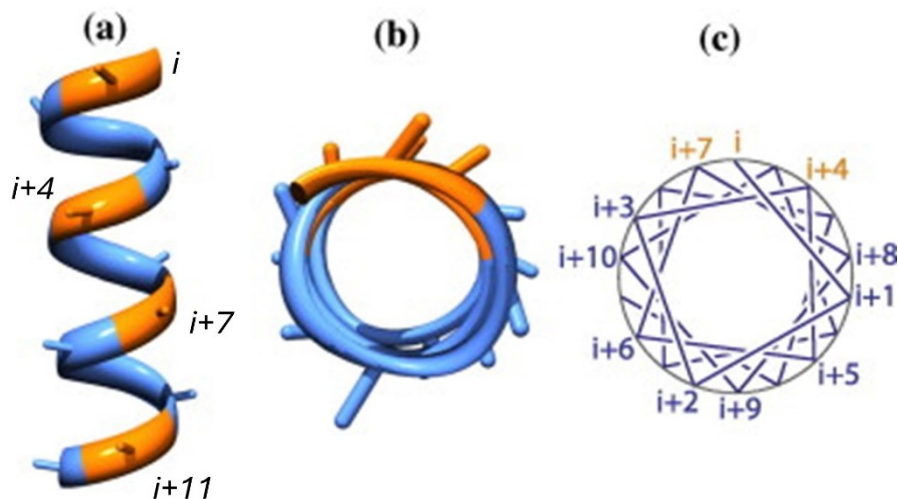


Abb. 22 Darstellung der Aminosäureseitenketten i , $i+4$, $i+7$ und $i+11$ aus verschiedenen Blickrichtungen. Abbildung modifiziert nach HAMILTON *et al.*^[129]

Die drei Aminosäureseitenketten der Positionen i , $i+4$ und $i+7$ haben einen vertikalen Abstand von 5,4 Å pro Windung und zeigen dabei in eine Richtung.

Durch die Modifizierung der Seitenkettensubstituenten können also gezielt α -Helix-Mimetika entwickelt werden, welche die *hot-spots* adressieren und hierdurch PPI modulieren können, sodass biologische Prozesse beeinflusst und inhibiert werden (**Abb. 23**).^[130]

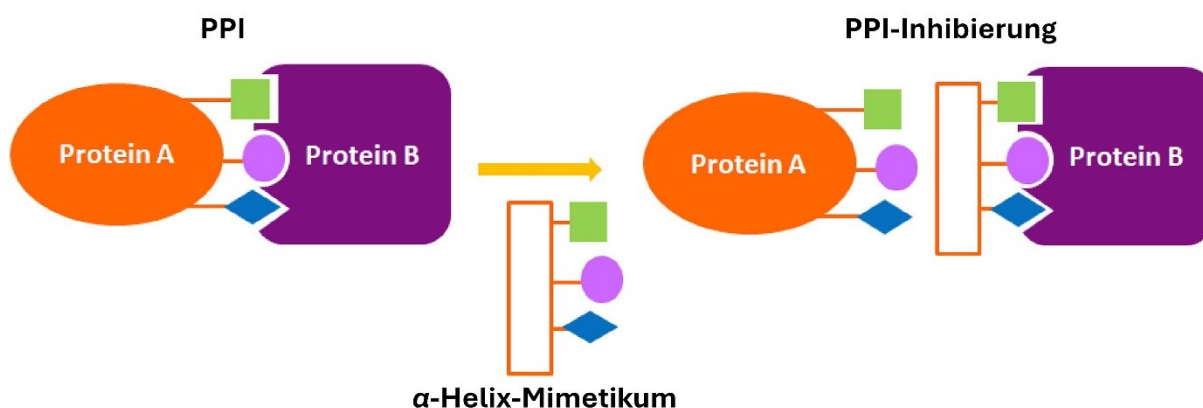


Abb. 23 Schematische Darstellung der PPI-Inhibierung durch ein α -Helix-Mimetikum mit drei verschiedenen Aminosäureseitenketten. Abbildung modifiziert nach ALGAR *et al.*^[130]

Die Grundgerüste der α -Helix-Mimetika können nach GROSSMANN *et al.* hinsichtlich ihrer Rigidität in drei Gruppen eingeteilt werden, nämlich die sterisch gesteuerten, kovalent eingeschränkten und Wasserstoffbrücken-gesteuerten Mimetika.^[126]

Zu den sterisch gesteuerten α -Helix-Mimetika zählt die Terphenylstruktur, die von HAMILTON *et al.* entwickelt wurde und die Positionen i , $i+3/4$ und $i+7$ einer α -Helix nachahmt (**Abb. 24**). Dabei wird eine gestaffelte Konformation mit dem Einbau von *ortho*-Substituenten erreicht, durch deren sterische Wechselwirkung die Terphenylringe zueinander verdreht sind und so die Seitenketten der Konformation einer α -Helix ähnlich sind.

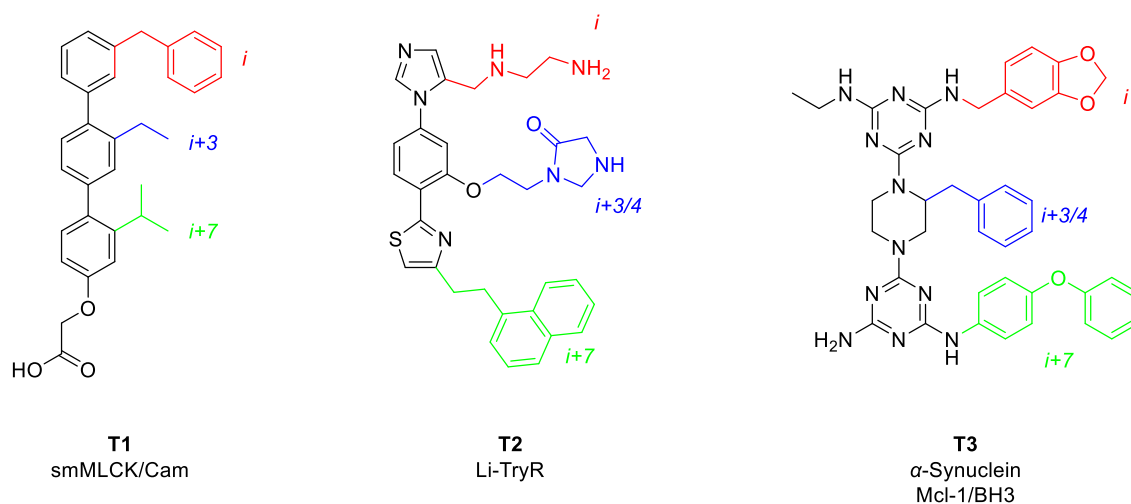


Abb. 24 Struktur der Terphenyl-basierten α -Helix-Mimetika **T1**, **T2** und **T3** sowie das PPI-Target.^[130]

Das von ORNER *et al.* entwickelte Terphenyl-Derivat **T1** zeigt eine inhibitorische Aktivität im submikromolaren Bereich, indem es die *hot-spot*-Aminosäureseitenketten der Kinase smMLCK imitiert und die Interaktion mit dem Rezeptorprotein Calmodulin (Cam) inhibiert.^[131] Das stark hydrophobe und aromatische Grundgerüst weist eine schlechte

Wasserlöslichkeit auf, weshalb die Terphenylstruktur weiterentwickelt wurde. HAMILTON *et al.* ersetzten zwei Phenylringe der Terphenylstruktur durch die hierzu im Vergleich polarerer Imidazol- und Thiazolheterozyklen. Mit entsprechender Seitenkettensubstitution nutzten VELAZQUEZ *et al.* dieses Grundgerüst und entwickelten das α -Helix-Mimetikum **T2**, welches eine antiparasitäre *in vitro* Aktivität im mikromolaren Bereich durch Inhibition der Trypanothion-Reduktase des Parasiten *Leishmania infantum* aufweist.^{[130],[132],[133]}

LIM *et al.* entwickelten den PPI-Inhibitor **T3** mit Triazin-Piperazin-Triazin-Grundgerüst und ersetzten somit alle Phenylringe der Terphenylstruktur durch stickstoffhaltige Heterozyklen, welcher sowohl die PPI von Leukämie-Proteinen Mcl-1/BH3 als auch dem Transportprotein α -Synuclein inhibieren kann.^[134]

Während bei den sterisch kontrollierten α -Helix-Mimetika meist ein aromatisches Grundgerüst vorzufinden ist, zeichnen sich die kovalent eingeschränkten α -Helix-Mimetika (**Abb. 25**) durch ein nicht-aromatisches und chirales Rückgrat aus. Die chiralen Zentren können dabei die Anordnung der Seitenketten durch die Hybridisierung stabilisieren.

NOLAN *et al.* und HORWELL *ET AL.* entwickelten kovalent eingeschränkte α -Helix-Mimetika mit 1,6-disubstituiertem und 1,1,6-trisubstituiertem Indan-Grundgerüsten. Im Kontrast zu den Terphenyl-basierten Mimetika können die Mimetika mit Indan-Struktur die Positionen *i-1*, *i* und *i+1* der α -Helix nachahmen.

Oligooxopiperazine und die von BROWN *et al.* entwickelten Spiroligomere sind weitere chirale Strukturklassen, welche als Grundgerüst für kovalent eingeschränkte α -Helix-Mimetika genutzt werden können (**Abb. 25**).^{[135],[136]}

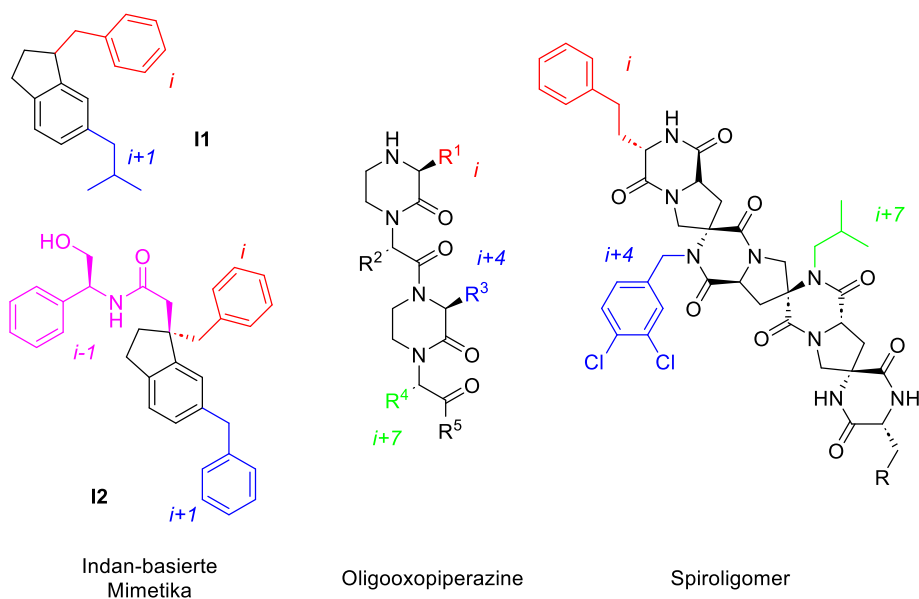


Abb. 25 Struktur von Indan-basierten sowie Oligooxopiperazin- und Spiroligomer-Grundgerüsten.

Das von HORWELL *et al.* entwickelte 1,1,6-trisubstituierte Indan **12** zeigte eine Affinität zum Neurotransmitter Tachykinin.^[137] Die von BROWN *et al.* hergestellten Spiroligomere wurden als Strukturmimetika des humanen Tumorsuppressors p53 entwickelt. Mit den einzelnen Spiromonomeren kann dabei die Ausrichtung und dreidimensionale Struktur der Seitenkettensubstituenten bestimmt werden. Das Spiroligomer zeigte eine submikromolare Bindungsaffinität zur E3 Ubiquitin-Protein Ligase MDM2. Weitere Studien ließen vermuten, dass das p53 Strukturmimetikum das Protein MDM2 stabilisiert und vor Proteolyse schützt.^[136]

Die Oligobenzamide können als synthetisch einfach zugängliches Grundgerüst für α -Helix-Mimetika dienen. Durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen kann eine gestaffelte ekliptische Konformation stabilisiert und ein rigides Grundgerüst aufgebaut werden, bei dem die Seitenketten in die gleiche Richtung zeigen.

BURSLEM *et al.* entwickelten Tribenzamide mit den Aminosäureseitenketten Leucin und Valin, welche die Positionen i , $i+4$ und $i+7$ einer α -Helix nachahmen können (**Abb. 26**).^[138]

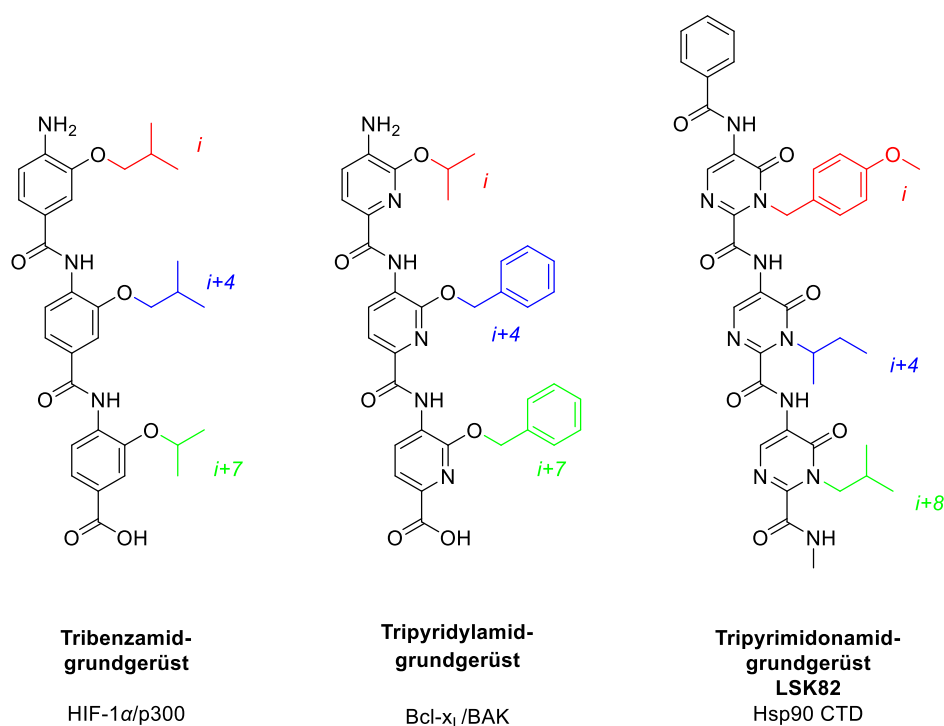


Abb. 26 Struktur wasserstoffbrücken-gesteuerten α -Helix-Mimetika mit Tribenzamid-, Tripyridyl- und Tripyrimidonamidgrundgerüst.^{[138]–[140]}

Die *hot-spot*-Aminosäureseitenketten Leu141, Leu145 und Val148 tragen maßgeblich zur Interaktion des Hypoxie-induzierten Transkriptionsfaktor HIF-1 α mit der Histone Acetyltransferase p300 bei. Das Tribenzamid kann mit den entsprechend substituierten Aminosäureseitenketten die Helix H3 von HIF-1 α imitieren und zeigt eine inhibitorische Aktivität von 9.2 μ M.^[138]

Durch den Einbau von weiteren Stickstoffatomen hin zum Tripyridylamidgrundgerüst konnten physikochemische Parameter verbessert werden. Durch den zusätzlichen Wasserstoffbrückenakzeptor wird die ekliptische Konformation weiter gekrümmt und ist im Vergleich zum Tribenzamidgrundgerüst weniger flexibel. Eine Inhibierung der Interaktion des Apoptose-Modulators Bc-x_L und dem Protein BAK BH3 durch das Tripyridylamid mit Valin- und zwei Phenylalaninseitenketten konnte erfolgreich von ERNST *et al.* gezeigt werden.^[139]

In der Arbeitsgruppe GOHLKE wurde ein *hot-spot*-Bereich in der C-terminalen Dimerisierungsdomäne des humanen Hsp90 identifiziert und experimentell validiert, welcher durch Nachahmen der Helix H5 adressiert werden kann. Durch die Berechnung der freien Energie ΔG mithilfe von molekularmechanischen Methoden mit verallgemeinerter Born- und Oberflächensolvatation (MM-GB/SA) wurden die Aminosäuren Tyr689, Ile692 und Leu696 und I688 als *hot-spot*-Bereich identifiziert.^[141]

KURZ designte α -Helix-Mimetika mit einem Tripyrimidonamid-Grundgerüst, welche von SPANIER aus der Arbeitsgruppe KURZ synthetisiert wurden. Dabei sind die Aminosäureseitenketten so angeordnet, dass diese die *i*, *i*+4 und *i*+8 Position auf der α -Helix imitieren können. Der erfolgreiche Einbau von polaren Seitenketten jeweils an dem Stickstoff der drei Pyrimidonmonomere des Tripyrimidonamidgrundgerüsts erlaubt ebenfalls die Adressierung von polaren PPI.

Durch einen Mikroskaliges-Thermophorese-Test konnte eine Bindungsaffinität von 3.42 μM für das Tripyrimidonamid zur CTD von humanem Hsp90 α ermittelt werden. Ferner wurde eine Inhibierung der Wechselwirkung zwischen Hsp90 und dem Clientprotein p53 sowie eine inhibitorische *in vitro* Aktivität in den Leukämiezelllinien K562 und KCL22 im mikromolaren Bereich beobachtet.^[140]

Die bisherige Entwicklung von α -Helix-Mimetika zeigt, dass auch Protein-Protein-Interaktionen mit einer größeren und flacheren Kontaktfläche erfolgreich inhibiert werden können. Die vielfältigen Möglichkeiten der Modifizierung des Grundgerüsts sowie die Anordnung und Variation der Seitenketten bieten viel Potenzial, die bisherigen Erkenntnisse auch auf weitere Organismen, in dieser vorliegenden Arbeit insbesondere auf den Parasiten *P. falciparum*, welche die Krankheit Malaria auslösen, auszuweiten.

2 Literaturübersicht und Vorarbeiten

2.1 Molekulardynamiksimulationen und *Cluster Docking*

Basierend auf der bekannten Kristallstruktur von humanem Hsp90 α (PDB: 3Q6M) sowie der Aminosäuresequenz des plasmodialen zytosolischen Hsp90 hat BICKEL aus der Arbeitsgruppe GOHLKE ein *Pf*Hsp90-Homologiemodell entwickelt. Werden die α -Helices H5 und H4' in der C-terminalen Domäne der humanen Hsp90-Struktur und der plasmodialen Hsp90-Modellierung übereinandergelegt, so können Unterschiede in den Seitenketten der Helices identifiziert werden (**Abb. 27**). Diese strukturellen Unterschiede können ausgenutzt werden, um Inhibitoren mit antiplasmodialer Aktivität und Selektivität gegenüber humanem Hsp90 zu erreichen.

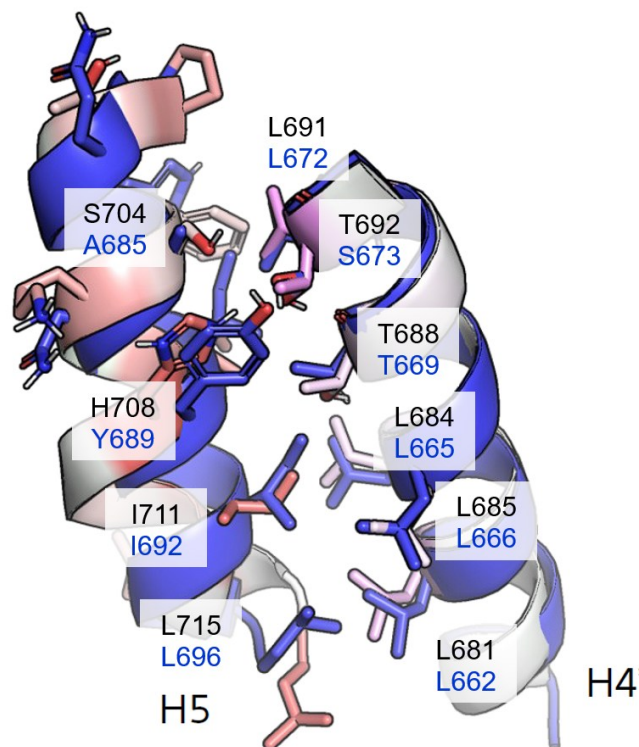


Abb. 27 Ausschnitt aus der humanen (grau/rot) und plasmodialen (blau) C-terminalen Domäne des Hitzeschockproteins Hsp90. Berechnungen, Modellierung und Abbildung von BICKEL sind bisher unveröffentlicht.

In der Helix H5 befinden sich die *hot spot* Aminosäuren Leucin und Isoleucin sowohl im humanen (L696, I692) als auch plasmodialen (L715, I711) Hsp90. Ein zentraler Unterschied ist eine Ganghöhe entfernt von Isoleucin I711 bzw. I692, da sich an dieser Stelle im humanen Hsp90 das schwach saure Tyrosin (Y689) und im plasmodialen Hsp90 der basische Rest Histidin (H708) befindet.

Sowohl Tyrosin Y689 als auch Histidin H708 der Helix H5 können mit Threonin T692 und T688 (*h*Hsp90) respektiv Serin S673 und Threonin T669 (*Pf*Hsp90) auf der Helix H4' interagieren. In *Pf*Hsp90 kann in räumlicher Nähe zu den Helices H5 und H4' Asparaginsäure D613 beobachtet werden, die in *h*Hsp90 nicht vorhanden ist (**Abb. 28**).

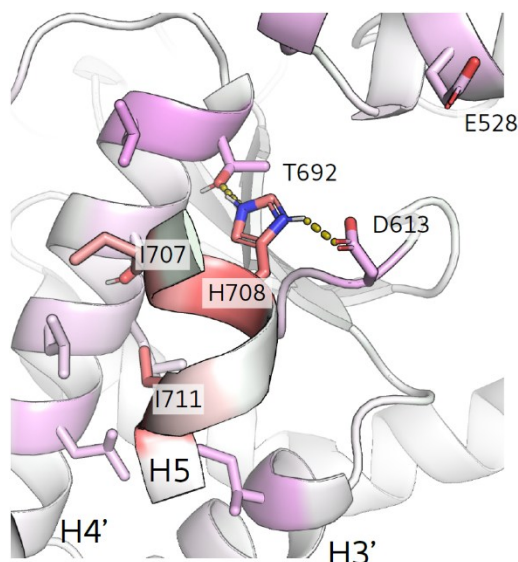


Abb. 28 Ausschnitt aus plasmodialer C-terminalen Domäne von Hsp90. Interaktion von Histidin (H708) mit Threonin (T692) und Asparaginsäure (D613) sind markiert. Abbildung wurde von BICKEL aus der Arbeitsgruppe GOHLKE erstellt und ist nicht veröffentlicht.

Die Aminosäure Histidin H708 könnte als Wasserstoffbrückenakzeptor und -donor mit Threonin T692 und Asparaginsäure D613 interagieren und zusätzlich (im protonierten Zustand) eine Salzbrücke zu D613 aufbauen. Diese Interaktion könnte in einem Inhibitor zu einer *Pf*Hsp90-Selektivität führen.

Hierzu könnte das von SPANIER entwickelte Tripyrimidonamid **LSK82** entsprechend angepasst werden, welches die drei Aminosäuren L696, I692 und Y689 (**Abb. 27**) der Helix H5 des humanen Hsp90 imitiert. **LSK82** zeigt eine Wachstumsinhibition der Leukämie-Zelllinie K562 ($IC_{50} = 1,3 \mu M$), indem es den Dimerisierungsprozess in der C-terminalen Domäne des Hitzeschockproteins inhibiert (**Abb. 29**).^{[140],[142]}

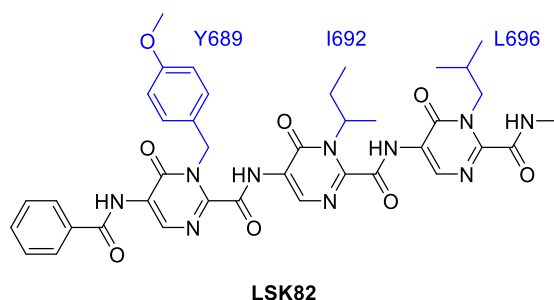


Abb. 29 Struktur von **LSK82** mit Tripyrimidonamid-Grundgerüst und Seitenketten, die die Aminosäuren der Helix H5 des humanen Hsp90-Proteins nachahmen.

Den Vorhersagen des Homologiemodells von BICKEL nach, könnte ausgehend von dem Tripyrimidonamid **LSK82** durch Austausch der Tyrosin-Seitenkette (Y689) hin zu einer oberen Histidinseitenkette (H708) oder auch Bioisostere des Imidazols, darunter die 1,2,3- und 1,2,4-Triazolgruppe, etwaige Pyrazol- oder Pyridyl-Derivate oder auch Oxazol-, Isoxazol- und Thiazolgruppen, die Affinität zum plasmodialen Hsp90-Protein verbessert werden (**Abb. 30**).

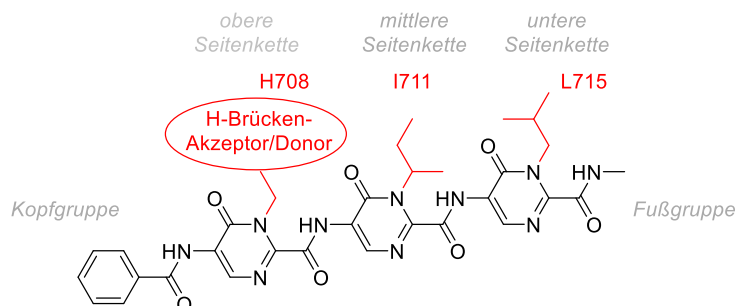


Abb. 30 Struktur eines Tripyrimidonamids in Anlehnung an **LSK82** mit Seitenketten, die die Aminosäuren L715, I711 und H708 der Helix H5 des plasmodialen Hsp90-Proteins nachahmen.

Das Homologiemodell von BICKEL wurde von GERTZEN aus der Arbeitsgruppe erweitert. Hierfür wurden zunächst die zytosolischen *Pf*Hsp90-Proteinstrukturen modelliert, an denen anschließend diverse Tripyrimidonamide als Liganden hinsichtlich ihrer Bindungsenergien untersucht wurden. Ein Liganden-Docking sollte so mögliche Wasserstoffbrückenakzeptoren und -donoren in der oberen Seitenkette (**Abb. 30**) oder auch weitere Interaktionsbereiche von Protein und Ligand identifizieren, die für die Inhibitorentwicklung geeignet sein könnten.

Für die *Pf*Hsp90-Proteinstrukturen wurden mittels Molekulardynamiksimulationen von GERTZEN viele Konformationen erzeugt, die anschließend in hauptsächlich drei Cluster *PfC*₀, *PfC*₁ und *PfC*₂ eingeteilt wurden, in denen räumlich ähnliche Proteinstrukturen zusammengefasst sind. Die Häufigkeit der einzelnen Cluster ist in Prozent berechnet worden (**Abb. 31**).

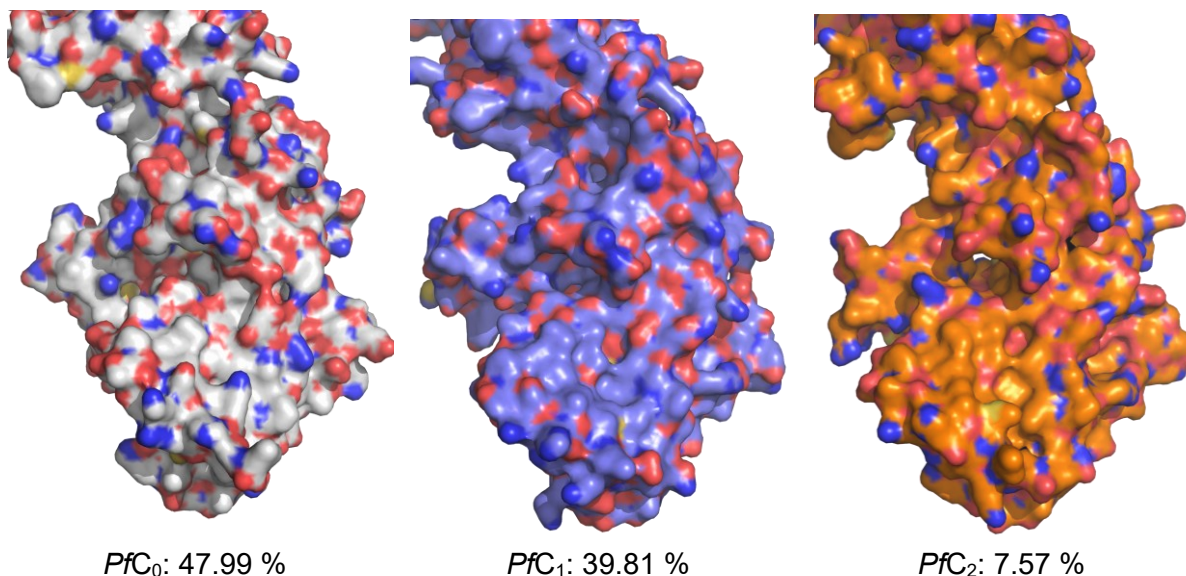


Abb. 31 Molekulardynamiksimulationen von *PfHsp90*. Gezeigt sind die repräsentativen Proteinstrukturen der drei größten Clustern PfC_0 , PfC_1 und PfC_2 in der C-terminalen Domäne, sowie die Wahrscheinlichkeit des Auftretens bezogen auf die Cluster in Prozent. Die beiden nicht gezeigten Cluster PfC_3 und PfC_4 haben zusammen eine Häufigkeit von 4.63 %. Abbildungen wurden von GERTZEN aus der Arbeitsgruppe GOHLKE erstellt und sind nicht veröffentlicht.

Es ist möglich, dass Liganden sowohl eine Affinität zu *PfHsp90* als auch *hHsp90* zeigen. Um diese Liganden identifizieren und jene mit (fast) ausschließlicher Affinität zu *PfHsp90* auswählen zu können, wurde neben den plasmodialen Clustern $PfC_0 - PfC_4$ die Proteinstruktur des humanen Hsp90 unter Zuhilfenahme der Kristallstruktur (PDB: 7L7I) mithilfe von Molekulardynamiksimulationen analog zu *PfHsp90* in Cluster eingeteilt. Der häufigste Cluster hC_0 macht hierbei einen Anteil von mehr als 80 % aller berechneten humanen Hsp90-Protein-Strukturen aus.

Als Liganden wurden zunächst ca. 170 verschiedene Tripyrimidonamide im Cluster-Docking eingesetzt, welche die Berechnungen von BICKEL berücksichtigen (**Abb. 30**). Diese Liganden unterscheiden sich durch ihre funktionelle Gruppe in der oberen Seitenkette sowie die Länge der Kohlenstoffseitenkette (**Abb. 32**). Als funktionelle Gruppe *R* wurden diverse basische Gruppen und aliphatische sowie aromatische Heterozyklen eingesetzt.

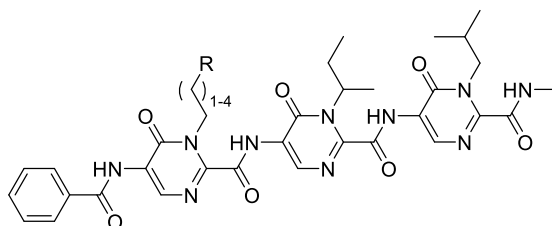


Abb. 32 Struktur der Tripyrimidonamide, die im Liganden-Docking eingesetzt wurden. Variierung der Seitenkettenlänge sowie dem Rest *R* ergeben ca. 170 mögliche Strukturen.

In dem am häufigsten vorkommenden, humanen Protein-Cluster hC_0 konnte für keinen der Liganden eine valide berechnete Bindepose mit dem Protein identifiziert werden. Erst im Cluster hC_1 mit einer Häufigkeit von 1 % der berechneten humanen Strukturen konnten Liganden mit einer validen berechneten Bindepose identifiziert werden, die zu einer Interaktion zwischen Ligand und Chaperon führen (**Abb. 33**).

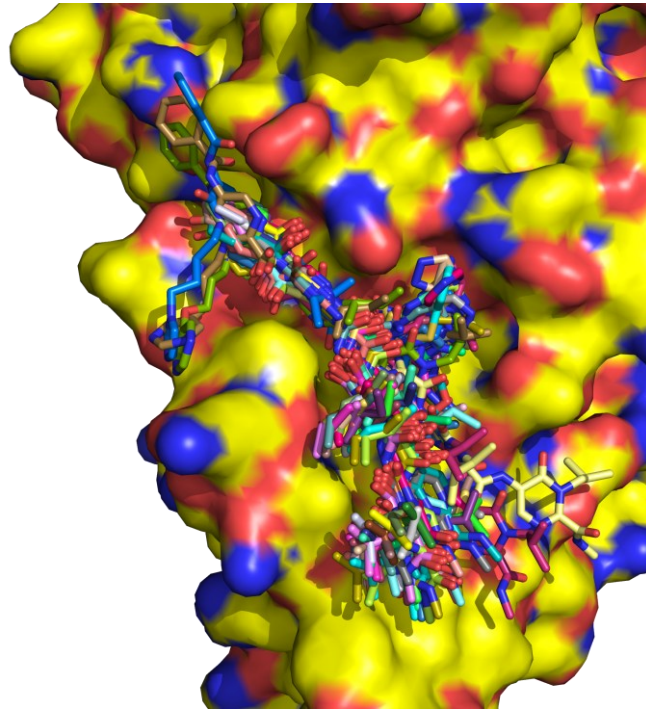


Abb. 33 Docking von Tripyrimidonamiden in humanem Hsp90. Gezeigt ist Cluster hC_1 bzw. ein Ausschnitt aus dem C-terminalen Bereich von Hsp90 mit jenen Liganden, die eine Bindungsenergie aufweisen, die zu einer Interaktion von Ligand und Chaperon führt. Abbildungen wurden von GERTZEN aus der Arbeitsgruppe GOHLKE erstellt und sind bisher unveröffentlicht.

Das Liganden-Docking am humanen Hsp90 liefert also unter Berücksichtigung der Clusterwahrscheinlichkeiten nur wenige Liganden, die eine Interaktion mit der C-terminalen Domäne des humanen Hsp90 eingehen können. Ausgehend von einem Schlüssel-Schloss Modell der Ligandeninteraktion befindet sich die Struktur von $hHsp90$ auch nur in 1 % der Zeit in einer Konformation, die eine Bindung der Liganden erlaubt.

Im plasmodialen Protein-Cluster PfC_0 und insbesondere im Cluster PfC_2 sind Liganden im Cluster-Docking vorhanden, welche eine valide berechnete Bindepose mit $PfHsp90$ aufweisen (**Abb. 34**).

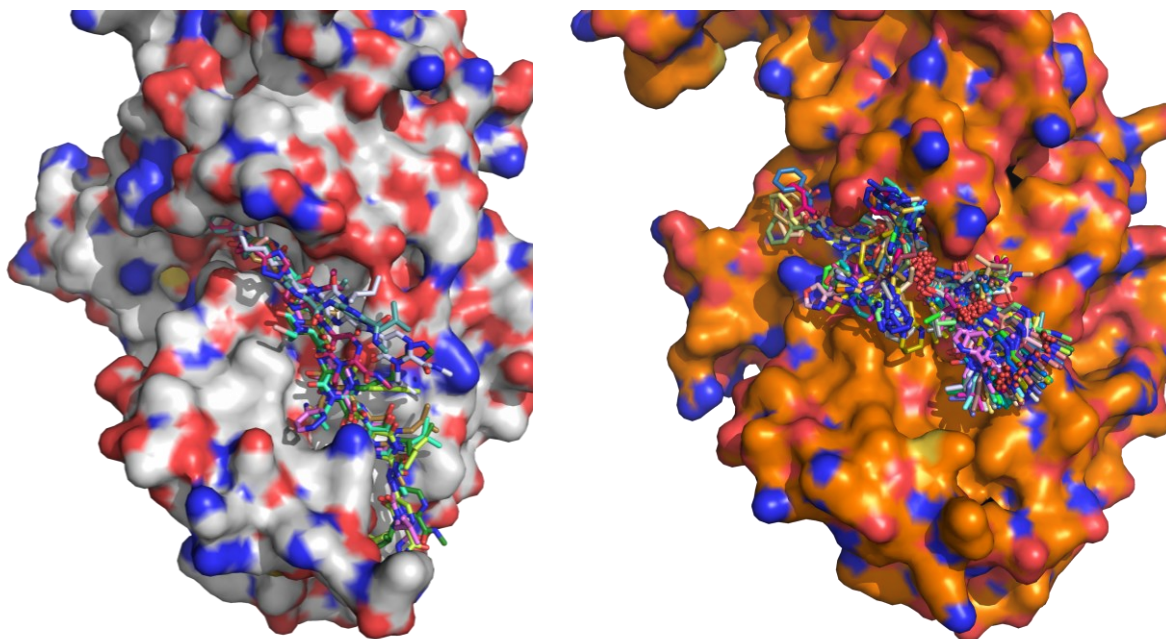


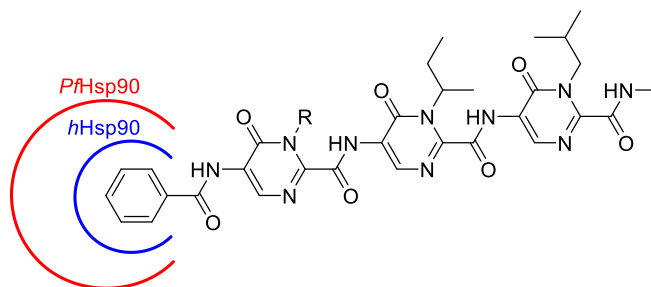
Abb. 34 Liganden-Docking von Tripyrimidonamiden **12** in berechneten Protein-Clustern von *PfHsp90*. Gezeigt sind Cluster *PfC₀* (links) und *PfC₂* (rechts), insb. ein Ausschnitt aus dem C-terminalen Bereich von *PfHsp90* mit jenen Liganden, die eine Bindungsenergie aufweisen, die zu einer Interaktion von Ligand und Chaperon führt. Abbildungen wurden von GERTZEN aus der Arbeitsgruppe GOHLKE erstellt und sind bisher unveröffentlicht.

Während die Liganden in Cluster *PfC₂* eine vergleichbare Konformation und Position auf der Proteinoberfläche von *PfHsp90* annehmen, so sind die Liganden am Cluster *PfC₀* in ihren Positionen räumlich weiter verteilt und nehmen verschiedene Konformationen an.

Bei genauerer Betrachtung der Proteinoberfläche von *PfC₀* ist eine Bindungstasche in der Nähe des *hot-spot*-Bereiches der C-terminalen Region (**Abb. 27** und **Abb. 28**) beobachtbar. Die Bindetasche ist sowohl im humanen als auch plasmodialen Hsp90 vorzufinden und kann potenziell von der 5-Benzamid-Kopfgruppe der Tripyrimidonamide (**LSK82** in **Abb. 29**) durch hydrophobe Wechselwirkungen adressiert werden.

Im Vergleich zum humanen Hsp90 ist die Bindetasche in *PfHsp90* räumlich größer, sodass ein größerer sterischer Anspruch der Benzoyl-Kopfgruppe der Tripyrimidonamide zu einer besseren Nutzung der Bindetasche und somit Erhöhung der Selektivität in *PfHsp90* führen könnte (**Abb. 35**).

(1)



(2)

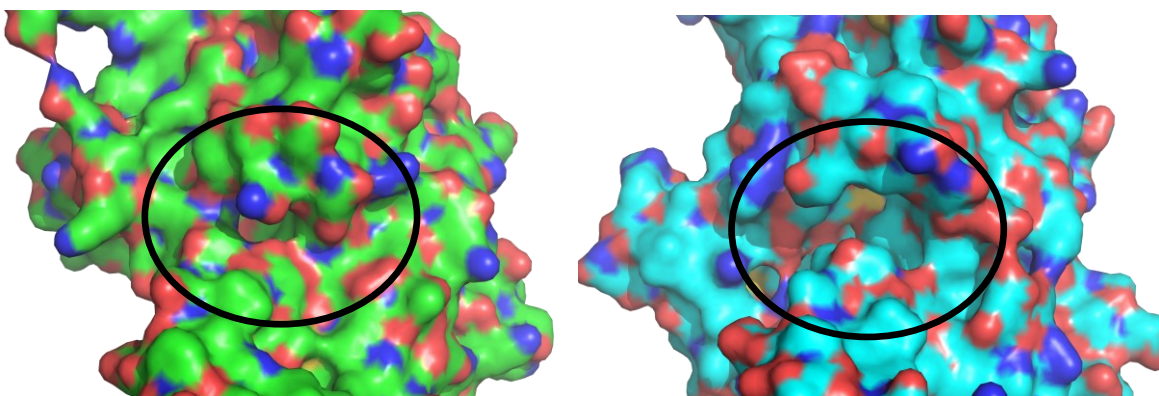


Abb. 35 Vergleich der Bindetaschen in den repräsentativen Strukturen der am meisten populierten Clustern von *hHsp90* und *PfHsp90* in der C-terminalen Region. **(1)** Qualitativer Unterschied der Bindetaschen und hydrophobe Wechselwirkung mit der 5-Benzamid-Kopfgruppe eines Tripyrimidonamids mit variabler oberer Seitenkette. **(2)** Proteinmodellierung der C-terminalen Region bzw. Bereich der Bindetasche (schwarze Umkreisung) in *hHsp90* (links) und *PfHsp90* (rechts). Abbildungen wurden von GERTZEN aus der Arbeitsgruppe GOHLKE erstellt und sind bisher unveröffentlicht.

Die Liganden in Cluster *PfC*₀ können trotz ihrer unterschiedlichen Position und Konformation auf der Proteinoberfläche von *PfHsp90* (**Abb. 34**) in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Die Gruppierung erfolgt nach der jeweiligen Wechselwirkung mit Helix H4' und der in *PfHsp90* vergrößerten Bindetasche (**Tab. 1**).

Tab. 1 Gruppierung der Liganden nach Wechselwirkung mit der Bindetasche in *PfHsp90* und Helix H4' in Cluster-Docking von *PfC*₀. „+“ bedeutet eine gute, „~“ eine mittelmäßige und „-“ eine schlechte Wechselwirkung. Abstufungen „+“, „~“ und „-“ sind rein qualitativer Art und haben keine quantitative Abgrenzung zueinander. BT = Bindetasche; H4' = Helix H4'.

Gruppe	Wechselwirkung Bindetasche	Wechselwirkung Helix
BT	+	-
BT-H4'	~	~
H4'	-	+

Die Position und Konformation von ausgewählten Liganden, welche in eine der drei Gruppen **BT**, **BT-H4'** oder **H4'** eingeordnet werden können, sind im Folgenden dargestellt.

Die Gruppe **BT** beinhaltet Liganden, die tief in der Bindetasche liegen und wenig Wechselwirkungen mit der Helix H4' zeigen. Umgekehrt weisen Liganden der Gruppe **H4'** eine ausgeprägte Wechselwirkung zur Helix H4' aus und vernachlässigen die Bindetasche (**Abb. 36**).

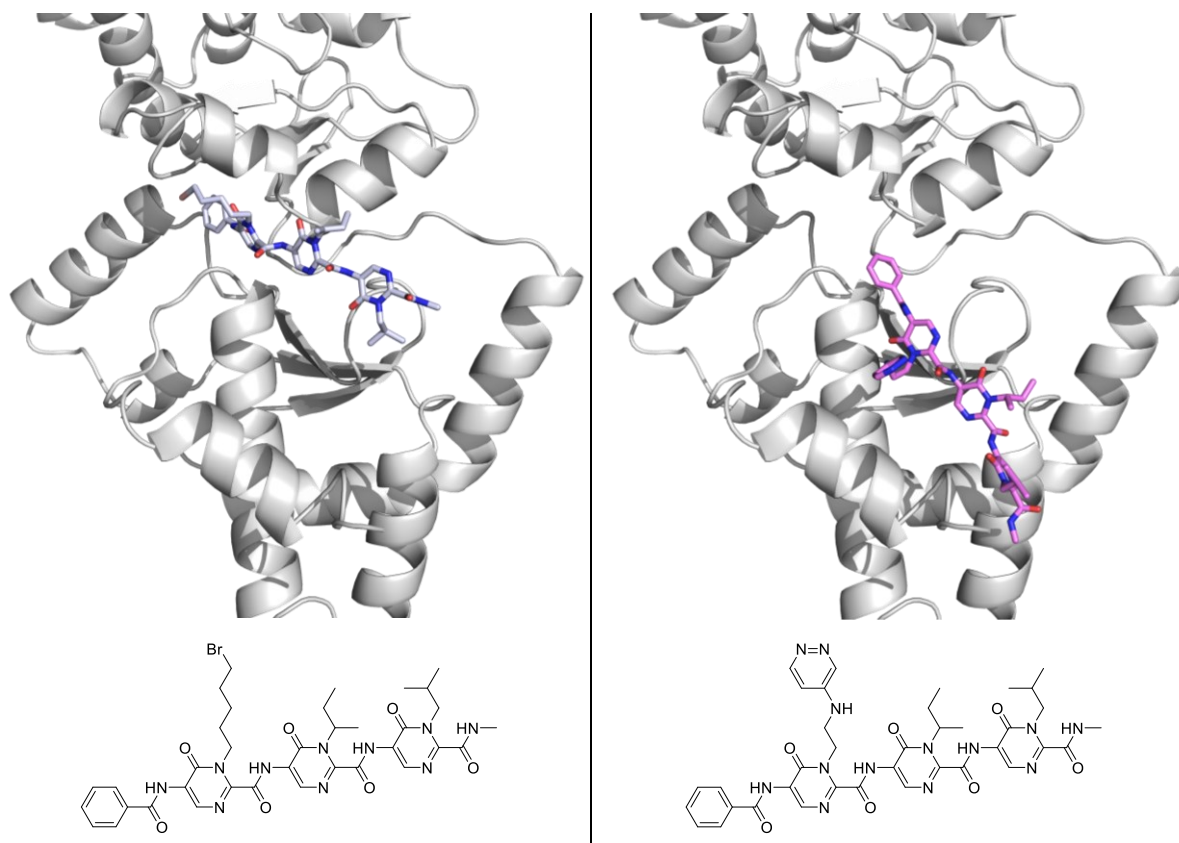


Abb. 36 Docking von Liganden in berechnetem PfHsp90-Cluster *PfC₀*. Ausschnitt aus C-terminalem Bereich. Linkes Bild: Gute Wechselwirkung des Liganden mit der Bindetasche sowie wenig Interaktion mit der Helix H4' (Gruppe **BT**). Rechtes Bild: Gute Wechselwirkung des Liganden mit der Helix H4' und wenig Interaktion mit der Bindetasche (Gruppe **H4'**). Molekülstrukturen der jeweiligen Liganden aus den entsprechenden Gruppen im Protein sind unterhalb der Proteinstrukturen abgebildet. Abbildungen der Proteinstrukturen wurden von GERTZEN aus der Arbeitsgruppe GOHLKE erstellt und sind nicht veröffentlicht.

Zwischen den beiden Extrema **BT** und **H4'** zeigen einige Liganden eine räumliche Position, zusammengefasst in der Gruppe **BT-H4'**, die sowohl mit der Bindetasche als auch Helix H4' interagieren können (**Abb. 37**).

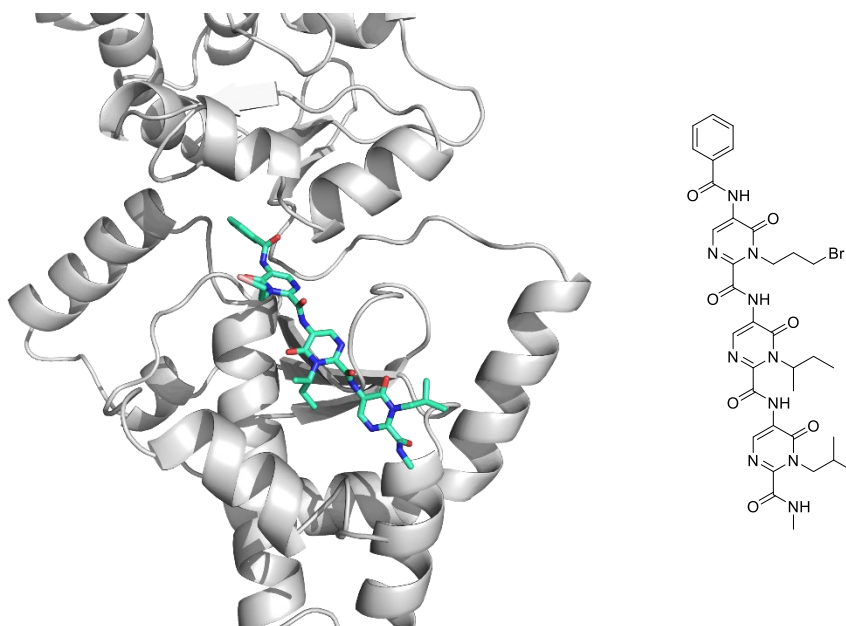


Abb. 37 Docking von Liganden der Gruppe **BT-H4'** in berechnetem *Pfhsp90*-Cluster *PfC₀*. Ausschnitt aus C-terminalem Bereich. Ligand interagiert sowohl mit der Bindetasche als auch der Helix H4'. Die Molekülstruktur des Liganden ist rechts abgebildet. Abbildungen der Proteinstrukturen wurden von GERTZEN aus der Arbeitsgruppe GOHLKE erstellt und sind nicht veröffentlicht.

Die Ergebnisse des Dockings von Liganden in geclusterte Strukturen von *Pfhsp90* zeigen, dass die untersuchten Liganden abhängig von ihrer funktionellen Gruppe in der oberen Seitenkette sowie die Länge der Kohlenstoffseitenkette verschiedene räumliche Positionen auf der *Pfhsp90*-Proteinoberfläche einnehmen, die in Abhängigkeit ihrer Wechselwirkung mit der Bindetasche oder mit der Helix H4' gruppiert werden können.

Ein Zusammenhang der Eigenschaften der funktionellen Gruppe und Länge der Kohlenstoffseitenkette zur räumlichen Position und Konformation der Liganden auf der Proteinoberfläche konnte nicht hergestellt werden.

Obwohl die Liganden der Gruppe **BT-H4'** im Vergleich zu Gruppe **BT** räumlich weniger tief in der Bindetasche liegen, können diese Liganden nach Modifizierung der Kopfgruppe die Bindetasche möglicherweise optimal ausnutzen. GERTZEN benutzte daher in einem weiteren Liganden-Docking im *Pfhsp90*-Cluster *PfC₀* Kopfgruppen aus einer Auswahl von ca. 4000 kommerziell verfügbaren aromatischen Carbonsäuren, die zur Synthese der Kopfgruppe genutzt werden können. Das Liganden-Docking lieferte dabei drei aromatische Carbonsäuren, welche als Kopfgruppe an einem Tripyrimidonamid der Gruppe **BT-H4'** die Bindetasche optimal ausnutzen (**Abb. 38**).

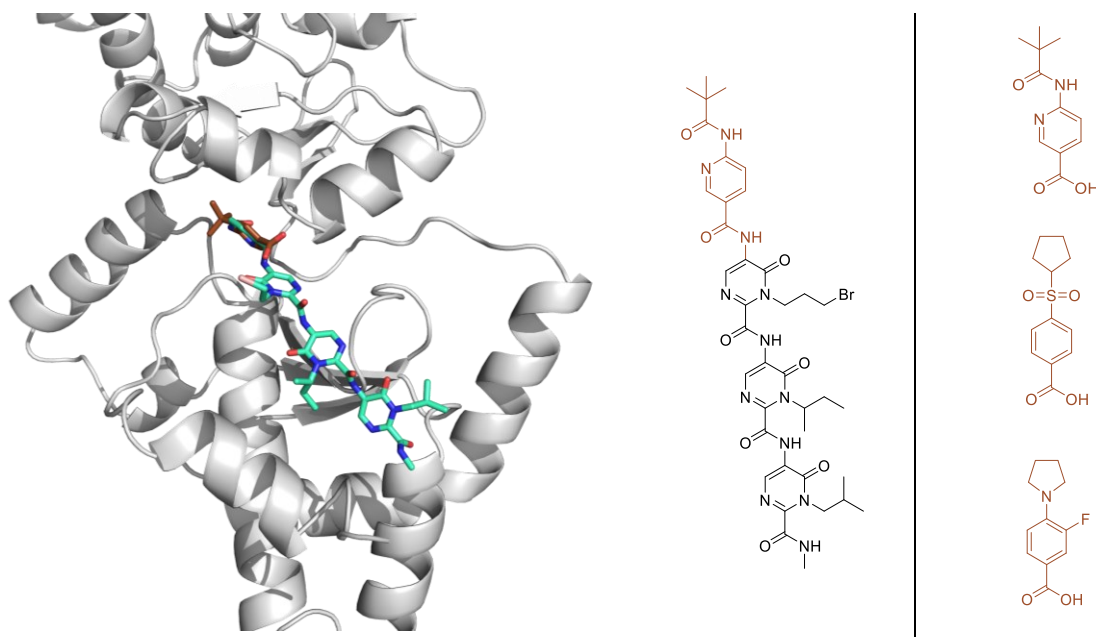


Abb. 38 Docking von Liganden der Gruppe **BT-H4'** in berechnetem *PfHsp90*-Cluster *PfC0* sowie einer Carbonsäure, welche die Bindetasche optimal ausnutzen kann. Ausschnitt aus C-terminalem Bereich. Linkes Bild: Ligand interagiert sowohl mit Bindetasche als auch Helix H4'. Mittleres Bild: Molekülstruktur des Liganden mit optimierter Kopfgruppe nach computerunterstützter Berechnung. Rechtes Bild: Ergebnisse des Liganden-Dockings von aromatischen Carbonsäuren, die eine optimale Nutzung der Bindetasche aufweisen. Abbildungen der Proteinstrukturen wurden von GERTZEN aus der Arbeitsgruppe GOHLKE erstellt und sind nicht veröffentlicht.

Die computerunterstützten *PfHsp90*-Proteinmodellierungen sowie das Cluster- und Liganden-Docking von BICKEL und GERTZEN zeigen zwei mögliche Strukturvariationen der Tripyrimidonamide, die zu einer Erhöhung der Affinität zu *PfHsp90* und einer möglichen antiplasmodialen Aktivität führen könnten (**Abb. 39**).

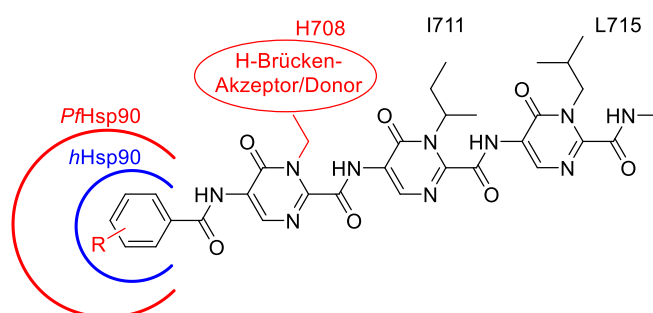
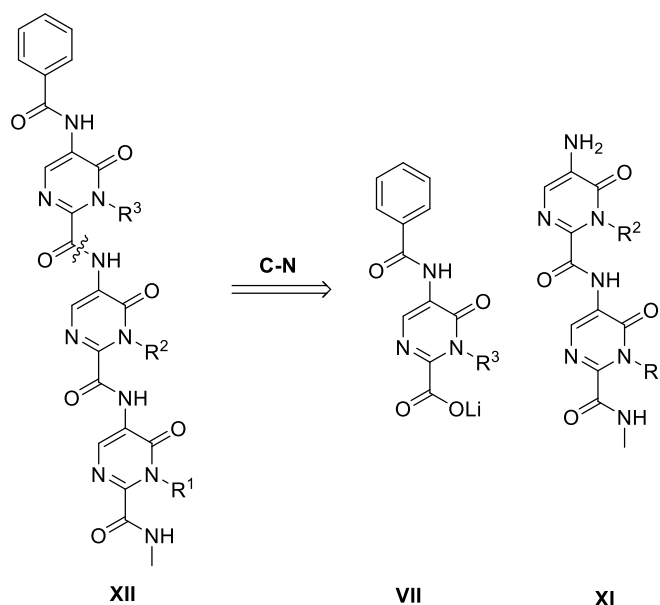


Abb. 39 Struktur eines Tripyrimidonamids in Anlehnung an **LSK82** mit strukturellen Modifizierungen, welche die computerunterstützten Berechnungen von BICKEL (H-Brückenakzeptor und -donor in der oberen Seitenkette) und GERTZEN (Vergrößerung der Kopfgruppe) beinhalten.

Ein Wasserstoffbrückenakzeptor und/oder -donor in der oberen Seitenkette könnte das Histidin H708 in *PfHsp90* nachahmen. Eine vergrößerte Kopfgruppe der Tripyrimidonamide kann die in *PfHsp90* vergrößerte Bindetasche optimal ausnutzen.

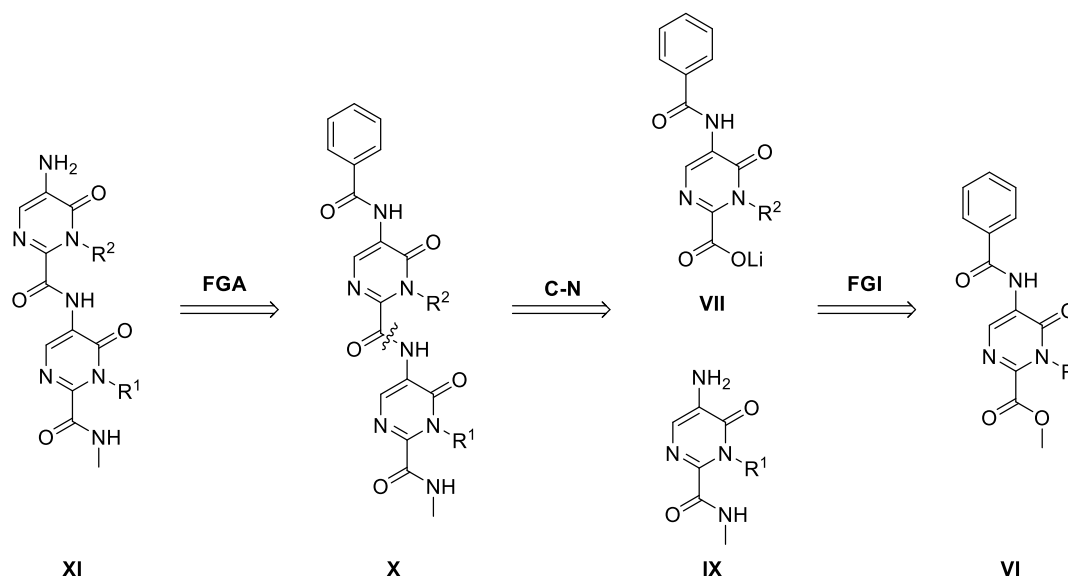
2.2 Vorarbeiten zur Darstellung von Tripyrimidonamiden

SPANIER entwickelte eine Syntheseroute, mit welcher Tripyrimidonamide aus Pyrimidonmonomeren mit *N*-substituierten Seitenketten aufgebaut werden können. Die Reihenfolge der Seitenketten am Grundgerüst kann dabei gezielt gesteuert werden, indem das Tripyrimidonamid **XII** konsekutiv mittels Amidkupplung eines entsprechenden monomeren Pyrimidon-2-carboxylat **VII** und 5-Aminobipyrimidonamid **XI** (Enamin-Dimer) aufgebaut wird (**Schema 1**).^[142]



Schema 1 Aufbau eines Tripyrimidonamids **XII** mittels Amidkupplung aus Pyrimidon-2-carboxylat **VII** und 5-Amino(bi)pyrimidonamid **XI**.

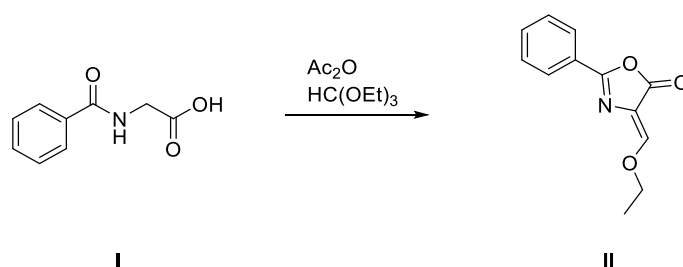
Das Enamin-Dimer **XI** kann durch Entfernen der Benzoyl-Gruppe aus dem Bipyrimidonamid **X** (Dimer) dargestellt werden (**Schema 2**). Das Dimer **X** kann analog zum Tripyrimidonamid **XII** durch eine Amidkupplung aus einem weiteren Pyrimidon-2-carboxylat **VII** und einem 5-Aminopyrimidon **IX** hergestellt werden. Das Lithiumcarboxylat-**VII** und das Enamin-Monomer **IX** können jeweils aus dem Pyrimidon-2-carbonsäureester **VI** dargestellt werden (**Schema 2**).



Schema 2 Retrosynthetische Betrachtung des 5-Aminobipyrimidonamids **XI** ausgehend von Pyrimidon-2-carboxylat **VII** und 5-Aminopyrimidon **IX**. **VII** und **IX** können aus der Vorstufe Pyrimidon-2-carbonsäureester **VI** dargestellt werden.

2.2.1 Darstellung von Pyrimidon-Monomeren

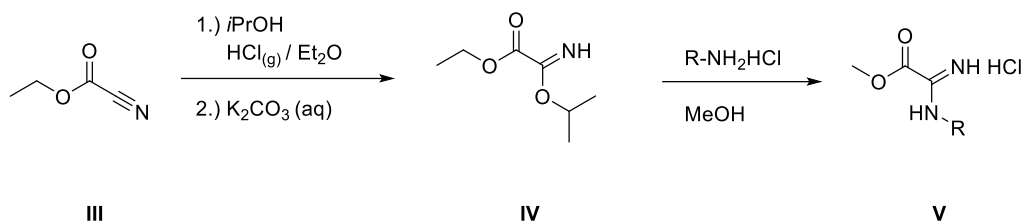
Der Pyrimidon-2-carbonsäureester **VI** kann als zentraler Baustein durch eine ringaufbauende Synthese aus einem Azlacton **II** und einem Amidinhydrochlorid **V** dargestellt werden. Das Azlacton **II** kann in einer modifizierten Synthese nach ERLÉNMEYER und PLÖCHL aus Hippursäure (**I**), Essigsäureanhydrid und Triethylorthoformiat dargestellt werden (**Schema 3**).^[143]



Schema 3 ERLÉNMEYER-PLÖCHL-Synthese zur Darstellung von Azlacton **II** ausgehend von Hippursäure **I**.^[143]

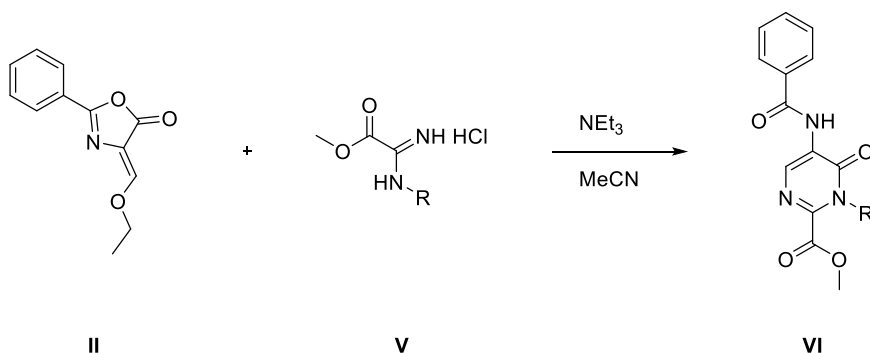
In einer PINNEN-Reaktion können Cyaneisensäureethylester (**III**) und *iso*-Propanol durch Einleiten von Chlorwasserstoff in Diethylether zum Imidoesterhydrochlorid umgesetzt werden (**Schema 4**). Nach Freisetzung der Imidoesterbase **IV** aus dem Hydrochloridsalz durch basische Flüssig-Flüssig-Extraktion mit einer wässrigen Kaliumcarbonat-Lösung kann die

Imidoesterbase **IV** in einer nukleophilen Substitution durch primäre Aminhydrochloride in Methanol zu den Amidinhydrochloriden **V** umgesetzt werden (**Schema 4**).^[144]



Schema 4 Darstellung von Amidinhydrochloriden **V** ausgehend von Cyanameisensäureethylester (**III**) mittels PINNER-Reaktion, basischer Flüssig-Flüssig-Extraktion sowie Umsetzung mit einem Aminhydrochlorid.^[144]

Das Azlacton **II** und Amidinhydrochlorid **V** können mit Triethylamin als Hilfsbase in Acetonitril zum Pyrimidon-2-carbonsäureester **VI** (Monomer) umgesetzt werden (**Schema 5**).^[142]

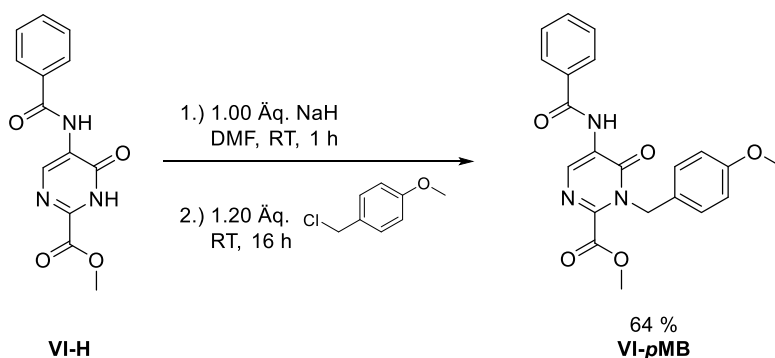


Schema 5 Synthese von Pyrimidon-2-carbonsäureestern **VI** aus Azlacton **II** und Amidinhydrochlorid **V**.^[142]

Basierend auf der Synthesestrategie von SPANIER können durch das frühzeitige Einführen der Seitenketten in der Amidinsynthese (**Schema 4**) *N*-substituierte Pyrimidon-Monomere aufgebaut werden. Durch das frühzeitige Einführen der Substituenten ist eine konvergente und komplexe Syntheseführung notwendig.

Eine Vereinfachung des Syntheseweges stellt die *N*-Alkylierung von Pyrimidonen dar, bei der zunächst das nicht-substituierte Monomer **VI-H** als zentraler Baustein hergestellt und die Seitenketten-Substituenten anschließend in einer nukleophilen Substitution eingeführt wird (**Schema 6**). Aufgrund der Tautomerie des Pyrimidons und des mesomeriestabilisierten Anions nach Deprotonierung von **VI-H** durch eine Base können sowohl das *N*-substituierte Pyrimidon **VI** als auch *O*-alkylierte Pyrimidin **VI-O** in der nukleophilen Substitution gebildet werden.

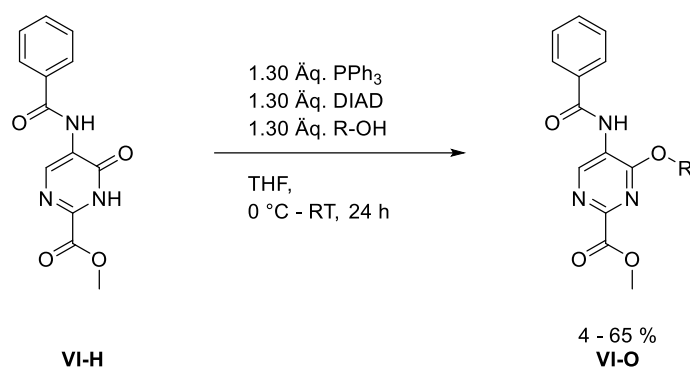
SPANIER setzte die Erkenntnisse von HOPKIN *et al.* in einer Alkylierungsreaktion um, indem das unsubstituierte Monomer **VI-H** zunächst mit Natriumhydrid als Base in Dimethylformamid deprotoniert und anschließend das Alkylanz 4-Methoxybenzylchlorid zugegeben wurde. Das *N*-alkylierte Pyrimidon konnte als Hauptprodukt mit 64 % Ausbeute isoliert werden (**Schema 7**). Das *O*-alkylierte Pyrimidin war nur in nicht isolierbaren Spuren vorhanden.^[142]



50

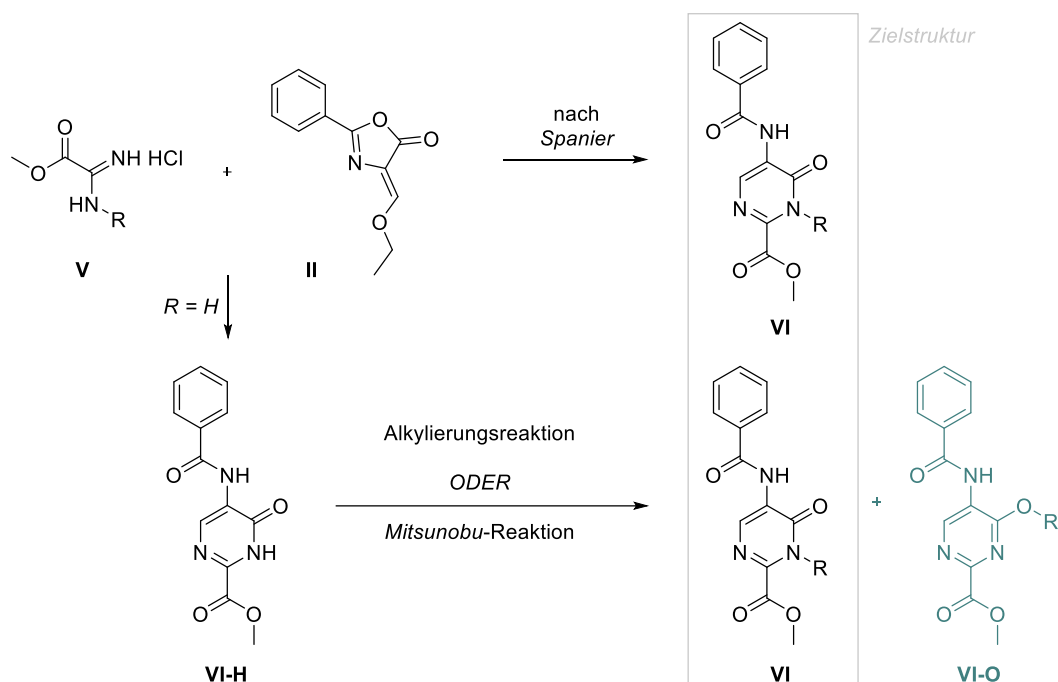
Während SPANIER die *N*-alkylierten Pyrimidone synthetisierte, versuchte WOLOSCHIN die *O*-alkylierten Pyrimidine als Hauptprodukte darzustellen.

Darüber hinaus gelang es WOLOSCHIN mithilfe der MITSUNOBU-Reaktion nach Optimierung der Reaktionsbedingungen das *O*-alkylierte Pyrimidin als Hauptprodukt sowie das *N*-alkylierte Pyrimidon als Nebenprodukt isolieren zu können (**Schema 8**). Auch wenn der Fokus bei WOLOSCHIN auf der Synthese der *O*-alkylierten Pyrimidine lag, zeigte die Bildung der *N*-alkylierten Pyrimidone, dass die MITSUNOBU-Reaktion auch für die Darstellung von *N*-alkylierten Pyrimidonen optimiert werden kann.^[146]



Schema 8 MITSUNOBU-Reaktion mit optimierten Reaktionsbedingungen nach WOLOSCHIN zur Darstellung von 4-Alkoxypyrimidin **VI-O** ausgehend von Monomer **VI-H**. Ausbeuten sind bezogen auf das isolierte *O*-alkylierte Produkt. Ausbeuten des *N*-alkylierten Pyrimidons sind aufgrund von Verunreinigung durch Nebenprodukte nicht eindeutig bestimmbar.^[146]

Es stehen derzeit drei etablierte Syntheserouten zur Verfügung, *N*-alkylierte Pyrimidone **VI** ausgehend von Amidinhydrochloriden **V** und Azlactonen **II** darzustellen. Je nach Verfügbarkeit und chemischer Stabilität der Reagenzien kann die Syntheseroute entsprechend angepasst werden (**Schema 9**).

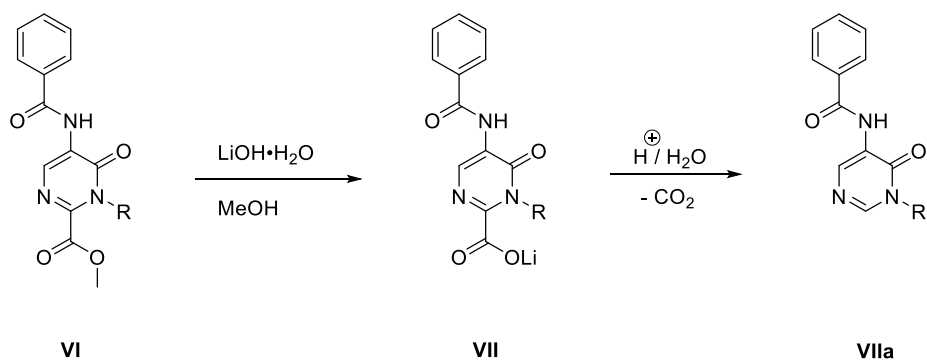


Schema 9 Darstellung von Pyrimidon-**VI** und Pyrimidinmonomeren **VI-O** ausgehend von Azlacton **II** und Amidinhydrochlorid **V**.

2.2.2 Darstellung von Oligopyrimidonamiden

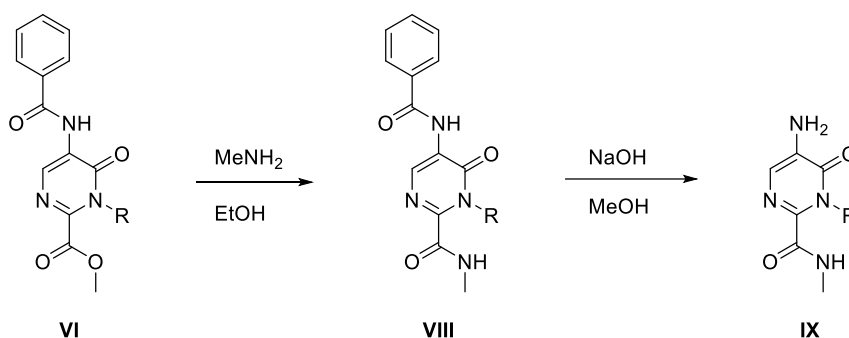
Für die Darstellung der Bipyrimidonamide **X** mittels Amidkupplungsreaktion nach SPANIER werden sowohl ein Monomerbaustein mit Aminfunktionalität als auch ein Monomer mit Carboxylgruppe benötigt.

Das Monomer **VII** mit Lithiumcarboxylatgruppe wurde durch Hydrolyse des Esters **VI** mit Lithiumhydroxidmonohydrat in Methanol dargestellt. Das Lithiumcarboxylat **VII** neigt nach Ansäuern zur Decarboxylierung, welches daher ohne weitere Reinigung in der Amidkupplung eingesetzt wurde (**Schema 10**).



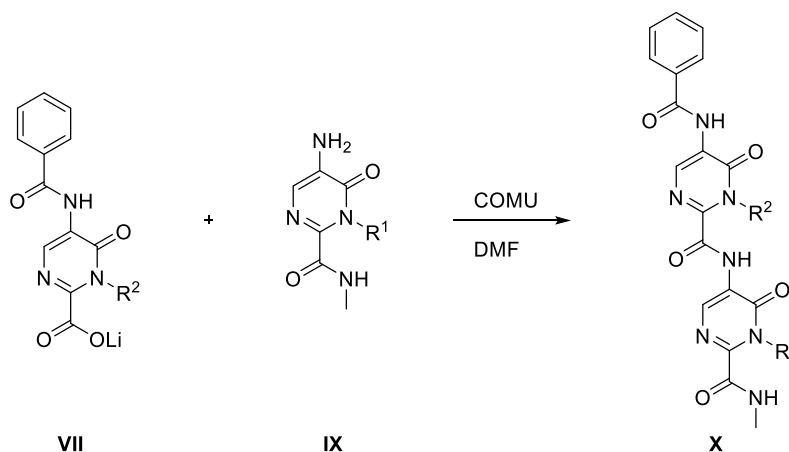
Schema 10 Synthese von Pyrimidon-2-carboxylaten **VII** durch Hydrolyse von Pyrimidonmonomer **VI**. Decarboxylierung als Nebenreaktion nach Ansäuern von **VII**.

Das Entfernen der Benzoylgruppe zum 5-Aminopyrimidon **IX** wurde mittels basischer Hydrolyse in heißem Methanol durchgeführt. Bei Umsetzung des Pyrimidon-2-carbonsäuremethylesters **VI** beobachtete SPANIER analog zum Ansäuern der Lithiumcarboxylate (**Schema 10**) eine Decarboxylierung, die gegenüber der basischen Hydrolyse der Benzoylgruppe bevorzugt war. Überführung des Methylesters **VI** mit wässriger Methylaminlösung in Ethanol zum stabileren *N*-Methylcarboxamid **VIII** erlaubte anschließend eine selektive Spaltung der Benzoylgruppe der 5-Benzamidopyrimidone **VIII** zu den 5-Aminopyrimidonen **IX** ohne Nebenreaktionen (**Schema 11**).



Schema 11 Darstellung von 5-Aminopyrimidonen **IX** durch Aminolyse von Methylester **VI** zum *N*-substituierten Carboxamid **VIII** mit wässrigem Methylamin und folgender basischer Hydrolyse.

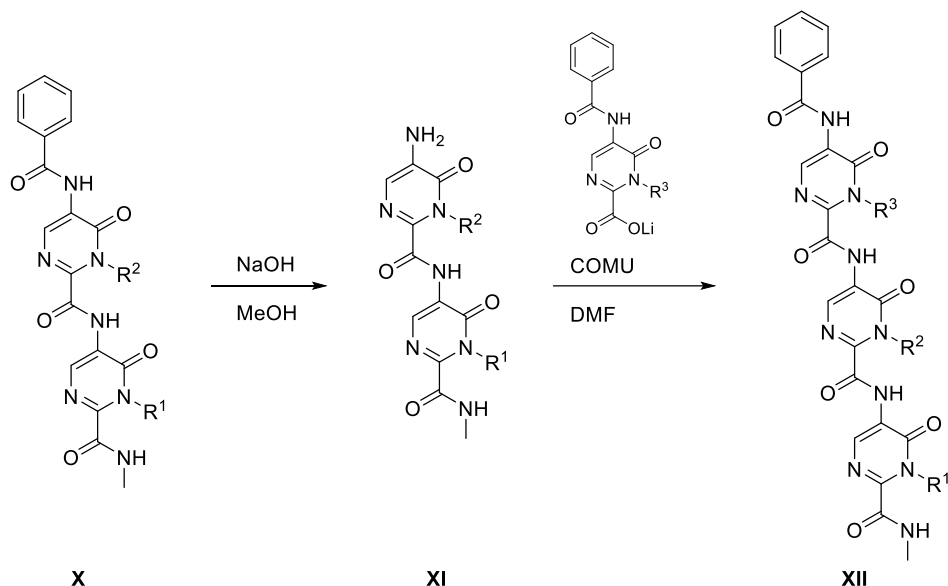
SPANIER untersuchte verschiedene Amidkupplungsreagenzien, um das Bipyrimidonamid **X** aus dem Enamin **IX** und dem Lithiumcarboxylat **VII** aufbauen zu können. [O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat] (HATU) und [1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy]dimethylamino-morpholino-carbenium-hexafluorophosphat] (COMU®) überzeugten, wobei COMU® durch die schnellere und bessere Umsetzung der Edukte im Vergleich zu HATU ausgewählt wurde (**Schema 12**).



Schema 12 Synthese von Bipyrimidonamid **X** durch COMU®-vermittelte Amidkupplung von Lithiumcarboxylat **VII** und Enamin **IX**.

Analog zum monomeren Enamin **IX** konnte das Enamin-Dimer **XI** aus 5-Benzamidobipyrimidon **X** mittels basischer Hydrolyse hergestellt werden (**Schema 13**).

Im letzten Schritt konnte das Tripyrimidonamid **XII** aus dem Enamin-Dimer **XI** und dem Lithiumcarboxylat **VII** unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie bei der Synthese der Bipyrimidonamide **X** hergestellt werden (**Schema 13**).



Schema 13 Synthese von Enamin-Dimer **XI** aus Bipyrimidonamid **X** mittels basischer Hydrolyse. Darstellung der Tripyrimidonamide **XII** durch COMU®-vermittelte Amidkupplung von Lithiumcarboxylat **VII** und Enamin-Dimer **XI**.

Die Reste R^1 , R^2 und R^3 bei Tripyrimidonamid **XII** bestehen aus den entsprechenden Seitenkettengruppen der nachgeahmten *hot-spot* Aminosäuren der Helix H5. Im Falle des humanen Hsp90-Inhibitors **LSK82** entspricht R^1 einer Isobutyl- (L696), R^2 einer *sec*-Butyl- (I692) und R^3 einer *para*-Methoxybenzylgruppe (Y689).

3 Zielsetzung

Mit rund 263 Mio. Malariafällen weltweit im Jahr 2023 und einer zunehmenden Resistenzentwicklung gegen den aktuellen Goldstandard der Malariatherapie (Artemisinin-basierte Kombinationspräparate) ist eine Entwicklung von neuen antiplasmodialen Wirkstoffen und die Identifizierung von Wirkmechanismen in den Plasmodien unabdingbar.

Das Hitzeschockprotein Hsp90 ist ein Chaperon, dessen Isoform Hsp90 α bei Zellstress z.B. in Krebszellen überexprimiert vorliegt und maßgeblich zur Stabilisierung von Onkoproteinen beiträgt.

Hsp90 ist ebenfalls im humanpathogenen *P. falciparum* vorzufinden. Äußere Stressbedingungen wie Temperatur (bei Fieberschüben), dem Wechsel zwischen Wirt und Vektor als auch die Wachstums- und Entwicklungsphasen führen zu einer Überexprimierung von PfHsp90, welches in einem Netzwerk mit weiteren (Co-)Chaperonen zur Homöostase der Zellen im Parasiten sowohl in den Leber- und Blut- als auch frühen Gametozytenstadien beiträgt. PfHsp90 ist somit essenziell für die Überlebensfähigkeit des Parasiten, wodurch eine Inhibierung von PfHsp90 ein mögliches *Target* für die Entwicklung von neuen antiplasmodialen Wirkstoffen darstellt.

LSK82 ist ein von SPANIER aus der Arbeitsgruppe KURZ synthetisiertes Tripyrimidonamid, welches die C-terminale Dimerisierung von humanem Hsp90 α inhibiert. In der Leukämiezelllinie K562 kann es so das Hsp90-Klient- und Onkoprotein BCR-ABL1 destabilisieren.

Das Tripyrimidonamid-Grundgerüst von **LSK82** soll im Rahmen dieser Arbeit aufgegriffen und basierend auf den Berechnungen der Proteinmodellierung von PfHsp90 sowie Cluster- und Liganden-Dockings von BICKEL und GERTZEN aus der Arbeitsgruppe GOHLKE rational modifiziert werden, sodass eine Affinität und Selektivität zum plasmodialen Hsp90 erreicht werden kann.

In dieser Arbeit wird die Modifizierung der Tripyrimidonamidstruktur in zwei strukturelle Bereiche eingeteilt, nämlich der Modifizierung der oberen Seitenkette durch chemisch diverse Seitenketten und der Vergrößerung der 5-Benzamidokopfgruppe (**Abb. 40**).

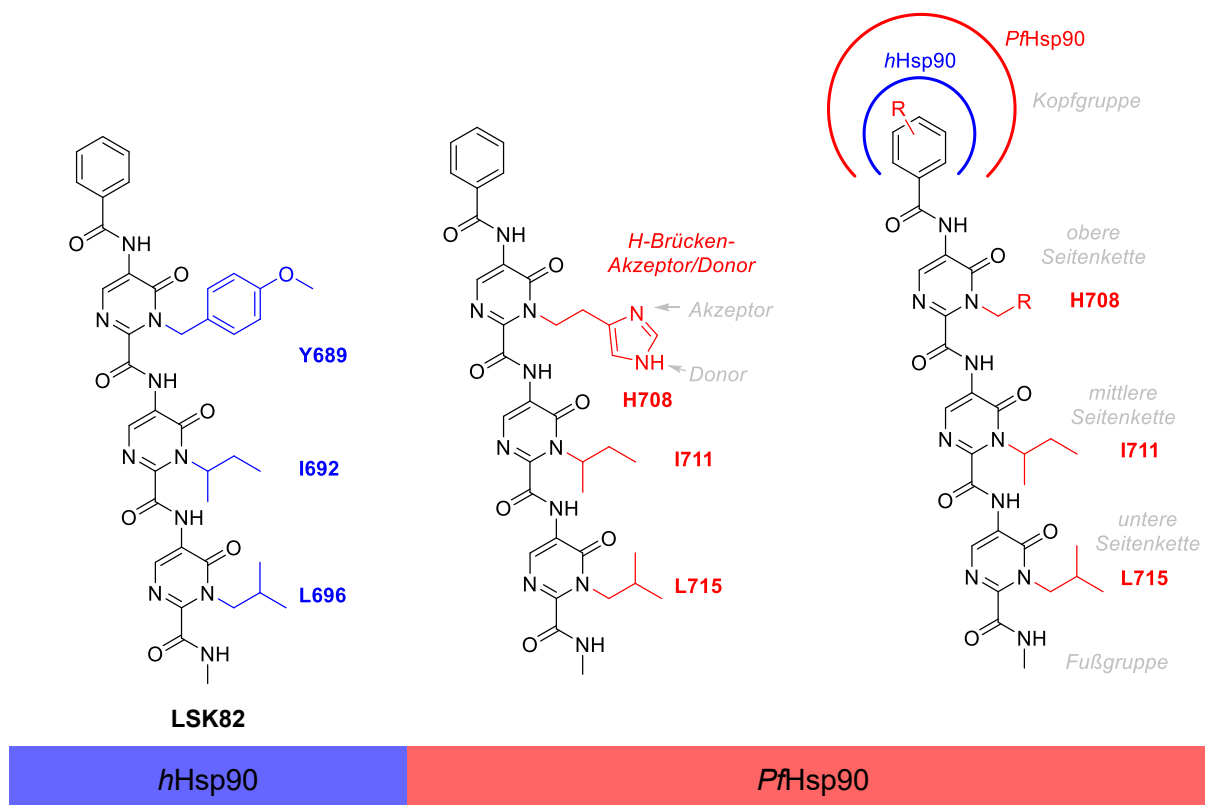


Abb. 40 Tripyrimidonamid **LSK82** (linke Struktur) als humaner Hsp90-Inhibitor sowie die nachgeahmten Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Tyrosin. Die Vorhersagen der Proteinmodellierung suggerieren, dass Affinität zu *PfHsp90* durch einen Wasserstoffbrückenakzeptor und/oder -donor in der obersten Seitenkette (mittlere Struktur) und eine Vergrößerung der Kopfgruppe (rechte Struktur) erreicht werden kann.

Zunächst sollte ein Tripyrimidonamid dargestellt werden, welches die Aminosäureseitenkette des Histidins H708 in oberer Position nachahmt. Anschließend sollten Tripyrimidonamide mit diversen funktionelle Gruppen in der oberen Seitenkette dargestellt werden, welche ebenfalls das Histidin H708 in *PfHsp90* nachahmen können (Vorhersagen nach BICKEL).

Anschließend sollte die Benzoyl-Kopfgruppe der Tripyrimidonamide durch sterisch anspruchsvollere Substituenten ersetzt werden, welche die in *PfHsp90* vergrößerte Bindetasche optimal ausnutzen können (Vorhersagen nach GERTZEN).

Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit des Tripyrimidonamids **LSK82** war eine *in vivo* Untersuchung in Xenograft-Modellen nicht möglich.^[140] WOLOSCHIN konnte erfolgreich zeigen, dass durch eine Strukturvereinfachung der Tri- zu den Bipyrimidonamiden und Bipyrimidinamiden sowie Modifizierung der Fußgruppe mit einem basischen Zentrum eine im Vergleich zu **LSK82** verbesserte antileukämische Aktivität unter Verbesserung der physikochemischen Eigenschaften und Verringerung der Synthesekomplexität erreicht werden kann.^[146]

Neben Tripyrimidonamiden sollten daher die strukturell weniger komplexen Bipyrimidonamide entwickelt werden, welche die Vorhersagen der *PfHsp90*-Proteinmodellierung von BICKEL und GERTZEN berücksichtigen (**Abb. 41**).

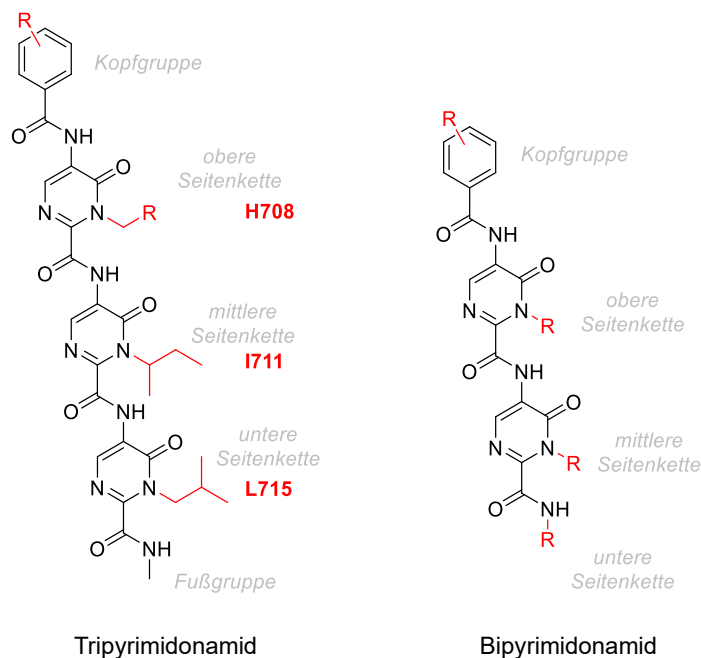


Abb. 41 Tripyrimidonamide mit variabler oberer Seitenkette sowie Kopfgruppe, die potenziell eine antiplasmodiale Aktivität zeigen (linke Struktur). Reduzierung der Molekülkomplexität von Tri- zu Bipyrimidonamiden und Variierung von Kopf-, Seiten- und Fußgruppe am Bipyrimidonamidgrundgerüst.

Die Tripyrimidonamide und Bipyrimidonamide sollen nach erfolgreicher Synthese zunächst hinsichtlich der antiplasmodialen *in vitro* Aktivität sowie die Zytotoxizität der Oligopyrimidonamide in Leberkrebszelllinien bestimmt werden. Potente Derivate sollen anschließend im Tierversuch untersucht werden.

Die *in vitro* und *in vivo* Studien wurden in den Arbeitsgruppen von HELD, BHATIA und WITTLIN durchgeführt (**Abb. 42**).

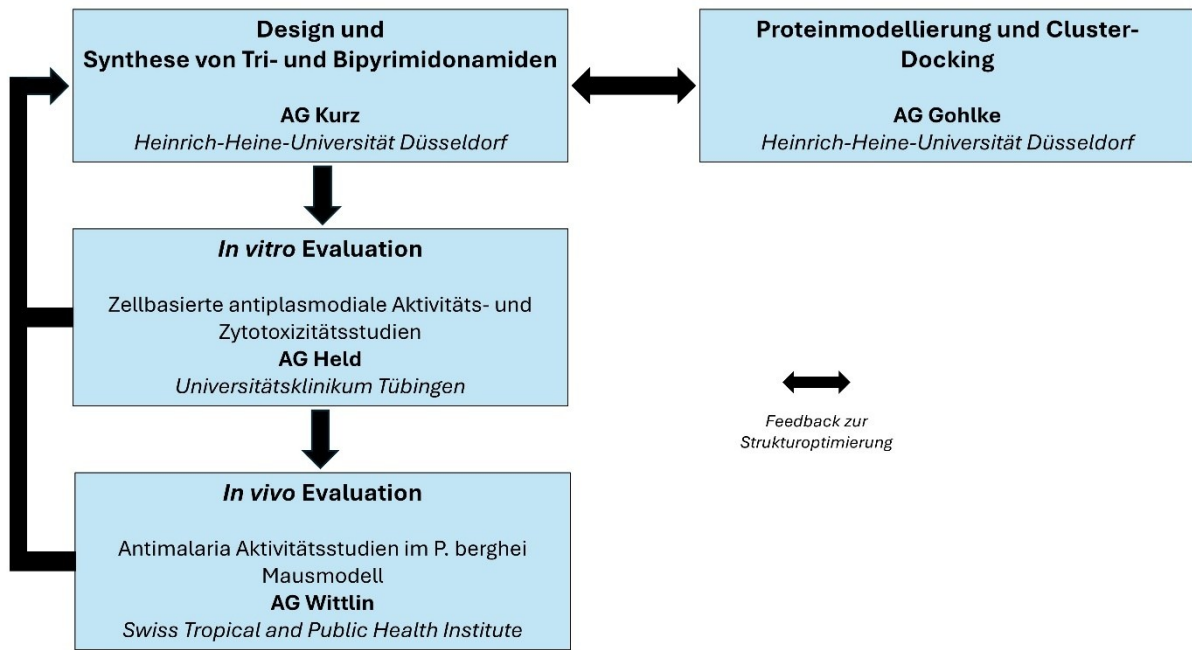


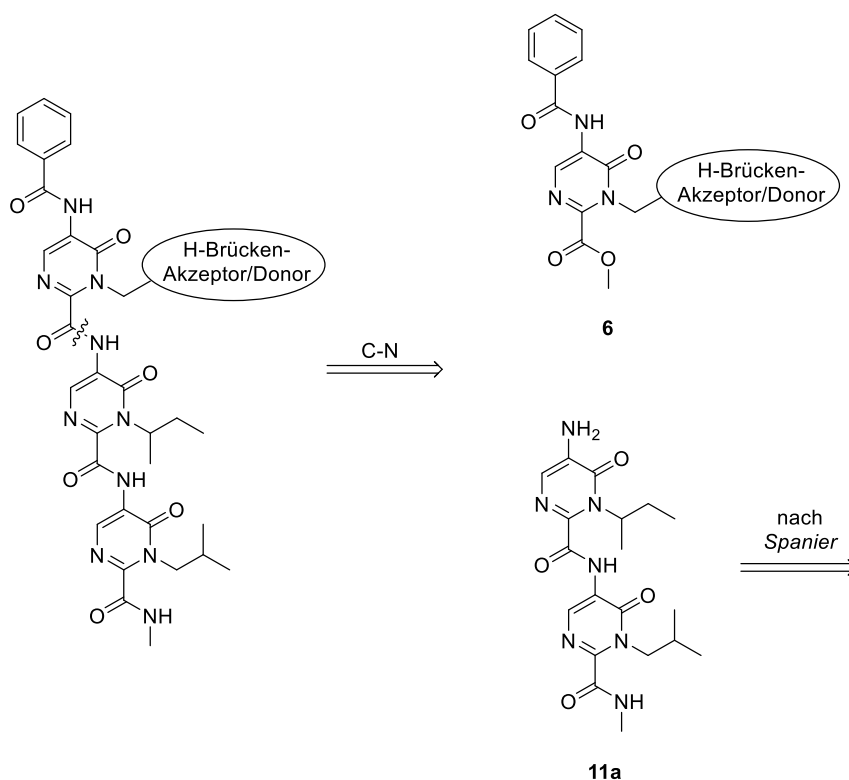
Abb. 42 Darstellung der Arbeitsabläufe der kooperierenden Arbeitsgruppen zur Entwicklung von Oligopyrimidonamiden mit antiplasmodialer Aktivität.

Durch den iterativen Prozess aus der Synthese von Tri- und Bipyrimidonamiden, der biologischen Testung und der computerunterstützten Proteinmodellierung sowie Docking-Studien sollten so Struktur-Aktivitäts-Beziehungen abgeleitet und die Oligopyrimidonamide hinsichtlich ihrer antiplasmodialen Aktivität optimiert werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

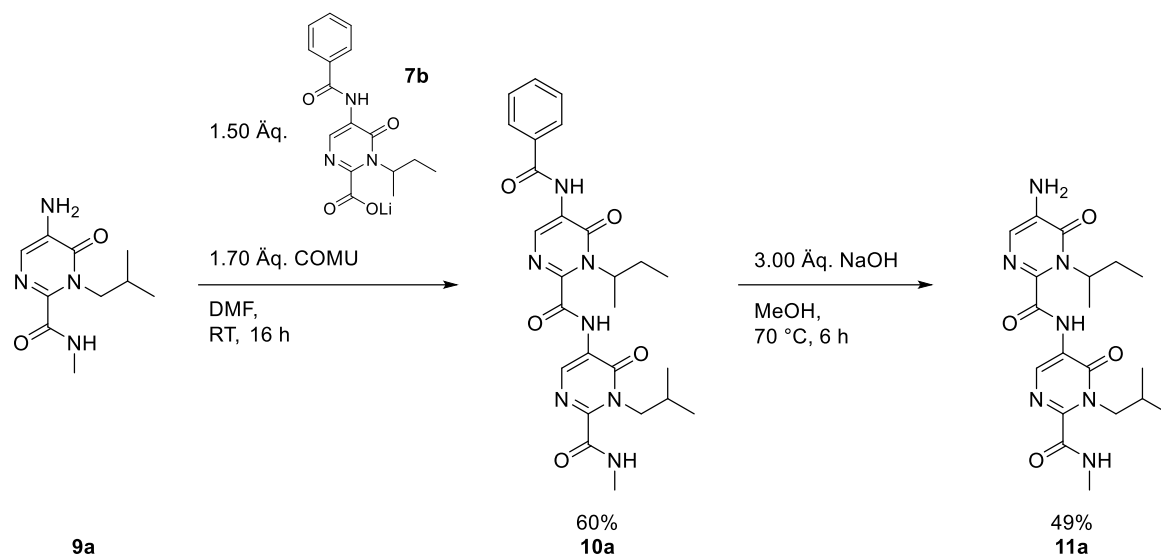
4.1 Synthese von Tripyrimidonamiden mit strukturell diverser Seitenkette

Basierend auf den Docking-Ergebnissen von BICKEL (Kap. 2.1) wurden Zielstrukturen (**Abb. 30**) entwickelt, welche die Aminosäureseitenketten Histidin (H708) in oberer sowie Isoleucin (I711) in mittlerer und Leucin (L715) in unterer Position am Tripyrimidonamidgrundgerüst imitieren können. Durch diese Aminosäureseitenketten soll so eine Affinität zu *Pf*Hsp90 erreicht und die Dimerisierung des Hitzeschockproteins in der CTD gehemmt werden. Für die Synthese der Tripyrimidonamide werden drei Pyrimidon-Monomere mit den entsprechenden Aminosäureseitenketten benötigt (**Schema 14**).



Schema 14 Darstellung von Tripyrimidonamiden mit einem Wasserstoffbrückenakzeptor und/oder -donor in der oberen Seitenkette. Enamin-Dimer **11a** kann nach der Syntheseroute von SPANIER dargestellt werden.

Die Strukturen und Anordnung der beiden Seitenketten von Leucin und Isoleucin in *Pf*Hsp90 ist identisch zum humanen Hsp90-Inhibitor **LSK82**, sodass das Enamin-Dimer **11a** basierend auf der Synthese von SPANIER aufgebaut werden konnte (**Schema 15**).^[142]



Schema 15 Synthese von Enamin-Dimer **11a** nach SPANIER.^[142]

Als Pyrimidon-Monomere mit einer Histidin-nachahmenden Gruppe in der Seitenkette sollte zunächst ein Derivat mit Imidazolgruppe dargestellt werden, welches als Wasserstoffbrückenakzeptor und -donor (**6-His**) fungieren könnte. Anschließend wurde ein Derivat mit *N,N*-Dimethylaminogruppe entwickelt, und als Wasserstoffbrückenakzeptor (**6d**) dienen könnte (**Abb. 43**).

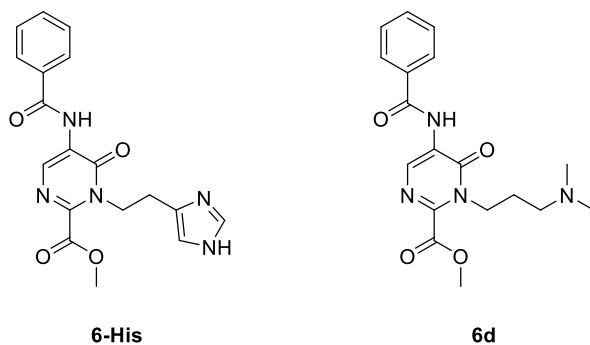
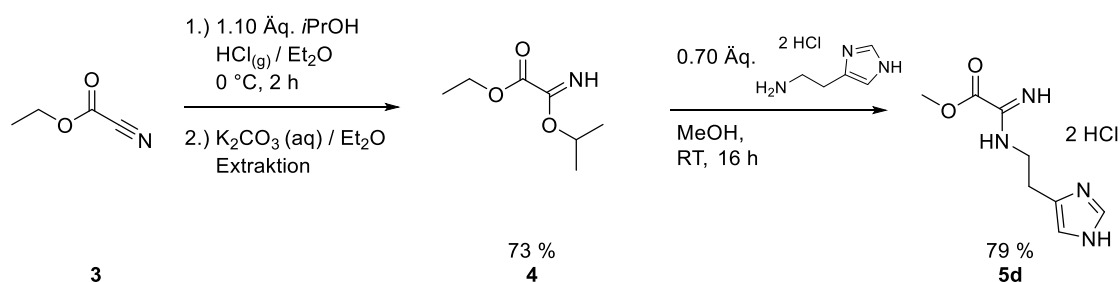


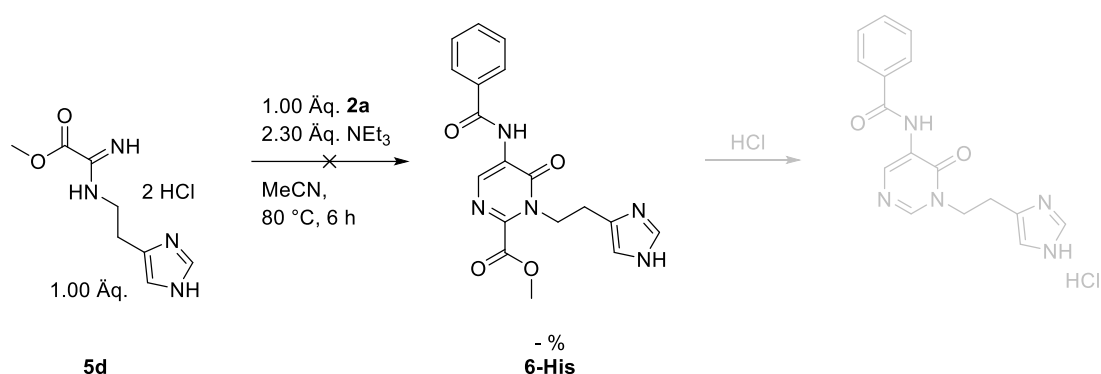
Abb. 43 Pyrimidon-Monomere mit Imidazol- (**6-His**) und *N,N*-Dimethylamino-Gruppe (**6d**).

Die 2-(1*H*-imidazol-5-yl)ethyl-Seitenkette des Pyrimidon-Monomers **6-His** wurde bereits in der Amidinsynthese eingebaut, indem die freie Imidoesterbase **4** mit dem kommerziell verfügbaren Histamindihydrochlorid zu Amidin **5d** umgesetzt wurde (**Schema 16**).



Schema 16 Darstellung von Amidinhydrochlorid **5d** ausgehend von Cyanameisensäureethylester (**3**) mittels PINNER-Reaktion, basischer Flüssig-Flüssig-Extraktion zur Imidoesterbase **4** sowie Umsetzung mit Histamindihydrochlorid zu **5d**.

Das Amidinhydrochlorid **5d** und das Azlacton **2a** wurden anschließend versucht, in einer Kondensationsreaktion umzusetzen. (**Schema 17**).

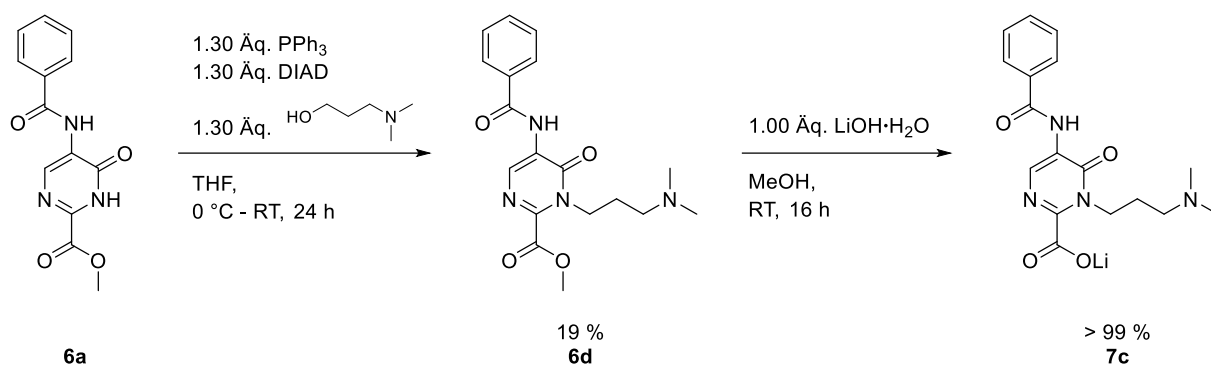


Schema 17 Darstellung von Pyrimidon-Monomer **6-His** aus Amidinhydrochlorid **5d** und Azlacton **2a**. Eine Isolierung von **6-His** war nicht erfolgreich.

Bei der Reaktionskontrolle mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) konnte Eduktumsatz beobachtet werden, jedoch konnte das Monomer **6-His** nach Flüssig-Flüssig-Extraktion und säulenchromatografischer Reinigung nicht in ausreichender Reinheit gewonnen werden. Eine Fällungsreaktion und Isolierung von **6-His** als Imidazoliumchlorid-Salz durch Ansäuern mit Chlorwasserstoff war aufgrund einer Decarboxylierung der Carboxygruppe nach saurer Hydrolyse der Methylestergruppe (vgl. **Schema 10** und **Schema 17**) nicht möglich.

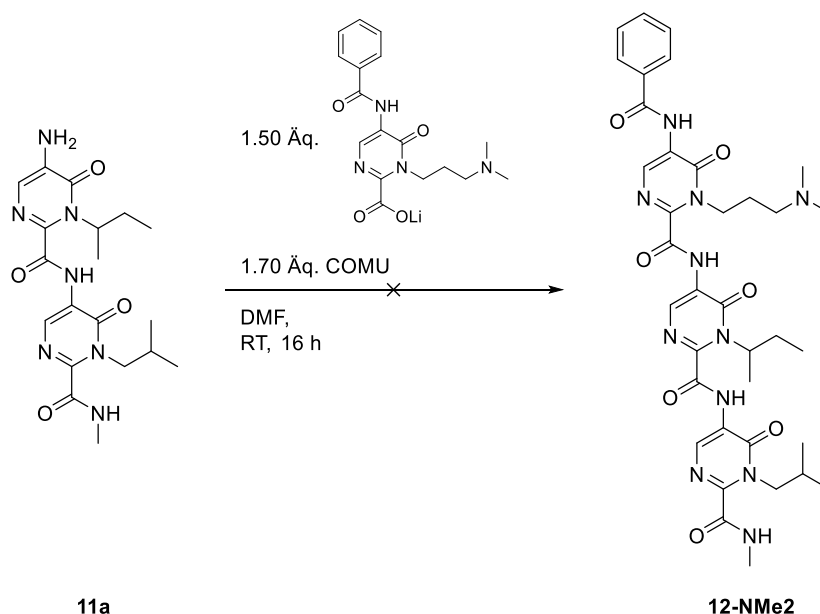
Da eine Darstellung des Pyrimidon-Monomer **6-His** durch Einführen des Seitenkettensubstituenten in der Amidinsynthese (**Schema 16**) nicht möglich war, wurde eine alternative Synthese mittels MITSUNOBU-Reaktion erprobt. Diese wurde zunächst mit dem kommerziell besser verfügbarem 3-Dimethylaminopropanol zur Darstellung von Pyrimidon-Monomer **6d** durchgeführt. Nach dem Syntheseprotokoll von WOLOSCHIN konnte das Pyrimidon **6d** mit Dimethylaminopropylseitenkette nach Flüssig-Flüssig-Extraktion und säulenchromatografischer Reinigung isoliert werden. Anschließende Umsetzung mit

äquimolarer Menge Lithiumhydroxidmonohydrat in Methanol lieferte das Lithiumcarboxylat **7c** (**Schema 18**).



Schema 18 MITSUNOBU-Reaktion zur Darstellung von **6d** sowie anschließende Umsetzung zu **7c**.

Das Lithiumcarboxylat **7c** und das Enamin-Dimer **11a** wurden anschließend in einer Amidkupplungsreaktion mit den Reaktionsbedingungen von SPANIER umgesetzt (**Schema 19**).



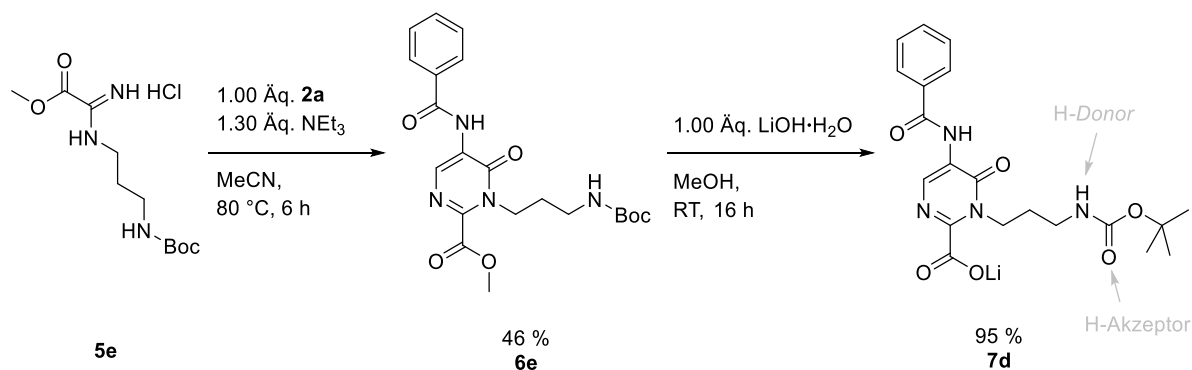
Schema 19 Darstellung von Tripyrimidonamid **12-NMe2** mit *N,N*-Dimethylaminopropyl-Seitenkette mittels COMU®-vermittelter Amidkupplungsreaktion aus Enamin-Dimer **11a** und Lithiumcarboxylat **7c**.

Die COMU®-vermittelte Reaktion von **7c** mit dem Enamin-Dimer **11a** zeigte keine in der HPLC und Dünnschichtchromatographie sichtbare Umsetzung der Edukte zum Tripyrimidonamid **12-NMe2**. Diese Reaktion wurde mit HATU als Kupplungsreagenz wiederholt. Hierbei wurde ebenfalls keine Produktbildung von **12-NMe2** beobachtet. WOLOSCHIN gelang es, Oligopyrimidonamide mit basischer Gruppe am C-Terminus, darunter einer *N,N*-Dimethylaminoethylgruppe zu synthetisieren.^[146] Da die Amidkupplung an dem

Beispiel von Monomer **7c** mit dem Enamin-Dimer **11a** jedoch Probleme bereitete, wurde eine erfolgversprechendere Synthesestrategie überlegt, mit welcher Tripyrimidonamide mit diverser oberer Seitenkette dargestellt werden können. Dazu wurde ein Pyrimidon-Monomer mit geschützter Aminogruppe in der Seitenkette entwickelt, welches mittels Amidkupplungsreaktion zum Tripyrimidonamid umgesetzt und die Schutzgruppe im letzten Schritt entfernt wurde.

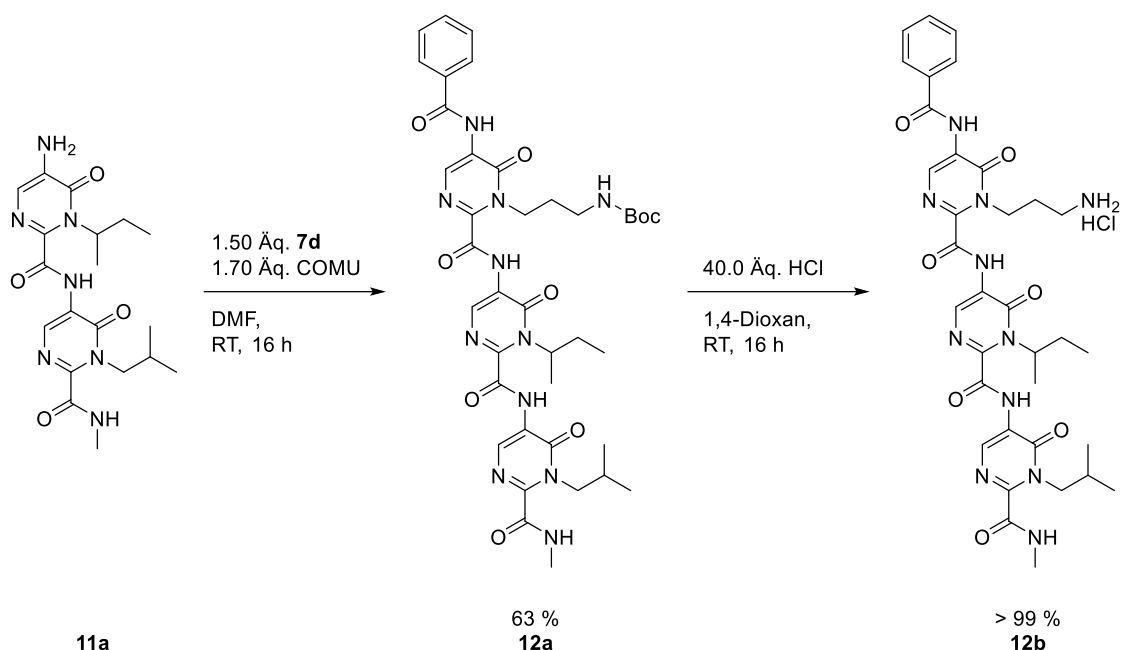
Mit einem säurestabilen Tripyrimidonamidgrundgerüst bietet sich die *tert*-Butyloxycarbonyl-Gruppe (Boc-Gruppe) als mögliche Schutzgruppe für primäre und sekundäre Aminogruppen an, welche in einem sauren Milieu abgespalten werden kann.^[147]

Das Carbamat-Monomer **6e** wurde aus dem Amidinhydrochlorid **5e** und dem Azlacton **2a** hergestellt und die Estergruppe anschließend mit Lithiumhydroxidmonohydrat in Methanol verseift, um das Lithiumcarboxylat **7d** zu erhalten (**Schema 20**).



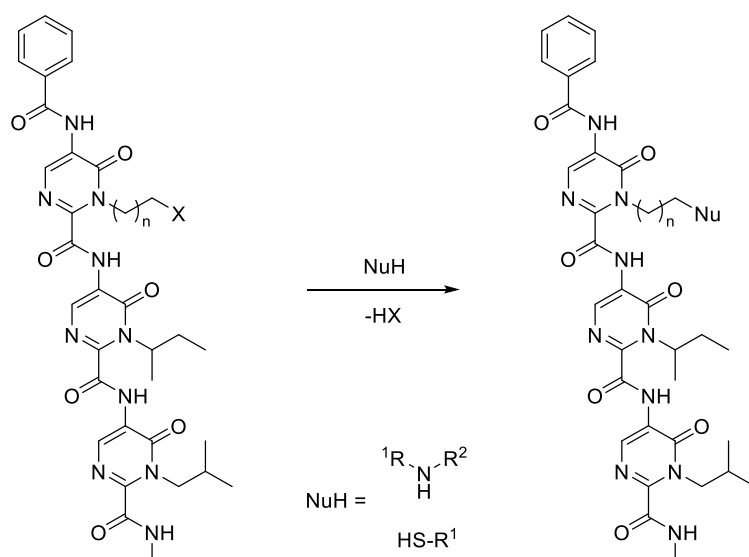
Schema 20 Darstellung von Pyrimidon-Monomer **6e** aus Amidinhydrochlorid **5e** und Azlacton **2a**. Anschließend erfolgte eine Hydrolyse der Estergruppe zu Lithiumcarboxylat **7d**.

Zusammen mit dem Enamin-Dimer **11a** wurde das Lithiumcarboxylat **7d** in einer Amidkupplungsreaktion zum Tripyrimidonamid **12a** umgesetzt (**Schema 21**). Das Entfernen der Boc-Schutzgruppe erfolgte mit einem Überschuss Chlorwasserstoff in 1,4-Dioxan (**Schema 21**).



Schema 21 Amidkupplungsreaktion von Enamin-Dimer **11a** mit Lithiumcarboxylat **7d** zu Tripyrimidonamid **12a** sowie anschließende Entschützung der Aminogruppe mit Chlorwasserstoff zu Tripyrimidonamid **12b**.

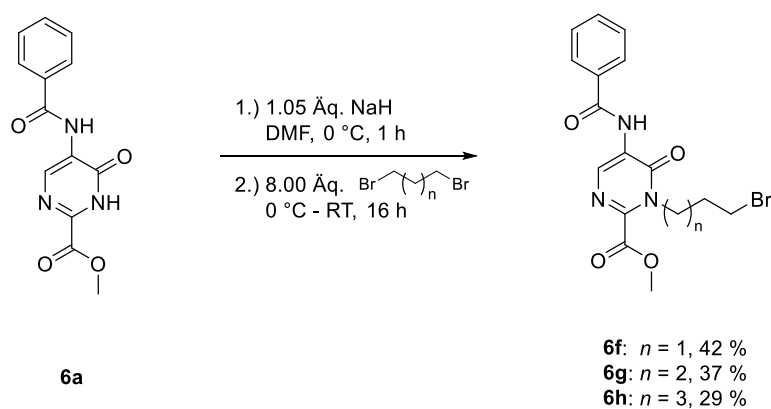
Neben dem Einsatz von Schutzgruppen, die nach Aufbau des Tripyrimidonamidgrundgerüsts im letzten Reaktionsschritt entfernt werden, wurde eine weitere Möglichkeit erprobt, Substituenten in der oberen Seitenkette der Tripyrimidonamide mittels *Late-Stage*-Funktionalisierung einzufügen. Zu diesem Zweck wurde ein Pyrimidongrundgerüst mit Alkylseitenkette und endständigem Halogen gewählt, dessen Halogenatom in einer Substitutionsreaktion im letzten Reaktionsschritt durch Stickstoff- oder Schwefelnukleophile substituiert werden sollte (**Schema 22**).



Schema 22 Nukleophile Substitution eines Tripyrimidonamids mit Alkylhalogensseitenkette durch Stickstoff- oder Schwefelnukleophile.

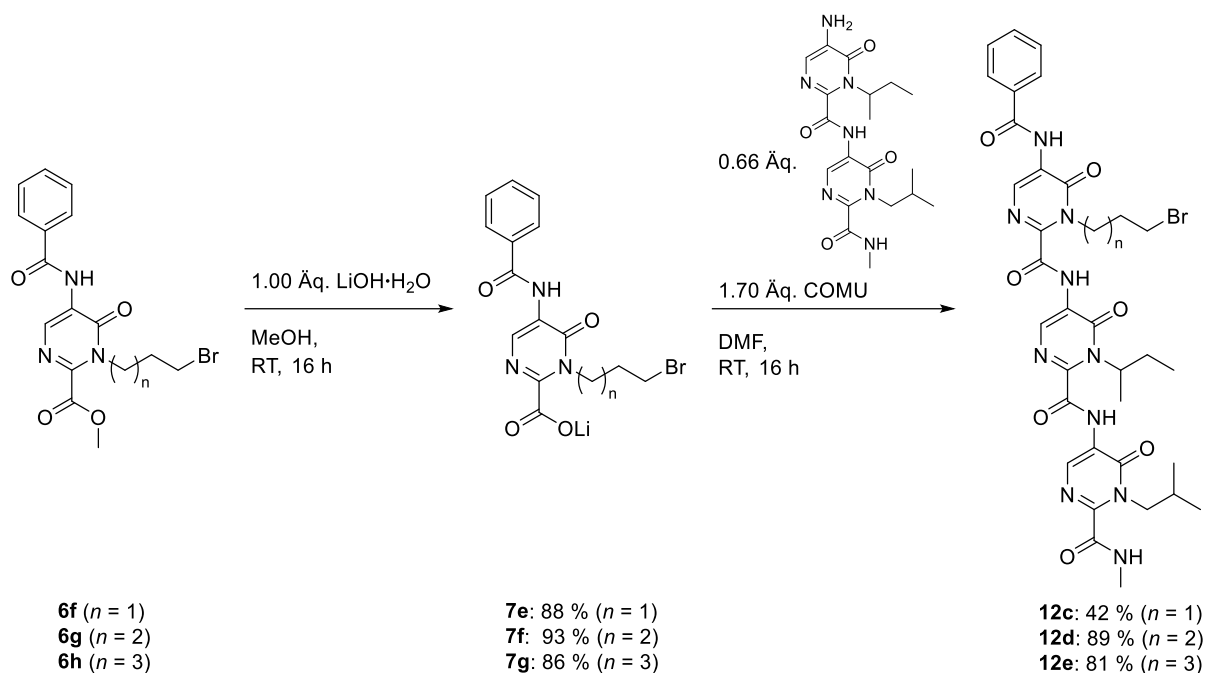
Es wurden unterschiedliche Seitenkettenlängen ausgewählt, da noch kein genauer Abstand bekannt ist, bei dem die funktionelle Gruppe in der oberen Seitenkette (Nachahmen von Histidin H708) optimal mit den beiden Aminosäureseitenketten Threonin T692 und Asparaginsäure D613 (**Abb. 28**) interagieren kann.

Die Synthese startete ausgehend von dem Monomer **6a**, welches mit Natriumhydrid unter Eiskühlung in Dimethylformamid (DMF) zunächst deprotoniert und anschließend mit homologen Dibromalkanen umgesetzt wurde. Durch die Verwendung eines achtfachen Überschuss des Dibromalkans wurde die Bildung eines dimeren Produktes unterdrückt (**Schema 23**).



Schema 23 Alkylierung von Pyrimidon **6a** mit homologen Dibromalkanen zu den Pyrimidonen **6f** – **6h**.

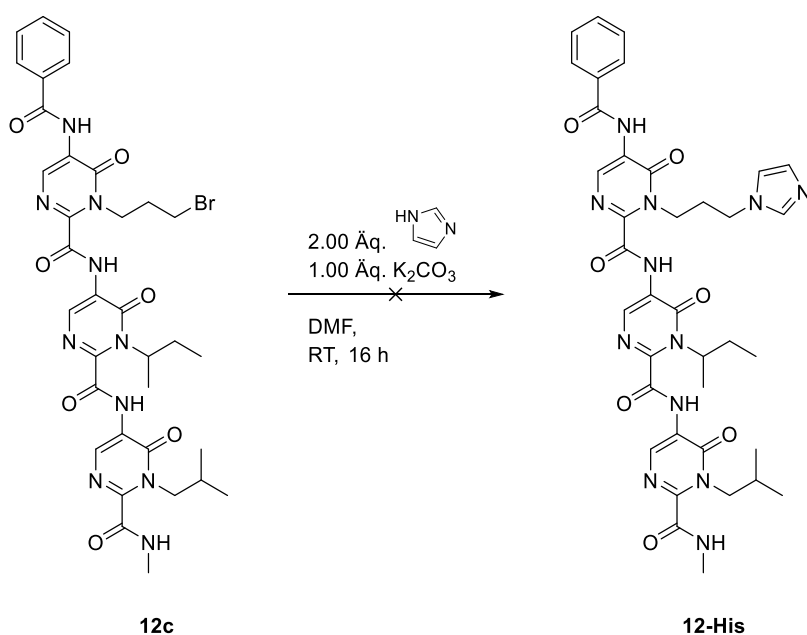
Die Methylestergruppe der *N*-alkylierten Monomere **6f** – **6h** wurde mit Lithiumhydroxidmonohydrat zu den Lithiumcarboxylaten **7e** – **7g** verseift und anschließend jeweils mit dem Enamin-Dimer **11a** in einer Amidkupplungsreaktion zu den Tripyrimidonamiden **12c** – **12e** umgesetzt (**Schema 24**).



Schema 24 Darstellung von Tripyrimidonamiden **12c** – **12e** ausgehend von den Monomeren **6f** – **6h**.

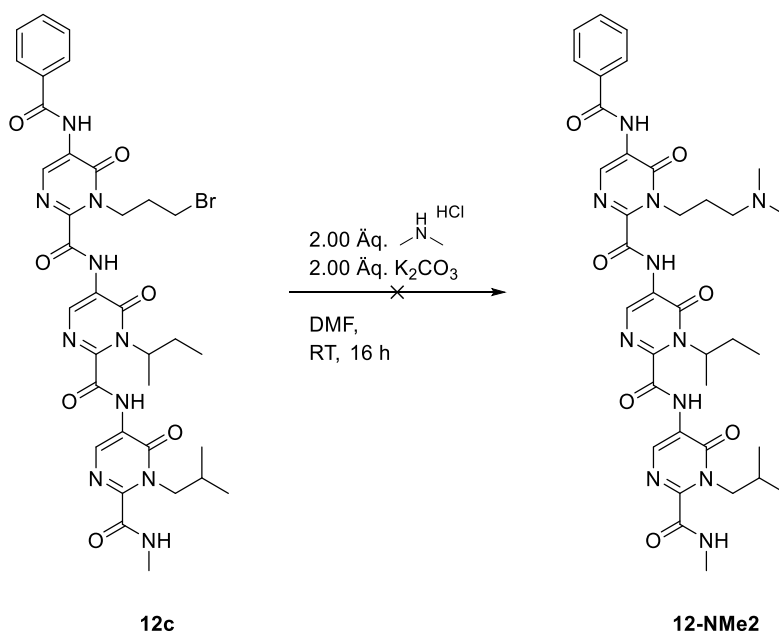
Das Tripyrimidonamid **12c** wurde anschließend mit Stickstoffnukleophilen versetzt, welches zu den synthetisch bisher nicht zugänglichen Tripyrimidonamiden mit Imidazol-, Imidazol-ähnlichen oder Dimethylamin-Substitutionsmuster (**Abb. 43**) führen könnte.

Bei dem ersten Versuch einer nukleophilen Substitutionsreaktion wurde das Tripyrimidonamid **12c** mit 2.00 Äq. Imidazol als Nukleophil und 1.00 Äq. wasserfreiem Kaliumcarbonat als Hilfsbase in DMF umgesetzt (**Schema 25**).



Schema 25 Nukleophile Substitutionsreaktion von Tripyrimidonamid **12c** mit Imidazol als Nukleophil.

Eine Reaktionskontrolle mittels HPLC zeigte nach 16 h Reaktionszeit bei Raumtemperatur zwar einen vollständigen Umsatz des Eduktes **12c**, jedoch konnte die Molekülmasse von dem gewünschten Produkt **12-His** in der Massenspektrometrie (Elektrospray-Ionisation, ESI) nicht beobachtet werden. Unter den gleichen Bedingungen wurde die Reaktion von Tripyrimidonamid **12c** mit Dimethylamin als stärkeres Nukleophil und einem weiteren Äquivalent Kaliumcarbonat zur Freisetzung der Base aus dem Hydrochloridsalz durchgeführt (**Schema 26**).



Schema 26 Nukleophile Substitutionsreaktion von Tripyrimidonamid **12c** mit Dimethylaminhydrochlorid als Nukleophil.

Zwar lief die Reaktion erneut unter vollständigem Eduktumsatz ab, allerdings deutet die Analyse des Reaktionsproduktes **12X** mittels Massenspektrometrie (ESI) aufgrund des gleichen Molekülpeaks (ESI⁺, $m/z = 699$) wie im Falle der Umsetzung von **12c** mit Imidazol auf dasselbe Reaktionsprodukt hin. Dieses Produkt wurde folglich unabhängig vom eingesetzten Stickstoffnukleophil gebildet.

Ein Vergleich der aromatischen Bereiche der ¹H-NMR-Spektren von Tripyrimidonamid **12c** und des unbekannten Produktes **12X** könnte Aufschluss über die Struktur des entstandenen Produktes geben (**Abb. 44**).

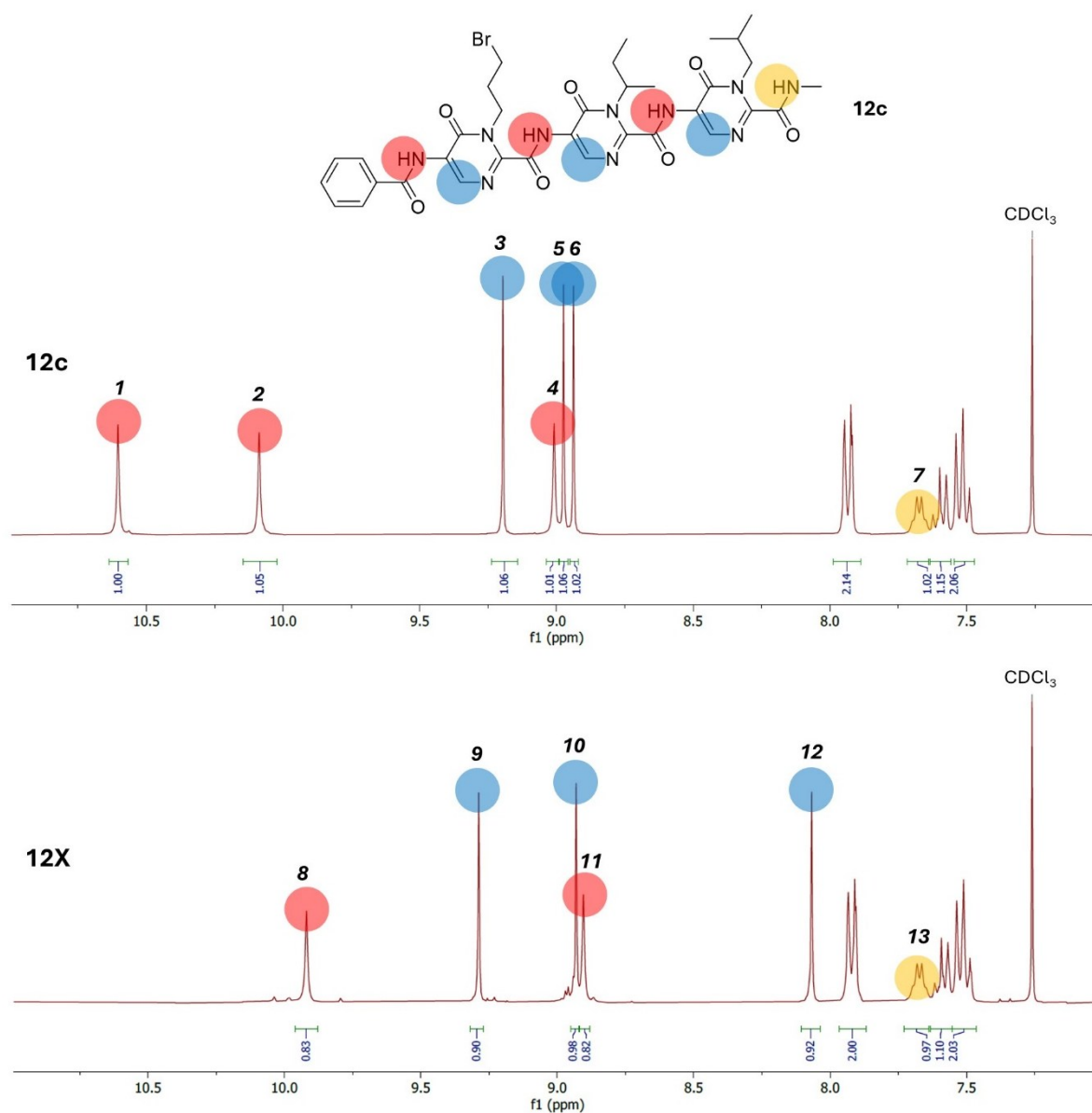


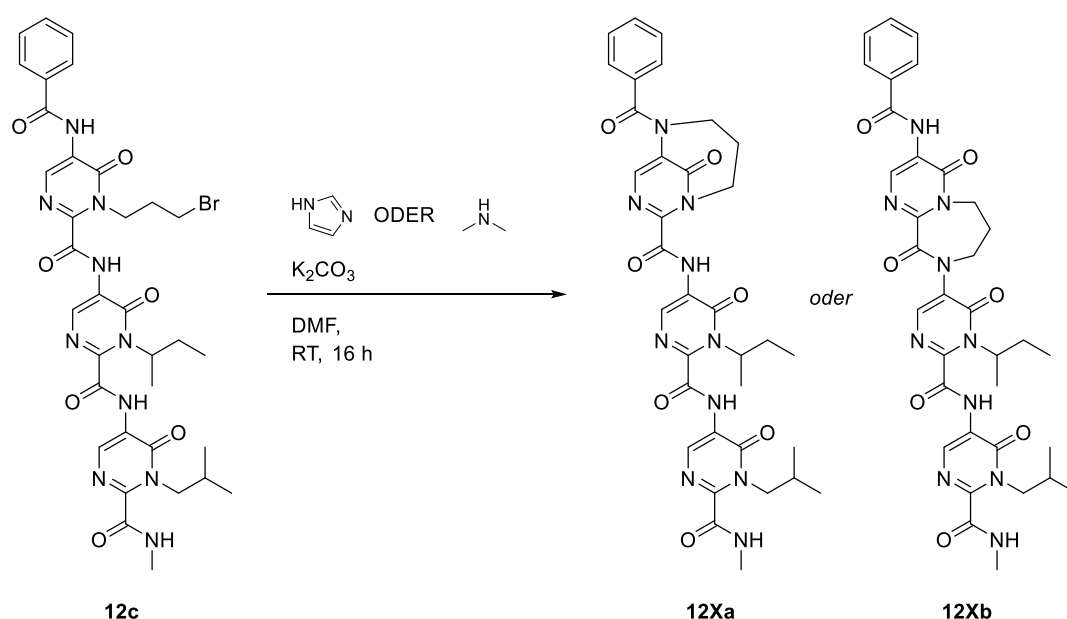
Abb. 44 Vergleich des aromatischen Bereichs der ¹H-NMR-Spektren (300 MHz, CDCl₃, 298 K) von Tripyrimidonamid **12c** (oben) und dem Hauptprodukt **12X** der nukleophilen Substitution (unten). Pyrimidonprotonen sind in blau, Amidprotonen in rot und orange und Phenylprotonen nicht farbig markiert.

In Tripyrimidonamid **12c** koppeln die drei Pyrimidonprotonen (blau - 3, 5 und 6) nicht mit weiteren Protonen und sind daher als scharfe Singulets erkennbar (Abb. oben). Die Amidprotonen (rot – 1, 2 und 4) sind als breite Singulets sichtbar. Das Amidproton der Fußgruppe (orange - 7) spaltet durch homonukleare ³J-Kopplung zu den benachbarten Methylprotonen als Quartett auf.

Im Vergleich zu **12c** sind im aromatischen Bereich von **12X** lediglich fünf statt sechs Singulets erkennbar (Abb. unten). Während zwei der drei Pyrimidonprotonen (blau – 9 und 10) und zwei der drei Amidprotonen (rot – 8 und 11) vergleichbare chemische Verschiebungen wie bei **12c**

aufweisen, ist Pyrimidonproton 12 in **12X** stärker hochfeldverschoben. Das am weitesten tieffeldverschobene Amidproton 1 in **12c** ist im Spektrum von **12X** nicht mehr vorhanden.

Die massenspektrometrischen Beobachtungen, die durch den fehlenden Isotopenpeak (^{79}Br und ^{81}Br) auf eine Abspaltung von HBr hindeuten, und die ^1H -NMR-Spektren können durch eine intramolekulare Cyclisierung von Tripyrimidonamid **12c** bei Umsetzung mit den *N*-Nukleophilen Imidazol oder Dimethylamin erklärt werden. Eine intramolekulare Cyclisierung könnte dabei zu zwei möglichen Produkten führen (**Schema 27**).



Schema 27 Nukleophile Substitution von Tripyrimidonamid **12d** durch Imidazol oder Dimethylaminhydrochlorid. Intramolekulare Cyclisierung als unerwünschte Hauptreaktion.

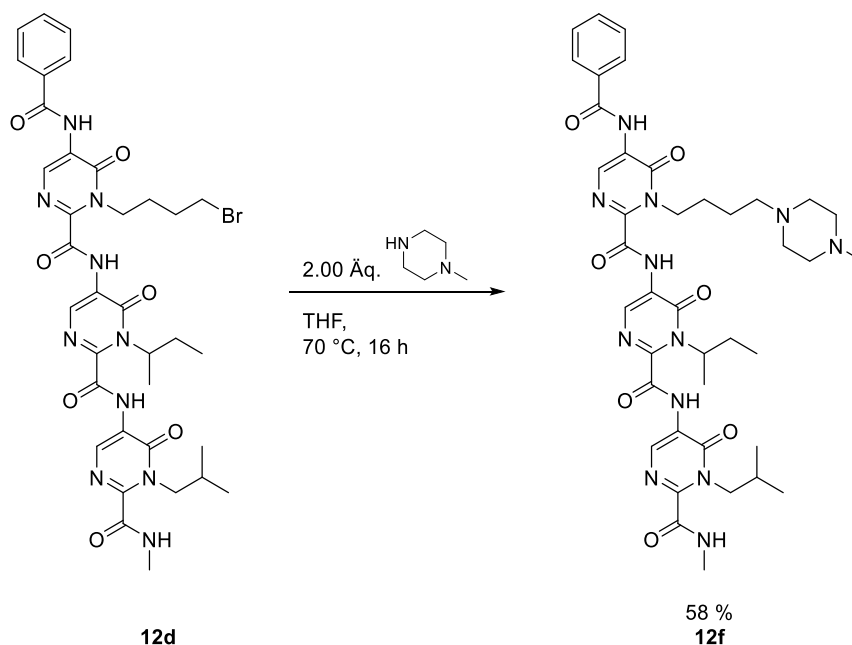
Der in der Massenspektrometrie beobachtete Molekülpeak des unbekannten Hauptproduktes **12X** entspricht dem eines cyclisierten Tripyrimidonamids. Die genaue Struktur von **12X** könnte z.B. durch kristallografische Analyse oder zweidimensionale NMR-Spektroskopie ermittelt werden.

Dass eine intramolekulare Cyclisierung nicht nur bei dem Tripyrimidonamid **12c** mit 3-Brompropylseitenkette nach Umsetzung mit *N*-Nukleophilen auftritt, wurde ferner an dem Tripyrimidonamid **12d** mit 4-Brombutyl-Seitenkette beobachtet. Unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie bei **12c** (**Schema 25**) wurde **12d** mit Imidazol als Nukleophil umgesetzt. Eine massenspektrometrische Analyse zeigt eine Molekülmasse, welche analog zur nukleophilen Substitution von **12c** weder dem Edukt **12d** noch dem substituierten Produkt **12-His** (mit *n*-Butyl- statt *n*-Propylkohlenstoffkette) zugeordnet werden kann

(ESI⁺, m/z = 713). Auch in diesem Fall entspricht die beobachtete Molekülmasse der eines intramolekular cyclisierten Tripyrimidonamids.

Als weiteres Nukleophil für die Derivatisierung der Seitenkette wurde das räumlich größere *N*-Methylpiperazin gewählt. Die beiden tertiären Stickstoffatome können als Wasserstoffbrückenakzeptoren sowohl mit Threonin T692 als auch Asparaginsäure D613 (Salzbrücke) interagieren (**Abb. 28**).

Das Tripyrimidonamid **12d** wurde mit 2.00 Äq. *N*-Methylpiperazin in THF versetzt, sodass das Tripyrimidonamid **12f** mit *N*-Methylpiperazin-Gruppe in der Seitenkette nach säulenchromatografischer Reinigung in 58 % Ausbeute dargestellt werden konnte (**Schema 28**).^[148]



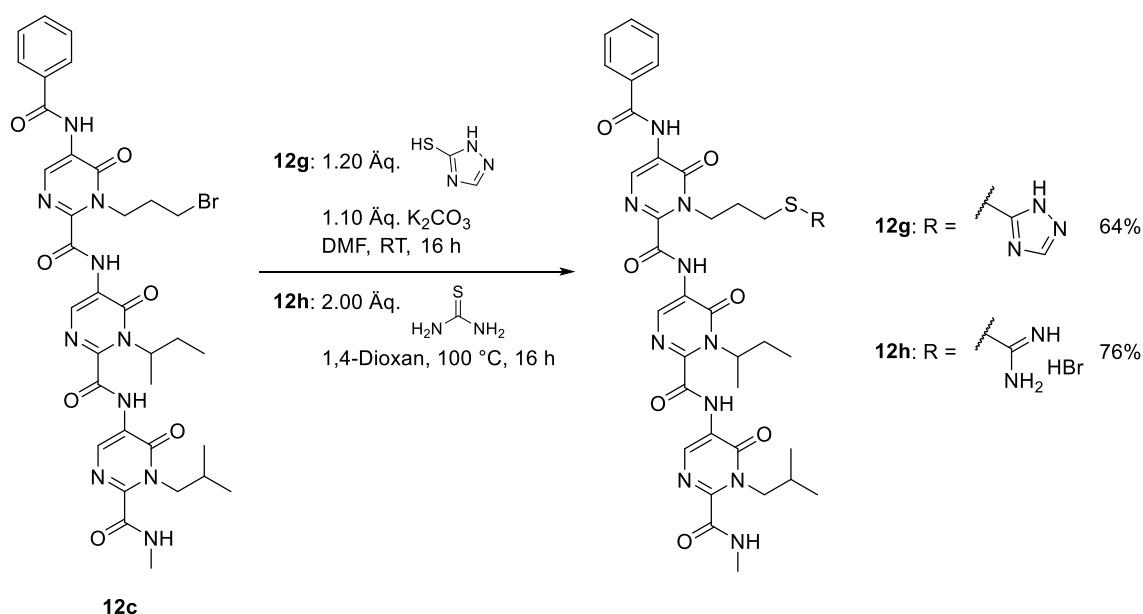
Schema 28 Nukleophile Substitutionsreaktion von Tripyrimidonamid **12d** durch *N*-Methylpiperazin als Nukleophil zu Tripyrimidonamid **12f**.^[148]

Anhand dieses Beispiels konnte gezeigt werden, dass eine Derivatisierung der Seitenkette mit Stickstoffnukleophilen möglich, aber die Wahl der Nukleophile eingeschränkt ist.

Neben Stickstoffnukleophilen wurden ebenfalls Schwefelnukleophile zur nukleophilen Substitution des Bromatoms von Tripyrimidonamid **12c** verwendet, mit denen weitere Struktur-Aktivitäts-Beziehungen aufgestellt werden können.

Das Tripyrimidonamid **12c** wurde zunächst mit 3-Mercapto-1,2,4-triazol in DMF und Kaliumcarbonat als Hilfsbase versetzt, wodurch das Tripyrimidonamid **12g** nach säulenchromatografischer Aufreinigung in einer Ausbeute von 64 % dargestellt wurde (**Schema 29**). Die 1,2,4-Triazolgruppe weist im Vergleich zur Imidazolgruppe (Histidin) eine ähnliche Geometrie, Aromatizität sowie vergleichbare H-Brücken-Akzeptor- und -Donoreigenschaften auf. Ferner ist das 1,2,4-Triazol durch das zusätzliche Stickstoffatom im Heterozyklus gegenüber dem Imidazol (Histidin) metabolisch stabiler (z.B. Oxidasen), wodurch die 1,2,4-Triazolgruppe ein geeignetes Bioisoster zum Imidazol darstellt.^[149]

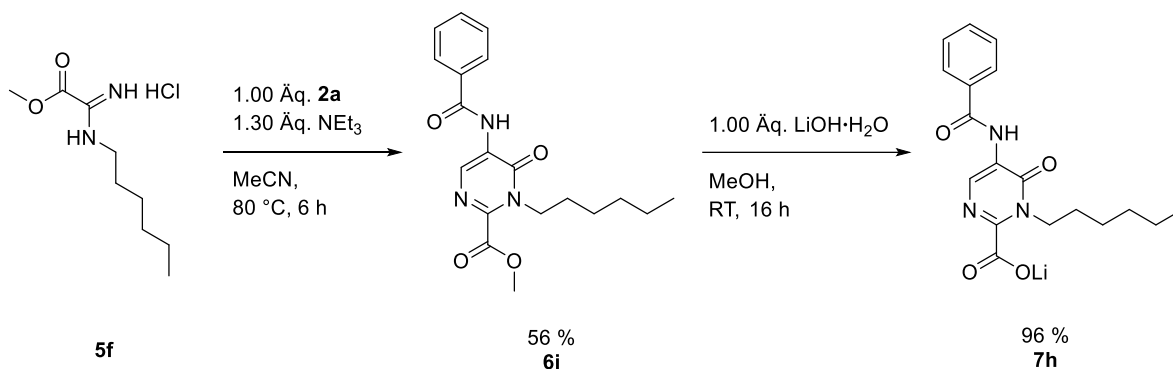
Weiterhin wurde das Tripyrimidonamid **12c** mit Thioharnstoff in 1,4-Dioxan versetzt, um **12h** zu erhalten. Allerdings war das Produkt während der säulenchromatografischen Reinigung nicht stabil, sodass die Isolierung von **12h** nur mittels Hydrobromidfällung des Tripyrimidonamids in 1,4-Dioxan durchgeführt wurde. Folglich wurde das Tripyrimidonamid **12g** in einer Ausbeute von 76 % als Isothiuroniumbromid dargestellt (**Schema 29**).^[150]



Schema 29 Nukleophile Substitutionsreaktion von Tripyrimidonamid **12c** durch 1,2,4-Mercaptotriazol (**12g**) und Thioharnstoff (**12h**) als Schwefelnukleophile.^{[149],[150]}

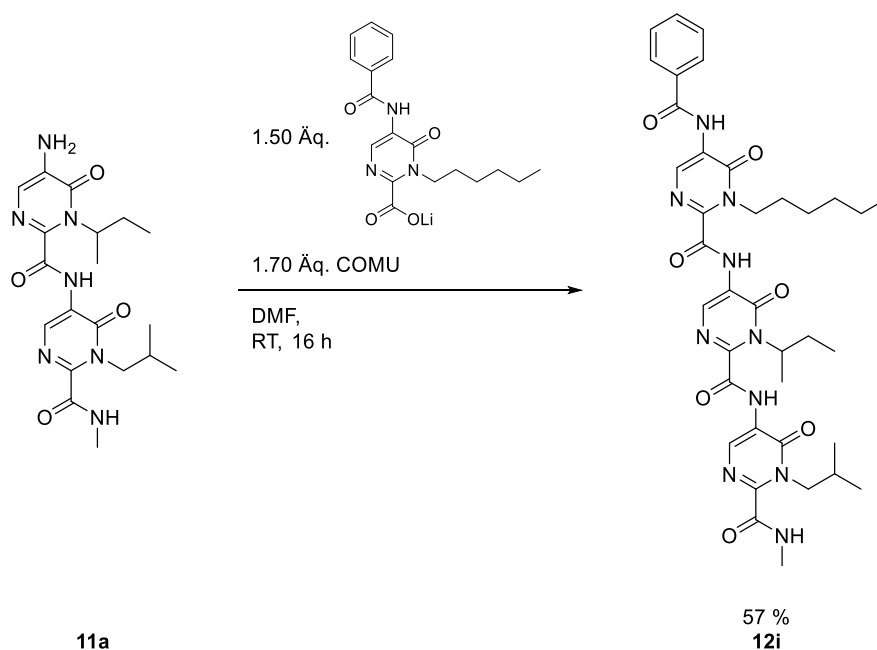
Während die dargestellten Tripyrimidonamide mit Wasserstoffbrückenakzeptoren- oder -donoren in der oberen Seitenkette mit Threonin T692 oder Asparaginsäure D613 interagieren (**Abb. 27**) und somit *Pf*Hsp90 potent inhibieren sollten, besteht die Hypothese, dass neutrale und unpolare Seitenketten eine geringere Affinität zu *Pf*Hsp90 und damit schwächere antiplasmodiale Aktivität zeigen sollten. Um diese Hypothese zu untersuchen, sollte ein Tripyrimidonamid mit aliphatischer Seitenkette dargestellt werden.

Das Pyrimidon-Monomer **6i** mit *n*-Hexylseitenkette wurde aus dem Amidinhydrochlorid **5f** und dem Azlacton **2a** hergestellt und die Methylestergruppe anschließend mit Lithiumhydroxid in Methanol zum Lithiumcarboxylat **7h** verseift (**Schema 30**).



Schema 30 Darstellung des Pyrimidon-Monomer **6i** aus Amidinhydrochlorid **5f** und Azlacton **2a**. Anschließend erfolgte eine Hydrolyse der Estergruppe zu Lithiumcarboxylat **7h**.

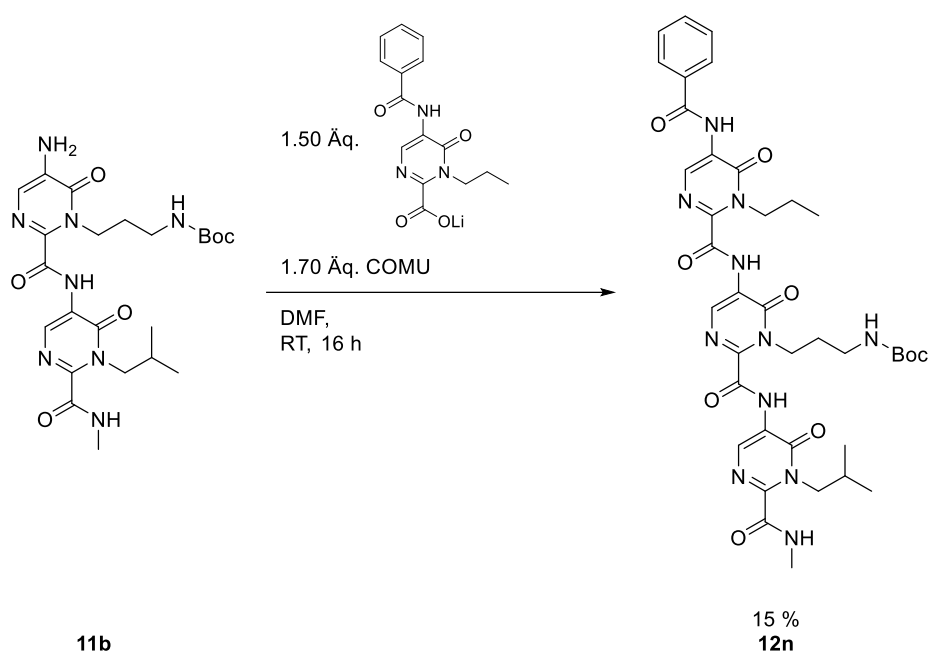
Das Lithiumcarboxylat **7h** wurde anschließend in einer COMU®-vermittelten Amidkupplungsreaktion mit dem Enamin-Dimer **11a** zum Tripyrimidonamid **12i** umgesetzt (**Schema 31**).



Schema 31 Amidkupplungsreaktion von Enamin-Dimer **11a** mit Lithiumcarboxylat **7h** zu Tripyrimidonamid **12i**.

In den bisher dargestellten Tripyrimidonamiden wurde die Position der drei Seitenketten am Tripyrimidongrundgerüst nicht verändert. Der Einfluss der Seitenkettenposition auf die antiplasmodiale Aktivität wurde durch die Darstellung des Tripyrimidonamids **12n** mit vertauschter oberer und mittlerer Seitenkettenposition im Vergleich zu **12a** untersucht. Die *n*-Propylseitenkette in oberer Position stellt hierbei vereinfacht die Isobutyl- oder sec-Butylgruppe dar.

12n wurde durch eine COMU®-vermittelte Amidkupplungsreaktion aus dem Lithiumcarboxylat **7i** und dem Enamin-Dimer **11b** in einer Ausbeute von 15 % dargestellt (Schema 32).



Schema 32 Darstellung von Tripyrimidonamid **12n** aus Enamin-Dimer **11b** und Lithiumcarboxylat **7i**.

4.2 Biologische Evaluation der Tripyrimidonamide mit strukturell diverser oberer Seitenkette

Bislang ist noch kein Target-basierter Assay vorhanden, sodass derzeit antizipiert wird, dass die antiplasmodiale Aktivität auf eine Hemmung von *Pf*Hsp90 zurückgeführt wird.

Die dargestellten Tripyrimidonamide **12a**, **12b**, **12f**, **12g**, **12h**, **12i** und **12n** wurden hinsichtlich ihrer antiplasmodialen Aktivität zunächst gegen Parasiten im asexuellen Blutstadium des multiresistenten Stamm *P. falciparum* (*Pf*Dd2) und dem Chloroquin-sensitiven Stamm (*Pf*3D7) im *in vitro* Wachstumsinhibierung Assay untersucht. Das Parasitenwachstum wurde anhand des *histidine-rich protein II* (HRP2) in einem *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) beobachtet.^[28]

Von ausgewählten Verbindungen wurde zusätzlich die Zytotoxizität in der humanen Leberkrebszelllinie HepG2 mit einem *Neutral Red Assay* untersucht.^[151]

Als Referenzverbindung in den plasmodialen Wachstumsinhibierungsassays wurde Chloroquin getestet.

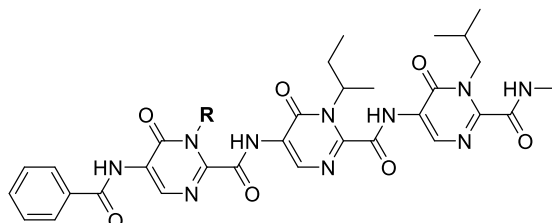
Das Tripyrimidonamid **LSK82** wurde als humaner Hsp90-Inhibitor entwickelt und zeigt inhibitorische Eigenschaften in der C-terminalen Domäne von Hsp90 gegen die chronisch myeloische Leukämiezelllinie K562 und der akuten B-lymphoblastischen Leukämiezelllinie SUP-B15 im mikromolaren Bereich. Die Wachstumsinhibierung der Leukämiezelllinien K562 und SUP-B15 durch die dargestellten Tripyrimidonamide (s.o.) wurde ebenfalls in einem *cell viability assay* mittels *CellTitre-Glo* Lumineszenz untersucht, um eine Affinität zum humanen Hsp90 und antileukämische Aktivität zeigen zu können.^{[152],[153]}

Falls nicht anders angegeben, sind alle angegebenen Aktivitäten Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen.

Die zellbasierten *in vitro* Assays wurden an dem Universitätsklinikum Tübingen am Institut für Tropenmedizin, Reisemedizin und Humanparasitologie in der Arbeitsgruppe von DR. JANA HELD (*Pf*3D7, *Pf*Dd2, HepG2) und am Universitätsklinikum Düsseldorf in der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie in der Arbeitsgruppe von DR. SANIL BHATIA (K562, SUP-B15) durchgeführt.

Zunächst wurde die antiplasmodiale *in vitro* Aktivität der Tripyrimidonamide **12a**, **12b**, **12f**, **12g**, **12h**, **12i** und **12n** untersucht (Tab. 2).

Tab. 2 IC₅₀-Werte der *in vitro* Zellassays mit den plasmodialen Stämmen *Pf3D7* und *PfDd2* sowie Leberkrebszelllinie HepG2 nach Behandlung mit Tripyrimidonamiden, die sich in der oberen Seitenkette unterscheiden.



#	R	<i>Pf3D7</i> IC ₅₀ [nM]	<i>PfDd2</i> IC ₅₀ [nM]	HepG2 IC ₅₀ [μM]	SI ^a HepG2/ <i>Pf3D7</i>	SI ^a HepG2/ <i>PfDd2</i>
12a (HPK163)		91 ± 8	90 ± 13	>25	>275	>278
12b (HPK165)		123 ± 17	186 ± 19	3.7 ± 2.2	30	20
12f (HPK253)		786 ± 10	796 ± 119	>25	>32	>31
12g (HPK208)		1711 ± 308	1405 ± 85	>25	>15	>18
12h (HPK231)		272 ± 90	491 ± 13	>25	>92	>51
12i (HPK306)		133 ± 1	332 ± 186	>25	>188	>75
12n^b (HPK539)		3905 ± 2666	2851 ± 1414	n.b.	-	-
LSK82		3582 ± 1325	5233 ± 2028	n.b.	-	-
LSK84		29237 ± 666	59867 ± 33995	>25	>0.85	>0.42
Chloroquin		7 ± 5	268 ± 117	>25	>3571	>93

n.b. = nicht bestimmt

^a Selektivitätsindex (SI) wurde aus dem Quotienten des IC₅₀-Wertes der HepG2- und *Pf3D7*- bzw. *PfDd2*-Messung berechnet.

^b Sec-Butylseitenkette wurde durch eine 3-*N*-Boc-propyl-Seitenkette ersetzt

Von den dargestellten Tripyrimidonamiden zeigen das Carbamat-Derivat **12a** und das Derivat **12b** mit primärer Aminogruppe die beste antiplasmodiale Aktivität dieser Substanzbibliothek in einem bis zu zweistellig-nanomolarem Bereich sowohl gegen den Chloroquin-sensitiven

Stamm *Pf3D7* (**12a**: 91 ± 8 nM, **12b**: 123 ± 17 nM) als auch den multiresistenten Stamm *PfDd2* (**12a**: 90 ± 13 nM, **12b**: 186 ± 19 nM).

Das sterisch anspruchsvollere Derivat **12f** mit *N*-Methylpiperazingruppe zeigt eine verringerte antiplasmodiale Aktivität (*Pf3D7*: 786 ± 10 nM, *PfDd2*: 796 ± 119 nM) im Vergleich zu **12a**. Die Derivate **12g** mit Mercaptotriazol- und **12h** mit Isothiuroniumbromid-Gruppe zeigen eine submikromolare (**12h**) und eine antiplasmodiale Aktivität im mikromolaren Bereich (**12g**). Der humane Hsp90-Inhibitor **LSK82** weist die geringste antiplasmodiale Aktivität im mikromolaren Bereich (*Pf3D7*: 3.6 ± 1.3 μ M, *PfDd2*: 5.2 ± 2.0 μ M) auf.

Die antiplasmodiale Aktivität von **12a** im zweistellig-nanomolaren Bereich könnte mit vergleichbaren Wasserstoffbrückeneigenschaften des Carbamats (**12a**) und der Imidazolgruppe des Histidins (H708, **Abb. 28**) erklärt werden. In der Imidazolgruppe kann eines der Stickstoffatome als H-Brückendonator und das andere als H-Brückenakzeptor fungieren. Das Wasserstoffatom des Carbamatstickstoffs (**12a**) könnte ebenfalls als Wasserstoffbrückendonator und das Carbonylsauerstoffatom des Carbamats als Wasserstoffbrückenakzeptor dienen, sodass eine Wechselwirkung zu den Aminosäuren Threonin (T692) und Asparaginsäure (D613) mittels Wasserstoffbrückenbindungen möglich wäre. Auch wenn die Tripyrimidonamide **12b**, **12f**, **12g** und **12h** ebenfalls als Wasserstoffbrückenakzeptoren und/oder -donoren mit den Aminosäuren T692 und D613 interagieren könnten, scheint die Interaktion der Carbamatgruppe in der oberen Seitenkette von **12a** mit dem Protein mittels Wasserstoffbrückenbindungen derzeit am besten zu sein.

Eine Verschiebung der 3-(Boc-amino)propylseitenkette von der oberen (**12a**) zur mittleren Position (**12n**) am Tripyrimidonamidgrundgerüst führt zu einer um Faktor 43 geringeren antiplasmodialen Aktivität in *Pf3D7* im Vergleich zum strukturverwandten Tripyrimidonamid **12a**. Dass die obere Seitenkette und das Substitutionsmuster dieser einen starken Einfluss auf die antiplasmodiale Aktivität haben, kann ferner an **LSK84** beobachtet werden, welches keine obere Seitenkettenfunktionalität hat und eine stark reduzierte antiplasmodiale Aktivität zeigt.

Die Beispiele **12n** und **LSK84** verdeutlichen, dass eine geeignet substituierte, obere Seitenkette am Tripyrimidonamidgrundgerüst essenziell für antiplasmodiale Aktivität ist.

Eine Zytotoxizität in der Leberkrebszelllinie HepG2 ist bis auf Derivat **12b** (HepG2: 3.7 ± 2.2 μ M) bei keinem der dargestellten Tripyrimidonamide innerhalb des getesteten Konzentrationsbereichs beobachtbar.

Die höchste Selektivität gegenüber den plasmodialen Stämmen *Pf3D7* und *PfDd2* zeigen von den oben beschriebenen Tripyrimidonamiden das Carbamat-Derivat **12a** (SI_{Pf3D7} : >275) und das Isothiuroniumhydrobromid **12h** (SI_{Pf3D7} : >92).

Die mögliche Affinität zum humanen Hsp90 wurde durch die inhibitorische Aktivität in den Leukämiezelllinien K562 und SUP-B15 abgeschätzt. Während das Tripyrimidonamid **12a** keine antileukämische Aktivität aufweist (K562: >25 μ M, SUP-B15: >25 μ M), zeigen die Tripyrimidonamide **12b**, **12f** und **12h** eine inhibitorische Aktivität gegen die beiden Leukämiezelllinien K562 (**12b**: 2.2 μ M, **12f**: 1.2 μ M, **12h**: 2.2 μ M) und SUP-B15 (**12b**: 2.4 μ M, **12f**: 0.6 μ M, **12h**: 2.1 μ M) im mikromolaren Bereich. Diese Aktivitäten sind teilweise mit der antileukämischen Aktivität von **LSK82** (K562: 1.3 μ M) vergleichbar und zeigen, dass die Tripyrimidonamide **12b**, **12f** und **12h** ebenfalls als mögliche humane Hsp90-Inhibitoren wirken könnten, aber keine signifikante plasmodiale Selektivität aufweisen.

Das Tripyrimidonamid **12i** mit *n*-Hexylseitenkette in oberer Position zeigt eine mit **12b** vergleichbare antiplasmodiale Aktivität im submikromolaren Bereich und keine Zytotoxizität gegenüber der Leberkrebszelllinie HepG2. Die obere Seitenkette von **12i** verfügt in Kontrast zu den vorher diskutierten Tripyrimidonamiden über keine Wasserstoffbrückenakzeptoren und -donoren, sodass die antiplasmodiale Aktivität von **12i** nicht über Wasserstoffbrücken-Wechselwirkungen erklärt werden kann. Vielmehr könnte die *n*-Hexylseitenkette durch hydrophobe Wechselwirkungen mit einer lipophilen Tasche interagieren, welche in räumlicher Nähe zu der oberen Seitenkettenposition liegen.

Die Vorstufen für die nukleophile Substitution (**12c** – **12e**) mit Alkylbromidseitenkette in oberster Position wurden ebenfalls auf antiplasmodiale Aktivität untersucht. Es ist eine Abhängigkeit der antiplasmodialen Aktivität von der Länge der Kohlenstoffseitenkette erkennbar. Je länger die Kohlenstoffseitenkette ist, desto stärker ist die antiplasmodiale Aktivität sowohl in *Pf*3D7 als auch *Pf*Dd2 (*Pf*3D7: **12c**: 2198 $\pm$ 497 nM, **12d**: 397 $\pm$ 41 nM, **12e**: 162 $\pm$ 1 nM). Das Derivat **12e** kann durch die lange und lipophile Seitenkette demnach mit **12i** verglichen werden. Dass sich dieser Trend durch weitere Verlängerung der Kohlenstoffseitenkette fortsetzt, muss mit weiteren Derivaten untersucht werden.

Eine Zytotoxizität der drei Tripyrimidonamide **12c** – **12e** gegenüber der Leberkrebszelllinie HepG2 ist nicht beobachtbar, jedoch sind diese Daten und die antiplasmodiale Aktivität aufgrund der zum Teil toxischen oder gar krebserregenden Eigenschaften von Halogenalkanen vorsichtig zu bewerten.^[154]

Die bisherigen biologischen Daten der Tripyrimidonamide mit strukturell diverser, oberer Seitenkette können die Hypothese der Proteinmodellierung, dass funktionelle Gruppen mit Wasserstoffbrückenakzeptoren und -donoren in der obersten Seitenkette der Tripyrimidonamide Affinität und Selektivität in *Pf*Hsp90 erhöht (**Abb. 28**) bestätigen. So zeigt

das Derivat **12a** eine antiplasmodiale Aktivität im zweistellig-nanomolaren Bereich und eine Selektivität von >275 gegenüber der humanen Krebszelllinie HepG2 sowie keine Zytotoxizität. Die Proteinmodellierung konnte bisher jedoch nicht die antiplasmodiale Aktivität von dem Derivat **12i** mit aliphatischer oberer Seitenkette erklären. Inwiefern die aliphatische obere Seitenkette mit einer weiteren hydrophoben Bindetasche wechselwirkt, könnte durch weitere Molekulardynamiksimulationen untersucht werden.

Derzeit stehen keine Target-basierten *Pf*Hsp90-Assays zur Verfügung, mit denen gezeigt werden könnte, dass die antiplasmodiale Aktivität der dargestellten Tripyrimidonamide auf eine Inhibierung von *Pf*Hsp90 zurückgeführt werden kann. Demnach kann noch nicht bestätigt werden, dass die dargestellten Tripyrimidonamide in dem vorhergesagten *hot-spot*-Bereich der C-terminalen Domäne mit den entsprechenden Aminosäuren interagieren (**Abb. 28**) und die Helix H5 nachahmen können.

4.3 Synthese von Tripyrimidonamiden mit vergrößerten Kopfgruppen

Im vorherigen Kapitel wurden Tripyrimidonamide mit strukturell diversen, oberen Seitenketten entwickelt, welche die erste Hypothese aus der Proteinmodellierung berücksichtigen (Kap. 2.1), dass die obere Seitenketten mit Threonin T692 oder Asparaginsäure D613 interagieren und das Histidin H708 nachahmen könnten.

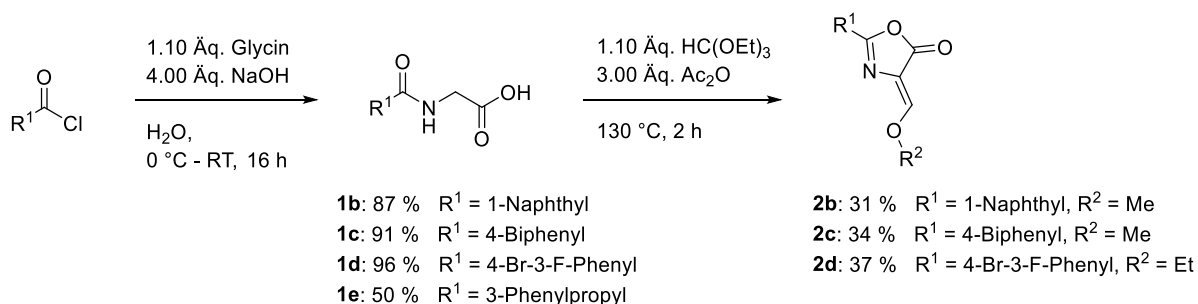
In der zweiten Hypothese der Proteinmodellierung wird postuliert, dass eine Vergrößerung der Tripyrimidonamidkopfgruppe die in *Pf*Hsp90 räumlich größere Bindetasche besser adressieren könnte.

Um den Einfluss der Tripyrimidonamid-Kopfgruppe auf die antiplasmodiale Aktivität zu untersuchen, wurden Analoga mit vergrößerter Kopfgruppe hergestellt.

Das Tripyrimidonamid **12a** zeigte die bisher beste antiplasmodiale Aktivität von den bisher dargestellten Tripyrimidonamiden sowohl gegen *Pf*3D7 (91 ± 8 nM) als auch *Pf*Dd2 (90 ± 13 nM) und keine akute Zytotoxizität gegen HepG2 (>25 μ M), daher wurde das Seitenkettensubstitutionsmuster von **12a** beibehalten und die Kopfgruppe variiert.

Zum Zeitpunkt der Synthese lagen nur Hinweise auf eine räumlich vergrößerte Bindetasche und noch keine exakten Strukturvorschläge aus den Proteinmodellierungen vor (**Schema 20**). Als Kopfgruppen wurden daher zunächst 1-Naphthyl, 4-Biphenyl, 4-Brom-3-fluorphenyl und 3-Phenylpropyl gewählt, mit denen eine verbreiterte, verlängerte, flexiblere oder halogenierte Kopfgruppe erreicht werden kann.

Die Kopfgruppen wurden bereits während der Synthese der Azlactone **2** eingeführt. Die für die Azlacton-Synthese benötigten *N*-substituierten Amidoessigsäuren **1**, wurden aus Glycin und dem entsprechend substituiertem Säurechlorid hergestellt und anschließend mit Triethylorthoformiat und Essigsäureanhydrid zu den Azlactonen **2b – 2d** umgesetzt. (**Schema 33**).

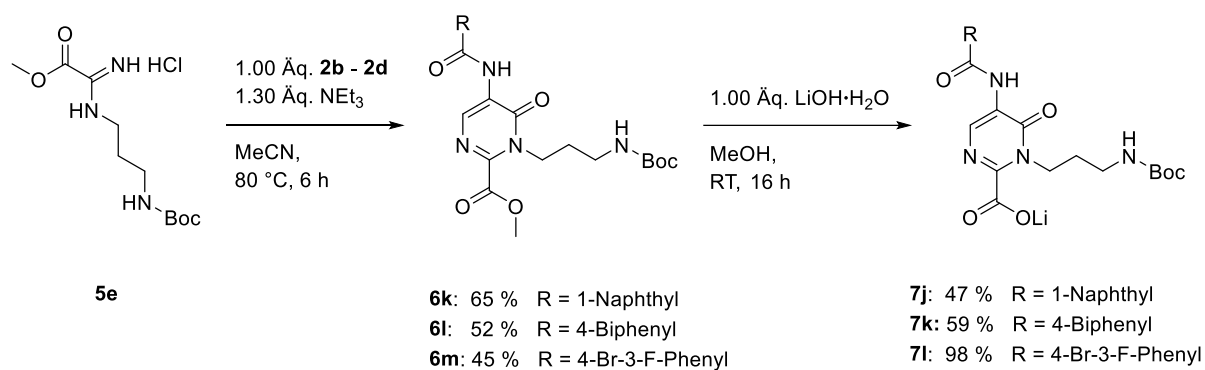


Schema 33 Darstellung der Azlactone **2b – 2d** ausgehend von Säurechloriden und Glycin.

Sowohl die 1-Naphtoyl- (**1b**) als auch 4-Biphenoyl- (**1c**) und 4-Brom-3-fluorbenzoyl- (**1d**) substituierten Amidoessigsäuren konnten erfolgreich zu den Azlactonen **2b** – **2d** umgesetzt werden. 3-Phenylpropionylglycin (**1e**) zeigte keine Bildung des entsprechenden Azlactons.

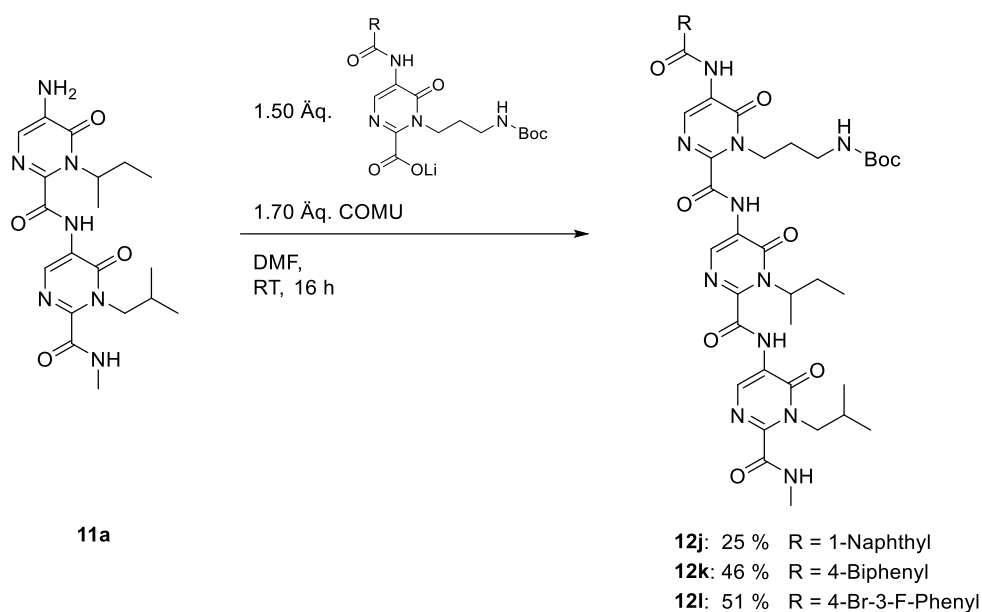
Im Falle von **2b** und **2c** erfolgte bei der Reinigung des intermediär entstandenen Ethylenolethers durch Rühren in heißem Methanol eine Substitution zum Methylenolether. Diese Substitution fand bei der Kristallisation aus *iso*-Propanol (**2d**) nicht statt.

Die Azlactone **2b** – **2d** wurden mit dem Amidinhydrochlorid **5e** zu den Pyrimidonon **6k** – **6m** umgesetzt und die Methylestergruppe anschließend mit Lithiumhydroxidmonohydrat in Methanol zu den Lithiumcarboxylaten **7j** – **7l** verseift (**Schema 34**).



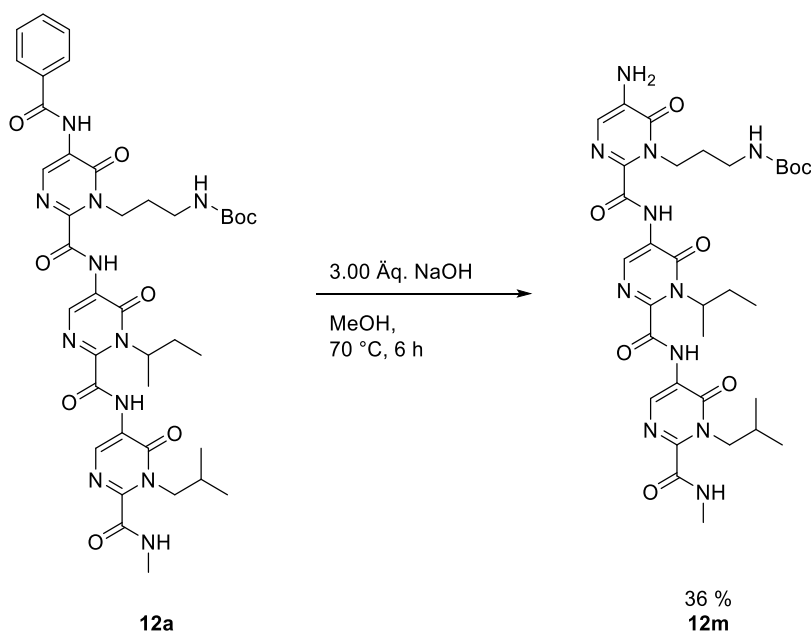
Schema 34 Darstellung von Pyrimidon-Monomeren **6k** – **6m** aus Amidinhydrochlorid **5e** und Azlactonen **2b** – **2d**. Anschließend erfolgte die Umsetzung der Estergruppe zu den Lithiumcarboxylaten **7j** – **7l**.

Die Lithiumcarboxylate **7j** – **7l** wurden sodann mit dem Enamin-Dimer **11a** in einer COMU®-vermittelten Amidkupplungsreaktion zu den Tripyrimidonamiden **12j** – **12l** gekuppelt (**Schema 35**).



Schema 35 Darstellung der Tripyrimidonamiden **12j** – **12l** ausgehend von Enamin-Dimer **11a** und Lithiumcarboxylaten **7j** – **7l**.

Ferner wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine fehlende Kopfgruppe zu einer Verringerung der Affinität zu *Pf*Hsp90 führen könnte. Daher wurde die Benzoylkopfgruppe von Tripyrimidonamid **12a** mittels basischer Hydrolyse entfernt und das Tripyrimidonamid **12m** mit einer Ausbeute von 36 % dargestellt (**Schema 36**).

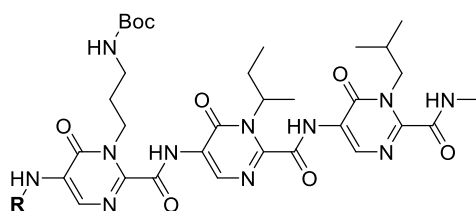


Schema 36 Entfernen der Benzoylgruppe von Tripyrimidonamid **12a** mittels basischer Hydrolyse zu Tripyrimidonamid **12m**.

4.4 Antiplasmodiale *in vitro* Aktivitäten von Tripyrimidonamiden mit vergrößerten Kopfgruppen

Die Tripyrimidonamide **12j** – **12m** mit vergrößerter oder auch fehlender Kopfgruppe wurden hinsichtlich ihrer antiplasmodialen Aktivität untersucht (**Tab. 3**).

Tab. 3 IC₅₀-Werte der *in vitro* Zellassays mit den plasmodialen Stämmen *Pf3D7* und *PfDd2* sowie Leberkrebszelllinie HepG2 nach Behandlung mit Tripyrimidonamiden **12j** – **12m**.



#	R	<i>Pf3D7</i> IC ₅₀ [nM]	<i>PfDd2</i> IC ₅₀ [nM]	HepG2 IC ₅₀ [μM]	SI HepG2/ <i>Pf3D7</i>	SI HepG2/ <i>PfDd2</i>
12a (HPK163)		91 ± 8	90 ± 13	>25	>275	>278
12j (HPK400)		374 ± 53	1405 ± 31	>25	>67	>18
12k (HPK407)		132 ± 2	408 ± 22	>25	>189	>61
12l (HPK495)		773 ± 129	1430 ± 377	n.b.	-	-
12m (HPK473)		2595 ± 1826	3701 ± 2552	>25	>10	>7
Chloroquin		7 ± 5	268 ± 117	>25	>3571	>93

n.b. = nicht bestimmt

Eine Expansion der Kopfgruppe führte bei keinem der Tripyrimidonamide **12j** – **12l** zu einer Verbesserung der antiplasmodialen Aktivität gegenüber der Leitstruktur **12a** (*Pf3D7*: 91 ± 8 nM, *PfDd2*: 90 ± 13 nM).

Während die Leitstruktur **12a** sowohl gegen den Chloroquin-sensitiven Stamm *Pf3D7* als auch Chloroquin-resistenzen Stamm *PfDd2* eine nahezu vergleichbare Aktivität aufweist, zeigt das 4-Biphenyl-Derivat **12k** gegen *Pf3D7* eine zu **12a** ähnliche (*Pf3D7*: 132 ± 2 nM) und gegen *PfDd2* um Faktor 4,5 verringerte Aktivität im Vergleich zu **12a**.

Gegen den multiresistenten Stamm *PfDd2* ist bei Derivat **12j** mit 1-Naphthyl- und bei **12l** mit 4-Brom-3-fluorphenylkopfgruppe eine reduzierte antiplasmodiale Aktivität im submikromolaren Bereich erkennbar.

Das Tripyrimidonamid **12l** mit halogensubstituierter Kopfgruppe zeigt die geringste antiplasmodiale Aktivität im einstellig mikromolaren Bereich in *Pf3D7* und *PfDd2* der untersuchten Tripyrimidonamide mit vergrößerter Kopfgruppe.

Die Tripyrimidonamide mit mono- (**12a**) und bicyclischer aromatischer Kopfgruppe (**12j**, **12k**) zeigen eine verbesserte antiplasmodiale Aktivität in *Pf3D7* und *PfDd2* im Vergleich zu **12l**.

Dass die Kopfgruppe essenziell für eine potente antiplasmodiale Aktivität ist, zeigt das Tripyrimidonamid **12m** ohne Kopfgruppe, da die antiplasmodiale Aktivität um Faktor 29 (*Pf3D7*) und um Faktor 41 (*PfDd2*) im Vergleich zu **12a** reduziert ist.

Tripyrimidonamid **12k** ist zwar geringfügig schwächer aktiv als Referenzverbindung **12a**, zeigt aber, dass im Bereich der Kopfgruppe Ansatzpunkte für weitere Strukturvariationen ist.

Durch den Einbau eines rigiden bicyclischen π -Systems (Naphthylkopfgruppe in **12j** und 1,1'-Biphenylkopfgruppe in **12k**) wird die Lipophilie des Wirkstoffs erhöht, woraus eine bessere Membranpermeabilität resultiert. Durch hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Protein kann ferner eine höhere Bindungsaffinität beobachtet werden. Jedoch kann die Löslichkeit des Wirkstoffs durch die hydrophoberen Eigenschaften in Wasser reduziert sein, sodass die Bioverfügbarkeit geringer sein könnte.

Es können in der Zukunft also weitere große Substituenten am Phenylring eingeführt werden, die zu einer verbesserten Bindungsaffinität mit dem Protein *PfHsp90* und somit verbesserten antiplasmodialen Aktivität führen könnten, jedoch müssen physikochemische Parameter, insbesondere die Lipophilie bzw. Löslichkeit der Wirkstoffe in Wasser bei der Wahl der Substituenten berücksichtigt werden.

4.5 *In vitro* PRR-Assay

Die beiden Tripyrimidonamide **12a** und **12b** mit potenter antiplasmodialer Aktivität sowohl gegen *Pf3D7* als auch *PfDd2* und geringer Zytotoxizität gegenüber Leberkrebszelllinie HepG2 (**Tab. 2**) wurden gegen zwei weitere Plasmodienstämme, dem chloroquin-sensitiven und dem zu *Pf3D7* stark verwandten Stamm *PfNF54* und dem multiresistenten Stamm *PfK1*, in der Arbeitsgruppe WITTLIN im zellbasierten *in vitro* Assay auf ihre antiplasmodiale Aktivität untersucht (**Tab. 4**).

Tab. 4 IC₅₀-Werte der *in vitro* Zellassays mit den plasmodialen Stämmen *PfNF54* und *PfK1* nach Behandlung mit Tripyrimidonamiden **12a**, **12b**, Chloroquin und Artesunat.

#	<i>PfNF54</i> IC ₅₀ [nM]	<i>PfK1</i> IC ₅₀ [nM]
12a (HPK163)	390 ± 40	581 ± 213
12b (HPK165)	340 ± 2	465 ± 21
Chloroquin	5.8 ± 1.4	170 ± 18
Artesunat	2.1 ± 0.6	1.3 ± 0.7

Im Vergleich zu den Stämmen *Pf3D7* (**12a**: 91 ± 8 nM, **12b**: 123 ± 17 nM) und *PfDd2* (**12a**: 90 ± 13 nM, **12b**: 186 ± 19 nM) ist eine etwas geringere antiplasmodiale Aktivität beobachtbar.

Die dargestellten Tripyrimidonamide wurden bisher nur hinsichtlich ihrer antiplasmodialen Aktivität untersucht. Für eine weitere Bewertung der inhibitorischen Eigenschaften ist die Abtötungsgeschwindigkeit von zentraler Bedeutung, da diese maßgeblichen Einfluss auf den Wirkmechanismus und das Risiko einer Resistenzentwicklung beeinflussen könnte.

Der *Parasite-Reduction-Ratio-Assay* (PRR-Assay) ermöglicht die quantitative Bestimmung der Abtötungsgeschwindigkeit der Parasiten unter Wirkstoffeinfluss. Werden die Parasiten innerhalb kurzer Zeit abgetötet, so deutet dies auf einen schnell-agierenden Wirkstoff und umgekehrt eine längere Abtötungszeit auf eine verzögerte Wirkung des Wirkstoffs hin. Beide Abtötungskinetiken bergen jedoch ein Risiko für Resistenzen, wenn Parasiten nicht schnell genug und vollständig getötet werden.

Die Kombination aus Wirkstoffen mit schnell-wirkenden und langsam-wirkenden Komponenten, wie es bereits bei Artemisinin-basierten Kombinationspräparaten angewendet wird, stellt daher einen effektiven Ansatz dar, sowohl eine rasche Reduzierung als auch vollständige Eliminierung der Parasitenlast zu gewährleisten. Die Bestimmung der Abtötungsgeschwindigkeit ist somit ein wesentlicher Bestandteil der präklinischen Untersuchungen von potenziellen Wirkstoffkandidaten.

Hierfür werden Parasiten einem Wirkstoff zeitlich unterschiedlich lange exponiert, die lebensfähigen Parasiten nach Herauswaschen des Wirkstoffes anschließend zu einer messbaren Kultur herangewachsen und die Anzahl der überlebensfähigen Parasiten bestimmt. Der aufwendige PRR-Assay wurde mit Tripyrimidonamid **12a** in der Arbeitsgruppe HELD durchgeführt (**Abb. 45**).^[155]

Für den Assay wurden Parasiten (*Pf3D7*) im Ringstadium mit einer Parasitämie von 0.5 % und einem Hämatokritwert von 2 % an fünf aufeinanderfolgenden Tagen (0, 24, 48, 72, 96 und 120 h) mit den jeweiligen Wirkstoffen (**Abb. 45**) versetzt. Die Wirkstoffkonzentration betrug das Zehnfache des vorher bestimmten IC_{50} -Wertes im 72 h Wachstumshemmungs-Assay. Als Referenz wurden Artesunat als schnellwirkender und Atovaquon als langsamwirkender Wirkstoff eingesetzt. Als weitere Referenz wurde Chloroquin mit mittelschneller Tötungskinetik verwendet.

Aliquote der jeweiligen Parasiten wurden von den Zellkulturen auf eine 96-Well-Plate übertragen und für 28 Tage zum Nachwachsen ruhen gelassen. Anschließend wurden die Proben mit lebensfähigen Parasiten identifiziert.

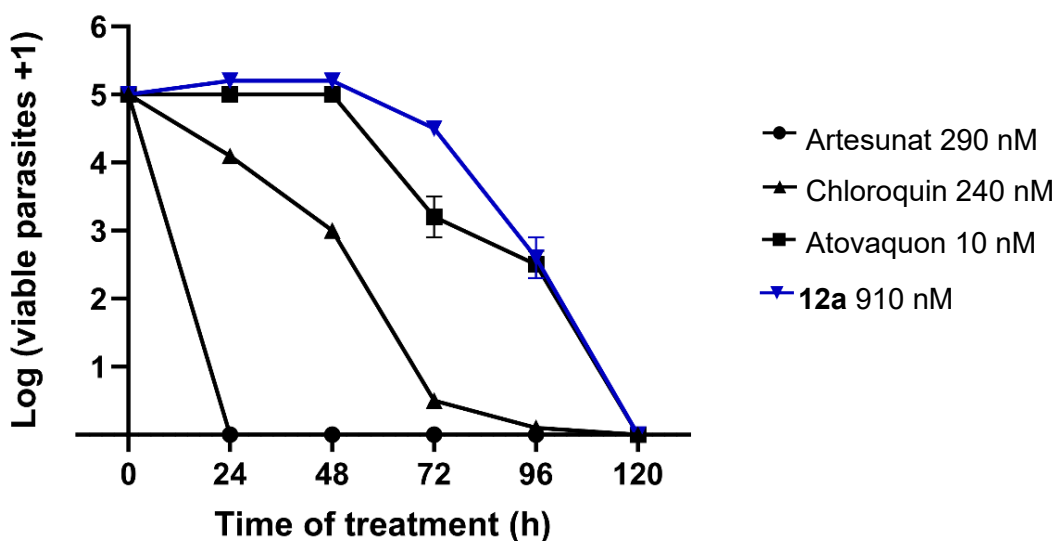


Abb. 45 Parasite-Reduction-Ratio (PRR) Assay von **12a** mit Artesunat, Chloroquin und Atovaquon als Referenz.

Aus dem PRR-Assay wird deutlich, dass das Tripyrimidonamid **12a** zu den langsam-wirkenden Wirkstoffen zählt und erst nach 120 h der Behandlung zu einer vollständigen Abtötung der lebensfähigen Parasiten führt (**Abb. 45**).

Aufgrund begrenzter Daten von bekannten *Pf*Hsp90-Inhibitoren (vgl. Kap. 1.2.2) in PRR-Assays ist ein Vergleich der Tötungskinetik mit **12a** nicht möglich. BAYIH *et al.* konnten jedoch im *P. berghei* Mausmodell zeigen, dass zwei ihrer untersuchten Harmin-Analoga (N-terminale *Pf*Hsp90-Inhibitoren) bereits nach einem Tag nach Ende der Verabreichung zu einer schwachen Verringerung der Parasitämie um 51 – 56 % sowie einer verlängerten Lebenszeit der Mäuse im Vergleich zu Harmin führten. Die Kombination der Harmin-Analoga mit Dihydroartemisinin zeigte positive synergistische Effekte, welche sich durch eine verlängerte Lebenszeit der Mäuse sowie eine geringere Parasitämie nach Behandlung mit den kombinierten Wirkstoffen im Vergleich zu den einzeln getesteten Wirkstoffen auszeichneten.^[106]

*Pf*Hsp90-Inhibitoren wirken allgemein in einem „indirekten“ Wirkmechanismus, indem die Funktion des Hitzeschockproteins 90 gehemmt und daraus resultierend für den Parasiten überlebenswichtige Proteinfaltungs- und Stabilisierungsprozesse in der Zelle destabilisiert werden, woraus der Zelltod resultieren kann. Durch diesen indirekten Wirkmechanismus wäre eine zeitlich verzögerte Wachstumshemmung durch die *Pf*Hsp90-Inhibitoren plausibel, sodass diese Inhibitoren eine langsame Tötungskinetik aufweisen könnten.

4.6 *in vivo* Untersuchungen

Neben den *in vitro* Studien wurden die Tripyrimidonamide **12a** und **12b** in Basel am Swiss Tropical and Public Health Institute in der Arbeitsgruppe von DR. SERGIO WITTLIN im *Plasmodium berghei* Mausmodell hinsichtlich der *in vivo* Aktivität untersucht.

Der *P. berghei* Parasit infiziert vor Allem Nagetiere und ist aufgrund der engen Wirtsspezifität nicht in der Lage, den Menschen zu infizieren. *P. berghei* ist jedoch in essenziellen Aspekten wie Struktur, Physiologie und Lebenszyklus denen von *P. falciparum* ähnlich, sodass zusammen mit der relativ einfachen Möglichkeit, Genveränderungen vorzunehmen, die Nagetiere als populäres Modell für experimentelle *in vivo* Studien von humanem Malaria genutzt werden können.^[156]

Die Tripyrimidonamide **12a** und **12b** wurden an jeweils drei mit *P. berghei* infizierten Mäusen verabreicht (**Tab. 5**).

Tab. 5: Untersuchung von **12a** und **12b** im *P. berghei* Mausmodell.

#	Parasitierte Erythrozyten pro 100 nach vier Tagen					Reduzierung der Parasitenlast
	Maus 1	Maus 2	Maus 3	Mittelwert	Normiert auf Kontrollgruppe	
12a (HPK163)	59,5	50,5	42	50,7	96.9 %	3 %
12b (HPK165)	46,2	49,5	52,4	49,4	94.4 %	6 %
Kontrollgruppe	48,7	54,8	53,4	52,3	-	-

P. berghei ist hierbei genetisch modifiziert (MRA-865) und exprimiert in allen Lebensstadien das grüne Biomarker-Fluoreszenzprotein GFP (engl. *green fluorescent protein*). Die Mutation hat keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit und Infektiosität.

Die Wirkstoffdosis betrug 4 x 50 mg/kg und wurde peroral als Suspension in Wasser mit 0.01 mL pro Gramm Mausgewicht verabreicht.

Eine Analyse der infizierten Erythrozyten wurde vier Tage nach der peroralen Applikation durchgeführt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigen die untersuchten Tripyrimidonamide keine signifikante Reduzierung der parasitierten Erythrozyten (**12a**: Reduzierung um 3 % und **12b**: Reduzierung um 6 %) in jeder der drei untersuchten Mäuse.

In vergleichbaren Untersuchungen zeigt Chloroquin mit einer fünffach-geringeren Dosis von 4 x 10 mg/kg eine fast vollständige Reduzierung der Parasitämie (Reduzierung um 99.9 %), sowie eine Überlebenszeit der Mäuse von ca. 16 Tagen.

Bereits in den *in vitro* Untersuchungen der Tripyrimidonamide **12a** – **12m** konnten Aktivitätsunterschiede zwischen den paralogen Plasmodienstämmen *Pf3D7* und *PfDd2* beobachtet werden (vgl. **Tab. 2** und **Tab. 3**). Die sehr geringe *in vivo* Aktivität der Tripyrimidonamide **12a** und **12b** könnte demnach durch speziesabhängige Unterschiede in den Gensequenzen der homologen zytosolischen Hsp90 von *P. falciparum* und *P. berghei* (*PbHsp90*) erklärt werden. Insbesondere der *hot-spot*-Bereich in der C-terminalen Domäne von Hsp90 (s. **Abb. 28**) könnte in *PbHsp90* zu *PfHsp90* unterschiedliche Aminosäureseitenketten aufweisen, sodass der *hot-spot*-Bereich von den Tripyrimidonamiden **12a** – **12m** nicht adressiert wird bzw. diese weniger Affinität zu diesem Bereich im Vergleich zu *PfHsp90* aufweisen.

Zur Untersuchung von speziesabhängigen Effekten (hier am Beispiel von *PbHsp90* und *PfHsp90*) kann das *Plasmodium falciparum* SCID-Mausmodell (engl. *Severe combined immunodeficiency*) verwendet werden, bei welchem Mäuse eine genetische Immundefizienz haben. Durch das Fehlen von funktionellen T- und B-Lymphozyten ist es für die Mäuse erschwert, eine adaptive Immunantwort zu entwickeln, sodass menschliche Erythrozyten oder Leberzellen in die Maus transfundiert werden und die parasitäre Entwicklung des humanpathogenen *P. falciparum* untersucht werden kann, ohne, dass diese Zellen vom Immunsystem der Maus abgestoßen werden. Durch die Untersuchung von menschlichen Zellen oder Genen in Tierversuchen zählt das SCID-Mausmodell daher zu den wertvollen aber gleichzeitig auch kostenintensiveren Untersuchungen.^[157]

In Kontrast zu den *in vitro* Studien ist in den *in vivo* Studien die gesamte physiologische Komplexität des Organismus zu berücksichtigen, d.h. die Wirksamkeit der Wirkstoffe kann durch diese biologischen Prozesse beeinflusst werden. Inwiefern sich der Wirkstoff im Körper des Organismus verhält, kann mit den pharmakokinetischen Parametern Absorption (Aufnahme des Wirkstoffs in den Blutkreislauf nach Verabreichung), Distribution (Verteilung des Wirkstoffs von der Blutbahn zum Ziel), Metabolismus (Chemische Umwandlung des Wirkstoffs) und Eliminierung (Ausscheidung des Wirkstoffs und der Metabolite aus dem Körper) beschrieben werden.^[158]

Die physikochemischen Eigenschaften eines Wirkstoffs (u.a. Wasserlöslichkeit, Lipophilie, chemische Stabilität, Molekülmasse und Ionisierbarkeit) haben einen maßgebenden Einfluss auf die Absorption und Verteilung im Organismus. Beispielsweise können lipophilere Wirkstoffe (und in nicht-ionisierter Form) die Zellmembranen besser diffundieren als wasserlöslichere Wirkstoffe, jedoch kann die Bioverfügbarkeit aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit verringert sein.^[158] So könnte bei **12b** vermutet werden, dass die Permeabilität durch die

primäre Aminogruppe in der oberen Seitenkette verringert und die Wasserlöslichkeit erhöht sein könnte oder auch die Kristallisation von **12a** aus dem protischem Lösungsmittel Methanol ein Indiz für eine schlechte Wasserlöslichkeit sein. Daher ist die gezielte Abstimmung der physikochemischen Eigenschaften eines Wirkstoffs entscheidend für ein günstiges pharmakokinetisches Profil, woraus eine ausreichende Bioverfügbarkeit und effektive therapeutische Wirksamkeit resultiert.

Zusammengefasst konnten in den bisherigen *in vitro* und *in vivo* Studien der Tripyrimidonamide **12a** – **12m** zwar Derivate mit potenter antiplasmodialen *in vitro* Aktivität gegenüber verschiedenen plasmodialen Stämmen und keiner Zytotoxizität gegenüber der Leberkrebszelllinie HepG2 identifiziert werden, die jedoch im *P. berghei* Mausmodell keine Antimalaria-Aktivität zeigten. Ferner wurden im PRR-Assay in Kontrast zum zeitlich schnellwirkenden Artesunat eine zeitlich langsame Tötungskinetik beobachtet.

WOLOSCHIN demonstrierte, dass die Wasserlöslichkeit der Tripyrimidonamide durch die Einführung eines basischen Substituenten in der Fußgruppe oder das Entfernen der Kopfgruppe verbessert werden konnte. Ferner konnte WOLOSCHIN durch eine Reduzierung der Struktur- und Synthesekomplexität von den Tripyrimidon- zu den Bipyrimidonamiden Derivate herstellen, die eine gleiche oder bessere antileukämische *in vitro* Aktivität wie die Tripyrimidonamide aufweisen und durch verbesserte physikochemische Eigenschaften antileukämische Eigenschaften *in vivo* zeigen. ^[146]

4.7 Entwicklung von Bipyrimidonamiden mit antiplasmodialer Aktivität

Mit Blick auf die fehlende antiplasmodiale *in vivo* Aktivität der Tripyrimidonamide **12a** und **12b** (vgl. Kap. 4.5) ist die Verringerung der Strukturkomplexität eine mögliche Strategie, physikochemische Eigenschaften zu verbessern und ein günstigeres pharmakokinetisches Profil zu erzielen. Daher wird im folgenden Kapitel der Fokus auf die Synthese von Bipyrimidonamiden gelegt, die sich durch strukturell diverse Kopfgruppen, Seitenketten und Fußgruppen unterscheiden, mit denen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen aufgestellt werden können.

Tripyrimidonamid **12a** wurde in der Entwicklung der Bipyrimidonamide als neue Leitstruktur gewählt, da es die bisher stärkste antiplasmodiale Aktivität (*Pf*3D7: 91 ± 8 nM, *Pf*Dd2: 90 ± 13 nM) und keine akute Zytotoxizität (HepG2: >25 μ M) aufweist (**Abb. 46**).

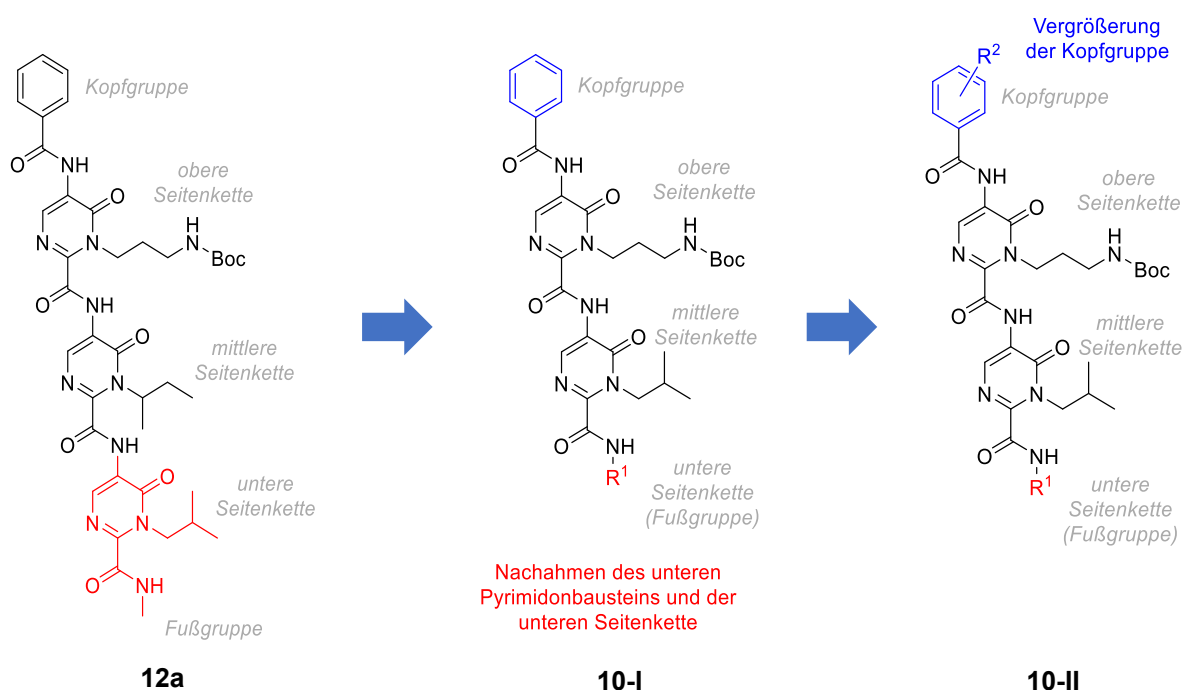


Abb. 46 Entwicklungsstufen der Bipyrimidonamide ausgehend von Tripyrimidonamid **12a** als Leitstruktur. Durch das Entfernen des untersten Pyrimidonbausteins von **12a** hin zu Bipyrimidonamiden **10-I** wird die Molekülkomplexität verringert. Modifizierung der Kopfgruppe hin zu **10-II** erhöht Spezifität und Affinität in *Pf*Hsp90 durch optimale Ausnutzung der in *Pf*Hsp90 vergrößerten Bindetasche.

In dem Liganden-Docking wurde vorhergesagt, dass Liganden, welche einen Kompromiss aus Wechselwirkung der Kopfgruppe mit der in *Pf*Hsp90 vergrößerten Bindetasche und einer Wechselwirkung der Seitenketten mit der Helix H4' einhergehen (**Abb. 38**, Gruppe **BT-H4'**),

eine optimale Grundlage darstellen, Affinität zu *Pf*Hsp90 durch räumliche Vergrößerung der Kopfgruppe und Anpassung der Seitenketten aufzubauen.

Durch die zur Bindetasche hin verschobene Position der Liganden (Gruppe **BT-H4'**) kann der Einfluss des unteren Pyrimidonfragments (Isobutyl-Seitenkette in **12a**) auf die antiplasmodiale Aktivität aufgrund der verringerten Wechselwirkung mit der Helix H4' in Frage gestellt werden. Für die Entwicklung von Bipyrimidonamiden wird in einem ersten Schritt daher der untere Pyrimidonbaustein von Tripyrimidonamid **12a** hin zu Bipyrimidonamid **10-I** entfernt. Mit strukturell diverser unterer Seitenkette (Fußgruppe, R¹) in **10-I** wurde die Seitenkette dieses Bausteins nachgeahmt, um den Einfluss der Fußgruppe (R¹) auf die antiplasmodiale Aktivität bestimmen zu können

Da für die Bipyrimidonamide keine computerunterstützten Vorhersagen durch Cluster- und Liganden-Docking vorlagen, wurden neben dem Einfluss einer unteren Seitenkette (Fußgruppe, R¹) das Vertauschen der oberen und mittleren Seitenkettenposition auf die antiplasmodiale Aktivität untersucht.

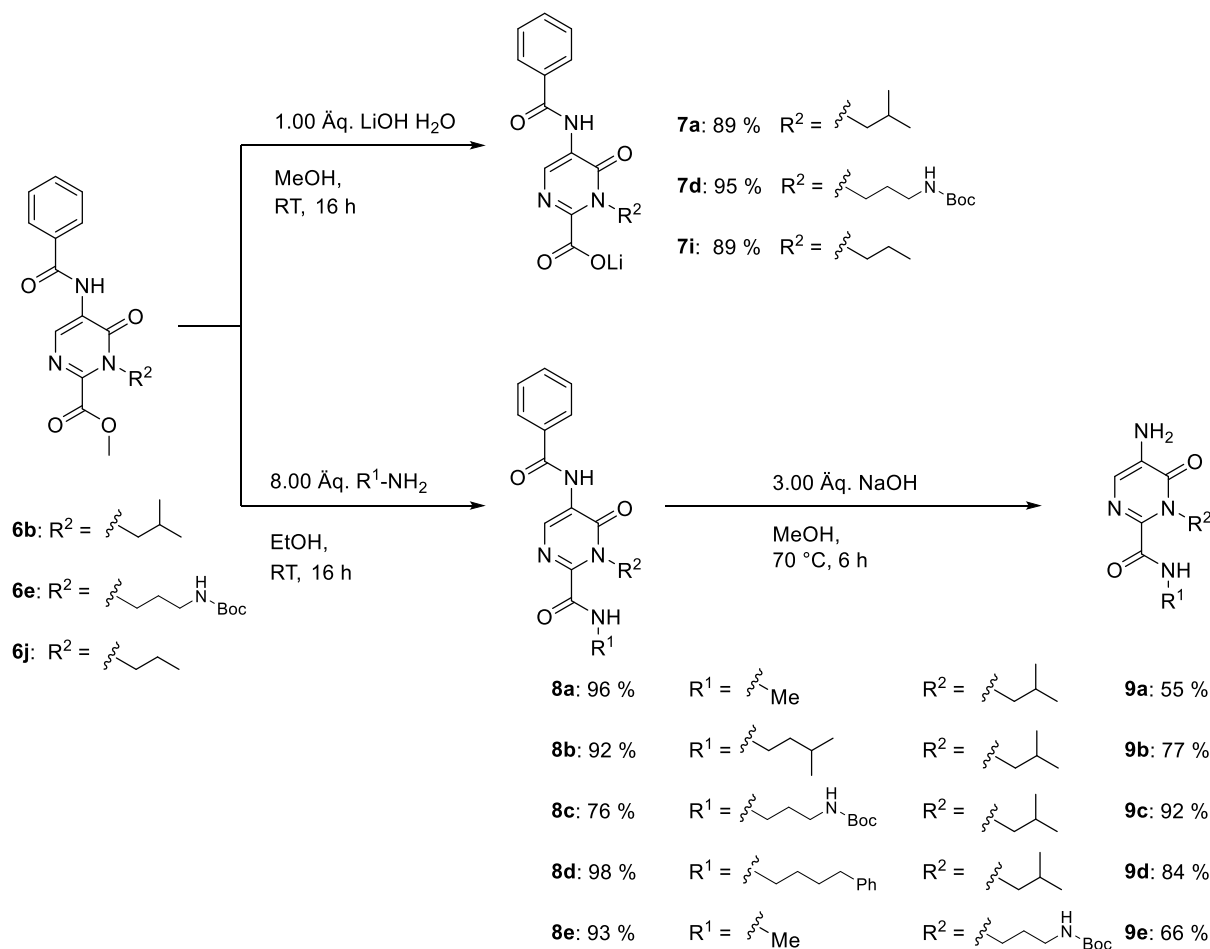
Nach Variierung der unteren Seitenkette (bzw. Fußgruppe R¹) sowie auch oberen und mittleren Seitenkette der Bipyrimidonamide zunächst mit Benzoylkopfgruppe, wurde in einem nächsten Schritt die Kopfgruppe ausgewählter Bipyrimidonamide **10-I** mit potenter antiplasmodialer Aktivität basierend auf den Vorhersagen aus dem Liganden-Docking (**Abb. 38**) modifiziert. Mit einer optimalen Ausnutzung der in *Pf*Hsp90 vergrößerten Bindetasche könnte Spezifität und Affinität in *Pf*Hsp90 erhöht werden.

4.8 Synthese von Bipyrimidonamiden mit Benzoylkopfgruppe

Für die Entwicklung der Bipyrimidonamide, zunächst mit Benzoylkopfgruppe, wurden sowohl die Fußgruppe als auch die Position der Seitenketten variiert. Der Einfluss der oberen Seitenkette auf die antiplasmodiale Aktivität wurde durch Einführung einer 3-(Boc-amino)propyl- (vgl. **12a**), *n*-Hexyl- (vgl. **12i**) und *n*-Propylkette untersucht.

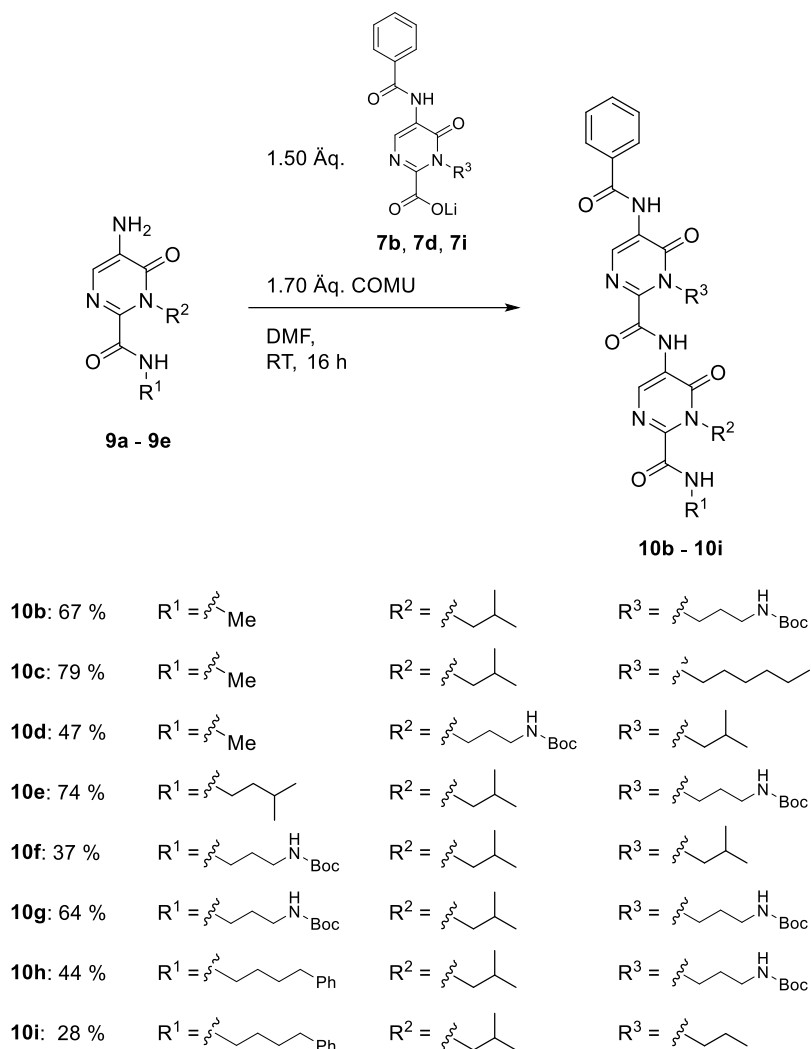
Enantiomere eines Wirkstoffes können aufgrund der räumlichen Strukturunterschiede durch Stereozentren unterschiedliche Aktivitäten zeigen. Daher wird die stereogene *sec*-Butylgruppe (mittlere Seitenkette in **12a**) durch die Isobutylgruppe ersetzt, um mögliche antiplasmodiale Aktivitätsunterschiede durch Enantiomere ausschließen zu können.

Die Synthese der Bipyrimidonamide **10b** – **10i** mit Benzoylkopfgruppe erfolgte ausgehend von den drei Pyrimidon-Monomeren mit Isobutyl- (**6b**), **6e** 3-(Boc-amino)propylseitenkette (**6e**) und *n*-Propylseitenkette (**6j**), die je nach Position am Bipyrimidongrundgerüst zu den Enaminen **9a** – **9e** (Schema 36, unten) und zu den Lithiumcarboxylaten **7a**, **7d** und **7i** umgesetzt wurden (Schema 37, oben).



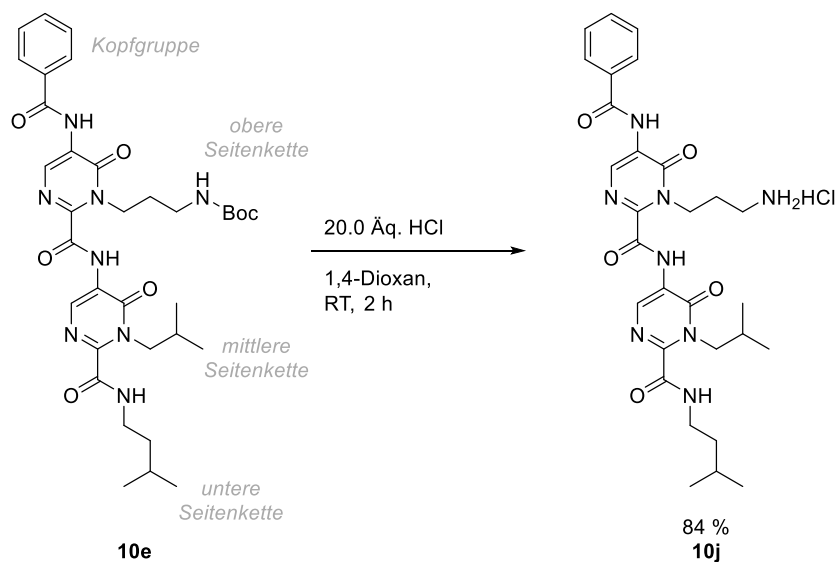
Schema 37 Synthese von Enamin-Monomeren **9a** – **9e** und Lithiumcarboxylaten **7a**, **7d** und **7i** ausgehend von Pyrimidon-Monomeren **6b**, **6e** und **6j**.

Die Lithiumcarboxylate **7a**, **7d**, **7i** und die Enamine **9a – 9e** wurden anschließend in einer COMU®-vermittelten Amidkupplungsreaktion zu den Bipyrimidonamiden **10b – 10i** umgesetzt (**Schema 38**).



Schema 38 Darstellung der Bipyrimidonamide **10b – 10i**.

Bipyrimidonamid **10j** wurde aus **10e** durch Entfernen der Enaminschutzgruppe in saurem Milieu dargestellt (**Schema 39**).

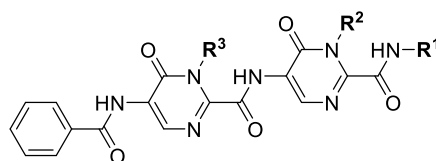


Schema 39 Darstellung von Bipyrimidonamid **10j** aus **10e**.

4.9 Biologische Evaluation der Bipyrimidonamide mit Benzoylkopfgruppe

Die Bipyrimidonamide **10b** – **10j** wurden hinsichtlich ihrer antiplasmodialen Aktivität gegen die Plasmodienstämme *Pf3D7* und *PfDd2* sowie hinsichtlich der Zytotoxizität gegenüber der Leberkrebszelllinie HepG2 untersucht (Tab. 6).

Tab. 6 IC₅₀-Werte der *in vitro* Zellassays mit den plasmodialen Stämmen *Pf3D7* und *PfDd2* sowie Leberkrebszelllinie HepG2 nach Behandlung mit Bipyrimidonamiden **10b** – **10j**.



#	R ¹	R ²	R ³	<i>Pf3D7</i> IC ₅₀ [nM]	<i>PfDd2</i> IC ₅₀ [nM]	HepG2 IC ₅₀ [μM]	SI HepG2/ <i>Pf3D7</i>	SI HepG2/ <i>PfDd2</i>
10b (HPK414)	Me	CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH-Boc	7837 ± 365	9138 ± 1018	>25	>3.2	>2.7
10c (HPK524)	Me	CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	27588 ± 2124	21435 ± 2929	>25	>0.9	>1.2
10d (HPK470)	Me	CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH-Boc	5738 ± 252	6983 ± 322	>25	>4.4	>3.6
10e (HPK454)	CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH-Boc	1285 ± 126	2623 ± 543	19.1 ± 4.5	14.8	7.3
10f (HPK535)	CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH-Boc	CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	1072 ± 366	1222 ± 200	>25	>23.3	>20.5
10g (HPK536)	CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH-Boc	CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH-Boc	2239 ± 190	1738 ± 94	>25	>11.2	>14.4
10h (HPK598)	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ Ph	CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH-Boc	595 ± 34	662 ± 14	>25	>42.0	>37.8
10i (HPK604)	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ Ph	CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	3956 ± 122	3341 ± 112	>25	>6.3	>7.5
10j (HPK484)	CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂ HCl	1758 ± 182	2121 ± 63	6.8 ± 0.05	3.9	3.2
12a (HPK163)	CH ₃	CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH-Boc	91 ± 8	90 ± 13	>25	>275	>278

n.b. = nicht bestimmt

Bipyrimidonamid **10b**, bei dem im Vergleich zu Tripyrimidonamid **12a** (IC₅₀ *Pf3D7*: 91 ± 8 nM) der unterste Pyrimidon-Baustein von **12a** durch eine Methylfußgruppe (R¹) ersetzt wurde, führt

zu einer starken Verringerung der antiplasmodialen Aktivität um Faktor 86 gegen *Pf*3D7 und Faktor 100 gegen *Pf*Dd2. Der untere Pyrimidonbaustein von **12a** mit Isobutylseitenkette hat demnach einen signifikanten Einfluss auf die antiplasmodiale Aktivität.

Ein Vertauschen der oberen und unteren Seitenkettenpositionen R² und R³ von Bipyrimidonamid **10b** hin zu **10d** führt zu einer ähnlich schwachen Aktivität gegen *Pf*3D7 als auch *Pf*Dd2.

Während bei dem Tripyrimidonamid **12i** mit *n*-Hexylseitenkette in oberer Position eine submikromolare antiplasmodiale Aktivität zu beobachten ist (IC₅₀ *Pf*3D7: 133 ± 1 nM), zeigt Bipyrimidonamid **10c** mit *n*-Hexylseitenkette in oberer Position (R³) keine antiplasmodiale Aktivität sowohl gegenüber *Pf*3D7 als auch *Pf*Dd2 (IC₅₀ >20 µM). Die Verringerung der antiplasmodialen Aktivität im Vergleich zu Tripyrimidonamid **12i** könnte sowohl auf das fehlende dritte Pyrimidonfragment (wie auch bei **12a** zu **10b**) als auch eine veränderte Konformation des Bipyrimidonamids zurückgeführt werden, bei der die *n*-Hexylseitenkette von **10c** nicht die gleiche Position wie die *n*-Hexylseitenkette von **12i** auf der Proteinoberfläche einnimmt und im Falle von **10c** weniger mit dem Protein wechselwirkt.

Die Bipyrimidonamide mit verlängerter 3-(Boc-amino)propyl- (**10g**), Isopentyl- (**10e**) und *n*-Phenylbutylfußgruppe (**10h**) weisen eine Verbesserung der antiplasmodialen Aktivität um Faktor vier (**10g**, 2239 ± 190 nM), Faktor sechs (**10e**, 1285 ± 126 nM) und Faktor 13 (**10h**, 595 ± 34 nM) im Vergleich zu **10b** mit Methylfußgruppe gegen *Pf*3D7 und *Pf*Dd2 auf. Eine Verlängerung der Fußgruppe (R¹) mit lipophilen Resten hat dabei den größten Einfluss auf die antiplasmodiale Aktivität und könnte auf vermehrt hydrophobe Wechselwirkungen der Fußgruppe mit der Proteinoberfläche hinweisen. So zeigt das Bipyrimidonamid **10h** die stärkste beobachtete antiplasmodiale Aktivität der dargestellten Bipyrimidonamide **10b** – **10j** im submikromolaren Bereich. Während **10e** mit Isopentylfußgruppe gegen *Pf*3D7 eine bessere antiplasmodiale Aktivität als **10g** mit 3-(Boc-amino)propylfußgruppe zeigt, ist ein inverses Verhalten der Aktivität gegen *Pf*Dd2 beobachtbar (**10e**: 2623 ± 543 nM, **10g**: 1738 ± 94 nM).

Aus den bisherigen Untersuchungen kann für die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen abgeleitet werden, dass je größer und lipophiler die Fußgruppe (R¹) der Bipyrimidonamide, desto höher ist die antiplasmodiale Aktivität. Eine stark lipophile Fußgruppe kann jedoch zu einer verringerten Wasserlöslichkeit führen. Ein Gleichgewicht aus Wasserlöslichkeit und Lipophilie des Wirkstoffs ist entscheidend für günstige pharmakokinetische Eigenschaften.

Das Bipyrimidonamid **10j** mit primärer aliphatischer Aminogruppe in der oberen Seitenkette weist eine geringere antiplasmodiale Aktivität im einstellig-mikromolaren Bereich als das Boc-geschützte Amin (**10e**) auf. Diese Aktivitätsverringering wurde ebenfalls bei den

Tripyrimidonamiden **12a** und **12b** (Kap. 4.2) beobachtet, bei denen analog zu **10j** und **10e** die Amin-Schutzgruppe (**12a**) entfernt und zum primären Amin (**12b**) umgesetzt wurde.

Die beiden Bipyrimidonamide **10e** und **10f** unterscheiden sich in den beiden oberen und unteren Seitenketten R^2 und R^3 sowie der Fußgruppe R^1 so, dass diese ein inverses Substitutionsmuster zueinander aufweisen. So stellt die 3-(Boc-amino)propylgruppe in **10e** die obere Seitenkette und in **10f** die Fußgruppe dar. Die Bipyrimidonamide **10e** und **10f** zeigen eine vergleichbare antiplasmodiale Aktivität gegen *Pf*3D7 im einstellig-mikromolaren Bereich und **10f** eine Verbesserung der Aktivität um Faktor zwei gegenüber *Pf*Dd2 (**10e**: 2623 ± 543 nM, **10f**: 1222 ± 200 nM) im Vergleich zu **10e**. Der antiplasmodiale Aktivitätsunterschied gegen *Pf*Dd2 könnte durch eine zueinander inverse Konformation der Bipyrimidonamide in dem *hot-spot*-Bereich von *Pf*Hsp90 erklärt werden.

Wird die obere 3-(Boc-amino)propylseitenkette (**10h**, R^3) gegen eine *n*-Propylseitenkette (**10i**) ausgetauscht, führt dies zu einer um rund sechsfachen Verringerung der antiplasmodialen Aktivität sowohl gegen *Pf*3D7 als auch gegen *Pf*Dd2. Dies zeigt erneut, dass die Wahl der oberen Seitenkette (R^3) essenziellen Einfluss auf die antiplasmodiale Aktivität hat.

Die biologischen Daten zeigen, dass mit der 3-(Boc-amino)propyl- und Isobutylgruppe als Seitenketten R^2 und R^3 (Tab. 6) nicht nur mit einem Tri- (**12a**), sondern auch Bipyrimidonamidgrundgerüst eine submikromolare antiplasmodiale Aktivität erreicht werden kann. Im Vergleich mit der Tripyrimidonamid-Leitstruktur **12a** zeigt jedoch keines der dargestellten Bipyrimidonamide **10b** – **10j** eine verbesserte antiplasmodiale Aktivität sowohl gegen *Pf*3D7 als auch *Pf*Dd2. Die antiplasmodiale Aktivität der Bipyrimidonamide kann insbesondere durch eine Verlängerung der Fußgruppe R^1 (**10e** – **10j**) um bis zu Faktor 14 im Vergleich zum Bipyrimidonamid **10b** mit Methylfußgruppe verbessert werden, wobei Verbindungen mit lipophilen Resten (**10h**) im Gegensatz zu polar neutralen Resten (**10g**) eine stärkere antiplasmodiale Aktivität aufweisen. Eine Zytotoxizität in HepG2-Zellen ist bei den beiden Bipyrimidonamiden **10f** und **10h** nicht beobachtbar.

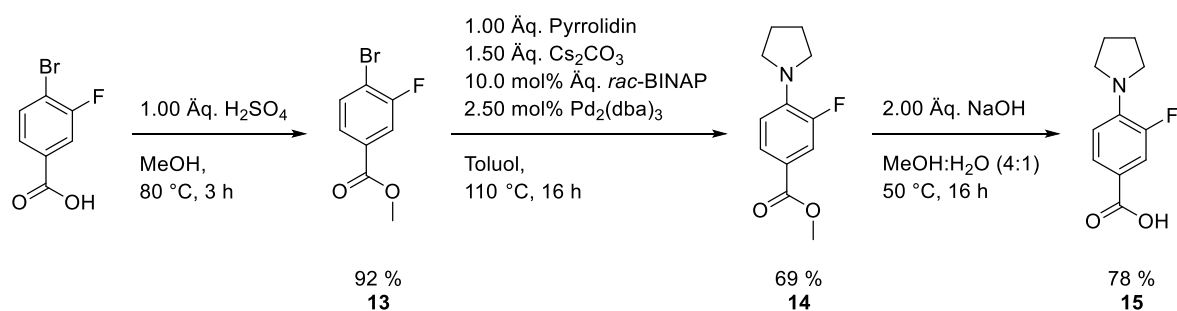
4.10 Synthese von Bipyrimidonamiden mit modifizierter Kopfgruppe

Neben der Veränderung der Fußgruppe R^1 (**Abb. 46**), deren Vergrößerung mit lipophilen Gruppen zu einer signifikanten Verbesserung der antiplasmodialen Aktivität im Vergleich zur Methylfußgruppe (**10b**) in Bipyrimidonamiden führt (**10e** und **10h**), wird im Folgenden die Kopfgruppe basierend auf den Vorhersagen aus dem Cluster- und Liganden-Docking (Kap. 2.1, **Abb. 38**) modifiziert.

Eine Modifizierung der Kopfgruppe konnte bereits bei den Tripyrimidonamiden **12j** – **12l** durch Einführung neuer *N*-substituierter Amidoessigsäuren **1** während der Synthese der Azlactone erfolgreich demonstriert werden (Kap. 4.3). Neben der Limitierung der Substituenten durch eine zu geringe Reaktivität der eingesetzten Hippursäuren hin zu den Azlactonen (**Schema 33**) ist durch das frühzeitige Einführen der Substituenten eine Vielzahl an Syntheseschritten und Pyrimidon-Bausteinen notwendig, sodass alternative Synthesewege zur Darstellung von Bipyrimidonamiden mit modifizierter Kopfgruppe entwickelt werden sollten.

Die Modifizierung der Kopfgruppe wurde an Bipyrimidonamid **10e** mit Isopentyl-Fußgruppe durchgeführt. Zwar weist Bipyrimidonamid **10h** mit *n*-Phenylbutylfußgruppe eine höhere antiplasmodiale Aktivität im Vergleich zu **10e** auf, jedoch standen zum Zeitpunkt der Synthese die biologischen *in vitro* Daten von **10h** noch nicht zur Verfügung.

Als Kopfgruppen wurden im Cluster-Docking drei Carbonsäuren identifiziert, welche die Bindetasche in PfHsp90 optimal ausnutzen könnten (**Abb. 38**). Die 3-Fluor-4-pyrrolidinobenzoessäure **15** wurde aufgrund geringerer Synthesekomplexität im Vergleich zu den beiden anderen aromatischen Carbonsäuren mit Pyridinring oder Sulfonylgruppe (**Abb. 38**) gewählt. Die Darstellung der Benzoessäure **15** erfolgte in einer dreistufigen Synthese ausgehend von 4-Brom-3-Fluorbenzoessäure (**Schema 40**).^[159]



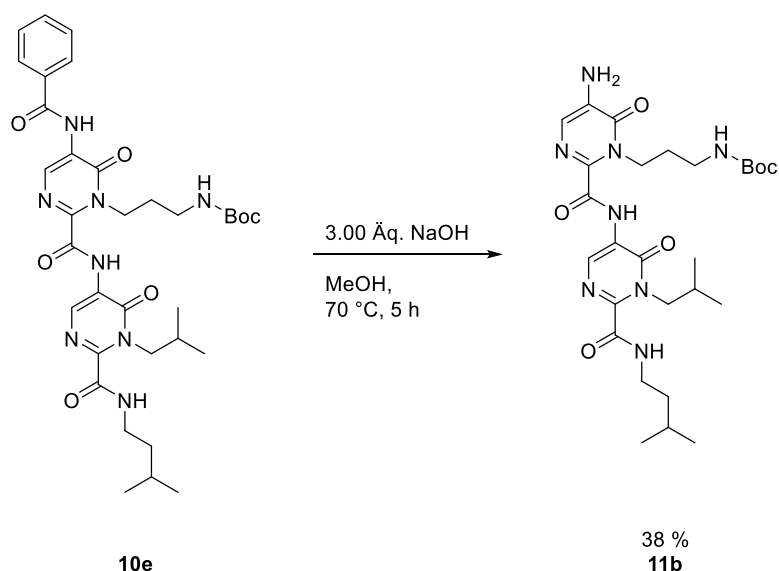
Schema 40 Darstellung von 3-Fluor-4-pyrrolidinylbenzoessäure **15** ausgehend von 4-Brom-3-fluorbenzoessäure.^[159]

Zentraler Reaktionsschritt in der Synthese von **15** ist der Einbau des Pyrrolidinsubstituenten mittels Palladium-katalysierter BUCHWALD-HARTWIG-Kupplung, mit der eine C-N-Bindung zwischen Arylhalogenid und einem primären oder sekundären Amin geknüpft werden kann.^[160]

Zunächst wurde die Carbonsäuregruppe der 4-Brom-3-fluorbenzoesäure in einer sauren FISCHER-Veresterung mit Schwefelsäure in Methanol als Methylester **13** geschützt. Zwar sind Methoden bekannt, die eine BUCHWALD-HARTWIG-Kupplung in Anwesenheit einer Carboxygruppe ermöglichen, jedoch reduziert eine Schützung der Carbonsäuregruppe als Methylestergruppe den Reinigungsaufwand und mögliche Nebenreaktionen in den Folgeschritten.^[161]

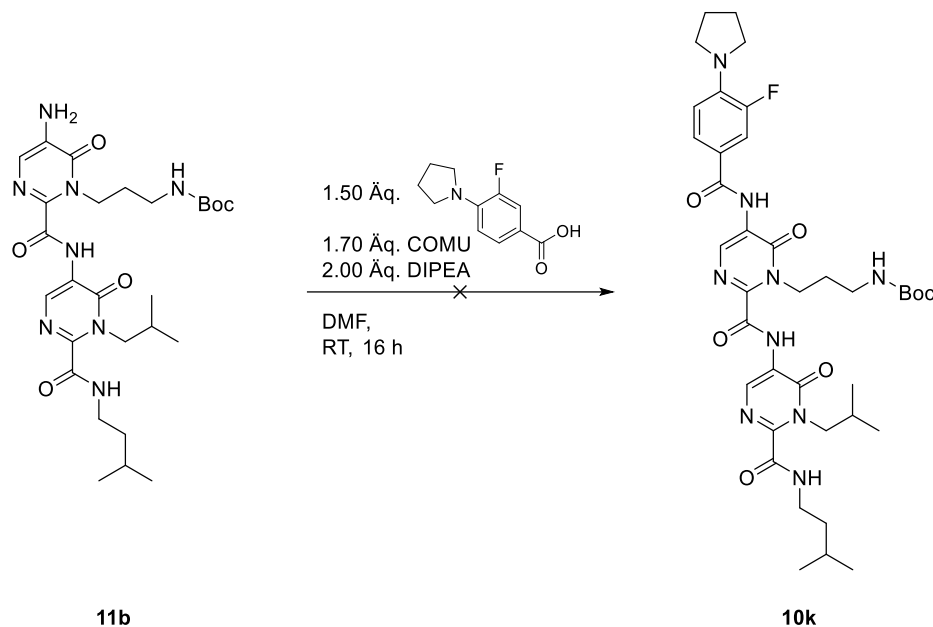
Das Arylhalogenid **13** wurde anschließend in einer BUCHWALD-HARTWIG-Kupplungsreaktion mit äquimolarer Menge Pyrrolidin, katalytischen Mengen $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ als Katalysator und racemischem ($\pm$)-2,2'-Bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl (BINAP) als Ligand sowie Cäsiumcarbonat als Hilfsbase in Toluol bei 110 °C zu **14** umgesetzt und in einer Ausbeute von 69 % dargestellt. Die Freisetzung zur Carbonsäure **15** erfolgte durch basische Hydrolyse von **14** mit Natriumhydroxid in methanolisch-wässriger Lösung und anschließendem Ansäuern mit konz. Salzsäure.^[159]

Die Benzoylgruppe des Bipyrimidonamids **10e** wurde durch basische Hydrolyse mit methanolischer Natriumhydroxid-Lösung entfernt und das Enamin-Dimer **11b** nach säulenchromatografischer Reinigung mit einer Ausbeute von 38 % isoliert (**Schema 41**).



Schema 41 Synthese von Enamin-Dimer **11b** aus Bipyrimidonamid **10e** mittels basischer Hydrolyse.

Das Enamin-Dimer **11b** wurde anschließend mit der 3-Fluor-4-pyrrolidinobenzoessäure **15** in einer COMU®-vermittelten Amidkupplungsreaktion zu Bipyrimidonamid **10k** mit modifizierter Kopfgruppe versucht, umzusetzen (**Schema 42**).



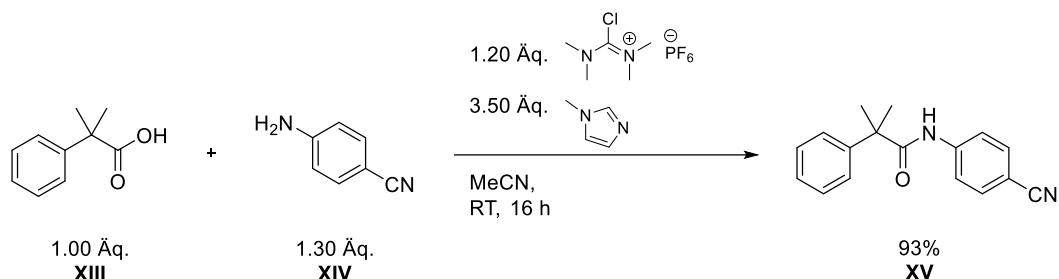
Schema 42 Amidkupplungsreaktion von Enamin-Dimer **11b** mit Carbonsäure **15** zu Bipyrimidonamid

Während die Lithiumcarboxylate **7a** – **7l** bereits mit deprotonierter Carboxylgruppe eingesetzt werden konnten, wurde die substituierte Benzoessäure **15** zunächst mit 2.00 Äq. Diisopropylethylamin (DIPEA) als Hilfsbase in Dimethylformamid deprotoniert. Nach Zugabe des Kupplungsreagenz COMU® und dem Enamin-Dimer **11b** konnte nach 16 h Reaktionszeit bei Raumtemperatur kein Umsatz von **11b** in der HPLC beobachtet werden. Der Reaktionsansatz wurde mit HATU als Kupplungsreagenz wiederholt, jedoch konnte auch hier kein Umsatz von **11b** zum Bipyrimidonamid **10k** beobachtet werden.

Eine Reaktion der substituierten Benzoessäure **15** mit den Kupplungsreagenzien COMU® oder HATU findet durch eine Gelbfärbung der Reaktionslösung statt. Herausforderung bei der Amidkupplungsreaktion von **11b** mit **15** könnte die geringe Nukleophilie des Enamin-Dimers **11b** sein, die auf die elektronenziehende Eigenschaft der Pyrimidonringe zurückgeführt werden kann.

BEUTNER *et al.* untersuchten Amidkupplungsreaktionen, bei denen die sterisch gehinderte 2-Methylphenylpropansäure (**XIII**) mit dem elektronenarmen 4-Aminobenzonitril (**XIV**) zum Amid **XV** umgesetzt wurden (**Schema 43**).^[162]

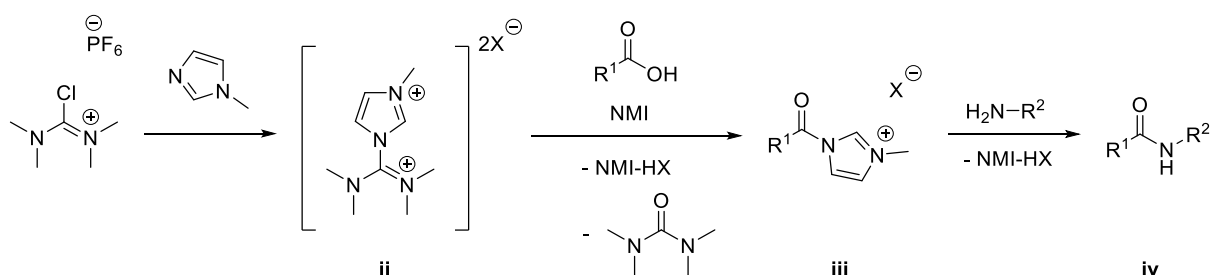
Nach Optimierung der Reagenzien und Reaktionsbedingungen überzeugten Chlor-*N,N,N',N'*-tetramethylformamidinium-hexafluorophosphat (TCFH) als Kupplungsreagenz, *N*-Methylimidazol (NMI) als Hilfsbase und Acetonitril als Lösungsmittel, mit denen nach 16 h Reaktionszeit bei Raumtemperatur das Amid **XV** in einer Ausbeute von 93 % isoliert werden konnte (**Schema 43**).



Schema 43 Amidkupplung von 2-Methylphenylpropansäure und 4-Aminobenzonitril mit TCFH als Kupplungsreagenz und *N*-Methylimidazol als Hilfsbase.^[162]

Neben 4-Aminobenzonitril (**XIV**) konnten BEUTNER *et al.* weitere elektronenarme Amine, darunter Nitrophenyl- und Trifluormethylphenylaniline oder auch stickstoffhaltige Heterozyklen, z.B. 4-Aminopyridin oder 2-Aminopyrazin, erfolgreich in der TCFH-vermittelten Amidkupplung umsetzen.

Der Mechanismus der TCFH-Kupplung mit NMI als Hilfsbase wurde von BEUTNER *et al.* postuliert und konnte mit IR-spektroskopischen Untersuchungen in Teilen belegt werden. (**Schema 44**).

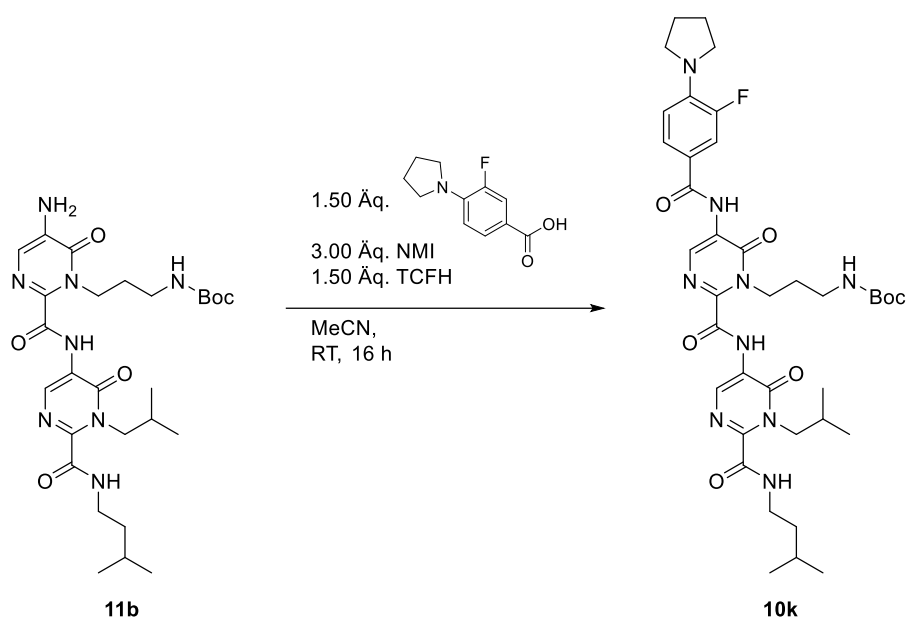


Schema 44 Schematische Darstellung des postulierten Mechanismus der Amidkupplung einer Carbonsäure und einem Amin mit TCFH als Kupplungsreagenz und NMI als Hilfsbase nach BEUTNER *et al.* R^1 und R^2 beinhalten sowohl aromatische als auch aliphatische Substituenten.^[162]

Im ersten Schritt reagieren das Kupplungsreagenz TCFH und die Hilfsbase NMI zum Addukt **ii**. Das Addukt **ii** reagiert zusammen mit der Carbonsäuregruppe und einem weiteren Äquivalent NMI zum Acyl-*N*-imidazoliumion **iii**. Im Vergleich zur Amidkupplungsreaktion mit dem Kupplungsreagenz Carbonyldiimidazol (CDI), bei dem intermediär das zu **iii**

strukturverwandte Acylimidazol gebildet wird, zeigt die Acyl-*N*-imidazoliumion-Spezies **iii** durch die stärker elektrophilen Eigenschaften des mesomeriestabilisierten Kations eine erhöhte Reaktivität gegenüber Nukleophilen, sodass auch weniger stark nukleophile Amine in der Kupplungsreaktion eingesetzt werden können. Nach nukleophiler Substitution durch das Amin unter Abspaltung von NMI wird das Amid **iv** gebildet.

Die TCFH-Kupplung wurde zunächst mit den Reaktionsbedingungen nach BEUTNER *et. al* unter Anpassung der Äquivalente mit dem Enamin-Dimer **11b** und der substituierten Benzoesäure **15** durchgeführt (**Schema 45**).



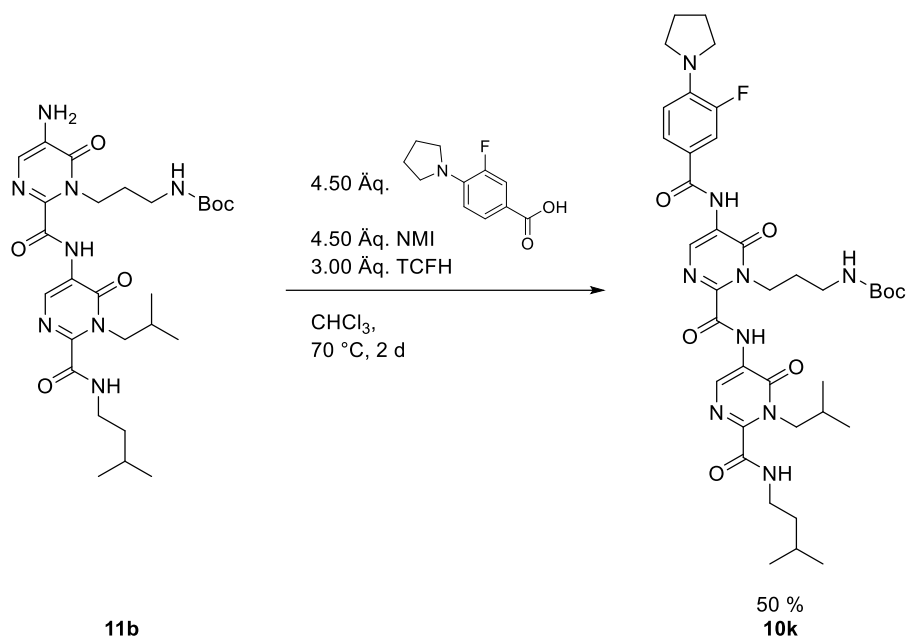
Schema 45 TCFH-Kupplung von **11b** und **15** nach BEUTNER *et. al.*^[162]

Nach 16 h Reaktionszeit bei Raumtemperatur konnte keine Eduktumsetzung des Enamin-Dimers **11b** beobachtet werden. Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur von Raumtemperatur auf 70 °C führte ebenfalls zu keiner Produktbildung. Als mögliche Ursache wurde die schlechte Löslichkeit der Edukte **11b** und **15** in Acetonitril vermutet.

Die Reaktion wurde mit DMF als Lösungsmittel wiederholt, bei der nicht-identifizierbare Produkte entstanden, die massenspektrometrisch nicht dem Bipyrimidonamid **10k** zugeordnet werden konnten.

Mit Chloroform als Lösungsmittel zeigte sich nach 16 h Reaktionszeit bei Raumtemperatur in der HPLC nur eine geringe Umsetzung von **11b** zu einem neuen Produkt, welches massenspektrometrisch dem Bipyrimidonamid **10k** entspricht. Durch Erhöhen der Reaktionstemperatur auf 70 °C konnte nach 16 h Reaktionszeit eine Verbesserung des Eduktumsatzes von **11b** und nach Zugabe eines Überschusses der substituierten Benzoesäure **15**, TCFH und NMI sowie weiteren 32 h Reaktionszeit bei 70 °C eine vollständige Eduktumsetzung von **11b** in der HPLC beobachtet werden. Das

Bipyrimidonamid **10k** konnte nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 50 % isoliert werden (**Schema 46**).

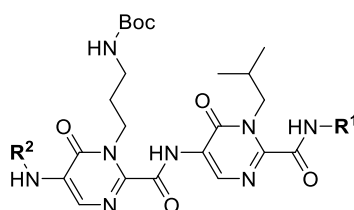


Schema 46 TCFH-Kupplung von **11b** und **15** mit NMI und Chloroform.

4.11 Biologische Evaluation der Bipyrimidonamide mit modifizierter Kopfgruppe

Das Bipyrimidonamid **10k** sowie das Enamin-Dimer **11b** wurden hinsichtlich ihrer antiplasmodialen Aktivität gegen die Plasmodienstämme *Pf3D7* und *PfDd2* sowie die Zytotoxizität gegenüber der Leberkrebszelllinie HepG2 untersucht (**Tab. 7**).

Tab. 7 IC₅₀-Werte der *in vitro* Zellassays mit den plasmodialen Stämmen *Pf3D7* und *PfDd2* sowie Leberkrebszelllinie HepG2 nach Behandlung mit Bipyrimidonamiden **10e**, **10k** und **11b**.



#	R ¹	R ²	<i>Pf3D7</i> IC ₅₀ [nM]	<i>PfDd2</i> IC ₅₀ [nM]	HepG2 IC ₅₀ [μM]	SI HepG2/ <i>Pf3D7</i>	SI HepG2/ <i>PfDd2</i>
10e (HPK454)			1285 ± 126	2623 ± 543	19141 ± 4537	14.9	7.3
10k (HPK493)			286 ± 4	447 ± 191	>25	>87	>56
11b (HPK481)		H	7345 ± 541	>18000	>25	>3.4	-

n.b. = nicht bestimmt

Das Enamin-Dimer **11b** ohne Benzoylkopfgruppe ($R^2 = H$) zeigt eine verringerte antiplasmodiale Aktivität um Faktor sechs in *Pf3D7* und mindestens Faktor sieben in *PfDd2* im Vergleich zum strukturverwandten Bipyrimidonamid **10e** mit Benzoylkopfgruppe. Dass die Kopfgruppe für die antiplasmodiale Aktivität essenziell ist, kann auch bei dem Tripyrimidonamid **12m** beobachtet werden (Kap. 4.3), welches keine Kopfgruppe besitzt und ebenfalls eine verringerte antiplasmodiale Aktivität im Vergleich zum strukturverwandten Tripyrimidonamid **12a** mit Benzoylkopfgruppe aufweist. Die Kopfgruppe ist folglich sowohl bei den Bi- als auch Tripyrimidonamiden für eine antiplasmodiale Aktivität essenziell.

Mit einer 3-Fluor-4-pyrrolidin-Benzoylkopfgruppe, welche die Bindetasche in *PfHsp90* nach den Vorhersagen des Liganden-Docking optimal ausnutzen soll (**Abb. 38**), zeigt das Bipyrimidonamid **10k** die beste antiplasmodiale Aktivität der untersuchten Bipyrimidonamide

im submikromolaren Bereich (*Pf*3D7: 286 ± 4 nM, *Pf*Dd2: 447 ± 191 nM) und kann fast mit der Aktivität von Tripyrimidonamid **12a** verglichen werden. Der Einfluss der modifizierten Kopfgruppe ist dadurch erkennbar, dass **10k** eine um Faktor vier in *Pf*3D7 und eine um Faktor sechs in *Pf*Dd2 bessere antiplasmodiale Aktivität als das Bipyrimidonamid **10e** mit Benzoylkopfgruppe zeigt. Eine Zytotoxizität in HepG2-Zellen ist bei **10k** nicht beobachtbar.

Anhand von Bipyrimidonamid **10k** konnte gezeigt werden, dass die Vorhersage des Liganden-Dockings für das rationale Design der Bipyrimidonamide genutzt werden kann, um die antiplasmodiale Aktivität durch Expansion der Bipyrimidonamidkopfgruppe zu erhöhen. Zur Verifizierung der Vorhersage sind jedoch weitere Bipyrimidonamide mit vergrößerter Kopfgruppe sowie die antiplasmodialen Aktivitäten dieser notwendig.

Nicht nur das Bipyrimidonamid **10e**, sondern auch das Tripyrimidonamid **12a** und das Bipyrimidonamid **10h** könnte mit einer 3-Fluor-4-pyrrolidin-Benzoylkopfgruppe substituiert werden. Das Tripyrimidonamid mit expandierter Kopfgruppe könnte analog zu **10e** und **10k** eine verbesserte antiplasmodiale *in vitro* Aktivität im Vergleich zu **12a** mit Benzoylkopfgruppe aufweisen. Es ist jedoch Spekulation, ob die strukturelle Expansion dieser Kopfgruppe einen positiven Einfluss auf pharmakokinetische und physikochemische Parameter hat, die zu einer verbesserten antiplasmodialen *in vivo* Aktivität führen könnte. Dementsprechend sind weitere Untersuchungen notwendig, mit denen jene Parameter identifiziert werden können, welche maßgeblich für die schlechte *in vivo* Aktivität verantwortlich sind.

Die Strukturvereinfachung von den Tri- zu den Bipyrimidonamiden zeigt ferner, dass der fehlende untere Pyrimidonbaustein durch die verlängerte lipophile Isopentylfußgruppe (R^1) nachgeahmt werden und die antiplasmodiale Aktivität durch die Fußgruppe gesteuert werden. Bei den bisher dargestellten Tri- und Bipyrimidonamiden zeigten jene Derivate mit einer 3-(Boc-amino)propyl-Gruppe in der oberen Seitenkette (z.B. **12a** oder **10k**) die stärkste antiplasmodiale Aktivität. Ob mit dieser Kohlenstoffkettenlänge die stärkste antiplasmodiale Aktivität erreicht wurde, kann erst durch weitere unterschiedlich lange Kohlenstoffketten bestimmt werden.

Eine optimale Kombination der Kopfgruppe, Seitenketten sowie Fußgruppe ist jedoch noch nicht gefunden, wobei die 3-Fluor-4-pyrrolidinokopfgruppe als auch die lipophile *n*-Phenylbutylfußgruppe am Bipyrimidonamidgrundgerüst wegweisend zur Verbesserung der antiplasmodialen Aktivität beitragen und als Ausgangspunkt für weitere Oligopyrimidonamide genutzt werden können.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Tripyrimidonamid-Grundgerüst des humanen, antileukämisch-aktiven Hsp90-Inhibitors **LSK82** aufgegriffen und mit den Vorhersagen eines Homologiemodells sowie Cluster- und Liganden-Dockings von BICKEL und GERTZEN aus der Arbeitsgruppe GOHLKE hin zu Leitstrukturen mit antiplasmodialer Aktivität modifiziert und optimiert, wobei die Vorgaben für einen *lead*-Kandidaten nach MMV ($IC_{50} < 100$ nM und $SI > 100$) anvisiert wurden (**Abb. 47**).

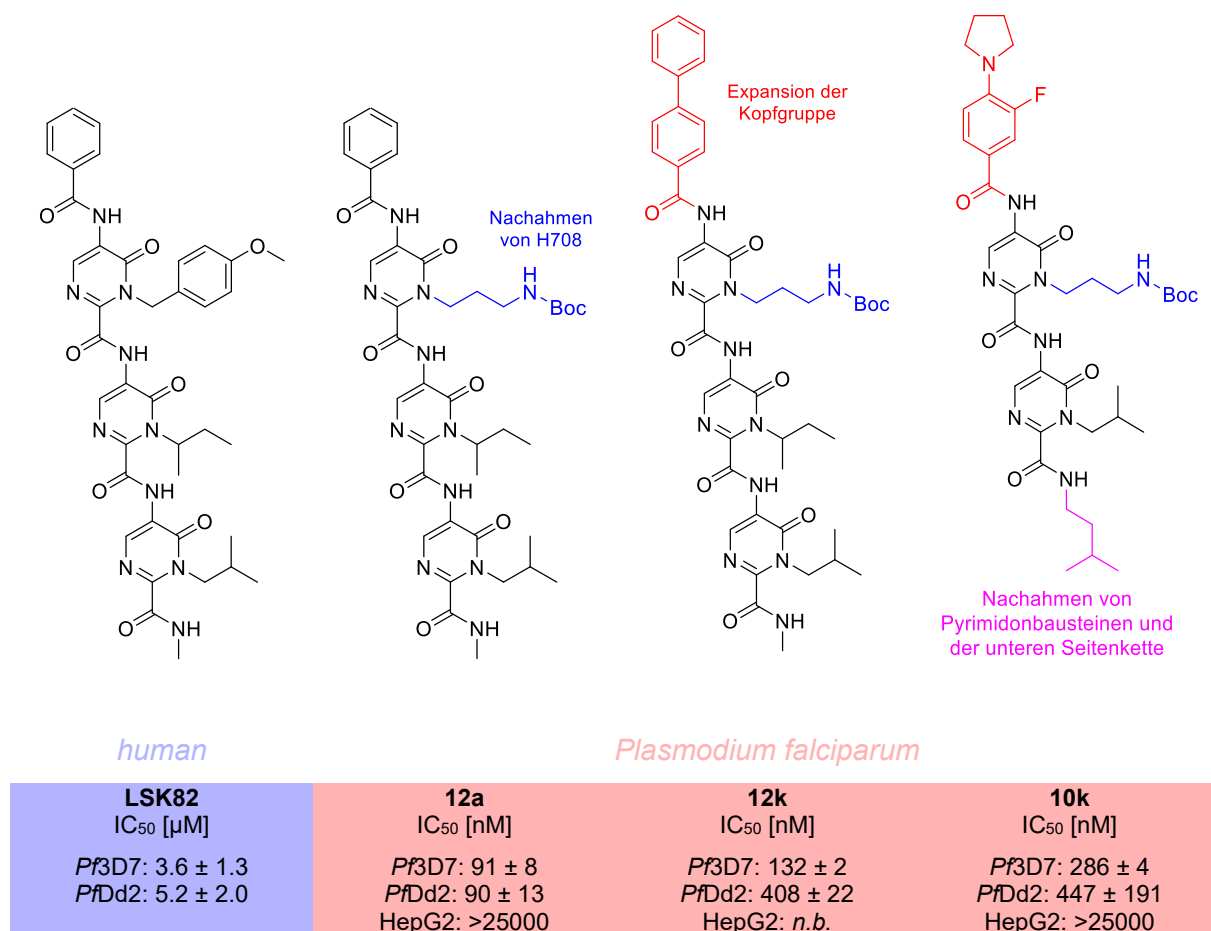


Abb. 47 Übersicht der Entwicklung von Tripyrimidon- und Bipyrimidonamiden mit antiplasmodialer Aktivität.

Im Homologiemodell von *Pf*Hsp90, erstellt von BICKEL (Arbeitsgruppe GOHLKE), basierend auf der Aminosäuresequenz des plasmodialen zytosolischen Hsp90 und der Kristallstruktur des humanen Hsp90, wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine erhöhte Affinität zum plasmodialen Hsp90 (*Pf*Hsp90) erreicht werden könnte, indem der *hot-spot*-Bereich in der C-terminalen Domäne mit den Aminosäuren H708, I711 und L715 nachgeahmt wird. Hierzu wurde die obere *para*-Methoxybenzyl-Seitenkette des von SPANIER aus der Arbeitsgruppe

KURZ synthetisierten Tripyrimidonamids **LSK82** gegen Histidin-nachahmende Seitenketten ersetzt.

Ein Tripyrimidonamid mit einem Imidazol-Heterozyklus in der oberen Seitenkette, welcher ebenfalls in der Aminosäure Histidin vorzufinden ist und H708 in *Pf*Hsp90 somit nachahmen könnte, war synthetisch nicht zugänglich. Es wurden daher die Tripyrimidonamide **12a** – **12i** dargestellt, welche zum Aufstellen von Struktur-Aktivität-Beziehungen strukturell diverse Gruppen in der oberen der drei Seitenketten enthalten. Einige dieser funktionellen Gruppen sind hinsichtlich der Wasserstoffbrückeneigenschaften mit dem Imidazol-Heterozyklus vergleichbar.

Die funktionellen Gruppen wurden sowohl frühzeitig in der Synthesesequenz beim Aufbau des Pyrimidon-Rings als auch in einer *Late-Stage-Funktionalisierung* mittels nukleophiler Substitution eines endständigen Bromatoms in der Seitenkette durch *N*- und *S*-Nukleophile eingebaut. Durch die Seitenkettenfunktionalisierung im letzten Reaktionsschritt konnten Syntheseschritte reduziert und funktionelle Gruppen, darunter die Isothiuronium-Gruppe, in der oberen Seitenkette eingebaut werden.

Die *in vitro* Aktivitätsdaten der dargestellten Tripyrimidonamide mit strukturell diverser oberer Seitenkette zeigten, dass mit einer 3-(Boc-amino)propylseitenkette (**12a**) eine bis zu zweistellig-nanomolare antiplasmodiale Aktivität gegen die beiden plasmodialen Stämme *Pf*3D7 und *Pf*Dd2 und Selektivität gegenüber der humanen Leberkrebszelllinie HepG2 erreicht werden kann. Die Boc-geschützte Aminogruppe von **12a** könnte analog zum Histidin H708 als Wasserstoffbrückenakzeptor und -donor mit den räumlich benachbarten Aminosäuren Threonin T692 und Asparaginsäure D613 interagieren.

Fehlt die obere Seitenkette am Tripyrimidonamidgrundgerüst (**LSK84**), so führt dies zu einem Verlust der antiplasmodialen Aktivität, sodass das Vorhandensein der oberen Seitenkette essenziell für antiplasmodiale Aktivität ist.

Das Tripyrimidonamid **12i** mit lipophiler *n*-Hexylseitenkette wies eine nahezu vergleichbare antiplasmodiale Aktivität gegen *Pf*3D7 im submikromolaren Bereich (IC_{50} : 133 ± 1 nM), keine Zytotoxizität und somit antiplasmodiale Selektivität auf. Diese antiplasmodiale Aktivität kann nicht mittels Wasserstoffbrückenbindungen erklärt werden. Vielmehr könnte die *n*-Hexylseitenkette mit einer lipophilen Tasche über hydrophobe Wechselwirkungen interagieren, die in räumlicher Nähe zu der oberen Seitenkettenposition liegt.

Das Homologiemodell von *Pf*Hsp90 wurde von GERTZEN (Arbeitsgruppe GOHLKE) in Molekulardynamiksimulationen erneut untersucht. Zusammen mit diversen Tripyrimidonamiden als Liganden wurde ein Liganden-Docking durchgeführt.

Der Fokus wurde auf eine Bindetasche gelegt, die in *Pf*Hsp90 im Vergleich zu *h*Hsp90 räumlich vergrößert ist und mit der Benzoylkopfgruppe der Tripyrimidonamide adressiert werden kann.

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine räumliche Expansion der Kopfgruppe zu einer Verbesserung der Affinität zu *Pf*Hsp90 führen könnte.

Zunächst wurden die Tripyrimidonamide **12j** – **12l** mit 1-Naphthoyl-, 4-Biphenoyl- und halogenerter Benzoylkopfgruppe dargestellt, jedoch konnte keine Verbesserung der antiplasmodialen *in vitro* Aktivität im Vergleich zu **12a** mit Benzoylgruppe beobachtet werden. Gegen *Pf*3D7 wies **12k** eine mit **12a** nahezu vergleichbare antiplasmodiale Aktivität auf. Dieses Beispiel zeigte, dass im Bereich der Tripyrimidonamidkopfgruppe Spielraum für weitere Substitutionsmuster besteht, mit denen die antiplasmodiale Aktivität verbessert werden könnte.

Tripyrimidonamid **12m**, bei dem die Kopfgruppe entfernt wurde, zeigte eine signifikante Verringerung der antiplasmodialen Aktivität im submikromolaren Bereich, sodass die Kopfgruppe essenziell für eine stark ausgeprägte antiplasmodiale Aktivität ist.

Ein *Parasite-Reduction-Ratio*-Assay, durchgeführt von PESSANHA DE CARVALHO (Arbeitsgruppe HELD), zeigte, dass **12a** wie der Arzneistoff Atovaquon ein Wirkstoff mit längerer Parasitenhalbwertszeit ist. Durch die langsame Reduzierung der Parasitenlast können Resistenzen gegenüber dem Wirkstoff auftreten, welche durch die Kombination des länger-wirkenden mit einem schnell-agierenden Arzneistoff unterbunden und minimiert werden können.

Neben *in vitro* Studien wurden die Tripyrimidonamide **12a** und **12b** im „Infektionsmausmodell *P. berghei*“ in der Arbeitsgruppe WITTLIN untersucht. Nur eine sehr geringe Reduzierung der Parasitämie (< 5 %) wurde sowohl nach peroraler Verabreichung von **12a** als auch **12b** beobachtet. Die sehr geringe *in vivo* Aktivität könnte sowohl auf schlechte pharmakokinetische und physikochemische Parameter der beiden Tripyrimidonamide als auch Spezies-abhängige strukturelle Unterschiede in dem *hot-spot*-Bereich der C-terminalen Domäne zwischen *Pf*Hsp90 und *Pb*Hsp90 erklärt werden. Dass es sich um Spezies-abhängige Unterschiede handelt, könnte durch ein SCID-Mausmodell intensiver untersucht werden.

Aufgrund der potenten *in vitro* und der sehr geringen *in vivo* Aktivität wurde die Strukturklasse der Tripyrimidonamide hin zu den strukturell weniger komplexen Bipyrimidonamiden vereinfacht, wodurch pharmakokinetische und physikochemische Parameter verbessert werden könnten. Der untere Pyrimidonbaustein von Tripyrimidonamid **12a** wurde entfernt und zunächst durch eine Methylfußgruppe ersetzt. Das daraus resultierende Bipyrimidonamid **10b** wies eine signifikant verringerte antiplasmodiale Aktivität im mikromolaren Bereich im Vergleich zu **12a** auf und verdeutlichte den Einfluss des entfernten Pyrimidonbausteins auf die Aktivität. Mit diversen Fußgruppen wurde versucht, den fehlenden Pyrimidonbaustein nachzuahmen. Insbesondere mit der lipophilen Isopentyl- (**10e**) oder *n*-Phenylbutylgruppe

(**10h**) konnte die antiplasmodiale Aktivität im Vergleich zu **10b** signifikant verbessert, jedoch nicht die Aktivität von **12a** übertroffen werden.

Neben einer Verlängerung der Bipyrimidonamidfußgruppe wurde die Benzoylkopfgruppe von Bipyrimidonamid **10e** basierend auf dem Liganden-Docking von GERTZEN mit einer 3-Fluor-4-pyrrolidinobenzoyl-Kopfgruppe substituiert. Die modifizierte Kopfgruppe wurde dabei in einer TCFH-vermittelten Amidkupplungsreaktion am Bipyrimidonamidgrundgerüst eingebaut. Das Bipyrimidonamid **10k** mit modifizierter Kopfgruppe wies eine um Faktor sechs verbesserte antiplasmodiale Aktivität (*Pf*3D7 IC₅₀: 286 ± 4 nM, *Pf*Dd2 IC₅₀: 447 ± 191 nM) im Vergleich zu **10e** mit Benzoylkopfgruppe auf. **10k** zeigte keine Zytotoxizität in der Leberkrebszelllinie HepG2 und stellt mit der potenten antiplasmodialen Aktivität und Selektivität eine neue Leitstruktur dar, welche jedoch die Vorgaben des MMV eines *lead*-Kandidaten noch nicht erfüllt.

6 Ausblick

In folgenden Generationen von *Pf*Hsp90-Inhibitoren sollten weitere Bipyrimidonamide aufgrund geringerer Molekül- und Synthesekomplexität sowie möglicher verbesserter pharmakokinetischer und physikochemischer Parameter gegenüber den Tripyrimidonamiden dargestellt werden. Die Veränderung der Kopf- und Fußgruppe der Bipyrimidonamide zeigte den größten Einfluss auf die antiplasmodiale Aktivität, sodass hier weitere Strukturmodifizierungen erfolgen sollten. Ein Carbamat in der oberen Seitenkette zeigte ebenfalls einen starken Einfluss auf die antiplasmodiale Aktivität, sodass ebenfalls weitere Carbamate aber auch mögliche Bioisostere des Imidazols (vgl. Kap. 2.1) überlegt werden sollten (**Abb. 48**).

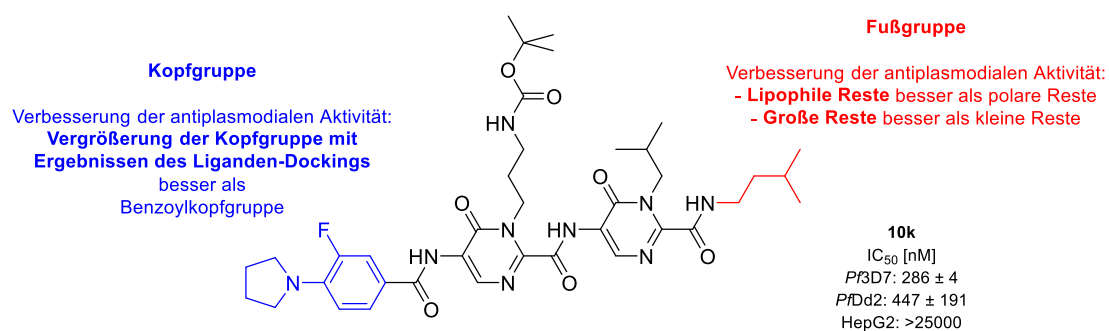


Abb. 48 Struktur von **10k** sowie Veränderung der antiplasmodialen Aktivität durch Modifizierung der Kopf- und Fußgruppe.

Bislang wurden ausschließlich Tripyrimidonamide und substituierte Benzoessäuren als Liganden im Liganden-Docking untersucht. Die dargestellten Bipyrimidonamide **10b** – **10l** aber auch weitere mögliche Kombinationen aus Kopf- und Fußgruppen sowie Seitenkettensubstitutionen sollten in ihrer Bindungsaffinität und räumlichen Position in Molekulardynamiksimulationen untersucht werden, sodass zusammen mit den biologischen *in vitro* Daten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen aufgestellt und neue Möglichkeiten für weitere Strukturmodifizierungen gewonnen werden können.

Das Bipyrimidonamid **10k** mit modifizierter Kopfgruppe zeigt erfolgreich, dass das Liganden-Docking wegweisende Informationen für die Synthese von Oligopyrimidonamiden mit antiplasmodialer Aktivität liefern kann.

Dass die dargestellten Tri- und Bipyrimidonamide tatsächlich die Dimerisierung in der C-terminalen Domäne von *Pf*Hsp90 inhibieren, muss durch biologische und biophysikalische Assays untersucht und verifiziert werden. Für den humanen Hsp90-Inhibitor **LSK82** wurden diverse biologische Assays durchgeführt, mit denen eine Dimerisierungshemmung des

Inhibitors in der CTD von *hHsp90* gezeigt werden konnte.^[140] Analog können diese Assays für *PfHsp90* angepasst und angewendet werden, indem z.B. Fluorescein-markierte Client-Proteine von *PfHsp90* ausgewählt werden, deren Fluoreszenz eine Dimerisierung des Chaperons und umgekehrt eine verringerte Fluoreszenz auf eine Hemmung der Dimerisierung durch die Tri- oder Bipyrimidonamide andeutet. Ein Cellular-Thermal-Shift-Assay kann weitere Hinweise zu einer Interaktion von Chaperon und Inhibitor geben. Mithilfe eines Microscale-Thermophoresis-Assays kann eine mögliche Interaktion von *PfHsp90* mit den Tri- und Bipyrimidonamiden quantifiziert und die Liganden hinsichtlich der Bindungsaffinität mit der Dissoziationskonstante K_D verglichen werden.

Neben der Frage, ob die Tri- und Bipyrimidonamide die Dimerisierung von *PfHsp90* inhibieren können, ist ebenfalls zu klären, bei welchen der bisher vier bekannten Isoformen von *PfHsp90* und in welchen Stadien des Parasiten eine antiplasmodiale Aktivität zu beobachten ist. Die antiplasmodiale Aktivität der dargestellten Tri- und Bipyrimidonamide wurde bislang nur in der erythrozytären Phase des Parasiten untersucht. Dementsprechend sollten *in vitro* Assays durchgeführt werden, mit denen die antiplasmodiale Aktivität in den Leber- und frühen Gametozytenstadien untersucht werden kann.

7 Experimenteller Teil

7.1 Allgemeine Versuchs- und Analyseangaben

Reaktionen, die mit Raumtemperatur angegeben sind, wurden bei 22 °C durchgeführt.

Reagenzien und Lösungsmittel

Nicht selbst dargestellte Reagenzien wurden von den Herstellern *abcr*, *Acros Organics*, *Alfa Aesar*, *Apollo Scientific Limited*, *BLDpharm*, *Carbolution Chemicals*, *Carl ROTH*, *Fisher Scientific*, *Fluka*, *Fluorochem*, *Glentham Life Sciences*, *J&K Scientific*, *Oakwood*, *Sigma-Aldrich* oder *TCI-Chemicals* in einer Reinheit von >95 % bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet. Trockene Lösungsmittel wurden ausschließlich von *Acros Organics* (Molsieb mit Septum), COMU® ausschließlich von *Carl ROTH* verwendet.

Dünnschichtchromatographie

Die Elution erfolgte mit Lösungsmittelgemischen aus *n*-Hexan oder Cyclohexan und Ethylacetat oder Dichlormethan und Methanol unterschiedlicher Verhältnisse. Ggf. wurde Triethylamin oder Essigsäure als Zusatz verwendet. Kieselgelbeschichtete Fertigfolien wurden von der Firma *Macherey Nagel* (ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254) bezogen. Die Analyse dieser erfolgte mittels Fluoreszenzlöschung unter einer UV-Lampe (254 nm oder 366 nm) oder durch Anfärben mittels Färbelösung. Die Färbelösungen Kaliumpermanganat und Ninhydrin wurden nach dem DAB hergestellt.

Säulenchromatographie

Die automatisierte Flash-Chromatographie erfolgte an einer *Teledyne Isco* CombiFlash® 200 oder an einer *Büchi* Pure C-810 Flash mit vorbepackten RediSep® (NP) Normalphasen- oder RediSep® Rf C-18 (RP) Umkehrphasen-Kartuschen.

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel von *Macherey-Nagel* oder *Acros Organics* (Silica 60, 0.040 – 0.063 mm) verwendet.

Die Rohprodukte wurden jeweils in einem geeigneten Lösungsmittel an Kieselgel adsorbiert und anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt.

Die Normalphasenchromatographie wurde mit Gemischen aus *n*-Hexan / Cyclohexan und Ethylacetat oder Dichlormethan und Methanol, die Umkehrphasenchromatographie mit einem Gemisch aus Acetonitril und Wasser durchgeführt. Als Additive wurden Triethylamin oder Trifluoressigsäure verwendet.

Substanztrocknung

Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurden die Substanzen an einer Hochvakkum-Linie (RV3, Edwards) für 16 h getrocknet.

Schmelzpunktbestimmung

Alle Schmelzpunkte wurden an einem *Cole-Parmer* MP-800 Series Stuart Automatic Digital Melting Point Apparatus gemessen. Die Auswertung der Schmelzpunkte erfolgte mittels Videoanalyse in Einfachbestimmung und war unkorrigiert.

Zentrifuge

Die Zentrifuge bestand aus einer *Hettich* EBA 21. Die Probe wurde im konischen Zentrifugenröhrchen (15 mL) vorbereitet. Als Gegengewicht diente ein weiteres konisches Zentrifugenröhrchen gefüllt mit entsprechender Menge Wasser. Jeder Durchlauf war auf 4.0000 Umdrehungen pro Minute eingestellt und dauerte zwei Minuten.

Hochleistungsflüssigchromatographie-Methode (HPLC)

Das System des Herstellers *Knauer* bestand aus einer AzuraP 6.1L Pumpe, einem Optimas 800 Autosampler, einem K-2600 Photometer und einer temperierten Umkehrphasensäule (FK36).

1 mg der zu untersuchenden Substanz wurden in Acetonitril, Methanol oder Wasser gelöst und in den Autosampler gegeben. Absorptionen wurden bei 254 nm detektiert. Als mobile Phasen wurden mit HPLC-Gradientenqualität Wasser + 0,1 % TFA und Acetonitril + 0,1 % TFA verwendet. Die Messzeit beträgt 30 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Dabei wurden folgende Gradienten durchlaufen:

Zeitintervall [min]	Wasser + TFA [%]	Acetonitril + TFA [%]
0 – 0,5	90	10
0,5 – 20	90 → 0	10 → 100
20 – 30	0	100

Kernresonanzspektroskopie

Folgende Geräte wurden bei der Messung von NMR-Spektren am *CeMSA@HHU* verwendet:

- Bruker Avance III – 300

^1H 300 MHz ^{13}C 75 MHz ^{19}F 282 MHz
- Bruker Avance DRX – 500

^1H 500 MHz ^{13}C 126 MHz ^{19}F 471 MHz
- Bruker Avance III – 600

^1H 600 MHz ^{13}C 151 MHz ^{19}F 565 MHz

Aufgenommene ^{13}C - und ^{19}F -Spektren sind ^1H -Breitbandentkoppelt. Als Lösungsmittel wurden CDCl_3 ($\delta = 7.26$ ppm), $\text{DMSO}-d_6$ ($\delta = 2.50$ ppm), $\text{Aceton}-d_6$ ($\delta = 2.05$ ppm), D_2O ($\delta = 4.79$ ppm) oder $\text{Methanol}-d_4$ ($\delta = 3.31$ ppm) verwendet.

Die chemischen Verschiebungen δ sind relativ zum externen Standard TMS in ppm angegeben und auf die Signale der undeuterten Lösungsmittelanteile der verwendeten Lösungsmittel normiert. Multiplizitäten werden mit s (Singulett), d (Duplett), t (Triplett), q (Quartett), pent (Pentett), hept (Heptett), dt (Duplett von Triplett), tt (Triplett von Triplett) oder m (Multipllett) angegeben.

Massenspektrometrie

Ca. 1.0 mg der zu untersuchenden Substanz wurden in 1.0 mL eines geeigneten Solvens gelöst und in folgenden Methoden bzw. Geräten am *CeMSA@HHU* massenspektrometrisch untersucht:

Elektronenstoßionisation-Spektren **EI**:

Thermo Electron Corp. Finnigan Trace DSQ mit Finnigan Trace GC Ultra

(Hochauflösende) Elektrosprayionisation (**HRMS**)-**ESI**:

Bruker Daltonics UHR-QTOF maXis 4G

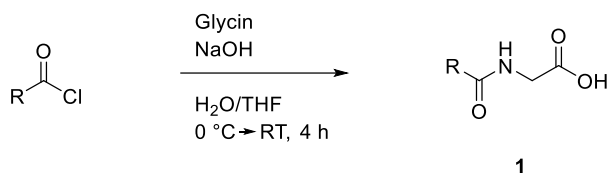
Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation-Flugzeitanalyse **MALDI-TOF**:

Bruker Daltonics UltrafleXtreme

7.2 Allgemeine Versuchsvorschriften

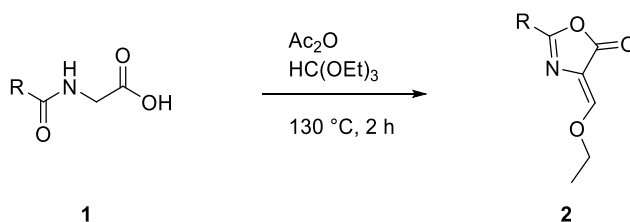
Die Raumtemperatur entspricht bei Reaktionen und Synthesen einer Temperatur von 22 °C.

AVV1 – Synthese von Amidoessigsäuren 1



In einem Zweihalskolben werden 4.00 Äq. Natriumhydroxid und 1.10 Äq. Glycin in entmineralisiertem Wasser (1.0 mL/mmol) gelöst. Unter Eisbadkühlung und starkem Rühren wurde 1.00 Äq. des Säurechlorids, gelöst in Tetrahydrofuran (0.1 mL/mmol), über einen Tropftrichter zugegeben, anschließend das Eisbad entfernt und die Reaktionslösung bei Raumtemperatur für 4 h gerührt. Nach vollständigem Eduktumsatz (DC) wurde der pH-Wert der Reaktionslösung unter Eisbadkühlung mit konzentrierter Salzsäure auf 1 eingestellt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert, mit entmineralisiertem Wasser gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet.^[163]

AVV2 - Synthese von Azlactonen 2



Methode A

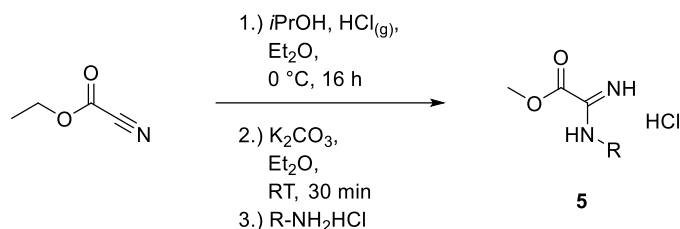
1.00 Äq. Amidoessigsäure **1** wurde zusammen mit 2.20 Äq. Essigsäureanhydrid und 1.10 Äq. Triethylorthoformiat bei Raumtemperatur in einem Einhalskolben vorgelegt und anschließend bei 130 °C für 2 h gerührt. Flüchtige Lösungsmittel und Nebenprodukte wurden am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde dreimal mit Toluol coevaporiert (0.5 ml/mmol), anschließend in 2-Propanol (0.5 mL/mmol) aufgenommen und bei 4 °C für 16 h gelagert. Der präzipitierte Feststoff wurde abfiltriert, mit kaltem 2-Propanol gewaschen und anschließend unter vermindertem Druck getrocknet.^[142]

Methode B

1.00 Äq. Amidoessigsäure **1** wurde zusammen mit 2.20 Äq. Essigsäureanhydrid und 1.10 Äq. Triethylorthoformiat bei Raumtemperatur in einem Einhalskolben vorgelegt und

anschließend bei 130 °C für 2 h gerührt. Flüchtige Lösungsmittel und Nebenprodukte wurden am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde dreimal mit Toluol (0.5 mL/mmol) coevaporiert. Das Produkt wurde aus Methanol (1.0 mL/mmol) bei Raumtemperatur gefällt, anschließend abfiltriert, mit kaltem Methanol gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet.

AVV3 – Synthese der Amidine 5



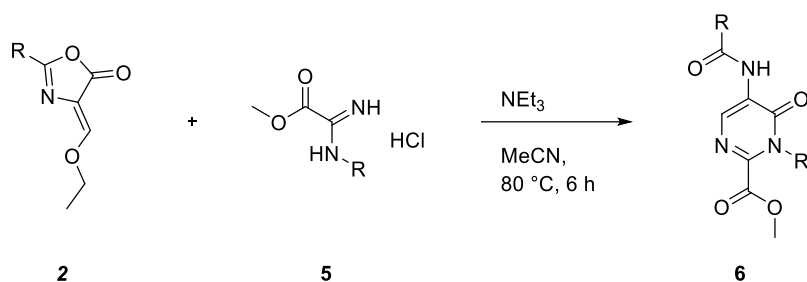
1.00 Äq. Ethylcyanoformat und 1.05 Äq. 2-Propanol wurden in Diethylether (1.0 mL/mmol) gelöst und auf 0 °C gekühlt. HCl-Gas wurde in einem separaten Kolben durch das Zutropfen von konzentrierter Schwefelsäure in Natriumchlorid hergestellt und in die Reaktionslösung so lange mit einem Schlauch in die Reaktionslösung eingeleitet, bis eine Trübung erkennbar war. Der Reaktionsansatz wurde sodann verschlossen und bei 4 °C für 16 h im Kühlschrank gelagert. Der präzipitierte farblose Feststoff wurde abfiltriert, mit Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet.

Das Hydrochlorid des Imidoesters wurde in einer gesättigten Kaliumcarbonat-Lösung (1.0 mL/mmol) gelöst und die wässrige Phase dreimal mit Diethylether (0.5 mL/mmol) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Imidoesterbase **4** unter vermindertem Druck getrocknet.

Die entsprechend substituierten Amine wurden in Diethylether (3.0 mL/mmol) gelöst und mit 1.50 Äq. Chlorwasserstoff (4 M in 1,4-Dioxan) zu den entsprechend substituierten Aminhydrochloriden umgesetzt. Die Suspension wurde filtriert und die Aminhydrochloride mit Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet.

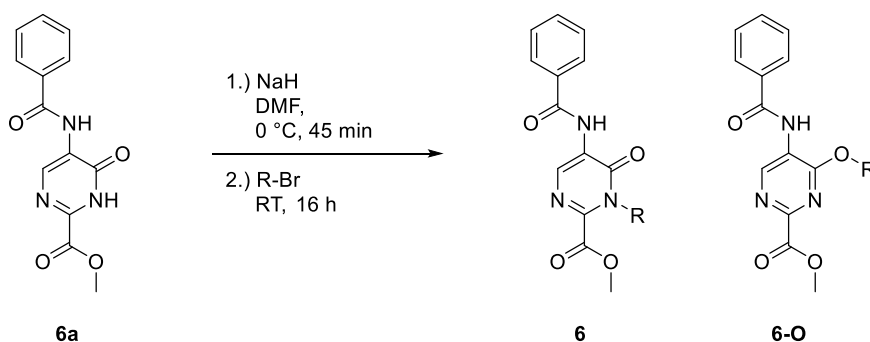
1.30 Äq. der Imidoesterbase **4** wurden in Methanol (3.0 mL/mmol) gelöst. Unter starkem Rühren wurden 1.00 Äq. des substituierten Aminhydrochlorids portionsweise bei Raumtemperatur zur Reaktionslösung gegeben und die Reaktion nach vollständiger Zugabe bei Raumtemperatur für 16 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Diethylether (4.0 mL/mmol) suspendiert und bei Raumtemperatur für 30 min gerührt. Das Lösungsmittel wurde dekantiert und das Amidinhydrochlorid **5** unter vermindertem Druck getrocknet. Die Amidinhydrochloride **5** wurden ohne weitere Reinigung für den nachfolgenden Syntheseschritt verwendet.

AVV4 – Synthese der Pyrimidone 6



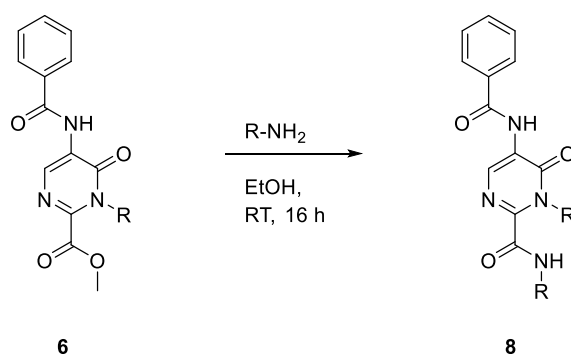
In einem Einhalskolben wurden 1.00 Äq Azlacton **2** und 1.10 Äq. Amidinhydrochlorid **5** in Acetonitril (5.0 mL/mmol) vorgelegt. Nach Zugabe von 1.30 Äq. Triethylamin wurde die Reaktion bei 80 °C für 6 h gerührt. Nach vollständigem Eduktumsatz (DC) wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mit Ethylacetat (1.0 mL/mmol) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung, entmineralisiertem Wasser und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen sowie anschließend mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Rohprodukt wurde an Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt.

AVV5 – Alkylierung von Pyrimidonen



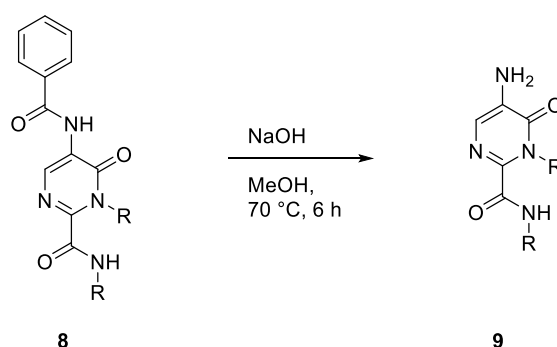
In einem Schlenkkolben wurde 1.00 Äq des unsubstituierten Pyrimidons **6a** in Dimethylformamid (5.0 mL/mmol) unter Stickstoffatmosphäre suspendiert und mittels Eisbades auf 0 °C gekühlt. Portionsweise wurde 1.05 Äq. Natriumhydrid (60 % Suspension in Mineralöl) zugegeben und die Reaktion so lange bei 0 °C gerührt (ca. 45 min), bis eine klare, gelbe Lösung erkennbar war. Anschließend wurden 8.00 Äq. des Alkylbromids hinzugegeben und die Reaktion bei Raumtemperatur für 16 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Ethylacetat (1.0 mL/mmol) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit entmineralisiertem Wasser und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen sowie mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Rohprodukt wurde an Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt.

AVV6 – Aminolyse von Pyrimidonamiden



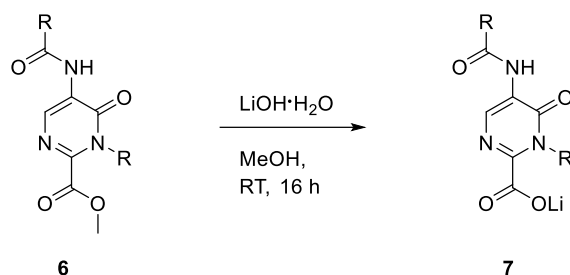
In einem Einhalskolben wurde 1.00 Äq. des Pyrimidons **6** in Ethanol (8.0 mL/mmol) gelöst. Unter starkem Rühren wurden 8.00 Äq. des primären Amins zugetropft und die Reaktion bei Raumtemperatur für 16 h gerührt. Nach vollständigem Eduktumsatz (DC) wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Ethylacetat (1.0 mL/mmmol) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung, entmineralisiertem Wasser, wässriger 10 %-Zitronensäure-Lösung und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen sowie mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt unter vermindertem Druck getrocknet. Bei unzureichender HPLC-Reinheit nach der Flüssig-Flüssig-Extraktion wurde das Rohprodukt an Kieselgel adsorbiert und säulenchromatografisch gereinigt.

AVV7 – Benzoylentschützung von Pyrimidonen



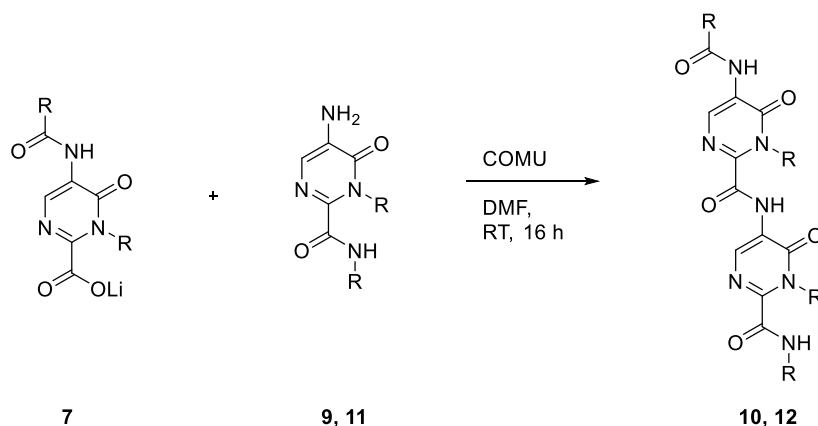
In einem Einhalskolben wurde 1.00 Äq. des Pyrimidons **8** in Methanol (3.0 mL/mmol) gelöst. 3.00 Äq. Natriumhydroxid wurden hinzugegeben und die Reaktion bei 70 °C für 6 h gerührt. Nach vollständigem Eduktumsatz (DC) wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Ethylacetat (1.0 mL/mmol) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung, entmineralisiertem Wasser und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen sowie mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Rohprodukt wurde an Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt.

AVV8 – Esterhydrolyse von Pyrimidonen



In einem Einhalskolben wurde 1.00 Äq. des Pyrimidons **6** in Methanol (3.0 mL/mmol) gelöst. 1.00 Äq. Lithiumhydroxid Monohydrat wurden hinzugegeben und die Reaktion bei Raumtemperatur für 16 h gerührt. Nach vollständigem Eduktumsatz (DC) wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in Diethylether (2.0 mL/mmol) suspendiert und für 5 min im Ultraschallbad behandelt. Der Feststoff wurde abfiltriert und mit Diethylether gewaschen. Das Produkt wurde unter vermindertem Druck getrocknet und ohne weitere Reinigung in nachfolgenden Syntheseschritten verwendet.

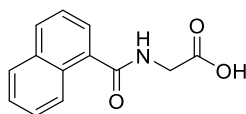
AVV9 – Amidkupplung zu Bi- oder Tripyrimidonamiden



In einem Einhalskolben wurden 1.30 - 1.50 Äq. des Lithiumcarboxylats **7** in Dimethylformamid (3.0 mL/mmol) gelöst. 1.70 Äq. COMU® wurde zugegeben und die Reaktion bei Raumtemperatur für 5 min gerührt. 1.00 Äq. des Amins **9** oder **11** wurden anschließend zugegeben und die Reaktion bei Raumtemperatur für 16 h gerührt. Nach vollständigem Eduktumsatz (DC) wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in Ethylacetat (3.0 mL/mmol) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung, entmineralisiertem Wasser und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen sowie mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Rohprodukt wurde an Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt.

7.3 Übersicht der synthetisierten Substanzen

(1-Naphthoyl)glycin (1b)^[164]



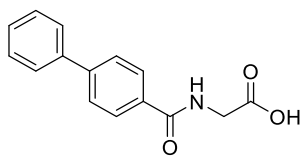
229.24 g/mol
C₁₃H₁₁NO₃

In einem Einhalskolben wurde 1.00 Äq. 1-Naphtoesäure (5.17 g, 30.0 mmol) in Toluol (120 mL) gelöst. 1.50 Äq. Thionylchlorid (3.26 mL, 45.0 mmol) wurden tropfenweise hinzugegeben und die Reaktion bei 120 °C für 2 h gerührt. Nach vollständigem Eduktumsatz (DC: Cyclohexan:Ethylacetat 1:1) wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Säurechlorid ohne weitere Reinigung für die nachfolgende Reaktion verwendet. Das Produkt wurde nach **AVV1** mit 1.00 Äq. des vorher hergestellten Säurechlorids (5.72 g, 30.0 mmol), 1.20 Äq. Glycin (2.70 g, 36.0 mmol) und 4.00 Äq. Natriumhydroxid (4.80 g, 120 mmol) hergestellt.

Ausbeute: 87 %, 5.99 g (26.1 mmol), farbloser Feststoff.

HPLC: 8.202 min, 97.2 %.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.68 (s, 1H), 8.87 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 8.39 – 8.29 (m, 1H), 7.69 – 7.50 (m, 4H), 4.01 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H).

([1,1'-Biphenyl]-4-carbonyl)glycin(1c)^[164]

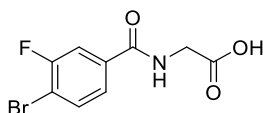
255.27 g/mol
C₁₃H₁₁NO₃

Hergestellt nach **AVV1** aus 1.00 Äq. [1,1'-Biphenyl]-4-carbonylchlorid (21.7 g, 100 mmol), 1.20 Äq. Glycin (9.01 g, 120 mmol) und 4.00 Äq. Natriumhydroxid (21.7 g, 400 mmol).

Ausbeute: 91 %, 23.2 g (91.1 mmol), farbloser Feststoff.

HPLC: 10.331 min, 98.1 %.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.63 (s, 1H), 8.91 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.05 – 7.94 (m, 2H), 7.84 – 7.68 (m, 4H), 7.55 – 7.34 (m, 3H), 3.98 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H).

(4-Brom-3-fluorbenzoyl)glycin (1d)

266.27 g/mol
C₉H₇BrFNO₃

In einem Einhalskolben wurden 1.00 Äq. 4-Brom-3-fluorbenzoesäure (4.47 g, 20.0 mmol) und 5.0 mol% DMF (0.08 mL, 73.1 mg, 1.00 mmol) in Dichlormethan (150 mL) vorgelegt. Unter Rühren wurde bei Raumtemperatur langsam 1.50 Äq. Oxalylchlorid (2.59 mL, 3.89 g, 30.0 mmol) zugetropft und die Reaktionslösung bei Raumtemperatur für 16 h gerührt. Nach vollständigem Eduktumsatz (DC: Cyclohexan:Ethylacetat 1:1) wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Säurechlorid ohne weitere Reinigungsschritte als Edukt eingesetzt. Das Produkt wurde nach **AVV1** mit 1.00 Äq. Säurechlorid (4.75 g, 20.0 mmol), 1.20 Äq. Glycin (1.80 g, 24.0 mmol) und 3.00 Äq. Natriumhydroxid (2.40 g, 60.0 mmol) hergestellt.

Ausbeute: 96 %, 26.6 g (96.4 mmol), brauner Feststoff.

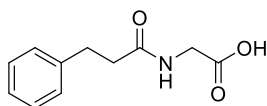
Schmelzpunkt: 188 °C.

HPLC: 8.994 min, 99.3 %.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.66 (s, 1H), 9.02 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 7.90 – 7.75 (m, 2H), 7.74 – 7.61 (m, 1H), 3.95 (d, J = 5.9 Hz, 2H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 171.1, 164.5 (d, J_{C-F} = 2.2 Hz), 159.8, 156.6, 135.5 (d, J_{C-F} = 6.2 Hz), 133.8, 124.9 (d, J_{C-F} = 3.6 Hz), 115.5 (d, J_{C-F} = 23.7 Hz), 111.8 (d, J_{C-F} = 20.9 Hz), 41.4.

¹⁹F-NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆): δ -107.4.

(3-Phenylpropanoyl)glycin (1e)^[165]

207.23 g/mol
C₁₁H₁₃NO₃

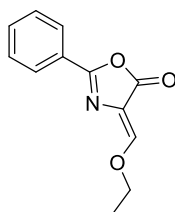
Hergestellt nach **AVV1** aus 1.05 Äq. 3-Phenylpropanoylchlorid (7.62 g, 50.0 mmol), 1.00 Äq. Glycin (3.57 g, 47.6 mmol) und 4.00 Äq. Natriumhydroxid (7.62 g, 190 mmol).

Ausbeute: 50 %, 4.98 g (24.0 mmol), farbloser Feststoff.

HPLC: 6.771 min, 98.8 %.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.52 (s, 1H), 8.20 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 7.32 – 7.11 (m, 5H), 3.75 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.82 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 2.44 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H).

(Z)-4-(Ethoxymethylen)-2-phenyloxazol-5(4H)-on (2a)^[142]



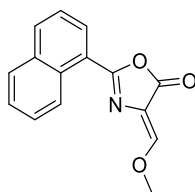
217.22 g/mol
C₁₂H₁₁NO₃

Hergestellt nach **AVV1 Methode A** aus 1.00 Äq. Hippursäure (75.3 g, 420 mmol), 1.10 Äq. Triethylorthoformiat (68.5 g, 76.8 mL, 462 mmol) und 2.20 Äq. Essigsäureanhydrid (94.3 g, 87.3 mL, 924 mmol).

Ausbeute: 31 %, 28.2 g (130 mmol), roter Feststoff.

HPLC: 12.983 min, 94.8 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.11 – 8.01 (m, 2H), 7.57 – 7.41 (m, 3H), 7.34 (s, 1H), 4.43 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 1.48 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

(Z)-4-(Ethoxymethylen)-2-(naphthalen-1-yl)oxazol-5(4H)-on (2b)^[166]

253.26 g/mol
C₁₅H₁₁NO₃

Hergestellt nach der **AVV1 Methode B** aus 1.00 Äq. Amidoessigsäure **1b** (4.59 g, 20.0 mmol), 3.00 Äq. Trimethylorthoformiat (6.37 g, 6.56 mL, 60.0 mmol) und 10.0 Äq. Essigsäureanhydrid (20.4 g, 18.9 mL, 200 mmol). Das Produkt wurde aus Methanol kristallisiert.

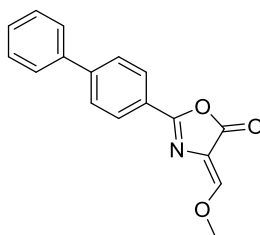
Ausbeute: 31 %, 1.55 g (6.14 mmol), hellroter Feststoff.

Schmelzpunkt: 168 °C.

HPLC: 13.799 min, 96.1 %.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 9.37 – 9.32 (m, 1H), 8.26 (dd, J = 7.4, 1.3 Hz, 1H), 8.05 – 8.00 (m, 1H), 7.93 – 7.88 (m, 1H), 7.70 – 7.63 (m, 1H), 7.60 – 7.50 (m, 2H), 7.35 (s, 1H), 4.27 (s, 3H).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 168.3, 159.5, 153.6, 134.0, 133.6, 130.8, 130.3, 128.9, 128.3, 126.6, 126.3, 124.9, 121.8, 118.2, 63.5.

(Z)-2-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)-4-(ethoxymethylen)oxazol-5(4H)-on (2c)

293.32 g/mol
C₁₈H₁₅NO₃

Hergestellt nach der **AVV1 Methode B** aus 1.00 Äq. Amidoessigsäure **1c** (7.66 g, 30.0 mmol), 3.00 Äq. Trimethylorthoformiat (13.3 g, 15.0 mL, 90.0 mmol) und 10.0 Äq. Essigsäureanhydrid (30.6 g, 28.4 mL, 200 mmol). Das Produkt wurde aus Methanol kristallisiert.

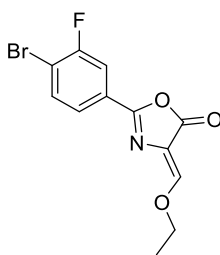
Ausbeute: 34 %, 2.88 g (10.3 mmol), roter Feststoff.

Schmelzpunkt: 154 °C.

HPLC: 14.556 min, 98.2 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.06 – 8.00 (m, 2H), 7.63 – 7.51 (m, 4H), 7.41 – 7.26 (m, 3H), 7.19 (s, 1H), 4.09 (s, 3H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 168.3, 159.4, 153.3, 145.1, 139.7, 129.0, 128.2, 128.2, 127.4, 127.2, 124.6, 118.2, 63.5, 63.5.

(Z)-2-(4-Brom-3-fluorophenyl)-4-(ethoxymethylen)oxazol-5(4H)-on (2d)

314.11 g/mol
C₁₂H₉BrFNO₃

Hergestellt nach der **AVV1 Methode B** aus 1.00 Äq. Amidoessigsäure **1d** (22.1 g, 80.0 mmol), 1.10 Äq. Triethylorthoformiat (13.0 g, 14.6 mL, 88.0 mmol) und 3.00 Äq. Essigsäureanhydrid (24.5 g, 22.7 mL, 240 mmol).

Ausbeute: 37 %, 9.16 g (29.2 mmol), gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 139 °C.

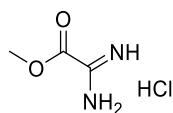
HPLC: 14.243 min, 98.5 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.80 (dd, J = 9.0, 1.8 Hz, 1H), 7.75 – 7.60 (m, 2H), 7.39 (s, 1H), 4.46 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 1.49 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 167.9, 160.1, 158.5, 157.7 (d, J_{C-F} = 3.3 Hz), 153.7, 134.3, 127.2 (d, J_{C-F} = 7.7 Hz), 124.3 (d, J_{C-F} = 3.9 Hz), 117.6, 115.5 (d, J_{C-F} = 25.3 Hz), 114.2 (d, J_{C-F} = 20.9 Hz), 73.4, 15.4.

¹⁹F-NMR (565 MHz, CDCl₃): δ -105.4.

Methyl-2-amino-2-iminoacetathydrochlorid (5a)^[146]

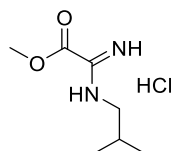


138.55 g/mol
C₃H₇ClN₃O₄

Hergestellt nach der **AVV3** aus 1.00 Äq. Imidoesterbase **4** (19.6 g, 123 mmol) und 1.00 Äq. Ammoniumchlorid (6.58 g, 123 mmol).

Ausbeute: 66 % über drei Schritte (15.6 g, 112 mmol), farbloser Feststoff.

Methyl-2-imino-2-(isobutylamino)acetathydrochlorid (5b)^[142]

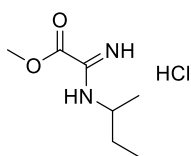


194.66 g/mol
C₇H₁₅ClN₂O₂

Hergestellt nach der **AVV3** aus 1.00 Äq. Imidoesterbase **4** (9.07 g, 57.0 mmol) und 1.00 Äq. Isobutylammoniumchlorid (6.19 g, 57.0 mmol).

Ausbeute: 65 % über drei Schritte (10.7 g, 51.5 mmol), farbloser Feststoff.

Methyl-2-(sec-butylamino)-2-iminoacetathydrochlorid (5c)^[142]

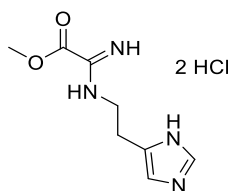


194.66 g/mol
C₇H₁₅ClN₂O₂

Hergestellt nach der **AVV3** aus 1.00 Äq. Imidoesterbase **4** (10.4 g, 65.2 mmol) und 1.00 Äq. racemischem sec-Butylammoniumchlorid (4.33 g, 39.5 mmol).

Ausbeute: 65 % über drei Schritte (6.85 g, 35.2 mmol), farbloser Feststoff.

Methyl-2-((2-(1H-imidazol-5-yl)ethyl)amino)2-iminoacetatdihydrochlorid (5d)

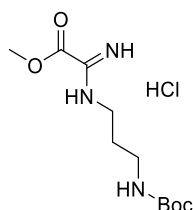


269.13 g/mol
C₈H₁₄Cl₂N₄O₂

Hergestellt nach der **AVV3** aus 1.60 Äq. Imidoesterbase **4** (1.27 g, 8.00 mmol) und 1.00 Äq. Histamindihydrochlorid (884 mg, 4.80 mmol).

Ausbeute: 58 % über drei Schritte (1.14 g, 4.24 mmol), farbloser Feststoff.

Methyl-2-((3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propyl)amino)-2-iminoacetathydrochlorid (5e)

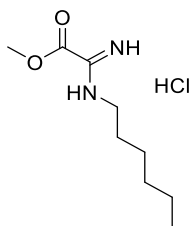


295.76 g/mol
C₁₁H₂₂ClN₃O₄

Hergestellt nach der **AVV3** aus 1.30 Äq. Imidoesterbase **4** (9.93 g, 62.4 mmol) und 1.00 Äq. *tert*-Butyl-(3-aminopropyl)carbamathydrochlorid (10.1 g, 48.0 mmol).

Ausbeute: 71 % über drei Schritte (13.9 g, 46.8 mmol), farbloser Feststoff.

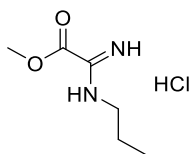
Methyl-2-(hexylamino)2-iminoacetathydrochlorid (5f)



222.71 g/mol
C₉H₁₉ClN₂O₂

Hergestellt nach der **AVV3** aus 1.20 Äq. Imidoesterbase **4** (5.73 g, 36.0 mmol) und 1.00 Äq. Hexylammoniumchlorid (4.13 g, 30.0 mmol).

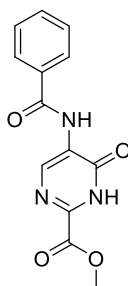
Ausbeute: 72 % über drei Schritte (6.62 g, 29.7 mmol), farbloser Feststoff.

Methyl-2-imino-2-(propylamino)acetathydrochlorid (5g)

180.63 g/mol
C₆H₁₃ClN₂O₂

Hergestellt nach der **AVV3** aus 1.30 Äq. Imidoesterbase **4** (7.04 g, 44.2 mmol) und 1.00 Äq. Propylammoniumchlorid (3.25 g, 34.0 mmol).

Ausbeute: 70 % über drei Schritte (5.98 g, 33.1 mmol), farbloser Feststoff.

Methyl-5-benzamido-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxylat (6a)^[146]

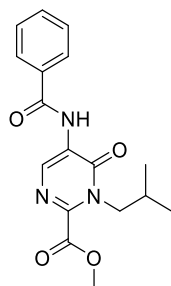
273.25 g/mol
C₁₃H₁₁N₃O₄

In einem Einhalskolben wurden 1.00 Äq. Azlacton **2a** (9.08 g, 41.8 mmol) und 1.00 Äq. Amidinhydrochlorid **5a** (5.79 g, 41.8 mmol) in Acetonitril (80 mL) suspendiert. Unter Rühren wurden 1.30 Äq. Triethylamin (5.50 g, 7.57 mL, 54.3 mmol) zugegeben und die Reaktion anschließend bei 80 °C für 3 h gerührt. Nach vollständigem Eduktumsatz (DC: Cyclohexan:Ethylacetat 7:3) wurde die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt und mit konzentrierter Salzsäure-Lösung (2.0 mL) versetzt. Der präzipitierte Feststoff wurde abfiltriert und mit entmineralisiertem Wasser und Methanol gewaschen. Der Feststoff wurde in Ethylacetat:Methanol (9:1 V/V) suspendiert und bei 80 °C für 20 min gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Produkt abfiltriert, mit Ethylacetat:Methanol (9:1) gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet.

Ausbeute: 53 %, 6.10 g (22.3 mmol), hellgelber Feststoff.

HPLC: 7.449 min, 96.4 %.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.45 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.00 - 7.90 (m, 2H), 7.70 - 7.50 (m, 3H), 3.89 (s, 3H).

Methyl-5-benzamido-1-isobutyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxylat (6b)^[142]

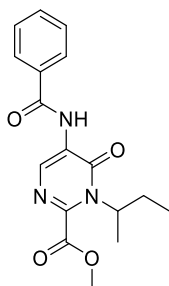
329.36 g/mol
C₁₇H₁₉N₃O₄

Hergestellt nach der **AAV4** aus 1.00 Äq. Azlacton **2a** (4.13 g, 19.0 mmol) und 1.00 Äq. Amidinhydrochlorid **5b** (3.70 g, 35.0 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 8:2. Das Produkt wurde aus Cyclohexan/Ethylacetat kristallisiert.

Ausbeute: 30 %, 1.90 g (5.77 mmol), hellgelber Feststoff.

HPLC: 14.052 min, 96.0 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9.17 (s, 1H), 8.97 (s, 1H), 7.97 - 7.88 (m, 2H), 7.63 - 7.46 (m, 3H), 4.27 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 4.01 (s, 3H), 2.02 (hept, J = 6.9 Hz, 1H), 0.93 (d, J = 6.7 Hz, 6H).

Methyl-5-benzamido-1-(sec-butyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxylat (6c)^[142]

329.36 g/mol
C₁₇H₁₉N₃O₄

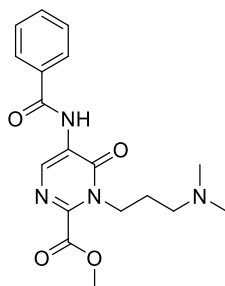
Hergestellt nach der **AAV4** aus 1.00 Äq. Azlacton **2a** (7.60 g, 35.0 mmol) und 1.00 Äq. Amidinhydrochlorid **5c** (6.81 g, 35.0 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 8:2. Das Produkt wurde aus Cyclohexan/Ethylacetat kristallisiert.

Ausbeute: 29 %, 3.07 g (3.28 mmol), gelbes Öl.

HPLC: 13.098 min, 95.3 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9.47 (s, 1H), 8.74 (s, 1H), 8.01 – 7.91 (m, 2H), 7.69 – 7.57 (m, 1H), 7.61 – 7.46 (m, 2H), 4.06 (dq, J = 17.9, 7.6 Hz, 2H), 3.97 (s, 3H), 2.32 – 2.11 (m, 1H), 1.92 – 1.75 (m, 1H), 1.55 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.77 (t, J = 7.4 Hz, 3H).

Methyl-5-benzamido-1-(3-((dimethylamino)propyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxylat (6d)



358.40 g/mol
C₁₈H₂₂N₄O₄

In einem Einhalskolben wurden 1.00 Äq. Pyrimidon **6a** (10.0 mmol, 2.73 g), 1.30 Äq. Triphenylphosphin (13.0 mmol, 3.41 g) und 1.30 Äq. 3-Dimethylamino-1-propanol (13.0 mmol, 1.54 mL, 1.34 g) in THF (40 mL) suspendiert und mittels Eisbad auf 0 °C gekühlt. 1.30 Äq. DIAD (13.0 mmol, 2.56 mL, 2.63 g) wurde tropfenweise zugegeben, bei 0 °C für 10 min und anschließend bei Raumtemperatur für 16 h gerührt. Nach vollständigem Eduktumsatz (DC: Ethylacetat + 1% Triethylamin V/V) wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Diethylether (70 mL) aufgenommen. Unter Rühren wurde *n*-Hexan (10 mL) zugegeben und die Lösung bei Raumtemperatur für 30 min gerührt. Die Suspension wurde filtriert und der Feststoff mit *n*-Hexan:Ethylacetat (1:1 V/V, 100 mL) gewaschen. Das Rohprodukt wurde an Kieselgel adsorbiert und säulenchromatografisch gereinigt (Eluenten: Zunächst Ethylacetat, danach Wechsel auf Dichlormethan:Methanol 10:1 V/V + 0.1% Triethylamin).

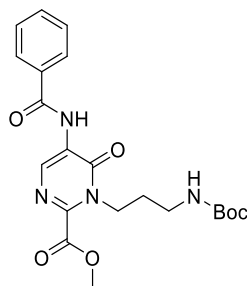
Ausbeute: 19 %, 663 mg (1.85 mmol), beiger Feststoff.

Schmelzpunkt: 97 °C.

HPLC: 6.972 min, 93.1 %.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.52 (s, 1H), 8.78 (s, 1H), 8.01 – 7.91 (m, 2H), 7.68 – 7.50 (m, 3H), 4.19 – 4.10 (m, 2H), 3.94 (s, 3H), 2.23 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.09 (s, 6H), 1.83 (p, *J* = 6.8 Hz, 2H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 170.3, 165.4, 161.0, 156.8, 144.5, 136.5, 133.2, 132.4, 128.7, 127.6, 59.7, 55.9, 53.5, 44.8, 25.3, 20.8, 14.1.

Methyl-5-benzamido-1-(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxylat (6e)

430.46 g/mol
C₂₁H₂₆N₄O₆

Hergestellt nach der **AAV4** aus 1.00 Äq. Azlacton **2a** (6.52 g, 30.0 mmol) und 1.00 Äq. Amidinhydrochlorid **5e** (8.87 g, 30.0 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 7:3. Das Produkt wurde aus Cyclohexan/Ethylacetat kristallisiert.

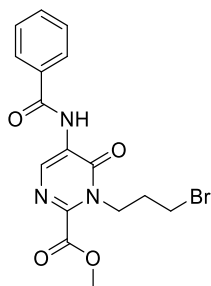
Ausbeute: 46 %, 5.96 g (13.9 mmol), beiger Feststoff.

Schmelzpunkt: 102 °C.

HPLC: 12.911 min, 97.4 %.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.19 (s, 1H), 8.93 (s, 1H), 7.96 - 7.87 (m, 2H), 7.65 - 7.45 (m, 3H), 4.97 (s, 1H), 4.32 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.02 (s, 3H), 3.20 (q, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.02 (p, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.45 (s, 9H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 165.8, 161.1, 157.8, 156.1, 142.4, 134.8, 133.4, 132.8, 129.1, 128.3, 127.5, 79.6, 54.1, 44.3, 29.7, 28.6.

Methyl-5-benzamido-1-(3-brompropyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxylat (6f)

394.23 g/mol
C₁₆H₁₆BrN₃O₄

Hergestellt nach der **AAV5** aus 1.00 Äq. Pyrimidon **6a** (820 mg, 3.00 mmol), 1.05 Äq. Natriumhydrid (126 mg, 3.15 mmol, 60% Dispersion in Mineralöl) und 8.00 Äq. 1,3-Dibrompropan (2.44 ml, 24.0 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 8:2. Das Produkt wurde aus Cyclohexan/Ethylacetat kristallisiert.

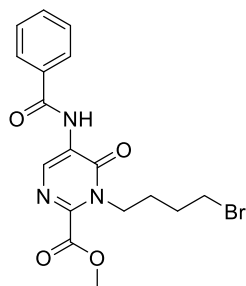
Ausbeute: 42 %, 497 mg (1.26 mmol), gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 88 °C.

HPLC: 12.533 min, 97.7 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9.17 (s, 1H), 8.93 (s, 1H), 7.95 – 7.87 (m, 2H), 7.62 – 7.54 (m, 1H), 7.54 – 7.45 (m, 2H), 4.44 – 4.32 (m, 2H), 4.02 (s, 3H), 3.48 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 2.47 – 2.34 (m, 2H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 165.7, 160.9, 157.6, 142.3, 134.7, 133.2, 132.8, 129.1, 128.3, 127.4, 54.1, 45.9, 31.4, 29.9.

Methyl-5-benzamido-1-(4-brombutyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxylat (6g)

408.25 g/mol
C₁₇H₁₈BrN₃O₄

Hergestellt nach der **AAV5** aus 1.00 Äq. Pyrimidon **6a** (1.36 g, 5.00 mmol), 1.10 Äq. Natriumhydrid (220 mg, 5.50 mmol, 60% Dispersion in Mineralöl) und 8.00 Äq. 1,4-Dibrombutan (4.78 ml, 40.0 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 8:2. Das Produkt wurde aus Cyclohexan/Ethylacetat kristallisiert.

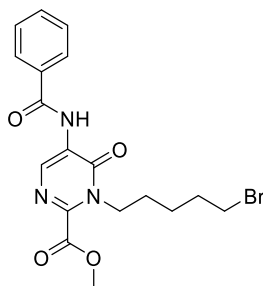
Ausbeute: 37 %, 757 mg (1.86 mmol), gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 95 °C.

HPLC: 14.148 min, 96.3 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9.18 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 7.96 - 7.86 (m, 2H), 7.62 - 7.46 (m, 3H), 4.36 - 4.24 (m, 2H), 4.02 (s, 3H), 3.50 - 3.39 (m, 2H), 2.01 - 1.92 (m, 4H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 165.7, 161.1, 157.5, 142.2, 134.6, 133.3, 132.8, 129.1, 128.3, 127.4, 54.1, 45.6, 32.6, 29.9, 27.8.

Methyl-5-benzamido-1-(5-brompentyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxylat (6h)

422.28 g/mol
C₁₈H₂₀BrN₃O₄

Hergestellt nach der **AAV5** aus 1.00 Äq. Pyrimidon **6a** (1.36 g, 5.00 mmol), 1.20 Äq. Natriumhydrid (240 mg, 6.00 mmol, 60% Dispersion in Mineralöl) und 8.00 Äq. 1,5-Dibrompentan (5.45 ml, 40.0 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 9:1. Das Produkt wurde aus Cyclohexan/Ethylacetat kristallisiert.

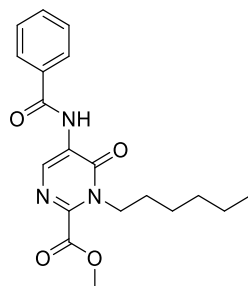
Ausbeute: 29 %, 613 mg (1.46 mmol), gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 98 °C.

HPLC: 14.067 min, 97.7 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9.15 (s, 1H), 8.93 (s, 1H), 7.93 – 7.86 (m, 2H), 7.60 – 7.43 (m, 3H), 4.30 – 4.17 (m, 2H), 4.00 (s, 3H), 1.97 – 1.75 (m, 5H), 1.63 – 1.43 (m, 3H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 165.7, 161.0, 157.4, 142.3, 134.6, 133.3, 132.7, 129.0, 128.2, 127.4, 54.0, 46.3, 33.4, 32.0, 28.0, 25.3.

Methyl-5-benzamido-1-hexyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxylat (6i)

357.41 g/mol
C₁₉H₂₀N₃O₄

Hergestellt nach der **AVV4** aus 1.00 Äq. Azlacton **2a** (5.43 g, 25.0 mmol) und 1.00 Äq. Amidinhydrochlorid **5f** (5.57 g, 35.0 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 9:1. Das Produkt wurde aus Cyclohexan/Ethylacetat kristallisiert.

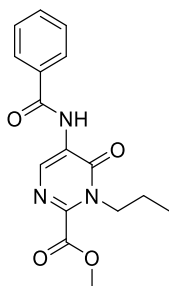
Ausbeute: 56 %, 4.97 g (13.9 mmol), gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 72 °C.

HPLC: 15.534 min, 97.8 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9.14 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 7.95 - 7.83 (m, 2H), 7.60 - 7.42 (m, 3H), 4.27 - 4.16 (m, 2H), 3.98 (s, 3H), 1.83 - 1.67 (m, 2H), 1.42 - 1.23 (m, 6H), 0.92 - 0.81 (m, 3H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 165.6, 161.1, 157.3, 142.6, 134.6, 133.3, 132.6, 128.9, 128.1, 127.3, 53.8, 46.5, 31.2, 28.9, 26.4, 22.5, 14.0.

Methyl-5-benzamido-6-oxo-1-propyl-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxylat (6j)

315.33 g/mol
C₁₆H₁₇N₃O₄

Hergestellt nach der **AVV4** aus 1.00 Äq. Azlacton **2a** (7.17 g, 33.0 mmol) und 1.00 Äq. Amidinhydrochlorid **5g** (5.96 g, 33.0 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat 8:2. Das Produkt wurde aus Cyclohexan/Ethylacetat kristallisiert.

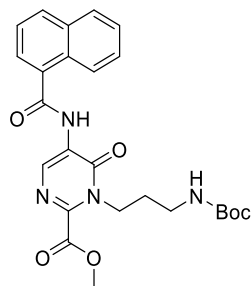
Ausbeute: 63 %, 6.59 g (20.9 mmol), hellgelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 87 °C.

HPLC: 12.411 min, 99.9 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9.15 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 7.95 – 7.85 (m, 2H), 7.62 – 7.42 (m, 3H), 4.26 – 4.15 (m, 2H), 4.0 (s, 3H), 1.89 – 1.70 (m, 2H), 0.97 (t, J = 7.4 Hz, 3H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 165.7, 161.1, 157.4, 142.6, 134.6, 133.4, 132.7, 129.0, 128.2, 127.4, 53.9, 47.9, 22.5, 11.2.

Methyl-5-(1-naphthamido)-1-(3-*tert*-butoxycarbonyl)amino)propyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxylat (6k)

480.52 g/mol
C₂₅H₂₈N₄O₆

Hergestellt nach der **AVV4** aus 1.00 Äq. Azlacton **2b** (267 mg, 1.00 mmol) und 1.00 Äq. Amidinhydrochlorid **5e** (296 mg, 1.00 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 8:2. Das Produkt wurde aus Cyclohexan/Ethylacetat kristallisiert.

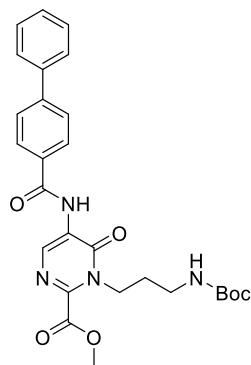
Ausbeute: 65 %, 312 mg (0.65 mmol), gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 94 °C.

HPLC: 13.750 min, 95.4 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9.28 (s, 1H), 8.73 (s, 1H), 8.46 - 8.37 (m, 1H), 8.05 - 7.97 (m, 1H), 7.97 - 7.84 (m, 1H), 7.83 - 7.74 (m, 1H), 7.65 - 7.47 (m, 3H), 4.98 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 4.28 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 4.03 (s, 3H), 3.18 (q, J = 6.1 Hz, 2H), 2.07 - 1.92 (m, 2H), 1.44 (s, 9H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 167.9, 161.1, 157.6, 156.1, 142.7, 135.0, 133.9, 132.6, 132.2, 130.2, 128.7, 128.4, 127.9, 126.9, 126.0, 125.2, 124.7, 54.1, 44.3, 37.8, 29.7, 28.5.

Methyl-5-([1,1'-biphenyl]-4-carboxamido)-1-(5-bromopentyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxylat (6l)

506.56 g/mol
C₂₇H₃₀N₄O₆

Hergestellt nach der **AVV4** aus 1.00 Äq. Azlacton **2c** (838 mg, 3.00 mmol) und 1.00 Äq. Amidinhydrochlorid **5e** (887 mg, 3.00 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 8:2. Das Produkt wurde aus Cyclohexan/Ethylacetat kristallisiert.

Ausbeute: 52 %, 793 mg (1.56 mmol), gelber Feststoff.

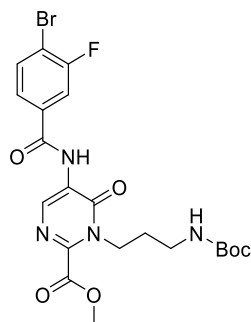
Schmelzpunkt: 137 °C.

HPLC: 15.622 min, 99.1 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9.21 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.04 - 7.94 (m, 2H), 7.78 - 7.70 (m, 2H), 7.67 - 7.59 (m, 2H), 7.53 - 7.36 (m, 3H), 4.99 (s, 1H), 4.33 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.02 (s, 3H), 3.21 (q, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.03 (p, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.46 (s, 9H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 165.4, 161.1, 157.8, 156.2, 145.7, 142.4, 139.8, 134.8, 132.0, 129.1, 128.4, 128.3, 128.0, 127.7, 127.4, 79.5, 54.0, 44.3, 37.9, 29.8, 28.6.

Methyl-5-(4-brom-3-fluorbenzamido)-1-(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxylat (6m)



527.35 g/mol
C₂₁H₂₄BrFN₄O₆

Hergestellt nach der **AVV4** aus 1.00 Äq. Azlacton **2d** (6.28 g, 20.0 mmol) und 1.00 Äq. Amidinhydrochlorid **5e** (5.91 g, 20.0 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 8:2. Das Produkt wurde aus Cyclohexan/Ethylacetat kristallisiert.

Ausbeute: 45 %, 4.75 g (9.00 mmol), gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 137 °C.

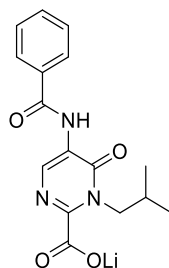
HPLC: 14.627 min, 96.1 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9.13 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 7.76 - 7.64 (m, 2H), 7.60 - 7.50 (m, 1H), 4.95 (s, 1H), 4.30 (dd, J = 8.1, 6.4 Hz, 2H), 4.02 (s, 3H), 3.20 (q, J = 6.2 Hz, 2H), 2.01 (p, J = 5.8 Hz, 2H), 1.45 (s, 9H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 163.6, 161.1 (d, J_{C-F} = 9.9 Hz), 157.7 (d, J_{C-F} = 9.6 Hz), 156.1, 142.9, 135.2, 134.5 (d, J_{C-F} = 6.1 Hz), 134.4, 127.8, 123.7 (d, J_{C-F} = 3.9 Hz), 115.9 (d, J_{C-F} = 24.2 Hz), 114.6 (d, J_{C-F} = 21.2 Hz), 79.6, 54.1, 54.1, 44.4, 37.8, 29.7, 28.5.

¹⁹F (565 MHz, CDCl₃): δ 130.4.

Lithium-5-benzamido-1-isobutyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxylat (7a)^[142]

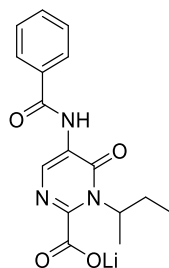


321.26 g/mol
C₁₆H₁₆LiN₃O₄

Hergestellt nach der **AVV8** aus 1.00 Äq. Pyrimidon **6b** (659 mg, 2.00 mmol) und 1.00 Äq. Lithiumhydroxidmonohydrat (83.9 mg, 2.00 mmol).

Ausbeute: 89 %, 570 mg (1.77 mmol), hellgelber Feststoff.

Lithium-5-benzamido-1-(sec-butyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxylat (7b)^[142]

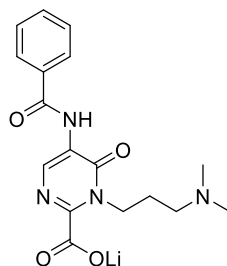


321.26 g/mol
C₁₆H₁₆LiN₃O₄

Hergestellt nach der **AVV8** aus 1.00 Äq. Pyrimidon **6c** (2.44 g, 7.40 mmol) und 1.00 Äq. Lithiumhydroxidmonohydrat (311 mg, 7.40 mmol).

Ausbeute: 92 %, 2.20 g (6.84 mmol), hellgelber Feststoff.

Lithium-5-benzamido-1-(3-((dimethylamino)propyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxylat (7c)

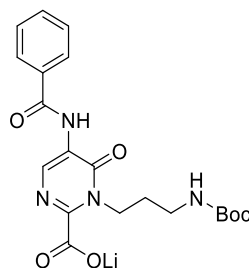


422.37 g/mol
C₂₀H₂₃LiN₄O₆

Hergestellt nach der **AVV8** aus 1.00 Äq. Pyrimidon **6d** (53.8 mg, 0.15 mmol) und 1.20 Äq. Lithiumhydroxidmonohydrat (7.55 mg, 0.18 mmol).

Ausbeute: 99 %, 52.5 mg (0.15 mmol), hellgelber Feststoff.

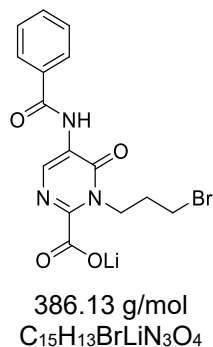
Lithium-5-benzamido-1-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)propyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxylat (7d)



422.37 g/mol
C₂₀H₂₃LiN₄O₆

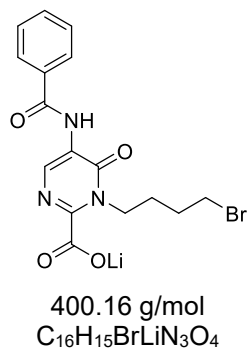
Hergestellt nach der **AVV8** aus 1.00 Äq. Pyrimidon **6e** (861 mg, 2.00 mmol) und 1.00 Äq. Lithiumhydroxidmonohydrat (101 mg, 2.00 mmol).

Ausbeute: 95 %, 805 mg (1.91 mmol), hellgelber Feststoff.

Lithium-5-benzamido-1-(3-brompropyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxylat (7e)

Hergestellt nach der **AVV8** aus 1.00 Äq. Pyrimidon **6g** (859 mg, 2.18 mmol) und 1.00 Äq. Lithiumhydroxidmonohydrat (91.5 mg, 2.18 mmol).

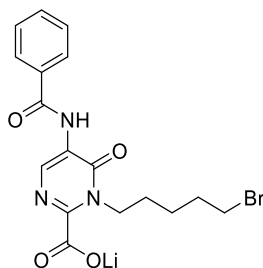
Ausbeute: 88 %, 739 mg (1.91 mmol), hellgelber Feststoff.

Lithium-5-benzamido-1-(4-brombutyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxylat (7f)

Hergestellt nach der **AVV8** aus 1.00 Äq. Pyrimidon **6h** (204 mg, 0.50 mmol) und 1.00 Äq. Lithiumhydroxidmonohydrat (21.0 mg, 0.50 mmol).

Ausbeute: 93 %, 185 mg (0.46 mmol), hellgelber Feststoff.

Lithium-5-benzamido-1-(5-brompentyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxylat (7g)

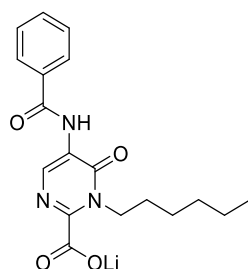


414.18 g/mol
C₁₇H₁₇BrLiN₃O₄

Hergestellt nach der **AVV8** aus 1.00 Äq. Pyrimidon **6i** (549 mg, 1.30 mmol) und 1.00 Äq. Lithiumhydroxidmonohydrat (54.5 mg, 1.30 mmol).

Ausbeute: 86 %, 461 mg (1.11 mmol), hellgelber Feststoff.

Lithium-5-benzamido-1-hexyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxylat (7h)

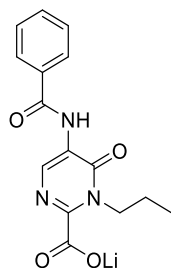


349.32 g/mol
C₁₈H₂₀LiN₃O₄

Hergestellt nach der **AVV8** aus 1.00 Äq. Pyrimidon **6f** (715 mg, 2.00 mmol) und 1.00 Äq. Lithiumhydroxidmonohydrat (83.9 mg, 2.00 mmol).

Ausbeute: 96 %, 670 mg (1.92 mmol), hellgelber Feststoff.

Lithium-5-benzamido-6-oxo-1-propyl-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxylat (7i)

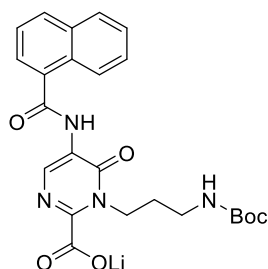


519.25 g/mol
C₂₀H₂₁BrFLiN₄O₆

Hergestellt nach der **AVV8** aus 1.00 Äq. Pyrimidon **6j** (3.15 g, 10.0 mmol) und 1.00 Äq. Lithiumhydroxidmonohydrat (420 mg, 10.0 mmol).

Ausbeute: 89 %, 2.74 g (8.93 mmol), hellgelber Feststoff.

Lithium-5-(1-naphthamido)-1-(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxylat (7j)

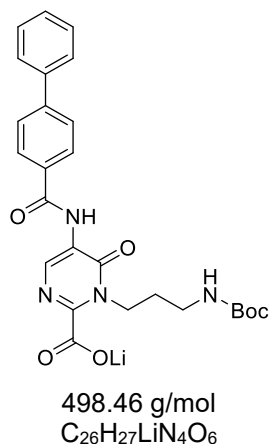


472.43 g/mol
C₂₄H₂₅LiN₄O₆

Hergestellt nach der **AVV8** aus 1.00 Äq. Pyrimidon **6k** (481 mg, 1.00 mmol) und 1.00 Äq. Lithiumhydroxidmonohydrat (42.0 mg, 1.00 mmol).

Ausbeute: 47 %, 220 mg (0.47 mmol), farbloser Feststoff.

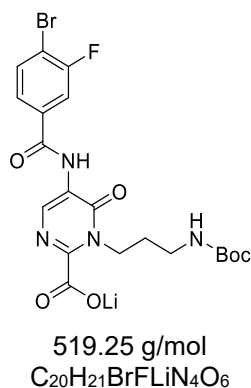
Lithium-5-([1,1'-biphenyl]-4-carboxamido)-benzamido-1-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)propyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxylat (7k)



Hergestellt nach der **AVV8** aus 1.00 Äq. Pyrimidon **6I** (507 mg, 1.00 mmol) und 1.00 Äq. Lithiumhydroxidmonohydrat (42.0 mg, 1.00 mmol).

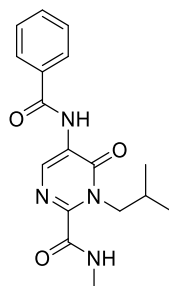
Ausbeute: 59 %, 295 mg (0.59 mmol), farbloser Feststoff.

Lithium-5-(4-brom-3-fluorbenzamido)-1-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)propyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxylat (7I)



Hergestellt nach der **AVV8** aus 1.00 Äq. Pyrimidon **6m** (3.69 g, 7.00 mmol) und 1.00 Äq. Lithiumhydroxidmonohydrat (294 mg, 7.00 mmol).

Ausbeute: 98 %, 3.55 g (6.83 mmol), hellgelber Feststoff.

5-Benzamido-1-isobutyl-*N*-methyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxamid (8a)^[142]

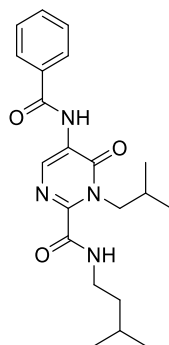
328.37 g/mol
C₁₇H₂₀N₄O₃

Hergestellt nach der **AVV6** aus 1.00 Äq. Pyrimidon **6b** (4.25 g, 12.9 mmol) und 8.00 Äq. Methylamin (40% in Wasser V/V, 11.4 mL, 8.01 g, 103 mmol).

Ausbeute: 96 %, 4.06 g (12.4 mmol), farbloser Feststoff.

HPLC: 11.613 min, 97.6 %.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 9.07 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 7.94 – 7.89 (m, 2H), 7.76 (s, 1H), 7.60 – 7.54 (m, 1H), 7.53 – 7.47 (m, 2H), 4.67 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 2.97 (d, J = 5.1 Hz, 3H), 2.09 (hept, J = 6.8 Hz, 1H), 0.92 (d, J = 6.7 Hz, 6H).

5-Benzamido-1-isobutyl-N-isopentyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxamid (8b)

384.48 g/mol
C₂₁H₂₈N₄O₃

Hergestellt nach der **AVV6** aus 1.00 Äq. Pyrimidon **6b** (1.32 g, 4.00 mmol) und 8.00 Äq. Isopentylamin (3.71 mL, 2.79 g, 32.0 mmol).

Ausbeute: 92 %, 1.42 g (3.69 mmol), farbloser Feststoff.

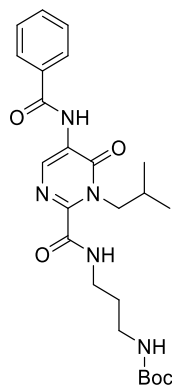
Schmelzpunkt: 107 °C.

HPLC: 15.685 min, 98.6 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9.07 (s, 1H), 8.97 (s, 1H), 7.97 – 7.87 (m, 2H), 7.68 (s, 1H), 7.63 – 7.38 (m, 3H), 4.67 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 3.46 – 3.35 (m, 2H), 2.08 (hept, J = 6.9 Hz, 1H), 1.77 – 1.57 (m, 1H), 1.57 – 1.45 (m, 2H), 0.95 (d, J = 6.6 Hz, 6H), 0.91 (d, J = 6.7 Hz, 6H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 165.8, 160.5, 158.5, 144.0, 133.7, 133.5, 132.7, 129.0, 127.7, 127.4, 51.1, 38.4, 38.2, 29.0, 26.0, 22.5, 20.0.

5-Benzamido-1-isobutyl-N-(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxamid (8c)



471.56 g/mol
C₂₄H₃₃N₅O₅

Hergestellt nach der **AVV6** aus 1.00 Äq. Pyrimidon **6b** (1.32 g, 4.00 mmol) und 8.00 Äq. *tert*-Butyl-(3-aminopropyl)carbamat (5.58 mL, 5.58 g, 32.0 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 7:3.

Ausbeute: 76 %, 1.44 g (3.05 mmol), farbloser Feststoff.

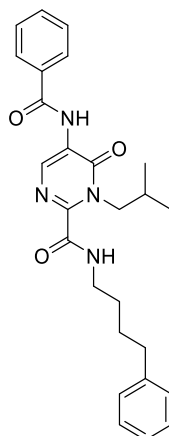
Schmelzpunkt: 140 °C.

HPLC: 13.818 min, 99.9 %.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 9.07 (s, 1H), 8.96 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.96 – 7.86 (m, 2H), 7.62 – 7.43 (m, 3H), 4.93 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 4.63 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 3.44 (q, J = 6.5 Hz, 2H), 3.33 – 3.09 (m, 3H), 2.16 – 1.96 (m, 1H), 1.75 (p, J = 6.5 Hz, 2H), 1.43 (s, 9H), 0.91 (d, J = 6.7 Hz, 6H).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 170.6, 165.8, 161.1, 158.4, 156.5, 144.1, 133.9, 133.5, 132.6, 129.0, 128.7, 127.7, 127.4, 79.5, 77.4, 77.2, 76.9, 51.1, 37.6, 37.0, 36.0, 30.3, 30.1, 29.0, 28.5, 28.5, 23.4, 20.0.

5-Benzamido-1-isobutyl-6-oxo-*N*-(4-phenylbutyl)-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxamid (8d)



446.55 g/mol
C₂₆H₃₀N₄O₃

Hergestellt nach der **AVV6** aus 1.00 Äq. Pyrimidon **6b** (988 mg, 3.00 mmol) und 8.00 Äq. 4-Phenylbutylamin (3.87 mL, 3.66 g, 24.0 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 8:2.

Ausbeute: 98 %, 1.31 g (2.94 mmol), farbloser Feststoff.

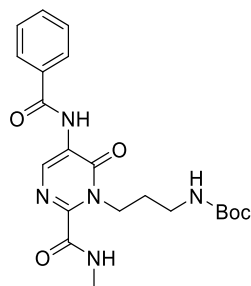
Schmelzpunkt: 94 °C.

HPLC: 16.289 min, 98.2 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9.06 (s, 1H), 8.97 (s, 1H), 7.96 – 7.86 (m, 2H), 7.79 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.62 – 7.51 (m, 1H), 7.55 – 7.42 (m, 2H), 7.33 – 7.18 (m, 2H), 7.23 – 7.11 (m, 3H), 4.65 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 3.40 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.65 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.18 – 1.97 (m, 1H), 1.79 – 1.56 (m, 2H), 0.90 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 165.8, 160.6, 158.4, 144.0, 142.0, 133.7, 133.4, 132.6, 129.0, 128.4, 127.6, 127.4, 125.9, 51.0, 39.8, 35.5, 28.9, 28.7, 19.9.

5-Benzamido-1-(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propyl)-*N*-methyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxamid (8e)



429.48 g/mol
C₂₁H₂₇N₅O₅

Hergestellt nach der **AVV6** aus 1.00 Äq. Pyrimidon **6e** (2.15 g, 5.00 mmol) und 8.00 Äq. Methylamin (40% in Wasser V/V, 3.46 mL, 3.11 g, 40.0 mmol).

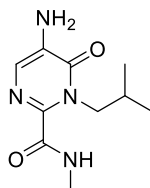
Ausbeute: 93 %, 1.99 g (4.63 mmol), farbloser Feststoff.

Schmelzpunkt: 138 °C.

HPLC: 11.545 min, 99.8 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9.09 (s, 1H), 8.95 (s, 1H), 7.97 – 7.87 (m, 2H), 7.83 (s, 1H), 7.65 – 7.53 (m, 1H), 7.56 – 7.45 (m, 2H), 5.16 (s, 1H), 4.67 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.19 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 2.98 (d, *J* = 5.1 Hz, 3H), 2.12 – 1.97 (m, 2H), 1.45 (s, 9H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 165.9, 160.7, 158.5, 156.2, 143.3, 133.9, 133.4, 132.8, 129.1, 127.8, 127.4, 43.9, 29.7, 28.6, 26.7.

5-Amino-1-isobutyl-N-methyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxamid (9a)^[142]

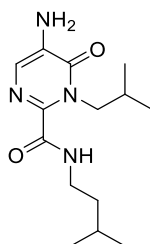
224.26 g/mol
C₁₀H₁₆N₄O₂

Hergestellt nach der **AVV7** aus 1.00 Äq. Pyrimidonamid **8a** (4.60 g, 14.0 mmol) und 3.00 Äq. Natriumhydroxid (1.68 g, 42.0 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 1:1.

Ausbeute: 55 %, 1.73 g (7.72 mmol), hellgelber Feststoff.

HPLC: 5.488 min, 99.9 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.55 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 4.62 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 4.35 (s, 2H), 2.91 (d, J = 5.2 Hz, 3H), 2.06 (hept, J = 6.9 Hz, 1H), 0.88 (d, J = 6.7 Hz, 6H).

5-Amino-1-isobutyl-N-isopentyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxamid (9b)

280.37 g/mol
C₁₄H₂₄N₄O₂

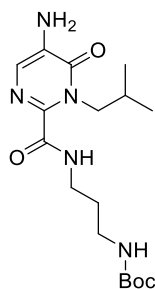
Hergestellt nach der **AVV7** aus 1.00 Äq. Pyrimidonamid **8b** (1.27 g, 3.30 mmol) und 3.00 Äq. Natriumhydroxid (396 mg, 9.90 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 6:4.

Ausbeute: 77 %, 708 mg (2.53 mmol), gelbes Öl.

HPLC: 11.864 min, 97.1 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.45 (s, 1H), 7.19 (s, 1H), 4.56 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 4.07 (s, 2H), 3.39 – 3.23 (m, 2H), 1.98 (dq, J = 13.8, 6.9 Hz, 1H), 1.59 (dp, J = 13.3, 6.7 Hz, 1H), 1.47 – 1.36 (m, 2H), 0.87 (d, J = 6.6 Hz, 6H), 0.82 (d, J = 6.7 Hz, 6H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 161.1, 158.3, 139.9, 135.5, 123.9, 53.6, 50.3, 38.3, 38.2, 28.9, 26.0, 22.5, 19.9.

5-Amino-1-isobutyl-N-3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxamid (9c)

367.45 g/mol
C₁₇H₂₉N₅O₄

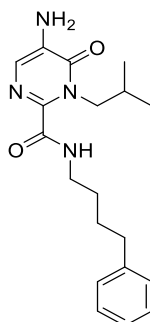
Hergestellt nach der **AVV7** aus 1.00 Äq. Pyrimidonamid **8c** (1.42 g, 3.00 mmol) und 3.00 Äq. Natriumhydroxid (360 mg, 9.00 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 3:7.

Ausbeute: 92 %, 1.01 g (2.75 mmol), gelbliches Öl.

HPLC: 11.434 min, 95.5 %.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 7.82 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 7.23 (s, 1H), 5.01 (s, 1H), 4.56 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 4.26 (s, 3H), 3.37 (q, J = 6.4 Hz, 2H), 3.15 (q, J = 6.3 Hz, 2H), 2.01 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 1.70 (q, J = 6.5 Hz, 2H), 1.40 (s, 9H), 0.85 (d, J = 6.8 Hz, 6H).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 161.7, 158.2, 156.4, 139.6, 135.6, 123.9, 79.3, 53.5, 50.3, 37.6, 36.8, 30.1, 28.9, 28.5, 27.8, 24.4, 19.9.

5-Amino-1-isobutyl-N-(4-phenylbutyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxamid (9d)

342.44 g/mol
C₁₉H₂₆N₄O₂

Hergestellt nach der **AVV7** aus 1.00 Äq. Pyrimidonamid **8d** (893 mg, 2.00 mmol) und 3.00 Äq. Natriumhydroxid (240 mg, 6.00 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 7:3.

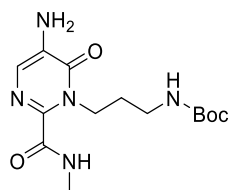
Ausbeute: 84 %, 572 mg (1.67 mmol), gelbes Öl.

HPLC: 13.183 min, 95.6 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.54 (s, 1H), 7.34 – 7.13 (m, 6H), 4.63 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 4.32 (s, 2H), 3.37 (q, J = 6.8 Hz, 2H), 2.65 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.15 – 1.96 (m, 1H), 1.78 – 1.54 (m, 3H), 0.88 (d, J = 6.7 Hz, 6H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 161.2, 158.4, 142.1, 139.8, 135.5, 128.5, 128.5, 126.0, 123.9, 50.4, 39.7, 35.6, 31.1, 29.1, 28.9, 28.8, 20.0.

5-Amino-1-(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propyl)-*N*-methyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxamid (**9e**)



325.37 g/mol
C₁₄H₂₃N₅O₄

Hergestellt nach der **AVV7** aus 1.00 Äq. Pyrimidonamid **8e** (1.72 g, 4.00 mmol) und 3.00 Äq. Natriumhydroxid (480 mg, 12.0 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Dichlormethan und Dichlormethan im Verhältnis 90:10. Das gelbliche Öl wurde in wenig Dichlormethan (2 mL) gelöst und kaltes Cyclohexan (100 mL) getropft. Die entstandene Suspension wurde im Ultraschallbad behandelt und der Feststoff abfiltriert.

Ausbeute: 66 %, 855 mg (2.63 mmol), hellgelber Feststoff.

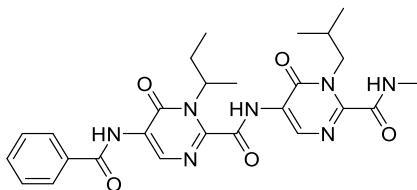
Schmelzpunkt: 144 °C.

HPLC: 7.474 min, 96.9 %.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 7.69 (q, J = 5.0 Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 5.36 (s, 1H), 4.64 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 4.10 (s, 3H), 3.16 (q, J = 6.1 Hz, 2H), 2.93 (d, J = 5.1 Hz, 3H), 2.01 (pent, 2H), 1.45 (s, 9H).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 161.4, 158.3, 156.2, 138.9, 135.7, 124.0, 79.1, 42.9, 37.8, 29.7, 28.6, 26.5.

5-Benzamido-(1-sec-butyl)-N-(1-isobutyl-2-(methylcarbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxamid (10a)^[142]



521.58 g/mol
C₂₆H₃₁N₇O₅

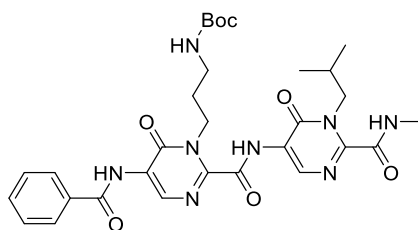
Hergestellt nach der **AVV9** aus 1.40 Äq. Lithiumcarboxylat **7b** (1.35 g, 4.20 mmol) und 1.00 Äq. Enamin-Monomer **9a** (673 mg, 3.00 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 1:1. Das Produkt wurde aus Cyclohexan/Ethylacetat kristallisiert.

Ausbeute: 60 %, 936 mg (1.79 mmol), hellgelber Feststoff.

HPLC: 14.859 min, 96.9 %.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 10.12 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 9.03 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 7.96 – 7.92 (m, 2H), 7.67 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 7.62 – 7.56 (m, 1H), 7.54 – 7.47 (m, 2H), 5.24 (hept, J = 6.8 Hz, 1H), 4.68 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 2.98 (d, J = 5.1 Hz, 3H), 2.28 (hept, 1H), 2.16 – 2.06 (m, 1H), 2.04 – 1.94 (m, 1H), 1.71 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.93 (dd, J = 6.8, 2.0 Hz, 6H), 0.86 (t, J = 7.4 Hz, 3H).

Tert-butyl-(3-(5-benzamido-2-((1-isobutyl-2-(methylcarbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)carbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin)propyl)carbamate (10b)



622.68 g/mol
C₃₀H₃₈N₈O₇

Hergestellt nach der **AVV9** aus 1.40 Äq. Lithiumcarboxylat **7d** (142 mg, 0.34 mmol) und 1.00 Äq. Enamin-Monomer **9a** (53.8 mg, 0.24 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 4:6. Das Produkt wurde aus Cyclohexan/Ethylacetat kristallisiert.

Ausbeute: 67 %, 100 mg (0.16 mmol), gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 153 °C.

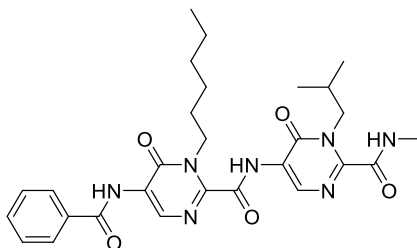
HPLC: 15.153 min, 97.1 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 10.56 (s, 1H), 9.17 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.92 (s, 1H), 7.97 – 7.86 (m, 2H), 7.71 (s, 1H), 7.65 – 7.53 (m, 1H), 7.51 (dd, *J* = 8.2, 6.4 Hz, 2H), 5.15 (s, 1H), 4.72 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.65 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 3.23 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.97 (d, *J* = 5.0 Hz, 3H), 2.13 – 1.99 (m, 3H), 1.45 (s, 9H), 0.92 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 165.8, 161.0, 158.4, 158.1, 158.0, 156.2, 144.9, 141.4, 134.3, 133.6, 133.3, 132.8, 129.1, 128.5, 127.5, 127.4, 127.0, 51.2, 43.9, 37.9, 31.0, 29.9, 28.9, 28.6, 26.7, 19.9.

HR-MS (ESI⁺): ber. für [C₃₀H₃₉N₈O₇+H⁺] *m/z*: 623.2936; gef.: 623.2942.

5-Benzamido-1-hexyl-N-(1-isobutyl-2-(methylcarbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxamid (10c)



549.63 g/mol
C₂₈H₃₅N₇O₅

Hergestellt nach der **AVV9** aus 1.50 Äq. Lithiumcarboxylat **7e** (157 mg, 0.45 mmol) und 1.00 Äq. Enamin-Monomer **9a** (67.3 mg, 0.30 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 6:4. Das Produkt wurde aus Cyclohexan/Ethylacetat kristallisiert.

Ausbeute: 79 %, 131 mg (0.24 mmol), gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 140 °C.

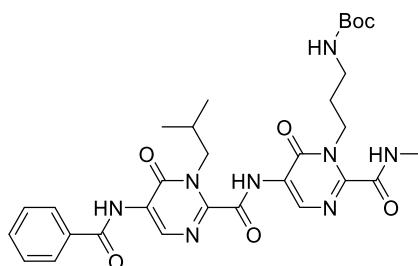
HPLC: 16.431 min, 96.4 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 10.53 (s, 1H), 9.17 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 8.95 (s, 1H), 7.99 – 7.87 (m, 2H), 7.68 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 7.63 – 7.47 (m, 3H), 4.68 (q, J = 4.3 Hz, 4H), 2.98 (d, J = 5.1 Hz, 3H), 2.18 – 2.01 (m, 1H), 1.79 (h, J = 8.1 Hz, 3H), 1.44 (m, 2H), 1.44 – 1.27 (m, 8H), 0.96 – 0.85 (m, 9H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 165.8, 161.1, 158.3, 158.2, 158.1, 144.8, 141.7, 134.7, 134.2, 133.6, 133.4, 132.8, 129.1, 128.5, 127.5, 127.1, 53.9, 51.1, 46.6, 46.1, 31.4, 29.5, 28.9, 26.8, 26.6, 22.7, 19.9, 14.1.

HR-MS (ESI+): ber. für [C₂₈H₃₅N₇O₅+H⁺] m/z : 550.2772; gef.: 550.2779.

***Tert*-butyl-(3-(5-(5-benzamido-1-isobutyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxamido)-2-(methylcarbamoyl)-6-1,6-dihydroprimidin)propyl)carbamat (10d)**



622.68 g/mol
C₃₀H₃₈N₈O₇

Hergestellt nach der **AVV9** aus 1.40 Äq. Lithiumcarboxylat **7a** (675 mg, 2.10 mmol) und 1.00 Äq. Enamin-Monomer **9e** (488 mg, 1.50 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 4:6. Das Produkt wurde aus Cyclohexan/Ethylacetat kristallisiert.

Ausbeute: 47 %, 442 mg (0.71 mmol), gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 155 °C.

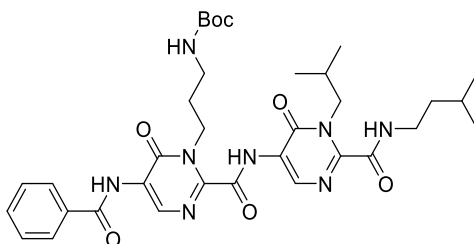
HPLC: 15.807 min, 96.7 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 10.51 (s, 1H), 9.18 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 8.95 (s, 1H), 7.98 – 7.89 (m, 2H), 7.76 (s, 1H), 7.65 – 7.53 (m, 1H), 7.56 – 7.45 (m, 2H), 5.16 (s, 1H), 4.72 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 4.70 – 4.62 (m, 2H), 3.20 (q, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.98 (d, *J* = 5.1 Hz, 3H), 2.20 – 1.97 (m, 3H), 1.45 (s, 9H), 0.95 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 165.8, 160.7, 158.5, 158.4, 158.0, 156.2, 141.8, 134.4, 133.4, 132.8, 129.1, 128.5, 127.5, 127.2, 79.3, 51.1, 43.9, 37.9, 29.6, 29.3, 28.6, 26.7, 20.0, 14.2.

HR-MS (ESI+): ber. für [C₃₀H₃₈N₈O₇+H⁺] *m/z*: 623.2936; gef.: 623.2936.

Tert-butyl-(3-(5-benzamido-2-((1-isobutyl-2-(isopentylcarbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)carbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin)propyl)carbamate (10e)



678.79 g/mol
C₃₄H₄₆N₈O₇

Hergestellt nach der **AVV9** aus 1.40 Äq. Lithiumcarboxylat **7d** (804 mg, 1.90 mmol) und 1.00 Äq. Enamin-Monomer **9b** (381 mg, 1.36 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 1:1. Das Produkt wurde aus Cyclohexan/Ethylacetat kristallisiert.

Ausbeute: 74 %, 681 mg (1.00 mmol), gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 127 °C.

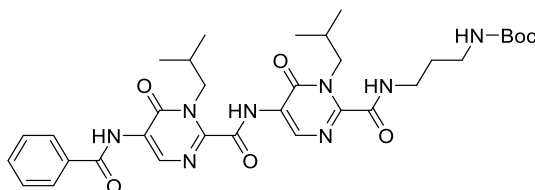
HPLC: 18.385 min, 97.7 %.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 10.56 (s, 1H), 9.19 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 8.95 (s, 1H), 7.96 – 7.91 (m, 2H), 7.64 – 7.57 (m, 2H), 7.55 – 7.49 (m, 2H), 5.13 (s, 1H), 4.73 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 4.67 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 3.45 – 3.38 (m, 2H), 3.24 (d, J = 6.2 Hz, 2H), 2.14 – 2.07 (m, 1H), 2.09 – 2.02 (m, 2H), 1.68 (dp, J = 13.4, 6.7 Hz, 1H), 1.52 (dt, J = 8.5, 7.0 Hz, 2H), 1.46 (s, 9H), 0.96 (d, J = 6.6 Hz, 6H), 0.92 (d, J = 6.7 Hz, 6H).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 165.8, 160.4, 158.4, 158.2, 158.0, 156.2, 145.1, 141.4, 134.4, 133.7, 133.3, 132.9, 129.1, 128.5, 127.5, 126.9, 77.4, 77.2, 76.9, 51.1, 43.9, 38.4, 38.1, 29.9, 28.9, 28.6, 26.0, 22.5, 20.0.

HR-MS (ESI⁺): ber. für [C₃₄H₄₆N₈O₇+H⁺] m/z : 679.3562; gef.: 679.3569.

***Tert*-butyl-(3-(5-(5-benzamido-1-isobutyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxamido)-1-isobutyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxamido)propyl)carbamate (10f)**



664.76 g/mol
C₃₃H₄₄N₈O₇

Hergestellt nach der **AVV9** aus 1.50 Äq. Lithiumcarboxylat **7a** (241 mg, 0.75 mmol) und 1.00 Äq. Enamin-Monomer **9c** (184 mg, 0.50 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 1:1. Das Produkt wurde aus Cyclohexan/Ethylacetat kristallisiert.

Ausbeute: 37 %, 122 mg (0.18 mmol), gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 162 °C.

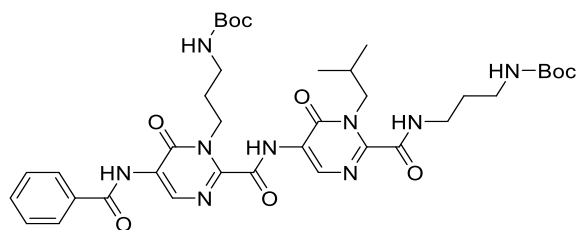
HPLC: 17.232 min, 97.3 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 10.51 (s, 1H), 9.18 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.97 – 7.91 (m, 2H), 7.65 – 7.45 (m, 3H), 4.85 (s, 1H), 4.73 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 4.64 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 3.46 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.22 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.10 (hept, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.76 (hept, *J* = 6.4 Hz, 2H), 1.46 (s, 9H), 0.99 – 0.89 (m, 12H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 165.8, 161.0, 158.5, 158.4, 158.0, 156.6, 145.1, 141.9, 134.4, 133.4, 132.8, 129.1, 128.4, 127.5, 127.1, 79.6, 51.1, 51.1, 37.6, 37.0, 30.2, 29.3, 28.9, 28.5, 20.0.

HR-MS (ESI⁺): ber. für [C₃₃H₄₄N₈O₇+H⁺] *m/z*: 665.3406; gef.: 665.3409.

***Tert*-butyl-(3-(5-(5-benzamido-1-(3-((*tert*-butoxycarbonyl)propyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxamido)-1-isobutyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxamido)propyl)carbamate (10g)**



765.87 g/mol
C₃₇H₅₁N₉O₉

Hergestellt nach der **AVV9** aus 1.50 Äq. Lithiumcarboxylat **7d** (317 mg, 0.75 mmol) und 1.00 Äq. Enamin-Monomer **9c** (184 mg, 0.50 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 2:8. Das Produkt wurde aus Cyclohexan/Ethylacetat kristallisiert.

Ausbeute: 64 %, 245 mg (0.32 mmol), gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 166 °C.

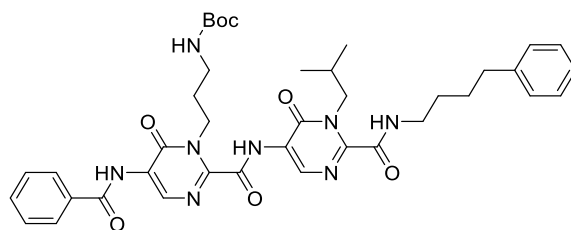
HPLC: 16.337 min, 96.9 %.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 10.55 (s, 1H), 9.17 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.95 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.94 – 7.88 (m, 2H), 7.61 – 7.55 (m, 1H), 7.54 – 7.48 (m, 2H), 5.16 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 4.90 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.72 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.62 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 3.44 (q, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.22 (hept, *J* = 6.2 Hz, 4H), 2.12 – 2.01 (m, 3H), 1.75 (pent, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.44 (s, 9H), 0.91 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 165.6, 160.9, 158.2, 157.9, 157.8, 156.5, 156.1, 145.2, 141.3, 134.6, 134.5, 133.5, 133.1, 132.7, 128.9, 128.3, 127.3, 126.7, 53.9, 53.9, 53.5, 51.0, 44.2, 43.8, 37.8, 37.4, 36.8, 31.7, 30.0, 29.7, 29.3, 28.7, 28.4, 28.4, 19.9, 14.1.

HR-MS (ESI+): ber. für [C₃₇H₅₁N₉O₉+H⁺] *m/z*: 766.3883; gef.: 766.3881.

***Tert*-butyl-(3-(5-benzamido-2-((1-isobutyl-6-oxo-2-((4-phenylbutyl)carbamoyl)-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)carbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin)propyl)carbamate (10h)**



740.86 g/mol
C₃₉H₄₈N₈O₇

Hergestellt nach der **AVV9** aus 1.50 Äq. Lithiumcarboxylat **7d** (234 mg, 0.56 mmol) und 1.00 Äq. Enamin-Monomer **9d** (127 mg, 0.37 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 6:4. Das Produkt wurde aus Cyclohexan/Ethylacetat kristallisiert.

Ausbeute: 44 %, 120 mg (0.16 mmol), gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 149 °C.

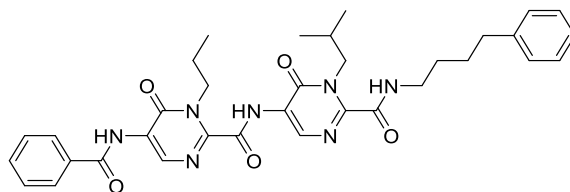
HPLC: 18.282 min, 96.9 %.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 10.56 (s, 1H), 9.19 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 7.96 – 7.90 (m, 2H), 7.66 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 7.63 – 7.56 (m, 1H), 7.55 – 7.50 (m, 2H), 7.31 – 7.23 (m, 2H), 7.22 – 7.15 (m, 3H), 5.13 (s, 1H), 4.74 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 4.67 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 3.45 – 3.40 (m, 2H), 3.28 – 3.21 (m, 2H), 2.70 – 2.63 (m, 2H), 2.13 – 2.02 (m, 3H), 1.75 – 1.64 (m, 4H), 1.46 (s, 9H), 0.91 (d, J = 6.7 Hz, 6H).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 165.81, 160.46, 158.44, 158.16, 158.06, 156.20, 144.99, 142.02, 141.42, 134.40, 133.68, 133.35, 132.86, 129.13, 128.53, 128.51, 127.52, 126.98, 126.06, 123.91, 51.10, 50.36, 43.88, 39.93, 39.71, 37.91, 35.58, 29.91, 28.98, 28.95, 28.81, 28.59, 22.09, 19.96.

HR-MS (ESI⁺): ber. für [C₃₉H₄₈N₈O₇+H⁺] m/z : 741.3719; gef.: 741.3722.

5-Benzamido-*N*-(1-isobutyl-6-oxo-2-((4-phenylbutyl)carbamoyl)-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)-6-oxo-1-propyl-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxamid (10i)



625.73 g/mol
C₃₄H₃₉N₇O₅

Hergestellt nach der **AVV9** aus 1.50 Äq. Lithiumcarboxylat **7f** (323 mg, 1.05 mmol) und 1.00 Äq. Enamin-Monomer **9d** (240 mg, 0.70 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 7:3. Das Produkt wurde aus Cyclohexan/Ethylacetat kristallisiert.

Ausbeute: 28 %, 122 mg (0.20 mmol), gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 132 °C.

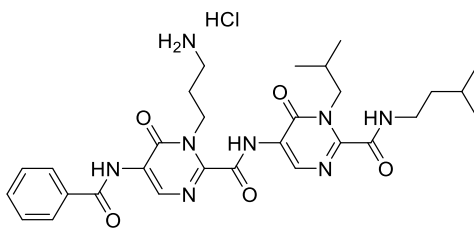
HPLC: 18.823 min, 96.7 %.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 10.53 (s, 1H), 9.17 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 7.96 – 7.90 (m, 2H), 7.67 (t, J = 6.1 Hz, 1H), 7.62 – 7.56 (m, 1H), 7.54 – 7.48 (m, 2H), 7.31 – 7.26 (m, 2H), 7.22 – 7.16 (m, 3H), 4.69 – 4.63 (m, 4H), 3.41 (q, J = 6.7 Hz, 2H), 2.67 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.09 (hept, J = 6.9 Hz, 1H), 1.89 – 1.80 (m, 2H), 1.76 – 1.62 (m, 4H), 1.04 (t, J = 7.4 Hz, 3H), 0.91 (d, J = 6.7 Hz, 6H).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 165.75, 160.48, 158.25, 158.19, 158.04, 144.90, 142.00, 141.68, 134.21, 133.53, 133.40, 132.77, 129.07, 128.51, 128.46, 127.48, 127.06, 126.03, 51.07, 47.39, 39.90, 35.56, 28.97, 28.91, 28.79, 22.91, 19.94, 11.33.

HR-MS (ESI⁺): ber. für [C₃₄H₃₉N₇O₅+H⁺] m/z : 626.3085; gef.: 626.3083.

1-(3-Aminopropyl)-5-benzamido-*N*-(1-isobutyl-2-(isopentylcarbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxamidhydrochlorid (10j)



615.13 g/mol
C₂₉H₃₉N₈O₅

In einem Einhalskolben wurde 1.00 Äq. Bipyrimidonamid **10e** (67.9 mg, 0.10 mmol) in 1,4-Dioxan (1.0 mL) gelöst. 20.0 Äq. HCl (4 M in 1,4-Dioxan, 2.00 mmol, 0.5 mL) wurden hinzugegeben und die Reaktion bei Raumtemperatur für 2 h gerührt. Nach vollständigem Eduktumsatz (DC, Cyclohexan:Ethylacetat 3:7) wurde die Reaktionslösung mit Diethylether (10 mL) versetzt und bei Raumtemperatur für 10 min gerührt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert, mit Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet.

Ausbeute: 84 %, 51.7 mg (0.08 mmol), beiger Feststoff.

Schmelzpunkt: 228 °C.

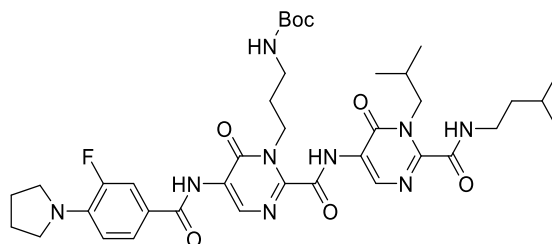
HPLC: 12.473 min, 96.3 %.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.52 (s, 1H), 9.61 (s, 1H), 9.09 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 8.81 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 8.01 (s, 3H), 7.99 – 7.94 (m, 2H), 7.67 – 7.61 (m, 1H), 7.59 – 7.53 (m, 2H), 4.34 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.11 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 3.29 – 3.23 (m, 2H), 2.89 (dp, *J* = 11.7, 5.9 Hz, 2H), 2.11 (pent, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.04 (qd, *J* = 12.9, 5.9 Hz, 1H), 1.62 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1H), 1.40 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 0.90 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H), 0.84 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H).

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 165.6, 161.1, 159.0, 157.6, 156.9, 148.9, 145.4, 133.2, 132.5, 128.8, 127.7, 127.3, 125.7, 66.4, 50.9, 43.3, 37.5, 37.2, 36.7, 27.8, 26.8, 25.2, 22.3, 19.8.

HR-MS (ESI+): ber. für [C₂₉H₃₉N₈O₅+H⁺] *m/z*: 579.3038; gef.: 579.3038. (*Aminbase* + H⁺)

Tert-butyl-(3-(5-(3-fluoro-4-(pyrrolidin-1-yl)benzamido)-2-((1-isobutyl-2-(isopentylcarbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)carbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin)propyl)carbamate (10k)



765.89 g/mol
C₃₈H₅₂FN₉O₇

In einem Einhalskolben wurden 1.00 Äq. Enamin-Dimer **11b** (28.7 mg, 50.0 µmol), 1.00 Äq. Benzoesäure **15** (15.7 mg, 75.0 µmol) und 4.50 Äq. *N*-Methylimidazol (17.9 µL, 18.5 mg, 225 µmol) in Chloroform (3.0 mL) unter Stickstoffatmosphäre vorgelegt. Unter Rühren wurden 1.00 Äq. TCFH (21.5 mg, 75.0 µmol) zugegeben und die Reaktion bei 70 °C für 16 h gerührt. Nach erneuter Zugabe von 0.50 Äq. Carbonsäure und 0.50 Äq. TCFH wurde die Reaktion bei 70 °C für weitere 3 h gerührt. Nach vollständigem Eduktumsatz (DC: Cyclohexan:Ethylacetat 4:6) wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung, entmineralisiertem Wasser und ges. Natriumchlorid-Lsg. gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Rohprodukt wurde an Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch (Eluenten: Cyclohexan:Ethylacetat 4:6) gereinigt.

Ausbeute: 50 %, 19.0 mg (0.02 mmol), gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 192 °C (Zersetzung).

HPLC: 19.919 min, 99.9 %.

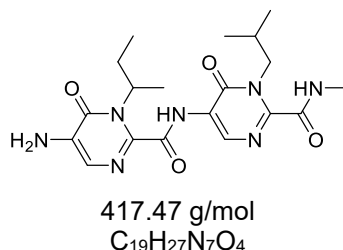
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 10.56 (s, 1H), 9.15 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 7.63 – 7.53 (m, 3H), 6.61 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H), 5.16 (s, 1H), 4.73 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.67 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 3.53 (h, *J* = 3.0 Hz, 4H), 3.45 – 3.38 (m, 2H), 3.24 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.14 – 2.03 (m, 3H), 2.02 – 1.95 (m, 4H), 1.73 – 1.64 (m, 1H), 1.52 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.47 (s, 9H), 1.34 – 1.26 (m, 1H), 1.26 (s, 4H), 1.25 (s, 1H), 0.96 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H), 0.92 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H).

^{13}C -NMR (151 MHz, CDCl_3): δ 164.6, 160.4, 158.3, 158.1, 151.5, 145.0, 140.9, 134.4, 133.0, 128.9, 127.0, 124.6, 115.9 (d, $J_{\text{C-F}} = 23.4$ Hz), 114.2, 51.1, 49.9, 49.8, 43.8, 38.4, 38.1, 32.0, 29.9, 29.2, 28.9, 28.6, 26.0, 25.6, 22.8, 22.6, 20.0, 14.3.

^{19}F -NMR (565 MHz, CDCl_3): δ -128.5.

HR-MS (ESI+): ber. für $[\text{C}_{38}\text{H}_{52}\text{FN}_9\text{O}_7+\text{H}^+]$ m/z : 766.4046; gef.: 766.4043.

5-Amino-1-(sec-butyl)-N-(1-isobutyl-2-(methylcarbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxamid (11a)
[142]



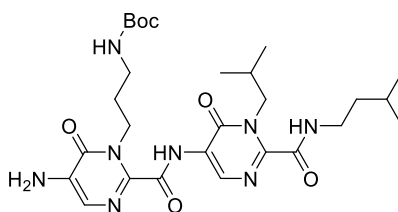
Hergestellt nach der **AVV7** aus 1.00 Äq. Bipyrimidonamid **10a** (1.34 g, 2.57 mmol) und 3.00 Äq. Natriumhydroxid (308 mg, 7.71 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 1:1.

Ausbeute: 49 %, 615 mg (1.25 mmol), gelber Feststoff.

HPLC: 11.428 min, 95.1 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 10.16 (s, 1H), 8.91 (s, 1H), 7.70 (q, J = 5.5 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 5.27 (hept, J = 6.7 Hz, 1H), 4.65 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 4.29 (s, 2H), 2.96 (d, J = 5.1 Hz, 3H), 2.27 (dt, J = 13.6, 7.6 Hz, 1H), 2.18 – 1.85 (m, 2H), 1.67 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.90 (d, J = 6.7 Hz, 6H), 0.82 (t, J = 7.4 Hz, 3H).

***Tert*-butyl-(3-(5-amino-2-((1-isobutyl-2-(isopentylcarbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)carbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin)propyl)carbamate (**11b**)**



574.68 g/mol
C₂₇H₄₂N₈O₆

Hergestellt nach der **AVV7** aus 1.00 Äq. Bipyrimidonamid **10e** (815 mg, 1.20 mmol) und 3.00 Äq. Natriumhydroxid (144 mg, 3.60 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 3:7.

Ausbeute: 38 %, 261 mg (0.45 mmol), gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 201 °C.

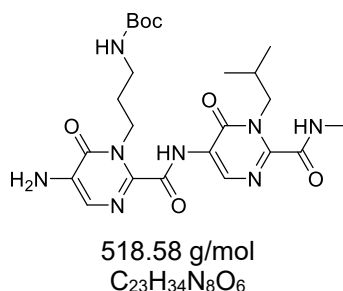
HPLC: 15.624 min, 99.9 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 10.50 (s, 1H), 8.92 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 5.29 (s, 1H), 4.76 – 4.62 (m, 6H), 3.46 – 3.35 (m, 2H), 3.19 (q, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.17 – 1.94 (m, 2H), 1.75 – 1.58 (m, 1H), 1.57 – 1.44 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 0.95 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H), 0.90 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 160.47, 158.69, 158.14, 158.10, 156.23, 144.50, 136.51, 133.79, 127.24, 123.65, 51.02, 42.91, 38.36, 38.10, 37.79, 29.84, 28.87, 28.57, 26.00, 22.51, 19.93.

HR-MS (ESI⁺): ber. für [C₂₇H₄₂N₈O₆+H⁺] *m/z*: 575.3300; gef.: 575.3304.

***Tert*-butyl-(3-(5-amino-2-((1-isobutyl-2-(methylcarbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)carbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin)propyl)carbamat (**11c**)**



Hergestellt nach der **AVV7** aus 1.00 Äq. Bipyrimidonamid **10b** (374 mg, 0.60 mmol) und 3.00 Äq. Natriumhydroxid (72.0 mg, 1.80 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 3:7.

Ausbeute: 38 %, 119 mg (0.23 mmol), gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 185 °C.

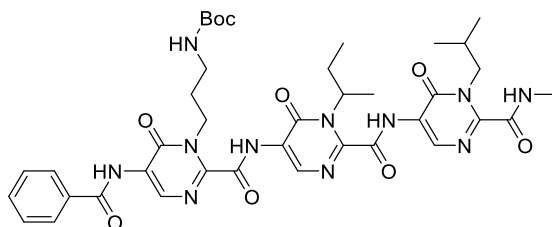
HPLC: 12.149 min, 95.4 %.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 10.46 (s, 1H), 8.85 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.20 (s, 1H), 5.21 (s, 1H), 4.64 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.60 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 3.13 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.91 (d, *J* = 5.1 Hz, 3H), 2.08 – 1.92 (m, jH), 1.39 (s, 9H), 0.85 – 0.72 (m, 9H).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 161.16, 158.72, 158.15, 156.29, 144.32, 136.84, 136.37, 133.70, 127.36, 123.79, 51.12, 42.97, 37.83, 29.88, 28.92, 28.61, 26.75, 19.95.

HR-MS (ESI⁺): ber. für [C₂₃H₃₄N₈O₆+H⁺] *m/z*: 519.2674; gef.: 519.2676.

***Tert*-butyl-(3-(5-benzamido-2-((1-(*sec*-butyl)-2-((1-isobutyl-2-(methylcarbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)carbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)carbamoyl)-6-1,6-dihydropyrimidin)propyl)carbamate (**12a**)**



815.89 g/mol
C₃₉H₄₉N₁₁O₉

Hergestellt nach der **AVV9** aus 1.30 Äq. Lithiumcarboxylat **7d** (275 mg, 0.65 mmol) und 1.00 Äq. Enamin-Dimer **11a** (209 mg, 0.50 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten *n*-Hexan und Ethylacetat im Verhältnis 6:4.

Ausbeute: 63 %, 255 g (0.31 mmol), gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 211 °C.

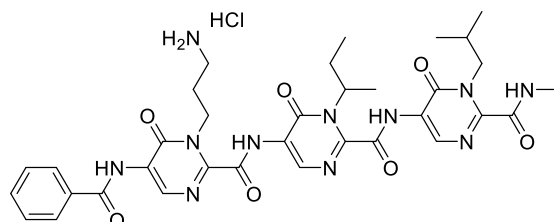
HPLC: 18.356 min, 96.8 %.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 10.61 (s, 1H), 10.05 (s, 1H), 9.18 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 8.95 (s, 1H), 8.92 (s, 1H), 7.94 – 7.89 (m, 2H), 7.70 (q, J = 5.1 Hz, 1H), 7.61 – 7.54 (m, 1H), 7.53 – 7.47 (m, 2H), 5.17 (dt, J = 8.0, 6.6 Hz, 1H), 5.14 (s, 1H), 4.74 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 4.66 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 3.27 – 3.21 (m, 2H), 2.97 (d, J = 5.1 Hz, 3H), 2.29 (hept, 1H), 2.14 – 1.93 (m, 4H), 1.70 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 1.45 (s, 9H), 0.91 (d, J = 6.7 Hz, 6H), 0.85 (t, J = 7.5 Hz, 3H).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 165.8, 161.0, 158.9, 158.4, 158.0, 158.0, 157.9, 156.2, 145.1, 145.0, 141.3, 134.4, 133.7, 133.6, 133.3, 132.8, 129.1, 128.5, 128.0, 127.5, 127.0, 79.4, 60.3, 51.1, 43.9, 37.9, 32.0, 29.9, 29.8, 28.9, 28.6, 28.5, 26.7, 26.0, 19.9, 18.0, 14.2, 11.5.

HR-MS (ESI+): ber. für [C₃₉H₄₉N₁₁O₉+H⁺] m/z : 816.3787; gef.: 816.3796.

1-(3-Aminopropyl)-5-benzamido-*N*-(1-(*sec*-butyl)-2-((1-isobutyl-2-(methylcarbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)carbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxamid-hydrochlorid (12b)



752.23 g/mol
C₃₄H₄₂N₁₁O₇

In einem Einhalskolben wurde 1.00 Äq. Tripyrimidonamid **12a** (81.6 mg, 0.10 mmol) in 1,4-Dioxan (1.0 mL) gelöst. 40.0 Äq. HCl (4 M in 1,4-Dioxan, 1.0 mL, 4.00 mmol) wurden zugetropft und die Reaktion bei Raumtemperatur für 2 h gerührt. Nach vollständigem Eduktumsatz (DC: Ethylacetat + 1% V/V Triethylamin) wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde mit Diethylether (10.0 mL) versetzt und bei Raumtemperatur für 10 min gerührt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert, mit Diethylether gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet.

Ausbeute: 99 %, 75 mg (0.10 mmol), gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 260 °C.

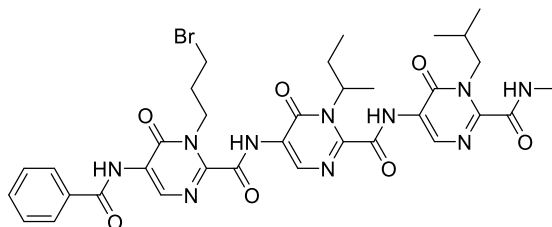
HPLC: 11.898 min, 97.2 %.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.76 (s, 1H), 10.52 (s, 1H), 9.63 (s, 1H), 9.01 (q, *J* = 4.7 Hz, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.02 (s, 3H), 7.99 – 7.96 (m, 2H), 7.68 – 7.62 (m, 1H), 7.60 – 7.53 (m, 2H), 4.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.32 (s, 2H), 4.14 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.90 (s, 2H), 2.78 (d, *J* = 4.7 Hz, 3H), 2.23 – 2.09 (m, 3H), 2.07 – 1.97 (m, 1H), 1.97 – 1.86 (m, 1H), 1.57 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.86 – 0.79 (m, 9H).

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 165.6, 161.5, 160.4, 158.9, 157.6, 156.8, 156.7, 148.8, 148.4, 145.3, 137.3, 136.6, 135.4, 133.2, 132.4, 128.8, 127.7, 127.3, 126.5, 125.8, 50.7, 43.2, 36.7, 27.7, 26.8, 25.9, 25.4, 19.7, 17.1, 11.0.

HR-MS (ESI+): ber. für [C₃₄H₄₁N₁₁O₇+H⁺] *m/z*: 716.3263; gef.: 716.3264.

5-Benzamido-1-(3-brompropyl)-*N*-(1-(*sec*-butyl)-2-((1-isobutyl-2-(methylcarbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)carbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2carboxamid (12c)



779.65 g/mol
C₃₄H₃₉BrN₁₀O₇

Hergestellt nach der **AVV9** aus 1.40 Äq. Lithiumcarboxylat **7g** (108 mg, 0.28 mmol) und 1.00 Äq. Enamin-Dimer **11a** (83.5 mg, 0.20 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 6:4. Das Produkt wurde aus Methanol kristallisiert.

Ausbeute: 42 %, 66 mg (0.08 mmol), gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 195 °C.

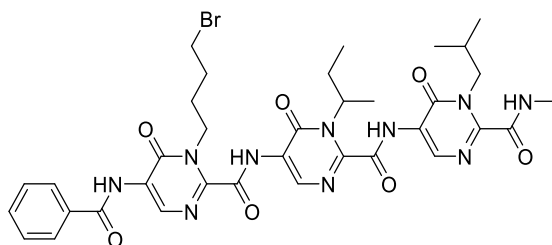
HPLC: 18.772 min, 95.6 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 10.60 (s, 1H), 10.09 (s, 1H), 9.20 (s, 1H), 9.01 (s, 1H), 8.97 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 7.99 – 7.89 (m, 2H), 7.67 (q, *J* = 5.2 Hz, 1H), 7.63 – 7.47 (m, 3H), 5.20 (dt, *J* = 8.0, 6.6 Hz, 1H), 4.87 – 4.76 (m, 2H), 4.68 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 3.56 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.98 (d, *J* = 5.1 Hz, 3H), 2.46 (pent, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.40 – 2.20 (m, 1H), 2.20 – 1.90 (m, 2H), 1.71 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.93 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 0.86 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 165.8, 161.1, 158.9, 158.3, 158.0, 157.9, 145.1, 144.9, 141.4, 134.4, 133.8, 133.5, 133.3, 129.1, 128.6, 128.1, 127.5, 127.1, 32.1, 30.1, 29.0, 26.8, 26.0, 20.0, 18.0, 11.5.

HR-MS (ESI⁺): ber. für [C₃₄H₃₉BrN₁₀O₇+H⁺] *m/z*: 779.2259; gef.: 779.2257.

5-Benzamido-1-(4-brombutyl)-*N*-(1-(*sec*-butyl)-2-((1-isobutyl-2-(methylcarbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)carbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2carboxamid (12d)



793.68 g/mol
C₃₅H₄₁BrN₁₀O₇

Hergestellt nach der **AVV9** aus 1.50 Äq. Lithiumcarboxylat **7h** (120 mg, 0.30 mmol) und 1.00 Äq. Enamin-Dimer **11a** (83.5 mg, 0.20 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 6:4. Das Produkt wurde aus Methanol kristallisiert.

Ausbeute: 89 %, 141 mg (0.18 mmol), gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 225 °C.

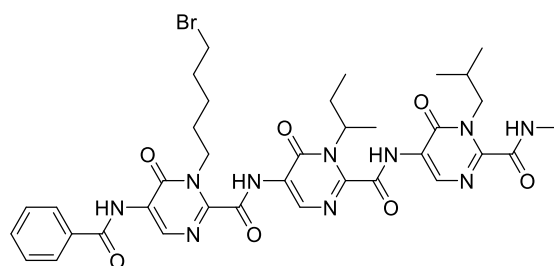
HPLC: 19.130 min, 95.2 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 10.63 (s, 1H), 10.09 (s, 1H), 9.19 (s, 1H), 9.01 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 7.99 – 7.86 (m, 2H), 7.68 (q, *J* = 5.2 Hz, 1H), 7.63 – 7.48 (m, 3H), 5.20 (dt, *J* = 8.0, 6.6 Hz, 1H), 4.73 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.68 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 3.50 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.98 (d, *J* = 5.0 Hz, 3H), 2.41 – 2.20 (m, 1H), 2.05 (d, *J* = 223.3 Hz, 3H), 1.71 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.93 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 0.86 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 165.8, 161.0, 158.9, 158.2, 158.0, 157.9, 145.1, 144.9, 141.3, 134.4, 133.7, 133.5, 132.8, 129.1, 128.6, 128.1, 127.5, 127.1, 77.4, 32.8, 30.1, 29.0, 26.8, 26.0, 20.0, 11.5.

HR-MS (ESI⁺): ber. für [C₃₅H₄₁BrN₁₀O₇+H⁺] *m/z*: 793.2416; gef.: 793.2408.

5-Benzamido-1-(5-bromopentyl)-N-(1-(sec-butyl)-2-((1-isobutyl-2-(methylcarbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)carbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2carboxamid (12e)



807.71 g/mol
C₃₆H₄₃BrN₁₀O₇

Hergestellt nach der **AVV9** aus 1.50 Äq. Lithiumcarboxylat **7i** (62.1 mg, 0.15 mmol) und 1.00 Äq. Enamin-Dimer **11a** (41.7 mg, 0.10 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 7:3. Das Produkt wurde aus Methanol kristallisiert.

Ausbeute: 81 %, 65 mg (0.08 mmol), gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 237 °C.

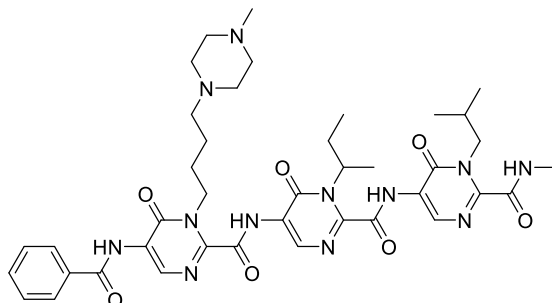
HPLC: 20.445 min, 95.8 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 10.61 (s, 1H), 10.09 (s, 1H), 9.18 (s, 1H), 9.01 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.93 (s, 1H), 7.98 – 7.87 (m, 2H), 7.68 (q, J = 5.3 Hz, 1H), 7.64 – 7.53 (m, 1H), 7.57 – 7.45 (m, 2H), 5.29 – 5.12 (m, 1H), 4.75 – 4.63 (m, 4H), 3.46 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.98 (d, J = 5.0 Hz, 3H), 2.30 (dt, J = 13.7, 7.6 Hz, 1H), 2.20 – 1.79 (m, 6H), 1.71 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 1.62 (p, J = 7.7 Hz, 2H), 0.92 (d, J = 6.7 Hz, 6H), 0.86 (t, J = 7.4 Hz, 3H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 165.8, 161.0, 158.9, 158.2, 158.1, 158.0, 157.9, 145.1, 144.9, 141.4, 134.4, 133.7, 133.5, 133.4, 132.8, 129.1, 128.5, 128.1, 127.5, 127.1, 51.2, 33.5, 32.2, 28.9, 28.5, 26.8, 26.0, 25.5, 19.9, 18.0, 11.5.

HR-MS (ESI+): ber. für [C₃₆H₄₃BrN₁₀O₇+H⁺] m/z : 807.2572; gef.: 807.2563.

5-Benzamido-*N*-(1-(*sec*-butyl)-2-((1-isobutyl-2-(methylcarbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)carbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)-1-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)butyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxamid (12f)



812.93 g/mol
C₄₀H₅₂N₁₂O₇

In einem Einhalskolben wurden 1.00 Äq. Tripyrimidonamid **12e** (31.7 mg, 40.0 µmol) und 2.00 Äq. 1-Methylpiperazin (8.01 mg, 8.87 µL, 80.0 µmol) wurden in Dimethylformamid (1.0 mL) gelöst und bei Raumtemperatur für 16 h gerührt. Nach vollständigem Eduktumsatz (DC: Ethylacetat + 1% V/V Triethylamin) wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt an Kieselgel adsorbiert. Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Dichlormethan und Methanol im Verhältnis 9:1.

Ausbeute: 58 %, 19 mg (0.02 mmol), gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 205 °C (Zersetzung).

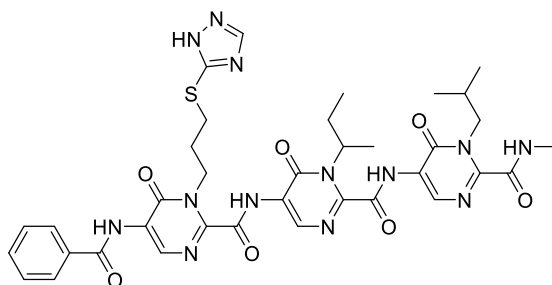
HPLC: 10.983 min, 97.3 %.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 10.60 (s, 1H), 10.09 (s, 1H), 9.18 (s, 1H), 9.00 (s, 1H), 8.96 (s, 1H), 8.93 (s, 1H), 7.96 – 7.91 (m, 2H), 7.68 (q, *J* = 5.0 Hz, 1H), 7.62 – 7.56 (m, 1H), 7.51 (dd, *J* = 8.3, 7.1 Hz, 2H), 5.20 (dt, *J* = 8.0, 6.7 Hz, 1H), 4.73 – 4.65 (m, 4H), 2.98 (d, *J* = 5.1 Hz, 3H), 2.82 – 2.52 (m, 8H), 2.49 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.37 (s, 3H), 2.35 – 2.25 (m, 1H), 2.15 – 2.05 (m, 1H), 2.05 – 1.95 (m, 1H), 1.85 (p, *J* = 7.8 Hz, 2H), 1.71 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 1.69 – 1.64 (m, 2H), 0.92 (dd, *J* = 6.7, 1.7 Hz, 6H), 0.86 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 165.8, 161.0, 158.9, 158.2, 158.1, 158.0, 157.9, 145.0, 144.9, 141.4, 134.4, 133.6, 133.5, 133.4, 132.8, 129.1, 128.5, 128.1, 127.5, 127.1, 60.3, 57.7, 54.8, 52.6, 51.2, 45.9, 45.7, 29.8, 28.9, 27.5, 26.8, 26.0, 24.1, 19.9, 18.0, 11.5.

HR-MS (ESI+): ber. für $[\text{C}_{40}\text{H}_{52}\text{N}_{12}\text{O}_7+\text{H}^+]$ m/z : 813.4141; gef.: 813.4149.

1-(3-((1*H*-1,2,4-triazol-5-yl)propyl)-5-benzamido-*N*-(1-(*sec*-butyl)-2-((1-isobutyl-2-(methylcarbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)carbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2carboxamid (12g)



799.87 g/mol
C₃₆H₄₁N₁₃O₇S

In einem Einhalskolben wurden 1.20 Äq. 3-Mercapto-1,2,4-triazol (6.13 mg, 60.0 µmol) und 1.10 Äq. wasserfreies Kaliumcarbonat (7.60 mg, 55.0 µmol) in Dimethylformamid (0.5 mL) vorgelegt. 1.00 Äq. Tripyrimidonamid **12d** (39.0 mg, 50.0 µmol) wurde hinzugegeben und die Reaktion bei Raumtemperatur für 16 h gerührt. Nach vollständigem Eduktumsatz (DC: Cyclohexan:Ethylacetat 3:7) wurde die Reaktionslösung mit Dichlormethan (10.0 mL) verdünnt. Die organische Phase wurde mit entmineralisiertem Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Die Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde nach Lösen in kaltem Dichlormethan (1.0 mL) und Versetzen mit kaltem Methanol (20.0 mL) gefällt. Das Produkt wurde abfiltriert, mit kaltem Methanol gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet.

Ausbeute: 64 %, 25.6 mg (0.03 mmol), gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 240 °C.

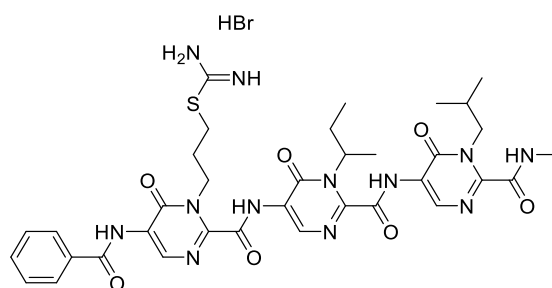
HPLC: 15.001 min, 96.5 %.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 10.52 (s, 1H), 10.08 (s, 1H), 9.19 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.93 (s, 1H), 8.91 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.95 – 7.90 (m, 2H), 7.69 (q, *J* = 5.0 Hz, 1H), 7.62 – 7.56 (m, 1H), 7.54 – 7.48 (m, 2H), 5.19 (hept, *J* = 6.9 Hz, 1H), 4.87 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 4.67 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 3.22 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.98 (d, *J* = 5.1 Hz, 3H), 2.28 (tt, *J* = 14.0, 7.2 Hz, 3H), 2.10 (hept, *J* = 6.9 Hz, 1H), 2.00 (dp, *J* = 14.5, 7.3 Hz, 1H), 1.70 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.92 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 0.86 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

^{13}C -NMR (600 MHz, CDCl_3): δ 165.9, 161.0, 158.9, 158.3, 158.1, 158.1, 158.0, 145.2, 145.0, 141.5, 134.6, 133.9, 133.8, 133.3, 132.9, 129.1, 128.5, 128.0, 127.5, 127.0, 60.4, 51.2, 44.9, 30.4, 29.8, 29.1, 28.9, 26.8, 26.0, 20.0, 18.0, 11.5.

HR-MS (ESI+): ber. für $[\text{C}_{36}\text{H}_{41}\text{N}_{13}\text{O}_7\text{S}+\text{H}^+]$ m/z : 800.3045; gef.: 800.3045.

3-(5-Benzamido-2-((1-(*sec*-butyl)-2-((1-isobutyl-2-(methylcarbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)carbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)carbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin)propyl-carbamimidothioat-hydrobromid (12h**)**



855.77 g/mol
C₃₅H₄₃BrN₁₂O₇S

In einem Einhalskolben wurden 1.00 Äq. Tripyrimidonamid **12d** (39.0 mg, 50.0 µmol) und 2.00 Äq. Thioharnstoff (7.61 mg, 100 µmol) in 1,4-Dioxan (0.3 mL) gelöst und bei 100 °C für 16 h gerührt. Nach vollständigem Eduktumsatz (DC: Ethylacetat) wurde die Reaktionslösung mit 1,4-Dioxan verdünnt. Die Suspension wurde zweimal zentrifugiert, der Überstand jeweils dekantiert und der Feststoff unter vermindertem Druck getrocknet.

Ausbeute: 76 %, 32.5 mg (0.04 mmol), gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 241 °C (Zersetzung).

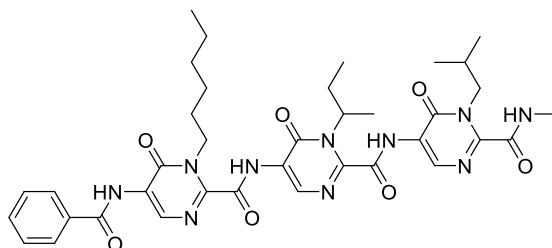
HPLC: 12.850 min, 97.3 %.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.74 (s, 1H), 10.50 (s, 1H), 9.58 (s, 1H), 9.07 (s, 4H), 8.99 (q, *J* = 4.8 Hz, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.01 – 7.96 (m, 2H), 7.68 – 7.61 (m, 1H), 7.60 – 7.52 (m, 2H), 4.41 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 4.37 – 4.30 (m, 1H), 4.15 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 3.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.78 (d, *J* = 4.6 Hz, 3H), 2.21 – 2.12 (m, 3H), 2.07 – 1.97 (m, 1H), 1.97 – 1.87 (m, 1H), 1.56 (t, *J* = 5.8 Hz, 3H), 0.84 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H), 0.83 – 0.80 (m, 3H).

¹³C-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 169.6, 165.5, 161.6, 160.4, 158.9, 157.5, 156.8, 156.7, 148.8, 148.3, 137.2, 136.3, 135.2, 133.2, 132.5, 128.8, 128.7, 127.7, 127.3, 126.5, 125.8, 50.7, 27.8, 27.7, 25.9, 25.4, 19.8, 19.7, 17.1, 11.1.

HR-MS (ESI+): ber. für [C₃₅H₄₃N₁₂O₇S+H⁺] *m/z*: 775.3093; gef.: 775.3086.

5-Benzamido-*N*-(1-(*sec*-butyl)-2-((1-isobutyl-2-(methylcarbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)carbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)-1-hexyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxamid (12i)



742.84 g/mol
C₃₇H₄₆N₁₀O₇

Hergestellt nach der **AVV9** aus 1.50 Äq. Lithiumcarboxylat **7e** (78.6 mg, 0.23 mmol) und 1.00 Äq. Enamin-Dimer **11a** (62.6 mg, 0.15 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 7:3.

Ausbeute: 57 %, 62.9 mg (0.08 mmol), gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 263 °C.

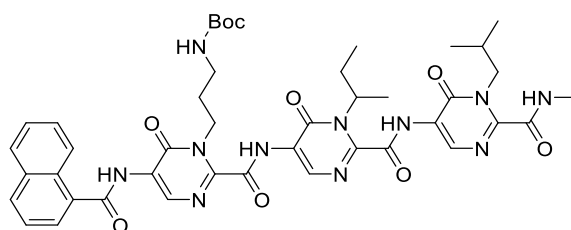
HPLC: 21.047 min, 95.8 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 10.59 (s, 1H), 10.09 (s, 1H), 9.18 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 7.98 – 7.87 (m, 2H), 7.68 (q, *J* = 5.3 Hz, 1H), 7.64 – 7.53 (m, 1H), 7.56 – 7.45 (m, 2H), 5.29 – 5.11 (m, 1H), 4.74 – 4.63 (m, 4H), 2.98 (d, *J* = 5.0 Hz, 3H), 2.30 (hept, *J* = 7.6 Hz, 1H), 2.20 – 1.90 (m, 2H), 1.85 – 1.74 (m, 2H), 1.39 (dtd, *J* = 17.6, 7.8, 4.4 Hz, 6H), 0.92 (d, *J* = 6.9 Hz, 9H), 0.86 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 165.8, 161.1, 159.0, 158.2, 158.1, 158.0, 157.9, 145.0, 144.9, 141.6, 134.4, 133.6, 133.5, 133.4, 132.8, 129.1, 128.5, 128.2, 127.5, 127.1, 70.2, 60.3, 51.1, 46.1, 31.4, 29.5, 28.9, 26.7, 26.6, 26.0, 22.7, 22.1, 19.9, 18.0, 14.1, 11.5.

HR-MS (ESI⁺): ber. für [C₃₇H₄₆N₁₀O₇+H⁺] *m/z*: 743.3624; gef.: 743.3617.

***Tert*-butyl-(3-(5-(1-naphthamido)-2-((1-(*sec*-butyl)-2-((1-isobutyl-2-(methylcarbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)carbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)carbamoyl)-6-1,6-dihydropyrimidin)propyl)carbamate (**12j**)**



865.95 g/mol
C₄₃H₅₁N₁₁O₉

Hergestellt nach der **AVV9** aus 1.50 Äq. Lithiumcarboxylat **7j** (142 mg, 0.30 mmol) und 1.00 Äq. Enamin-Dimer **11a** (83.5 mg, 0.20 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 1:1.

Ausbeute: 25 %, 42.6 mg (0.05 mmol), gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 214 °C (Zersetzung).

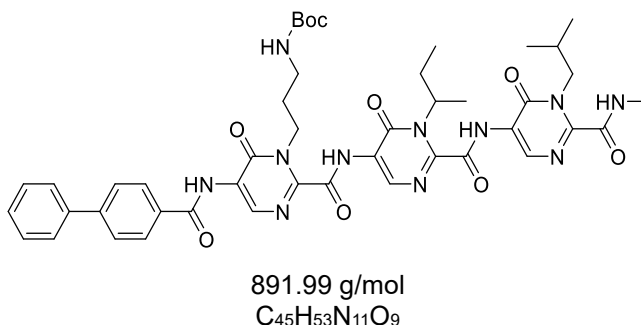
HPLC: 19.410 min, 98.3 %.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 10.64 (s, 1H), 10.06 (s, 1H), 9.30 (s, 1H), 8.96 (s, 1H), 8.93 (s, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.42 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.00 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.92 – 7.88 (m, 1H), 7.83 – 7.78 (m, 1H), 7.71 – 7.66 (m, 1H), 7.63 – 7.49 (m, 3H), 5.21 – 5.13 (m, 1H), 5.12 (s, 1H), 4.74 – 4.69 (m, 2H), 4.64 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 3.25 – 3.19 (m, 2H), 2.98 (d, J = 5.1 Hz, 3H), 2.36 – 2.26 (m, 1H), 2.13 – 1.96 (m, 4H), 1.72 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 1.44 (s, 9H), 0.91 (d, J = 6.7, 6H), 0.87 (t, J = 7.4 Hz, 3H).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 167.9, 161.1, 159.0, 158.2, 158.1, 158.0, 157.9, 156.2, 145.3, 145.0, 141.6, 134.5, 133.9, 133.9, 133.8, 132.6, 132.2, 130.2, 128.7, 128.7, 128.0, 127.9, 127.0, 126.9, 126.1, 125.2, 124.8, 79.4, 60.4, 51.1, 43.8, 37.9, 29.9, 29.8, 28.9, 28.6, 26.7, 26.0, 19.9, 18.0, 11.5.

HR-MS (ESI⁺): ber. für [C₄₃H₅₁N₁₁O₉+H⁺] m/z : 866.3944; gef.: 866.3948.

Tert-butyl-(3-(5-([1,1'-biphenyl]-4-carboxamido)-2-((1-(sec-butyl)-2-((1-isobutyl-2-(methoxycarbonyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)carbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)carbamoyl)-6-1,6-dihydropyrimidin)propyl)carbamate (12k)



In einem Einhalskolben wurde 1.50 Äq. Lithiumcarboxylat **7k** (150 mg, 0.30 mmol) in Dimethylformamid (2.0 mL) gelöst. 1.70 Äq. COMU® (146 mg, 0.34 mmol) wurde zugegeben und der Reaktionsansatz bei Raumtemperatur für 5 min gerührt. 1.00 Äq. Enamin-Dimer **11a** (83.5 mg, 0.20 mmol) wurde zugegeben und der Reaktionsansatz bei Raumtemperatur für 16 h gerührt. Nach vollständigem Eduktumsatz (DC: Cyclohexan:Ethylacetat 4:6) wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde mit Methanol (20.0 mL) verdünnt und bei 8 °C für 1 h gelagert. Das Produkt wurde abfiltriert, mit kaltem Methanol gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet.

Ausbeute: 46 %, 81.6 mg (0.09 mmol), gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 221 °C (Zersetzung).

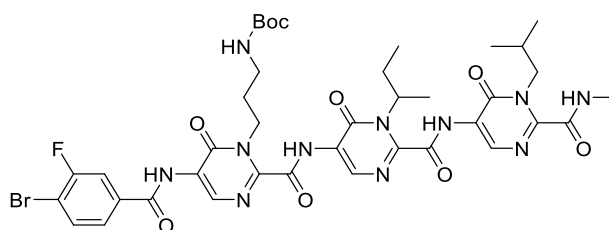
HPLC: 20.062 min, 95.9 %.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 10.60 (s, 1H), 10.05 (s, 1H), 9.18 (s, 1H), 9.03 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.01 – 7.97 (m, 2H), 7.74 – 7.68 (m, 3H), 7.66 – 7.60 (m, 2H), 7.49 – 7.43 (m, 2H), 7.42 – 7.36 (m, 1H), 5.20 – 5.13 (m, 2H), 4.77 – 4.72 (m, 2H), 4.68 – 4.64 (m, 2H), 3.27 – 3.22 (m, 2H), 2.97 (d, J = 5.0 Hz, 3H), 2.34 – 2.24 (m, 1H), 2.14 – 2.04 (m, 3H), 2.04 – 1.95 (m, 1H), 1.47 (s, 9H), 0.92 (d, J = 6.8 Hz, 6H), 0.86 (t, J = 7.4 Hz, 3H).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 165.4, 161.0, 158.9, 158.4, 158.0, 158.0, 157.9, 156.2, 145.6, 145.1, 145.0, 141.2, 139.6, 134.4, 133.7, 133.5, 131.8, 129.1, 128.5, 128.4, 128.0, 128.0, 127.6, 127.3, 127.0, 60.3, 51.1, 43.9, 37.9, 30.4, 29.9, 28.9, 28.6, 26.7, 26.0, 19.9, 17.9, 11.5.

HR-MS (ESI+): ber. für $[\text{C}_{45}\text{H}_{53}\text{N}_{11}\text{O}_9+\text{H}^+]$ m/z : 892.4100; gef.: 892.4100.

Tert-butyl-(3-5-(4-brom-3-fluorbenzamido)-2-((1-(*sec*-butyl)-2-((1-isobutyl-2-(methylcarbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)carbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)carbamoyl)-6-1,6-dihydropyrimidin)propyl)carbamate (12l)



912.78 g/mol
C₃₉H₄₇BrFN₁₁O₉

Hergestellt nach der **AVV9** aus 1.50 Äq. Lithiumcarboxylat **7l** (156 mg, 0.30 mmol) und 1.00 Äq. Enamin-Dimer **11a** (83.5 mg, 0.20 mmol). Der Rückstand wurde nach Flüssig-Flüssig-Extraktion (**AVV9**) und Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfers mit Methanol verdünnt und bei Raumtemperatur für 1 h gerührt. Der präzipitierte Feststoff wurde abfiltriert, mit kaltem Methanol gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet.

Ausbeute: 51 %, 93.9 mg (0.10 mmol), gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 165 °C (Zersetzung).

HPLC: 18.225 min, 95.1 %.

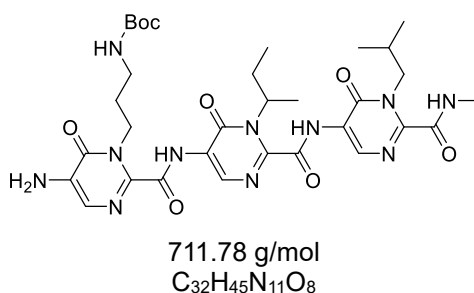
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 10.62 (s, 1H), 10.06 (s, 1H), 9.16 (s, 1H), 8.97 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 8.93 (s, 1H), 7.75 – 7.70 (m, 2H), 7.67 (q, J = 5.1 Hz, 1H), 7.58 (dd, J = 8.2, 2.1 Hz, 1H), 5.19 (dt, J = 8.0, 6.7 Hz, 1H), 5.09 (s, 1H), 4.75 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 4.68 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 3.27 – 3.22 (m, 2H), 2.99 (d, J = 5.1 Hz, 3H), 2.35 – 2.25 (m, 1H), 2.16 – 1.95 (m, 4H), 1.71 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 1.47 (s, 9H), 0.93 (dd, J = 6.7, 1.4 Hz, 6H), 0.86 (t, J = 7.4 Hz, 3H).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 163.6, 161.1, 158.9, 158.4, 158.0, 157.9, 145.3, 145.0, 141.8, 134.4 (d, J = 5.4 Hz), 134.0 (d, J = 27.4 Hz), 128.1 (d, J = 16.6 Hz), 127.1, 123.8, 116.1, 115.9, 60.4, 51.2, 44.0, 37.9, 29.9, 29.0, 28.6, 26.8, 26.0, 20.0, 18.0, 11.5.

¹⁹F-NMR (565 MHz, CDCl₃): δ -104.52.

HR-MS (ESI+): ber. für [C₃₉H₄₇BrFN₁₁O₉+H⁺] m/z : 912.2798; gef.: 912.2791.

***Tert*-butyl-(3-(5-amino-2-((1-(*sec*-butyl)-2-((1-isobutyl-2-(methylcarbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)carbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)carbamoyl)-6-1,6-dihydropyrimidin)propyl)carbamate (**12m**)**



Hergestellt nach der **AVV7** aus 1.00 Äq. Tripyrimidonamid **12a** (628 mg, 0.77 mmol) und 3.00 Äq. Natriumhydroxid (92.4 mg, 2.31 mmol). Säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit den Eluenten Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 3:7.

Ausbeute: 36 %, 196 mg (0.28 mmol), gelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 140 °C (Zersetzung).

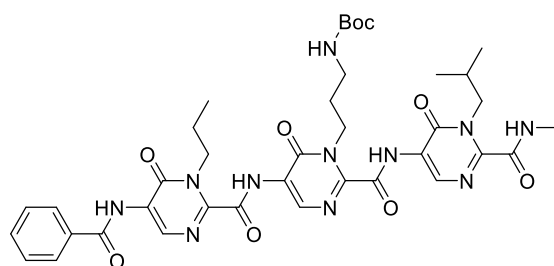
HPLC: 14.684 min, 98.7 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 10.57 (s, 1H), 10.08 (s, 1H), 8.95 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 7.69 (q, J = 5.2 Hz, 1H), 7.40 (s, 1H), 5.28 (s, 1H), 5.19 (dt, J = 8.0, 6.7 Hz, 1H), 4.78 – 4.60 (m, 6H), 3.24 – 3.14 (m, 2H), 2.99 (d, J = 5.0 Hz, 3H), 2.30 (dt, J = 13.7, 7.6 Hz, 1H), 2.20 – 1.92 (m, 5H), 1.70 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 1.47 (s, 8H), 0.96 – 0.90 (m, 6H), 0.85 (t, J = 7.4 Hz, 3H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 161.1, 159.0, 158.6, 158.1, 158.0, 158.0, 156.3, 144.9, 144.6, 136.7, 136.5, 134.4, 133.1, 128.4, 127.1, 123.7, 77.4, 60.5, 51.1, 42.9, 37.8, 29.9, 28.9, 28.6, 26.7, 26.0, 19.9, 18.0, 11.5.

HR-MS (ESI⁺): ber. für [C₃₂H₄₅N₁₁O₈+H⁺] m/z : 712.3525; gef.: 712.3527.

***Tert*-butyl-(3-(5-(5-benzamido-6-oxo-1-propyl-1,6-dihydropyrimidin-2-carboxamido)-2-((1-isobutyl-2-(methylcarbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)carbamoyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidincarbamat (12n)**



801.86 g/mol
C₃₈H₄₇N₁₁O₉

Hergestellt nach der **AVV9** aus 1.50 Äq. Lithiumcarboxylat **7f** (50.7 mg, 0.17 mmol) und 1.00 Äq. Enamin-Dimer **11a** (57.0 mg, 0.11 mmol). Das Produkt wurde aus Methanol kristallisiert.

Ausbeute: 15 %, 13 mg (0.02 mmol), gelber Feststoff.

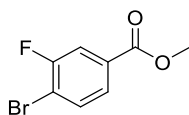
Schmelzpunkt: 217 °C (Zersetzung).

HPLC: 17.693 min, 96.2 %.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 10.53 (s, 1H), 10.47 (s, 1H), 9.12 (s, 1H), 9.00 (s, 1H), 8.96 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 7.89 – 7.84 (m, 2H), 7.64 – 7.61 (m, 1H), 7.55 – 7.50 (m, 1H), 7.47 – 7.42 (m, 2H), 5.08 – 5.05 (m, 1H), 4.66 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.63 – 4.57 (m, 4H), 3.18 (q, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.92 (d, *J* = 5.0 Hz, 3H), 2.07 – 1.97 (m, 3H), 1.78 (h, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.40 (s, 9H), 0.98 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 0.86 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 165.8, 161.1, 158.2, 158.2, 158.0, 156.2, 144.9, 142.4, 141.4, 134.4, 134.1, 133.4, 133.4, 132.8, 129.1, 128.6, 127.8, 127.5, 127.0, 79.4, 51.1, 47.4, 43.9, 37.9, 29.8, 28.9, 28.6, 26.8, 22.9, 19.9, 14.3, 11.3.

HR-MS (ESI⁺): ber. für [C₃₈H₄₇N₁₁O₉+H⁺] *m/z*: 802.3631; gef.: 802.3626.

Methyl-4-brom-3-fluorbenzoat (13)^[167]

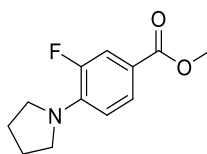
233.04 g/mol
C₈H₆BrFO₂

Die Synthese erfolgte gemäß einer Vorschrift von RICE *et al.* 1.00 Äq. 4-Brom-3-fluorbenzoesäure (11.2 g, 50.0 mmol) und 1.00 Äq. konzentrierte Schwefelsäure (4.90 g, 2.66 mL, 50.0 mmol) wurden bei Raumtemperatur in Methanol (50 mL) vorgelegt und bei 80 °C für 3 h gerührt. Nach vollständigem Eduktumsatz (DC: Cyclohexan:Ethylacetat 8:2) wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mit Ethylacetat (30 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung, entmineralisiertem Wasser und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt unter vermindertem Druck getrocknet.

Ausbeute: 92 %, 10.7 g (45.9 mmol), farbloser Feststoff.

HPLC: 13.690 min, 98.8 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.81 – 7.57 (m, 3H), 3.92 (s, 3H).

Methyl-3-fluor-4-(pyrrolidin-1-yl)benzoat (14)^[167]

223.25 g/mol
C₁₂H₁₄FN₁O₂

Die Synthese erfolgte gemäß einer Vorschrift von RICE *et al.* In einem ausgeheizten Einhalskolben wurden unter Stickstoffatmosphäre 1.00 Äq. Methyl-4-brom-3-fluorbenzoat (2.33 g, 10.0 mmol, **13**), 1.00 Äq. Pyrrolidin (0.84 mL, 10.0 mmol), 1.50 Äq. Cäsiumcarbonat (4.90 g, 15.0 mmol), 10.0 mol% (*rac*)-BINAP (642 mg, 1.00 mmol) und 2.50 mol% Pd₂(dba)₃ (229 mg, 0.25 mmol) in Toluol (30 mL) suspendiert und bei 110 °C für 16 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde über Celite® filtriert und mit Ethylacetat gewaschen. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt, das Rohprodukt an Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch (Eluent: Cyclohexan:Ethylacetat 6:4) aufgereinigt.

Ausbeute: 69 %, 1.54 g (6.89 mmol), farblose Kristalle.

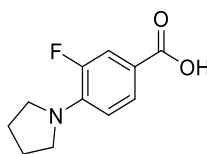
Schmelzpunkt: 76 °C.

HPLC: 14.691 min, 97.5 %.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.70 – 7.55 (m, 2H), 6.54 (t, J = 8.7 Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.58 – 3.44 (m, 4H), 2.03 – 1.89 (m, 4H).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 165.6 (d, J_{C-F} = 2.6 Hz), 150.0, 148.4, 139.8 (d, J_{C-F} = 9.3 Hz), 125.9 (d, J_{C-F} = 2.2 Hz), 116.4, 116.3, 116.21 (d, J_{C-F} = 6.4 Hz), 112.7 (d, J_{C-F} = 5.6 Hz), 50.6, 48.6 (d, J_{C-F} = 5.5 Hz), 24.4 (d, J_{C-F} = 2.3 Hz).

¹⁹F-NMR (565 MHz, CDCl₃): δ -129.6.

3-Fluor-4-(pyrrolidin-1-yl)benzoesäure (15)^[159]

209.22 g/mol
C₁₁H₁₂FNO₂

Die Synthese erfolgte gemäß einer Vorschrift von X. Liu *et al.* In einem Einhalskolben wurden 1.00 Äq. Methyl-3-fluor-4-(pyrrolidin-1-yl)benzoat **14** (1.54 g, 6.90 mmol) und 2.00 Äq. Natriumhydroxid (0.55 g, 13.8 mmol) in Methanol (20 mL) und entmineralisiertem Wasser (5 mL) vorgelegt und bei 50 °C für 16 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in entmineralisiertem Wasser aufgenommen. Der pH-Wert wurde mit konzentrierter Salzsäure auf 2 eingestellt. Der präzipitierte Feststoff wurde abfiltriert, mit entmineralisiertem Wasser gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet.

Ausbeute: 78 %, 1.12 g (5.37 mmol), grauer Feststoff.

HPLC: 11.976 min, 99.9 %.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.40 (s, 1H), 7.73 – 7.34 (m, 2H), 6.74 – 6.62 (m, 1H), 3.58 – 3.34 (m, 4H), 1.93 – 1.87 (m, 4H).

7.4 Konkordanz

Nachfolgend sind alle in Kapitel 5 dargestellten Substanzen mit den entsprechenden Laborjournaleinträgen verknüpft (s. **Tab. 8**).

Tab. 8 Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Substanzen sowie die entsprechenden Laborjournaleinträge.

#	Laborjournal	#	Laborjournal	#	Laborjournal
1b	HPK373	7a	HPK185	10g	HPK536
1c	HPK395	7b	HPK160	10h	HPK598
1d	HPK512	7c	HPK93	10i	HPK604
1e	HPK382	7d	HPK120	10j	HPK484
2a	HPK60	7e	HPK220	10k	HPK493
2b	HPK378	7f	HPK242	11a	HPK214
2c	HPK398	7g	HPK237	11b	HPK481
2d	HPK482	7h	HPK523	11c	HPK476
5a	HPK322	7i	HPK494	12a	HPK163
5b	HPK48	7j	HPK399	12b	HPK165
5c	HPK59	7k	HPK404	12c	HPK191
5d	HPK139	7l	HPK492	12d	HPK247
5e	HPK424	8a	HPK151	12e	HPK245
5f	HPK508	8b	HPK440	12f	HPK253
5g	HPK446	8c	HPK526	12g	HPK208
6a	HPK83	8d	HPK592	12h	HPK231
6b	HPK136	8e	HPK450	12i	HPK306
6c	HPK75	9a	HPK453	12j	HPK400
6d	HPK85	9b	HPK442	12k	HPK407
6e	HPK427	9c	HPK533	12l	HPK495
6f	HPK182	9d	HPK594	12m	HPK473
6g	HPK238	9e	HPK461	12n	HPK539
6h	HPK232	10a	HPK462	12o	HPK603
6i	HPK510	10b	HPK414	13	HPK463
6j	HPK447	10c	HPK524	14	HPK465
6k	HPK394	10d	HPK470	15	HPK474
6l	HPK401	10e	HPK454		
6m	HPK490	10f	HPK535		

8 Literaturverzeichnis

- [1] World Health Organization. World Malaria Report 2024; Geneva, Switzerland; **2024**.
- [2] Lee, A. H. *et al.* DNA Repair Mechanisms and Their Biological Roles in the Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum*. *Microbiol Mol Biol Rev* **2014**, 78 (3), 469–486. DOI:10.1128/MMBR.00059-13.
- [3] Mota, M. M. *et al.* Migration of *Plasmodium* Sporozoites Through Cells Before Infection. *Science* **2001**, 291 (5501), 141–144. DOI:10.1126/science.291.5501.141.
- [4] Cogswell, F. B. The Hypnozoite and Relapse in Primate Malaria. *Clin Microbiol Rev* **1992**, 5 (1), 26–35. DOI:10.1128/CMR.5.1.26.
- [5] Loiseau, C. *et al.* First Evidence and Predictions of *Plasmodium* Transmission in Alaskan Bird Populations. *PLoS ONE* **2012**, 7 (9), e44729. DOI:10.1371/journal.pone.0044729.
- [6] Gupta, P. *et al.* Heme Detoxification Protein (*PFHDP*) Is Essential for the Hemoglobin Uptake and Metabolism in *Plasmodium Falciparum*. *FASEB BioAdvances* **2022**, 4 (10), 662–674. DOI:10.1096/fba.2022-00021.
- [7] Grand, M. *et al.* Hepatic Inflammation Confers Protective Immunity Against Liver Stages of Malaria Parasite. *Front. Immunol.* **2020**, 11, 585502. DOI:10.3389/fimmu.2020.585502.
- [8] Phillips, M. A. *et al.* Malaria. *Nat Rev Dis Primers* **2017**, 3 (1), 17050. DOI:10.1038/nrdp.2017.50.
- [9] Garcia, G. E. *et al.* Xanthurenic Acid Induces Gametogenesis in *Plasmodium*, the Malaria Parasite. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, 273 (20), 12003–12005. DOI:10.1074/jbc.273.20.12003.
- [10] Mazier, D. *et al.* A Pre-Emptive Strike against Malaria's Stealthy Hepatic Forms. *Nat Rev Drug Discov* **2009**, 8 (11), 854–864. DOI:10.1038/nrd2960.
- [11] World Health Organization. WHO Guidelines for Malaria; Geneva, Switzerland; **2023**.
- [12] Rothe, C. *et al.* Empfehlungen zur Malariaprophylaxe: Recommendations for antimalarial prophylaxis. *Flugmedizin · Tropenmedizin · Reisemedizin - FTR* **2024**, 31 (04), 165–206. DOI:10.1055/a-2351-8414.
- [13] Skinner-Adams, T. S. *et al.* Cyclization-Blocked Proguanil as a Strategy to Improve the Antimalarial Activity of Atovaquone. *Commun Biol* **2019**, 2 (1), 166. DOI:10.1038/s42003-019-0397-3.
- [14] Cohen, J. *et al.* From the Circumsporozoite Protein to the RTS,S/AS Candidate Vaccine. *Human Vaccines* **2010**, 6 (1), 90–96. DOI:10.4161/hv.6.1.9677.
- [15] Nadeem, A. Y. *et al.* Mosquirix™ RTS, S/AS01 Vaccine Development, Immunogenicity, and Efficacy. *Vaccines* **2022**, 10 (5), 713. DOI:10.3390/vaccines10050713.

- [16] Daily, J. P. Malaria Vaccine Trials — Beyond Efficacy End Points. *N Engl J Med* **2012**, 367 (24), 2349–2351. DOI:10.1056/NEJMe1213392.
- [17] Collins, K. A. *et al.* Enhancing Protective Immunity to Malaria with a Highly Immunogenic Virus-like Particle Vaccine. *Sci Rep* **2017**, 7 (1), 46621. DOI:10.1038/srep46621.
- [18] Dattoo, M. S. *et al.* Safety and Efficacy of Malaria Vaccine Candidate R21/Matrix-M in African Children: A Multicentre, Double-Blind, Randomised, Phase 3 Trial. *The Lancet* **2024**, 403 (10426), 533–544. DOI:10.1016/S0140-6736(23)02511-4.
- [19] Ledford, H. Malaria Vaccine Wows and Seeds COVID-19 Vaccine Effort. *Nat Biotechnol* **2021**, 39 (7), 786–787. DOI:10.1038/s41587-021-00983-8.
- [20] World Health Organization. Malaria Rapid Diagnostic Test Performance: Results of WHO Product Testing of Malaria RDTs: Round 8 (2016–2018); World Health Organization: Geneva; **2018**.
- [21] White, T. E. K. *et al.* Artesunate-Induced Depletion of Embryonic Erythroblasts Precedes Embryoethality and Teratogenicity in Vivo. *Birth Defect Res B* **2006**, 77 (5), 413–429. DOI:10.1002/bdrb.20092.
- [22] Antimalarial Chemotherapy: Mechanisms of Action, Resistance, and New Directions in Drug Discovery; Rosenthal, P. J., Ed.; Infectious disease; Humana Press: Totowa, N.Y; **2001**.
- [23] Blasco, B. *et al.* Antimalarial Drug Resistance: Linking Plasmodium Falciparum Parasite Biology to the Clinic. *Nat Med* **2017**, 23 (8), 917–928. DOI:10.1038/nm.4381.
- [24] Bridgford, J. L. *et al.* Artemisinin Kills Malaria Parasites by Damaging Proteins and Inhibiting the Proteasome. *Nat Commun* **2018**, 9 (1), 3801. DOI:10.1038/s41467-018-06221-1.
- [25] Cowman, A. F. *et al.* Malaria: Biology and Disease. *Cell* **2016**, 167 (3), 610–624. DOI:10.1016/j.cell.2016.07.055.
- [26] Arya, A. *et al.* Artemisinin-Based Combination Therapy (ACT) and Drug Resistance Molecular Markers: A Systematic Review of Clinical Studies from Two Malaria Endemic Regions – India and Sub-Saharan Africa. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* **2021**, 15, 43–56. DOI:10.1016/j.ijpddr.2020.11.006.
- [27] Wongsrichanalai, C. *et al.* Declining Artesunate-Mefloquine Efficacy against Falciparum Malaria on the Cambodia–Thailand Border. *Emerg. Infect. Dis.* **2008**, 14 (5), 716–719. DOI:10.3201/eid1405.071601.
- [28] Noedl, H. *et al.* Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Western Cambodia. *N Engl J Med* **2008**, 359 (24), 2619–2620. DOI:10.1056/NEJMc0805011.
- [29] Ashley, E. A. *et al.* Spread of Artemisinin Resistance in *Plasmodium Falciparum* Malaria. *N Engl J Med* **2014**, 371 (5), 411–423. DOI:10.1056/NEJMoa1314981.

- [30] De Haan, F. *et al.* Strategies for Deploying Triple Artemisinin-Based Combination Therapy in the Greater Mekong Subregion. *Malar J* **2023**, 22 (1), 261. DOI:10.1186/s12936-023-04666-4.
- [31] Van Der Pluijm, R. W. *et al.* Triple Artemisinin-Based Combination Therapies versus Artemisinin-Based Combination Therapies for Uncomplicated Plasmodium Falciparum Malaria: A Multicentre, Open-Label, Randomised Clinical Trial. *The Lancet* **2020**, 395 (10233), 1345–1360. DOI:10.1016/S0140-6736(20)30552-3.
- [32] Xie, S. C. *et al.* K13, the Cytostome, and Artemisinin Resistance. *Trends in Parasitology* **2020**, 36 (6), 533–544. DOI:10.1016/j.pt.2020.03.006.
- [33] Amato, R. *et al.* Genetic Markers Associated with Dihydroartemisinin–Piperaquine Failure in Plasmodium Falciparum Malaria in Cambodia: A Genotype–Phenotype Association Study. *The Lancet Infectious Diseases* **2017**, 17 (2), 164–173. DOI:10.1016/S1473-3099(16)30409-1.
- [34] Kim, J. *et al.* Structure and Drug Resistance of the Plasmodium Falciparum Transporter PfCRT. *Nature* **2019**, 576 (7786), 315–320. DOI:10.1038/s41586-019-1795-x.
- [35] Foote, S. J. *et al.* Amplification of the Multidrug Resistance Gene in Some Chloroquine-Resistant Isolates of P. Falciparum. *Cell* **1989**, 57 (6), 921–930. DOI:10.1016/0092-8674(89)90330-9.
- [36] Müller, I. B. *et al.* Antimalarial Drugs: Modes Of Action And Mechanisms Of Parasite Resistance. *Future Microbiol.* **2010**, 5 (12), 1857–1873. DOI:10.2217/fmb.10.136.
- [37] Nkrumah, L. J. *et al.* Probing the Multifactorial Basis of Plasmodium Falciparum Quinine Resistance: Evidence for a Strain-Specific Contribution of the Sodium-Proton Exchanger PfNHE. *Molecular and Biochemical Parasitology* **2009**, 165 (2), 122–131. DOI:10.1016/j.molbiopara.2009.01.011.
- [38] Ranford-Cartwright, L. C. *et al.* Analysis of Malaria Parasite Phenotypes Using Experimental Genetic Crosses of Plasmodium Falciparum. *International Journal for Parasitology* **2012**, 42 (6), 529–534. DOI:10.1016/j.ijpara.2012.03.004.
- [39] Uwimana, A. *et al.* Emergence and Clonal Expansion of in Vitro Artemisinin-Resistant Plasmodium Falciparum Kelch13 R561H Mutant Parasites in Rwanda. *Nat Med* **2020**, 26 (10), 1602–1608. DOI:10.1038/s41591-020-1005-2.
- [40] Fidock, D. A. *et al.* Antimalarial Drug Discovery: Efficacy Models for Compound Screening. *Nat Rev Drug Discov* **2004**, 3 (6), 509–520. DOI:10.1038/nrd1416.
- [41] Gashaw, I. *et al.* What Makes a Good Drug Target? *Drug Discovery Today* **2012**, 17, S24–S30. DOI:10.1016/j.drudis.2011.12.008.
- [42] Gardner, M. J. *et al.* Genome Sequence of the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum. *Nature* **2002**, 419 (6906), 498–511. DOI:10.1038/nature01097.

- [43] Vincent, F. *et al.* Phenotypic Drug Discovery: Recent Successes, Lessons Learned and New Directions. *Nat Rev Drug Discov* **2022**, 21 (12), 899–914. DOI:10.1038/s41573-022-00472-w.
- [44] Isgut, M. *et al.* Application of Combination High-Throughput Phenotypic Screening and Target Identification Methods for the Discovery of Natural Product-Based Combination Drugs. *Medicinal Research Reviews* **2018**, 38 (2), 504–524. DOI:10.1002/med.21444.
- [45] Hughes, J. *et al.* Principles of Early Drug Discovery. *British J Pharmacology* **2011**, 162 (6), 1239–1249. DOI:10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x.
- [46] Burrows, J. N. *et al.* New Developments in Anti-Malarial Target Candidate and Product Profiles. *Malar J* **2017**, 16 (1), 26. DOI:10.1186/s12936-016-1675-x.
- [47] Medicines for Malaria Venture. *MMV's pipeline of antimalarial drugs*. <https://www.mmv.org/mmv-pipeline-antimalarial-drugs> (Abgerufen am 30.9.2024).
- [48] Medicines for Malaria Venture. *MMV's strategy to 2030*. <https://www.mmv.org/our-work/MMV-strategy> (Abgerufen am 27.9.2024).
- [49] Drugs for Neglected Diseases Initiative. *Diseases*. <https://www.dndi.org/diseases/> (Abgerufen am 23.7.2024).
- [50] Umumarungu, T. *et al.* Recent Developments in Antimalarial Drug Discovery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2023**, 88–89, 117339. DOI:10.1016/j.bmc.2023.117339.
- [51] Koller, R. *et al.* The Early Preclinical and Clinical Development of Ganaplacide (KAF156), a Novel Antimalarial Compound. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2018**, 27 (10), 803–810. DOI:10.1080/13543784.2018.1524871.
- [52] White, N. J. *et al.* Antimalarial Activity of KAF156 in Falciparum and Vivax Malaria. *N Engl J Med* **2016**, 375 (12), 1152–1160. DOI:10.1056/NEJMoa1602250.
- [53] Huskey, S.-E. W. *et al.* KAE609 (Cipargamin), a New Spiroindolone Agent for the Treatment of Malaria: Evaluation of the Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion of a Single Oral 300-Mg Dose of [¹⁴C]KAE609 in Healthy Male Subjects. *Drug Metabolism and Disposition* **2016**, 44 (5), 672–682. DOI:10.1124/dmd.115.069187.
- [54] Dennis, A. S. M. *et al.* Cell Swelling Induced by the Antimalarial KAE609 (Cipargamin) and Other PfATP4-Associated Antimalarials. *Antimicrob Agents Chemother* **2018**, 62 (6), e00087-18. DOI:10.1128/AAC.00087-18.
- [55] Yeung, B. K. S. *et al.* Spirotetrahydro β -Carbolines (Spiroindolones): A New Class of Potent and Orally Efficacious Compounds for the Treatment of Malaria. *J. Med. Chem.* **2010**, 53 (14), 5155–5164. DOI:10.1021/jm100410f.
- [56] Spillman, N. J. *et al.* Na⁺ Regulation in the Malaria Parasite Plasmodium Falciparum Involves the Cation ATPase PfATP4 and Is a Target of the Spiroindolone Antimalarials. *Cell Host & Microbe* **2013**, 13 (2), 227–237. DOI:10.1016/j.chom.2012.12.006.

- [57] Jiménez-Díaz, M. B. *et al.* (+)-SJ733, a Clinical Candidate for Malaria That Acts through ATP4 to Induce Rapid Host-Mediated Clearance of *Plasmodium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2014**, *111* (50). DOI:10.1073/pnas.1414221111.
- [58] Charman, S. A. *et al.* Synthetic Ozonide Drug Candidate OZ439 Offers New Hope for a Single-Dose Cure of Uncomplicated Malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108* (11), 4400–4405. DOI:10.1073/pnas.1015762108.
- [59] Wang, X. *et al.* Comparative Antimalarial Activities and ADME Profiles of Ozonides (1,2,4-Trioxolanes) OZ277, OZ439, and Their 1,2-Dioxolane, 1,2,4-Trioxane, and 1,2,4,5-Tetraoxane Isosteres. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (6), 2547–2555. DOI:10.1021/jm400004u.
- [60] Phyo, A. P. *et al.* Antimalarial Activity of Artefenomel (OZ439), a Novel Synthetic Antimalarial Endoperoxide, in Patients with *Plasmodium Falciparum* and *Plasmodium Vivax* Malaria: An Open-Label Phase 2 Trial. *The Lancet Infectious Diseases* **2016**, *16* (1), 61–69. DOI:10.1016/S1473-3099(15)00320-5.
- [61] Siriwardana, A. *et al.* Endoperoxide Drug Cross-Resistance Patterns for *Plasmodium Falciparum* Exhibiting an Artemisinin Delayed-Clearance Phenotype. *Antimicrob Agents Chemother* **2016**, *60* (11), 6952–6956. DOI:10.1128/AAC.00857-16.
- [62] Baumgärtner, F. *et al.* In Vitro Activity of Anti-Malarial Ozonides against an Artemisinin-Resistant Isolate. *Malar J* **2017**, *16* (1), 45. DOI:10.1186/s12936-017-1696-0.
- [63] Collins, K. A. *et al.* A Controlled Human Malaria Infection Model Enabling Evaluation of Transmission-Blocking Interventions. *Journal of Clinical Investigation* **2018**, *128* (4), 1551–1562. DOI:10.1172/JCI98012.
- [64] Collins, K. A. *et al.* Antimalarial Activity of Artefenomel Against Asexual Parasites and Transmissible Gametocytes During Experimental Blood-Stage *Plasmodium Vivax* Infection. *The Journal of Infectious Diseases* **2022**, *225* (6), 1062–1069. DOI:10.1093/infdis/jiaa287.
- [65] Kim, H. S. *et al.* Seeking the Elusive Long-Acting Ozonide: Discovery of Artefenomel (OZ439). *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (7), 2651–2653. DOI:10.1021/acs.jmedchem.7b00299.
- [66] Dong, Y. *et al.* Structure–Activity Relationship of the Antimalarial Ozonide Artefenomel (OZ439). *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (7), 2654–2668. DOI:10.1021/acs.jmedchem.6b01586.
- [67] Dubar, F. *et al.* Ferroquine, an Ingenious Antimalarial Drug –Thoughts on the Mechanism of Action. *Molecules* **2008**, *13* (11), 2900–2907. DOI:10.3390/molecules13112900.

- [68] Biot, C. *et al.* Synthesis and Antimalarial Activity in Vitro and in Vivo of a New Ferrocene–Chloroquine Analogue. *J. Med. Chem.* **1997**, 40 (23), 3715–3718. DOI:10.1021/jm970401y.
- [69] Dubar, F. *et al.* The Ferroquine Antimalarial Conundrum: Redox Activation and Reinvasion Inhibition. *Angew Chem Int Ed* **2013**, 52 (30), 7690–7693. DOI:10.1002/anie.201303690.
- [70] Chavain, N. *et al.* Investigation of the Redox Behavior of Ferroquine, a New Antimalarial. *Mol. Pharmaceutics* **2008**, 5 (5), 710–716. DOI:10.1021/mp800007x.
- [71] De Villiers, K. A. *et al.* The Crystal Structure of Halofantrine–Ferriprotoporphyrin IX and the Mechanism of Action of Arylmethanol Antimalarials. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2008**, 102 (8), 1660–1667. DOI:10.1016/j.jinorgbio.2008.04.001.
- [72] Biot, C. *et al.* Structure–Activity Relationships of 4-N-Substituted Ferroquine Analogues: Time to Re-Evaluate the Mechanism of Action of Ferroquine. *Journal of Organometallic Chemistry* **2009**, 694 (6), 845–854. DOI:10.1016/j.jorganchem.2008.09.033.
- [73] Taipale, M. *et al.* HSP90 at the Hub of Protein Homeostasis: Emerging Mechanistic Insights. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2010**, 11 (7), 515–528. DOI:10.1038/nrm2918.
- [74] Donnelly, A. *et al.* Novobiocin and Additional Inhibitors of the Hsp90 C-Terminal Nucleotide- Binding Pocket. *CMC* **2008**, 15 (26), 2702–2717. DOI:10.2174/092986708786242895.
- [75] Workman, P. Combinatorial Attack on Multistep Oncogenesis by Inhibiting the Hsp90 Molecular Chaperone. *Cancer Letters* **2004**, 206 (2), 149–157. DOI:10.1016/j.canlet.2003.08.032.
- [76] Pratt, W. B. *et al.* Steroid Receptor Interactions with Heat Shock Protein and Immunophilin Chaperones*. *Endocrine Reviews* **1997**, 18 (3), 306–360. DOI:10.1210/edrv.18.3.0303.
- [77] Workman, P. *et al.* Drugging the Cancer Chaperone HSP90: Combinatorial Therapeutic Exploitation of Oncogene Addiction and Tumor Stress. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2007**, 1113 (1), 202–216. DOI:10.1196/annals.1391.012.
- [78] Whitesell, L. *et al.* HSP90 and the Chaperoning of Cancer. *Nat Rev Cancer* **2005**, 5 (10), 761–772. DOI:10.1038/nrc1716.
- [79] Zhang, H. *et al.* Targeting Multiple Signal Transduction Pathways through Inhibition of Hsp90. *J Mol Med* **2004**, 82 (8). DOI:10.1007/s00109-004-0549-9.
- [80] Pavithra, S. R. *et al.* Systems Analysis of Chaperone Networks in the Malarial Parasite Plasmodium Falciparum. *PLoS Comput Biol* **2007**, 3 (9), e168. DOI:10.1371/journal.pcbi.0030168.

- [81] Pavithra, S. R. *et al.* Recurrent Fever Promotes Plasmodium Falciparum Development in Human Erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, 279 (45), 46692–46699. DOI:10.1074/jbc.M409165200.
- [82] Blatch, G. L. Plasmodium Falciparum Molecular Chaperones: Guardians of the Malaria Parasite Proteome and Renovators of the Host Proteome. *Front. Cell Dev. Biol.* **2022**, 10, 921739. DOI:10.3389/fcell.2022.921739.
- [83] Spiegelberg, D. *et al.* The HSP90 Inhibitor Onalespib Exerts Synergistic Anti-Cancer Effects When Combined with Radiotherapy: An in Vitro and in Vivo Approach. *Sci Rep* **2020**, 10 (1), 5923. DOI:10.1038/s41598-020-62293-4.
- [84] Kumar, R. *et al.* The Heat Shock Protein 90 of Plasmodium Falciparum and Antimalarial Activity of Its Inhibitor, Geldanamycin. *Malar J* **2003**, 2 (1), 30. DOI:10.1186/1475-2875-2-30.
- [85] Banumathy, G. *et al.* Heat Shock Protein 90 Function Is Essential for Plasmodium Falciparum Growth in Human Erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278 (20), 18336–18345. DOI:10.1074/jbc.M211309200.
- [86] Posfai, D. *et al.* Identification of Hsp90 Inhibitors with Anti-Plasmodium Activity. *Antimicrob Agents Chemother* **2018**, 62 (4), e01799-17. DOI:10.1128/AAC.01799-17.
- [87] Mansfield, C. R. *et al.* Selective Targeting of Plasmodium Falciparum Hsp90 Disrupts the 26S Proteasome. *Cell Chemical Biology* **2024**, 31 (4), 729-742.e13. DOI:10.1016/j.chembiol.2024.02.008.
- [88] Silva, N. S. M. *et al.* Solution Structure of Plasmodium Falciparum Hsp90 Indicates a High Flexible Dimer. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2020**, 690, 108468. DOI:10.1016/j.abb.2020.108468.
- [89] Lee, C.-C. *et al.* The Hexameric Structures of Human Heat Shock Protein 90. *PLoS ONE* **2011**, 6 (5), e19961. DOI:10.1371/journal.pone.0019961.
- [90] Schopf, F. H. *et al.* The HSP90 Chaperone Machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2017**, 18 (6), 345–360. DOI:10.1038/nrm.2017.20.
- [91] Dutta, T. *et al.* Hsp90 and Associated Co-Chaperones of the Malaria Parasite. *Biomolecules* **2022**, 12 (8), 1018. DOI:10.3390/biom12081018.
- [92] Pallavi, R. *et al.* Heat Shock Protein 90 as a Drug Target against Protozoan Infections. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, 285 (49), 37964–37975. DOI:10.1074/jbc.M110.155317.
- [93] Corbett, K. D. *et al.* Structure of the ATP-binding Domain of *Plasmodium Falciparum* Hsp90. *Proteins* **2010**, 78 (13), 2738–2744. DOI:10.1002/prot.22799.
- [94] Sahasrabudhe, P. *et al.* The Plasticity of the Hsp90 Co-Chaperone System. *Molecular Cell* **2017**, 67 (6), 947-961.e5. DOI:10.1016/j.molcel.2017.08.004.

- [95] Alag, R. *et al.* Crystallographic Structure of the Tetratricopeptide Repeat Domain of *Plasmodium Falciparum* FKBP35 and Its Molecular Interaction with Hsp90 C-terminal Pentapeptide. *Protein Science* **2009**, 18 (10), 2115–2124. DOI:10.1002/pro.226.
- [96] Lindenthal, C. *et al.* Identification and Biochemical Characterisation of a Protein Phosphatase 5 Homologue from *Plasmodium Falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **2002**, 120 (2), 257–268. DOI:10.1016/S0166-6851(02)00007-5.
- [97] Tsutsumi, S. *et al.* Charged Linker Sequence Modulates Eukaryotic Heat Shock Protein 90 (Hsp90) Chaperone Activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, 109 (8), 2937–2942. DOI:10.1073/pnas.1114414109.
- [98] Meyer, P. *et al.* Structural and Functional Analysis of the Middle Segment of Hsp90: Implications for ATP Hydrolysis and Client Protein and Cochaperone Interactions. *Molecular Cell* **2003**, 11 (3), 647–658. DOI:10.1016/S1097-2765(03)00065-0.
- [99] Dahiya, V. *et al.* The Switch from Client Holding to Folding in the Hsp70/Hsp90 Chaperone Machineries Is Regulated by a Direct Interplay between Co-Chaperones. *Molecular Cell* **2022**, 82 (8), 1543-1556.e6. DOI:10.1016/j.molcel.2022.01.016.
- [100] Roe, S. M. *et al.* Structural Basis for Inhibition of the Hsp90 Molecular Chaperone by the Antitumor Antibiotics Radicicol and Geldanamycin. *J. Med. Chem.* **1999**, 42 (2), 260–266. DOI:10.1021/jm980403y.
- [101] Supko, J. G. *et al.* Preclinical Pharmacologic Evaluation of Geldanamycin as an Antitumor Agent. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1995**, 36 (4), 305–315. DOI:10.1007/BF00689048.
- [102] Stofberg, M. L. *et al.* Inhibitors of the *Plasmodium Falciparum* Hsp90 towards Selective Antimalarial Drug Design: The Past, Present and Future. *Cells* **2021**, 10 (11), 2849. DOI:10.3390/cells10112849.
- [103] Stebbins, C. E. *et al.* Crystal Structure of an Hsp90–Geldanamycin Complex: Targeting of a Protein Chaperone by an Antitumor Agent. *Cell* **1997**, 89 (2), 239–250. DOI:10.1016/S0092-8674(00)80203-2.
- [104] Perković, I. *et al.* Harmicines – Harmine and Cinnamic Acid Hybrids as Novel Antiplasmodial Hits. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2020**, 187, 111927. DOI:10.1016/j.ejmech.2019.111927.
- [105] Marinović, M. *et al.* Further Investigation of Harmicines as Novel Antiplasmodial Agents: Synthesis, Structure-Activity Relationship and Insight into the Mechanism of Action. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2021**, 224, 113687. DOI:10.1016/j.ejmech.2021.113687.
- [106] Bayih, A. G. *et al.* In Vitro and in Vivo Anti-Malarial Activity of Novel Harmine-Analog Heat Shock Protein 90 Inhibitors: A Possible Partner for Artemisinin. *Malar J* **2016**, 15 (1), 579. DOI:10.1186/s12936-016-1625-7.

- [107] Shahinas, D. *et al.* A Purine Analog Synergizes with Chloroquine (CQ) by Targeting Plasmodium Falciparum Hsp90 (PfHsp90). *PLoS ONE* **2013**, 8 (9), e75446. DOI:10.1371/journal.pone.0075446.
- [108] Wang, T. *et al.* Differences in Conformational Dynamics between *Plasmodium Falciparum* and Human Hsp90 Orthologues Enable the Structure-Based Discovery of Pathogen-Selective Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2014**, 57 (6), 2524–2535. DOI:10.1021/jm401801t.
- [109] Bansod, S. *et al.* Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation Identify a Novel Radicicol Derivative That Predicts Exclusive Binding to *Plasmodium Falciparum* Topoisomerase VIB. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **2022**, 40 (15), 6939–6951. DOI:10.1080/07391102.2021.1891970.
- [110] Wei, H. *et al.* Heat Shock Protein 90: Biological Functions, Diseases, and Therapeutic Targets. *MedComm* **2024**, 5 (2), e470. DOI:10.1002/mco2.470.
- [111] Yim, K. H. *et al.* Gambogic Acid Identifies an Isoform-Specific Druggable Pocket in the Middle Domain of Hsp90 β . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2016**, 113 (33). DOI:10.1073/pnas.1606655113.
- [112] Zhang, F. Z. *et al.* Triptolide, a HSP90 Middle Domain Inhibitor, Induces Apoptosis in Triple Manner. *Oncotarget* **2018**, 9 (32), 22301–22315. DOI:10.18632/oncotarget.24737.
- [113] Strocchia, M. *et al.* Targeting the Hsp90 C-Terminal Domain by the Chemically Accessible Dihydropyrimidinone Scaffold. *Chem. Commun.* **2015**, 51 (18), 3850–3853. DOI:10.1039/C4CC10074C.
- [114] Yu, X. M. *et al.* Hsp90 Inhibitors Identified from a Library of Novobiocin Analogues. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (37), 12778–12779. DOI:10.1021/ja0535864.
- [115] Mbaba, M. *et al.* Novobiocin–Ferrocene Conjugates Possessing Anticancer and Antiplasmodial Activity Independent of HSP90 Inhibition. *J Biol Inorg Chem* **2019**, 24 (2), 139–149. DOI:10.1007/s00775-018-1634-9.
- [116] Hillier, C. *et al.* Landscape of the Plasmodium Interactome Reveals Both Conserved and Species-Specific Functionality. *Cell Reports* **2019**, 28 (6), 1635-1647.e5. DOI:10.1016/j.celrep.2019.07.019.
- [117] O. Villoutreix, B. *et al.* A Leap into the Chemical Space of Protein-Protein Interaction Inhibitors. *CPD* **2012**, 18 (30), 4648–4667. DOI:10.2174/138161212802651571.
- [118] Sable, R. *et al.* Surfing the Protein-Protein Interaction Surface Using Docking Methods: Application to the Design of PPI Inhibitors. *Molecules* **2015**, 20 (6), 11569–11603. DOI:10.3390/molecules200611569.

- [119] Thorn, K. S. *et al.* ASEdb: A Database of Alanine Mutations and Their Effects on the Free Energy of Binding in Protein Interactions. *Bioinformatics* **2001**, 17 (3), 284–285. DOI:10.1093/bioinformatics/17.3.284.
- [120] Silva, K. S. F. *et al.* Structure-Based Design of TFF3-PAR2 Inhibitor Peptides as A Promising New Therapeutic Approach for Endometriosis Patients. *M J Gyne.* **2018**, 3 (1), 016.
- [121] Bogan, A. A. *et al.* Anatomy of Hot Spots in Protein Interfaces. *Journal of Molecular Biology* **1998**, 280 (1), 1–9. DOI:10.1006/jmbi.1998.1843.
- [122] Werner, H. M. *et al.* Peptide Backbone Composition and Protease Susceptibility: Impact of Modification Type, Position, and Tandem Substitution. *ChemBioChem* **2016**, 17 (8), 712–718. DOI:10.1002/cbic.201500312.
- [123] Vagner, J. *et al.* Peptidomimetics, a Synthetic Tool of Drug Discovery. *Current Opinion in Chemical Biology* **2008**, 12 (3), 292–296. DOI:10.1016/j.cbpa.2008.03.009.
- [124] Van Regenmortel, M. H. V. Antigenicity and Immunogenicity of Synthetic Peptides. *Biologicals* **2001**, 29 (3–4), 209–213. DOI:10.1006/biol.2001.0308.
- [125] Hirschmann, R. F. *et al.* The β -D-Glucose Scaffold as a β -Turn Mimetic. *Acc. Chem. Res.* **2009**, 42 (10), 1511–1520. DOI:10.1021/ar900020x.
- [126] Pelay-Gimeno, M. *et al.* Strukturbasierte Entwicklung von Protein-Protein-Interaktionsinhibitoren: Stabilisierung und Nachahmung von Peptidliganden. *Angewandte Chemie* **2015**, 127 (31), 9022–9054. DOI:10.1002/ange.201412070.
- [127] Nick Pace, C. *et al.* A Helix Propensity Scale Based on Experimental Studies of Peptides and Proteins. *Biophysical Journal* **1998**, 75 (1), 422–427. DOI:10.1016/S0006-3495(98)77529-0.
- [128] Lenci, E. *et al.* Peptidomimetic Toolbox for Drug Discovery. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, 49 (11), 3262–3277. DOI:10.1039/D0CS00102C.
- [129] Jayatunga, M. K. P. *et al.* α -Helix Mimetics: Outwards and Upwards. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2014**, 24 (3), 717–724. DOI:10.1016/j.bmcl.2013.12.003.
- [130] Algar, S. *et al.* Evolution in Non-Peptide α -Helix Mimetics on the Road to Effective Protein-Protein Interaction Modulators. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2021**, 211, 113015. DOI:10.1016/j.ejmech.2020.113015.
- [131] Yin, H. *et al.* Terphenyl-Based Helical Mimetics That Disrupt the P53/HDM2 Interaction. *Angew Chem Int Ed* **2005**, 44 (18), 2704–2707. DOI:10.1002/anie.200462316.
- [132] Cummings, C. G. *et al.* Synthesis and Biological Evaluation of a 5-6-5 Imidazole-Phenyl-Thiazole Based α -Helix Mimetic. *Org. Lett.* **2009**, 11 (1), 25–28. DOI:10.1021/ol8022962.

- [133] Toro, M. A. *et al.* Probing the Dimerization Interface of *Leishmania Infantum* Trypanothione Reductase with Site-Directed Mutagenesis and Short Peptides. *ChemBioChem* **2013**, 14 (10), 1212–1217. DOI:10.1002/cbic.201200744.
- [134] Lee, Y. *et al.* Bridged α -Helix Mimetic Small Molecules. *Chem. Commun.* **2019**, 55 (88), 13311–13314. DOI:10.1039/C9CC03627J.
- [135] Nolan, W. P. *et al.* The Synthesis of 1,6-Disubstituted Indanes Which Mimic the Orientation of Amino Acid Side-Chains in a Protein Alpha-Helix Motif. *Tetrahedron Letters* **1992**, 33 (45), 6879–6882. DOI:10.1016/S0040-4039(00)61800-2.
- [136] Brown, Z. Z. *et al.* A Spiroligomer α -Helix Mimic That Binds HDM2, Penetrates Human Cells and Stabilizes HDM2 in Cell Culture. *PLoS ONE* **2012**, 7 (10), e45948. DOI:10.1371/journal.pone.0045948.
- [137] Horwell, D. C. *et al.* The Design of Dipeptide Helical Mimetics: The Synthesis, Tachykinin Receptor Affinity and Conformational Analysis of 1,1,6-Trisubstituted Indanes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1996**, 4 (1), 33–42. DOI:10.1016/0968-0896(95)00169-7.
- [138] Burslem, G. M. *et al.* Small-Molecule Proteomimetic Inhibitors of the HIF-1 α -P300 Protein–Protein Interaction. *ChemBioChem* **2014**, 15 (8), 1083–1087. DOI:10.1002/cbic.201400009.
- [139] Ernst, J. T. *et al.* Design and Application of an α -Helix-Mimetic Scaffold Based on an Oligoamide-Foldamer Strategy: Antagonism of the Bak BH3/Bcl-xL Complex. *Angew Chem Int Ed* **2003**, 42 (5), 535–539. DOI:10.1002/anie.200390154.
- [140] Bhatia, S. *et al.* Development of a First-in-Class Small-Molecule Inhibitor of the C-Terminal Hsp90 Dimerization. *ACS Cent. Sci.* **2022**, 8 (5), 636–655. DOI:10.1021/acscentsci.2c00013.
- [141] Ciglia, E. *et al.* Resolving Hot Spots in the C-Terminal Dimerization Domain That Determine the Stability of the Molecular Chaperone Hsp90. *PLoS ONE* **2014**, 9 (4), e96031. DOI:10.1371/journal.pone.0096031.
- [142] Spanier, L. Trispyrimidonamide Als Neuartige α -Helixmimetika: Design, Synthese Und Biologische Evaluierung, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, **2014**.
- [143] Norton Matos, M. R. P. *et al.* Studies on the Preparation of 4-Ethoxyalkyliden and 4-Aminoalkyliden-5(4 *H*)-Oxazolones. *Synthetic Communications* **2003**, 33 (8), 1285–1299. DOI:10.1081/SCC-120018688.
- [144] Martinu, T. *et al.* Synthesis of Carboalkoxychloro- and Bromodiazirines. *J. Org. Chem.* **2004**, 69 (21), 7359–7362. DOI:10.1021/jo040194r.
- [145] Hopkins, G. *et al.* Alkylations of Heterocyclic Ambident Anions II. Alkylation of 2-Pyridone Salts. *J. Org. Chem.* **1967**, 32 (12), 4040–4044. DOI:10.1021/jo01287a600.

- [146] Woloschin, V. Synthese Und Biologische Evaluation Pyrimidon- Und Pyrimidin-Basierter α -Helixmimetika, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, **2020**.
- [147] Beghyn, T. B. *et al.* Drug to Genome to Drug: Discovery of New Antiplasmodial Compounds. *J. Med. Chem.* **2011**, 54 (9), 3222–3240. DOI:10.1021/jm1014617.
- [148] Huang, S.-X. *et al.* Incorporation of Piperazino Functionality into 1,3-Disubstituted Urea as the Tertiary Pharmacophore Affording Potent Inhibitors of Soluble Epoxide Hydrolase with Improved Pharmacokinetic Properties. *J. Med. Chem.* **2010**, 53 (23), 8376–8386. DOI:10.1021/jm101087u.
- [149] Lazrak, F. *et al.* Synthesis of New Condensing Systems Containing 1,2,4-Triazole, 1,3-Thiazine, 1,3-Thiazepine and 1,3,5,7-Dithiadiazocine. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* **2004**, 179 (9), 1799–1808. DOI:10.1080/10426500490466526.
- [150] Mamedov, V. A. *et al.* Macrocycles, Derivatives of Nitrogen-Containing Heterocycles 3. Synthesis of Di(Imidazo[1,5-a]Quinoxalina)-2(1,3)-Benzadithiacycloalkaphanes. *Russ Chem Bull* **2009**, 58 (7), 1493–1503. DOI:10.1007/s11172-009-0201-5.
- [151] Mishra, S. J. *et al.* The Development of Hsp90 β -Selective Inhibitors to Overcome Detriments Associated with *Pan* -Hsp90 Inhibition. *J. Med. Chem.* **2021**, 64 (3), 1545–1557. DOI:10.1021/acs.jmedchem.0c01700.
- [152] Borenfreund, E. *et al.* A Simple Quantitative Procedure Using Monolayer Cultures for Cytotoxicity Assays (HTD/NR-90). *Journal of Tissue Culture Methods* **1985**, 9 (1), 7–9. DOI:10.1007/BF01666038.
- [153] Banerjee, M. *et al.* Assay Design and Development Strategies for Finding Hsp90 Inhibitors and Their Role in Human Diseases. *Pharmacology & Therapeutics* **2021**, 221, 107747. DOI:10.1016/j.pharmthera.2020.107747.
- [154] Perocco, P. *et al.* DNA Damage by Haloalkanes in Human Lymphocytes Cultured in Vitro. *Cancer Letters* **1981**, 13 (3), 213–218. DOI:10.1016/0304-3835(81)90020-3.
- [155] De Carvalho, L. P. *et al.* Quantification of Plasmodium Falciparum HRP-2 as an Alternative Method to [3H]Hypoxanthine Incorporation to Measure the Parasite Reduction Ratio in Vitro. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2023**, 62 (3), 106894. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2023.106894.
- [156] Carter, R. *et al.* Plasmodia of Rodents; Academic Press, Inc.: New York; **1977**.
- [157] Tyagi, R. K. *Plasmodium Falciparum* -Infected Humanized Mice: A Viable Preclinical Tool. *Immunotherapy* **2021**, 13 (16), 1345–1353. DOI:10.2217/imt-2021-0102.
- [158] Derendorf, H. *et al.* Rowland and Tozer's Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: Concepts and Applications, Fifth edition.; Wolters Kluwer: Philadelphia Baltimore New York London Buenos Aires Hong Kong Sydney Tokyo; **2020**.

- [159] Liu, X. *et al.* Optimization of a Small Tropomyosin-Related Kinase B (TrkB) Agonist 7,8-Dihydroxyflavone Active in Mouse Models of Depression. *J. Med. Chem.* **2012**, 55 (19), 8524–8537. DOI:10.1021/jm301099x.
- [160] Dorel, R. *et al.* The Buchwald–Hartwig Amination After 25 Years. *Angew Chem Int Ed* **2019**, 58 (48), 17118–17129. DOI:10.1002/anie.201904795.
- [161] Forni, J. A. *et al.* Rapid Microwave-Assisted Synthesis of N-Aryl 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolines. *Aust. J. Chem.* **2015**, 68 (12), 1890. DOI:10.1071/CH15490.
- [162] Beutner, G. L. *et al.* TCFH–NMI: Direct Access to *N*-Acyl Imidazoliums for Challenging Amide Bond Formations. *Org. Lett.* **2018**, 20 (14), 4218–4222. DOI:10.1021/acs.orglett.8b01591.
- [163] Eißmann, F. *et al.* Synthesis and Structural Characterization of Amino Acid and Peptide Derivatives Featuring N-(p-Bromobenzoyl) Substituents as Promising Connection Unit for Bio-Inspired Hybrid Compounds. *Journal of Molecular Structure* **2011**, 994 (1–3), 392–402. DOI:10.1016/j.molstruc.2011.03.058.
- [164] Krasovitskii, B. M. *et al.* Synthesis and Spectral-Luminescence Properties of 2-Aryl-4-Benzylidene-*N*-5-Oxazolones. *Chem Heterocycl Compd* **1980**, 16 (7), 701–703. DOI:10.1007/BF00557739.
- [165] Guella, G. *et al.* Isolation, Synthesis and Photochemical Properties of Almazolone, a New Indole Alkaloid from a Red Alga of Senegal. *Tetrahedron* **2006**, 62 (6), 1165–1170. DOI:10.1016/j.tet.2005.10.072.
- [166] Kóczán, G. *et al.* Synthesis and Characterization of 4-Ethoxymethylene-2-[1]-Naphthyl-5(4H)-Oxazolone and Its Fluorescent Amino Acid Derivatives. *Tetrahedron* **2001**, 57 (21), 4589–4598. DOI:10.1016/S0040-4020(01)00332-5.
- [167] Rice, K. D. *et al.* TROPANE COMPOUNDS. WO2009055077.

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Lebenszyklus der Plasmodien und Entwicklung der Sporozoiten zu Gametozyten im Menschen. Abbildung modifiziert nach LEE <i>et al.</i> ^[2]	1
Abb. 2 Geschlechtliche Entwicklung von Sporozoiten aus Mikro- und Makrogametozyten in der weiblichen Anopheles Stechmücke. Abbildung modifiziert nach LEE <i>et al.</i> ^[2]	3
Abb. 3 Struktur der Repellenzien Icaridin und DEET.	4
Abb. 4 Struktur von Atovaquon, Proguanil, Mefloquin und Doxycyclin.....	4
Abb. 5 Struktur der Malariaarzneimittel Dihydroartemisinin, Artemether, Artesunat, Piperaquin, Amodiaquin, Chloroquin, Sulfadoxin, Pyrimethamin und Lumefantrin.	7
Abb. 6 Struktur von Artemisinin und Chinin.	8
Abb. 7 Prozessschritte im <i>Target</i> -basierten und Zell-basierten Screening. ^{[43],[44]}	11
Abb. 8 Zusammenhang zwischen <i>target candidate profiles</i> (TCPs) und <i>target product profiles</i> (TPPs) nach BURROWS <i>et al.</i> Abbildung modifiziert vom MMV. ^[46]	13
Abb. 9 Portfolio der MMV-unterstützten Projekte (Stand September 2024). ^[47]	13
Abb. 10 Strukturen von ausgewählten MMV-unterstützten Wirkstoffen in klinischer Phase II. ^[50]	14
Abb. 11 Illustration eines von <i>P. falciparum</i> befallenen Erythrozyten sowie die Orte der vier Hsp90-Isoformen (blaue Objekte). Grau hinterlegt sind jeweils die <i>PlasmoDB</i> -Datenbanknummern (https://plasmodb.org).....	18
Abb. 12 Schematischer Aufbau von PfHsp90.....	19
Abb. 13 Schematische Darstellung der korrekten Faltung eines Clientproteins durch einen Komplex aus Hsp90 und Co-Chaperonen. (Abbildung modifiziert nach DUTTA, SINGH, EDIKINS, BLATCH <i>et al.</i>) ^[91]	20
Abb. 14 Struktur und Wachstumsinhibierung (IC ₅₀) in <i>P. falciparum</i> von Geldanamycin (GA) sowie die Geldanamycin-Derivate 17-AAG und 17-DMAG . ^[85]	23

Abb. 15 Struktur, Wachstumsinhibierung (IC_{50}) in <i>P. falciparum</i> (Pf3D7) und Selektivitätsindices gegenüber HepG2 von Harmin (HA) sowie die Harmin-Derivate HA-7h und HA-27a . ^{[104],[105]}	24
Abb. 16 Struktur und Wachstumsinhibierung (IC_{50}) in <i>P. falciparum</i> von PU-H71 , 5B und RA . ^[108]	25
Abb. 17 Struktur von GBA , DAP-19 und TL . ^{[111],[112]}	26
Abb. 18 Struktur von Novobiocin und den Derivaten A4 , NB-10c sowie DHPM . ^{[113]–[115]}	27
Abb. 19 Ausschnitte aus der Oberflächendarstellung des Proteins TFF3 und der Tertiärstruktur von Protein PP3. <i>Hot-spot</i> -Bereiche von TFF3 sind rot markiert. TFF3 und PP3 bilden durch PPI einen TFF3-PP3-Komplex. ^[120]	28
Abb. 20 Struktur des Hormons Somatostatin-14 sowie das von HIRSCHMANN und NICOLAOU entwickelte Somatostatin-14-Mimetikum . ^[125]	31
Abb. 21 Schematische Übersicht der vier Peptidomimetikaklassen nach GROSSMANN <i>et al.</i> ^[126]	31
Abb. 22 Darstellung der Aminosäureseitenketten <i>i</i> , <i>i+4</i> , <i>i+7</i> und <i>i+11</i> aus verschiedenen Blickrichtungen. Abbildung modifiziert nach HAMILTON <i>et al.</i> ^[129]	32
Abb. 23 Schematische Darstellung der PPI-Inhibierung durch ein α -Helix-Mimetikum mit drei verschiedenen Aminosäureseitenketten. Abbildung modifiziert nach ALGAR <i>et al.</i> ^[130]	33
Abb. 24 Struktur der Terphenyl-basierten α -Helix-Mimetika T1 , T2 und T3 sowie das PPI-Target. ^[130]	33
Abb. 25 Struktur von Indan-basierten sowie Oligofoxopiperazin- und Spiroligomer-Grundgerüsten.	34
Abb. 26 Struktur wasserstoffbrücken-gesteuerten α -Helix-Mimetika mit Tribenzamid-, Tripyridyl- und Tripyrimidonamidgrundgerüst. ^{[138]–[140]}	35
Abb. 27 Ausschnitt aus der humanen (grau/rot) und plasmodialen (blau) C-terminalen Domäne des Hitzeschockproteins Hsp90. Berechnungen, Modellierung und Abbildung von BICKEL sind bisher unveröffentlicht.	37

Abb. 28 Ausschnitt aus plasmodialer C-terminalen Domäne von Hsp90. Interaktion von Histidin (H708) mit Threonin (T692) und Asparaginsäure (D613) sind markiert. Abbildung wurde von BICKEL aus der Arbeitsgruppe GOHLKE erstellt und ist nicht veröffentlicht.....	38
Abb. 29 Struktur von LSK82 mit Tripyrimidonamid-Grundgerüst und Seitenketten, die die Aminosäuren der Helix H5 des humanen Hsp90-Proteins nachahmen.....	38
Abb. 30 Struktur eines Tripyrimidonamids in Anlehnung an LSK82 mit Seitenketten, die die Aminosäuren L715, I711 und H708 der Helix H5 des plasmodialen Hsp90-Proteins nachahmen.	39
Abb. 31 Molekulardynamiksimulationen von <i>Pf</i> Hsp90. Gezeigt sind die repräsentativen Proteinstrukturen der drei größten Clustern <i>PfC</i> ₀ , <i>PfC</i> ₁ und <i>PfC</i> ₂ in der C-terminalen Domäne, sowie die Wahrscheinlichkeit des Auftretens bezogen auf die Cluster in Prozent. Die beiden nicht gezeigten Cluster <i>PfC</i> ₃ und <i>PfC</i> ₄ haben zusammen eine Häufigkeit von 4.63 %. Abbildungen wurden von GERTZEN aus der Arbeitsgruppe GOHLKE erstellt und sind nicht veröffentlicht.....	40
Abb. 32 Struktur der Tripyrimidonamide, die im Liganden-Docking eingesetzt wurden. Variierung der Seitenkettenlänge sowie dem Rest <i>R</i> ergeben ca. 170 mögliche Strukturen. 40	
Abb. 33 Docking von Tripyrimidonamiden in humanem Hsp90. Gezeigt ist Cluster <i>hC</i> ₁ bzw. ein Ausschnitt aus dem C-terminalen Bereich von Hsp90 mit jenen Liganden, die eine Bindungsenergie aufweisen, die zu einer Interaktion von Ligand und Chaperon führt. Abbildungen wurden von GERTZEN aus der Arbeitsgruppe GOHLKE erstellt und sind bisher unveröffentlicht.....	41
Abb. 34 Liganden-Docking von Tripyrimidonamiden 12 in berechneten Protein-Clustern von <i>Pf</i> Hsp90. Gezeigt sind Cluster <i>PfC</i> ₀ (links) und <i>PfC</i> ₂ (rechts), insb. ein Ausschnitt aus dem C-terminalen Bereich von <i>Pf</i> Hsp90 mit jenen Liganden, die eine Bindungsenergie aufweisen, die zu einer Interaktion von Ligand und Chaperon führt. Abbildungen wurden von GERTZEN aus der Arbeitsgruppe GOHLKE erstellt und sind bisher unveröffentlicht.....	42
Abb. 35 Vergleich der Bindetaschen in den repräsentativen Strukturen der am meisten populierte Clustern von <i>h</i> Hsp90 und <i>Pf</i> Hsp90 in der C-terminalen Region. (1) Qualitativer Unterschied der Bindetaschen und hydrophobe Wechselwirkung mit der 5-Benzamid-Kopfgruppe eines Tripyrimidonamids mit variabler oberer Seitenkette. (2) Proteinmodellierung der C-terminalen Region bzw. Bereich der Bindetasche (schwarze Umkreisung) in <i>h</i> Hsp90 (links) und <i>Pf</i> Hsp90 (rechts). Abbildungen wurden von GERTZEN aus der Arbeitsgruppe GOHLKE erstellt und sind bisher unveröffentlicht.	43

Abb. 36 Docking von Liganden in berechnetem PfHsp90-Cluster *PfC₀*. Ausschnitt aus C-terminalem Bereich. Linkes Bild: Gute Wechselwirkung des Liganden mit der Bindetasche sowie wenig Interaktion mit der Helix H4' (Gruppe **BT**). Rechtes Bild: Gute Wechselwirkung des Liganden mit der Helix H4' und wenig Interaktion mit der Bindetasche (Gruppe **H4'**). Molekülstrukturen der jeweiligen Liganden aus den entsprechenden Gruppen im Protein sind unterhalb der Proteinstrukturen abgebildet. Abbildungen der Proteinstrukturen wurden von GERTZEN aus der Arbeitsgruppe GOHLKE erstellt und sind nicht veröffentlicht.....44

Abb. 37 Docking von Liganden der Gruppe **BT-H4'** in berechnetem PfHsp90-Cluster *PfC₀*. Ausschnitt aus C-terminalem Bereich. Ligand interagiert sowohl mit der Bindetasche als auch der Helix H4'. Die Molekülstruktur des Liganden ist rechts abgebildet. Abbildungen der Proteinstrukturen wurden von GERTZEN aus der Arbeitsgruppe GOHLKE erstellt und sind nicht veröffentlicht.....45

Abb. 38 Docking von Liganden der Gruppe **BT-H4'** in berechnetem PfHsp90-Cluster *PfC₀* sowie einer Carbonsäure, welche die Bindetasche optimal ausnutzen kann. Ausschnitt aus C-terminalem Bereich. Linkes Bild: Ligand interagiert sowohl mit Bindetasche als auch Helix H4'. Mittleres Bild: Molekülstruktur des Liganden mit optimierter Kopfgruppe nach computerunterstützter Berechnung. Rechtes Bild: Ergebnisse des Liganden-Dockings von aromatischen Carbonsäuren, die eine optimale Nutzung der Bindetasche aufweisen. Abbildungen der Proteinstrukturen wurden von GERTZEN aus der Arbeitsgruppe GOHLKE erstellt und sind nicht veröffentlicht.....46

Abb. 39 Struktur eines Tripyrimidonamids in Anlehnung an **LSK82** mit strukturellen Modifizierungen, welche die computerunterstützten Berechnungen von BICKEL (H-Brückenakzeptor und -donor in der oberen Seitenkette) und GERTZEN (Vergrößerung der Kopfgruppe) beinhalten.46

Abb. 40 Tripyrimidonamid **LSK82** (linke Struktur) als humaner Hsp90-Inhibitor sowie die nachgeahmten Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Tyrosin. Die Vorhersagen der Proteinmodellierung suggerieren, dass Affinität zu PfHsp90 durch einen Wasserstoffbrückenakzeptor und/oder -donor in der obersten Seitenkette (mittlere Struktur) und eine Vergrößerung der Kopfgruppe (rechte Struktur) erreicht werden kann.56

Abb. 41 Tripyrimidonamide mit variabler oberer Seitenkette sowie Kopfgruppe, die potenziell eine antiplasmodiale Aktivität zeigen (linke Struktur). Reduzierung der Molekülkomplexität von Tri- zu Bipyrimidonamiden und Variierung von Kopf-, Seiten- und Fußgruppe am Bipyrimidonamidgrundgerüst.....57

Abb. 42 Darstellung der Arbeitsabläufe der kooperierenden Arbeitsgruppen zur Entwicklung von Oligopyrimidonamiden mit antiplasmodialer Aktivität.....	58
Abb. 43 Pyrimidon-Monomere mit Imidazol- (6-His) und <i>N,N</i> -Dimethylamino-Gruppe (6d)..	60
Abb. 44 Vergleich des aromatischen Bereichs der ¹ H-NMR-Spektren (300 MHz, CDCl ₃ , 298 K) von Tripyrimidonamid 12c (oben) und dem Hauptprodukt 12X der nukleophilen Substitution (unten). Pyrimidonprotonen sind in blau, Amidprotonen in rot und orange und Phenylprotonen nicht farbig markiert.	68
Abb. 45 <i>Parasite-Reduction-Ratio</i> (PRR) Assay von 12a mit Artesunat, Chloroquin und Atovaquon als Referenz.	85
Abb. 46 Entwicklungsstufen der Bipyrimidonamide ausgehend von Tripyrimidonamid 12a als Leitstruktur. Durch das Entfernen des untersten Pyrimidonbausteins von 12a hin zu Bipyrimidonamiden 10-I wird die Molekülkomplexität verringert. Modifizierung der Kopfgruppe hin zu 10-II erhöht Spezifität und Affinität in <i>Pf</i> Hsp90 durch optimale Ausnutzung der in <i>Pf</i> Hsp90 vergrößerten Bindetasche.....	90
Abb. 47 Übersicht der Entwicklung von Tripyrimidon- und Bipyrimidonamiden mit antiplasmodialer Aktivität.	107
Abb. 48 Struktur von 10k sowie Veränderung der antiplasmodialen Aktivität durch Modifizierung der Kopf- und Fußgruppe.	111

10 Schemaverzeichnis

- Schema 1** Aufbau eines Tripyrimidonamids **XII** mittels Amidkupplung aus Pyrimidon-2-carboxylat **VII** und 5-Amino(bi)pyrimidonamid **XI**.47
- Schema 2** Retrosynthetische Betrachtung des 5-Aminobipyrimidonamids **XI** ausgehend von Pyrimidon-2-carboxylat **VII** und 5-Aminopyrimidon **IX**. **VII** und **IX** können aus der Vorstufe Pyrimidon-2-carbonsäureester **VI** dargestellt werden.48
- Schema 3** ERLÉNMEYER-PLÖCHL-Synthese zur Darstellung von Azlacton **II** ausgehend von Hippursäure **I**.^[143]48
- Schema 4** Darstellung von Amidinhydrochloriden **V** ausgehend von Cyanameisensäureethylester (**III**) mittels PINNER-Reaktion, basischer Flüssig-Flüssig-Extraktion sowie Umsetzung mit einem Aminhydrochlorid.^[144]49
- Schema 5** Synthese von Pyrimidon-2-carbonsäureestern **VI** aus Azlacton **II** und Amidinhydrochlorid **V**.^[142]49
- Schema 6** Tautomere von **VI-H**, die mit entsprechender Base deprotoniert und anschließend mit einem Alkylanz zum *N*-substituiertem Pyrimidon **VI** und *O*-alkyliertem Pyrimidin **VI-O** umgesetzt werden können.50
- Schema 7** Darstellung des *N*-alkylierten Pyrimidon **VI-pMB** mittels Monomer **VI-H** ohne Seitenkettensubstituenten sowie *para*-Methoxybenzylchlorid als Alkylanz. Die angegebene Ausbeute bezieht sich auf das isolierte Produkt. Das *O*-alkylierte Pyrimidin ist nicht gezeigt, dessen Ausbeute vernachlässigbar gering ist.^[142]50
- Schema 8** MITSUNOBU-Reaktion mit optimierten Reaktionsbedingungen nach WOLOSCHIN zur Darstellung von 4-Alkoxy-pyrimidin **VI-O** ausgehend von Monomer **VI-H**. Ausbeuten sind bezogen auf das isolierte *O*-alkylierte Produkt. Ausbeuten des *N*-alkylierten Pyrimidons sind aufgrund von Verunreinigung durch Nebenprodukte nicht eindeutig bestimmbar.^[146]51
- Schema 9** Darstellung von Pyrimidon- **VI** und Pyrimidinmonomeren **VI-O** ausgehend von Azlacton **II** und Amidinhydrochlorid **V**.52
- Schema 10** Synthese von Pyrimidon-2-carboxylaten **VII** durch Hydrolyse von Pyrimidonmonomer **VI**. Decarboxylierung als Nebenreaktion nach Ansäuern von **VII**.....52

Schema 11 Darstellung von 5-Aminopyrimidonen IX durch Aminolyse von Methylester VI zum <i>N</i> -substituierten Carboxamid VIII mit wässrigem Methylamin und folgender basischer Hydrolyse.	53
Schema 12 Synthese von Bipyrimidonamid X durch COMU®-vermittelte Amidkupplung von Lithiumcarboxylat VII und Enamin IX	53
Schema 13 Synthese von Enamin-Dimer XI aus Bipyrimidonamid X mittels basischer Hydrolyse. Darstellung der Tripyrimidonamide XII durch COMU®-vermittelte Amidkupplung von Lithiumcarboxylat VII und Enamin-Dimer XI	54
Schema 14 Darstellung von Tripyrimidonamiden mit einem Wasserstoffbrückenakzeptor und/oder -donor in der oberen Seitenkette. Enamin-Dimer 11a kann nach der Syntheseroute von SPANIER dargestellt werden.	59
Schema 15 Synthese von Enamin-Dimer 11a nach SPANIER. ^[142]	60
Schema 16 Darstellung von Amidinhydrochlorid 5d ausgehend von Cyanameisensäureethylester (3) mittels PINNER-Reaktion, basischer Flüssig-Flüssig-Extraktion zur Imidoesterbase 4 sowie Umsetzung mit Histamindihydrochlorid zu 5d	61
Schema 17 Darstellung von Pyrimidon-Monomer 6-His aus Amidinhydrochlorid 5d und Azlacton 2a . Eine Isolierung von 6-His war nicht erfolgreich.	61
Schema 18 MITSUNOBU-Reaktion zur Darstellung von 6d sowie anschließende Umsetzung zu 7c	62
Schema 19 Darstellung von Tripyrimidonamid 12-NMe2 mit <i>N,N</i> -Dimethylaminopropyl-Seitenkette mittels COMU®-vermittelter Amidkupplungsreaktion aus Enamin-Dimer 11a und Lithiumcarboxylat 7c	62
Schema 20 Darstellung von Pyrimidon-Monomer 6e aus Amidinhydrochlorid 5e und Azlacton 2a . Anschließend erfolgte eine Hydrolyse der Estergruppe zu Lithiumcarboxylat 7d	63
Schema 21 Amidkupplungsreaktion von Enamin-Dimer 11a mit Lithiumcarboxylat 7d zu Tripyrimidonamid 12a sowie anschließende Entschützung der Aminogruppe mit Chlorwasserstoff zu Tripyrimidonamid 12b	64
Schema 22 Nukleophile Substitution eines Tripyrimidonamids mit Alkylhalogeneseitenkette durch Stickstoff- oder Schwefelnukleophile.	64

Schema 23 Alkylierung von Pyrimidon 6a mit homologen Dibromalkanen zu den Pyrimidonen 6f – 6h	65
Schema 24 Darstellung von Tripyrimidonamiden 12c – 12e ausgehend von den Monomeren 6f – 6h	66
Schema 25 Nukleophile Substitutionsreaktion von Tripyrimidonamid 12c mit Imidazol als Nukleophil.	66
Schema 26 Nukleophile Substitutionsreaktion von Tripyrimidonamid 12c mit Dimethylaminhydrochlorid als Nukleophil.	67
Schema 27 Nukleophile Substitution von Tripyrimidonamid 12d durch Imidazol oder Dimethylaminhydrochlorid. Intramolekulare Cyclisierung als unerwünschte Hauptreaktion. .	69
Schema 28 Nukleophile Substitutionsreaktion von Tripyrimidonamid 12d durch <i>N</i> -Methylpiperazin als Nukleophil zu Tripyrimidonamid 12f . ^[148]	70
Schema 29 Nukleophile Substitutionsreaktion von Tripyrimidonamid 12c durch 1,2,4-Mercaptotriazol (12g) und Thioharnstoff (12h) als Schwefelnukleophile. ^{[149],[150]}	71
Schema 30 Darstellung des Pyrimidon-Monomer 6i aus Amidinhydrochlorid 5f und Azlacton 2a . Anschließend erfolgte eine Hydrolyse der Estergruppe zu Lithiumcarboxylat 7h	72
Schema 31 Amidkupplungsreaktion von Enamin-Dimer 11a mit Lithiumcarboxylat 7h zu Tripyrimidonamid 12i	72
Schema 32 Darstellung von Tripyrimidonamid 12n aus Enamin-Dimer 11b und Lithiumcarboxylat 7i	73
Schema 33 Darstellung der Azlactone 2b – 2d ausgehend von Säurechloriden und Glycin.	79
Schema 34 Darstellung von Pyrimidon-Monomeren 6k – 6m aus Amidinhydrochlorid 5e und Azlactonen 2b – 2d . Anschließend erfolgte die Umsetzung der Estergruppe zu den Lithiumcarboxylaten 7j – 7l	80
Schema 35 Darstellung der Tripyrimidonamiden 12j – 12l ausgehend von Enamin-Dimer 11a und Lithiumcarboxylaten 7j – 7l	81
Schema 36 Entfernen der Benzoylgruppe von Tripyrimidonamid 12a mittels basischer Hydrolyse zu Tripyrimidonamid 12m	81

Schema 37 Synthese von Enamin-Monomeren 9a – 9e und Lithiumcarboxylaten 7a, 7d und 7i ausgehend von Pyrimidon-Monomeren 6b, 6e und 6j .	92
Schema 38 Darstellung der Bipyrimidonamide 10b – 10i .	93
Schema 39 Darstellung von Bipyrimidonamid 10j aus 10e .	94
Schema 40 Darstellung von 3-Fluor-4-pyrrolidinylnbenzoesäure 15 ausgehend von 4-Brom-3-fluorbenzoesäure. ^[159]	98
Schema 41 Synthese von Enamin-Dimer 11b aus Bipyrimidonamid 10e mittels basischer Hydrolyse.	99
Schema 42 Amidkupplungsreaktion von Enamin-Dimer 11b mit Carbonsäure 15 zu Bipyrimidonamid.	100
Schema 43 Amidkupplung von 2-Methylphenylpropansäure und 4-Aminobenzonitril mit TCFH als Kupplungsreagenz und <i>N</i> -Methylimidazol als Hilfsbase. ^[162]	101
Schema 44 Schematische Darstellung des postulierten Mechanismus der Amidkupplung einer Carbonsäure und einem Amin mit TCFH als Kupplungsreagenz und NMI als Hilfsbase nach BEUTNER <i>et al.</i> R ¹ und R ² beinhalten sowohl aromatische als auch aliphatische Substituenten. ^[162]	101
Schema 45 TCFH-Kupplung von 11b und 15 nach BEUTNER <i>et al.</i> ^[162]	102
Schema 46 TCFH-Kupplung von 11b und 15 mit NMI und Chloroform.	103

11 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Gruppierung der Liganden nach Wechselwirkung mit der Bindetasche in <i>Pf</i> Hsp90 und Helix H4' in Cluster-Docking von <i>Pf</i> C ₀ . „+“ bedeutet eine gute, „~“ eine mittelmäßige und „-“ eine schlechte Wechselwirkung. Abstufungen „+“, „~“ und „-“ sind rein qualitativer Art und haben keine quantitative Abgrenzung zueinander. BT = Bindetasche; H4' = Helix H4'43	43
Tab. 2 IC ₅₀ -Werte der <i>in vitro</i> Zellassays mit den plasmodialen Stämmen <i>Pf</i> 3D7 und <i>Pf</i> Dd2 sowie Leberkrebszelllinie HepG2 nach Behandlung mit Tripyrimidonamiden, die sich in der oberen Seitenkette unterscheiden.75	75
Tab. 3 IC ₅₀ -Werte der <i>in vitro</i> Zellassays mit den plasmodialen Stämmen <i>Pf</i> 3D7 und <i>Pf</i> Dd2 sowie Leberkrebszelllinie HepG2 nach Behandlung mit Tripyrimidonamiden 12j – 12m82	82
Tab. 4 IC ₅₀ -Werte der <i>in vitro</i> Zellassays mit den plasmodialen Stämmen <i>Pf</i> NF54 und <i>Pf</i> K1 nach Behandlung mit Tripyrimidonamiden 12a, 12b , Chloroquin und Artesunat.84	84
Tab. 5: Untersuchung von 12a und 12b im <i>P. berghei</i> Mausmodell.87	87
Tab. 6 IC ₅₀ -Werte der <i>in vitro</i> Zellassays mit den plasmodialen Stämmen <i>Pf</i> 3D7 und <i>Pf</i> Dd2 sowie Leberkrebszelllinie HepG2 nach Behandlung mit Bipyrimidonamiden 10b – 10j95	95
Tab. 7 IC ₅₀ -Werte der <i>in vitro</i> Zellassays mit den plasmodialen Stämmen <i>Pf</i> 3D7 und <i>Pf</i> Dd2 sowie Leberkrebszelllinie HepG2 nach Behandlung mit Bipyrimidonamiden 10e, 10k und 11b104	104
Tab. 8 Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Substanzen sowie die entsprechenden Laborjournaleinträge.197	197