

Design, Synthese und Evaluation von Inhibitoren der bakteriellen RNase P und der Dengue-Virus-Protease

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Fabian Gert Robert Ehlert

aus **Hannover**

Marburg/Lahn **2016**

Erstgutachter: Prof. Dr. Wibke E. Diederich

Zweitgutachter: Prof. Dr. Gerhard Klebe

Eingereicht am 19.08.2016

Tag der mündlichen Prüfung am 29.09.2016

Hochschulkennziffer: 1180

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden auf Anregungen von Frau Prof. Dr. Wibke E. Diederich am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereiches Pharmazie der Philipps-Universität Marburg in der Zeit von Februar 2012 bis Mai 2016 durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1. Entwicklung neuartiger Antibiotika gegen die RNase P	3
1.1. Einleitung.....	3
1.1.1. Antibiotika in der Therapie.....	3
1.1.2. Resistenzmechanismen.....	4
1.1.3. Derzeit verfügbare Antibiotika und Pipeline.....	5
1.1.4. Die bakterielle RNase P.....	6
1.1.4.1. RNase P als Drug Target.....	6
1.1.4.2. pre-tRNA als Substrat der bakteriellen RNase P.....	7
1.1.4.3. Der katalytische Mechanismus der RNase P.....	8
1.1.4.4. Inhibition der RNase P.....	11
1.1.4.4.1. Antisense-Inhibitoren.....	12
1.1.4.4.2. Aminoglykoside.....	13
1.1.4.4.3. Substratbindende Inhibitoren.....	13
1.2. Vorarbeiten und Aufgabenstellung.....	13
1.2.1. Virtuelles Hochdurchsatzscreening.....	13
1.2.2. Testung von Inhibitoren.....	15
1.2.3. <i>In vitro</i> Assaysystem.....	15
1.2.4. <i>In vivo</i> Assaysystem.....	16
1.2.5. Getestete Inhibitoren.....	16
1.2.6. Ergebnisse der <i>in vitro</i> Tests.....	17
1.2.7. Ergebnisse der <i>in vivo</i> Tests.....	18
1.2.8. Aufgabenstellung für diese Arbeit.....	18
1.3. Inhibitor-design.....	18
1.3.1. Strukturelle Eigenschaften.....	18
1.3.2. Entwicklung einer Syntheseroute.....	20
1.3.2.1. Ausgangssituation.....	20
1.3.2.2. Synthese des linken Molekülteils von MT53.....	20
1.3.2.3. Synthese des rechten Molekülteils von MT53.....	22
1.3.2.4. Synthese von MT53.....	22
1.3.2.5. Zusammenfassung der Synthese von MT53.....	23
1.3.2.6. Synthese des rechten Molekülteils mit Piperazin.....	23
1.3.3. Molekülvariationen.....	24
1.3.3.1. Syntheseschritte zum Einführen von Variationen.....	24
1.3.3.2. Synthetisierte Inhibitoren.....	26
1.3.3.3. Verbesserung der Löslichkeit durch Bildung von Salzen.....	28
1.3.3.4. Verbesserung der Löslichkeit durch Einführen von Substituenten.....	30
1.4. Messergebnisse.....	30
1.4.1. <i>In vitro</i> Messergebnisse.....	30
1.4.2. <i>In vivo</i> Messergebnisse.....	31
1.5. Kristallisation.....	33
1.6. Zusammenfassung.....	34
1.7. Ausblick.....	35

2. Entwicklung von Hemmstoffen der Dengue-Virus-Protease NS2B-NS3	37
2.1. Einleitung	37
2.1.1. Das Dengue-Virus	37
2.1.2. Globale Verbreitung	38
2.1.3. Symptome.....	40
2.1.4. Bekämpfung	41
2.1.5. Behandlung.....	41
2.1.6. Impfstoff.....	41
2.1.7. Serinproteasen	42
2.1.8. Dengue-Virus-Protease	44
2.1.8.1. Generelle Eigenschaften der Dengue-Virus-Protease	44
2.1.8.2. Strukturelle Eigenschaften der Dengue-Virus-Protease.....	44
2.1.9. Stand der Forschung	46
2.1.9.1. Antivirale Hemmstoffe.....	46
2.1.9.2. Inhibitoren der NS2B-NS3 Protease	47
2.1.9.2.1. Peptidische Inhibitoren.....	47
2.1.9.2.2. Nicht-peptidische Inhibitoren.....	48
2.1.10. Strukturbasiertes Wirkstoffdesign.....	49
2.1.11. Ausgangssituation dieser Arbeit und Zielsetzung	51
2.2. Entwicklung neuer Inhibitoren.....	52
2.2.1. <i>De novo</i> Design von neuartigen Inhibitoren der Dengue NS2B-NS3 Protease ...	52
2.2.1.1. Auswahl und Vorbereitung der für das Docking verwendeten Proteasestruktur	52
2.2.1.2. Auswahl von Liganden für das Docking	53
2.2.1.3. Docking	55
2.2.1.4. Grundstruktur der Inhibitoren	55
2.2.2. Synthese und biologische Testung der Inhibitoren der ersten Serie	58
2.2.2.1. Synthese der ersten Serie.....	58
2.2.2.2. Testung der ersten Serie	62
2.2.2.2.1. Verwendete Assay-Systeme	62
2.2.2.2.2. Ergebnisse der ersten Serie	62
2.2.3. Strukturaufklärung und Synthese der „roten Substanz“	64
2.2.4. Synthese der „gelben Substanz“ und deren biologische Testung	71
2.2.5. Synthese und biologische Testung der zweiten Serie	73
2.2.5.1. Synthese der zweiten Serie.....	73
2.2.5.2. Assay Ergebnisse.....	74
2.2.5.3. Struktur-Wirkungs-Beziehung	75
2.2.6. Hit Validierung.....	76
2.2.6.1. Optimierung der verwendeten Assay-Systeme	76
2.2.6.1.1. DMSO-Gehalt im Assay-System	76
2.2.6.1.2. DMSO-Gehalt im Thermal-Shift-Assay von DV2pro und DV3pro	76
2.2.6.1.3. DMSO-Gehalt im Fluoreszenz-basierten Assay von DV3pro	79
2.2.6.1.4. DMSO-Gehalt in der Kristallisation	79
2.2.6.1.4. Zusammenfassung.....	80
2.2.6.2. DLS Experimente	81
2.2.6.2.1. Dynamische Lichtstreuung.....	81
2.2.6.2.2. Ermittlung der CMC von Verbindung 96	81
2.2.6.3. Einsatz von Detergenzien zur Hit-Validierung bei der Dengue-Protease.....	83
2.2.6.3.1. Einfluss von Triton X-100 auf Verbindung 96	83
2.2.6.3.2. Einfluss von Triton X-100 auf einen bestätigten Inhibitor von DV2pro84	

2.2.6.4. Bestimmung des Bindungsmodus	85
2.2.6.4.1. Ausgangssituation	85
2.2.6.4.2. Kristallstruktur	86
2.2.6.4.3. Quenching Assay	86
2.2.6.4.4. Möglicher Bindungsmodus von Verbindung 96 in der allosterischen Bindetasche	89
2.3. Zusammenfassung	92
2.4. Ausblick	93
3. Identifikation von falsch-negativen Hits in Triton X-100 Screens	95
3.1. Einleitung	95
3.2. Ergebnisse	97
3.3. Zusammenfassung	104
Zusammenfassung der Arbeit	105
Summary	107
Experimenteller Teil	109
1. Allgemeine Arbeitsweise	109
2. Mikrowellenreaktionen	109
3. Lösungsmittel	109
4. Chromatographie	109
4.1. Dünnschichtchromatographie	109
4.2. MPLC	110
4.3. HPLC	110
5. Analysemethoden	110
5.1. Kernresonanzspektroskopie	110
5.2. Massenspektrometrie	111
5.3. Elementaranalyse	111
5.4. Schmelzpunkte	112
6. Verwendete Assaysysteme	113
6.1. Durchführung des Fluoreszenz-basierten Assays der Dengue-Protease	113
6.2. Durchführung des TSA	113
6.3. Durchführung des Fluoreszenz-Quenching Assays der Dengue-Protease	114
6.4. Fluoreszenz-basierter Assay der HIV-1-Protease und von Endothiapepsin	115
7. Durchführung der DLS-Messungen	115
8. Durchführung der Docking Experimente	116
9. Allgemeine Arbeitsvorschriften	117
10. Einzelsynthesen	121
Literaturverzeichnis	200
Anhang	210
1. Erklärung	210

Abkürzungsverzeichnis

Abz	2-Aminobenzoyl	DLS	Dynamische Lichtstreuung
Ac	Acetyl	DMF	Dimethylformamid
AcOH	Essigsäure	DMSO	Dimethylsulfoxid
ADE	<i>Antibody-Dependent Enhancement</i>	DNA	Desoxyribonukleinsäure
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>	DSS	Dengue-Schock-Syndrom
AMC	4-Methylcoumaryl-7-amid	DV2pro	Protease von DENV-2
AUC	<i>area under the curve</i>	DV3pro	Protease von DENV-3
Boc	<i>t</i> -Butyloxycarbonyl	EA	Elementaranalyse
br.	breit(es)	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
bs.	breites Singulett	EI	Elektronenstoßionisation
BSA	Bovines Serum Albumin	EP	Endothiapepsin
Bz	Benzoyl	eq.	Äquivalente
Cbz	Benzyloxycarbonyl	ESI	Elektrospray Ionisation
C-Domäne	<i>catalytic domain</i>	EtOH	Ethanol
CMC	kritische Mizellbildungs- konzentration	FRET	Förster- Resonanzenergietransfer
d	Dublett	FSME- Virus	Frühsommer- Meningoenzephalitis-Virus
DC	Dünnschichtchromatographie	ges.	gesättigt(er)
DCM	Dichlormethan	h	Stunde(n)
DENV	Dengue-Virus	HBTU	2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)- 1,1,3,3-tetramethyluronium- hexafluorophosphat
DHF	Dengue-Hämorrhagisches Fieber	HCl	Salzsäure

HIV	Humanes Immundefizienz-Virus	n.b.	Nicht bestimmt
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>	NaCl	Natriumchlorid
HRMS	hochaufgelöste Massenspektrometrie	NaH	Natriumhydrid
Hz	Hertz	NaOH	Natriumhydroxid
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration	NEt ₃	Triethylamin
<i>J</i>	Kopplungskonstante	nL	Norleucin
kB	kilo Basen	NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
K _D	Dissoziationskonstante	NMR	Kernresonanzspektroskopie
K _i	Inhibitionskonstante	Nr.	Nummer
LiCl	Lithiumchlorid	PDB	<i>Protein Data Bank</i>
Lsg.	Lösung	Phac	Phenacetyl
M	mol/l	ppm.	parts per million
m	Multipllett	pst	Pseudotriplett
mCPBA	<i>m</i> -Chlorperoxybenzoesäure	q	Quartett
MeCN	Acetonitril	qHNMR	quantitatives ¹ H-NMR
MeOH	Methanol	RFU	<i>Relative Fluorescence Unit</i>
mg	Milligramm	RNA	Ribonukleinsäure
ml	Milliliter	RNase P	Ribonuklease P
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>	RT	Raumtemperatur
MS	Massenspektrometrie	s	Singulett
MW	Molekulargewicht	SAR	Struktur-Wirkungs-Beziehung

Abkürzungsverzeichnis

S-Domäne	<i>specificity domain</i>	TSA	Thermal-Shift-Assay
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethyl- piperidin- 1-yl)oxyl	TX-100	Triton X-100
T _m	Schmelzpunkt	v/v	Volumenprozent
tmRNA	<i>transfer messenger RNA</i>	w/v	Massenprozent
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan-Hydrochlorid	WHO	World Health Organisation
tRNA	<i>transfer-RNAs</i>		

Einleitung

Die vorliegende Arbeit widmet sich dem Design, der Synthese und der Evaluation von Antiinfektiva. Infektionskrankheiten haben sich in den letzten Jahrzehnten zu einer wachsenden Bedrohung entwickelt und sind nach kardiovaskulären Erkrankungen die zweit häufigste Todesursache weltweit.¹ Die Bekämpfung dieser Bedrohung ist eines der Hauptziele der World Health Organization (WHO) und ein Teil dieser Strategie ist die Entwicklung neuer Arzneimittel, die sich zur Behandlung von Infektionskrankheiten eignen, da in den letzten Jahren nur noch wenige innovative Wirkstoffe bis hin zur Marktreife entwickelt wurden.

Die Suche nach neuen antibakteriellen Wirkstoffen und das Auffinden neuer Targets ist ein wichtiger Bestandteil bei der Bekämpfung von bakteriellen Infektionen, da in den letzten 50 Jahren nur eine neue Wirkstoffklasse gefunden werden konnte² und sich Resistenzen von Bakterien gegen bekannte Antibiotika und damit therapieresistente Infektionen zu einem Problem bei der Behandlung von bakteriellen Infektionen entwickelt haben. Als ein mögliches neues Target hat sich die bakterielle Ribonuklease P (RNase P) erwiesen, die an der Prozessierung der tRNA beteiligt und damit für das Überleben der Bakterien essentiell ist.³ Die RNase P wird dabei bisher nicht von antibakteriellen Wirkstoffen adressiert und stellt daher ein vielversprechendes Ziel bei der Bekämpfung von bakteriellen Infektionen dar. Eine Besonderheit der RNase P ist, dass sie sowohl aus RNA als auch aus Protein besteht und die Reaktion durch die RNA-Untereinheit katalysiert wird.⁴ Im ersten Teil dieser Arbeit soll ein Inhibitor, der sich gegen die bakterielle RNase P richtet, ausgehend von einem Screeninghit⁴ und bereits durchgeführten Vorarbeiten⁵ verbessert und weiterentwickelt werden.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit dem *de novo* Design eines Inhibitors der Dengue-Virus-Protease. Die WHO schätzt, dass sich jährlich 50 bis 100 Millionen Menschen mit den unterschiedlichen Dengue-Virus-Serotypen infizieren und etwa eine halbe Million Menschen schwere Komplikationen nach einer Infektion mit dem Virus erleidet und hospitalisiert werden muss. Die Serotypen des Dengue-Virus breiten sich dabei immer weiter über den Globus aus und bedrohen die Gesundheit vor allem von Menschen in tropischen und subtropischen Gebieten, zudem werden aber auch vermehrt Fälle von Dengue-Fieber in gemäßigteren Klimazonen gemeldet.⁶ Da es sich bei der

Dengue-Virus-Protease um eine Serin-Protease handelt, von der bereits eine Kristallstruktur mit gebundenem peptidischen Inhibitor bekannt ist,⁷ sollen ausgehend von dieser Struktur Inhibitoren *in silico* entworfen, in die Bindetasche der Protease gedockt und schließlich synthetisiert und *in vitro* getestet werden. Da die Löslichkeit von Inhibitoren häufig ein Problem darstellt, soll darüber hinaus deren Löslichkeit durch den Einsatz höherer DMSO-Konzentrationen in den zur Bestimmung von Inhibitoren der Dengue-Virus-Protease eingesetzten Assaysystemen verbessert werden.

Der dritte Teil der vorliegenden Arbeit untersucht schließlich den Einfluss des nicht-ionischen Detergenzes Triton X-100 auf die Inhibitionswerte bekannter spezifischer Inhibitoren der HIV-1-Protease und Endothiaepsin. Triton X-100 ist ein häufig eingesetztes Detergenz, welches die Bildung von Inhibitor-Aggregaten und damit eine unspezifische Inhibition von Enzymen durch diese Aggregate verhindern soll. Durch den Einsatz von Triton X-100 soll so die Identifikation von sogenannten *false positives* in Screenings ermöglicht werden.⁸ Der Einsatz von Triton X-100 im Assaypuffer führte jedoch im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit zu einem Inhibitionsverlust zweier spezifischer Inhibitoren der Dengue-Virus-Protease, während der Einsatz von CHAPS als Detergenz keinen Einfluss auf den IC₅₀-Wert der genannten Inhibitoren nahm. Ausgehend von diesen Beobachtungen soll der Effekt von Triton X-100 auf spezifische Inhibitoren der HIV-1-Protease und Endothiaepsin untersucht werden, um festzustellen, ob Triton X-100 die Inhibition der HIV-1-Protease und Endothiaepsin durch diese bekannten spezifischen Inhibitoren beeinflusst.

1. Entwicklung neuartiger Antibiotika gegen die RNase P

1.1. Einleitung

1.1.1. Antibiotika in der Therapie

Seit der Entdeckung des Penicillins durch Alexander Flemming sind Antibiotika zu einem festen Bestandteil der Arzneimitteltherapie von Infektionskrankheiten geworden. Die derzeitig verwendeten Antibiotika adressieren insgesamt fünf unterschiedliche Strukturen oder Mechanismen (Targets), die für das Überleben der Bakterien essentiell sind. Dies sind im Einzelnen die Synthese der Zellwand, die Proteinbiosynthese, die DNA und RNA des Bakteriums (RNA Polymerase und DNA Topoisomerase), der Folsäuremetabolismus und die Membranstruktur des Bakteriums.⁹ Ein wachsendes Problem in der Therapie von Infektionskrankheiten stellt die Entwicklung von Resistenzen gegen die derzeit verwendeten Antibiotika dar. Dieses Phänomen ist bereits seit den 1990er Jahren bekannt,¹⁰ verschlimmert sich aber in den letzten Jahren zusehends. Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (MRSA) Bakterien sind z.B. in den USA für mehr Todesfälle verantwortlich als Emphyseme, HIV/AIDS, Parkinson und Mord zusammen.¹¹ Am Beispiel der Tuberkulose (Erreger: Mykobakterien) wird deutlich, wie dringend neue Antibiotika bzw. neue Angriffspunkte gefunden werden müssen, da inzwischen 3,5% aller neuen und 20% aller bereits behandelten Tuberkulosefälle von Erregern hervorgerufen werden, die gegen die Standardbehandlung mit Isoniazid, Rifampicin, Ethambutol und Pyrazinamid resistent sind.¹¹ Schätzungen gehen davon aus, dass durch Infektionen mit Antibiotika-resistenten Bakterien in Europa durch die zum Teil intensivmedizinische Versorgung jährliche Kosten von 9 Milliarden Euro verursacht werden und jährlich 25.000 Menschen sterben.¹¹ Das Auftreten resistenter Bakterien variiert in Europa sehr stark, so waren im Jahr 2014 in Finnland 4,5% der *Escherichia coli* (*E. coli*) Isolate resistent gegen Aminoglycoside, in Bulgarien hingegen 28,2%.¹² Diese Zahl belegt eindrucksvoll, dass zum einen neue Wirkstoffe für bekannte Targets, aber auch neue Targets gefunden werden müssen, dass sich weiterhin aber auch die Art und Häufigkeit der Verordnungen durch Ärzte ändern muss, da momentan in Europa 80 - 90% der Antibiotika durch Hausärzte verordnet werden.¹¹ Die häufig bei Hausärzten (aber auch in Krankenhäusern) nicht durchgeführte Bestimmung des Erregers birgt die Gefahr einer fehlerhaften Verordnung, z.B. eines Antibiotikums mit falschem Wirkspektrum oder bei

viralen Infektionen. Ein weiteres Problem stellt eine mangelnde Compliance der Patienten dar, die ein verordnetes Antibiotikum nach Abklingen der Symptome unter Umständen zu früh absetzen. Neue Resistenzen können darüber hinaus durch die Zunahme der Verordnung von Breitspektrum- und Reserve-Antibiotika entstehen,¹³ die schweren und therapieresistenten Infektionen vorbehalten sein sollten.¹⁴

1.1.2. Resistenzmechanismen

Die Bildung von Resistenzen gegen antibiotisch wirkende Substanzen bei Bakterien ist ein natürliches Phänomen und existiert nicht erst seit der Entwicklung von Antibiotika und deren gezieltem Einsatz.¹⁵ Da die meisten Antibiotika ursprünglich von Antibiotika-produzierenden Mikroorganismen stammen, die ihre Umgebung diesen antibiotisch wirksamen Substanzen zum eigenen Schutz aussetzen, sind Resistenzen gegen diese Substanzen aufgrund eines natürlichen Selektionsdruckes zu erwarten.¹⁰

Bei der Resistenz gegen antibiotisch wirkende Substanzen wird zwischen der intrinsischen und der erworbenen Resistenz unterschieden.¹⁰ Das einfachste Beispiel für eine intrinsische Resistenz ist die Abwesenheit oder die Veränderung der Zielstruktur des Antibiotikums, wie bei gram-negativen Pseudomonaden gegen Triclosan. Triclosan, ein Inhibitor der bakteriellen Fettsäuresynthese,¹⁶ wirkt gegen viele gram-negative und gram-positive Bakterien. Pseudomonaden tragen hingegen ein Allel von *fabI*, das eine zusätzliche enoyl-ACP Reduktase kodiert, die nicht sensitiv gegenüber Triclosan ist.¹⁰ Ein weiteres Beispiel ist die Resistenz von gram-negativen Bakterien gegenüber vielen Antibiotika, die bei gram-positiven Bakterien ihre Wirkung entfalten. Vancomycin zum Beispiel kann nicht über die äußere Zellwand von gram-negativen Bakterien gelangen und so nicht an sein Ziel, das *D-Ala-D-Ala* Peptid im Periplasma, binden, wodurch die Quervernetzung der Zellwand gestört würde.¹⁰ Neben der intrinsischen Resistenz gegen antibiotisch wirkende Substanzen können Bakterien zudem Resistenzen entwickeln oder erwerben, wobei diese Resistenzmechanismen weiter in drei Gruppen unterteilt werden: 1) solche Resistenzen, die zu einer verringerten Konzentration an antibiotisch wirkenden Substanzen führen, entweder durch verringerte Permeabilität oder durch erhöhten Efflux von Substanzen, 2) genetische Mutation oder post-translationale Veränderung der Zielstruktur des Antibiotikums und 3) solche, die das Antibiotikum modifizieren.¹⁰ *P. aeruginosae* und *S. aureus* Bakterien, die Effluxpumpen überexprimieren, wurden bereits in den 1990er Jahren bei Patienten isoliert.¹⁰ Besorgniserregend ist, dass Gene, die für

solche Effluxpumpen kodieren, im Bakterium mobilisiert wurden, also vom Chromosom auf Plasmide übertragen wurden. Diese Plasmide können nun von anderen Bakterien durch horizontalen Gentransfer aufgenommen werden, was zur einer schnelleren Verbreitung der Resistenzen führt.¹⁰

1.1.3. Derzeit verfügbare Antibiotika und Pipeline

Abbildung 1 gibt einen Überblick über Meilensteine der Antibiotikaentwicklung. Mit der Entdeckung des Salvarsans durch *Paul Ehrlich* und *Sahachirō Hata* zu Beginn des 20. Jahrhunderts¹⁷ begann die moderne Antibiotikaforschung, die schließlich in die Entdeckung zahlreicher neuer Wirkstoffklassen Mitte des 20. Jahrhunderts mündete. Zugleich ist die Entwicklung von Salvarsan auch das erste Beispiel für eine rationale Arzneimittelentwicklung.¹⁷ Nach dem Vorbild der Entdeckungsgeschichte von Penicillin wurden in den 40er und 50er Jahren des 20. Jahrhunderts vermehrt Pilze und Bakterien auf ihre antimikrobiellen Eigenschaften hin untersucht. Diese systematische Forschung führte zur Entdeckung von u.a. Gramicidin aus *Bacillus brevis*, Chloramphenicol aus *Streptomyces venezuelae* und Chlortetracyclin aus *Streptomyces aureofaciens*. Die weiteren nach den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts neu auf den Markt gebrachten Antibiotika stellen mit Ausnahme von Ciprofloxacin und Linezolid, die beide synthetisch gewonnen wurden, lediglich Modifikationen der bereits bekannten Strukturen dar.¹⁸

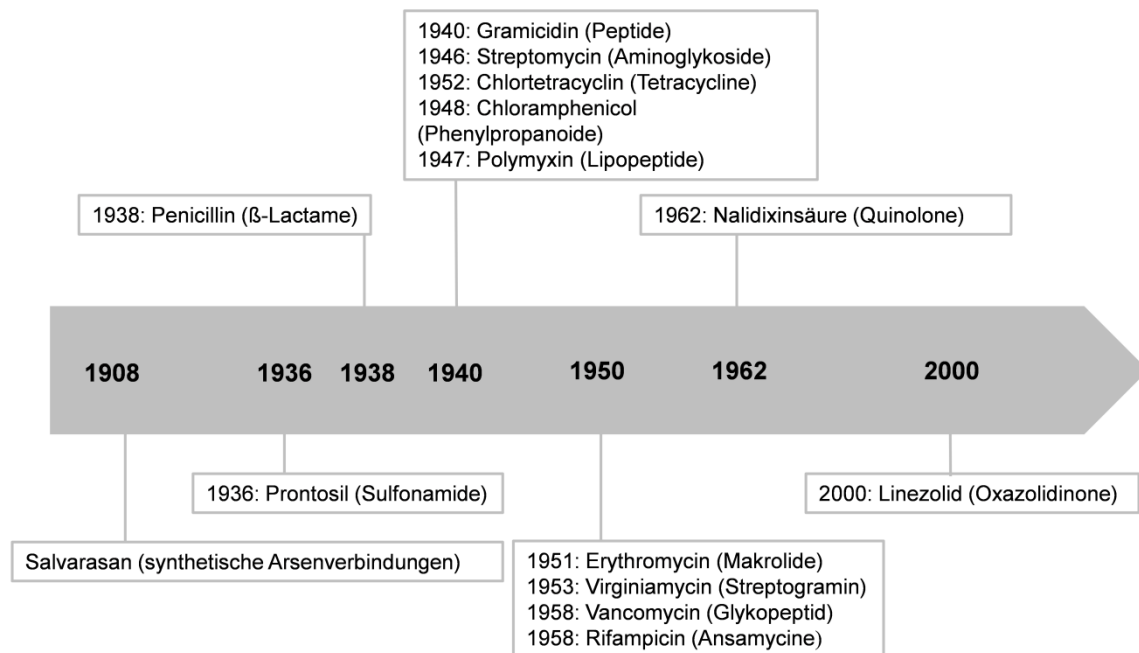


Abbildung 1. Die bisher entwickelten Antibiotika und der Zeitpunkt ihrer Markteinführung.²

Deshalb ist vor allen die Suche nach neuen Zielstrukturen aber auch nach neuen Wirkstoffklassen essentiell, um die vermehrt auftretenden resistenten Bakterienstämme auch in Zukunft effektiv bekämpfen zu können. Die wichtigsten Anforderungen an eine mögliche Zielstruktur für eine neue antibakterielle Therapie sind dabei folgende: 1) sie ist nicht oder nur in stark veränderter Form im Menschen zu finden, 2) sie ist essentiell für das Wachstum/Überleben des Bakteriums, 3) sie liegt konserviert über die meisten Pathogene vor und 4) sie ist idealerweise durch kleine Moleküle zu inhibieren.¹⁸ Selbst unter Berücksichtigung all dieser Anforderungen deutet sich bei der Analyse des mikrobiellen Genoms eine viel höhere Anzahl an potentiellen Targets als die bisher adressierten an.¹⁸ Die fehlende Bereitschaft der pharmazeutischen Industrie neue Antibiotika bis zur Marktreife zu entwickeln, könnte zum Teil darin begründet sein, dass neue Antibiotika zunächst nur als Reservemittel eingesetzt werden, um das Auftreten von Resistenzen möglichst lange zu verhindern.¹⁹ Darüber hinaus werden Antibiotika nur für einen begrenzten Zeitraum angewendet, im Gegensatz zu Medikamenten gegen chronische Krankheiten, wie z.B. Diabetes oder Bluthochdruck. Dies hat zur Folge, dass das Marktvolumen und damit der „Return on Investment“ geringer als bei anderen Therapiefeldern ist und die Entwicklung eines neuen Antibiotikums somit wirtschaftlich nicht sinnvoll erscheint.²⁰ Daher verwundert es nicht, dass neuartige Antibiotika, vor allem mit neuartigen Wirkmechanismen, in letzter Zeit hauptsächlich aus kleineren Unternehmen bzw. dem akademischen Bereich stammen, wie z.B. Daptomycin (cyclisches Lipopeptid) von *Cubist* oder Telavancin (semisynthetisches Glykopeptid) von *Astellas*.¹⁸ Die momentan in der „Pipeline“ befindlichen Substanzen sind hauptsächlich Weiterentwicklungen bekannter Grundstrukturen, die dazu geeignet sind, bestehende Resistenzen gegen andere Vertreter ihrer Klasse zu überwinden und stellen somit keine innovativen Wirkstoffe dar.⁹

1.1.4. Die bakterielle RNase P

1.1.4.1. RNase P als Drug Target

Aus den bereits genannten Gründen ist das Auffinden neuer antibakterieller Targets und die Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen diese Targets von eminenter Bedeutung. Als ein mögliches neues Target hat sich die bakterielle RNase P erwiesen, ein historisches Überbleibsel aus einer ehemals RNA basierten Welt.²¹ Die RNase P ist an der Reifung der *Transfer-RNAs* (tRNAs) beteiligt und wurde erstmals vor über 40 Jahren in *E. coli*

entdeckt.⁴ Sie ist essentiell für das Überleben des Bakteriums³ und unterscheidet sich in ihrem Aufbau grundlegend zwischen Bakterien, *Archaea* und *Eukaryoten*. Bei der RNase P handelt es sich um ein Ribozym, welches aus RNA und Protein besteht. In Bakterien ist *in vivo* eine Proteineinheit (P Protein) an der Reaktion beteiligt, bei *Archaea* sind es vier oder fünf Untereinheiten und bei Eukaryoten sind es zehn verschiedene Proteinkomponenten. Aufgrund des unterschiedlichen Aufbaus eignet sie sich daher als Ziel für die Entwicklung von selektiv wirkenden Antibiotika.³ Die meisten Studien zur Aufklärung der Struktur und des Mechanismus haben sich mit der bakteriellen RNase P beschäftigt, da sie relativ einfach aufgebaut ist (ungefähr 400 Nukleotide und 120 Aminosäuren²²) und der RNA-Teil und nicht das Protein die Reaktion an der tRNA katalysiert.³ Die RNase P und das Ribosom sind die einzig bekannten Ribozyme, die *in vivo* mehr als einen Reaktionszyklus katalysieren.³ Eine weitere Eigenschaft der RNase P ist, dass sie neben den pre-tRNAs (in manchen Zellen über 100 unterschiedliche pre-tRNAs) weitere Substrate besitzt, hierzu zählen die *transfer messenger RNA* (tmRNA) und die 4.5S RNA, die zusammen mit Proteinkomponenten am Transport von Proteinen in der Zelle beteiligt sind.^{3,23} Bereits 1983 konnte aufgeklärt werden, dass der RNA-Teil der RNase P alleine die Reaktion zur Reifung der tRNAs katalysiert.³ *In vitro* bei einer erhöhten Salzkonzentration ist die RNA auch ohne das P Protein in der Lage, die Reaktion an der tRNA zu katalysieren - wenn auch langsamer, *in vivo* wird der Proteinanteil jedoch benötigt.²² Der Protein-Teil reduziert *in vivo* die Abhängigkeit der Reaktion von Mg^{2+} -Ionen, stabilisiert die aktive Konformation der RNA-Untereinheit, erhöht die Substrataffinität (indem er den 5'-*Leader*-Teil der tRNA mit der zentralen Furche im Protein bindet) und beeinflusst die Substratspezifität für z.B. die pre-4.5S RNA.²² Das P Protein erhöht in *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) den k_{cat}/k_m der RNase P katalysierten Spaltung um den Faktor 2000 und erhöht die Substrataffinität 10.000-fach.²⁴ Aufgrund seiner Funktion ist das bakterielle P Protein strukturell homolog, besitzt aber nur eine geringe Sequenzidentität innerhalb der Bakterien: nur 14 Aminosäurereste sind zu mehr als 67% konserviert, bezogen auf 112 untersuchte bakterielle Spezies.²⁵

1.1.4.2. pre-tRNA als Substrat der bakteriellen RNase P

Die tRNAs werden als inaktive Vorstufen synthetisiert und werden einer post-transkriptionellen Reifung unterworfen.³ Die Reifung der tRNA umfasst dabei das Entfernen von Nukleotiden am 5'- und am 3'-Ende der pre-tRNA durch eine Reihe von Endo- und Exonukleasen; das Hinzufügen des 3' CCA-Teils durch eine terminale

Transferase (an diese Stelle wird später die Aminosäure angefügt); das Entfernen von Nukleotid-Sequenzen am 5'-Ende und eine hohe Zahl an Nukleotid-Modifikationen, wie z.B. Methylierung der Nukleobasen und der Zucker oder die Bildung von Pseudouridin.³ Die Funktion vieler dieser Modifikationen konnte bisher nicht aufgeklärt werden, da der *Knockout* von Genen, die für manche dieser Modifikationen verantwortlich sind, zu keiner Veränderung des Phänotyps führte.³ Die globale Organisation der tRNA ist über alle Formen des Lebens hoch konserviert, die Sekundärstruktur der reifen tRNA ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt und besteht aus folgenden Elementen: einem CCA-Trinukleosid am 3'-Ende, an dem die Aminoacetylierung und die Transpeptidase-Reaktion (Übertragung der Aminosäure der tRNA auf das wachsende Peptid im Ribosom) während der Proteinsynthese am Ribosom stattfindet, einer D Schleife (*D loop*), dem Anticodon, welches für das Erkennen der Basentriplets der mRNA zuständig ist, und der T ψ C Schleife (T-loop).³

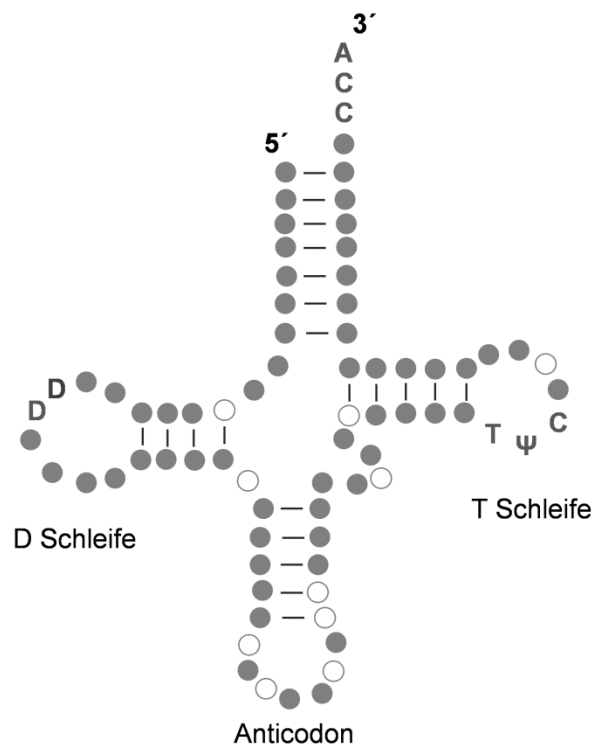


Abbildung 2. Struktur der reifen tRNA. Offene Kreise zeigen üblicherweise in der Sequenz variable Nucleotide. Abbildung nach *Kazantsev et al.*³

1.1.4.3. Der katalytische Mechanismus der RNase P

Die RNase P katalysiert das Abspalten der 5'-*Leader*-Sequenz durch die Hydrolyse einer Phosphodiester-Bindung in der pre-tRNA, das Produkt ist die reife tRNA (siehe Abbildung 3).

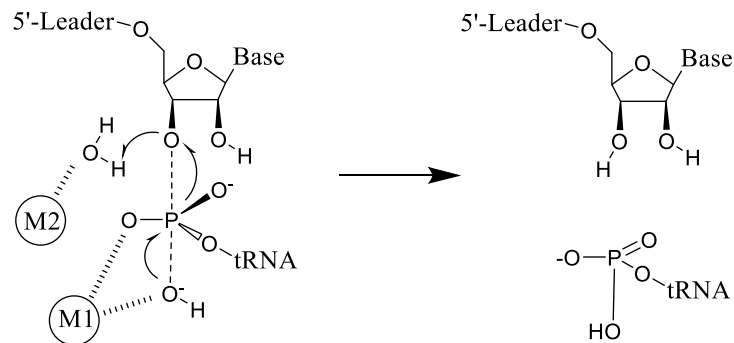


Abbildung 3. Postulierter katalytischer Mechanismus der Substratspaltung.²⁶

Hierzu ist die RNA Komponente (P RNA) in dem RNase P Komplex in zwei Domänen aufgeteilt, die *specificity domain* (S-Domäne) und die *catalytic domain* (C-Domäne), die für die Substrat-Erkennung und für die Bildung des aktiven Zentrums zuständig sind, mit fünf konservierten Regionen, die in allen Organismen zu finden sind.²¹ Die P RNA wird in zwei Sekundärstrukturtypen unterteilt (A-Typ (*ancestral*) und B-Typ (*Bacillus*)), die trotz ihrer abweichenden Sekundärstruktur eine ähnliche Tertiärstruktur aufweisen und *in vivo* miteinander austauschbar sind.²⁷ Durch Interaktionen von ungepaarten Nucleobasen des Akzeptor-Teils der tRNA zur S-Domäne und zur C-Domäne der P RNA, durch Kontakte der T ψ C Schleife zur S-Domäne und durch intensive Wechselwirkungen der pre-tRNA 5'-Leader-Sequenz mit dem P Protein des Komplexes wird die pre-tRNA vom Holoenzym erkannt.²¹ Die Hauptaufgabe des P Proteins im Komplex ist somit die Interaktion mit der 5'-Leader-Sequenz der tRNA (über die zentrale Furche) und das Stabilisieren der RNA Komponente des Komplexes.²¹ Das aktive Zentrum befindet sich in der Nähe der 5'-Leader-Sequenz und wird von der RNA Komponente des Komplexes durch ungepaarte Nucleobasen geformt (siehe Abbildung 4).²¹ Wie in Abbildung 3 und Abbildung 4 zu sehen ist, spielen zwei Metallionen (M1 und M2), vermutlich Magnesium-Ionen, die von der P RNA stabilisiert werden, eine direkte Rolle bei der Spaltung der Phosphodiester-Bindung. M1 positioniert das Sauerstoffatom des Phosphats der 5'-Leader-Sequenz und ermöglicht einem Hydroxyl-Anion eine S_N2-artige Substitution durchzuführen. M2 stabilisiert dabei den Übergangszustand und vermittelt den Protonentransfer auf das entstandene 3'-Ende des Nucleosids. Andere hochkonservierte Nucleoside des Komplexes spielen keine direkte Rolle in der Katalysereaktion, sondern stabilisieren die richtige Ausrichtung des Substrates.²¹

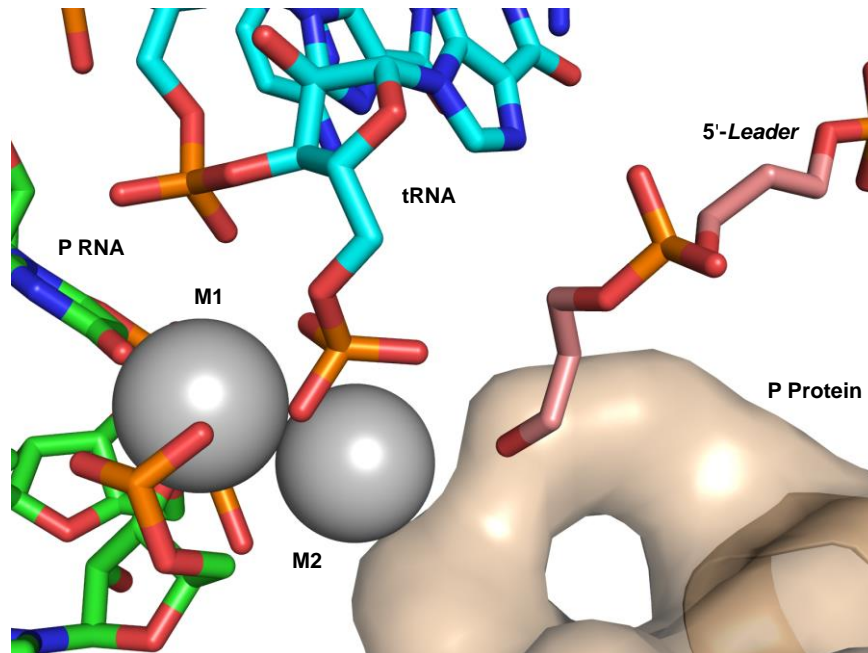


Abbildung 4. Aktives Zentrum der RNase P nach erfolgter Substratspaltung (PDB-Code: 3Q1R).²¹

Das Substrat wird folglich durch komplementäre Regionen der Tertiärstruktur, RNA-RNA Kontakte und intermolekulare Basenpaarung erkannt und, vermittelt durch zwei Metall-Ionen, gespalten. Die 5'-Leader-Sequenz der tRNA liegt in der zentralen Furche des P Proteins, deren Grund durch ein β -Faltblatt geformt wird (siehe Abbildung 5).²¹

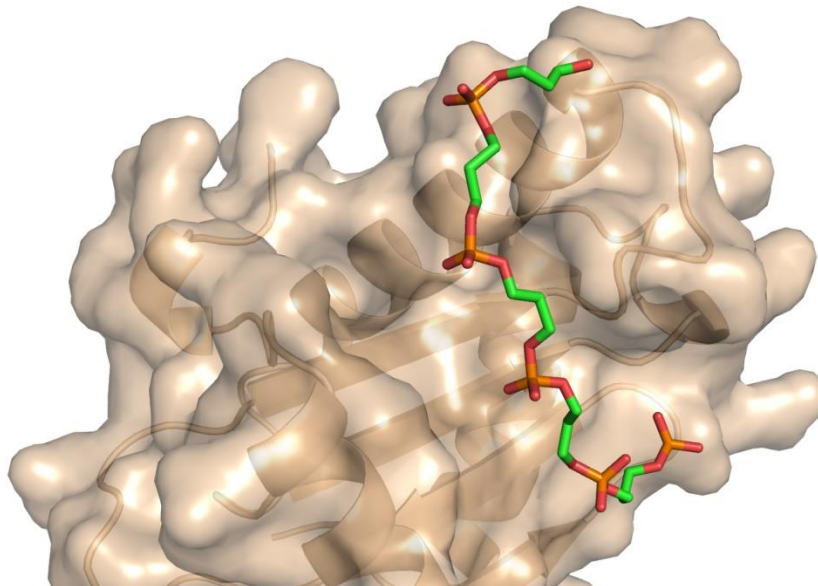


Abbildung 5. 5'-Leader der tRNA (grün) in der zentralen Furche des P Proteins der RNase P (PDB-Code: 3Q1R).²¹

1.1.4.4. Inhibition der RNase P

Der erste in der Literatur beschriebene RNase P Inhibitor war Puromycin,²⁸ welcher die Prozessierung der pre-tRNA durch die P RNA in *E. coli* mit einem K_D von 1 mM nur sehr schwach inhibiert.⁴ Auch Neomycin B inhibiert das Prozessieren der pre-tRNA (50% Inhibition bei 35 μ M) für die RNA Reaktion ohne P Protein, mit P Protein liegt eine 50% Inhibition bei 50 μ M vor.⁴ Die Inhibition ist auf ein Verhindern der Bindung von divalenten Metallionen an die RNA zurückzuführen. Nachdem die Kristallstruktur des P Proteins der RNase P vom *B. subtilis* 1998 publiziert wurde (PDB-Code: 1A6F²²), begannen zwei Pharmazeutische Unternehmen (*GlaxoSmithKline* und *Message Pharmaceuticals*) die RNase P als Zielstruktur zu untersuchen. *Message Pharmaceuticals* etablierte ein Hochdurchsatzscreening für die RNase P Reaktion, durch welches Substanzen (Guanylhydrazone) identifiziert werden konnten, die selektiv das Wachstum von *S. aureus* und *Streptococcus pyogenes* inhibierten,⁴ jedoch stellten beide Unternehmen die Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet ein (*Message Pharmaceuticals* im Jahre 2004). Ein Einstellen der Forschung von Pharmazeutischen Unternehmen muss aber nicht zwingend bedeuten, dass die RNase P als Target nicht „druggable“ ist, es könnten auch wirtschaftliche Gründe eine Rolle gespielt haben. Wie im Kapitel 1.1.3. erwähnt, ist es schwer, für neue Antibiotika das erforderliche Marktvolumen während der Patentlaufzeit zu erreichen, da neue Antibiotika aus berechtigter Sorge vor aufkommenden Resistenzen zunächst nur als Reservemittel eingesetzt werden.¹⁸

Die Möglichkeiten zur Inhibition der RNase P Funktion sind in Abbildung 6 dargestellt und im Folgenden sollen die wichtigsten bisher verfolgten Ansätze zur Inhibition kurz vorgestellt werden.

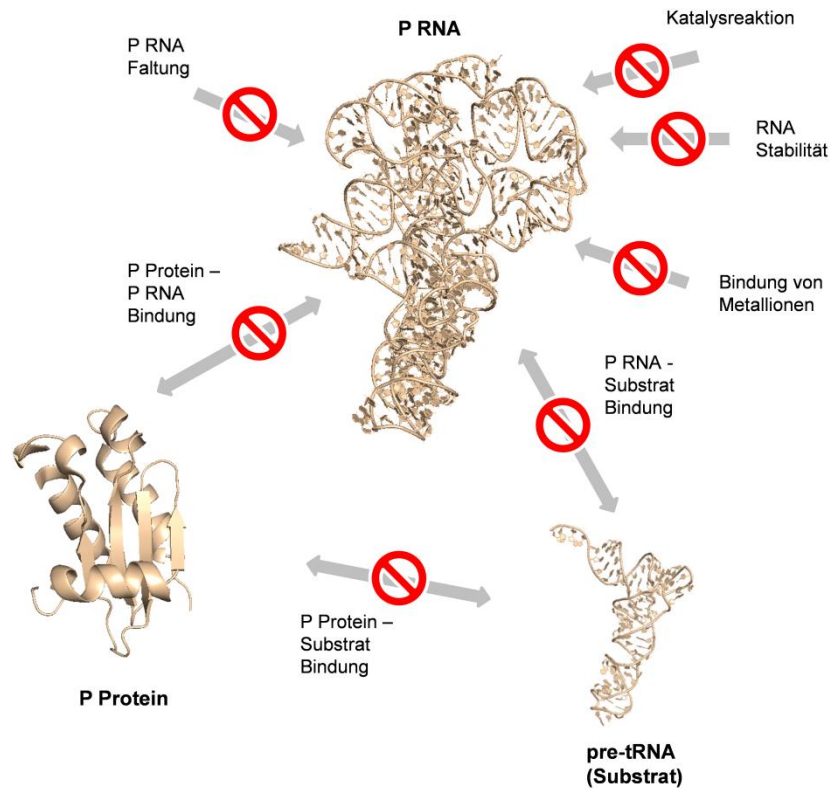


Abbildung 6. Möglichkeiten zum Beeinflussen der korrekten RNase P Funktion (modifiziert nach *Willkomm et al.*⁴).

1.1.4.4.1. Antisense-Inhibitoren

Die Grundlage für den Antisense-Ansatz ist die Fähigkeit von DNA und RNA stabile Interaktionen durch das Formen von Basenpaaren auszubilden, um so zum Beispiel die Translation von mRNA in Proteine am Ribosom zu verhindern. Bei der RNase P könnte durch das Verwenden von Antisense-Inhibitoren, die ihrerseits an die P RNA binden, die Bindung der pre-tRNA an das RNase P Holoenzym (besteht aus P RNA und P Protein) verhindert werden (Abbildung 6). Folglich kann die pre-tRNA nicht mehr an das Holoenzym binden, wird nicht mehr prozessiert und es entsteht keine reife tRNA mehr.⁴ Ein Nachteil der RNA als Wirkstoff ist, dass sie relativ schnell degradiert wird, daher kommen auch LNA Varianten (2'-Sauerstoff und 4'-Kohlenstoff sind über eine Methylenbrücke verbunden) und PNA Analoga (Zucker-Phosphat-Rückgrat durch Pseudopeptid ersetzt) zum Einsatz, da sie deutlich stabiler sind.⁴ Mit Hilfe der Antisense-Strategie konnten IC_{50} -Werte im einstellig nanomolaren Bereich erreicht werden.²⁹ Das Hauptproblem dieses Therapieansatzes ist die schlechte Bioverfügbarkeit der Inhibitoren.⁴

1.1.4.4.2. Aminoglykoside

Neben ihrer Hauptwirkung, der Bindung an das Ribosom und damit der Verhinderung der Proteinbiosynthese, können Aminoglykoside auch an RNA Moleküle binden. Die Bindung erfolgt durch elektrostatische Interaktionen zwischen den protonierten Amino-Gruppen und dem Phosphat-Rückgrat der RNA, aber auch durch eine Art von komplementärer Ergänzung der Form der RNA, über Wasserstoffbrücken und van der Waals Kontakte.⁴ Aufgrund der wenig spezifischen Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Gruppen der Aminoglykoside und dem Phosphat-Rückgrat weisen Aminoglykoside ein promiskuitives Bindeverhalten auf, da diese Interaktionen, im Gegensatz zur Bindung der Aminoglykoside an das Ribosom, nicht auf spezielle Regionen im Rückgrat der RNA begrenzt sind. Trotz des problematischen Bindeverhaltens konnte für Derivate der Aminoglykoside eine gewisse Selektivität für bakterielle RNase P Enzyme erreicht werden.⁴

1.1.4.4.3. Substratbindende Inhibitoren

Neben anderen synthetischen Inhibitoren, die an die pre-tRNA binden und so die katalytische Reaktion der RNase P verhindern (Abbildung 6), sind Porphyrine die bisher stärksten bekannten niedermolekularen Inhibitoren der RNase P Reaktion. Diese Inhibitoren binden aber nicht nur an die pre-tRNA (K_D -Wert: 100 nM) sondern mit ähnlichen K_D -Werten an die P RNA (K_D -Wert: 50 nM) und an die tRNA (K_D -Wert: 1200 nM).⁴ Dieses wenig selektive Bindeverhalten könnte zu Problemen bei einer weiteren Wirkstoffentwicklung auf Basis der Porphyrine führen.

1.2. Vorarbeiten und Aufgabenstellung

1.2.1. Virtuelles Hochdurchsatzscreening

Obwohl die Primärstruktur des P Proteins wenig konserviert ist, ist die dreidimensionale Struktur des P Proteins hoch konserviert. Diese Beobachtung wird dadurch unterstützt, dass eine Vielzahl an bakteriellen P Proteinen dazu in der Lage ist, das *B. subtilis* P Protein *in vivo* zu ersetzen.³⁰ Daher wurde anhand der von *Stams et al.* (PDB-Code: 1A6F²²) publizierten Kristallstruktur von *Dr. Patrick Pfeffer* im Arbeitskreis von *Prof. Dr. Gerhard Klebe, Philipps-Universität Marburg*, ein virtuelles Hochdurchsatzscreening mit einem Teil der ZINC Datenbank³¹ (ca. 8 Millionen Verbindungen) durchgeführt.⁴ Als

Bindetasche wurde die zentrale Furche ausgewählt, in welche die 5'-Leader-Sequenz der pre-tRNA bindet (siehe Abbildung 5), da sie die größte Vertiefung im P Protein aufweist und *in vivo* essentiell für das Erkennen der pre-tRNA ist (P Protein – Substrat Bindung, Abbildung 6). Ein möglicher Nachteil dieses Ansatzes ist, dass ein möglicher Inhibitor mit der RNA konkurrieren muss. Abbildung 7 und Abbildung 8 zeigen die Aminosäuren, die im Docking die möglichen Interaktionen zum Liganden ausbilden.

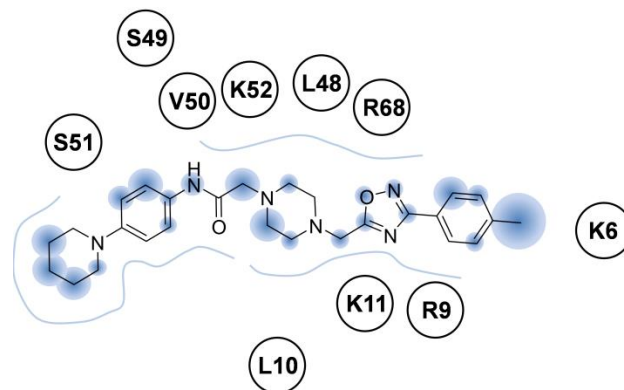


Abbildung 7. Interaktionspartner des Inhibitors im Docking.⁴

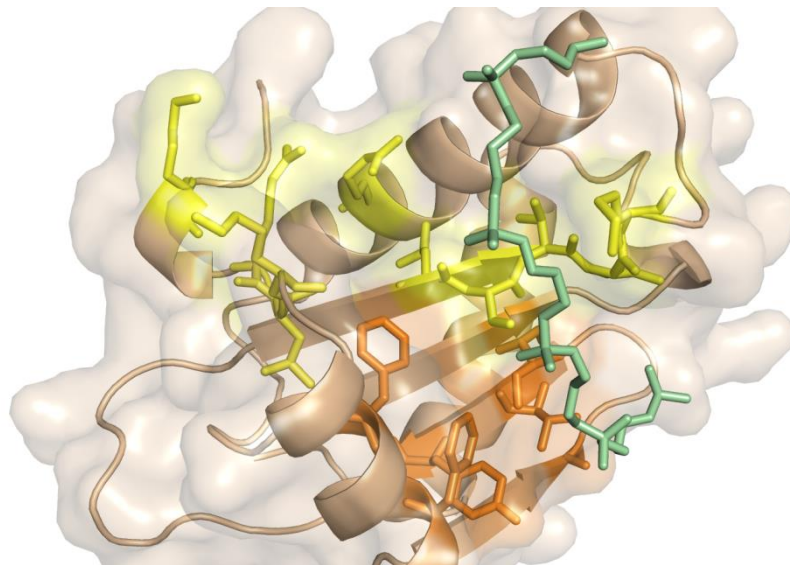


Abbildung 8. Interaktionspartner des Screeninghits (gelb) und hydrophobe Aminosäuren (orange) im P Protein.⁴ (Überlagerung des P Proteins aus der Struktur mit dem PDB-Code: 1A6F²² und der 5'-Leader-Sequenz (grün) aus der Struktur mit dem PDB-Code: 3Q1R²¹).

Durch Überlagerung der Struktur, die im Docking von *Dr. Patrick Pfeffer* verwendet wurde (PDB-Code: 1A6F) und der 5'-Leader-Sequenz der pre-tRNA der von *Reiter et al.* publizierten ligandgebundenen Struktur (PDB-Code: 3Q1R²¹), wird deutlich, dass die in Abbildung 7 gezeigten Aminosäuren, die im Docking Interaktionen zum Screeninghit eingehen, sowohl an der Kontaktfläche des P Proteins zur P RNA lokalisiert sind (Lys6, Arg9, Leu10, Lys11, Arg68), sich aber auch in unmittelbarer Nähe zur 5'-Leader-Sequenz

der pre-tRNA (Leu48, Ser49, Val50, Ser51 und Lys52) befinden (Abbildung 8, gelb eingefärbte Aminosäuren). Darüber hinaus ist zu erkennen, dass sich in unmittelbarer Nähe zur Bindetasche der 5'-Leader-Sequenz der pre-tRNA im P Protein Aminosäuren mit hydrophoben aromatischen Seitenketten (Phe16, Phe20 (beide Helix A), Tyr34 (β -Faltblatt)) und solche Aminosäuren mit hydrophoben Eigenschaften (Ala27, Val32, Ile86 (β -Faltblatt)) befinden (Abbildung 8, orange eingefärbt), diese Aminosäuren können weitere potentielle Interaktionspartner für einen Inhibitor der RNase P darstellen. Die nach Abschluss des Dockings durchgeführte visuelle Inspektion der 15 besten Binder zeigte, dass ein zentrales Strukturelement in den Inhibitor-Strukturen bevorzugt wird.⁴ Da alle Substanzen der ZINC Datenbank kommerziell erhältlich sind, stellte dieses Hochdurchsatzdocking den Ausgangspunkt für die Vorarbeiten der vorliegenden Arbeit dar.

1.2.2. Testung von Inhibitoren

Die mittels virtuellem Hochdurchsatzscreening ausgewählten Inhibitoren wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Roland K. Hartmann, Philipps-Universität Marburg, durch Dennis Walcyk im Rahmen seiner Masterarbeit⁵ sowohl *in vitro* gegen die RNase P als auch *in vivo* gegen *E. coli* (Stämme K-12 und AS19) sowie gegen *B. subtilis* (Stamm PY79) getestet.

1.2.3. *In vitro* Assaysystem

Die Inhibition des bakteriellen RNase P Holoenzym wird mittels einer Holoenzymkinetik gemessen, bei der bestimmt wird, wie schnell das Substrat pre-tRNA^{Gly} durch das Holoenzym umgesetzt wird.⁵ Das Substrat und das Holoenzym werden miteinander inkubiert und zu bestimmten Zeitpunkten werden Proben entnommen.⁵ In diesen Proben wird die Menge an entstandenem Produkt mittels Gelelektrophorese und Autoradiographie bestimmt (Verfahren um Isotope zu detektieren und zu quantifizieren, für ein tieferes Verständnis dieses Verfahrens wird auf Johnston *et al.*³² verwiesen). Aus der Auftragung der Konzentration gegen die Zeit lässt sich die Reaktionskonstante k_{obs} bestimmen.⁵ Diese Reaktionskonstante k_{obs} wird anschließend mit einer Negativkontrolle verglichen und aus diesen beiden Werten dann die relative Restaktivität der RNase P ermittelt.⁵ Mit dem Ziel, eine selektive Inhibition des P Proteins durch die Inhibitoren nachzuweisen, wurde zusätzlich getestet, ob die Inhibitoren die P RNA katalysierte

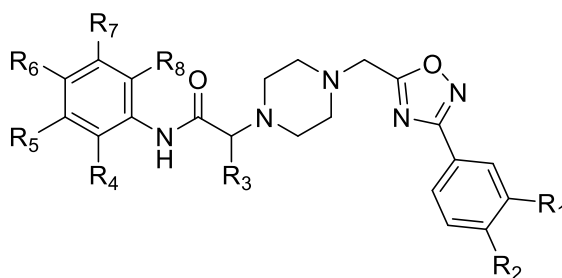
Prozessierung der pre-tRNA in Abwesenheit des P Proteins inhibieren. Wie in Kapitel 1.1.4.1. beschrieben, ist die P RNA bei einer erhöhten Salzkonzentration in der Lage, die Reaktion alleine zu katalysieren. Bei Inhibitoren, die selektiv das P Protein inhibieren, sollten die Umsetzung der pre-tRNA durch die P RNA in Abwesenheit des P Proteins also nicht gestört werden und folglich eine Zunahme vom Produkt (reife tRNA) über die Zeit zu erkennen sein.⁵

1.2.4. *In vivo* Assaysystem

Nach erfolgten *in vitro* Tests wurden ausgewählte Inhibitoren auf ihre Fähigkeit hin untersucht, das Bakterienwachstum *in vivo* zu hemmen. Hierfür wurde ein Agar-Diffusionstest verwendet, bei dem Inhibitorlösungen (10 mM in DMSO) auf ein Filterpapier gegeben werden. Nach Inkubation werden die Bakterienhemmhöfe gemessen und mit der DMSO-Kontrolle verglichen.⁵ Als Bakterienstämme wurden *E. coli* AS19 (Gram-negativ mit einem Lipopolysaccharid-Defekt, der zu einer für Substanzen besser durchlässigen Zellwand führt), *B. subtilis* PY79 (gram-positiv, Wildtyp) und *E. coli* K12 (gram-negativ, Wildtyp) eingesetzt.

1.2.5. Getestete Inhibitoren

Tabelle 1 zeigt alle in den Vorarbeiten verwendeten Inhibitoren, die aus der ZINC Datenbank bestellt wurden.⁵ Die Inhibitoren weisen das gleiche Grundgerüst auf, lediglich das Substitutionsmuster der Aromaten sowie in zwei Fällen am C-10 Kohlenstoffatom (R₄) ist unterschiedlich.



Inhibitor	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
MT42	H	CH ₃	CH ₃	H	H	NO ₂	H	H
MT47	CF ₃	H	H	CH ₃	H	CH ₃	H	CH ₃
MT49	CF ₃	H	H	H	Cl	H	H	CH ₃
MT50	H	CH ₃	H	H	H	H		H
MT51	H	Cl	H	H	H		H	CH ₃
MT52	H	CH ₃	H	H	H		H	H
MT53	H	CH ₃	H	CH ₃	H		H	H
MT54	CF ₃	H	H	H	H	CH ₃	F	H

Tabelle 1. In den Vorarbeiten von Dennis Walcyk getestete Inhibitoren.⁵

1.2.6. Ergebnisse der *in vitro* Tests

Die Inhibitoren wurden in Konzentrationen von 100 μ M auf Hemmung der RNase P Holoenzymaktivität getestet. Die Verbindung MT53 (siehe Tabelle 1 und Abbildung 9) zeigte hierbei die stärkste Inhibition der RNase P Holoenzymaktivität mit einer Restaktivität von 36%, insgesamt unterscheiden sich die Messwerte aber nicht sehr stark voneinander.⁵ Da in Gegenwart der Inhibitoren (100 μ M) keine Beeinflussung der pre-tRNA Prozessierung in Abwesenheit des P Proteins festgestellt werden konnte (Kapitel 1.2.3.), inhibieren die Verbindungen folglich selektiv das P Protein des RNase P Holoenzymkomplexes.⁵

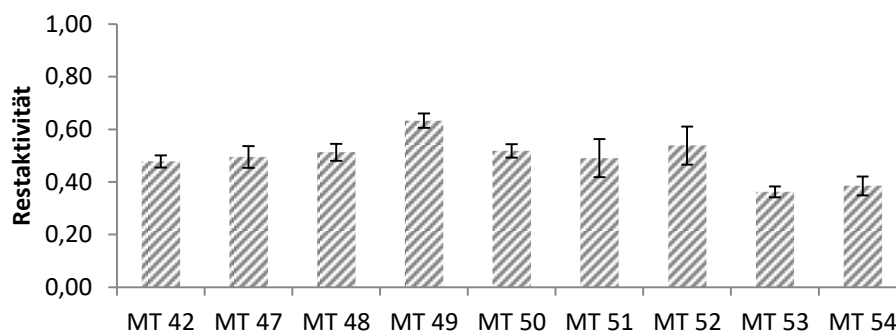


Abbildung 9. Inhibition der RNase P Holoenzymaktivität.⁵

1.2.7. Ergebnisse der *in vivo* Tests

Wie Tabelle 2 zu entnehmen ist, zeigten bei dem *B. subtilis* PY79 Stamm nicht alle *in vitro* aktiven Inhibitoren einen Hemmhof, sondern lediglich MT47, MT48, MT49, MT50, MT51 und MT53. Bei dem Zellwand-defekten Bakterien-Stamm *E. coli* AS19 zeigten hingegen fast alle Inhibitoren, mit Ausnahme von MT51 und MT52, einen deutlichen Hemmhof im Vergleich zur DMSO-Kontrolle.⁵

Inhibitor	Hemmhof <i>E. coli</i> AS19 [cm]	Hemmhof <i>B. Subtilis</i> PY79 [cm]
MT42	0,8	-
MT47	1,35	leichte Hemmung
MT48	0,8	leichte Hemmung
MT49	0,9	0,8
MT50	0,8	leichte Hemmung
MT51	-	0,7
MT52	-	-
MT53	1,1	leichte Hemmung
MT54	1,2	-
DMSO	0,75	-

Tabelle 2. Hemmhöfe der Verbindungen der MT-Serie.⁵

1.2.8. Aufgabenstellung für diese Arbeit

Die Aufgabenstellung für diese Arbeit leitete sich aus den in der Master Arbeit von *Dennis Walczyk*⁵ erzielten Ergebnissen ab. Zunächst galt es eine Syntheseroute zu entwickeln, die eine voneinander unabhängige Variation der Reste an den beiden endständigen Aromaten erlaubte, um systematisch Struktur-Wirkungs-Beziehungen (SAR) ableiten zu können. Darüber hinaus sollte versucht werden, mit den potentesten Inhibitoren eine Kristallstruktur zu erhalten, um den Bindungsmodus aufzuklären und um Informationen für ein weiteres Inhibitor-design zu erhalten.

1.3. Inhibitor-design

1.3.1. Strukturelle Eigenschaften

Häufig verletzen antibakteriell wirkende Substanzen die *Lipinski Regeln (Rule of Five)*.^{33,34} Der potenteste Inhibitor der Vorarbeiten *in vitro* (Abbildung 10) gehorcht jedoch diesen Regeln, da er nur einen Wasserstoffbrücken-Donor, acht Wasserstoffbrücken-Akzeptoren, einen cLogP von 4,76 (berechnet mit *ChemBioDraw Ultra*, Version 14.0³⁵) und ein Molekulargewicht von unter 500 g/mol aufweist. Diese

Substanz stellt also einen guten Ausgangspunkt für die Synthese weiterer Inhibitoren dar, da auch das Einbringen weiterer Reste nicht unmittelbar zu einer Verletzung der *Lipinski's Rule of Five* führen dürfte. Bei den im *in vitro* Assay gewählten pH Bedingungen (Kapitel 1.2.3.;⁵) liegt das Piperazin monoprotioniert vor, trägt also zur Löslichkeit der Substanz bei. Der Stickstoff des Pyrrolidins ist hingegen bei den Assaybedingungen nicht protoniert, da es sich gleichzeitig um einen Anilin-Stickstoff handelt, der nur bis zu einem pH-Wert von ca. 4 in protonierter Form vorliegt. Trotzdem leistet auch dieser Substituent aufgrund seiner Polarität einen positiven Beitrag zum Lösungsverhalten der Substanz.

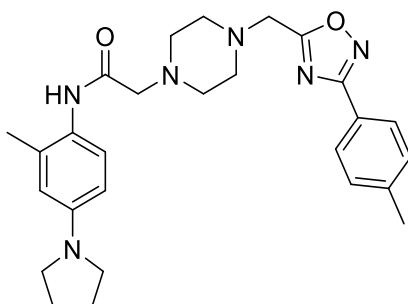


Abbildung 10. Struktur von MT53.

Alle im virtuellen Hochdurchsatzscreening der ZINC Datenbank erhaltenen Hits haben einen ähnlichen strukturellen Aufbau (Abbildung 11): ein (mehrfach) substituierter Aromat und das Säureamid bilden den linken Molekülteil, das zentrale Piperazin ist über eine Methylenbrücke mit einem 1,2,4-Oxadiazol verknüpft, das mit dem anschließenden Aromaten, der unterschiedliche Substituenten tragen kann, den rechten Molekülteil bildet.

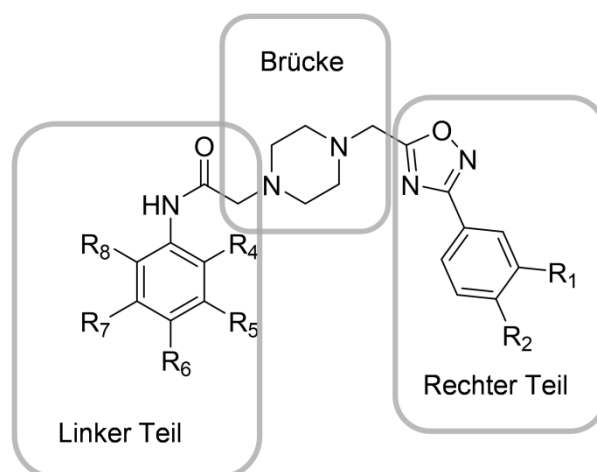
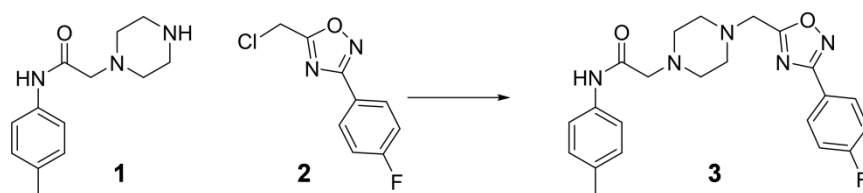


Abbildung 11. Grundstruktur der Inhibitoren.

1.3.2. Entwicklung einer Syntheseroute

1.3.2.1. Ausgangssituation

Auch wenn eine Vielzahl von Derivaten von MT53 käuflich zu erwerben ist, wurde bislang keine komplette Syntheseroute für diese Substanzklasse veröffentlicht. Die einzig verfügbare Synthese³⁶ (Schema 1) zu dieser Substanzklasse wurde im Jahr 2013 veröffentlicht, rund ein Jahr nachdem das Projekt zur Synthese der Inhibitoren im Rahmen dieser Arbeit begonnen wurde. In dieser Vorschrift führt die nukleophile Substitution des Piperazinderivats **1**, mit dem Chlor-Derivat **2** zu **3**³⁶. Eine Patentschrift³⁷ ist ebenfalls verfügbar, aber auch hier ist keine Syntheseroute für diese Substanzklasse veröffentlicht worden.



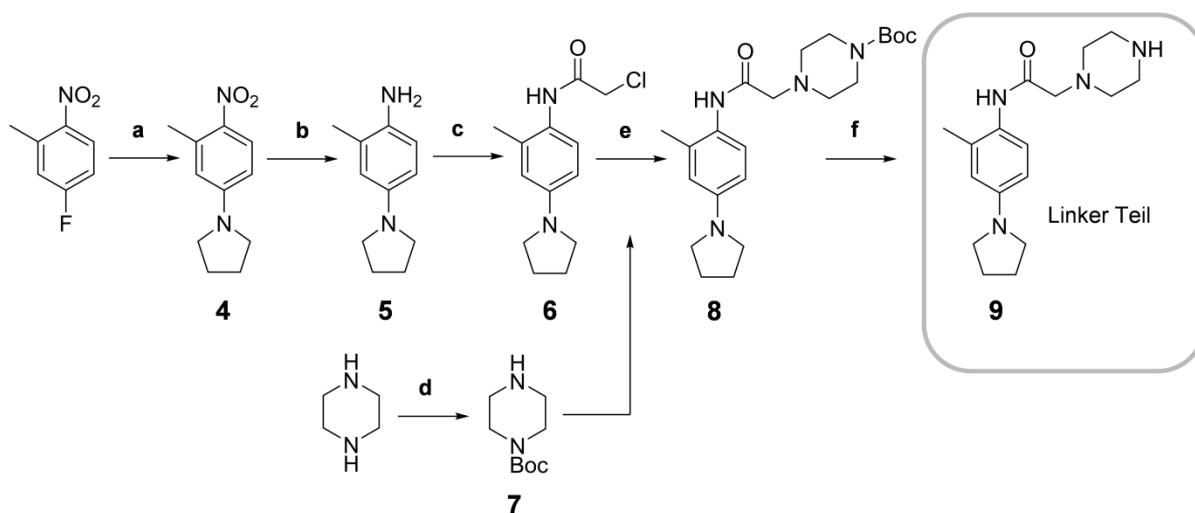
Schema 1. Reaktionsschema 1. 1 eq. **1** und 1 eq. **2**, 1.1 eq. Diisopropylethylamin, 1,5 ml DMF, 3 h bei 60 °C im Ultraschallbad, 86%.³⁶

Primär galt es, eine Syntheseroute zu entwickeln, mit der sich die Substituenten der beiden Aromaten unter Beibehaltung der in Kapitel 1.3.1. genannten Grundstruktur schnell und kosteneffektiv variieren lassen, um eine SAR ableiten zu können. Die Syntheseroute wurde in Zusammenarbeit mit *Dr. Frithjof Scheer* (ebenfalls Arbeitskreis *Diederich, Philipps-Universität Marburg*) entwickelt. Bei einer linearen Syntheseroute bestünde diese Synthese aus 9 Stufen, daher sollte eine Variation der linken und rechten Molekülteile getrennt erfolgen. Eine Verknüpfung der beiden Molekülhälften erfolgt dann über das zentrale Piperazin (siehe Abbildung 11). Mit Hilfe dieser konvergenten Synthese sind zur Variation des linken Molekülteils nur drei und zur Variation des rechten Molekülteils nur zwei Synthesestufen notwendig, insgesamt also 6 Stufen.

1.3.2.2. Synthese des linken Molekülteils von MT53

Für weitere *in vitro* und *in vivo* Versuche wurde MT53 in größeren Mengen benötigt, daher erfolgte zunächst die Synthese dieser Substanz. Nukleophile Substitution von 4-Fluoro-2-methyl-1-nitrobenzen mit Pyrrolidin führte zu **4** (Schema 2). Durch Einsatz einer von *Dr. Philipp Toth* (ebenfalls Arbeitskreis *Diederich, Philipps-Universität Marburg*) entwickelten Synthesemethode³⁸ konnte die Reaktionszeit von anfänglich 27

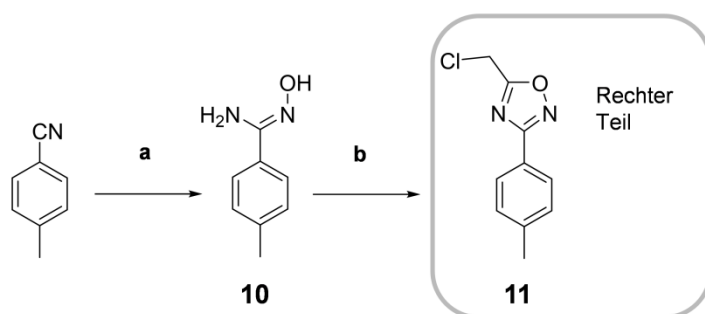
Stunden unter Reflux durch Verwenden eines Mikrowellenreaktors auf 2 Stunden verkürzt werden. Reduktion der aromatischen Nitrogruppe und anschließende Umsetzung des oxidationsempfindlichen Amins mit Chloracetylchlorid führte zu **6**. Die moderate Ausbeute dieser Reaktion ließe sich eventuell durch ein weiteres Optimieren der Reaktionsbedingungen verbessern. Jedoch konnte durch Durchführung der Reaktion unter Schutzgas und Lichtausschluss, wie von Herrn *Dr. Philipp Toth* in seiner Dissertation³⁸ für ähnliche Verbindungen vorgeschlagen, keine erhöhte Ausbeute erzielt werden. Durch anschließende Umsetzung mit dem mono-Boc geschützten Piperazin (**7**) und nachfolgende Entschützung wurde die zentrale Synthesestufe **9** in einer Gesamtausbeute von 50% über 5 Stufen erhalten (Schema 2). Darüber hinaus wurde versucht, ob dieser Teil der Synthese auch ohne Isolierung und Aufreinigung der Zwischenstufen durchzuführen ist. Die Nebenprodukte der vorherigen Reaktionen ließen sich durch Waschen der organischen Phase mit gesättigter (ges.) NaHCO₃-Lsg und ges. Kochsalzlösung entweder abtrennen oder sie störten den weiteren Reaktionsverlauf nicht. Die Ausbeute bis zur Verbindung **9** war vergleichbar mit der in Schema 2 aufgeführten Syntheseroute, der präparative Aufwand aber entsprechend geringer. **9** bildet zugleich den konstanten Molekülteil bei einer Aufstellung einer SAR, bei der nur der rechte Molekülteil variiert werden soll.



Schema 2. Synthese des linken Molekülteils von MT53. (a) Pyrrolidin, MeCN, 120 °C in Mikrowelle, 2 h, 99%; (b) 4 Bar H₂ Pd/C, DCM, 2 h; (c) Chloracetylchlorid, NEt₃, DCM, 0 °C, 7 h 57% über 2 Stufen; (d) (Boc)₂O, DCM, 0 °C, 12 h, 97%; (e) Boc-Piperazin (**7**), K₂CO₃, MeCN, Reflux, 7 h; (f) HCl, MeOH, 12 h, 89% über 2 Stufen.

1.3.2.3. Synthese des rechten Molekülteils von MT53

Die Synthese von **10** (Schema 3) erfolgte analog der publizierten Vorschrift³⁹ mit Hydroxylaminhydrochlorid und lieferte gute Ausbeuten (86%). Die Zyklisierung von **10** mit Chloracetylchlorid zum 1,2,4-Oxadiazol erfolgte in der Mikrowelle bei 120 °C in Acetonitril anders als in den publizierten Vorschriften,^{40,41} die als Lösungsmittel Toluol unter Refluxbedingungen verwenden. Durch das Überschreiten der Siedetemperatur von Acetonitril um 38 °C in der Mikrowelle konnte ein vollständiger Umsatz des Eduktes schon nach einer Stunde beobachtet werden. Das verwendete Lösungsmittel Acetonitril unterscheidet sich mit seinen aprotisch-polaren Eigenschaften von dem in den publizierten Vorschriften verwendeten Toluol, welches aprotisch-apolar ist. Die Zwischenstufen der Zyklisierung sind polar und bei dem letzten Schritt der Zyklisierung wird bei einer Kondensation Wasser frei, daher kann diese Reaktion besser in polaren Lösungsmitteln ablaufen, da diese die Zwischenstufen der Reaktion und die Reaktionsprodukte besser solvatisieren als apolare Lösungsmittel. Versuche, diese Reaktion in Dichlormethan (DCM) unter Reflux bei Normaldruck durchzuführen, zeigten bei der Kontrolle des Reaktionsverlaufs durch Dünnschichtchromatographie auch nach 48 bis 72 Stunden noch sehr viel Edukt im Reaktionsansatz. Die höhere Reaktionstemperatur und ein aprotisch-polares Lösungsmittel scheinen also notwendig für einen schnellen und kompletten Ablauf der Reaktion und verringern die Reaktionszeit um mehr als den Faktor 70 bei einer nahezu quantitativen Ausbeute ohne säulenchromatographische Aufreinigung des Reaktionsproduktes. So wurde **11** in einer Gesamtausbeute von 82% über zwei Stufen erhalten (Schema 3).

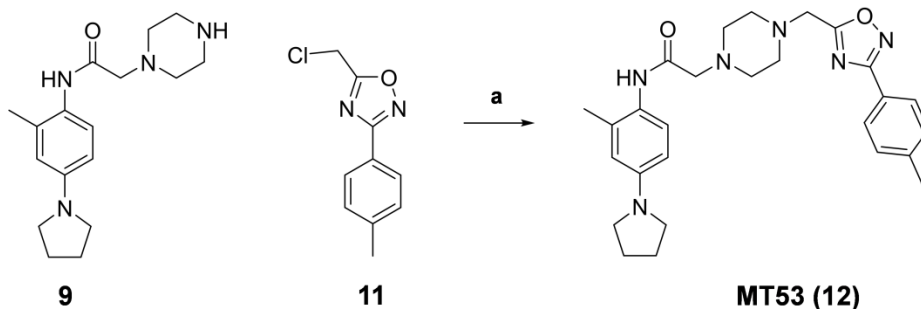


Schema 3. Synthese des rechten Molekülteils von MT53. (a) HONH_3^+ , NEt_3 , EtOH, Reflux, 3h, 86%; (b) Chloracetylchlorid, K_2CO_3 , MeCN, 120 °C in Mikrowelle, 1 h, 95%.

1.3.2.4. Synthese von MT53

Unter Verwendung von **9** und **11** konnte im letzten Syntheseschritt die Zielverbindung MT53 in einer Ausbeute von 94% erhalten werden. Durch Wechseln der verwendeten

Base von Triethylamin auf Kaliumcarbonat konnte die Ausbeute von anfangs 88% auf 94% gesteigert werden, die Reaktion war bereits nach 6 Stunden vollständig abgelaufen (Schema 4). Bei der Verwendung von Dichlormethan als Lösungsmittel für die Reaktion verlängert sich die Reaktionszeit erheblich. Dies kann auf den geringeren Siedepunkt von Dichlormethan im Vergleich zu Acetonitril und die Fähigkeit von Acetonitril, die Abgangsgruppe der S_N2 Reaktion (Chlorid-Ion), besser zu stabilisieren, zurückzuführen sein (Siedepunkt DCM: 39 °C; Acetonitril: 82 °C).



Schema 4. Synthese von MT53. (a) K₂CO₃, MeCN, Reflux, 6 h, 94%.

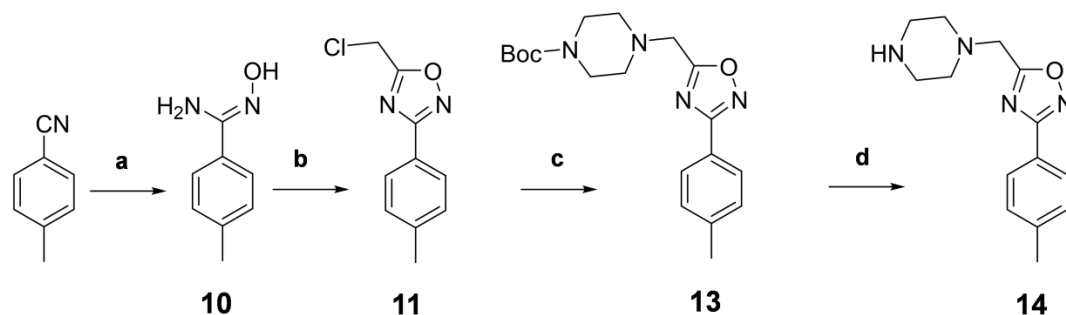
1.3.2.5. Zusammenfassung der Synthese von MT53

MT53 konnte in einer Gesamtausbeute von 47% über sechs Stufen erhalten werden. Die Reaktionszeiten konnten zum Teil stark verkürzt und der Aufwand, der zum Aufreinigen der Produkte nötig war, ebenfalls reduziert werden. Wenn auf eine Isolierung und Aufreinigung der Zwischenstufen verzichtet wurde, konnte die säulenchromatographische Aufreinigung auf den letzten Schritt, die Vereinigung der beiden Molekülhälften, reduziert werden. Das größte Potential zur Verbesserung hat der Syntheseschritt von **4** zu **6**, da hier nur eine Ausbeute von 57% über zwei Stufen erzielt worden ist.

1.3.2.6. Synthese des rechten Molekülteils mit Piperazin

Um die Variation des linken Molekülteils von MT53 möglichst effizient zu gestalten, sollte die Synthese dieses Molekülteils verkürzt werden. Hierzu eignet sich der Syntheseschritt, in dem das Boc-geschützte Piperazin (**7**) eingeführt wird. Das Piperazin, welches die Brücke zwischen den beiden Molekülteilen darstellt, lässt sich gewissermaßen am rechten Molekülteil, also auf der Stufe der Verbindung **11**, einführen. Da für das Aufstellen einer SAR anfänglich entweder nur der rechte oder nur der linke Molekülteil variiert werden sollte, lässt sich die Länge der Synthesesequenz des zu variiierenden Molekülteils verkürzen. Die Synthesesequenz des jeweils anderen Molekülteils verlängert sich in der Folge zwar um 2 Synthesestufen, da dieser aber

konstant bleibt und zudem in größeren Mengen benötigt wird, wurde dieser baukastenartigen Synthesesequenz der Vorrang gegeben (Schema 5).



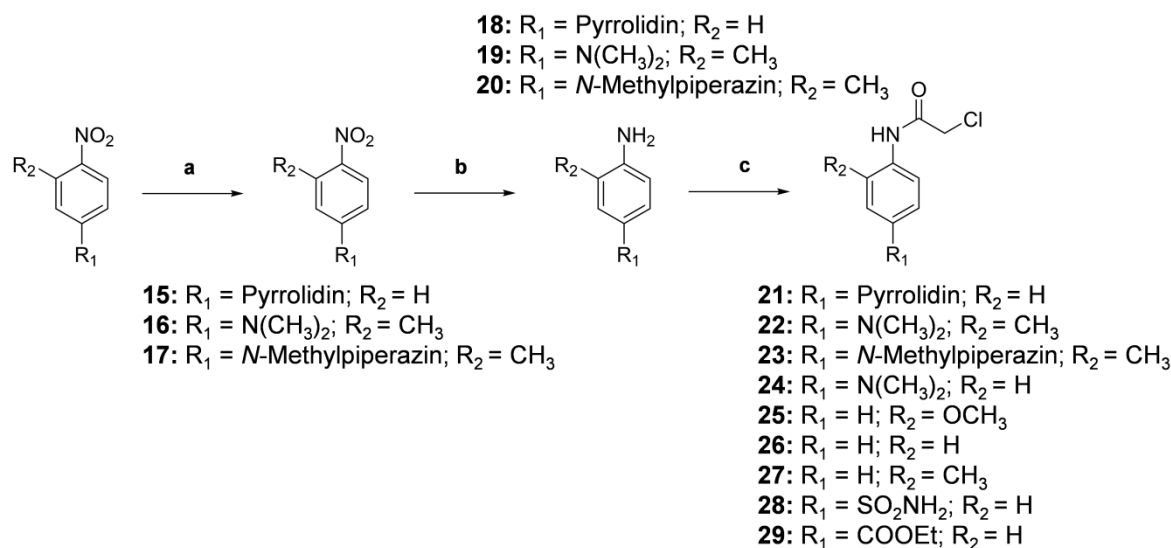
Schema 5. Synthese von **14**. Synthese des rechten Molekülteils von MT53. (a) HONH_3^+ , Net_3 , EtOH, Reflux, 3h, 86%; (b) Chloracetylchlorid, K_2CO_3 , MeCN, 120 °C in Mikrowelle, 1 h, 95%; (c) Boc-Piperazin (**7**), K_2CO_3 , MeCN, Reflux, 6 h; (d) HCl, DCM, 24 h, 80% über 2 Stufen.

Die Synthese des rechten Molekülteils erfolgte in einer Ausbeute von 63% über 5 Synthesestufen. Eine säulenchromatographische Aufreinigung war nur auf der vierten Synthesestufe (d) nach Einführen des Boc-geschützten Piperazins (**7**) notwendig.

1.3.3. Molekülvariationen

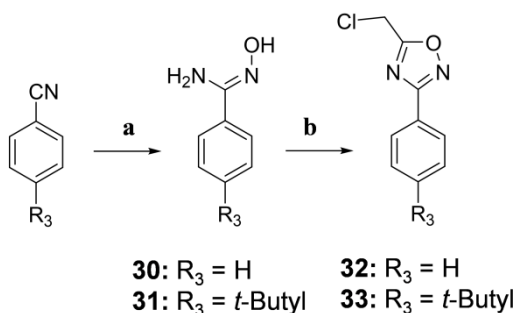
1.3.3.1. Syntheseschritte zum Einführen von Variationen

Das Einführen von Variationen am linken und am rechten Molekülteil (siehe Abbildung 11) ist dank der entwickelten Synthese relativ schnell durchzuführen. Für die Variation des linken Molekülteils müssen, falls ein Rest nukleophil am Aromaten eingefügt werden soll, nur 3 Stufen synthetisiert und zwei Produkte isoliert werden. Da eine Vielzahl von Anilinen käuflich zu erwerben ist, ist häufig nur eine Chloracetylierung derselben notwendig, daher reduziert sich die Synthese des linken Molekülteils dann auf nur einen Schritt, der in guten Ausbeuten realisierbar ist (**24-29**, Schema 6).



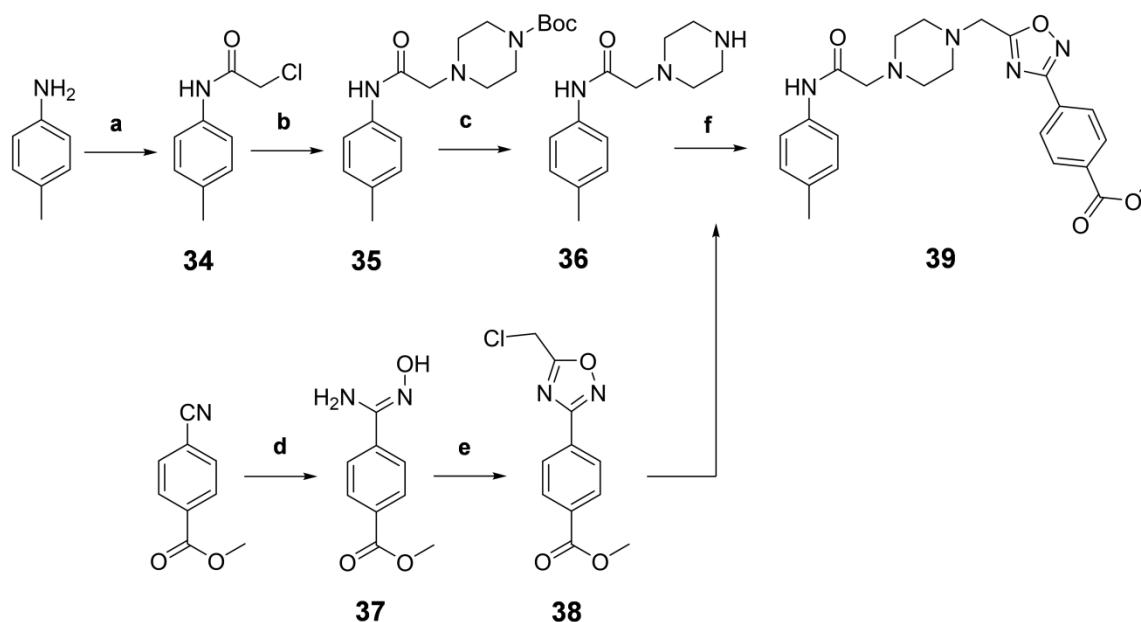
Schema 6. Synthese des linken Molekülteils der Inhibitoren. (a) Amin, MeCN, 120 °C in Mikrowelle, 2 h, 55 – 99%; (b) 4 Bar H₂ Pd/C, DCM, 2 h (nicht isoliert); (c) Chloroacetylchlorid, NEt₃, DCM, 0 °C, 24 h, 34 – 92%.

Zur Variation des rechten Molekülteils sind, ausgehend vom Nitril, nur zwei Synthesestufen notwendig, die sich ebenfalls in sehr guten Ausbeuten durchführen lassen (Schema 7).



Schema 7. Synthese des rechten Molekülteils der Inhibitoren. (a) HONH₃⁺, NEt₃, EtOH, Reflux, 3h, 69 – 73%; (b) Chloroacetylchlorid, K₂CO₃, MeCN, 120 °C in Mikrowelle, 1 h, 65 – 84%.

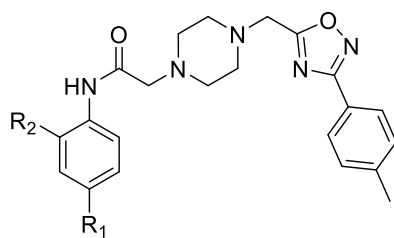
Bei der Synthese von **39** wurde von den oben aufgeführten Syntheschemata abgewichen und stattdessen wie in Schema 8 vorgegangen. **49** und **52** wurden durch Entschützung der jeweiligen Carbonsäureester (**39** und **48**) erhalten.



Schema 8. Synthese von **39**. (a) Chloroacetylchlorid, NEt_3 , DCM, 0 °C, 24 h, 60%. (b) Boc-Piperazin (**7**), K_2CO_3 , MeCN, Reflux, 6 h, 93%; (c) HCl, DCM, 48 h, RT, 56%; (d) HONH_3^+ , NEt_3 , EtOH, Reflux, 3h, 86%; (e) Chloroacetylchlorid, K_2CO_3 , MeCN, 120 °C in Mikrowelle, 1 h, 86%; (f) K_2CO_3 , MeCN, Reflux, 12 h, 54%.

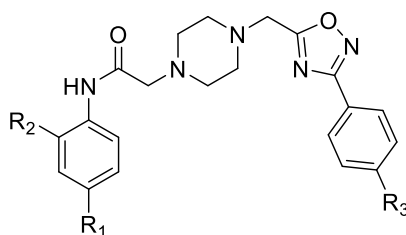
1.3.3.2. Synthetisierte Inhibitoren

Die in Tabelle 3 und Tabelle 4 aufgeführten Verbindungen wurden im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert und es konnten durch das Baukastenprinzip teilweise Gesamtausbeuten von über 70% erreicht werden. Die Auswahl der Substituenten erfolgte anhand des im Docking gefundenen Bindungsmodus (Kapitel 1.2.1.) und der Beobachtung, dass die Verbindungen der MT-Serie nur eine geringe Löslichkeit aufwiesen. Durch die Synthese von Derivaten von MT53 sollten erste Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufgestellt werden, in dem die Substituenten der beiden Aromaten von MT53 entweder weggelassen (**40**, **41**, **42**, **43**, **44**, **45** und **50**) oder durch größere ausgetauscht wurden (**46**, **51**). Um die Polarität zu erhöhen, ohne eine Ladung zu erzeugen, wurde in Verbindung **47** ein Sulfonamid und in **39** und **48** jeweils ein Carbonsäureester eingeführt. Um die Löslichkeit der Verbindungen weiter zu erhöhen, wurden schließlich solche Substituenten eingeführt, die unter Assaybedingungen (pH 6,5) geladen vorliegen (Carbonsäuren in **49** und **52** und *N*-Methylpiperazin in **46**). Auf die Synthese weiterer Verbindungen wurde verzichtet, da bis zum Abschluss dieser Arbeit die *in vitro* und *in vivo* Messergebnisse der bereits synthetisierten Verbindungen leider noch nicht vollständig vorlagen und somit eine Interpretation der SAR-Daten nicht möglich ist.



Inhibitor	R ₁	R ₂	Edukte	Gesamt Ausbeute
MT53 (12)		CH ₃	11 9	47%
40		H	14 21	26%
41	H	H	14 26	71%
42	H	CH ₃	14 27	57%
43		H	14 24	67%
44		CH ₃	14 22	39%
45	H		14 25	65%
46		CH ₃	14 23	19%
47	SO ₂ NH ₂	H	14 28	40%
48		H	14 29	60%
49		H	48	30%

Tabelle 3. Synthetisierte Inhibitoren mit Variationen an R₁ und R₂.



Inhibitor	R ₁	R ₂	R ₃	Edukte	Gesamt Ausbeute
50		CH ₃	H	9 32	41%
51		CH ₃		9 33	49%
39	CH ₃	H		36 38	42%
52	CH ₃	H		39	36%

Tabelle 4. Synthetisierte Inhibitoren mit Variationen an R₁, R₂ und R₃.

1.3.3.3. Verbesserung der Löslichkeit durch Bildung von Salzen

In den Vorarbeiten wurde deutlich, dass Verbindungen der MT-Serie, die käuflich erworben wurden, nur eine relativ geringe Löslichkeit aufweisen. Trotz dieser geringen Löslichkeit wurden Inhibitionseffekte *in vitro* und *in vivo* beobachtet (siehe Kapitel 1.2.6. und 1.2.7.). Eine Verbesserung der Löslichkeit könnte also auch einen Einfluss auf die *in vitro* und *in vivo* beobachteten Effekte haben, da sich so die effektive Inhibitorkonzentration in Lösung erhöhen ließe. Um die Löslichkeit zu bestimmen, wurde von MT53 mittels HPLC und anschließender Berechnung der area under the curve (AUC) eine Kalibriergerade erzeugt.

Salz	H ₂ O / Puffer	Konzentration
Base	H ₂ O	54 µM
HCl	H ₂ O	> 86 mM
Base	Puffer	28 µM
HCl	Puffer	20 µM
HBr	Puffer	<1 µM
Triflat	Puffer	28 µM

Tabelle 5. Maximale Löslichkeit von MT53 in drei Salzformen, gelöst in H₂O oder Assaypuffer.

Tabelle 5 zeigt deutlich, dass die Verbindung MT53 als Base mit einer Konzentration von 54 µM nur schlecht in Wasser löslich, als HCl-Salz hingegen mit über 86 mM deutlich besser wasserlöslich ist. Im Assaypuffer hingegen ist sowohl das HCl-Salz als auch das HBr-Salz schlecht löslich und auch das Trifluormethansulfonsäure-Salz (Triflat-Salz) von

MT53 zeigt keine verbesserte Löslichkeit gegenüber der Base, dem HBr- und dem HCl-Salz. Um zu ermitteln, warum MT53 als dreifaches HCl-Salz in Wasser, aber nicht im Puffer löslich ist, wurde MT53 als HCl-Salz in Wasser gelöst und der pH-Wert bestimmt, dieser betrug 2,3. Ein schrittweises Anheben des pH-Wertes mit 1 mM Natriumhydroxidlösung führte dazu, dass sich die Lösung bei einem pH von 3,4 eintrübte, MT53 also anfing, aus der Lösung auszufallen. Der pH entspricht ungefähr dem pK_A der konjugierten Säure des Anilin-Stickstoffs und dem ersten pK_A -Wert der konjugierten Säure des Piperazins in Lösung. MT53 als Hydrochlorid scheint also für seine Löslichkeit in Wasser mehr als nur eine positive Ladung zu benötigen (siehe Abbildung 12). Im Puffer liegt der pH mit 6,5 oberhalb der beiden pK_A -Werte der konjugierten Säuren, somit liegt dort die einfach am Piperazin-Stickstoff protonierte Form von MT53 mit Chlorid als Gegenion vor, die nicht in Lösung bleibt. Auch das Salz der Trifluoressigsäure und das HBr-Salz konnten die Lösungseigenschaften von MT53 nicht positiv beeinflussen. Es ist bekannt, dass Versuche, Lösungen schlecht oder moderat löslicher Salze zu puffern, häufig zu einem Präzipitieren der Substanzen führen.⁴² Durch diesen Effekt kann auch der Verlust der Löslichkeit von MT53 in der einfach protonierten Form im Puffer im Vergleich zu Wasser erklärt werden, da der pH-Wert, ab dem MT53 als HCl-Salz in Wasser anfängt auszufallen, 3,4 beträgt, der pH des Puffers aber mit 6,5 deutlich über diesem Wert liegt. Auch der Versuch den pH-Wert des Puffers auf 6,0 und damit auf einen Wert abzusenken, bei dem die *in vitro* Reaktion noch abläuft (siehe Kapitel 1.2.3.), führte zu keiner verbesserten Löslichkeit von MT53. Da mitunter auch das Gegenion einen entscheidenden Einfluss auf die Löslichkeit haben kann,⁴² wurde eine mögliche Verbesserung der Löslichkeit von MT53 durch weitere Salzformen untersucht. Diese Versuche führten aber z.B. im Fall des Methansulfonsäure-Salzes (Mesylat-Salz) zu hygroskopischen und stöchiometrisch nicht definierten Verbindungen, daher erschien eine strukturelle Veränderung der Substanz, um die Löslichkeitseigenschaften zu verbessern, aussichtsreicher.

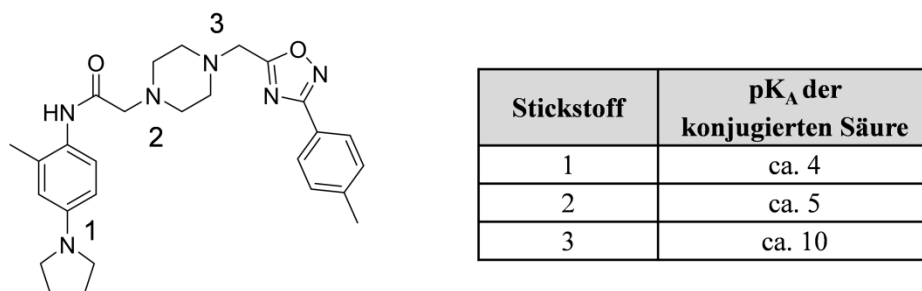


Abbildung 12. pK_A -Werte von MT53.

1.3.3.4. Verbesserung der Löslichkeit durch Einführen von Substituenten

Mit dem Wissen, dass MT53 in der einfach protonierten Form nicht in Assaypuffer löslich ist, wurde das Pyrrolidin in MT53 durch ein *N*-Methylpiperazin ausgetauscht (Abbildung 13). **46** sollte nun auch im Puffer zweifach protoniert vorliegen und damit löslich sein. Um die Löslichkeit zu überprüfen, wurde analog zu MT53 mittels HPLC und anschließender Berechnung der AUC eine Kalibriergerade erzeugt. Die Löslichkeit der Base in Puffer konnte durch das Einführen des zweiten Piperazins deutlich erhöht werden (>200 μM in Puffer). Um zu überprüfen, ab welchem pH **46** aus wässriger Lösung ausfällt, wurde analog zu dem Versuch mit MT53 das HCl-Salz von **46** in Wasser gelöst und der pH-Wert bestimmt. Der pH-Wert betrug 2,3, und ein Anheben des pH-Wertes mit 1 mM Natriumhydroxidlösung führte dazu, dass sich die Lösung erst bei einem pH von 8,0 eintrübte. Dieser pH-Wert entspricht ungefähr dem 2. pK_A -Wert der beiden Piperazine und liegt damit über dem pH-Wert des Puffers.

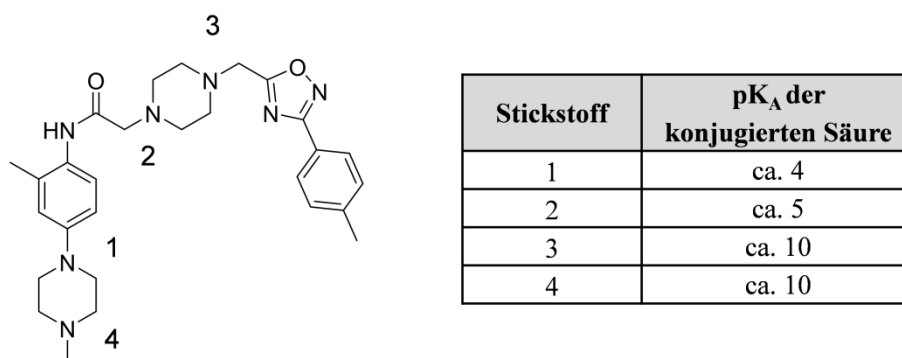


Abbildung 13. pK_A -Werte von **46**.

Ein Entfernen der Methylgruppe am rechten Molekülteil von MT53, um die hydrophoben Eigenschaften zu verringern, führte nicht zu einer verbesserten Löslichkeit des Moleküls (Löslichkeit von **50** im Assaypuffer: 21 μM). Auch das Einfügen von endständigen Carbonsäuren (**49** und **52**) führte nicht zu einer verbesserten Löslichkeit der Verbindungen in Wasser oder Puffer.

1.4. Messergebnisse

1.4.1. *In vitro* Messergebnisse

Die Substanzen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Roland K. Hartmann, Philipps-Universität Marburg, durch Dennis Walcyk, gemessen. Die Messergebnisse der *in vitro* Messungen (Durchführung in Kapitel 1.2.3. beschrieben) lagen leider bis zum Abschluss dieser Arbeit nur teilweise vor und lassen daher zum gegenwärtigen Zeitpunkt

noch keinen endgültigen Schluss auf eine mögliche SAR zu, sollen aber dennoch im Folgenden kurz diskutiert werden.

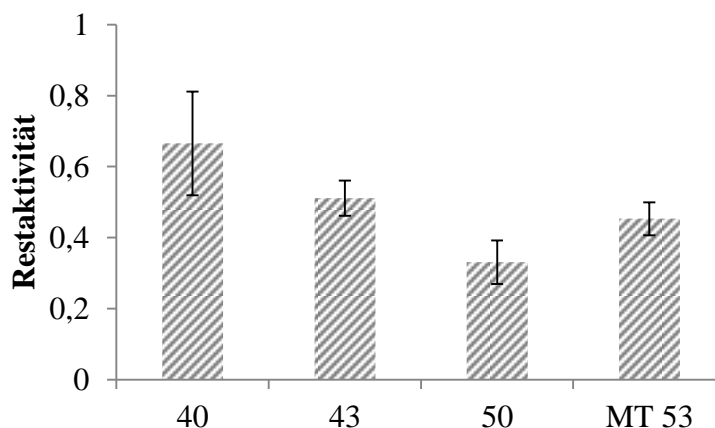


Abbildung 14. Die Inhibitoren wurden als HCl-Salze in einer Ausgangskonzentration von 100 μ M vermessen.

Verglichen mit der in den Vorarbeiten als Base vorliegenden Form weist MT53 als Hydrochlorid eine vergleichbare Restaktivität auf. **50** ist der bislang potenteste Inhibitor mit einer RNase P Restaktivität von nur ca. 20%, also knapp 50% weniger Restaktivität als MT53, dem Screeninghit (Abbildung 14).

1.4.2. *In vivo* Messergebnisse

Die *in vivo* Messungen wurden ebenfalls von *Dennis Walcyk* durchgeführt. Die *in vivo* Ergebnisse (Durchführung in Kapitel 1.2.4. beschrieben) lagen bis zum Abschluss dieser Arbeit ebenfalls noch nicht vollständig vor und die vorliegenden Ergebnisse sind nur eingeschränkt auswertbar, da ein Teil der Substanzen auf dem Filterpapier ausgefallen war und so nicht in das Medium diffundieren konnte. Bei **50** konnte gegen *E. coli* AS19 ein Hemmhof beobachtet werden, der eine ähnliche Größe wie der von MT53 aufwies (Abbildung 15). **46** zeigte bei *B. subtilis* PY79 Hemmhöfe, die im Durchmesser deutlich größer waren, als die durch MT53 hervorgerufenen Hemmhöfe (Abbildung 16).

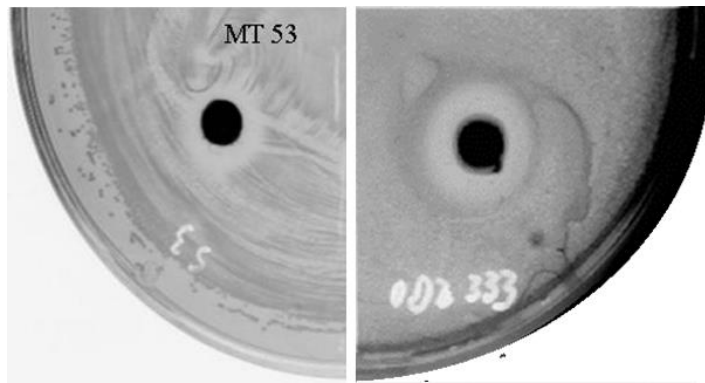


Abbildung 15. Vergleich der Hemmhöfe von MT53 (links) und 50 (rechts) gegen *E. coli* AS19 (gemessen auf unterschiedlichen Platten).

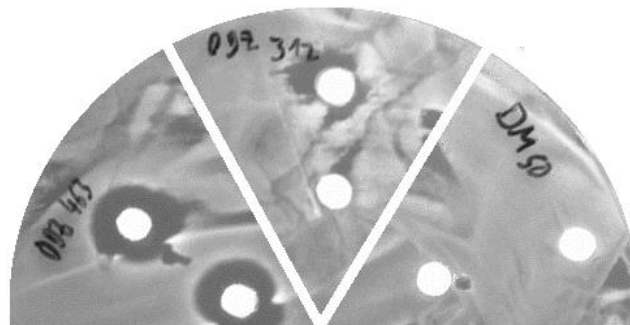


Abbildung 16. Hemmhöfe von 12 (MT53, in der Mitte) und 46 (links, ODZ463) gegen *B. subtilis* PY79 (gemessen auf einer Platte, mit DMSO-Kontrolle (rechts)).

1.5. Kristallisation

Da in den Vorarbeiten gezeigt wurde, dass MT53 selektiv das P Protein des RNase P Holoenzym inhiert (Kapitel 1.2.6.), wurde versucht, eine Kristallstruktur des P Proteins im Komplex mit MT53 zu erhalten. Hierzu wurden zunächst die von *Stams et al.*²² publizierten Bedingungen reproduziert, um eine ausreichende Menge an gut streuenden Kristallen zu gewinnen. Unter Verwendung der publizierten Bedingungen wurden in Zusammenarbeit mit *Dennis Walczyk* Kristalle erhalten, die zwar keine einheitliche Morphologie aufwiesen, sich aber aufgrund ihrer Größe für Soakingexperimente mit MT53 eigneten (siehe Abbildung 17 bis Abbildung 19). Die Kristalle wurden zunächst isoliert und in den Soakingpuffer überführt. Bei Soakingzeiten von mehr als 24 Stunden wurden die Kristalle allerdings zerstört und konnten daher nicht mehr vermessen werden. Bei Soakingzeiten von unter 24 Stunden ergaben einige noch ein Streubild und konnten am BESSY vermessen werden. In den so erhaltenen Strukturen war jedoch kein Inhibitor gebunden. Die Auflösung einer erhaltenen Struktur war mit 2,4 Å etwas höher, als die von *Stams et al.*²² publizierte (2,6 Å), wurde aber nicht endgültig verfeinert. Der Versuch der Kokristallisation der RNase P mit MT53 führte ebenfalls nicht zu einer ligandgebundenen Struktur von Inhibitor und Protein, sondern lediglich zu Apo-Kristallen ohne gebundenen Inhibitor.

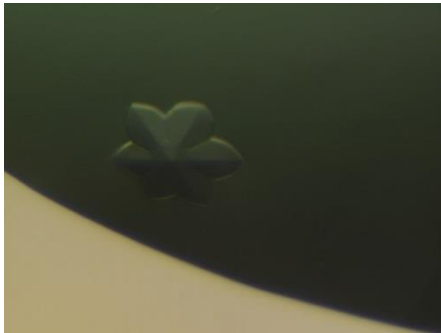


Abbildung 17. RNase P Kristall.

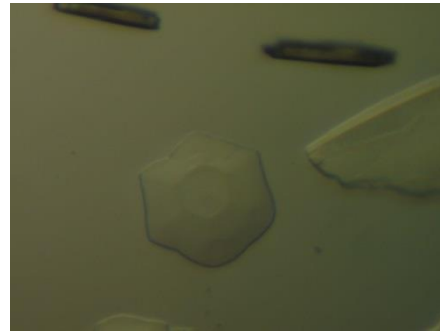


Abbildung 18. RNase P Kristall.

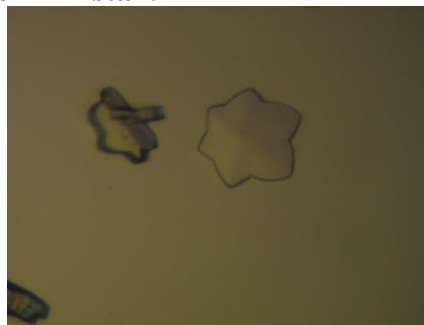


Abbildung 19. RNase P Kristall.

1.6. Zusammenfassung

Die RNase P kommt in allen Bakterien vor und unterscheidet sich strukturell von der im Menschen vorhandenen RNase P – daher ist sie ein optimales Ziel zum Entwickeln neuer Antibiotika. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Synthese eines Screeninghits (Abbildung 20) etabliert und so optimiert werden, dass die Verbindung in großen Mengen für weitere Tests verfügbar gemacht werden konnte.

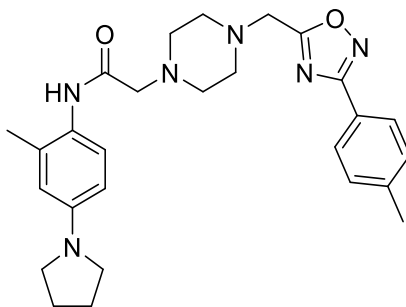


Abbildung 20. Struktur von MT53.

Die entwickelte Syntheseroute erlaubt darüber hinaus die Variation der Substituenten an beiden Aromaten mit hohen Ausbeuten, um mit wenig Aufwand eine SAR aufstellen zu können. Die Löslichkeit des Screeninghits konnte durch die Variation des Substitutionsmusters verbessert werden. So konnte ein Inhibitor synthetisiert werden, der eine deutlich verbesserte Löslichkeit im verwendeten Puffer aufweist. Vor Abschluss der Arbeit lagen für die bereits synthetisierten Verbindungen nur ein Teil der *in vitro* und *in vivo* Messergebnisse vor. Die vorliegenden Ergebnissen zeigen, dass durch Einführen eines weiteren Piperazinrestes (Verbindung **46**) nicht nur die Löslichkeit, sondern auch die *in vivo* Aktivität von **46** gegen *B. subtilis* im Vergleich zu MT53 verbessert werden kann. Auch die *in vitro* Aktivität konnte mit Verbindung **50** ebenfalls um den Faktor 2 gegenüber MT53 verbessert werden. Der Versuch, den Screeninghit in Komplex mit dem P Protein der RNase P zu kristallisieren, war bisher leider nicht erfolgreich, lieferte aber reproduzierbar gut streuende Kristalle, die für weitere Versuche eingesetzt werden können.

1.7. Ausblick

Ziel weiterer Ligandenserien sollte das Aufklären der Struktur-Wirkungs-Beziehungen sein. Zu diesem Zweck kann das Oxadiazol des Grundgerüsts gegen weitere Heteroaromaten ausgetauscht werden und darüber hinaus weitere Substituenten in das Grundgerüst von MT53 eingeführt werden mit dem Ziel, die zentrale Furche des P Proteins besser zu besetzen, die inhibitorische Potenz weiter zu erhöhen und die Löslichkeit zu verbessern. Der Test zur Bestimmung der *in vivo* Aktivität kann um die Bestimmung der minimalen Hemm-Konzentration⁴³ erweitert werden, um genauere Aussagen über die *in vivo* Wirksamkeit treffen zu können. Weiterführende Untersuchungen setzen eine erfolgreiche Röntgenstrukturanalyse voraus, um den genauen Bindungsmodus aufzuklären. Dies wird weitere Informationen für eine gezielte Optimierung von MT53 liefern.

2. Entwicklung von Hemmstoffen der Dengue-Virus-Protease NS2B-NS3

2.1. Einleitung

2.1.1. Das Dengue-Virus

Das Dengue-Virus (DENV) stellt eine wachsende Bedrohung für die Gesundheit von Menschen weltweit dar, da 3,9 Milliarden Menschen in Gebieten leben, in denen das Virus endemisch vorkommt.⁴⁴ Die WHO schätzt, dass jährlich 50 bis 100 Millionen Neuinfektionen in über 100 Ländern auftreten und dass sich die Zahl der Infektionen in den letzten 50 Jahren verdreißigfacht hat.⁴⁵ Jährlich sterben etwa 20.000 Menschen an den Folgen einer Infektion und mindestens eine halbe Million Menschen erleidet schwere Komplikationen nach einer Infektion mit dem DENV und muss hospitalisiert werden.⁴⁶ Das DENV ist in den weniger entwickelten Ländern der Erde, aufgrund der dort vorherrschenden tropischen und sub-tropischen klimatischen Bedingungen, weit verbreitet, führt dort zu hohen Behandlungskosten und verursacht so einen hohen volkswirtschaftlichen Schaden.

Das DENV gehört zur Gattung *Flavivirus* und der Familie *Flaviviridae*, der Name für diese Gattung stammt von dem ersten nachgewiesenen Vertreter, dem Gelbfieber Virus (flavus lateinisch für gelb).⁴⁷ Weitere Vertreter der Gattung *Flavivirus* sind das West-Nil-Virus, das Japanische Enzephalitis-Virus, das FSME-Virus (Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus, das auch in Deutschland regional gehäuft auftritt) und das Zika-Virus;⁴⁷ zur Familie der *Flaviviridae* gehört unter anderem auch das Hepatitis-C-Virus.⁴⁸ Die *Flaviviridae* sind Viren mit einem als positiv strängigen RNA-Einzelstrang vorliegendem ca. 10 kB umfassendem Genom. Diese Eigenschaft verleiht dem Virus zugleich eine um mehr als den Faktor 100 erhöhte Neigung zu Mutationen als Viren mit DNA Genom, was sich in Mutationen widerspiegelt, die zu neuen Formen des Virus mit unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften (Serotypen) führen können.^{49,50} Das Genom kodiert ein Polyprotein, welches durch Wirtsproteasen und durch eine virale Protease in drei Struktur- und sieben Nichtstrukturproteine aufgespalten wird (siehe Abbildung 21).^{48,51} Zu den Strukturproteinen zählen am N-Terminus des Polyproteins das *Envelope* Protein (E), das *Capsid* Protein (C) und der Vorläufer des Membranproteins (prM). Am

C-Terminus finden sich sieben Nichtstrukturproteine, darunter eine virale Protease mit einem Co-Faktor (NS2B-NS3), eine Helikase (NS3) und eine Methyltransferase (NS5).⁵² Das DENV wurde erstmals 1943 in Japan isoliert,⁵³ übertragen hauptsächlich von zwei Mosquito-Arten (Vektoren): *Aedes aegypti* (*A. aegypti*) und *Aedes albopictus* (*A. albopictus*). *A. aegypti* stellt den Hauptvektor von DENV dar und ist ebenfalls Überträger des Zika-Virus, des Gelbfieber-Virus und des Chikungunya-Virus.

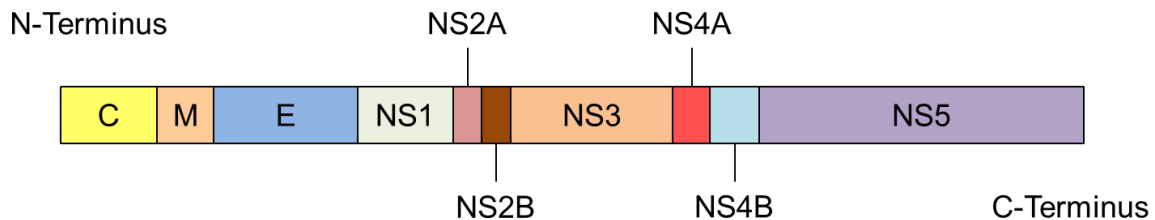


Abbildung 21. Aufbau des DENV Polyproteins. Am N-Terminus sind die Strukturproteine (Capsid Protein (C), Membran Protein (M) und Envelope Protein (E)), am C-Terminus die Nichtstrukturproteine (NS1 bis NS5) lokalisiert.⁵²

2.1.2. Globale Verbreitung

Das zentrale Problem bei der Bekämpfung des DENV ist die globale Ausbreitung und die unterschiedlichen Serotypen des Virus. Wie in Abbildung 22 zu sehen, ist das DENV hauptsächlich auf der Südhalbkugel verbreitet, es treten aber vermehrt auch Fälle auf der Nordhalbkugel auf.⁶

Der Hauptvektor *A. aegypti* wurde während des Sklavenhandels im 15. bis 19. Jahrhundert von Afrika aus verbreitet und erreichte schließlich durch den globalen Handel und den Transport von Truppen und Kriegsmaterial während der beiden Weltkriege weitere Regionen der Erde.⁴⁹ Durch das erhöhte Reiseaufkommen der modernen Welt konnte sich der Vektor schließlich auch in zuvor unberührte Gebiete ausbreiten.⁴⁹ Der Dengue-Vektor *A. aegypti* verbreitet sich dabei hauptsächlich in warmen Bereichen, *A. albopictus* hingegen kann sich auch in gemäßigteren Klimazonen, wie in Europa, ausbreiten und wurde bereits in mehr als 25 europäischen Ländern und Nordamerika nachgewiesen. *A. albopictus* ist sehr anpassungsfähig und in der Lage im Eistadium Temperaturen unterhalb des Gefrierpunktes zu überstehen und so zu überwintern. Diese Eigenschaft versetzt *A. albopictus* in die Lage auch kältere Regionen zu besiedeln.⁵⁴ Durch die zunehmende Verbreitung der Vektoren auf der Welt treten die ehemals nur lokal auftretenden vier Dengue Serotypen mittlerweile über den gesamten Globus verteilt auf (Abbildung 22 und Abbildung 23).⁵¹

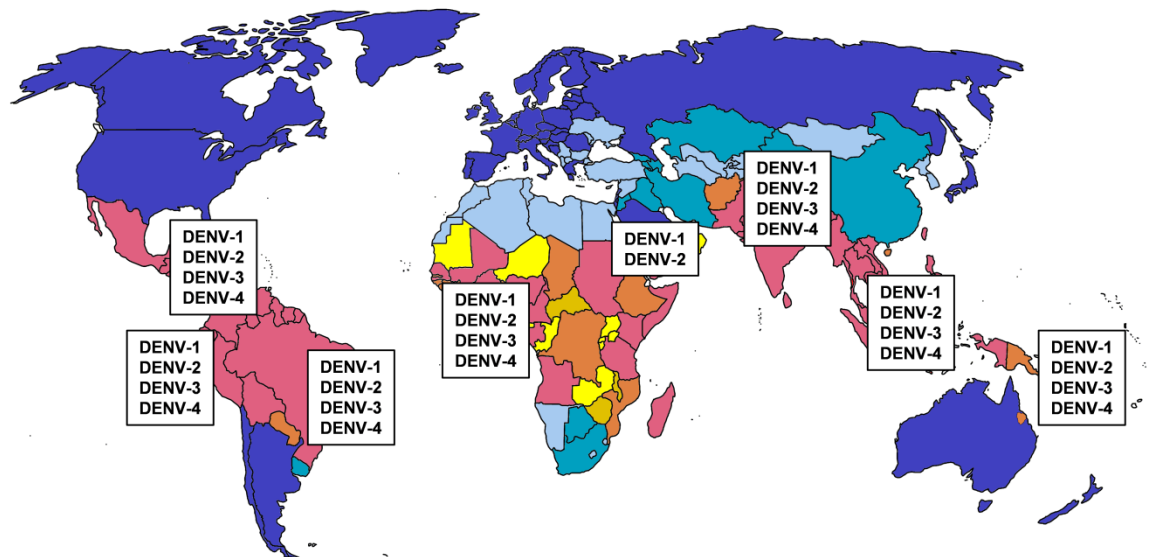


Abbildung 22. Verteilung der unterschiedlichen Dengue Serotypen 2004; je wärmer die Farbe umso mehr Fälle von Dengue treten in dem jeweiligen Land auf.^{51,6}



Abbildung 23. Verteilung der unterschiedlichen Dengue Serotypen 1970; nach *Guzman et al.*⁵¹

Neben den bereits seit längerer Zeit bekannten Serotypen des DENV (DENV-1 – DENV-4),⁵³ ist im Jahr 2007 erstmals nach über 50 Jahren ein weiterer Serotyp (DENV-5) entdeckt worden.⁵⁵ Dieser Serotyp konnte aber erst bei einem Ausbruch des Dengue-Fiebers nachgewiesen werden. Die strukturellen Eigenschaften des DENV-5-Serotyps weichen zu stark von den bisher bekannten und für die Impfstoffentwicklung verwendeten, strukturellen Eigenschaften der anderen DENV-Serotypen ab, was bedeutet, dass die bisher entwickelten Impfstoffe unwirksam gegen diesen Serotyp sind. Eine Infektion mit DENV-5 kann also trotz bestehendem Impfschutz durch einen tetravalenten Impfstoff zu schwerwiegenden Komplikationen im Krankheitsverlauf führen. Zugleich

zeigt die Entdeckung dieses Serotyps auf, dass möglicherweise weitere bisher nicht identifizierte Serotypen in Primaten, dem ursprünglichen Dengue-Wirt, zirkulieren.⁵⁰

2.1.3. Symptome

Die Symptome einer Infektion mit dem DENV sind vielfältig und abhängig vom Alter des Patienten und seinem immunologischen Status.⁵¹ Die WHO hat daher 2009 zur Vereinfachung eine Klassifizierung aufgrund des Krankheitsverlaufs vorgenommen: die unkomplizierte Dengue-Erkrankung (mit oder ohne Warnzeichen) und die schwerwiegende Verlaufsform.⁴⁹ Während der erstmaligen Infektion mit Dengue sind die Patienten in der Regel asymptomatisch oder die Symptome sind schwach ausgeprägt und umfassen grippeähnliche Symptome wie Fieber, Schüttelfrost und Kopfschmerzen. Nach einer Primärinfektion besteht zwar eine Immunität gegen den entsprechenden Serotyp (DENV-1 bis DENV-4), diese schützt aber nicht vor einer Infektion mit einem anderen Dengue-Serotyp. Eine Sekundärinfektion mit einem anderen Dengue-Serotyp erhöht in den meisten Fällen sogar das Risiko von schwerwiegenden Komplikationen (mindestens 10-fach häufiger).⁴⁹ Interessanterweise führen bestimmte Infektionssequenzen dabei zu besonders schweren Verlaufsformen: eine Infektion mit DENV-1 gefolgt von einer Infektion mit DENV-2 oder DENV-3 oder wenn auf eine Infektion mit DENV-3 eine Infektion mit DENV-2 folgt.⁵¹ Eine mögliche Ursache für die Komplikationen während einer wiederholten Infektion durch einen anderen Serotyp ist die Bildung infektionsverstärkender Antikörper während der Erstinfektion (*antibody-dependent enhancement* – ADE).⁴⁹ Dieser Effekt führt zu einer bis 100-fach erhöhten Viruslast in Versuchstieren, wenn Tiere zum zweiten Mal mit einem anderen Dengue-Serotypen infiziert wurden⁴⁸ und kann zu Hämorrhagien (Dengue-Hämorrhagisches Fieber – DHF) und einer erhöhten vaskulären Permeabilität führen, dem sogenannten Dengue-Schock-Syndrom (DSS), welches besonders häufig bei Kindern auftritt.⁵¹ Bei Erwachsenen tritt das nicht-schwere Dengue-Fieber besonders häufig nach einer Erstinfektion mit den Serotypen DENV-1 und -3 auf, solche mit DENV-2 verlaufen häufig symptomlos.⁵¹ Bei der Schwere der Komplikationen spielt auch der Zeitabstand zwischen der ersten und der zweiten Infektion eine Rolle, denn je größer das Intervall ist, desto stärker ausgeprägt sind in der Regel die Symptome.

2.1.4. Bekämpfung

Zur Bekämpfung des Dengue-Fiebers wurde von der WHO eine globale Strategie ausgerufen, um die Zahl der Dengue-Todesopfer bis zum Jahr 2020 um 50% zu reduzieren.⁴⁵ Diese besteht in einer Vektorkontrolle, der besseren Überwachung von Ausbrüchen, einer verbesserten Schulung der Bevölkerung und des medizinischen Personals und der Entwicklung von Impfstoffen und Medikamenten gegen das DENV. Da der Hauptvektor die Mücke *A. aegyti* ist, besteht die Kontrolle in einem Verhindern der Fortpflanzung durch das Vernichten von Lebensräumen (z.B. Regenwasserauffangbehälter), dem Einsatz von chemischen Substanzen, die das Wachstum der Larven behindern, und dem Einsatz von biologischen Feinden der Larven, wie dem Mosquito Fisch *Gambusia affinis*.⁴⁹ (Für ein tieferes Verständnis zur Vektorkontrolle wird an *Guzman et al.* verwiesen.⁵¹)

2.1.5. Behandlung

Da für die Behandlung von Dengue-Fieber zurzeit keine spezifische Therapie zur Verfügung steht, erfolgt diese symptomatisch durch Gabe von Schmerzmitteln wie Paracetamol und durch eine ausreichende Flüssigkeitszufuhr, um eine Dehydrierung der Patienten zu verhindern. Zusätzlich kann die Gabe von Flüssigkeit intravenös indiziert sein, um eine Hypotension zu vermeiden.^{51,45}

2.1.6. Impfstoff

Die Entwicklung eines Impfstoffes stellt, wie in Kapitel 2.1.4. erwähnt, einen wichtigen Teil in der Strategie zur Bekämpfung des Dengue-Fiebers dar, daher werden viele Anstrengungen in die Impfstoff-Entwicklung gesteckt. Die Entwicklung eines Impfstoffs gestaltet sich jedoch als schwierig, da ein zuverlässiger Schutz gegen alle auftretenden Dengue-Serotypen gewährleistet sein muss. Wenn der Impfschutz nicht alle Serotypen abdeckt, besteht, wie in Kapitel 2.1.3. beschrieben, die Gefahr von schwerwiegenden Komplikationen bei einer Infektion mit einem anderen Serotyp, gegen den kein Impfschutz besteht. Auf Grund dieser Schwierigkeiten ist momentan nur ein DENV Impfstoff zugelassen. Die Zulassung erfolgte im Dezember 2015 weltweit erstmals in Mexiko. Es handelt sich hierbei um einen rekombinanten, lebenden, abgeschwächten tetravalenten Impfstoff (gegen DENV-1 bis DENV-4), basierend auf einem System,

welches schon zur Entwicklung eines Gelb-Fieber-Impfstoffs genutzt wurde.⁵⁶ Als Antigene werden die pre-Membran (prM) und Envelope (E) Proteine der Dengue-Serotypen 1 bis 4 verwendet, als Rückgrat dient der Gelb-Fieber-Virus-Strang YFV-17D (für ein tieferes Verständnis der Impfstoffentwicklung wird auf Referenz *Guy et al.*⁵⁶ verwiesen). Der Impfstoff liefert einen zuverlässigen Schutz gegen die Serotypen DENV-1, DENV-3 und DENV-4. In einer klinischen Studie der Phase IIB⁴⁶ (4002 thailändische Kinder im Alter von 4 bis 11 Jahren) erwies sich der Impfstoff jedoch als nicht ausreichend wirksam gegen den DENV-2, obwohl ausreichend Antikörper gegen DENV-2 im Körper der Probanden nachgewiesen werden konnten.⁵⁶ Daher lag die Wirksamkeit des Impfstoffes gegen alle Serotypen in dieser Phase IIB Studie lediglich bei 30%.^{50,46} In einer größeren Phase III Studie (mehr als 35.000 Kinder im Alter von 2 bis 16 Jahren im asiatischen und lateinamerikanischen Raum), lag die Wirksamkeit hingegen bei 60,3%.^{50,46,57} Die Autoren der Phase IIB⁴⁶ Studie diskutieren, ob die fehlende Wirksamkeit gegen DENV-2 durch einen Antigen-*Mismatch* zwischen dem DENV-2 Genotyp, der in der Studie die Infektion hervorgerufen hat, und dem für den Impfstoff verwendeten DENV-2 Subtyp zu erklären ist.⁴⁶ Bei einem *Mismatch* erkennt der Antikörper nicht die entsprechende Zielstruktur und bleibt daher ohne Wirkung. Dieser *Mismatch* kann auf die unterschiedlichen in Südostasien zirkulierenden DENV-2 Genotypen zurückgeführt werden, die unterschiedliche Mutationen in der Domäne 2 des E Proteins aufweisen, der Genotyp von DENV-2, der für den Impfstoff verwendet wurde, kommt hingegen in Asien/Amerika vor.⁴⁶ Trotz der offensichtlich fehlenden Wirksamkeit gegen einzelne DENV-2 Subtypen ist die erfolgreiche Entwicklung und Zulassung ein Meilenstein in der Bereitstellung von Impfstoffen gegen das DENV, zeigt aber zugleich die Probleme, die durch die Vielzahl an verschiedenen Subtypen innerhalb der Serotypen verursacht werden. Auch liefert keiner der in der Entwicklung befindlichen Impfstoffe einen Schutz gegen den jüngst aufgetretenen Serotyp DENV-5.

2.1.7. Serinproteasen

Wie in Kapitel 2.1.1. dargestellt, besitzt das DENV eine virale Protease (NS3), die zu der Familie der Serinproteasen gehört. Die Struktur einer Serinprotease wurde erstmals 1967 durch David Blow an dem Verdauungsenzym Chymotrypsin aufgeklärt.⁵⁸ Der katalytische Mechanismus ist in Abbildung 24 dargestellt.

Als gemeinsames Strukturmerkmal besitzen die Serinproteasen eine katalytische Triade, die aus einem Serin, einem Histidin und einem Aspartat besteht. In manchen Fällen kann das Aspartat durch ein Glutamat und das Histidin durch ein Lysin ausgetauscht sein.⁵⁸ Das Proton des Serins wird vom Imidazol des Histidins aufgenommen (Abbildung 24a) und der negativ geladene Sauerstoff des Serins greift dann den Kohlenstoff der Amid-Carbonylgruppe des Substrats nukleophil an.⁵⁸ Das Aspartat stabilisiert dabei die positive Ladung des Imidazolrings, die negative Ladung des Sauerstoffs wird durch ein sogenanntes O⁻-Loch stabilisiert (Abbildung 24b).⁵⁸ Aus dem tetraedrischen Übergangszustand wird dann das C-terminale Spaltprodukt freigesetzt. Der N-terminale Teil des Peptids bleibt kovalent mit dem Enzym über das Serin verbunden (Acylenzym-Zwischenstufe) (Abbildung 24c).⁵⁸ Nun greift ein Wassermolekül dieses Zwischenprodukt an, die negative Ladung des Sauerstoffs wird wieder durch das O⁻-Loch stabilisiert (Abbildung 24d).⁵⁸ Durch eine Umlagerung zerfällt der tetraedrische Übergangszustand (Abbildung 24d), die Serinprotease gelangt wieder in ihren Ausgangszustand und steht für weitere Katalysereaktionen bereit.

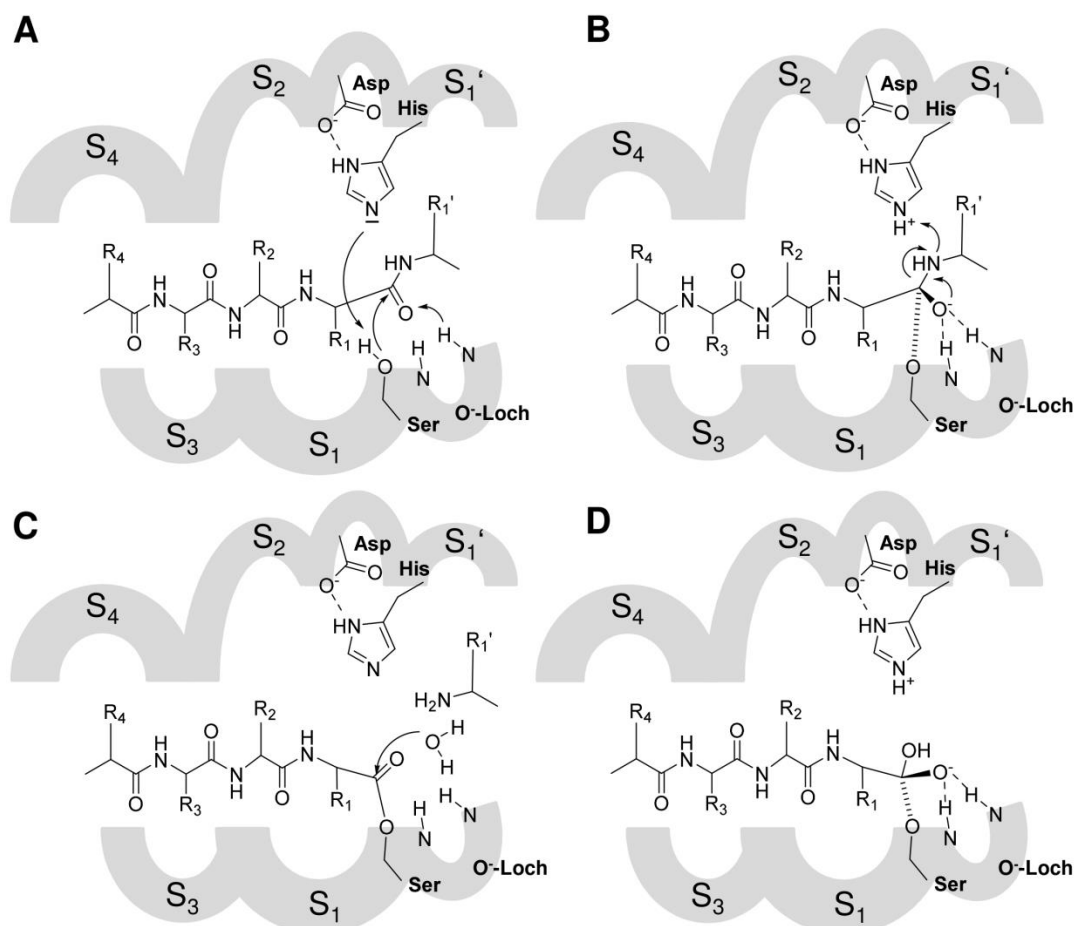


Abbildung 24. Katalytischer Mechanismus der Serinprotease.⁵⁸

2.1.8. Dengue-Virus-Protease

2.1.8.1. Generelle Eigenschaften der Dengue-Virus-Protease

Der Aufbau der viralen NS3 Protease ist innerhalb der Flaviviren sehr ähnlich, daher wird im Folgenden nur der Aufbau der DENV Protease näher beschrieben. Die DENV Protease hat die Faltung einer chymotrypsin-artigen Serinprotease und befindet sich im NS3 Protein. Innerhalb der unterschiedlichen Dengue-Serotypen DENV-1 bis DENV-4 liegen die Regionen zur Substraterkennung und das aktive Zentrum hoch konserviert vor. Neben der Protease Domäne besitzt das NS3 Protein eine RNA Helikase und RTPase/NTPase Funktionalität. Das NS3 Protein ist Teil des 375 kDa großen Prekursor-Polyproteins, welches aus drei Struktur- und sieben Nichtstrukturproteinen besteht (Abbildung 21). Dieses Polyprotein wird durch Wirts-Proteasen und der vom Virus kodierten NS3 Protease gespalten.⁴⁹ NS3 spaltet die Peptidbindungen zwischen NS2A-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A und NS4B-NS5.⁴⁹ Die Aktivität von NS3 hängt stark von einem Co-Faktor (NS2B) ab, der 14 kDa groß ist und zusammen mit NS3 ein Heterodimer bildet (NS2B-NS3).⁴⁹ Da das Heterodimer nicht nur an der Prozessierung des Polyproteins, sondern auch an weiteren zellulären Prozessen beteiligt ist (z.B. Apoptose⁴⁹), würde ein möglicher Inhibitor dieser Protease die korrekte Zellfunktion an mehreren Punkten stören und damit die Effektivität eines Inhibitors erhöhen.

2.1.8.2. Strukturelle Eigenschaften der Dengue-Virus-Protease

Wie in Kapitel 2.1.8.1. beschrieben, besteht die DENV Protease aus dem NS3 Protein und dem Co-Faktor NS2B. Das katalytische Zentrum wird von His51, Asp75 und Ser135 gebildet.⁴⁹ Der Co-Faktor NS2B weist eine erhebliche strukturelle Flexibilität in den publizierten Kristallstrukturen auf, abhängig davon, ob in der Kristallstruktur ein Inhibitor gebunden ist oder nicht (siehe Abbildung 25a und b). In Abbildung 25b ist zu erkennen, dass der Co-Faktor NS2B sich um NS3 legt, indem er einen β -Strang zum N-terminalen β -Barrel und zwei β -Stränge als β -Haarnadelmotiv zum C-terminalen β -Barrel beiträgt.^{49,7} Diese als „geschlossen“ bezeichnete Konformation stellt die katalytisch aktive Form des NS2B-NS3 Komplexes dar, in der NS2B zur Bildung der S2 und S3 Taschen des aktiven Zentrums der Protease beiträgt. In Abbildung 25a ist zu erkennen, dass der Co-Faktor NS2B ohne gebundenen Inhibitor eine andere Konformation einnimmt und nicht zur Bildung des aktiven Zentrums beiträgt, da NS2B vom aktiven Zentrum weg zeigt.

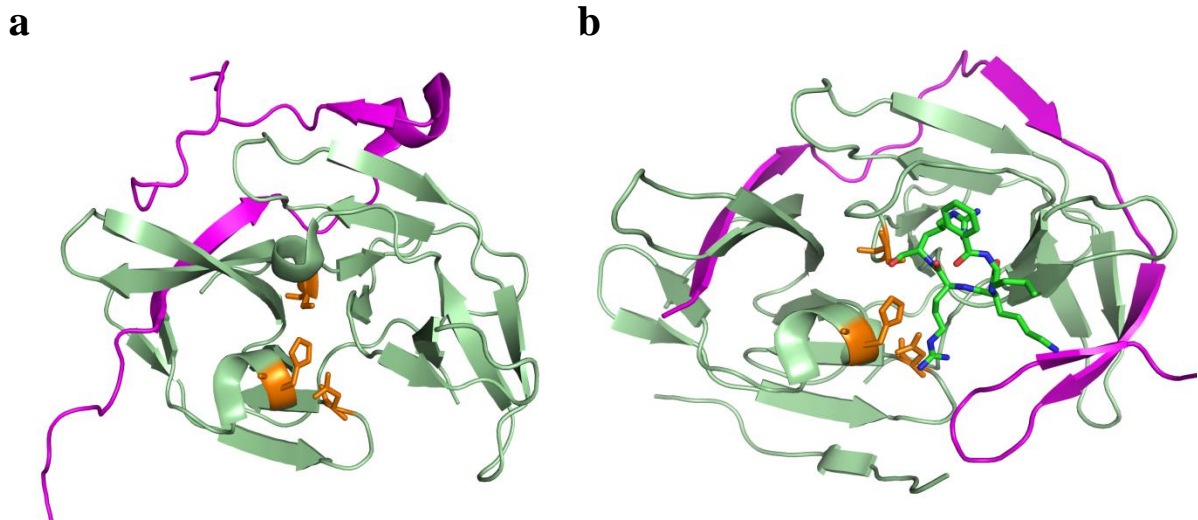


Abbildung 25. (a) Offene Konformation (PDB-Code: 2FOM⁵⁹). (b) Geschlossene Konformation mit gebundenem Inhibitor (PDB-Code:3U1I⁷). Die katalytische Triade (His51, Asp75 und Ser135) ist orange dargestellt, der Co-Faktor NS2B cyan und NS3 grün.⁴⁹

Eine weitere Eigenschaft der DENV-Protease ist eine relativ flach ausgeprägte und Solvent-exponierte Bindetasche der Protease (siehe Abbildung 26a), wie sie auch anderen Mitgliedern der *Flaviviridae*, z.B. der West-Nil-Virus Protease oder der Hepatitis C-Protease, gemein ist.

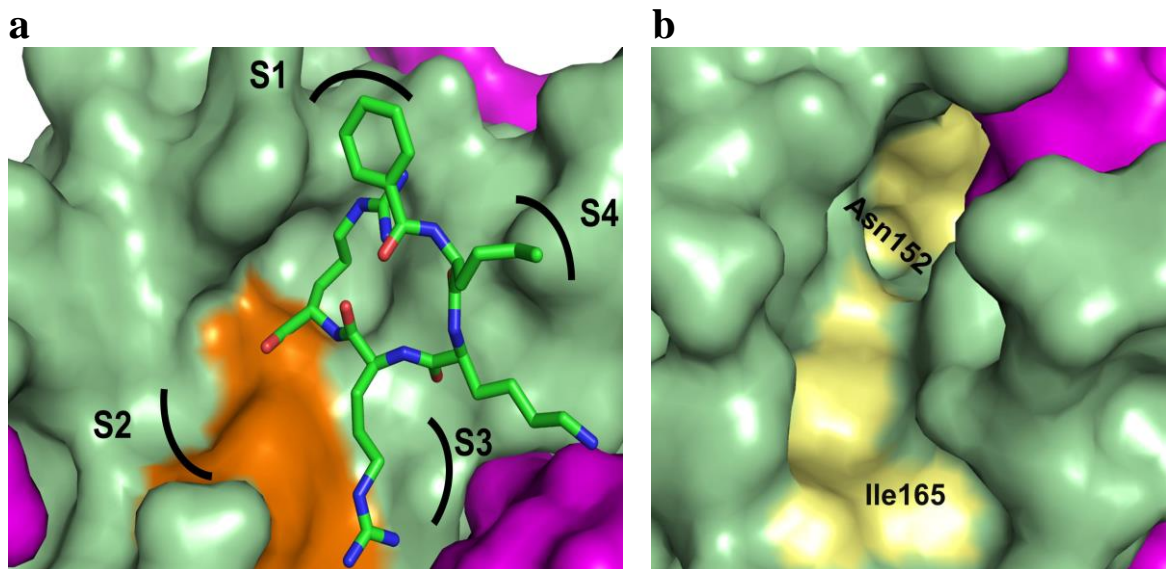


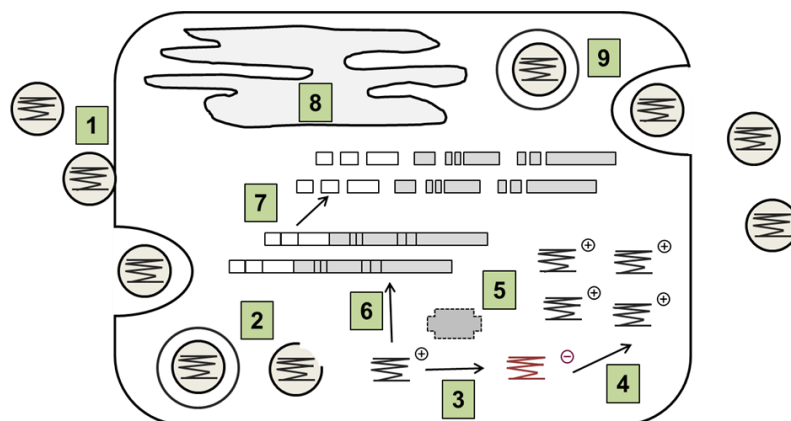
Abbildung 26. (a) Oberflächenansicht der Bindetasche der DENV-3-Protease mit gebundenem Inhibitor Bz-nKRR-H (PDB-Code:3U1I⁷). Die katalytische Triade (His51, Asp75 und Ser135) ist orange dargestellt, der Co-Faktor NS2B cyan und NS3 grün. Die Bindetaschen sind mit S1 bis S4 benannt. (b) Allosterische Bindetasche (gelb) in der Struktur mit dem PDB-Code 3U1I.⁷ Der Co-Faktor NS2B ist in cyan und NS3 grün dargestellt. Der Abstand zwischen Asn152 und Ser135 beträgt ca. 8 Å.

In der von *Noble et al.* beschriebenen Struktur (PDB-Code: 3U1I⁷) mit einem kovalent gebundenen, peptidartigen Inhibitor befindet sich auf der Rückseite des aktiven Zentrums eine allosterische Bindetasche, die in der geschlossenen Konformation sowohl von Resten von NS3 als auch von NS2B gebildet wird (Abbildung 26b).⁷ Diese Bindetasche stellt zugleich die größte Vertiefung dar und könnte von niedermolekularen Inhibitoren adressiert werden, um die Proteaseaktivität allosterisch zu regulieren.⁷

2.1.9. Stand der Forschung

2.1.9.1. Antivirale Hemmstoffe

Um eine Vermehrung des DENV zu unterbinden, stehen eine Reihe von Targets zur Verfügung, die sich auch schon in der Therapie anderer Virusinfektionen als wertvoll erwiesen haben. In Abbildung 27 sind die Schlüsselschritte der Flavivirus-Vermehrung abgebildet.⁴⁸



Nr.	Ereignis	Target	Nr.	Ereignis	Target
1	Adsorption	DENV Envelope Glycoprotein	6	Translation des viralen Polyproteins	Wirts-Targets
2	Endozytose, Membranfusion und Uncoating	Wirts-Targets	7	Schneiden und posttranslationale Modifikation des viralen Polyproteins	Virale NS3 Protease; Wirts-Proteasen; Alpha-Glucosidase
3	Transkription zum negativ strängigen RNA Templat	Virale NS5 Polymerase; NS3 Helikase; NS4B	8	Zusammenbau des Virus im trans-Golgi Netzwerk	Virales Capsid-Protein C; Wirts-Targets
4	Transkription zum positiven RNA-Strang	Virale NS5 Polymerase und Methyltransferase; NS3 Helikase, NS4B	9	Freisetzen des Virus	Wirts-Targets
5	Replikationskomplex	Unterschiedliche Ziele			

Abbildung 27. Schlüsselschritte der DENV Vermehrung im Körper (modifiziert nach *Behnam et al.*⁴⁸).

Potentiell ließe sich eine Virusvermehrung durch Beeinflussung jedes dieser Schritte unterbinden. Da sich die vorliegende Arbeit mit der Synthese von Hemmstoffen der viralen Dengue-Protease beschäftigt, soll im Folgenden der bisherige Forschungsstand auf diesem Gebiet zusammengefasst werden, für einen Überblick über die Forschung an den anderen Zielstrukturen wird an den Übersichtsartikel von *Behnam et al.*⁴⁸ verwiesen.

2.1.9.2. Inhibitoren der NS2B-NS3 Protease

Die Inhibitoren der NS2B-NS3 Protease können in zwei Klassen eingeteilt werden: peptidische Inhibitoren und nicht-peptidische Inhibitoren.

2.1.9.2.1. Peptidische Inhibitoren

Der Ansatz, der mit dem Design von peptidischen Inhibitoren verfolgt wird, ist ein Einführen von funktionellen Gruppen in vom Substrat abgeleitete Strukturen, die eine Peptidspaltung verhindern und damit die Protease inhibieren. Als Gruppen können z.B. α -Keto-Amidreste eingeführt oder eine C-terminale Amidierung durchgeführt werden.⁴⁹ Auf diese Weise wurden die ersten Inhibitoren der Dengue-Protease entwickelt, die moderate Affinitäten im mittleren mikromolaren-Bereich gegen DENV-2 aufweisen (**53**, **54** und **55**, Tabelle 6).^{49,52,60}

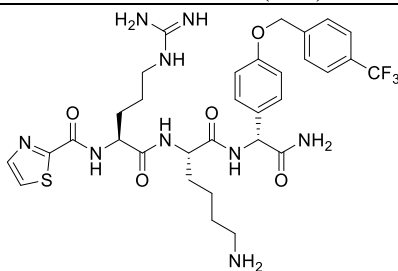
Nr.	Struktur des Peptids	K_i gegen die DENV-2 Protease [μ M]
53	Ac-FAAGR- α -keto-SL-CONH ₂	47 ⁶⁰
54	Ac-EVKKQR-CONH ₂	66,7 ⁶¹
55	Ac-FAAGRK-CONH ₂	25,9 ⁶¹
56	Bz-nL-KRR-B(OH) ₂	0,043 ⁶²
57		0,012 ⁶³

Tabelle 6. Ausgewählte peptidische Inhibitoren der DENV-2 Protease.

Durch Verwendung von Boronsäuren konnten potente Inhibitoren mit einem K_i -Wert von 43 nM (**56**) erhalten werden, die kovalent an das Serin im aktiven Zentrum des Enzyms binden.⁶² Ein Erfolg in der Entwicklung von nicht-kovalent bindenden reversiblen Inhibitoren konnte jüngst mit der Synthese von kurzen Peptiden erzielt werden, deren potentester Vertreter die DENV-2 NS2B-NS3 Protease mit einem K_i -Wert von 12 nM

inhibiert (**57**).⁶³ Diese Peptide stellen zugleich die bislang potentesten Inhibitoren der DENV Protease dar (Tabelle 6).

2.1.9.2.2. Nicht-peptidische Inhibitoren

Trotz intensiver Forschung auf dem Gebiet der nicht-peptidischen Inhibitoren der Dengue-Protease konnten bisher noch keine hochpotenten Inhibitoren entwickelt werden. Die publizierten Inhibitoren sind strukturell sehr heterogen und weisen keine einheitliche Grundstruktur auf (siehe Tabelle 7).⁴⁹

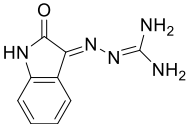
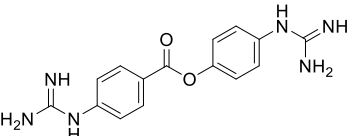
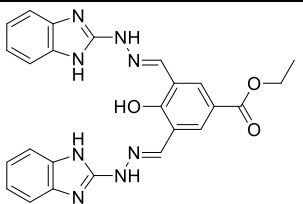
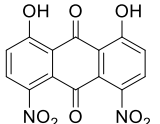
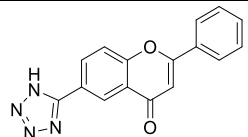
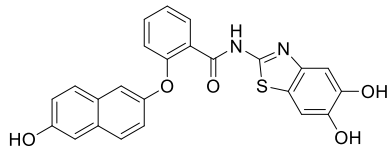
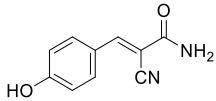
Nr.	Struktur des Inhibitors	K _i gegen die DENV-2 Protease [μM]
58		23 ± 2^{64}
59		$2,0^{65}$
60		$IC_{50} = 13,1 \pm 1^{66}$
61		432 ± 46^{67}
62		69 ± 9^{68}
63		$IC_{50} = 4,2 \pm 0,4^{69}$
64		$98,1^{70}$

Tabelle 7. Ausgewählte nicht-peptidische Inhibitoren der DENV-2 Protease.

Häufig finden basische Reste, wie Guanidin oder Amidin, Verwendung (**58** – **60**), die sich am Substrat der Protease orientieren.⁴⁹ Es sind aber auch Inhibitoren publiziert worden, die keinen basischen Rest aufweisen (**61** – **64**).^{49,67,68,66,69,70} Das Ableiten eines

bevorzugten Bindungsmodus von Inhibitoren innerhalb der flachen Bindetasche und das Identifizieren einer potentiellen Leitstruktur ist daher so gut wie nicht möglich. Die potentesten bisher publizierten nicht-peptidischen Inhibitoren hemmen die Dengue-Protease mit einem K_i -Wert im einstellig mikromolaren Bereich. Dass eine Inhibition von Proteasen der Familie der *Flaviviridae* trotz ihrer wenig ausgeprägten, flachen und Solvent-exponierten Bindetaschen möglich ist, zeigt die Entwicklung von Inhibitoren der NS3 Protease des Hepatitis-C Virus. Hier konnte mit Boceprevir (Abbildung 28) ein oral verfügbarer, reversibel kovalent-bindender Inhibitor mit einem K_i -Wert von 14 nM entwickelt werden.⁷¹

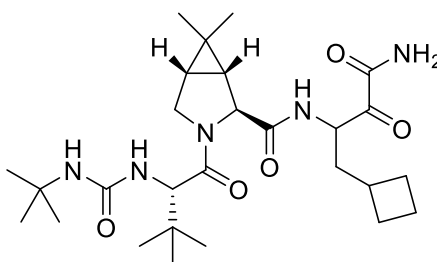


Abbildung 28. Struktur von Boceprevir.

2.1.10. Strukturbasiertes Wirkstoffdesign

Der erste Schritt jeder Wirkstoffentwicklung ist die Identifizierung der Prozesse, die einer Erkrankung zugrunde liegen. Ist ein potentielles Target identifiziert, ist im Fall des strukturbasierten Wirkstoffdesigns die genaue Kenntnis der dreidimensionalen Zielstruktur eines möglichen Liganden die Grundlage für die weitere Entwicklung.^{72,73} Dieses Wissen kann entweder durch eine röntgenkristallographische oder NMR-spektroskopische Aufklärung der Zielstruktur erhalten werden.⁷² Alternativ kann auf Homologiemodelle zurückgegriffen werden, wenn die Struktur zu Beginn des Projektes noch nicht aufgeklärt wurde.⁷² Im Idealfall liegt bereits zu Beginn des Projektes eine 3D-Struktur des Zielproteins in Komplex mit einem Liganden vor, aus der sich mögliche Wechselwirkungen zwischen Ligand und Target ableiten lassen. Als Zielstrukturen für diesen Ansatz lassen sich neben Proteinen auch Ribozyme, DNA oder RNA untersuchen.⁷² Ausgehend von den Strukturinformationen können unterschiedliche Ansätze zu Beginn des strukturbasierten Wirkstoffdesigns verfolgt werden: 1) virtuelles Screening von großen Strukturbibliotheken mittels Computer-gestützter Methoden in der Bindetasche der Zielstruktur, 2) *de novo* Design potentieller Liganden und 3) das Optimieren eines bereits bekannten Liganden mit dem Ziel, seine physikochemischen

Eigenschaften und seine Wirksamkeit zu optimieren.⁷² Bei dem ersten Ansatz kann man sich bei der Generierung von Ausgangsstrukturen für eine weitere Optimierung großer Strukturbibliotheken, wie z.B. der ZINC Datenbank, bedienen.⁷⁴ In dieser sind über 35 Millionen⁷⁵ kommerziell erhältliche Substanzen gespeichert. Diese Substanzen werden mittels eines Dockingprogramms *in silico* in die Bindetasche der Zielstruktur eingepasst („gedockt“) und danach bezüglich ihrer Interaktionen mit der Zielstruktur bewertet.⁷² Die geeignetsten Liganden können dann, im Fall der ZINC Datenbank, gekauft und mit biochemischen Methoden auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, die Zielstruktur zu beeinflussen. Ein Vorteil dieses Ansatzes ist, dass eine Vielzahl an Substanzen gekauft und getestet werden kann, von Nachteil ist, dass dieser Ansatz in der Regel nicht zu völlig neuen Strukturen führt. Der zweite Ansatz basiert auf einer genauen Analyse der Bindetasche des Liganden. Die möglichen Interaktionspartner (Aminosäuren, RNA- oder DNA-Moleküle) werden hinsichtlich ihrer Interaktionseigenschaften untersucht und es werden *de novo* Moleküle entworfen, die in der Lage sind, mit diesen Strukturen Wechselwirkungen einzugehen.⁷² Die so entwickelten Moleküle können nochmals gedockt werden, um die Designhypothese zu überprüfen und müssen bei Bestätigung der Hypothese im Anschluss synthetisiert werden. Ein Vorteil dieses *de novo* Ansatzes ist, dass man völlig neue Strukturen generieren kann, ein Nachteil ist, dass zunächst Ressourcen in die Synthese der Liganden investiert werden müssen, die möglicherweise keinerlei Wirkung auf die Zielstruktur besitzen.⁷⁶ Der dritte Ansatz beschäftigt sich mit der Optimierung eines bestehenden Liganden mit bekanntem Bindungsmodus. Auch hier kann die Designhypothese der *in silico* entwickelten Derivate dieses Liganden mittels Docking und der anschließenden Bewertung durch Scoringfunktionen überprüft werden. Bei diesem Ansatz werden also bereits gewonnene Erkenntnisse über den Bindungsmodus der Ausgangsstruktur durch computergestützte Methoden ergänzt, um so zu wirksameren Vertretern des initialen Treffers zu gelangen. Allen drei Ansätzen folgt die biologische Testung der erhaltenen Substanzen gegen die Zielstruktur und eine strukturelle Aufklärung des eingenommenen Bindungsmodus.⁷² Auf Basis dieser Ergebnisse erfolgt dann die weitere Optimierung. Der Prozess aus Strukturoptimierung, Synthese, biologischer Testung und Strukturermittlung erfolgt solange, bis ausreichend affine Liganden erhalten wurden. Im Anschluss findet deren Testung in komplexeren Systemen statt, bis schließlich eine neue Leitstruktur erhalten werden kann. So einfach der Prozess des strukturbasierten Designs scheinen mag, weist er doch einige Einschränkungen auf, die sich negativ auf das Ergebnis, das Auffinden neuer Leitstrukturen, auswirken können.

Die Bewertungsfunktionen von Docking-Programmen berücksichtigen häufig nur polare und hydrophobe Ligand-Zielstruktur-Interaktionen. Die Stärke dieser Interaktionen und deren letztendlicher Beitrag zur Wirkung des Liganden hängt jedoch von weiteren Faktoren ab. So wird z.B. das Docking in der Kristallstruktur durchgeführt. Die Kristallstruktur stellt aber lediglich eine Momentaufnahme dar und dynamische Eigenschaften der Zielstruktur, z.B. des Proteins, werden häufig nicht oder nur unzulässig berücksichtigt. Auch werden häufig Solvations- und Desolvationseffekte des Proteins und des Liganden vernachlässigt, da diese nur schwer zu berechnen sind. Schließlich stellt der Prozess des strukturbasierten Designs, trotz seiner Nachteile, einen guten Ausgangspunkt zum Auffinden von neuen Strukturen für bekannte Zielstrukturen dar.

2.1.11. Ausgangssituation dieser Arbeit und Zielsetzung

Eine Inhibition von viralen Proteasen hat sich schon bei der Behandlung von HIV- und HCV-Infektionen als wertvoller Therapieansatz erwiesen.^{77,71} Die Inhibition der viralen NS2B-NS3 Protease des DENV ist daher ebenfalls ein vielversprechender Therapieansatz zur Behandlung einer DENV Infektion. Da die Bindetasche der Dengue-Protease Solvent-exponiert und sehr flach ist, ohne ausgeprägte Spezifitätstaschen zu besitzen, ist ein gezieltes Adressieren dieser Taschen schwieriger. Dass ein Adressieren dieser Bindetaschen durch kompetitive reversible Inhibitoren allerdings möglich ist, die auch noch bei nanomolaren Konzentrationen inhibieren, wurde durch die Arbeiten von *Behnam et al.*⁶³ mit der Entwicklung von kurzen Peptiden als Inhibitoren der Dengue- und West-Nil-Protease kürzlich gezeigt (Verbindung **57**, Tabelle 6). Es ist jedoch wünschenswert, nicht-peptidische Inhibitoren zu identifizieren, da mit der peptidischen Struktur von Inhibitoren häufig ein ungünstiges pharmakokinetisches Profil verknüpft ist.⁷¹ Daher beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit dem Design und der Synthese von nicht-peptidischen Inhibitoren. Da sich aus den bisher in diesem Feld publizierten Arbeiten⁴⁹ keine vom Enzym bevorzugte Leitstruktur für eine weitere Optimierung nicht-peptidischer Inhibitoren ableiten lässt, wird in dieser Arbeit ein *de novo* Ansatz verfolgt, um neuartige, nicht-peptidische Inhibitoren der DENV Protease zu erhalten.

2.2. Entwicklung neuer Inhibitoren

2.2.1. *De novo* Design von neuartigen Inhibitoren der Dengue NS2B-NS3 Protease

2.2.1.1. Auswahl und Vorbereitung der für das Docking verwendeten Proteasestruktur

Als Ausgangspunkt für das *de novo* Design von Inhibitoren der DENV Protease NS2B-NS3 wurde die ligandgebundene Struktur von *Noble et al.*⁷ (PDB-Code: 3U1I, DENV-3) ausgewählt, die einen kovalent gebundenen Inhibitor (Bz-nL-KRR-H) im aktiven Zentrum der Protease aufweist und zugleich die einzige Kristallstruktur einer Dengue-Protease mit einem niedermolekularen Inhibitor darstellt. Da das Ziel dieser Arbeit das Design und die Synthese von niedermolekularen Inhibitoren der Dengue-Protease ist, wurde diese Struktur ausgewählt, da die Aminosäureseitenketten in der ebenfalls von *Noble et al.*⁷ publizierten Struktur der NS2B-NS3 Protease von DENV-3 (DV3pro) mit dem Peptid-Inhibitor Aprotinin (PDB-Code: 3U1J) eine leicht abweichende Orientierung im Vergleich zur Komplexstruktur von DV3pro mit einem niedermolekularen Inhibitor (PDB-Code; 3U1I) aufweisen. Mit 2,3 Å ist die Auflösung der verwendeten Protease-Struktur ausreichend für ein Docking⁷² und die Protease liegt in der aktiven „geschlossenen“ Konformation vor, in welcher der Co-Faktor NS2B Teile zu der S2 und S3 Bindetasche des Enzyms beiträgt und somit die Bindetasche vollständig ausgebildet ist (siehe Kapitel 2.1.8.2.). Das in der Komplexstruktur gebundene Tetrapeptid Bz-nL-KRR-H leitet sich vom optimalen Substrat der Protease ab, der kokristallisierte Aldehyd Bz-nL-KRR-H führt so zu einem Fixieren der katalytisch kompetenten Struktur des aktiven Zentrums im Kristall.⁷ Durch die Durchführung des Dockings an dieser Struktur können *in silico* Interaktionen von Inhibitoren mit der katalytisch aktiven Konformation der Protease gefunden werden. Diese ließen sich nicht finden, wenn für das Docking eine Struktur verwendet werden würde, die nicht der katalytisch aktiven Konformation entspricht, wie dies z.B. für die Struktur mit dem PDB-Code 2FOM der Fall ist (siehe Kapitel 2.1.8.2.). In der für das Docking ausgewählten Struktur befinden sich zwei Moleküle der Protease DV3pro pro asymmetrischer Einheit. Für eines dieser Protease-Moleküle ist der Inhibitor vollständig in der Dichte zu erkennen und kovalent (über den

Aldehyd-Kohlenstoff) mit Ser135 des Enzyms verbunden, bei dem anderen Protease-Molekül ist der Inhibitor nur teilweise zu erkennen und nicht kovalent mit dem Enzym verbunden. Die Autoren⁷ vermuten, dass es sich bei dem nicht-kovalent gebundenen Inhibitor um ein Abbauprodukt handelt oder dass der Inhibitor nur partiell geordnet und somit in der Dichtedichte nicht vollständig definiert ist.⁷ Die Geometrie der beiden Proteinstrukturen der asymmetrischen Einheit ist mit einem RMSD ($C\alpha$) von 0,51 Å jedoch nahezu gleich. In der vorliegenden Arbeit wurde für das Docking von Inhibitoren mit dem Programm *FlexX*⁷⁸ das Proteasemolekül verwendet, bei dem der Inhibitor kovalent gebunden und durch die Dichte vollständig definiert ist. Der kovalent gebundene Inhibitor wurde aus der Bindetasche entfernt, ebenso wie die Wassermoleküle und ein Sulfation. Für das Docking wurde die Bindetasche mit einem Radius von 15 Å um das katalytisch aktive Ser135 definiert. Danach wurden mit Hilfe von *FlexX* die einzelnen Aminosäureseitenketten in der Bindetasche auf ihren Protonierungszustand und die Winkel hin untersucht. Das katalytisch aktive Ser135 wurde nach Herausschneiden des kovalent gebundenen Inhibitors protoniert, die anderen Aminosäureseitenketten wurden nicht modifiziert. Danach wurde die Struktur als für das Docking adäquat betrachtet.

2.2.1.2. Auswahl von Liganden für das Docking

Zunächst wurden Strukturen mit überwiegend basischen Eigenschaften (Auswahl der Strukturen in Tabelle 8) für das Docking mit Hilfe von *MOE*⁷⁹ generiert, diese Strukturelemente wurden mit unterschiedlichen Resten (R_1) zum Adressieren der Subtaschen der Protease dekoriert und anschließend mit *MOE* minimiert. Bei der Auswahl der Strukturelemente wurde darauf geachtet, dass sich, ohne eine lange lineare Synthesesequenz verwenden zu müssen, unterschiedliche Derivate des jeweiligen Inhibitors zur Ableitung einer SAR darstellen lassen.

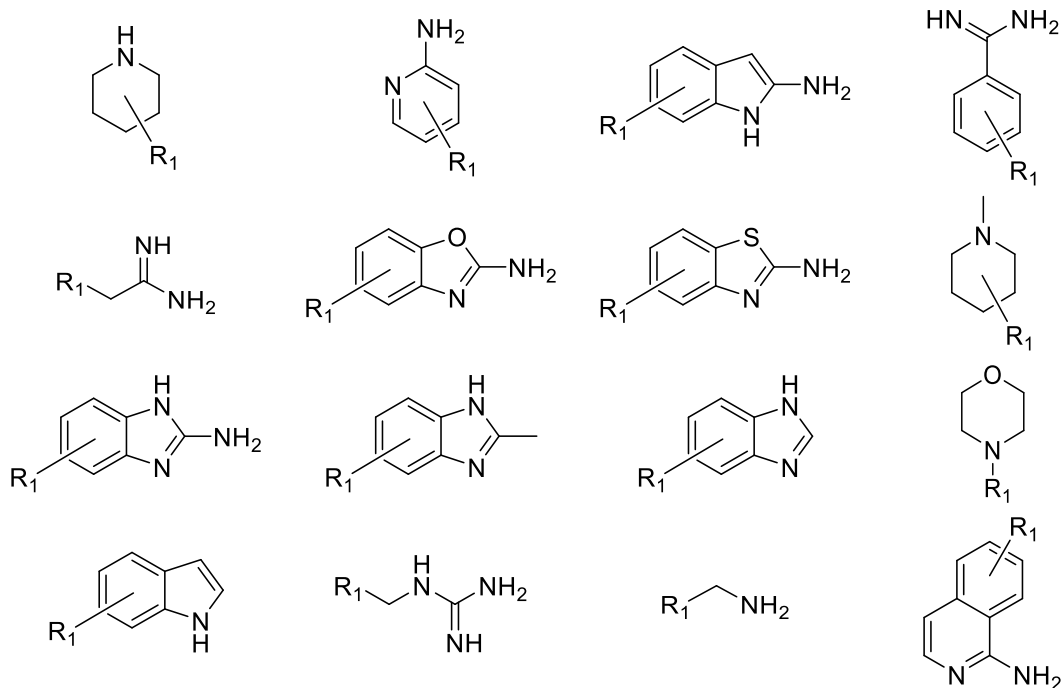


Tabelle 8. Auswahl der in die Protease gedockten Strukturen mit variierenden Resten „R₁“.

Mit Hilfe der basischen Strukturelemente sollte eine Interaktion dieser Gruppen und dem Asp75 der katalytischen Triade erreicht werden. Eine Interaktion zwischen dem Inhibitor und Asp75 stellt eine aussichtsreiche Option zur Inhibition der Dengue-Protease dar, da die katalytische Triade in allen Serotypen des DENV hoch konserviert vorliegt⁸⁰ und daher eine Inhibition der Protease von allen Dengue-Serotypen erreicht werden kann. Die Interaktion eines basischen Strukturelements mit Asp75 kann auch in der für das Docking verwendeten Protease-Struktur für das Arg in P2 des Inhibitors (Bz-nL-KRR-H) beobachtet werden.⁷ Nach erfolgter Synthese und Testung sollte durch weitere Designzyklen eine Optimierung der Spezifität der ermittelten Inhibitoren gegen die Dengue-Protease über eine Erweiterung der Struktur zum Adressieren der Subtaschen erfolgen. Wie in Tabelle 8 zu sehen, zählten zu den basischen Strukturelementen unter anderem verschiedene Benzimidazole, Indole, Amidine, Guanidine und aliphatische und aromatische Amine. Der Rest „R₁“ war in der Regel ein Carbonsäure- oder Sulfonsäureamid (Tabelle 9), das mit weiteren Heteroaromaten (R₂ in Tabelle 9) verknüpft war, um die Subtaschen der Dengue-Protease adressieren zu können.

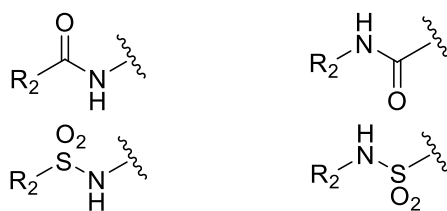


Tabelle 9. R₁ der in Tabelle 8 gezeigten und in die Dengue-Protease gedockten Inhibitoren.

Wichtig war, dass nur jeweils eines der in Tabelle 8 gezeigten basischen Strukturelemente im *in silico* entworfenen Inhibitor vorhanden war, um ein günstigeres pharmakokinetisches Profil des Inhibitors zu erhalten, da mehrere positive Ladungen in einem Inhibitor die Passage über die Zellmembran und damit die Aufnahme des Inhibitors in die Zelle ungünstig beeinflussen. Mit der im Docking verwendeten Strukturbibliothek, bestehend aus überwiegend basischen Strukturelementen zum Adressieren von Asp75 der katalytischen Triade, sollte die Designhypothese überprüft werden, um auf Grundlage der im Docking erhaltenen Ergebnisse erste Inhibitoren zu synthetisieren und anschließend zu testen.

2.2.1.3. Docking

Die in Kapitel 2.2.1.2. beschriebene Strukturbibliothek wurde mit *FlexX*⁷⁸ in die Bindetasche der Protease gedockt. Die Protonierungszustände der Inhibitoren wurden vor dem Docking überprüft und angepasst, wenn diese von *FlexX*⁷⁸ nicht entsprechend zugeordnet werden konnten, weil z.B. mesomere und induktive Effekte in der Struktur des Inhibitors durch *FlexX* nicht ausreichend berücksichtigt wurden. Das Docking wurde auf zehn Lösungen pro gedockter Struktur limitiert, diese wurden durch die in *FlexX* integrierte Scoring-Funktion bewertet, zusätzlich wurden die einzelnen Lösungen noch einer visuellen Inspektion unterzogen, um Bindungswinkel von Wasserstoffbrücken, hydrophobe Interaktionen und Salzbrücken sowie deren Abstände zwischen Ligand und Protease beurteilen zu können.

2.2.1.4. Grundstruktur der Inhibitoren

Nach Abschluss des Dockings durch *FlexX*⁷⁸ wurden die Wechselwirkungen der gedockten Inhibitoren, wie in Kapitel 2.2.1.3. beschrieben, untersucht, um Strukturen für eine Synthese zu identifizieren. Bei der Bewertung und Suche nach geeigneten Inhibitoren wurde die synthetische Zugänglichkeit der Verbindungen ebenso berücksichtigt wie die Bewertung durch die Scoring-Funktion von *FlexX*. Eine Auswahl an Inhibitoren und den

zugehörigen *FlexX*-Scores ist in Tabelle 10 aufgeführt. Die Inhibitoren, die synthetisch gut zugänglich waren und von *FlexX* am Besten bewertet wurden, wiesen ein unter Assaybedingungen (pH 9) positiv geladenes und in 5-Position substituiertes 2-Aminobenzimidazol (Abbildung 29) auf, welches mit Asp75 der katalytischen Triade interagiert.

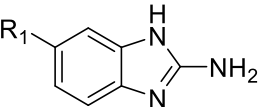
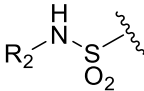
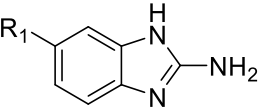
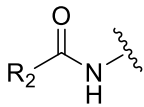
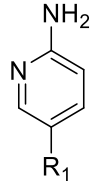
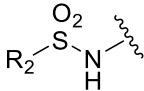
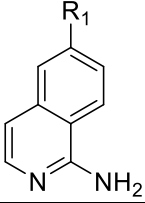
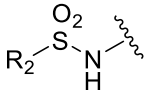
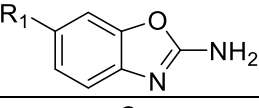
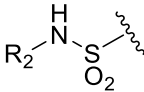
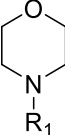
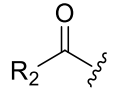
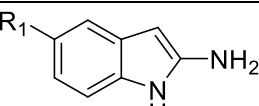
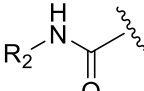
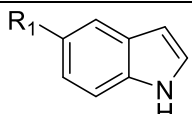
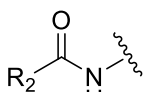
Nr.	Grundstruktur	Rest R ₁	<i>FlexX</i> -Score
65			-31
66			-28
67			-27
68			-26
69			-25
70			-23
71			-23
72			-22

Tabelle 10. Auswahl an gedockten Inhibitoren mit den dazugehörigen *FlexX*-Scores; je negativer der Score, umso besser wurde die Lösung bewertet. R₂ jeweils ein Phenylrest.

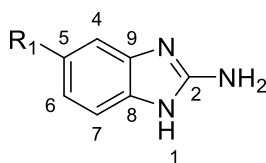


Abbildung 29. Struktur des *in silico* gefundenen Inhibitors (R₁ in Tabelle 11 gezeigt).

Innerhalb der Serie der 2-Aminobenzimidazole (wobei R_1 jeweils einer der in Tabelle 11 gezeigten Reste entsprach; insgesamt also vier Inhibitoren) befanden sich die Werte, die durch die Scoring-Funktion von *FlexX* für die besten zehn Lösungen je Inhibitor ermittelt wurden, im gleichen Bereich (-31 bis -28).

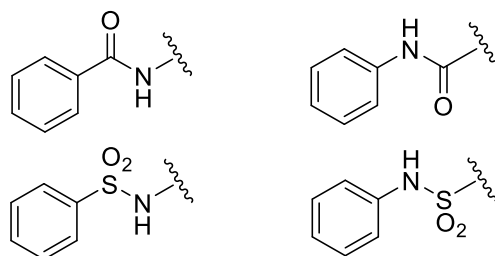


Tabelle 11. Reste für R_1 in 5-Position des 2-Aminobenzimidazols.

Aufgrund einer bereits publizierten Synthese⁸¹ wurde der in Abbildung 30 gezeigte Inhibitor gewählt, da dieser synthetisch leicht zugänglich zu sein schien.

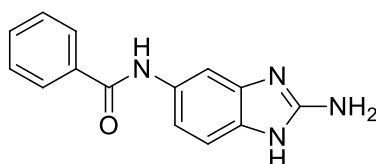


Abbildung 30. Für die Synthese ausgewählte Struktur (**66**).

Wie in Abbildung 31 zu sehen, bindet der Inhibitor mit dem 2-Aminobenzimidazol-Strukturelement an das Asp75 der katalytischen Triade, die Carbonylfunktion interagiert mit dem Rückgratstickstoff von Met84 des Co-Faktors NS2B, der Phenylrest geht hydrophobe Interaktionen mit Gly153 von NS3 ein.

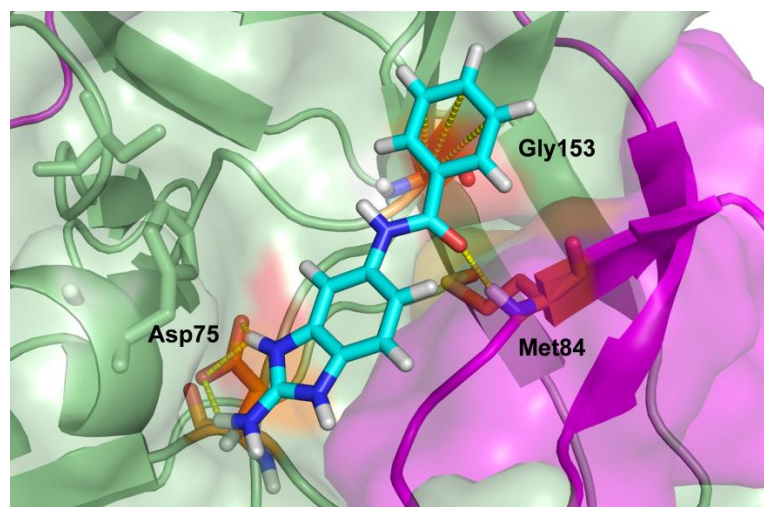


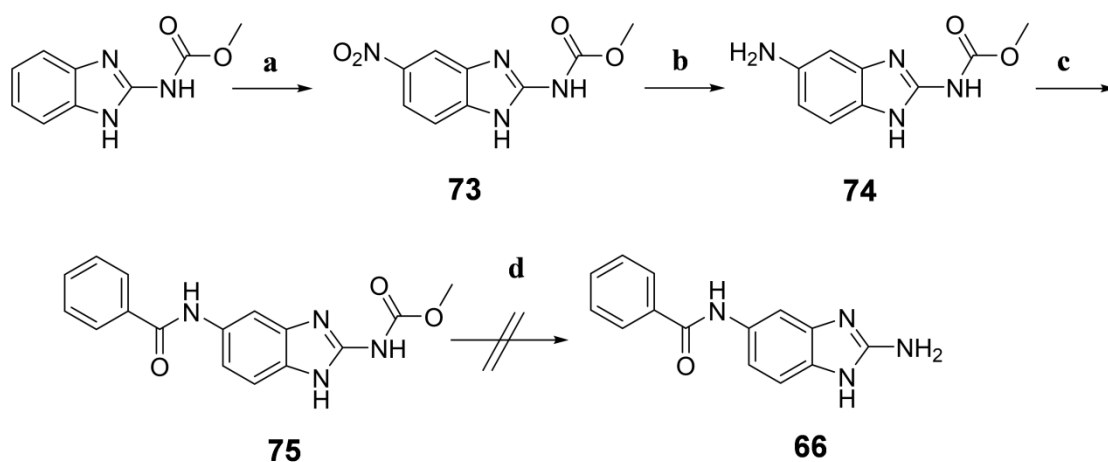
Abbildung 31. Im Docking von *FlexX* gefundener Bindungsmodus der 2-Aminobenzimidazolstruktur. Die Interaktionspartner des Inhibitors sind in orange dargestellt (Asp75, Gly153, Met84), der Co-Faktor NS2B in cyan und NS3 in grün angeführt.

Dass die *in silico* gefundene Interaktion zwischen einem 2-Aminobenzimidazol und einem Aspartat eines Protein *in vitro* stattfinden kann, wurde durch die Struktur mit dem PDB-Code 1QA0 (2-Aminobenzimidazol im Komplex mit bovinen Trypsin⁸²) gezeigt. Darüber hinaus lässt sich die Basizität des 2-Aminobenzimidazols durch Wahl der Substituenten am Grundgerüst (in Tabelle 9 gezeigt) und deren Position über einen weiten pH-Wert Bereich beeinflussen. Durch eine direkte Positionierung einer Carbonylfunktion in 5-Position des 2-Aminobenzimidazols können, z.B. durch negativ mesomere Effekte, die basischen Eigenschaften dieses Strukturelements abgeschwächt werden. Die S1 Tasche der Protease lässt sich darüber hinaus adressieren, indem der Phenylrest von **66** mit weiteren Resten, z.B. Heteroaromaten, dekoriert wird.

2.2.2. Synthese und biologische Testung der Inhibitoren der ersten Serie

2.2.2.1. Synthese der ersten Serie

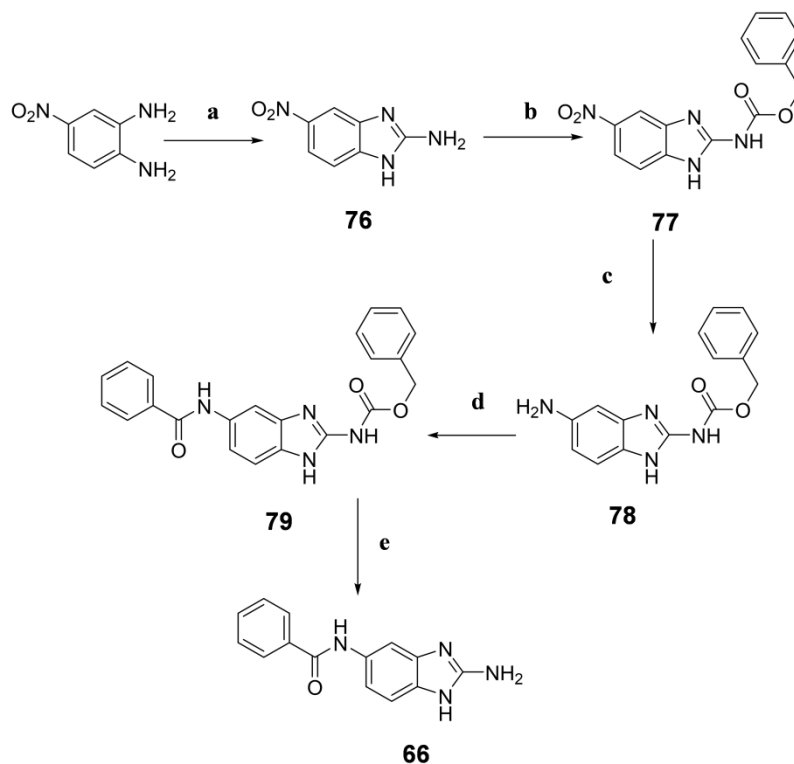
Die Synthese des in 5-Position substituierten 2-Aminobenzimidazols sollte über die Einführung einer Methylcarbammat-Schutzgruppe an der 2-Aminofunktion des 2-Aminobenzimidazols, anschließender Nitrierung in 5-Position (**73**), Reduktion der Nitrogruppe zum primären aromatischen Amin (**74**) und nachfolgender Kupplung mit Carbonsäurederivaten (**75**) erfolgen. Im letzten Schritt sollte dann die Abspaltung der Schutzgruppe erfolgen (**66**) (Schema 9). Dieser Synthesesequenz folgend ließen sich eine Vielzahl an Derivaten des in 5-Position substituierten 2-Aminobenzimidazols mit relativ geringem synthetischen Aufwand erhalten. Die Methylcarbammat-Schutzgruppe wurde gewählt, da zum einen das Edukt kommerziell erhältlich ist und zum anderen die Abspaltung des Methylcarbamats unter Freisetzung der 2-Aminobenzimidazolstruktur in der Literatur gut belegt ist.⁸³⁻⁸⁵



Schema 9. Darstellung von **66**. (a) konzentrierte Salpetersäure, 30 °C, 1 h, 74%; (b) 10 Bar H₂ Pd/C, MeOH/NaOH, RT, 24 h; (c) Benzoesäure, HBTU, NMM, DMF, RT, 12 h, 16%; (d) Entschützung (nicht erfolgreich).

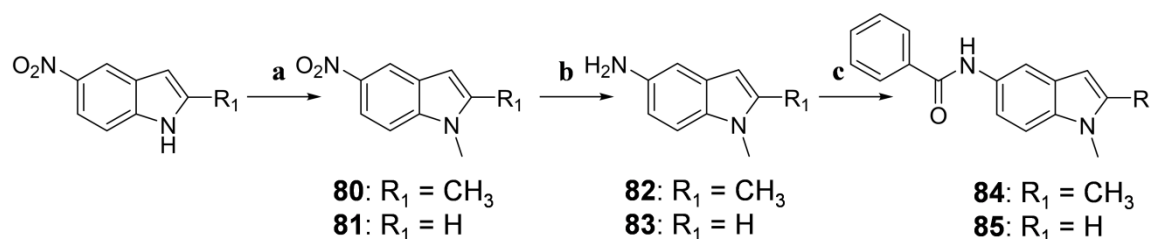
Einer Vorschrift von Wang *et al.*⁸¹ zur Darstellung von Albendazol folgend, wurde zur Darstellung von **73** Nitriersäure bei 0 °C für 1 Stunde eingesetzt. Wider Erwarten konnte jedoch nur das bisnitrierte Produkt erhalten werden. Auch ein Verkürzen der Reaktionsdauer, ein weiteres Absenken der Temperatur, ein Verringern der Zutropfgeschwindigkeit der Nitriersäure und ein Ändern des Verhältnisses von konzentrierter Schwefelsäure zu rauchender Salpetersäure führte nicht zum gewünschten mono-nitrierten Produkt **73**. Dass eine Nitrierung von Aromaten auch ohne Nitriersäure, nur mit rauchender Salpetersäure möglich ist, ist in der Literatur belegt,^{86,87} so dass im vorliegenden Fall dieser Ansatz gewählt wurde. Durch Erhöhen der Reaktionstemperatur von 0 °C auf 30 °C und Verkürzen der Reaktionszeit, konnte nach Gabe des Reaktionsansatzes auf Eis und durch anschließendes Abfiltrieren des entstandenen Niederschlags, selektiv das mono-nitrierte Carbendazim (**73**) ohne weitere Aufreinigung erhalten werden. Im Anschluss folgte die Reduktion der Nitrogruppe zum Amin (**74**). Diese Reduktion lieferte aufgrund der sehr schlechten Löslichkeit von 5-Nitro-Carbendazim (**73**) in polaren und apolaren Lösungsmitteln zunächst nur sehr geringe Ausbeuten und benötigte sehr lange Reaktionszeiten (10% Umsatz bei 10 bar Wasserstoffdruck über eine Woche). Um die Löslichkeit zu verbessern wurde ein Lösungsmittelsystem aus Natriumhydroxid in Methanol gewählt. Die Löslichkeit verbesserte sich in diesem Lösungsmittelsystem erheblich und so konnten auch größere Mengen 5-Nitro-Carbendazim (**73**) in kurzer Zeit hydriert werden. Nach Kupplung der entsprechenden Carbonsäure mit dem Amin (**74**) sollte laut publizierter Vorschrift die Abtrennung der Schutzgruppe zum Endprodukt erfolgen. Die Schutzgruppe ließ sich aber

unter Anwendung der publizierten Bedingungen (NaOH in H₂O⁸⁸; KOH in MeOH⁸⁹) nicht abspalten. Drastischere Bedingungen, wie z.B. zusätzliches Erhitzen des Reaktionsansatzes, führten zwar zu einem teilweisen Abspalten der Schutzgruppe, jedoch ließ sich das Produkt nicht aus dem Reaktionsansatz isolieren. Daher wurde in der Literatur nach einer alternativen Syntheseroute bzw. Schutzgruppe für das gewünschte 2-Aminobenzimidazol Produkt gesucht. Schließlich fiel die Entscheidung auf eine Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe⁹⁰ (Cbz-Schutzgruppe) (Schema 10), da diese Schutzgruppe im letzten Schritt der Synthese reduktiv abgespalten werden kann und sie die Löslichkeit der Vorstufen von **66** in organischen Lösungsmitteln durch ihre Lipophilie erhöhen sollte. Abweichend von der im Patent publizierten Vorschrift,⁹⁰ wurde zunächst das 5-Nitro-2-aminobenzimidazol Grundgerüst (**76**) durch Reaktion von Bromcyan mit 4-Nitro-*o*-phenyldiamin aufgebaut, mit der Cbz-Schutzgruppe an der 2-Aminoposition geschützt (**77**) und schließlich die Nitrogruppe mit Zn/Essigsäure zur Aminogruppe reduziert, ohne dass die Cbz-Schutzgruppe abgespalten wurde (**78**). Kuppeln des reduziertenamins mit der entsprechenden Carbonsäure (**79**) und Abspalten der Cbz-Schutzgruppe unter einer 10 bar Wasserstoffatmosphäre führte zum gewünschten Produkt (**66**) in 5 Stufen mit 10% Gesamtausbeute (Schema 10).

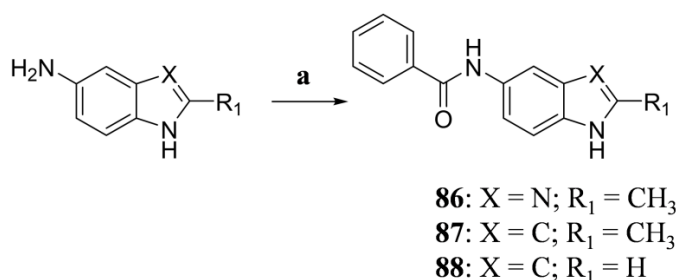


Schema 10. Darstellung von **66**. (a) Bromcyan, H₂O/MeCN, Reflux, 4 h, 99%; (b) Benzylchloroformat, THF, 0 °C, 24 h, 45%; (c) Zn/AcOH, RT, 1 h, 80%; (d) Benzoesäure, HBTU, NMM, DMF, RT, 12h, 30%; (e) 10 Bar H₂ Pd/C, MeOH, 24 h, 92%.

Parallel zur Synthese des 2-Aminobenzimidazol-Derivates wurde eine weitere Serie synthetisiert, bei der schrittweise zum einen die Stickstoffe des 2-Aminobenzimidazols durch Kohlenstoffe substituiert (**86**, **87**, **88**) und zum anderen die Stickstoffe methyliert wurden (**84** und **85**). Diese Serie sollte den Beitrag der einzelnen Stickstoffe bzw. NH-Funktionalitäten zur inhibitorischen Potenz überprüfen und zugleich den im Docking gefundenen Bindungsmodus an Asp75 (Interaktionen des basischen Guanidin-Elementes des 2-Aminobenzimidazols zur Seitenkette des Aspartats) bestätigen. Die Synthese dieser Derivate konnte ohne Schutzgruppenstrategie erfolgen, da durch Ersatz der 2-Aminofunktionalität nun die Amino-Gruppe in der 5-Position des Aromaten das beste Nukleophil darstellt. Daher beschränkte sich die Synthese auf die Methylierung des Indolstickstoffs und auf die Reduktion der Nitro-Funktion der kommerziell erhältlichen Nitro-Aromaten zum aromatischen Amin und die anschließende Kupplung mit der entsprechenden Carbonsäure (**84** und **85**, Schema 11) oder die direkte Kupplung der kommerziell erhältlichen Amine mit der entsprechenden Carbonsäure (**86**, **87**, **88**, Schema 12). Das entschützte 2-Aminobenzimidazol und dessen Derivate bildeten zusammen die erste Inhibitorserie.



Schema 11. Synthese von **84** und **85**. (a) Methyljodid, NaH, DMF, 0 °C, 50 – 63%; (b) 10 Bar H₂ Pd/C, DCM, <24 h, nicht aufgearbeitet; (c) Benzoesäure, HBTU, NMM, DMF, RT, 12h, 67 - 84%.



Schema 12. Synthese von **86**, **87** und **88**. (a) Benzoesäure, HBTU, NMM, DMF, RT, 12h, 58 - 97%.

2.2.2.2. Testung der ersten Serie

2.2.2.2.1. Verwendete Assay-Systeme

Um zu ermitteln, ob und wie stark die synthetisierten Inhibitoren ihre Zielstruktur, also die NS2B-NS3 Protease von DENV-2 (DV2pro) und DENV-3 (DV3pro) inhibieren, wurde ein Fluoreszenz-basierter Assay und ein Thermal-Shift-Assay (TSA) verwendet. Die Bestimmung der Inhibitionswerte der ersten und der zweiten Inhibitor-Serie wurden von *Manuel Kanitz* (ebenfalls Arbeitskreis *Diederich*, *Philipps-Universität Marburg*) durchgeführt. Der Fluoreszenz-basierte Assay wurde mit einem in der Gruppe von *Prof. Dr. Torsten Steinmetzer*, *Philipps-Universität Marburg*, synthetisierten fluorogenen Substrat (Phac-Lys-Arg-Arg-AMC) durchgeführt. Die genaue Durchführung und die Zusammensetzung des Puffers wird näher im experimentellen Teil beschrieben.

Die Bestimmung der TSA Daten der ersten Serie wurden ebenfalls von *Manuel Kanitz* durchgeführt. Eine TSA Bestimmung kann u.a. dazu benutzt werden, das Binden von Liganden an Proteine zu identifizieren. Als möglicher Hit in einer TSA Messung wird ein Ligand definiert, der die Schmelztemperatur des Proteins ändert. Eine Änderung der Schmelztemperatur eines Proteins kann durch eine Stabilisierung (der Schmelzpunkt erhöht sich) oder Destabilisierung (der Schmelzpunkt erniedrigt sich) verursacht werden. Die Bestimmung des Schmelzpunktes des Proteins erfolgt mittels eines Farbstoffes (*Sypro Orange*, *BioRad Laboratories GmbH*). Dieser Farbstoff lagert sich an hydrophobe Bereiche des Proteins an, die erst nach dem Aufschmelzen des Proteins zugänglich werden, in Folge fluoresziert der Farbstoff. Dieses Fluoreszenzsignal wurde mit einem *iQ5-Cycler* RT-PCR der Firma *Bio-Rad Laboratories GmbH* aufgezeichnet. Die genaue Durchführung des TSA und der verwendete Puffer wird ebenfalls im experimentellen Teil beschrieben.

2.2.2.2.2. Ergebnisse der ersten Serie

Die Verbindungen der ersten Serie wurden in einem Fluoreszenz-basierten Assay von *Manuel Kanitz* gegen DV2pro gemessen. Für alle Verbindungen wurden die %-Inhibitionswerte bei zwei unterschiedlichen Inhibitor-Konzentrationen gemessen. Leider zeigte keine der Verbindungen eine Inhibition der Protease, die sie für weitere Strukturoptimierungen qualifiziert hätte, auf eine Bestimmung der TSA Daten wurde daher verzichtet.

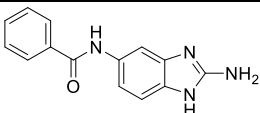
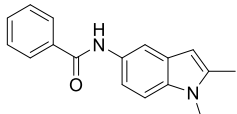
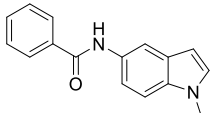
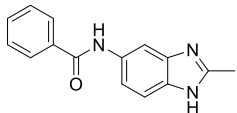
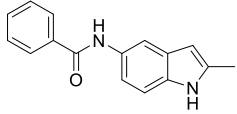
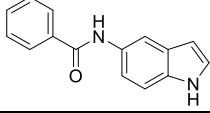
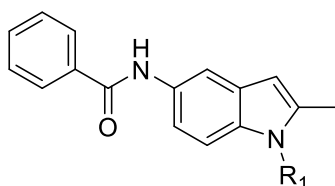
Struktur	Nr.	%-Inhibition bei 300µM Inhibitor	%-Inhibition bei 150µM Inhibitor
	66	19,6	1,2
	84	52,8	31,1
	85	19,7	6,0
	86	28,8	8,8
	87	3,4	0,8
	88	5,3	0

Tabelle 12. %-Inhibitionswerte der ersten Serie gegen DV2pro.

Die im Docking gefundene Interaktion des 2-Aminobenzimidazol-Strukturelements von **66** an die Carbonsäure der Seitenkette von Asp75 scheint also *in vitro* nicht stattzufinden oder diese Interaktion allein ist nicht ausreichend, um das Substrat an einer Bindung an die Protease zu hindern. DV2pro und DV3pro unterscheiden sich nur wenig in ihrer Bindetasche und es wurde bereits mittels anderer Inhibitoren gezeigt, dass diese nahezu keine Serotyp-Spezifität aufweisen.⁹¹ Daher wurde auf eine Ermittlung der %-Inhibitionswerte der ersten Serie gegen DV3pro verzichtet, da keine erhebliche Verbesserung der %-Inhibitionswerte, ausgehend von den vorliegenden Werten, erwartet werden konnte.⁶⁹ Da sich die Inhibitor-Stammlösungen von **84** und **87** nach einer gewissen Zeit rot verfärbten und **84**, wie in Tabelle 12 angegeben, die stärkste Inhibition zeigte, wurden die rot verfärbten Lösungen und die restlichen Inhibitoren der ersten Inhibitorserie nochmals vermessen. Bei dieser wiederholten Messung inhibierten **84** und **87** DV2pro mit einem Wert von 60,2% (**84**) und 71,4% (**87**) bei 100 µM (Tabelle 13), die anderen Verbindungen der ersten Inhibitorserie zeigten hingegen kein verändertes Inhibitionsverhalten gegenüber DV2pro. Daher wurden die Inhibitor-Stammlösungen für eine dritte Messung nochmals frisch hergestellt und die Substanzen im Fluoreszenz-basierten Assay gemessen. Bei der dritten Messung konnte für keine der Verbindungen eine Inhibition registriert werden. Da die „rote Substanz“ in den Inhibitor-Stammlösungen

von **84** und **87** für eine Inhibition der Protease verantwortlich zu sein schien, wurde versucht, die „rote Substanz“ zu isolieren, um diese als isoliertes Produkt vermessen zu können.



Ligand	R ₁	1. Messung	2. Messung	3. Messung
		%-Inhibition bei 150 µM	%-Inhibition bei 100 µM	%-Inhibition bei 100 µM
84	CH ₃	52,8	60,2	8,6
87	H	3,4	71,4	14,6

Tabelle 13. Inhibitionswerte von **84** und **87** in der 1. Messung, der 2. Messung (rot verfärbt) und der 3. Messung (klar) gegen DV2pro.

2.2.3. Strukturaufklärung und Synthese der „roten Substanz“

Bevor weitere Arbeit in eine Strukturaufklärung und das Etablieren einer Synthese investiert wurde, sollte zunächst mit einfachen Mitteln mehr von der „roten Substanz“ von **87** hergestellt werden, um zu überprüfen, ob diese auch isoliert in der Lage ist, die Protease zu inhibieren oder ob nur eine Mischung aus mehreren Substanzen diese Fähigkeit besitzt. Da von der 100 mM Inhibitor-Stammlösung nur eine geringe Menge vorhanden war, konnte die Lösung nicht ohne größeren Aufwand verwendet werden, um deren Bestandteile zu isolieren und im Anschluss mit den isolierten Bestandteilen den Inhibitionsassay durchzuführen. Eine Analyse der rot verfärbten Inhibitor-Stammlösung von **87** mittels dünnschichtchromatographischer (DC) Analyse zeigte drei größere ((1) **87**; (2) bei 366 nm fluoreszierender *Spot*; (3) roter *Spot* nahe der Basislinie) und viele kleine rot gefärbte *Spots* nahe der Basislinie (Abbildung 32).

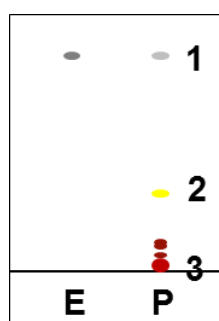


Abbildung 32. DC der Inhibitor-Stammlösung (E: **87**, P: DMSO-Inhibitor-Stammlösung nach 3 Tagen, Fließmittel DCM:MeOH = 97:3).

Zunächst wurde die Möglichkeit einer Darstellung des roten *Spots* (3) nahe der Basislinie untersucht, da nur die rot verfärbte Inhibitor-Stammlösung DV2pro inhibieren konnte und dieser *Spot* der größte auf der DC war. Da die in Abbildung 32 zu erkennenden „Zersetzungsprodukte“ von **87** durch Lagerung in DMSO unter Lichteinfluss entstanden waren, lag die Vermutung nahe, dass es sich entweder um Produkte einer Oxidations- oder einer Photoreaktion handeln könnte. Daher wurde **87** in unterschiedlichen Lösungsmitteln gelöst und mit Oxidationsmitteln und UV-Strahlung behandelt (Tabelle 14).

Oxidationsmittel	Lösungsmittel	Reaktionszeit	Produkt entstanden
mCPBA	DMSO	24 h	Nein
H ₂ O ₂	Methanol	24 h	Nein
H ₂ O ₂	Aceton	24 h	Nein
Druckluft	DMSO	24 h	Nein
Tageslichtlampe (300W)	MeCN	24 h	Sehr wenig
UV-Licht (254 nm)	Methanol	24 h	Nein
UV-Licht (254 nm)	MeCN	24 h	Sehr wenig
UV-Licht (254 nm)	Aceton	24 h	Nein
UV-Licht (254 nm)	DMSO	48 h	Ja

Tabelle 14. Verwendete Bedingungen zum Herstellen der „roten Substanz“ (mCPBA: *meta*-Chlorperoxybenzoesäure).

Gängige Oxidationsmittel führten jedoch nicht zu einer roten Verfärbung des Reaktionsansatzes. Unter UV-Bestrahlung (254 nm) färbte sich eine DMSO Lösung über Nacht rot, eine DC Analyse zeigte aber, dass sich nur sehr wenig der roten Substanz gebildet hatte, die auf der ursprünglichen DC nahe der Basislinie zu finden war (Abbildung 32). Durch Verlängern der Bestrahlungszeit gelang es, genügend Substanz (ca. 1,5 mg) herzustellen und säulenchromatographisch zu isolieren, um diese massenspektrometrisch und im Fluoreszenz-basierten Assay zu vermessen. Die Substanz, die dem roten Punkt auf der Baseline der DC entsprach, war laut HPLC/MS Untersuchung jedoch ein Substanzgemisch, der Hauptpeak der HPLC Analyse wies einen Massenpeak von 759,38 g/mol (M+H⁺) auf. Dieses Substanzgemisch wurde ohne nähere Bestimmung in einer Menge gelöst, die ca. 100 µM (Masse vom Hauptpeak als Berechnungsgrundlage) im Inhibitionsassay entsprach, damit lag die Konzentration wesentlich höher als bei dem vorangegangenen Test, da in der für den Assay verwendeten Inhibitor-Stammlösung laut DC nur ein Teil von **87** als „rote Substanz“ vorlag und noch Edukt (**87**) vorhanden war. Obwohl die im Assay eingesetzte Konzentration an isolierter roter Substanz wesentlich höher war als die Konzentration der „roten Substanz“ in der

ursprünglich vermessenen roten Inhibitor-Stammlösung, wurde eine vergleichbare %-Inhibition der Protease bei einer Inhibitorkonzentration von 100 μM ermittelt (Tabelle 15). Erwartet wurde eine Vollinhibition bei einer Inhibitorkonzentration von 100 μM und so lag auch der ermittelte IC_{50} der „roten Substanz“ lediglich bei 66,1 μM , daher wurde nicht versucht die Struktur der „roten Substanz“ aufzuklären, obwohl diese offensichtlich zu einer moderaten Inhibition der Protease in der Lage war.

„Rote Substanz“ (isoliert)		Rote Inhibitor-Stammlösung	
Konzentration	%-Inhibition	Konzentration	%-Inhibition
100 μM	67,8	100 μM	71,4

Tabelle 15. %-Inhibitionswerte der „roten Substanz“ und der roten Inhibitor-Stammlösung (Gemisch aus **87**, „roter Substanz“ und „gelber Substanz“ (*Spot* Nr. 2 und 3 auf DC (Abbildung 32)) gegen DV2pro.

Da die für die „rote Substanz“ erhaltenen Inhibitionswerte nicht den Effekt der roten Inhibitor-Stammlösung von **87** auf DV2pro erklären konnten und **87** keinen Inhibitionseffekt zeigte, wurde als nächstes versucht, mehr von der auf der DC identifizierten „gelben Substanz“ (*Spot* 2, Abbildung 32) herzustellen. Die „gelbe Substanz“ schien nach den vorliegenden Ergebnissen zur isolierten „roten Substanz“ und zu **87** für die bei der roten Inhibitor-Stammlösung beobachteten Inhibitionseffekte gegen DV2pro verantwortlich zu sein, da diese Inhibitor-Stammlösung sowohl **87** als auch Anteile an „roter Substanz“ und „gelber Substanz“ enthielt (Abbildung 32). Hierzu wurde **87** wieder in DMSO gelöst und mit UV-Strahlung behandelt, da sich die „gelbe Substanz“ ebenfalls bei diesen Bedingungen bildete. Nach 48 h Reaktionszeit konnte in der DC Analyse ein ungefähres Verhältnis von Edukt (**87**) zur „gelben Substanz“ von 1:1 festgestellt werden. Durch säulenchromatographische Aufreinigung konnte die „gelbe Substanz“ isoliert werden, die in der HPLC/MS-Bestimmung nur einen Peak in der UV Spur aufwies (515,20 g/mol ($\text{M}+\text{H}^+$)). Von dieser Substanz wurde dann eine 100 mM Inhibitor-Stammlösung angefertigt (ausgehend vom Massenpeak) und diese bei 2 Konzentrationen im Fluoreszenz-basierten Assay vermessen. Tatsächlich zeigte die „gelbe Substanz“ schließlich eine Inhibition von 99,8% bei 100 μM und von 99,7% bei 50 μM . Aufgrund dieser Inhibitionswerte und für eine bessere Vergleichbarkeit mit publizierten Inhibitoren wurde ein IC_{50} von $14,4 \pm 1,30$ μM gegen DV2pro für die „gelbe Substanz“ bestimmt. Somit war die Substanz identifiziert, die bei dem ersten Test auf Inhibition der Protease den Effekt verursacht hatte, da sich die entsprechende Substanz ebenfalls unter Lichteinfluss gebildet hatte und sie laut DC Analyse der „gelben

Substanz“ in der Inhibitor-Stammlösung entsprach. Mit ihrem IC_{50} von $14,4 \pm 1,30 \mu\text{M}$ gegen DV2pro sollte sie darüber hinaus einen idealen Ausgangspunkt für weitere Struktur-Optimierungen darstellen.

Nachdem es gelungen war die Substanz, die initial den inhibitorischen Effekt im Assay verursacht hatte, zu isolieren, wurde versucht, diese in größeren Mengen darzustellen, um deren Struktur aufklären zu können. Hierzu wurde wieder die Methode der UV-Bestrahlung angewendet, da diese zwar in geringen Ausbeuten (21%) aber reproduzierbar die gewünschte Substanz lieferte. Je größer der Reaktionsansatz gewählt wurde, desto länger waren die Reaktionszeiten. Bei längeren Reaktionszeiten fiel die Ausbeute allerdings geringer aus (<10%), da sich verhältnismäßig mehr von der „roten Substanz“ im Vergleich zur „gelben Substanz“ bildete. Daher wurde entschieden, den Reaktionsansatz klein zu halten, auf ein Upscaling zu verzichten und die jeweils per Säulenchromatographie aus den Reaktionsansätzen isolierten Substanzen per DC und HPLC/MS Analyse miteinander zu vergleichen und dann zu vereinigen. Als genügend von der Substanz zur Verfügung stand, wurde diese schließlich per ^1H - und ^{13}C -NMR analysiert, um deren Struktur aufzuklären, wobei die entsprechende Masse bereits aus den Vorversuchen bekannt war (514,20 g/mol).

Der Vergleich der ^1H -NMR-Spektren des Edukts (**87**) sowie der „gelben Substanz“ lässt bereits erste Rückschlüsse auf die Struktur zu, auch ohne die Masse in die Überlegungen mit einzubeziehen.

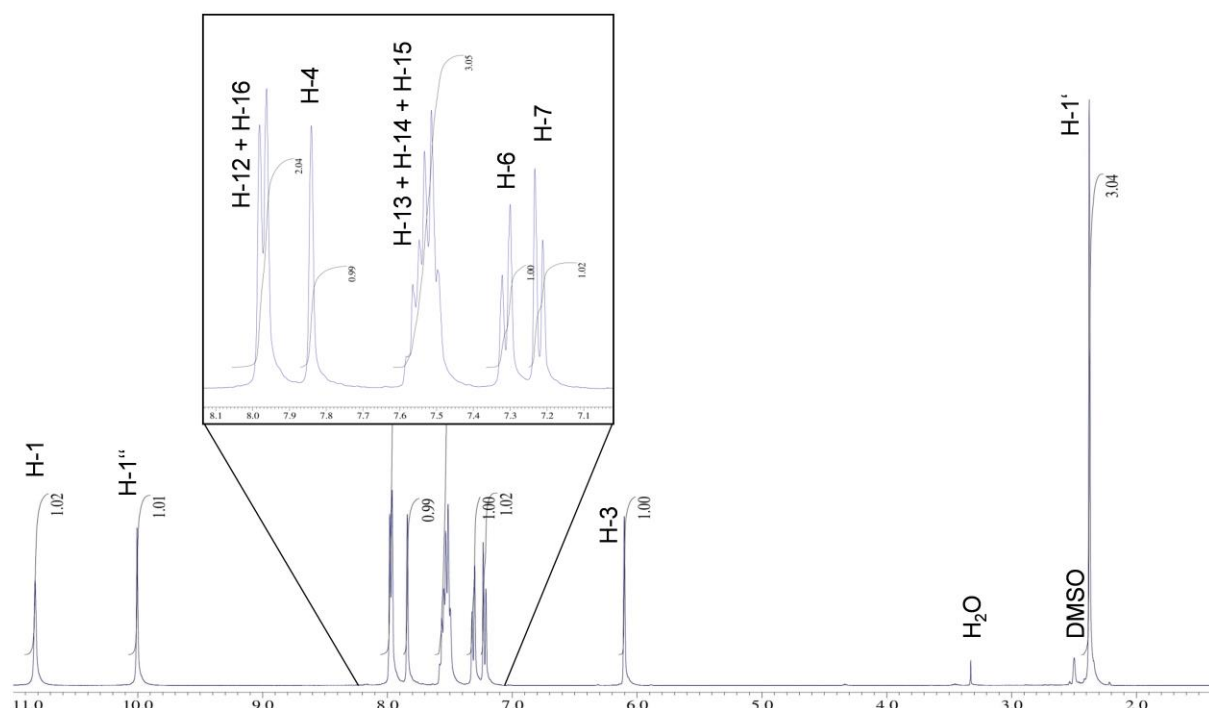


Abbildung 33. ^1H -NMR-Spektrum der „gelben Substanz“.

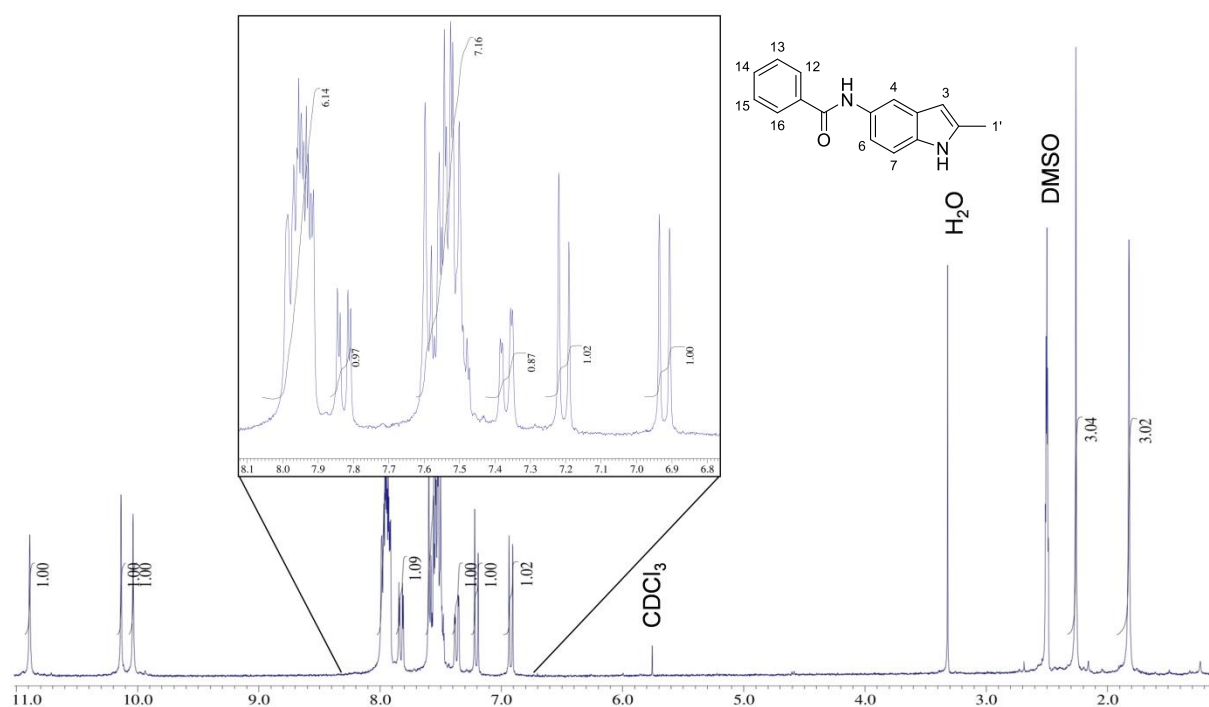


Abbildung 34. ^1H -NMR-Spektrum von **87**.

Ein Vergleich der ^1H -NMR-Spektren der „gelben Substanz“ und **87** (Abbildung 33 und Abbildung 34) zeigt, dass in der „gelben Substanz“ zwei Methylgruppen vorhanden sind (1,82 ppm und 2,26 ppm), in **87** hingegen nur eine (2,38 ppm). Im ^1H -NMR-Spektrum von **87** sind 9 aromatische Protonen vorhanden, bei der „gelben Substanz“ sind es hingegen 17 Protonen. Die Abwesenheit des H-3 (6,10 ppm) von **87** im Spektrum der

„gelben Substanz“ ist ein weiterer Unterschied. H-6 (7,31 ppm) und H-7 (7,22 ppm) von **87** scheinen im Spektrum der „gelben Substanz“ hingegen zweifach vorhanden zu sein (6,92 ppm, 7,21 ppm, 7,37 ppm und 7,83 ppm, siehe vergrößerter Bereich in Abbildung 33). Im Bereich von 9,80 bis 11,20 ppm sind bei der „gelben Substanz“ drei Signale zu erkennen (10,04 ppm, 10,14 ppm und 10,89 ppm), bei **87** hingegen nur zwei (10,00 ppm und 10,82 ppm). Der Vergleich der Spektren legt also nahe, dass es sich bei der „gelben Substanz“ um ein Addukt aus zwei Molekülen von **87** handelt, da zwei Methylgruppen vorhanden sind und auch die Protonen H-6 und H-7 zweifach auftraten. Unter Berücksichtigung aller Tieffeld-verschobenen Protonen sind es bei **87** 11 Protonen und bei der „gelben Substanz“ 20 Protonen. Die Spektren lassen ebenfalls eine Aussage über den Grad der Veränderung zu, da das Amid-Proton im Tieffeld von **87** bei der „gelben Substanz“ („gelbe Substanz“: 10,04 ppm; **87**: 10,01 ppm) und das Proton des Indol-Stickstoffs („gelbe Substanz“: 10,89 ppm; **87**: 10,82 ppm) nur wenig verschoben sind. Daher sollte ein Molekül des Addukts im Vergleich zu **87** strukturell nur gering verändert sein. Das andere Molekül hingegen trägt nur noch ein Tieffeld-verschobenes Stickstoff-Proton (10,14 ppm). Da deutliche Veränderungen nur am H-3 von **87**, welches im Spektrum der „gelben Substanz“ fehlt, und an einem Indol-Proton auftreten, scheint an diesen Stellen eine chemische Veränderung stattgefunden zu haben. Diese führt dazu, dass der C-3 Kohlenstoff im Spektrum der „gelben Substanz“ an den beiden Molekülen des Addukts kein Proton mehr trägt und dass das Proton des Indol-Stickstoffs eines der beiden Moleküle des Addukts im Spektrum der „gelben Substanz“ nicht mehr im Bereich von 10 ppm bis 11 ppm zu finden ist. Weiter eingrenzen lässt sich der Ort, an dem eine Veränderung des Moleküls stattgefunden hat, durch die Betrachtung der Signale der Methylgruppen, da sie im Spektrum der „gelben Substanz“ magnetisch inäquivalent sind. Eine Methylgruppe ist dabei im Vergleich zu **87** (Methylgruppe bei **87**: 2,38 ppm) deutlich Hochfeld-verschoben (1,82 ppm), die andere ist nahezu unverändert (2,26 ppm). Der Vergleich der ¹³C-APT-NMR-Spektren (Abbildung 35 und Abbildung 36) lieferte weitere Hinweise auf die mögliche Struktur von der „gelben Substanz“. Hier ist bei **87** im Hochfeld ein Kohlenstoffatom zu finden, das drei Protonen trägt (13,5 ppm), im Spektrum von der „gelben Substanz“ ist dieses Signal zweimal zu finden. Hier bestätigt das ¹³C- das ¹H-NMR-Spektrum, da hier bei der „gelben Substanz“ ebenfalls zwei Methylgruppen zu finden waren. Im Spektrum der „gelben Substanz“ tritt, abweichend vom Edukt, ein quartärer Kohlenstoff bei 67,0 ppm auf, dieser ist aufgrund seiner chemischen Verschiebung vermutlich nicht aromatisch. Das Signal des C-3 Kohlenstoffs von **87** (99,3

ppm) ist nicht im Spektrum der „gelben Substanz“ zu finden und unterstützt damit die Annahme, dass an C-3 von **87** eine chemische Veränderung stattgefunden haben muss. Das Signal des Carbonylkohlenstoffs C-10 von **87** (165,0 ppm) tritt im Spektrum der „gelben Substanz“ zweimal auf (165,0 und 165,1 ppm). Zusätzlich ist bei 203,6 ppm ein weiterer quartärer Kohlenstoff zu finden, dessen Signal aufgrund seiner Tieffeldverschiebung vermutlich einem Carbonylkohlenstoff zugeordnet werden kann.

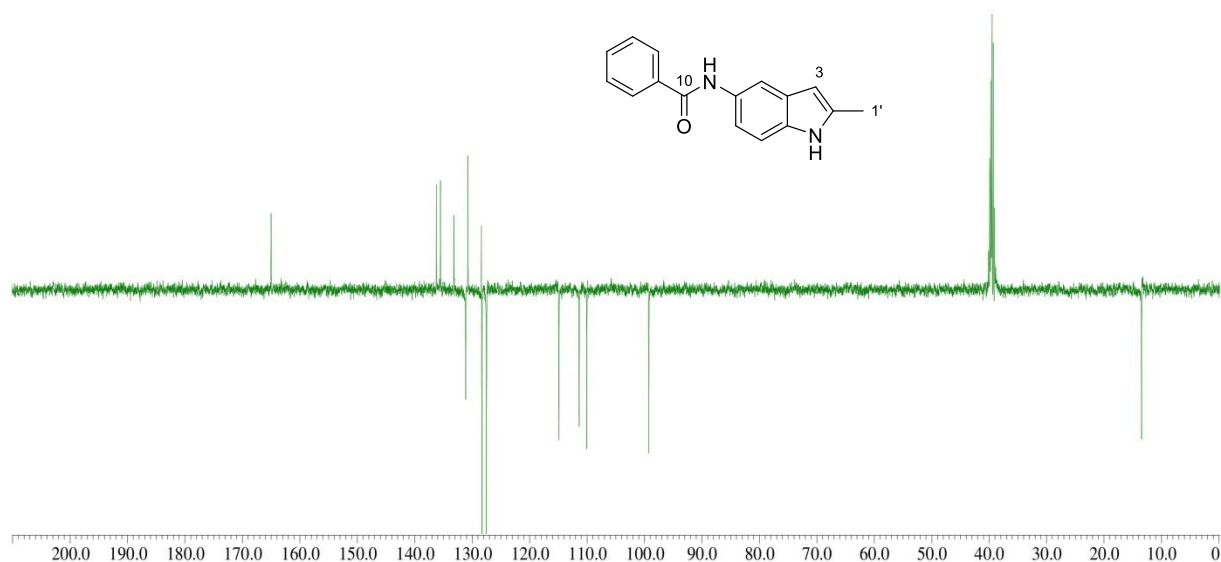


Abbildung 35. ^{13}C -APT-NMR-Spektrum von **87**.

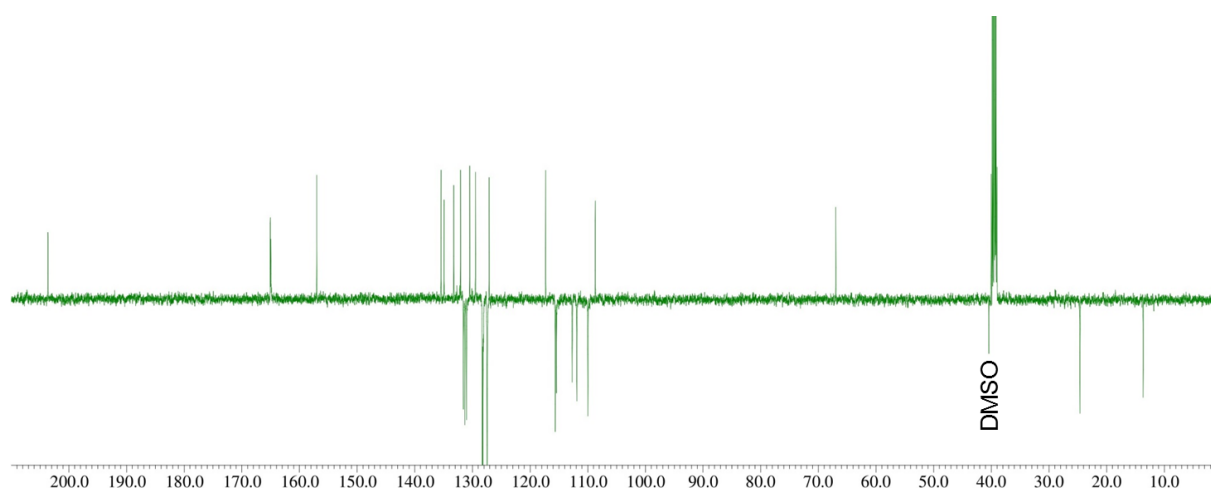


Abbildung 36. ^{13}C -APT-NMR-Spektrum der „gelben Substanz“.

Die aufgefundene Masse von 514,2 g/mol bestätigt ebenfalls die Annahme, dass es sich bei der „gelben Substanz“ um ein Addukt aus zwei Molekülen von **87** handelt, da die Masse von **87** 250,2 g/mol beträgt, also ungefähr die Hälfte der „gelben Substanz“. Anhand der im ^1H - und ^{13}C -APT-NMR-Spektrum ermittelten Veränderungen konnte eine mögliche Struktur für die „gelbe Substanz“ vorgeschlagen werden.

Strukturelle Voraussetzung der „gelben Substanz“
Zwei Methylgruppen, nicht an Heteroatomen
Nicht aromatischer quartärer Kohlenstoff
Fehlen von H-3 und C-3 des Eduktes
Amidfunktion nicht verändert
Zusätzliche Carbonylfunktion
Ungefähr doppelte Masse

Tabelle 16. Veränderungen der „gelben Substanz“ im Vergleich zum Edukt (87).

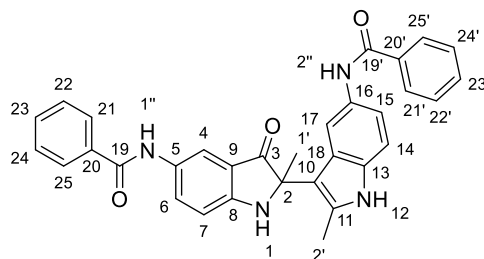


Abbildung 37. Strukturvorschlag für die „gelbe Substanz“ (MW: 514,20 g/mol).

Die vorgeschlagene Substanz (siehe Abbildung 37) erfüllt die Bedingungen, die anhand der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren definiert worden sind (Tabelle 16). Sie besitzt zwei Methylgruppen, die magnetisch nicht äquivalent sind, einen quartären nicht aromatischen Kohlenstoff (C-2), zwei Amidfunktionen, drei Carbonylkohlenstoffe, C-3 des Edukts trägt kein Proton mehr (C-3 und C-10 in Abbildung 37), ein Proton des Indol-Stickstoffs ist chemisch weitgehend unverändert und schließlich entspricht die Masse der gefundenen Masse der „gelben Substanz“.

Um zu bestätigen, dass die vorgeschlagene Struktur tatsächlich der „gelben Substanz“ entspricht, wurde diese auf einem anderen Weg synthetisiert, um die resultierenden ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren miteinander vergleichen zu können. Zugleich sollte so die Ausbeute der initialen Synthese unter UV-Licht erhöht und die Dauer der Reaktion verringert werden.

2.2.4. Synthese der „gelben Substanz“ und deren biologische Testung

Anhand der vorgeschlagenen Struktur wurde nach bereits bekannten Syntheserouten, mit Konzentration auf das gemeinsame Grundgerüst, dem 2-Methyl-2-(2-methyl-1*H*-indol-3-yl)indolin-3-on (Abbildung 38), für diese Substanzklasse gesucht.

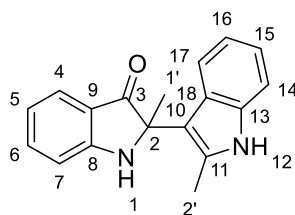


Abbildung 38. Grundgerüst der „gelben Substanz“ (**89**, MW: 276,34 g/mol).

Eine Suche ergab mehrere Publikationen zu dieser Substanzklasse.^{92–95} Um die gewünschte Substanz darzustellen, wurde die Synthese von *Kong et al.*⁹⁵ gewählt, die für die Reaktion 2,2,6,6-Tetramethyl-piperidin-1-yl)oxyl (TEMPO) einsetzten. Dieses Reagenz lieferte auch den Namen für die zweite Inhibitorserie. Die von *Kong et al.* bei der Reaktion eingesetzte Benzoesäure (0,4 eq) wurde jedoch weggelassen, da unter Verwendung von Benzoesäure mehr Nebenprodukte während der Reaktion entstanden waren und die Ausbeute daher ebenfalls geringer war. Um das Produkt der Reaktion mit den bereits erhaltenen ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren der „gelben Substanz“ vergleichen zu können, wurde als Edukt für die Reaktion **87** eingesetzt. Die Synthese wurde, wie im experimentellen Teil beschrieben, durchgeführt und die resultierenden Spektren verglichen. Das Überlagern sowohl des ¹H-NMR- als auch des ¹³C-NMR-Spektrums zeigte, dass es sich bei der nach der Vorschrift von *Kong et al.* synthetisierten Substanz (**94**, Schema 13), um die „gelbe Substanz“ handelte, die aus der roten Inhibitor-Stammlösung isoliert werden konnte. Diese Substanz wurde ebenfalls im Fluoreszenz-basierten Assay vermessen und auch die ermittelten %-Inhibitionswerte gegen DV2pro waren vergleichbar mit denen der „gelben Substanz“ (Tabelle 17) und bestätigten damit das Ergebnis, dass es sich bei der synthetisierten Substanz tatsächlich um die „gelbe Substanz“ aus der roten Inhibitor-Stammlösung handelte.

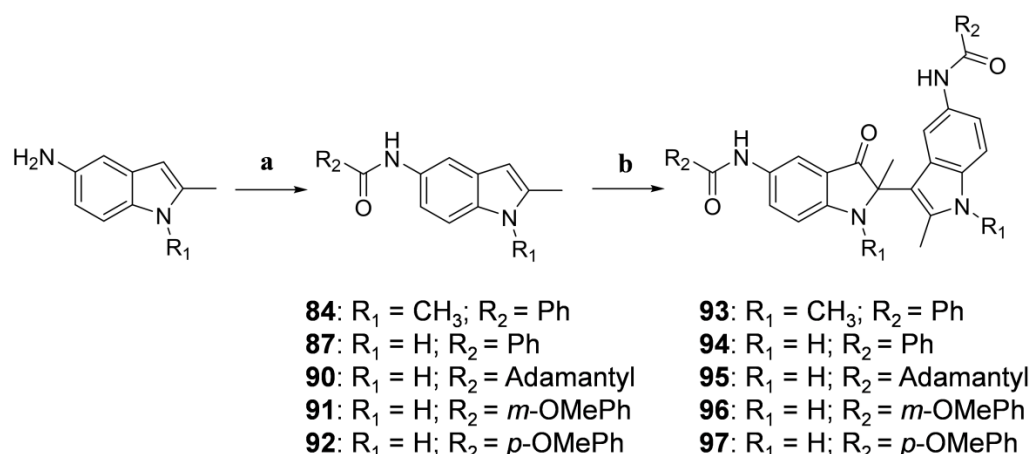
Konzentration im Assay	„gelbe Substanz“ synthetisiert nach <i>Kong et al.</i> ⁹⁵	„gelbe Substanz“ isoliert
100 µM	99,8%	99,9%
50 µM	98,3%	99,7%

Tabelle 17. %-Inhibitionswerte aus dem Fluoreszenz-basierten Assay gegen DV2pro der nach *Kong et al.* synthetisierten „gelben Substanz“ und der isolierten „gelben Substanz“.

2.2.5. Synthese und biologische Testung der zweiten Serie

2.2.5.1. Synthese der zweiten Serie

Um Struktur-Wirkungs-Beziehungen ableiten zu können, sollten weitere Derivate von **94** synthetisiert werden. Zur Synthese wurde wieder die von *Kong et al.* publizierte Vorschrift verwendet (Schema 13), nur im Fall von **99** ($R_2 = \text{Acetyl}$, Schema 14) konnte keine Produktbildung unter diesen Reaktionsbedingungen beobachtet werden.



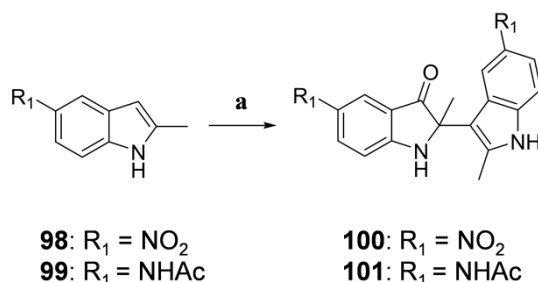
Schema 13. Synthese der zweiten Serie. (a) Carbonsäure, HBTU, NMM, DMF, RT, 12h, 26 – 86%; (b) TEMPO, $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, Aceton, 0°C , 0,5h, 34 – 65%.

Daher musste die Synthese angepasst werden, da **101** (Schema 14) wichtig für das Ableiten von Struktur-Wirkungs-Beziehungen war. Es wurden daher unterschiedliche Bedingungen zur Synthese von **101** getestet (siehe Tabelle 18).

Nr.	Lösungsmittel	Zeit	TEMPO	$\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	HCl	Temp.	Umsatz
1.	Aceton	2h	0,40 eq	0,14 eq	Nein	0°C	0
2.	Aceton	4h	0,80 eq	0,28 eq	Nein	0°C	0
3.	Aceton	2h	0,40 eq	0,14 eq	Nein	RT	+
4.	Aceton	3h	0,40 eq	0,14 eq	Nein	Reflux	+
5.	MeCN	3h	0,40 eq	0,14 eq	Nein	Reflux	0
6.	DCM	3h	0,40 eq	0,14 eq	Nein	Reflux	0
7.	DCM/MeOH	0,5 h	0,40 eq	Nein	Ja	RT	+
8.	DCM/Aceton	0,25 h	0,90 eq	Nein	Ja	RT	+
9.	DCM/MeOH	0,5 h	Nein	Nein	Ja	RT	0
10.	DCM/MeOH	10 min	0,90 eq	Nein	Ja	0°C	++
11.	DCM/MeOH	1 min	1,20 eq	Nein	Ja	0°C	+++

Tabelle 18. Reaktionsbedingungen für **101** (0 = kein Umsatz; + = wenig Umsatz. ++ = Umsatz +++ vollständiger Umsatz (DC Kontrolle)).

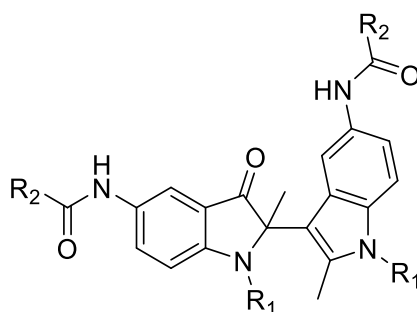
Bedingung Nr. 11 führte schließlich zum Erfolg und es konnte die benötigte Substanz **101** synthetisiert werden. Darüber hinaus war es mit dieser Vorschrift möglich, Substanzen mit starken negativen Mesomerie- und negativen induktiven-Effekten in der 5-Position (Nitro-Gruppe) am Grundgerüst umzusetzen (**100**), dies war mit der von *Kong et al.* publizierten Vorschrift, auch unter Verwendung von Benzoesäure, nicht möglich. Erst durch ein Weglassen von Kupfer(II)-chlorid und das Hinzufügen von HCl als wesentlich stärkere Säure, anstatt von Benzoesäure, konnte Produktbildung beobachtet werden (Schema 14). Darüber hinaus konnte die Anzahl an Nebenprodukten durch diese Methode und durch Absenken der Reaktionstemperatur auf 0 °C deutlich vermindert und die Reaktionszeit auf <1 Minute begrenzt werden. Dank der durchgeführten Veränderungen ist die Synthese von *Kong et al.* auf ein größeres Spektrum an Edukten anwendbar und mehr Inhibitoren mit der beschriebenen Grundstruktur sind nun zugänglich.



Schema 14. Synthese von **100** und **101**. (a) (TEMPO), HCl, Aceton, 0°C, 0,5h, 51%.

2.2.5.2. Assay Ergebnisse

Die Substanzen wurden von *Manuel Kanitz* im Fluoreszenz-basierten Assay und im TSA gegen DV2pro und DV3pro vermessen und konnten die Protease bis zu einem IC₅₀ von 6,95 μM (DV2pro) und 4,87 μM (DV3pro) inhibieren (Tabelle 19). Die Temperaturverschiebungen, welche durch die Inhibitoren hervorgerufen wurden, waren im Vergleich zu Aprotinin (9,6 °C bei DV2pro) weniger ausgeprägt. Die stärksten Verschiebungen konnten bei **96** sowohl bei DV2pro als auch bei DV3pro festgestellt werden. Generell waren die Schmelzpunktverschiebungen des Proteins im TSA, die durch die Inhibitoren hervorgerufen wurden, bei DV2pro weniger stark ausgeprägt als bei DV3pro (Tabelle 19).



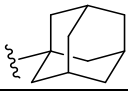
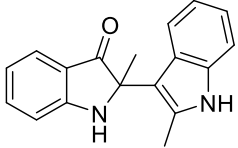
Inhibitor	R ₁	R ₂	IC ₅₀ [μM] DV2pro	IC ₅₀ [μM] DV3pro	ΔT [(°C)] DV2pro	ΔT [(°C)] DV3pro
93	CH ₃	Ph	8,15 ± 0,56	9,05 ± 0,96	0,39 ± 0,00	2,7 ± 0,35
94	H	Ph	14,73 ± 0,73	11,76 ± 0,67	0,06 ± 0,58	1,0 ± 0,50
95	H		7,78 ± 0,85	4,87 ± 0,33	0,56 ± 0,29	2,0 ± 0,76
96	H	<i>m</i> -MePh	6,95 ± 0,77	10,76 ± 0,86	1,39 ± 0,00	3,0 ± 0,71
97	H	<i>p</i> -OMePh	8,43 ± 1,02	9,64 ± 0,92	0,22 ± 0,29	2,5 ± 0,29
101	H	CH ₃	12,5% Inhibition bei 100 μM	n.b.	n.b.	n.b.
89			28,7% bei 150 μM	n.b.	n.b.	n.b.

Tabelle 19. Messwerte der zweiten Serie und **89** gegen DV2pro und DV3pro (n.b.: nicht bestimmt).

2.2.5.3. Struktur-Wirkungs-Beziehung

Nach Auswertung der erhaltenen Inhibitionskonstanten fällt auf, dass auch die am Indolstickstoff methylierte Substanz **93** DV2pro und DV3pro mit einem vergleichbaren IC₅₀ inhibiert wie **94**. Das Weglassen der Amidfunktion und der Aromaten führt zu einem nahezu vollständigen Inhibitionsverlust (**89**, Abbildung 38 (28,7% Inhibition bei 150 μM gegen DV2pro)). Der Wegfall der Aromaten unter Beibehaltung der Amidfunktion (**101**) führt ebenfalls zu einem Verlust der Inhibition (12,5% Inhibition bei 100 μM gegen DV2pro). Die Variationen, die an den beiden Aromaten durchgeführt wurden, haben dahingegen keinen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität der Verbindungen, auch ein Austausch der Aromaten gegen einen sterisch anspruchsvollen Adamantylrest führt nicht zum Inhibitionsverlust. Mit dieser Serie lässt sich bereits eine Aussage über Inhibitoren auf Basis dieser Grundstruktur treffen, da es außer hydrophoben Substituenten am Amid und dem Grundgerüst keine essentiellen Strukturvoraussetzungen zu geben scheint. Da die SAR der synthetisierten Verbindungen insgesamt flach und eine Selektivität weder für

DV2pro noch für DV3pro zu erkennen war und die Temperaturverschiebungen durch die Verbindungen im TSA nur gering ausgeprägt waren, wurde im Folgenden überprüft, ob die Inhibition der Protease eventuell durch nicht-spezifische Effekte zustande kommt. Falls die Inhibitoren die Protease spezifisch inhibieren, sollte darüber hinaus geklärt werden, ob die Inhibitoren die Protease kompetitiv oder nicht-kompetitiv inhibierten. Für diese Untersuchungen wurde **96** ausgewählt, da diese Verbindung im DV2pro Fluoreszenz-basierten Assay den stärksten Effekt zeigte und auch die im TSA von DV2pro hervorgerufene Verschiebung der Schmelztemperatur durch diese Verbindung am größten war.

2.2.6. Hit Validierung

2.2.6.1. Optimierung der verwendeten Assay-Systeme

2.2.6.1.1. DMSO-Gehalt im Assay-System

Da die Verbindungen der zweiten Serie nur relativ geringe Löslichkeiten aufwiesen, sollten sowohl der Fluoreszenz-basierte Assay als auch der TSA in Bezug auf den maximal möglichen DMSO-Gehalt hin optimiert werden, um diese schwerlösliche Substanzen hinreichend für den Assay lösen zu können. Insbesondere im Hinblick auf Fragment-basierte Substanzbibliotheken ist ein möglichst hoher DMSO-Gehalt im Assay wünschenswert, da es bei Fragmenten ebenfalls zu Löslichkeitsproblemen (in Folge der sehr hohen einzusetzenden Fragment-Konzentrationen) kommen kann. Die mangelnde Löslichkeit kann wiederum zu falsch negativen oder falsch positiven Ergebnissen führen, da sich das entsprechende Fragment nicht im Assay-Puffer löst.⁹⁶

2.2.6.1.2. DMSO-Gehalt im Thermal-Shift-Assay von DV2pro und DV3pro

Zunächst wurde der DMSO-Gehalt im TSA mit DV2pro und DV3pro optimiert, um eine bessere Löslichkeit der Inhibitoren zu erreichen. Der DMSO-Gehalt im TSA lag ursprünglich bei 2,5% (v/v) (siehe Tabelle 20)

Bestandteil	Volumen
99,8 μl Puffer + 0,2 μl <i>Sypro Orange</i>	36 μl
Protein 5 mg/ml	3 μl
DMSO oder Inhibitor	1 μl

Tabelle 20. Zusammensetzung des TSA-Reaktionsansatzes in jedem Well.

Unter Beibehaltung der ursprünglich im Assay verwendeten Proteinkonzentration und einer Verdopplung der *Sypro Orange* Konzentration (99,6 μl Puffer + 0,4 μl *Sypro Orange*) wurde die DMSO Konzentration stufenweise erhöht. Bis zu einer DMSO-Konzentration von 30% (v/v) verändert sich die Schmelztemperatur nicht, danach sinkt die Schmelztemperatur deutlich mit steigendem DMSO-Gehalt, das Protein wird also destabilisiert (siehe Abbildung 39 und Abbildung 40).

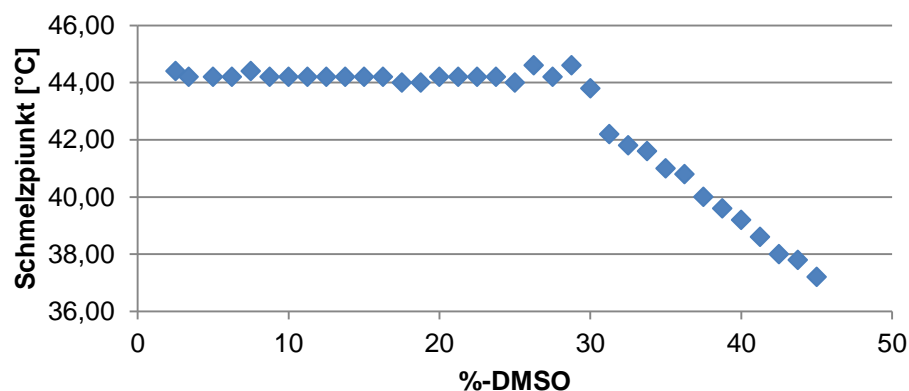


Abbildung 39. Schmelzpunkt von DV3pro in Abhängigkeit der DMSO-Konzentration.

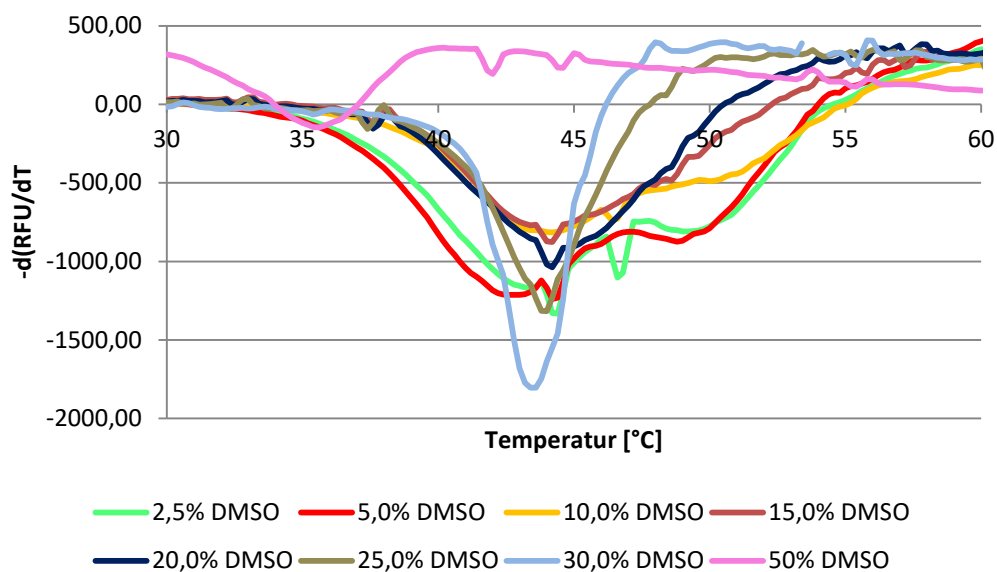


Abbildung 40. 1. Ableitung der Schmelztemperaturkurve von DV3pro bei steigenden DMSO-Konzentrationen.

Bei einer Konzentration von 35% ist zwar der Schmelzpunkt der DV3pro um ca. 3 °C abgesenkt, die Qualität der erhaltenen Kurven ist aber immer noch ausreichend, um einen Schmelzpunkt bestimmen zu können (Abbildung 41).⁹⁷ Bei 40% DMSO ist der Schmelzpunkt um etwa 4 °C abgesenkt, bei 45% DMSO um ca. 7 °C (Abbildung 39). Ab einer DMSO-Konzentration von über 40% wird das Protein so stark destabilisiert, dass es in Lösung fast vollständig denaturiert vorliegt und keine Schmelztemperaturkurven mehr erhalten werden konnten (siehe Abbildung 40, 50% DMSO). Da von DV2pro nur eine begrenzte Menge an Protease zur Verfügung stand, wurden, auf Grund des hohen Bedarfs an Protease für den TSA, zur Bestätigung der bei DV3pro beobachteten Effekte für DV2pro lediglich Messungen ab einer DMSO-Konzentration von 35% durchgeführt. Das Verhalten der DV2pro gegenüber DMSO im TSA war vergleichbar und es konnten auch bei 35% DMSO, trotz einer leichten Destabilisierung des Proteins, noch auswertbare Kurven erhalten werden,⁹⁷ der Schmelzpunkt von DV2pro bei 35% DMSO liegt um ca. 2 °C höher als der von DV3pro (siehe Abbildung 41).

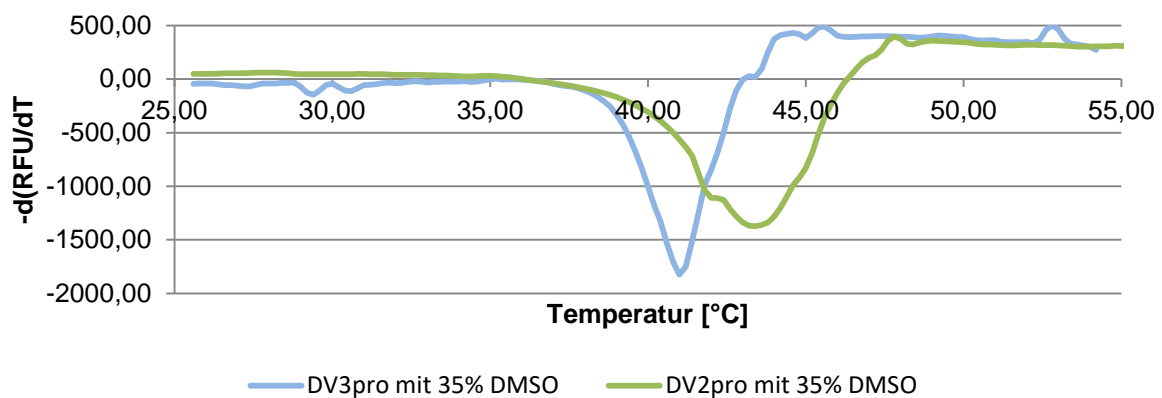


Abbildung 41. 1. Ableitung der Schmelztemperaturkurve von DV2pro und DV3pro bei 35% DMSO.

Generell ist also eine Durchführung des TSA mit einer DMSO-Konzentration von bis zu 30% problemlos möglich, darüber kommt es zu einer schrittweisen Destabilisierung des Proteins und die Qualität der Schmelzpunktkurven nimmt ab. Da aber die Löslichkeit der getesteten Substanz die einzige Limitierung bei der Durchführung eines TSA darstellt,⁹⁸ kann eine moderate Destabilisierung des Proteins und eine verringerte Qualität der Schmelzpunktkurven zugunsten einer nochmals erhöhten DMSO-Konzentration von über 30% (maximal 40% DMSO) in Kauf genommen werden, da dieser sehr hohe DMSO-Gehalt dazu genutzt werden kann, auch schwach bindende Liganden der Dengue-Protease, wie z.B. Fragmente, die in sehr hohen Konzentrationen eingesetzt werden

müssen, zu identifizieren. Diese Versuche bildeten zugleich den Ausgangspunkt für eine Optimierung des DMSO-Gehalts im Fluoreszenz-basierten Assay.

2.2.6.1.3. DMSO-Gehalt im Fluoreszenz-basierten Assay von DV3pro

Nach Erhöhung des DMSO-Gehaltes im TSA sollte der DMSO-Gehalt im Fluoreszenz-basierten Assay ebenfalls erhöht werden. Die DMSO-Konzentration des Assay-Puffers (50 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid (Tris-HCl), 1 mM CHAPS bei pH 9) wurde schrittweise erhöht und jeweils die Proteaseaktivität bestimmt. Als Maß für die Proteaseaktivität wurde die Spaltung des fluorogenen Substrats (Phac-Lys-Arg-Arg-AMC) pro Zeiteinheit bestimmt und die resultierende Steigung in Abhängigkeit von der DMSO Konzentration aufgetragen (Abbildung 42).

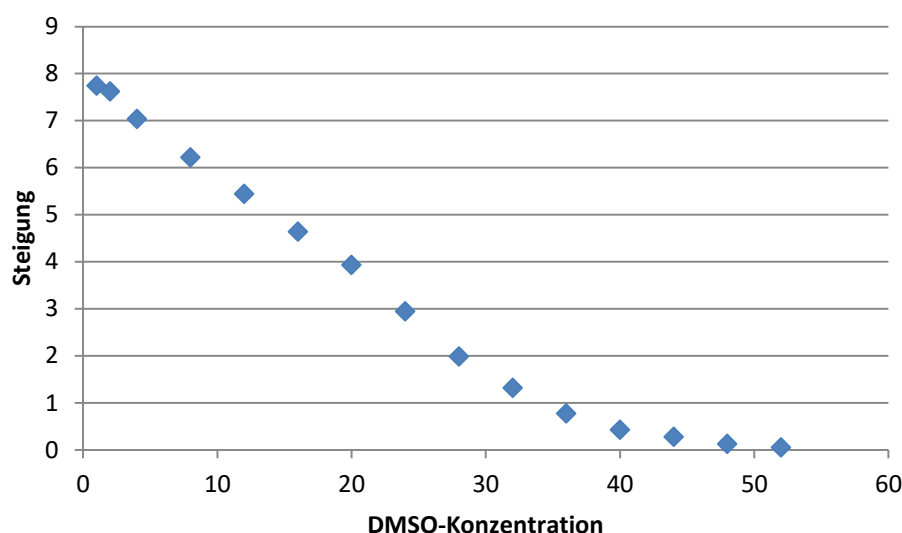


Abbildung 42. Proteaseaktivität von DV3pro in Abhängigkeit von der DMSO-Konzentration.

Mit steigender DMSO-Konzentration nimmt die Aktivität der Protease immer weiter ab, bis sie schließlich bei ca. 40% DMSO zum Erliegen kommt. Bei einer Konzentration von 20% DMSO hat die Protease noch eine Restaktivität von 50%, bei 28% DMSO immerhin noch eine Restaktivität von ca. 25%. Die Aktivität der Protease ist also bei einem DMSO-Gehalt von 20% im Assaypuffer immer noch ausreichend, um Inhibitionskonstanten bestimmen zu können.

2.2.6.1.4. DMSO-Gehalt in der Kristallisation

Nachdem der DMSO-Gehalt sowohl im TSA als auch im Fluoreszenz-basierten Assay gesteigert werden konnte, wurde versucht diese Ergebnisse auf das Soaking von

Inhibitoren in DV3pro zu übertragen (Soaking: Tränken von Proteinkristallen in Inhibitorlösung, mit dem Ziel ligandgebundene Strukturen von Protein und Inhibitor zu erhalten). Durch einen erhöhten DMSO-Gehalt im Soaking lassen sich Fragmente und Inhibitoren in einer höheren Konzentration einsetzen, da diese dann besser im Puffer löslich sind. Für das Soaking konnte ein maximaler DMSO-Gehalt von 35% erreicht werden; bei dieser Konzentration war ein Soaking in einer Inhibitorlösung von **96** für 22 Stunden möglich. Der Datensatz, der so erhalten wurde, hatte eine Auflösung von ca. 2 Å, wurde aber nicht abschließend verfeinert, da kein Inhibitor gebunden hatte.

2.2.6.1.4. Zusammenfassung

Im TSA und beim Soaking von DV3pro Kristallen kann mit einer DMSO-Konzentration von bis zu 30% gearbeitet werden, im Fluoreszenz-basierten Assay mit einer DMSO-Konzentration von bis zu 20%, ohne gravierende Einbußen bei der Genauigkeit der verwendeten Methoden in Kauf nehmen zu müssen. Der Einsatz von DMSO ist aber nicht nur durch die Proteaseaktivität sondern auch durch die Beschaffenheit der Bindetasche der Dengue-Protease limitiert. Die Bindetasche ist, wie in Kapitel 2.1.8.2. beschrieben, sehr Solvent-exponiert, durch diese Eigenschaft kann DMSO in der Lage sein, den Inhibitor aus der Bindetasche zu verdrängen und damit den Inhibitionseffekt abzuschwächen. Der Inhibitor löst sich folglich besser im Puffer und eine Desolvatation aus dem Puffer, um Interaktionen mit der Bindetasche des Proteins auszubilden, wird erschwert. Infolge der verbesserten Löslichkeit von Inhibitoren in Assaypuffern mit einem hohen DMSO-Gehalt können diese aber in wesentlich höheren Konzentrationen eingesetzt werden und dementsprechend können wichtige Hinweise auf mögliche Inhibitionseffekte, von z.B. Fragmenten, in hohen Konzentrationsbereichen erhalten werden.

Assay	Regulärer DMSO-Gehalt	Maximaler DMSO-Gehalt
Fluoreszenz-basierter Assay	1,0%	20,0%
Thermal-Shift-Assay	2,5%	30,0%
Soaking von Kristallen	5,0%	35,0%

Tabelle 21. DMSO-Gehalt der Assay-Systeme.

2.2.6.2. DLS Experimente

Für die weiteren Tests der Hit-Validierung wurde, wie oben beschrieben, ebenfalls die Verbindung **96** ausgewählt, da diese den niedrigsten IC_{50} der gesamten Serie gegen DV2pro aufwies.

Nachdem optisch eine schlechte Löslichkeit im ursprünglichen Assaypuffer beobachtet worden war, sollte die Löslichkeit der Substanz im Assaypuffer näher mithilfe der dynamischen Lichtstreuung untersucht werden.

2.2.6.2.1. Dynamische Lichtstreuung

Dynamische Lichtstreuung (DLS) kann eingesetzt werden, um Aggregate in Lösung zu detektieren. Hierbei strahlt ein Laser Licht in die zu untersuchende Lösung. Das Streulicht, welches durch Partikel in der Lösung erzeugt wird, kann durch einen Detektor, der im 90° Winkel zum Laser angebracht ist, detektiert werden. Anhand der Intensität und der Frequenz des Streulichtes kann die Anzahl und Größe von Partikeln in Lösung bestimmt werden.⁸ Die Durchführung der DLS-Messung wird näher im experimentellen Teil beschrieben.

2.2.6.2.2. Ermittlung der CMC von Verbindung **96**

Aus den Vorversuchen war bereits bekannt, dass sich **96** nur schlecht im Assaypuffer löst. Da sich hydrophobe Substanzen in Lösung zu Aggregaten zusammenlagern können, um ihre Kontaktfläche mit dem polaren Lösungsmittel (Wasser im Fall des Assaypuffers) zu verringern, wurde die kritische Mizellbildungs-konzentration (CMC) von **96** bestimmt. Die CMC ist die Konzentration, unterhalb der die einzelnen Moleküle frei in Lösung vorliegen und keine Aggregate mehr ausbilden. Oberhalb dieser Konzentration bilden sich Molekülaggregate, die Zielstrukturen unspezifisch inhibieren können⁸ (siehe Kapitel 3). Zur Bestimmung der CMC wurde **96** in steigenden Konzentrationen im Assaypuffer gelöst und mit dem DLS-Gerät vermessen. Das so erhaltene DLS-Signal wurde gegen die Konzentration aufgetragen und die CMC mittels zweier Ausgleichsgeraden bestimmt (Abbildung 43).

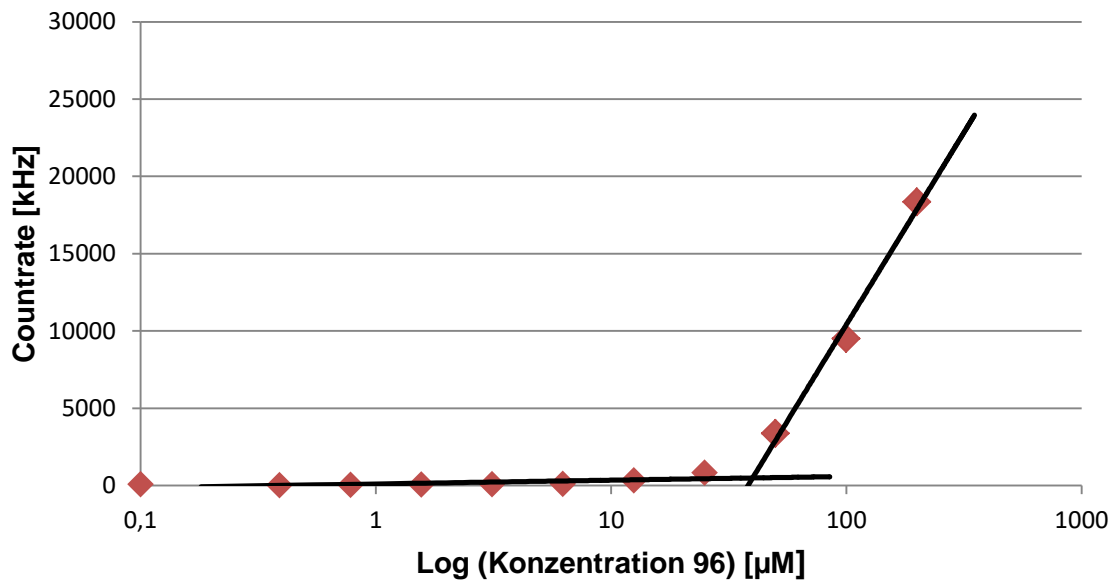


Abbildung 43. Bestimmung der CMC von **96** mittels DLS.

Die CMC von **96** im Assaypuffer mit 1% DMSO liegt zwischen 25 bis 50 µM, also oberhalb des IC_{50} dieser Substanz. Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von **96** nicht auf eine Vortäuschung durch Bildung von Aggregaten zurückzuführen sein dürfte, da auch noch unterhalb der CMC Inhibitionseffekte beobachtet werden konnten. Es wurden jedoch noch weitere Messungen mithilfe des DLS-Gerätes durchgeführt, um das Ergebnis der CMC Messung zu überprüfen. Hierzu wurde in einem weiteren Versuch der Einfluss der DMSO-Konzentration auf die Aggregatbildung von **96** bestimmt, da davon ausgegangen wurde, dass eine steigende DMSO-Konzentration im Assaypuffer den Inhibitor besser in Lösung halten kann und Aggregate erst bei einer höheren Konzentration auftreten. Hierzu wurden 25 µM **96** im Assaypuffer mit steigenden DMSO-Konzentrationen gelöst. Aus Tabelle 22 geht hervor, dass die Zahl an Partikeln mit steigender DMSO-Konzentration abnimmt, die %-Inhibition aber gleich bleibt (*Countrates* ab ca. 500 kHz deuten bei Verwendung des Gerätes *Spectro Size 300* der Firma *XtalConcepts* auf Aggregate hin). Gleiches konnte auch bei einer Konzentration von 12,5 µM **96** beobachtet werden, auch hier nimmt die Anzahl an Partikeln mit steigender DMSO-Konzentration ab, die %-Inhibitionswerte sind aber gleichbleibend oder steigen sogar leicht mit steigender DMSO-Konzentration. Das Auflösen der Aggregate führt aber nicht zu einer Verringerung der Inhibitionseffekte, daher inhibiert **96** die Dengue-Protease spezifisch und nicht durch Aggregat-Bildung.

Konzentration Verbindung 96	DMSO- Konzentration im Puffer [%]	DLS-Signal (Countrate) [kHz]	%-Inhibition
Blank	1	80 ± 53	
25,0 µM	1	955 ± 80	80,0%
25,0 µM	2	658 ± 94	85,6%
25,0 µM	4	395 ± 57	86,9%
25,0 µM	6	326 ± 39	90,8%
25,0 µM	8	366 ± 30	89,0%
12,5 µM	0,5	715 ± 264	39,4%
12,5 µM	1	383 ± 102	49,3%
12,5 µM	2	300 ± 148	44,4%
12,5 µM	4	328 ± 169	53,4%
12,5 µM	6	104 ± 51	55,5%

Tabelle 22. Abhängigkeit der DLS-Countrate und %-Inhibition von **96** bei 25,0 und 12,5 µM von der DMSO-Konzentration (Countrates ab ca. 500 kHz deuten auf Aggregate hin).

2.2.6.3. Einsatz von Detergenzien zur Hit-Validierung bei der Dengue-Protease

2.2.6.3.1. Einfluss von Triton X-100 auf Verbindung **96**

Eine häufig verwendete Methode um abzuklären, ob ein Inhibitor seine Zielstruktur durch spezifische Interaktionen oder durch unspezifische Effekte inhibiert, besteht in der Durchführung des Assays unter Zusatz von Detergentien.⁹⁹ Diese brechen die Molekülaggregate auf, die zu einer unspezifischen Inhibition führen und verhindern so eine Vortäuschung der Inhibition der Zielstruktur durch diese Molekülaggregate. Der Einfluss von Detergenzien auf die Inhibition der Protease durch **96** sollte daher näher untersucht werden, da im DLS Aggregate bis zu einer DMSO-Konzentration von 4% detektiert wurden. Als Detergenz für diese Tests wurde der Literatur folgend⁸ Triton X-100 ausgewählt, da dieses aufgrund seiner nicht-ionischen und Aggregat-aufbrechenden Eigenschaften häufig bei Tests auf unspezifische Inhibition Verwendung findet.^{8,99} In Tabelle 23 sind die Inhibitionswerte von **96** gegen die DV2pro aufgeführt, gemessen im Standard-Assaypuffer mit 1 mM CHAPS oder mit 0,01% Triton X-100.

Konzentration Verbindung 96	%-Inhibition bei 0,01% (v/v) Triton X-100	%-Inhibition bei 0,061% (w/v) CHAPS
25 µM	11,6	95,9
50 µM	18,2	98,8
100 µM	21,5	99,8

Tabelle 23. %-Inhibition der DV2pro durch **96** im gleichen Puffer mit unterschiedlichem Detergenz.

Aus den Daten geht hervor, dass die Inhibition der DV2pro durch **96** durch den Austausch von CHAPS gegen Triton X-100 negativ beeinflusst wird. Dieser Effekt überrascht, da **96** die Protease auch unterhalb der CMC inhibiert und die Inhibitionseffekte so nicht auf unspezifische Interaktion von Molekülaggregaten und der Protease zurückzuführen sein sollten. Um diesen Einfluss von Triton X-100 auf die Inhibition der DENV-2 Protease näher zu untersuchen, wurden unterschiedliche publizierte Inhibitoren gegen die DV2pro in einem Assaypuffer mit 0,01% Triton X-100 anstatt CHAPS als Detergenz getestet und die Inhibitionswerte mit denen verglichen, die mit einem Assaypuffer erhalten wurden, der 1 mM CHAPS enthielt.

2.2.6.3.2. Einfluss von Triton X-100 auf einen bestätigten Inhibitor von DV2pro

Wie beschrieben, wurde nach Inhibitoren gesucht, die ein ähnliches Verhalten wie **96** nach der Zugabe von Triton X-100 im Assaypuffer anstelle von CHAPS zeigten. Dieser Versuch sollte abklären, ob der Verlust der inhibitorischen Potenz von **96** nach Triton X-100 Zugabe keinen Hinweis auf eine unspezifische Inhibition der Protease zulässt. Zu diesem Zweck wurde ein Inhibitor (**63**, Tabelle 7, durch *Hongmei Wu*, Arbeitsgruppe von *Prof. Dr. Tanja Schirmeister*, *Johannes Gutenberg-Universität Mainz*, zur Verfügung gestellt) einer von *Wu et al.*⁶⁹ publizierten Serie verwendet und zunächst per DLS auf Aggregatbildung und anschließend im Fluoreszenz-basierten Enzymassay unter Verwendung von Triton X-100 untersucht. **63** weist einen IC_{50} von $4,2 \pm 0,44 \mu\text{M}$ gegen DENV-2 und $0,99 \pm 0,1 \mu\text{M}$ gegen DENV-3 auf, in einem Virus-Replikations-Assay zeigte **63** einen EC_{50} von $0,8 \pm 0,2 \mu\text{M}$.⁶⁹ Da die Fähigkeit dieses Inhibitors die Dengue-Protease zu inhibieren durch einen weiteren Assay bestätigt wurde, eignet er sich, den Einfluss von Triton X-100 zu untersuchen, da eine spezifische Inhibition der Dengue-Protease als gesichert angesehen werden kann. Zunächst wurde per DLS untersucht, ab welcher Konzentration **63** im Assaypuffer Aggregate bildet. Hierzu wurde das Signal des Standard-Assaypuffers mit 1 mM CHAPS als Detergenz (Blindwert) mit dem Signal von **63** (in verschiedenen Konzentrationen) im gleichen Puffer verglichen (siehe Tabelle 24).

Konzentration Verbindung 63	DLS-Signal
Blindwert	44 ± 53 kHz
12,5 µM	24 ± 15 kHz
25,0 µM	39 ± 12 kHz
50,0 µM	118 ± 28 kHz
100,0 µM	735 ± 119 kHz
200,0 µM	5705 ± 870 kHz

Tabelle 24. DLS-Signal von **63** im Assaypuffer (1mM CHAPS, 1% DMSO) in unterschiedlichen Konzentrationen.

Die CMC von **63** liegt zwischen 50 µM und 100 µM und damit deutlich oberhalb des IC₅₀ von **63** gegen die DV2pro und DV3pro. Da es sich bei **63** um einen spezifischen Inhibitor handelt, der keine Aggregate bildet, sollte Triton X-100 als Detergenz keinen Einfluss auf die Inhibition der Protease durch **63** haben.⁸ Tabelle 25 zeigt die %-Inhibitions-Werte gegen DV2pro, die mit 0,01% Triton im Puffer für **63** erhalten wurden.

Konzentration Verbindung 63	%-Inhibition bei 0,01% (v/v) Triton X-100	%-Inhibition bei 0,061% (w/v) CHAPS
12,5 µM	8,9	93,5
25 µM	11,4	97,4
50 µM	31,6	99,1

Tabelle 25. Inhibition der DENV-2 Protease durch **63** in zwei Puffern bei unterschiedlichen Konzentrationen.

Die Daten in Tabelle 25 zeigen, dass Triton X-100 auch die Inhibition der Protease durch einen bestätigten spezifischen Inhibitor beeinflusst, der erst ab 50 µM Aggregate bildet. Bei einer Konzentration von 25 µM liegt im Standard-Assaypuffer komplette Inhibition vor. Im Puffer, in dem Triton X-100 anstelle von CHAPS verwendet wird, wird die DV2pro bei gleicher Konzentration von **63** nur noch marginal inhibiert (11% Inhibition). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde entschieden, den Einfluss des häufig verwendeten Detergenzes Triton X-100 auf spezifische Binder systematisch zu untersuchen (siehe Kapitel 3).

2.2.6.4. Bestimmung des Bindungsmodus

2.2.6.4.1. Ausgangssituation

Für ein strukturbasiertes Wirkstoffdesign ist, wie in Kapitel 2.1.10. beschrieben, die Bestimmung des Bindungsmodus eines Inhibitors essentiell, um zusammen mit den Informationen, die in biologischen Assays erhalten werden, die Inhibitionseigenschaften

systematisch verbessern zu können. Aus diesem Grund wurde versucht, eine Kristallstruktur von **96** im Komplex mit DV2pro und DV3pro zu erhalten.

2.2.6.4.2. Kristallstruktur

Die röntgenkristallographischen Untersuchungen wurden von *Manuel Kanitz* durchgeführt. Hierfür wurde die Technik der Kokristallisation und des Soakings verwendet. Es konnten jedoch mit diesen beiden Techniken keine Strukturen der Inhibitoren im Komplex mit der Dengue-Protease erhalten werden.

2.2.6.4.3. Quenching Assay

Da eine Bestimmung des Bindungsmodus von **96** im Komplex mit der NS2B-NS3 Protease des DENV über röntgenkristallographische Analysen nicht erfolgreich war, sollte bestimmt werden, ob **96** im aktiven Zentrum der Protease bindet oder in einer allosterischen Bindetasche, wie für **63** von *Wu et al.*⁶⁹ vorgeschlagen. Zunächst wurde die erhaltene Inhibitionskurve von **96** nach Dixon ausgewertet, um einen ersten Hinweis auf den Bindungsmodus (kompetitiv oder nicht-kompetitiv) zu erhalten. Da der Dixon-Plot keine eindeutige Aussage bezüglich eines kompetitiven oder nicht kompetitiven Bindungsmodus lieferte, wurde ein weiterer Assay verwendet, der einen Schluss auf das Bindeverhalten von **96** an die Dengue-Protease zulässt. Hierzu wurde ein von *Bodenreider et al.*¹⁰⁰ etablierter Assay verwendet. Inhibitoren, die im aktiven Zentrum der Dengue-Protease binden, können mittels eines Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) zwischen dem Inhibitor und einem Tryptophan in der Nähe der Bindetasche identifiziert werden (in Abbildung 44 markiert, Trp50).¹⁰⁰ Hierbei ist zu beachten, dass die Absorptionswellenlänge des Inhibitors im Bereich der Emissionswellenlänge des Tryptophans liegt und der Abstand zwischen den beiden Strukturen nicht mehr als 10 nm beträgt,¹⁰¹ da nur dann ein FRET zwischen dem Tryptophan und dem Inhibitor auftritt und eine Bindung ermittelt werden kann. Durch ein Verdrängen des Inhibitors durch Aprotinin (inhibiert DV2pro mit einem IC₅₀ von 25,6 nM), welches mit einer höheren Affinität im aktiven Zentrum bindet als der Inhibitor, wird der Inhibitor aus dem aktiven Zentrum verdrängt. Infolgedessen kann Trp50 wieder fluoreszieren, da zwischen Aprotinin und dem entsprechenden Tryptophan kein FRET stattfindet. Wenn ein FRET nach Zugabe des Inhibitors auftritt, das sich nicht durch die Zugabe von Aprotinin unterbinden lässt, dann bindet der Inhibitor zwar an die Dengue-Protease, aber nicht im aktiven Zentrum, sondern in der Nähe der 4 anderen Tryptophane (Trp61 (NS2B), Trp69,

Trp83, Trp89 (alle NS3)) (Abbildung 44), die an der Oberfläche von DV3pro lokalisiert sind.

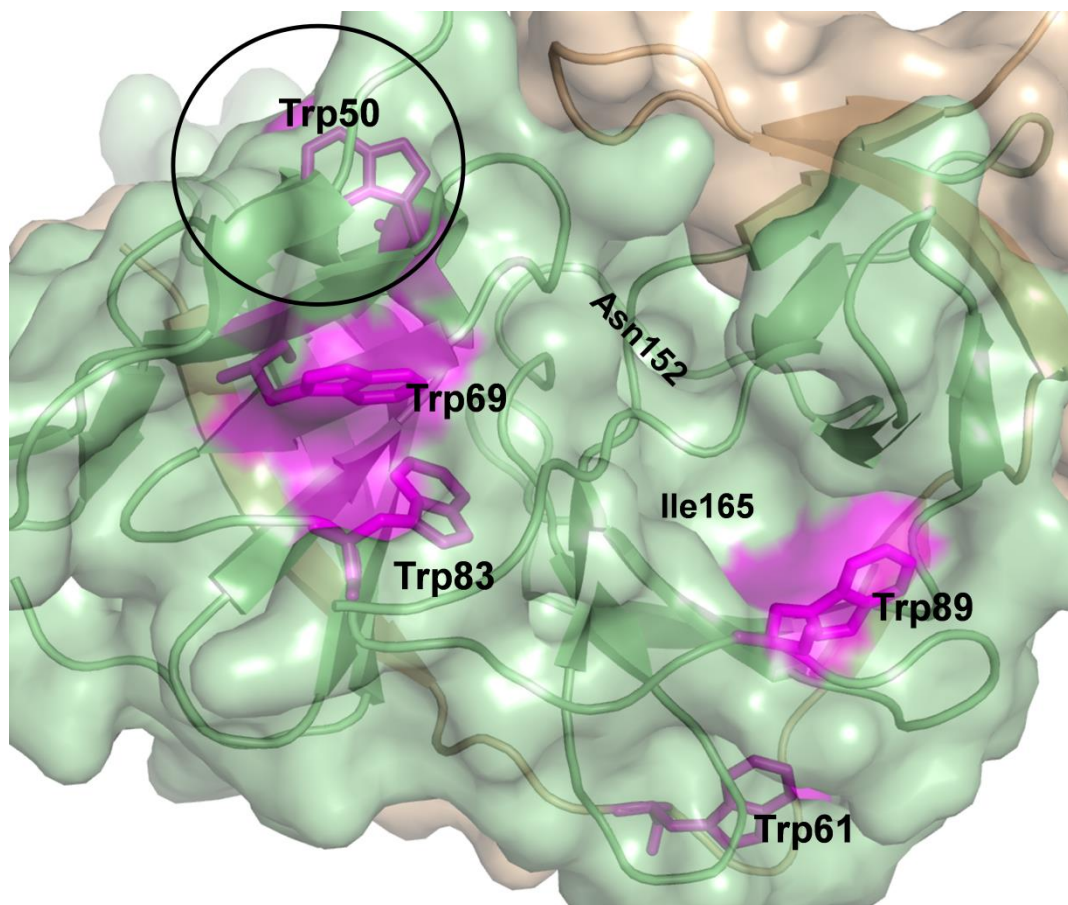


Abbildung 44. Tryptophane in DV3pro (PDB-Code: 3U1I). Die Tryptophane (Trp61 von NS2B; Trp50, Trp69, Trp83 und Trp83 von NS3) sind cyan dargestellt, der Co-Faktor NS2B in beige und NS3 in grün (Blick auf die allosterische Bindetasche mit Asn152 und Ile165; das aktive Zentrum befindet sich auf der gegenüberliegenden Seite).

Die genaue Durchführung des Versuchs ist in der Publikation von *Bodenreider et al.*¹⁰⁰ und im experimentellen Teil dieser Arbeit beschrieben, daher wird im Folgenden lediglich auf die Ergebnisse dieses Versuchs eingegangen. Nach Zugabe von **96** konnte ein konzentrationsabhängiges *Quenching* der Tryptophan-Emission beobachtet werden, nach Zugabe von Aprotinin (Endkonzentration im Assay: 20 μM) veränderte sich das Signal jedoch nicht (Tabelle 26), daher wird der Inhibitor nicht durch Aprotinin aus dem aktiven Zentrum verdrängt sondern bindet wahrscheinlich nicht-kompetitiv in der Nähe einer der in Abbildung 44 gezeigten Tryptophane. Für eine genaue Lokalisierung der Bindestelle müssten, wie von *Bodenreider et al.*¹⁰⁰ durchgeführt, alle Tryptophane einzeln mutiert werden, um festzustellen bei welcher Tryptophan-Mutante kein Quenching durch den Inhibitor mehr auftritt.

Konzentration Verbindung 96	Signal vor Aprotinin-Zugabe	Nach Aprotinin-Zugabe [20 μ M]
100 μ M	9859	10527
50 μ M	13248	13648
25 μ M	15399	15748
Blank	17436	

Tabelle 26. *Quenching*-Signal von **96** an DV3pro in Abhängigkeit der Konzentration (Eigenfluoreszenz von **96** berücksichtigt)

Da von *Wu et al.*⁶⁹ für **63** ein nicht-kompetitiver Bindungsmodus vorgeschlagen wurde, wurde für diese Substanz der *Quenching*-Assay analog durchgeführt. Die von *Wu et al.*⁶⁹ vorgeschlagene Bindestelle für **63** liegt auf der Rückseite des aktiven Zentrums, in der größten Vertiefung auf der Oberfläche der Dengue-Protease in der Nähe von Trp89 (siehe Abbildung 45). Aufgrund der räumlichen Nähe der postulierten Bindestelle von **63** zu Trp89 wäre ein *Quenching* der Tryptophan-Emission durch **63**, welches nicht durch die Zugabe von Aprotinin unterbunden wird, zu erwarten.

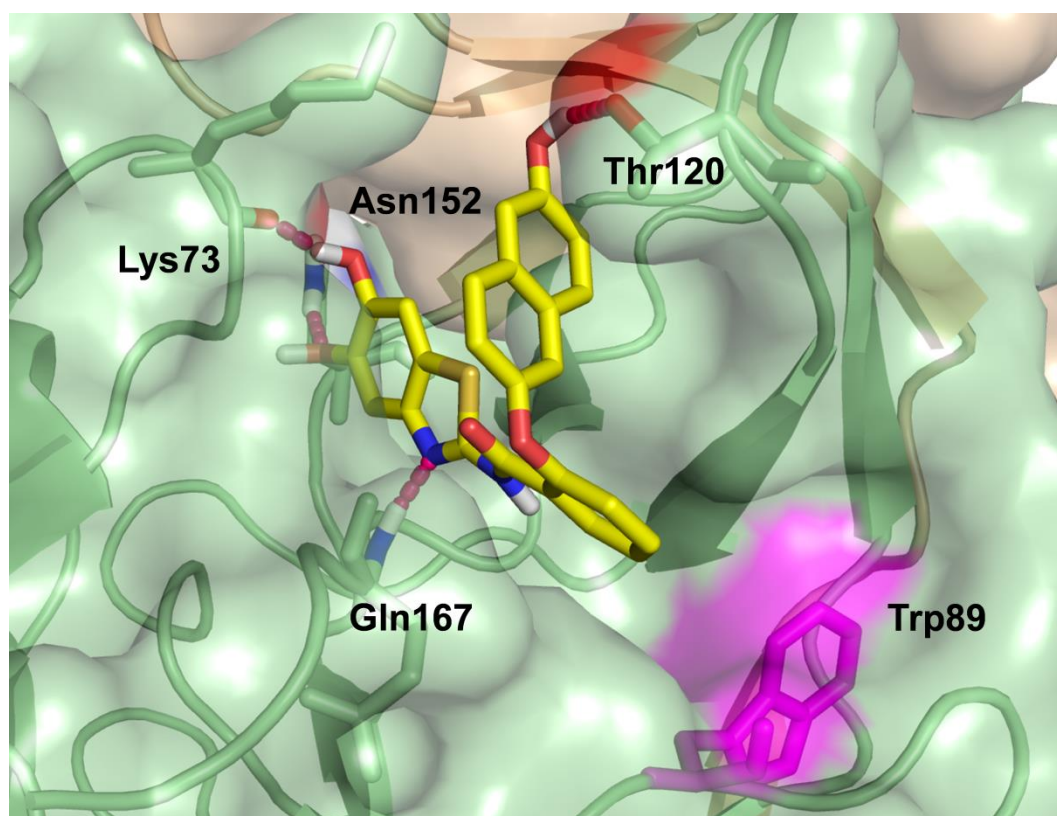


Abbildung 45. Von *Wu et al.* postulierter Bindungsmodus von **63** in der allosterischen Bindetasche in räumlicher Nähe zu Trp89. Die polaren Interaktionen von **63** zu Lys73, Thr120, Asn152 und Gln167 (alle NS3) sind als rote Linien dargestellt.⁶⁹

Konzentration 63	Signal vor Aprotinin-Zugabe	Nach Aprotinin- Zugabe [20 μ M]
100 μ M	9411	9700
50 μ M	11700	12110
25 μ M	13460	13931
Blank	16301	

Tabelle 27. *Quenching*-Signal von **63** an DV3pro in Abhängigkeit der Konzentration.

Die Werte in Tabelle 27 bestätigen auch im Fall von **63** die Vermutung, dass es sich um einen nicht-kompetitiven Inhibitor der DV3pro handelt, da auch hier nach Zugabe von Aprotinin die Fluoreszenz des Tryptophans nicht wieder hergestellt wird.

2.2.6.4.4. Möglicher Bindungsmodus von Verbindung **96** in der allosterischen Bindetasche

Aufgrund des ähnlichen Verhaltens von **96** und **63** im Fluoreszenz-*Quenching* Assay und der von *Wu et al.*⁶⁹ in der Nähe von Trp89 postulierten Bindestelle, ließe sich auch für **96** eine Bindestelle in der allosterischen Bindetasche in räumlicher Nähe zu Trp89 postulieren. Um die Möglichkeit einer Bindung von **96** in der allosterischen Bindetasche von DV3pro *in silico* zu überprüfen, wurde, analog zum Docking in Kapitel 2.2.1., ein Docking der beiden Stereoisomere von **96** in der allosterischen Bindetasche von DV3pro in der Struktur von *Noble et al.*⁷ (PDB-Code: 3U1I) durchgeführt.

Die beiden Stereoisomere von **96** gehen im Docking ähnliche Interaktionen mit der allosterischen Bindetasche der Protease ein und auch die *FlexX*-Scores sind vergleichbar (Abbildung 46a und b). Ein Unterschied ist aber, dass einer der in *meta*-Position substituierten Aromaten des *S*-Isomers bis zum Boden der allosterischen Bindetasche reicht und dort hydrophobe Interaktionen eingeht, während diese Interaktionen bei dem *R*-Isomer von **96** im Docking nicht stattfinden (Abbildung 46b). Im Folgenden wird aufgrund des im Docking gefundenen ähnlichen Bindungsmodus beider Stereoisomere von **96** nur ein möglicher Bindungsmodus des *S*-Isomers von **96** näher beschrieben.

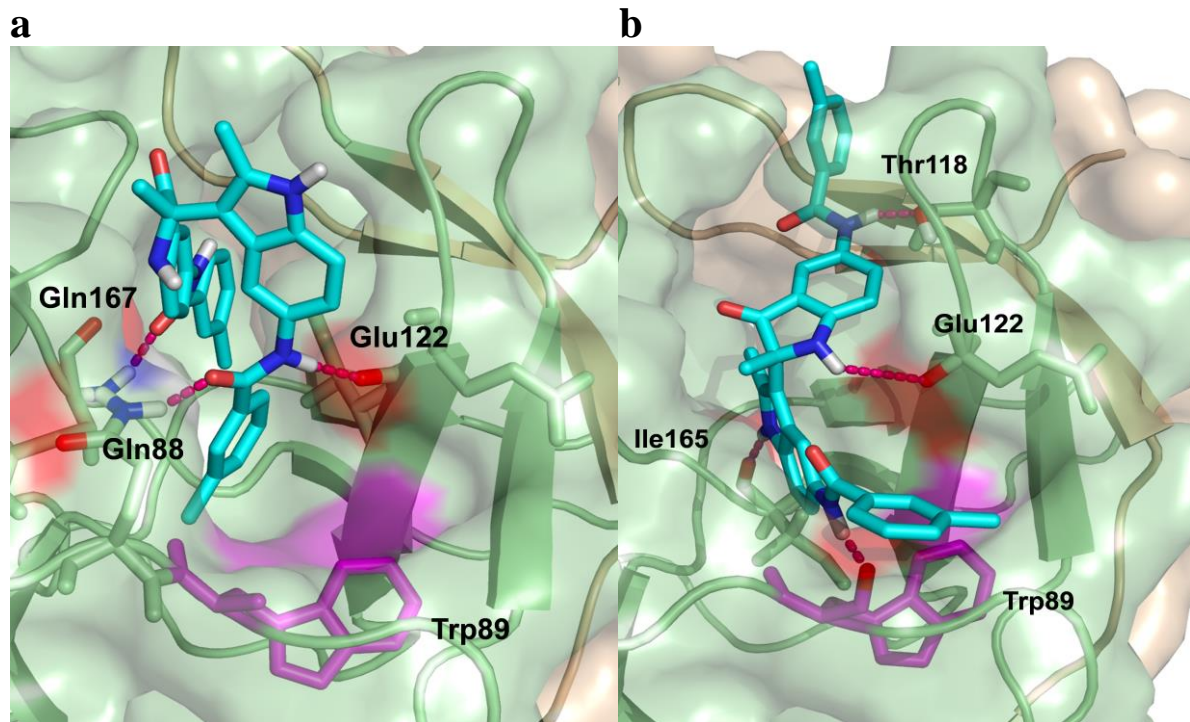


Abbildung 46. (a) Möglicher Bindungsmodus des *S*-Isomers von **96** in der allosterischen Bindetasche in räumlicher Nähe zu Trp89. Die polaren Interaktionen von **96** zu Gln88, Glu122, Gln167 (alle NS3) sind als rote Linien dargestellt. (b) Möglicher Bindungsmodus des *R*-Isomers von **96** in der allosterischen Bindetasche in räumlicher Nähe zu Trp89. Die polaren Interaktionen von **96** zu Trp89, Thr118, Glu122 und Ile165 (alle NS3) sind als rote Linien dargestellt.

Wie in Abbildung 46a zu sehen, geht das *S*-Isomer von **96** im Docking polare Interaktionen mit Gln88, Glu122 und Gln167 (NS3) ein. Weitere mögliche hydrophobe Interaktionen des *S*-Isomers von **96** und der Protease sind in Abbildung 47 gezeigt.

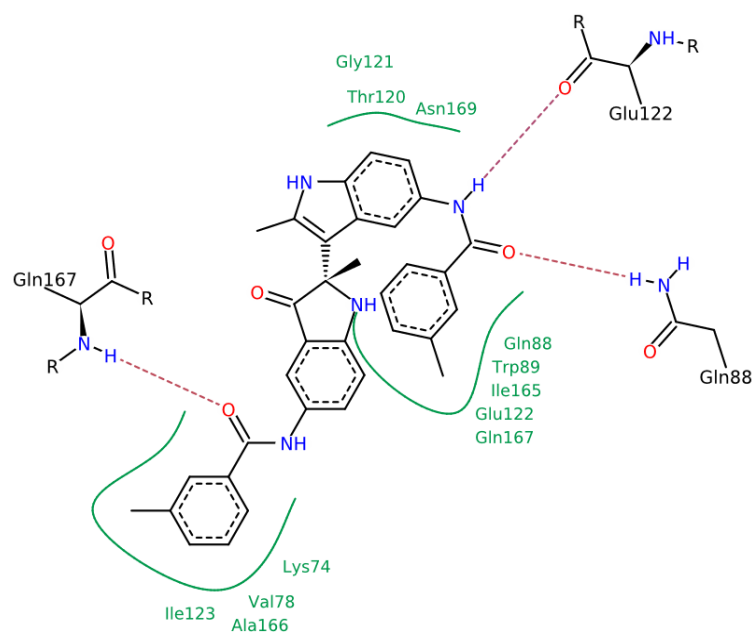


Abbildung 47. Von FlexX vorgeschlagener Bindungsmodus des *S*-Isomers von **96** (erzeugt mit PoseView von FlexX 2.1.8.⁷⁸).

Aus Abbildung 47 geht hervor, dass neben den drei polaren Wechselwirkungen zwischen dem *S*-Isomer von **96** und der allosterischen Bindetasche eine Reihe hydrophober Wechselwirkungen stattfinden könnte, wie z.B. am Grund der allosterischen Bindetasche zwischen dem in *meta*-Position substituierten Aromaten und Val78 (NS2B), Ile123 und Ala166 (beide NS3). Der zweite in *meta*-Position substituierte Aromat des *S*-Isomers von **96** geht im Docking unter anderem eine direkte Interaktion mit Trp89 ein, die das im *Quenching*-Assay beobachtete konzentrationsabhängige *Quenching* der Tryptophan-Emission durch **96** erklären könnte. Das durchgeführte Docking zeigt, dass beide Stereoisomere von **96** in der allosterischen Bindetasche in räumlicher Nähe zu Trp89 binden könnten. Um dieses Ergebnis experimentell zu bestätigen, müssten aber die verbleibenden vier Tryptophane einzeln mutiert werden, um festzustellen, ob der Inhibitor tatsächlich in der allosterischen Bindetasche und damit in der Nähe von Trp89 bindet, oder möglicherweise in räumlicher Nähe zu den drei anderen verbleibenden Tryptophanen (Trp61 (NS2B), Trp69 und Trp83 (beide NS3)).

2.3. Zusammenfassung

Das DENV stellt eine weltweit wachsende Bedrohung dar, wie auch jüngst durch Ausbrüche von mit dem DENV verwandten Viren, wie dem Gelb-Fieber-Virus¹⁰² und dem Zika-Virus¹⁰³ verdeutlicht wurde. Daher ist sowohl die Entwicklung eines Impfstoffes als auch die Entwicklung von Inhibitoren der Dengue-Protease wichtig, um dieses Virus zu bekämpfen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden spezifische, nicht-kompetitive Inhibitoren der DENV Protease synthetisiert. Dabei ist es gelungen, die Struktur eines Inhibitors aufzuklären und diesen durch eine einfache Syntheseroute in größeren Mengen darzustellen. Vor der Synthese weiterer Derivate galt es, eine spezifische Inhibition der Protease durch die bereits synthetisierten Inhibitoren abzusichern, da die wenig ausgeprägte SAR dieser Klasse möglicherweise durch eine nicht-spezifische Inhibition der Protease hervorgerufen wurde. Im Rahmen dieser Studien konnte im TSA der DMSO-Gehalt des Assaypuffers auf über 30% und im Fluoreszenz-basierten Assay auf 20% erhöht werden. Diese Ergebnisse ließen sich auf das Soaking von Kristallen von DV3pro übertragen, da hier erstmals diese Versuche mit einem DMSO-Gehalt von 35% ausgeführt werden konnten. Dieser sehr hohe DMSO-Anteil in den Assaysystemen ebnet wiederum den Weg für einen fragmentbasierten Ansatz bei der Suche nach neuen Inhibitoren der Dengue-Protease, da auch schwach bindende Fragmente nun in wesentlich höheren Konzentrationen eingesetzt werden können, als dies bisher möglich war. Die erhöhte DMSO-Konzentration, die Ergebnisse des DLS sowie die Daten des TSA und des Fluoreszenz-*Quenching* Assays lassen den Schluss zu, dass **96** sowohl die DENV-2 als auch die DENV-3 Protease sehr wahrscheinlich spezifisch inhibiert. Durch Einsatz eines Fluoreszenz-*Quenching* Assays konnte darüber hinaus eine nicht-kompetitive Inhibition der Protease durch **96** gezeigt werden. Leider kann aus den vorliegenden Daten noch nicht auf einen Bindungsmodus zurückgeschlossen werden, durch das durchgeführte Docking konnte jedoch eine mögliche Bindung von **96** in der allosterischen Bindetasche, in der Nähe von Trp89, gezeigt werden. Trotz des nicht experimentell bestätigten Bindungsmodus könnte die gefundene Grundstruktur einen guten Ausgangspunkt für weitere Strukturoptimierungen darstellen, da sie sich mit dem etablierten Syntheseverfahren leicht variieren lässt.

2.4. Ausblick

Die Aufklärung des Bindungsmodus des niedermolekularen Inhibitors in Komplex mit DV2pro oder DV3pro mittels Röntgenkristallographie wäre für die weitere Optimierung der vorliegenden Grundstruktur wertvoll. Auf diese Weise könnten die Interaktionen des nicht-kompetitiven Inhibitors mit dem Protein aufgeklärt und Informationen für ein strukturbasiertes Wirkstoffdesign erhalten werden. Sollte eine kristallographische Aufklärung des Bindungsmodus nicht gelingen, müssten, um die im Docking gefundene mögliche Bindestelle von **96** zu überprüfen, die vier verbliebenen Tryptophane systematisch mutiert und dann der Fluoreszenz-*Quenching* Assay erneut durchgeführt werden.¹⁰⁰ So könnte die wahrscheinlichste Bindestelle identifiziert und ausgehend von diesen Ergebnissen und weiteren systematischen Veränderungen der Grundstruktur der Ligand auch ohne genaue Kenntnisse des Bindungsmodus optimiert und der durch *in silico* Docking vorgeschlagene Bindungsmodus experimentell überprüft werden. Die durchgeführte Erhöhung der DMSO-Konzentration in den verfügbaren Assays und der Kristallisation kann verwendet werden, um ein Fragment-basiertes Wirkstoffdesign bei der Leitstruktursuche für die Dengue-Protease zu etablieren, da es nun möglich ist, wesentlich höhere Fragmentkonzentrationen einzusetzen. Die systematische Untersuchung der Effekte von Triton X-100, welches häufig in Inhibitorscreens eingesetzt wird, um auf spezifische Binder von Proteinen zu schließen, ist Gegenstand des dritten Kapitels dieser Arbeit.

3. Identifikation von falsch-negativen Hits in Triton X-100 Screens

3.1. Einleitung

Das nachfolgende Kapitel wurde im Juli 2016 zur Publikation eingereicht, der Text und die Abbildungen dieses Manuskriptes wurden ins Deutsche übersetzt. Der Autor dieser Dissertation hat alle Messungen, soweit nicht anders kenntlich gemacht, selbst durchgeführt, die Daten initial interpretiert und bei der Erstellung des Manuskriptes mitgewirkt.

Das Identifizieren von unspezifischen Inhibitoren und damit die Identifikation von falsch-positiven Treffern in einer Screening-Kampagne ist häufig eine große Herausforderung auf der Suche nach neuen Startstrukturen in der frühen Phase der Arzneimittelforschung. Falls unspezifische Inhibitoren nicht frühzeitig erkannt werden, könnten wertvolle Ressourcen in die Entwicklung von Verbindungen investiert werden, die viele Targets lediglich durch einen unspezifischen Mechanismus inhibieren. Die Bildung von Aggregaten in Lösung ist häufig die Ursache für unspezifisches Bindeverhalten und kann, wie im 2. Kapitel dieser Arbeit beschrieben, per DLS identifiziert werden. Das „Binden“ von Enzymen an die Oberfläche dieser Molekül-Assoziate führt dann zu einer scheinbaren Inhibition.¹⁰⁴

Diese scheinbare Inhibition von Enzymen durch Molekülaggregate kann durch Hinzufügen eines Detergenzes zum Assaypuffer vermieden werden, indem das Detergenz die Adsorption des Enzyms an die Molekülaggregate verhindert und in höheren Konzentrationen diese Aggregate auflöst. Für diesen Zweck wird häufig das nicht-ionische Detergenz Triton X-100 verwendet, welches in Konzentrationen von bis zu 0,1% (v/v) dem Assaypuffer zugesetzt wird.^{105,106,8} Eine Erhöhung des ursprünglichen bestimmten IC_{50} -Wertes des Inhibitors in Gegenwart des Detergenzes Triton X-100 wird als Indiz für ein unspezifisches Bindeverhalten des Inhibitors durch Bildung von Molekülaggregaten gewertet.⁸ Neben dem Zusatz von Detergenz zum Assaypuffer, um die Bildung von Aggregaten und somit die unspezifische Inhibition durch Molekülaggregate zu verhindern, kommen auch andere Methoden zum Einsatz, die im Folgenden beschrieben werden. Da Enzyme von Inhibitor-Aggregaten nicht durch einen klassischen kompetitiven Mechanismus inhibiert werden, führt eine Erhöhung der Enzymkonzentration oder das Hinzufügen von Bovinem Serum Albumin (BSA) zu einer

Verschlechterung des ursprünglich ermittelten IC_{50} -Wertes.¹⁰⁷ Dieser Effekt lässt sich durch eine Zunahme der Konzentration an freiem Enzym in der Lösung erklären, da die Oberflächen der Molekülaggregate entweder von Enzym oder BSA abgesättigt werden können. Da die Inhibition durch Aggregat-bildende Inhibitoren zeitabhängig ist, führt ein Vorinkubieren von Enzym und Inhibitor oftmals zu einem verringerten IC_{50} .¹⁰⁷ Ein weiteres Anzeichen für eine unspezifische Inhibition durch Molekülaggregate sind ungewöhnlich steil verlaufende Inhibitionskurven (Hill-Steigung $>1,5$) oder die Inhibition nicht-verwandter Enzymfamilien.^{105,8,108,109}

Wie in Kapitel 2.2.6.3. beschrieben, führte der Einsatz von Triton X-100 im Assaypuffer zu einem Inhibitionsverlust von **63** und **96**, während der Einsatz von CHAPS als Detergenz keinen Einfluss auf den IC_{50} -Wert der genannten Inhibitoren nahm. Schon *Padmanabhan et al.*¹¹⁰ und *Lim et al.*¹⁰⁰ hatten beobachtet, dass der Einsatz von Triton X-100 auch unterhalb der CMC (CMC von ungefähr 0,02%) zu Problemen bei Fluoreszenz-basierten Affinitäts-Assays der Dengue- und West-Nil-Protease führte.

Um tiefere Einblicke in dieses ungewöhnliche Phänomen zu erhalten, wurde der Effekt von Triton X-100 näher untersucht. Aufgrund der Tatsache, dass für die in dieser Arbeit synthetisierten Dengue-Inhibitoren keine Kristallstruktur vorlag und die Anzahl an synthetisierten Inhibitoren begrenzt war, wurde entschieden, die Studien an den in unserem Arbeitskreis etablierten Aspartylproteasen HIV-1-Protease und Endothiapepsin (EP) durchzuführen. Für diese beiden Enzyme sind im Arbeitskreis Inhibitor-Serien vorhanden, die sowohl eine schlüssige SAR als auch einen definierten Bindungsmodus aufweisen, wie durch zahlreiche Kristallstrukturen der Inhibitoren in Komplex mit dem jeweiligen Zielenzym (HIV-1-Protease oder EP) gezeigt werden konnte. Darüber hinaus wurde bereits von *Dr. Kerstin Linde* (ebenfalls Arbeitskreis *Diederich, Philipps-Universität Marburg*) ein Effekt von Triton X-100 auf Inhibitoren der HIV-1-Protease beobachtet, jedoch nicht vertieft systematisch untersucht.¹¹¹

Ähnlich wie bei **63** und **96** beobachtet, beeinflusste das Detergenz Triton X-100 auch im Fall der untersuchten Aspartylproteasen die entsprechenden Assayergebnisse. Überraschenderweise wurde die Affinität mancher der bekannten spezifischen Inhibitoren der oben genannten Enzyme deutlich beeinflusst, während andere, strukturell verwandte Inhibitoren, vollständig unbeeinflusst blieben. Dieses Phänomen kann letztendlich zu falsch-negativen Ergebnissen in Screens, in denen Triton X-100 verwendet wird, führen und hätte in diesem Fall den Ausschluss dieser Inhibitoren von weiteren Studien zur

Folge, obwohl diese als exzellente Ausgangspunkte für eine weitere Strukturoptimierung dienen könnten.

3.2. Ergebnisse

Um auszuschließen, dass die erhaltenen Ergebnisse auf eine Störung des gesamten Assaysystems durch Triton X-100 zurückzuführen sind, wurde zunächst die Aktivität der beiden Proteasen unter den jeweiligen Standard-Assaybedingungen (1 mg/ml BSA für HIV,¹¹² 0,001% TWEEN 20 für EP¹¹³; genaue Pufferzusammensetzung siehe Tabelle 28 und Tabelle 29; die Durchführung des Assays wird im experimentellen Teil dieser Arbeit beschrieben) ermittelt. Zusätzlich wurde die Aktivität der Proteasen ohne zugesetztes Detergenz und mit zwei unterschiedlichen Triton X-100 Konzentrationen als Detergenz ermittelt. Ohne Detergenzzusatz ist die Aktivität der HIV-1-Protease im Vergleich zu den Standardbedingungen signifikant verringert, wohingegen die Aktivität von EP nur minimal beeinflusst wird (Abbildung 48). Dieser Effekt lässt sich wahrscheinlich auf eine verringerte Proteinkonzentration in Lösung durch Anhaften der Protease an die Wandungen der Vertiefungen in der Mikrotiterplatte zurückführen.

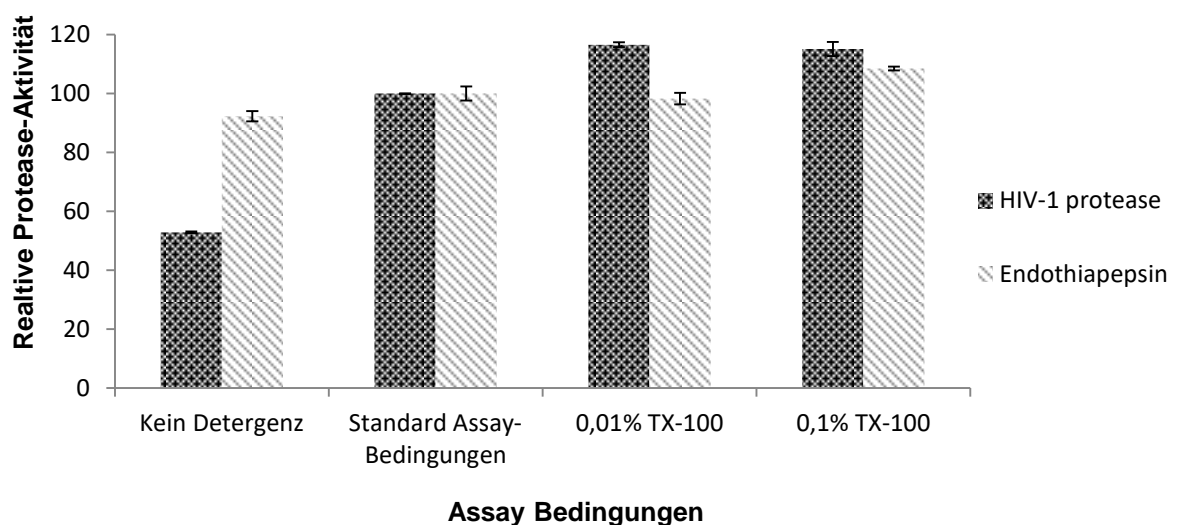


Abbildung 48. Aktivität der HIV-1-Protease und Endothiapepsin relativ zu den Standard-Assaybedingungen (100%). Die Zusammensetzung des Puffers ist in Tabelle 28 (HIV-1-Protease) und Tabelle 29 (Endothiapepsin) angegeben.

Im Anschluss wurde der K_i -Wert von Pepstatin, einem etablierten peptidischen Inhibitor von Aspartylproteasen, für die beiden Enzyme unter Verwendung der unterschiedlichen Assaybedingungen ermittelt. Die K_i -Werte für beide Proteasen wurden innerhalb der Fehlertoleranz des Assays nicht durch steigende Mengen Detergenz beeinflusst und sind vergleichbar mit den in der Literatur publizierten Werten (Tabelle 28 und Tabelle 29).

Assay Bedingungen HIV	Puffer	K _i [μM]
Standard-Assaybedingungen	100 mM MES, 300 mM KCl, 5 mM EDTA, pH 5,5 1 mg/ml BSA	1,28 ± 0,07
Kein Detergenz	100 mM MES, 300 mM KCl, 5 mM EDTA, pH 5,5	0,92 ± 0,25
0,01% Triton X-100	100 mM MES, 300 mM KCl, 5 mM, EDTA, pH 5,5 0,1% Triton X-100	2,46 ± 0,05
0,1% Triton X-100	100 mM MES, 300 mM KCl, 5 mM EDTA, pH 5,5 0,1% Triton X-100	1,50 ± 0,18
Literatur ¹¹⁴	50 mM NaAc, pH 5,5	1,1*

Tabelle 28. K_i-Werte von Pepstatin gegen die HIV-1-Protease in unterschiedlichen Puffern bestimmt (für mit * gekennzeichnete Werte wurde kein Fehler angegeben).

Assay Bedingungen EP	Puffer	K _i [nM]
Standard-Assaybedingungen	0,1 M NaAc pH 4,6 0,001% Tween	3,13 ± 0,11
Kein Detergenz	0,1 M NaAc pH 4,6	3,00 ± 0,11
0,01% Triton X-100	0,1 M NaAc pH 4,6 0,01% Triton X-100	2,83 ± 0,20
0,1% Triton X-100	0,1 M NaAc pH 4,6 0,1% Triton X-100	2,52 ± 0,50
1 mg/ml BSA	0,1 M NaAc pH 4,6 1 mg/ml BSA	3,19 ± 0,13
Literatur ¹¹⁵	Gemessen bei 37 °C, pH 3,1	0,5*

Tabelle 29. K_i-Werte von Pepstatin gegen Endothiapepsin in unterschiedlichen Puffern bestimmt (für mit * gekennzeichnete Werte wurde kein Fehler angegeben).

Da gezeigt werden konnte, dass Triton X-100 in Konzentrationen von bis zu 0,1% keinen Einfluss auf den Fluoreszenz-basierten Assay oder auf die Affinität von Pepstatin gegen die HIV-1-Protease oder EP hat, wurden unterschiedliche Inhibitoren^{112,116} aus unserer Aspartylproteasen-Bibliothek gegen die HIV-1-Protease, unter Verwendung folgender Assaybedingungen, gemessen: 1) ohne Detergenz, 2) mit 0,01% Triton X-100 und 3) mit 0,1% Triton X-100. Dann wurden die prozentualen Inhibitionswerte (%-Inhibitionswerte), die mindestens bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen erhalten wurden, miteinander verglichen und nur nach solchen Wertepaaren gesucht, die eine signifikant geringere %-Inhibition im Assaypuffer mit 0,01% oder 0,1% Triton X-100, im Vergleich zum Assaypuffer ohne Detergenz, gezeigt hatten. Auf diese Weise können nach einem von *Shoichet et al.*¹⁰⁵ etablierten Protokoll potentiell unspezifische Inhibitoren identifiziert werden. Unter Anwendung dieses Screening-Protokolls konnten zahlreiche Inhibitoren

aufgedeckt werden, die dieses Verhalten zeigten, für weitere Untersuchungen wurden dann zwei dieser Verbindungen ausgewählt (Tabelle 30, Tabelle 31 und Tabelle 32).

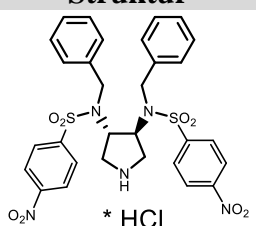
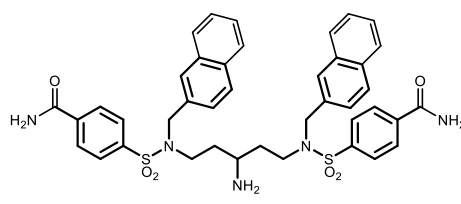
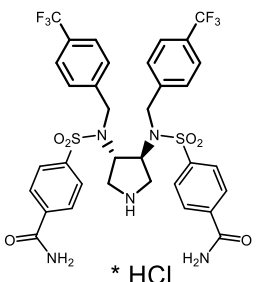
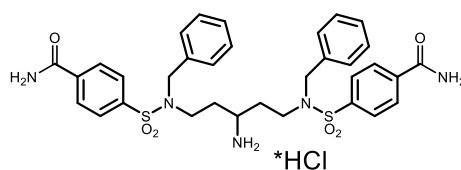
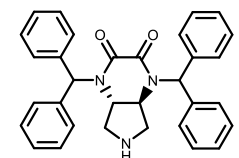
Verbindung	Struktur	Verbindung	Struktur
102		104	
103		105	
		106	

Tabelle 30. Strukturen der verwendeten Inhibitoren **102** bis **106**.

Verbindung	Assay Bedingungen	K_i [μM]
102	Standard-Assaybedingungen	1,72 ¹¹²
	Kein Detergenz	1,04 \pm 0,09
	0,01% Triton X-100	13% Inhibition bei 200 μM
	0,1% Triton X-100	n.b.

Tabelle 31. K_i -Werte der Verbindung **102** gegen die HIV-1-Protease in unterschiedlichen Puffern bestimmt. Die Zusammensetzung der Puffer ist in Tabelle 28 angegeben (n.b.: nicht bestimmt)

Verbindung	Assay Bedingungen	K_i [μM]
103	Standard-Assaybedingungen	0,07 ¹¹²
	Kein Detergenz	0,16 \pm 0,01
	0,01% Triton X-100	0,18 \pm 0,01
	0,1% Triton X-100	55% Inhibition bei 6,25 μM

Tabelle 32. K_i -Werte der Verbindung **103** gegen die HIV-1-Protease in unterschiedlichen Puffern bestimmt. Die Zusammensetzung der Puffer ist in Tabelle 28 angegeben.

Im Fall der Verbindung **102** führte die Zugabe von Triton X-100 in einer Konzentration von 0,01% zum Assaypuffer zu einem nahezu kompletten Verlust ihrer inhibitorischen

Potenz. Unter Anwendung der oben erwähnten Regel von *Shoichet et al.*, würde Verbindung **102** als unspezifischer Inhibitor klassifiziert werden, obwohl er aus einer Serie von HIV-1-Protease Inhibitoren stammt, die eine schlüssige SAR aufweisen.¹¹² Darüber hinaus wurde jüngst eine Kristallstruktur dieser Verbindung in Komplex mit der verwandten HTLV-1-Protease publiziert.¹¹⁷

Im Gegensatz zu Verbindung **102** wurden für Verbindung **103**, einer analogen Substanz aus der gleichen Serie, ähnliche K_i -Werte ohne Detergenz und mit 0,01% Triton X-100 im Assaypuffer erhalten. Jedoch wurde ein massiver Abfall der inhibitorischen Potenz bei 0,1% Triton X-100 im Assaypuffer beobachtet. Der Abfall der Affinität tritt dabei schrittweise mit steigender Triton X-100 Konzentration auf (Abbildung 49). Die Affinität anderer Verbindungen dieser Liganden-Serie wurde nicht oder nur geringfügig durch 0,1% oder 0,01% Triton X-100 im Assaypuffer beeinflusst und die Inhibitions-Daten (%-Inhibition für mindestens zwei Inhibitor-Konzentrationen bestimmt) stimmten mit den Werten überein, die unter Verwendung der Standard-Assaybedingungen ermittelt wurden.

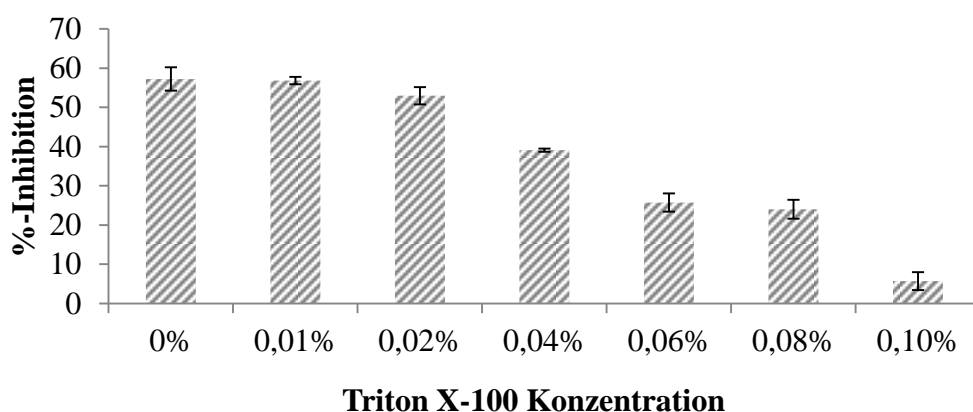


Abbildung 49. %-Inhibitionswerte von Verbindung **103** [500 nM] gegen die HIV-1-Protease, mit steigender Triton X-100 Konzentration im Assaypuffer (100 mM MES, 300 mM KCl, 5 mM EDTA, pH 5,5) bestimmt.

Mit diesen widersprüchlichen Ergebnissen wurde als nächstes eine Serie von Inhibitoren¹¹¹ von EP untersucht. Zugleich dienten diese Versuche der Bestätigung der bereits erhaltenen Ergebnisse und dem Nachweis, dass die Effekte von Triton X-100 auf spezifische Inhibitoren nicht auf die Dengue- und HIV-1-Protease beschränkt sind und auch weitere Grundstrukturen betroffen sein können. Tatsächlich konnten im Fall der Amin-basierten Inhibitoren Verbindung **104** und Verbindung **105** (Tabelle 30) wiederum ein Abfall in den bestimmten K_i -Werten beobachtet werden. Der K_i -Wert verschlechterte sich unter Zusatz von 0,01% Triton X-100 um den Faktor 4 für Verbindung **105** und um den Faktor 20 für Verbindung **104**, verglichen mit dem K_i -Wert, der ohne Detergenz im

Assaypuffer erhalten wurde (Tabelle 33 und Tabelle 34). Demzufolge wären sowohl Verbindung **104** als auch Verbindung **105** als unspezifische Inhibitoren klassifiziert worden, obwohl auch sie aus einer Serie von Verbindungen stammen, die eine schlüssige SAR aufweisen. Für Verbindung **105** wird die Design-Hypothese durch eine kürzlich bestimmte Kristallstruktur des Inhibitors im Komplex mit EP unterstützt (von *Manuel Kanitz* durchgeführt) Darüber hinaus sind die K_i -Werte, welche unter Standard-Assaybedingungen bestimmt wurden, vergleichbar mit den K_i -Werten, die ohne Detergenz im Assaypuffer bestimmt wurden.

Verbindung	Assay Bedingungen	K_i [μ M]
104	Standard-Assaybedingungen	0,55 ¹¹¹
	Kein Detergenz	0,90 \pm 0,04
	0,01% Triton X-100	53% Inhibition bei 25 μ M
	0,1% Triton X-100	28% Inhibition bei 100 μ M

Tabelle 33. K_i -Werte der Verbindung **104** gegen EP, gemessen in unterschiedlichen Puffern. Die Zusammensetzung der Puffer ist in Tabelle 29 angegeben.

Verbindung	Assay Bedingungen	K_i [μ M]
105	Standard-Assaybedingungen	2,8 ¹¹¹
	Kein Detergenz	5,2 \pm 0,29
	0,01% Triton X-100	20,5 \pm 0,74
	0,1% Triton X-100	25% Inhibition bei 100 μ M

Tabelle 34. K_i -Werte der Verbindung **105** gegen EP, gemessen in unterschiedlichen Puffern. Die Zusammensetzung der Puffer ist in Tabelle 29 angegeben.

Da bis zu diesem Punkt der Untersuchungen alle Verbindungen, die ihre inhibitorische Potenz nach Zugabe von Triton X-100 zum Assaypuffer verloren hatten, hydrophob waren und einen clog P größer als 4,5 (clog P-Werte wurden mit ChemBioDraw³⁵ berechnet) hatten, sollte nun untersucht werden, ob dieses Phänomen mit der Hydrophobizität der Verbindungen korrelierte. Daher wurden weitere HIV-1-Protease Inhibitoren untersucht, die einen clog P von mehr als 4,5 aufwiesen. Die Affinität des Pyrrolidin-basierten Inhibitors **106** (Tabelle 30), welcher ein einstellig nanomolarer Inhibitor der HIV-1-Protease mit einem clog P von 6,4 ist, wurde jedoch nicht durch die Zugabe von unterschiedlichen Triton X-100 Konzentrationen im Assaypuffer beeinflusst (Tabelle 35). Daher können die beobachteten Effekte von Triton X-100 auf die Affinität

von Inhibitoren nicht direkt mit der hydrophoben Natur oder den K_i -Werten der Verbindungen verknüpft werden.

Verbindung	Assay Bedingungen	K_i [nM]
106	Standard-Assaybedingungen	7^{116}
	Kein Detergenz	$13,4 \pm 1,12$
	0,01% Triton X-100	$18,9 \pm 2,48$
	0,1% Triton X-100	$20,4 \pm 1,78$

Tabelle 35. K_i -Werte der Verbindung **106** gegen die HIV-1-Protease, gemessen in unterschiedlichen Puffern. Die Zusammensetzung der Puffer ist in Tabelle 28 angegeben.

Nach dem allgemein anerkannten Screening-Protokoll⁸ für die Identifikation von Aggregatoren wären Verbindung **102**, Verbindung **103**, Verbindung **104** und Verbindung **105** als unspezifische Inhibitoren klassifiziert und von weiteren Untersuchungen und Optimierungen möglicherweise ausgeschlossen worden. Diese vier Verbindungen gehören aber zu zwei Serien mit einer in sich schlüssigen SAR und der Bindungsmodus innerhalb dieser Serien wurde über röntgenkristallographische Analysen bestätigt. Retrospektiv betrachtet, unter Berücksichtigung der zusätzlich verfügbaren Daten, sind Verbindung **102**, Verbindung **103**, Verbindung **104** und Verbindung **105** spezifische Inhibitoren der jeweiligen Protease. Daher führte das Screening in unserem Fall zu einer Identifikation von falsch-negativen Hits. Um falsch-negative Hits frühzeitig in einem Triton X-100 Screen zu identifizieren, wurde nach einem zusätzlichen Screening-Protokoll gesucht. Wie schon erwähnt, führte die Zugabe von BSA zum HIV-1-Protease- und EP-Assay bei Pepstatin zu K_i -Werten für die beiden Proteasen, die vergleichbar mit den in der Literatur beschriebenen Werten waren. Da aber BSA aufgrund seiner Eigenschaften nicht immer die beste Wahl ist, wurde nach weiteren Detergenzien gesucht, die im Assay eingesetzt werden können.⁹⁹ Es stellte sich heraus, dass die besten Ergebnisse erhalten wurden, wenn das zwitter-ionische Detergenz CHAPS in einer Konzentrationen bis 0,01% (v/v) zum Assaypuffer gegeben wurde. Im Fall von Verbindung **103** und Verbindung **104** führte sogar die Zugabe von 0,1% CHAPS zum Assaypuffer nur zu einer geringfügigen Veränderung der %-Inhibitionswerte bei einer Konzentration von 1 μ M und der K_i -Werte, während Triton X-100 als Detergenz die inhibitorische Potenz sehr deutlich verringerte (Abbildung 50, Tabelle 36).

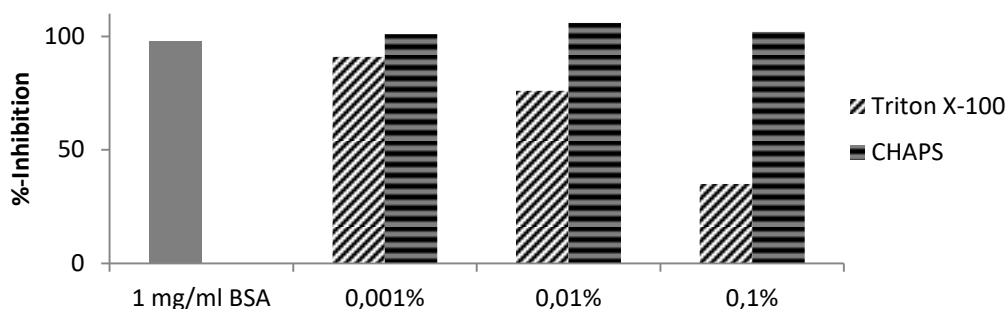


Abbildung 50. %-Inhibition der Verbindung **103** [1 μM] gegen die HIV-1-Protease gemessen mit 1 mg/ml BSA und steigenden Triton X-100 und CHAPS Konzentrationen im Assaypuffer.¹¹¹

Verbindung	Protease	Assaybedingungen	K_i
Pepstatin	HIV	Kein Detergenz	$0,92 \pm 0,25 \mu\text{M}$
	HIV	0,01% Triton X-100	$2,46 \pm 0,05 \mu\text{M}$
	HIV	0,01% CHAPS	$1,41 \pm 0,09 \mu\text{M}$
	HIV	0,1% Triton X-100	$1,50 \pm 0,18 \mu\text{M}$
	HIV	0,1% CHAPS	$1,14 \pm 0,07 \mu\text{M}$
	EP	Kein Detergenz	$3,00 \pm 0,11 \text{ nM}$
	EP	0,01% Triton X-100	$2,83 \pm 0,20 \text{ nM}$
	EP	0,01% CHAPS	$3,15 \pm 0,13 \text{ nM}$
	EP	0,1% Triton X-100	$2,52 \pm 0,50 \text{ nM}$
	EP	0,1% CHAPS	$4,52 \pm 0,26 \text{ nM}$
102	HIV	Kein Detergenz	$1,04 \pm 0,09 \mu\text{M}$
	HIV	0,01% Triton X-100	13% Inhibition bei 200 μM
	HIV	0,01% CHAPS	$2,78 \pm 0,52 \mu\text{M}$
103	HIV	Kein Detergenz	$0,16 \pm 0,01 \mu\text{M}$
	HIV	0,01% Triton X-100	$0,18 \pm 0,01 \mu\text{M}$
	HIV	0,01% CHAPS	$0,17 \pm 0,01 \mu\text{M}$
	HIV	0,1% Triton X-100	55% Inhibition bei 6,25 μM
	HIV	0,1% CHAPS	$0,15 \pm 0,01 \mu\text{M}$
104	EP	Kein Detergenz	$0,90 \pm 0,04 \mu\text{M}$
	EP	0,01% Triton X-100	53% Inhibition bei 25 μM
	EP	0,01% CHAPS	$0,88 \pm 0,02 \mu\text{M}$
	EP	0,1% Triton X-100	28% Inhibition bei 100 μM
	EP	0,1% CHAPS	$2,01 \pm 0,06 \mu\text{M}$
105	EP	Kein Detergenz	$5,20 \pm 0,29 \mu\text{M}$
	EP	0,01% Triton X-100	$20,5 \pm 0,74 \mu\text{M}$
	EP	0,01% CHAPS	$5,20 \pm 0,11 \mu\text{M}$

Tabelle 36. K_i -Werte von Pepstatin, **102**, **103**, **104** und **105** gegen die HIV-1-Protease und EP, gemessen in unterschiedlichen Puffern. Die Zusammensetzung der Puffer ist in Tabelle 28 für die HIV-1-Protease und Tabelle 29 für EP angegeben.

3.3. Zusammenfassung

Ausgehend von den Ergebnissen im 2. Kapitel zu den Inhibitoren der Dengue-Protease, **63** und **96**, wurde ein Screening nach unspezifischen Inhibitoren der HIV-1-Protease und Endothiapepsin durchgeführt. Auch wenn sich das im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Screening nach unspezifischen Inhibitoren auf eine relativ geringe Anzahl an Verbindungen und lediglich auf die HIV-1-Protease und Endothiapepsin beschränkte, war es so doch möglich, zahlreiche spezifische Inhibitoren zu identifizieren, die retrospektiv betrachtet tatsächlich als unspezifische Inhibitoren klassifiziert wurden. Als Konsequenz dieser Klassifizierung wären diese Verbindungen sehr wahrscheinlich von weiteren Optimierungsstudien ausgeschlossen worden. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt kann keine Erklärung dafür abgegeben werden, warum Triton X-100 die inhibitorische Potenz von manchen spezifischen Inhibitoren stark beeinflusst, während andere, strukturell verwandte Inhibitoren von Triton X-100 unbeeinflusst blieben. Jedoch kann basierend auf den vorliegenden Ergebnissen festgestellt werden, dass es bei Screening-Kampagnen in der frühen Phase der Hitfindung, die der Identifizierung von unspezifischen Bindern dienen, ratsam sein kann, einen weiteren Screen unter Verwendung eines anderen Detergenz für die Substanzen durchzuführen, die aufgrund des Triton X-100 Screens als unspezifische Binder klassifiziert wurden. In dem vorliegenden Fall erwiesen sich BSA (für die HIV-1-Protease) und CHAPS (für die Dengue-Protease, die HIV-1-Protease und Endothiapepsin) als geeignet. Für andere Assaysysteme kann aber die Verwendung weiterer Detergenzien als Alternative nötig sein, daher ist diese Entscheidung von Fall zu Fall zu treffen. Insbesondere wenn zwei Screenings unter Verwendung zweier Detergenzien bei gleichen Inhibitoren zu unterschiedlichen Ergebnissen führen, kann es lohnenswert sein, die Verbindungen nicht direkt von weiteren Untersuchungen auszuschließen, sondern sie als Hits zu behandeln, da, wie in unserem Fall gezeigt, strukturell eng verwandte Inhibitoren nicht als Aggregatoren in Triton X-100 Screens klassifiziert werden konnten. Dieses Vorgehen könnte zu einer gesteigerten Zahl von Startpunkten zur weiteren Strukturoptimierung führen.

Zusammenfassung der Arbeit

Das Auffinden neuer Targets und Wirkstoffe, um bakterielle und virale Infektionen auch in Zukunft behandeln zu können, ist ein zentraler Bestandteil der Bekämpfung von Infektionskrankheiten.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte ausgehend von einem Screeninghit, der ein Inhibitor der bakteriellen RNase P ist, eine Syntheseroute entwickelt werden, die nicht nur das Bereitstellen des Screeninghits in größeren Mengen, sondern auch eine einfache Variation der Substituenten des Screeninghits erlaubte. Mit Hilfe dieser Synthese konnten Verbindungen hergestellt werden, die besser löslich und aktiver im *in vitro* Assay waren und im Agar-Diffusionstest einen größeren Hemmhof als der initiale Screeninghit aufwiesen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit, der das *de novo* Design von Inhibitoren der Dengue-Virus-Protease zum Ziel hatte, wurden Inhibitoren der Dengue-Virus-Protease dargestellt, deren Grundstruktur sich von den bisher publizierten Inhibitoren der Dengue-Virus-Protease unterscheidet. Aufgrund einer wenig ausgeprägten SAR der synthetisierten Inhibitoren galt es zunächst, eine unspezifische Inhibition der Dengue-Virus-Protease durch die erhaltenen Inhibitoren auszuschließen. Eine spezifische Inhibition der Dengue-Virus-Protease durch die synthetisierten Inhibitoren konnte schließlich durch eine Verbesserung der Löslichkeit des Inhibitors im verwendeten Fluoreszenz-basierten Inhibitionsassay und durch Anwendung der dynamischen Lichtstreuung nachgewiesen werden. Die Verbesserung der Löslichkeit wurde durch ein Steigern des DMSO-Anteils im Assay erreicht. Der gesteigerte Anteil an DMSO im Fluoreszenz-basierten Inhibitionsassay ließ sich auch auf den verwendeten Thermal-Shift-Assay und das Soaking von Kristallen der Dengue-Virus-Protease übertragen. Sowohl im Thermal-Shift-Assay, als auch beim Soaking von DV3pro Kristallen konnte der DMSO-Anteil auf über 30% gesteigert werden. Dieser sehr hohe DMSO-Gehalt ermöglicht es, weniger potente oder schlecht lösliche Inhibitoren in hohen Konzentrationen auf eine Inhibition der Dengue-Virus-Protease zu testen und so mögliche Ausgangspunkte für ein weiteres Design von Inhibitoren zu erhalten.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde schließlich der Effekt des nicht-ionischen Detergenzes Triton X-100, welches Aggregate aufbrechen und damit unspezifische Inhibition

verhindern soll, untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die bei dem Test von spezifischen Inhibitoren der Dengue-Virus-Protease beobachteten Effekte von Triton X-100 auch bei weiteren Proteasen und Assaysystemen auftreten. Zunächst konnte durch Verwenden von Pepstatin A, einem peptidischen und kompetitiven Inhibitor von Aspartylproteasen, gezeigt werden, dass Triton X-100 nicht das gesamte Assaysystem beeinflusst, da das Inhibitionsverhalten von Pepstatin A gegen die HIV-1-Protease und Endothiapepsin nicht beeinflusst wurde. Durch das Testen von strukturell unterschiedlichen Inhibitoren der HIV-1-Protease und Endothiapepsin konnte nachgewiesen werden, dass Triton X-100 bestimmte Inhibitoren beeinflusst, andere strukturell verwandte Inhibitoren aber nicht in ihrem Inhibitionsverhalten gegenüber der Protease gestört werden. Da in Screenings, in denen Inhibitoren unter Verwendung von Triton X-100 als Detergenz keine Inhibition mehr zeigen, davon ausgegangen wird, dass deren Inhibition nicht spezifisch ist, also durch Aggregate verursacht wird,¹¹⁸ führt der beobachtete Inhibitionsabfall der spezifischen Aspartylproteasen-Inhibitoren unter Triton X-100 zu falsch-negativen Hits in diesen Screenings. Um solche falsch-negativen Hits zu vermeiden, konnte gezeigt werden, dass alternativ in Dengue-Protease-, HIV-1-Protease- und Endothiapepsin-Assays das Detergenz CHAPS eingesetzt werden kann, da dieses Detergenz im vorliegenden Fall keine falsch-negativen Hits generiert.

Zusammenfassend konnten im Rahmen dieser Arbeit Inhibitoren durch die unterschiedlichen Methoden der medizinischen Chemie von sowohl bakteriellen als auch viralen Krankheitserregern gefunden und optimiert werden. Der DMSO-Gehalt der bei der Suche nach Inhibitoren der Dengue-Virus-Protease verwendeten Assaysysteme konnte deutlich gesteigert werden und es konnte nachgewiesen werden, dass Triton X-100 Inhibitoren beeinflussen kann und es daher nicht das optimale Detergenz für Screening-Kampagnen darstellt. Unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse können Inhibitoren der RNase P und der Dengue-Virus-Protease entworfen und weiter optimiert werden und dank der Aussagen über die Verwendung Triton X-100 in Screening-Kampagnen lässt sich in Zukunft die Anzahl von potentiellen Ausgangspunkten für eine weitere Strukturoptimierung möglicherweise deutlich erhöhen.

Summary

The discovery of new targets and drugs to treat bacterial and viral infections in the future is an integral part in fighting infectious diseases.

In the first part of this thesis a synthetic route for a screening hit, an inhibitor of the bacterial RNase P, was developed, in order to provide the screening hit in larger quantities and to allow an easy variation of its substituents. This synthetic route delivered compounds with better solubility and improved activity in the *in vitro* assay as well as in the agar diffusion test compared to the initial screeninghit, resulting in an increased diameter of the inhibition zone.

The second part of this thesis aimed at the *de novo* design of inhibitors of the dengue virus protease. Inhibitors of the dengue virus protease with a core structure different from what has been published so far, were synthesized. Due to a sparsely pronounced SAR of the inhibitors synthesized an unspecific inhibition of the dengue virus protease by the inhibitors had to be ruled out. By increasing the solubility of the compounds in the fluorescence-based inhibition assay and by using dynamic light scattering to detect aggregates in solution, a specific inhibition of the dengue virus protease was finally proven. The increased solubility was achieved by increasing the concentration of DMSO in the assay. The increased DMSO concentration in the fluorescence-based inhibition assay was also successfully applied to the thermal shift assay and to the soaking conditions for dengue virus protease crystals. Both in the thermal shift assay and for the soaking of the dengue virus protease crystals the DMSO percentage was increased to >30%. This very high concentration of DMSO allows to test less potent or poorly soluble compounds at higher concentrations for an inhibition of the dengue virus protease and thus can serve as a starting point for the development of new inhibitors.

In the third part of this thesis the effect of the non-ionic detergent Triton X-100, which is used to break up aggregates in solution in order to prevent unspecific inhibition, was studied. It could be shown that the effects observed when using Triton X-100 together with specific inhibitors of the dengue virus protease were not limited to this protease but also occurred with different proteases and assay setups. By using Pepstatin A, a peptidic and competitive inhibitor of aspartic proteases, it could be shown that Triton X-100 does not negatively affect the assay system, as the inhibition of Pepstatin A versus HIV-1

protease and endothiapepsin was not altered. When testing structurally different inhibitors of the HIV-1 protease and endothiapepsin it could be shown that Triton X-100 influences the inhibition of both proteases by some inhibitors, while other structurally related inhibitors remained entirely unaffected, consequently resulting in false negatives. In screenings it is assumed that the inhibitor acts non-specific, via aggregation, when showing a lower inhibition when used together with Triton X-100 as detergent. Consequently, the decline of inhibition observed for specific aspartyl protease inhibitors together with Triton X-100 as a detergent would lead to false negative results. In order to avoid false negative results it could be shown that CHAPS as a detergent in dengue virus protease, HIV-1 protease and endothiapepsin inhibition assays did not produce false-negative hits.

In summary, by applying different medicinal chemistry methods, the detection and an optimization of inhibitors of bacterial and viral targets could be achieved. The DMSO concentration used in the assay systems when screening for inhibitors of the dengue virus protease was increased and it was shown, that Triton X-100 influences specific inhibitors of different proteases, leading to false-negatives and thus being not the optimal detergent for screening campaigns. Taking into account the results of this thesis, inhibitors of the bacterial RNase P and the dengue virus protease can be designed and further optimized and due to the results of the Triton X-100 studies the hit rate of screening campaigns can eventually be increased, leading to more starting points for further hit optimization processes.

Experimenteller Teil

1. Allgemeine Arbeitsweise

Alle Reaktionen, bei denen sauerstoff- und feuchtigkeitsempfindliche Reagenzien eingesetzt wurden, wurden in ausgeheizten Glasapparaturen und unter Schutzgasatmosphäre (Argon N5.0 der Firma *Air Liquide*) durchgeführt.

2. Mikrowellenreaktionen

Die Reaktionen wurden in einer Mikrowelle des Typs *Discover* der Firma *CEM (CEM GmbH Kamp-Lintfort, Deutschland)* in einem geschlossenen, drucksicheren Glasreaktionsgefäß durchgeführt.

3. Lösungsmittel

Acetonitril (p.a.) wurde ohne weitere Aufreinigung direkt verwendet.

Cyclohexan (p.a.) wurde mittels Destillation aufgereinigt.

Dichlormethan (p.a.) wurde ohne weitere Aufreinigung direkt verwendet.

Dimethylformamid (p.a.) wurde unter Argon und über Molsieb aufbewahrt.

Dimethylsulfoxid (p.a.) wurde unter Argon und über Molsieb aufbewahrt.

Ethanol (p.a.) wurde ohne weitere Aufreinigung direkt verwendet.

Ethylacetat (p.a.) wurde ohne weitere Aufreinigung direkt verwendet.

Methanol (p.a.) wurde ohne weitere Aufreinigung direkt verwendet.

Pyridin (technisch) wurde mittels Destillation aufgereinigt und über Molsieb aufbewahrt.

Tetrahydrofuran (p.a.) wurde ohne weitere Aufreinigung direkt verwendet.

4. Chromatographie

4.1. Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie (DC) wurden Kieselgelplatten (Kieselgel 60 F₂₅₄-Platten) der Firma *Merck (Darmstadt, Deutschland)* verwendet. Die Detektion der Substanzen erfolgte bei 366 nm oder 254 nm.

4.2. MPLC

Für die säulenchromatographische Aufreinigung der Substanzen wurde eine MPLC-Anlage der Firma *Büchi (Flawil, Schweiz)* mit folgenden Komponenten eingesetzt: Pumpmanager C-615, Pump Module C-601, Fraction-Collector C-660 und UV-Monitor C-630. Für die Säulenchromatographie an der MPLC-Anlage kamen entweder kommerziell erhältliche Kartuschen der Firma *Interchim* (puriFlash 15 oder 30 μM in 4 g, 12 g, 24 g und 40 g) zum Einsatz oder es wurden Kartuschen selbst gepackt (mit Kieselgel 60 (0.015-0.040 mm) der Firma Merck).

4.3. HPLC

Das Erstellen der Kalibriergeraden für **12**, **46** und **50** erfolgte an einer HPLC-Anlage der Firma *Shimadzu (Kyoto, Japan)* (Entgaser DGU-20A_s, Autosampler SIL-20A HAT, Detektor SPD-20AT, Pumpensystem LC-20AT und Kommunikationsmodul CBM-20A). Als Trennsäule diente eine Säule des Typs LiChroCART 125-4 LiChrosphere 60 RP-select B 5 μM der Firma Merck.

Alle weiteren HPLC-Bestimmungen erfolgten auf einem HPLC/MS System der Firmen *Agilent Technologies (HPLC) (Santa Clara, Vereinigte Staaten)* und *Advion (ESI Massendetektor) (Ithaca, Vereinigte Staaten)* mit folgenden Komponenten: UV/Vis Detektor MWD SL, Autosampler 1260 ALS, Pumpensystem 1260 Quat Pump und Massendetektor expression S CMS. Als Trennsäule diente eine Säule des Typs Poroshell 120 EC-C18 2.7 μM der Firma *Agilent*.

5. Analysemethoden

5.1. Kernresonanzspektroskopie

Die Verbindungen wurden in kommerziell erhältlichen Lösungsmitteln gelöst und die Kernresonanzspektren wurden in der NMR-Abteilung des Fachbereichs Pharmazie der *Philipps-Universität Marburg* an den Geräten ECA-500 und ECX-400 (^1H -NMR: 500 MHz und 400 MHz; ^{13}C -NMR: 100 MHz und 125 MHz) der Firma *Joel Inc. (Peabody, Vereinigte Staaten)* oder dem Gerät AV 300 II (^1H -NMR: 300 MHz) der Firma *Bruker (Billerica, Vereinigte Staaten)* des Fachbereichs Chemie der *Philipps-Universität Marburg* aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen δ wurden auf den Restprotonengehalt des verwendeten Lösungsmittels bezogen (CDCl_3 : ^1H = 7.26 ppm, ^{13}C

= 77.1 ppm; DMSO-d₆: ¹H = 2,50 ppm; ¹³C = 39.5 ppm). Die jeweils verwendeten Aufnahmefrequenzen werden gesondert aufgeführt.

Bei symmetrischem Multipletts (*sm*) wurde der Signalschwerpunkt, bei unsymmetrischen Multipletts (*m*) wurde der gesamte Bereich des Signals angegeben. Die Signalmultiplizitäten der Spektren wurden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, T = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett. Die Angabe der Kopplungskonstanten (*J*) erfolgt in Hertz (Hz).

Die Nummerierung der Verbindung weicht von den gängigen Konventionen ab, um eine einfachere Vergleichbarkeit zwischen den Verbindungen innerhalb einer Serie herzustellen.

Die Zuordnung der Signale erfolgte hauptsächlich durch die Betrachtung der chemischen Verschiebung, der Multiplizität und der Kopplungskonstanten. Zusätzlich wurden die Verbindungen mit den Spektren von ähnlichen und bereits publizierten Substanzen verglichen, oder es wurde die NMR-Vorhersage Funktion der Software *ChemBioDraw Ultra Version 14.0.0.117*. von *PerkinElmer (Waltham, Vereinigte Staaten)* genutzt. Die Bearbeitung der erhaltenen Spektren erfolgte mit Hilfe der Software *Delta 5.0.1*. der Firma *Joel Inc*.

5.2. Massenspektrometrie

Die Verbindungen wurden in Methanol gelöst und in der Abteilung für Massenspektrometrie des Fachbereichs Pharmazie der *Philipps-Universität Marburg* an einem Triple Quadrupol Massenspektrometer vom Typ Q-Trap 2000 der Firma *Applied Biosystems (Foster City, Vereinigte Staaten)* oder einem doppelfokussierenden Sektorfeld-Spektrometer vom Typ AutoSpec der Firma *Micromass (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland)* oder in der in der Abteilung für Massenspektrometrie des Fachbereichs Chemie der *Philipps-Universität Marburg* an einem Hybridmassen-spektrometer (*Finnigan LTQ-FT*) der Firma *Thermo Fischer Scientific (Waltham, Vereinigte Staaten)* vermessen.

5.3. Elementaranalyse

Die Elementaranalysen wurden in der Analytik-Abteilung des Fachbereichs Pharmazie der *Philipps-Universität Marburg* an einem Gerät des Typs *Vario Micro Cube* der Firma *Elementar Analysensysteme GmbH (Hanau, Deutschland)* bestimmt.

5.4. Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden an einem Schmelzpunktgerät vom Typ MPM-H2 der Firma Schorpp-Gerätetechnik (*Überlingen, Deutschland*) bestimmt und sind unkorrigiert.

6. Verwendete Assaysysteme

6.1. Durchführung des Fluoreszenz-basierten Assays der Dengue-Protease

Der Inhibitionsassay wurde mit dem fluorogenen Substrat Phac-Lys-Arg-Arg-AMC durchgeführt, welches in der Arbeitsgruppe von *Prof. Dr. Torsten Steinmetzer, Philipps-Universität Marburg*, synthetisiert wurde. Die Änderung der Fluoreszenz wurde mit einem *Tecan Sapphire²* Platten-Lesegerät mit einem 380 nm Excitations-Filter und einem 460 nm Emissions-Filter gemessen. Die IC_{50} -Werte wurden ermittelt, indem die Abnahme des Fluoreszenz-Signals bei 11 unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen ermittelt wurde. Der zur Bestimmung des IC_{50} -Wertes vermessene Konzentrationsbereich der Inhibitoren lag, abhängig von der inhibitorischen Potenz des Liganden, bei 1,56 – 500 μM oder 0,049 – 100 μM . Für die Messung kamen 96-Well Platten (*NuncTM, Thermo Scientific*) zum Einsatz, die DV2pro/DV3pro Assay Puffer (50 mM Tris-HCl, 1 mM CHAPS bei pH 9), 20 μM (DV2pro) oder 40 μM (DV3pro) Substrat gelöst in Wasser und die Inhibitorlösung (finale DMSO-Konzentration im Well: 1%) mit einem Volumen von 200 μl enthielten. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Protease (DV2pro oder DV3pro gelöst in Kristallisationspuffer DV3pro (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5% Glycerol, pH 8,5) mit einer finalen Konzentration von 50 nM im Well gestartet.

Bestandteil	Volumen
DV2/3pro Assay Puffer	183 μl
DMSO oder Inhibitor	2 μl
Substrat	5 μl
Protease	10 μl

Tabelle 37. Bestandteile je Well des Fluoreszenz-basierten Assays.

6.2. Durchführung des TSA

Für den TSA wurde ein *iQ5-Cycler RT-PCR Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)* verwendet, um Stabilisierungs- oder Destabilisierungs-Effekte auf DV2pro und DV3pro durch Liganden verfolgen zu können. Als Puffer wurden 20 mM Tris-HCl, 50 mM Natriumchlorid (NaCl), 5% (v/v) Glycerol bei einem pH von 7,5 eingesetzt. Dieser Puffer wurde mit *Sypro Orange* (Struktur nicht bekannt, *Bio-Rad Laboratories GmbH*) in einem Verhältnis von 98,8 μl + 0,2 μl oder 98,6 + 0,4 μl gemischt, und lieferte die Mischung A. Für die Messung kam die jeweilige Protease (DV2pro oder DV3pro) in einer Konzentration von 3-5 mg/ml zum Einsatz. 96-Well Platten von *Bio-Rad* wurden

verwendet und nachdem jede Vertiefung der Mikrotiterplatten befüllt war, wurde die Platte mit der mitgelieferten Folie versiegelt. Die generelle Zusammensetzung ist in Tabelle 38 angegeben.

Bestandteil	Volumen
99,8 μ l Puffer + 0,2 μ l <i>Sypro Orange</i>	36 μ l
Protein 5 mg/ml	3 μ l
DMSO oder Inhibitor	1 μ l

Tabelle 38. Assay-Zusammensetzung je Vertiefung für den TSA.

Es wurden 10 mM Inhibitor in DMSO oder DMSO als Blindprobe verwendet. Der Assay wurde im Temperaturbereich von 20 °C bis 80 °C in 0,5 °C Temperaturschritten pro Zyklus durchgeführt. Die vom Gerät registrierten Fluoreszenzintensitäts-Daten wurden gegen die Temperatur aufgetragen. Die erste Ableitung dieses Graphen wurde gebildet. Das globale Minimum der so erhaltenen Funktion lieferte die Schmelzpunkte (T_m). Die Temperaturverschiebungen werden erhalten, in dem die Temperatur der Blindprobe (DMSO) von der Probe mit Ligand abgezogen wird.

6.3. Durchführung des Fluoreszenz-Quenching Assays der Dengue-Protease

Der Fluoreszenz-*Quenching* Assay wurde nach der Vorschrift von *Bodenreider et al.*¹⁰⁰ durchgeführt. Hierzu wurden 96-Well-Platten (NuncTM, *Thermo Scientific*) mit 86 μ l DV2/3pro Assay Puffer (50 mM Tris(hydroxymethylaminomethan-Hydrochlorid (Tris-HCl), 1 mM CHAPS bei pH 9), 4 μ l DMSO/Inhibitor-Stammlösung und 10 μ l DV3pro in Assaypuffer zu einem Endvolumen von 100 μ l im Well gemischt. Die Fluoreszenz wurde mit einem *Tecan Sapphire²* Platten-Lesegerät registriert. DV3pro wurde ausgehend von einer Lösung mit 3 mg/ml so lange verdünnt, bis vom Gerät ein Blindwert von ca. 18.000 RFUs (Relative fluorescence units) der Tryptophane in DV3pro gemessen wurde (ca. 1:30). Dann wurde entweder **63** oder **96** in DMSO mit einer Endkonzentration von 25 bis 100 μ M ins Well gegeben, vermischt und die Messung gestartet. Nach Zugabe von Aprotinin (20 μ M Endkonzentration im Well) wurde nochmals das Signal aufgezeichnet. Für **63** und **96** wurden die jeweiligen Signale um die Eigenfluoreszenz der Substanz und des Puffers korrigiert, um die tatsächlich durch den Inhibitor vermittelte Verminderung der Fluoreszenz der Protease registrieren zu können.

6.4. Fluoreszenz-basierter Assay der HIV-1-Protease und von Endothiapepsin

Der Fluoreszenz-basierte Kinetikassay wurden entsprechend der Literatur für die HIV-1-Protease¹¹² und Endothiapepsin¹¹¹ auf einem *Tecan Sapphire²* Platten-Lesegerät (*Tecan, Männedorf, Schweiz*) mit einem 337 nm Excitations-Filter und einem 414 nm Emissions-Filter durchgeführt. Für die Messung kamen 96-Well Platten (*NuncTM, Thermo Scientific*) zum Einsatz. Das fluorogene Substrat Abz-Thr-Ile-Nle-(p-NO₂-Phe)-Gln-Arg-NH₂ wurde von Bachem käuflich erworben. Für den HIV-1-Protease Assay wurde das fluorogene Substrat in einer Endkonzentration von 20 µM, für den Endothiapepsin Assay in einer Konzentration von 10 µM in der Mikrotitelplatte eingesetzt. Aus dem Anstieg der Fluoreszenz wurden die IC₅₀-Werte mit dem Programm *GraFit 4.09 (Erithacus Software)* berechnet. Die korrespondierenden K_i-Werte wurden mit der *Cheng-Prusoff-Gleichung*¹¹⁹ unter Einbeziehung des bestimmten K_m-Wertes und der Substratkonzentration berechnet. Die K_m-Werte der HIV-1-Protease (20,9 µM) und von Endothiapepsin (8,26 µM) wurden nach der Methode von Lineweaver-Burk bestimmt. Die K_i-Werte wurden mindestens als Duplikat bestimmt.

7. Durchführung der DLS-Messungen

Zur Bestimmung des DLS-Signals wurde ein *Spectro Size 300* der Firma *XtalConcepts GmbH (Hamburg, Deutschland)* verwendet. Die DMSO-Stammlösung des Inhibitors wurde mit dem Assaypuffer des Fluoreszenz-basierten Assays in einem Eppendorfcup durch *Vortexen* gemischt. Dann wurden 30 µl dieser Lösung in eine Küvette gegeben und in dem Gerät platziert. Die Messung erfolgte bei 21 °C, bei einer Emissions-Wellenlänge von 660 nm und es wurden nacheinander 10 Messungen mit einer Dauer von jeweils 30 Sekunden durchgeführt. Der Mittelwert dieser Messungen wurde vom Computer aus diesen Messungen gebildet und lieferte das DLS-Signal

8. Durchführung der Docking Experimente

Für das Docking wurde der im Programm *FlexX*⁷⁸ verfügbare Hybrid-Ansatz gewählt. Hierbei wird das Docking in Abhängigkeit der Enthalpie und der Entropie von Ligand und Rezeptor durchgeführt, anstatt nur enthalpische oder entropische Effekte zu berücksichtigen. Die Protein-Ligand Überlagerungen wurden durch *FlexX* auf ein Minimum reduziert (2,9 Å³; Standart-Einstellungen). Um die Flexibilität des Liganden im Docking zu erhöhen wurden Intra-Ligand Überlagerungen, also ein geringerer Abstand zwischen den einzelnen Atomen im Ligand, als es die van-der-Waals-Radii zulassen würden, zu einem gewissen Grad zugelassen (*Clash Factor*: 0,6; Standart-Einstellungen von *FlexX*).

9. Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV1: Synthese von *N*-Alkyl-4-nitroanilinen

Das entsprechende 1-Fluor-4-Nitrobenzol (1.0 eq.) wurde in Acetonitril (2 ml) vorgelegt, mit dem entsprechenden Amin versetzt (4 eq.) und bei 120 °C für 2 h in einem drucksicheren, geschlossenen 10 ml Mikrowellengefäß gerührt. Anschließend wurde der Ansatz mit Ethylacetat (100 ml) aufgenommen, die organische Phase wurde mit ges. NaHCO₃-Lsg und ges. Kochsalzlösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt wurde direkt oder durch säulenchromatographische Reinigung erhalten.

Einstellungen des Mikrowellenreaktors:

Ramp.: 2 min, Hold 120 min, T = 120 °C, P = 300 W

AAV2.1: Reduktion der *N*-Alkyl-4-nitroaniline zu den entsprechenden ¹*N*-Alkyl-1,4-phenylendiaminen

Das entsprechende *N*-Alkyl-4-nitroanillin (1.0 eq.) wurde in einem Druckreaktor mit einem Volumen von 25 ml in Dichlormethan (DCM) (5 ml/mmol Edukt) gelöst und mit Pd/C (30 mg/mmol Edukt) versetzt. Die Luft wurde aus dem Reaktionsgefäß verdrängt und durch eine Wasserstoffatmosphäre ersetzt. Die Reaktionsmischung wurde bis zur vollständigen Umsetzung bei 4 bar Druck gerührt (<24 h). Im Anschluss wurde die Reaktionsmischung durch Kieselgur filtriert. Das Filtrat wurde direkt weiter umgesetzt.

AAV2.2: Synthese von Carbonsäureamiden

Das Filtrat aus der vorherigen Reaktion (AAV2.1) wurde unter Rühren auf 0 °C abgekühlt, dann wurde Triethylamin (NEt₃) (1.5 eq.) hinzugegeben und Chloracetylchlorid (1.5 eq.) langsam hinzugegeben und die Reaktionsmischung langsam über 6 h auf Raumtemperatur erwärmt. Nach vollständigem Umsatz (24 h) wurde der Ansatz mit 100 ml DCM aufgenommen, die organische Phase wurde mit ges. NaHCO₃-Lsg und ges. Kochsalzlösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Säulenchromatographische Reinigung (DCM:Methanol = 95:5) lieferte das Produkt.

AAV3: Synthese der *N*-Hydroxy-benzamide

Das entsprechende Benzonitril wurde in Ethanol gelöst (1.5 ml/mmol), mit Hydroxylaminhydrochlorid (2.2 eq.) und NEt₃ (2.3 eq.) versetzt und 3 h unter Rückfluss bei 80 °C gerührt. Nach Beendigung wurde H₂O hinzugegeben (1.5 ml/mmol) und der Ethanol bei vermindertem Druck entfernt. Der sich bildende Niederschlag wurde abgesaugt und mit H₂O gewaschen.

AAV4: Synthese der Oxadiazole

Das entsprechende *N*-Hydroxy-benzamidin wurde in Acetonitril gelöst (4 ml/mmol), mit Kaliumcarbonat (2.0 eq.) und Chloracetylchlorid (3.0 eq.) versetzt und bei 120 °C für 1 h in einem drucksicheren, geschlossenen 10 ml Mikrowellengefäß gerührt. Anschließend wurde der Ansatz mit Ethylacetat (50 ml) aufgenommen, die organische Phase wurde mit H₂O, ges. NaHCO₃-Lsg und ges. Kochsalzlösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Die weitere Aufreinigung erfolgte, falls nötig, säulenchromatographisch.

Einstellungen des Mikrowellenreaktors:

Ramp.: 2 min, Hold 60 min, T = 120°C, P = 300 W

AAV5: Synthese der Boc-geschützten Piperazinderivate

Das entsprechende Alkyl-Chlorid wurde in Acetonitril gelöst (10 ml/mmol) mit Kaliumcarbonat (4.0 eq.) und *N*-Boc-Piperazin (**7**) (1.5 eq.) versetzt und unter Reflux für 6 h gerührt. Anschließend wurde der Ansatz mit Ethylacetat (50 ml) aufgenommen, die organische Phase wurde mit H₂O, ges. NaHCO₃-Lsg und ges. Kochsalzlösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Säulenchromatographische Reinigung (DCM:Methanol = 95:5) lieferte das Produkt.

AAV6: Entschützung der Boc-geschützten Piperazinderivate

Das Boc-geschützte Piperazinderivat wurde in DCM gelöst (10 ml/mmol), mit 6 N Salzsäure in Isopropanol versetzt (1 ml/mmol) und für 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurde der Ansatz mit DCM aufgenommen, mit ges. NaHCO₃-Lsg und ges. Kochsalzlösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet. Entfernen des Lösungsmittels lieferte das Produkt.

AAV7: Synthese der Endstufen

9/14 (0,5 mmol) und der entsprechende Reaktionspartner (**21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 32, 33**) (0,33 mmol) wurden in 5 ml Acetonitril gelöst, mit Kaliumcarbonat (4.0 eq.) und 4 mg Kaliumiodid versetzt und über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde der Ansatz mit DCM (50 ml) aufgenommen, mit H₂O, ges. NaHCO₃-Lsg und ges. Kochsalzlösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Säulenchromatographische Reinigung (DCM:Methanol = 95:5) lieferte das Produkt.

AAV8: Synthese der Carbonsäureamide

Unter Schutzgas wurden 1 eq. (1 mmol) Carbonsäure in 6 ml trockenem DMF gelöst und mit 1.1 eq. HBTU (2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat) versetzt. Danach wurden *N*-Methylmorpholin (5 eq.) und das entsprechende Amin (1.1 eq.) hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur unter Schutzgas gerührt. Nach Beenden der Reaktion wurde der Ansatz mit 50 ml DCM aufgenommen und die organische Phase fünf Mal mit 50 ml einer 5% LiCl Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Säulenchromatographische Reinigung (DCM:Methanol = 95:5) und umkristallisieren aus Ethanol lieferte das Produkt.

AAV9: Oxidierung der 2-Methylindole

In Anlehnung an Zhu *et al.*⁹⁵ wurden 0.33 mmol Carbonsäureamid in 5 ml Aceton gelöst, mit 1 eq. 2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxy (TEMPO) versetzt und auf 0 °C abgekühlt und mit 0.4 eq. Kupfer(II)-chlorid x 2 H₂O versetzt. Nach 30 min wurde die Reaktion mit 1 ml gesättigter Na₂SO₃-Lösung gestoppt und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Säulenchromatographische Reinigung (DCM:Methanol = 90:10) und umkristallisieren aus Methanol lieferte das Produkt.

AAV10: Reduktion der 5-Nitro-indole

0.5 mmol des 5-Nitro-indols wurden in einem Druckreaktor mit einem Volumen von 25 ml in 10 ml DCM gelöst und mit Pd/C (30 mg/mmol Edukt) versetzt. Die Luft wurde aus dem Reaktionsgefäß verdrängt und durch eine Wasserstoffatmosphäre ersetzt. Die Reaktionsmischung wurde bis zur vollständigen Umsetzung bei 10 Bar Druck gerührt (<24 h). Im Anschluss wurde die Reaktionsmischung durch Kieselgur filtriert und unter

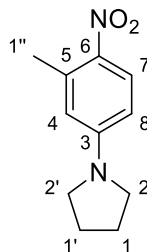
vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt wurde direkt weiter umgesetzt.

AAV11: Methylierung

In einem ausgeheizten Kolben wurden unter Schutzgas 6.2 mmol des 5-Nitro-indols in 6 ml trockenem DMF gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Dann wurden 1.2 eq. Natriumhydrid langsam hinzugegeben. Nachdem keine Gasbildung mehr zu beobachten war, wurden schließlich 1.1 eq. Methyljodid hinzugegeben und der Ansatz auf Raumtemperatur erwärmt. Nach Beenden der Reaktion (ca. 8 h) wurde der Ansatz mit 50 ml DCM aufgenommen und die organische Phase fünf Mal mit 5% LiCl Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Säulenchromatographische Reinigung (Cyclohexan:Ethylacetat = 80:20) lieferte das Produkt.

10. Einzelsynthesen

1-(3-Methyl-4-nitrophenyl)pyrrolidin (4)



[MW: 206.24 g/mol]

Unter Verwendung der AAV1 mit 155 mg (1 mmol) 4-Fluoro-2-methyl-1-nitrobenzen und 385 mg Pyrrolidin in 2 ml Acetonitril wurden 204 mg (99%) **4** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 2.02–2.08 (m, 4H, H-1 + H-1'), 2.64 (s, 3H, H-1''), 3.39 (pst, ³J = 6.6 Hz; 4H, H-2 + H-2'), 6.28 (d, ⁴J = 2.5 Hz; 1H, H-4), 6.36 (dd, ³J = 9.3, ⁴J = 2.5 Hz; 1H, H-8), 8.11 (d, ³J = 9.2 Hz; 1H, H-7).

¹³C-NMR (CDCl₃, 21 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 23.0 (1C, C-1''), 25.5 (2C, C-1 + C-1'), 47.8 (2C, C-2 + C-2'), 109.1 (1C, C-8), 113.8 (1C, C-4), 128.4 (1C, C-7), 137.0 (1C, C-5), 137.9 (1C, C-6), 151.0 (1C, C-3).

MS (ESI+):

m/z (%) = 229.4 (100, [M+Na]⁺), 413.6, (15 [2M+H]⁺).

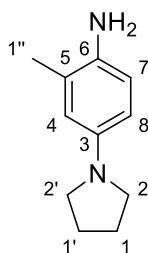
HRMS (EI+):

m/z	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O ₂ Na ₁	ber.: 229.0947 [M+Na] ⁺
		gef.: 229.0947 [M+Na] ⁺

qNMR:

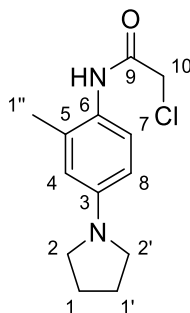
90.31% Reinheit

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 87.6 °C

2-Methyl-4-(pyrrolidin-1-yl)anilin (5)

[MW: 176.26 g/mol]

Unter Verwendung der AAV2.1 mit 200 mg (1 mmol) **4** in 5 ml DCM wurde **5** erhalten und direkt weiter umgesetzt.

2-Chloro-N-(2-methyl-4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)acetamid (6)

[MW: 252.74 g/mol]

Unter Verwendung der AAV2.2 mit 171 mg (0.97 mmol) **5** und 164 mg (1.46 mmol) Chloroacetylchlorid in DCM mit säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM:Methanol = 95:5) wurden 209 mg (52% über zwei Stufen) **6** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 1.95–2.04 (sm, 4H, H-1 + H-1'), 2.24 (s, 3H, H-1'), 3.26 (brt, ³J = 6.4 Hz; 4H, H-2 + H-2'), 4.21 (s, 2H, H-10), 6.37–6.44 (m, 2H, H-4 + H-8), 7.41 (d, ³J = 8.5 Hz; 1H, H-7), 7.97 (bs, 1H, NH).

¹³C-NMR (d₆-DMSO, 30 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 18.0 (1C, C-1'), 24.8 (2C, C-1 + C-1'), 43.0 (1C, C-10), 47.9 (2C, C-2 + C-2'), 109.7 (1C, C-8), 113.5 (1C, C-4), 124.5 (1C, C-7), 126.5 (1C, C-6), 133.4 (1C, C-5), 145.6 (1C, C-3), 164.8 (1C, C-9).

MS (EI+):

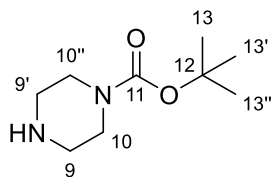
m/z (%) = 253.5 (100, $[M+H]^+$), 255.5 (32 $[^{37}ClM+H]^+$), 275.5 (50 $[M+Na]^+$), 277.4 (14 $[^{37}ClM+Na]^+$).

HRMS (EI+):

m/z $C_{13}H_{17}ClN_2O_1$: ber.: 253.1102 $[M+H]^+$
gef.: 253.1104 $[M+H]^+$

EA: $C_{13}H_{16}ClN_2O_1 \times \frac{1}{4} H_2O$ ber.: C: 60.70, H: 6.86, N: 10.89.
gef.: C: 60.77, H: 6.77, N: 10.84.

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 163.0 °C

***tert*-Butyl-piperazin-1-carboxylat (7)**

[MW: 186.25 g/mol]

Zu einer Lösung von Piperazin (3.0 g, 34.9 mmol) in DCM (50 ml) wurden bei 0 °C di-*tert*-butyldicarbonat (1.52 g, 6.96 mmol) gelöst in 25 ml DCM langsam hinzugegeben (~1 h). Nach Rühren über Nacht und langsamen Erwärmen auf RT (Eisbad nicht erneuern) wurde mit konzentrierter NaOH (~3 M) ausgeschüttelt, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Die Lösung wurde auf Kieselgel absorbiert und in eine zu 75% mit Kieselgel befüllte 40 g Leersäule gefüllt. Säulenchromatographie dieser Säule mit DCM:MeOH (9:1) ergab das Produkt in 97% Ausbeute als Öl, das nach dem Einrotieren als farbloser Feststoff erstarrt.

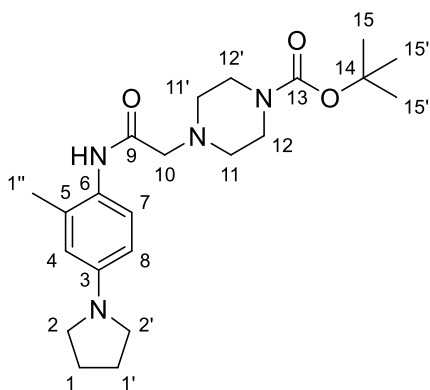
 1H -NMR ($CDCl_3$, 21 °C, 400 MHz):

δ_H (ppm) = 1.45 (s, 9H, H-13 + H-13' + H-13''), 2.43 (t, $^3J = 4.4$ Hz; 4H, H-9 + H-9'), 3.39 (t, $^3J = 5.0$ Hz; 4H, H-10 + H-10').

HRMS (ESI+):m/z C₉H₁₉N₂O₂: ber.: 187.1441 [M+H]⁺

gef.: 187.1442 [M+H]

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den publizierten Daten für diese Verbindung überein¹²⁰

***tert*-Butyl 4-(2-((2-methyl-4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)amino)-2-oxoethyl)piperazin-1-carboxylat (8)**

[MW: 402.54 g/mol]

Unter Verwendung der AAV5 mit 127 mg (0.5 mmol) **6** und 140 mg (0.75 mmol) *tert*-Butyl piperazin-1-carboxylat in Acetonitril wurden 350 mg (87%) **8** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 1.47 (s, 9H, H-15 + H-15' + H-15''), 1.99 (sm, 4H, H-1 + H-1'), 2.23 (s, 3H, H-1''), 2.60 (t, ³J = 4.6 Hz; 4H, H-11 + H-11'), 3.17 (s, 2H, H-10), 3.25 (t, ³J = 6.6 Hz; 4H, H-2 + H-2'), 3.50 (t, ³J = 4.8 Hz; 4H, H-12 + H-12'), 6.38 (d, ⁴J = 2.5 Hz; 1H, H-4), 6.43 (dd, ³J = 8.7 Hz; ⁴J = 2.8 Hz; 1H, H-8), 7.67 (d, ³J = 8.7 Hz; 1H, H-7), 8.81 (bs, 1H, NH).

¹³C-NMR (CDCl₃, 21 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 18.5 (1C, C-1''), 25.5 (2C, C-1 + C-1'), 28.5 (3C, C-15 + C-15' + C-15''), 43.4 (2C, C-12 + C-12'), 47.9 (2C, C-2 + C-2'), 53.3 (2C, C-11 + C-11'), 62.0 (1C, C-10), 80.3 (1C, C-14), 110.1 (1C, C-8), 113.4 (1C, C-4), 124.2 (2C, C-7 + C-6), 130.4 (1C, C-5), 145.9 (1C, C-3), 154.7 (1C, C-13), 167.4 (1C, C-9).

MS (EI+):

m/z (%) = 403.6 (15, $[M+H]^+$), 806.0 (75, $[2M+H]^+$), 827.8 (70, $[2M+Na]^+$).

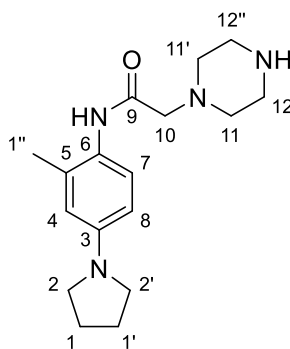
HRMS (EI+):

m/z C₂₂H₃₅N₄O₃: ber.: 403.2704 $[M+H]^+$
gef.: 403.2705 $[M+H]^+$

EA: C₂₂H₃₄N₄O₃ ber.: C: 65.64, H: 8.51, N: 13.92.
gef.: C: 65.51, H: 8.42, N: 13.76.

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 168.0 °C

***N*-(2-Methyl-4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)-2-(piperazin-1-yl)acetamid (**9**)**



[MW: 302.42 g/mol]

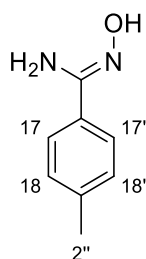
Unter Verwendung der AAV6 mit 152 mg (0.35 mmol) **8** und 6 N Salzsäure in Isopropanol (1 ml) wurden 97 mg (91%) als brauner Feststoff erhalten.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

δ_H (ppm) = 1.93 (sm, 4H, H-1 + H-1'), 2.15 (s, 3H, H-1''), 2.46 (t, ³*J* = 4.6 Hz; 4H, H-11 + H-11'), 2.77 (t, ³*J* = 4.8 Hz; 4H, H-12 + H-12'), 3.01 (s, 2H, H-10), 3.18 (t, ³*J* = 6.6 Hz, 4H, H-2 + H-2'), 6.34 (dd, ³*J* = 8.6 Hz; ⁴*J* = 2.5 Hz; 1H, H-8), 6.39 (d, ⁴*J* = 2.4 Hz, 1H, H-4), 7.38 (d, ³*J* = 8.7 Hz; 1H, H-7), 9.05 (bs, 1H, NH).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 100 MHz):

δ_C (ppm) = 18.4 (1C, C-1''), 25.5 (2C, C-1 + C-1'), 46.0 (2C, C-12 + C-12'), 47.9 (2C, C-2 + C-2'), 54.1 (2C, C-11 + C-11'), 62.5 (1C, C-10), 109.9 (1C, C-8), 113.3 (1C, C-4), 124.1 (1C, C-7), 124.2 (1C, C-6), 130.3 (1C, C-5), 146.0 (1C, C-3), 168.0 (1C, C-9).

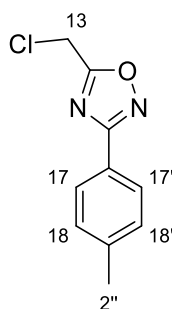
MS (ESI+): m/z (%) = 303.5 (100, [M+H]⁺).**HRMS (ESI+):** m/z C₁₇H₂₇N₄O: ber.: 303.2179 [M+H]⁺gef.: 303.2179 [M+H]⁺**qNMR:** 95.70% Reinheit**Schmelzpunkt** (unkorrigiert): 112.4 °C**(Z)-N'-Hydroxy-4-methylbenzimidamid (10)**

[MW: 150.18 g/mol]

Unter Verwendung der AAV3 mit 1 g (8.5 mmol) 4-Methylbenzonnitril und 1.3 g (18.8 mmol) Hydroxylaminhydrochlorid in Ethanol wurden 1.1 g (86%) von **10** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 400 MHz): δ_{H} (ppm) = 2.38 (s, 3H, H-2''), 4.86 (bs, 2H, NH₂), 7.21 (d, ³J + ⁵J = 8.0 Hz; 2H, H-18 + H-18'), 7.52 (d, ³J + ⁵J = 8.0 Hz; 2H, H-17 + H-17'), 8.21 (bs, 1H, OH).**MS (ESI+):** m/z (%) = 151.1 (100, [M+H]⁺).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den publizierten Daten für diese Verbindung überein.¹²¹

5-(Chloromethyl)-3-(*p*-tolyl)-1,2,4-oxadiazol (11**)**

[MW: 208.64 g/mol]

Unter Verwendung der AAV4 mit 75 mg (0.5 mmol) **10** und 169 mg (1.5 mmol) Chloracetylchlorid in Acetonitril wurden 99 mg (95%) von **11** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 400 MHz):

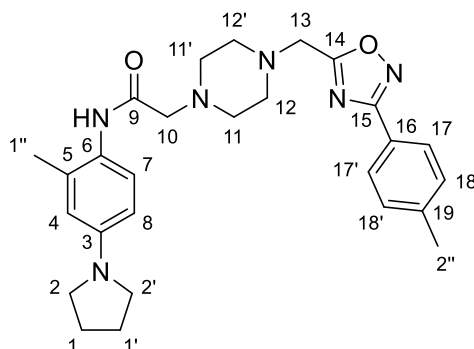
δ_{H} (ppm) = 2.42 (s, 3H, H-2''), 4.74 (s, 2H, H-13), 7.29 (d, $^3J + ^5J = 8.0$ Hz; 2H, H-18 + H-18'), 7.96 (d, $^3J + ^5J = 8.2$ Hz; 2H, H-17 + H-17').

MS (EI+):

m/z (%) = 209.1 (60, [M+H]⁺), 211.1 (32, [³⁷C]M+H⁺).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den publizierten Daten für diese Verbindung überein.⁴¹

***N*-(2-Methyl-4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)-2-(4-((3-(*p*-tolyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)methyl)piperazin-1-yl)acetamid (MT53 (12))**



[MW: 474.61 g/mol]

Unter Verwendung der AAV7 mit 0.33 mmol **9** und 0.5 mmol **11** in 5 ml Acetonitril wurden 147 mg (94%) MT53 (**12**) als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 1.98 (sm, 4H, H-1 + H-1'), 2.20 (s, 3H, H-1''), 2.42 (s, 3H, H-2''), 2.75 (bs, 8H, H-11 + H-11' + H-12 + H-12'), 3.18 (s, 2H, H-10), 3.25 (t, ³*J* = 6.6 Hz; 4H, H-2 + H-2'), 3.95 (s, 2H, H-13), 6.37 (d, ⁴*J* = 2.5 Hz; 1H, H-4), 6.42 (dd, ³*J* = 8.6 Hz, ⁴*J* = 2.5 Hz; 1H, H-8), 7.29 (d, ³*J* + ⁵*J* = 8.0 Hz; 2H, H-18 + H-18'), 7.65 (d, ³*J* = 8.7 Hz; 1H H-7), 7.89 (d, ³*J* + ⁵*J* = 8.2 Hz; 2H, H-17 + H-17'), 8.81 (bs, 1H, NH).

¹³C-NMR (CDCl₃, 21 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 18.5 (1C, C-1''), 21.7 (1C, C-2''), 25.5 (2C, C-1 + C-1'), 47.9 (2C, C-2 + C-2'), 52.9, 53.9 (5C, C-11 + C-11' + C-12 + C-12', C-13), 61.8 (1C, C-10), 109.9 (1C, C-8), 113.5 (1C, C-4), 123.7 (1C, C-7), 123.8 (1C, C-16), 124.2 (1C, C-6), 127.5 (2C, C-17 + C-17'), 129.6 (2C, C-18 + C18'), 130.5 (1C, C-5), 141.8 (1C, C-19), 145.9 (1C, C-3), 167.5 (1C, C-9), 168.5 (1C, C-14), 175.8 (1C, C-15).

MS (ESI+):

m/z (%) = 949.7 (90, [2M+H]⁺).

HRMS (EI+):

m/z C₂₇H₃₄N₆O₂H₁ ber.: 475.2816 [M+H]⁺
gef.: 475.2820 [M+H]⁺

EA: $C_{27}H_{34}N_6O_2 \times \frac{1}{4} H_2O$ ber.: C: 67.69, H: 7.26, N: 17.54.
gef.: C: 67.87, H: 7.15, N: 17.46.

Als 3x HCl gefällt:

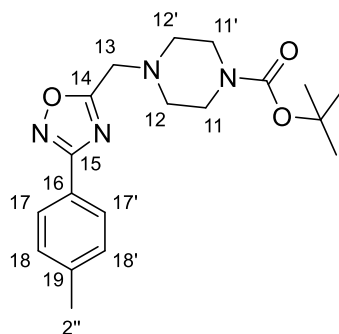
EA: $C_{27}H_{37}N_6O_2Cl_3$ ber.: C: 55.53, H: 6.39, N: 14.39.
gef.: C: 55.13, H: 6.52, N: 14.34.

Als 3x HBr gefällt:

EA: $C_{27}H_{37}N_6O_2Br_3$ ber.: C: 45.21, H: 5.20, N: 11.72.
gef.: C: 45.20, H: 5.13, N: 11.57.

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 141.0 °C

***tert*-Butyl 4-((3-(*p*-tolyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)methyl)piperazin-1-carboxylat (**13**)**



[MW: 358.44 g/mol]

Unter Verwendung der AAV5 mit 280 mg (1.34 mmol) **11** und 375 mg (2.01 mmol) **7** in Acetonitril wurden 405 mg (84%) **13** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 400 MHz):

δ_H (ppm) = 1.44 (s, 9H, H-22 + H-22' + H-22''), 2.41 (s, 3H, H-2''), 2.64 (bs, 4H, H-12 + H-12), 3.51 (bs, 4H, H-11 + H-11'), 3.96 (s, 2H, H-13), 7.28 (d, ³J + ⁵J = 8.0 Hz; 2H, H-18 + H-18'), 7.97 (d, ³J + ⁵J = 8.0 Hz; 2H, H-17 + H-17').

¹³C-NMR (CDCl₃, 21 °C, 100 MHz):

δ_C (ppm) = 21.7 (1C, C-2''), 28.5 (3C, C-22 + C-22' + C-22''), 43.5 (2C, C-11 + C-11'), 52.5 (2C, C12 + C-12'), 52.6 (1C, C-13), 80.3 (1C, C-21), 123.6 (1C, C-16), 127.6 (2C,

C-17 + C-17'), 129.7 (2C, C18 + C-18'), 142.0 (1C, C-19), 154.6 (1C, C-20), 168.6 (1C, C-14), 174.7 (1C, C-15).

MS (ESI+):

m/z (%) = 259.8 (100, [M(-Boc)+H]⁺).

HRMS (EI+):

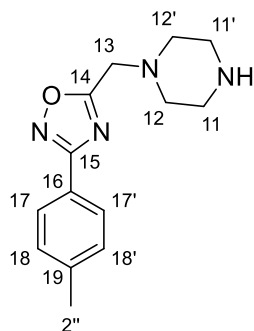
m/z C₁₄H₁₉N₄O₁ ber.: 259.1553 [M(-Boc)+H]⁺
gef.: 259.1554 [M(-Boc)+H]⁺

EA: C₁₉H₂₆N₄O₃ ber.: C: 63.67, H: 7.31, N: 15.63.

gef.: C: 63.53, H: 7.24, N: 15.58.

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 74.0 °C

5-(Piperazin-1-ylmethyl)-3-(p-tolyl)-1,2,4-oxadiazol (**14**)



[MW: 258.32 g/mol]

Unter Verwendung der AAV6 mit 2.78 g (7.76 mmol) und abweichend mit 14 ml 6 N Salzsäure in Isopropanol in DCM (78 ml) wurden 1.89 g (95%) **14** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 1.93 (s, 1H, NH), 2.40 (s, 3H, H-2''), 2.63 (t, ³J = 4.6 Hz; 4H, H-12 + H-12'), 2.95 (t, ³J = 4.8 Hz; 4H, H-11 + H-11'), 3.89 (s, 2H, H-13), 7.28 (d, ³J + ⁵J = 8.0 Hz; 2H, H-18 + H-18'), 7.97 (d, ³J + ⁵J = 8.0 Hz; 2H, H-17 + H-17').

¹³C-NMR (CDCl₃, 21 °C, 100 MHz):

δ_C (ppm) = 21.7 (1C, C-2''), 45.7 (2C, C-11 + C-11'), 53.6 (1C, C-13), 53.8 (2C, C-12 + C-12'), 123.9 (1C, C-16), 127.5 (2C, C-17 + C-17'), 129.7 (2C, C-18 + C-18'), 141.7 (1C, C-19), 168.4 (1C, C-14), 176.0 (1C, C-15).

MS (ESI+):

m/z (%) = 259.5 (100, [M+H]⁺).

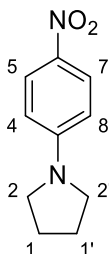
HRMS (EI+):

m/z C₁₄H₁₈N₄O₁H₁ ber.: 259.1553 [M+H]⁺
gef.: 259.1555 [M+H]⁺

EA: C₁₄H₁₈N₄O₁ x ¼ H₂O ber.: C: 63.98, H: 7.09, N: 21.32.
gef.: C: 62.79, H: 7.03, N: 20.79.

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 77.0 °C

1-(4-Nitrophenyl)pyrrolidin (15)



[MW: 192.22 g/mol]

Unter Verwendung der AAV1 mit abweichend 200 mg (1.4 mmol) 1-Fluor-4-Nitrobenzol und 286 mg (4.25 mmol) Pyrrolidin in 2 ml Acetonitril wurden 267 mg (99%) **15** ohne weitere Aufreinigung als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 400 MHz):

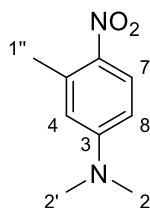
δ_H (ppm) = 4.19 (m, 4H, H-1 + H-1'), 3.40 (m, 4H, H-2 + H-2'), 6.46 (ddd, ³J = 7.1 Hz, ⁴J = 3.4 Hz; ⁵J = 2.1 Hz; 2H, H-4 + H-8), 8.11 (ddd, ³J = 7.3 Hz, ⁴J = 3.3 Hz; ⁵J = 2.1 Hz; 2H, H-5 + H-7).

MS (EI+):

m/z (%) = 193.1 (100, $[M+H]^+$).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den publizierten Daten für diese Verbindung überein.¹²²

***N,N*,3-Trimethyl-4-nitroanilin (16)**



[MW: 180.21 g/mol]

Unter Verwendung der AAV1 mit 155 mg (1 mmol) 4-Fluoro-2-methyl-1-nitrobenzen und abweichend 163 mg (2 mmol) Dimethylammoniumchlorid und 505 mg (5 mmol) NEt_3 in Acetonitril (2 ml) wurden 395 mg (73%) **16** als gelber Feststoff erhalten.

1H -NMR ($CDCl_3$, 21 °C, 400 MHz):

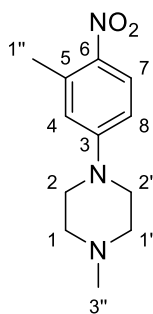
δ_H (ppm) = 2.65 (s, 3H, H-1''), 3.08 (s, 6H, H-2 + H-2'), 6.42 (d, $^4J = 2.6$ Hz; 1H, H-4), 6.50 (dd, $^3J = 9.3$ Hz, $^4J = 2.8$ Hz; 1H, H-8), 8.11 (d, $^3J = 9.4$ Hz; 1H, H-7).

MS (EI+):

m/z (%) = 181.1 (100, $[M+H]^+$).

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 80.2 °C

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den publizierten Daten für diese Verbindung überein.¹²³

1-Methyl-4-(3-methyl-4-nitrophenyl)piperazin (17)

[MW: 235.29 g/mol]

Unter Verwendung der AAV1 mit 200 mg (1.29 mmol) 4-Fluoro-2-methyl-1-nitrobenzen und 387 mg (3.85 mmol) in Acetonitril (2 ml) wurden 167 mg (55%) **17** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 2.38 (s, 3H, H-3''), 2.59 (t, ³*J* = 5.0 Hz; 4H, H-1 + H-1'), 2.62 (s, 3H, H-1''), 3.43 (t, ³*J* = 5.0 Hz; 4H, H-2 + H-2'), 6.42 (d, ⁴*J* = 2.8 Hz; 1H, H-4), 6.70 (dd, ³*J* = 9.4 Hz, ⁴*J* = 2.8 Hz; 1H, H-8), 8.07 (d, ³*J* = 9.2 Hz; 1H, H-7).

¹³C-NMR (CDCl₃, 21 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 22.7 (1C, C-1''), 46.1 (1C, C-3''), 46.9 (2C, C 2 + C-2'), 54.6 (2C, C-1 + C-1'), 111.5 (1C, C-8), 116.5 (1C, C-4), 127.9 (1C, C-7), 137.3 (1C, C-5), 139.3 (1C, C-6), 153.8 (1C, C-3).

MS (ESI+):

m/z (%) = 236.5 (100, [M+H]⁺).

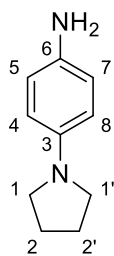
HRMS (EI+):

m/z C₁₂H₁₇N₃O₂H₁ ber.: 236.1394 [M+H]⁺
gef.: 236.1394 [M+H]⁺

EA: C₁₂H₁₇N₃O₂ ber.: C: 61.26, H: 7.28, N: 17.86.

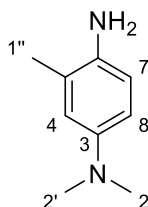
gef.: C: 61.50, H: 7.41, N: 17.80.

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 65.8 °C

4-(Pyrrolidin-1-yl)anilin (18)

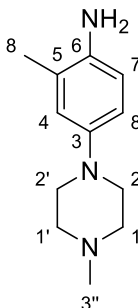
[MW: 162.23 g/mol]

Unter Verwendung der AAV2.1 mit 274 mg (1.4 mmol) **14** in 5 ml DCM wurde **18** erhalten und direkt weiter umgesetzt.

N1,N1,3-Trimethylbenzen-1,4-diamin (19)

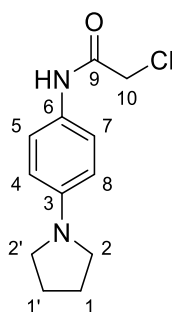
[MW: 150.22 g/mol]

Unter Verwendung der AAV2.1 mit 320mg (1.78 mmol) **16** in 5 ml DCM wurde **19** erhalten und direkt weiter umgesetzt.

2-Methyl-4-(4-methylpiperazin-1-yl)anilin (20)

[MW: 205.31 g/mol]

Unter Verwendung der AAV2.1 mit 440 mg (1.87 mmol) **17** in 5 ml DCM wurde **20** erhalten und direkt weiter umgesetzt.

2-Chloro-N-(4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)acetamid (21)

[MW: 238.71 g/mol]

Unter Verwendung der AAV2.2 mit 231 mg (1 mmol) **18** und 216 mg (1.5 mmol) Chloracetylchlorid in DCM mit säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM:Methanol = 95:5) wurden 117 mg (34%) **21** als brauner Feststoff erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 2.01 (sm, 4H, H-1 + H-1'), 3.27 (sm, 4H, H-2 + H-2'), 4.17 (s, 2H, H-10), 6.53 (d, $^3J + ^5J = 8.9$ Hz; 2H, H-4 + H-8), 7.34 (d, $^3J + ^5J = 8.9$ Hz; 2H, H-5 + H-7), 8.06 (bs, 1H, NH).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 24.9 (2C, C-1 + C-1'), 43.6 (1C, C-10), 47.4 (2C, C-2 + C-2'), 111.4 (2C, C-4 + C-8), 121.0 (2C, C-5 + C-7), 127.1 (1C, C-6), 144.7 (1C, C-3), 163.6 (1C, C-9).

MS (ESI+):

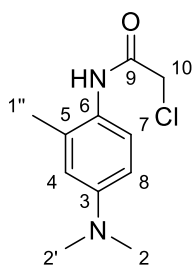
m/z (%) = 239.5 (40, [M+H]⁺), 241.5 (12, [³⁷Cl M+H]⁺), 261.4 (100, [M+Na]⁺), 263.3 (30, [³⁷Cl M+Na]⁺).

HRMS (EI+):

m/z C₁₂H₁₅ClN₂O₁Na₁ ber.: 261.0765 [M+Na]⁺
gef.: 261.0765 [M+Na]⁺

EA: C₁₂H₁₅ClN₂O₁ x ¼ H₂O ber.: C: 59.26, H: 6.42, N: 11.52.
gef.: C: 58.89, H: 6.39, N: 11.38.

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 167.0 °C

2-Chloro-N-(4-(dimethylamino)-2-methylphenyl)acetamid (22)

[MW: 226.70 g/mol]

Unter Verwendung der AAV2.2 mit 267 mg (1.78 mmol) **19** und 302 mg (2.67 mmol) Chloracetylchlorid in DCM mit säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM:Methanol = 95:5) wurden 369 mg (92%) **22** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 2.25 (s, 3H, H-1''), 2.93 (s, 6H, H-2 + H-2'), 4.22 (s, 2H, H-10), 6.53 – 6.6 (m, 2H, H-4 + H-8), 7.49 (d, ³J = 7.8 Hz; 1H, H-7), 8.01 (bs, 1H, NH).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 18.0 (1C, C-1''), 40.4 (2C, C-2 + C-2'), 43.0 (1C, C-10), 110.3 (1C, C-8), 114.1 (1C, C-4), 125.0 (1C, C-7), 126.3 (1C, C-6), 133.2 (1C, C-5), 148.4 (1C, C-3), 164.7 (1C, C-9).

MS (ESI+):

m/z (%) = 227.5 (45, [M+H]⁺), 249.4 (50, [M+Na]⁺), 251.5 (15, [³⁷ClM+Na]⁺), 453.3 (50, [2M+H]⁺), 475.2 (100, [2M+Na]⁺), 477.1 (50, [³⁷Cl2M+Na]⁺).

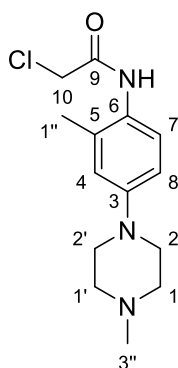
HRMS (EI+):

m/z C₁₁H₁₅ClN₂O₁Na₁ ber.: 249.0765 [M+Na]⁺
gef.: 249.0766 [M+Na]⁺

EA: C₁₁H₁₅ClN₂O₁ x ¼ H₂O ber.: C: 57.14, H: 6.76, N: 12.12.

gef.: C: 56.89, H: 6.75, N: 11.94.

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 161.0 °C

2-Chloro-N-(2-methyl-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)acetamid (23)

[MW: 281.78 g/mol]

Unter Verwendung der AAV2.2 mit 384 mg (1.87 mmol) **20** und 317 mg (2.8 mmol) Chloracetylchlorid in DCM wurden 220 mg (42%) **23** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 2.25 (s, 3H, H-1''), 2.38 (s, 3H, H-3''), 2.62 (t, ³J = 4.8, 4H, H-1 + H-1'), 3.22 (t, ³J = 4.8, 4H, H-2 + H-2'), 4.21 (s, 2H, H-10), 6.73 – 6.85 (m, 2H, H-4 + H-8), 7.58 (d, ³J = 8.5 Hz; 1H, H-7), 8.05 (bs, 1H, NH).

¹³C-NMR (CDCl₃, 21 °C, 400 MHz):

δ_{C} (ppm) = 18.1 (1C, C-1''), 43.1 (1C, C-10), 45.8 (1C, C-3''), 48.2 (2C, C-2 + C-2'), 54.6 (2C, C-1 + C-1'), 113.0 (1C, C-8), 117.0 (1C, C-4), 126.1 (1C, C-7), 127.0 (1C, C-6), 133.1 (1C, C-5), 149.0 (1C, C-3), 164.8 (1C, C-9).

MS (ESI+):

m/z (%) = 282.7 (100, [M+H]⁺), 284.5 (30, [³⁷C]M+H)⁺).

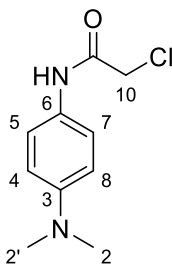
HRMS (EI+):

m/z	C ₁₄ H ₂₀ ClN ₃ O ₁ H ₁	ber.: 282.1368	[M+H] ⁺
		gef.: 282.1367	[M+H] ⁺

EA: C₁₄H₂₀ClN₃O₁ x ¼ H₂O ber.: C: 58.74, H: 7.22, N: 14.68.

gef.: C: 58.50, H: 7.08, N: 14.42.

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 262.0 °C (zersetzt sich)

2-Chloro-*N*-(4-(dimethylamino)phenyl)acetamid (24)

[MW: 212.68 g/mol]

Abweichend von AAV2.2 wurden 329 mg (2.4 mmol) *p*-Dimetylaminoanilin in H₂O (75 ml) und 1 g (7.2 mmol) Kaliumcarbonat gelöst. Dann 290 µl (3.6 mmol) Chloracetylchlorid hinzutropfen. Nach Reaktionsende wurde der entstandene Niederschlag abgesaugt und mit H₂O gewaschen. 385 mg (69%) **24** wurden als farbloser Feststoff erhalten.

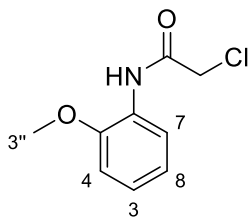
¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 2.85 (s, 6H, H-2 + H-2'), 4.18 (s, 2H, H-10), 6.70 (psd, $^3J + ^5J = 9.2$ Hz; 2H, H-4 + H-8), 7.79 (psd, $^3J + ^5J = 8.9$ Hz; 2H, H-5 + H-7), 9.96 (s, 1H, NH).

MS (EI+):

m/z (%) = 213.1 (100, [M+H]⁺).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den publizierten Daten für diese Verbindung überein.¹²⁴

2-Chloro-*N*-(2-methoxyphenyl)acetamid (25)

[MW: 199.63 g/mol]

Abweichend von AAV2.2 wurden 492 mg (4.0 mmol) 2-Methoxyanilin und 1.36 g (12.0 mmol) Chloracetylchlorid und 1.66 g (12.0 mmol) Kaliumcarbonat in H₂O gelöst, der Niederschlag nach Reaktionsende abgesaugt und mit H₂O gewaschen. Es wurden 525 mg (66%) **25** als gelber Feststoff erhalten.

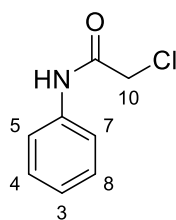
¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 3.91 (s, 3H, H-3''), 4.19 (s, 2H, H-10), 6.91 (dd, $^3J + ^5J = 8.1$ Hz; 1H, H-4), 6.99 (ddd, $^3J = 7.8$ Hz, $^4J = 1.4$ Hz; 1H, H-3), 7.10 (ddd, $^3J = 7.7$ Hz, $^4J = 1.8$ Hz; 1H, H-8), 8.33 (dd, $^3J = 8.0$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz; 1H, H-7), 9.94 (bs, 1H, NH).

MS (EI+):

m/z (%) = 200.1 (100, [^{35}Cl M+H]⁺), 202.2 (32, [^{37}Cl M+H]⁺).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den publizierten Daten für diese Verbindung überein.¹²⁵

2-Chloro-*N*-phenylacetamid (26)

[MW: 169.61 g/mol]

Abweichend von der AAV2.2 wurden 1 g (10.7 mmol) Anilin, 3.64 g (32.2 mmol) Chloracetylchlorid und 1.28 g (32.1 mmol) Natriumhydroxid in H₂O gelöst. Nach Reaktionsende wurde der Niederschlag abgesaugt und mit H₂O gewaschen. Es wurden 1.31 g (72%) **26** als farbloser Feststoff erhalten.

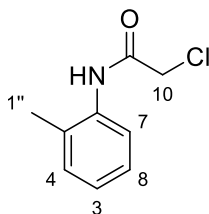
¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 4.19 (s, 2H, H-10), 7.18 (pst, $^3J = 7.33$ Hz, 1H, H-3), 7.36 (pst, $^3J + ^5J = 7.56$, 2H, H-4 + H-8), 7.55 (d, $^3J + ^5J = 7.6$ Hz; 2H, H-5 + H-7), 8.25 (bs, 1H, NH).

MS (EI+):

m/z (%) = 170.1 (100, [^{35}Cl M+H]⁺), 172.1 (32, [^{37}Cl M+H]⁺).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den publizierten Daten für diese Verbindung überein.¹²⁶

2-Chloro-*N*-(*o*-tolyl)acetamid (27)

[MW: 183.63 g/mol]

Abweichend von AAV2.2 wurde 1 g (9.3 mmol) *o*-Toluidin in H₂O (80 ml) und Dioxan (10 ml) gelöst und mit 1.12 g (28.0 mmol) Natriumhydroxid und 3.16 g (28.0 mmol) Chloracetylchlorid versetzt. Nach Reaktionsende wurde der entstandene Niederschlag abgesaugt und mit H₂O gewaschen. 841 mg (58%) wurden als farbloser Feststoff erhalten.

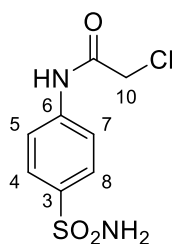
¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 300 MHz):

δ_{H} (ppm) = 2.31 (s, 3H, H-1''), 4.24 (s, 2H, H-10), 7.12 (dd, ³*J* = 6.8 Hz; ³*J* = 7.2 Hz; 1H, H-3), 7.23 (m, 2H, H-4 + H-8), 7.88 (d, ³*J* = 7.9 Hz; 1H, H-7), 8.23 (bs, 1H, NH).

MS (EI+):

m/z (%) = 184.1 (100, [M+H]⁺), 186.1 (32, [³⁷C]M+H)⁺).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den publizierten Daten für diese Verbindung überein.¹²⁵

2-Chloro-N-(4-sulfamoylphenyl)acetamid (28)

[MW: 248.68 g/mol]

Abweichend von AAV2.2 wurden 258 mg (1.5 mmol) Sulfanilamid in H₂O (20 ml) und 339 mg (3.0 mmol) NEt₃ gelöst. Dann wurden 179 µl (2.3 mmol) Chloracetylchlorid hinzugegeben. Nach Reaktionsende wurde der entstandene Niederschlag abgesaugt und mit H₂O gewaschen. 210 mg (56%) **28** wurden als farbloser Feststoff erhalten.

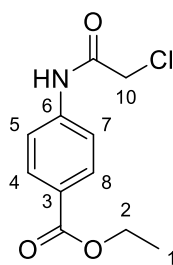
¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 4.30 (s, 2H, H-10), 7.25 (bs, 2H, NH₂), 7.74 (d, $^3J + ^5J = 9.2$ Hz; 2H, H-5 + H-7), 7.79 (d, $^3J + ^5J = 8.9$ Hz; 2H, H-4 + H-8), 10.59 (s, 1H, NH).

MS (EI+):

m/z (%) = 249.2 (40, [M+H]⁺).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den publizierten Daten für diese Verbindung überein.¹²⁷

Ethyl 4-(2-chloroacetamido)benzoat (29)

[MW: 241.67 g/mol]

Abweichend von AAV2.2 wurden mit 495 mg (3.0 mmol) Ethyl 4-aminobenzoat, 678 mg (6.0 mmol) Chloracetylchlorid und 304 mg (3.0 mmol) NEt_3 517 mg (71%) **29** als gelber Feststoff erhalten.

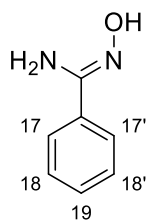
$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO, 30 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 1.30 (t, $^3J = 7.1$ Hz; 3H, H-1), 4.29 (s, 2H, H-10), 4.29 (q, $^3J = 7.1$ Hz; 2H, H-2), 7.72 (d, $^3J + ^5J = 8.9$ Hz; 2H, H-5 + H-7), 7.94 (d, $^3J + ^5J = 8.7$ Hz; 2H, H-4 + H-8), 10.6 (s, 1H, NH).

MS (EI+):

m/z (%) = 242.2 (100, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 244.2 (32, $[\text{}^{37}\text{C}]\text{M}+\text{H}]^+$).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den publizierten Daten für diese Verbindung überein.¹²⁸

(Z)-N'-Hydroxybenzimidamid (30)

[MW: 136.15 g/mol]

Abweichend von der AAV3 wurden 2 g (1.80 mmol) Benzonitril, 2.6 g (3.7 mmol) Hydroxylamin und 5.5 ml NEt_3 (7.4 mmol) in 25 ml Ethanol gelöst. 2.41 g (73%) **30** wurden als gelber Feststoff erhalten.

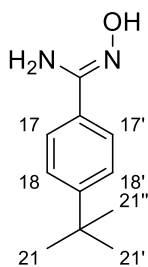
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 21 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 4.95 (bs, 2H, NH_2), 7.31 – 7.46 (m, 3H, H-18 + H-18' + H-19), 7.55 – 7.66 (m, 2H, H-17 + H-17'), 8.79 (bs, 1H, OH).

MS (EI+):

m/z (%) = 137.1 (100, $[\text{M}+\text{H}]^+$).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den publizierten Daten für diese Verbindung überein.¹²¹

(Z)-4-(tert-Butyl)-N'-hydroxybenzimidamid (31)

[MW: 192.26 g/mol]

Unter Verwendung der AAV3 mit 200 mg (1.3 mmol) 4-(*tert*-Butyl)benzonnitril und 192 mg (2.763 mmol) Hydroxyalminhydrochlorid in 5 ml Ethanol wurden 152 mg (69%) **31** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 400 MHz):

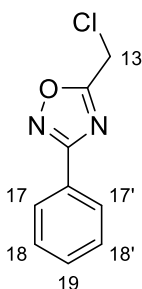
δ_{H} (ppm) = 1.33 (s, 9H, H-21 + H-21' + H-21''), 4.87 (bs, 2H, NH₂), 7.42 (d, ³J + ⁵J = 8.5 Hz; 2H, H-18 + H-18'), 7.57 (d, ³J + ⁵J = 8.5 Hz; 2H, H-17 + H-17').

MS (EI+):

m/z (%) = 193.2 (100, [M+H]⁺).

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 140.0 °C

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den publizierten Daten für diese Verbindung überein.¹²⁹

5-(Chloromethyl)-3-phenyl-1,2,4-oxadiazol (32)

[MW: 194.62 g/mol]

Unter Verwendung der AAV4 mit 103 mg (1.0 mmol) **30** und 338 mg (3.0 mmol) Acetylchlorid in Acetonitril (4 ml) wurden 126 mg (65%) **32** als farbloser Feststoff erhalten.

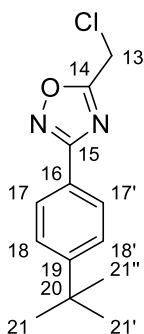
¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 4.76 (s, 2H, H-13), 7.50 (m, 3H, H-18 + H-18' + H-19), 8.09 (sm; 2H, H-17 + H-17').

MS (EI+):

m/z (%) = 194.02 (100, [M+H]⁺).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den publizierten Daten für diese Verbindung überein.¹³⁰

3-(4-(*tert*-Butyl)phenyl)-5-(chloromethyl)-1,2,4-oxadiazol (33)

[MW: 250.73 g/mol]

Unter Verwendung der AAV4 mit 194 mg (1 mmol) **31** und abweichend 451 mg (4 mmol) Chloracetylchlorid und 276 mg (2 mmol) Kaliumcarbonat wurden nach Entfernen des Lösungsmittels und säulenchromatographischer Reinigung (Cyclohexan:DCM = 1:1) 206 mg (84%) **33** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 1.36 (s, 9H, H-21 + H-21' + H-21''), 4.75 (s, 2H, H-13), 7.42 (d, $^3J + ^5J = 8.5$ Hz; 2H, H-18 + H-18'), 8.01 (d, $^3J + ^5J = 8.2$ Hz; 2H, H-17 + H-17').

¹³C-NMR (CDCl₃, 21 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 31.3 (3C, C-21 + C-21' + C-21''), 33.5 (1C, C-20), 35.2 (1C, C-13), 123.4 (1C, C-16), 126.1 (2C, C-18 + C-18'), 127.4 (2C, C-17 + C-17'), 155.2 (1C, C-19), 168.9 (1C, C-14), 174.2 (1C, C-15).

MS (ESI+):

m/z (%) = 251.07 (10, [M+H]⁺), 279.2 (100, [R-Cl → R-OMe + MeOH + H]⁺).

HRMS (EI+):

m/z C₁₃H₁₅N₂O₅ ber.: 279.0975 [M+H]⁺
gef.: 279.0941 [M+H]⁺

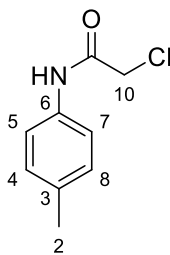
EA: C₁₃H₁₅ClN₂O

ber.: C: 62.28, H: 6.03, N: 11.17.

gef.: C: 62.91, H: 6.28, N: 10.89.

Schmelzpunkt (unkorrigiert):

51.9 °C

2-Chloro-*N*-(*p*-tolyl)acetamid (34)

[MW: 183.63 g/mol]

Unter Verwendung der AAV2.2 wurden 750 mg (7.0 mmol) *p*-Toluidin, 1.3 g (10.5 mmol) Chloracetylchlorid und 1.1 g (10.5 mmol) NEt₃ in abweichend H₂O (60 ml) und Dioxan (20 ml) gelöst. Nach Ende der Reaktion wurde der entstandene Niederschlag abgesaugt und mit H₂O gewaschen. 772 mg (60%) **34** wurden als gelber Feststoff erhalten.

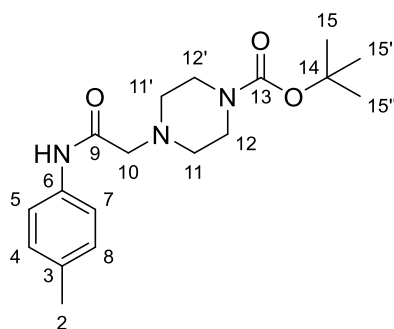
¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 300 MHz):

δ_{H} (ppm) = 2.33 (s, 3H, H-2), 4.18 (s, 2H, H-10), 7.16 (d, $^3J + ^5J = 7.9$ Hz; 2H, H-4 + H-8), 7.42 (d, $^3J + ^5J = 7.9$ Hz; 2H, H-5 + H-7), 8.19 (bs, 1H, NH).

MS (EI+):

m/z (%) = 184.1 (100, [M+H]⁺), 186.1 (32, [³⁷ClM+H]⁺).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den publizierten Daten für diese Verbindung überein.¹²⁸

***tert*-Butyl 4-(2-oxo-2-(*p*-tolylamino)ethyl)piperazin-1-carboxylat (35)**

[MW: 333.43 g/mol]

Unter Verwendung der AAV5 mit 367 mg (2.0 mmol) **34** und 558 mg (3.0 mmol) *tert*-Butyl piperazin-1-carboxylat in Acetonitril (20 ml) wurden 309 mg (93%) **35** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 1.46 (s, 9H, H-15 + H-15' + H-15''), 2.31 (s, 3H, H-2), 2.64 (bs, 4H, H-11 + H-11'), 3.22 (s, 2H, H-10), 3.53 (bs, 4H, H-12 + H-12'), 7.13 (d, ³*J* + ⁵*J* = 8.0 Hz; 2H, H-4 + H-8), 7.45 (d, ³*J* + ⁵*J* = 8.2 Hz; 2H, H-5 + H-7), 9.01 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (CDCl₃, 21 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 21.0 (1C, C-2), 28.5 (3C, C-15 + C-15' + C-15''), 43.7 (2C, C-12 + C-12'), 53.2 (2C, C-11 + C-11'), 61.9 (1C, C-10), 80.3 (1C, C-14), 119.7 (2C, C-5 + C-7), 129.7 (2C, C-4 + C-8), 134.2 (1C, C-6), 135.0 (1C, C-3), 154.6 (1C, C-13), 167.2 (1C, C-9).

MS (ESI+):

m/z (%) = 334.4 (70, [M+H]⁺), 356.4 (100, [M+Na]⁺), 689.1 (75, [2M+Na]⁺).

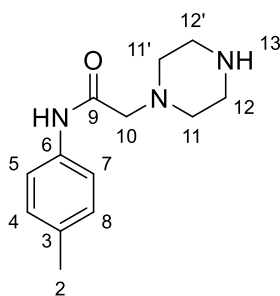
HRMS (EI+):

<i>m/z</i>	C ₁₈ H ₂₇ N ₃ O ₃ Na ₁	ber.: 356.1945 [M+Na] ⁺
		gef.: 356.1946 [M+Na] ⁺

EA: C₁₈H₂₇N₃O₃ ber.: C: 64.84, H: 8.16, N: 12.60.

gef.: C: 65.37, H: 8.24, N: 12.62.

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 131.5 °C

2-(Piperazin-1-yl)-*N*-(*p*-tolyl)acetamid (36)

[MW: 233.31 g/mol]

Unter Verwendung der AAV6 mit 666.8 mg (2 mmol) **35** und 6 M Salzsäure in Isopropanol (2 ml) in DCM (20 ml), und abweichend Reflux für 6 h, da nach 48 h bei RT kein kompletter Umsatz beobachtet wurde, wurden 263 mg (56%) **36** als gelbes Harz erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 2.32 (s, 3H, H-2), 2.51 (t, ³*J* = 4.6 Hz; 4H, H-11 + H-11'), 3.03 (t, ³*J* = 4.8 Hz; 4H, H-12 + H-12'), 3.13 (s, 2H, H-10), 3.29 (bs, 1H, H-13), 7.14 (d, ³*J* + ⁵*J* = 8.0 Hz; 2H, H-4 + H-8), 7.63 (d, ³*J* + ⁵*J* = 8.5 Hz; 2H, H-7 + H-5), 8.98 (s, 1H, NH).

¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 21.0 (1C, C-2), 45.8 (2C, C-12 + C-12'), 53.9 (2C, C-11 + C-11'), 62.6 (1C, C-10), 119.6 (2C, C-7 + C-5), 129.7 (2C, C-4 + C-8), 134.1 (1C, C-6), 135.0 (1C, C-3), 168.0 (1C, C-9).

MS (ESI⁺):

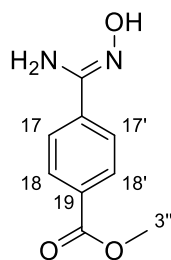
m/z (%) = 234.4 (100, [M+H]⁺).

HRMS (EI⁺):

m/z C₁₃H₁₉N₃O₁H₁ ber.: 234.1601 [M+H]⁺
gef.: 234.1601 [M+H]⁺

EA: C₁₃H₁₉N₃O₁ ber.: C: 66.92, H: 8.21, N: 18.01.

gef.: C: 67.18, H: 8.47, N: 17.54.

Methyl (Z)-4-(N'-hydroxycarbamimidoyl)benzoat (37)

[MW: 194.19 g/mol]

Unter Verwendung der AAV3 mit 1 g (6.2 mmol) Methyl 4-Cyanobenzoat und abweichend 368 mg (11.16 mmol) Hydroxylamin, ohne Verwendung von NEt_3 , in Ethanol (50 ml) wurden 1.1 g (90%) **37** als farbloser Feststoff erhalten.

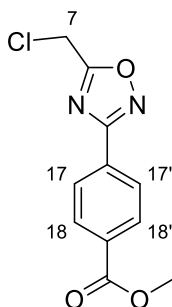
$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO, 30 °C, 300 MHz):

δ_{H} (ppm) = 3.86 (s, 3H, H-3''), 5.94 (bs, 2H, NH_2), 7.82 (d, $^3J + ^5J = 8.7$ Hz; 2H, H-17 + H-17'), 7.95 (d, $^3J + ^5J = 8.7$ Hz; 2H, H-18 + H-18'), 9.90 (s, 1H, OH).

MS (EI+):

m/z (%) = 195.2 (100, $[\text{M}+\text{H}]^+$).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den publizierten Daten für diese Verbindung überein.¹³¹

Methyl 4-(5-(chloromethyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl)benzoate (38)

[MW: 252.65 g/mol]

Unter Verwendung der AAV4 mit 388 mg (2 mmol) **37**, 738 mg (6 mmol) Chloracetylchlorid und 553 mg (4 mmol) Kaliumcarbonat wurden nach Entfernen des Lösungsmittels und säulenchromatographischer Reinigung (Ethylacetat:Cyclohexan = 1:1) 435 mg (86%) **38** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 300 MHz):

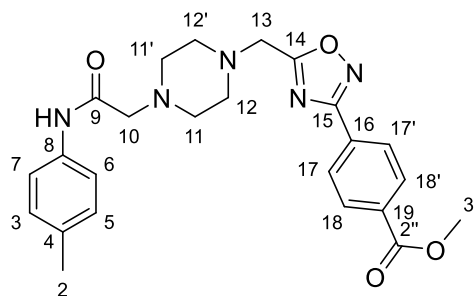
δ_{H} (ppm) = 3.95 (s, 3H, H-3''), 4.77 (s, 2H, H-7), 8.16 (s, 4H, H-17 + H-17' + H-18 + H-18').

MS (ESI⁺):

m/z (%) = 249.3 (10, [-Cl → -OMe+H]⁺).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den publizierten Daten für diese Verbindung überein.¹³²

Methyl 4-(5-((4-(2-oxo-2-(*p*-tolylamino)ethyl)piperazin-1-yl)methyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl)benzoate (39)



[MW: 449.51 g/mol]

Unter Verwendung der AAV7 mit abweichend 233 mg (1.0 mmol) **36** und abweichend 253 mg (1.1 mmol) **38** in Acetonitril (10 ml) wurden 243 mg (54%) **39** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 2.24 (s, 3H, H-2), 2.51 – 2.70 (m, 8H, H-11 + H-11' + H-12 + H-12'), 3.11 (s, 2H, H-10), 3.90 (s, 3H, H-3''), 4.02 (s, 2H, H-13), 7.09 (d, $^3J + ^5J = 8.2$ Hz; 2H, H-2 + H-5), 7.48 (d, $^3J + ^5J = 8.4$ Hz; 2H, H-6 + H-7), 8.13 (d, $^3J + ^5J = 8.5$ Hz; 2H, H-17 + H-17'), 8.17 (d, $^3J + ^5J = 8.5$ Hz; 2H, H-18 + H-18'), 9.57 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 21.0 (1C, C-2), 52.5 (2C, C-12 + C-12'), 52.6 (1C, C-13), 53.0 (1C, C-3''), 53.1 (2C, C-11 + C-11'), 62.1 (1C, C-10), 120.0 (2C, C-6 + C-7), 128.0 (2C, C-17 + C-17'), 129.5 (2C, C-3 + C-5), 130.6 (2C, C-18 + C-18'), 130.8 (1C, C-16), 132.6 (1C, C-19), 132.8 (1C, C-8), 136.6 (1C, C-4), 166.1 (1C, C-2''), 167.4 (1C, C-9), 168.4 (1C, C-14), 178.0 (1C, C-15).

MS (ESI+):

m/z (%) = 450.9 (100, [M+H]⁺).

HRMS (EI+):

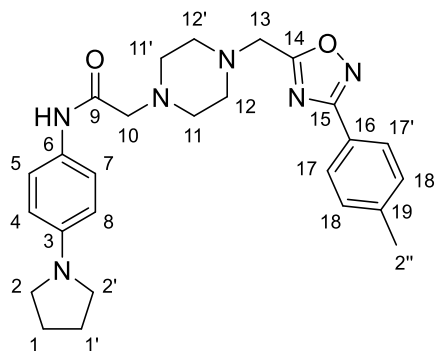
m/z C₂₄H₂₇N₅O₄H₁ ber.: 450.2136 [M+H]⁺
gef.: 450.2139 [M+H]⁺

EA: $C_{23}H_{25}N_5O_4 \times \frac{1}{2} H_2O$ ber.: C: 62.87, H: 6.16, N: 15.27.

gef.: C: 62.88, H: 6.39, N: 14.89.

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 148.1 °C

***N*-(4-(Pyrrolidin-1-yl)phenyl)-2-(4-((3-(*p*-tolyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)methyl)piperazin-1-yl)acetamid (40)**



[MW: 460.58 g/mol]

Unter Verwendung der AAV7 mit 78 mg (0.33 mmol) **21** und 129 mg (0.5 mmol) **14** in 5 ml Acetonitril wurden 118 mg (78%) **40** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 400 MHz):

δ_H (ppm) = 1.99 (sm, 4H, H-1 + H-1'), 2.42 (s, 3H, H-2''), 2.65 – 2.81 (m, 8H, H-11 + H-11' + H-12 + H-12'), 3.18 (s, 2H, H-10), 3.26 (t, ³*J* = 6.6 Hz; 4H, H-2 + H-2'), 3.96 (s, 2H, H-13), 6.51 (d, ³*J* + ⁵*J* = 8.7 Hz; 2H, H-4 + H-8), 7.29 (d, ³*J* + ⁵*J* = 8.0 Hz; 2H, H-18 + H-18'), 7.36 (d, ³*J* + ⁵*J* = 8.9 Hz; 2H, H-5 + H-7), 7.99 (d, ³*J* + ⁵*J* = 8.2 Hz; 2H, H-17 + H-17'), 8.76 (bs, 1H, NH).

¹³C-NMR (CDCl₃, 21 °C, 100 MHz):

δ_C (ppm) = 21.7 (1C, C-2''), 25.5 (2C, C-1 + C-1'), 47.9 (2C, C-2 + C-2'), 52.9 (1C, C-13), 52.9 (2C, C-12 + C-12'), 53.3 (3C, C-11 + C-11'), 61.9 (1C, C-10), 111.8 (2C, C-4 + C-8), 121.5 (1C, C-6), 121.6 (2C, C-7 + C-5), 123.8 (1C, C-16), 126.3 (1C, C-19), 127.5 (2C, C-17 + C-17'), 129.7 (2C, C-18 + C-18'), 141.7 (1C, C-19), 145.5 (1C, C-3), 167.5 (1C, C-9), 168.5 (1C, C-14), 175.9 (1C, C-15).

MS (ESI+):

m/z (%) = 461.6 (100, [2M+H]⁺), 921.2 (40, [2M+H]⁺).

HRMS (EI+):

m/z $C_{26}H_{32}N_6O_2H_1$ ber.: 461.2660[M+H]⁺
 gef.: 461.2264[M+H]⁺

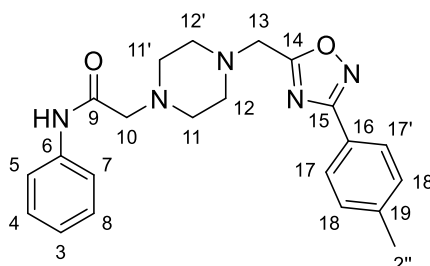
EA: $C_{26}H_{32}N_6O_2 \times 1 H_2O$ ber.: C: 65.25, H: 7.16, N: 17.56.
 gef.: C: 65.33, H: 6.77, N: 17.56.

Als 3x HCl gefällt:

EA: $C_{26}H_{35}N_6O_2Cl_3 \times 1.75 H_2O$ ber.: C: 51.92, H: 6.45, N: 13.97.
 gef.: C: 52.20, H: 6.46, N: 13.45.

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 167.0 °C

***N*-Phenyl-2-(4-((3-(*p*-tolyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)methyl)piperazin-1-yl)acetamid (**41**)**



[MW: 391.47 g/mol]

Unter Verwendung der AAV7 mit 112 mg (0.66 mmol) **26** und 258 mg (1 mmol) **14** in 10 ml Acetonitril wurden 263 mg (99%) **41** als farbloses Öl erhalten. Dieses wurde in Ethylacetat gelöst und mit 6 M HCl in Isopropanol gefällt.

¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 400 MHz):

δ_H (ppm) = 2.42 (s, 3H, C-2''), 2.81 (bs, 8H, H-11 + H-11' + H-12 + H-12'), 3.27 (bs, 2H, H-10), 3.97 (s, 2H, H-13), 7.11–7.12 (pst, ³J = 7.3 Hz; 1H, H-3), 7.25–7.35 (m, 4H, H-4 + H-8 + H-7 + H-5), 7.58 (d, ³J + ⁵J = 8.0 Hz; 2H, H-18 + H-18'), 7.99 (d, ³J + ⁵J = 8.0 Hz; 2H, H-17 + H-17'), 9.20 (bs, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 21 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 21.7 (1C, C-2''), 52.6 (1C, C-13), 52.8 (2C, C-12 + C-12'), 53.2 (2C, C-11 + C-11'), 61.7 (1C, C-10), 119.7 (2C, C-7 + C-5), 123.8 (1C, C-16), 124.5 (1C, C-3), 127.5 (2C, C-17 + C-17'), 129.2 (2C, C-4 + C-8), 129.7 (2C, C-18 + C-18'), 137.6 (1C, C-6), 141.9 (1C, C-19), 168.5 (2C, C-9 + C-14), 175.7 (1C, C-15).

MS (ESI+):

m/z (%) = 392.4 (100, $[\text{M}+\text{H}]^+$).

HRMS (EI+):

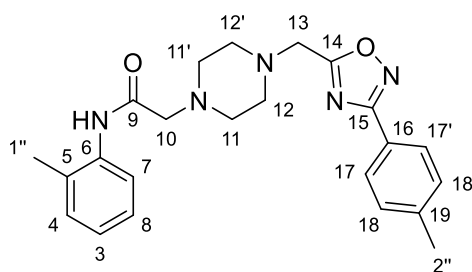
m/z $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_2\text{H}_1$ ber.: 392.2081 $[\text{M}+\text{H}]^+$
gef.: 392.2083 $[\text{M}+\text{H}]^+$

EA: $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_2 \times 2 \text{HCl}$ ber.: C: 56.90, H: 5.86, N: 15.08.

Als HCl gefällt gef.: C: 56.70, H: 5.89, N: 14.92.

***N*-(*o*-Tolyl)-2-(4-((3-(*p*-tolyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)methyl)piperazin-1-yl)acetamid**

(42)



[MW: 405.50 g/mol]

Unter Verwendung der AAV7 mit 122 mg (0.66 mmol) **27** und 258 mg (1 mmol) **14** in 10 ml Acetonitril wurden 264 mg (99%) **42** als farbloses Harz erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 21 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 2.26 (s, 3H, H-1''), 2.42 (s, 3H, H-2''), 2.77 (bs, 8H, H-11 + H-11' + H-12 + H-12'), 3.20 (s, 2H, H-10), 3.97 (s, 2H, H-13), 6.51 (ddd, $^3J = 7.4$ Hz, $^4J = 1.4$ Hz; 1H, H-3), 7.16 (d, $^3J = 7.6$ Hz; 1H, H-4), 7.22 (ddd, $^3J = 8.2$ Hz, $^4J = 1.4$ Hz; 1H, H-8), 7.29 (d, $^3J + ^5J = 7.8$ Hz; 2H, H-18 + H-18'), 7.99 (d, $^3J + ^5J = 8.2$ Hz; 2H, H-17 + H-17'), 8.12 (dd, $^3J = 8.2$ Hz, $^4J = 0.9$ Hz; 1H, H-7), 9.22 (bs, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 21 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 17.9 (1C, C-1''), 21.7 (1C, C-2''), 52.9 (1C, C-13), 53.1 (2C, C-12 + C-12'), 53.3 (2C, C-11 + C-11'), 62.0 (1C, C-10), 121.0 (1C, C-7), 123.8 (1C, C-16), 124.5 (1C, C-3), 126.0 (1C, C-8), 127.1 (1C, C-4), 127.5 (2C, C-17 + C-17'), 129.7 (2C, C-18 + C-18'), 130.4 (1C, C-19), 135.8 (1C, C-5), 141.8 (1C, C-6), 167.9 (1C, C-14), 168.4 (1C, C-9), 175.8 (1C, C-15).

MS (ESI+):

m/z (%) = 406.8 (100, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 428.5 (30, $[\text{M}+\text{Na}]^+$).

HRMS (EI+):

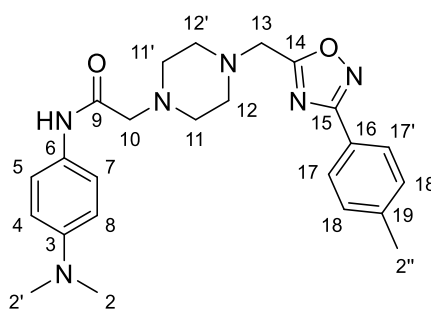
m/z $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_2\text{H}_1$ ber.: 406.2238 $[\text{M}+\text{H}]^+$

gef.: 406.2240 $[\text{M}+\text{H}]^+$

qNMR:

97.18%

***N*-(4-(Dimethylamino)phenyl)-2-(4-((3-(*p*-tolyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)methyl)piperazin-1-yl)acetamid (43)**



[MW: 434.54 g/mol]

Unter Verwendung der AAV7 mit 140 mg (0.66 mmol) **24** und 258 mg (1 mmol) **14** in 10 ml Acetonitril wurden 278 mg (97%) **43** als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 21 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 2.42 (s, 3H, H-2''), 2.64 – 2.81 (m, 8H, H-11 + H-11' + H-12 + H-12'), 2.91 (s, 6H, H-2 + H-2'), 3.13 (s, 2H, H-10), 3.96 (s, 2H, H-13), 6.71 (d, $^3J + ^5J = 8.9$ Hz; 2H, H-4 + H-8), 7.29 (d, $^3J + ^5J = 8.0$ Hz; 2H, H-18 + H-18'), 7.39 (d, $^3J + ^5J = 8.9$ Hz; 2H, H-7 + H-), 57.99 (d, $^3J + ^5J = 8.2$ Hz; 2H, H-17 + H-17'), 8.79 (bs, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 21 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 21.6 (1C, C-2''), 41.0 (2C, C-2 + C-2''), 52.9 (1C, C-13), 52.9 (2C, C-12 + C-12'), 53.3 (2C, C-11 + C-11'), 61.9 (1C, C-10), 113.2 (2C, C-4 + C-8), 121.2 (1C, C-6), 121.3 (2C, C-7 + C-5), 123.8 (1C, C-16), 127.5 (2C, C-17 + C-17'), 129.7 (2C, C-18 + C-18'), 141.7 (1C, C-19), 148.1 (1C, C-3), 167.6 (1C, C-9), 168.4 (1C, C-14), 175.8 (1C, C-15).

MS (ESI+):

m/z (%) = 435.5 (100, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 869.1 (20, $[2\text{M}+\text{H}]^+$).

HRMS (EI+):

m/z	$\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_2\text{H}_1$	ber.: 435.2503 $[\text{M}+\text{H}]^+$
		gef.: 435.2505 $[\text{M}+\text{H}]^+$

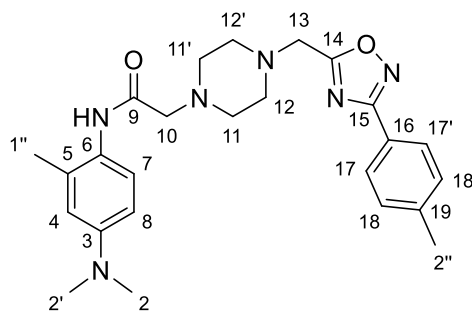
Als 3x HCl gefällt:

EA:	$\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{O}_2\text{Cl}_3 \times 1 \text{H}_2\text{O}$	ber.: C: 51.30, H: 6.28, N: 14.96.
		gef.: C: 51.03, H: 6.58, N: 14.59.

qNMR:

96.26%

***N*--(4-(Dimethylamino)-2-methylphenyl)-2-(4-((3-(*p*-tolyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)methyl)piperazin-1-yl)acetamid (**44**)**



[MW: 448.57 g/mol]

Unter Verwendung der AAV7 mit 227 mg (1 mmol) **22** und 388 mg (1.5 mmol) **14** in 20 ml Acetonitril wurden 265 mg (58%) **44** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 2.22 (s, 3H, H-1''), 2.42 (s, 3H, H-2''), 2.75 (bs, 8H, H-11 + H11' + H-12' + H-12'), 2.91 (s, 6H, H-2 + H-2'), 3.18 (s, 2H, H-10), 3.95 (s, 2H, H-13), 6.53 – 6.66 (m, 2H, H-4 + H-8), 7.29 (d, ³*J* + ⁵*J* = 8.0 Hz; 2H, H-18 + H-18'), 7.72 (d, ³*J* = 8.7 Hz; 1H, H-7), 7.98 (d, ³*J* + ⁵*J* = 8.0 Hz; 2H, H-17 + H-17'), 8.88 (bs, 1H, NH).

¹³C-NMR (CDCl₃, 21 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 18.4 (1C, C-1''), 21.6 (1C, C-2''), 41.0 (2C, C-2 + C-2'), 52.9 (1C, C-13), 53.1 (2C, C-11 + C-11'), 53.3 (3C, C-12 + C-12'), 61.9 (1C, C-10), 111.3 (1C, C-8), 114.7 (1C, C-4), 123.5 (1C, C-7), 123.7 (1C, C-6), 125.5 (1C, C-16), 127.5 (2C, C-17 + C-17'), 129.6 (2C, C-18 + C-18'), 129.7 (1C, C-19), 141.7 (1C, C-5), 148.4 (1C, C-3), 167.7 (1C, C-14), 168.4 (1C, C-9), 175.8 (1C, C-15).

MS (ESI+):

m/z (%) = 449.5 (100, [M+H]⁺), 471.4 (20, [M+Na]⁺), 897.0 (30, [2M+H]⁺).

HRMS (EI+):

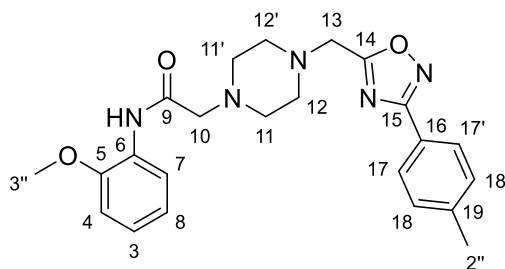
m/z C₂₅H₃₂N₆O₂H₁ ber.: 449.2660 [M+H]⁺
gef.: 449.2663 [M+H]⁺

EA: C₂₅H₃₂N₆O₂ x ¼ H₂O ber.: C: 66.27, H: 7.23, N: 18.55.

gef.: C: 66.16, H: 7.09, N: 18.50.

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 127.0 °C

***N*-(2-Methoxyphenyl)-2-(4-((3-(*p*-tolyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)methyl)piperazin-1-yl)acetamid (45)**



[MW: 421.50 g/mol]

Unter Verwendung der AAV7 mit 66 mg (0.33 mmol) **25** und 129 mg (0.5 mmol) **14** in 5 ml Acetonitril wurden 278 mg (98%) **45** als farbloses Harz erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 2.42 (s, 3H, H-2''), 2.84 (bs, 8H, H-11 + H-11' + H-12 + H-12'), 3.25 (bs, 2H, H-10), 3.81 (s, 3H, H-3''), 4.01 (s, 2H, H-13), 6.85 (dd, ³*J* = 8.1 Hz, ⁴*J* = 1.4 Hz; 1H, H-4), 6.95 (ddd, ³*J* = 7.6 Hz, ⁴*J* = 1.4 Hz; 1H, H-3), 7.04 (ddd, ³*J* = 7.9 Hz, ⁴*J* = 1.6 Hz; 1H, H-8), 7.29 (d, ³*J* + ⁵*J* = 7.8 Hz; 2H, H-18 + H-18'), 7.98 (d, ³*J* + ⁵*J* = 8.0 Hz; 2H, H-17 + H-17'), 8.31 (d, ³*J* = 7.8 Hz, ³*J* = 7.8 Hz; 1H, H-7), 9.69 (bs, 1H, NH).

¹³C-NMR (CDCl₃, 21 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 21.7 (1C, C-2''), 52.7 (2C, C-12 + C-12'), 52.9 (3C, C-11 + C-11' + C-13), 55.8 (1C, C-3''), 61.7 (1C, C-10), 110.1 (1C, C-4), 119.8 (1C, C-7), 121.1 (1C, C-8), 123.7 (1C, C-16), 124.1 (1C, C-3), 127.2 (1C, C-6), 127.5 (2C, C-17 + C-17'), 129.7 (2C, C-18 + C-18'), 141.9 (1C, C-19), 148.5 (1C, C-5), 168.4 (1C, C-9), 168.5 (1C, C-14), 175.6 (1C, C-15).

MS (ESI+):

m/z (%) = 422.8 (100, [M+H]⁺), 444.6 (90, [M+Na]⁺), 865.1 (25, [2M+Na]⁺).

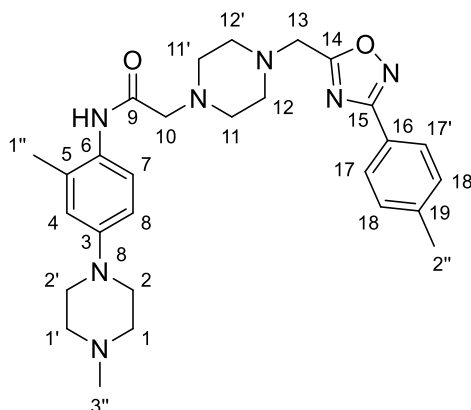
HRMS (EI+):

m/z C₂₃H₂₇N₅O₃Na₁ ber.: 444.2006[M+Na]⁺
gef.: 444.2009[M+Na]⁺

qNMR:

97.90%

***N*-(2-Methyl-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-2-(4-((3-(*p*-tolyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)methyl)piperazin-1-yl)acetamid (46)**



[MW: 503.65 g/mol]

Unter Verwendung der AAV7 mit 197 mg (0.7 mmol) **23** und 274 mg (1.06 mmol) **14** in 10.6 ml Acetonitril wurden 284 mg (80%) **46** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 2.21 (s, 3H, H-1''), 2.40 (s, 3H, H-3''), 2.41 (s, 3H, H-2''), 2.62 (t, ³*J* = 4.8 Hz; 4H, H-1 + H-1'), 2.74 (bs, 8H, H-11 + H-11' + H-12 + H-12'), 3.17 (s, 2H, H-13), 3.21 (t, ³*J* = 4.8 Hz; 4H, H-2 + H-2'), 3.95 (s, 2H, H-10), 6.74 (d, ⁴*J* = 2.5 Hz; 1H, H-4), 6.78 (dd, ³*J* = 8.8 Hz, ⁴*J* = 2.5 Hz; 1H, H-8), 7.29 (d, ³*J* + ⁵*J* = 8.0 Hz; 2H, H-18 + H-18'), 7.84 (d, ³*J* = 8.9 Hz; 1H, H-7), 7.98 (d, ³*J* + ⁵*J* = 8.0 Hz; 2H, H-17 + H-17'), 8.97 (bs, 1H, NH).

¹³C-NMR (CDCl₃, 21 °C, 100 MHz):

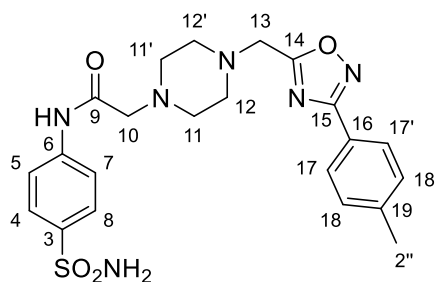
δ_{C} (ppm) = 18.4 (1C, C-1''), 21.7 (1C, C-2''), 45.9 (1C, C-3''), 49.3 (2C, C-2 + C-2'), 52.9 (1C, C-13), 53.1 (2C, C-12 + C-12'), 53.4 (2C, C-11 + C-11'), 55.0 (2C, C-1 + C-1'), 62.0 (1C, C-10), 115.0 (1C, C-8), 118.5 (1C, C-4), 122.9 (1C, C-7), 123.8 (1C, C-16), 127.5 (2C, C-17 + C-17'), 128.5 (1C, C-6), 129.1 (1C, C-5), 129.7 (2C, C-18 + C-18'), 141.8 (1C, C-19), 148.3 (1C, C-3), 167.8 (1C, C-9), 168.5 (1C, C-14), 175.9 1C, C-15).

MS (ESI+):

m/z (%) = 504.6 (100, [M+H]⁺).

HRMS (EI+):m/z C₂₈H₃₇N₇O₂H₁ ber.: 504.3081 [M+H]⁺gef.: 504.3084 [M+H]⁺**EA:** C₂₈H₃₇N₇O₂ x ¼ H₂O ber.: C: 66.18, H: 7.44, N: 19.30.

gef.: C: 66.02, H: 7.47, N: 19.07.

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 145.0 °C***N*-(4-Sulfamoylphenyl)-2-(4-((3-(*p*-tolyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)methyl)piperazin-1-yl)acetamid (**47**)**

[MW: 470.55 g/mol]

Unter Verwendung der AAV7 mit 125 mg (0.5 mmol) **28** und 194 mg (0.75 mmol) **14** in 7.5 ml Acetonitril wurden 235 mg (71%) **47** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 2.43 (s, 3H, H-2''), 2.74 (bs, 8H, H-11 + H-11' + H-12 + H-12'), 3.19 (s, 2H, H-13), 3.95 (s, 2H, H-10), 4.87 (bs, 2H, NH₂), 7.30 (d, ³*J* + ⁵*J* = 8.3 Hz; 2H, H-18 + H-18'), 7.71 (d, ³*J* + ⁵*J* = 8.9 Hz; 2H, H-5 + H-7), 7.74 (d, ³*J* + ⁵*J* = 8.0 Hz; 2H, H-4 + H-8), 7.79 (d, ³*J* + ⁵*J* = 8.6 Hz; 2H, H-17 + H-17'), 9.31 (bs, 1H, NH).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 100 MHz)

δ_{C} (ppm) = 21.1 (1C, C-2''), 52.0 (2C, C-12 + C-12'), 52.5 (3C, C-11 + C-11' + C-13), 119.0 (2C, C-5 + C-7), 123.3 (1C, C-16), 126.6 (2C, C-4 + C-8), 127.0 (2C, C-17 + C-17'), 129.9 (2C, C-18 + C-18'), 138.5 (1C, C-6), 141.5 (1C, C-19), 141.6 (1C, C-3), 167.5 (1C, C-9), 173.7 (1C, C-14), 176.7 (1C, C-15).

MS (ESI+):

m/z (%) = 471.6 (100, $[M+H]^+$), 941.1 (55, $[2M+H]^+$).

HRMS (EI+):

m/z $C_{22}H_{26}N_6O_4SH_1$ ber.: 471.1809 $[M+H]^+$

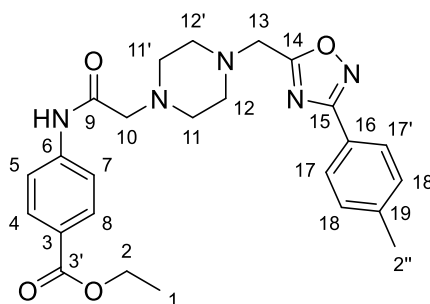
gef.: 471.1813 $[M+H]^+$

EA: $C_{22}H_{26}N_6O_4S \times 1 H_2O$ ber.: C: 54.08, H: 5.78, N: 17.20.

gef.: C: 54.43, H: 5.75, N: 17.32.

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 171.0 °C

Ethyl 4-(2-(4-((3-(*p*-tolyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)methyl)piperazin-1-yl)acetamido)benzoat (48)



[MW: 463.54 g/mol]

Unter Verwendung der AAV7 mit 242 mg (1.0 mmol) **29** und abweichend 284 mg (1.1 mmol) **14** in Acetonitril (10 ml) wurden 387 mg (84%) **48** als gelber Feststoff erhalten.

1H -NMR (d_6 -DMSO, 30 °C, 400 MHz):

δ_H (ppm) = 1.31 (t, $^3J = 7.1$ Hz; 3H, H-1), 2.38 (s, 3H, H-2''), 2.48 – 2.75 (m, 8H, H-11 + H-11' + H-12 + H-12'), 3.17 (s, 2H, H-10), 3.98 (s, 2H, H-13), 4.28 (q, $^3J = 7.1$ Hz; 2H, H-2), 7.38 (d, $^3J + ^5J = 7.8$ Hz; 2H, H-18 + H-18'), 7.76 (d, $^3J + ^5J = 8.9$ Hz; 2H, H-5 + H-7), 7.90 (d, $^3J + ^5J = 8.7$ Hz; 2H, H-4 + H-8), 7.91 (d, $^3J + ^5J = 8.3$ Hz; 2H, H-17 + H-17'), 10.01 (s, 1H, NH).

^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 30 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 14.1 (1C, C-1), 21.0 (1C, C-2''), 51.9 (2C, C-12 + C-12'), 52.0 (1C, C-13), 52.5 (2C, C-11 + C-11'), 60.3 (1C, C-2), 61.6 (1C, C-10), 118.7 (2C, C-7 + C-5), 123.3 (1C, C-16), 124.3 (1C, C-6), 126.9 (2C, C-17 + C-17'), 129.7 (2C, C-18 + C-18'), 130.0 (2C, C-4 + C-8), 141.4 (1C, C-19), 142.9 (1C, C-3), 165.2 (1C, C-9), 167.4 (1C, C-14), 168.8 (1C, C-3'), 176.7 (1C, C-15).

MS (ESI+):

m/z (%) = 464.5 (100, $[\text{M}+\text{H}]^+$).

HRMS (EI+):

m/z $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_4\text{H}_1$ ber.: 464.2292 $[\text{M}+\text{H}]^+$

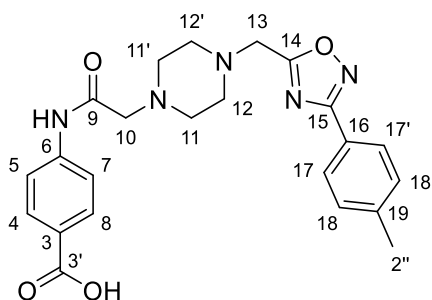
gef.: 464.2298 $[\text{M}+\text{H}]^+$

EA: $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_4$ ber.: C: 64.78, H: 6.31, N: 15.11.

gef.: C: 65.76, H: 6.41, N: 14.95.

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 103.0 °C

4-(2-(4-((3-(*p*-Tolyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)methyl)piperazin-1-yl)acetamido)benzoesäure (49)



[MW: 435.48 g/mol]

100 mg (0.22 mmol) **48** wurden in 5 ml Methanol gegeben, mit 1 ml 2 M NaOH-Lsg. und 0.25 ml H_2O versetzt und bei RT über Nacht gerührt. Nach vollständigem Umsatz, Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck und säulenchromatographischer Reinigung (Ethylacetat:Methanol = 95:5) wurden 34 mg (50%) **49** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 2.39 (s, 3H, H-2''), 2.51 – 2.69 (m, 8H, H-11 + H-11' + H-12 + H-12'), 3.16 (s, 2H, H-10), 3.98 (s, 2H, H-13), 7.38 (d, ³*J* + ⁵*J* = 7.8 Hz; 2H, H-18 + H-18'), 7.73 (d, ³*J* + ⁵*J* = 7.3 Hz; 2H, H-5 + H-7), 7.81 – 7.94 (m, 4H, H-4 + H-8 + H-17 + H-17'), 9.98 (s, 1H, NH), 12.68 (s, 1H, OH).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 21.1 (1C, C-2''), 52.0 (2C, C-12 + C-12'), 52.1 (1C, C-13), 52.5 (2C, C-11 + C-11'), 61.7 (1C, C-10), 118.6 (2C, C-5 + C-7), 123.4 (1C, C-16), 126.5 (1C, C-6), 127.0 (2C, C-17 + C-17'), 129.8 (2C, C-18 + C-18'), 130.2 (2C, C-4 + C-8), 141.5 (1C, C-19), 142.2 (1C, C-3), 167.4 (1C, C-9), 167.5 (1C, C-14), 168.7 (1C, C-3'), 176.8 (1C, C-15).

MS (ESI+):

m/z (%) = 436.5 (100, [M+H]⁺).

HRMS (EI+):

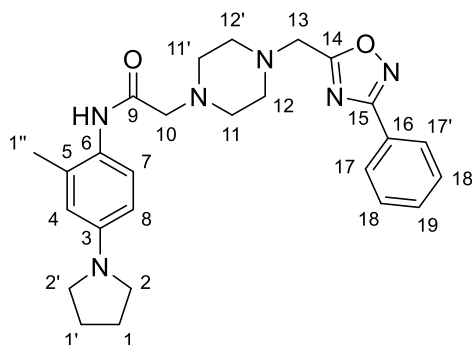
m/z	$\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_4\text{H}_1$	ber.: 436.1979 [M+H] ⁺
		gef.: 436.1983 [M+H] ⁺

EA: $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_4 \times 1.5 \text{H}_2\text{O}$ ber.: C: 59.73, H: 6.10, N: 15.14.

gef.: C: 59.27, H: 6.13, N: 14.89.

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 213.0 °C (Zersetzung)

***N*-(2-Methyl-4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)-2-(4-((3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)methyl)piperazin-1-yl)acetamid (50)**



[MW: 460.58 g/mol]

Unter Verwendung der AAV7 mit 64 mg (0.33 mmol) **32** und 150 mg (0.5 mmol) **9** in 5 ml Acetonitril wurden 132 mg (87%) **50** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 1.98 (sm, 4H, H-1 + H-1'), 2.21 (s, 3H, H-1''), 2.79 (s, 8H, H-11 + H-11' + H-12 + H-12'), 3.15 – 3.35 (m, 6H, H-2 + H-2' + H-10), 3.97 (s, 2H, H-13), 6.33 – 6.49 (m, 2H, H-4 + H-8), 7.46 – 7.55 (m, 3H, H-18 + H-18' + H-19), 7.62 (d, ³*J* = 8.0 Hz; 1H, H-7), 8.10 (dd, ³*J* = 8.0 Hz, ⁴*J* = 1.8 Hz; 2H, H-17 + H-17'), 8.89 (bs, 1H, NH).

¹³C-NMR (CDCl₃, 21 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 18.5 (1C, C-1''), 25.5 (2C, C-1 + C-1'), 47.9 (2C, C-2 + C-2'), 52.9 (2C, C-11 + C-11'), 53.3 (3C, C-12 + C-12' + C-13), 61.7 (1C, C-10), 109.9 (1C, C-8), 113.4 (1C, C-4), 124.2 (1C, C-7), 126.6 (1C, C-16), 127.6 (2C, C-17 + C-17'), 129.0 (2C, C-18 + C-18'), 131.4 (1C, C-19), 168.5 (1C, C-9 + C-14), 175.9 (1C, C-15).

MS (ESI+):

m/z (%) = 461.6 (100, [M+H]⁺), 483.6 (10, [M+Na]⁺), 921.2 (40, [2M+H]⁺).

HRMS (EI+):

<i>m/z</i>	C ₂₆ H ₃₂ N ₆ O ₂ H ₁	ber.: 461.2660 [M+H] ⁺
		gef.: 461.2664 [M+H] ⁺

EA: C₂₆H₃₂N₆O₂ 1 H₂O

ber.: C: 65.25, H: 7.16, N: 17.56.

gef.: C: 65.33, H: 6.77, N: 17.56.

Als 3x HCl gefällt:

EA: C₂₆H₃₅N₆O₂Cl₃

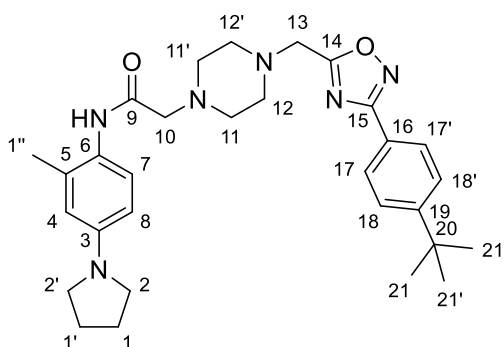
ber.: C: 53.94, H: 6.27, N: 14.52.

gef.: C: 54.01, H: 6.35, N: 14.31.

Schmelzpunkt (unkorrigiert):

146.0 °C

2-(4-((3-(4-(*tert*-Butyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)methyl)piperazin-1-yl)-*N*-(2-methyl-4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)acetamid (51**)**



[MW: 516.69 g/mol]

Unter Verwendung der AAV7 mit 83 mg (0.33 mmol) **33** und 150 mg (0.5 mmol) **9** in 5 ml Acetonitril wurden 144 mg (84%) **51** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 1.36 (s, 9H, H-21 + H-21' + H-21''), 1.98 (sm, 4H, H-1 + H-1'), 2.20 (s, 3H, H-1''), 2.75 (bs, 8H, H-11 + H11' + H-12' + H-12'), 3.16 (s, 2H, H-10), 3.25 (t, ³*J* = 6.6 Hz; 4H, H-2 + H-2'), 3.96 (s, 2H, H-13), 6.37 (d, ⁴*J* = 2.5 Hz; 1H, H-4), 6.42 (dd, ³*J* = 8.7 Hz, ⁴*J* = 2.7 Hz; 1H, H-8), 7.50 (d, ³*J* + ⁵*J* = 8.7 Hz; 2H, H-18 + H-18'), 7.64 (d, ³*J* = 8.7 Hz; 1H, H-7), 8.03 (d, ³*J* + ⁵*J* = 8.5 Hz; 2H, H-17 + H-17'), 8.81 (bs, 1H, NH).

¹³C-NMR (CDCl₃, 21 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 18.5 (1C, C-1''), 25.5 (2C, C-1 + C-1'), 31.3 (3C, C-21 + C-21' + C-21''), 35.1 (1C, C-20), 47.9 (2C, C-2 + C-2'), 52.8 (2C, C-11 + C-11'), 53.2 (3C, C-12 + C-12' + C-13), 61.7 (1C, C-10), 109.9 (1C, C-8), 113.4 (1C, C-4), 123.7 (1C, C-7), 124.2 (1C, C-6), 124.3 (1C, C-16), 125.9 (2C, C-17 + C-17'), 127.4 (2C, C-18 + C-18'), 130.6 (1C, C-5), 146.0 (1C, C-3), 154.8 (1C, C-19), 168.5 (2C, C-9 + C-14), 175.8 (1C, C-15).

MS (ESI+):

m/z (%) = 517.7 (100, $[M+H]^+$).

HRMS (EI+):

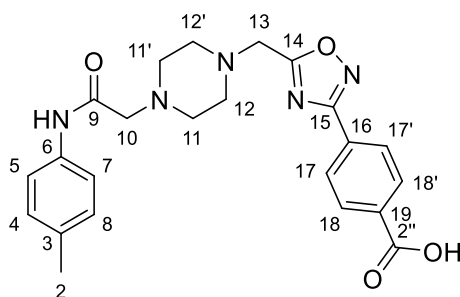
m/z $C_{30}H_{40}N_6O_2H_1$ ber.: 517.3286 $[M+H]^+$
gef.: 517.3289 $[M+H]^+$

EA: $C_{30}H_{40}N_6O_2 \times \frac{1}{4} H_2O$ ber.: C: 69.14, H: 7.83, N: 16.12.

gef.: C: 69.17, H: 7.79, N: 16.05.

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 99.0 °C

4-(5-((4-(2-Oxo-2-(*p*-tolylamino)ethyl)piperazin-1-yl)methyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl)benzoesäure (52)



[MW: 435.48 g/mol]

100 mg **39** (0.22 mmol) wurden in 5 ml Methanol gegeben, mit 1 ml 2M NaOH-Lsg. und 0.25 ml H_2O versetzt und bei RT über Nacht gerührt. Nach vollständigem Umsatz, Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck und säulenchromatographischer Reinigung (DCM:Methanol = 92:8) und Umkristallisation aus Methanol wurden 82 mg (86%) **52** als farbloser Feststoff erhalten.

 1H -NMR (d_6 -DMSO, 30 °C, 400 MHz):

δ_H (ppm) = 2.24 (s, 3H, H-2), 2.52 – 2.70 (m, 8H, H-11 + H-11' + H-12 + H-12'), 3.11 (s, 2H, H-10), 4.02 (s, 2H, H-13), 7.09 (d, $^3J + ^5J = 8.2$ Hz; 2H, H-4 + H-8), 7.48 (d, $^3J + ^5J = 8.4$ Hz; 2H, H-7 + H-5), 8.11 (d, $^3J + ^5J = 8.7$ Hz; 2H, H-17 + H-17'), 8.15 (d, $^3J + ^5J = 8.2$ Hz; 2H, H-18 + H-18'), 9.57 (s, 1H, NH), 13.26 (bs, 1H, OH).

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 6.10 (bs, 2H, H-3''), 7.04 (d, $^3J = 8.5$ Hz; 1H, H-7), 7.19 (d, $^3J = 8.2$ Hz; 1H, H-6), 7.41 – 7.58 (m, 3H, H-13 + H-14 + H-15), 7.65 (s, 1H, H-4), 7.95 (d, $^3J = 8.0$ Hz; 1H, H-12 + H-16), 9.99 (s, 1H, H-1''), 10.68 (bs, 1H, H-1).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 104.9 (1C, C-4), 110.9 (1C, C-7), 112.9 (1C, C-6), 127.5 (2C, C-12 + C-16), 128.3 (2C, C-13 + C-15), 131.0 (1C, C-14), 131.2 (1C, C-5), 135.5 (2C, C-8 + C-11), 138.0 (1C, C-9), 155.7 (1C, C-2), 164.9 (1C, C-10).

MS (ESI+):

m/z (%) = 253.1 (100, [M+H]⁺), 505.2 (10, [2M+H]⁺), 757.3 (5, [3M+H]⁺).

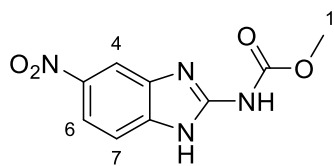
HRMS (EI+):

m/z	$\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_1$	ber.: 253.1084 [M+H] ⁺
		gef.: 253.1101 [M+H] ⁺

qHNMR:

95.39%

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 288.3 °C

Methyl (5-nitro-1*H*-benzimidazol-2-yl)carbamat (73)

[MW: 236.19 g/mol]

1 g (5.2 mmol) Methyl (1*H*-Benzoimidazol-2-yl)carbamate wurden zu 4 ml konzentrierter Salpetersäure gegeben und für 1 Stunde bei 30 °C gerührt. Der Ansatz wurde auf 50 g Eis gegeben, der entstandene Niederschlag abgesaugt und bei vermindertem Druck bei 60 °C getrocknet. Es wurden 0.91 g (74%) **73** als gelber Feststoff erhalten.

¹**H-NMR** (*d*₆-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

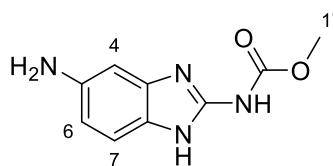
δ_{H} (ppm) = 3.81 (s, 3H, H-1'), 7.58 (d, ³*J* = 8.9 Hz; 1H, H-7), 8.06 (dd, ³*J* = 8.6 Hz, ⁴*J* = 2.3 Hz; 1H, H-6), 8.29 (d, ⁴*J* = 2.3 Hz; 1H, H-4).

MS (ESI+):

m/z (%) = 237.2 (23, [M+H]⁺), 278.3 (100, [M+MeCN+H]⁺).

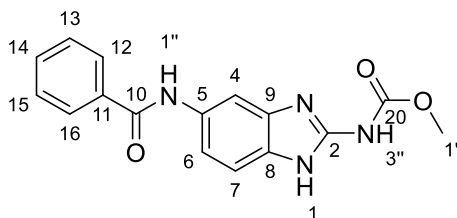
Schmelzpunkt (unkorrigiert): 114.0 °C

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den publizierten Daten für diese Verbindung überein.⁸¹

Methyl (5-amino-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)carbamat (74)

[MW: 206,21 g/mol]

500 mg (2.1 mmol) **73** wurden in einem Druckreaktor mit einem Volumen von 25 ml in 10 ml gesättigter methanolischer Natriumhydroxidlösung gegeben und mit Pd/C (30 mg/mmol Edukt) versetzt. Die Luft wurde aus dem Reaktionsgefäß verdrängt und durch eine Wasserstoffatmosphäre ersetzt. Die Reaktionsmischung wurde bis zur vollständigen Umsetzung bei 10 Bar Druck gerührt (<24 h). Nach vollständigem Umsatz wurde der entstandene Niederschlag mit 0.5 ml konz. Salzsäure gelöst und der Katalysator über einen Glassinterfilter entfernt. Das Filtrat wurde mit 2M Natriumhydroxid-Lösung auf pH 14 gebracht und der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt und bei vermindertem Druck im Vakuumtrockenofen getrocknet. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

Methyl (5-benzamido-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)carbamat (75)

[MW: 310.31 g/mol]

Unter Verwendung der AAV8 mit 226 mg (1.1 mmol) **74** und 122 mg (1.0 mmol) Benzoesäure wurden 50 mg (16%) **75** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 3.75 (s, 3H, H-1'), 7.33 (d, ³*J* = 8.7 Hz; 1H, H-7), 7.40 (dd, ³*J* = 8.7 Hz, ⁴*J* = 1.8 Hz; 1H, H-6), 7.48 – 7.60 (m, 3H, H-13 + H-14 + H-15), 7.97 (m, 3H, H-4 + H-12 + H-16), 10.16 (s, 1H, H-1''), 11.58 (bs, 2H, H-1 + H-3'').

^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 30 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 52.4 (1C, C-1'), 106.2 (1C, C-4), 113.2 (1C, C-7), 115.0 (1C, C-6), 127.6 (2C, C-12 + C-16), 128.3 (2C, C-13 + C-15), 131.3 (1C, C-14), 133.0 (1C, C-5), 135.5 (1C, C-8), 147.2 (1C, C-2), 147.9 (1C, C-9), 155.2 (2C, C-11 + C-20), 165.2 (1C, C-10).

MS (ESI+):

m/z (%) = 311.5 (100, $[\text{M}+\text{H}]^+$).

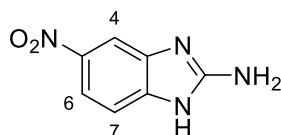
HRMS (EI+):

m/z $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_3$ ber.: 311.1139 $[\text{M}+\text{H}]^+$
gef.: 311.1142 $[\text{M}+\text{H}]^+$

EA: $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3 \times 1 \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ ber.: C: 56.97, H: 5.08, N: 16.61.
gef.: C: 57.22, H: 4.68, N: 16.70.

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 303.5 °C

5-Nitro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amin (**76**)



[MW: 178.15 g/mol]

Die Synthese von **76** wurde entsprechend der Vorschrift von R. W. Huigens *et al.*¹³³ mit 5.1 g (33.1 mmol) 4-Nitro-1,2-phenylendiamin und 3.55 g (33.5 mmol) Bromcyan durchgeführt. 5.9 g (99%) **76** wurden als gelber Feststoff erhalten.

^1H -NMR (d_6 -DMSO, 30 °C, 400 MHz):

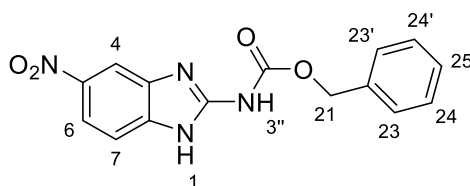
δ_{H} (ppm) = 6.94 (s, 2H, NH_2), 7.19 (d, $^3J = 8.7$ Hz; 1H, H-7), 7.88 (dd, $^3J = 8.7$ Hz, $^4J = 2.3$ Hz; 1H, H-6), 7.94 (d, $^3J = 2.3$ Hz; 1H, H-4).

MS (ESI+):

m/z (%) = 179.3 (100, [1M+H]⁺).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den publizierten Daten für diese Verbindung überein.¹³³

Benzyl (5-nitro-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbammat (77)



[MW: 312.28 g/mol]

445 mg (2.5 mmol) **76** wurden in 80 ml Tetrahydrofuran suspendiert und auf 0 °C abgekühlt. 427 mg (355 µl, 2.5 mmol Benzylchloroformat) wurden in 25 ml Tetrahydrofuran gelöst, langsam zu **76** hinzuge tropft und der Reaktionsansatz auf Raumtemperatur erwärmt. Nach vollständigem Umsatz wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (DCM:Methanol = 95:5) lieferten 350 mg (45%) **77** als farblosen Feststoff.

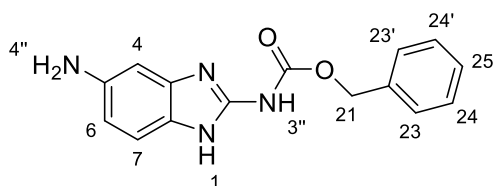
¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 5.29 (s, 2H, H-21), 7.29-7.50 (m, 5H, H-23 + H-23' + H-24 + H-24' + H-25), 7.54 (d, ³*J* = 8.7 Hz; 1H, H-7), 8.02 (dd, ³*J* = 8.7 Hz, ⁴*J* = 2.3 Hz; 1H, H-6), 8.23 (d, ³*J* = 2.1 Hz; 1H, H-4), 12.15 (bs, 2H, H-1 + H-3'').

MS (ESI+):

m/z (%) = 179.3 (75, [5-nitro-1H-benzo[d]imidazol-2-amin+H]⁺), 313.3 (15, [M+H]⁺).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den publizierten Daten für diese Verbindung überein.¹³⁴

Benzyl (5-amino-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)carbamat (78)

[MW: 282.30 g/mol]

800 mg (2.5 mmol) **77** wurden in 67 ml Methanol und 4 ml konzentrierter Essigsäure suspendiert und mit 320 mg/mmol Zink Pulver versetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung wurde der Reaktionsansatz mit 100 ml Ethylacetat aufgenommen und ges. NaHCO₃ zugeben, bis ein pH-Wert von 7 erreicht war. Die organische Phase wurde dann unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Säulenchromatographische Reinigung (DCM:Methanol = 95:5) lieferte 578 mg (80%) **78** als braunen Feststoff.

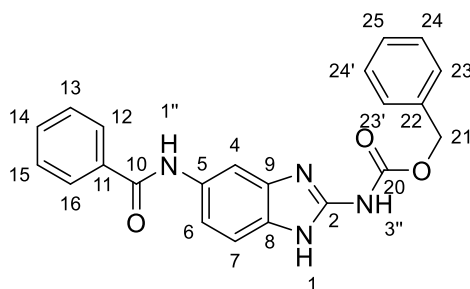
¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 4.76 (bs, 2H, H-4''), 5.46 (s, 2H, H-21), 6.20 (dd, ³*J* = 8.5 Hz, ⁴*J* = 1.6 Hz; 1H, H-6), 6.41 (d, ⁴*J* = 1.8 Hz; 1H, H-4), 7.06 (bs, 2H, H-1 + H-3''), 7.20 (d, ³*J* = 8.5 Hz; 1H, H-7), 7.37 – 7.47 (m, 3H, H-24 + H-24' + H-25), 7.52 (d, ³*J* = 7.1 Hz; 2H, H-23 + H-23').

MS (ESI+):

m/z (%) = 283.3 (100, [M+H]⁺), 324.4 (20, [M+MeCN+H]⁺).

Die Verbindung wurde ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

Benzyl (5-benzamido-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbammat (79)

[MW: 386.41 g/mol]

Unter Verwendung der AAV8 mit 310 mg (1.1 mmol) **78** und 122 mg (1.0 mmol) Benzoesäure wurden 117 mg (30%) **79** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 300 MHz):

δ_{H} (ppm) = 5.52 (s, 2H, H-21), 7.26 (bs, 2H, H-1 + H-3''), 7.34 (dd, ³*J* = 8.7 Hz, ⁴*J* = 1.8 Hz; 1H, H-6), 7.37 – 7.60 (m, 9H, H-7 + H-13 + H-14 + H-15 + H-23 + H-23' + H-24 + H-24' + H-25), 7.70 (s, 1H, H-4), 7.94 (d, 2H, ³*J* = 8.2 Hz; 2H, H-12 + H-16), 10.14 (s, 1H, H-1'').

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 68.8 (1C, C-21), 108.0 (1C, C-4), 112.6 (1C, C-7), 113.2 (1C, C-6), 126.2 (1C, C-25), 127.6 (2C, C-12 + C-16), 128.4 (2C, C-23 + C-23'), 128.6 (2C, C-13 + C-15), 128.7 (2C, C-24 + C-24'), 131.4 (1C, C-14), 135.1 (1C, C-22), 135.2 (2C, C-5 + C-8), 135.9 (1C, C-11), 143.0 (1C, C-9), 150.8 (1C, C-2), 154.0 (1C, C-20), 165.3 (1C, C-10).

MS (ESI+):

m/z (%) = 301.5 (70, [Ringöffnung vom 2-Aminobenzimidazol, Abspaltung von Benzyl]⁺), 387.3 (100, [M+H]⁺).

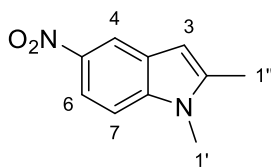
HRMS (EI+):

<i>m/z</i>	C ₂₂ H ₁₉ N ₄ O ₃	ber.: 387.1452 [M+H] ⁺
		gef.: 387.1454 [M+H] ⁺

qHNMR:

95.33%

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 237.0 °C

1,2-Dimethyl-5-nitro-1*H*-indol (80)

[MW: 190.20 g/mol]

Unter Verwendung der AAV11 mit 1.1 g (6.2 mmol) 2-Methyl-5-nitro-1*H*-indol und 964 mg (6.8 mmol, 1.2 eq.) Methyljodid wurden 685 mg (63%) **80** als gelber Feststoff erhalten.

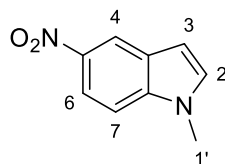
¹H-NMR (CDCl₃, 21 °C, 300 MHz):

δ_{H} (ppm) = 2.46 (s, 3H, H-1''), 3.72 (s, 3H, H-1'), 6.42 (s, 1H, H-3), 7.25 (d, ³*J* = 9.1 Hz; 1H, H-7), 8.06 (dd, ³*J* = 9.1 Hz, ⁴*J* = 2.3 Hz; 1H, H-6), 8.46 (d, ⁴*J* = 1.9 Hz; 1H, H-4).

MS (ESI+):

m/z (%) = 213.5 (100, [M+Na]⁺).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den publizierten Daten für diese Verbindung überein.¹³⁵

1-Methyl-5-nitro-1*H*-indol (81)

[MW: 176.17 g/mol]

Unter Verwendung der AAV11 mit 1.2 g (6.2 mmol) 5-Nitro-1*H*-indol und 694 mg (6.8 mmol, 1.2 eq.) Methyljodid wurden 599 mg (50%) **81** als gelber Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO, 30 °C, 300 MHz):

δ_{H} (ppm) = 3.88 (s, 3H, H-1'), 6.74 (psd, $^3J = 2.6$ Hz, 1H, H-3), 7.60 (d, $^3J = 3.0$ Hz, 1H, H-2), 7.64 (d, $^3J = 9.1$ Hz, 1H, H-7), 8.04 (dd, $^3J = 9.2$ Hz, $^4J = 2.3$ Hz, 1H, H-6), 8.57 (d, $^4J = 2.3$ Hz, 1H, H-4).

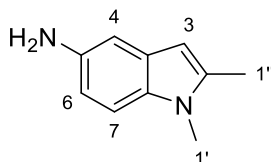
MS (ESI+):

m/z (%) = 199.5 (100, $[\text{M}+\text{Na}]^+$).

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 167.5 °C

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den publizierten Daten für diese Verbindung überein.¹³⁶

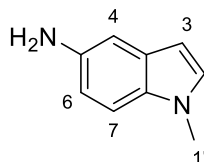
1,2-Dimethyl-1*H*-indol-5-amin (**82**)



[MW: 160.22 g/mol]

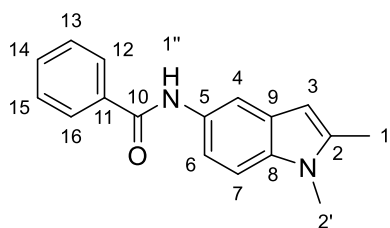
Unter Verwendung der AAV10 mit 100 mg (0.5 mmol) **80** wurde **82** erhalten. Das Produkt wurde direkt weiter umgesetzt.

1-Methyl-1*H*-indol-5-amin (**83**)



[MW: 146.19 g/mol]

Unter Verwendung der AAV10 mit 600 mg (3.4 mmol) **81** wurde **83** erhalten. Das Produkt wurde direkt weiter umgesetzt.

***N*-(1,2-Dimethyl-1*H*-indol-5-yl)benzamid (**84**)**

[MW: 264.33 g/mol]

Unter Verwendung der AAV8 mit 176 mg (1.1 mmol) **82** und 122 mg (1.0 mmol) Benzoesäure wurden 177 mg (67%) **84** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 2.39 (s, 3H, H-1'), 3.65 (s, 3H, H-2'), 6.19 (s, 1H, H-3), 7.32 (d, $^3J = 8.7$ Hz; 1H, H-7), 7.38 (dd, $^3J = 8.8$ Hz, $^4J = 1.8$ Hz; 1H, H-6), 7.47 – 7.59 (m, 3H, H-13 + H-15 + H-14), 7.88 (d, $^4J = 1.4$ Hz; 1H, H-4), 7.97 (d, $^3J = 6.9$ Hz; 2H, H-12 + H-16), 10.03 (s, 1H, H-1'').

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 12.5 (1C, C-1'), 29.3 (1C, C-2'), 99.2 (1C, C-3), 108.8 (1C, C-4), 111.4 (1C, C-7), 114.8 (1C, C-6), 127.1 (1C, C-9), 127.5 (2C, C-12 + C-16), 128.3 (2C, C-13 + C-15), 131.0 (1C, C-8), 131.1 (1C, C-14), 134.2 (1C, C-5), 135.5 (1C, C-11), 137.6 (1C, C-2), 165.0 (1C, C-10).

MS (ESI+):

m/z (%) = 265.6 (25, [M+H]⁺), 287.5 (100, [M+Na]⁺).

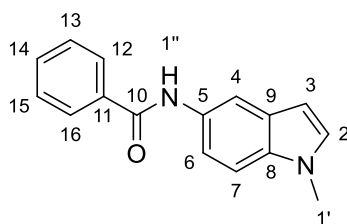
HRMS (EI+):

m/z	$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_1\text{Na}$	ber.: 287.1155 [M+Na] ⁺
		gef.: 287.1157 [M+Na] ⁺

EA: $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_1 \times \frac{1}{4} \text{H}_2\text{O}$ ber.: C: 75.95, H: 6.19, N: 10.42.

gef.: C: 76.19, H: 6.08, N: 10.43.

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 253.3 °C

***N*-(1-Methyl-1*H*-indol-5-yl)benzamid (**85**)**

[MW: 250.30 g/mol]

Unter Verwendung der AAV8 mit 161 mg (1.1 mmol) **83** und 122 mg (1.0 mmol) Benzoesäure wurden 211 mg (84%) **85** als rosa Feststoff erhalten.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 3.79 (s, 3H, H-1'), 6.41 (s, 1H, H-3), 7.30 (s, 1H, H-2), 7.40 (d, ³*J* = 8.7 Hz; 1H, H-7), 7.47 (d, ³*J* = 8.7 Hz; 1H, H-6), 7.49 – 7.61 (m, 3H, H-13 + H-14 + H-15), 7.98 (d, ³*J* = 7.8 Hz; 2H, H-12 + H-16), 8.01 (s, 1H, H-4), 10.09 (s, 1H, H-1'').

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 32.5 (1C, C-1'), 100.3 (1C, C-3), 109.4 (1C, C-4), 112.4 (1C, C-7), 116.0 (1C, C-6), 127.5 (2C, C-12 + C-16), 127.7 (1C, C-9), 128.3 (2C, C-13 + C-15), 130.2 (1C, C-2), 131.2 (1C, C-8), 131.2 (1C, C-14), 133.6 (1C, C-5), 135.4 (1C, C-11), 165.1 (1C, C-10).

MS (ESI⁺):

m/z (%) = 251.4 (33, [M+H]⁺), 273.3 (100, [M+Na]⁺).

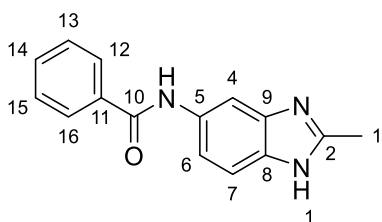
HRMS (EI⁺):

<i>m/z</i>	C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O ₁ Na ₁	ber.: 273.0998 [M+Na] ⁺
		gef.: 273.1003 [M+Na] ⁺

EA: C₁₆H₁₄N₂O₁ ber.: C: 76.78, H: 5.64, N: 11.19.

gef.: C: 76.83, H: 5.67, N: 11.11.

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 195.7 °C

***N*-(2-Methyl-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)benzamid (**86**)**

[MW: 251.29 g/mol]

Unter Verwendung der AAV8 mit 269 mg (1.83 mmol) 2-Methyl-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-amin und 204 mg (1.67 mmol) Benzoesäure wurden 242 mg (58%) **86** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 2.48 (s, 3H, H-1'), 7.41 (d, ³*J* = 8.5 Hz; 1H, H-7), 7.44 (dd, ³*J* = 8.6 Hz; ⁴*J* = 1.8 Hz; 1H, H-6), 7.48 – 7.60 (m, 3H, H-13 + H-14 + H-15), 7.95 – 7.99 (m, 2H, H-12 + H-16), 8.03 (d, ⁴*J* = 1.4 Hz; 1H, H-4), 10.18 (s, 1H, H-1''), 12.12 (s, 1H, H-1).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 14.6 (1C, C-1'), 105.6 (1C, C-4), 114.3 (1C, C-7), 115.2 (1C, C-6), 127.5 (2C, C-12 + C-16), 128.2 (2C, C-13 + C-15), 131.2 (1C, C-14), 133.2 (1C, C-5), 135.3 (1C, C-11), 136.4 (1C, C-9), 137.9 (1C, C-8), 151.4 (1C, C-2), 165.2 (1C, C-10).

MS (ESI+):

m/z (%) = 252.1 (100, [M+H]⁺).

HRMS (EI+):

m/z C₁₅H₁₄N₃O₁

ber.: 252.1131 [M+H]⁺

gef.: 252.1161 [M+H]⁺

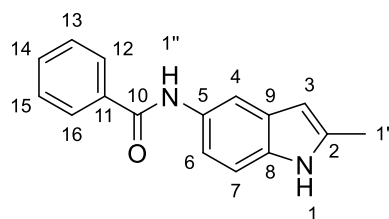
EA: C₁₅H₁₃N₃O₁ x ½ H₂O

ber.: C: 69.22, H: 5.42, N: 16.14.

gef.: C: 69.40, H: 5.29, N: 16.03.

Schmelzpunkt (unkorrigiert):

253.5 °C

***N*-(2-Methyl-1*H*-indol-5-yl)benzamid (**87**)**

[MW: 250.30 g/mol]

Unter Verwendung der AAV8 mit 161 mg (1.1 mmol) 2-Methyl-1*H*-indol-5-amin und 122 mg (1.0 mmol) Benzoesäure wurden 214 mg (86%) **87** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 2.38 (s, 3H, H-1'), 6.10 (s, 1H, H-3), 7.22 (d, $^3J = 8.5$ Hz; 1H, H-7), 7.31 (d, $^3J = 8.7$ Hz; 1H, H-6), 7.43 – 7.59 (m, 3H, H-13 + H-14 + H-15), 7.84 (s, 1H, H-4), 7.97 (d, $^3J = 7.8$ Hz; 2H, H-12 + H-16), 10.00 (s, 1H, H-1''), 10.82 (s, 1H, H-1).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 13.5 (1C, C-1'), 99.3 (1C, C-3), 110.1 (1C, C-4), 111.4 (1C, C-7), 114.9 (1C, C-6), 127.5 (2C, C-12 + C-16), 128.3 (2C, C-13 + C-15), 128.4 (1C, C-9), 130.8 (1C, C-8), 131.1 (1C, C-14), 133.2 (1C, C-5), 135.5 (1C, C-11), 136.2 (1C, C-2), 165.0 (1C, C-10).

MS (ESI+):

m/z (%) = 251.2 (100, [M+H]⁺).

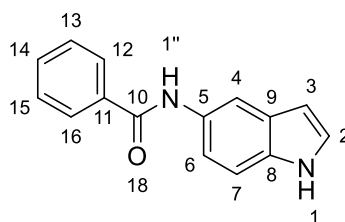
HRMS (EI+):

m/z	$\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_1$	ber.: 251.1179 [M+H] ⁺
		gef.: 251.1180 [M+H] ⁺

EA: $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_1$ ber.: C: 76.78, H: 5.64, N: 11.19.

gef.: C: 76.61, H: 5.66, N: 11.14.

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 194.2 °C

***N*-(1*H*-Indol-5-yl)benzamid (88)**

[MW: 236.27 g/mol]

Unter Verwendung der AAV8 mit 161 mg (1.1 mmol) 1*H*-Indol-5-amin und 122 mg (1.0 mmol) Benzoesäure wurden 230 mg (97%) **88** als brauner Feststoff erhalten.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 6.41 (dd, ³*J* = 2.3 Hz ⁴*J* = 2.2 Hz, 1H, H-3), 7.32 (t, ³*J* = 2.8 Hz, 1H, H-2), 7.36 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 1H, H-7), 7.41 (dd, ³*J* = 8.7 Hz ⁴*J* = 1.8 Hz, 1H, H-6), 7.49 – 7.60 (m, 3H, H-13 + H-14 + H-15), 7.95 – 8.02 (m, 3H, H-4 + H-12 + H-16), 10.07 (s, 1H, H-1''), 11.02 (s, 1H, H-1).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 101.2 (1C, C-3), 111.0 (1C, C-4), 112.2 (1C, C-7), 116.1 (1C, C-6), 125.9 (1C, C-2), 127.4 (1C, C-9), 127.5 (2C, C-12 + C-16), 128.3 (2C, C-13 + C-15), 130.9 (1C, C-8), 131.2 (1C, C-14), 133.0 (1C, C-5), 135.5 (1C, C-11), 165.1 (1C, C-10).

MS (ESI+):

m/z (%) = 237.5 (10, [M+H]⁺), 259.4 (30, [M+Na]⁺), 495.2 (100, [2M+Na]⁺).

HRMS (EI+):

m/z C₁₅H₁₂N₂O₁Na₁ ber.: 259.0842 [M+Na]⁺
gef.: 259.0844 [M+Na]⁺

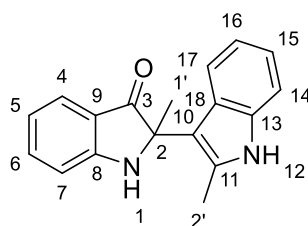
EA: C₁₅H₁₂N₂O₁

ber.: C: 76.25, H: 5.12, N: 11.86.

gef.: C: 76.00, H: 5.14, N: 11.77.

Schmelzpunkt (unkorrigiert):

193.3 °C

2-Methyl-2-(2-methyl-1*H*-indol-3-yl)indolin-3-on (89)

[MW: 276.34 g/mol]

Unter Verwendung der AAV9 mit 100 mg 2-Methyl-1*H*-indol (0.76 mmol), 107 mg (0.68 mmol, 0.9 eq.) TEMPO und 0.3 eq. Kupfer(II)-chlorid x 2 H₂O (39 mg, 0.23 mmol) wurden 80 mg (76%) **89** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 1.75 (s, 3H, H-1'), 2.40 (s, 3H, H-2'), 6.73 (dd, 1H, $^3J = 7.3$ Hz; $^3J = 7.3$ Hz; H-15), 6.80 (dd, 1H, $^3J = 7.3$ Hz; $^3J = 7.8$ Hz; H-16), 6.89 (d, 1H, $^3J = 8.2$ Hz; H-7), 6.95 (dd, 1H, $^3J = 7.3$ Hz; $^3J = 7.8$ Hz; H-6), 7.22 (d, 1H, $^3J = 7.8$ Hz; H-14), 7.26 (d, 1H, $^3J = 8.0$ Hz; H-17), 7.46 (d, 1H, $^3J = 8.0$ Hz; H-4), 7.50 (psd, 1H, $^3J = 7.1$ Hz; H-5), 7.70 (s, 1H, H-1), 10.86 (s, 1H, H-12).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 14.0 (1C, C-2''), 24.4 (1C, C-1''), 66.2 (1C, C-2), 108.5 (1C, C-10), 110.5 (1C, C-14), 111.8 (1C, C-7), 117.0 (1C, C-5), 117.7 (1C, C-18), 118.4 (1C, C-17), 119.4 (1C, C-16), 120.0 (1C, C-15), 124.4 (1C, C-4), 127.2 (1C, C-9), 133.0 (1C, C-11), 134.7 (1C, C-13), 137.5 (1C, C-6), 159.9 (1C, C-8), 203.9 (1C, C-3).

MS (ESI+):

m/z (%) = 277.1 (80, [M+H]⁺), 299.1 (40, [M+Na]⁺), 575.2 (100, [2M+Na]⁺).

HRMS (EI+):

m/z C₁₈H₁₇N₂O₁

ber.: 277.1335 [M+H]⁺

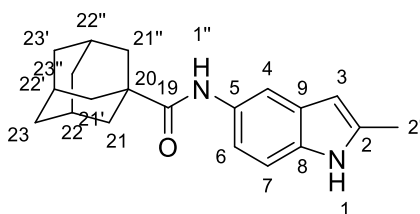
gef.: 277.1335 [M+H]⁺

qHNMR:

96.91%

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 131.7 °C

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den publizierten Daten für diese Verbindung überein.⁹⁵

(3*r*,5*r*,7*r*)-*N*-(2-Methyl-1*H*-indol-5-yl)adamantan-1-carboxamid (90**)**

[MW 308.42 g/mol]

Unter Verwendung der AAV8 mit 161 mg (1.1 mmol) 2-Methyl-1*H*-indol-5-amin und 180 mg (1.0 mmol) Adamantylcarbonsäure wurden 91 mg (30%) **90** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 1.66 – 1.75 (m, 6H, H-23 + H-23' + H-23''), 1.86 – 1.95 (m, 6H, H-21 + H-21' + H-21''), 1.99 – 2.05 (m, 3H, H-22 + H-22' + H-22''), 2.35 (s, 3H, H-2'), 6.04 (s, 1H, H-3), 7.14 (s, 2H, H-6 + H-7), 7.65 (s, 1H, H-4), 8.82 (s, 1H, H-1''), 10.74 (s, 1H, H-1).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 13.4 (1C, C-2'), 27.8 (3C, C-22 + C-22' + C-22''), 36.1 (3C, C-23 + C-23' + C-23''), 38.5 (3C, C-21 + C-21' + C-21''), 40.6 (1C, C-20), 99.1 (1C, C-3), 109.8 (1C, C-4), 111.5 (1C, C-7), 115.1 (1C, C-6), 128.3 (1C, C-9), 130.8 (1C, C-8), 132.9 (1C, C-5), 136.0 (1C, C-2), 175.4 (1C, C-19).

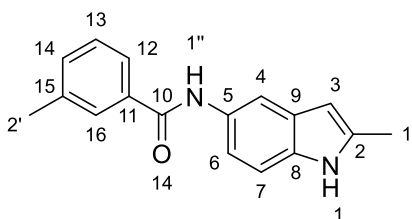
MS (ESI+): m/z (%) = 331.3 (100, $[M+Na]^+$).**HRMS (EI+):** m/z $C_{20}H_{24}N_2O_1Na$ ber.: 331.1781 $[M+Na]^+$ gef.: 331.1784 $[M+Na]^+$ **EA:** $C_{20}H_{24}N_2O_1$

ber.: C: 77.89, H: 7.84, N: 9.08.

gef.: C: 77.77, H: 7.87, N: 9.01.

Schmelzpunkt (unkorrigiert):

283.6 °C

3-Methyl-N-(2-methyl-1H-indol-5-yl)benzamid (91)

[MW: 264,33 g/mol]

Unter Verwendung der AAV8 mit 161 mg (1.1 mmol) 2-Methyl-1H-indol-5-amin und 136 mg (1.0 mmol) 3-Methyl-benzoesäure wurden 181 mg (69%) **91** als rosa Feststoff erhalten.

 1H -NMR (d_6 -DMSO, 30 °C, 400 MHz):

δ_H (ppm) = 2.38 (s, 3H, H-1'), 2.40 (s, 3H, H-2'), 6.10 (s, 1H, H-3), 7.22 (d, $^3J = 8.7$ Hz; 1H, H-7), 7.31 (dd, $^3J = 8.5$ Hz, $^4J = 1.8$ Hz; 1H, H-6), 7.34 – 7.43 (m, 2H, H-13 + H-14), 7.72 – 7.81 (m, 2H, H-12 + H-16), 7.83 (s, 1H, H-4), 9.96 (s, 1H, H-1''), 10.82 (s, 1H, H-1).

 ^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 30 °C, 100 MHz):

δ_C (ppm) = 13.5 (1C, C-1'), 21.0 (1C, C-2'), 99.3 (1C, C-3), 110.0 (1C, C-4), 111.3 (1C, C-7), 114.9 (1C, C-6), 124.7 (1C, C-12), 128.1 (1C, C-13), 128.2 (1C, C-16), 128.4 (1C,

C-9), 130.8 (1C, C-8), 131.7 (1C, C-14), 133.2 (1C, C-5), 135.5 (1C, C-11), 136.2 (1C, C-2), 137.6 (1C, C-15), 165.1 (1C, C-10).

MS (ESI+):

m/z (%) = 265.4 (25, $[M+H]^+$), 287.3 (100, $[M+Na]^+$).

HRMS (EI+):

m/z C₁₇H₁₆N₂O₁Na

ber.: 287.1155 $[M+Na]^+$

gef.: 287.1160 $[M+Na]^+$

EA: C₁₇H₁₆N₂O₁

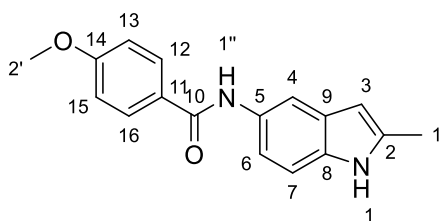
ber.: C: 77.25, H: 6.10, N: 10.60.

gef.: C: 77.20, H: 6.13, N: 10.55.

Schmelzpunkt (unkorrigiert):

201.3 °C

4-Methoxy-*N*-(2-methyl-1*H*-indol-5-yl)benzamid (**92**)



[MW: 280.33 g/mol]

Unter Verwendung der AAV8 mit 161 mg (1.1 mmol) 2-Methyl-1*H*-indol-5-amin und 152 mg (1.0 mmol) 4-Methoxy-benzoesäure wurden 200 mg (71%) **92** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

δ_H (ppm) = 2.37 (s, 3H, H-1'), 3.83 (s, 3H, H-2'), 6.09 (s, 1H, H-3), 7.05 (d, $^3J + ^5J = 7.3$ Hz; 2H, H-13 + H-15), 7.21 (d, $^3J = 8.5$ Hz; 1H, H-6), 7.29 (d, $^3J = 8.7$ Hz; 1H, H-7), 7.81 (s, 1H, H-4), 7.97 (d, $^3J + ^5J = 8.5$ Hz; 2H, H-12 + H-15), 9.85 (s, 1H, H-1''), 10.80 (s, 1H, H-1).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 100 MHz):

δ_C (ppm) = 13.5 (1C, C-1'), 55.4 (1C, C-2'), 99.2 (1C, C-3), 110.0 (1C, C-4), 111.4 (1C, C-7), 113.5 (1C, C-13 + C-15), 115.0 (1C, C-6), 127.6 (1C, C-11), 128.4 (1C, C-9), 129.4 (1C, C-12 + C-16), 130.9 (1C, C-8), 133.1 (1C, C-5), 161.6 (1C, C-14), 164.4 (1C, C-10).

MS (ESI+):

m/z (%) = 281.4 (25, [M+H]⁺), 303.3 (100, [M+Na]⁺).

HRMS (EI+):

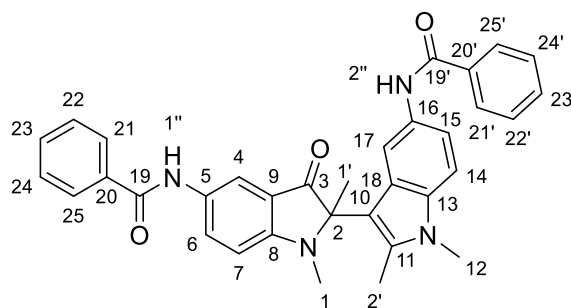
m/z	C ₁₇ H ₁₆ N ₂ O ₂ Na	ber.: 303.1104 [M+Na] ⁺
		gef.: 303.1107 [M+Na] ⁺

EA: C₁₇H₁₆N₂O₂ x 0.25 H₂O ber.: C: 71.69, H: 5.84, N: 9.84.

gef.: C: 71.77, H: 5.78, N: 9.82.

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 201.7 °C

***N*-(2-(5-Benzamido-1,2-dimethyl-1*H*-indol-3-yl)-1,2-dimethyl-3-oxoindolin-5-yl)benzamid (**93**)**



[MW: 542.64 g/mol]

Unter Verwendung der AAV9 mit 100 mg **84** (0.38 mmol), 53 mg (0.9 eq., 0.34 mmol) TEMPO und 0.3 eq. Kupfer(II)-chlorid x 2 H₂O (21 mg, 0.12 mmol) wurden 66 mg (65%) **93** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

δ_H (ppm) = 1.84 (s, 3H, H-1'), 2.11 (s, 3H, H-2'), 2.84 (s, 3H, H-1), 3.64 (s, 3H, H-12), 7.04 (d, ³*J* = 8.9 Hz; 1H, H-7), 7.39 (d, ³*J* = 8.9 Hz; 1H, H-14), 7.44 – 7.61 (m, 7H, H-15 + H-22 + H-23 + H-24 + H-22' + H-23' + H-24'), 7.86 – 8.01 (m, 6H, H-21 + H-25 + H-21' + H-25' + H-6 + H-17), 8.06 (bs, 1H, H-4), 10.06 (s, 1H, H-2''), 10.16 (s, 1H, H-1'').

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 100 MHz):

δ_C (ppm) = 11.2 (1C, C-2'), 21.8 (1C, C-1'), 27.7 (1C, C-12), 29.4 (1C, C-1), 70.9 (1C, C-2), 106.1 (1C, C-Ar), 108.9 (1C, C-10), 109.0 (1C, C-Ar), 111.6 (1C, C-Ar), 115.1 (1C, C-14), 115.7 (1C, C-4), 117.0 (1C, C-9), 126.6 (1C, C-Ar), 127.5 (4C, C-21 + C-21' + C-25 + C-25'), 128.2 (2C, C-22 + C-24), 128.3 (2C, C-22' + C-24'), 129.2 (1C, C-Ar), 131.1 (1C, C-Ar), 131.3 (1C, C-Ar), 131.3 (1C, C-Ar), 131.8 (1C, C-Ar), 133.4 (1C, C-Ar), 134.9 (1C, C-Ar), 135.4 (1C, C-Ar), 135.9 (1C, C-Ar), 155.8 (1C, C-8), 165.0 (1C, C-19'), 165.1 (1C, C-19), 202.4 (1C, C-3).

MS (ESI+):

m/z (%) = 543.2 (100, [M+H]⁺).

HRMS (EI+):

m/z C₃₄H₃₁N₄O₃

ber.: 543.2391 [M+H]⁺

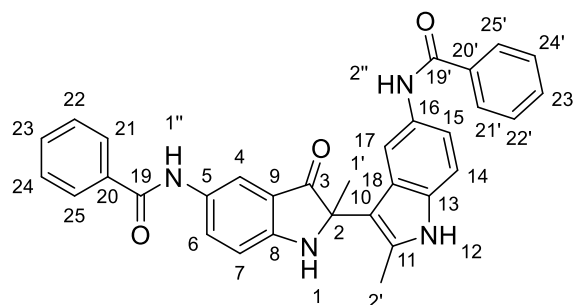
gef.: 543.2359 [M+H]⁺

qHNMR:

94.21%

Schmelzpunkt (unkorrigiert):

175.3 °C

N*-(2-(5-Benzamido-2-methyl-1*H*-indol-3-yl)-2-methyl-3-oxoindolin-5-yl)benzamid*(94)**

[MW: 514.58 g/mol]

Unter Verwendung der AAV9 mit 100 mg **87** (0.4 mmol), 50 mg (0.8 eq., 0.32 mmol) TEMPO und 0.3 eq. Kupfer(II)-chlorid x 2 H₂O (20 mg, 0.11 mmol) wurden 18 mg (37%) **94** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 500 MHz):

δ_{H} (ppm) = 1.83 (s, 3H, H-1'), 2.26 (s, 3H, H-2'), 6.92 (d, ³*J* = 8.8 Hz; 1H, H-7), 7.21 (d, ³*J* = 8.8 Hz; 1H, H-14), 7.37 (dd, ³*J* = 8.6 Hz, ⁴*J* = 1.3 Hz; 1H, H-15), 7.47 – 7.61 (m, 7H, H-1 + H-22 + H-23 + H-24 + H-22' + H-23' + H-24'), 7.83 (dd, ³*J* = 8.7 Hz, ⁴*J* = 2.3 Hz; 1H, H-6), 7.91 – 8.02 (m, 6H, H-21 + H-25 + H-21' + H-25' + H-4 + H-17), 10.02 (s, 1H, H-2''), 10.12 (s, 1H, H-1''), 10.87 (s, 1H, H-12),

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 13.7 (1C, C-2'), 24.7 (1C, C-1'), 67.0 (1C, C-2), 108.7 (1C, C-10), 110.1 (1C, C-Ar), 112.0 (1C, C-Ar), 112.6 (1C, C-Ar), 115.5 (1C, C-Ar), 115.6 (1C, C-Ar), 117.3 (1C, C-9), 127.1 (1C, C-Ar), 127.5 (4C, C-21 + C-21' + C-25 + C-25'), 128.3 (2C, C-22 + C-24), 128.4 (2C, C-22' + C-24'), 129.5 (1C, C-Ar), 130.5 (1C, C-6), 131.1 (1C, C-16), 131.5 (1C, C-Ar), 131.6 (2C, C-5 + C-Ar), 132.1 (1C, C-Ar), 133.3 (1C, C-Ar), 135.5 (1C, C-Ar), 157.1 (1C, C-8), 165.0 (1C, C-19'), 165.1 (1C, C-19), 203.7 (1C, C-3).

MS (ESI⁺):

m/z (%) = 515.2 (45, [M+H]⁺), 537.3 (100, [M+Na]⁺).

HRMS (EI⁺):

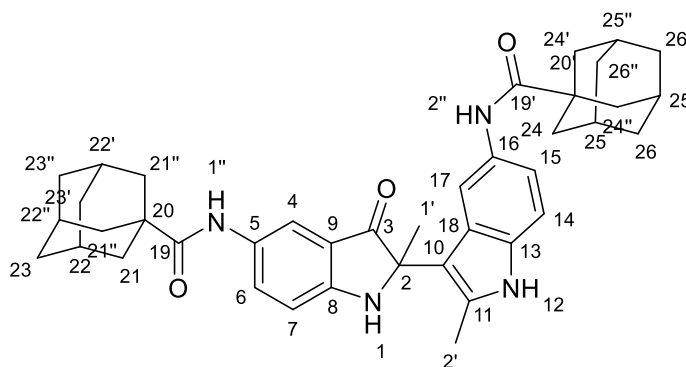
m/z C₃₂H₂₆N₄O₃Na

ber.: 537.1897 [M+Na]⁺

gef.: 537.1901 [M+Na]⁺

qHNMR:

98.30%

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 180.1 °C**(3*r*,5*r*,7*r*)-N-(2-(5-((3*r*,5*r*,7*r*)-Adamantan-1-carboxamido)-2-methyl-1*H*-indol-3-yl)-2-methyl-3-oxoindolin-5-yl)adamantan-1-carboxamid (**95**)**

[MW: 630.83 g/mol]

Unter Verwendung der AAV9 mit 100 mg **90** (0.32 mmol), 51 mg (1 eq., 0.32 mmol) TEMPO und 0.3 eq. Kupfer(II)-chlorid x 2 H₂O (17 mg, 0.10 mmol) wurden 35 mg (34%) **95** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 1.64 – 1.74 (m, 12H, H-23 + H-23' + H-23'' + H-26 + H-26' + H-26''), 1.78 (s, 3H, H-1'), 1.85 – 1.93 (m, 12H, H-21 + H-21' + H-21'' + H-24 + H-24' + H-24''), 1.97 – 2.07 (m, 6H, H-22 + H-22' + H-22'' + H-25 + H-25' + H-25''), 2.18 (s, 3H, H-2'), 6.83 (d, 1H, ³*J* = 8.7 Hz; H-7), 7.12 (d, 1H, ³*J* = 8.7 Hz; H-14), 7.21 (dd, ³*J* = 8.7 Hz, ⁴*J* = 1.8 Hz; 1H, H-15), 7.43 (s, 1H, H-1), 7.69 (dd, ³*J* = 8.7 Hz, ⁴*J* = 2.3 Hz; 1H, H-6), 7.74 (d, 1H, ⁴*J* = 2.1 Hz; H-4), 7.85 (d, 1H, ⁴*J* = 1.4 Hz; H-17), 8.83 (s, 1H, H-2''), 8.98 (s, 1H, H-1''), 10.77 (s, 1H, H-12).

$^{13}\text{C-NMR}$ (d_6 -DMSO, 30 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 13.5 (1C, C-2'), 24.6 (1C, C-1'), 27.6 (3C, C-22 + C-22' + C-22''), 27.7 (3C, C-25 + C-25' + C-25''), 36.0 (3C, C-23 + C-23' + C-23''), 36.1 (3C, C-26 + C-26' + C-26''), 38.4 (3C, C-21 + C-21' + C-21''), 38.5 (3C, C-24 + C-24' + C-24''), 40.5 (1C, C-20), 40.6 (1C, C-20'), 66.9 (1C, C-2), 108.6 (1C, C-10), 109.7 (1C, C-7), 111.6 (1C, C-15), 112.7 (1C, C-17), 115.5 (1C, C-14), 115.5 (1C, C-4), 117.3 (1C, C-9), 127.0 (1C, C-13), 129.6 (1C, C-18), 130.6 (1C, C-6), 131.6 (1C, C-16), 131.8 (1C, C-5), 132.8 (1C, C-11), 156.8 (1C, C-8), 175.4 (1C, C-19), 175.5 (1C, C-19'), 203.6 (1C, C-3).

MS (ESI+):

m/z (%) = 631.4 (100, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 653.3 (100, $[\text{M}+\text{Na}]^+$).

HRMS (EI+):

m/z $\text{C}_{40}\text{H}_{47}\text{N}_4\text{O}_3$

ber.: 631.3643 $[\text{M}+\text{H}]^+$

gef.: 631.3613 $[\text{M}+\text{H}]^+$

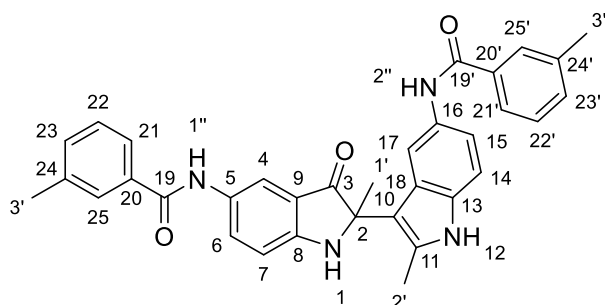
EA: $\text{C}_{40}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_3 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

ber.: C: 72.05, H: 7.56, N: 8.40.

gef.: C: 72.33, H: 7.32, N: 8.38.

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 238.6 °C

3-Methyl-*N*-(2-methyl-2-(2-methyl-5-(3-methylbenzamido)-1*H*-indol-3-yl)-3-oxoindolin-5-yl)benzamid (96)



[MW: 542.64 g/mol]

Unter Verwendung der AAV9 mit 100 mg **91** (0.33 mmol), 53 mg (1 eq., 0.33 mmol) TEMPO und 0.36 eq. Kupfer(II)-chlorid x 2 H₂O (21 mg, 0.12 mmol) wurden 56 mg (55%) **96** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 500 MHz):

δ_{H} (ppm) = 1.82 (s, 3H, H-1'), 2.26 (s, 3H, H-2'), 2.39 (s, 3H, H-3'), 2.40 (s, 3H, H-3''), 6.92 (d, ³*J* = 8.8 Hz; 1H, H-7), 7.20 (d, ³*J* = 8.6 Hz; 1H, H-14), 7.33 – 7.42 (m, 5H, H-22 + H-23 + H-22' + H-23' + H-15), 7.56 (s, 1H, H-1), 7.69 – 7.79 (m, 4H, H-21 + H-25 + H-21' + H-25'), 7.82 (dd, ³*J* = 8.8 Hz, ⁴*J* = 2.1 Hz; 1H, H-6), 7.91 (d, ⁴*J* = 1.9 Hz; 1H, H-17), 7.98 (s, 1H, H-4), 9.96 (s, 1H, H-2''), 10.07 (s, 1H, H-1''), 10.86 (s, 1H, H-12).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 13.7 (1C, C-2'), 21.0 (2C, C-3' + C-3''), 24.7 (1C, C-1'), 67.0 (1C, C-2), 108.7 (1C, C-10), 110.0 (1C, C-6), 112.0 (1C, C-15), 112.6 (1C, C-17), 115.4 (1C, C-14), 115.6 (1C, C-4), 117.3 (1C, C-9), 124.7 (2C, C-Ar), 127.1 (1C, C-Ar), 128.0 (1C, C-Ar), 128.1 (1C, C-Ar), 128.2 (1C, C-Ar), 128.3 (1C, C-Ar), 129.6 (1C, C-Ar), 130.6 (1C, C-Ar), 131.6 (1C, C-Ar), 131.7 (1C, C-Ar), 132.0 (1C, C-Ar), 132.0 (1C, C-Ar), 133.3 (1C, C-Ar), 135.0 (1C, C-20'), 135.5 (1C, C-20), 137.5 (1C, C-24'), 137.7 (1C, C-24), 157.0 (1C, C-8), 165.1 (1C, C-19'), 165.2 (1C, C-19), 203.7 (1C, C-3).

MS (ESI+):

m/z (%) = 543.2 (90, [M+H]⁺), 565.2 (10, [M+Na]⁺).

HRMS (EI+):

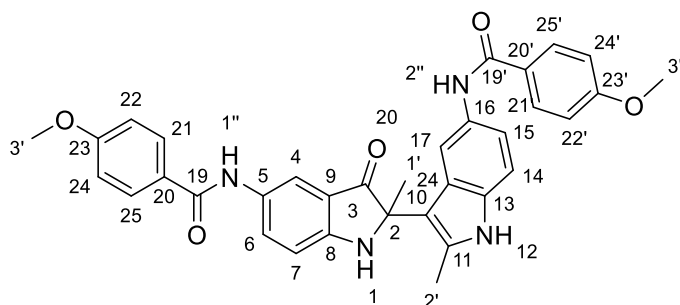
<i>m/z</i>	C ₃₄ H ₃₁ N ₄ O ₃	ber.: 543.2391 [M+H] ⁺
		gef.: 543.2369 [M+H] ⁺

EA: C₃₄H₃₀N₄O₃ x ½ H₂O ber.: C: 74.03, H: 5.66, N: 10.16.

gef.: C: 74.24, H: 5.97, N: 10.13.

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 208.7 °C

4-Methoxy-N-(2-(5-(4-methoxybenzamido)-2-methyl-1H-indol-3-yl)-2-methyl-3-oxoindolin-5-yl)benzamid (97)



[MW: 574,64 g/mol]

Unter Verwendung der AAV9 mit 100 mg **92** (0.35 mmol), 56 mg (1 eq., 0.35 mmol) TEMPO und 0.4 eq. Kupfer(II)-chlorid x 2 H₂O (22 mg, 0.13 mmol) wurden 48 mg (47%) **97** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 500 MHz):

δ_{H} (ppm) = 1.82 (s, 3H, H-1'), 2.26 (s, 3H, H-2'), 3.84 (s, 6H, H-3' + H-3''), 6.91 (d, ³*J* = 8.7 Hz; 1H, H-7), 7.00 – 7.10 (m, 4H, H-22 + H-24 + H-22' + H-24'), 7.20 (d, ³*J* = 8.6 Hz; 1H, H-14), 7.35 (dd, ³*J* = 8.7 Hz, ⁴*J* = 1.6 Hz; 1H, H-15), 7.54 (s, 1H, H-1), 7.82 (dd, ³*J* = 8.8 Hz, ⁴*J* = 2.1 Hz; 1H, H-6), 7.89 (d, ⁴*J* = 2.1 Hz; 1H, H-17), 7.92 – 8.00 (m, 5H, H-4 + H-21 + H-25 + H-21' + H-25'), 9.87 (s, 1H, H-2''), 9.97 (s, 1H, H-1''), 10.85 (s, 1H, H-12).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 13.6 (1C, C-2'), 24.6 (1C, C-1'), 55.3 (1C, C-3'), 55.4 (1C, C-3), 66.9 (1C, C-2), 108.7 (1C, C-10), 109.9 (1C, C-7), 111.9 (1C, C-15), 112.7 (1C, C-Ar), 113.4 (2C, C-22' + C-24'), 113.5 (2C, C-22 + C-24), 115.6 (2C, C-Ar), 117.3 (1C, C-Ar), 127.0 (1C, C-Ar), 127.1 (1C, C-Ar), 127.5 (1C, C-Ar), 129.3 (4C, C-21 + C-25 + C-21' + C-25'), 129.6 (1C, C-Ar), 130.4 (1C, C-Ar), 130.6 (1C, C-Ar), 131.6 (1C, C-Ar), 133.9 (1C, C-Ar), 156.9 (1C, C-8), 161.5 (1C, C-23'), 161.7 (1C, C-23), 164.4 (1C, C-19'), 164.5 (1C, C-19), 203.6 (1C, C-3).

MS (ESI⁺):

m/z (%) = 575.2 (90, [M+H]⁺), 597.2 (100, [M+Na]⁺).

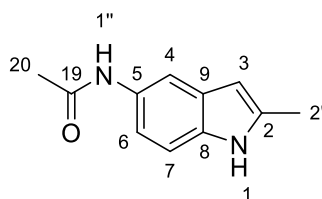
HRMS (EI+):m/z $C_{34}H_{31}N_4O_5$ ber.: 575.2289 [M+H]⁺gef.: 575.2269 [M+H]⁺**EA:** $C_{34}H_{30}N_4O_5 \times 1 H_2O$

ber.: C: 68.91, H: 5.44, N: 9.45.

gef.: C: 69.16, H: 5.60, N: 9.43.

Schmelzpunkt (unkorrigiert):

218.3 °C

***N*-(2-Methyl-1*H*-indol-5-yl)acetamid (**99**)**

[MW: 188,23 g/mol]

Abweichend von der AAV8 wurden 438 mg (3 mmol) 2-Methyl-1*H*-indol-5-amin in 70 ml Aceton und 4 ml DMF gelöst, mit 4 eq. (1.2 g, 1.3 ml) *N*-Methylmorpholin versetzt und auf 0 °C abgekühlt. 237 mg, 215 µl (3 mmol) Acetylchlorid in 10 ml Aceton gelöst, wurden langsam hinzugegeben. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Ansatz mit 50 ml DCM aufgenommen und die organische Phase fünf Mal mit 50 ml einer 5% LiCl Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Säulenchromatographische Reinigung (DCM:Methanol = 97:3) und umkristallisieren aus Ethanol lieferten 150 mg (26%) **99** als gelben Feststoff.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 2.01 (s, 3H, H-20), 2.35 (s, 3H, H-2'), 6.04 (s, 1H, H-3), 7.08 (d, 1H, ³*J* = 8.7 Hz; H-7), 7.15 (d, 1H, ³*J* = 8.7 Hz; H-6), 7.69 (s, 1H, H-4), 9.61 (s, 1H, H-1''), 10.74 (s, 1H, H-1)

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 13.4 (1C, C-2'), 23.9 (1C, C-20), 99.1 (1C, C-3), 109.7 (1C, C-4), 110.1 (1C, C-7), 113.5 (1C, C-6), 128.4 (1C, C-9), 131.2 (1C, C-8), 132.7 (1C, C-5), 136.1 (1C, C-2), 167.5 (1C, C-19).

MS (ESI+):

m/z (%) = 189.6 (15, [M+H]⁺), 211.6 (100, [M+Na]⁺), 399.5 (40, [2M+Na]⁺).

HRMS (EI+):

<i>m/z</i>	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₁ Na	ber.: 211.0842 [M+Na] ⁺
		gef.: 211.0843 [M+Na] ⁺

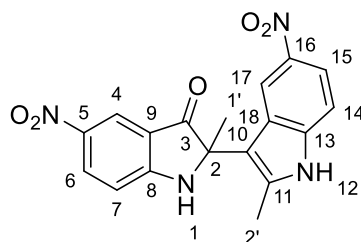
EA: C₁₁H₁₂N₂O₁ x ½ H₂O

ber.: C: 66.99, H: 6.64, N: 14.20.

gef.: C: 66.99, H: 6.28, N: 14.32.

Schmelzpunkt (unkorrigiert):

159.9 °C

2-Methyl-2-(2-methyl-5-nitro-1*H*-indol-3-yl)-5-nitroindolin-3-on (100)

[MW: 366.33 g/mol]

Abweichend von der AAV9 wurden 150 mg (0.8 mmol) 2-Methyl-5-nitro-1*H*-indol in 2 ml DCM und 2 ml Methanol gelöst, mit 1.2 eq. TEMPO versetzt (150 mg, 0.96 mmol), auf 0 °C abgekühlt und 100 µl 6 M HCl in Isopropanol zugetropft. Nach einer Minute wurden 2 ml gesättigte Na₂SO₃-Lösung hinzugeben. Dann wurden 6 eq. NEt₃ (4.8 mmol, 665 µl) hinzugeben und der entstandene Niederschlag abgesaugt, resuspendiert in Methanol, der Niederschlag wurde wieder absaugt. Erneutes Resuspendieren in DCM und Trocknen lieferten 80 mg (51%) **100** als gelben Feststoff.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 1.87 (s, 3H, H-1'), 2.47 (s, 3H, H-2'), 7.07 (d, ³*J* = 9.2 Hz; 1H, H-7), 7.44 (d, ³*J* = 8.9 Hz; 1H, H-14), 7.92 (dd, ³*J* = 8.9 Hz; ⁴*J* = 1.83 Hz, 1H, H-15), 8.29 (d, ⁴*J* = 1.8 Hz; 1H, H-17), 8.39 (dd, ³*J* = 9.4 Hz, ⁴*J* = 1.6 Hz; 2H, H-6 + H-4), 9.34 (s, 1H, H-1), 11.83 (s, 1H, H-12).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 14.0 (1C, C-2'), 23.7 (1C, C-1'), 67.8 (1C, C-2), 109.6 (1C, C-10), 111.2 (1C, C-14), 111.5 (1C, C-7), 116.0 (1C, C-15), 116.2 (1C, C-17), 116.7 (1C, C-9), 122.0 (1C, C-4), 125.7 (1C, C-11), 133.1 (1C, C-6), 137.7 (1C, C-18), 137.9 (1C, C-16), 138.2 (1C, C-5), 140.4 (1C, C-13), 161.7 (1C, C-8), 201.4 (1C, C-3).

MS (ESI⁺):

m/z (%) = 389.1 (90, [M+Na]⁺), 755.2 (100, [2M+Na]⁺).

HRMS (EI⁺):

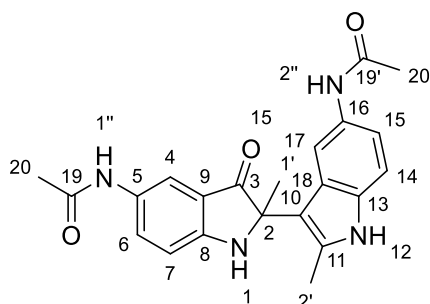
m/z C₁₈H₁₄N₄O₅Na

ber.: 389.0856 [M+Na]⁺

gef.: 389.0845 [M+Na]⁺

^qH-NMR:

96.53%

Schmelzpunkt (unkorrigiert): 182.5 °C***N*-(2-(5-Acetamido-2-methyl-1*H*-indol-3-yl)-2-methyl-3-oxoindolin-5-yl)acetamid****(101)**

[MW: 390.44 g/mol]

Abweichend von der AAV9 wurden 150 mg (0.8 mmol) **99** in 2 ml DCM und 2 ml Methanol gelöst, mit 1.2 eq. TEMPO versetzt (150 mg, 0.96 mmol), auf 0 °C abgekühlt und 100 µl 6 M HCl in Isopropanol zugetropft. Nach einer Minute wurden 2 ml gesättigte Na₂SO₃-Lösung hinzugeben. Dann wurden 6 eq. NEt₃ (4.8 mmol, 665 µl) hinzugeben und der entstandene Niederschlag abgesaugt, resuspendiert in Methanol, der Niederschlag wurde wieder absaugt. Erneutes Resuspendieren in DCM und Trocknen lieferten 80 mg (51%) **101** als gelben Feststoff.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 30 °C, 400 MHz):

δ_{H} (ppm) = 1.75 (s, 3H, H-1'), 1.98 (s, 3H, H-20), 2.02 (s, 3H, H-20'), 2.25 (s, 3H, H-2'), 6.86 (d, 1H, ³*J* = 8.7 Hz; H-7), 7.13 (d, 1H, ³*J* = 8.5 Hz; H-14), 7.21 (d, 1H, ³*J* = 8.7 Hz; H-15), 7.43 (s, 1H, H-1), 7.58 (dd, ³*J* = 8.7 Hz, ⁴*J* = 1.8 Hz; 1H, H-6), 7.71 (s, 1H, H-17), 7.76 (d, 1H, ⁴*J* = 1.1 Hz; H-4), 9.59 (s, 1H, H-2''), 9.78 (s, 1H, H-1''), 10.78 (s, 1H, H-12).

^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 30 °C, 100 MHz):

δ_{C} (ppm) = 13.8 (1C, C-2'), 23.8 (1C, C-20), 23.9 (1C, C-20'), 24.6 (1C, C-1'), 66.9 (1C, C-2), 108.6 (1C, C-10), 110.0 (1C, C-14), 110.9 (1C, C-7), 112.2 (1C, C-15), 114.0 (1C, C-17), 114.2 (1C, C-4), 117.3 (1C, C-9), 127.1 (1C, C-13), 129.9 (1C, C-18), 130.4 (1C, C-6), 130.9 (1C, C-16), 131.6 (1C, C-5), 133.3 (1C, C-11), 156.7 (1C, C-8), 167.5 (1C, C-19'), 167.8 (1C, C-19), 203.9 (1C, C-3).

MS (ESI+):

m/z (%) = 391.2 (90, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 413.2 (80, $[\text{M}+\text{Na}]^+$), 803.3 (100, $[\text{2M}+\text{Na}]^+$).

HRMS (EI+):

m/z $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_3$

ber.: 391.1765 $[\text{M}+\text{H}]^+$

gef.: 391.1774 $[\text{M}+\text{H}]^+$

qHNMR:

95.24%

Schmelzpunkt (unkorrigiert):

235.5 °C

Literaturverzeichnis

1. Lozano, R.; et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010. A systematic analysis for the global burden of disease study 2010. *Lancet*. **2012**, *380*, 2095–2128.
2. Lewis, K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 371–387.
3. Kazantsev, A. V.; Pace, N. R. Bacterial RNase P. A new view of an ancient enzyme. *Nat. Rev. Micro.* **2006**, *4*, 729–740.
4. Willkomm, D. K.; Pfeffer, P.; Reuter, K.; Klebe, G.; Hartmann, R. K. RNase P as a drug target. In *Ribonuclease P*. Liu, F.; Altman, S., Eds.; Springer New York: New York, 2010, pp. 235–256.
5. Walczyk, D., *Analyse von Inhibitoren der bakteriellen RNase P aus Bacillus subtilis*. Masterarbeit. Philipps-Universität Marburg, Marburg, 2012.
6. DengueMap. <http://www.healthmap.org/dengue/en/> 10.06.2016 (Abfragedatum).
7. Noble, C. G.; Seh, C. C.; Chao, A. T.; Shi, P. Y. Ligand-bound structures of the dengue virus protease reveal the active conformation. *J. Virol.* **2012**, *86*, 438–446.
8. Irwin, J. J.; Duan, D.; Torosyan, H.; Doak, A. K.; Ziebart, K. T.; Sterling, T.; Tumanian, G.; Shoichet, B. K. An aggregation advisor for ligand discovery. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 7076–7087.
9. Chellat, M. F.; Raguž, L.; Riedl, R. Antibiotikaresistenzen gezielt überwinden. *Angew. Chem.* **2016**, 6710–6738.
10. Blair, J. M. A.; Webber, M. A.; Baylay, A. J.; Ogbolu, D. O.; Piddock, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Micro.* **2014**, *13*, 42–51.
11. Llor, C.; Bjerrum, L. Antimicrobial resistance. Risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. *Ther. Adv. Drug. Saf.* **2014**, *5*, 229–241.
12. ECDC, *Antimicrobial resistance surveillance in Europe*, 2015.
13. Borgmann, S.; Jakobiak, T.; Gruber, H.; Schroder, H.; Sagel, U. Prescriptions of broad-spectrum antibiotics to outpatients do not match increased prevalence and antibiotic resistance of respiratory pathogens in Bavaria. *The Polish Society of Microbiologists.* **2009**, *58*, 105–110.
14. National Institute for Health and Care Excellence. Antibiotic prescribing – especially broad spectrum antibiotics. <https://www.nice.org.uk/guidance/ktt9/resources/antibiotic-prescribing-especially-broad-spectrum-antibiotics-1632178559941> 15.05.2016 (Abfragedatum).
15. Davies, J.; Davies, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *MMBR.* **2010**, *74*, 417–433.
16. Heath, R. J.; Rubin, J. R.; Holland, D. R.; Zhang, E.; Snow, M. E.; Rock, C. O. Mechanism of triclosan inhibition of bacterial fatty acid synthesis. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 11110–11114.

17. Aminov, R. I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front. Microbiol.* **2010**, *1*, 134.
18. Wright, G. D. Antibiotics. A New Hope. *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 3–10.
19. Wright, G. D. The antibiotic resistome. The nexus of chemical and genetic diversity. *Nat. Rev. Micro.* **2007**, *5*, 175–186.
20. Fernandes, P. Antibacterial discovery and development--the failure of success? *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1497–1503.
21. Reiter, N. J.; Osterman, A.; Torres-Larios, A.; Swinger, K. K.; Pan, T.; Mondragón, A. Structure of a bacterial ribonuclease P holoenzyme in complex with tRNA. *Nature.* **2010**, *468*, 784–789.
22. Stams, T. Ribonuclease P protein structure. Evolutionary origins in the translational apparatus. *Science.* **1998**, *280*, 752–755.
23. Lundblad, E. W.; Xiao, G.; Ko, J.-h.; Altman, S. Rapid selection of accessible and cleavable sites in RNA by *Escherichia coli* RNase P and random external guide sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 2354–2357.
24. Koutmou, K. S.; Day-Storms, J. J.; Fierke, C. A. The RNR motif of *B. subtilis* RNase P protein interacts with both PRNA and pre-tRNA to stabilize an active conformer. *RNA.* **2011**, *17*, 1225–1235.
25. Jovanovic, M.; Sanchez, R.; Altman, S.; Gopalan, V. Elucidation of structure-function relationships in the protein subunit of bacterial RNase P using a genetic complementation approach. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 5065–5073.
26. Howard, M. J.; Lim, W. H.; Fierke, C. A.; Koutmos, M. Mitochondrial ribonuclease P structure provides insight into the evolution of catalytic strategies for precursor-tRNA 5' processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 16149–16154.
27. Wegscheid, B.; Condon, C.; Hartmann, R. K. Type A and B RNase P RNAs are interchangeable in vivo despite substantial biophysical differences. *EMBO Rep.* **2006**, *7*, 411–417.
28. Vioque, A. Protein synthesis inhibitors and catalytic RNA effect of puromycin on tRNA precursor processing by the RNA component of *Escherichia coli* RNase P. *FEBS Letters.* **1989**, *246*, 137–139.
29. Gruegelsiepe, H.; Willkomm, D. K.; Goudinakis, O.; Hartmann, R. K. Antisense inhibition of *Escherichia coli* RNase P RNA. Mechanistic aspects. *ChemBioChem.* **2003**, *4*, 1049–1056.
30. Gößringer, M.; Hartmann, R. K. Function of heterologous and truncated RNase P proteins in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **2007**, *66*, 801–813.
31. Irwin, J. J.; Shoichet, B. K. ZINC – A free database of commercially available compounds for virtual screening. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, 177–182.
32. Johnston, R. F.; Pickett, S. C.; Barker, D. L. Autoradiography using storage phosphor technology. *Electrophoresis.* **1990**, *11*, 355–360.

33. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3–26.
34. Frantz, S. Better antibiotics through chemistry. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2004**, *3*, 900.
35. *ChemBioDraw Ultra 14.0*; PerkinElmer, 14.0.0.117.
36. Zentner, I.; Sierra, L.-J.; Fraser, A. K.; Maciunas, L.; Mankowski, M. K.; Vinnik, A.; Fedichev, P.; Ptak, R. G.; Martín-García, J.; Cocklin, S. Identification of a small-molecule inhibitor of HIV-1 assembly that targets the phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding site of the HIV-1 matrix protein. *ChemMedChem.* **2013**, *8*, 426–432.
37. Cocklin, S. Small molecule inhibitors of functions of the HIV-1 matrix protein. WO 2011/129636 A1. 10.11.2011.
38. Toth, P., *Entwicklung von Antagonisten und inversen Agonisten für den Peroxisom Proliferator aktivierten Rezeptor Beta/Delta auf Basis der Struktur von GSK0660*. Dissertation. Philipps-Universität Marburg, Marburg.
39. Quan, C.; Kurth, M. Solid-phase synthesis of 5-isoxazol-4-yl-[1,2,4]oxadiazoles. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 1470–1474.
40. Dürüst, Y.; Karakuş, H.; Kaiser, M.; Tasdemir, D. Synthesis and anti-protozoal activity of novel dihydropyrrolo[3,4-d][1,2,3]triazoles. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *48*, 296–304.
41. Cai, J.; Wei, H.; Hong, K. H.; Wu, X.; Cao, M.; Zong, X.; Li, L.; Sun, C.; Chen, J.; Ji, M. Discovery and preliminary evaluation of 2-aminobenzamide and hydroxamate derivatives containing 1,2,4-oxadiazole moiety as potent histone deacetylase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *96*, 1–13.
42. Wermuth, C. G., *The Practice of Medicinal Chemistry (3rd ed.)*; Elsevier, 2008.
43. Andrews, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* **2001**, *48*, 5–16.
44. Brady, O. J.; Gething, P. W.; Bhatt, S.; Messina, J. P.; Brownstein, J. S.; Hoen, A. G.; Moyes, C. L.; Farlow, A. W.; Scott, T. W.; Hay, S. I. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6*, e1760.
45. World Health Organization, *Handbook for Clinical Management of Dengue*, 2012.
46. Sabchareon, A.; Wallace, D.; Sirivichayakul, C.; Limkittikul, K.; Chanthavanich, P.; Suvannadabba, S.; Jiwariyavej, V.; Dulyachai, W.; Pengsaa, K.; Wartel, T. A.; Moureau, A.; Saville, M.; Bouckenooghe, A.; Viviani, S.; Tornieporth, N. G.; Lang, J. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren. A randomised, controlled phase 2b trial. *The Lancet.* **2012**, *380*, 1559–1567.
47. Bollati, M.; Alvarez, K.; Assenberg, R.; Baronti, C.; Canard, B.; Cook, S.; Coutard, B.; Decroly, E.; Lamballerie, X. de; Gould, E. A.; Grard, G.; Grimes, J. M.;

- Hilgenfeld, R.; Jansson, A. M.; Malet, H.; Mancini, E. J.; Mastrangelo, E.; Mattevi, A.; Milani, M.; Moureau, G.; Neyts, J.; Owens, R. J.; Ren, J.; Selisko, B.; Speroni, S.; Steuber, H.; Di Stuart; Unge, T.; Bolognesi, M. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: perspectives for drug design. *Antiviral Res.* **2010**, *87*, 125–148.
48. Behnam, M. A. M.; Nitsche, C.; Boldescu, V.; Klein, C. D. The medicinal chemistry of dengue virus. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 5622–5649.
49. Steuber, H.; Kanitz, M.; Ehlert, F. G. R.; Diederich, W. E. Recent advances in targeting dengue and west nile virus proteases using small molecule inhibitors. In *Therapy of viral infections*. Diederich, W. E.; Steuber, H., Eds.; Springer: Heidelberg, 2015; 15, pp. 93–141.
50. Mustafa, M. S.; Rasotgi, V.; Jain, S.; Gupta, V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Med. J. Armed Forces India.* **2015**, *71*, 67–70.
51. Guzman, M. G.; Halstead, S. B.; Artsob, H.; Buchy, P.; Farrar, J.; Gubler, D. J.; Hunsperger, E.; Kroeger, A.; Margolis, H. S.; Martínez, E.; Nathan, M. B.; Pelegrino, J. L.; Simmons, C.; Yoksan, S.; Peeling, R. W. Dengue: a continuing global threat. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, S7-S16.
52. Perera, R.; Kuhn, R. J. Structural proteomics of dengue virus. *Curr. Opin. Microbiol.* **2008**, *11*, 369–377.
53. Messina, J. P.; Brady, O. J.; Scott, T. W.; Zou, C.; Pigott, D. M.; Duda, K. A.; Bhatt, S.; Katzelnick, L.; Howes, R. E.; Battle, K. E.; Simmons, C. P.; Hay, S. I. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol.* **2014**, *22*, 138–146.
54. Hawley, W. A.; Pumpuni, C. B.; Brady, R. H.; Craig, G. B. Overwintering survival of *Aedes albopictus* (Diptera Culicidae) eggs in Indiana. *J. Med. Entomol.* **1989**, *26*, 122–129.
55. Normile, D. Tropical medicine. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. *Science.* **2013**, *342*, 415.
56. Guy, B.; Barrere, B.; Malinowski, C.; Saville, M.; Teyssou, R.; Lang, J. From research to phase III: preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Vaccine.* **2011**, *29*, 7229–7241.
57. Hadinegoro, S. R.; Arredondo-García, J. L.; Capeding, M. R.; Deseda, C.; Chotpitayasunondh, T.; Dietze, R.; Hj Muhammad Ismail, H. I.; Reynales, H.; Limkittikul, K.; Rivera-Medina, D. M.; Tran, H. N.; Bouckenooghe, A.; Chansinghakul, D.; Cortés, M.; Fanouillere, K.; Forrat, R.; Frago, C.; Gailhardou, S.; Jackson, N.; Noriega, F.; Plennevaux, E.; Wartel, T. A.; Zambrano, B.; Saville, M. Efficacy and long-term safety of a dengue vaccine in regions of endemic disease. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 1195–1206.
58. Klebe, G., *Wirkstoffdesign*; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2009.

59. Erbel, P.; Schiering, N.; D'Arcy, A.; Rénatus, M.; Kroemer, M.; Lim, S. P.; Yin, Z.; Keller, T. H.; Vasudevan, S. G.; Hommel, U. Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and west nile virus. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 372–373.
60. Leung, D.; Schroder, K.; White, H.; Fang, N.-X.; Stoermer, M. J.; Abbenante, G.; Martin, J. L.; Young, P. R.; Fairlie, D. P. Activity of recombinant dengue 2 virus NS3 protease in the presence of a truncated NS2B co-factor, small peptide substrates, and inhibitors. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 45762–45771.
61. Chanprapaph, S.; Saparpakorn, P.; Sangma, C.; Niyomrattanakit, P.; Hannongbua, S.; Angsuthanasombat, C.; Katzenmeier, G. Competitive inhibition of the dengue virus NS3 serine protease by synthetic peptides representing polyprotein cleavage sites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *330*, 1237–1246.
62. Yin, Z.; Patel, S. J.; Wang, W.-L.; Wang, G.; Chan, W.-L.; Rao, K. R. R.; Alam, J.; Jeyaraj, D. A.; Ngew, X.; Patel, V.; Beer, D.; Lim, S. P.; Vasudevan, S. G.; Keller, T. H. Peptide inhibitors of dengue virus NS3 protease. Part 1: Warhead. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 36–39.
63. Behnam, M. A.; Graf, D.; Bartenschlager, R.; Zlotos, D. P.; Klein, C. D. Discovery of nanomolar dengue and west nile virus protease inhibitors containing a 4-Benzyloxyphenylglycine residue. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 9354–9370.
64. Ganesh, V. K.; Muller, N.; Judge, K.; Luan, C.-H.; Padmanabhan, R.; Murthy, K. H. M. Identification and characterization of nonsubstrate based inhibitors of the essential dengue and west nile virus proteases. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 257–264.
65. Knehans, T.; Schuller, A.; Doan, D. N.; Nacro, K.; Hill, J.; Guntert, P.; Madhusudhan, M. S.; Weil, T.; Vasudevan, S. G. Structure-guided fragment-based in silico drug design of dengue protease inhibitors. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2011**, *25*, 263–274.
66. Deng, J.; Li, N.; Liu, H.; Zuo, Z.; Liew, O. W.; Xu, W.; Chen, G.; Tong, X.; Tang, W.; Zhu, J.; Zuo, J.; Jiang, H.; Yang, C.-G.; Li, J.; Zhu, W. Discovery of novel small molecule inhibitors of dengue viral NS2B-NS3 protease using virtual screening and scaffold hopping. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 6278–6293.
67. Tomlinson, S. M.; Watowich, S. J. Anthracene-based inhibitors of dengue virus NS2B-NS3 protease. *Antiviral Res.* **2011**, *89*, 127–135.
68. Heh, C. H.; Othman, R.; Buckle, M. J. C.; Sharifuddin, Y.; Yusof, R.; Rahman, N. A. Rational discovery of dengue type 2 non-competitive inhibitors. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2013**, *82*, 1–11.
69. Wu, H.; Bock, S.; Snitko, M.; Berger, T.; Weidner, T.; Holloway, S.; Kanitz, M.; Diederich, W. E.; Steuber, H.; Walter, C.; Hofmann, D.; Weissbrich, B.; Spannaus, R.; Acosta, E. G.; Bartenschlager, R.; Engels, B.; Schirmeister, T.; Bodem, J. Novel dengue virus NS2B/NS3 protease inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 1100–1109.

70. Nitsche, C.; Steuer, C.; Klein, C. D. Arylcianoacrylamides as inhibitors of the dengue and west nile virus proteases. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 7318–7337.
71. Njoroge, F. G.; Chen, K. X.; Shih, N. Y.; Piwinski, J. J. Challenges in modern drug discovery: a case study of boceprevir, an HCV protease inhibitor for the treatment of hepatitis C virus infection. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 50–59.
72. Anderson, A. C. The process of structure-based drug design. *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 787–797.
73. Acharya, C.; Coop, A.; Polli, J. E.; Mackerell, A. D., JR. Recent advances in ligand-based drug design: relevance and utility of the conformationally sampled pharmacophore approach. *Curr. Comput. Aided. Drug. Des.* **2011**, *7*, 10–22.
74. Irwin, J. J.; Sterling, T.; Mysinger, M. M.; Bolstad, E. S.; Coleman, R. G. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 1757–1768.
75. Welcome to ZINC is not commercial - a database of commercially-available compounds. <http://zinc.docking.org/> 19.05.2016 (Abfragedatum).
76. Klebe, G. Recent developments in structure-based drug design. *J. Mol. Med. (Berl)*. **2000**, *78*, 269–281.
77. Clercq, E. de. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2009**, *33*, 307–320.
78. *FlexX*; BioSolveIT GmbH, 2.0.2.
79. *MOE*; Chemical Computing Group, 2012.10.
80. Phong, W. Y.; Moreland, N. J.; Lim, S. P.; Wen, D.; Paradkar, P. N.; Vasudevan, S. G. Dengue protease activity: the structural integrity and interaction of NS2B with NS3 protease and its potential as a drug target. *Biosci. Rep.* **2011**, *31*, 399–409.
81. Wang, Y.; Gao, Y.; Wang, L.; Wang, Y.; Yang, K.; Wang, S.; Hu, X.; Cao, Z.; Zhang, C.; Zhang, W.; Jin, C.; Xu, A.; Wang, N. Method for synthesizing albendazole. CN101333193 A. 31.12.2008.
82. Whitlow, M.; Arnaiz, D. O.; Buckman, B. O.; Davey, D. D.; Griedel, B.; Guilford, W. J.; Koovakkat, S. K.; Liang, A.; Mohan, R.; Phillips, G. B.; Seto, M.; Shaw, K. J.; Xu, W.; Zhao, Z.; Light, D. R.; Morrissey, M. M. Crystallographic analysis of potent and selective factor Xa inhibitors complexed to bovine trypsin. *Acta. Cryst.* **1999**, *55*, 1395–1404.
83. Wang, W.; Kong, D.; Cheng, H.; Tan, L.; Zhang, Z.; Zhuang, X.; Long, H.; Zhou, Y.; Xu, Y.; Yang, X.; Ding, K. New benzimidazole-2-urea derivatives as tubulin inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 4250–4253.
84. Munguía, B.; Mendina, P.; Espinosa, R.; Lanz, A.; Saldaña, J.; J. Andina, M.; Ures, X.; López, A.; Manta, E.; Domínguez, L. Synthesis and anthelmintic evaluation of novel valerolactam- benzimidazole hybrids. *LDDD.* **2013**, *10*, 1007–1014.
85. Singh, B.; Leshner, G. Y. Synthesis of analogs of amrinone. 4-(3,4-Disubstitutedphenyl)pyridines and derivatives thereof. *J. Heterocyclic Chem.* **1991**, *28*, 933–937.

86. Othmer, D. F.; Jacobs, J. J.; Levy, J. F. Nitration of benzene. *Ind. Eng. Chem.* **1942**, *34*, 286–291.
87. Kulkarni, A. A. Continuous flow nitration in miniaturized devices. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 405–424.
88. Stedman, R. J. 2-aminobenzimidazole and a process for preparing 2-aminobenzimidazoles. US3455948 A. 15.7.1969.
89. Glunz, P. W.; Bisacchi, G. S.; Morton, G. C.; Holubec, A. A.; Priestley, E. S.; Zhang, X.; Treuner, U. D. Preparation of phenylglycine sulfonamide derivatives useful as serine protease inhibitors. WO 2004072101. 26.08.2004.
90. Bisacchi, G.; Sutton, J.; Slusarchyk, W.; Treuner, U.; Zhao, G.; Cheney, D.; Wu, S.; Shi, Y. Acid derivatives useful as serine protease inhibitors. WO 02/42273 A2. 30.05.2002.
91. Nitsche, C.; Holloway, S.; Schirmeister, T.; Klein, C. D. Biochemistry and medicinal chemistry of the dengue virus protease. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 11348–11381.
92. Astolfi, P.; Greci, L.; Rizzoli, C.; Sgarabotto, P.; Marrosu, G. Radical intermediates in the peroxidation of indoles. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.* **2001**, 1634–1640.
93. Tholander, J.; Bergman, J. Thallium(III) acetate-mediated 3,3-couplings of indoles with the formation of indolocarbazoles. *Tetrahedron.* **1999**, *55*, 12595–12602.
94. Cardellini, L.; Carloni, P.; Damiani, E.; Greci, L.; Stipa, P.; Rizzoli, C.; Sgarabotto, P. Nitrenium ions. Part 1. Acid-catalysed reactions of 2-methylindole with nitrosobenzenes. Crystal structures of 2-phenylamino-3-phenylimino-3*H*-indole, 2-(*o*-tolylamino)-3-(*o*-tolylimino)-3*H*-indole, *N*-phenyl-*N*-(2-phenylamino-3*H*-indol-3-ylidene)amine *N*-oxide and bis(2-methyl-1*H*-indol-3-yl)methane. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.* **1994**, 1589–1596.
95. Kong, Y.-B.; Zhu, J.-Y.; Chen, Z.-W.; Liu, L.-X. Copper-catalyzed oxidative trimerization of indoles by using TEMPO to construct quaternary carbon centers. The synthesis of 2-(1*H*-indol-3-yl)-2,3'-biindolin-3-ones. *Can. J. Chem.* **2014**, *92*, 269–273.
96. Davis, B. J.; Erlanson, D. A. Learning from our mistakes: the 'unknown knowns' in fragment screening. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 2844–2852.
97. Reinhard, L.; Mayerhofer, H.; Geerlof, A.; Mueller-Dieckmann, J.; Weiss, M. S. Optimization of protein buffer cocktails using thermofluor. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2013**, *69*, 209–214.
98. Kranz, J. K.; Schalk-Hihi, C. Protein thermal shifts to identify low molecular weight fragments. *Methods Enzymol.* **2011**, *493*, 277–298.
99. Ryan, A. J.; Gray, N. M.; Lowe, P. N.; Chung, C.-w. Effect of detergent on "promiscuous" inhibitors. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3448–3451.
100. Bodenreider, C.; Beer, D.; Keller, T. H.; Sonntag, S.; Wen, D.; Yap, L.; Yau, Y. H.; Shochat, S. G.; Huang, D.; Zhou, T.; Caflisch, A.; Su, X.-C.; Ozawa, K.; Otting, G.; Vasudevan, S. G.; Lescar, J.; Lim, S. P. A fluorescence quenching assay to

- discriminate between specific and nonspecific inhibitors of dengue virus protease. *Anal. Biochem.* **2009**, *395*, 195–204.
101. Stryer, L. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu. Rev. Biochem.* **1978**, *47*, 819–846.
102. Robert Koch-Institut, *Epidemiologisches Bulletin*, 2016.
103. Petersen, L. R.; Jamieson, D. J.; Powers, A. M.; Honein, M. A. Zika Virus. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 1552–1563.
104. McGovern, S. L.; Helfand, B. T.; Feng, B.; Shoichet, B. K. A specific mechanism of nonspecific inhibition. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4265–4272.
105. Feng, B. Y.; Shoichet, B. K. A detergent-based assay for the detection of promiscuous inhibitors. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 550–553.
106. Feng, B. Y.; Shelat, A.; Doman, T. N.; Guy, R. K.; Shoichet, B. K. High-throughput assays for promiscuous inhibitors. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 146–148.
107. McGovern, S. L.; Caselli, E.; Grigorieff, N.; Shoichet, B. K. A common mechanism underlying promiscuous inhibitors from virtual and high-throughput screening. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1712–1722.
108. Seidler, J.; McGovern, S. L.; Doman, T. N.; Shoichet, B. K. Identification and prediction of promiscuous aggregating inhibitors among known drugs. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4477–4486.
109. Shoichet, B. K. Interpreting steep dose-response curves in early inhibitor discovery. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7274–7277.
110. Ezgimen, M. D.; Mueller, N. H.; Teramoto, T.; Padmanabhan, R. Effects of detergents on the west Nile virus protease activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 3278–3282.
111. Linde, K., *Design und Synthese neuartiger Grundstrukturen zur Inhibition von Aspartat-Proteasen der Familien A1 und A2*. Dissertation. Philipps-Universität Marburg, Marburg, 2012.
112. Blum, A.; Böttcher, J.; Heine, A.; Klebe, G.; Diederich, W. E. Structure-guided Design of C₂-symmetric HIV-1 protease inhibitors based on a pyrrolidine scaffold. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2078–2087.
113. Hartman, A.; Mondal, M.; Radeva, N.; Klebe, G.; Hirsch, A. Structure-based optimization of inhibitors of the aspartic protease endothiapepsin. *IJMS.* **2015**, *16*, 19184–19194.
114. Darke, P. L.; Leu, C. T.; Davis, L. J.; Heimbach, J. C.; Diehl, R. E.; Hill, W. S.; Dixon, R. A. and Sigal, I. S. Human immunodeficiency virus protease. Bacterial expression and characterization of the purified aspartic protease. *J. Biol. Chem.* **1989**, 2307–2312.
115. Bailey, D.; Cooper, J. B.; Veerapandian, B.; Blundell, T. L.; Atrash, B.; Jones, D. M.; Szelke, M. X-ray-crystallographic studies of complexes of pepstatin A and a statine-containing human renin inhibitor with endothiapepsin. *Biochem. J.* **1993**, *289*, 363–371.

116. Klee, N., *Strukturbasiertes Design, Synthese und Affinitätsbestimmung neuartiger HIV-1-Protease-Inhibitoren*. Dissertation. Philipps-Universität Marburg, Marburg, 2013.
117. Kuhnert, M.; Blum, A.; Steuber, H.; Diederich, W. E. Privileged structures meet human T-cell leukemia virus-1 (HTLV-1): C_2 -symmetric 3,4-disubstituted pyrrolidines as nonpeptidic HTLV-1 protease inhibitors. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 4845–4850.
118. Irwin, J. J.; Duan, D.; Torosyan, H.; Doak, A. K.; Ziebart, K. T.; Sterling, T.; Tumanian, G.; Shoichet, B. K. An Aggregation Advisor for Ligand Discovery. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 7076–7087.
119. Yung-Chi, C.; Prusoff, W. H. Relationship between the inhibition constant (K_I) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099–3108.
120. Zmuda, F.; Malviya, G.; Blair, A.; Boyd, M.; Chalmers, A. J.; Sutherland, A.; Pimlott, S. L. Synthesis and evaluation of a radioiodinated tracer with specificity for poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in vivo. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 8683–8693.
121. Renodon-Cornière, A.; Dijols, S.; Perollier, C.; Lefevre-Groboillot, D.; Boucher, J.-L.; Attias, R.; Sari, M.-A.; Stuehr, D.; Mansuy, D. *N*-Aryl *N'*-hydroxyguanidines, a new class of NO-donors after selective oxidation by nitric oxide synthases: structure–activity relationship. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 944–954.
122. Toma, G.; Yamaguchi, R. Cobalt-catalyzed C-N bond-forming reaction between chloronitrobenzenes and secondary amines. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *33*, 6404–6408.
123. Wilson, A. A.; Dannals, R. F.; Ravert, H. T.; Sonders, M. S.; Weber, E.; Wagner, H. N. Radiosynthesis of σ receptor ligands for positron emission tomography: ^{11}C and ^{18}F labeled guanidines. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1867–1870.
124. Mano, M.; Seo, T.; Kaneko, T.; Imai, K.-I. Anticoccidials. V. A convenient synthesis of 2(1*H*)-pyrazinone 4-oxide derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, *28*, 2720–2733.
125. Modh, R. P.; Kumar, S. P.; Jasrai, Y. T.; Chikhaliya, K. H. Design, synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of coumarin-piperazine derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2013**, *346*, 793–804.
126. Kumar, R.; Kaur, M.; Bahia, M. S.; Silakari, O. Synthesis, cytotoxic study and docking based multidrug resistance modulator potential analysis of 2-(9-oxoacridin-10(9*H*)-yl)-*N*-phenyl acetamides. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *80*, 83–91.
127. Alafeefy, A. M.; Ceruso, M.; Al-Tamimi, A.-M. S.; Del Prete, S.; Capasso, C.; Supuran, C. T. Quinazoline–sulfonamides with potent inhibitory activity against the α -carbonic anhydrase from vibrio cholerae. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 5133–5140.

128. Ren, J.-L.; Zhang, X.-Y.; Yu, B.; Wang, X.-X.; Shao, K.-P.; Zhu, X.-G.; Liu, H.-M. Discovery of novel AHLs as potent antiproliferative agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *93*, 321–329.
129. Gellibert, F. J.; Guangcheng, K. L. Preparation of 1,2,4-oxadiazoles as hPPAR alpha agonists. US7141591 B2. 28.11.2006.
130. Agirbag, H.; Sümengen, D.; Dürüst, Y.; Dürüst, N. The reaction of amidoximes with chloroacetyl chloride. *Synth. Commun.* **2006**, *22*, 209–217.
131. Mizusawa, K.; Ishida, Y.; Takaoka, Y.; Miyagawa, M.; Tsukiji, S.; Hamachi, I. Disassembly-driven turn-on fluorescent nanoprobe for selective protein detection. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7291–7293.
132. Liu, K.; Lu, H.; Hou, L.; Qi, Z.; Teixeira, C.; Barbault, F.; Fan, B.-T.; Liu, S.; Jiang, S.; Xie, L. Design, synthesis, and biological evaluation of *N*-Carboxyphenylpyrrole derivatives as potent HIV fusion inhibitors targeting gp41. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 7843–7854.
133. Huigens, R. W.; Reyes, S.; Reed, C. S.; Bunders, C.; Rogers, S. A.; Steinhauer, A. T.; Melander, C. The chemical synthesis and antibiotic activity of a diverse library of 2-aminobenzimidazole small molecules against MRSA and multidrug-resistant *A. baumannii*. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 663–674.
134. Pollock, J. A.; Kim, S. H.; Katzenellenbogen, J. A. Imidoyl dichlorides as new reagents for the rapid formation of 2-aminobenzimidazoles and related azoles. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 6097–6099.
135. Ferlin, M. G.; Chiarelto, G.; Dall'Acqua, S.; Maciocco, E.; Mascia, M. P.; Pisu, M. G.; Biggio, G. Novel anellated pyrazoloquinolin-3-ones: synthesis and in vitro BZR activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3531–3541.
136. Lawrence, N. J.; Sebt, S. M.; Pireddu, R. Novel rho kinase inhibitors and methods of use. WO2012135697 A3. 17.01.2013.

Anhang

1. Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**„Design, Synthese und Evaluation von Inhibitoren der bakteriellen RNase P und der
Dengue-Virus-Protease“**

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 18.08.2016

.....
Fabian Ehlert