

**NEUE DERIVATE DER ETACRYNSÄURE:
SYNTHESE UND BIOLOGISCHE AKTIVITÄT**



DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES NATURWISSENSCHAFTLICHEN DOKTORGRADES DER
JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG

vorgelegt von
Diplom-Chemiker Markus Schiller
aus Hanau

Würzburg 2009

Eingereicht am
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:
2. Gutachter:
der Dissertation

1. Prüfer:
2. Prüfer:
3. Prüfer:
des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am

Die vorliegende Dissertation wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Tanja Schirmeister von Februar 2004 bis Juli 2009 am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg angefertigt.

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

“A New Lead for Nonpeptidic Active-Site-Directed Inhibitors of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Main Protease Discovered by a Combination of Screening and Docking Methods.”

Käppler U., Stiefl N., Schiller M., Vicik R., Breuning A., Schmitz W., Rupprecht D., Schmuck C., Baumann K., Ziebuhr J., Schirmeister T.; *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (22), 6832-6842.

“Screening of Electrophilic Compounds Yields an Aziridinyl Peptide as New Active-Site Directed SARS-CoV Main Protease Inhibitor.”

Martina E., Stiefl N., Degel B., Schulz F., Breuning A., Schiller M., Vicik R., Baumann K., Ziebuhr J., Schirmeister T.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15* (24), 5365-5369.

“Synthesis and Evaluation of Non-peptidic Cysteine Protease Inhibitors of *P. falciparum* derived from Etcacrynic Acid.“

Dude M. A., Kaeppler U., Herb M., Schiller M., Schulz F., Vedder B., Heppner S., Pradel G., Gut J., Rosenthal P. J., Schirmeister T., Leippe M., Gelhaus C.; *Molecules* **2009**, *14*, 19-35.

„Enzyme Kinetics and Hit Validation in Fluorimetric Protease Assays.“

Ludewig S., Kossner M., Schiller M., Baumann K., Schirmeister T.; *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, *accepted for publication*.

DANKSAGUNG

Zum Gelingen dieser Arbeit haben zahlreiche Personen durch Ihre Unterstützung beigetragen. Bei ihnen möchte mich auf diesem Weg herzlich bedanken.

An erster Stelle gilt mein Dank Prof. Dr. Tanja Schirmeister für die Überlassung dieses interessanten Themas, deine immer offene Tür, für die vielen Diskussionen, die gewährten Freiräume sowie das stete Interesse an meiner Arbeit. Herzlichen Dank ebenfalls für die Möglichkeit der Teilnahme an zahlreichen Fachtagungen im In- und Ausland sowie am VIGONI-Projekt.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. Carsten Schmuck für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Weiterhin danke ich folgenden Personen für ihre Unterstützung:

- Prof. Dr. Knut Baumann, Markus Kossner und Stefanie Ludewig, TU Braunschweig, für die Zusammenarbeit am Cinanserin-Projekt
- Prof. Dr. Bernd Engels und Alexander Paasche, Institut für Organische Chemie, Universität Würzburg, für die Durchführung der quantenchemischen Rechnungen an den Etacrynsäure-Derivaten
- Prof. Dr. Carsten Schlücker (Universität Osnabrück) und Gero Bergner (IPHT Jena) für die Durchführung der Raman-Experimente
- Dr. Christoph Gelhaus und Saskia Heppner, Zoologisches Institut, Universität Kiel, für die Untersuchungen an *Plasmodium falciparum* und Falcipain
- Prof. Dr. John Ziebuhr, Queens University, Belfast, für die Überlassung von SARS-CoV-M^{pro}, TGEV-M^{pro} sowie den Testungen an den Coronaviren
- Prof. Dr. Caroline Kisker, Martin Stempka und Uwe Dietzel für die Expressierung von SARS-CoV-M^{pro} und SARS-CoV-PL^{pro}
- Dr. Tobias Ölschläger, Dr. August Stich, Elena Katzowitsch, Jennifer Rath und Martina Schultheis (SFB 630, Teilprojekt Z1) für die Durchführung der mikrobiologischen Testungen sowie Dr. Heike Bruhn (SFB 630, Teilprojekt QM) für die Unterstützung in punkto Organisation und SOPs
- Monika Herb, Christian Büchold und Dr. Radim Vičik für die Messung diverser NMR-Spektren
- Dr. Franziska Schulz, Monika Herb und Thomas Pfeuffer für die LC-MS-Messungen
- Conny Heindl für die Durchführung der Enzymassays
- Eva Kugelmann für die Unterstützung bei der präparativen HPLC

- meinen ehemaligen F-Praktikanten Doris Brunner, Nadine Laskowski, Theresa Winkler und Michael Moos für ihre Unterstützung und ihr Engagement im Labor.

Ein besonderer Dank gilt meinen ehemaligen Kollegen Dr. Ulrich Käppler für die Vorarbeiten am Etacrynsäure-Thema und die Einführung in die Geheimnisse von NMR-Automation und Enzym-Assays, sowie Dr. Radim Vičik für die uneingeschränkte Hilfe bei allen technischen Problemen und die Fähigkeit (fast) jedes defekte Gerät reparieren zu können.

Ein herzlicher Dank geht an Dr. Birgit Vedder, Dr. Franziska Schulz und Monika Herb für die gute Arbeitsatmosphäre im Labor 017. Die gute Stimmung, die vielen fachlichen und privaten Gespräche und Diskussionen und die „*bring your own music*“-Tage konnten so manche missglückte Synthese vergessen machen.

Neben den bereits genannten danke ich allen ehemaligen und aktuellen Kollegen im AK Schirmeister: Alexander Breuning, Verena Buback, Christian Büchold, Dr. Björn Degel, Philipp Fey, Conny Heindl, Erika Martina, Thomas Pfeuffer, Matthias Rappold, Caroline Schad, Roswitha Scheblein, Magdalena Schneider, Thomas Schneider, Swarna Oli, Martin Stempka, Paula Tabares, Thilo Waag, Constanze Waltenberger, Armin Welker, Hongmei Wu und Qing Ye für ein einmaliges Arbeitsklima im, um, an oder bei Labor, Praktikum, Schreibtisch, Kaffee und Grill sowie den spontanen Aktionen, bei denen es manchmal auch etwas später wurde. Arbeitet fleißig an der Korkensammlung weiter!

Ein großes Dankeschön geht auch an meine Korrekturleser Dr. Christof Albert, Verena Buback und Jens Kimmel für die aufmerksame und kritische Durchsicht des Manuskripts.

Dank ebenfalls an meine Assistenten-Kollegen des 2. Semesters Alexander Breuning, Tim Göbel, Dr. Verena Hörr, Caroline Schad, Thomas Schneider, Martin Stempka und Dr. Radim Vičik für das gute Klima und die Unterstützung bei der Praktikumsbetreuung und -organisation.

Ebenfalls ein Dankeschön geht an die gesamte Mannschaft der Instituts-Werkstatt für die umgehende und umfassende Hilfe bei technischen Problemen aller Art.

DFG und DAAD sei für die gewährte finanzielle Unterstützung im Rahmen meiner Promotionszeit gedankt.

Manchmal ist es wichtig, daran erinnert zu werden, dass es noch andere Sachen neben dem Laboralltag gibt. Dazu haben die Bewohner der *Drei Amigos*-WG maßgeblich beigetragen. Herzlichen Dank dafür!

Abschließend geht ein ganz besonderer Dank an meine Eltern sowie meinen Bruder Tobias! Danke für eure fortwährende Unterstützung in jeglicher Hinsicht, Euren Rückhalt und dafür, dass ich immer auf Euch zählen kann.

meiner Familie

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

abs.:	absolut	ges.:	gesättigt
Abz:	2-Aminobenzoessäure (Anthranilsäure)	HMBC:	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
AMC:	7-Amino-4-methylcumarin	HMQC:	Heteronuclear Multiple- Quantum Correlation
Äq:	Äquivalent	HOBt:	1-Hydroxybenzotriazol
CARS:	Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy	konz.:	konzentriert
CL:	Cathepsin L	LM:	Lösungsmittel
CoV:	Coronavirus	m:	Multipllett
Cy:	Cyclohexan	MHK:	Minimale Hemmkonzentration
d:	Dublett	M ^{pro} :	main protease
dc:	dünnschichtchromatographisch	Mts:	Mesitylen-2-sulfonyl-
DABCYL:	4-((4-(Dimethylamino)phenyl)-azo)- benzoessäure	ppm:	parts per million
DCC:	Dicyclohexylcarbodiimid	PL ^{pro} :	papain like protease
DCM:	Dichlormethan	q:	Quartett
DEPT:	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer	quint:	Quintett
DIC:	Diisopropylcarbodiimid	RP:	Reversed-phase
DMF:	<i>N,N</i> -Dimethylformamid	RT:	Raumtemperatur
DMSO:	Dimethylsulfoxid	s:	Singulett
DPPA:	Diphenylphosphorylazid	SARS:	Severe Acute Respiratory Syndrome (Schweres Akutes Atemwegs- syndrom)
DTT:	Dithioerythritol	SC:	Säulenchromatographie
EDANS:	(5-(2-Aminoethyl)amino)- naphthalin-1-sulfonsäure	sext:	Sextett
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure	SPPS:	Solid Phase Peptide Synthesis
EEDQ:	1-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy- 1,2-dihydrochinolin	t:	Tripllett
ESI:	Elektronenspray-Ionisation	TFA:	Trifluoressigsäure
EtOAc:	Ethylacetat	TGEV:	transmissible gastroenteritis virus
Fmoc:	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-	THF:	Tetrahydrofuran
FP:	Falcipain	TMDM:	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl- diaminomethan
FRET:	Fluorescence Resonance Energy Transfer	Tris:	Tris(hydroxymethyl)amino- methan, Trometamol
FS:	Feststoff	Trt:	Trityl- (Triphenylmethyl-)
		wfr.:	wasserfrei

Aminosäuren (falls nicht anders gekennzeichnet, liegen alle Aminosäuren in der L-Form vor):

Ala	A	Alanin	Leu	L	Leucin
Arg	R	Arginin	Lys	K	Lysin
Asn	N	Asparagin	Met	M	Methionin
Asp	D	Aspartat	Phe	F	Phenylalanin
Cys	C	Cystein	Pro	P	Prolin
Gln	Q	Glutamin	Ser	S	Serin
Glu	E	Glutaminsäure	Thr	T	Threonin
Gly	G	Glycin	Trp	W	Tryptophan
His	H	Histidin	Tyr	Y	Tyrosin
Ile	I	Isoleucin	Val	V	Valin

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Vorkommen, Funktion und Bedeutung von Cystein-Proteasen	2
1.2	Aufbau und katalytische Aktivität von Cystein-Proteasen	4
1.3	Schweres Akutes Atemwegssyndrom (SARS)	7
1.3.1	Übertragung und Krankheitsverlauf	7
1.3.2	Virusreplikation und Enzymausstattung des SARS-CoV	8
1.3.3	Charakterisierung der SARS-CoV-Hauptprotease (M ^{pro})	11
1.3.4	Charakterisierung der SARS-Coronavirus Papain-like-Protease (PL ^{pro})	13
1.4	Proteasen des SARS-CoV als Targets für Inhibitoren	13
1.4.1	Bekannte Inhibitoren der SARS-CoV-M ^{pro}	14
1.4.2	Bekannte Inhibitoren der SARS-CoV-PL ^{pro}	18
1.4.3	Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)	19
1.4.4	Etacrynsäure als Leitstruktur für Inhibitoren von Cystein-Proteasen	22
1.5	Zielsetzung der Arbeit	23
2	Synthesen	27
2.1	Festphasensynthese des FRET-Substrats	27
2.2	Synthese der Etacrynsäure-Derivate	31
2.2.1	Friedel-Crafts-Acylierung	34
2.2.2	Darstellung von Acryloylphenol und acyliertem Thiophenol	39
2.2.3	Veretherung von Phenolen und Thiophenolen	41
2.2.4	Einführung der Doppelbindung unter Ausbildung des Michael-Systems	48
2.2.5	Synthese von Amid-Derivaten der Etacrynsäure	53
2.3	Synthese markierter Etacrynsäure-Derivate	56
2.3.1	Synthese von Biotin-markierter Etacrynsäure (Eta-bADA)	57
2.3.2	Synthese Deuterium-markierter Etacrynsäure-Derivate	59
2.4	Synthese der Cinanserin-Derivate	64
2.5	Chromanon-Derivate	65
2.5.1	3-Methylen-4-chromanon (MS75)	66
2.5.2	Versuch der Synthese von (6-Chlor-3-methylen-4-oxochroman-7-yloxy)-essigsäure	66
3	Biochemische und biologische Untersuchungen	73
3.1	Enzym-Assays	73

3.1.1	Charakterisierung zeitabhängiger Hemmung	75
3.1.2	Charakterisierung nicht-zeitabhängiger Hemmung	78
3.1.3	K_m -Wert-Bestimmung der FRET-Substrate	80
3.1.4	Durchführung und Ergebnisse der fluorimetrischen Enzym-Assays	82
3.1.5	Testung der Cinanserin-Derivate an SARS-CoV-M ^{pro}	86
3.2	Infektionsbiologische Testungen	88
3.2.1	Antibakterielle Aktivität	88
3.2.2	Aktivität gegen <i>Leishmania major</i> und <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	91
3.3	Untersuchung an Falcipain-2/-3 und <i>Plasmodium falciparum</i>	94
3.4	Diskussion der Ergebnisse	96
3.4.1	Enzym-Assays	96
3.4.1.1	Etacrynsäure-Derivate	96
3.4.1.2	Cinanserin-Derivate	98
3.4.2	Antibakterielle Aktivität	100
3.4.3	Testung an <i>L. major</i> , <i>T. b. brucei</i> und <i>P. falciparum</i>	101
4	CARS-Mikroskopie an deuterierten Etacrynsäurederivaten	104
5	Kinetische Untersuchungen mittels NMR-Spektroskopie	109
5.1	Quantenchemische Berechnungen	110
5.1.1	Modellsystem der Berechnungen	110
5.1.2	Ergebnisse der quantenchemischen Berechnungen	112
5.2	NMR-Kinetische Untersuchungen	116
5.2.1	Modellverbindungen und Reaktionsbedingungen	116
5.2.2	Ergebnisse der NMR-Experimente	119
5.3	Diskussion der Ergebnisse	123
6	Zusammenfassung	127
7	Summary	133
8	Experimenteller Teil	139
8.1	Geräte und Materialien	139
8.2	Reagenzien	141
8.3	Enzym-Assays	142
8.4	Allgemeine Synthesevorschriften	144
8.5	Synthesen	149
8.5.1	Synthese des FRET-Substrats (MS01)	149
8.5.2	Synthese der mit Crotonylchlorid acylierten Anisole	150

8.5.3	Synthese der Bromessigsäureamide und Chlorpropionsäureamide	153
8.5.4	Synthese von Brom-Etacrinsäure- <i>tert</i> -butylamid	157
8.5.5	Synthese der Etacrinsäurederivate	160
8.5.6	Synthese der Amide/Ester ohne Michael-System	174
8.5.7	Synthese der Etacrinsäureamid-Derivate	183
8.5.8	Synthese markierter Etacrinsäurederivate	195
8.5.9	Synthese der Cinanserin-Derivate	201
8.5.10	Weitere Verbindungen	211
9	<i>Literaturverzeichnis</i>	216
10	<i>Veröffentlichungen</i>	228

1 Einleitung

Enzymen kommt im Stoffwechsel aller lebenden Organismen als Katalysatoren biochemischer Reaktionen eine zentrale Bedeutung zu. Eine wichtige Funktion ist dabei die Spaltung von Peptiden, zu der die Enzymgruppe der Proteasen in der Lage ist. Die Klassifizierung von Proteasen kann nach mehreren Ordnungsmerkmalen erfolgen. Bezüglich des Aufbaus des aktiven Zentrums und des Katalysemechanismus im Enzym unterscheidet man Aspartat-, Cystein-, Serin-, Threonin-, und Metalloproteasen. Diese Einteilung findet sich auch im MEROPS-System (<http://merops.sanger.ac.uk>) wieder, das die Proteasen je nach Abstammung in Clans ordnet.^[1,2] Die Benennung eines Clans erfolgt durch einen Zwei-Buchstaben-Code, wobei der erste den Katalysemechanismus (A, C, S, T, M, P (gemischter Clan), U (unknown), s. o.) codiert und der zweite fortlaufend vergeben wird. Innerhalb eines Clans werden verwandte Proteasen zu Familien zusammengefasst. Zur Kennzeichnung erhält jede Familie den ersten Clanbuchstaben sowie eine fortlaufende Nummer. Die verwandtschaftlichen Beziehungen der Proteasen spiegeln sich neben dem katalytischen Mechanismus auch in ähnlicher Aminosäuresequenz, Tertiärstruktur oder Vorkommen wider.

Im Gegensatz dazu berücksichtigt die Einteilung nach der EC-Nomenklatur, die von der IUPAC und IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) zur Benennung von Enzymen erarbeitet wurde, die vom Enzym katalysierte Reaktionsart als Ordnungsmerkmal.^[3] Demnach zählen die Proteasen zur Klasse der peptidspaltenden Hydrolasen (EC 3.4, Peptidasen), die – je nach Position der Spaltstelle – in Exo- (EC 3.4.11-19) bzw. Endopeptidasen (EC 3.4.21-99) unterschieden werden. In den Untergruppen wird wiederum der Katalysemechanismus (Cystein, Serin, usw.) berücksichtigt.

Proteasen übernehmen durch spezifische Hydrolyse von Proteinen und Peptiden wichtige Aufgaben im menschlichen Körper, können aber auch in pathologische Prozesse und bei Infektionen durch Viren, Bakterien oder Protozoen involviert sein. Während in der Arzneimittelforschung Aspartat- und Serinproteasen schon seit geraumer Zeit als Angriffspunkte für Wirkstoffe entdeckt wurden, gibt es für Cystein-Proteasen noch keine vergleichbaren Beispiele an Inhibitoren, die zu marktfähigen Produkten entwickelt werden konnten.

1.1 Vorkommen, Funktion und Bedeutung von Cystein-Proteasen

Cystein-Proteasen sind in der Natur weit verbreitet. Im MEROPS-System^[2] sind sie derzeit in neun Clans mit insgesamt ca. 60 Familien unterteilt. Dabei stellen die Papain-ähnlichen Cystein-Proteasen (Clan CA) die umfangreichste Gruppe dar. Ihr Vorkommen ist nicht nur auf das Tier- und Pflanzenreich beschränkt. Auch in Bakterien, Viren, Pilzen und Protozoen übernehmen sie wichtige biologische Funktionen.^[4]

Clan	Fam.	Protease	Katalyse	Spezifität des Enzyms	Herkunft
CA	C1	Papain	Cys ⁻ , HisH ⁺	S2: lipophil z. B. Phe, Leu	<i>Carica papaya</i>
		Cathepsin B		S2: Arg	<i>Homo sapiens</i>
		Cathepsine L, S, K, P, Q, X			<i>Homo sapiens</i>
		Falcipain 1-3		S2: lipophil z. B. Phe, Leu	<i>Plasmodium falciparum</i>
		Rhodesain			<i>Trypanosoma brucei</i>
		Cruzipain 1+2			<i>Trypanosoma cruzi</i>
C2	Calpain-2 (Ca ²⁺ -abhängig)	Cys ⁻ , HisH ⁺	S2: Tyr, Met, Leu, Val, Arg	<i>Homo sapiens</i>	
C10	Streptopain	Cys ⁻ , HisH ⁺	S2: lipophil	<i>Strept. pyogenes</i>	
C16	SARS-CoV-PL ^{pro}	Cys ⁻ , HisH ⁺ , Asp	LXGG A LXGG K	humanes SARS-Coronavirus	
C47	Staphopain A+B	Cys ⁻ , HisH ⁺	S2: lipophil	<i>Staphylococcus aureus</i>	
CD	C11	Clostripain	Cys ⁻ , HisH ⁺	S1: Arg	<i>Clostridium histolyticum</i>
	C14	Caspase-1 = ICE	Cys ⁻ , HisH ⁺	Asp X	<i>Homo sapiens</i> , <i>Rattus norvegicus</i>
CL	C60	Sortase A Sortase B	Cys, His, Arg	LPXT G	<i>Staphylococcus aureus</i>
PA	C3	Poliovirus-type Picornain 3C	Cys, His	Q G	Humanes Poliovirus Typ 1
		HAV-Typ Picornain 3C	Cys, His, Asp/Glu		Hepatitis A-Virus
	C30	SARS-CoV-M ^{pro} TGEV-M ^{pro}	Cys, His Cys, His	LQ A/S LQ A	humanes SARS-Coronavirus Porcine Transmissible Gastroenteritis Virus

||: Spaltstelle im Peptid; SARS-CoV-PL^{pro}: Severe Acute Respiratory Syndrom-Coronavirus Papain-like Protease; HAV: Hepatitis-A-Virus; SARS-CoV-M^{pro}: Severe Acute Respiratory Syndrom-Coronavirus Hauptprotease; TGEV-M^{pro}: Transmissible Gastroenteritis Virus Hauptprotease

Tab. 1–1: Ausgewählte Cystein-Proteasen mit pharmazeutischer Bedeutung

Die bedeutendsten Vertreter der humanen Cystein-Proteasen sind die lysosomalen Cathepsine (Clan CA, Familie C1) mit bislang elf bekannten Enzymen (Cathepsin B, C, F, H, K, L, O, S, V, X und W) sowie die im Cytoplasma vorkommenden Calpaine (Clan CA, Familie C2). Tab. 1–1 zeigt eine Übersicht wichtiger Cystein-Proteasen. Ihre Bedeutung als pharmazeutisches Target wurde erst in den vergangenen Jahren erkannt. Entgegen der früheren Annahme, die Hauptfunktion dieser Enzyme sei der unspezifische Proteinabbau in den Lysosomen, konnten neuere Arbeiten die Beteiligung von Cystein-Proteasen an einer Vielzahl pathologischer Vorgänge im menschlichen Organismus, wie beispielsweise Osteoporose, Arthritis, Schlaganfall, Alzheimer oder Tumorgenese, zeigen.^[5,6,7] Tropische Erkrankungen wie Malaria, Leishmaniose, die Chagas-Krankheit oder die Afrikanische Schlafkrankheit werden durch Protozoen verursacht. Diese Parasiten nutzen Cystein-Proteasen zur Invasion in den Wirt sowie zur eigenen Ernährung durch Abbau von Wirtsproteinen in den Nahrungsvakuolen.^[8]

Erreger	Enzym	Funktion	Erkrankung
Parasit			
<i>Plasmodium falciparum</i>	Falcipain 1-3	Ernährung/ Vermehrung des Parasiten	Malaria
<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>	Rhodesain	Replikation des Parasiten	Schlafkrankheit
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Cruzain	Ernährung des Parasiten ^[9]	Chagas-Krankheit
Virus			
TGEV	TGEV-M ^{pro}	virale Replikation	Gastroenteritis bei Schweinen
SARS-Coronavirus	SARS-CoV-M ^{pro} SARS-CoV-PL ^{pro}	virale Replikation/ Deubiquitinierung ^[10]	SARS
Bakterium			
<i>S. aureus</i>	Sortase	Transpeptidase-Aktivität bei Zellwandaufbau, Virulenzfaktor ^[11]	bakterielle Infektion

TGEV-M^{pro}: Transmissible Gastroenteritis Virus Hauptprotease; SARS-CoV-M^{pro}: Severe Acute Respiratory Syndrom Coronavirus Hauptprotease; SARS-CoV-PL^{pro}: Severe Acute Respiratory Syndrom-Coronavirus Papain-like Protease; *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*

Tab. 1–2: Parasitäre und bakterielle Cystein-Proteasen verschiedener Krankheitserreger

Weiterhin hat man festgestellt, dass auch einige Viren nicht nur den Zellapparat des Wirtes zur Replikation nutzen, sondern auch für eigene Cystein-Proteasen codieren, die essentiell für die Virusreplikation und die Produktion neuer Virionen sind.^[12,13] Dabei handelt es sich – nach MEROPS-Systematik – sowohl um Cystein-Proteasen im engeren Sinn (Cystein-Clan) als auch um Cystein-Proteasen mit Chymotrypsin-ähnlicher Struktur, die dem Clan mit gemischtem Katalysemechanismus (Clan PA(C)) zugeordnet sind. Eine Übersicht über diverse Infektionskrankheiten, bei denen Cystein-Proteasen eine zentrale Bedeutung zukommt, ist in Tab. 1–2 zu finden. Viele dieser Krankheiten sind vor allem in tropischen Gebieten mit Fallzahlen in Millionenhöhe weit verbreitet oder können durch rasche Übertragung über internationale Luftverkehrswege – wie im Fall von SARS – in kurzer Zeit zu einer weltweiten Epidemie führen. Zur Therapie einiger dieser Krankheiten sind derzeit keine effektiven spezifischen Medikamente vorhanden. Meist wird auf bereits langjährig eingesetzte Medikation mit zahlreichen Nebenwirkungen zurückgegriffen. Ebenso sind noch keinerlei Impfstoffe verfügbar. Das zunehmende Auftreten von Resistenzen gegenüber den bekannten Therapien ist ein weiteres Problem. Die beteiligten Cystein-Proteasen stellen daher ein attraktives Target bei der Entwicklung neuer antiinfektiver Wirkstoffe dar.

1.2 Aufbau und katalytische Aktivität von Cystein-Proteasen

Die Tertiärstruktur von Enzymen wird maßgeblich von der Aminosäuresequenz, den daraus resultierenden Sekundärstrukturelementen (α -Helix, β -Faltblatt, etc.) und der Faltung des Peptidstranges bestimmt. Die Proteinstruktur ist vor allem unter den Cystein-Proteasen der Papain-Familie (C1) hochkonserviert. So weisen diese Enzyme eine L-Domäne und eine R-Domäne auf, zwischen denen ein von außen zugänglicher Spalt (*active site cleft*) verläuft, der das aktive Zentrum des Enzyms enthält. Die an der proteolytischen Aktivität beteiligten Aminosäurereste liegen sich am Rande der *active site cleft* gegenüber, wobei der Cystein-Rest in der L-Domäne und der Histidin-Rest in der R-Domäne des Enzyms lokalisiert ist (vgl. Abb. 1–1). Bei der Enzym-Substrat-Reaktion lagert sich das zu spaltende Substratpeptid entlang der *active site cleft* an das Enzym an. Hierbei werden von den jeweiligen Aminosäureresten des Substrats bestimmte Binde-taschen des Enzyms adressiert, d. h. die Aminosäurereste in der Nähe des aktiven Zentrums treten mit denen des Substrats in Wechselwirkung.

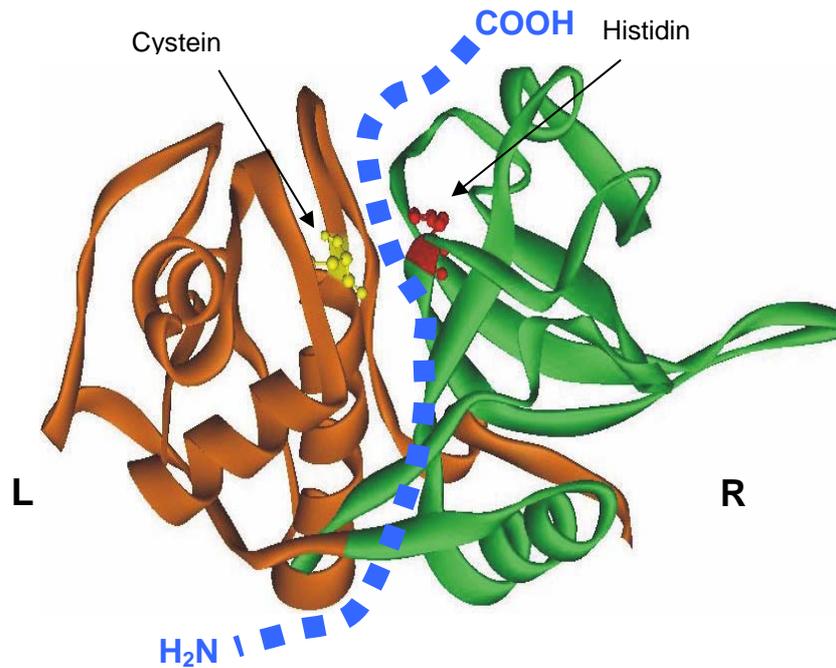


Abb. 1–1: Raumstruktur der Papain-ähnlichen Proteasen am Beispiel von Cathepsin L mit L-/R-Domäne, *active site cleft* und gebundenem Substrat (schematisch)^[14]

Dies kann durch Ausbildung von H-Brückenbindungen, elektrostatischen Wechselwirkungen oder hydrophoben Wechselwirkungen geschehen und bestimmt letztendlich die Substratspezifität des Enzyms.

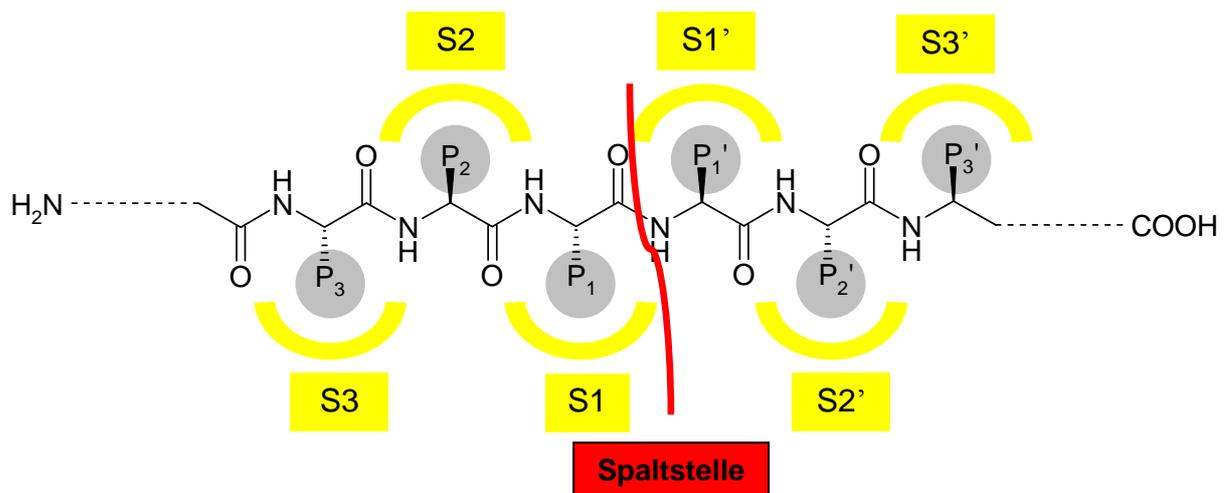
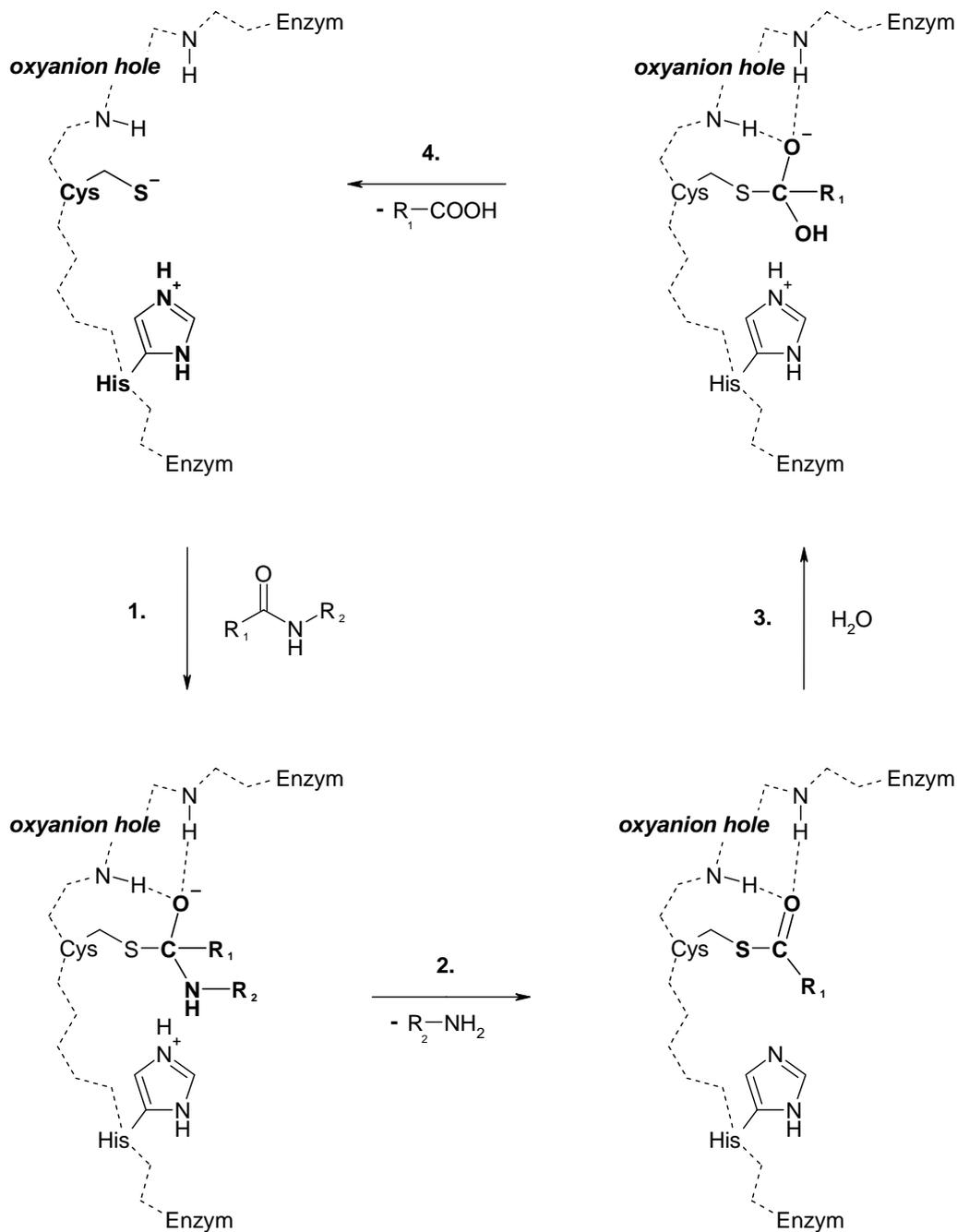


Abb. 1–2: Nomenklatur nach Schechter und Berger

Für diese Enzym-Substrat-Wechselwirkung wird üblicherweise die Nomenklatur von Schechter und Berger^[15] angewendet. Danach werden, beginnend an der Spaltstelle, die Bindungstaschen des Enzyms in Richtung des N-Terminus des Substrates mit S1-Sn, in

Richtung des C-Terminus mit S1'-Sn' bezeichnet. Analog dazu erhalten die Aminosäurereste des Substrates die Bezeichnungen P1-Pn bzw. P1'-Pn' (vgl. Abb. 1-2).



Schema 1-1: Katalytischer Mechanismus der Peptidspaltung durch Cystein-Proteasen der C1-Familie^[8]

Die Spaltung eines Substrates durch die Protease erfolgt in zwei Reaktionsschritten. Die Aminosäurereste des aktiven Zentrums (Cystein, Histidin) spielen dabei die maßgebliche Rolle. Sie können, je nach Art der Protease, schon präkatalytisch als Ionenpaar (Cys^-

/HisH⁺) oder neutral (Cys/His) vorliegen. Im ersten Schritt greift der Cystein-Schwefel das Carbonylkohlenstoffatom der zu spaltenden Amidbindung an. Es kommt dabei zur Ausbildung eines tetraedrischen Intermediates, dessen negative Ladung am ursprünglichen Carbonyl-Sauerstoff durch Wasserstoffbrückenbindungen zum Peptidrückgrat des Enzyms stabilisiert wird („Oxyanion hole“). Aus diesem spaltet sich nun das C-terminale Fragment des Substrates ab, es bildet sich als Zwischenprodukt der katalytischen Reaktion das acylierte Enzym in Form eines Thioesters. Im anschließenden zweiten Reaktionsschritt fungiert ein Wassermolekül als Nucleophil, das nun wiederum die Carbonylfunktion des Thioesters angreift. Im Zuge dieser zweiten Reaktion, die ebenfalls über ein tetraedrisches Intermediat verläuft, wird nun auch das N-terminale Substratfragment freigesetzt und das aktive Zentrum des Enzyms „regeneriert“. Schema 1–1 zeigt den allgemeinen Mechanismus der Protolyse-Reaktion der Papain-ähnlichen Proteasen (C1-Familie).

1.3 Schweres Akutes Atemwegssyndrom (SARS)

Ausgehend von einer Häufung zahlreicher Fälle von atypischer Lungenentzündung unter der Bevölkerung in der chinesischen Provinz Guangdong Ende 2002 breitete sich in den darauf folgenden Monaten eine neue Infektionskrankheit epidemieartig aus, die unter dem Namen SARS (= Severe Acute Respiratory Syndrome, Schweres Akutes Atemwegssyndrom) bekannt wurde. Durch die schnelle weltweite Verbreitung, vor allem über die Luftverkehrswege, wurden bis Mitte 2003 rund 8000 Fälle registriert, von denen ca. 10 % tödlich verliefen. Als Erreger von SARS konnte bereits wenige Wochen nach Ausrufung des Globalen Alarms durch die WHO das SARS-assoziierte Coronavirus (SARS-CoV) identifiziert werden.^[16,17] Kurz darauf folgte die Entschlüsselung des viralen Genoms des SARS-CoV,^[18] die den Grundstein für die Suche nach neuen Wirk- bzw. Impfstoffen legte.

1.3.1 Übertragung und Krankheitsverlauf

Untersuchungen haben ergeben, dass eine Übertragung des SARS-Virus von Tieren auf den Menschen und die anschließende Mensch-zu-Mensch-Übertragung die Ursache der SARS-Pandemie 2002/2003 darstellte. Als unmittelbarer Überträger gilt der Larvenroller (*Paguma larvata*) – eine in Südostasien verbreitete Art der Schleichkatzen – als wahrscheinlich. Auf zahlreichen Marktplätzen in der Provinz Guangdong konnte bei den dort gehaltenen Larvenrollern ein Virus mit hoher Ähnlichkeit zum SARS-Coronavirus nachgewiesen werden.^[19] Es zeigte sich auch, dass dieses Virus in den Larvenrollern mehrere

Wochen existent sein kann.^[20] Trotz der weiten Verbreitung des Virus unter den Larvenrollern werden diese als Ursprung von SARS jedoch ausgeschlossen. Grund dafür ist die Tatsache, dass die bei den Larvenrollern gefundenen Genom-Sequenzen der SARS-CoV-ähnlichen Viren zu mehr als 99.6 % übereinstimmen, was lediglich eine zeitlich kurze Verbreitung innerhalb dieser Spezies nahe legt.^[21] Vielmehr sind mittlerweile verschiedene Fledermausarten, vorwiegend die der Hufeisennasen (Gattung *Rhinolophus*), als natürliches Reservoir des Virus in der Diskussion. Fledermäuse sind als Wirte verschiedener Coronaviren bekannt und auch ein SARS-ähnliches Coronavirus (SL-CoV, „SARS-like coronavirus“) konnte bei den Hufeisennasen nachgewiesen werden, ohne dass die infizierten Tiere offensichtliche Krankheitsanzeichen aufwiesen.^[22,23] Dieses SL-CoV zeigte eine Genom-Übereinstimmung mit dem humanen SARS-CoV von 87-92%.^[21] Ob in der Infektionskette zwischen Fledermäusen und Larvenrollern noch weitere Spezies involviert sind, ist bis dato nicht geklärt. Es gilt jedoch als gesichert, dass zur Übertragung auf den Larvenroller und den Menschen eine genetische Veränderung des SL-CoV erfolgen muss, die zu Veränderungen am Spike-Protein des Virus führt und so ein Eindringen in humane Zellen erst ermöglicht.^[24]

Eine Infektion mit dem SARS-Coronavirus kann beim Menschen durch Tröpfcheninfektion oder durch direkten Kontakt mit erkrankten Patienten erfolgen. Klinisch äußert sich die SARS-Infektion als grippeähnliche Erkrankung beginnend mit Kopfschmerz, Fieber und Myalgien. In fortgeschrittenem Stadium kann sich daraus eine atypische Pneumonie entwickeln und bis zum Versagen der Atmung und zum Tode führen.^[24]

1.3.2 Virusreplikation und Enzymausstattung des SARS-CoV

Coronaviren (Familie *Coronaviridae*) sind einzelsträngige positiv-orientierte (ss+)-RNA-Viren mit einem Genomumfang von 20-30 Kilobasen, die vorwiegend Wirbeltiere (Hunde, Katzen, Rinder, Schweine, Nagetiere) infizieren und beim Menschen – mit Ausnahme von SARS – meist banale Infekte des Respirationstraktes verursachen. Serologisch werden sie in drei Gruppen mit zahlreichen Serotypen eingeteilt, von denen außer den drei humanen Coronaviren (HCoV-229E, HCoV-OC43, SARS-CoV) alle tierpathogen sind (vgl. Abb. 1–3). Der Name Coronavirus leitet sich von den Spike-Proteinen der Virionen ab, deren extrazellulärer Teil kranzförmig aus der Virushülle herausragt. Diese Glykoproteine dienen dem Virus zur Bindung an den zellulären Rezeptor und verleihen ihm ein charakteristisches elektronenmikroskopisches Bild.^[25]

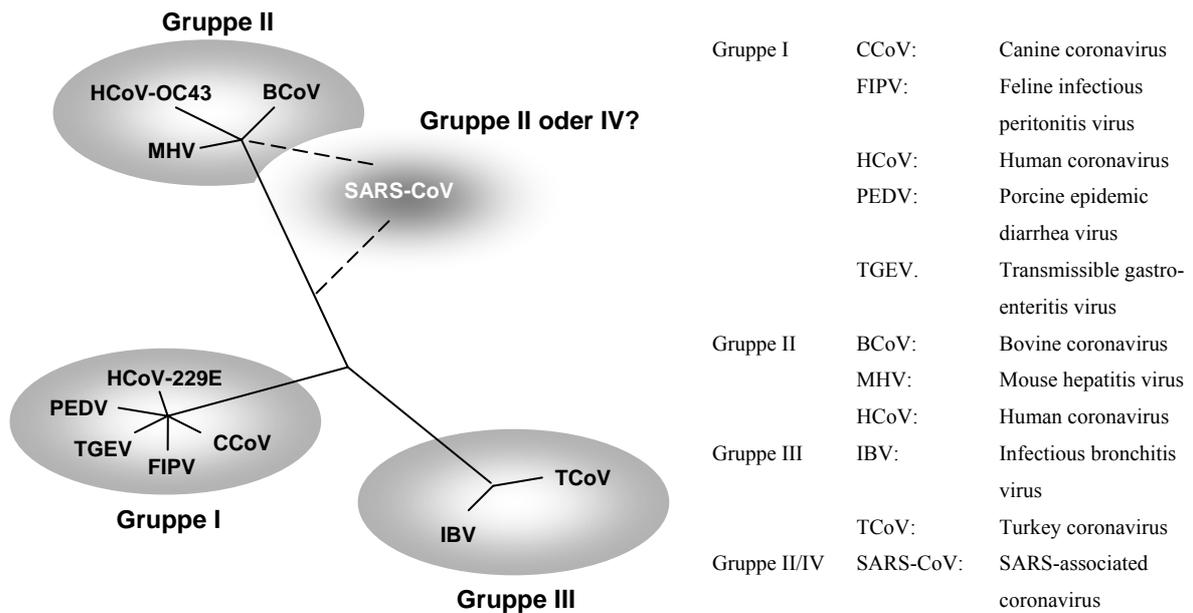


Abb. 1–3: Phylogenie der Coronaviren (in Anlehnung an Lit.^[26])

Die Zuordnung des SARS-CoV zu den Serogruppen der Coronaviren ist immer noch Gegenstand der Diskussion. Aufgrund seiner genetischen Verschiedenheit von den anderen Gruppen wurde es zunächst als erster Vertreter einer neuen vierten Serogruppe klassifiziert. Neuere Studien spezieller SARS-CoV-Gene haben jedoch eine Verwandtschaft mit der Serogruppe II erkennen lassen.^[27,28]

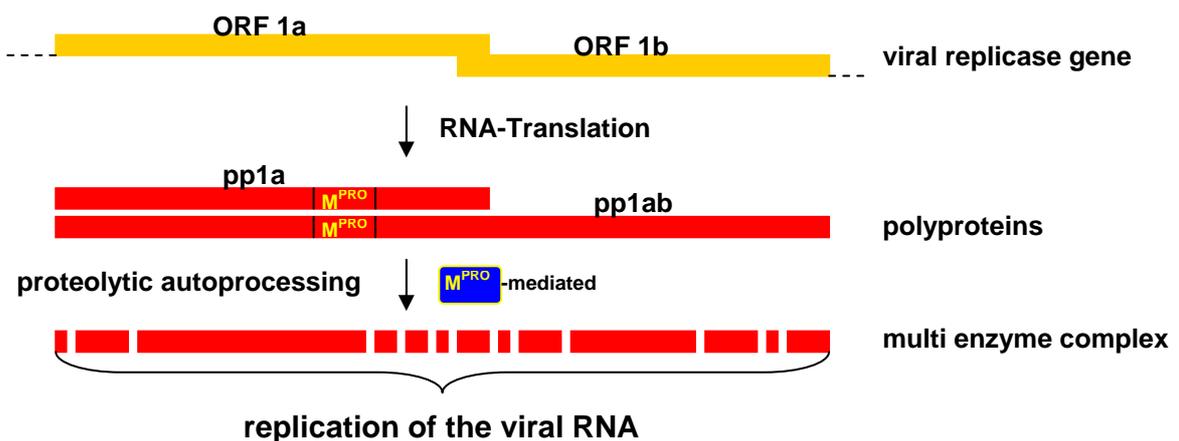


Abb. 1–4: Prozessierung des viralen Replikase-Gens im SARS-CoV

Das SARS-CoV besitzt ein Genom bestehend aus ca. 29700 Nucleotiden und zählt damit zu den Viren mit der umfangreichsten Erbinformation. Ca. 22000 Basen sind dem Replikase-Gen zugeordnet, das die zur Virusreplikation benötigten Enzyme (*non structural*

proteins, nsp) codiert. Die restlichen Gene tragen die Information für die Struktur- und sonstigen Proteine des Virus.^[29] Aufgrund der positiv-Orientierung der viralen RNA wird die Genominformation direkt abgelesen und in zwei Polyproteine (pp1a und pp1ab) translatiert. Durch die Spaltung dieser beiden Polyproteine werden alle zur Virusreplikation und zum Aufbau neuer Virionen notwendigen Proteine freigesetzt (vgl. Abb. 1–4). Eine ausführliche Beschreibung der strukturellen Eigenschaften des SARS-CoV ist in einer Arbeit von *Bartlam et al.* zu finden.^[30] Demnach werden die Polyproteine pp1a und pp1ab in insgesamt 28 Proteine aufgespalten. Darunter befinden sich 16 sogenannte *non structural proteins* (nsp), die für die Synthese der viralen RNA erforderlich sind, 4 Strukturproteine (Spike (S) protein, Envelope (E) protein, Membrane (M) protein, Nucleocapsid (N) protein), die als Strukturelemente zum Aufbau neuer Virusteilchen verwendet werden, sowie acht zusätzliche Proteine (accessory proteins), deren genaue Bedeutung bislang weitgehend ungeklärt ist. Für zwölf dieser Proteine sind die Strukturen in der *protein-data-base* (pdb) verfügbar und diese stellen somit einen Ausgangspunkt für die gezielte Intervention in den Prozess der Virusreplikation dar. Tab. 1–3 gibt eine Gesamtübersicht über die 28 Proteine des SARS-Coronavirus.

Protein*	Protein size (a. a.)	Putative functional assignment(s)	structure available
Structural proteins			
Spike (S) protein	1255	ACE2 recognition, viral entry into infected cells, major virion coat glycoprotein	yes (fusion core, receptor binding domain)
ORF3a	274	Minor structural protein	no
Envelope (E) protein	76	Structural protein, induces apoptosis in cells	no
Membran (M) protein	221	Viral structural glycoprotein	no
ORF7a	122	Integral membrane protein	yes (luminal domain)
Nucleocapsid (N) protein	422	Genomic RNA packaging	yes (N-terminal RNA binding domain, C-terminal domain)
Non structural proteins (nsp)			
nsp1	180		yes
nsp2	638		no
nsp3	1922	UBI, AC, ADRP, SUD, PL ^{pro} , TM1-4, Zn finger, Y	yes (Glu-rich, ADRP, PL ^{pro} domains)
nsp4	500	Transmembrane	no
nsp5	306	M ^{pro}	yes
nsp6	290	Transmembrane	no
nsp7	83	RNA primase	yes
nsp8	198		yes
nsp9	113	ssRNA binding	yes
nsp10	139	RNA binding	yes
nsp11	13		no
nsp12	932	RdRp	no
nsp13	601	Helicase	no
nsp14	527	3'→5' exonuclease	no

nsp15	346	Uridilate specific endonuclease	yes
nsp16	298	Putative methyltransferase	no
Accessory proteins			
ORF3b	154		no
ORF6	63		no
ORF7b	44		no
ORF8a	39		no
ORF8b	84		no
ORF9b	98	Lipid binding, putative membrane attachment	yes

* **fettgedruckt**: Struktur in der pdb verfügbar; ACE: angiotensin converting enzyme; UBI: ubiquitin-like; AC: acidic Glu-rich domain; ADRP: adenosine diphosphate-ribose 100-phosphatase; SUD: SARS-CoV unique domain; TM: transmembrane domain; PL^{pro}: papain-like protease; M^{pro}: main protease; RdRP: RNA-dependent RNA polymerase.

Tab. 1–3: Zusammenfassung der Proteine des SARS-CoV^[30]

Zwei dieser Enzyme sind dabei aufgrund ihrer zentralen Funktion in der Virusvermehrung in den Mittelpunkt der Forschung gerückt. Dies sind zum einen die SARS-Coronavirus Hauptprotease (main protease, M^{pro}, nsp5), die maßgeblich an der Proteolyse der viralen Polyproteine (pp1a, pp1ab) beteiligt ist, sowie die Papain-ähnliche Protease des SARS-Coronavirus (papain-like protease, PL^{pro}, nsp3), die neben der Polyprotein-Hydrolyse auch deubiquitinierende Eigenschaften besitzt.

1.3.3 Charakterisierung der SARS-CoV-Hauptprotease (M^{pro})

Die SARS-CoV-M^{pro} ist eine ca. 33 kDa große Cystein-Protease bestehend aus 306 Aminosäuren, die in der aktiven Form als Homodimer vorliegt.^[31,32,33] Innerhalb eines Protomers lassen sich drei Domänen (I-III) unterscheiden. Die Domänen I und II besitzen – wie andere coronavirale chymotrypsin-ähnliche Proteasen auch – eine antiparallele β -Faltblatt-Struktur. Das aktive Zentrum ist in einer Spalte zwischen den Domänen I und II lokalisiert. Domäne III besteht aus fünf α -Helix-Einheiten, die in einem kugelförmigen Cluster angeordnet sind. Aufgrund der Wechselwirkung der Domäne III mit dem zweiten Protomer wird ihr eine besondere Bedeutung bei der Dimer-Bildung zugeschrieben.^[34]

In der MEROPS-Systematik ist die SARS-CoV-M^{pro} zusammen mit anderen Proteasen positivsträngiger RNA-Viren in der Familie C30 (Clan PA(C)) zusammengefasst. Die MEROPS-Klassifizierung der SARS-CoV-M^{pro} im gemischten Clan PA geht auf die strukturelle Verwandtschaft mit der Serin-Protease Chymotrypsin (Stammprotease des Clans PA) zurück. Es liegt nahe, dass sich beide Proteasen von einem gemeinsamen Urtyp aus entwickelt haben und die katalytische Aktivität trotz eines Austausches von Serin durch Cystein im aktiven Zentrum erhalten blieb.

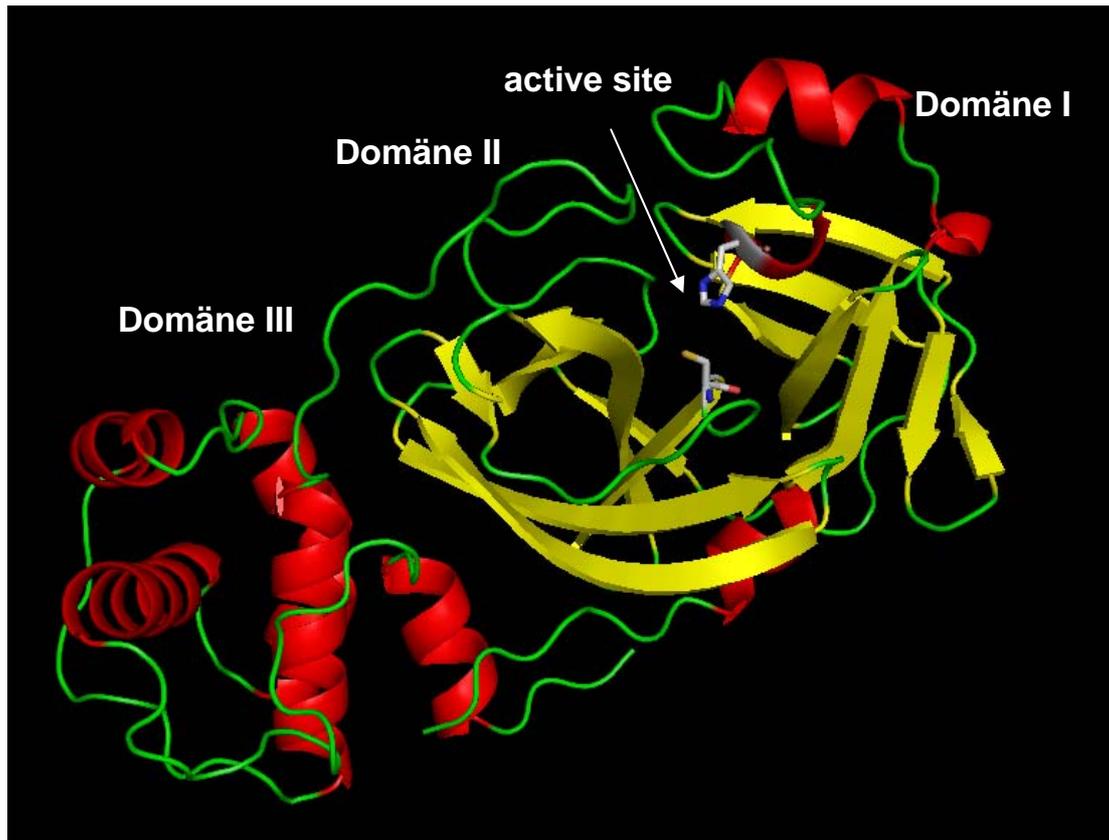


Abb. 1–5: Struktur des SARS-CoV-M^{pro} Monomers (pdb-code 2AMQ, generiert mit PyMOL^{©[35]})

Dies, sowie die Ähnlichkeit der SARS-CoV-M^{pro} mit den seit längerer Zeit bekannten 3C-Proteasen der *Picornaviridae* (Familie C3), ist der Grund für die Synonyme „Chymotrypsin-like protease“ oder „3C-like-protease“ (3CL^{pro}), die in der Literatur ebenfalls für die SARS-CoV-M^{pro} verwendet werden. Im Gegensatz zu den 3C-Proteasen anderer RNA-Viren, bei denen die Proteolyse des Substrats über die katalytische Triade Cys-His-Asp(Glu) verläuft, besitzt die SARS-CoV-M^{pro} jedoch lediglich eine katalytische Diade Cys(145)-His(41).^[36] Hauptaufgabe der SARS-CoV-M^{pro} ist die Proteolyse des von der viralen RNA codierten Polyproteins. Diese Funktion ist für die Hauptproteasen der Coronaviren, die anstelle von zellulären Proteinen vorwiegend eigenes Enzymmaterial zur Replikation nutzen, bereits bekannt und hochkonserviert.^[37,38] Die M^{pro} spaltet das virale Replikase-Polyprotein an insgesamt 11 Stellen und setzt dabei alle wichtigen Proteine zur Virusreplikation frei. Der erste Schritt ist dabei zunächst die autokatalytische Abspaltung der M^{pro} selbst. Die bevorzugte Spaltstelle der M^{pro} am Peptid ist die Aminosäuresequenz Leu-Gln↓(Ser,Ala,Gly).^[32,39] Ihre zentrale Rolle bei der Virusreplikation, die gute Kenntnis ihrer Struktur durch zahlreiche bekannte Kristallstrukturen sowie die Tatsache, dass ein analoges Enzym im humanen Zellapparat nicht vorhanden ist, machen die M^{pro} zu einem

herausragenden Target für die Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen SARS bzw. andere coronavirale Infektionen.

1.3.4 Charakterisierung der SARS-Coronavirus Papain-like-Protease (PL^{pro})

Neben der SARS-CoV-M^{pro} ist noch eine weitere Protease an der Spaltung des viralen Polyproteins beteiligt. Sie wird aufgrund ihrer Papain-ähnlichen Struktur als „Papain-like protease“ (SARS-CoV-PL^{pro}) bezeichnet. Genetisch ist sie nach der Spaltung des Polyproteins pp1a bzw. pp1ab innerhalb einer Domäne des freigesetzten *non structural proteins* 3 (nsp3) lokalisiert, das außerdem noch eine Phosphatase, eine transmembrane Domäne, eine „saure Domäne“ (acidic domain) sowie eine Y-Domäne mit bislang unbekannter Funktion enthält.^[28,40,41] Die SARS-CoV-PL^{pro} spaltet das virale Polyprotein an drei Stellen, wodurch die *non structural proteins* nsp1-3 freigesetzt werden. Als bevorzugte Aminosäuresequenz an der Spaltstelle wurde LXGG↓(A,K) identifiziert. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die SARS-CoV-PL^{pro} neben ihrer proteolytischen Funktion auch noch deubiquitinierende Eigenschaften besitzt. Inwieweit diese für die Virusreplikation von Bedeutung sind, ist derzeit noch Gegenstand der Forschung.

Die Kristallstruktur der SARS-CoV-PL^{pro} wurde im Jahr 2006 von *Ratia et al.* gelöst.^[42] Demnach besteht die PL^{pro} aus vier verschiedenen Domänen, von denen sich drei – in Analogie zur Architektur einer menschlichen rechten Hand – als Daumen-, Handflächen- und Fingerregion beschreiben lassen. Anhängend an die „Daumen“-Region bildet eine vierte, Ubiquitin-ähnliche Domäne (UB-like, UBI) bestehend aus 62 Aminosäuren den N-Terminus des Enzyms. In der „Finger“-Region sorgt eine spezielle Anordnung von Cystein-Resten für ein Zink-bindendes Motiv in der PL^{pro}, was zum Erhalt sowohl der Struktur als auch der proteolytischen Aktivität des Enzyms essentiell ist.^[10] Die Struktur zeigt auch die Existenz der katalytischen Triade Cys-His-Asp im aktiven Zentrum der Protease.

1.4 Proteasen des SARS-CoV als Targets für Inhibitoren

Bei der Suche nach antiviralen Wirkstoffen gegen das SARS-Coronavirus sind die hauptsächlich an der Replikation beteiligten Proteine SARS-CoV-M^{pro} und SARS-CoV-PL^{pro} schon früh in den Fokus des Forschungsinteresses gerückt. Besonders die SARS-CoV-M^{pro} wurde vielfach als Target für die Entwicklung neuer Protease-Inhibitoren ausgewählt. Ihre essentielle Funktion bei der Virus-Replikation und das Fehlen vergleichbarer

Enzyme im menschlichen Organismus sind maßgebliche Gründe dafür. Zudem hat bereits die frühe Kenntnis der Kristallstruktur der SARS-CoV-M^{pro} und die damit verbundene Anwendung des „Virtual Screenings“ (VS) ein schnelles computergestütztes Screenen großer Substanzbibliotheken ermöglicht. Im Folgenden wird eine kurze Übersicht über ausgewählte Verbindungen gegeben, die bis dato als Inhibitoren der SARS-CoV-M^{pro} bzw. SARS-CoV-PL^{pro} identifiziert werden konnten.

1.4.1 Bekannte Inhibitoren der SARS-CoV-M^{pro}

Eine weit verbreitete Strategie zum Design neuer Protease-Inhibitoren ist die Entwicklung peptidischer bzw. peptidomimetischer Verbindungen. Diese setzen sich meist aus einem Oligopeptid und einer reaktiven Kopfgruppe (*warhead*) zusammen. Strukturell entspricht der peptidische Teil dem natürlichen Substrat des Enzyms und sorgt damit für die notwendige Affinität zur Bildung eines Assoziationskomplexes mit dem Enzym. Die reaktive Kopfgruppe, die in der Regel eine Bindungstasche am aktiven Zentrum (S1 bzw. S1') adressiert, sollte zur Reaktion mit dem katalytisch aktiven Aminosäurerest im aktiven Zentrum der Protease in der Lage sein und sie auf diesem Wege durch Ausbildung einer kovalenten Bindung deaktivieren. Typische Strukturfragmente, die als *warheads* in Protease-Inhibitoren genutzt werden, sind Halomethylketone, Diazoverbindungen, Epoxide, Aziridine oder Michael-Akzeptoren.^[4,43]

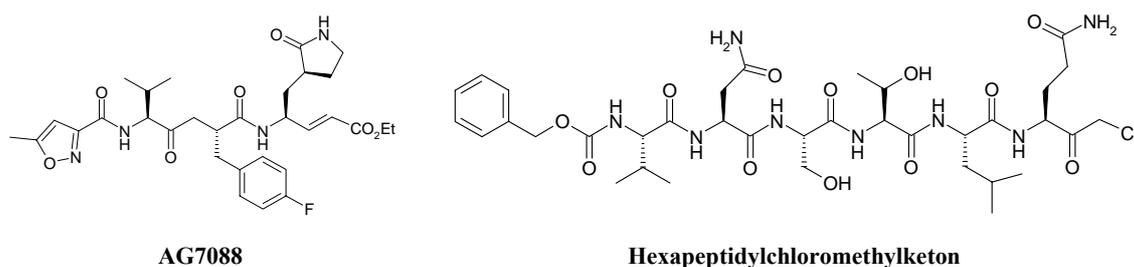
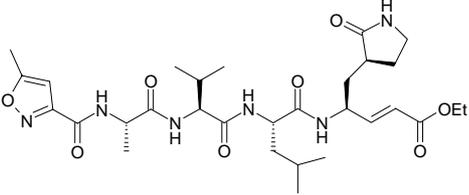
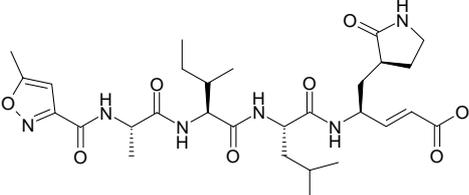
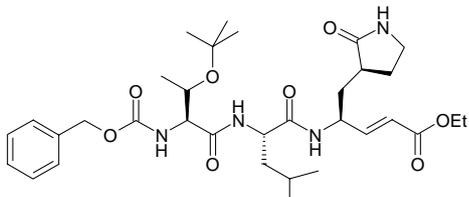
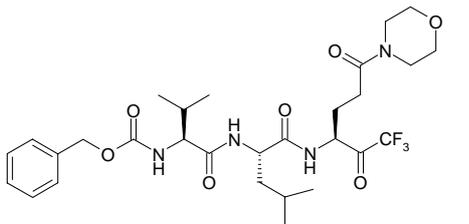


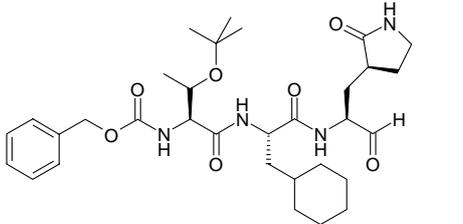
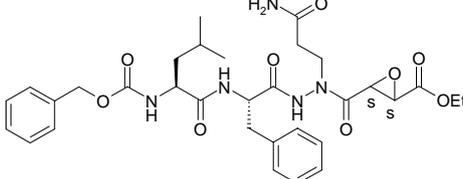
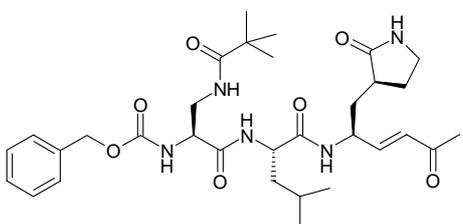
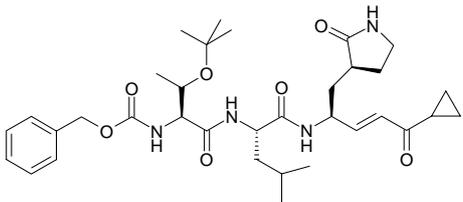
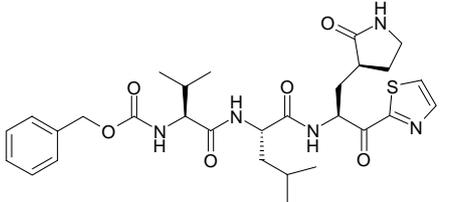
Abb. 1–6: Struktur von AG7088 (Ruprintrivir, links) und des Hexapeptidylchloromethylketons (rechts)

Die ersten Entwicklungen von Inhibitoren der SARS-CoV-M^{pro} waren ebenfalls auf diesem Konzept begründet. Aus einem Homologie-Modell zur TGEV-M^{pro} und zur 3C-Protease des humanen Rhinovirus (HRV) wurden zunächst ein Substrat-analoges Hexapeptidylchloromethylketon (CMK) bzw. der Wirkstoff AG7088 (Ruprintrivir) – ein pep-

tidischer Vinylester und bekannter HRV-3C^{pro}-Inhibitor – als Leitstrukturen vorgeschlagen.^[32,44]

AG7088 selbst bewirkt keine Hemmung der SARS-CoV-M^{pro},^[45] jedoch wurden durch Variation der Peptidkette sowie der Kopfgruppe einige aktive Substanzen gefunden. Charakteristisch für diese Substanzklasse ist die Imitation des P2-P1-Motivs Leu-Gln, das in allen aktiven Verbindungen fast unverändert bleibt. Als *warheads* wurden neben Vinylestern (vgl. Tab. 1–4, Eintrag #1-3) und Halogenmethylketonen (#4) auch Aldehyde (#5), Epoxide (#6) sowie weitere Carbonylderivate (#7-9) eingesetzt. Inhibitoren dieses Typs mit K_i -Werten im submikromolaren Bereich sind jedoch erst seit jüngster Zeit bekannt (#3,5,7,8).

Struktur	K_i [μM]	k_i [10^{-3} s^{-1}]	$k_{2\text{nd}}$ [$\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$]	Lit
	10.7	4.1	—	Yang et al. 2005 ^[46]
	3.1	61.3	27000	Xue et al. 2008 ^[47]
	0.058*	—	—	Lee et al. 2009 ^[48]
	21.0	—	—	Regnier et al. 2009 ^[49]

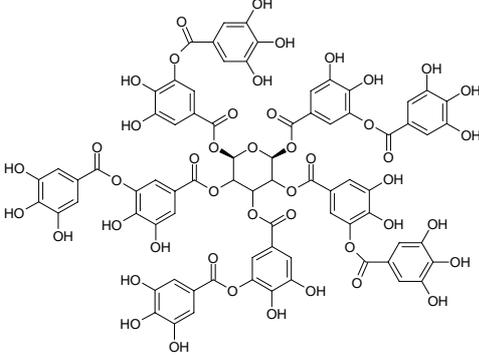
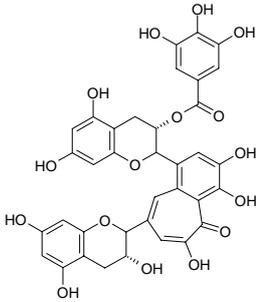
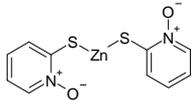
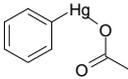
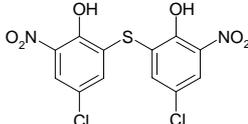
#5		0.054*	—	—	<i>Lee et al.</i> 2009 ^[48]
#6		18	35	1900	<i>Lee et al.</i> 2005 ^[50]
#7		0.038*	—	—	<i>Lee et al.</i> 2009 ^[48]
#8		0.099*	—	—	<i>Lee et al.</i> 2009 ^[48]
#9		2.20	—	—	<i>Regnier et al.</i> 2009 ^[49]

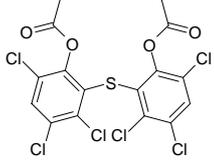
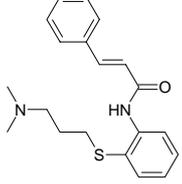
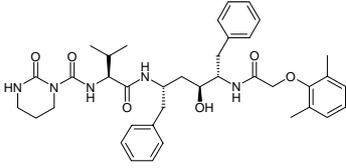
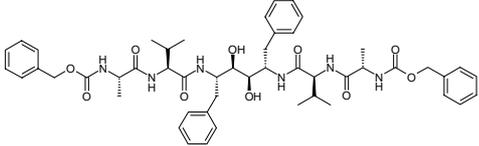
* Assay mit 20 min Präinkubation des Enzyms

Tab. 1–4: Ausgewählte peptidomimetische Inhibitoren der SARS-CoV-M^{pro}

Eine weitere Möglichkeit, eine relativ große Zahl an Substanzen auf Aktivität gegen ein bestimmtes Target zu prüfen, ist das Screening bereits vorhandener Substanzbibliotheken. Diese Bibliotheken können eine beliebige Zahl an bekannten Wirkstoffen, Wirkstoffgruppen oder Naturstoffen in der Größenordnung von einigen hundert bis zu tausenden enthalten. Die automatisierte Vorgehensweise sowie der Rückgriff auf bereits bekannte Verbindungen macht die zeitlich aufwändige Synthese neuer Wirkstoffe überflüssig und kann schon in relativ kurzer Zeit aktive Substanzen liefern. Aus der Literatur sind

dabei neben Polyphenolen (aus Teeinhaltsstoffen, #10,11) sowie Metall-Konjugaten (#12,13) und Hexachlorophen-Analoga (#14,15), deren antimikrobielle Wirkung bereits pharmazeutisch genutzt wird, auch einige bereits anderweitig eingesetzte Wirkstoffe als SARS-CoV-M^{pro}-Inhibitoren bekannt. So wurde im Jahr 2005 von *Chen et al.* über den bereits seit den sechziger Jahren eingesetzten Serotonin-Inhibitor Cinanserin (#16) als Inhibitor der SARS-CoV-M^{pro} berichtet (vgl. 2.4 und 3.1.5, Cinanserin-Derivate). Ebenso zeigte der Wirkstoff Lopinavir (#17) – ein bereits zugelassener HIV-Protease-Hemmstoff (Kaletra[®]) – sowie ein weiterer bekannter peptidischer HIV-Protease-Inhibitor (#18) eine Hemmung der SARS-CoV-M^{pro}. Tab. 1–5 gibt eine Übersicht über die publizierten Hemm-
daten dieser Verbindungen.

Forts.	Struktur	IC ₅₀ [μM]	K _i [μM]	Lit
#10		3	–	<i>Chen, Lin et al. 2005</i> ^[51]
#11		7	–	<i>Chen, Lin et al. 2005</i> ^[51]
#12		0.8 ^a	0.17 ^b	^a <i>Kuo et al. 2004</i> ^[52] ^b <i>Hsu et al. 2004</i> ^[53]
#13		–	0.7	<i>Hsu et al. 2004</i> ^[53]
#14		9.2	–	<i>Liu et al. 2005</i> ^[54]

#15		7.6	—	<i>Liu et al. 2005</i> ^[54]
#16		5	—	<i>Chen, Gui et al. 2005</i> ^[55]
#17		—	14	<i>Wu et al. 2004</i> ^[56]
#18		—	0.6	<i>Wu et al. 2004</i> ^[56]

Tab. 1–5: Screening-Hits als Inhibitoren der SARS-CoV-M^{pro}

Eine zusätzliche Schwierigkeit bei der Evaluierung von Inhibitoren ist die Vergleichbarkeit der erhaltenen Hemmdaten. Generell ist dabei die Angabe von IC₅₀-Werten als problematisch zu erachten, da diese von den jeweiligen Assaybedingungen abhängig sind. Vielmehr sollte zur Angabe des Inhibitorpotentials den Hemmkonstanten K_i , k_i oder k_{2nd} der Vorzug gegeben werden. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass der K_i -Wert ausschließlich die reversible Bindung des Inhibitors an das Enzym ausdrückt und für kovalent bindende Inhibitoren nicht aussagefähig ist, da sich u. a. für unterschiedliche Inkubationszeiten mit dem Enzym unterschiedliche K_i -Werte ergeben. Daher ist es bei Inhibitoren, die aufgrund Ihrer Struktur einen irreversiblen Mechanismus vermuten lassen (vgl. Eintrag #3,7,8) unerlässlich, den Mechanismus der Enzymhemmung durch weitere Untersuchungen aufzuklären, um auf diese Weise eine verlässliche Angabe der publizierten Daten zu gewährleisten.^[57]

1.4.2 Bekannte Inhibitoren der SARS-CoV-PL^{pro}

Im Gegensatz zur SARS-CoV-M^{pro} sind für die Papain-like Protease (SARS-CoV-PL^{pro}) bisher nur wenige Inhibitoren bekannt. Maßgeblicher Grund dafür ist die fehlende

Information über die Enzymstruktur. Anders als im Fall der M^{pro}, wo durch Homologie-Modelle bekannter coronaviraler Hauptproteasen in kurzer Zeit eine Basis für das Inhibitor-Design geschaffen werden konnte, war bis zur Lösung der Kristallstruktur der SARS-CoV-PL^{pro} im Jahr 2006 durch *Ratia et al.*^[42] keine Struktur einer coronaviralen PL^{pro} bekannt. Bis dato konnte daher nur eine Reihe von Mercaptopurinen^[58] und Naphthyl-derivaten^[59] als Inhibitoren der SARS-CoV-PL^{pro} identifiziert werden.

1.4.3 Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

Eine weit verbreitete Technik zur Messung der Protease-Aktivität und zur Evaluierung von Protease-Inhibitoren sind sog. „FRET“-Assays. Bei **FRET** (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) handelt es sich um einen strahlungslosen Energieübertragungsprozess zwischen zwei unterschiedlichen Molekülspezies, die beide zur Fluoreszenz befähigt sind.^[60] Eine Molekülspezies fungiert dabei als Fluoreszenz-Donor, die ihre Anregungsenergie auf die zweite Spezies (den Fluoreszenz-Akzeptor) überträgt. Dazu müssen zwei Voraussetzungen gegeben sein: Das Emissionsspektrum des Donors muss mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen und Donor und Akzeptor müssen sich in räumlicher Nähe (wenige Nanometer) zueinander befinden. Findet bei einem geeigneten Donor-Akzeptor-Paar FRET statt, d. h. Donor und Akzeptor befinden sich in räumlicher Nähe und die Anregungsenergie des Donors wird auf den Akzeptor übertragen, so lässt sich nach außen hin keine oder nur geringe Fluoreszenzemission des Donors detektieren. Diese wird erst messbar, wenn sich Donor und Akzeptor soweit voneinander entfernen, dass die strahlungslose Energieübertragung nicht mehr stattfinden kann.

Dieses Phänomen wird beim FRET-Assay für verschiedene Proteasen, u. a. auch für die SARS-CoV-M^{pro}, genutzt. Dazu wird das Substrat der Protease mit einem geeigneten Donor-Akzeptor-Paar so modifiziert, dass die Spaltstelle des Enzyms zwischen dem Chromophorenpaar liegt. Innerhalb dieses Abstandes, der in der Regel ca. 8-11 Aminosäurereste beträgt, findet im intakten Substrat FRET statt. Wird das Substrat vom Enzym gespalten, so entfernen sich Donor- und Akzeptor-Fragment voneinander, der Energietransfer kann nicht mehr stattfinden. Stattdessen ist eine Zunahme der Donor-Emission zu beobachten. Diese kann als Maß für die Aktivität der Protease und die inhibitorische Wirkung von Hemmstoffen herangezogen werden.

FRET-Assays eignen sich besonders für Enzyme, die – ähnlich wie die SARS-CoV-M^{pro} – aufgrund ihrer Substratspezifität an Position P1' keine großen Chromophor-Moleküle akzeptieren und daher für einfache fluorimetrische Enzym-Assays nicht zugänglich

sind. Im Zuge der Entwicklung von SARS-CoV-M^{pro}-Inhibitoren sind neben dem seit längerem bekannten FRET-Paar DABCYL/EDANS eine Reihe weiterer FRET-Substrate verfügbar geworden.

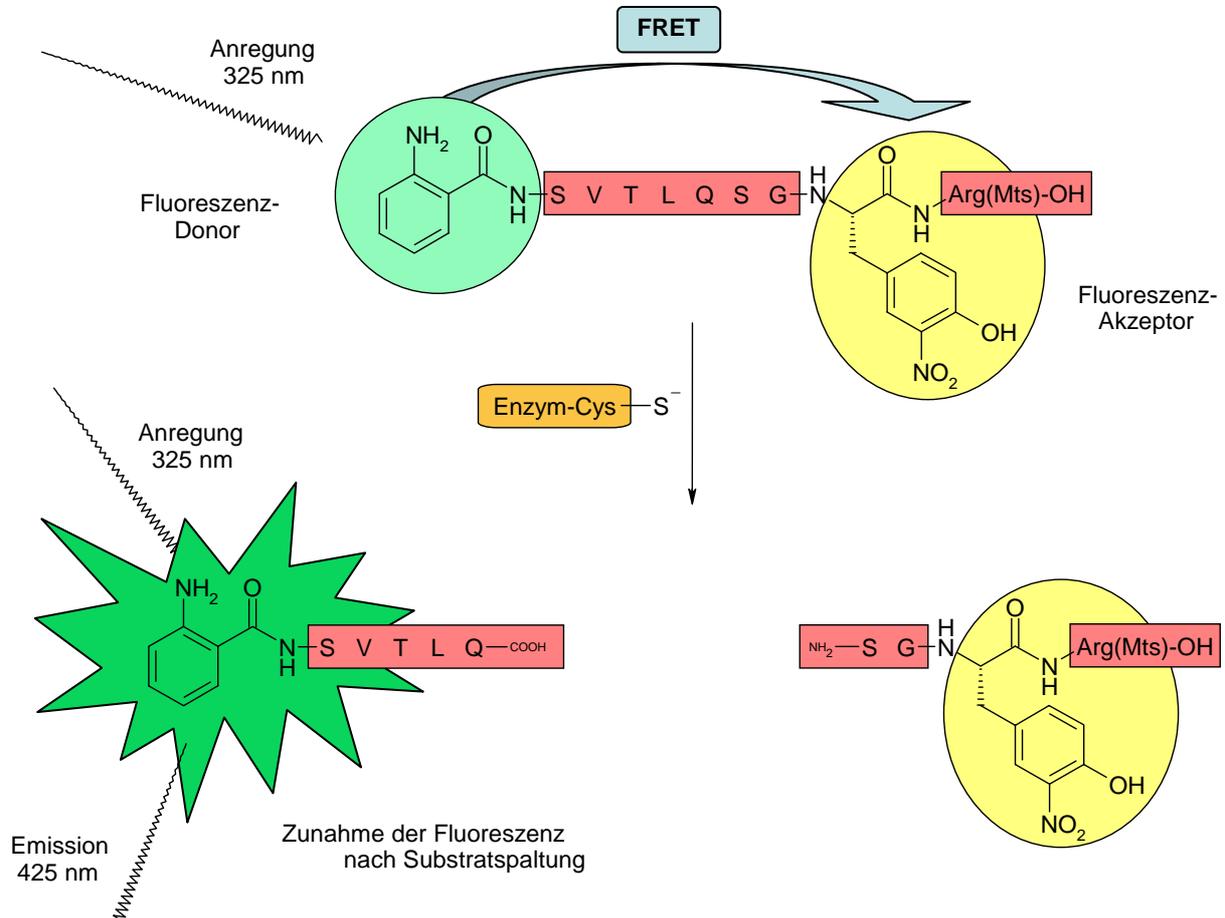
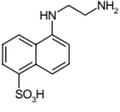
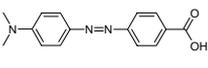
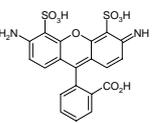
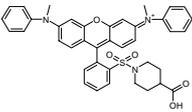
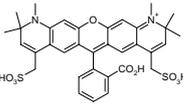
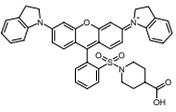
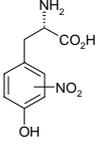
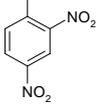
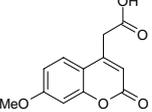
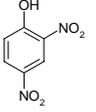


Abb. 1–7: Schema des FRET-Prozesses am Beispiel eines Abz/Tyr(NO₂)-markierten Substrates

Bei den Abz/Tyr(NO₂) bzw. Abz/ Dnp-Paaren (Abz: 2-Aminobenzoesäure, Dnp: 2,4-Dinitrophenol) ist ein Einbau der Chromophore direkt in das Peptidrückgrat möglich, was die Substratsynthese erheblich vereinfacht. Zudem erschließen neue FRET-Paare wie AlexaFluor 488/ QSY 7 und AlexaFluor 594/ QSY21 neue Wellenlängenbereiche zur Anregung und Detektion, was die Anwendungsbreite der FRET-Substrate zusätzlich vergrößert. Tab. 1–6 gibt eine Übersicht über FRET-Paare und FRET-Substrate, die bereits für Enzym-Assays an der SARS-CoV-M^{pro} etabliert sind.

Trotz des einfachen und schnellen Messverfahrens, das die FRET-Assays ermöglichen, sind dennoch einige Effekte zu beachten, um falsch-positive Screening-Ergebnisse zu vermeiden. Zur Auswertung der FRET-Assays wird die Zunahme der Fluoreszenz durch Spaltung eines fluorogenen Substrats durch ein proteolytisches Enzym gemessen. Eine

Verminderung der Fluoreszenzzunahme in Gegenwart eines Inhibitors kann mit einer Hemmung der Enzymaktivität korreliert werden.

Donor	Akzeptor	$\lambda(\text{Ex})/$ $\lambda(\text{Em})$	P7 P6 P5 P4 P3 P2 P1	P1'P2'P3'P4'P5'P6'P7'	Lit
EDANS 	DABCYL 	330-360 nm/ 490-538 nm	E* S A T L Q K# T S A V L Q L# A Q V* N S T L Q S# A V L Q	S G L A K# S S G F R K M E* A V R S S S R* S G L R K# M S G L A K*	Grum-Tokars, 2008 ^[61] Chen, 2005 ^[51] Bacha, 2004 ^[62] Chen, 2005 ^[55] Kao, 2004 ^[63]
AlexaFluor 488 	QSY 7 	490 nm/ 535 nm	C* E S A T L Q	S G L A K#	Grum-Tokars, 2008 ^[61]
AlexaFluor 594 	QSY 21 	595 nm/ 629 nm	C* E S A T L Q	S G L A K#	Grum-Tokars, 2008 ^[61]
Abz 	Nitrotyrosin 	320-340 nm/ 400-440 nm	S* V T L Q	S G Y# R	Blanchard, 2004 ^[64] Käppler, 2005 ^[65]
Abz 	Dnp 	320-362 nm/ 420-425 nm	S* A V L Q T* S A V L Q S* G V T F Q	S G F R K# S G F R K# G K F K K#	Liu, 2005 ^[54] Chou, 2004 ^[34] Kuang, 2005 ^[66]
MCA 	Dnp 	320 nm/ 405 nm	A* V L Q	S G F K# K	Yang, 2005 ^[46]

* Bindungsstelle des FRET-Donors # Bindungsstelle des FRET-Akzeptors

Tab. 1–6: FRET-Donor-Akzeptor-Paare, die für fluorimetrische Assays an der SARS-CoV-M^{pro} verwendet werden.

Zusätzlich müssen jedoch weitere Effekte ausgeschlossen werden, die ebenfalls eine Verminderung der Fluoreszenzzunahme bewirken können, jedoch nicht mit einer Enzymhemmung zusammenhängen. Dazu gehören die Absorption der emittierten Fluoreszenzstrahlung durch den Inhibitor selbst und der Innere Filter Effekt, der bei der K_m -Wert-

Bestimmung des FRET-Substrates selbst zu berücksichtigen ist (vgl. Kap. 3.1.3, Biochemische Methoden).^[57,67]

1.4.4 Etacrynsäure als Leitstruktur für Inhibitoren von Cystein-Proteasen

Wie bereits oben erläutert, eignen sich Michael-Akzeptoren als *warhead* zum Design von Serin- oder Cystein-Protease-Inhibitoren. Dieses elektrophile Strukturelement in Form einer α,β -ungesättigten Carbonyl- oder Sulfonylverbindung (z. B. Vinylketone, -ester, -amide oder Vinylsulfone) bietet die Möglichkeit zur kovalenten Bindung mit dem katalytisch aktiven Aminosäurerest des Enzyms.

Eine seit Jahren bekannte Verbindung, die diese Struktureinheit besitzt, ist die Etacrynsäure (vgl. Abb. 1–8). Sie wurde lange Zeit als diuretisches Arzneimittel eingesetzt, welches nach Bildung eines Cystein-Konjugats als Hemmstoff eines $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Transporters agiert und so die Rück-Resorption dieser Ionen in der Niere verhindert.^[68] Weiterhin ist bekannt, dass Etacrynsäure auch zur Bildung von Glutathion-Addukten in der Lage ist und sowohl als Substrat als auch als Inhibitor der Glutathion-S-Transferase fungieren kann.^[69,70]

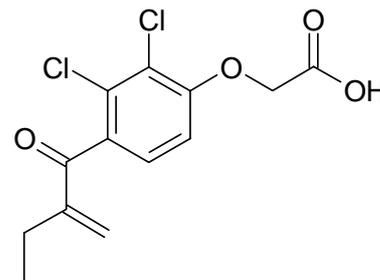


Abb. 1–8: Etacrynsäure

Frühere Arbeiten in der Arbeitsgruppe Schirmeister zeigten, dass Etacrynsäure-Derivate auch verschiedene Cystein-Proteasen inhibieren können.^[71] Dabei wurden insbesondere für die Amid-Derivate Hemmkonstanten im niederen mikromolaren Bereich gefunden. Einige dieser Amide wurden auch an der SARS-CoV-M^{pro} getestet. Dabei stellten sich das Etacrynsäure-*tert*-butylamid und das Etacrynsäure- β -methylalanylamid mit einem K_i -Wert von 46 bzw. 35 μM als die aktivsten Verbindungen heraus. Zusätzlich besitzen beide Verbindungen auch antivirale Aktivität gegen das SARS-CoV^[72] und andere Coronaviren.^[73]

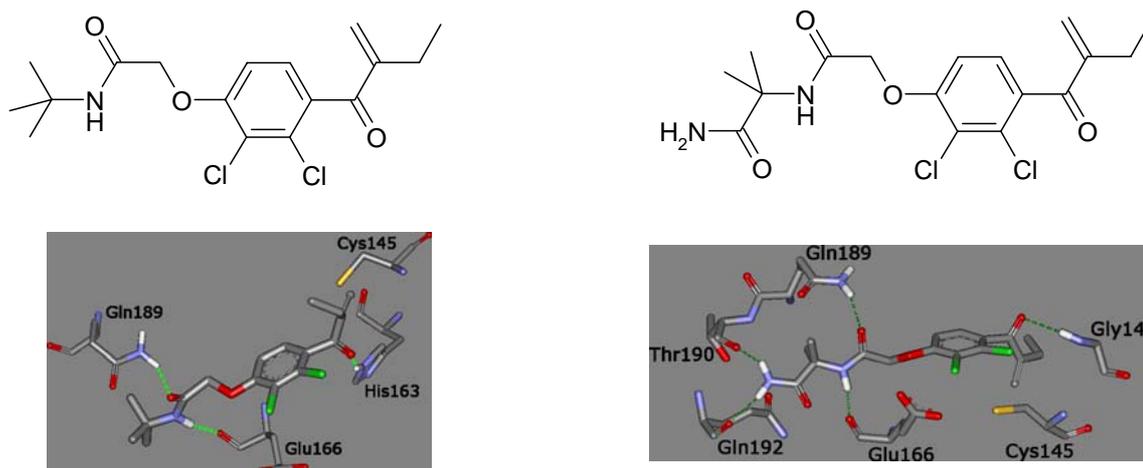


Abb. 1–9: Dockingstudien von Etacrynsäureamiden an der SARS-CoV-M^{pro}

Docking-Studien dieser Inhibitoren an der SARS-CoV-M^{pro} untermauern diese Ergebnisse.^[65] Sie zeigen neben der räumlichen Nähe des Michael-Systems zum *active-site*-Cys145 auch die Ausbildung diverser Wasserstoffbrückenbindungen der Amid-Funktionalität des Inhibitors zu den umliegenden Aminosäureresten in der Nähe des aktiven Zentrums. Diese tragen zusätzlich zur Stabilisierung des Enzym-Inhibitor-Komplexes bei (vgl. Abb. 1–9).

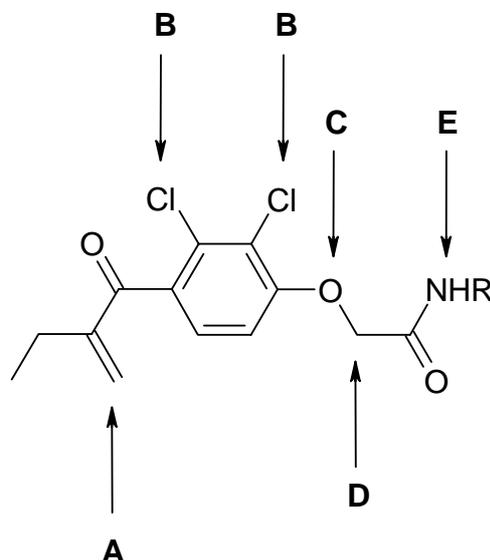
1.5 Zielsetzung der Arbeit

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist sowohl die Synthese neuer Verbindungen als Inhibitoren von Cystein-Proteasen anhand bekannter Leitstrukturen sowie die Testung der synthetisierten Verbindungen an Cystein-Proteasen und pathogenen Organismen. Zusätzlich sollen an ausgewählten Verbindungen mit Michael-Systemen Reaktivitätsstudien durchgeführt werden

Synthese

Aufbauend auf den bereits vorhandenen Kenntnissen zum inhibitorischen Potential der Etacrynsäure und ihrer Derivate an Cystein-Proteasen, ist das primäre Ziel dieser Arbeit die Synthese neuer Etacrynsäure-Derivate als Inhibitoren der SARS-CoV-M^{pro}. Dies umfasst zunächst die Synthese eines geeigneten FRET-markierten Oligopeptides als Substrat zur Etablierung eines fluorimetrischen Enzym-Assays sowie zur Evaluierung der synthetisierten Inhibitoren. Dieses soll mittels automatisierter Festphasensynthese verwirklicht werden.

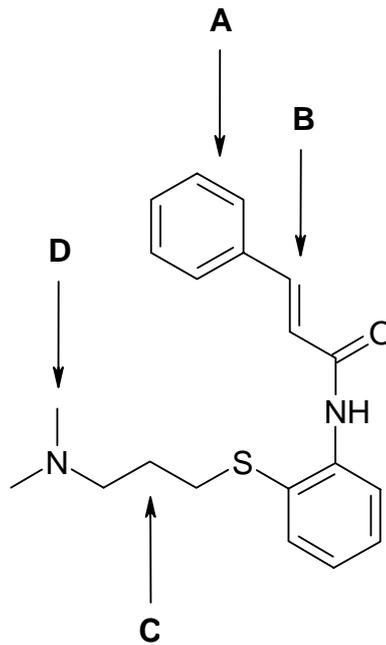
Zur Synthese der Inhibitoren soll die Etacrynsäure-Leitstruktur wie folgt variiert werden:



- **A:** Variation der Seitenkette: Synthese von Michael-Systemen mit unterschiedlicher Konfiguration (*exo/endo*) oder Konformation (*s-cis/s-trans*)
- **B:** Variation des Substitutionsmusters am aromatischen Ring: Synthese von Fluor- und Bromderivaten
- **C:** Heteroatomaustausch: Synthese von Thio-Analoga
- **D:** Variation der Acetylkette zum Carbonsäurefragment: Darstellung von Propionyl- bzw. Butyryl-Analoga
- **E:** Variation der Amidfunktion: Darstellung verschiedener Amid-Derivate

Eine weitere Aufgabenstellung ist die Synthese markierter Etacrynsäurederivate. Die Markierung soll zum einen durch H/D-Austausch sowie durch die Einführung einer Biotin-Einheit erzielt werden. Ziel der Markierung ist die Wirkstoffdetektion in biologischen Systemen durch CARS-Experimente bzw. Biotin/Streptavidin-Assays.

Ausgangspunkt eines zweiten Syntheseprojekts ist die Leitstruktur des bekannten Wirkstoffs Cinanserin. Hier sollen ebenfalls durch Strukturvariationen die inhibitorischen Eigenschaften an der SARS-CoV-M^{pro} verbessert werden. Dabei ergeben sich anhand der Cinanserin-Grundstruktur verschiedene Möglichkeiten zur Modifikation:



- **A:** Halogensubstitution am aromatischen Ring: Darstellung von 2,3-Dichlor-Derivaten des Cinanserins
- **B:** Variation des Zimtsäurefragmentes: Einführung einer gesättigten Phenylpropionsäure-Einheit
- **C:** Variation der Kettenlänge an der Aminosulfanylseitenkette
- **D:** Variation der Dimethylaminogruppe: Einführung voluminöser Alkylamino-Reste

Testungen

Zur Evaluierung des inhibitorischen Potentials der synthetisierten Verbindungen sollen diese zunächst auf Aktivität gegen die coronaviralen Proteasen SARS-CoV-M^{pro} sowie SARS-CoV-PL^{pro} getestet werden. Zum Vergleich mit einer humanen Protease sollen zusätzlich Testungen an Cathepsin L erfolgen.

Weiterhin sollen im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 630 („Erkennung, Gewinnung und funktionale Analyse von Wirkstoffen gegen Infektionskrankheiten,“) die Aktivitäten der synthetisierten Verbindungen gegen verschieden pathogene Organismen (Leishmanien, Trypanosomen, Plasmodien, Staphylokokken) sowie deren Cytotoxizitäten untersucht werden.

Reaktivitätsstudien

An ausgewählten Inhibitoren soll die Reaktivität des Michael-Systems bezüglich der Addition von Thiolen in einem Modellsystem untersucht werden. Diese Aufgabe umfasst neben der Synthese die Etablierung eines Modellsystems zum Reaktions-Monitoring mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie. Die Ergebnisse sollen als Vergleich zu theoretischen quantenchemischen Berechnungen der Thiol-Addition an α,β -ungesättigte Systeme dienen, die in der Arbeitsgruppe Engels (Inst. f. Organische Chemie, Uni Würzburg) durchgeführt wurden und Aufschlüsse über den Reaktionsmechanismus lieferten.

2 Synthesen

2.1 Festphasensynthese des FRET-Substrats

Um bei Proteasen die Enzymaktivität bzw. deren Hemmung quantitativ erfassen zu können, macht man sich die natürliche Funktion des Enzyms in Kombination mit spektroskopischen Methoden zu Nutze. In der Praxis setzt man dabei ein Peptid ein, das dem natürlichen Substrat der Protease ähnelt und somit eine gute Affinität zum Enzym aufweist. Dieses wird dann in Gegenwart der Protease unter geeigneten Umgebungsbedingungen (Puffer, pH-Wert, etc.) gespalten. Weiterhin muss dieses Substrat derart modifiziert sein, dass die erfolgte Spaltung durch die Protease durch entsprechende Zunahme oder Abnahme der UV-Absorption oder Fluoreszenz detektierbar wird.

Dies kann im einfachsten Fall schon durch ein Chromophor oder Fluorophor erreicht werden, welches an der P1'-Position über eine Amid-Bindung in die Aminosäuresequenz des Substrat-Peptides eingebunden ist und – wie beispielsweise im Falle des 7-Amino-4-methylcoumarins (AMC) – direkt durch Enzymspaltung freigesetzt wird.

Die Verwendung von AMC-modifizierten Substraten ist, wie im Fall der SARS-CoV-M^{pro}, nicht möglich, falls eine Protease in der P1'-Position nur kleine Aminosäuren (Glycin, Alanin, Serin) akzeptiert. Das sterisch anspruchsvolle Chromophor/Fluorophor würde die Affinität zum Enzym zu stark herabsetzen, was es für die Verwendung in Enzym-Assays unbrauchbar macht.

Eine Möglichkeit, diese Art von Proteasen trotzdem einem fluorimetrischen Enzym-Assay zugänglich zu machen, ist der Einsatz sog. FRET-Substrate (**FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer**). Es handelt sich dabei um Peptide, die ein FRET-Donor-Akzeptor-Paar enthalten, das jedoch nicht an der Spalt-Stelle des Substrats, sondern einige Positionen davon entfernt, jeweils in C- bzw. N-terminaler Richtung, lokalisiert ist. Befinden sich im intakten Substrat Donor und Akzeptor in ausreichender räumlicher Nähe, wird die Fluoreszenz des Donors durch den Akzeptor gequencht. Erst nach Substratspaltung wird die vom Donor ausgehende Fluoreszenz detektierbar (siehe auch Kap. 1.4.3, FRET).

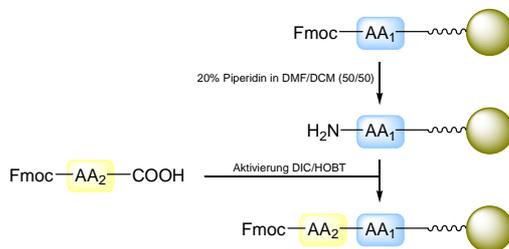
Die Etablierung des Enzym-Assays für die SARS-CoV-M^{pro} in der Arbeitsgruppe des Autors im Jahr 2004 machte die Synthese eines geeigneten FRET-Substrates erforderlich. Bislang waren dazu nur wenige Beispiele in der Literatur veröffentlicht.^[52,62,63] Blanchard

et al. berichteten im Jahr 2004 über ein High-Throughput-Screening, das an der SARS-CoV-M^{pro} mittels eines FRET-Assays durchgeführt wurde.^[64] Das eingesetzte Substrat enthielt als Donor-Akzeptor-Paar Anthranilsäure (2-Aminobenzoesäure, Abz) und 2-Nitrotyrosin (Tyr(NO₂)). Diese waren – anders als bei den meisten DABCYL/EDANS-Substraten, bei denen die Chromophore an die Seitenkette von Lysin oder Glutaminsäure gebunden sind – direkt in das Peptid-Rückgrat eingebaut. Das Substrat besaß damit die Gesamtsequenz H₂N-Abz-Ser-Val-Thr-Leu-Gln-Ser-Gly-Tyr(NO₂)-Arg-OH, der *K_m*-Wert wurde zu 820 ± 130 μM bestimmt.

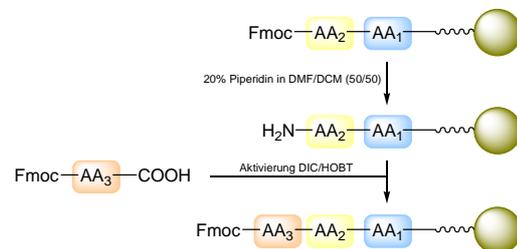
Weiterhin zeigte es im FRET-Assay eine deutlich höhere Sensitivität als das entsprechende DABCYL/EDANS-Derivat und wurde daher als Ausgangspunkt für die Synthese des eigenen FRET-Substrates mittels SPPS gewählt.

Die automatisierte Peptidsynthese an fester Phase (*SPPS: Solid Phase Peptide Synthesis*) ist das Hauptverfahren zur technischen Darstellung von Peptiden. Dabei wird zunächst eine *N*-terminal geschützte Aminosäure über ihre Carboxylgruppe an ein modifiziertes Polymer-Harz gebunden.

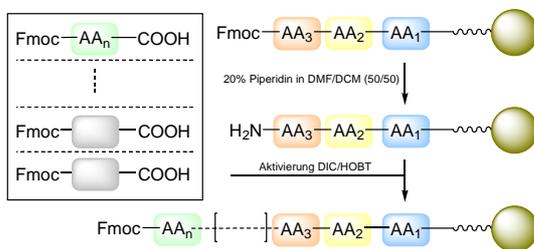
a) Entschützung der harzgebundenen Aminosäure und 1. Kupplung



b) 2. Kupplungsschritt mit Entschützung und Aktivierung



c) Kupplungszyklen bis zur *N*-terminalen Aminosäure (AA_n)



d) Isolierung des Zielpeptids

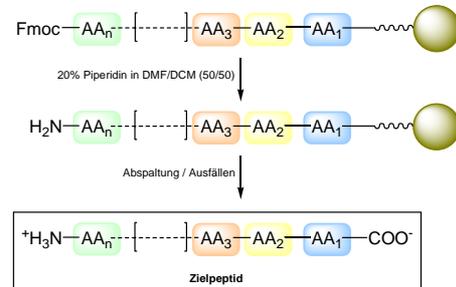


Abb. 2–1: Schema der Festphasenpeptidsynthese (SPPS) nach Fmoc-Protokoll

Ist dies erfolgt, wird die Schutzgruppe an der Aminofunktion entfernt und die für Position zwei vorgesehene Aminosäure – ebenfalls *N*-terminal geschützt – unter Ausbildung einer Amid-Bindung an die erste gekuppelt. Abspaltung der Schutzgruppe, Waschgänge und Anknüpfung der nächsten Aminosäure werden zyklisch wiederholt, bis die gewünschte Sequenz als harzgebundenes Peptid vorliegt. Dieses wird abschließend unter Zugabe eines Abspaltungsreagenzes von der festen Phase getrennt (vgl. Abb. 2–1). Vorteile gegenüber der Synthese in Lösung sind die Automatisierbarkeit der einzelnen Syntheseschritte, effiziente Entfernung überschüssiger Edukte und Reagenzien aus dem Reaktionsansatz und damit verbundene höhere Reinheit und Ausbeute.

Für die Synthese des FRET-Substrates wurde ein Milligen 9050 PepSynthesiser genutzt. Als Verfahren wurde die SPPS nach Fmoc-Protokoll gewählt, d. h. die Aminosäuren wurden als Fmoc-geschützte Derivate eingesetzt. Die Entfernung der Schutzgruppe im Anschluss an die Amid-Kupplung erfolgte standardmäßig durch Waschen mit Piperidin-Lösung (20% in DCM/DMF 1:1) über sieben Minuten. Neben der Reaktionskontrolle der vollständigen Schutzgruppenabspaltung durch Messung der UV-Absorption ermöglicht das Fmoc-Protokoll den Einsatz säurelabiler Schutzgruppen für die Aminosäure-Seitenketten von Serin, Threonin und Glutamin. Dies ist erforderlich, um mögliche Nebenreaktionen wie Quervernetzung und Aminosäureeinbau in die Seitenkette zu verhindern. Deren Abspaltung kann – bei entsprechender Wahl des Harzes – in einem Reaktionsschritt mit der Peptidabspaltung vom Harz erfolgen.

Die Festphasensynthese wurde an Wang-Harz durchgeführt, an dem bereits Fmoc-Arginin(Mts)-OH als erste Aminosäure der Sequenz gebunden war. Die Mts-Schutzgruppe (Mts = Mesitylen-2-sulfonyl) des Arginins bleibt auch nach der Peptidabspaltung im fertigen FRET-Substrat erhalten. Alle benötigten natürlichen Aminosäuren sowie die Chromophore Anthranilsäure und 3-Nitrotyrosin wurden als Fmoc-Derivate eingesetzt. Bei Serin und Threonin ist die Seitenkette zusätzlich durch eine *tert*-Butylgruppe, bei Glutamin durch eine Trityl-Gruppe geschützt. 3-Nitrotyrosin kann ohne Schutz der aromatischen Hydroxyfunktion eingesetzt werden. Die Aminosäuren wurden in vierfachem Überschuss bezüglich der Beladung des Harzes eingesetzt. Ihre Aktivierung erfolgte standardmäßig durch DIC / HOBT (*N,N'*-Diisopropylcarbodiimid / 1-Hydroxybenzotriazol). Die Reaktionszeit der Kupplung betrug jeweils 60 Minuten pro Aminosäure-Rest.

Nach beendeter Synthese ist es erforderlich, das Harz durch wiederholte wechselweise Behandlung mit Dichlormethan und Methanol frei von DMF zu waschen. Anschließend kann die Abspaltung des Peptides vom Harz bei gleichzeitiger Entfernung der *tert*-Butyl

bzw. Trityl-Schutzgruppen vorgenommen werden. Dazu wird das Harz in einen Schüttelkolben überführt und unter Einwirkung des Reagenzes für die Abspaltung vom Harz für 2 Stunden bei Raumtemperatur geschwenkt.

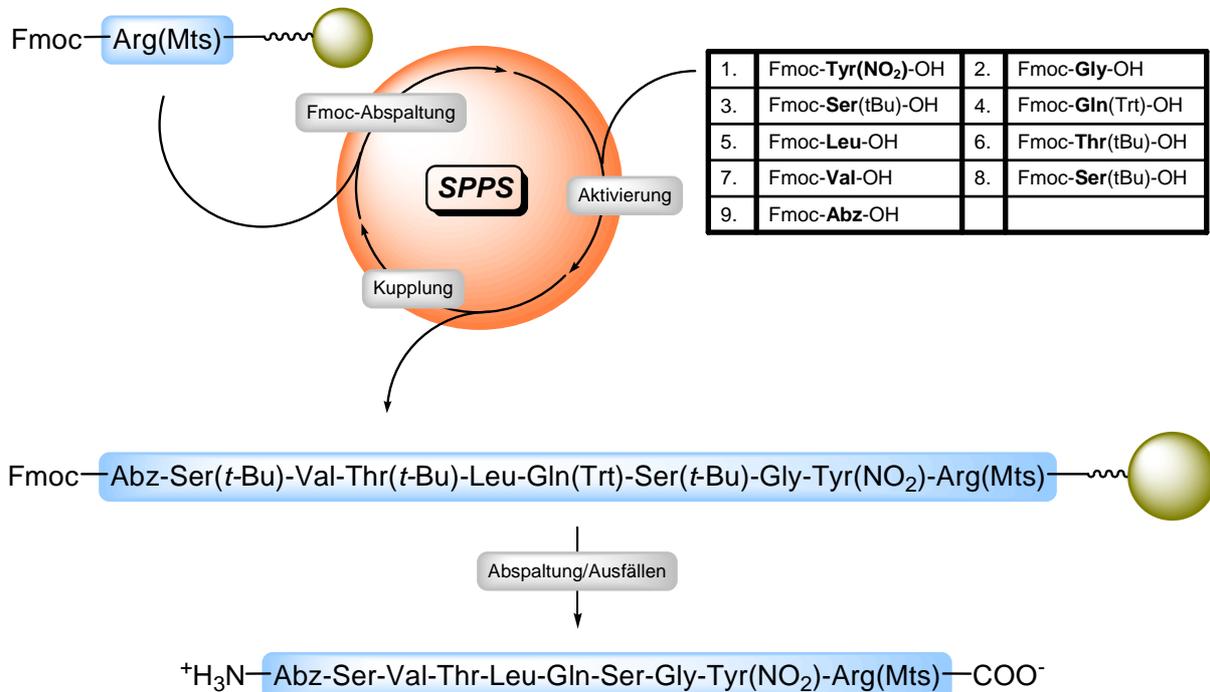


Abb. 2–2: SPPS des FRET-Substrates MS01; Tyr(NO₂) = 3-Nitrotyrosin

Zur Abspaltung vom Wang-Harz wurde eine Mischung von TFA und Dichlormethan (1 : 1) verwendet. Dieser wurde zum Abfangen von *tert*-Butyl- bzw. Trityl-Radikalen 2.5 % Triisopropylsilan zugesetzt. Das Gemisch aus TFA-Lösung und darin enthaltenem Peptid wurde im Vakuum eingengt. Durch Zugabe von kaltem Diethylether konnte das Produkt als Trifluoracetat-Salz ausgefällt und isoliert werden. Anschließende Charakterisierung durch HPLC und Massenspektrometrie bestätigten die Identität und Reinheit des gewünschten FRET-Substrates.

Im Enzym-Assay zeigt sich eine gute Handhabbarkeit des Substrates. Weder der Verbleib der Mts-Schutzgruppe am Arginin-Rest noch der Austausch von 2-(NO₂)-Tyr durch 3-(NO₂)-Tyr – welches ebenfalls als Akzeptor-Chromophor in FRET-Substraten eingesetzt werden kann^[74] – wirkte sich negativ auf die Affinität zum Substrat aus. Der K_m -Wert des Substrats wurde sowohl für die SARS-CoV-M^{pro} als auch die TGEV-M^{pro} bestimmt. Hier zeigte sich nach Korrektur des Inneren Filtereffekts^[67] mit $K_m = 190 \pm 23 \mu\text{M}$ für die SARS-CoV-M^{pro} (TGEV-M^{pro}: $K_m = 88.1 \mu\text{M} \pm 13.7 \mu\text{M}$) sogar eine Verbesserung

der Substrat-Affinität. Ein zu einem späteren Zeitpunkt zum Vergleich kommerziell erworbenes (*GenScript Corp., Piscataway (NJ), USA*) analoges Substrat ohne Mts-Schutzgruppe weist einen K_m -Wert von $108 \pm 26 \mu\text{M}$ auf. Durch das Fehlen der Schutzgruppe wird die Affinität zum Enzym erwartungsgemäß zusätzlich erhöht.

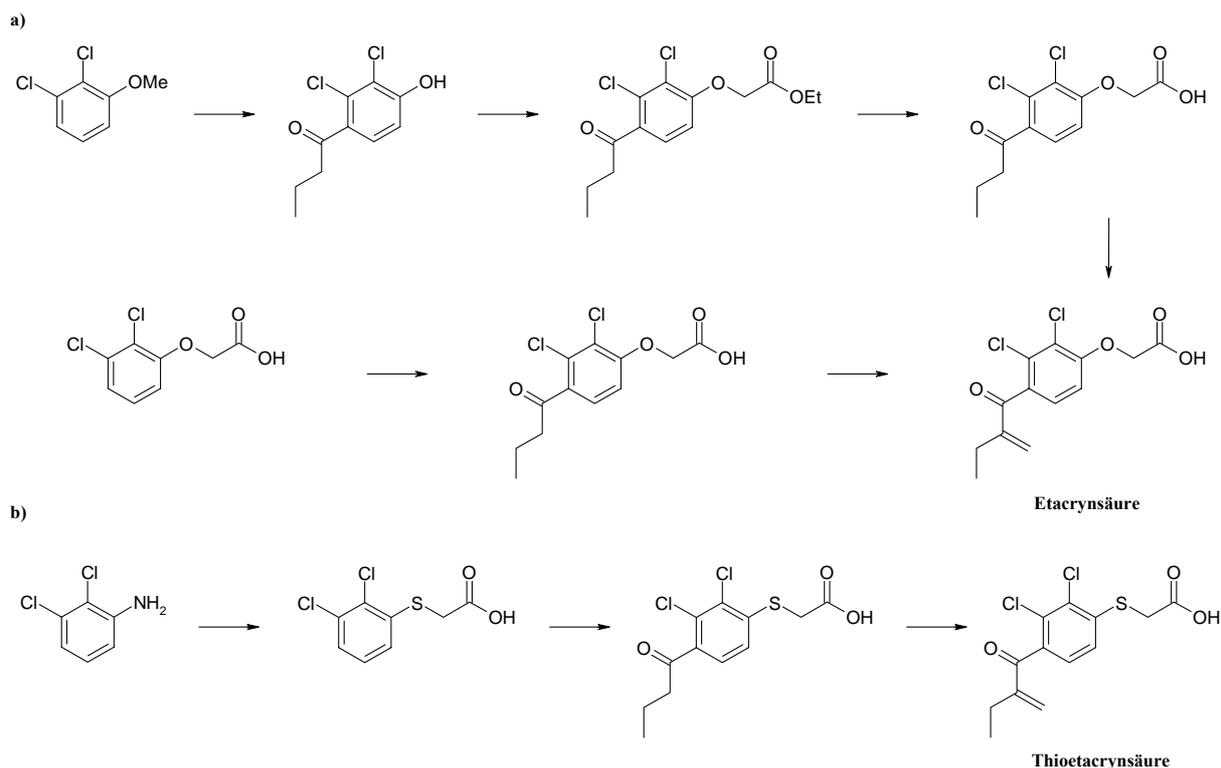
Substrat	K_m -Wert [μM]	
	SARS-CoV-M ^{pro}	TGEV-M ^{pro}
Abz-Ser-Val-Thr-Leu-Gln-Ser-Gly- [3-(NO ₂)Tyr]-Arg(Mts)-OH	190 ± 23	88.1 ± 13.7
Abz-Ser-Val-Thr-Leu-Gln-Ser-Gly- [3-(NO ₂)Tyr]-Arg-OH	108 ± 26	n.d.
Abz-Ser-Val-Thr-Leu-Gln-Ser-Gly- [2-(NO ₂)Tyr]-Arg-OH	$820 \pm 130^{[64]}$	n.d.

Tab. 2–1: Übersicht über die K_m -Werte der eingesetzten FRET-Substrate

2.2 Synthese der Etacrynsäure-Derivate

Die Darstellung der Etacrynsäure (2,3-Dichlor-4-(2-methylenbutyryl)phenoxyessigsäure) ist bereits seit fast 50 Jahren bekannt und wurde im Jahr 1961 von E. M. Schultz und J. M. Sprague in einem Patent zur Verwendung der Etacrynsäure als Diuretikum beschrieben^[75] (Merck & Co., Inc., US3255241, 1966). Darin werden zwei verschiedene Verfahren zur Synthese angeführt (Schema 2–1a). In der ersten Variante wird ausgehend von 2,3-Dichloranisol zunächst durch Friedel-Crafts-Acylierung mit Buttersäurechlorid und Aluminiumchlorid in Schwefelkohlenstoff das acylierte Phenol dargestellt. Nach Veretherung mit Bromessigsäureethylester und anschließender Esterhydrolyse erhält man ein Phenoxyessigsäurederivat, in dessen Butyryl-Seitenkette durch Mannich-Reaktion mit Paraformaldehyd und Dimethylamin HCl das Michael-System eingeführt wird.

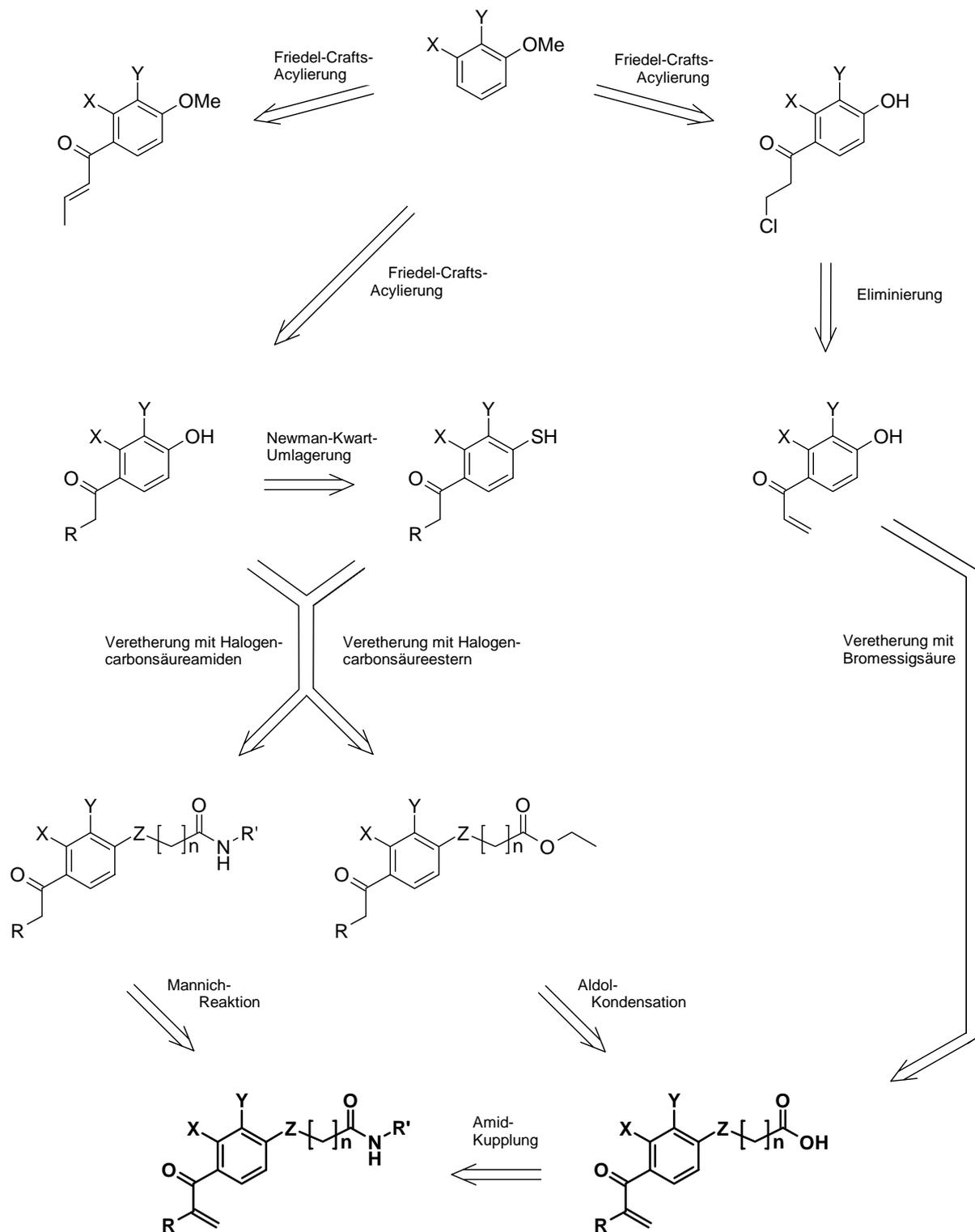
Die zweite Variante startet bereits mit dem Phenoxyessigsäure-Derivat. Im nächsten Schritt wird die Butyryl-Seitenkette wiederum durch Friedel-Crafts-Acylierung mit Buttersäurechlorid und Aluminiumchlorid in Schwefelkohlenstoff eingeführt. Die abschließende Mannich-Reaktion zur Etacrynsäure entspricht ebenfalls der ersten Variante.



Schema 2–1: a) Darstellung von Etacrynsäure und b) Thioetacrynsäure nach patentierten Verfahren^[75,76]

Die Darstellung von Thioetacrynsäure (2-[(4-(2-Methylenbutyryl)-2,3-dichlorphenyl)sulfanyl]essigsäure) ist ebenfalls Teil eines patentierten Verfahrens zur Synthese von Diuretika, das 1964 von J. B. Bicking für die Firma Merck angemeldet wurde^[76] (US3419606, 1968). Als Edukt wird 2,3-Dichloranilin eingesetzt, woraus nach Diazotierung und Umsetzung mit Mercaptoessigsäure (2,3-Dichlorphenylthio)essigsäure erhalten wird. Die weiteren Syntheseschritte zur Acylierung mittels Buttersäurechlorid und zur Einführung der Doppelbindung entsprechen dem Verfahren, welches bei der Etacrynsäure-Synthese Anwendung findet (Schema 2–1).

Für die Synthese der im Rahmen dieser Arbeit angestrebten Etacrynsäure-Derivate und ihrer Strukturvarianten sind die oben erwähnten Verfahren nur bedingt praktikabel. Teilweise wurden Syntheseschritte variiert oder Alternativrouten zur Darstellung der Zielverbindungen erarbeitet. Vermeidung von Synthesereagenzien mit hohem Risikopotential in Bezug auf Toxizität und Handhabbarkeit im Labor spielten dabei ebenso eine Rolle wie die Vereinfachung der Synthese durch Reduzierung der Anzahl der Synthesestufen.



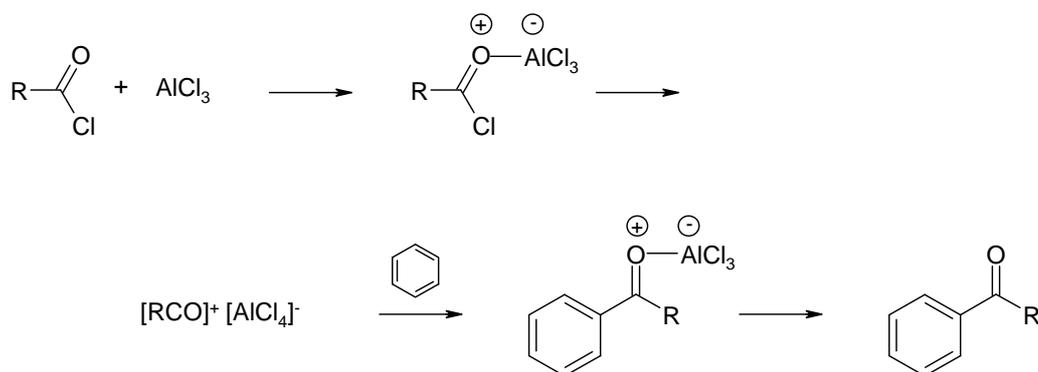
Schema 2–2: Syntheseroute zur Darstellung der Etacrynsäure-Derivate

Schema 2–2 zeigt die Hauptsyntheserouten der synthetisierten Etacrynsäure-Derivate. Vorrangige Zielverbindungen waren die freien Carbonsäuren und die Carbonsäureamide, die jeweils auch das Michael-System in der Alkylseitenkette besitzen. Im Folgenden

werden die einzelnen Syntheseschritte und die dadurch erhaltenen Verbindungen detailliert erläutert.

2.2.1 Friedel-Crafts-Acylierung

Die Friedel-Crafts-Acylierung stellt die wichtigste Synthesemethode zur Bildung aromatischer Ketone dar.^[77] Sie verläuft durch Umsetzung geeigneter Aromaten mit Carbonsäurechloriden in Anwesenheit von Lewis-Säuren (z. B. Aluminiumtrichlorid). Dabei bildet zunächst das Säurechlorid mit der Lewis-Säure einen Donor-Akzeptor-Komplex, der in ein Acylium-Ion und – bei Einsatz von AlCl_3 – ein Aluminiumtetrachlorid-Anion dissoziieren kann. Das Acylium-Ion ist in der Lage, den Aromat elektrophil anzugreifen. Nach Bildung des σ -Komplexes und Rearomatisierung erhält man den Komplex aus Produkt und Lewis-Säure, aus dem durch Hydrolyse das aromatische Keton freigesetzt wird. Dies macht den Einsatz der Lewis-Säure in mindestens äquimolarer Menge erforderlich.

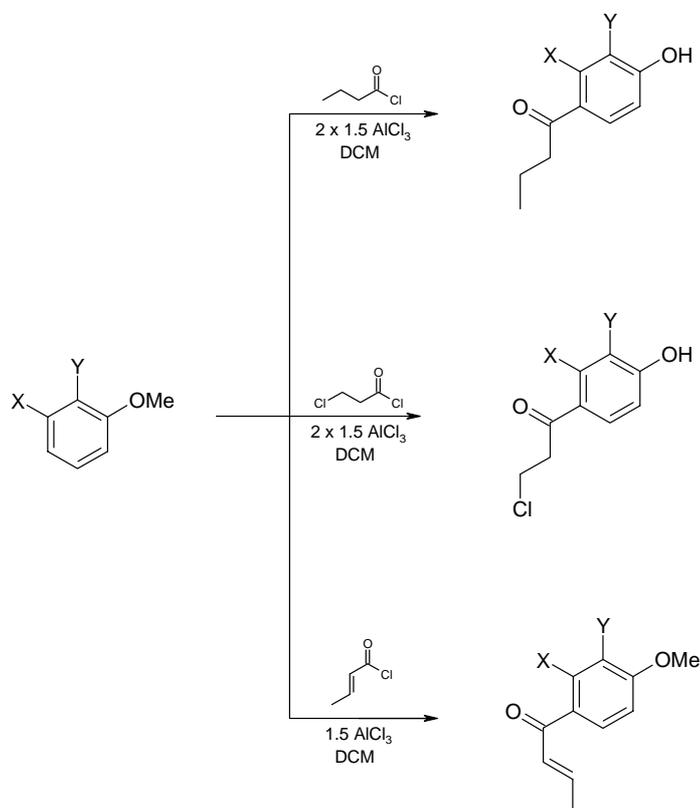


Schema 2–3: Mechanismus der Friedel-Crafts-Acylierung

Alternativ zu Carbonsäurechloriden können auch Carbonsäuren in Anwesenheit starker Protonensäuren eingesetzt werden. In beiden Fällen sind die entstehenden Produkte in der Regel weniger reaktiv als die eingesetzten Aromaten, so dass eine Zweitsubstitution nicht stattfindet.

Bei der Synthese der Etacrynsäure-Derivate stellte die Friedel-Crafts-Acylierung stets den ersten Syntheseschritt dar. Als Aromaten-Komponente kamen hierbei halogensubstituierte Anisole zum Einsatz, die mit den jeweiligen Carbonsäurechloriden in Anwesenheit von Aluminiumchlorid umgesetzt wurden. Die Wahl des Anisols legt damit schon das

aromatische Substitutionsmuster der Zielverbindung fest. Es wurden 2,3-Dichloranisol, 2-Bromanisol und 2-Fluoranisol als Edukte verwendet. Die verwendete Carbonsäure bestimmt die Art der Seitenkette am Aromaten, die zu einem späteren Zeitpunkt noch entsprechend modifiziert werden kann. Die Synthese erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von *Cragoe* und *Woltersdorf et al.*^[78] Darin wurde als Lösungsmittel Dichlormethan verwendet, was im Vergleich zu Schwefelkohlenstoff eine deutlich einfachere und unbedenklichere Handhabung zulässt. Die Carbonsäurechloride sowie das Aluminiumchlorid wurden in 1.5-fachem Überschuss zum Anisol eingesetzt und zunächst unter Eiskühlung gerührt, bis keine Produktzunahme mehr zu beobachten war. Durch Zugabe weiterer 1.5 Äquivalente AlCl_3 und anschließendes Erhitzen unter Rückfluss wurde nun die Methoxygruppe des acylierten Anisols zum Phenol gespalten.

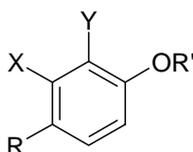


Schema 2–4: Friedel-Crafts-Acylierung der Halogenanisole

Hierbei kann es vorkommen, dass ein Teil des entstehenden Phenols mit überschüssigem Carbonsäurechlorid durch *O*-Acylierung zum Phenylester reagiert. Bei der Aufarbeitung wurde zunächst das para-acylierte Phenol durch basische Extraktion von verbliebenem Anisol bzw. *O*-acyliertem Phenol getrennt und dann nach Ansäuern aus wässrigem Milieu ausgefällt oder mit organischem Lösemittel extrahiert. Durch Esterspaltung von

zusätzlich *O*-acyliertem Phenol lässt sich weiteres Produkt gewinnen. Im Falle der Friedel-Crafts-Acylierung mit Buttersäurechlorid oder 3-Chlorpropionsäurechlorid lassen sich die gewünschten Phenole wie beschrieben in guten bis sehr guten Ausbeuten darstellen. Durch den +M-Effekt der Methoxygruppe findet die elektrophile aromatische Substitution bevorzugt in *para*-Position statt. Das *ortho*-Acylierungsprodukt wurde in keinem Fall isoliert.

Bei der Acylierung der Halogenanisole mit Crotonsäurechlorid lieferte das Verfahren keine eindeutig identifizierbaren Reaktionsprodukte. Zwar schien die Acylierung laut DC-Kontrolle wie gewünscht zu verlaufen, die Phenole konnten aber nach Methyletherspaltung unter obigen Bedingungen nicht isoliert werden. Daher wurde die Reaktionsfolge auf der Stufe der acylierten Anisole unterbrochen. Diese konnten in fast quantitativen Ausbeuten erhalten werden.



Produkt	R	X	Y	R'	Ausbeute
MS02	butyryl	Cl	Cl	H	84 %
MS03	butyryl	H	Br	H	75 %
MS04	3-Cl-propanoyl	Cl	Cl	H	56 %
MS05	crotonyl	Cl	Cl	Me	89 %
MS06	crotonyl	H	F	Me	98 %
MS07	crotonyl	H	Br	Me	96 %

Tab. 2–2: Friedel-Crafts-Acylierung der Halogenanisole

Die Acylierung von 3-Trifluormethylanisol gelang nach diesem Verfahren jedoch nicht. Auch nach mehreren Stunden Reaktionszeit war bei Einsatz sowohl von Buttersäurechlorid als auch Crotonsäurechlorid keine Umsetzung zu beobachten. Im zweiten Fall konnte nach der Aufarbeitung nur das eingesetzte Anisol zu 95 % wieder isoliert werden. Offensichtlich ist der aromatische Ring durch den –I-Effekt der Trifluormethylgruppe zu wenig reaktiv, um vom Acylium-Ion angegriffen zu werden. Tab. 2–2 gibt einen Überblick über die durch Friedel-Crafts-Acylierung erhaltenen Phenole und Anisole.

Versuche zur Methyletherspaltung (Crotonyl-Derivate)

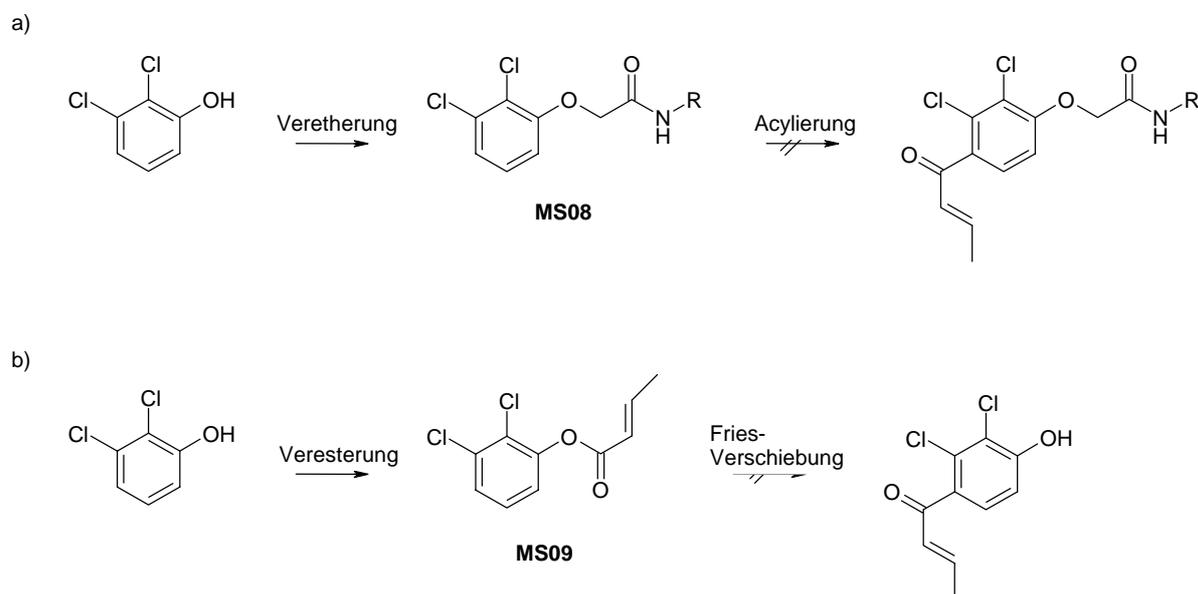
Da bei den Crotonyl-Anisolen die direkte Methyletherspaltung mit AlCl_3 in einer Reaktionsfolge mit der Friedel-Crafts-Acylierung nicht zu den gewünschten Phenolen führte, wurde nach alternativen Methoden gesucht. Als weitere Möglichkeit der Lewis-Säure-katalysierten Demethylierung wurde zunächst die Etherspaltung mit Bortribromid versucht.^[79] Hier bildet – analog zur Etherspaltung mit Aluminiumchlorid – die Lewis-Säure einen Komplex mit dem Ethersauerstoff des Anisols. Hieraus kann die Methylgruppe als Methylbromid abgespalten und das Phenol durch abschließende Hydrolyse freigesetzt werden. Doch auch mit dieser Methode konnte das acylierte Phenol nicht dargestellt werden. Da neben dem Sauerstoff der Methoxygruppe auch der Carbonyl-Sauerstoff der Crotonyl-Seitenkette als Elektronen-Donor für die Lewis-Säure zur Verfügung steht, findet offensichtlich auch an dieser Stelle des Moleküls die Bildung eines Bor-Sauerstoff-Komplexes, verbunden mit unerwünschten Nebenreaktionen, statt.

Chakraborti et al.^[80] beschreiben eine schonende Möglichkeit zur Spaltung von Aryl-Alkylethern unter „quasi-neutralen“ Bedingungen. Dabei kommen Thiophenolat-Anionen – sukzessive freigesetzt aus Thiophenol durch Anwesenheit katalytischer Mengen Kaliumcarbonat – zum Einsatz. Als am besten geeignetes Lösungsmittel wird *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) angegeben. Bei dieser Reaktionsführung kann weiteres Thiophenolat nur durch Deprotonierung durch gebildetes Phenolat erzeugt werden. Die Autoren beschreiben darin unter anderem die Überführung verschiedener Methoxy-Chalcone in die entsprechenden Hydroxy-Derivate. Trotz struktureller Verwandtschaft konnte auch diese Variante nicht erfolgreich auf die Crotonyl-Anisole angewandt werden. Es war zwar eine Umsetzung der Edukte zu beobachten. Die Reaktionsprodukte waren jedoch im Zuge der Aufarbeitung durch basische Extraktion nicht isolierbar. Daraus wurde gefolgert, dass eine Spaltung des Methylethers zum Phenol nicht stattgefunden hat.

Weitere Versuche zur Darstellung der Crotonylphenole

Um die problematische Methyletherspaltung nach der Acylierung mit Crotonsäurechlorid zu umgehen, wurden zwei weitere Synthesewege zur Darstellung der Crotonylphenole getestet. Zum einen wurde aus 2,3-Dichlorphenol durch Veretherung mit Bromessigsäure-*tert*-butylamid zunächst das Phenoxyessigsäureamid **MS08** hergestellt (Details zur Synthese siehe Kap. 2.2.3). Dies entspricht von der Synthesefolge dem patentierten Verfahren zur Etacrynsäureherstellung. Ergebnisse in der Arbeitsgruppe zeigten jedoch, dass Acylierungen von Phenoxyessigsäureestern mit Buttersäurechlorid in Dichlormethan

nur bedingt möglich sind. Während sich der 2,3-Dimethylphenoxyessigsäureester in guten Ausbeuten acylieren lässt, ist dies im Fall des 2,3-Dichlor-Derivats nicht möglich.^[71]



Schema 2–5: Alternativrouten zur Synthese der Crotonylphenole

Auch der hier durchgeführte Versuch der Acylierung von 2,3-Dichlorphenoxyessigsäure-*tert*-butylamid (**MS08**) mit Crotonsäurechlorid in Anwesenheit von Aluminiumchlorid in Dichlormethan führte nicht zum Erfolg (Schema 2–5a). Offenbar hat die Wahl des Lösungsmittels dabei einen entscheidenden Einfluss. Auf die Verwendung von Schwefelkohlenstoff wurde dennoch verzichtet.

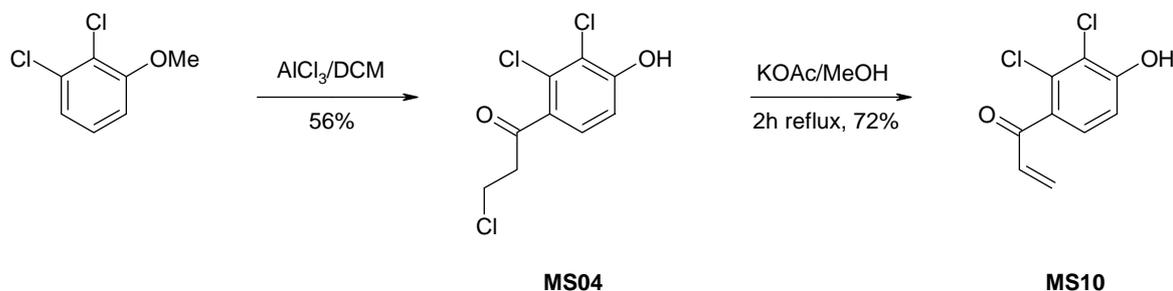
Als letzte Möglichkeit wurde die Freisetzung des Phenols durch Fries-Umlagerung am Phenylester getestet. Dazu wurde 2,3-Dichlorphenol mit Crotonsäurechlorid verestert (**MS09**). Durch Zusatz von Aluminiumchlorid sollte dann der Crotonylrest aktiviert werden und unter Verschiebung in die *para*-Position das acylierte Phenol bilden (Schema 2–5b). Die Darstellung des Esters **MS09** wurde mit Pyridin als Hilfsbase zum Abfangen des entstehenden Chlorwasserstoffs vorgenommen. **MS09** wurde dabei in einer Ausbeute von 50 % isoliert. Zur anschließenden Fries-Umlagerung in wasserfreiem Dichlormethan wurden 1.5 Äquivalente Aluminiumchlorid eingesetzt. Da bei Raumtemperatur nach mehreren Stunden keine Umsetzung zu beobachten war, wurde die Reaktion anschließend unter Rückfluss durchgeführt. Nach Aufarbeitung konnte das gewünschte Produkt jedoch nicht erhalten werden. NMR-spektroskopische Messungen der isolierten Produkte lassen eine Umlagerung der Acyl-Gruppe unter Ausbildung eines Bicyclus vermuten.

2.2.2 Darstellung von Acryloylphenol und acyliertem Thiophenol

Durch die Synthese weiterer acylierter Phenole neben 2,3-Dichlor-4-butyrylphenol (**MS02**) und 2-Brom-4-butyrylphenol (**MS03**) wird das Spektrum an Etacrynsäurederivaten zusätzlich erweitert. Die durch Friedel-Crafts-Acylierung gewonnenen Phenole können durch nachfolgend beschriebene Umsetzungen zu geeigneten Phenolderivaten umgesetzt werden.

Acryloylphenol durch Eliminierung

Im patentierten Verfahren zur Etacrynsäure-Synthese erfolgt die Einführung der Doppelbindung als letzter Schritt der Synthese. Dort wird durch Mannich-Reaktion in β -Stellung zum Carbonyl-Kohlenstoff der Acyl-Seitenkette das Michael-System ausgebildet. Im Falle der angestrebten Acryloyl-Seitenkette als Strukturvariante der Etacrynsäure lässt sich die Synthese allerdings erheblich vereinfachen.^[81] Durch Acylierung von 2,3-Dichloranisol mit 3-Chlorpropanoylchlorid erhält man zunächst das 3-Chlorpropanoylphenol **MS04** (vgl. Kap. 2.2.1).



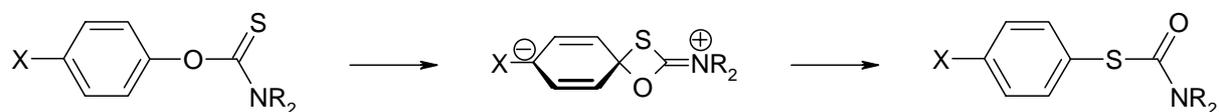
Schema 2–6: Darstellung von 2,3-Dichlor-4-acryloylphenol (**MS10**)

Diese Verbindung besitzt in der Seitenkette eine *CH*-acide Position in Nachbarschaft zur Carbonylgruppe. Gemeinsam mit dem Chlorid als gute Abgangsgruppe in 3-Position der Seitenkette lässt sich eine Eliminierung bereits unter milden Bedingungen durchführen. Als Base kommt dabei Kaliumacetat in Methanol zum Einsatz. Nach zwei Stunden Erhitzen unter Rückfluss erhält man so das 2,3-Dichlor-4-acryloylphenol (**MS10**) in einer Ausbeute von 72 % (Schema 2–6).

Acylierte Thiophenole durch Newman-Kwart-Umlagerung

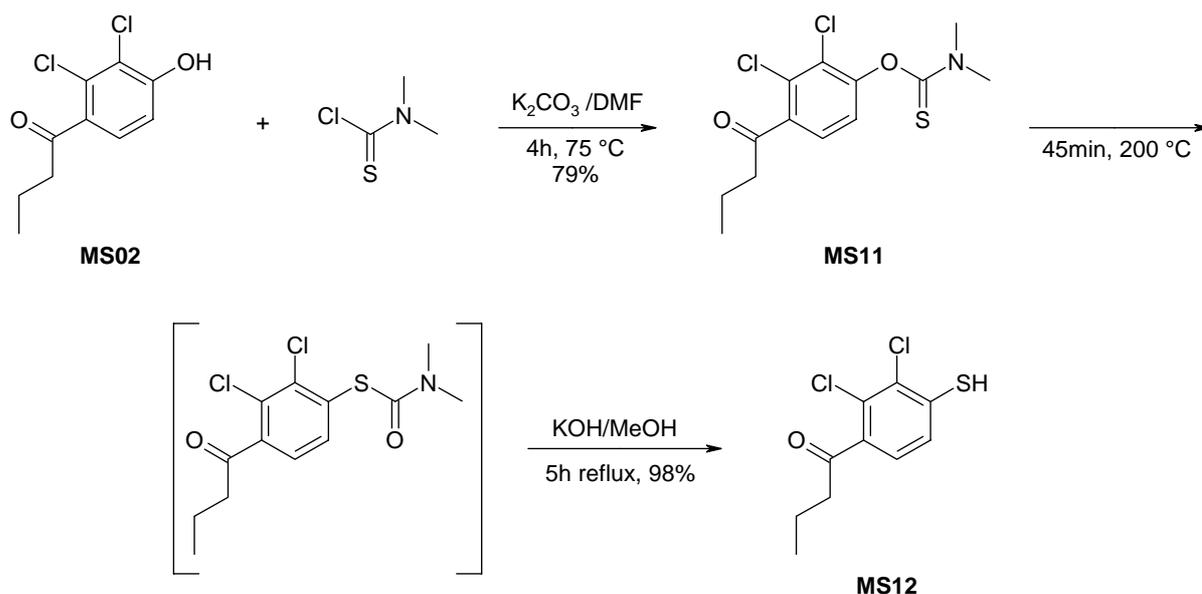
Zur Darstellung von *S*-Analoga der Etacrynsäure und ihrer Strukturvarianten ist die Einführung eines Schwefelatoms am aromatischen Ring erforderlich. Dies kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Die Diazotierung von Dichloranilin mit nachfolgender Substitution durch Mercaptoessigsäure (vgl. Patent, Schema Synthese 1b) ist insofern nicht einsetzbar, da für die nachfolgende Acylierung Schwefelkohlenstoff verwendet wird. Daher musste ein alternativer Syntheseweg erarbeitet werden.

Eine Möglichkeit ist die Umwandlung eines Phenols in das entsprechende Thiophenol, welche bereits in den sechziger Jahren von *Newman* und *Kwart* beschrieben wurde.^[82,83,84] Zentraler Schritt ist dabei die Umlagerung eines *O*-Aryl-Thiocarbamats in das *S*-Aryl-Thiocarbamat. Besonders gute Substrate für diese Umlagerung sind Phenole, die in *para*-Position zur Hydroxy-Gruppe einen Substituent mit $-I$ - bzw. $-M$ -Effekt besitzen, der eine negative Partialladung stabilisieren kann. Dieser Effekt wurde bereits für 4-NO₂-, 4-CN- und 4-SO₂Me-Substituenten beobachtet.^[85] Diese Phenole werden zunächst durch Reaktion mit Dimethylthiocarbamoylchlorid zum *O*-Aryl-Thiocarbamat umgesetzt. Die Umlagerung erfolgt durch Erhitzen des *O*-Aryl-Thiocarbamats – meist ohne Zugabe eines Lösungsmittels. Nach dem allgemein akzeptierten Reaktionsmechanismus handelt es sich um eine nucleophile ipso-Substitution am aromatischen Ring, bei der der Schwefel am Phenol-Kohlenstoff des Aromaten angreift. Es kommt zur Bildung eines 4-gliedrigen Übergangszustandes. Dabei erhält der Thiocarbamat-Stickstoff eine positive, der Aromat eine negative Formalladung. Im Folgenden reagiert der eingangs phenolische Sauerstoff des Thiocarbamats als Abgangsgruppe. Unter Rearomatisierung wird das *S*-Aryl-Thiocarbamat freigesetzt, welches nach Hydrolyse das Thiophenol liefert.



Schema 2–7: Mechanismus der Newman-Kwart-Umlagerung

Für die Synthese der Thioetacrynsäure-Derivate war das 2,3-Dichlor-4-butyrylthiophenol (**MS12**) die angestrebte Schlüsselverbindung. Die Synthese erfolgte in Anlehnung an *Cragoe et al.*,^[78] ausgehend vom Phenol **MS02**. Dieses wurde mit einem Überschuss Dimethylaminothiocarbamoylchlorid (2 Äq) in DMF und Kaliumcarbonat (1.5 Äq) als Base zum *O*-Arylthiocarbamat **MS11** umgesetzt (Ausbeute: 79%).



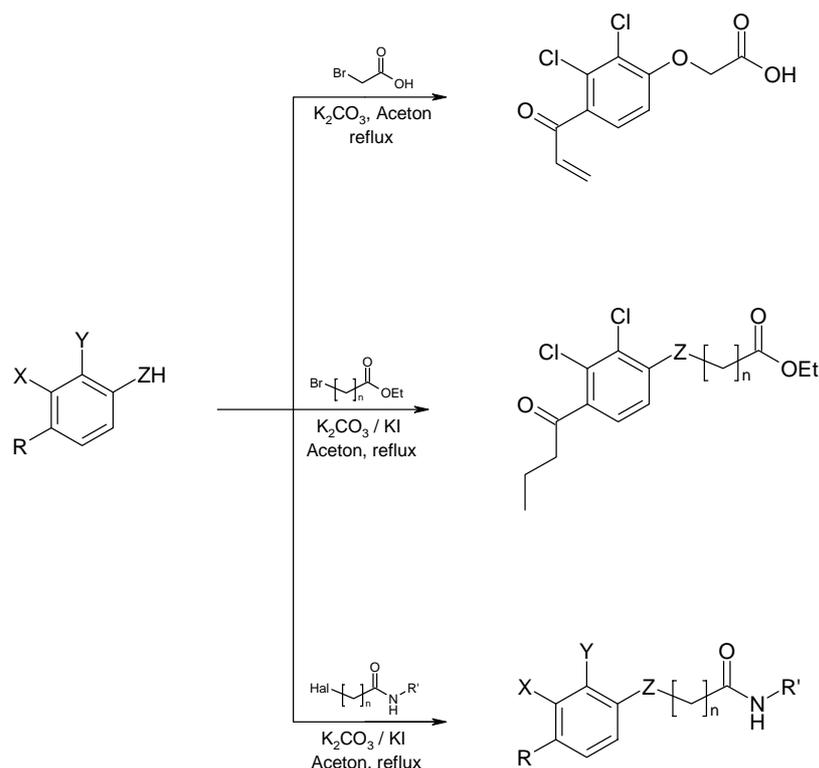
Schema 2–8: Synthese des Thiophenols MS12

Zur Umlagerung wurde **MS11** im Sandbad für 45 Minuten auf 200 °C erhitzt. Sowohl laut DC-Kontrolle als auch im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Reaktionsansatzes war eine quantitative Umsetzung zum *S*-Aryl-Thiocarbamat erkennbar. Die anschließende Carbamatspaltung zum Thiophenol **MS12** erfolgte durch mehrstündiges Refluxieren in Methanol/ KOH. **MS12** konnte dabei ebenfalls quantitativ (98% Ausbeute) isoliert werden. Um die Bildung von Disulfiden zu vermeiden, ist jedoch eine zügige weitere Umsetzung bzw. Lagerung unter inerter Atmosphäre ratsam.

2.2.3 Veretherung von Phenolen und Thiophenolen

Nach Erhalt der acylierten Phenole und Thiophenole schließt sich als nächster Schritt in der Synthesefolge die Veretherung der aromatischen Hydroxy- bzw. Mercaptofunktionen durch nucleophile Substitution an. Dies erfolgte mit Halogenderivaten der Carbonsäuren, wie sie in den Zielverbindungen vorliegen sollten.

Die dabei eingesetzten Halogencarbonsäuren und -carbonsäureester waren kommerziell erhältlich. Die Halogencarbonsäureamide mussten zuvor synthetisiert werden.



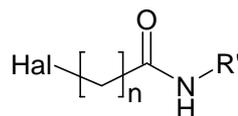
Schema 2–9: Veretherung der acylierten Halogenphenole und -thiophenole

Synthese der Bromessigsäure- und Chlorpropionsäureamide

Um die Synthese der Etacrynsäureamide und deren Strukturvarianten zu vereinfachen, sollte die Veretherung der acylierten Phenole bzw. Thiophenole (Kap. 2.2.1 und 2.2.2) bereits mit den jeweiligen Halogencarbonsäureamiden durchgeführt werden. Ziel war, nach erfolgter Veretherung in nur einem abschließenden Reaktionsschritt durch Mannich-Reaktion direkt zu den α - β -ungesättigten Amid-Derivaten zu gelangen. Die dazu notwendige Synthese der Halogencarbonsäureamide sollte zudem einfach, schnell und effizient durchzuführen sein.

Als Carbonsäure-Komponenten wurden zur Synthese Bromessigsäurebromid und 3-Chlorpropionsäurechlorid eingesetzt. Diese wurden bei tiefer Temperatur mit *tert*-Butyl-, *n*-Butyl-, *n*-Hexyl- und Benzylamin umgesetzt. Als Hilfsbase wurde Triethylamin verwendet.

Die Bromessigsäureamide **MS13**, **MS14**, **MS15** und **MS16** waren in guten Ausbeuten synthetisierbar und ließen sich durch Umkristallisieren oder Säulenchromatographie gut aufreinigen. Bei den 3-Chlorpropionsäureamiden waren Nebenreaktionen zu beobachten. Aufgrund des aciden Protons in 2-Position zur Carbonylgruppe in Verbindung mit dem Chlorid als guter Abgangsgruppe an C-3 ist neben der Substitution des Chlorids auch mit einer HCl-Eliminierung zu rechnen.



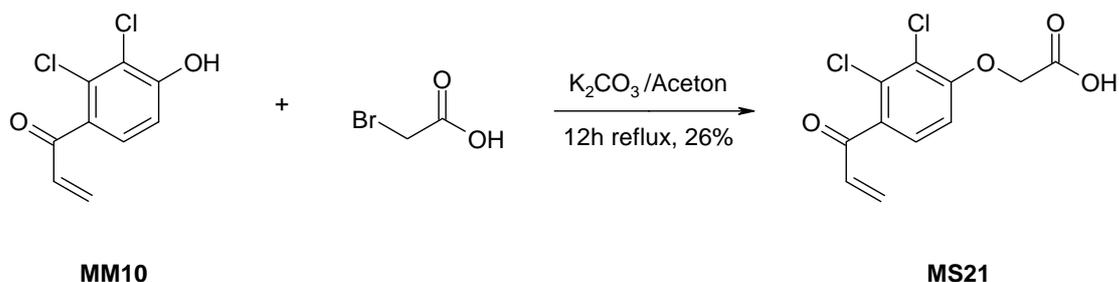
Produkt	Hal	n	R'	Ausbeute
MS13	Br	1	<i>tert</i> -butyl	62 %
MS14	Br	1	<i>n</i> -butyl	62 %
MS15	Br	1	<i>n</i> -hexyl	74 %
MS16	Br	1	benzyl	84 %
MS17	Cl	2	<i>tert</i> -butyl	62 %
MS18	Cl	2	<i>n</i> -butyl	33 %
MS19	Cl	2	<i>n</i> -hexyl	72 %
MS20	Cl	2	benzyl	57 %

Tab. 2–3: Darstellung der Halogencarbonsäureamide

Durch die Reaktionsführung bei tiefer Temperatur (– 30 bis – 50 °C) sollte diese Konkurrenzreaktion soweit wie möglich verhindert werden. Dennoch wurden neben den Chlorpropionsäureamiden auch Acrylsäure bzw. die jeweiligen Acrylamide gebildet. Durch die strukturelle Ähnlichkeit war die Abtrennung des Acrylamids vom Chlorpropionsäureamid durch Säulenchromatographie zum Teil nur mit erheblichem Ausbeuteverlust zu erreichen.

Veretherung mit Bromessigsäure

Im Falle des Acryloylphenols **MS10**, welches ja bereits das Michael-Fragment in sich trägt, stellt die Veretherung den letzten Syntheseschritt zum fertigen Etacrynsäure-Derivat dar. Daher konnte die Veretherung direkt mit Bromessigsäure in Aceton vorgenommen werden.^[81] Zur Aktivierung wurde das Acryloylphenol **MS10** zunächst mit Kaliumcarbonat gerührt, die Etherkupplung an die Bromessigsäure erfolgte unter Rückfluss. Nach Aufarbeitung konnte die Acryloyl-Etacrynsäure **MS21** in einer Ausbeute von 26 % erhalten werden.



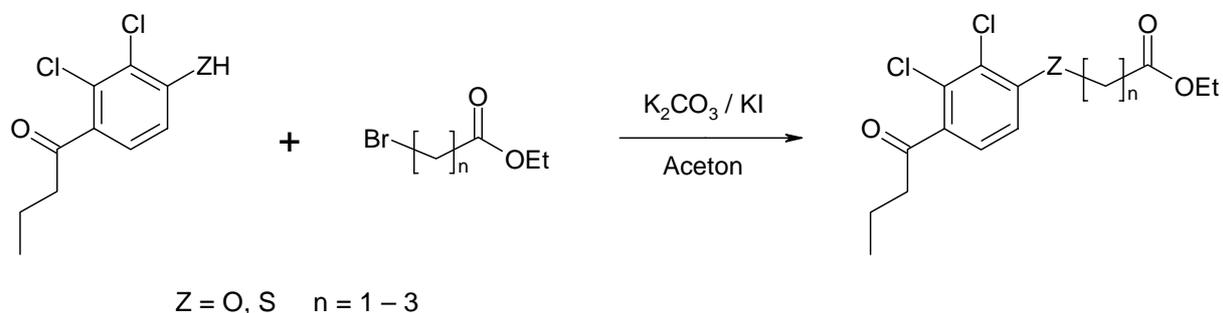
Schema 2–10: Synthese der Acryloyl-Etacrinsäure MS21

Veretherung mit Bromcarbonsäureestern

Durch die Veretherung des acylierten 2,3-Dichlorphenols **MS02** und -thiophenols **MS12** mit Halogencarbonsäureestern erhält man die entsprechenden Phenoxy-carbonsäureester bzw. Phenylsulfanyl-carbonsäureester als Vorstufen der jeweiligen Säure-Derivate der Etacrinsäure. Die 2,3-Dichlor-Substitution am aromatischen Ring bleibt erhalten. Durch die Verwendung homologer Carbonsäureester – von Essigsäure bis Buttersäure (C₂-C₄) – wird neben der Variation des Heteroatoms an Position 1 des Aromaten (O/S) eine weitere Diversifizierung bezüglich der Kettenlänge erreicht.

Die Reaktion wurde in Aceton durchgeführt. Zur besseren Substitution des Bromids wurde das (Thio)-phenol zunächst mit Kaliumcarbonat gerührt, um durch Deprotonierung dessen Nucleophilie zu erhöhen. Zusätzlich wurden 0.1 Äq Kaliumiodid als Katalysator zugesetzt, vom Ester wurde ein 1.2-facher Überschuss verwendet.

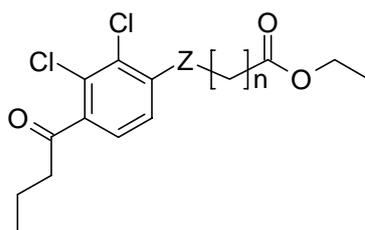
Der Phenoxyessigsäureester **MS22** sowie der Phenoxybuttersäureester **MS24** waren ausgehend vom Phenol **MS02** in guten Ausbeuten synthetisierbar (Tab. 2–4). Nach 3 bis 5 Stunden Reaktionsdauer unter Rückfluss war keine Produktzunahme mehr erkennbar.



Schema 2–11: Veretherung von 2,3-Dichlor-4-butyrylphenol bzw. -thiophenol

Nicht umgesetztes Phenol konnte durch basische Extraktion vollständig entfernt werden. Die Aufreinigung durch Säulenchromatographie gestaltete sich ebenfalls problemlos.

Die Verwendung des 3-Brompropionsäureesters zur Synthese des Phenoxypropionsäureesters **MS23** brachte ähnliche Probleme mit sich wie die Verwendung von 3-Chlorpropanoylchlorid bei der Synthese der 3-Chlorpropionsäureamide. Auch hier steht die Eliminierung in Konkurrenz zur Substitution des Halogenids. Bei der Veretherung wird die Eliminierung zusätzlich durch das Bromid als noch bessere Abgangsgruppe im Vergleich zu Chlorid sowie durch die hohe Temperatur begünstigt. Daher konnte der Ester **MS23** nur in 0.5 % Ausbeute erhalten werden. Über 90 % des eingesetzten Phenols wurden nach der Reaktion unverändert reisoliert. Die Änderung der Reaktionsbedingungen führte nicht zur Verbesserung. Für eine Umsetzung bei Raumtemperatur erwies sich das Phenol als zu unreaktiv. Auch nach mehreren Tagen Rühren war keine Produkt-Bildung zu beobachten.



Produkt	Z	n	Rx-Dauer, T [°C]	Ausbeute
MS22	O	1	4 h reflux	85 %
MS23	O	2	3 h reflux	0.5 %
	O	2	5 d RT	0 %
MS24	O	3	5 h reflux	79 %
MS25	S	1	5 d RT	85 %
MS26	S	2	5 d RT	78 %
MS27	S	3	7 d RT	94 %

Tab. 2–4: Veretherung von **MS02** und **MS12** mit Halogencarbonsäureestern

Im Falle des Thiophenols **MS12** führten schon bedeutend mildere Bedingungen zum Erfolg. Durch die erhöhte Nucleophilie des Thiolats gegenüber dem Phenolat war die Umsetzung mit allen drei homologen Bromcarbonsäureestern bereits bei Raumtemperatur

möglich. Die Produkte wurden in guten bis sehr guten Ausbeuten synthetisiert (vgl. Tab. 2–4). Durch diese Möglichkeit, die Rückflussbedingungen zu vermeiden, wurde die Synthese in zwei Aspekten günstig beeinflusst. Bei der Umsetzung des Thiophenols mit 3-Brompropionsäureethylester bei Raumtemperatur wird die Eliminierung zum Acrylester weitestgehend unterdrückt. Die Veretherung liefert das angestrebte Hauptprodukt **MS26** in 78 % Ausbeute. Weiterhin kann eine mögliche Verunreinigung des Thiophenols **MS12** mit noch vorhandenem Phenol an dieser Stelle elegant entfernt werden. Verläuft die Newman-Kwart-Umlagerung zum *S*-Aryl-Thiocarbamat nicht quantitativ, so liefert die anschließende Hydrolyse als Nebenprodukt das ursprünglich eingesetzte Phenol **MS02** (vgl. Kap. 2.2.2). Eine Aufreinigung an dieser Stelle der Synthese kann zu erheblichen Ausbeuteverlusten führen (Mischfraktionen bei SC, vermehrte Disulfidbildung durch Behandlung an der Luft, etc.). Darauf kann in diesem Fall verzichtet werden, da die Veretherung bei Raumtemperatur nur mit dem Thiophenol und nicht mit dem Phenol erfolgt. Das nicht umgesetzte Phenol lässt sich bei der Aufarbeitung nach der Veretherung durch basische Extraktion (KOH-Lösung, 5-10%) vollständig entfernen.

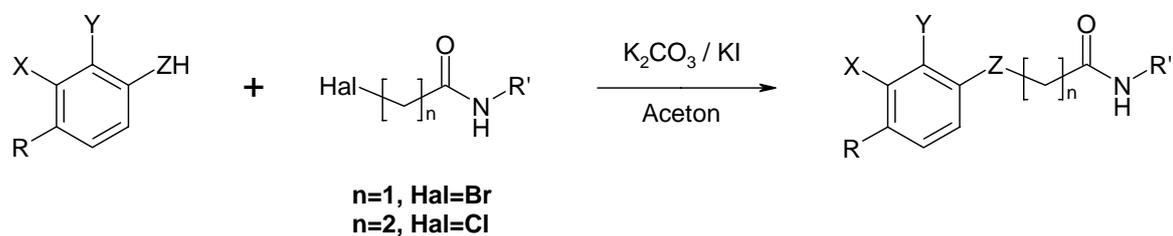
Veretherung mit Halogencarbonsäureamiden

Wie frühere Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe zeigten,^[65,71] besitzen die Amide der Etacrynsäure im Vergleich zur freien Säure ein erhöhtes inhibitorisches Potential gegen die SARS-CoV-M^{pro}. Daher stellten die Amid-Derivate der Etacrynsäure (vgl. Kap. 2.2.5) ein vorrangiges Synthesziel dar. Die Umsetzung der (Thio)-phenole mit Halogencarbonsäureamiden war dabei als Vereinfachung in der Synthesesequenz geplant, indem schon bei der Veretherung der „fertige“ Amid-Teil des Moleküls eingeführt wird. Die Ausbildung des Michael-Systems sollte dann durch eine Mannich-Reaktion als letzte Synthesestufe vorgenommen werden.

Da die Veretherung, wie bei der Synthese der Phenoxycarbonsäureester bzw. Phenylsulfanylcarbonsäureester, durch Substitution an Halogencarbonsäurederivaten mit *O*- bzw. *S*-Nucleophilen vorgenommen wurde, waren quasi identische Ausgangsbedingungen geschaffen. Die Verwendung von Amiden anstelle von Estern ließ keinen erheblichen Einfluss auf die Umsetzung erwarten. Zudem wurde diese Strategie schon bei der Synthese von Fluor-Derivaten der Etacrynsäure erfolgreich eingesetzt.^[86,87]

Die Veretherung mit Halogencarbonsäureamiden wurde daher analog zur Veretherung mit Halogencarbonsäureestern durchgeführt (s. o.). Die Reaktion erfolgte mit Kaliumcarbonat als Base in Aceton, unter Zusatz von 0.1 Äq Kaliumiodid. Als Carbonsäurederivate

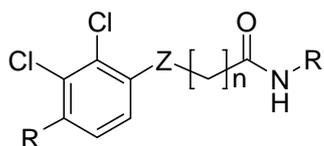
wurden Amide von Bromessigsäure bzw. 3-Chlorpropionsäure in 1.2 bis 2-fachem Überschuss eingesetzt (vgl. Schema 2–12).



Schema 2–12: Veretherung mit Halogencarbonsäureamiden

Die Ausbeuten der Synthesen sind ähnlich denen der Ester-Derivate. Mit Verbindung **MS08** wurde ein Derivat ohne Acyl-Seitenkette dargestellt. Die Synthese erfolgte – ausgehend von 2,3-Dichlorphenol – als Modellverbindung, um die nachträgliche Friedel-Crafts-Acylierung von Phenoxyessigsäureamiden mit Crotonsäurechlorid zu testen (vgl. Kap. 2.2.1). Die Ausbeute an **MS08** lag mit 76 % nach 5 h unter Rückflussbedingungen ebenfalls im Bereich der acylierten Phenoxyessigsäureester.

Bei den Phenoxypropionsäureamiden **MS28** und **MS29** wurden die Ausbeuten durch die schon erwähnte Eliminierung als Konkurrenz zur Substitution erheblich gemindert. Dennoch lagen sie mit 6 % bzw. 9 % über der des Ester-Derivats **MS23** (0.5 %).

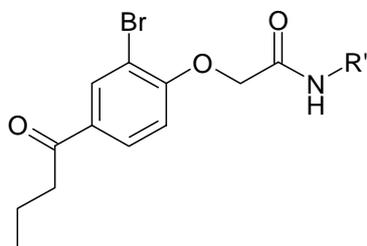


Produkt	R	Z	n	R'	Äq Amid	Rx-Dauer, T [°C]	Ausbeute
MS08	H	O	1	<i>tert</i> -butyl	2	5 h reflux, 3d RT	76 %
MS28	butyryl	O	2	<i>n</i> -butyl	2	8 h reflux	9 %
MS29	butyryl	O	2	<i>tert</i> -butyl	2	6 h reflux	6 %
MS30	butyryl	S	1	<i>tert</i> -butyl	2	5 d RT	71 %
MS31	butyryl	S	1	<i>n</i> -butyl	1.2	24 h RT	84 %
MS32	butyryl	S	1	benzyl	1.2	24 h RT	90 %

Tab. 2–5: Veretherung von 2,3-Dichlorphenol, MS02 und MS12

Die Veretherung des Thiophenols **MS12** zu den Amiden **MS30**, **MS31** und **MS32** verlief ebenfalls mit guten bis sehr guten Ausbeuten. Die gute Nucleophilie des Thiolats ermöglichte sowohl eine Reaktion bei Raumtemperatur als auch einen geringeren Überschuss an Halogencarbonsäureamid ohne Ausbeuteeinbußen.

Die Veretherung von 2-Brom-4-butyrylphenol (**MS03**) wurde unter analogen Bedingungen mit 2 Äquivalenten des jeweiligen Bromessigsäureamids durchgeführt (vgl. Schema 2–12). Zur Aufreinigung von **MS34** und **MS35** war zusätzlich zur Säulenchromatographie eine Umkristallisation aus Methanol erforderlich, um überschüssiges als Edukt eingesetztes Amid zu entfernen. Die Ausbeuten lagen mit 22 – 61 % im moderaten bis guten Bereich.



Produkt	R'	Äq Amid	Rx-Dauer, T [°C]	Ausbeute
MS33	<i>tert</i> -butyl	2	4 h reflux	61 %
MS34	<i>n</i> -butyl	2	4 h reflux	22 %
MS35	<i>n</i> -hexyl	2	4 h reflux	48 %
MS36	benzyl	2	4 h reflux	34 %

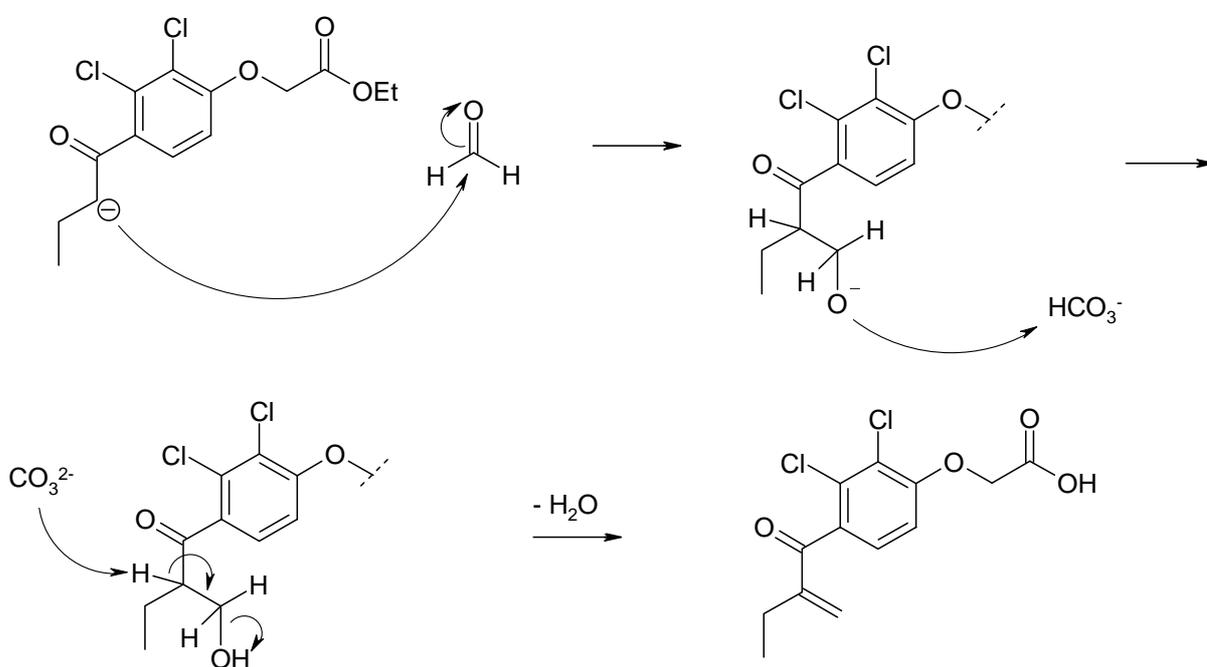
Tab. 2–6: Veretherung von **MS03**

2.2.4 Einführung der Doppelbindung unter Ausbildung des Michael-Systems

Mit der Ausbildung des Michael-Systems erhalten die Etacrynsäure-Derivate das Strukturelement, welches ihnen die Reaktion mit Thiolat- und Thiolresten von Cystein-Proteasen ermöglicht und dadurch deren Inhibition bewirken kann. Die dazu notwendige Einführung der C-C-Doppelbindung in der α -Position der Acylseitenkette der in Kap. 2.2.3 beschriebenen Ester und Amide kann auf vielerlei Weisen erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden dafür die Aldolkondensation mit Formaldehyd sowie die Mannich-Reaktion angewandt.

Aldolkondensation

Die Aldolkondensation ist eine vielfach eingesetzte Reaktion zur Darstellung α - β -ungesättigter Aldehyde und Ketone. Erster Schritt ist dabei die Bildung des Enolats der eingesetzten Carbonylverbindung durch Einwirkung einer geeigneten Base. Durch nucleophilen Angriff des Enolats am Carbonyl-Kohlenstoff eines zweiten Ketons bzw. Aldehyds kommt es zur Knüpfung der C-C-Bindung (Aldoladdition) mit einer β -Hydroxy-Carbonylverbindung („Aldol“ bzw. „Ketol“) als Zwischenprodukt. In der Wärme und unter Basenkatalyse wird die Hydroxyfunktion leicht eliminiert, unter Wasserabspaltung erhält man das α - β -ungesättigte Produkt (Aldolkondensation).

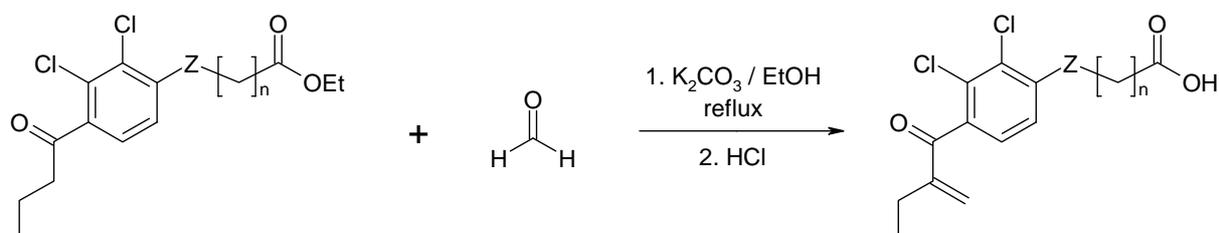


Schema 2–13: Mechanismus der Aldolkondensation am Beispiel der Etacrynsäure

Bei der Etacrynsäure-Synthese hat sich die Aldolkondensation zur Einführung des Michael-Systems ebenfalls bewährt.^[71] Dazu wird der acylierte Phenoxyessigsäureester mit Formaldehyd in Anwesenheit von Kaliumcarbonat umgesetzt. Die Phenoxy-carbonsäureester mit der Acyl-Seitenkette als enolisierbare Carbonylspezies stellen geeignete Edukte dar. Die Richtung der Enolatbildung ist bezüglich der Regioselektivität eindeutig, da nur der β -Kohlenstoff der Acyl-Seitenkette ein acides Proton trägt. Das gebildete Enolat greift den eingesetzten Formaldehyd unter Ausbildung der C-C-Bindung an. Durch Erhitzen in wässriger ethanolischer Lösung erhält man nach der Wasserabspaltung und gleichzeitiger Esterhydrolyse die entsprechenden Etacrynsäure-Derivate. Eine

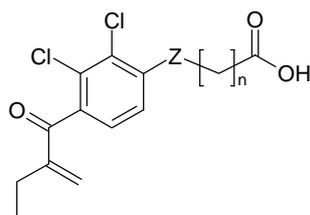
Aldolkondensation zweier Phenoxycarbonsäurederivate ist sowohl sterisch als auch thermodynamisch benachteiligt und konnte in keinem Fall beobachtet werden.

Die praktische Durchführung erfolgte durch Behandlung der Ester **MS22**, **MS24**, **M08**, **MS26** und **MS27** mit Formaldehyd (40% wässrige Lösung) und Kaliumcarbonat in Ethanol/Wasser unter Rückflussbedingungen.



Schema 2–14: Aldolkondensation der Phenoxy- und Phenylsulfanylcarbonsäureester mit Formaldehyd

Nach maximal 6 Stunden war bereits eine vollständige Umsetzung erreicht. Die freien Säuren **MS37**, **MS38**, **MS40** und **MS41** konnten nach Überführung in kalte halbkonzentrierte Salzsäure als Feststoffe ausgefällt werden. Die auf diese Weise isolierten Rohprodukte enthielten noch ca. 10% nicht umgesetzten Ester. Die weitere Aufreinigung erfolgte durch Umkristallisation aus Benzol bzw. Toluol.



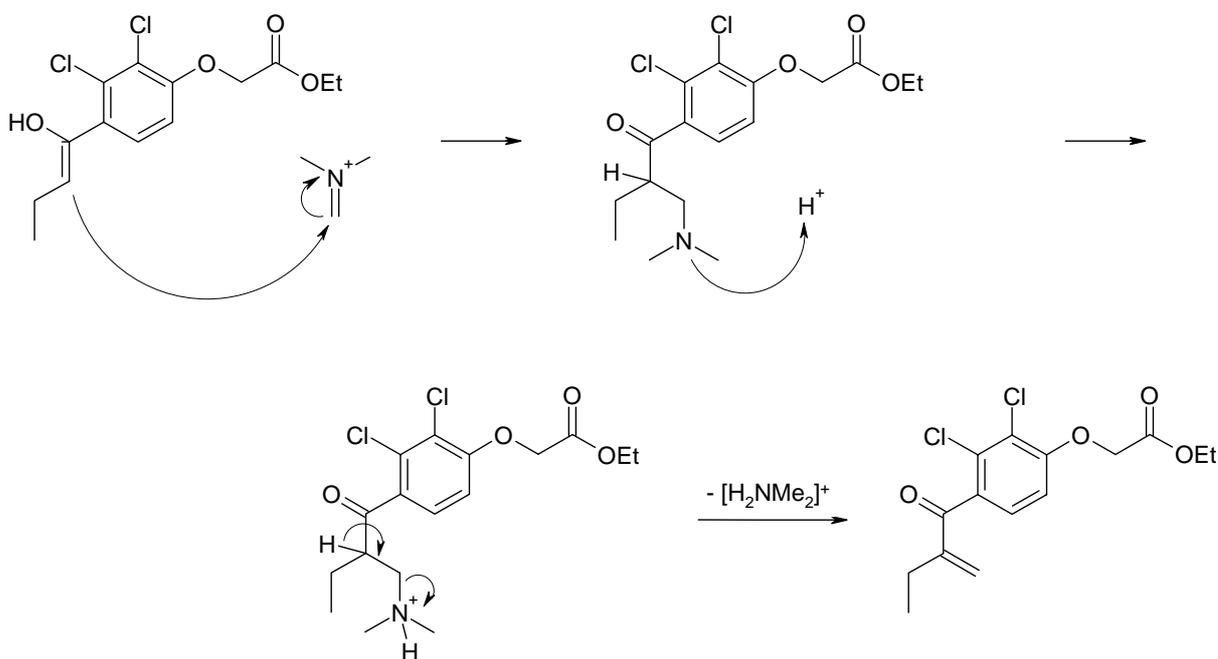
Produkt	Z	n	Rx-Dauer, T [°C]	Ausbeute
MS37	O	1	5 h reflux	40 %
MS38	O	3	6 h reflux	96 %
MS39	S	1	5 h reflux	1 %
MS40	S	2	5 h reflux	36 %
MS41	S	3	6 h reflux	74 %

Tab. 2–7: Darstellung der Etacrynsäure und weiterer Säure-Derivate durch Aldolkondensation

Bei der Säure **MS39** gelang das Ausfällen in salzsaurer Lösung nicht. Das Rohprodukt konnte jedoch nach Extraktion in guter Ausbeute erhalten werden. Die Aufreinigung erfolgte durch präparative HPLC. Dabei konnte aus einigen Fraktionen schon ein Teil des reinen Produktes isoliert werden, welches nach Entfernen des organischen Anteils aus der wässrigen Phase auskristallisiert war. Das anschließende Lyophilisieren der einzelnen Fraktionen erbrachte keine Steigerung der Ausbeute. Offensichtlich neigt die Verbindung zur Sublimation, was bei der Gefriertrocknung zu erheblichen Verlusten führt.

Mannich-Reaktion mit TMDM

Unter der Mannich Reaktion im klassischen Sinn versteht man die Aminomethylierung einer CH-aciden Verbindung – beispielsweise einer Carbonylverbindung – mit einem Dialkylamin und Formaldehyd. Zunächst kommt es durch Reaktion desamins mit dem Formaldehyd zur Bildung eines Iminium-Ions. Greift nun das Enol der CH-aciden Komponente das Iminium-Ion nucleophil an, bildet sich unter C-C-Verknüpfung die β -Amino-carbonylverbindung (Mannich-Base).



Schema 2–15: Mechanismus der Mannich Reaktion

Alternativ zur Variante Dialkylamin/Formaldehyd lassen sich weitere Reagenzien für die Aminomethylierung verwenden. Eines davon ist TMDM (*N,N,N',N'*-Tetramethyldiaminomethan). Durch die Aminal-Funktionalität der Methylengruppe dient es als Aldehyd-

Äquivalent und kann in Gegenwart von Acetanhydrid oder Trifluoressigsäure ebenfalls Iminium-Ionen bilden.

Damit ist die direkte Darstellung von α - β -ungesättigten Carbonylverbindungen unter milden Mannich-Bedingungen möglich. Der Zwischenschritt der Isolierung der Mannich-Base vor der abschließenden Desaminierung entfällt. Arylalkylketone, die den Verbindungen in Kap. 2.2.3 ähneln – sind als Edukte für diesen Reaktionstyp schon lange in der Literatur bekannt.^[88,89]

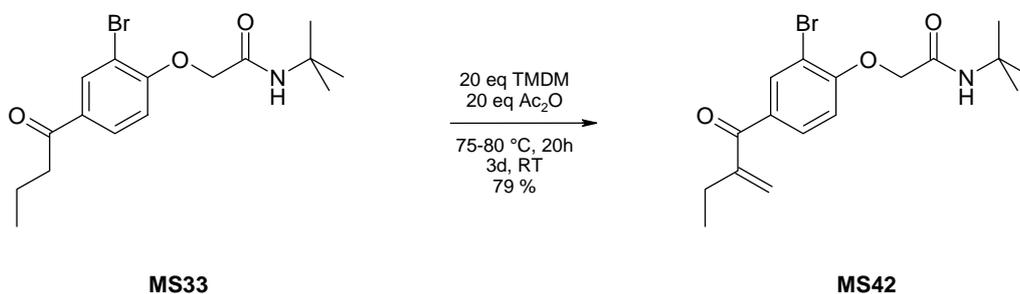
Die Mannich-Reaktion mit TMDM wurde bereits bei der Synthese von Etacrynsäureethylestern^[71] und ähnlichen Verbindungen^[78] erfolgreich angewandt. Sie diene dabei zur Einführung des Michael-Systems in die Acyl-Seitenkette des Aromaten. Im Gegensatz zur Aldolkondensation war hier die Einführung der Doppelbindung ohne Hydrolyse des Esters als erwünschte oder unerwünschte Nebenreaktion möglich. In der vorliegenden Arbeit sollte die Mannich-Reaktion zur Synthese von Amiden der Etacrynsäure-Derivate aus den acylierten Phenoxy-carbonsäureamiden eingesetzt werden. Die gewünschten Zielverbindungen sind dadurch, ausgehend vom acylierten Phenol bzw. Thiophenol, in nur zwei weiteren Reaktionsschritten – der Veretherung und der Mannich-Reaktion – zugänglich.

Die erste Umsetzung erfolgte mit 2-Brom-4-butyrylphenoxyessigsäure-*tert*-butylamid (**MS33**). Dieses wurde mit je 20 Äquivalenten TMDM und Acetanhydrid gerührt. Der Reaktionsverlauf konnte NMR-spektroskopisch verfolgt werden, indem die Zunahme der Signale der neu gebildeten Methylen-Protonen des Michael-Systems verfolgt wurde. Mit der Ausbildung des Michael-Systems ist auch eine Verschiebung der Aromaten-Signale zu beobachten, wodurch verbliebenes Edukt detektierbar wird. Diese Methode ist deshalb Mittel der Wahl, da eine Reaktionskontrolle mittels DC aufgrund der fast identischen R_f -Werte von Edukt und Produkt nicht aussagekräftig ist. Dieser Umstand macht bei unvollständiger Umsetzung auch eine Aufreinigung des Produktes mittels Säulenchromatographie weitgehend unmöglich.

Zur Aufarbeitung wurde zum Abfangen der Essigsäure mit gesättigter Kaliumcarbonatlösung extrahiert. Die Umsetzung von **MS33** lieferte nach 20 h Reaktionszeit bei 75-80 °C und weiteren drei Tagen bei Raumtemperatur das Brom-Derivat **MS42** in einer Ausbeute von 79%.

Verbindung **MS42** stellt das Brom-Analogon zum Etacrynsäure-*tert*-butylamid dar, welches in früheren Untersuchungen aus einer Reihe von Etacrynsäure-Amiden als potentester Inhibitor der SARS-CoV-M^{pro} identifiziert wurde (vgl. Kap. 1.4.4).^[71] Testungen von

MS42 an der SARS-CoV-M^{pro} zeigten jedoch keine inhibitorische Aktivität dieses Brom-Derivats.



Schema 2–16: Mannich-Reaktion zu MS42

Da aufgrund dieses Ergebnisses von ähnlichen Verbindungen dieses Typs, deren 2,3-Dichlor-Analoga jeweils geringere Inhibition als das Etacrynsäure-*tert*-butylamid zeigten, ebenfalls keine Enzym-Inhibition zu erwarten war, wurde die Synthese weiterer Brom-Derivate nicht verfolgt.

Bei der Umsetzung weiterer Phenoxy-carbonsäureamide (**MS28**) bzw. Phenylsulfanyl-carbonsäureamide (**MS30**, **MS31**) mit 2,3-Dichlorsubstitution am aromatischen Ring erwies sich die Mannich-Reaktion mit TMDM/Acetanhydrid als nicht praktikabel. In keinem Fall konnte das angestrebte Produkt erhalten werden. Im Gegensatz zu den Estern scheinen Amide in Kombination mit der 2,3-Dichlorsubstitution am Aromaten keine geeigneten Ausgangsverbindungen für derartige Reaktionen zu sein.

2.2.5 Synthese von Amid-Derivaten der Etacrynsäure

Die Ausbildung einer Amidbindung zwischen einer Carbonsäure und einem Amin macht den Einsatz geeigneter Kupplungsreagenzien erforderlich. Diese überführen die reaktionsträge Carbonsäure in eine reaktivere Spezies, wie beispielsweise einen Aktivester oder ein Anhydrid, und ermöglichen so die Amidkupplung unter milden Reaktionsbedingungen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kamen folgende Strategien zur Carbonsäureaktivierung zur Verwendung:

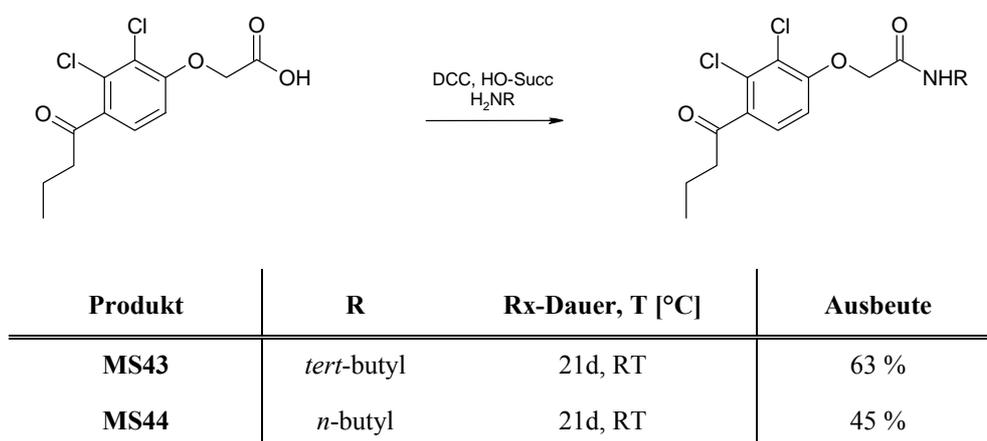
- Säurechlorid: Generierung des Säurechlorids durch Refluxieren mit Thionylchlorid (SOCl₂) (siehe Kap. 2.4)

- DCC/HOSuc: Aktivierung mit DCC (*N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid) und Bildung des Hydroxysuccinimid-Aktivesters durch Zugabe von *N*-Hydroxysuccinimid
- DPPA: Aktivierung mit Diphenylphosphorylazid (siehe Kap. 2.3)
- EEDQ: Aktivierung mit 1-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin (siehe Kap. 2.3)

Für die in diesem Kapitel beschriebenen Kupplungsreaktionen wurden ausschließlich DCC/HOSuc verwendet. Als Carbonsäure-Komponente diente 2,3-Dichlor-4-butyrylphenoxyessigsäure sowie die verschiedenen durch *O/S*-Austausch bzw. Variation der Carbonsäure-Seitenkette dargestellten Etacrynsäure-Derivate **MS38**, **MS40** und **MS41**.

Phenoxyessigsäureamide

Der postulierte Inhibitionsmechanismus der bereits bekannten Etacrynsäureamide^[65] verläuft über die Inaktivierung des Cystein-Restes durch Angriff des Schwefels am Michael-System der Etacrynsäure. Die Amid-Reste sorgen durch Wasserstoffbrücken-Wechselwirkungen für zusätzliche Affinität des Inhibitors zum Enzym. Zur experimentellen Evaluierung des Hemmmechanismus wurden daher Analoga der wirksamsten Inhibitoren, jedoch ohne Michael-System, synthetisiert (Tab. 2–8).



Tab. 2–8: Amidkupplung an 2,3-Dichlor-4-butyrylphenoxyessigsäure

Die Synthese erfolgte ausgehend von 2,3-Dichlor-4-butyrylphenoxyessigsäure mittels DCC-/Hydroxysuccinimid-Aktivierung in wasserfreiem Dichlormethan. Nach Bildung des Aktivesters konnte nach 2 Stunden Rühren bei Raumtemperatur vom entstandenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert werden. Nach Zugabe des Amins wurde zur Amidbildung

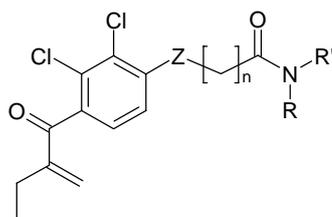
mehrere Tage bei Raumtemperatur gerührt. Beide Derivate (**MS43**, **MS44**) konnten nach Säulenchromatographie in moderater bis guter Ausbeute erhalten werden.

Amide von Etacrynsäurederivaten

Die Amidsynthese aus den Carbonsäure-Derivaten **MS38**, **MS40** und **MS41** ist der letzte Schritt zur Darstellung der angestrebten Verbindungen. Zum direkten Vergleich mit den bereits getesteten Inhibitoren der SARS-CoV-M^{Pro} wurden von jeder Säure jeweils das *tert*-Butyl- bzw. *n*-Butyl-Amid synthetisiert, um die Einflüsse des Austauschs der Heteroatome und der Variation der Kettenlänge direkt vergleichen zu können. Weiterhin wurde mit dem Hexylamid eine längere, flexible Alkylkette in das Molekül eingebaut. Als Alternative dazu sollte die Einführung eines aromatischen Restes durch das Benzylamin eine mögliche Wechselwirkung mit lipophilen Regionen bzw. aromatischen Resten in der Bindetasche des Enzyms unterstützen. Bei der Analytik der synthetisierten Verbindungen wurde festgestellt, dass es sich – offensichtlich aufgrund eines Fehlers des Lieferanten – bei dem eingesetzten *n*-Butylamin in Wahrheit um Dibutylamin handelte. Dies war auch bei dem deuterierten Derivat **MS62** der Fall (siehe Kap. 2.3.2). Dadurch wurde in diesen Fällen bei der Synthese das Amin nicht stöchiometrisch eingesetzt. Die angegebenen Ausbeuten beziehen sich auf die Stoffmenge von Dibutylamin.

Sämtliche Amide wurden ebenfalls über den Hydroxysuccinimid-Aktivester nach DCC-Aktivierung in Dichlormethan dargestellt. Nach der Aktivierung wurde der unlösliche Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, der Aktivester mit einer Lösung des jeweiligenamins versetzt und mehrere Tage bei Raumtemperatur gerührt. Da nach einem ersten Ansatz mit 20 Tagen Reaktionszeit keine vollständige Umsetzung zu beobachten war, wurde die Reaktionszeit im Folgenden auf 14 Tage reduziert, was ohne signifikante Ausbeuteeinbußen möglich war. Zur Aufarbeitung wurden die Ansätze bis zur Trockne eingengt und nach Aufnahme in Ethylacetat jeweils mit verdünnter HCl und NaOH-Lösung gewaschen, um Reste an verbliebenem Amin bzw. Säure zu entfernen. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt, wonach die angestrebten Amide in moderaten bis guten Ausbeuten erhalten werden konnten (siehe Tab. 2–9).

Da nach diesem abschließenden Syntheseschritt alle Amide in ausreichender Menge und Reinheit isoliert werden konnten, wurde auf weitere Versuche zur Synthese-Optimierung durch alternative Kupplungsreagenzien und andere Änderungen der Reaktionsparameter verzichtet.



Produkt	Z	n	R	R'	Rx-Dauer, T [°C]	Ausbeute
MS45	O	3	H	<i>tert</i> -butyl	20d, RT	51 %
MS46	O	3	<i>n</i> -butyl	<i>n</i> -butyl	20d, RT	44 %
MS47	O	3	H	<i>n</i> -hexyl	20d, RT	25 %
MS48	O	3	H	benzyl	14d, RT	53 %
MS49	S	2	H	<i>tert</i> -butyl	14d, RT	57 %
MS50	S	2	<i>n</i> -butyl	<i>n</i> -butyl	14d, RT	63 %
MS51	S	2	H	<i>n</i> -hexyl	14d, RT	56 %
MS52	S	2	H	benzyl	14d, RT	66 %
MS53	S	3	H	<i>tert</i> -butyl	14d, RT	36 %
MS54	S	3	<i>n</i> -butyl	<i>n</i> -butyl	14d, RT	81 %
MS55	S	3	H	<i>n</i> -hexyl	14d, RT	62 %
MS56	S	3	H	benzyl	14d, RT	48 %

Tab. 2–9: Darstellung der Amide aus den Säure-Derivaten MS38, MS40 und MS41

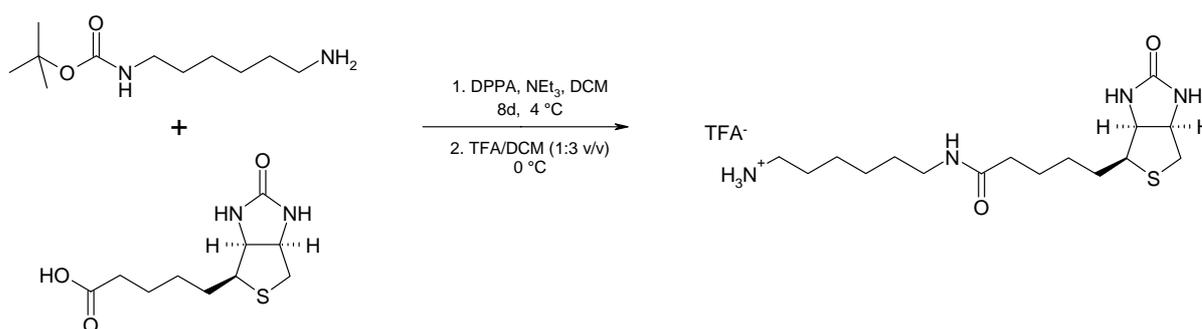
2.3 Synthese markierter Etacrynsäure-Derivate

Neben den bisher beschriebenen Etacrynsäure-Derivaten, die als Enzym-Inhibitoren vorgesehen waren, wurden zusätzlich speziell markierte Analoga der Etacrynsäure bzw. ihrer Derivate synthetisiert. Dazu wurde einerseits die Etacrynsäure über eine *spacer*-Einheit mit Biotin verknüpft. Dieses dient als Ankergruppe zur Detektion des Wirkstoffes in mikro- und immunobiologischen sowie Protein-chemischen Assays. Weiterhin wurden von der Etacrynsäure ein vielfach deuteriertes Analogon sowie drei daraus gewonnene Amide synthetisiert. Die deuterierte Etacrynsäure dient als Modellsubstanz zum *In-vitro*-Nachweis von *d*-markierten Wirkstoffen in Gewebe durch **CARS**-Mikroskopie (*Coherent Anti-Raman-Spectroscopy*). Die Streckschwingung der C-D-Bindung ist Raman-aktiv und kann durch zwei speziell abgestimmte Laserpulse orts aufgelöst detektiert werden. C-H-Schwingungen besitzen keine Raman-Aktivität und treten somit nicht als störende Banden im aufgenommenen Spektrum auf. Die C-D-Schwingung ist daher spezifisch für den

markierten Wirkstoff, der in normaler Umgebung unter physiologischen Bedingungen als einzige deuterierte Spezies im untersuchten Medium (Gewebeschnitt o.ä.) vorliegt. Ziel ist es, durch die Information über Wirkstoffverteilung und -lokalisierung Rückschlüsse auf mögliche Targets, Rezeptoren oder den Wirkmechanismus ziehen zu können.

2.3.1 Synthese von Biotin-markierter Etacrynsäure (Eta-bADA)

Zur Biotinylierung der Etacrynsäure wurden die Säurefunktionen der beiden Komponenten mittels eines 1,6-Hexyldiamin-*spacers* über zwei Amidbindungen verknüpft. Als zweckmäßig erwies sich hierbei die Synthese ausgehend von einfach Boc-geschütztem 1,6-Hexyldiamin. Die DPPA-vermittelte Kupplung^[90] (DPPA = Diphenylphosphorylazid) mit der freien Aminofunktion des *spacers* liefert im ersten Schritt das biotinylierte Amid. Die Reaktionsführung der DPPA-Kupplung erforderte eine Reaktion über mehrere Tage bei 4 °C (Kühlraum) in DMF. Dabei konnte das noch geschützte *spacer*-Biotin-Fragment erhalten werden. Diese Reaktionsbedingungen sind notwendig, um etwaige Nebenreaktionen, wie die Curtius-Umlagerung des Säureazids zum Isocyanat, zu unterdrücken. Durch weitere Reaktion mit der Aminkomponente ist dabei die Bildung von Harnstoffderivaten an Stelle der gewünschten Amide möglich. Dies wird bei tiefer Temperatur vermieden. Gleichzeitig ist daher jedoch die längere Reaktionszeit von mehreren Tagen in Kauf zu nehmen. Eine möglichst hohe Konzentration im Reaktionsansatz, d. h. die Verwendung möglichst geringer Lösungsmittelmengen, fördert ebenfalls die Amidbildung.

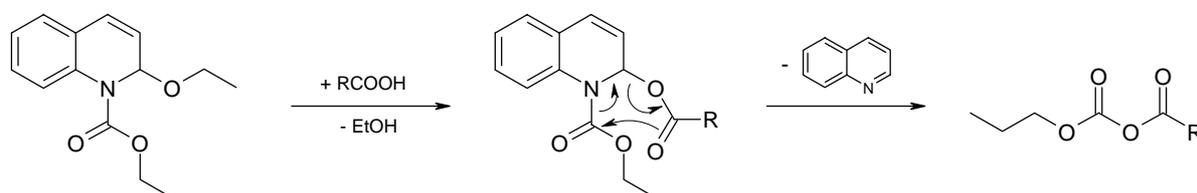


Schema 2–17: DPPA-vermittelte Kupplung von D-Biotin an den 1,6-Hexyldiamin-*spacer*

Zur weiteren Umsetzung wurde die Boc-Schutzgruppe durch wiederholte Behandlung mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan entfernt. Die quantitative Freisetzung des Amins konnte NMR-spektroskopisch bestätigt werden. Überschüssige Trifluoressigsäure wurde

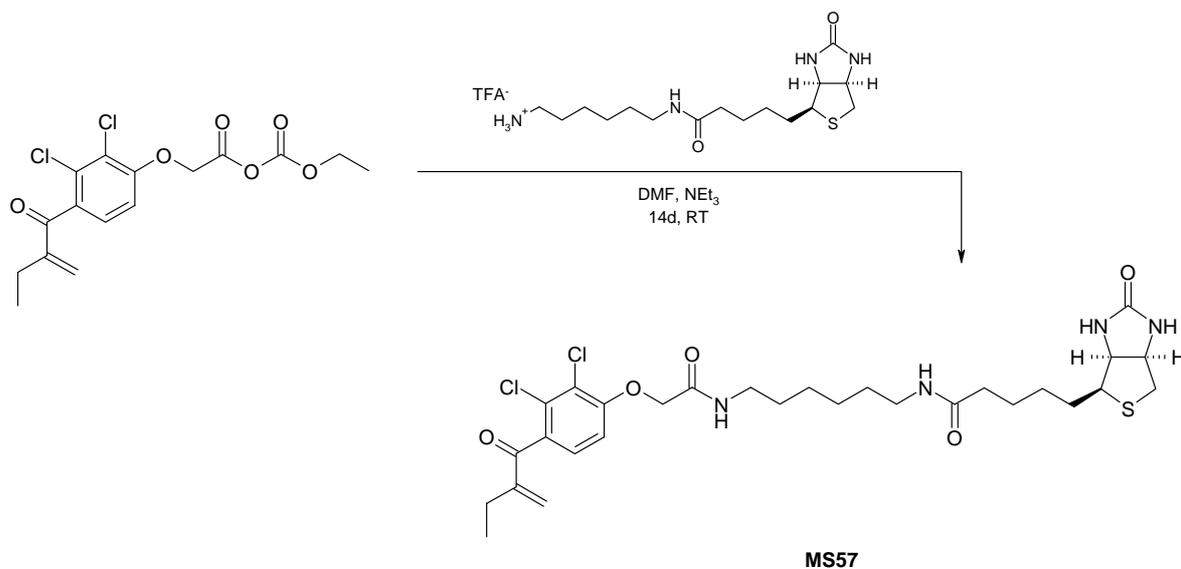
durch sukzessives Versetzen mit Dichlormethan und anschließendes Einengen im Vakuum vollständig entfernt. Danach konnte das TFA-Salz des Biotin-Fragmentes ohne Verunreinigungen erhalten werden (Ausbeute: 19%).

Die abschließende Kupplung an die Etacrynsäure verlief über EEDQ-Aktivierung^[91] (EEDQ = 1-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin). An diesem Chinolin-Derivat ist die Ethoxygruppe in 2-Position des Aromaten leicht durch die Carboxylat-Komponente substituierbar. Diese Zwischenstufe kann über einen sechsgliedrigen Übergangszustand unter Freisetzung von Chinolin das gemischte Anhydrid aus Ethoxycarbonyl- und eingesetztem Carbonsäurefragment bilden. Ein Zusatz von Base ist in diesem Fall nicht erforderlich.



Schema 2–18: Mechanismus der Säureaktivierung mit EEDQ

Die Spaltung des gemischten Anhydrids durch ein Nucleophil ist prinzipiell an beiden Carbonylfunktionen möglich. Um die Bildung des Amids zu favorisieren, muss die Reaktivität am „Carbonsäure“-Teil des Anhydrids gegenüber der des „Formiat“-Teils erheblich erhöht sein. Ist dies nicht der Fall, ist mit der Bildung des Urethans als unerwünschte Nebenreaktion zu rechnen, die den Einsatz dieser Kupplungsmethode erheblich stören oder sie sogar für synthetische Zwecke unbrauchbar machen kann. Bei der durchgeführten Kupplung an die Etacrynsäure waren jedoch keinerlei Nebenreaktionen zu beobachten. Die „Säure“-Carbonylfunktion wird durch den Phenoxyessigsäurerest so stark aktiviert, dass die Urethanbildung vollkommen in den Hintergrund tritt. Ein weiterer Vorteil der Methode ist die einfache Aufreinigung, da als Nebenprodukte der Aktivierung nur Ethanol, CO₂ und Chinolin anfallen. Dafür muss allerdings eine geringere Ausbeute in Kauf genommen werden. Bei der Synthese von **MS57** fiel das Endprodukt während der Aufarbeitung als Feststoff an und konnte einfach durch Absaugen und Waschen in sehr guter Reinheit und mit 26 % Ausbeute erhalten werden.



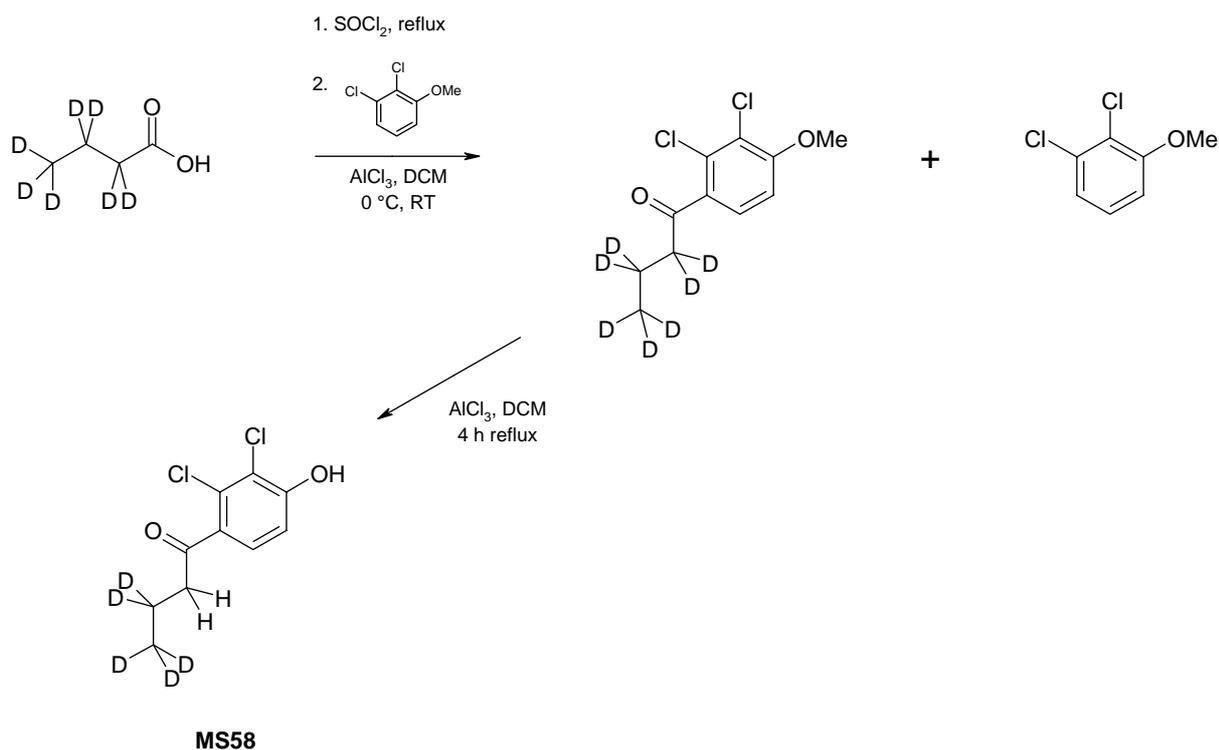
Schema 2–19: Umsetzung des gemischten Anhydrids zum biotinylierten Derivat MS57

2.3.2 Synthese Deuterium-markierter Etacrynsäure-Derivate

Zur Synthese der deuterierten Etacrynsäure und davon abgeleiteter Derivate musste die bereits verwendete Synthesestrategie nur geringfügig verändert und an die kommerzielle Verfügbarkeit deuterierter Edukte angepasst werden. Die Synthesefolge Friedel-Crafts-Acylierung – Veretherung mit Bromessigsäureethylester – Aldolkondensation konnte beibehalten werden. Lediglich das Buttersäurechlorid war als d_7 -markierte Verbindung nicht käuflich zu erwerben und musste aus d_7 -Buttersäure dargestellt werden. Hierbei wurden aufgrund der hohen Preise der kommerziell erhältlichen deuterierten Edukte im Vorfeld Syntheserversuche mit dem unmarkierten Analogon durchgeführt, um die Reaktionsbedingungen für den später verwendeten Maßstab zu optimieren. Auch die weiteren Syntheseschritte wurden zunächst mit der jeweils undeuterierten Verbindung durchgeführt. Zur Darstellung von Buttersäurechlorid wurde Buttersäure mit Thionylchlorid unter Rückfluss erhitzt. Dabei wurden verschiedene Synthese-Varianten bezüglich Ansatzgrößen, Molverhältnissen und Aufreinigungsprozeduren durchgeführt und auf ihre Anwendbarkeit getestet.

In einem ersten Versuch wurde ein großer Überschuss Thionylchlorid (5 Äq) verwendet. Dies garantiert zwar die vollständige Umsetzung der Buttersäure zum Säurechlorid, bringt aber bei der Aufreinigung bzw. der weiteren Umsetzung Probleme mit sich. Verbleibt das überschüssige SOCl_2 im Reaktionsgemisch, so liefert die anschließende Acylierung des Anisols ein Gemisch an Produkten. Eine destillative Trennung von Thionyl-

chlorid und Buttersäurechlorid ist aufgrund der Siedepunkte nur über eine Vigreux-Kolonne möglich. Da das Butyrylchlorid als höher siedende Komponente des Gemischs vorliegt, wurde diese Möglichkeit wegen der zu erwartenden Verluste nicht verfolgt. Bei unselektivem Einengen des Ansatzes im Vakuum muss ebenfalls mit Verlust durch verdampfendes Buttersäurechlorid gerechnet werden. Insgesamt stellte sich damit die Methode „vielfacher Überschuss SOCl_2 “ als nicht praktikabel dar.



Rx-Dauer (Acylierung)	acyliertes Anisol / Edukt	Ausbeute Phenol
3 h	1.4 : 1	30 %
8 h	4 : 1	63 %

Schema 2–20: Acylierung von 2,3-Dichloranisol mit d_7 -Buttersäurechlorid

Daher wurde zunächst mit einem Molverhältnis 1.1 / 1 bis 2 / 1 von Thionylchlorid zu Buttersäure gearbeitet und durch Anpassung der Zugabe von Anisol versucht, die Ausbeute zu optimieren. Hierbei zeigte sich ein Verhältnis SOCl_2 / Buttersäure / Anisol von 2 / 1 / 0.66 \checkmark als bester Ansatzmaßstab. Dieser beinhaltet ebenfalls den bei der konventionellen Friedel-Crafts-Acylierung der Etacrynsäure-Synthese bereits verwendeten 1.5-fachen Überschuss an Säurechlorid und AlCl_3 .

Die Acylierung mit d_7 -Buttersäure wurde in zwei aufeinander folgenden Ansätzen durchgeführt. Im ersten Ansatz wurde nach Generierung des Säurechlorids und Zugabe von AlCl_3 und 2,3-Dichloranisol 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Aufarbeitung zeigte das NMR-Spektrum ein Produktgemisch von acyliertem Anisol zu Edukt-Anisol im Verhältnis von 1.4 : 1. Durch einen zweiten Ansatz mit einer verlängerten Reaktionszeit (8 h) konnte dieses Verhältnis auf 4 : 1 zugunsten des acylierten Phenols gesteigert werden. Auf eine Aufreinigung auf dieser Stufe wurde verzichtet, da nach der Methyletherspaltung im nächsten Schritt eine säulenchromatographische Trennung von acyliertem Phenol und 2,3-Dichlorphenol ebenfalls problemlos möglich war. Die Demethylierung erfolgte durch Refluxieren über 3 – 4 Stunden in Anwesenheit von 1.5 Äq AlCl_3 in Dichlormethan. Die schlechte Ausbeute der Acylierung im ersten Ansatz wirkte sich entsprechend auf die Ausbeute an 2,3-Dichlor-4-butyrylphenol aus. Diese betrug im ersten Fall nur 30 % (über beide Stufen), konnte jedoch mit verlängerter Reaktionszeit auf 63 % gesteigert werden, was mit der Ausbeute in der Reaktion mit nicht markierten Edukten vergleichbar ist. Dennoch macht sich an dieser Stelle die durch den H/D-Austausch erhöhte Reaktionsbarriere der deuterierten Verbindung bemerkbar.

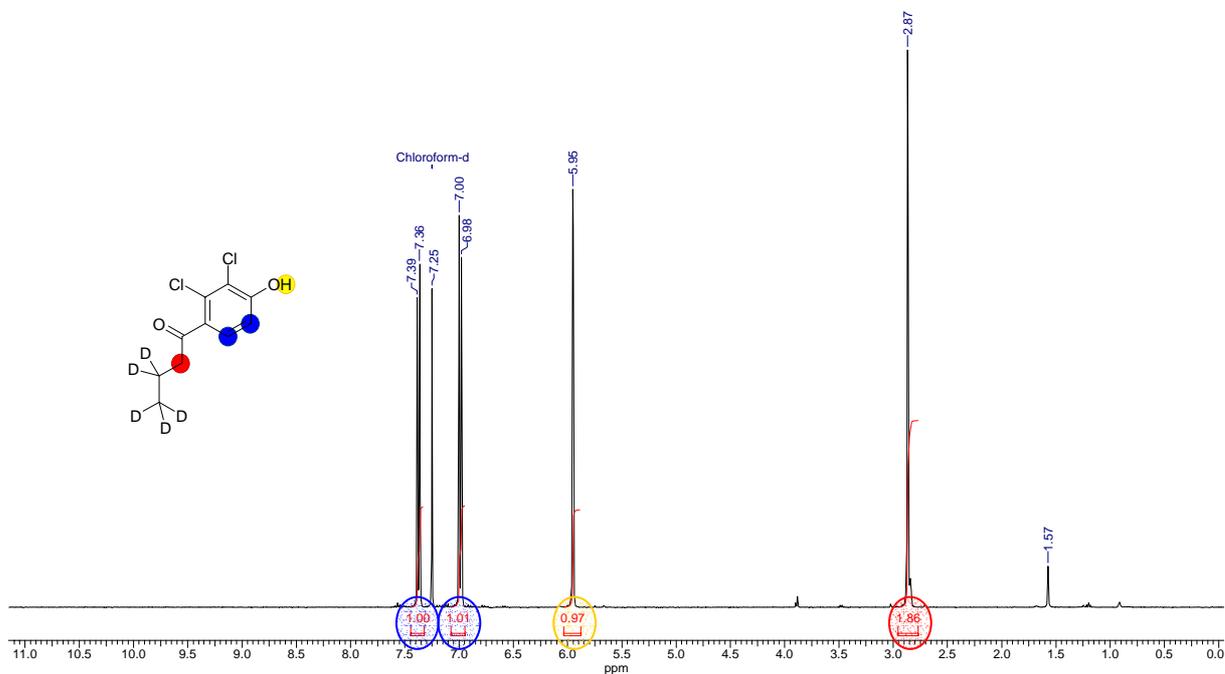
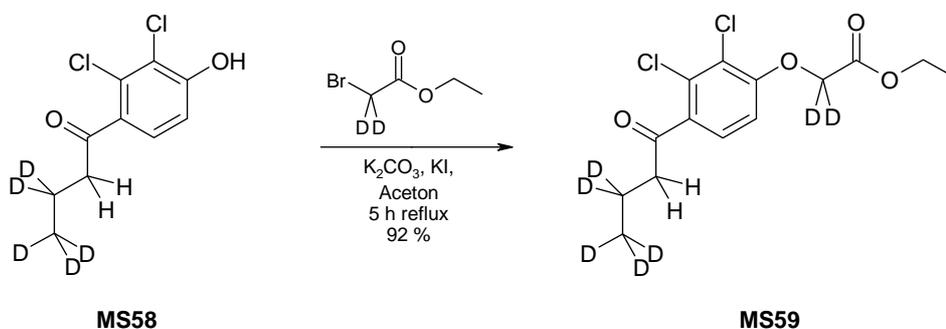


Abb. 2–3: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von d_5 -2,3-Dichlor-4-butyrylphenol (MS58)

Ein weiterer Umstand, der in der Syntheseplanung zunächst nicht berücksichtigt wurde, sich aber im späteren Verlauf als durchaus vorteilhaft zeigte, war der D/H-Aus-

tausch des acylierten Phenols an der aziden α -Position zur Carbonylfunktion in der Seitenkette. Dieser erfolgt vermutlich während der Aufarbeitung nach der Methyletherspaltung durch Extraktion mit KOH-Lösung. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ist das Singulett bei 2.87 ppm eindeutig dieser Position zuzuordnen. Der positive Aspekt für die spätere Aldolkondensation, welche genau an dieser aziden Position erfolgt und ohnehin durch die entstehende Doppelbindung einen quartären α -Kohlenstoff bildet, ist die erhöhte Reaktivität im Vergleich zur deuterierten Spezies.

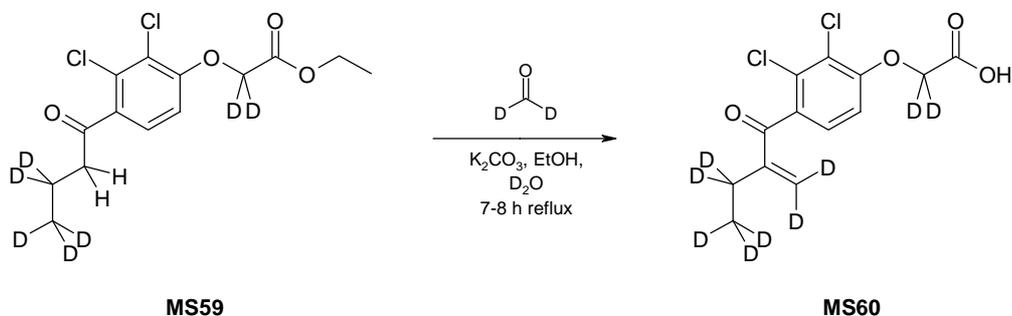
Die Veretherung des Phenols mit Bromessigsäureethylester wurde ebenfalls nach bekanntem Verfahren (siehe Kap. 2.2.3) mit Kaliumcarbonat in Aceton in Anwesenheit katalytischer Mengen Kaliumiodid durchgeführt. In einer Testreaktion mit 500 mg 2,3-Dichlor-4-butyrylphenol konnte dabei eine Ausbeute von 85 % erzielt werden. Die Umsetzung des deuterierten Phenols wurde wiederum in zwei Chargen mit d_2 -Bromessigsäureethylester unter äquivalenten Bedingungen zur Testreaktion vorgenommen, lediglich die Reaktionszeit wurde von vier auf fünf Stunden verlängert. Hierbei lag in beiden Fällen die Rohausbeute nach Entfernung von nicht umgesetztem Phenol jeweils über 97 %. Vor der Säulenchromatographie wurden die Rohprodukte beider Ansätze vereinigt. Der reine d_7 -Phenoxyessigsäureethylester wurde in 92 % Ausbeute erhalten, was gegenüber der Testreaktion sogar noch eine Ausbeuteverbesserung darstellt.



Schema 2–21: Veretherung von MS58 mit d_2 -Bromessigsäureethylester zu MS59

1.50 g des erhaltenen Esters wurden anschließend mit Formaldehyd-Lösung (29.7 % in D_2O) refluxiert, um mittels Aldolkondensation unter gleichzeitiger Esterhydrolyse das Michael-System einzuführen (vgl. Kap. 2.2.4). Die Reaktionszeit wurde dabei ebenfalls von 3-5 h im Falle des H-Analogons auf 7-8 h erhöht. Die Umsetzung erfolgte wiederum in zwei Chargen (500 mg, 1.10 g Ester). Das Rohprodukt konnte nach Einbringen des Ansatzes in gekühlte halbkonzentrierte HCl-Lösung als Feststoff in einer Ausbeute von 93 % isoliert werden. Darin war als Nebenprodukt der Etacrynsäureethylester als Verunreini-

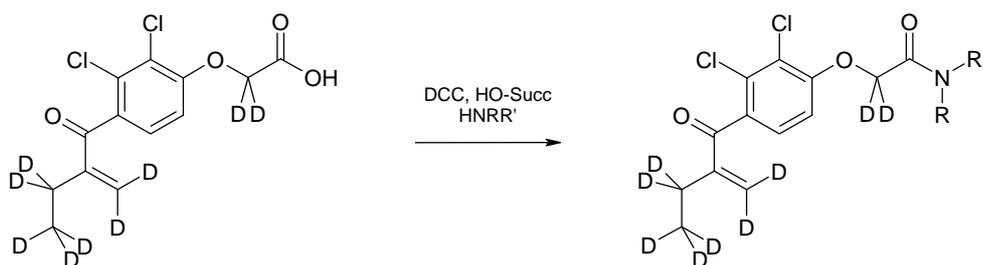
gung in einem Anteil von 1 : 5 (Ester / Säure) enthalten. Dieser wurde durch mehrfaches Umkristallisieren aus Benzol entfernt. Ein weiterer Teil des Rohproduktes wurde durch präparative HPLC aufgereinigt.



Schema 2–22: Aldolkondensation mit d_2 -Formaldehyd zur d_9 -Etacrynsäure MS60

Insgesamt war es auf diesem Weg möglich, ausgehend von 3.69 g (20.8 mmol) 2,3-Dichloranisol 1.012 g (3.24 mmol) deuterierte Etacrynsäure zu erhalten. Dies entspricht einer Gesamtausbeute von 16 % über alle Stufen.

Zur weiteren Derivatisierung wurde die d_9 -Etacrynsäure durch Umsetzung mit *tert*-Butylamin, *n*-Dibutylamin und d_{13} -*n*-Hexylamin in die entsprechenden Amide überführt. Die Auswahl der Amide erfolgte entsprechend der Hemmung durch nicht deuterierte Derivate (*tert*-Butylamin) sowie mit dem Ziel, eine möglichst große Zahl an Deuterium-Atomen in das Molekül einzubringen (d_{13} -*n*-Hexylamin).



Produkt	R	R'	Rx-Dauer, T [°C]	Ausbeute
MS61	H	<i>tert</i> -butyl	28d, RT	77 %
MS62	<i>n</i> -butyl	<i>n</i> -butyl	28d, RT	83 %
MS63	H	n -C ₆ D ₁₃	28d, RT	60 %

Schema 2–23: Synthese der deuterierten Etacrynsäureamide

Zur Carboxyl-Aktivierung wurde die DCC-Succinimid-Ester-Variante gewählt. Die Umsetzung verlief analog zur Synthese der in Kap. 2.2.5 beschriebenen Amide. Alle angestrebten Derivate konnten dabei in guten Ausbeuten (60 – 83 %) erhalten werden (vgl. Schema 2–23).

2.4 Synthese der Cinanserin-Derivate

Der Synthese des Wirkstoffs Cinanserin als Serotonin-Rezeptor-Antagonist wurde erstmals im Jahr 1964 von *Krapcho et al.*^[92] beschrieben. Strukturell betrachtet handelt es sich bei Cinanserin ((*E*)-*N*-[2-(3-Dimethylamino-propylsulfanyl)-phenyl]-3-phenyl-acrylamide) um ein Zimtsäureanilid, an dessen Anilin-Teil sich in ortho-Position ein 3-Dimethylaminopropylrest, verknüpft über einen Thioether, befindet. Die Darstellung erfolgt über zwei Stufen ausgehend von 2-Aminothiophenol. In Anlehnung an diese Strategie wurde eine Reihe von Cinanserin-Derivaten synthetisiert. Dabei wurden als Säurekomponenten Derivate der Zimtsäure sowie der Phenylpropionsäure verwendet. An der Aminoseitenkette wurde alternativ eine Dimethyl- oder Diisopropylaminoethylkette eingeführt. Die Synthese beginnt mit der Veretherung des Thiols am Aminothiophenol. Nach Deprotonierung im basischen Milieu ist das Schwefelatom in der Lage, das jeweilige Dimethylaminoalkylhalogenid zu substituieren. Diese Reaktion findet aufgrund der erhöhten Nucleophilie selektiv nur durch das Schwefelatom statt. Auf diese Weise wurden drei Thioaniline mit Amino-Seitenkette erhalten. Als Vertreter ohne funktionelle Gruppe wurde nach Umsetzung mit 1-Brompentan ein Derivat mit rein aliphatischer Seitenkette dargestellt.

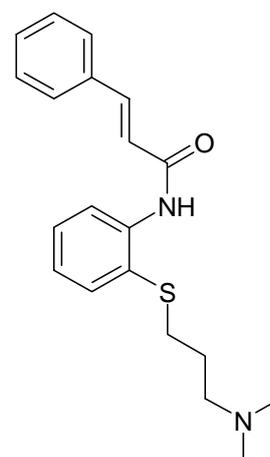
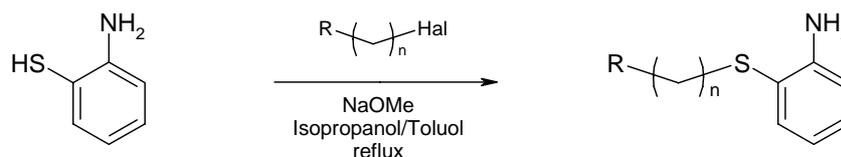


Abb. 2–4: Cinanserin

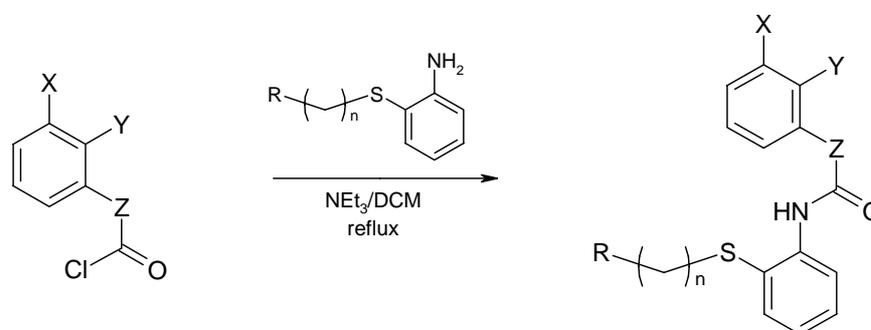


Produkt	n	R	Rx-Dauer, T [°C]	Ausbeute
MS64	2	NMe ₂	6h reflx	63 %

MS65	2	N(CH(CH ₃) ₂) ₂	6h reflux	4 %
MS66	3	NMe ₂	7h reflux, 3d RT	15 %
MS67	3	- <i>n</i> -propyl	6h reflux	22 %

Schema 2–24: Veretherung mit 2-Aminothiophenol

Zwei der erhaltenen Aniline wurden mit verschiedenen Phenylcarbonsäuren zu den entsprechenden Amiden umgesetzt. Die Aktivierung erfolgte über das Säurechlorid durch Refluxieren mit Thionylchlorid. Die Amidbildung erfolgt nach Zugabe des jeweiligen Anilins in Anwesenheit von Triethylamin.



Produkt	X/Y	Z	n	R	Rx-Dauer, T [°C]	Ausbeute
MS68	H	CH ₂ CH ₂	3	NMe ₂	1h reflux	70 %
MS69	H	CH ₂ CH ₂	2	NMe ₂	1h reflux	88 %
MS70	H	CH=CH	2	NMe ₂	1h, reflux	87 %
MS71*	H	CH=CH	3	NMe ₂	1h, reflux	15 %
MS72	Cl	CH ₂ CH ₂	3	NMe ₂	1h, reflux	30 %
MS73	Cl	CH=CH	3	NMe ₂	1h, reflux	35 %
MS74	Cl	CH=CH	2	NMe ₂	1h, reflux	39 %

* Cinanserin

Schema 2–25: Synthese der Cinanserin-Derivate

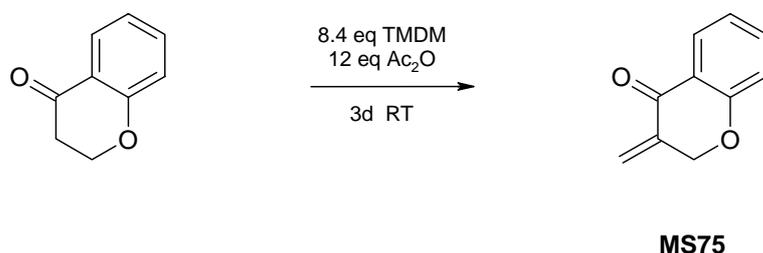
2.5 Chromanon-Derivate

Eine weitere Fragestellung der Arbeit beinhaltete die Reaktivität des Michael-Systems der Etacrynsäure-Derivate in Abhängigkeit von Konformation und Substituenten. Die Konformation der Doppelbindung bezüglich der σ -Bindung zwischen dem C₁- und C₂-Atom der Seitenkette ist bei der Etacrynsäure jedoch nicht definiert. Fixiert man die Seitenkette

über einen weiteren Ringschluss jedoch am Aromaten, so lässt sich die Doppelbindung definiert in *s-cis*- bzw. *s-trans*-Konformation einführen. Hierzu wurden Derivate des Chromanons synthetisiert. Diese ähneln in ihrer Grundstruktur mit aromatischem Ring und Acyl-Seitenkette der Etacrynsäure. Aufgrund der beiden kondensierten Ringe bieten diese Verbindungen aber zusätzlich die Möglichkeit der „Fixierung“ des Michael-Systems.

2.5.1 3-Methylen-4-chromanon (MS75)

Analog zur Einführung des Michael-Systems mittels Mannich-Reaktion (vgl. Kap. 2.2.5) erfolgte die Synthese von **MS75** durch Umsetzung von 4-Chromanon mit einem Überschuss TMDM und Acetanhydrid. Trotz des Überschusses an Methylierungsreagenz war auch nach drei Tagen Reaktionszeit noch ein großer Anteil des Eduktes nicht umgesetzt. Zur Aufarbeitung wurde zum Abfangen der entstandenen Essigsäure mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Das gewünschte Produkt konnte nach Säulenchromatographie lediglich in 3.1 % Ausbeute erhalten werden.

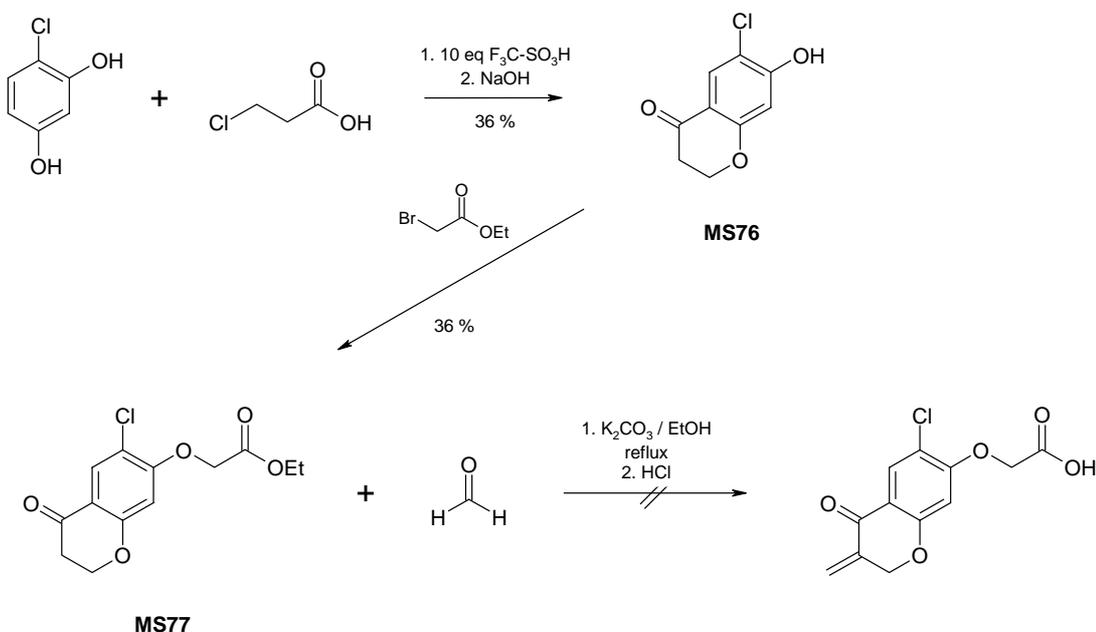


Schema 2–26: Synthese von 3-Methylen-4-chromanon (MS75)

2.5.2 Versuch der Synthese von (6-Chlor-3-methylen-4-oxochroman-7-yloxy)-essigsäure

In einem weiteren Syntheseansatz wurde versucht, die fixierte Doppelbindung beizubehalten und gleichzeitig noch größere strukturelle Ähnlichkeit mit dem Etacrynsäure-Grundkörper zu erreichen. Als Edukt diente dabei 4-Chlorresorcin. Dieses wurde zunächst mit 3-Chlorpropionsäure selektiv in 6-Position des Ringes acyliert. Als Lewis-Säure kam dabei Trifluormethansulfonsäure zum Einsatz. Unter diesen Bedingungen konnte auf die Verwendung des Säurechlorids verzichtet werden.^[93] Nach der erfolgten Acylierung ist der Hydroxylrest des Resorcins in ortho-Position zur Acyl-Seitenkette in der Lage, durch nucleophile Substitution des Chlorids in der Seitenkette den Ringschluss zum Hydroxy-

chromanon (**MS76**) zu vollziehen. Dieses wurde in 36 % Ausbeute erhalten. Die noch freie Hydroxyfunktion am Aromat wurde mit Bromessigsäureethylester verethert. Die Reaktion erfolgte analog zur Synthese der Phenoxyessigsäureester (vgl. Kap. 2.2.3). Damit wurde der Essigsäureteil in die Struktur eingeführt. Der Ethylester **MS77** wurde in 43% Ausbeute isoliert.

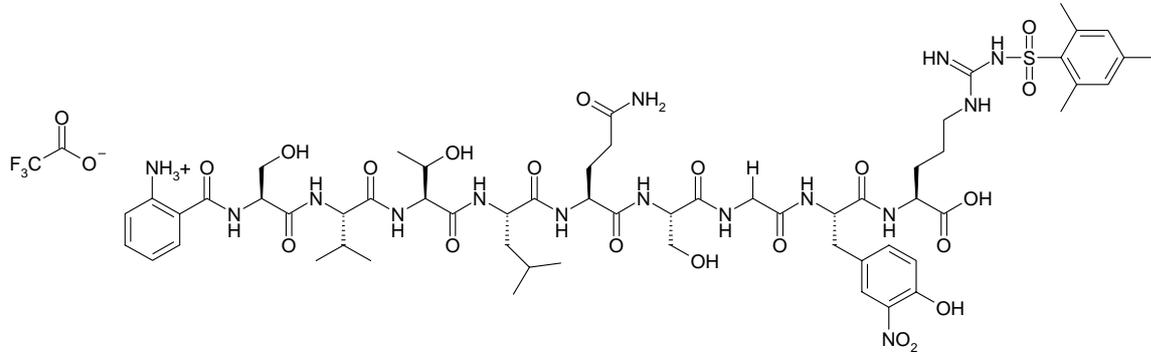


Schema 2–27: Syntheseroute zum bicyclischen Etacrynsäure-Derivat

Die Einführung der Doppelbindung sollte durch Aldolkondensation mit Formaldehyd unter gleichzeitiger Hydrolyse des Ethylesters erfolgen. Nach 6 Stunden Reaktionszeit unter Rückflussbedingungen wurde der Ansatz in kalte HCl gegeben. Der verbliebene Überstand wurde mit Ethylacetat extrahiert und die Aufreinigung des erhaltenen Rückstandes durch präparative HPLC versucht. Diese Prozedur führte jedoch nicht zum gewünschten Produkt.

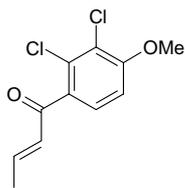
ÜBERSICHT ÜBER DIE SYNTHETISIERTEN ZIELVERBINDUNGEN

FRET-Substrat

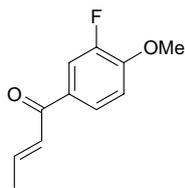


MS01

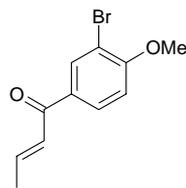
Anisole



MS05

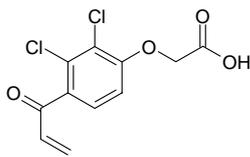


MS06

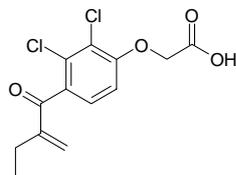


MS07

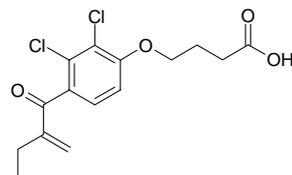
Etacrynsäure und weitere Carbonsäure-Derivate



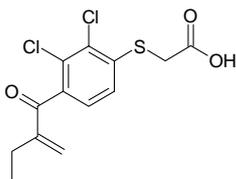
MS21



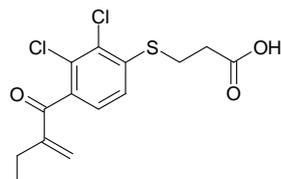
MS37 (Etacrynsäure)



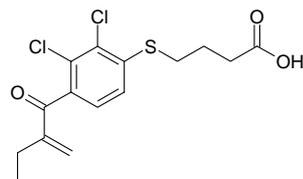
MS38



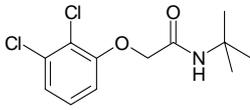
MS39



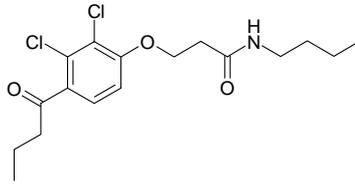
MS40



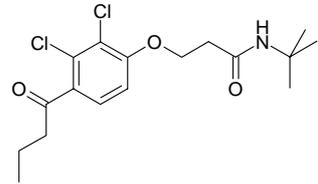
MS41

Etacrynsäure-Amid-Derivate ohne aktivierte Doppelbindung

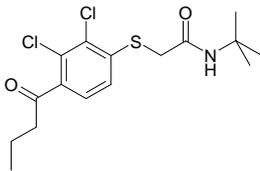
MS08



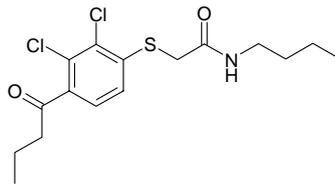
MS28



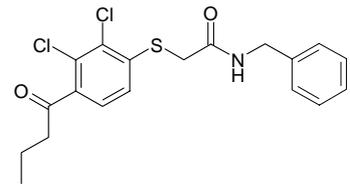
MS29



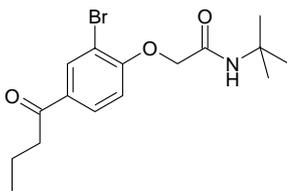
MS30



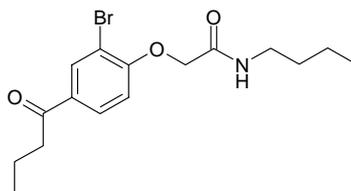
MS31



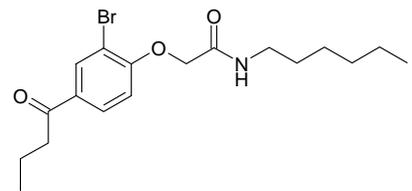
MS32



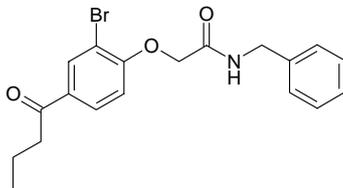
MS33



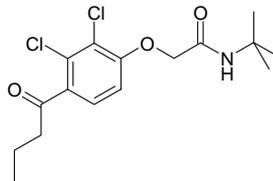
MS34



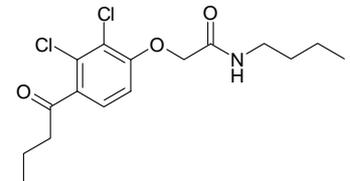
MS35



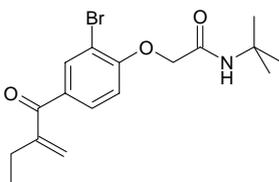
MS36



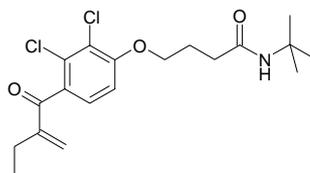
MS43



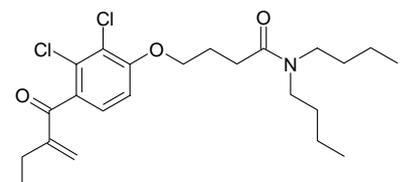
MS44

Etacrynsäure-Amid-Derivate mit aktivierter Doppelbindung

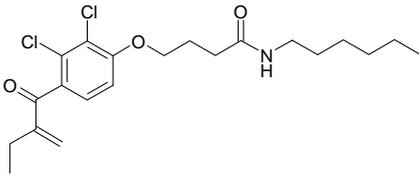
MS42



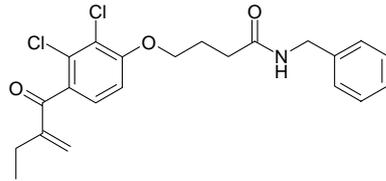
MS45



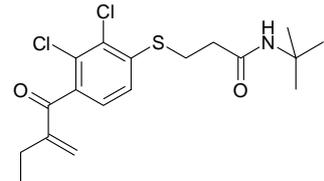
MS46



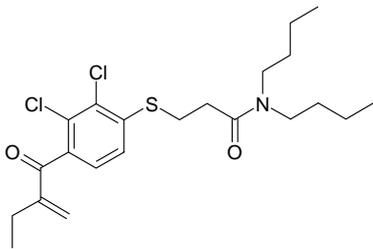
MS47



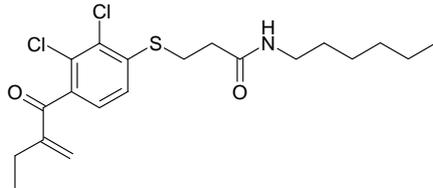
MS48



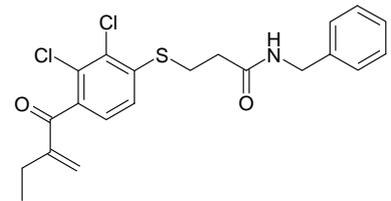
MS49



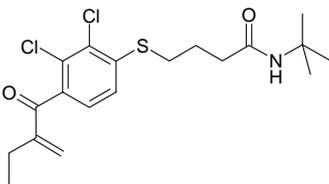
MS50



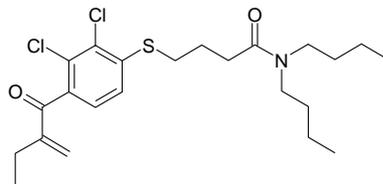
MS51



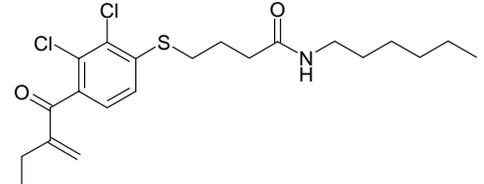
MS52



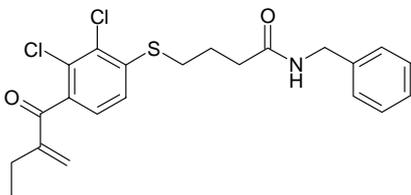
MS53



MS54

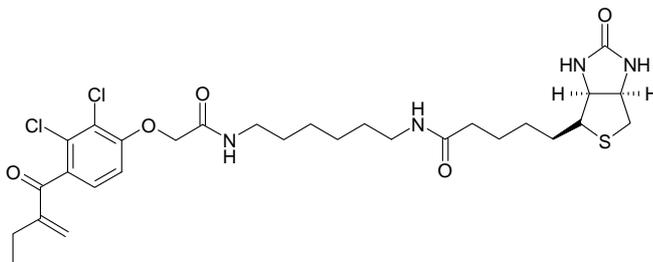


MS55

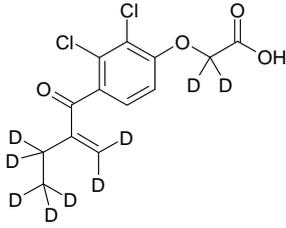


MS56

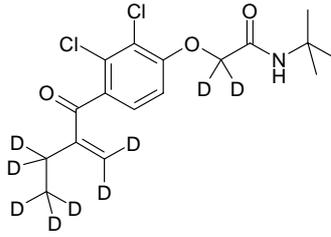
markierte Etacrynsäure Derivate



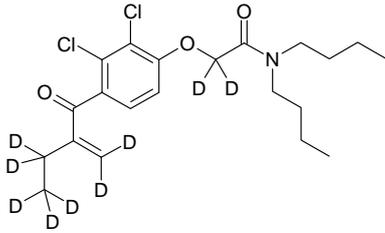
MS57



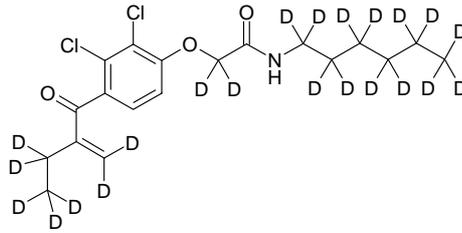
MS60



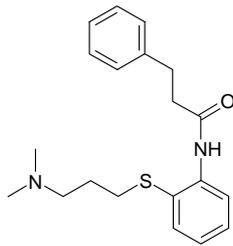
MS61



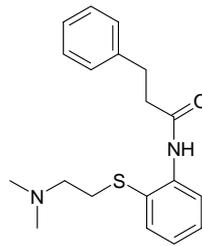
MS62



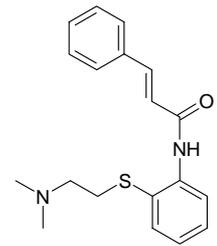
MS63

Cinanserin und -Derivate

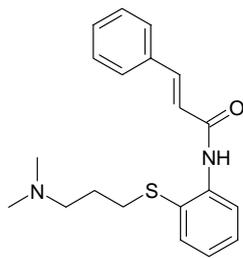
MS68



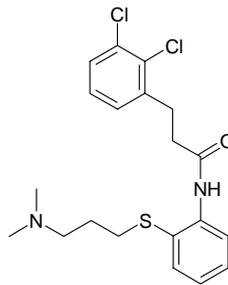
MS69



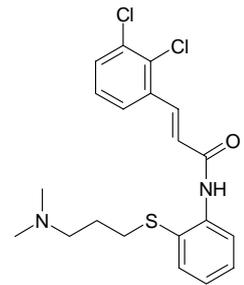
MS70



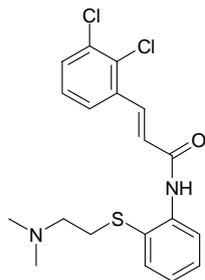
MS71 (Cinanserin)



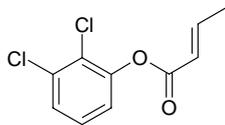
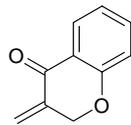
MS72



MS73



MS74

Sonstige Verbindungen**MS09****MS75**

3 Biochemische und biologische Untersuchungen

3.1 Enzym-Assays

Enzyme sind in der Lage, biochemische Reaktionen (Peptidspaltung, Hydrolyse, Reduktionen, Oxidationen, etc.) zu katalysieren. Dabei wird ein Substrat S vom Enzym zum jeweiligen Produkt P umgesetzt. Die Umsatzrate ist dabei unter festgelegten äußeren Bedingungen – pH-Wert, Temperatur, Puffer, Konzentrationen der Reaktionspartner – für ein Enzym-Substrat-Paar spezifisch. Unter Enzymhemmung oder -inhibition versteht man die Verminderung dieses katalytischen Potentials durch einen Inhibitor I. Der Inhibitor ist gleichfalls zur Wechselwirkung mit dem Enzym in der Lage. Dies kann beispielsweise durch Reaktion einer funktionellen Gruppe im aktiven Zentrum des Enzyms (z. B. Cystein- oder Serin-Reste im Falle von Proteasen) mit dem Inhibitormolekül geschehen. Wird dabei eine dauerhafte kovalente Bindung geknüpft, ist das aktive Zentrum des Enzyms blockiert. Es handelt sich dann um kovalente irreversible Enzymhemmung. Die im Arbeitskreis synthetisierten Aziridin- und Epoxidderivate^[94] sind typische Vertreter dieses Inhibitions-Mechanismus. Besetzt der Inhibitor das aktive Zentrum des Enzyms ohne Ausbildung einer kovalenten Bindung bzw. wird diese durch eine nachfolgende Rückreaktion wieder gespalten, so spricht man von nicht-kovalent reversibler bzw. kovalent reversibler Enzymhemmung. Bei kompetitiver Hemmung konkurriert dabei der Inhibitor mit dem Substratmolekül um die Besetzung des aktiven Zentrums des Enzyms.

Anhand der Struktur des Inhibitors lässt sich die Art der Enzymhemmung – reversibel oder irreversibel – zwar vermuten, zur endgültigen Bestätigung sind jedoch weitere Untersuchungen nötig.^[95] Als experimentelle Methoden stehen dazu Dialyse, Gelfiltration, etc. zur Verfügung, wodurch nach vorheriger Inkubation des Enzyms mit dem Inhibitor dieser im Falle reversibler Hemmung wieder abgetrennt und die ursprüngliche Enzymaktivität wiedergewonnen wird. Bindet der Inhibitor irreversibel an das Enzym, so erfolgt keine Abtrennung und die Enzymhemmung bleibt erhalten. Ein ähnlicher Effekt stellt sich bei definierter Verdünnung einer Enzym-Inhibitor-Lösung ein. Dabei dissoziiert ein reversibel gebundener Inhibitor ab und die Abnahme der Enzymaktivität reduziert sich in geringerem Maße, als man durch die Verdünnung erwarten würde. Ein irreversibel gebundener Inhibitor kann durch Verdünnung nicht vom Enzym getrennt werden, d. h. die Enzymaktivität fällt proportional zur Verdünnung der Probelösung. Ein Nachteil dieser Verfahren besteht

darin, dass durch die Prozedur der Dialyse, Filtration, etc. die Enzymaktivität gemindert wird und daher oft keine eindeutige Aussage über die Art der Hemmung getroffen werden kann.

Einen weitaus einfacheren und schnelleren Zugang liefert die Betrachtung der Zeitabhängigkeit der Enzymhemmung. Reagiert das Enzym (E) ohne Zusatz eines Inhibitors mit dem Substrat (S), so erfolgt unter steady-state-Bedingungen ($[S] \gg [E]$) die Produktbildung mit konstanter Geschwindigkeit. In Gegenwart eines reversiblen Inhibitors wird die Produktbildung vermindert, aufgrund der Gleichgewichtseinstellung – Inhibitor in Konkurrenz zum Substrat – ist ihre Geschwindigkeit aber trotzdem konstant. Die Minderung der Enzymaktivität ist dabei von der Stärke des Inhibitors sowie seiner Konzentration abhängig. Hierbei handelt es sich um nicht-zeitabhängige Enzymhemmung (vgl. Abb. 3–1, E+I₁, E+I₂). Bindet der Inhibitor irreversibel an das Enzym, so werden im Zeitverlauf immer mehr Enzym-Moleküle durch den Inhibitor inaktiviert, bis – sofern $[I] \gg [E]$ – die Enzymaktivität und damit die Substratspaltung vollständig zum Erliegen kommt. Dieses Phänomen wird als zeitabhängige Enzymhemmung bezeichnet (vgl. Abb. 3–1, E+I₃).

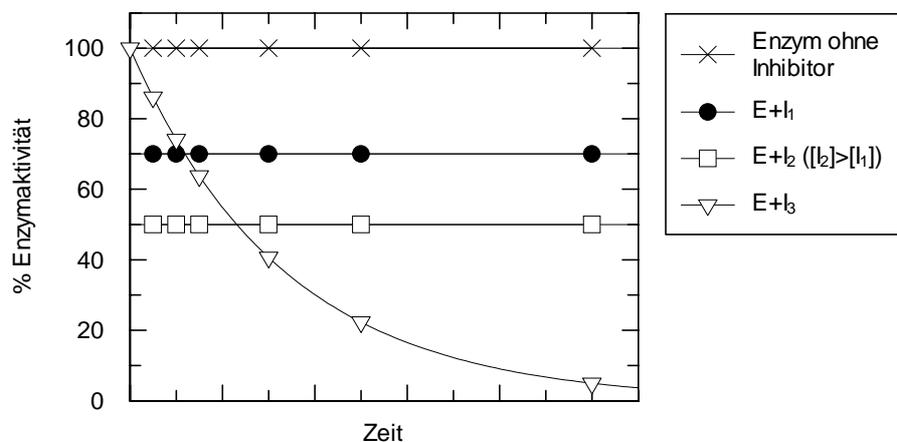
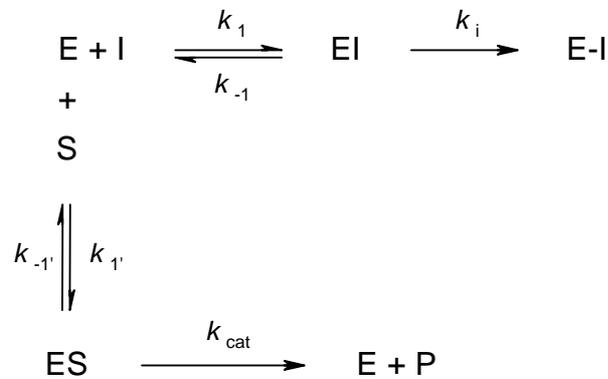


Abb. 3–1: Verlauf der Enzymaktivität bei zeitabhängiger und nicht zeitabhängiger Enzymhemmung

Für jede Art der Enzymhemmung lassen sich aus den erhaltenen Assay-Daten charakteristische Hemmkonstanten ableiten, die eine Aussage über die Stärke des Inhibitors ermöglichen und auch Vergleiche zwischen dem Inhibitorpotential einzelner Inhibitoren zulassen.

3.1.1 Charakterisierung zeitabhängiger Hemmung

Zur Charakterisierung der zeitabhängigen Hemmung eines Enzyms (E) durch ein Inhibitormolekül (I) in Gegenwart eines Substrates (S) kann folgendes Reaktionsschema zugrunde gelegt werden:



Betrachtet man die Reaktion des Enzyms mit dem Inhibitor, so erfolgt zunächst die reversible Bildung eines Enzym-Inhibitor-Assoziationskomplexes EI. In einer nachfolgenden irreversiblen Reaktion wird die kovalente Bindung des Inhibitormoleküls I an das Enzym geknüpft, es bildet sich die inaktivierte Form E-I. Gleichzeitig dazu findet in Konkurrenz zur Inaktivierung des Enzyms die Reaktion mit dem Substrat S statt. Der ebenfalls reversibel gebildete Enzym-Substrat-Komplex ES wird in der „normalen“ Enzym-Reaktion zum Produkt P umgesetzt. Die Affinität des Substrates S zum Enzym sowie die Geschwindigkeit der Enzymreaktion werden durch die Michaelis-Menten-Konstante K_m und die Wechselzahl k_{cat} beschrieben. Charakteristische Konstanten für die Beschreibung der Reaktion des Enzyms mit dem Inhibitor sind die Hemmkonstanten k_i , K_i und $k_{2\text{nd}}$.

- k_i [min^{-1}] ist die Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung der Bildung des inaktivierten Enzyms E-I.
- K_i [M] ist die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes. Sie ergibt sich aus dem Massenwirkungsgesetz und lässt sich in der Form

$$K_i = \frac{[\text{E}] \cdot [\text{I}]}{[\text{EI}]} \quad (1)$$

bzw.

$$K_i = \frac{k_{-1} + k_i}{k_1} \quad (2)$$

darstellen. Da der irreversible Schritt geschwindigkeitsbestimmend ist, vereinfacht sich die Gleichung zu

$$K_i = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (3)$$

Ein kleiner K_i -Wert bedeutet eine hohe Affinität des Inhibitors zum Enzym.

- k_{2nd} [$M^{-1} \text{ min}^{-1}$] ist die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung der Inaktivierung und ist definiert als

$$k_{2nd} = \frac{k_i}{K_i} \quad (4)$$

Hierbei wird sowohl die Bildung des Assoziationskomplexes (K_i) als auch die irreversible Inaktivierung (k_i) berücksichtigt. Hohe Affinität zum Enzym – also kleiner K_i -Wert – und schnelle Inaktivierung (großer k_i -Wert) resultieren dabei in einem hohen k_{2nd} -Wert, d. h. je größer k_{2nd} , desto besser ist die Inaktivierung des Enzyms durch den Inhibitor.

Eine schnelle und effiziente Methode zur Ermittlung der Hemmkonstanten k_i , K_i und k_{2nd} bietet der kontinuierliche Assay nach *Tian* und *Tsou*.^[96] Man mischt dazu Substrat und Enzym sowie eine bestimmte Menge des Inhibitors und beobachtet die Produktzunahme über einen Zeitraum von 5 bis zu 60 Minuten. Liegen sowohl Inhibitor als auch Substrat in großem Überschuss bezüglich des Enzyms vor, so erfolgt die Produktbildung unter steady-state-Bedingungen nach einer Kinetik pseudo-erster-Ordnung, d. h. die Produktzunahme nimmt in Anwesenheit eines irreversiblen Inhibitors mit der Zeit exponentiell ab und nähert sich dabei der Konzentration $[P]_\infty$. Den Verlauf der Produktzunahme beschreibt Gleichung (5):

$$P_t = P_\infty \cdot (1 - e^{-k_{obs} \cdot t}) \quad (5)$$

Um sicherzustellen, dass die Abnahme der Produktbildung nicht als Folge niedriger Substratkonzentration auftritt, beobachtet man als Kontrolle gleichzeitig eine Enzym-Substrat-Reaktion unter analogen Bedingungen, jedoch ohne Zusatz von Inhibitor.

Da hier keine Inaktivierung des Enzyms stattfindet, muss die Produktzunahme über den gesamten Messzeitraum linear verlaufen. Aus dem Umsatz-Zeit-Diagramm ist es möglich, durch nicht-lineare Regressionsanalyse die Geschwindigkeitskonstante k_{obs} (Geschwindigkeits-Konstante pseudo-erster-Ordnung) zu ermitteln.

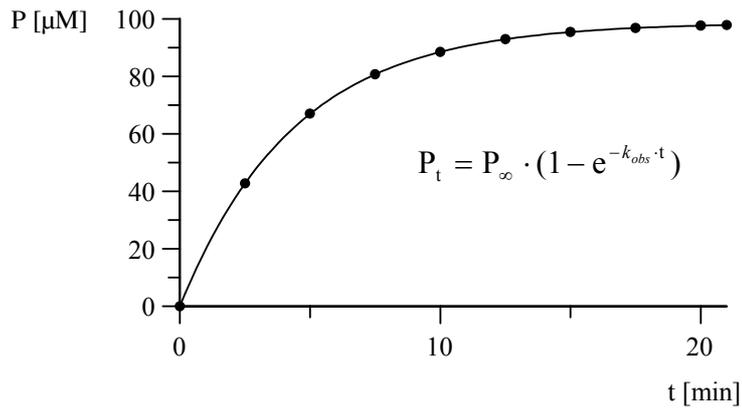


Abb. 3–2: Umsatz-Zeit-Diagramm eines kontinuierlichen Assays bei zeitabhängiger Hemmung, Bestimmung von k_{obs}

So erhält man für eine Reihe von eingesetzten Inhibitor-Konzentrationen $[I]$ jeweils den zugehörigen k_{obs} -Wert. k_{obs} lässt sich gemäß Gleichung (6) durch die Hemmkonstanten k_i und K_i in Abhängigkeit der Inhibitor-Konzentration $[I]$ ausdrücken:

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_i \cdot [I]}{(K_i + [I])} \quad (6)$$

Durch eine Auftragung von k_{obs} über $[I]$ lassen sich – wiederum durch nicht-lineare Regressionsanalyse – die Hemmkonstanten k_i und K_i ermitteln. Auf die detaillierte Herleitung von Gleichung (6) wird an dieser Stelle verzichtet, da die zeitabhängige Hemmung bei den durchgeführten Enzym-Assays sich als nicht relevant erwies.

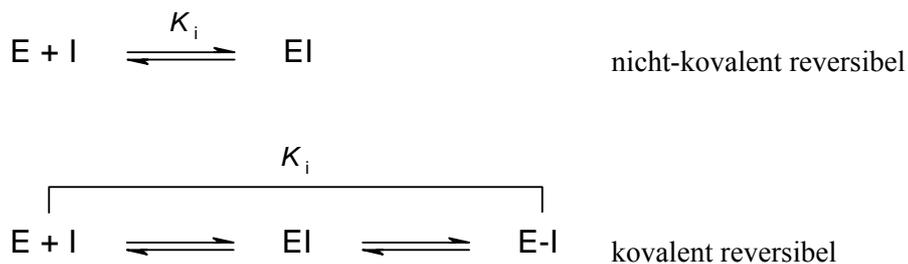
Zu beachten ist, dass obige Auswertung nur die Reaktion des Enzyms mit dem Inhibitor betrachtet. Im Assay konkurriert aber das Substrat als zweiter Ligand mit dem Inhibitor um die Bindungsstelle am Enzym. Bei der ermittelten Dissoziationskonstante handelt es sich also nur um die apparente Dissoziationskonstante $K_{i\text{app}}$.

$$K_{i\text{app}} = K_i \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right) \quad (7)$$

Der wahre K_i -Wert kann daraus durch Division durch den Term $(1+[S]/K_m)$ berechnet werden. Die Michaelis-Menten-Konstante K_m muss dabei in einem gesonderten Experiment bestimmt werden (siehe auch Kap. 3.1.3).

3.1.2 Charakterisierung nicht-zeitabhängiger Hemmung

Im Falle nicht-zeitabhängiger Enzymhemmung bewirkt die Anwesenheit des Inhibitors eine Verringerung der Enzymaktivität. Die herabgesetzte Aktivität ist jedoch zeitlich konstant (vgl. Abb. 3–1). Mechanistisch sind dazu zwei Möglichkeiten denkbar. Ist der Inhibitor aufgrund seiner chemischen Eigenschaften nicht zur kovalenten Bindung an das Enzym in der Lage, kommt es lediglich zur reversiblen Bildung des Enzym-Inhibitor-Assoziationskomplexes EI. Man spricht dabei von nicht-kovalent-reversiblen Inhibitoren. Erlaubt die chemische Natur des Inhibitors eine kovalente Bindung an das Enzym und zeigt sich im Assay aber eine nicht-zeitabhängige Hemmung, so ist es wahrscheinlich, dass die kovalente Bindung durch die entsprechende Rückreaktion wieder gebrochen wird. Diese Inhibitoren werden als kovalent-reversibel bezeichnet. Die in beiden Fällen ermittelte Hemmkonstante K_i ist ein Maß für die Affinität des Inhibitors zum Enzym. Welcher der beiden Mechanismen im konkreten Fall vorliegt, kann aufgrund der Assay-Daten jedoch nicht ermittelt werden.



Schema 3–1: Mögliche Enzym-Inhibitor-Reaktionen bei nicht-zeitabhängiger Hemmung

Zur Ermittlung von K_i kann ebenfalls der kontinuierliche Assay verwendet werden. Setzt man dabei den Inhibitor in verschiedenen Konzentrationen – inklusive einer Kontrolle mit $[\text{I}] = 0$ – ein, so erhält man ein Umsatz-Zeit-Diagramm mit Geraden unterschiedlicher Steigung. Die Steigungen entsprechen der Geschwindigkeit v der Produktbildung. Die ungehemmte Enzymreaktion ohne Inhibitor zeigt dabei die größte Steigung. Bei zunehmender Konzentration von I wird die Enzymreaktion und damit die Produktbildung zunehmend gehemmt.

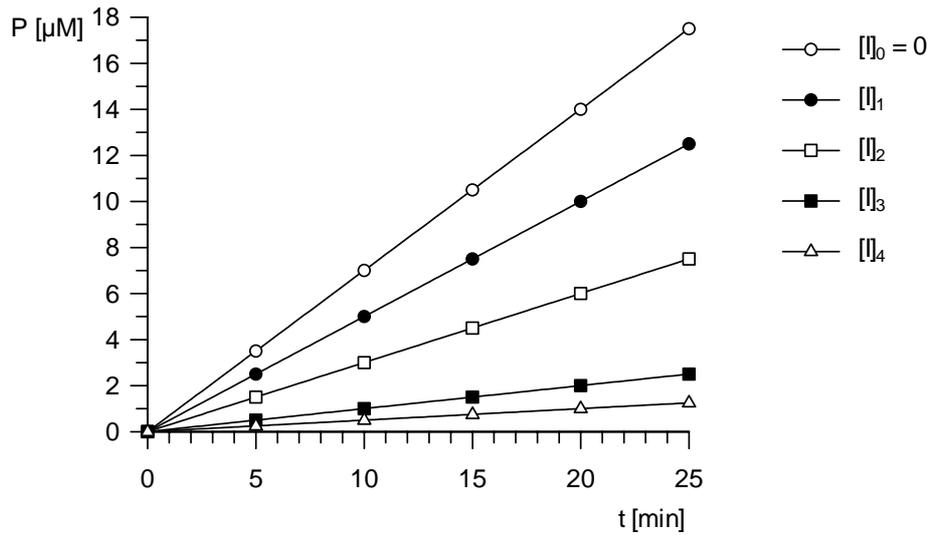


Abb. 3-3: Umsatz-Zeit-Diagramm bei nicht-zeitabhängiger Enzymhemmung für ansteigende Inhibitor-Konzentrationen I_0 bis I_4

Die Auswertung der Assays erfolgt anhand der Dixon-Gleichung^[97] (Dixon M., "The Determination of Enzyme Inhibitor Constants." *Biochem. J.* 1953, 55 (1), 170-171)

$$v_i = \frac{v_0}{\left(1 + \frac{I}{K_i}\right)} \tag{8}$$

mit v_0 bzw. v_i als Enzymaktivitäten ohne bzw. mit Inhibitor. K_i kann dann aus der Steigung $= 1/K_i$ des linearisierten Dixon-Plots ermittelt werden. Hierzu wird der Quotient v_0 / v_i gegen die Inhibitor-Konzentration $[I]$ aufgetragen.

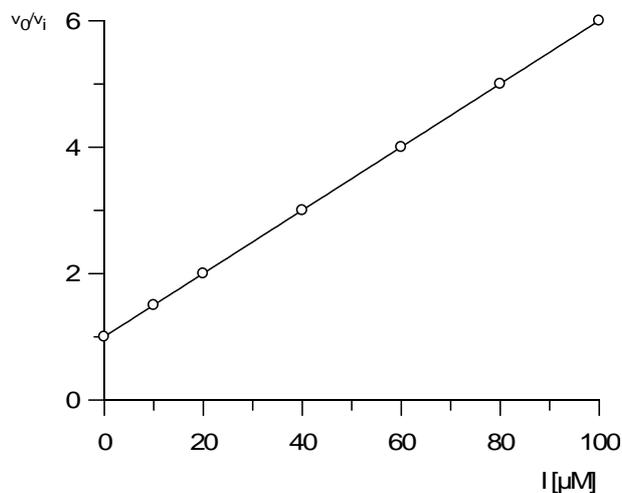


Abb. 3-4: Linearisierter Dixon-Plot bei nicht-zeitabhängiger Hemmung, Ermittlung von K_i

Alternativ zur Linearisierungs-Methode kann K_i durch nicht-lineare Regression bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden dazu alle Assay-Daten mit dem Enzymkinetik-Programm *GraFit*^[98] ausgewertet. Auch hier muss bei den so erhaltenen K_{iapp} -Werten wiederum die Konkurrenz-Reaktion des Enzyms mit dem Substrat berücksichtigt werden und der K_{iapp} nach Gleichung (7) zu K_i korrigiert werden.

Enzym-Assays mit Etacrynsäure-Derivaten an verschiedenen Cystein-Proteasen, die im Rahmen früherer Arbeiten durchgeführt wurden,^[71] zeigten sowohl zeitabhängige als auch zeitunabhängige Enzymhemmung. Hierbei zeigt sich deutlich die Problematik, dass aufgrund der Zeitabhängigkeit der Enzymhemmung kein eindeutiger Rückschluss auf den Hemm-Mechanismus gezogen werden kann. Dieser scheinbare Widerspruch kann einerseits mit den unterschiedlichen Affinitäten der Substrate zum Enzym in den jeweiligen Assays erklärt werden. Besitzt das Substrat eine sehr viel höhere Affinität zum Enzym als der Inhibitor, so wird dadurch soviel freies Enzym aus dem Gleichgewicht entzogen, dass sich trotz Anwesenheit eines kovalent irreversiblen Inhibitors keine Zeitabhängigkeit innerhalb des Messzeitraums feststellen lässt. Andererseits kann ein reversibler „slow-binding“ Inhibitor eine Zeitabhängigkeit vortäuschen. Dies liegt jedoch daran, dass die Gleichgewichtseinstellung zwischen Enzym und Inhibitor sehr langsam verläuft und so der lineare Bereich der Umsatz-Zeit-Kurve innerhalb des Messzeitraumes oft nicht erfasst werden kann. Daher sind zur endgültigen Bestimmung darüber, ob es sich um reversible oder irreversible Inhibitoren bzw. Enzymhemmung handelt, weitere Untersuchungen vonnöten. Für die Etacrynsäure-Derivate wurden dazu Dialyseversuche durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass diese Verbindungen reversibel an Cystein-Proteasen binden.^[71]

3.1.3 K_m -Wert-Bestimmung der FRET-Substrate

Wie bereits in Kap. 3.1.1 beschrieben, ist für die Berechnung der Hemmkonstanten der K_m -Wert erforderlich. Für die FRET-Substrate der SARS-CoV-M^{Pro} wurden aufgrund fehlender Literaturdaten die K_m -Werte bestimmt. Dazu wurden jeweils die Initialgeschwindigkeiten der Enzym-Substrat-Reaktion bei Substratkonzentrationen [S] zwischen 10 und 600 μM bestimmt. Die Bedingungen wurden analog zu den Assay-Bedingungen gewählt. Zur Berechnung der K_m -Werte müssen die erhaltenen Geschwindigkeitswerte jedoch korrigiert werden. Grund dafür ist der sog. „Innere-Filter-Effekt“. Er beschreibt das Phänomen, dass die Fluoreszenz des FRET-Donors in Gegenwart des FRET-Substrats, welches ja

seinerseits auch in ungespaltenem Zustand den FRET-Akzeptor enthält und damit in der Lage ist, Strahlung aufzunehmen, durch den Akzeptor im Substrat gequencht wird.^[67] Dieser Effekt muss nur bei Experimenten mit variabler Substrat-Konzentration, wie z. B. der K_m -Wert –Bestimmung, berücksichtigt werden.

Zur Berechnung des Korrekturfaktors wird die Fluoreszenz des reinen Donors (ohne Enzym) im Puffer mit und ohne Zusatz von FRET-Substrat bestimmt. Die Konzentrationen des FRET-Substrates entsprechen denen bei der K_m -Wert-Bestimmung. Zur Berechnung des Faktors werden die erhaltenen Fluoreszenzwerte jeweils durch den Referenz-Wert (Donor ohne Substrat) dividiert. Mit dem Quotient aus Initialgeschwindigkeit und Korrekturfaktor ergibt sich die korrigierte Geschwindigkeit v_{korr} . Auftragung von v_{korr} über $[S]$ liefert mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 9) den jeweiligen K_m -Wert.

$$v = \frac{V_{\text{max}} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (9)$$

Die Bestimmung der K_m -Werte erfolgte ebenfalls durch nichtlineare Regression. Für das Substrat mit Mts-Schutzgruppe (Substrat 1) wurde der K_m -Wert zusätzlich für die TGEV-Protease bestimmt. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit zur SARS-CoV-M^{pro} kann dabei unter gleichen Bedingungen vorgegangen werden. Tab. 3–1 gibt eine Übersicht über die ermittelten K_m -Werte.

Substrat	K_m -Wert [μM]	
	SARS-CoV-M ^{pro}	TGEV-M ^{pro}
1 Abz-Ser-Val-Thr-Leu-Gln-Ser-Gly- [3-(NO ₂)Tyr]-Arg(Mts)-OH	190 ± 23	88.1 ± 13.7
2 Abz-Ser-Val-Thr-Leu-Gln-Ser-Gly- [3-(NO ₂)Tyr]-Arg-OH	108 ± 26	n.d.

Tab. 3–1: Ermittelte K_m -Werte unter Berücksichtigung des Inneren-Filter-Effekts

Nachfolgende Abbildung zeigt den Kurvenverlauf der ermittelten Initialgeschwindigkeiten für Substrat 2 mit und ohne Korrektur. Man erkennt hier leicht, dass ein Verzicht

auf den Korrekturfaktor eine falsche Bestimmung liefert bzw. diese sogar unmöglich machen kann.

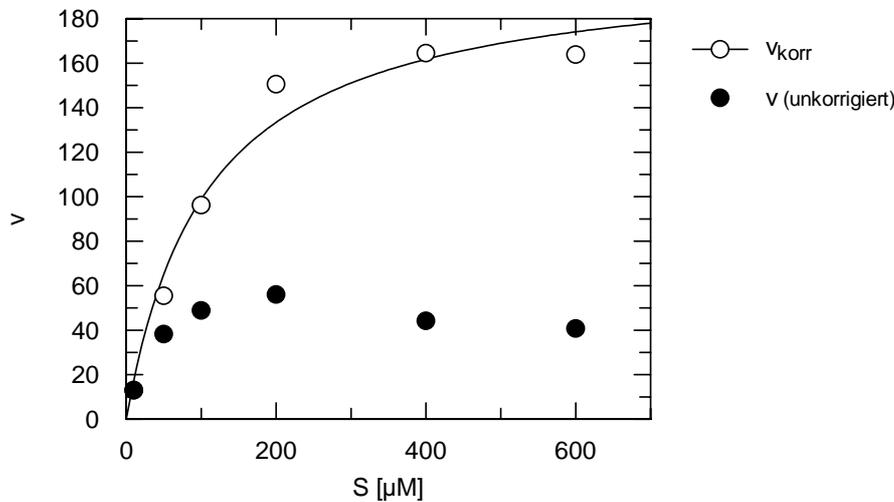


Abb. 3-5: Auftragung von v über $[S]$ mit und ohne Korrekturfaktor (Substrat 2)

3.1.4 Durchführung und Ergebnisse der fluorimetrischen Enzym-Assays

Sämtliche Hemmkonstanten der synthetisierten Inhibitoren wurden mittels des kontinuierlichen Assays nach *Tian* und *Tsou*^[96] bestimmt. Die Durchführung erfolgte an einem Fluoreszenz-Spektrometer mit temperierbarer Mikrotiterplatten-Leseinheit in weißen 96-Well-Platten bei 25 °C. Die Versuche wurden jeweils als Doppelbestimmung unter analogen Bedingungen inklusive einer Negativ-Kontrolle mit DMSO-Lösung an Stelle von Inhibitor-Zusatz durchgeführt. Die Enzymaktivität wurde durch den Einsatz fluoreszenz-markierter Substrate detektiert. Die aufgezeichnete Fluoreszenz-Intensität über den Messzeitraum ist dabei direkt proportional zur Konzentration des aus der Enzym-Substrat-Reaktion gebildeten Produktes.

Die synthetisierten Inhibitoren wurden in fluorimetrischen Assays an den Enzymen SARS-CoV-M^{pro}, SARS-CoV-PL^{pro} sowie Cathepsin L getestet. Zur Testung wurden zunächst der Assay-Puffer vorgelegt und nacheinander Enzym-Lösung, Inhibitor-Lösung und Substrat zupipettiert. Dabei wurde im Vorfeld bei fixer Substratkonzentration die Konzentration des Enzyms so angepasst, dass bei ungehemmter Reaktion eine Zunahme der Fluoreszenz von ca. 20 Einheiten pro Minute erreicht wurde. Dem Tris-Assay-Puffer wurde neben NaCl EDTA als Komplexbildner von Schwermetallen zugesetzt. Der Enzym-Puffer entspricht dem Assay-Puffer. Ihm wurde aber zur Aktivierung des Enzyms zusätzlich ein

niedermolekulares Thiol (DTT, *DL*-Dithiothreitol, 1 – 2 mM) zugegeben. Für die Stammlösungen von Substrat und Inhibitor wurde DMSO als Lösungsmittel verwendet. Die Konzentrationen der Stammlösungen wurden so gewählt, dass der DMSO-Anteil im Assay bei maximal 15 % lag. Tab. 3–2 gibt eine detaillierte Übersicht über die verwendeten Assay-Bedingungen.

Enzym	[E] ^a	[S] ^b	Assay-Puffer	pH
SARS-CoV-M ^{pro} <i>(zur Verfügung gestellt von Dipl.- Biol. M. Stempka)</i>	n.d.	50 µM	Tris ^c	7.5
SARS-CoV-PL ^{pro} <i>(zur Verfügung gestellt von Uwe Dietzel, AG Prof. Dr. C. Kisker)</i>	n.d.	50 µM	Tris ^c	7.5
Cathepsin L <i>aus humaner Leber</i>	0.725 mg/mL	6.25 µM	Tris ^d	6.5
TGEV-M ^{pro} <i>(zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. J. Ziebuhr)</i>	0.163 mg/mL	n.d.	Tris ^e	7.0

^a Konz. der Enzym-Stammlösung, ^b Endkonzentration des Substrats im well

^c 20 mM Tris, 0.1 mM EDTA, 200 mM NaCl; Enzym-Puffer mit 1mM DTT

^d 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl; Enzym-Puffer mit 2mM DTT

^e 20 mM Tris, 0.1 mM EDTA, 120 mM NaCl; Enzym-Puffer mit 1mM DTT

Tab. 3–2: Assaybedingungen der durchgeführten Enzymassays

Als fluorogene Substrate wurden fluoreszenz-markierte Oligopeptide eingesetzt. Für den SARS-CoV-PL^{pro}- bzw. den Cathepsin L-Assay wurde als Fluorophor 4-Methylcoumarylamin (AMC) verwendet. Dieses ist im Substrat terminal als Amid gebunden und wird durch die Enzymreaktion als freies Amin abgespalten. Die Fluoreszenz des freien AMC kann nach Anregung bei 360 – 380 nm bei 460 nm detektiert werden. Für den Assay an der SARS-CoV-M^{pro} ist die Verwendung von AMC-Substraten nicht möglich. Stattdessen wurde ein FRET-Substrat mit dem FRET-Donor Abz (2-Aminobenzoesäure) und dem FRET-Akzeptor 3-(NO₂)Tyr (3-Nitrotyrosin) eingesetzt. Das Substrat wurde mittels SPPS selbst hergestellt (vgl. Kap. 2.1 Synthese SPPS) bzw. in Auftrags-Peptidsynthese kommerziell erworben. Die Anregungs- und Detektionswellenlängen des FRET-Donor-Akzeptor-Paares Abz und 3-(NO₂)Tyr betragen 325 bzw. 425 nm. Die K_m-Werte der Sub-

strate wurden entweder selbst bestimmt oder aus bereits etablierten Assay-Bedingungen übernommen. Bei der Bestimmung der K_m -Wertes für die FRET-Substrate wurde zusätzlich der Innere-Filter-Effekt^[67] berücksichtigt (vgl. Kap. 3.1.3). Die erhaltenen Werte sind zusammen mit den jeweiligen Messbedingungen in Tab. 3–3 aufgelistet.

Enzym	Substrat	K_m [μM]	λ_{ex} [nm]	λ_{em} [nm]
SARS-CoV-M ^{pro}	Abz-Ser-Val-Thr-Leu-Gln-Ser-Gly-[3-(NO ₂)Tyr]-Arg(Mts)-OH, (TFA-Salz)	190	325	425
	Abz-Ser-Val-Thr-Leu-Gln-Ser-Gly-[3-(NO ₂)Tyr]-Arg-OH, (TFA-Salz)	108		
SARS-CoV-PL ^{pro}	Z-Arg-Leu-Arg-Gly-Gly-AMC, (Acetat-Salz)	850	360	460
Cathepsin L	Z-Phe-Arg-AMC, (HCl-Salz)	6.5	380	460

Tab. 3–3: Im Enzymassay verwendete fluorogene Substrate

Für eine erste grobe Abschätzung der Inhibitor-Wirkung der synthetisierten Verbindungen wurde zunächst ein Screening bei einer Inhibitor-Konzentration von 100 μM durchgeführt. Zur Auswertung wurden die ersten 5 Minuten der Messung berücksichtigt. Aus dem Quotienten aus der erhaltenen Steigung, die der Enzymaktivität entspricht, und der Steigung der DMSO-Kontrolle (ungehemmte Reaktion) wurde die prozentuale Hemmung des Inhibitors bestimmt. Zur Vermeidung falsch-positiver Ergebnisse im FRET-Assay aufgrund von Absorption von Fluoreszenzstrahlung im Bereich der Emissionswellenlänge durch den Inhibitor wurde bei aktiven Substanzen (relative Hemmung > 50 %) die Fluoreszenz von Abz mit und ohne Zusatz von Inhibitor bestimmt. Falls erforderlich, wurde mit dem so erhaltenen Faktor der ursprüngliche Wert des Screenings korrigiert.

Für die aktiven Substanzen (relative Hemmung im Screening > 50 % bei 100 μM) wurde der K_i -Wert durch Messung einer Verdünnungsreihe bestimmt. Dazu wurde neben der DMSO-Kontrolle der Inhibitor in sieben Konzentrationen (10 – 100 μM) im kontinu-

ierlichen Assay umgesetzt. Die Auswertung erfolgte durch Ermittlung der jeweiligen Umsatzgeschwindigkeiten nach der Dixon-Gleichung (vgl. Kap. 3.1.2).

	% Hemmung bei [I] = 100µM			% Hemmung bei [I] = 100µM			
	SARS-CoV		Cathepsin L	SARS-CoV		Cathepsin L	
	M ^{pro}	PL ^{pro}		M ^{pro}	PL ^{pro}		
MS05	13	<5	40	MS46	22	13	14
MS06	19	<5	<5	MS47	29	13	11
MS07	62	<5	7	MS48	<5	<5	n.d.
MS21	19	<5	91	MS49	10	<5	20
MS29	7	6	<5	MS50	18	17	17
MS30	22	10	5	MS51	20	6	29
MS31	30	13	8	MS52	20	<5	18
MS32	23	5	<5	MS53	37	<5	57
MS38	12	<5	12	MS54	30	<5	17
MS39	<5	<5	n.d.	MS55	22	13	<5
MS40	39	<5	43	MS56	10	<5	<5
MS41	35	<5	1	MS57	13	<5	39
MS42	<10	n.d.	n.d.	MS77	27	<5	1
MS45	16	<5	27				

Tab. 3–4: Ergebnisse des Screenings der Etacrynsäure-Derivate

Es wurde im Einzelfall nur der Bereich linearer Produktzunahme berücksichtigt, wobei die Toleranzgrenze bei maximal 1 % Abweichung von der Linearität lag. Das so ermittelte Zeitintervall wurde dann für die gesamte Verdünnungsreihe beibehalten.

Die Ergebnisse des Screenings der Etacrynsäure-Derivate sind in Tab. 3–4 aufgeführt. Für die aktiven Verbindungen **MS07** (M^{pro}: 62 % Hemmung) und **MS21** (CL: 91 % Hemmung) wurden die K_i-Werte der reversiblen Hemmung bestimmt. Diese ergaben sich für das Anisol **MS07** zu 52.7 ± 0.81 µM und für die Säure **MS21** zu 22.8 ± 0.65 µM.

	K _i [µM]	
	SARS-CoV-M ^{pro}	Cathepsin L
MS07	52.7 ± 0.81	-
MS21	-	22.8 ± 0.65

Tab. 3–5: K_i-Werte der aktivsten Etacrynsäure-Derivate

Mit den synthetisierten Cinanserin-Derivaten **MS68**, **MS69**, **MS70**, **MS71**, **MS72**, **MS73** und **MS74** wurde ebenfalls ein Screening an der SARS-CoV-M^{pro} durchgeführt. Hier lag die prozentuale Hemmung für alle Verbindungen unter 10 %. Auf eine Bestimmung von K_i -Werten wurde daher aufgrund der zu geringen Aktivität verzichtet. Die genauere Charakterisierung der Hemmdaten der Cinanserin-Derivate wird im folgenden Kapitel erläutert.

3.1.5 Testung der Cinanserin-Derivate an SARS-CoV-M^{pro}

Im Jahr 2005 berichteten *Chen et al.* über Cinanserin als Inhibitor der SARS-CoV-M^{pro}.^[55] Cinanserin ist ein seit den sechziger Jahren bekannter Serotonin-Antagonist^[92] und wurde in der Publikation durch Virtual Screening an der Kristallstruktur der SARS-CoV-M^{pro} (pdb-Code 1UK4)^[32] als potentieller Inhibitor identifiziert. Als Hemmkonstante an der SARS-CoV-M^{pro} wurde in einem FRET-basierten Enzym-Assay der IC₅₀-Wert zu 5 μ M bestimmt.

Ausgehend von der Leitstruktur des Cinanserins wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Derivate synthetisiert, um durch Strukturvariation die Inhibitor-Eigenschaften des Moleküls weiter zu verbessern. Modifikationen wurden sowohl am Zimtsäurefragment als auch an der Aminoalkylseitenkette des Cinanserins vorgenommen. Bezüglich der Zimtsäure wurde neben 2,3-Dichlorsubstitution am Aromaten der α,β -ungesättigte Carboxylat-Teil durch 3-Phenylpropionsäure ersetzt. An der Aminoalkylseitenkette wurde als Länge des Alkylspacers zwischen Stickstoff- und Schwefelatom eine C₂- bzw. C₃-Einheit gewählt und als voluminöse terminale Reste am Stickstoff zwei Isopropyl-Einheiten gewählt (vgl. Kap. 2.4, Synthese). Zusätzlich zu den Derivaten wurde auch das Cinanserin selbst synthetisiert.

Alle Verbindungen wurden im Screening ($[I] = 100\mu\text{M}$) an der SARS-CoV-M^{pro} getestet und zeigten eine Enzymhemmung von < 20% (vgl. Kap. 3.1.4). Da dies nicht in Einklang mit den Literaturdaten für Cinanserin zu bringen ist, wurden genauere Untersuchungen, sowohl mit dem selbst synthetisierten Cinanserin, als auch mit kommerziell erworbenem Cinanserin*HCl (Biosystem) durchgeführt.

Zur genaueren Evaluierung des Screenings wurden verschiedene Kombinationen von Enzym- und Substratkonzentrationen getestet. Bestes Ergebnis dabei war eine Enzymhemmung von 33 % bei $[S] = 50\mu\text{M}$ und 1/10 verdünnter Enzym-Stammlösung. Eine darauf aufbauende Verdünnungsreihe mit unverdünnter Enzym-Stammlösung, $[S] = 50\mu\text{M}$ und Inhibitorkonzentrationen zwischen 10 und 200 μM lieferte IC₅₀-Werte von 200 – 250 μM

bzw. K_i -Werte von 160 – 200 μM . Weiterhin gab die Testreihe Hinweise auf eine reversible Enzymhemmung. Bei einem Versuch wurde dazu bei der Testung DTT als überschüssiges Thiol zugesetzt. Dabei wurde jedoch keine Verringerung der Enzymhemmung im Vergleich zur Kontrolle ohne DTT beobachtet. Wäre eine Reaktion des Cystein-Restes im aktiven Zentrum mit dem Cinanserin für die Hemmung verantwortlich – evtl. durch Reaktion mit dem Michael-System des Zimtsäure-Fragments – so würde diese Reaktion durch den DTT-Zusatz im Überschuss abgefangen werden. Als Folge daraus hätte man eine geringere Enzymhemmung mit DTT-Zusatz erwartet. Weiterhin zeigt sich bei einer Verringerung der Substratkonzentration eine erhöhte Enzymhemmung, was eine Konkurrenz-Reaktion des Inhibitors mit dem Substrat um die Bindungsstelle im aktiven Zentrum vermuten lässt. Alle diese Befunde legen eine schwache kompetitive Hemmung der SARS-CoV-M^{pro} durch Cinanserin nahe.

Höhere Werte für die prozentuale Hemmung wurden lediglich bei Substratkonzentrationen zwischen 5 und 0.5 μM erreicht. Hierbei ergab der Vergleich mit der DMSO-Kontrolle eine Hemmung von max. 79 % ($[\text{S}] = 0.5 \mu\text{M}$, unverdünnte Enzym-Stammlösung). Die unter diesen Bedingungen erhaltenen Hemmdaten können jedoch nicht als seriös betrachtet werden. Zum einen sind durch die geringe Substratkonzentration die steady-state-Bedingungen nur für kurze Zeit gegeben. Eine Auswertung ist dann nur über einen sehr kurzen Zeitraum möglich (Vergleich der Initialgeschwindigkeiten). Als weitere Folge der geringen Substratkonzentration erhält man im fluorimetrischen Assay nur einen sehr geringen Anstieg der Fluoreszenz. An Stelle des gängigen Richtwertes von ca. 20 Fluoreszenzeinheiten pro Minute wird nur eine Steigung von 1-2 Einheiten pro Minute für die DMSO-Kontrolle erreicht. Durch diese geringen Steigungen sind die erhaltenen Werte äußerst fehlerbehaftet und somit nicht verlässlich. Unter Assay-Bedingungen, die dem „state of the art“ entsprechen wurden nur ca. 30 % Hemmung der SARS-CoV-M^{pro} durch Cinanserin (100 μM) erreicht.

Im Jahr 2008 wurde eine weitere Publikation von *Chen et al.* veröffentlicht, bei der für Cinanserin ein IC_{50} -Wert von 323 μM angegeben wurde.^[99] Die Diskrepanz zur vorangegangenen Veröffentlichung wurde von den Autoren nicht näher kommentiert.

3.2 Infektionsbiologische Testungen

Neben enzymhemmender Aktivität haben bereits bekannte Etacrynsäurederivate auch Aktivität gegen verschiedene Organismen und Bakterien gezeigt.^[71] Aus diesem Grunde wurden die synthetisierten Verbindungen im Rahmen der Kooperation innerhalb des SFB 630 („Erkennung, Gewinnung und funktionale Analyse von Wirkstoffen gegen Infektionskrankheiten“) ebenfalls auf Wirkung gegen verschiedenen Bakterien, Hemmung von Biofilmbildung, sowie auf anti-leishmaniale, anti-trypanosomale Aktivität und Cytotoxizität getestet. Die Durchführung der Tests erfolgte am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg sowie am Missionsärztlichen Institut Würzburg. Weitere Untersuchungen an Falcipain-2 und -3 sowie *Plasmodium falciparum* wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Gelhaus am Zoologischen Institut der Christian-Albrechts-Universität Kiel durchgeführt.

3.2.1 Antibakterielle Aktivität

Bei der Testung auf antibakterielle Aktivität wird der inhibitorische Effekt der synthetisierten Etacrynsäure-Derivate auf das Wachstum von Bakterien getestet. Als Teststämme wurde dazu eine Auswahl von acht pathogenen Keimen – meist Erreger nosokomialer Infektionen – herangezogen. Gram-positive Vertreter waren die Staphylokokken-Arten *S. aureus* (NCTC 8325) und *S. epidermidis* (RP62A) sowie die Enterokokken-Spezies *E. faecalis* (JH212) und *E. faecium* (6413). Gram-negative Erreger waren *E. coli* 536, *Pseudomonas aeruginosa* und die beiden Yersinia-Spezies *Y. pseudotuberculosis* (252 01A) und *Y. pestis* (KUMA). Als Kenngröße der antibakteriellen Aktivität wurde die *Minimale Hemmkonzentration* (MHK) bestimmt. Dies ist die niedrigste Konzentration einer Substanz, die das Keimwachstum gerade noch hemmt. Die Ermittlung der MHK erfolgt nach Inkubation und Bebrütung der jeweiligen Keime durch Bestimmung der optischen Dichte der inkubierten Proben im Vergleich zu einer Referenzprobe. Eine Substanz gilt als antibakteriell aktiv, wenn sie eine MHK $< 160 \mu\text{M}$ besitzt. Liegt die MHK bei $20 \mu\text{M}$ und kleiner wird zusätzlich die *Minimale bakterizide Konzentration* (MBK) bestimmt. Als MBK wird die niedrigste Konzentration bezeichnet, bei der die Bakterien getötet werden und auch nach Ausplattieren auf Agarplatten kein Wachstum zeigen.

Zusätzlich zur Wachstumshemmung wurde bei *S. epidermidis* (RP62A) die Hemmung der Biofilmbildung untersucht. Diese Eigenschaft bestimmter Bakterien stellt ein großes

Verb.	Mikrobouillondilutionstest – (Wachstumshemmtest)				Biofilm-Test
	Minimale Hemmkonzentration (MHK) [μM] ^a				% Hemmung (μM) <i>S. epidermidis</i> RP62
	<i>S. aureus</i> 8325	<i>S. epidermidis</i> RP62	<i>E. faecalis</i> JH212	<i>E. faecium</i> 6413	
MS05	80	80	>160	>160	95 (80) 0 (40)
MS06	>160	>160	>160	>160	0 (160)
MS07	>160	160	>160	>160	0 (160)
MS21	>160	>160	>160	>160	0 (160)
MS29	>160	>160	>160	>160	0 (160)
MS30	>160	>160	>160	>160	0 (160)
MS31	>160	>160	>160	>160	50 (160) ^b
MS32	>160	>160	>160	>160	50 (160) ^b
MS38	160	80	>160	>160	95 (160) 0 (80)
MS39	80	40	160	160	0 (160)
MS40	40	20 (MBK > 160)	160	160	90 (40) 0 (20)
MS41	40	20 (MBK > 160)	80	160	95 (40) 0 (20)
MS42	>160	>160	>160	>160	n.d.
MS45	>160	>160	>160	>160	0 (160)

Verb.	Mikrobouillondilutionstest – (Wachstumshemmtest)				Biofilm-Test
	Minimale Hemmkonzentration (MHK) [μM] ^a				% Hemmung (μM) <i>S. epidermidis</i> RP62
	<i>S. aureus</i> 8325	<i>S. epidermidis</i> RP62	<i>E. faecalis</i> JH212	<i>E. faecium</i> 6413	
MS46	>160	>160	>160	>160	0 (160)
MS47	>160	>160	>160	>160	0 (160)
MS48	>160	>160	>160	>160	0 (160)
MS49	40	40 (MBK > 160)	40	>160	0 (160)
MS50	>160	>160	>160	>160	0 (160)
MS51	>160	>160	>160	>160	90 (80) 40 (5) 0 (2.5)
MS52	>160	20 (MBK > 160)	>160	>160	0 (160)
MS53	>160	40 (MBK > 160)	>160	>160	0 (160)
MS54	>160	>160	>160	>160	0 (160)
MS55	>160	>160	>160	>160	0 (160)
MS56	>160	>160	>160	>160	0 (160)
MS57	>160	>160	>160	>160	n.d.
MS77	>160	>160	>160	>160	0 (160)

^a Die MHK an den gram-negativen Keimen *E. coli* 536, *Pseudomonas aeruginosa*, *Y. pseudotuberculosis* (252 01A) und *Y. pestis* (KUMA) lagen für alle Substanzen bei > 160 μM und sind daher nicht detailliert aufgeführt; ^b durch starke Kristallbildung verursacht

Tab. 3–6: Ergebnisse der Testung auf Wachstums- und Biofilmhemmung an verschiedenen nosokomialen Keimen

Problem der Infektionsbekämpfung dar. Die Biofilmbildung findet häufig an Grenzflächen zwischen einer festen und einer wässrigen Phase statt. Besonders betroffen sind in diesem Zusammenhang auch Oberflächen von medizinischen Materialien, wie sie im Krankenhausumfeld zur Infusion, Beatmung, Dialyse oder auch Diagnostik (z. B. Verweilkanülen, Katheter, Beatmungstuben, Endoskope etc.) verwendet werden. Dies kann bei entsprechend immungeschwächten Patienten ernste Infektionen hervorrufen. Durch Expression des interzellulären Virulenzfaktors Adhäsins bildet sich zwischen den Keimen eine extrazelluläre Matrix aus, die die Erreger mit Nährstoffen versorgt, ihr Anhaften auf der Oberfläche ermöglicht und sie zusätzlich vor Vernichtung durch die körpereigene Immunabwehr oder Antibiotika schützt.

Die Biofilmbildung von Staphylokokken an einer Plastikoberfläche wird mittels des Adhärenztestes quantitativ bestimmt. Hierzu werden Bakterien in eine Mikrotiterplatte überführt und mit verschiedenen Konzentrationen des Wirkstoffs inkubiert. Nach Entfernung der nicht-adhärierenden Bakterien werden die filmbildenden Bakterien fixiert und mit Kristallviolett inkubiert. Die Quantifizierung erfolgt photometrisch im Vergleich zu einer Kontrolle.^[100]

Von den getesteten Verbindungen war in keinem Fall eine Wirkung auf gram-negative Keime zu beobachten. **MS41** und **MS49** zeigten mit einer MHK von 80 bzw. 40 µM eine schwache Wirkung gegen das Wachstum von *E. faecalis*. Beste Vertreter mit einer MHK von 20 µM gegen *S. epidermidis* waren die Verbindungen **MS40**, **MS41** und **MS52**. Die beiden ersteren Substanzen zeigten zudem eine 90 bzw. 95 %ige Hemmung der Biofilmbildung von *S. epidermidis* bei einer Konzentration von 40 µM sowie eine Aktivität gegen *S. aureus* mit einer MHK von ebenfalls 40 µM. Dieser Wert wurde als bestes Ergebnis für die MHK gegen *S. aureus* unter allen getesteten Verbindungen nur noch bei **MS49** beobachtet (vgl. Tab. 3–6).

3.2.2 Aktivität gegen *Leishmania major* und *Trypanosoma brucei brucei*

Neben Bestimmung der antibakteriellen Aktivität wurden die Etacrynsäure-Derivate auf Aktivität gegen Leishmanien und Trypanosomen getestet. Diese Protozoen sind die Erreger der Afrikanischen Schlafkrankheit (Trypanosomiasis) bzw. der Leishmaniose und zählen neben Malaria und HIV zu den häufigsten Erkrankungen in Dritte-Welt-Ländern. Beide Krankheiten sind besonders in den tropischen Gebieten Afrikas und Lateinamerikas

weit verbreitet und bislang nicht effektiv therapierbar. Neben der Erkrankung von Menschen stellt der Befall von Nutz- und Haustierbeständen ein zusätzliches Problem dar.

Überträger von Trypanosomen ist die Tse-Tse-Fliege. Durch sie können die Erreger per Insektenstich auf den Menschen übertragen werden. Eine Infektion verläuft über drei Stadien, beginnend mit Schüttelfrost und Fiebersymptomatik über Verwirrheitszustände bis hin zu einem das Endstadium kennzeichnenden Dämmerzustand, dem die Erkrankung auch ihren Namen verdankt. Leishmanien werden durch den Stich der Sandmücke übertragen. Innerhalb ihres Lebenszyklus, der über zwei Wirte verläuft, treten sie in zwei Entwicklungsformen auf, als sog. „Amastigoten“ (unbegeißelt) und als „Promastigoten“ (begeißelt). Zu Beginn der Infektion wird mit dem Insektenstich die promastigote Form der Leishmanien auf den Menschen übertragen. Die Erreger werden dann von Makrophagen aufgenommen, in denen sie zur amastigoten Form heranreifen, als Amastigoten freigesetzt werden und weitere Zellen im Körper infizieren sowie durch einen erneuten Stich wieder als Amastigoten auf die Sandmücke zurück übertragen werden. Der Zyklus schließt sich mit der erneuten Bildung von Promastigoten im Organismus des Insekts. Je nach Art des Erregers kann die Leishmaniose als oberflächliche Erkrankung der Haut (kutane L.) und der Schleimhäute (mukokutane L.) auftreten oder auch mit einem Befall innerer Organe (viscerale L.) einhergehen, was bei ausbleibender Behandlung in 90 % der Fälle zum Tod führt.

Zum Test auf anti-trypanosomale bzw. anti-leishmaniale Aktivität werden Trypanosomen (*Trypanosoma brucei brucei* TC 221) bzw. Leishmania-Promastigoten (*Leishmania major* MHOM/IL/81/FE/BNI) in einer Mikrotiterplatte kultiviert und dort mit verschiedenen Konzentrationen des Wirkstoffes inkubiert. Nach 24 h wird Alamar Blue[®] (Resazurin, 7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-on-10-oxid) als reduktionssensitiver Indikator zugegeben und nach weiteren 24 – 48 h die Absorption des Zellüberstands photometrisch bestimmt. Im Falle der Trypanosomen wird die Absorption der Zellkultur nach 48 bzw. 72 h nach Inkubation der Zellen mit dem Wirkstoff bestimmt. Die Zunahme der Absorption ist ein Maß für die metabolische Aktivität der Zellen. Durch Vergleich der metabolischen Aktivität der Zellen der mit Wirkstoff inkubierten Proben mit einer Kontrollpopulation wird die zytotoxische Wirkung quantifiziert. Als Ergebnis wird dazu die Wirkstoff-Konzentration angegeben, bei der 50 % der Zellen in ihrem Metabolismus inhibiert sind (IC₅₀).^[101]

Parallel dazu wurde die Cytotoxizität der Verbindungen auf Makrophagen (J774.1, Makrophagenzelllinie, Maus) und menschliche Nierenepithelzellen (293T, embryonale

Nierenzelllinie) getestet, um gezielt Wirkstoffe zu identifizieren, die gegen die Erreger aktiv sind, gegen die befallenen Zellen des Wirt-Organismus jedoch keine toxische Wirkung zeigen. Die Quantifizierung erfolgt im analogen Procedere zur oben beschriebenen Bestimmung des IC₅₀-Wertes.

Bestimmung der IC ₅₀ -Werte [µM]					
Verb.	<i>L. major</i>	<i>T. b. brucei</i>		Makrophagen (J774.1, Maus)	Nierenepithel- zellen 293T, embryonal
	MHOM/IL/81/FE/B NI	TC221 48h	72h		
MS05	8,01	2,59	3,12	7,99	4,03
MS06	7,29	2,04	2,88	8,36	n.d.
MS07	8,04	2,82	3,16	7,69	3,84
MS21	>25	>25	>25	>25	n.d.
MS29	>25	26,72	31,42	>25	n.d.
MS30	>25	29,1	40,18	>25	n.d.
MS31	>25	26,57	39,1	>25	n.d.
MS32	>25	17,91	14,04	>18,21	n.d.
MS38	11,25	0,52	0,64	6,49	2,82
MS39	>25	4,8	2,01	7,68	28,1
MS40	>25	0,84	0,83	6,31	3,9
MS41	12,67	0,63	0,54	2,44	2,03
MS42	3,29	3,81	3,87	3,38	n.d.
MS45	6,24	0,63	0,75	0,87	n.d.
MS46	7,8	4,62	6,6	7,84	n.d.
MS47	7,1	0,77	0,86	0,86	n.d.
MS48	7,7	0,72	0,85	0,78	n.d.
MS49	5,4	0,79	0,83	0,844	2,07
MS50	7,9	2,37	2,26	8,024	n.d.
MS51	5,1	0,88	0,88	0,936	1,75
MS52	6	0,82	0,81	1,11	2,33
MS53	8,87	0,76	0,77	5,7	2,91
MS54	7,33	3,44	4,27	6,29	n.d.
MS55	7,08	0,94	0,89	0,82	n.d.
MS56	7,83	0,87	0,87	1,04	n.d.
MS57	>100	0,76	0,69	33,8	6,56
MS77	>25	>25	>25	>25	n.d.

Tab. 3–7: Ergebnisse der Testungen an *L. major*, *T. b. brucei*, Makrophagen und Nierenepithelzellen

Die IC_{50} -Werte an *Leishmania major* liegen für die aktiven Verbindungen im Bereich zwischen 3 und 12 μM . Bester Vertreter ist das Bromderivat **MS42** mit einem IC_{50} -Wert von 3.29 μM . Die biotinylierte Verbindung **MS57** sowie die freien Säuren **MS21**, **MS39** und **MS40** zeigen keine Aktivität. Gleiches gilt für die Verbindungen **MS29**, **MS30**, **MS31**, **MS32** und **MS77**, die als Analoga ohne Michael-System getestet wurden und von denen auch keine Inhibition erwartet wurde. Für alle lag hier der IC_{50} -Wert über 25 μM , womit die Substanzen als unwirksam definiert sind. Dieses findet sich auch in den Testergebnissen an den übrigen Zelllinien wieder, was die Vermutung zulässt, dass dem Michael-System eine entscheidende Rolle bei der cytotoxischen Wirkung zukommt.

Bei den Ergebnissen an *T. b. brucei* finden sich zahlreiche Vertreter mit IC_{50} -Werten unter 1 μM . Hierbei handelt es sich durchweg um Carbonsäure-Analoga der Etacrynsäure oder Etacrynsäureamid-Derivate. Mit Hinblick auf die Toxizität an Makrophagen zeichnen sich die Verbindungen **MS38**, **MS40** und **MS41** – jeweils freie Säuren – sowie die biotinmarkierte Verbindung **MS57** besonders aus, da ihre Wirkung auf Trypanosomen mindestens um den Faktor 4 höher ist als die Cytotoxizität auf Makrophagen.

3.3 Untersuchung an Falcipain-2/-3 und *Plasmodium falciparum*

Zur weiteren Testung des antibiotischen Potentials der Etacrynsäurederivate wurden Untersuchungen am Malariaerreger *Plasmodium falciparum* sowie an den Enzymen Falcipain-2 und -3 durchgeführt. Mit der Verbindung **MS57** wurde ein Etacrynsäure-Derivat synthetisiert, das eine Biotin-Markierung trägt, die über einen Hexyldiamin-*spacer* mit der Carbonsäurefunktion verknüpft ist. Durch die Biotin-Funktion kann der Inhibitor Biotin-Streptavidin-Konjugate ausbilden, was auf diese Weise eine nähere Untersuchung der Bindungseigenschaften, des Bindungsortes und der Zielmoleküle ermöglicht. Diese Arbeiten wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Gelhaus (Zoologisches Institut der Universität Kiel) von Dipl. Biol. Saskia Heppner durchgeführt.^[102] Mit Hilfe dieser Methode konnte bereits für Aziridin-2,3-Dicarboxylate die kovalente Bindung an das aktive Zentrum von Cystein-Proteasen nachgewiesen werden.^[103,104]

Im Enzym-Assay an Falcipain-2 und -3 wurden zunächst die IC_{50} -Werte der Enzym-Hemmung bestimmt.^[86] Hier zeigte sich **MS57** als die aktivste unter allen getesteten Verbindungen. Die IC_{50} -Werte lagen bei 3.0 μM (FP-2) bzw. 11.9 μM (FP-3). Ebenso wurde bei *In-vitro*-Tests an Plasmodien ein IC_{50} von 9.0 μM bestimmt. Die Etacrynsäureamide **MS43** und **MS44** ohne Michael-System zeigten mit IC_{50} -Werten von 531 μM bzw. 713

μM an FP-2 eine deutlich schlechtere Enzym-Hemmung. An FP-3 konnte für beide Verbindungen keine Hemmung der Enzymaktivität festgestellt werden. Bei den entsprechenden Analoga von **MS43** und **MS44** mit Michael-System (Verb. **VI-1f**, **VI-1i**, synthetisiert von U. Käßler) verbesserte sich die Enzym-Hemmung nur leicht. Die IC_{50} -Werte lagen bei $255 \mu\text{M}$ bzw. $184 \mu\text{M}$ (FP-2) sowie bei $153 \mu\text{M}$ und $158 \mu\text{M}$ (FP-3).

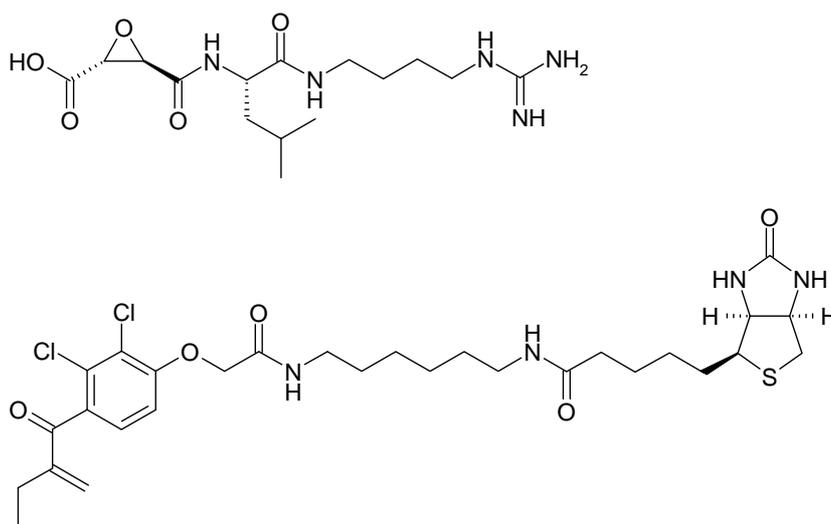
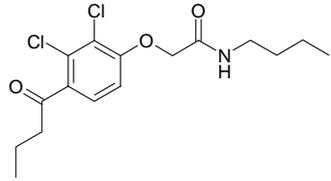
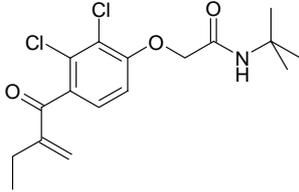
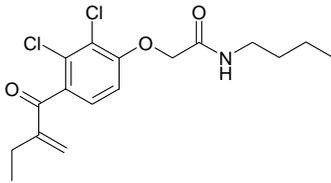


Abb. 3–6: Struktur von E64 (oben) und des Biotin-markierten Inhibitors MS57 (unten)

Die Bindungseigenschaften von **MS57** wurden an rekombinantem Falcipain-2 (rFP-2) untersucht. Verdrängungsexperimente mit dem Konkurrenz-Inhibitor E64^[103] sowie massenspektrometrische Experimente zeigten, dass **MS57** kovalent an rFP-2 bindet, die Bindung aber nicht im aktiven Zentrum des Enzyms stattfindet. Durch Inkubation von rFP-2 mit E64 und anschließendem tryptischen Verdau konnte die Bindung von E64 an das aktive Zentrum von Falcipain-2 massenspektrometrisch bestätigt werden. Dies war für **MS57** nicht der Fall, da das entsprechende Massenfragment nicht detektiert wurde. Daher liegt die Vermutung nahe, dass **MS57** unspezifisch mit rFP-2 reagieren kann.

Verb.	Struktur	IC_{50} [μM]		
		FP-2	FP-3	<i>P.f.</i> W2
MS43		484 ^a	n.i.	n.i.

MS44		713 ^a	n.i.	n.i.
VI-1f ^b		255 ± 4	153 ± 16	n.i.
VI-1i ^b		184 ± 17	158 ± 17	n.i.
MS57	(siehe Abb. 3–6)	3.0 ± 1.1	11.9 ± 1.1	9.0 ± 0.4

^a nur ein Experiment; ^b synthetisiert von U. Käppler; n.i.: keine Hemmung

Tab. 3–8: Ergebnisse der Testung an Falcipain-2, -3 und *Plasmodium falciparum* W2

3.4 Diskussion der Ergebnisse

3.4.1 Enzym-Assays

3.4.1.1 Etacrynsäure-Derivate

Die synthetisierten Etacrynsäure-Derivate wurden in fluorimetrischen Assays an den Enzymen SARS-CoV-M^{pro}, SARS-CoV-PL^{pro} sowie Cathepsin L getestet. Im Screening bei einer Inhibitorkonzentration von [I] = 100 μM konnte für den Großteil der Substanzen eine moderate Enzymhemmung (10 – 40 %) festgestellt werden. Struktur-Wirkungs-Beziehungen lassen sich aus den erhaltenen Testergebnissen nur bedingt ableiten. Grund dafür sind zum einen die jeweils geringen Unterschiede in der Aktivität, die z. T. innerhalb der Messtoleranz liegen. Ebenso ist anhand der berücksichtigten Strukturvariationen (vgl. Kap. 1.5 Zielsetzung) kein eindeutiger Trend erkennbar. Dennoch lassen sich folgende Aussagen treffen:

Selektivität bezüglich der Enzyme

Alle getesteten Etacrynsäurederivate zeigen ausschließlich eine Aktivität an der SARS-CoV-M^{pro} sowie an Cathepsin L. Für die SARS-CoV-PL^{pro} lag die prozentuale

Hemmung lediglich für **MS50** bei 17 %, für alle weiteren Verbindungen unter 15 %. Somit waren alle Substanzen an der PL^{pro} inaktiv. Als aktivste Verbindung an der SARS-CoV-M^{pro} wurde mit 62 % Hemmung ($K_i = 52.7 \pm 0.81 \mu\text{M}$) das 2-Bromanisol **MS07** identifiziert. Dieses zeigte auch eine hohe Selektivität für die M^{pro}, eine Hemmung von PL^{pro} (< 5 %) und CL (7 %) war nicht zu beobachten. Gleiches gilt für die an CL aktivste Verbindung **MS21** (91 % Hemmung, $K_i = 22.8 \pm 0.65 \mu\text{M}$), die an der M^{pro} nur geringe (19 %) und an der PL^{pro} keine Aktivität (< 5%) zeigte.

Einfluss der Halogensubstituenten am Aromaten

Von den Halogenanisolen mit Crotonylseitenkette wurden das 2,3-Dichlor- (**MS05**), das 2-Fluor- (**MS06**) sowie das 2-Brom-Derivat (**MS07**) getestet. An der PL^{pro} waren alle drei Substanzen nicht aktiv (< 5 % Hemmung). An Cathepsin L zeigte nur das 2,3-Dichloranisol **MS05** eine Hemmung (40 %), wohingegen das Bromderivat **MS07** mit 62 % Hemmung die höchste Aktivität an der SARS-CoV-M^{pro} zeigte. An diesem Enzym waren **MS05** und **MS06** nur moderat aktiv (13 bzw. 19 % Hemmung). Dies scheint eine Ausnahme zum allgemeinen Trend zu sein, dass die 2,3-Dichlor-Derivate der Etacrynsäure eine höhere Aktivität als ihre 2-Brom- bzw. 2-Fluor-Analoga besitzen, denn auch das 2-Bromanalogon (**MS42**) zum aktiven Etacrynsäure-*tert*-butylamid (M^{pro}: $K_i = 46 \mu\text{M}$)^[71] zeigte – wie auch das Fluor-Derivat^[87] – keine Hemmung an der SARS-CoV-M^{pro}. Offensichtlich liegt bei den Amiden im Falle des 2,3-Dichlor-Derivats durch die optimale Größe des Inhibitors eine erhöhte Affinität für die Bindetasche des Enzyms vor, wohingegen die 1-Brom- und 1-Fluor-Derivate durch den veränderten Raumbedarf diese Affinität nicht besitzen.

Etacrynsäure-Derivate vs. Etacrynsäure

Für die Etacrynsäure ist eine moderate Hemmung (10 – 50 % bei [I] = 100 μM) der SARS-CoV-M^{pro} bekannt. Bessere Werte konnten durch die vorgenommenen Strukturvariationen nicht erzielt werden. Die zur Etacrynsäure analoge Schwefel-Verbindung **MS39** besitzt keinerlei Aktivität an den viralen Proteasen (M^{pro}: < 5 % Hemmung, PL^{pro}: < 5 % Hemmung). Durch Verlängerung der Alkylcarbonsäuren-Seitenkette konnte bei den schwefelhaltigen Derivaten jedoch eine geringe Verbesserung erzielt werden (M^{pro}: Propionsäure-Derivat **MS40** 39 % Hemmung, Buttersäure-Derivat **MS41** 35 % Hemmung). Dieser Trend war bei den Sauerstoff-Derivaten nicht zu beobachten. Alle getesteten

Carbonsäure-Derivate zeigten keinerlei Hemmung der SARS-CoV-PL^{pro} (Hemmung jeweils < 5 %).

Carbonsäuren vs. Amide

Bei der Etacrynsäure konnte durch Derivatisierung zum *tert*-Butylamid die Inhibitor-Aktivität signifikant erhöht werden, so dass bis zu Konzentrationen von 50 μ M eine über 90 %ige Hemmung der SARS-CoV-M^{pro} festgestellt wurde.^[71] Aus diesem Grunde wurde von den Etacrynsäure-Derivaten **MS38**, **MS40** und **MS41** jeweils eine Serie von Amiden synthetisiert, die neben dem *tert*-Butylamid auch voluminösere (Dibutyl-, *n*-Hexylamid) bzw. aromatische (Benzylamid) Reste umfasste. Im Gegensatz zur Etacrynsäure konnte in allen Fällen keine Verbesserung der Inhibitoraktivität beobachtet werden. Alle getesteten Amid-Derivate mit aktivierter Doppelbindung zeigten eine moderate Hemmung der SARS-CoV-M^{pro} (10 -37 % bei [I] = 100 μ M), die sich im Bereich der Carbonsäure-Derivate bewegte.

3.4.1.2 Cinanserin-Derivate

Für die synthetisierten Cinanserin-Derivate (**MS68**, **MS69**, **MS70**, **MS72**, **MS73**, **MS74**) sowie für das in eigener Synthese hergestellte Cinanserin (**MS71**) wurde keine inhibitorische Aktivität an der SARS-CoV-M^{pro} festgestellt. Das Screening zeigte für alle Verbindungen eine Hemmung von < 20 % bei [I] = 100 μ M. Dies steht im Widerspruch zu ersten publizierten Ergebnissen von *Chen et al.*, in denen Cinanserin als ein Inhibitor der SARS-CoV-M^{pro} mit einem IC₅₀-Wert von 5 μ M beschrieben wird.^[55] Dieser Wert wurde in einer Verdünnungsreihe durch einen fluorimetrischen Enzym-Assay ([I] = 0 – 200 μ M, [S] = 10 μ M, [E] = 1 μ M) nach 2 h Inkubationszeit bei 4 °C und einem Messzeitraum von 60 Minuten ermittelt. Außerdem wurde durch Surface-Plasmon-Resonance-(SPR)-Experimente eine Bindung des Inhibitors an das Enzym nachgewiesen. Um diese Testergebnisse zu reproduzieren bzw. die im eigenen Assay verwendeten Bedingungen und Ergebnisse zu verifizieren, wurde die Testprozedur sowohl anhand der Literaturbedingungen wiederholt als auch durch breite Variation der Testparameter (Inkubationszeit, Konzentrationen [S], [I], [E]) validiert.

Unter diesen beschriebenen Bedingungen wurde auch kommerziell erworbenes Cinanserin*HCl (Biosystem) als Inhibitor der SARS-CoV-M^{pro} getestet. Nach der Inkubationszeit von 2 h wurde bei einer Inhibitorkonzentration von 100 μ M eine maximale Hemmung von 37 % gemessen. Eine Verdünnung der Enzym-Stammlösung sowie die Variation der

Substratkonzentration zeigten dabei keinen wesentlichen Einfluss, lediglich der lineare Bereich (steady state) der Substratumsetzung, der zur Auswertung herangezogen werden kann, wurde durch erhöhte Enzym- bzw. Substratkonzentrationen verkürzt. Weitere Testungen ergaben, dass die Inkubationszeit keinen Einfluss auf die Enzymhemmung hat, genauso wie der Zusatz von DTT zum Assay-Puffer. Es wurde weder die Enzymaktivität erhöht noch zeigte sich eine signifikante Absenkung der Enzymhemmung. Dies legt die Vermutung nahe, dass das Cinanserin keine Reaktion mit niedermolekularen Thiolen eingeht und eine Bindung an den *active-site*-Cystein-Rest des Enzyms eher unwahrscheinlich ist. In Verdünnungsreihen von 0 – 200 μM Cinanserin*HCl ($[\text{S}] = 50\mu\text{M}$; Puffer mit DTT) wurden für die Hemmung der SARS-CoV-M^{pro} IC₅₀-Werte in der Größenordnung von 200 bis 250 μM ermittelt. Unter Berücksichtigung des Substrates erhält man daraus K_i -Werte zwischen 160 und 200 μM .

Die einzige Parametervariation, die zu einer deutlichen Erhöhung der Enzymhemmung führte, war die Verminderung der Substratkonzentration. Hierdurch ergeben sich aber zwei Effekte, die sich äußerst negativ auf die Qualität und die Verlässlichkeit der erhaltenen Daten auswirken. Zum einen verkürzt sich der steady-state-Bereich der Enzym-Reaktion auf wenige Minuten, außerdem zeigen die erhaltenen Umsatz-Zeit-Kurven aufgrund der geringen Substratkonzentration nur eine geringe Steigung, d. h. die Fluoreszenzzunahme pro Zeit (dF/min) liegt im Bereich von 1.5 – 2.1 dF/min ohne Inhibitor bzw. 0.45 – 0.78 dF/min für $[\text{I}] = 100\mu\text{M}$. Durch die kurzen Messzeiten und die geringen Steigungen, die als Grundlage zur Berechnung der Hemmdaten dienen, besitzen die erhaltenen Daten einen relativ großen Fehler. Für eine InhibitorKonzentration von $[\text{I}] = 100\mu\text{M}$ wurde dabei eine zunehmende Enzymhemmung für geringere Substratkonzentrationen beobachtet. Die Werte betragen im Einzelnen für $\text{S} = 5\mu\text{M}$, 48 % Hemmung; $\text{S} = 2\mu\text{M}$, 64 % Hemmung; $\text{S} = 1\mu\text{M}$, 71 % Hemmung; $\text{S} = 0.5\mu\text{M}$, 79 % Hemmung. Diese Zunahme bei gleichzeitig abnehmender Substratkonzentration ist ein weiterer Hinweis auf kompetitive Enzymhemmung, bei der das Cinanserin mit dem Substrat um die Bindungsstelle konkurriert. Dennoch ist die auf diese Weise beobachtete Enzymhemmung immer noch zu schwach, um in einem IC₅₀-Wert von $< 10\mu\text{M}$ zu resultieren. Daher wurde der publizierte IC₅₀-Wert von $5\mu\text{M}$ für die Hemmung der SARS-CoV-M^{pro} als nicht reproduzierbar eingestuft. Bestätigt wurde dieser Befund durch eine Nachfolgepublikation von *Chen et al.* im Jahre 2008, in der Cinanserin als unwirksam an der SARS-CoV-M^{pro} beschrieben wird (IC₅₀ = 323 μM).^[99]

Generell sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass IC_{50} -Werte aufgrund der schlechten Vergleichbarkeit nur innerhalb einer konsistenten Messreihe eine Aussagekraft besitzen. Sowohl die Konzentration des Substrats im Assay als auch dessen Affinität zum Enzym (K_m -Wert) bleiben dabei unberücksichtigt. Daher sollte wenn möglich bei der Angabe von Enzym-Hemmkonstanten den Werten K_i , k_i , und k_{2nd} stets den Vorzug gegeben werden. Zusätzlich ist bei FRET-Substraten der Innere-Filter-Effekt bei der K_m -Wert-Bestimmung zu berücksichtigen.

3.4.2 Antibakterielle Aktivität

In Kooperation mit dem Institut für Molekulare Infektionsbiologie (Uni-Würzburg) im Rahmen des SFB 630 wurden die synthetisierten Etacrynsäure-Derivate auf Wachstumshemmung verschiedener grampositiver und gramnegativer nosokomialer Keime getestet. In einem zusätzlichen Test wurde die Hemmung der Biofilmbildung von *S. epidermidis* RP62 untersucht.

Bei den getesteten Verbindungen konnte ausschließlich eine Wachstumshemmung der grampositiven Erreger *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecialis* und *E. faecium* beobachtet werden. An den gramnegativen Keimen *E. coli*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia pestis* und *Pseudomonas aeruginosa* waren die getesteten Verbindungen inaktiv. Innerhalb der Testreihe zeigte sich die beste Aktivität an *S. epidermidis* RP62. Hier wurden minimale Hemmkonzentrationen (MHK) von bis zu 20 μM erreicht. Geringste Aktivität besaßen die Verbindungen an *E. faecium* 6413, wo lediglich MHKs von 160 μM und darüber erhalten wurden. Als aktivste Stoffgruppe wurden die Schwefelanaloga der Etacrynsäure mit unterschiedlichen Kettenlängen in der Carbonsäureseitenkette identifiziert. Neben einer Verbesserung der MHK mit zunehmender Kettenlänge von 40 μM (**MS39**, Acetyl-Seitenkette) bis zu 20 μM (**MS40**, Propionyl-; **MS41**, Butyryl-Seitenkette) zeigt sich auch eine Verbesserung der Wirkung auf die anderen Erreger, was für die aktivste Verbindung **MS41** in MHKs von 40 μM (*S. aureus* 8325), 80 μM (*E. faecalis* JH212) und 160 μM (*E. faecium* 6413) resultiert. Hierbei scheint der O-S-Austausch einen entscheidenden Beitrag zu leisten, da die analoge Sauerstoffverbindung **MS38** lediglich eine moderate Aktivität (MHK = 80 μM) an *S. epidermidis* RP62 zeigt und an den übrigen Keimen inaktiv ist.

Neben den Carbonsäure-Derivaten zeigten auch einige Amid-Derivate antibakterielle Aktivität. Hier scheint ebenfalls die Anwesenheit des Schwefelatoms sowie größerer lipophiler Amid-Reste von Vorteil zu sein. Darunter waren die Verbindungen **MS52** (Benzyl-

amid) und **MS53** (*tert*-Butylamid) lediglich an *S. epidermidis* RP62 aktiv (MHK 20 bzw. 40 μM), das *tert*-Butylamid **MS49** zeigte zudem eine vergleichbar gute Hemmung an den Keimen *S. aureus* und *E. faecalis* (MHK je 40 μM).

Bei den getesteten Anisolen nimmt die antibakterielle Wirkung ebenfalls mit der Einführung größerer lipophiler Halogensubstituenten zu. So zeigt das 2,3-Dichloranisol **MS05** die höchste Aktivität an *S. epidermidis* (MHK 40 μM), wohingegen sich diese bei den nur monosubstituierten Brom- (**MS07**) und Fluoranisolen (**MS06**) deutlich abfällt (MHK 160 μM bzw. > 160 μM). Auch das Brom-Derivat **MS42** (Analogon zum Etacrynsäure-*tert*-butylamid) ist an allen getesteten Keimen inaktiv.

Ein Teil der antibakteriell wirksamen Substanzen zeigte auch eine Hemmung der Biofilmbildung die von *S. epidermidis* RP62. Hierbei zählten wiederum die Säure-Derivate **MS40** und **MS41** mit 95 % bzw. 90 % Hemmung bei $[I] = 40 \mu\text{M}$ zu den aktivsten Verbindungen. Für das schwefelhaltige Derivat **MS41** wurde dabei bei einem Viertel der Konzentration die gleiche Hemmung wie in Anwesenheit der sauerstoffanalogen Säure **MS38** erhalten. Auch das an Staphylokokken aktive Anisol **MS05** konnte die Biofilmbildung bei einer Konzentration von 80 μM zu 90 % hemmen. Das Hexylamid **MS51** war mit einer Hemmung von 40 % (5 μM) bzw. 90 % (80 μM) die aktivste Verbindung, zeigte jedoch weder gegen *S. epidermidis* noch gegen die übrigen Keime antibakterielle Wirkung.

3.4.3 Testung an *L. major*, *T. b. brucei* und *P. falciparum*

Bei der Testung der Etacrynsäure-Derivate an *Leishmania major* wurde eine Reihe aktiver Verbindungen mit einem IC_{50} -Wert zwischen 3 und 12 μM identifiziert. Dazu zählen sowohl die Anisole (**MS05**, **MS06**, **MS07**) sowie die Amid-Derivate mit aktivierter Doppelbindung. Alle getesteten Verbindungen ohne dieses Strukturelement (**MS29**, **MS30**, **MS31**, **MS32**, **MS77**) waren inaktiv ($\text{IC}_{50} > 25 \mu\text{M}$). Als einzige aktive Carbonsäure zeigte die Verbindung **MS38** eine Wirkung an *L. major*, die anderen Säure-Derivate (**MS21**, **MS39**, **MS40**) sowie die biotinylierte Verbindung **MS57** waren ebenfalls inaktiv. Die aktivste Verbindung unter den 2,3-Dichlor-Derivaten war das *n*-Hexylamid **MS51** ($\text{IC}_{50} = 5.1 \mu\text{M}$), der beste IC_{50} -Wert innerhalb der Testreihe wurde für das 2-Brom-Analogon **MS42** des Etacrynsäure-*tert*-butylamids ermittelt ($\text{IC}_{50} = 3.29 \mu\text{M}$). Trotz der guten IC_{50} -Werte von z. T. < 10 μM stellt die Toxizität der Verbindungen ein Problem dar. Verglichen mit der Aktivität der Verbindungen an *L. major* war diese in den meisten

Fällen in gleichem Maße vorhanden, vereinzelt lag der IC_{50} -Wert für Makrophagen sogar darunter (vgl. Abb. 3–7).

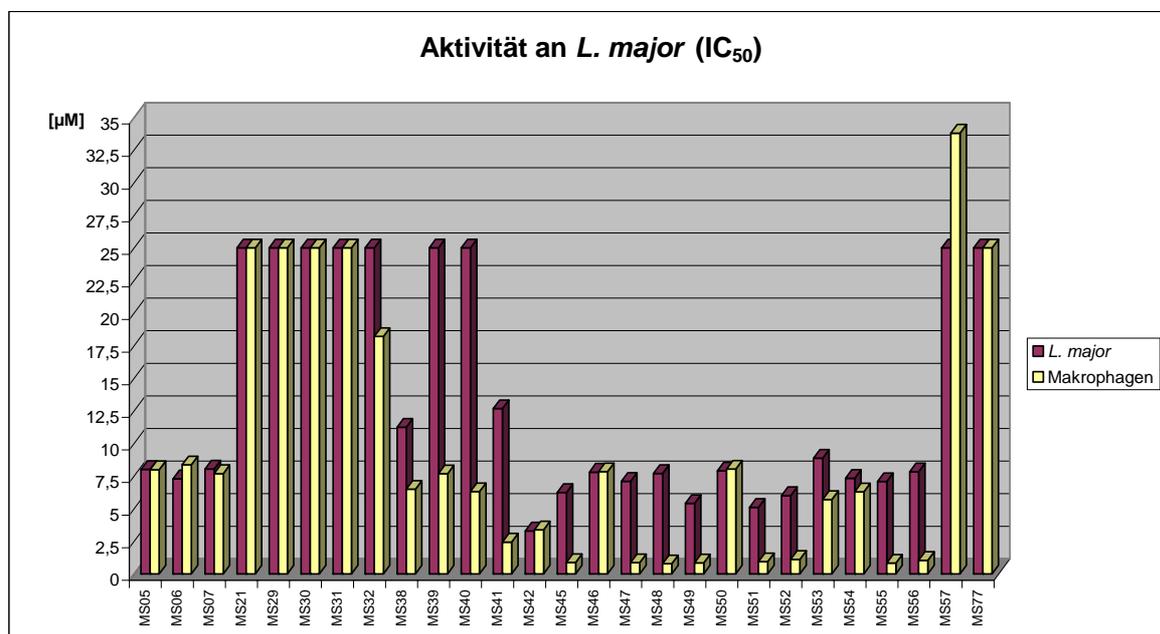


Abb. 3–7: Testergebnisse der Etacrynsäure-Derivate an *L. major*

Bei den Testungen an *T. b. brucei* waren die Verbindungen ohne aktivierte Doppelbindung (MS29, MS30, MS31, MS77) ebenfalls inaktiv. Lediglich bei MS32 wurde mit einem IC_{50} von 14 μM eine moderate Aktivität festgestellt, die jedoch im Bereich der gemessenen Cytotoxizität der Verbindung liegt. Insgesamt zeigten die getesteten Substanzen an *T. b. brucei* eine höhere Aktivität als an *L. major*. Der Großteil der ermittelten IC_{50} -Werte lag unter 5 μM , vielfach wurde dabei auch der Wert von 1 μM unterschritten. Dadurch ließ sich für einige Verbindungen ein günstigeres Verhältnis von antitrypanosomaler Aktivität und Cytotoxizität (Aktivität an Makrophagen) erreichen. Dies zeigte sich bereits bei den getesteten Anisolen (MS05, MS06, MS07), die bei IC_{50} -Werten zwischen 2.0 und 3.2 μM an Trypanosomen eine um Faktor 2.6 bis 3.4 geringere Cytotoxizität aufweisen. Die getesteten Carbonsäure-Derivate MS38, MS40 und MS41 weisen IC_{50} -Werte von 1 μM auf, was im Vergleich zur Cytotoxizität eine Selektivität bezüglich der Trypanosomen zwischen Faktor 4.2 (MS41) und 11.2 (MS38) bedeutet. In diesem Bereich bewegt sich auch das einzig aktive Amid-Derivat (MS53), welches mit einem IC_{50} -Wert an Trypanosomen von 0.77 μM ebenfalls im submikromolaren Bereich liegt und eine um Faktor 7.5 geringere Toxizität aufweist. Bestes Ergebnis im Hinblick auf diese Fragestellung lieferte das biotinylierte Derivat MS57, das von den antitrypanosomalen Substanzen mit

IC₅₀-Werten < 1 µM und einer Aktivität an Makrophagen von 33.8 µM die deutlich geringste Toxizität aufwies und damit einen Selektivitätsfaktor (IC₅₀ Makrophagen/IC₅₀ *T.b.b.*) von über 46 erreichte.

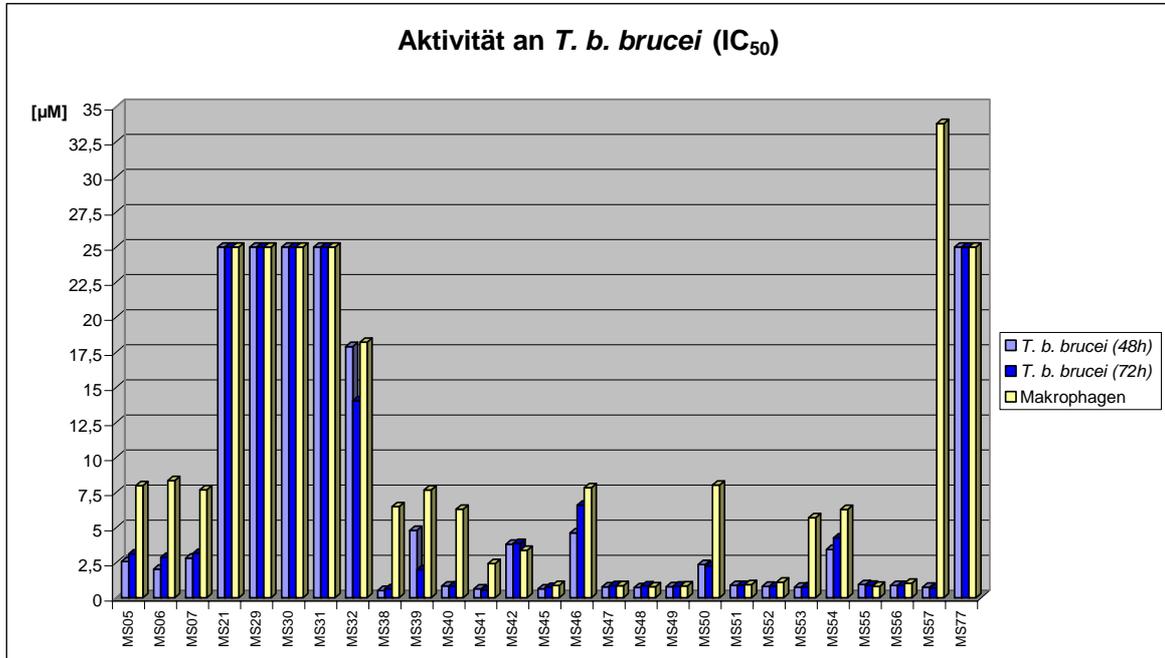


Abb. 3–8: Testergebnisse der Etacrynsäure-Derivate an *T. b. brucei*

4 CARS-Mikroskopie an deuterierten Etacrynsäurederivaten

Ein wichtiges Hilfsmittel zur Aufklärung von Wirkmechanismen in biologischen Systemen ist die Wirkstoffdetektion und -charakterisierung mittels spektroskopischer Methoden. Hierbei ist die Raman-Spektroskopie der in der allgemeinen Analytik sonst weit verbreiteten IR-Spektroskopie überlegen, da die Analyse von biologischem Material nicht durch Absorption der Strahlung durch anwesende Wassermoleküle verhindert wird. Nachteile der konventionellen Raman-Spektroskopie sind jedoch der hohe Anteil an Rayleigh-Streuung, der unmoduliert wieder abgegeben wird, sowie die geringe Intensität der auftretenden Raman-Banden, was für ein detektierbares Signal eine sehr hohe Konzentration an Molekülen sowie eine Laserquelle mit ausreichend hoher Intensität bzw. empfindliche Detektorsysteme erfordert. Bei CARS (*CARS: Coherent Anti-Stokes Raman Scattering*) handelt es sich um einen nicht-linearen Streuungsprozess, bei dem im Gegensatz zur normalen Anregung durch eine Strahlungsquelle, in der Regel ein Laser, zwei oder drei Laser eingesetzt werden. Durch die Wechselwirkung mit einem Molekül wird ein kohärentes Signal erzeugt. Sind die Wellenlängen der eingesetzten Laser so abgestimmt, dass die Differenz genau der Energie einer Raman-Schwingungsmode entspricht, wird dieses Signal resonant verstärkt. Im Gegensatz zur spontanen Raman-Streuung ist das CARS-Signal räumlich orientiert und besitzt eine um Faktor $10^4 - 10^6$ höhere Intensität. Daraus resultieren eine verbesserte Detektion sowie eine Verkürzung der Aufnahmezeiten. Die Verwendung von zwei oder drei Laserquellen ermöglicht die zwei- oder dreidimensionale Fokussierung der Strahlungsquellen und eine Anregung von Probenmaterial in einer Volumeneinheit in der Größenordnung von $1 \mu\text{m}^3$.^[105] Dies eröffnet eine neue Methode des „Chemical Imaging“, wodurch sich z. B. Gewebeproben *In-vivo* durch Raster-Scanning analysieren lassen.

Die deuterierte Etacrynsäure sowie die Amid-Derivate dienen als Modell-Substanzen zur Etablierung eines neuartigen Assays zur Wirkstoffdetektion. Da einige bereits bekannte Etacrynsäure-Derivate neben enzymhemmenden Eigenschaften auch antibakterielle Wirksamkeit besitzen sowie eine Hemmung der Biofilmbildung von Bakterien bewirken, stellen die analogen markierten Verbindungen wertvolle Prototyp-Verbindungen zur Aufklärung des noch unbekanntes Wirkmechanismus in den jeweiligen biologischen Systemen dar. Die diesbezüglichen Arbeiten wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sebastian

Schlücker (Universität Osnabrück) am Institut für Photonische Technologie (IPHT) Jena von Dipl.-Phys. Gero Bergner durchgeführt.

In einer Messreihe wurden dazu die Raman-Spektren der deuterierten sowie der analogen undeuterierten Spezies aufgenommen. Dazu wurde neben der Reinsubstanz auch Lösungen verschiedener Konzentrationen in DMSO vermessen. Die Messung erfolgte durch Laser-Anregung bei 532 nm, 633 nm oder 1024 nm.

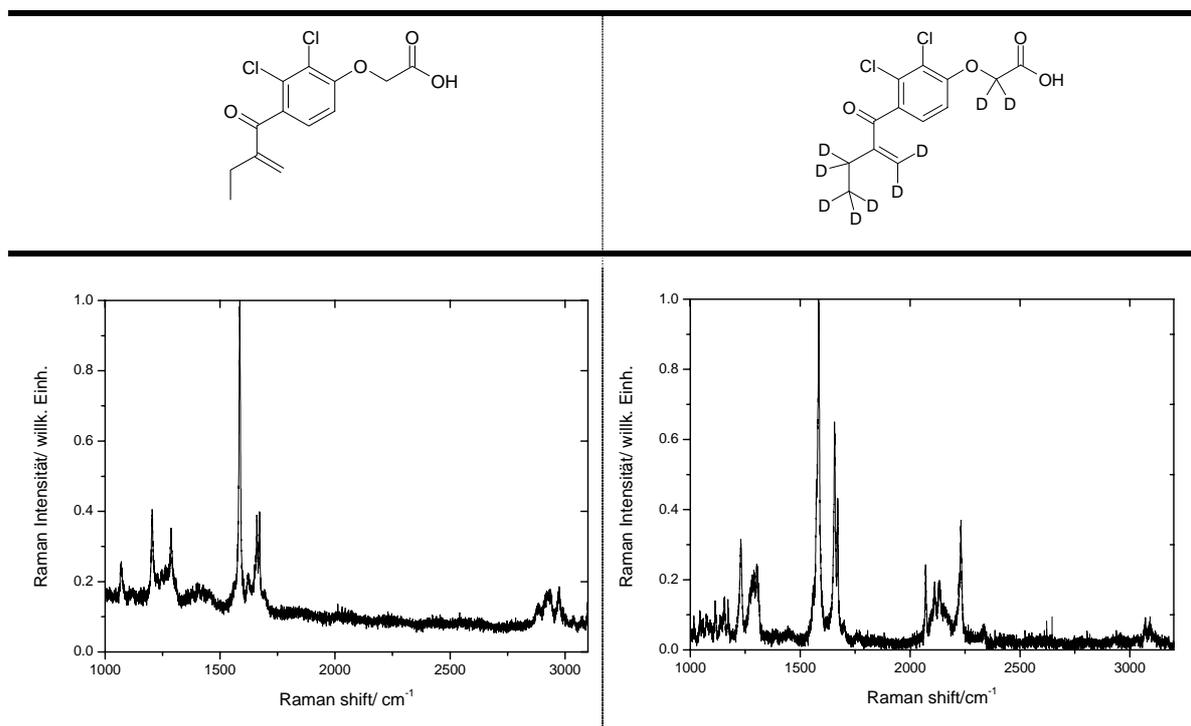


Abb. 4-1: Ramanspektren von Etacrynsäure (li.) und d_9 -Etacrynsäure bei 633 nm

Im Gegensatz zur unmarkierten Etacrynsäure (links) zeigt das Spektrum der deuterierten Verbindung **MS60** (rechts) eine deutliche Bande bei 2100 – 2230 cm⁻¹. Diese entspricht der Raman-aktiven C–D-Valenzschwingung. Im Spektrum der normalen Etacrynsäure sind im Bereich von 2900 – 2950 cm⁻¹ die Banden der C–H-Valenzschwingung zu sehen (vgl. Abb. 4-1). Im Spektrum des d_9 -Etacrynsäure-*tert*-butylamids (**MS61**) sind beide Banden deutlich sichtbar. Der höhere Deuterierungsgrad der d_{22} -Verbindung **MS63** resultiert in einer deutlich stärkeren C–D-Bande im Ramanspektrum verglichen mit den anderen Derivaten.

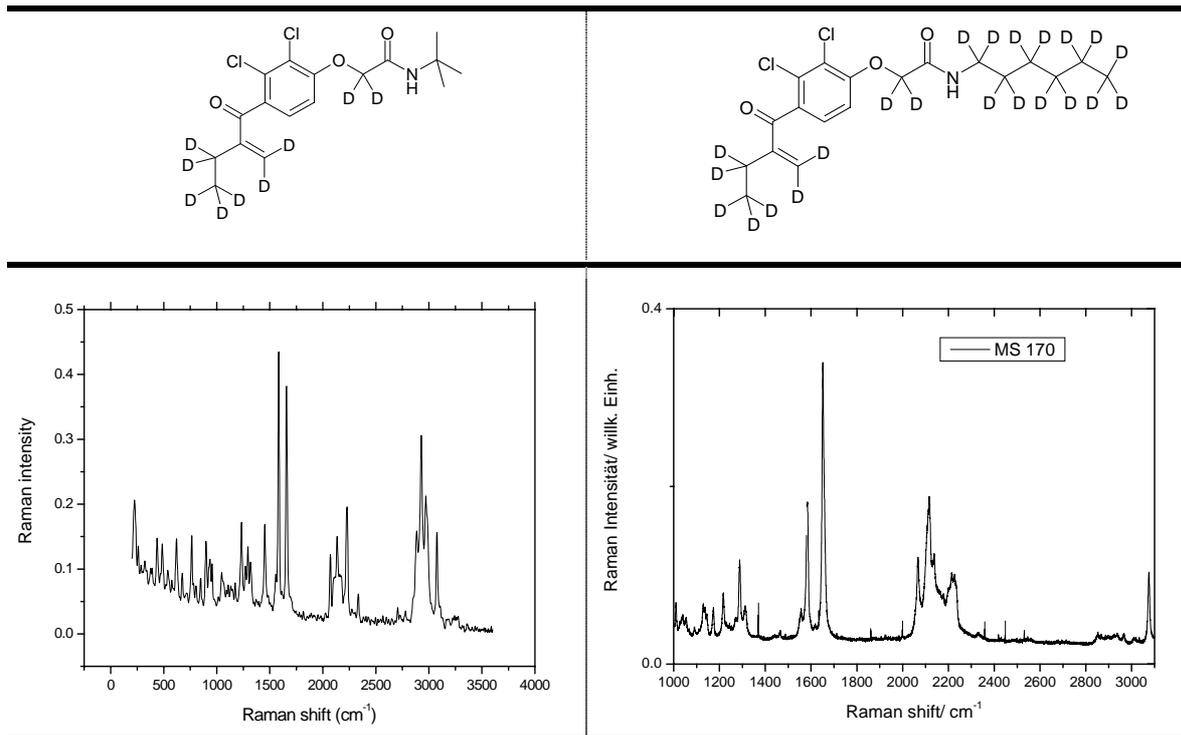


Abb. 4–2: Ramanspektren von d_9 -Etacrynsäure-*tert*-butylamid (MS61, aufgenommen bei 1024 nm, li.) und d_{22} -Etacrynsäure-*n*-hexylamid (MS63) bei 633 nm

Die Aufnahme der CARS-Bilder erfolgte in einem Mikrofluidikchip (Abmessungen 15 x 25 mm) mit Wirkstofflösungen unterschiedlicher Konzentrationen in DMSO. In dieser Messanordnung sind die zu vermessenden Wirkstofflösungen in zwei separaten Kanälen des Chips im Abstand von 200 μm lokalisiert. Mit einem Objektiv wird ein Gesichtsfeld von ca 600 x 600 μm^2 erfasst, das beide Kanäle enthält. Zur Messung werden pump- und Stokes-Laser auf eine Raman-Bande (entweder C–H oder C–D-Schwingung) abgestimmt und die Intensität des Signals innerhalb des Gesichtsfeldes mit Hilfe eines Photomultipliers detektiert.

Zur Bildgebung wird der sog. „chemische Kontrast“ genutzt. Dieser entsteht aus dem Intensitätsverhältnis des resonanten CARS-Signals der markierten zur unmarkierten Verbindung. Um die Grenzkonzentration des chemischen Kontrasts zu ermitteln, wurden Messungen in abnehmenden Konzentrationen an Etacrynsäure (gleiche Konzentrationen für markierte und unmarkierte Substanz) zwischen 10 mM und 0.25 mM durchgeführt. Der Intensitätsverlauf des CARS-Signals entlang des Gesichtsfeldes ist in Abb. 4–3 (rechts) dargestellt. Man erkennt darin am jeweils linken und rechten Rand die zwei Kanäle mit der Etacrynsäurelösung. Das darunter dargestellte Intensitätsprofil ergibt sich aus einer Mittelung der Intensitäten über einen Bereich von 2500 x 2500 Pixeln (Schnitt entlang des

oben eingezeichneten Pfeils). Hierbei konnte bis zu einer Konzentration von 500 μM ein nutzbares Intensitätsverhältnis beobachtet werden.

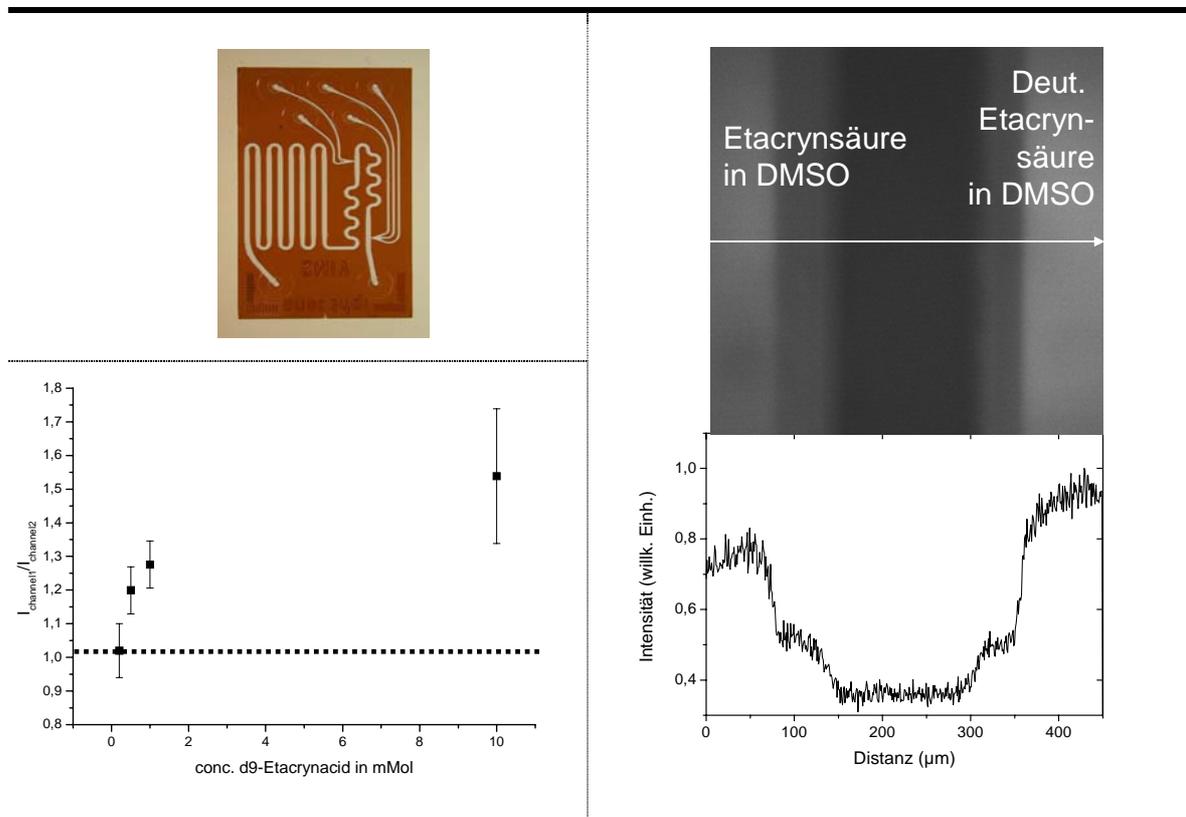


Abb. 4-3: li. oben: Mikrofluidikchip; rechts: CARS-Bild von MS60 (10 mM in DMSO) mit Intensitätsprofil; li. unten: Intensitätsverhältnis der CARS-Signale bei den gemessenen Konzentrationen

Wie diese ersten Versuche mit deuterierter Etacrynsäure zeigten, ist es möglich, mittels CARS-Mikroskopie ein spezifisches Signal, das dem markierten Wirkstoff zuzuordnen ist, in DMSO-Lösung zu detektieren. Weitere Arbeiten zur Etablierung der Methode dauern im Moment noch an. Es folgen nun Versuche mit Messungen in Zell-Lysat an Stelle von DMSO als Medium. Dieses soll im Gegensatz zu reinem DMSO die Solvens-Umgebung in biologischem Material abbilden, um so schrittweise zu *In-vivo*-Bedingungen übergehen zu können. Ein weiterer Ansatzpunkt zur Verbesserung ist die Verringerung der vergleichsweise hohen Grenzkonzentration von 500 μM Etacrynsäure, die zur Detektion eines CARS-Signals erforderlich ist. Um mit dieser Methode therapeutisch einsetzbare Wirkstoffspiegel zu erfassen, ist es wünschenswert, die Detektionsgrenze der Methode auf Konzentrationen von 100 μM und darunter zu senken. Dies wiederum erfordert eine Erhöhung der CARS-Intensität, um den chemischen Kontrast in günstiger

Weise zu beeinflussen. Dies kann beispielsweise durch eine Erhöhung des Deuterierungsgrades im Wirkstoffmolekül erreicht werden. Vielversprechender Kandidat ist das d_{22} -Hexylamid der Etacrynsäure, das ebenfalls innerhalb der Reihe d -markierter Etacrynsäure-Derivate synthetisiert wurde. Im Vergleich zur markierten d_9 -Etacrynsäure wurde durch entsprechende Derivatisierung mit d_{13} - n -Hexylamin der Deuteriumanteil pro Wirkstoffmolekül um mehr als den Faktor 2 erhöht. Die Ergebnisse dieser Messungen stehen bis dato noch aus.

5 Kinetische Untersuchungen mittels NMR-Spektroskopie

Ein weit verbreiteter Mechanismus von Cystein-Protease-Inhibitoren ist die kovalente Addition des Thiolat-Restes im aktiven Zentrum an geeignete elektrophile Gruppen der Inhibitor-Moleküle. Hierbei stellen Michael-Systeme ein häufig verwendetes Strukturfragment in den bereits bekannten Inhibitoren dar. Dennoch scheint der Mechanismus der Enzymhemmung trotz des wiederkehrenden Motivs der α,β -ungesättigten Carbonylgruppe, wie beispielsweise in der Etacrynsäure, nicht immer gleich zu verlaufen. Untersuchungen mit unterschiedlichen Vertretern von Inhibitoren mit Michael-Systemen an der SARS-CoV-M^{pro} und verwandten Enzymen zeigten sowohl eine irreversible Bindung als auch lediglich eine reversible Hemmung.^[71] Ähnliches gilt für die bereits bekannten theoretischen Untersuchungen zu dieser Problematik,^[106,107] die zudem durch die unterschiedliche Konstruktion der Modellsysteme nur schwer oder nicht vergleichbar sind. So wurden hier weder Solvens-Effekte noch die Einflüsse der Protein-Umgebung berücksichtigt. Außerdem liegen bei der SARS-CoV-M^{pro} durch das neutrale Cys-His-Paar im aktiven Zentrum andere Ausgangsbedingungen als bei den dort betrachteten Systemen vor.

Um die elektronischen Einflüsse des elektrophilen *warheads* einer Michael-Verbindung bei der Reaktion mit dem Cystein-Rest der SARS-CoV-M^{pro} aufzuklären, wurden quantenchemische Berechnungen vorgenommen. Diese wurden in der Arbeitsgruppe Engels (Institut für Organische Chemie, Universität Würzburg) von Herrn Dipl. Chem. Alexander Paasche durchgeführt. Dabei wurden sowohl die elektronischen Verhältnisse im aktiven Zentrum des Enzyms sowie die Einflüsse der Substitution und Konformation der Doppelbindung des Michael-Systems berücksichtigt.

Zum experimentellen Vergleich der Ergebnisse wurden aufbauend auf den theoretischen Ergebnissen verschiedene – im Rahmen dieser Arbeit synthetisierte bzw. kommerziell erworbene – Verbindungen mit α,β -ungesättigter Carbonylgruppe in einer Modellreaktion mit einem Thiolat umgesetzt. Dabei wurde der Reaktionsverlauf ¹H-NMR-spektroskopisch verfolgt, um daraus Aussagen über die Reaktivität der jeweiligen Verbindungen abzuleiten. Mit Hilfe dieser Methode konnte bereits die Reaktivität von Inhibitoren mit Aziridin- bzw. Epoxidfragmenten als elektrophile Gruppen erfolgreich untersucht werden.^[108,109,110]

5.1 Quantenchemische Berechnungen

Zur theoretischen Beschreibung von Interaktionen zwischen Enzymen und geeigneten Substraten bzw. Inhibitoren stellt der QM/MM-Ansatz das Mittel der Wahl dar, da hierbei sowohl Effekte der Enzymstruktur und des Solvens als auch kovalente Bindungsspaltungen und -bildungen berücksichtigt werden können. Wie jedoch frühere Untersuchungen zeigten,^[110,111,112] liefern an Stelle der sehr aufwändigen QM/MM-Rechnungen bereits auch einfacher aufgebaute Modelle hinreichend aussagefähige Ergebnisse mit deutlich reduziertem Rechenaufwand. Die nachfolgend beschriebenen Ergebnisse wurden mit Hilfe des Kontinuumsmodells *COSMO*^[113] erhalten, das die elektrostatischen Wechselwirkungen mit dem Solvens aufgrund seines Dipolmoments ($\epsilon = 78.39$ für Wasser) berücksichtigt. Die Berechnung der Potentialhyperflächen erfolgte mittels DFT (B3LYP/TZVP//BLYP/ TZVP).

5.1.1 Modellsystem der Berechnungen

Wie bereits in Kap. 3.1 (Enzym-Assays) erläutert, kann der Mechanismus der irreversiblen Enzymhemmung als zweistufiger Prozess beschrieben werden. Nach der Bildung des nicht kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes EI folgt in einem irreversiblen Schritt die Ausbildung der Bindung zum kovalent verknüpften Enzym-Inhibitor-Addukt E-I, bei dem – im Falle der SARS-CoV-M^{pro} bzw. anderer Cystein-Proteasen – der Schwefel des Cystein-Restes im aktiven Zentrum alkyliert bzw. acyliert wird.



Schema 5–1: Zweistufiges Modell der irreversiblen Hemmung von Cystein-Proteasen; E = Enzym, I = Inhibitor, EI = nicht kovalenter Enzym-Inhibitor-Komplex, E-I = irreversibel deaktiviertes Enzym

Bei den folgenden Berechnungen wurde der erste Schritt (Bildung von EI), der hauptsächlich durch entropische Effekte und nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen Enzym und Inhibitor bestimmt wird, nicht berücksichtigt. Der Fokus der Betrachtung lag auf der Bildung von E-I. Hier dominieren hauptsächlich enthalpische Effekte sowie elektronische Einflüsse aufgrund unterschiedlicher Substitutionsmuster des Michael-Systems. Zur Simulation der Inhibition der SARS-CoV-M^{pro} durch ein Etacrynsäure-

Derivat wurde daher folgende Modellumgebung herangezogen: Der Cystein-Rest des Enzyms, der in der nativen SARS-CoV-M^{pro} in der Neutralform vorliegt^[114] wurde durch Methylthiol simuliert. Als Protonenakzeptor zur Deprotonierung des Thiols fungiert im Enzym ein Histidin-Rest im aktiven Zentrum. Dieser wurde in die Berechnungen in Form eines Ammoniak-Moleküls einbezogen. Die Stabilisierung des Enolats durch das „Oxyanion-hole“ wurde durch ein Ammonium-Ion simuliert, welches als Protonenquelle agieren kann. Der Inhibitor wurde zunächst in Form von Acrolein, das die strukturellen Minimalanforderungen an ein Michael-System widerspiegelt, berücksichtigt. Alle genannten Startbedingungen sind in nachfolgender Abbildung (Abb. 5–1 links) nochmals zusammengefasst.

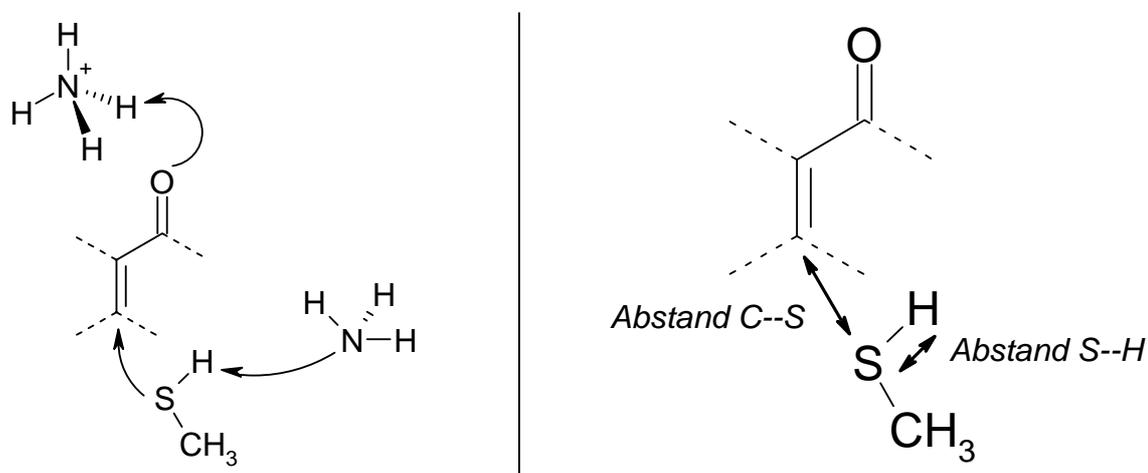


Abb. 5–1: Modellreaktion zur Berechnung des Angriffs von Cystein an Michael-Systemen

Für das Modellierung des Angriffs des Schwefelatoms am β -Kohlenstoff des Michael-System ist eine Verkleinerung des Atomabstandes bis hin zur Bindungsbildung notwendig (Abstand C--S, Abb. 5–1, rechts). Ein weitere Rolle spielt die Deprotonierung des Thiols, die mit einer Vergrößerung des Abstandes zwischen Schwefelatom und Thiol-Wasserstoff einhergeht (Abstand S--H, Abb. 5–1, rechts). Da im Vorfeld nicht offensichtlich war, wie sich diese beiden Schritte gegenseitig beeinflussen, wurde das Energieprofil dieser Reaktionen auf einer Potentialhyperfläche abgebildet. Dazu wurden jeweils Paare mit festen C--S- bzw. S--H-Abständen – zwischen 1.3 und 2.2 Å für S--H bzw. 1.7 und 3.7 Å für C--S – definiert. Für jedes Paar wurden die geometrischen Parameter auf DFT-Basis mit Hilfe des TURBOMOLE-Softwarepakets^[115] optimiert, d. h. mit Ausnahme der zwei vorgegebenen Bindungsabstände wurde unter Berücksichtigung sämtlicher Freiheitsgrade eine Energieminimierung durchgeführt.

Ausgehend von den Ergebnissen am Acrolein-Modell wurde versucht, den elektronischen Einfluss verschiedener Reste am Michael-System aufzuklären. Zusätzlich wurde der Einfluss der Konformation des Michael-Systems (*s-cis* vs. *s-trans*) untersucht.

5.1.2 Ergebnisse der quantenchemischen Berechnungen

Aus der Berechnung des Acrolein-Modells wurde nachstehende Potentialhyperfläche erhalten (vgl. Abb. 5–2). Die Auflösung betrug 0.1 Å. Die Verteilung der Energiemaxima legt für die Addition des Thiols am β -Kohlenstoff des Michael-Systems einen zweistufigen Prozess nahe.

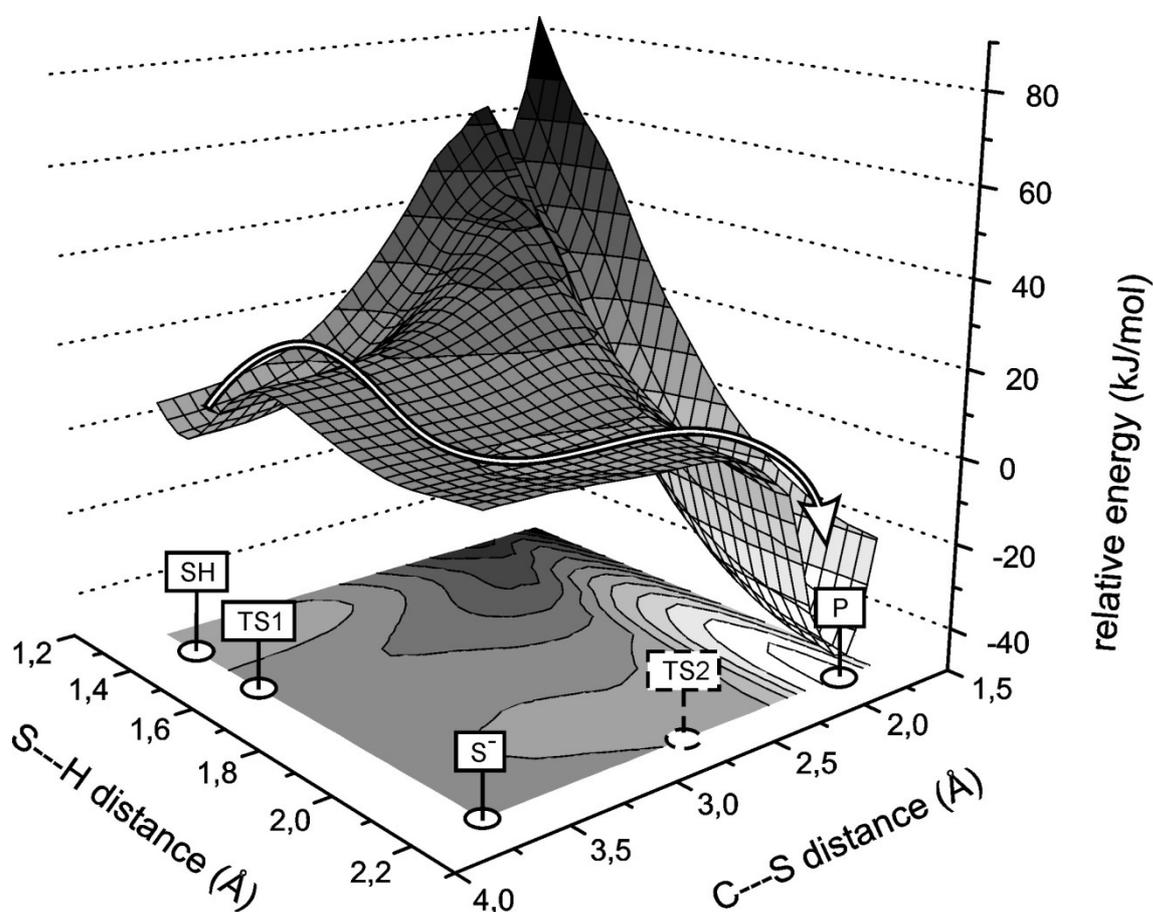


Abb. 5–2: Potentialhyperfläche des Acrolein-Modellsystems für die Variation des S-H- bzw. C-S-Abstandes (zur Verfügung gestellt von Dipl.-Chem. A. Paasche)

Im vorgelagerten Schritt erfolgt zunächst die Deprotonierung des Thiols (SH) zum Thiolat-Anion (S^-). Dieser Schritt erfordert die Überwindung einer berechneten Energiebarriere von 18 kJ/mol (TS1). Nach der Deprotonierung erfolgt die Addition an das Michael-System. Dabei geht gleichzeitig das Proton des Ammoniumions auf den Enolat-

Sauerstoff über. Im Falle des Acrolein-Modells wird dabei kein weiterer Übergangszustand (TS2) durchlaufen, d. h. die Deprotonierung des Thiols stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gesamtreaktion dar. Bezogen auf das Thiol (SH) verläuft der gesamte Prozess mit einer relativen Energie von -45 kJ/mol (SH) leicht exotherm. Die genauen Energien der jeweiligen Reaktionsschritte sind in Abb. 5–3 nochmals zusammengefasst.

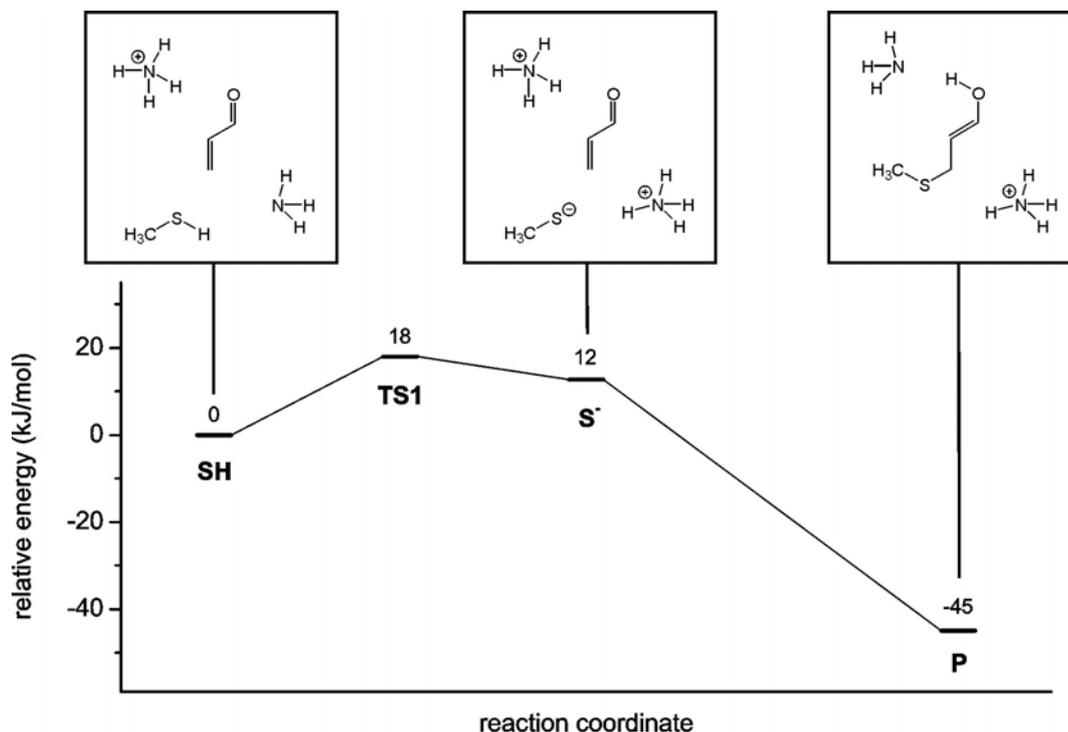


Abb. 5–3: Energieprofil des Acrolein-Modells

Für die charakteristischen Punkte der Reaktionskoordinate wurden die jeweiligen Bindungslängen berechnet. Diese stehen in guter Korrelation mit dem postulierten Modell. Bemerkenswert ist, dass die Energiebilanz der Gesamtreaktion stark von der Protonierung des Sauerstoffs im Michael-System abhängig ist. Steht als Protonendonator lediglich Wasser an Stelle eines Ammoniumions zur Verfügung, findet keine Protonierung statt, die Energiebilanz verringert sich um 40 kJ/mol. Ohne Donor verläuft die Reaktion sogar endotherm. Für eine irreversible Addition des Cystein-Restes an das Michael-System eines Inhibitors scheint daher die Orientierung der Carbonylgruppe in Richtung des „Oxyanion-hole“ eine entscheidende Rolle zu spielen.

Im Folgenden wurden die Einflüsse verschiedener Substituenten am Michael-Fragment untersucht. Dabei wurde ebenfalls die Konformation des Michael-Systems (*s-cis* vs. *s-trans*) berücksichtigt. Abb. 5–4 zeigt die Kennzeichnung der eingefügten Reste an ihrer jeweiligen Position.

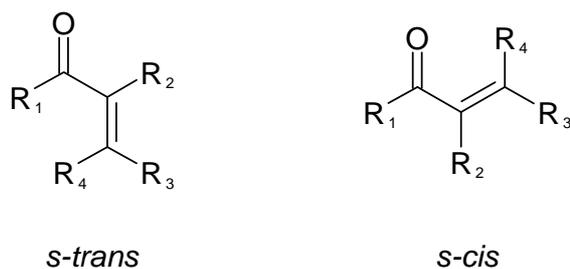


Abb. 5–4: Kennzeichnung der Substituenten am Michael-System unter Berücksichtigung der s -trans- bzw. der s -cis-Form

Die Ergebnisse der durchgeführten Berechnungen sind in nachstehender Tabelle zusammengefasst (Tab. 5–1). Aufgrund der erhaltenen Daten lassen sich folgende vergleichende Betrachtungen anstellen (es soll zunächst nur die s -trans-Konformation berücksichtigt werden):

Verb.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	ΔE_{rel} [kJ/mol] ^a					
					s -trans			s -cis		
					S ⁻	TS2	P	S ⁻	TS2	P
I	H	H	H	H	12,7	-	-45,0	13,2	-	-54,3
II	Ph	H	H	H	14,8	21,6	-27,6	15,1	-	-34,9
IIIa	Ph	CH ₃	H	H	16,6	30,6	-2,1			n.d.
IIIb	Ph	H	CH ₃	H	17,6	39,3	-4,4	22,2	31,5	-11,9
IIIc	Ph	H	H	CH ₃	20,8	44,3	7,4	18,1	30,9	-9,5
IVa	PhF ₂	H	H	H	14,0	15,9	-43,4			n.d.
IVb	PhCl ₂	H	H	H	16,1	-	-43,5			n.d.
IVc	PhBr ₂	H	H	H	16,7	-	-43,1			n.d.
Va	PhCl ₂	CH ₃	H	H	22,2	-	-26,8			n.d.
Vb	PhCl ₂	H	CH ₃	H	25,5	32,6	-17,3	19,6	25,0	-23,6
Vc	PhCl ₂	H	H	CH ₃	20,2	30,0	-7,0	15,3	21,6	-23,2

^a die angegebenen Energien beziehen sich auf die jeweils ungeladenen, unendlich voneinander entfernten Reaktionspartner

Tab. 5–1: Berechnete relative Energien [kJ/mol] der einzelnen Reaktionsschritte in Abhängigkeit des Substitutionsmusters des Michael-Systems

Acrolein vs. Phenylacrolein

Wird als Variation zum Acrolein-Modell (**I**, $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$) eine Phenylgruppe in R_1 -Position (**II**) eingeführt, zeigen sich zwei Effekte. Zum einen reduziert sich die Energiebilanz der Gesamtreaktion um 17 kJ/mol auf -28 kJ/mol, d. h. die Addition verläuft weniger exotherm, zum anderen muss zur Addition nun eine Reaktionsbarriere (TS2) von 7 kJ/mol ausgehend vom Thiolat (S^-) überwunden werden. Die Tatsache, dass die Energie des deprotonierten Zustandes (S^-) sich für $R_1 = H$ (**I**) bzw. $R_1 = Ph$ (**II**) nur um 2 kJ/mol unterscheidet, zeigt, dass die elektronische Natur des Michael-Systems aufgrund des Substitutionsmusters nur geringen Einfluss auf die Deprotonierung hat und diese somit – wie bereits angenommen – als separater Reaktionsschritt behandelt werden kann.

Einfluss dihalogensubstituierter Phenylreste an R_1 -Position

Um den Einfluss elektronenziehender Substituenten am Phenylring zu untersuchen, wurde die Reaktion mit 2,3-Dihalogenphenylresten (PhX_2 ; $X = 2,3$ -Difluoro (**IVa**), 2,3-Dichloro (**IVb**), 2,3-Dibromo (**IVc**)) an Position R_1 berechnet. Hier zeigt sich wiederum ein gegenläufiger Trend. Im Vergleich zum unsubstituierten Phenylrest verringert sich mit $X = 2,3$ -Difluoro die Barriere auf weniger als 2 kJ/mol. Für die Chlor- und Bromsubstituierten Reste verschwindet die Barriere vollständig, die erhaltenen Energiewerte zeigen wieder eine ähnlich exotherme Reaktion (-44 kJ/mol für **IVb**) wie beim Acrolein-Modell (vgl. Abb. 5–3). Als allgemeiner Trend kann aus den Ergebnissen von Inkrementabschätzungen festgestellt werden, dass eine 2,3-Dichlorsubstitution am Phenylrest eine Absenkung der Reaktionsbarriere (ΔE^{TS2}) von ca. 10 kJ/mol bzw. der relativen Energie der Produkte (ΔE^P) von ca. 14 kJ/mol zur Folge hat.

Einfluss des Substitutionsmusters an der C-C-Doppelbindung

Wie bereits oben erläutert, verläuft die Reaktion des Phenyl-substituierten Analogons des Acroleins über eine Reaktionsbarriere von 7 kJ/mol. Ausgehend von dieser Struktur wurde der Effekt jeweils eines Methylsubstituenten an den Positionen $R_2 - R_4$ berechnet (jeweils *s-trans*). Es zeigte sich, dass eine Methylsubstitution die Reaktion immer negativ beeinflusst. In jedem Fall kam es zu einer Anhebung der Reaktionsbarriere. Für die *exo*-Doppelbindung (**IIIa**, $R_2 = Me$) lag die Barriere bei 14 kJ/mol bezüglich S^- . Die beiden Derivate mit *endo*-Doppelbindung waren im Vergleich dazu mit einer Barriere von 21 kJ/mol (**IIIb**, $R_3 = Me$) bzw. 23 kJ/mol (**IIIc**, $R_4 = Me$) deutlich benachteiligt. Im letzten Fall kommt es zudem zu einer positiven Energiebilanz von +7 kJ/mol, d. h. die Reaktion

verläuft insgesamt endotherm. Dieser Trend ist auch bei den 2,3-Dichlorphenyl-Derivaten zu beobachten. Durch die höhere Reaktivität im Vergleich zu den Derivaten mit unsubstituiertem Phenylrest (s. o.) verschwindet die Barriere für die Verbindung mit *exo*-Doppelbindung (**Va**, R₁ = PhCl₂, R₂ = Me, R₃ = R₄ = H). Methylsubstitution an Position R₃ (**Vb**) bzw. R₄ (**Vc**) ergibt eine Reaktionsbarriere von 7 bzw. 10 kJ/mol. Für alle drei Verbindungen ist die Energiebilanz der Gesamtreaktion jedoch exotherm.

s-cis vs. *s-trans*-Konformation

Nachdem zuvor nur die Substituenten-Effekte in der *s-trans* Konformation diskutiert wurden, soll nun die Aufmerksamkeit den beiden möglichen Konformationen des Michael-Systems gelten. Wie die Ergebnisse für die berechneten Systeme zeigen, besitzt die jeweilige *s-cis* Form die höhere Reaktivität verglichen mit dem *s-trans*-Analogon. Die gilt sowohl für das Acrolein-System (**I**) als auch das Phenylpropenon-Modell (**II**). Für R₁ = Ph sorgt die *s-cis*-Konformation zudem für das Verschwinden der Reaktionsbarriere, die in der *s-trans*-Konformation noch erhalten war. Bei den berechneten *endo*-Michael-Systemen (**IIIb**, **IIIc**) bleibt die Barriere erhalten, die Reaktion verläuft jedoch für die *s-cis*-Derivate jeweils über eine niedrigere Reaktionsbarriere und zudem deutlich exothermer. Dieser Trend ist ebenfalls bei den Ergebnissen für die berechneten 2,3-Dichlorphenyl-Spezies (**Vb** bzw. **Vc**) zu beobachten.

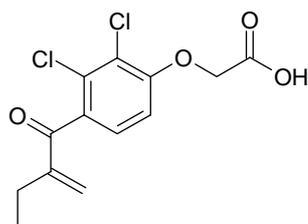
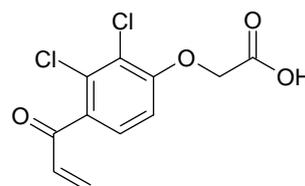
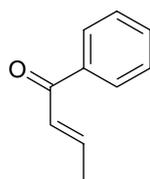
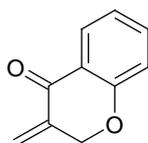
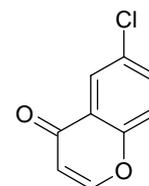
5.2 NMR-Kinetische Untersuchungen

Um die berechneten Ergebnisse im Experiment nachzuvollziehen, wurden geeignete Modellsubstanzen im NMR-Experiment mit einem Thiol umgesetzt. Als Verbindungen kamen dabei synthetisierte Derivate der Etacrynsäure sowie kommerziell erworbene Substanzen mit unterschiedlich substituiertem Michael-System zum Einsatz. Durch kontinuierliche Detektion spezifischer Signale des ¹H-NMR-Spektrums der Ausgangsverbindungen wurde der Umsatz mit dem eingesetzten Thiol beobachtet, um daraus Aussagen über die Reaktivität der Modellsubstanzen abzuleiten.

5.2.1 Modellverbindungen und Reaktionsbedingungen

Zur Untersuchung der Additionsreaktion von Thiolen an α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen wurden insgesamt fünf verschiedene Modellsubstanzen mit *p*-Methoxythiophenol umgesetzt. Dies waren neben der Etacrynsäure (**MS37**) und dem Norethylderivat

der Etacrynsäure (**MS21**) das 3-Methylenchroman-4-on **MS75** sowie die kommerziell erworbenen Verbindungen *trans*-Crotonylphenon ((*E*)-1-Phenylbut-2-en-1-one, *Sigma-Aldrich*) und 6-Chlorchromenon (6-Chlor-4*H*-chromen-4-on, *Maybridge*). Das 2,3-Dichlor-4-crotonylanisol (**MS05**) war ebenfalls als Modellsubstanz für diese Testreihe vorgesehen, konnte aber aufgrund seiner schlechten Löslichkeit im verwendeten Puffer nicht miteinbezogen werden. Abb. 5–5 zeigt die Strukturen der getesteten Modellverbindungen.

**MS37** (Etacrynsäure, EA)**MS21** (Norethyletacrynsäure)*trans*-Crotonylphenon**MS75** (Methylenchromanon)

6-Cl-Chromenon

Abb. 5–5: Strukturen der untersuchten Modellverbindungen

Mit der Auswahl der Substanzen wurde versucht, diverse Einflüsse des Substitutionsmusters der Doppelbindung auf die Geschwindigkeit der Thiol-Addition zu beobachten. Wie aus den Strukturen ersichtlich, wurden dabei Systeme mit *exo*- (**MS37**) bzw. unsubstituierter Doppelbindung (**MS21**) gewählt. Da **MS05** als Derivat mit *endo*-Doppelbindung nicht einsetzbar war, wurde auf das *trans*-Crotonylphenon zurückgegriffen. Mit **MS75** stand eine Modellsubstanz zur Verfügung, bei der durch die Ringstruktur das Michael-System in der *s-cis*-Konformation fixiert ist. Als Vergleich dazu fungierte das 6-Chlorchromenon mit fixierter *s-trans*-Struktur.

Als Reaktionspartner, der in dieser Modellreaktion als Ersatz für den Cystein-Rest im aktiven Zentrum der SARS-CoV-M^{pro} diente, wurde *p*-Methoxythiophenol eingesetzt. Die Wahl dieses Thiols war durch zwei notwendige Eigenschaften bestimmt. Zum einen handelt es sich bei dieser Verbindung mit einem pK_a -Wert von 7.4 – 7.8 um ein vergleichs-

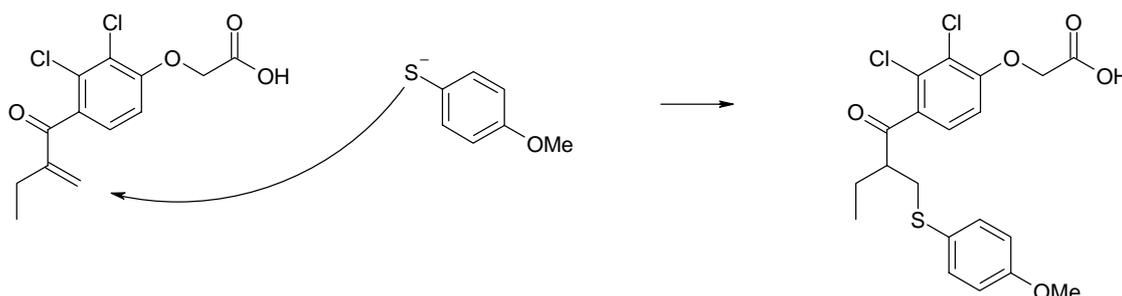
weise saures Thiol. Bei dem eingestellten pH-Wert des Puffers von $\text{pH} = 7.6$, welches dem pH-Wert der Assay-Bedingungen und somit den physiologischen Bedingungen des Enzyms entspricht, liegt somit die Hälfte des Thiols bereits in der deprotonierten Form vor. Zum anderen zeigt *p*-Methoxythiophenol durch seine aromatische und symmetrische Struktur nur wenige, klar definierte Signale im ^1H -NMR-Spektrum. Weder durch die zwei Signale des aromatischen Rings (> 6.7 ppm) noch durch das Singulett der Methoxy-Gruppe (< 3.8 ppm) ist eine Überlagerung mit den relevanten Doppelbindungssignalen der Modellverbindungen ($\approx 5.5 - 6.5$ ppm) zu erwarten. Dies war eine essentielle Voraussetzung für die erfolgreiche Durchführung dieser Testreihe.

Für die Reaktion wurden jeweils Stammlösungen von Thiophenol (S) und Inhibitor (I) in d_6 -DMSO hergestellt. Die Konzentrationen der Stammlösungen betragen für das *p*-Methoxythiophenol bzw. für den jeweiligen Inhibitor jeweils 100 mM. Als Reaktionsmedium wurde ein Phosphatpuffer (100 mM, $\text{pH} = 7.6$) in D_2O verwendet. Die pH-Einstellung erfolgte durch Mischung von K_2HPO_4 -Lösung (100 mM in D_2O) und KH_2PO_4 -Lösung (100 mM in D_2O). Zur Reaktion wurden nacheinander 10 μL Inhibitor-Stammlösung, 770 μL Puffer und 20 μL Thiophenol-Stammlösung in das NMR-Röhrchen pipettiert und gut gemischt. Die erhaltenen Endkonzentrationen im Endvolumen von 800 μL betragen somit $[\text{I}] = 1.25$ mM bzw. $[\text{S}] = 2.50$ mM. Dieses Konzentrationsverhältnis entspricht unter Berücksichtigung des $\text{p}K_a$ -Wertes des *p*-Methoxythiophenols und des eingestellten pH-Wertes Reaktionsbedingungen 2. Ordnung.

Die Aufnahme der ^1H -NMR-Spektren erfolgte an einem „Avance 400“-Spektrometer der Firma *Bruker* (Rheinstetten) bei 25 °C. Die Messung des Reaktionsverlaufs begann direkt im Anschluss an das Mischen der Reaktionspartner. Als Startzeit für die Auswertung ($t = 0$ min) wurde der Zeitpunkt des Mischens angenommen. Die Spektren wurden mit einer Scanzahl von 64 Scans/Spektrum aufgenommen. Es wurden zunächst kontinuierlich über 60 Minuten Spektren aufgezeichnet, nachfolgend in größeren Zeitabständen, abhängig von der bereits beobachteten Umsatzrate. Parallel zu jeder Kinetik-Messung wurde jeweils zu Beginn und am Ende der Messreihe ein Referenz-Spektrum des Inhibitors im Puffer aufgenommen, um dessen Stabilität ohne Zugabe von Thiol zu überprüfen. Diese war in allen Experimenten gewährleistet.

5.2.2 Ergebnisse der NMR-Experimente

In einem ersten Versuch wurde die Etacrynsäure (**MS37**) unter den oben beschriebenen Bedingungen mit *p*-Methoxythiophenol umgesetzt (vgl. Schema 5–2) und der Reaktionsverlauf $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch verfolgt. Eine erste grundsätzliche Fragestellung war dabei zunächst die Größenordnung der Reaktionsdauer. Für Aziridine wurde mit dem beschriebenen Versuchsaufbau eine Umsetzung innerhalb mehrerer Stunden bzw. Tage^[109,110] beobachtet.



Schema 5–2: Modellreaktion des NMR-Experiments am Beispiel der Etacrynsäure (**MS37**)

Zur Detektion des Umsatzes wurden diejenigen Signale der Edukte verfolgt, die sich durch die Addition des Thiols verändert, also mit zunehmender Produktbildung allmählich verschwinden sollten. Dabei handelte es sich in erster Linie um die Protonensignale der C-C-Doppelbindung im Bereich von 5.5 – 6.2 ppm.

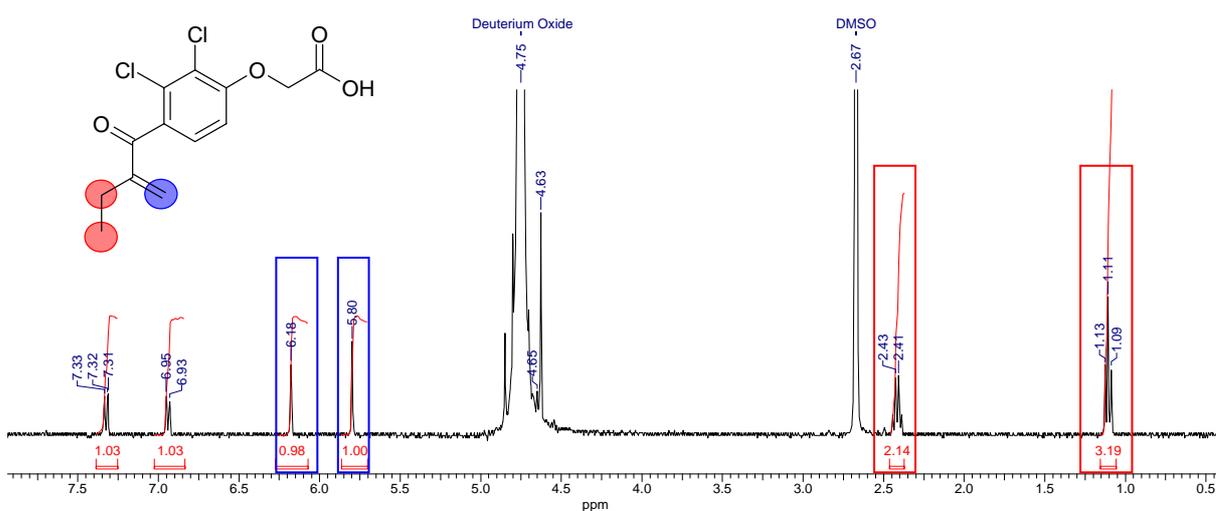


Abb. 5–6: $^1\text{H-NMR}$ -Referenzspektrum der Etacrynsäure im Puffer

Bei der Etacrynsäure waren zusätzlich Veränderungen in den Signalen des Ethenrestes in der Seitenkette festzustellen. Deren Integration zur Quantifizierung war jedoch

aufgrund der Signalmultiplizität (Quartett bzw. Triplet) nicht zielführend, da gerade bei fortgeschrittener Umsetzung ein sehr ungünstiges Signal/Rausch-Verhältnis zu beobachten war. Dennoch war mit ihrer Hilfe die Bildung des Thiol-Adduktes nachzuvollziehen. Abb. 5–6 zeigt das $^1\text{H-NMR}$ -Referenzspektrum der Etacrynsäure im verwendeten Phosphatpuffer ($[\text{I}] = 1.25 \text{ mM}$) mit den Signalen, die im Laufe der Umsetzung verschwinden.

Die Auswertung zeigte, dass nach der Aufnahme des ersten Spektrums ($t = 12 \text{ min}$) bereits über 60 % der Etacrynsäure zum Thiol-Addukt umgesetzt waren. Der Umsatz nach $t = 42 \text{ Minuten}$ betrug 90 %. Innerhalb der ersten 60 Minuten waren mehr als 95 % des Eduktes verbraucht. Damit zeigt die Etacrynsäure mit dem Michael-System als elektrophile Strukturelement eine deutlich höhere Reaktivität bei der Umsetzung mit Thiolen als die innerhalb der Arbeitsgruppe bereits getesteten Aziridine (s. o.). Die zeitabhängige Abnahme der $^1\text{H-NMR}$ -Signale der Etacrynsäure ist in nachfolgender Abbildung illustriert (Abb. 5–7). Farbig gekennzeichnet sind die jeweils abnehmenden Signale der Etacrynsäure (blau: $\text{C}=\text{CH}_2$, rot: CH_2CH_3) und des Thiols (gelb: Ar-H).

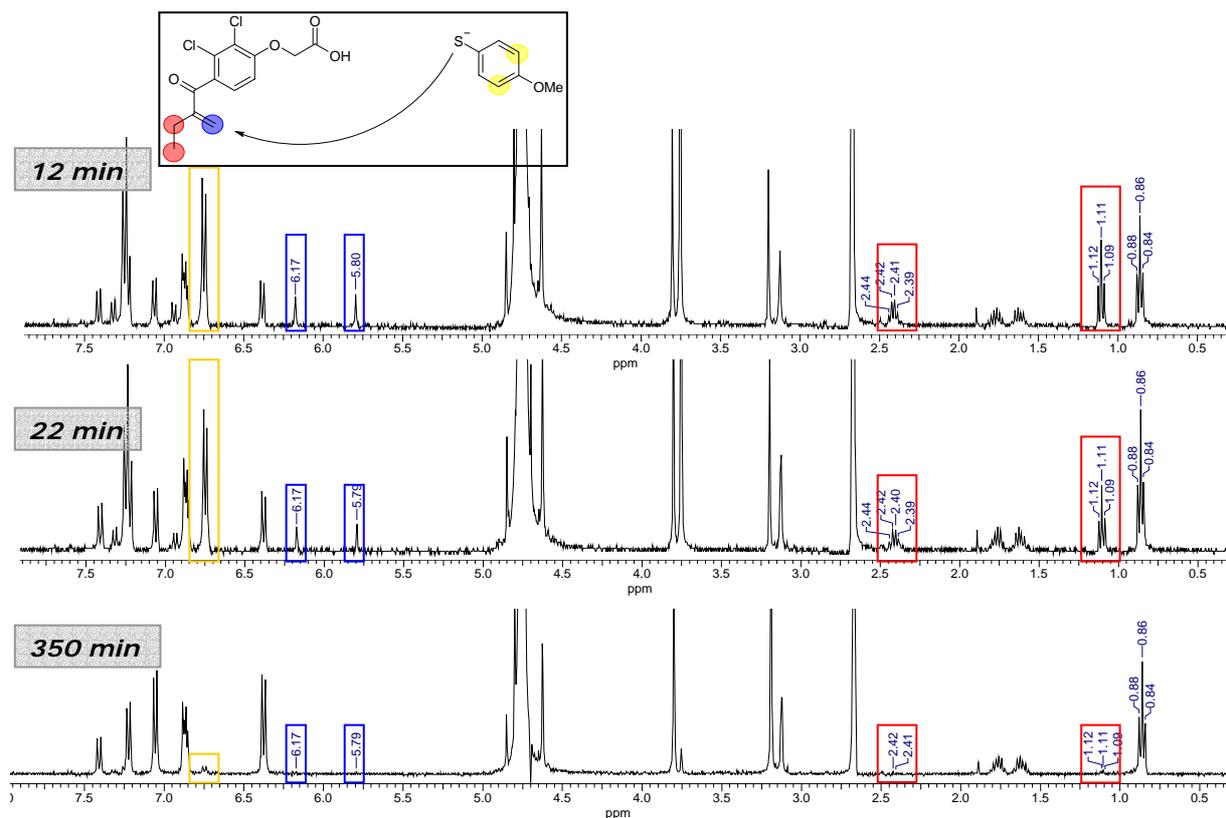


Abb. 5–7: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Umsetzung von Etacrynsäure (MS37, rot/blau) mit *p*-Methoxythiophenol (gelb)

Durch die unabhängige Detektion der in Abb. 5–7 gekennzeichneten Signale ist neben dem Verbrauch der beiden Edukte Etacrynsäure (blau) und Thiol (gelb) auch die Bildung des Thiol-Adduktes zu erkennen. Addiert man die Integrale der jeweiligen CH₃-Gruppen in der Seitenkette von Etacrynsäure (1.11 ppm) und Thiol-Addukt (0.86 ppm), liefert deren Summe einen konstanten Wert. Daraus lässt sich die Produktbildung in Abhängigkeit der Zeit darstellen. Wie Abb. 5–8 zeigt, folgt die Umsetzung der Etacrynsäure mit dem *p*-Methoxythiophenol einem exponentiellen Verlauf.

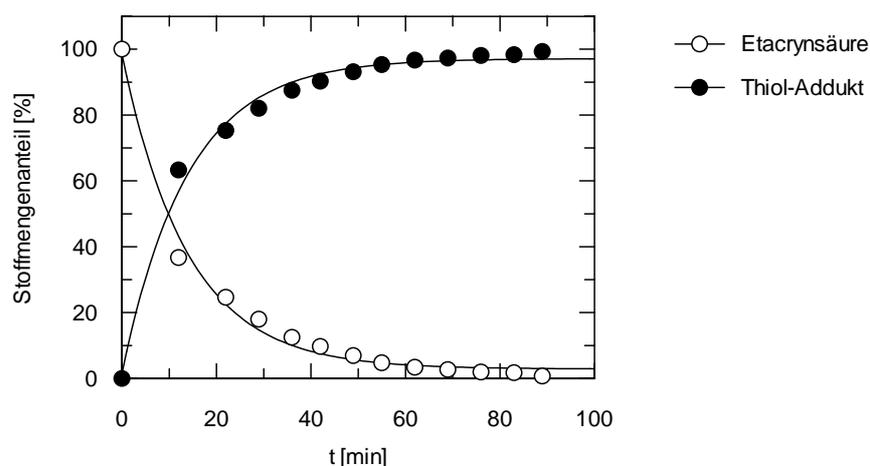


Abb. 5–8: Umsatz-Zeit-Diagramm der Addition von *p*-Methoxythiophenol an Etacrynsäure

Da – wie auch die Integration von Edukt und Produktsignalen zeigt – die Summe von Etacrynsäure und Addukt jeweils konstant ist, konnten die erhaltenen Integralwerte in Konzentrationen umgerechnet werden. Als Summe diente der Mittelwert der jeweiligen CH₃-Signale von Etacrynsäure und Addukt. Gleiches ist auch für das Thiophenol möglich. Zur Umrechnung in Konzentrationen wurde der Mittelwert der Summen der Integrale für die Methoxygruppe in Thiol-Edukt und Thiol-Addukt als konstanter Wert herangezogen. Aus dem zeitlichen Verlauf der Konzentrationen der beiden Edukte Etacrynsäure [A] und *p*-Methoxythiophenol [B] und den jeweiligen Anfangskonzentrationen [A]₀ bzw. [B]₀ lässt sich nach der Gleichung

$$\ln \frac{[A]}{[B]} = \ln \frac{[A]_0}{[B]_0} + ([A]_0 - [B]_0)k_2t$$

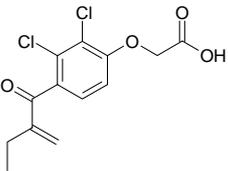
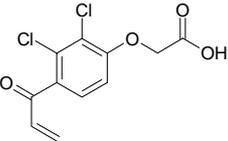
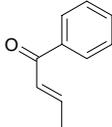
die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung k_2 berechnen. Man erhält sie durch Auftragung von $\ln([A]/[B])$ über t . Die Steigung der erhaltenen Gerade entspricht $([A]_0 - [B]_0)k_2$. Der daraus ermittelte Wert der Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung betrug für die Um-

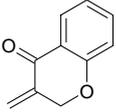
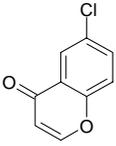
setzung der Etacrynsäure mit *p*-Methoxythiophenol $k_2 = 25.6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Die unabhängige Ermittlung der Integrale von Edukt und Produkt war für die anderen Verbindungen der Testreihe aufgrund von Signalüberlagerungen nicht möglich. Daher sind im Folgenden für deren Umsetzung nur die prozentualen Werte angegeben.

Die Verbindungen **MS21** und **MS75** wurden bereits im Vorfeld aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften am Michael-System reaktiver als die Etacrynsäure eingeschätzt. Dies konnte durch das NMR-Experiment bestätigt werden. In beiden Fällen waren bereits im ersten aufgenommenen Spektrum ($t = 12 \text{ min}$) die Signale der C-C-Doppelbindung vollständig verschwunden. Referenzspektren der Inhibitoren **MS21** und **MS75** ohne Thiol-Zusatz zeigten jeweils, dass beide Verbindungen unter den Versuchsbedingungen im Puffer löslich und stabil sind, d. h. die Umsetzung findet mit dem *p*-Methoxythiophenol statt und ist bereits innerhalb von 12 Minuten vollständig abgeschlossen.

Das *trans*-Crotonylphenon wurde als Vertreter einer Spezies mit *endo*-Doppelbindung in die Testreihe mit aufgenommen. Seine Reaktivität liegt im Bereich der Etacrynsäure. Nach der ersten Messung ($t = 12 \text{ min}$) konnten bereits 88 % Umsatz beobachtet werden. Nach 42 Minuten war der Umsatz mit 99 % nahezu quantitativ.

Als Vergleich zum 2-Methylenchromanon **MS75** (*s-cis*, s. o.) wurde das 6-Chlorchromanon als Analogon mit fixierter *s-trans*-Doppelbindung getestet. Für diese Verbindung konnte keine Umsetzung mit dem *p*-Methoxythiophenol festgestellt werden. Auch nach einer Reaktionszeit von zwei Tagen war die Ausgangsverbindung nahezu vollständig vorhanden. Alle Ergebnisse der NMR-Testreihe sind in Tab. 5–2 zusammengefasst.

Verb.	Umsatz [% (Zeit)]	k_2 [$\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$]
 Etacrynsäure (EA) (MS37)	63% (12 min) 90% (42 min) > 99 % (90 min)	25.6
 Norethyletacrynsäure (MS21)	> 99 % (12 min)	n.d.
 <i>trans</i> - Crotonylphenon	88 % (12 min) > 99 % (42 min)	n.d.

	Methylenchromanon (MS75)	> 99 % (12 min)	n.d.
	6-Cl-Chromenon	< 5 % (2d)	n.d.

Tab. 5–2: Ergebnisse der NMR-Kinetik-Experimente (Umsatzraten in %; ermittelte Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung k_2)

Da die relativ lange Vorlaufzeit von mindestens 10 bis 12 Minuten für das jeweils erste NMR-Experiment einer Messreihe durch die Äquilibrierung (Lock/Shim) des Geräts und die Aufnahmedauer der Spektren nicht zu vermeiden war, wurde als Alternative für die Verbindungen **MS21** und **MS75**, deren Umsetzung mittels $^1\text{H-NMR}$ zeitlich nicht erfasst werden konnte, eine UV-Titration versucht. Diese Methode eignet sich ebenfalls zur Bestimmung von kinetischen Parametern durch die Detektion der zeitlichen Veränderung der Absorptionsmaxima der beteiligten Verbindungen und ist durch die schnellere Datenaquisition der NMR-Spektroskopie in punkto Zeitdauer überlegen. Eine Übertragung auf das oben beschriebene Modellexperiment war jedoch nicht möglich. Durch die Überlagerung der Absorptionsmaxima von Inhibitor und Thiol konnten keine aussagekräftigen Daten erhalten werden. Für diese Alternative wäre eine weitergehende Adaption der Versuchsbedingungen notwendig (alternatives Thiol, Referenzsystem, etc.), die im Rahmen dieser Arbeit nicht verfolgt wurde.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

Zur kinetischen Betrachtung des Angriffs eines Thiols an verschiedenen Strukturvarianten eines Michael-Systems erwies sich die Kombination von quantenchemischen Berechnungen und zeitabhängigen $^1\text{H-NMR}$ -Experimenten als aufschlussreiches Werkzeug. Die Rechnungen postulieren den vorgelagerten Schritt der Deprotonierung des Thiols zum Thiolat, der unabhängig von der Addition an die C-C-Doppelbindung betrachtet werden kann. Entscheidenden Einfluss hat hierbei die Base, die als Protonendonator zur Stabilisierung des entstehenden Enolats am Carbonyl-Sauerstoff beiträgt. Weiterhin ist eine klare Tendenz der Reaktivitäten in Abhängigkeit des Substitutionsmusters des Michael-Systems zu erkennen. Es zeigt sich, wie zu erwarten, ein klarer negativer Einfluss

von Substituenten mit +I-Effekt ($R_1 = \text{Ph}$, $R_2 - R_4 = \text{Me}$), der durch die Anwesenheit elektronenziehender Substituenten am Phenylring ($R_1 = \text{PhX}_2$) z. T. wieder kompensiert werden kann. Ebenso kann eine klare Bevorzugung der *s-cis*-Konformation des Michael-Systems gegenüber *s-trans*-Analoga beobachtet werden.

Mit Hilfe der zeitabhängigen $^1\text{H-NMR}$ -Experimente konnte die Addition von *p*-Methoxythiophenol an eine Reihe von Modellverbindungen mit verschiedenen substituierten Michael-Fragmenten verfolgt werden. In allen Fällen war die Umsetzung des Michael-Eduktes durch die Detektion der Integrale der jeweiligen C-C-Doppelbindungssignale nachzuvollziehen, eine störende Signalüberlagerung lag nicht vor. Ebenso waren alle getesteten Verbindungen im Modellsystem ausreichend löslich und stabil. Dies ermöglichte für alle Verbindungen eine Aussage über die prozentuale Umsetzung des jeweiligen Inhibitors mit dem Thiol. Für die Etacrynsäure (**MS37**) konnte durch Auswertung der Edukt-Integrale von Inhibitor und Thiol zusätzlich zum prozentualen Anteil von verbrauchtem Edukt und gebildetem Thiol-Addukt eine Umrechnung in die jeweiligen Konzentrationen durchgeführt und die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung zu $k_2 = 25.6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ bestimmt werden. Dieses Resultat bestätigt die schon anhand der Umsetzungsdauer beobachtete um ca. Faktor 10 schnellere Reaktion der Etacrynsäure-Derivate im Vergleich zu Aziridinen^[108] und Epoxiden.^[116] Verglichen mit Geschwindigkeitskonstanten, die mittels eines Glutathion-Chemoassays für ähnliche Michael-Systeme ermittelt wurden, liegt der erhaltene Wert aber durchaus innerhalb derselben Größenordnung.^[117]

Der Nachteil der gewählten Methode besteht zum einen in der fehlenden Nullpunktmessung. Durch die Aufnahmezeit wird der erste Datenpunkt für den Umsatz der Reaktion erst nach 12 Minuten erhalten, was für die Verbindungen **MS21** und **MS75** jenseits der Detektionsgrenze lag, da die Umsetzung mit dem Thiol innerhalb dieser Zeit schon vollständig erfolgt war. Zum zweiten liefert die Integration der Protonensignale, insbesondere beim Auftreten von Multipletts im fortgeschrittenen Stadium der Umsetzung, aufgrund des schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses sehr ungenaue Werte.

Eine Abschätzung der Reaktivität mit Hilfe der erhaltenen Werte ist dennoch möglich. Im Folgenden werden die experimentell erhaltenen Daten mit den Ergebnissen der quantenchemischen Berechnungen verglichen:

Die schnellsten Umsetzungen (< 12 min) innerhalb der Testreihe wurden für die Nor-ethyletacrynsäure **MS21** (unsubstituierte C-C-Doppelbindung) und das Methylenchromanon **MS75** mit der fixierten *s-cis*-Konformation des Michael-Fragmentes beobachtet. Ob die Reaktion schon unmittelbar nach dem Mischen der Reaktanten abgeschlossen

war, oder einige Minuten zur Umsetzung benötigte, kann nicht geklärt werden. Die analogen berechneten Fragmente zu den vermessenen Modellsubstanzen **MS21** und **MS75** sind die Verbindungen **IVb** ($R_1 = \text{PhCl}_2$, $R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$) bzw. **II** (*s-cis*, $R_1 = \text{Ph}$, $R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$). Die Berechnungen zeigen, dass die Addition ausgehend vom deprotonierten Thiol sowohl für **II** als auch für **IVb** ohne Reaktionsbarriere verläuft. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den durchgeführten NMR-Experimenten. Wie die Berechnungen zeigten, verringert eine Substitution der C-C-Doppelbindung die Reaktivität des Moleküls. Dies konnte ebenfalls im Experiment beobachtet werden. Im Gegensatz zur sehr schnellen Reaktion von **MS21** konnte die Addition an die Etacrynsäure (**MS37**) bzw. an das *trans*-Crotonylphenon über einen Zeitraum von 40 bis 60 Minuten beobachtet werden. Zwar wurde für die Verbindung **Va** (*exo*-Doppelbindung, *s-trans*, $R_1 = \text{PhCl}_2$, $R_2 = \text{Me}$, $R_3 = R_4 = \text{H}$) als entsprechendes Analogon zur Etacrynsäure ebenfalls keine Reaktionsbarriere gefunden, dieser scheinbare Widerspruch kann aber in dem größeren +I-Effekt der im NMR-Experiment vorhandenen Ethylgruppe in Position R_2 im Vergleich zu $R_2 = \text{Me}$ bei den Berechnungen begründet liegen. Zudem ist dieser Umstand eine mögliche Erklärung für die offensichtlich schnellere Reaktion des *trans*-Crotonylphenons, das ja durch die *endo*-Konstitution der C-C-Doppelbindung im Gegensatz zur Etacrynsäure in seiner Reaktivität benachteiligt sein sollte.

Zum Vergleich von *s-cis* vs. *s-trans* sollten im NMR-Experiment die Verbindungen **MS75** bzw. 6-Chlorchromenon mit jeweils fixierter Struktur des Michael-Systems dienen. Während das Methylenchromanon **MS75** sofort umgesetzt wurde, war beim *s-trans*-Analogon keinerlei Abnahme der Edukt-Signale zu erkennen. Offenbar ist diese Verbindung durch ihre elektronische Struktur derart eingeschränkt, dass ein direkter Vergleich mit **MS75** bezüglich dieser Fragestellung nicht möglich ist. Vergleicht man **MS75**, unter der Annahme, dass dieses (hauptsächlich) in der energetisch günstigeren *s-trans*-Konformation vorliegt, mit dem *trans*-Crotonylphenon, so belegen die experimentellen Daten wiederum die Ergebnisse der Rechnungen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die getesteten Etacrynsäure-Derivate im Vergleich zu Aziridinen als elektrophile *warheads* in Protease-Inhibitoren erheblich schneller mit Thiolen reagieren. Während die Umsetzung von Aziridinen mehrere Stunden bis Tage benötigt, war bei den Etacrynsäure-Derivaten bereits unmittelbar nach dem Mischen bzw. innerhalb weniger Minuten eine fortgeschrittene Umsetzung zu beobachten. Die mit Hilfe von quantenchemischen Berechnungen gefundenen Tendenzen zur Reaktivität aufgrund elektronischer Einflüsse durch Substituenten am Michael-System

konnte durch zeitabhängige NMR-Experimente weitgehend belegt werden. Durch die teilweise nur sehr geringen Unterschiede in den berechneten Reaktionsbarrieren sind dem experimentellen Befund jedoch ebenfalls Grenzen gesetzt. Die gefundene hohe Reaktivität des Michael-Systems könnte zudem eine Erklärung für die teilweise nur geringe inhibitorische Wirkung im Enzym-Assay oder auch die hohe biologische Wirksamkeit und Cytotoxizität liefern (vgl. Kap. 3.1 und 3.2).

6 Zusammenfassung

Neben der Beteiligung an zahlreichen physiologischen Prozessen im menschlichen Organismus sowie bei diversen Krankheitsgeschehen spielen Cystein-Proteasen auch bei der Infektion mit dem humanen SARS-Coronavirus eine zentrale Rolle. Durch die Aufgabe der Polyprotein-Spaltung innerhalb der Virusreplikation sind die Cystein-Proteasen SARS-CoV-M^{pro} (SARS-Coronavirus Hauptprotease) und SARS-CoV-PL^{pro} (SARS-Coronavirus-papain-like Protease) essentiell für das Überleben und die Verbreitung des Virus. Dadurch stellen sie herausragende Targets für die Entwicklung neuer Protease-Inhibitoren als anti-virale Wirkstoffe dar.

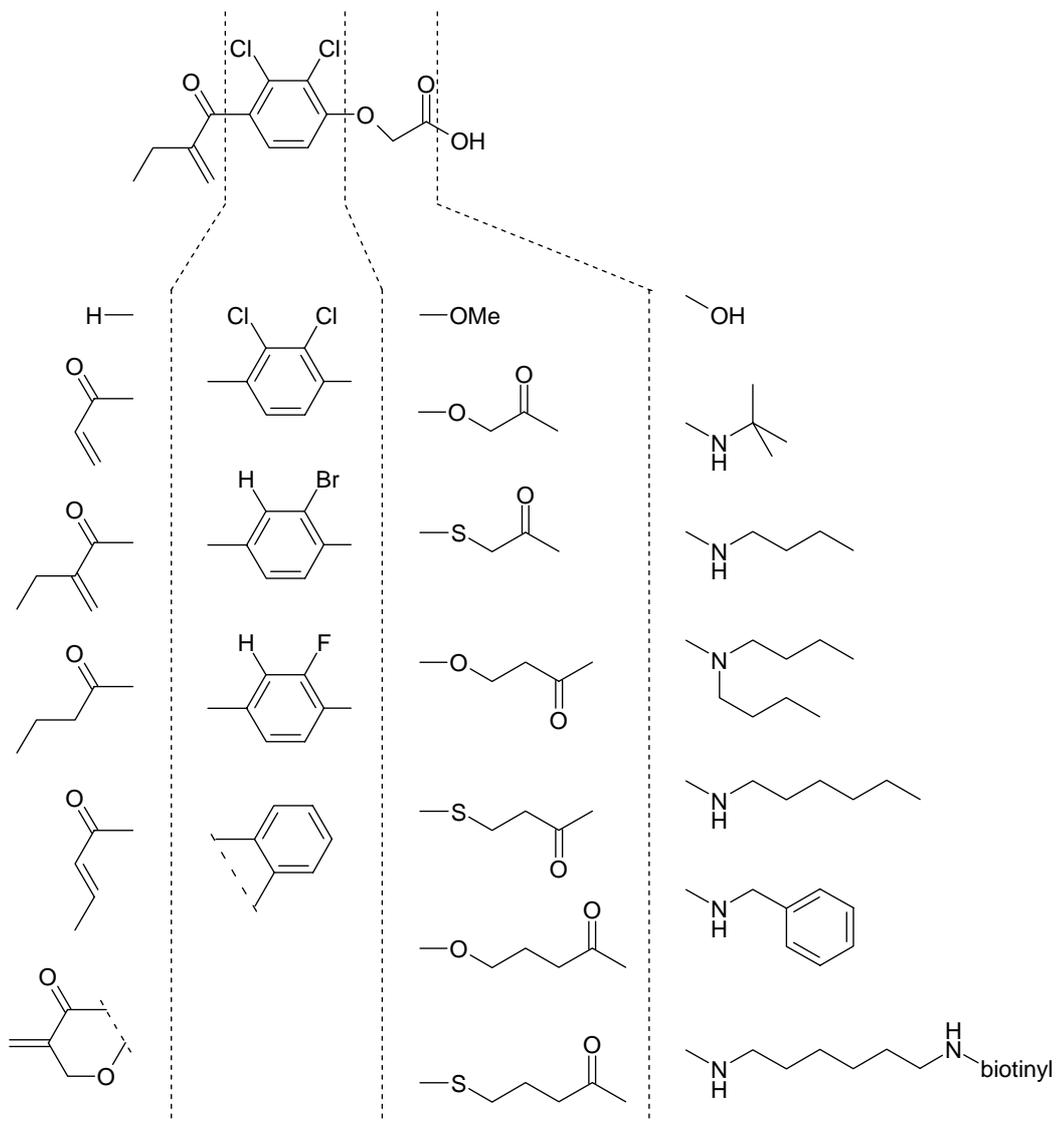
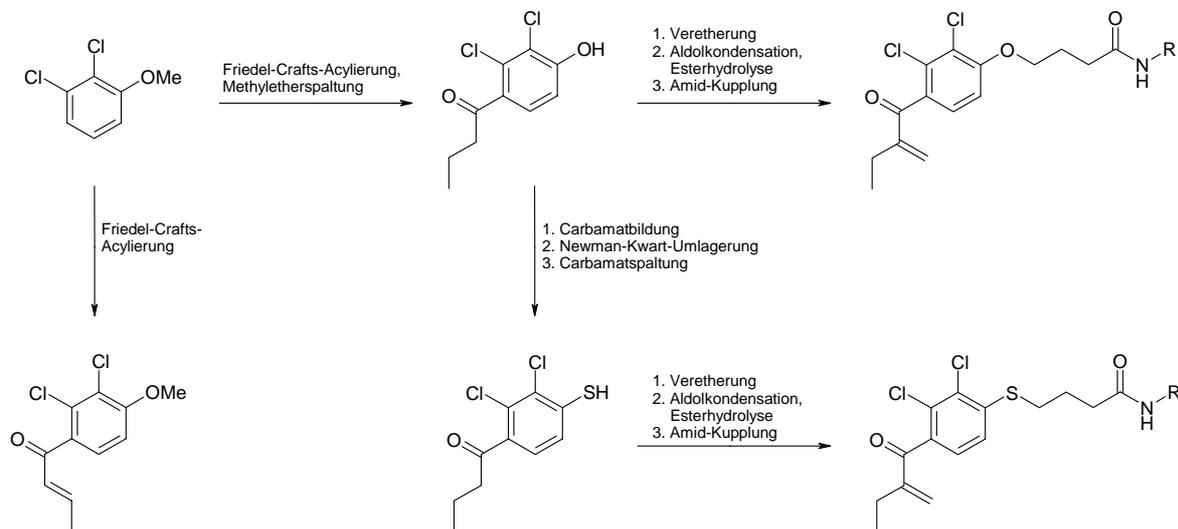


Abb. 6-1: Strukturvariationen an der Leitstruktur der Etacrynsäure

Etacrynsäure – ein langjährig eingesetztes Diuretikum – und verschiedene ihrer Derivate sind als nichtpeptidische Inhibitoren von Cystein-Proteasen bekannt. Einige Amid-Derivate besitzen bezüglich des SARS-CoV sowohl enzymhemmende (SARS-CoV-M^{pro}) als auch antivirale Wirkung. Das elektrophile Strukturfragment des Moleküls, das als Michael-Akzeptor eine Reaktion mit dem *active-site* Cystein-Rest der Protease eingehen kann, ist die α,β -ungesättigte Carbonyleinheit in der Acyl-Seitenkette. Ausgehend von der Etacrynsäure als Leitstruktur wurden durch Strukturvariationen neue Etacrynsäure-Derivate, bevorzugt Amid-Derivate, dargestellt. Abb. 6–1 zeigt die vorgenommenen Modifikationen an den einzelnen Strukturelementen der Etacrynsäure.

Erster Syntheseschritt war dabei die Friedel-Crafts-Acylierung von 2-Halogen- bzw. 2,3-Dichloranisolen. Durch den Einsatz von Butyryl-, Crotonyl- und 3-Chlorpropanoylchlorid wurden verschiedene Acylseitenketten in 4-Position am Aromaten eingeführt. Im selben Syntheseschritt erfolgte, außer bei den Crotonylderivaten, die Methyletherspaltung zum acylierten Phenol. Diese war bei den Crotonylderivaten auch durch alternative Methoden nicht möglich.

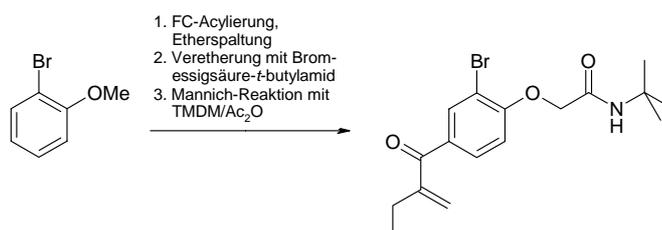


Schema 6–1: Hauptsyntheserouten der Etacrynsäure-Derivate an ausgewählten Beispielen

Die Einführung des Schwefelatoms erfolgte durch Umsetzung von 2,3-Dichlor-4-butyrylphenol zum Dimethylthiocarbamat und anschließende Newman-Kwart-Umlagerung mit Carbamat-Spaltung. An die so erhaltenen Phenole/Thiophenole wurde durch Substitution von Halogencarbonsäureestern und -amiden verschiedener Kettenlänge die zweite Seitenkette am Aromaten eingeführt. Auf diese Weise konnte eine Reihe homologer acylierter

Phenoxy- bzw. Phenylsulfanylcarbonsäure-Derivate (Essigsäure bis Buttersäure) erhalten werden. Die Einführung des Michaelssystems an der Acylseitenkette erfolgte vorwiegend durch Aldolkondensation an den jeweiligen Estern unter gleichzeitiger Esterhydrolyse zur freien Säure.

Die Mannich-Reaktion mit TMDM aus der Amid-Vorstufe fand nur bei der Darstellung des Bromderivats **MS42** Anwendung. Aus den erhaltenen Carbonsäuren wurden durch Umsetzung mit Aminen unter Standardkupplungsmethoden die angestrebten Amide dargestellt.



Schema 6–2: Synthese des Bromderivats MS42

Zusätzlich zu diesen Verbindungen wurden außerdem weitere Etacrynsäure-Derivate synthetisiert, die durch Biotin- und Deuterium-Markierung als Modellsubstanzen zum *In-vitro*-Nachweis des Wirkstoffes in biochemischen und spektroskopischen Assays dienen. Die Biotin-Markierung wurde an Etacrynsäure über einen Hexyldiamin-*spacer* vorgenommen. Unter zweifacher Peptidkupplung wurde im ersten Schritt zunächst das *spacer*-Biotin-Fragment dargestellt, welches anschließend an die Etacrynsäure kondensiert wurde.

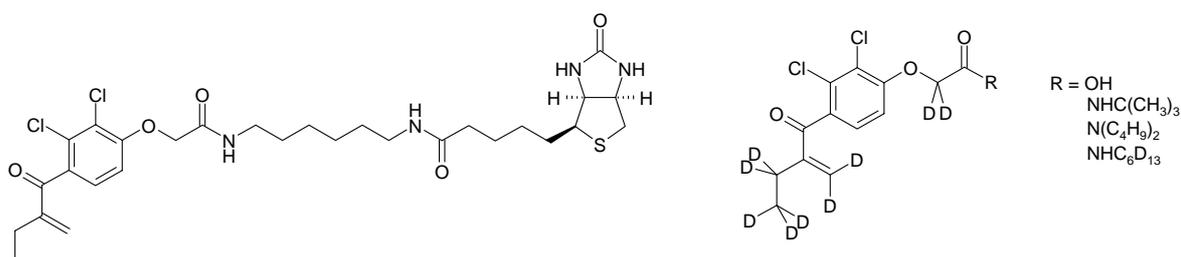


Abb. 6–2: Markierte Etacrynsäure-Derivate

Zur Deuterium-Markierung wurde ausgehend von 2,3-Dichloranisol unter Verwendung von *d*₇-Buttersäure, *d*₂-Ethylbromoacetat und *d*₂-Formaldehyd in Anlehnung an die angewendete Etacrynsäure-Synthese mit der *d*₉-Etacrynsäure ein hochdeutertes Wirkstoff-Analogon dargestellt. Der Grad der Deuterium-Markierung konnte durch Kupplung

von d_{13} -*n*-Hexylamin an die d_9 -Etacrynsäure noch auf ein d_{22} -Amid-Derivat erweitert werden. Insgesamt konnten neben dem direkten d_9 -Analogon des Wirkstoffes drei weitere Amid-Derivate erhalten werden.

Die zweite Leitstruktur, die zur Synthese neuer Wirkstoff-Derivate herangezogen wurde, war die des bekannten Serotonin-Antagonists Cinanserin. Die vorgenommenen Strukturvariationen beschränkten sich auf die Verwendung von z. T. halogenierten Zimtsäure- bzw. Phenylpropionsäurefragmenten. Diese wurden mittels Säurechlorid-Aktivierung an den Anilinteil gekuppelt. Am Anilinfragment wurde in einem vorgelagerten Syntheseschritt die Sulfonylseitenkette durch verschiedene Aminoalkylreste variiert. Insgesamt konnten auf diese Weise neben dem Cinanserin sechs weitere Derivate erhalten werden.

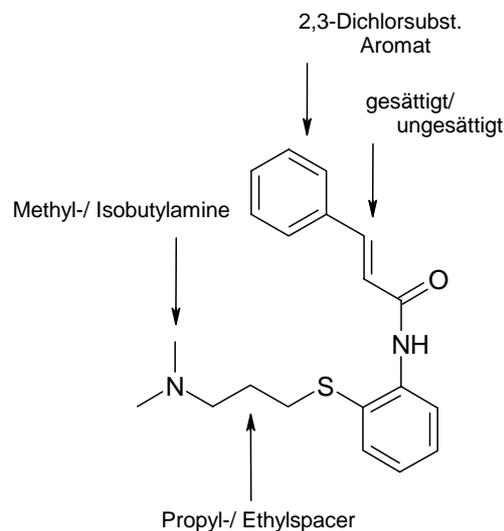


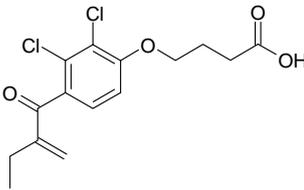
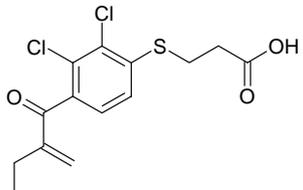
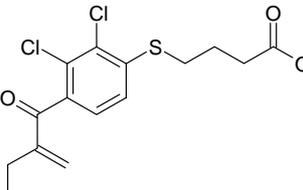
Abb. 6–3: Strukturvariationen an der Leitstruktur von Cinanserin

Zur Testung der erhaltenen Substanzen an der SARS-CoV-M^{pro} war die Synthese eines FRET-Substrats erforderlich. Dafür wurde mittels automatisierter SPPS ein Dekapeptid mit dem FRET-Donor-Akzeptor-Paar Anthranilsäure – Nitrotyrosin hergestellt. Das Substrat besitzt die Sequenz H₂N-Abz-Ser-Val-Thr-Leu-Gln-Ser-Gly-Tyr(NO₂)-Arg(Mts)-COOH. Der K_m -Wert für die SARS-CoV-M^{pro} wurde unter Berücksichtigung des *inner filter effect* zu $190 \pm 23 \mu\text{M}$ bestimmt.

Zur Evaluation der enzymhemmenden Aktivität wurden die synthetisierten Inhibitoren an den drei Enzymen SARS-CoV-M^{pro}, SARS-CoV-PL^{pro} und Cathepsin L getestet. Als potenteste Inhibitoren wurden das Bromanisol **MS07** ($K_i = 52.7 \mu\text{M}$, SARS-CoV-M^{pro})

sowie das Norethyl-Derivat der Etacrynsäure **MS21** ($K_i = 22.8 \mu\text{M}$, Cathepsin L) identifiziert. Alle getesteten Verbindungen zeigten an der SARS-CoV-PL^{pro} keine Aktivität.

Im Rahmen des SFB 630 wurden mit den synthetisierten Verbindungen weitere Testungen an Bakterien, den Protozoen *Leishmania major* und *Typanosoma brucei brucei* sowie an Makrophagen durchgeführt. Dabei zeigten die Verbindungen **MS38**, **MS40** und **MS41** eine besondere Wirksamkeit. Es konnten zwar im Wachstumstest sowie im Biofilmtest Aktivitäten gegen den Bakterienstamm *Staphylococcus epidermidis* sowie die Hemmung der Biofilmbildung von *S. epidermidis* festgestellt werden. Die zur Hemmung notwendigen Mindestkonzentrationen lagen oberhalb der Konzentrationen, die auch cytotoxisch auf Makrophagen wirkt. Ähnliches gilt für die Aktivität an *L. major*.

			
	MS38	MS40	MS41
	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ [μM]
<i>T. b. brucei</i>	0.52	0.83	0.54
Makrophagen	6.49	6.31	2.44

Tab. 6–1: Testergebnisse der aktivsten Etacrynsäure-Derivate

Bezüglich *T. b. brucei* zeigen diese drei Verbindungen jedoch eine erhöhte Aktivität mit MHK-Werten von $< 1 \mu\text{M}$. Das bedeutet, dass für eine Hemmung eine Konzentration erforderlich ist, die um Faktor 4 bis 11 unterhalb der cytotoxischen Konzentration liegt. Dieser Wert konnte nur noch durch das Biotin-markierte Derivat **MS57** (IC₅₀ *T. b. brucei*: $0.69 \mu\text{M}$; IC₅₀ Makrophagen: $33.8 \mu\text{M}$) übertroffen werden.

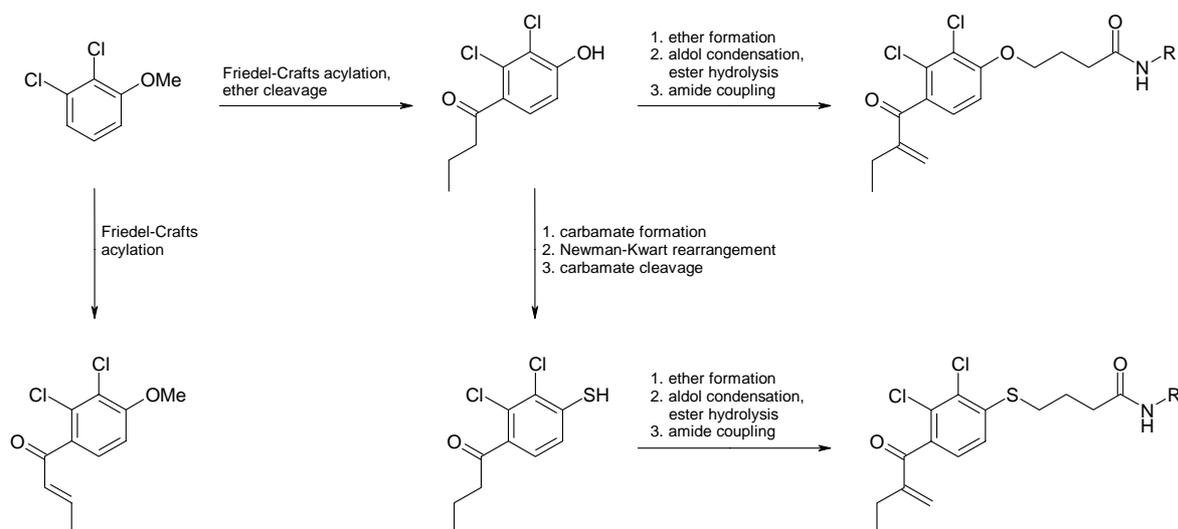
Weitere Untersuchungen mit der Biotin-markierten Verbindung **MS57** zeigten zudem eine Hemmung von Falcipain-2 und -3 sowie von *Plasmodium falciparum* mit IC₅₀-Werten von $3.0 \mu\text{M}$ (FP-2) $11.9 \mu\text{M}$ (FP-3) und $9.0 \mu\text{M}$ (*P.f.*). Weiterhin konnte mit Hilfe der Massenspektrometrie eine Bindung von **MS57** an FP-2 nachgewiesen werden. Diese findet aber offensichtlich nicht im aktiven Zentrum des Enzyms statt.

Die deuterierten Derivate der Etacrynsäure kamen als Modellsubstanzen zur Etablierung eines CARS-Mikroskopie-Assays zur spektroskopischen Wirkstoffdetektion zum Einsatz. Dabei war es bisher möglich, das CARS-Signal der d_9 -Etacrynsäure in DMSO-Lösung bis zu einer Konzentration von 500 μM zu erfassen.

Quantenchemische Berechnungen zur Simulation des Reaktionsmechanismus des *active-site*-Cystein-Restes der SARS-CoV-M^{pro} mit Michael-Systemen als elektrophile *warhead* zeigten, dass es sich dabei um einen zweistufigen Prozess handelt, bei dem nach erfolgter Deprotonierung des Thiols der Angriff an der Doppelbindung erfolgt. Zudem ergaben die Berechnungen, dass sowohl Halogenarylsubstituenten am Carbonylkohlenstoff sowie *exo*-konfigurierte Systeme sich energetisch günstig auswirken. Diese Trends konnten durch kinetische NMR-Experimente durch Umsetzung einer Reihe von Modellsubstanzen mit *p*-Methoxythiophenolat bestätigt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass für die betrachteten Systeme die Umsetzung innerhalb von wenigen Minuten, spätestens aber innerhalb von 90 Minuten zu 99 % erfolgt ist.

Etacrylic acid, which has been used as a diuretic drug for many years, and several derivatives thereof are well-known as non-peptidic inhibitors of cysteine proteases. Some amide derivatives possess both, enzyme inhibiting (SARS-CoV-M^{PrO}) and antiviral properties (SARS-CoV, TGEV, MHV). The α,β -unsaturated carbonyl unit located in the acyl side chain serves as an electrophilic scaffold which is supposed to react as a Michael-type acceptor with the active site cysteine residue of the protease. Starting from etacrylic acid as a lead structure, new derivatives, mainly amides, were synthesised. Fig. 7–1 presents the structural modifications of etacrylic acid.

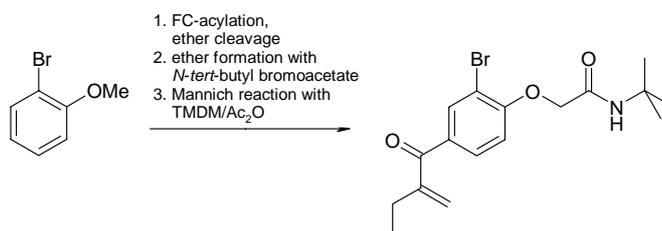
The first synthetic step was the Friedel-Crafts acylation of 1-halogenated or 2,3-dichloro anisoles using butyryl, crotonyl and 3-chloropropanoyl chloride. Methyl ether cleavage was possible in most cases within the same reaction step.



Scheme 7–1: Examples for the major synthetic pathways towards the etacrylic acid derivatives

Exchange of oxygen against sulphur was performed by conversion of 2,3-dichloro-4-butylphenol into a dimethyl thio carbamate followed by Newman-Kwart rearrangement. Cleavage of the *S*-aryl thio carbamate yielded the acylated thiophenol. The second side chain was introduced by nucleophilic substitution reactions with halogenated carboxylic acid esters or amides. Thus, a series of homologous phenoxy-carboxylic acid and phenyl-sulfanyl carboxylic acid derivatives was synthesised. The Michael-system was introduced by aldol condensation with concomitant ester hydrolysis to yield the free acids, or by Mannich reaction with TMDM yielding the amide (**MS42**). The carboxylic acids were

converted into the amide derivatives by treatment with different amines using standard coupling procedures.



Scheme 7-2: Synthesis of the bromo derivative MS42

Additionally, etacrynic acid derivatives labelled either with biotin or deuterium were synthesised as model compounds for *in-vitro* detection in biochemical and spectroscopic assays. The biotin labelling was achieved by coupling biotin to etacrynic acid *via* a hexane diamine spacer. In the first step the spacer-biotin moiety was synthesised followed by condensation with etacrynic acid.

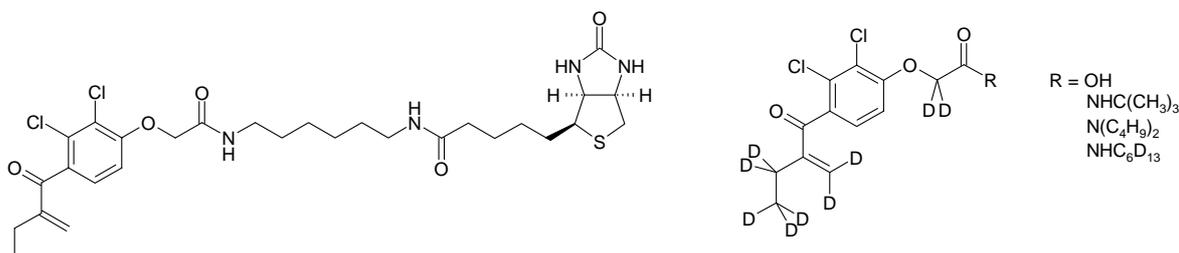


Fig. 7-2: Labelled derivatives of etacrynic acid

For the synthesis of the deuterated compounds the established procedure of the etacrynic acid synthesis described above could be applied using *d*₇-butyric acid, *d*₂-ethylbromoacetate and *d*₂-formaldehyde. Thus, a highly deuterated analogue of the known drug etacrynic acid could be obtained. The labelling was enhanced by peptide coupling of *d*₁₃-hexane-1-amine with *d*₉-etacrynic acid yielding a *d*₂₂-amide derivative. In total, the deuterated etacrynic acid and three amide derivatives were synthesised.

The second lead structure, which was used as a basis for new cysteine protease inhibitors, was the well known serotonin antagonist cinanserin. For the structural variation of this cinnamic acid anilide halogenated cinnamic acid and phenyl propanoic acid moieties were used as acid fragments. Amide coupling was performed by thionyl chloride

activation. In a preliminary step the sulfanyl side chain of the aniline fragment was derivatised by the introduction of different alkyl amine residues. In total, cinanserin and six derivatives were synthesised.

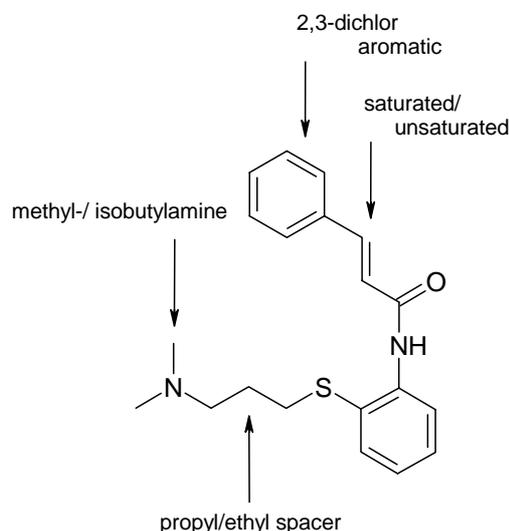
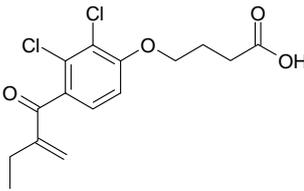
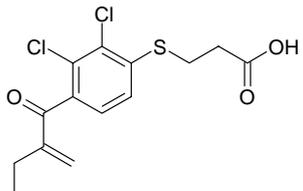
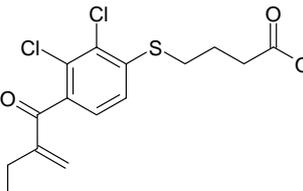


Fig. 7-3: Structural modifications of cinanserin

In order to evaluate inhibitory properties in fluorometric enzyme assays a FRET-pair labelled substrate ($\text{H}_2\text{N-Abz-Ser-Val-Thr-Leu-Gln-Ser-Gly-Tyr(NO)}_2\text{-Arg(Mts)-COOH}$) was synthesised by SPPS. The K_m value was determined to $190 \pm 23 \mu\text{M}$ (SARS-CoV-M^{pro}).

The synthesised compounds were tested against SARS-CoV-M^{pro}, SARS-CoV-PL^{pro}, and human cathepsin L. Within this tested series the bromo anisole **MS07** ($K_i = 52.7 \mu\text{M}$, SARS-CoV-M^{pro}) and the norethyl derivative of etacrynic acid (**MS21**, $K_i = 22.8 \mu\text{M}$, cathepsin L) turned out to be the most active compounds. No inhibition of the SARS-CoV-PL^{pro} was detected for any of the tested substances.

Within the framework of the SFB 630 the antibacterial properties of the synthesised compounds as well as their activities towards the protozoa *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei brucei* were determined. Compounds **MS38**, **MS40** and **MS41** inhibit biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*, growth of the bacteria as well as growth of *Leishmania major* in low micromolar concentrations. However, the compounds also display cytotoxic effects against macrophages.

	 MS38	 MS40	 MS41
	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ [μM]
<i>T. b. brucei</i>	0.52	0.83	0.54
macrophages	6.49	6.31	2.44

Tab. 7–1: Test results for the active derivatives of etacrynic acid

In contrast, growth of *T. b. brucei* is inhibited with IC₅₀ values < 1 μM leading to selectivity indices of 5 to 11 with the biotin-labelled derivative **MS57** displaying the highest selectivity (IC₅₀ *T. b. brucei*: 0.69 μM; IC₅₀ macrophages: 33.8 μM).

Further investigations with the labelled compound **MS57** showed the compound to inhibit falcipain-2 and -3 as well as *Plasmodium falciparum*. The IC₅₀ values are 3.0 μM (FP-2), 11.9 μM (FP-3) and 9.0 μM (*P. f.*). Binding of **MS57** to FP-2 could be proved by mass spectroscopic experiments. Results indicate an allosteric binding mode of **MS57** to falcipain-2.

The deuterated etacrynic acid derivatives served as model compounds for the development of a spectroscopic detection assay using CARS microscopy. Currently, the detection of the CARS signal of *d*₉-etacrynic acid in a DMSO solution is possible for a 500 μM concentration.

Quantum chemical calculations simulating the reaction of the active site cysteine residue of SARS-CoV-M^{Pro} with Michael-type acceptors revealed a two step mechanism. Deprotonation of the thiol is followed by the addition of the thiolate to the double bond of the α,β-unsaturated moiety. Calculations of the energy profiles of the second reaction step showed, that the reaction rate can be enhanced by halogenated aryl residues and by *exo*-configuration of the Michael-system. These trends could be confirmed by means of kinetic NMR experiments monitoring the reactions of a set of model compounds with *p*-methoxy thiophenolate.

8 Experimenteller Teil

8.1 Geräte und Materialien

Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Schmelzpunktgerät „melting point SMP3“ der Fa. Stuart in offener Kapillare bestimmt und sind unkorrigiert.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur Dünnschichtchromatographie wurden DC-Aluminiumfolien mit Kieselgel 60 F₂₅₄ oder RP-18 Kieselgel F_{254s} der Fa. Merck KGaA, Darmstadt, verwendet. Die Substanzen wurden durch Fluoreszenzlöschung bei 254 nm, durch Eigenfluoreszenz bei 365 nm, Behandlung mit *Ehrlichs*-Reagenz, KMnO₄-Lösung oder durch Ioddämpfe detektiert.

Säulenchromatographie (SC)

Als Säulenfüllung wurde Kieselgel 60 (0.063-0.2 mm bzw. 70-230 mesh) der Firmen Merck oder Fluka verwendet. Die Säulen wurden nass befüllt. Die Laufmittelzusammensetzungen für DC und SC sind in Volumenanteilen angegeben.

Kernresonanzspektroskopie (¹H- / ¹³C-NMR)

Die NMR-Spektren wurden mit einem AVANCE 400 MHz Spektrometer der Fa. Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, bei 300 K aufgenommen. Die Frequenzen bei den Aufnahmen der Spektren betragen für ¹H-NMR-Spektren 400.13 MHz, für ¹³C-NMR-Spektren 100.61 MHz. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm, die Kopplungskonstanten J in Hz angegeben. Als Referenz dienten die Signale der Restprotonen des eingesetzten deuterierten Lösungsmittels (δ (CDCl₃) = 7.25 / 77.0 ppm, δ (DMSO-*d*₆) = 2.49 / 39.5 ppm, δ (D₂O) = 4.75 ppm).

Die Multiplizität der Signale wird wie folgt angegeben:

s, Singulett; d, Dublett; t, Triplett; q, Quartett; quint, Quintett; sext, Sextett; sept, Septett; dd, Dublett vom Dublett; m, Multiplett. Ar-H steht für ein Proton-Signal am Aromaten (¹H-NMR). Ar-qC und Ar-CH bezeichnet ein aromatisches quartäres C-Atom bzw. aromatisches CH-Signal (¹³C-NMR).

Die Zuordnung der Signale zu einzelnen Protonen oder Kohlenstoff-Atome erfolgte über zweidimensionale ^1H - ^{13}C -Korrelations- und Dept135-Spektren.

Festphasenpeptidsynthese (SPPS)

Die Festphasenpeptidsynthese erfolgte an einem *Milligen 9050 PepSynthesiser* nach Standard-Fmoc-Protokoll und DIC-HOBT-Aktivierung. Als Edukt wurde die C-terminale an Wang-Harz gebundene Aminosäure verwendet. Aminosäuren und Kupplungsreagenz wurden in vierfachem Überschuss im Verhältnis zur Beladung des Harzes eingesetzt. Als Lösungsmittel wurde DMF/DCM (60/40, v/v) verwendet. Die Schutzgruppenabspaltung erfolgte in Piperidinlösung (Vol.-20 % in DMF). Die Kupplungszeit pro Aminosäure betrug 60 Minuten.

High Performance Liquid Chromatographie (HPLC)

Analytisch: *KONTRON* HPLC-Anlage mit Pumpen (422S, 420), Hochdruckgradientenmischer, Autosampler 465, HPLC Detektor 430.

Präparativ: *Varian* PrepStar mit Autosampler 410 ProStar, UV-Detektor ProStar, Fraktionssammler 701 ProStar; *Agilent HPLC-System 1100 Series* mit Gradientenmischer, Autosampler (1200 Series), Fraktionssammler.

Es wurden RP-18-Säulen der Marke *Agilent* und *Phenomenex* verwendet. Als Eluenten kamen Gemische von Wasser und Methanol bzw. Acetonitril mit einem Zusatz von je 0.1 % Ameisensäure oder TFA zum Einsatz.

Massenspektrometrie (LC-ESI-MS)

Die Aufnahmen der ESI-Massenspektren und die LC-MS-Analysen erfolgten an einer *Agilent 1100 LC / MSD-Trap* ausgerüstet mit einem HPLC-System 1100 von *Agilent*. Die Analyse der Reinheit der Verbindungen fand mittels LC-MS statt. Dafür wurde eine *Phenomenex* Jupiter 4 μ Proteo 90A RP C-18 Säule (4.6 x 150 mm) verwendet. Sofern nicht anders angegeben wurden folgende Bedingungen verwendet:

Eluent A: Wasser (0.1 % Ameisensäure), Eluent B: Acetonitril (0.1% Ameisensäure)

Flussrate: 0.6 mL/min

Gradient:	0 min	40% B
	5 min	40% B
	25 min	95% B
	35 min	95% B

Es wurde mittels eines UV-Detektors bei 254 nm detektiert. Die Kapillarspannung betrug dabei standardmäßig 2.6 kV und als Trockengas wurde N₂ eingesetzt. Die Verbindungen wurden im positiven Modus vermessen.

Die bei der LC-MS erhaltenen Retentionszeiten (in min) sowie die Reinheit (in %) über die gesamte Fläche aller auftretenden Peaks werden jeweils für die Verbindungen angegeben.

Infrarotspektroskopie (IR)

Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte an einem FT-IR-Gerät der Firma Jasco (FT/IR 4100) mit ATR-Einheit. Alle Spektren wurden unverdünnt (neat) aufgenommen. Die angegebenen Werte sind Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ in der Einheit cm⁻¹.

8.2 Reagenzien

Lösungsmittel

Alle verwendeten Lösungsmittel wurden durch Destillation gereinigt und, falls nötig, mit geeigneten Trocknungsmitteln nach Literaturangaben von Wasser befreit. Für Reaktionen unter Schutzgasatmosphäre wurde getrocknetes Argon-Gas der Firma *Linde* verwendet.

Synthesereagenzien

Edukte, Synthesebausteine, Kupplungsreagenzien, Pufferreagenzien, etc.	Merck KGaA, Darmstadt, Fluka, Sigma-Aldrich
--	---

Deuterierte Reagenzien

<i>d</i> ₇ -Buttersäure	Cambridge Isotope Laboratories, Andover (MA), USA
<i>d</i> ₂ -Bromessigsäureethylester	CDN-Isotopes, Quebec, Kanada
<i>d</i> ₁₃ - <i>n</i> -Hexylamin	
<i>d</i> ₂ -Formaldehyd (29.7 %ige Lösung in D ₂ O)	Euriso-top, Gif-sur-Yvette, Frankreich

Festphasenpeptidsynthese (SPPS)

Fmoc-Arg(Mts)-Wang Harz	Novabiochem
Fmoc-Aminosäuren	Novabiochem
Dimethylformamid (peptide grade)	Iris-Biotech

Dichlormethan (peptide grade)	Iris-Biotech
Piperidin	Acros Organics
Diisopropylcarbodiimid	Merck

Enzyme

SARS-CoV-M ^{pro}	Prof. Dr. C. Kisker, Universität Würzburg
SARS-CoV-PL ^{pro}	Prof. Dr. C. Kisker, Universität Würzburg
Cathepsin L aus humaner Leber	CalBiochem

Substrate

SARS-CoV-M ^{pro} -Substrat: Abz-Ser-Val-Thr-Leu-Gln-Ser-Gly-[3-(NO ₂)Tyr]- Arg(Mts)-OH, (TFA-Salz)	Selbst hergestellt mit SPPS bzw. kommerziell erworben (<i>GenScript Corp., Piscataway (NJ), USA</i>)
SARS-CoV-PL ^{pro} -Substrat: Z-Arg-Leu-Arg-Gly-Gly-AMC, (Acetat-Salz)	Bachem
Z-(L)-Phe-(L)-Arg-AMC	Bachem

8.3 Enzym-Assays

Für die fluorimetrischen Enzymassays wurde ein Cary Eclipse Fluorimeter der Fa. Varian GmbH, Darmstadt, mit einer Mikrotiterplatten-Leseinheit verwendet. Zur Einstellung der Messtemperatur diente eine selbstgebaute Heizeinheit, die aus einer Aluminiumplatte mit aufgeklebter Heizfolie, einer Temperaturkontrolleinheit mit Sensor und einem 12-Volt-Netzgerät bestand. Es kamen weiße 96-Well-Mikrotiterplatten der Fa. Nunc GmbH, Wiesbaden, zum Einsatz. Die Screenings wurden bei einer Inhibitor-Konzentration von 100 μM durchgeführt. Die Inhibitor-Konzentrationen für die Verdünnungsreihen lagen zwischen 10 und 100 μM . Alle Versuche wurden jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt.

Assaybedingungen

Enzym	Cathepsin L
Substrat-Stammlösung	Z-Phe-Arg-7-amino-4-methylcumarin*HCl (250 μM in DMSO)

Temperatur	25 °C		
Enzympuffer	Tris-Puffer (pH 6.5) : 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 2 mM DTT		
Assaypuffer	Tris-Puffer (pH 6.5): 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl		
Volumina		Screening [μ L]	Verdünnungsreihe [μ L]
	Puffer	170	185
	Enzym-Lösung	5	5
	DMSO oder Inhibitorlösung	20	5
	Substrat	<u>5</u>	<u>5</u>
	Σ	200	200

Enzym	SARS-CoV-M^{pro}		
Substrat-Stammlösung	Abz-Ser-Val-Thr-Leu-Gln-Ser-Gly-[3-(NO₂)Tyr]-Arg(Mts)-OH (TFA-Salz), (1mM in DMSO)		
Temperatur	25 °C		
Enzympuffer	Tris-Puffer (pH 7.5) : 20 mM Tris, 0.1 mM EDTA, 200 mM NaCl, 1 mM DTT		
Assaypuffer	Tris-Puffer (pH 7.5): 20 mM Tris, 0.1 mM EDTA, 200 mM NaCl		
Volumina		Screening [μ L]	Verdünnungsreihe [μ L]
	Puffer	160	175
	Enzym-Lösung	10	10
	DMSO oder Inhibitorlösung	20	5
	Substrat	<u>10</u>	<u>10</u>
	Σ	200	200

Enzym	SARS-CoV-PL^{pro}		
Substrat-Stammlösung	Z-Arg-Leu-Arg-Gly-Gly-AMC, (Acetat-Salz, 1 mM in DMSO)		
Temperatur	25 °C		
Enzympuffer	Tris-Puffer (pH 7.5) : 20 mM Tris, 0.1 mM EDTA, 200 mM NaCl, 1 mM DTT		
Assaypuffer	Tris-Puffer (pH 7.5): 20 mM Tris, 0.1 mM EDTA, 200 mM NaCl		
Volumina		Screening [μ L]	

Puffer	160
Enzym-Lösung	10
DMSO oder Inhibitorlösung	20
Substrat	<u>10</u>
Σ	200

8.4 Allgemeine Synthesevorschriften

Method A: Allgemeine Vorschrift zur Darstellung der Bromessigsäureamide oder Chlorpropionsäureamide

1 Äq Bromacetyl bromid bzw. Chlorpropionsäurechlorid werden in ca. 30 mL wasserfreiem Dichlormethan vorgelegt und auf -30 bis -50 °C gekühlt (Aceton/fl. Stickstoff).

Jeweils 1 Äq Amin und Triethylamin – gelöst in ca. 45 mL wasserfreiem Dichlormethan – werden langsam unter Kühlung zugetropft.

Nach 2 h Rühren bei -30 °C lässt man auf Raumtemperatur erwärmen und über Nacht rühren. Anschließend wird vom entstandenen Feststoff abfiltriert. Das Filtrat wird dreimal mit Salzsäure (2 M) gewaschen. Das Rohprodukt wird nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhalten. Gegebenenfalls wird aus einem geeigneten Lösungsmittel umkristallisiert oder säulenchromatographisch aufgereinigt.

Method B: Allgemeine Vorschrift zur Friedel-Crafts-Acylierung von Anisolen mit Säurechlorid/ $AlCl_3$

Method B1: Acylierung mit Säurechlorid und anschließende Methyletherspaltung

Acylierung: In einem Dreihals-Kolben werden unter Argon-Atmosphäre 1 Äq des entsprechenden Anisols zusammen mit 1 Äq Säurechlorid in wasserfreiem Dichlormethan vorgelegt und auf 0 °C abgekühlt. Unter Rühren und Eiskühlung werden langsam 1.5 Äq $AlCl_3$ zugegeben und die Mischung anschließend 2-3 h bei 0 °C gerührt.

Etherspaltung: Zur Spaltung des Methylethers werden weitere 1.5 Äq $AlCl_3$ zugegeben und der Ansatz anschließend 2-3 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Ende der Reaktionszeit gibt man die Mischung auf Eis, säuert mit konz. HCl auf pH 1 an, fügt 3 Äq Kalium-Natrium-Tartrat (Rochelle-Salz) hinzu und lässt bis zur Klärung rühren. Man extrahiert nun dreimal mit Diethylether. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen und anschließend dreimal mit KOH-Lösung (10%) extrahiert. Der gesamte KOH-Extrakt wird mit HCl angesäuert (pH 1). Fällt das gewünschte Phenol daraufhin als Feststoff aus, wird es abfiltriert.

Andernfalls wird erneut mit Diethylether extrahiert. Die gesammelten Etherphasen werden mit Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhält man das gewünschte Phenol. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie oder durch Umkristallisation aus einem geeigneten Lösungsmittel aufgereinigt.

Methode B2: Acylierung von Anisolen mit Crotonsäurechlorid ohne Methyletherspaltung

Zu 1 Äq des entsprechenden Anisols – vorgelegt in 50 mL wasserfreiem Dichlormethan – werden unter Eiskühlung und Stickstoffatmosphäre eine Lösung von 1.5 Äq Crotonsäurechlorid und 1.5 Äq AlCl₃ in 25 mL wasserfreiem Dichlormethan zugetropft. Man lässt über Nacht rühren. Anschließend wird die Reaktionsmischung auf Eis gegeben und mit 1.5 Äq Rochelle-Salz versetzt, um sämtliches Aluminium zu binden. Die Mischung wird dreimal mit Diethylether extrahiert und die gesammelten organischen Phasen mit Wasser gewaschen. Anschließend extrahiert man dreimal mit KOH-Lösung (10 %). Nach Entfernen des organischen Lösungsmittels erhält man das gewünschte acylierte Anisol.

Methode B3: Acylierung von 2,3-Dichloranisole mit in situ generiertem Carbon säurechlorid und anschließende Methyletherspaltung

Acylierung: 1 Äq Buttersäure wird im Dreihalskolben unter Argonatmosphäre vorgelegt. Nach Zugabe von 2 Äq Thionylchlorid wird 2 h bei 75 °C gerührt. Nach Abkühlen auf RT werden 10 mL wasserfreies DCM sowie 0.66 Äq 2,3-Dichloranisole zugegeben und in einem Eisbad auf 0 °C gekühlt. Danach wird 1 Äq Aluminiumchlorid in zwei Portionen zur Mischung gegeben und 5-8 h bei 0 °C gerührt. Zur Aufarbeitung wird der Ansatz auf Eis gegeben und nach Zugabe von 1 Äq Rochelle-Salz bis zur Klärung gerührt. Anschließend wird dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten Etherphasen werden mit Wasser und NaOH-Lsg. (5%) gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat, Filtration und Entfernen des LM erhält man das Rohprodukt als leicht bräunlich gefärbte Flüssigkeit.

Etherspaltung: Das gesamte Rohprodukt wird in 7 mL wasserfreiem DCM gelöst und mit 1 Äq Aluminiumchlorid versetzt (Rotfärbung). Die Mischung wird 4 h unter Rückfluss erhitzt. Zur Aufarbeitung wird der Ansatz auf Eis gegeben und nach Zugabe von 1 Äq Rochelle-Salz bis zur Klärung gerührt. Anschließend wird dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten Etherphasen werden eingeeengt und mit Wasser gewaschen. Anschließend wird mit KOH-Lsg. (10%) extrahiert. Nach Ansäuern der vereinigten KOH-Phasen mit

konz. HCl fällt das Produkt als leicht bräunlich gefärbter FS aus, der abgesaugt werden kann.

Methode C: Allgemeine Vorschrift zur Veretherung von Phenolen/Thiophenolen mit Halogencarbonsäureestern und -amiden unter Anwesenheit von Kaliumcarbonat/Kaliumiodid in Aceton

1 Äq des entsprechenden Phenols bzw. Thiophenols wird zusammen mit 1.5 Äq Kaliumcarbonat und 0.1 Äq Kaliumiodid in trockenem Aceton vorgelegt und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 1.2 bis 2 Äq des gewünschten Halogencarbonsäureesters oder -amids – gelöst in trockenem Aceton – zugegeben. Der Ansatz wird nun im Falle der Phenole mehrere Stunden unter Rückfluss erhitzt. Im Falle der Thiophenole wird in der Regel über Nacht lediglich bei RT gerührt.

Zur Aufarbeitung wird der Ansatz bis zur Trockne eingeengt und der Rückstand in Diethylether aufgenommen. Man extrahiert zunächst dreimal mit NaOH-Lsg. (5%), anschließend wird die organische Phase mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird das Rohprodukt nach Filtration und Entfernen des Lösungsmittels erhalten. Die weitere Aufreinigung erfolgt durch Säulenchromatographie mit Kieselgel.

Methode D: Allgemeine Vorschrift zur Einführung der C-C-Doppelbindung unter Ausbildung des Michaelsystems

Methode D1: Aldolkondensation mit Formaldehyd/Kaliumcarbonat unter gleichzeitiger Esterhydrolyse

1 Äq des Esters wird mit 2 Äq Formaldehyd (eingesetzt als 30 – 40 %ige wässrige Lösung) in ca. 10-15 mL Ethanol vorgelegt (Lösung 1). Kaliumcarbonat wird in ca. 5 mL Wasser + 5 mL Ethanol unter Erwärmen gelöst (Lösung 2).

In einem Dreihalskolben werden 10-15 mL Ethanol zum Sieden erhitzt. Lsg. 1 und Lsg. 2 werden gleichzeitig aus zwei Tropftrichtern zur heißen Vorlage getropft. Anschließend wird 5 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen wird die Reaktionsmischung zu einer Mischung aus 2.5 mL konz. HCl und 40 mL Wasser gegeben und für 2 Tage in den Kühlschrank gestellt. Hat sich nach dieser Zeit das Produkt als Feststoff abgeschieden, so wird dieser abfiltriert und aus einem geeigneten Lösungsmittel umkristallisiert.

Andernfalls wird mit EtOAc extrahiert, die organische Phase mit Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das daraus erhaltene Rohprodukt wird entweder umkristallisiert oder chromatographisch aufgereinigt.

Methode D2: Mannich-Reaktion mit N,N,N',N'-Tetramethyldiaminomethan

1 Äq Phenoxyessigsäureamid wird zusammen mit 20 Äq *N,N,N',N'*-Tetramethyldiaminomethan (TMDM) und 20 Äq Essigsäureanhydrid im Reaktionsgefäß des Parallelsyntheseautomaten vorgelegt und 20 h bei 75 °C geschüttelt. Die Reaktionskontrolle erfolgt durch Aufnahme von NMR-Spektren der Reaktionsmischung. Zur Aufarbeitung wird der Ansatz in Dichlormethan aufgenommen und mit gesättigter Kaliumcarbonatlösung versetzt. Nach Ende der Gasentwicklung werden die Phasen getrennt und die organische Phase mit gesättigter Kaliumcarbonatlösung, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und nach Filtration das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt.

*Methode E: Allgemeine Vorschrift zur Darstellung der Carbonsäureamide durch Aktivierung der Carboxylfunktion und anschließender Amidkupplung.**Methode E1: Amid-Kupplung mit N-Hydroxysuccinimid/Dicyclohexylcarbodiimid*

1 Äq Carbonsäure wird mit 1 Äq *N*-Hydroxysuccinimid in 5-10 mL wasserfreiem Dichlormethan (ggf. unter leichtem Erwärmen) gelöst. Man fügt 1 Äq Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) zu und lässt 1-2 h bei Raumtemperatur rühren.

In einem zweiten Gefäß wird 1 Äq desamins in ca. 5 mL wasserfreiem Dichlormethan oder THF gelöst. Zur Abtrennung des entstandenen Dicyclohexylharnstoffs wird die Hydroxysuccinimid-Lösung in die Amin-Lösung hineinfltriert. Der Ansatz wird mehrere Tage bei Raumtemperatur gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das vorhandene Lösungsmittel entfernt und der Rückstand mit Ethylacetat gerührt. Eventuell dabei abgeschiedener Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt.

Methode E2: Amid-Kupplung mit DPPA

1 Äq Carbonsäure und 1 Äq Amin-Komponente werden in DMF vorgelegt und bei 0 °C mit jeweils 1.1 Äq DPPA und Triethylamin versetzt. Nach mehreren Tagen Rühren bei 4 °C wird Dichlormethan zugegeben und mit Citronensäure (10%, 2 x) und Wasser (2 x) extrahiert.

Methode E3: Amid-Kupplung mit EEDQ

1 Äq der Amin-Komponente (im Falle eines Ammoniumsalzes wird zusätzlich 1 Äq Triethylamin zugegeben) wird mit 2 Äq der Carbonsäure in 2 mL DMF vorgelegt. Man gibt 2 Äq EEDQ zur Lösung hinzu und lässt mehrere Tage bei RT rühren. Zur Aufarbeitung werden 50 mL Ethylacetat zugegeben und 2 x mit je 25 mL 2%iger Na₂CO₃-Lösung, 2 x mit Wasser und 1 x mit ges. NaCl-Lösung gewaschen.

Methode E4: Amid-Kupplung durch Aktivierung mit Thionylchlorid

Die Carbonsäure wird zusammen mit Thionylchlorid ohne weiteres Lösungsmittel vorgelegt. Man erhitzt unter Rückfluss bis zum Ende der Gasentwicklung. Nach Abkühlen wird überschüssiges Thionylchlorid im Vakuum entfernt. Das verbliebene Carbonsäurechlorid wird in wasserfreiem Lösungsmittel aufgenommen und anschließend wird die entsprechende Amin-Lösung unter Rühren zugetropft.

Methode F: Allgemeine Vorschrift zur Darstellung der Alkylaminosulfanyl-Aniline

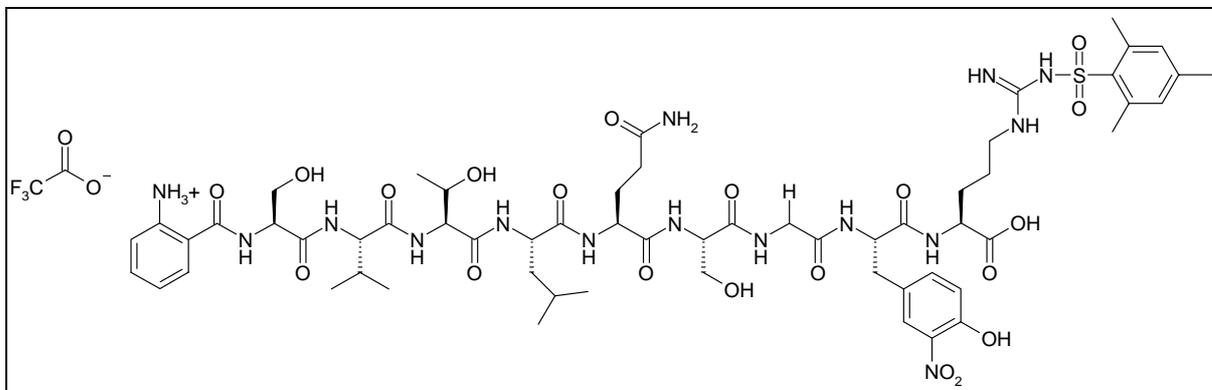
1 Äq Natriummethanolat wird in 30 mL Isopropanol vorgelegt, mit 1 Äq 2-Aminothiophenol versetzt und 2 h bei RT gerührt. Anschließend wird eine Suspension von 1 Äq des entsprechenden Alkylhalogenids bzw. 1 Äq des Hydrochlorids des Aminohalogenalkans in 100 mL Toluol – versetzt mit 1 Äq Triethylamin – zugegeben und die Mischung mehrere Stunden refluxiert.

Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand mit Wasser versetzt und mit Diethylether extrahiert. Die wässrige Phase wird nach Versetzen mit KOH-Lsg. (10%) nochmals mit Diethylether extrahiert.

Von den organischen Phasen wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt.

8.5 Synthesen

8.5.1 Synthese des FRET-Substrats (MS01)



Festphasenpeptidsynthese ausgehend von 500 mg Fmoc-Arg(Mts)-Wang-Harz (Beladung 0.63 mmol/g \cong 0.315 mmol).

Eingesetzte Aminosäuren: 565 mg (1.26 mmol) Fmoc-Tyr-3-(NO₂)-OH, 375 mg (1.26 mmol) Fmoc-Gly-OH, 2 x 483 mg (1.26 mmol) Fmoc-Ser(OtBu)-OH, 769 mg (1.26 mmol) Fmoc-Gln(Trt)-OH, 445 mg (1.26 mmol) Fmoc-Leu-OH, 501 mg (1.26 mmol) Fmoc-Thr(OtBu)-OH, 428 mg (1.26 mmol) Fmoc-Val-OH, 453 mg (1.26 mmol) Fmoc-Abz-OH. Die Synthese erfolgt nach Fmoc-Protokoll mit DIC/HOBT-Aktivierung (193 mg, 1.26 mmol HOBT*H₂O pro Aminosäure), Kupplungszeit pro Aminosäure: 60 Minuten + Fmoc-Entschützung nach dem letzten Kupplungsschritt.

Vor der Abspaltung wird das Harz in einen Schüttelkolben überführt und wie folgt gewaschen: DMF (2 x), DCM/Methanol im Wechsel (2 x), Eisessig (1 x), DCM/Methanol im Wechsel (2 x). Anschließend wird das Harz im Exsikkator getrocknet.

Die Abspaltung erfolgt durch Behandlung mit TFA/DCM (1 : 1, + Zusatz von 2.5 % Triisopropylsilan) für 2 h und anschließender Filtration. Nach Einengen des Filtrats wird das Peptid durch Zutropfen von kaltem Diethylether als TFA-Salz ausgefällt, abfiltriert und der Feststoff mit Diethylether gewaschen. Die Charakterisierung erfolgte mittels LC-MS (Säule: Agilent Zorbax SB-Aq, 5 μ m, 4.6 x 150 mm, Eluent A: H₂O/0.1% TFA, Eluent B: Acetonitril/0.1% TFA, Gradient: 50 % B \rightarrow 95 % B über 45 min)

Ausbeute: 406 mg (0.276 mmol, 88 %) gelber Feststoff

Molare Masse: 1356.49 g/mol (Peptid); 1470.51 g/mol (TFA-Salz)

Summenformel: C₅₉H₈₅N₁₅O₂₀S (*C₂HF₃O₂)

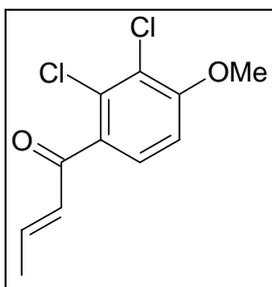
LC-MS **m/z:** 1357.0 [M+H]⁺

R_t (min): 3.2

Reinheit: 97 %

8.5.2 Synthese der mit Crotonylchlorid acylierten Anisole

E-1-(2,3-Dichlor-4-methoxyphenyl)-but-2-en-1-on (MS05)



Methode B2; Ansatz: 5.40 g (31.9 mmol) 2,3-Dichloranisol, 5.00 g (47.8 mmol) Crotonylchlorid, 6.38 g (47.8 mmol) Aluminiumchlorid, 13.5 g (47.8 mmol) Rochelle-Salz, 75 mL Dichlormethan.

Ausbeute: 6.96 g (28.4 mmol, 89 %)

Schmelzpunkt: 79 – 81 °C

Molare Masse: 245.11 g/mol

Summenformel: C₁₁H₁₀Cl₂O₂

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.95 (dd, 3H, ³J = 6.8 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, CHCH₃), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 6.48 (dq, 1H, ³J = 15.7 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, O=CCHCH), 6.74 (dq, 1H, ³J = 15.7 Hz, 6.8 Hz, CH=CHCH₃), 6.88 (d, ³J = 8.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.28 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, Ar-H).

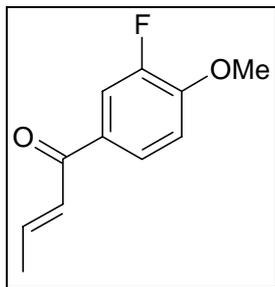
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 18.5 (CHCH₃), 56.6 (OCH₃), 109.4 (Ar-CH), 122.7 (Ar-qC), 127.7 (Ar-CH), 131.4 (Ar-qC), 131.8 (O=CCH), 132.8 (Ar-qC), 147.1 (CH=CHCH₃), 157.5 (Ar-qC), 192.5 (qC, C=O).

IR (cm⁻¹) $\tilde{\nu}$ = 3078, 2964, 1668, 1618, 1585, 1473, 1435, 1379, 1321, 1288, 1234, 1126, 1107, 1059, 1028, 970, 930, 895, 845, 810, 756, 688.

LC-MS m/z: 245 (69) [M+H]⁺, 247 (47), 249 (11)

R_t (min): 22.3

Reinheit: 86 %

***E*-1-(3-Fluor-4-methoxyphenyl)-but-2-en-1-on (MS06)**

Methode B2; Ansatz: 4.02 g (31.9 mmol) 2-Fluoranisol, 5.00 g (47.8 mmol) Crotonylchlorid, 6.38 g (47.8 mmol) Aluminiumchlorid, 13.5 g (47.8 mmol) Rochelle-Salz, 75 mL Dichlormethan.

Ausbeute: 6.08 g (31.3 mmol, 98 %)

Schmelzpunkt: 70 °C

Molare Masse: 194.21 g/mol

Summenformel: C₁₁H₁₁FO₂

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.99 (dd, 3H, ³J = 7.0 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, CHCH₃), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 6.86 (dq, 1H, ³J = 15.2 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, O=CCHCH), 6.97 – 7.11 (m, 2H, CHCHCH₃, Ar-H₆), 7.28 – 7.74 (m, 2H, Ar-H₃, Ar-H₅).

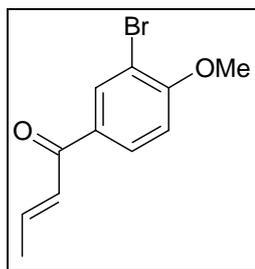
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 18.5 (CHCH₃), 56.3 (d, OCH₃, ⁴J_{CF} = 4.4 Hz), 112.4 (Ar-CH, C₆), 116.2 (d, Ar-CH, C₃, ²J_{CF} = 19 Hz), 125.7 (d, Ar-CH, C₅, ⁴J_{CF} = 3.7 Hz), 126.6 (O=CCH), 131.0 (d, Ar-qC, C₄, ³J_{CF} = 5.2 Hz), 144.7 (CHCHCH₃), 151.6 (d, Ar-qC, C₁, ²J_{CF} = 11 Hz), 152.0 (d, Ar-qC, C₂, ¹J_{CF} = 248 Hz), 187.9 (qC, C=O).

IR (cm⁻¹) $\tilde{\nu}$ = 3080, 3014, 2976, 2943, 2910, 2846, 2605, 1666, 1608, 1579, 1516, 1433, 1325, 1298, 1275, 1257, 1227, 1192, 1163, 1142, 1105, 1047, 1022, 962, 947, 891, 804, 762, 721, 685.

LC-MS m/z: 195 (90) [M+H]⁺

R_t (min): 19.5

Reinheit: 95 %

***E*-1-(3-Brom-4-methoxyphenyl)-but-2-en-1-on (MS07)**

Methode B2; Ansatz: 5.97 g (31.9 mmol) 2-Bromanisol, 5.00 g (47.8 mmol) Crotonylchlorid, 6.38 g (47.8 mmol) Aluminiumchlorid, 13.5 g (47.8 mmol) Rochelle-Salz, 75 mL Dichlormethan.

Ausbeute: 7.84 g (30.7 mmol, 96 %)

Schmelzpunkt: 82 °C

Molare Masse: 255.11 g/mol

Summenformel: C₁₁H₁₁BrO₂

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.99 (dd, 3H, ³J = 6.8 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, CHCH₃), 3.95 (s, 3H, OCH₃), 6.86 (dq, 1H, ³J = 15.2 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, O=CCHCH), 6.93 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, Ar-H), 7.06 (dq, 1H, ³J = 15.2 Hz, 6.8 Hz, CHCHCH₃), 7.90 (dd, 1H, ³J = 8.6 Hz, ⁴J = 2.2 Hz, Ar-H), 8.15 (d, 1H, ⁴J = 2.2 Hz, Ar-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 18.6 (CHCH₃), 56.5 (OCH₃), 111.1 (Ar-CH), 111.9 (Ar-qC), 126.7 (O=CCH), 129.6 (Ar-CH), 131.8 (Ar-qC), 134.0 (Ar-CH) 144.9 (CHCHCH₃), 159.3 (Ar-qC), 187.8 (qC, C=O).

IR (cm⁻¹) $\tilde{\nu}$ = 2995, 2954, 2844, 1662, 1618, 1587, 1558, 1496, 1435, 1408, 1377, 1302, 1277, 1255, 1207, 1047, 1012, 960, 914, 802, 719, 673.

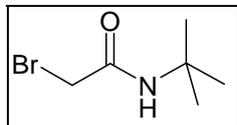
LC-MS **m/z:** 255 (62) [M+H]⁺, 257 (71)

R_t (min): 21.7

Reinheit: 88 %

8.5.3 Synthese der Bromessigsäureamide und Chlorpropionsäureamide

2-Brom-*N*-*tert*-butyl-acetamid (MS13)



Methode A; Ansatz: 10.0 g (49.5 mmol) Bromacetylbromid, 3.62 g (49.5 mmol) *tert*-Butylamin, 5.01 g (49.5 mmol) Triethylamin, 75 mL Dichlormethan. Das Rohprodukt wird aus Benzol umkristallisiert.

Ausbeute: 5.98 g (30.8 mmol, 62 %) farblose Kristalle

Molare Masse: 194.07 g/mol

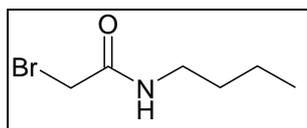
Summenformel: C₆H₁₂BrNO

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.36 (s, 9H, CH₃), 3.77 (s, 2H, CH₂), 6.25 (br s, 1H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 28.4 (C(CH₃)₃), 29.9 (CH₂), 51.9 (C(CH₃)₃), 164.34 (C=O).

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.^[118]

2-Brom-*N*-butyl-acetamid (MS14)



Methode A; Ansatz: 10.0 g (49.5 mmol) Bromacetylbromid, 3.62 g (49.5 mmol) *n*-Butylamin, 5.01 g (49.5 mmol) Triethylamin, 75 mL Dichlormethan. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Ethylacetat/Cyclohexan 1:2).

Ausbeute: 5.92 g (30.5 mmol, 62 %) weißer Feststoff

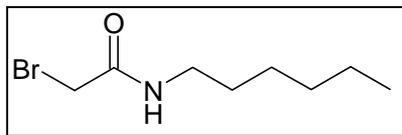
Schmelzpunkt: 38 – 40 °C

Molare Masse: 194.07 g/mol

Summenformel: C₆H₁₂BrNO

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.92 (3H, t, ³J = 7.3 Hz, CH₃), 1.35 (2H, tq, CH₂-CH₂-CH₃), 1.51 (2H, tt, CH₂-CH₂-CH₂), 3.27 (2H, td, NH-CH₂-CH₂), 3.86 (2H, s, Br-CH₂-CO), 6.47 (1H, br s, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 13.7 (CH₃), 20.0 (CH₂), 29.4 (CH₂), 31.3 (NH-CH₂), 39.9 (Br-CH₂-CO), 165.1 (C=O).

2-Brom-*N*-hexyl-acetamid (MS15)

Methode A; Ansatz: 10.0 g (49.5 mmol) Bromacetyl bromid, 5.01 g (49.5 mmol) *n*-Hexylamin, 5.01 g (49.5 mmol) Triethylamin, 75 mL Dichlormethan. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Ethylacetat/Cyclohexan 1:2).

Ausbeute: 8.14 g (36.6 mmol, 74 %) hellgelber Feststoff

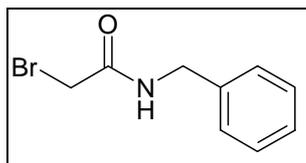
Schmelzpunkt: < 30 °C

Molare Masse: 222.13 g/mol

Summenformel: C₈H₁₆BrNO

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.88 (3H, t, ³J = 6.8 Hz, CH₃), 1.30 (6H, m, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂), 1.53 (2H, m, NH-CH₂-CH₂), 3.27 (2H, q, NH-CH₂-CH₂), 3.87 (2H, s, Br-CH₂-CO), 6.46 (1H, br s, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 14.0 (CH₃), 22.5 (CH₂), 26.5 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.4 (CH₂), 31.4 (NH-CH₂-CH₂), 40.3 (Br-CH₂-CO), 165.1 (C=O).

***N*-Benzyl-2-brom-acetamid (MS16)**

Methode A; Ansatz: 10.0 g (49.5 mmol) Bromacetyl bromid, 5.30 g (49.5 mmol) Benzylamin, 5.01 g (49.5 mmol) Triethylamin, 75 mL Dichlormethan. Das Rohprodukt wird aus Toluol umkristallisiert.

Ausbeute: 9.46 g (41.5 mmol, 84 %) farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 110 – 111 °C (Toluol), [Lit. 110-111.6 °C (EtOAc/Hexan)]^[119]

Molare Masse: 228.10 g/mol

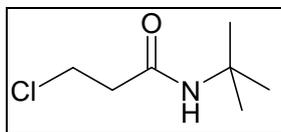
Summenformel: C₉H₁₀BrNO

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 3.92 (2H, s, Br-CH₂-CO), 4.47 (2H, d, ³J = 5.8 Hz, NH-CH₂-C₆H₅), 6.75 (1H, br s, NH), 7.32 (5H, m, arom. C₆H₅).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 29.1 (NH-CH₂-C₆H₅), 44.2 (Br-CH₂-CO), 127.7 (arom. CH), 127.8 (arom. CH), 128.8 (arom. CH), 137.3 (arom. qC), 165.3 (C=O).

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.^[119]

N-*tert*-Butyl-3-chlor-propionamid (MS17)



Methode A; anstelle von Triethylamin wird ein weiteres Äquivalent *tert*-Butylamin eingesetzt. Die Kühlbadtemperatur betrug $-72\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ansatz: 10.0 g (78.8 mmol) 3-Chlorpropionsäurechlorid, 11.5 g (158 mmol) *tert*-Butylamin, 75 mL Dichlormethan.

Ausbeute: 8.05 g (49.2 mmol, 62 %) brauner Feststoff

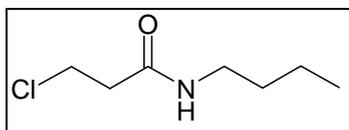
Molare Masse: 163.65 g/mol

Summenformel: $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{ClNO}$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.35$ (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.56 (2H, t, $^3J = 6.5$ Hz, $\text{Cl-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 3.78 (2H, t, $^3J = 6.5$ Hz, $\text{Cl-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 5.58 (1H, br s, NH).

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.^[120]

N-Butyl-3-chlor-propionamid (MS18)



Methode A; Ansatz: 10.0 g (78.8 mmol) 3-Chlorpropionsäurechlorid, 5.76 g (78.8 mmol) *n*-Butylamin, 7.97 g (78.8 mmol) Triethylamin, 75 mL Dichlormethan. Das Rohprodukt wird aus Ethylacetat/Petrolether umkristallisiert.

Ausbeute: 4.24 g (25.9 mmol, 33 %) gelber Feststoff

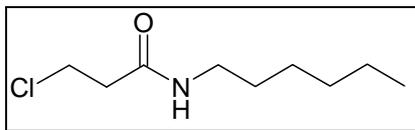
Schmelzpunkt: $45 - 47^{\circ}\text{C}$ (Ethylacetat/Petrolether), [Lit. $49 - 51^{\circ}\text{C}$]^[121]

Molare Masse: 163.65 g/mol

Summenformel: $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{ClNO}$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.92$ (3H, t, $^3J = 7.3$ Hz, CH_3), 1.35 (2H, sext, $^3J = 7.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 1.49 (2H, quint, $^3J = 7.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.60 (2H, t, $^3J = 6.4$ Hz, $\text{Cl-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 3.28 (2H, q, $\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$), 3.80 (2H, t, $^3J = 6.4$ Hz, $\text{Cl-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 5.53 (1H, br s, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 13.7$ (CH_3), 20.0 (CH_2), 31.6 (CH_2), 39.4 (CH_2), 39.8 (CH_2), 40.3 (CH_2), 169.3 (C=O).

3-Chlor-*N*-hexyl-propionamid (MS19)

Methode A; Ansatz: 10.7 g (84.0 mmol) 3-Chlorpropionsäurechlorid, 8.50 g (84.0 mmol) *n*-Hexylamin, 8.50 g (84.0 mmol) Triethylamin, 75 mL Dichlormethan. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Ethylacetat/Cyclohexan 1:2).

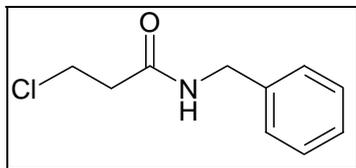
Ausbeute: 11.6 g (60.5 mmol, 72 %) gelber Feststoff

Schmelzpunkt: 45 – 47°C, [Lit. 45 – 47°C]^[122]

Molare Masse: 191.70 g/mol

Summenformel: C₉H₁₈ClNO

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.87 (3H, t, ³J = 6.8 Hz, CH₃), 1.28 (6H, m, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂), 1.49 (2H, m, CH₂-CH₃), 2.59 (2H, t, ³J = 6.4 Hz, Cl-CH₂-CH₂-CO), 3.25 (2H, td, NH-CH₂-CH₂), 3.79 (2H, t, ³J = 6.4 Hz, Cl-CH₂-CH₂-CO), 5.67 (1H, br s, NH).

***N*-Benzyl-3-chlor-propionamid (MS20)**

Methode A; Ansatz: 10.0 g (78.8 mmol) 3-Chlorpropionsäurechlorid, 8.44 g (78.8 mmol) Benzylamin, 7.97 g (78.8 mmol) Triethylamin, 75 mL Dichlormethan. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Ethylacetat).

Ausbeute: 8.84 g (44.7 mmol, 57 %) hellgelber Feststoff

Schmelzpunkt: 82 – 83 °C

Molare Masse: 197.66 g/mol

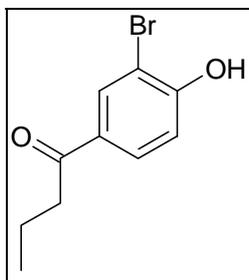
Summenformel: C₁₀H₁₂ClNO

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.65 (2H, t, ³J = 6.5 Hz, Cl-CH₂-CH₂-CO), 3.82 (2H, t, ³J = 6.5 Hz, Cl-CH₂-CH₂-CO), 4.46 (2H, s, ³J = 5.9 Hz, NHCH₂), 5.94 (1H, br s, NH), 7.29 (5H, m, arom. CH).

8.5.4 Synthese von Brom-Etacrinsäure-*tert*-butylamid

(2-[2-Brom-4-(2-methylen-butyryl)-phenoxy]-*N*-*tert*-butyl-acetamid)

1-(3-Brom-4-hydroxy-phenyl)-butan-1-on (MS03)



Methode B1; Ansatz: 5.00 g (27.0 mmol) 2-Bromanisol, 4.27 g (40.0 mmol) Buttersäurechlorid, 2 x 5.35 g (40.0 mmol) Aluminiumchlorid, 22.6 g (80.0 mmol) Kalium-Natriumtartrat, 50 mL Dichlormethan. Das Rohprodukt wird aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 4.90 g (20 mmol, 75 %) farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 120 – 121 °C (Methanol) [Lit. 122 °C]^[123]

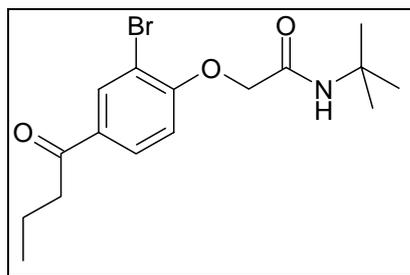
Molare Masse: 243.10 g/mol

Summenformel: C₁₀H₁₁BrO₂

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.99 (3H, t, ³J = 7.3 Hz, H₃C–CH₂–CH₂), 1.75 (2H, sext, ³J = 7.3 Hz, H₃C–CH₂–CH₂), 2.86 (2H, t, ³J = 7.3 Hz, H₃C–CH₂–CH₂), 5.93 (1H, s, OH), 7.06 (1H, d, ³J = 8.3 Hz, Ar-H), 7.85 (1H, dd, ³J = 8.5 Hz, ⁴J = 2.1 Hz, Ar-H), 8.12 (1H, d, ⁴J = 2.1 Hz, Ar-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 13.9 (H₃C–CH₂–CH₂), 17.8 (H₃C–CH₂–CH₂), 40.2 (H₃C–CH₂–CH₂), 110.6 (Ar-qC), 115.8 (Ar-CH), 129.7 (Ar-CH), 131.5 (Ar-qC), 132.6 (Ar-CH), 156.1 (Ar-qC), 197.7 (C=O).

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.^[123]

2-[2-Brom-4-butyrylphenoxy]-*N*-*tert*-butyl-acetamid (MS33)

Methode C; Ansatz 0.50 g (2.06 mmol) 1-(3-Brom-4-hydroxy-phenyl)-butan-1-on (**MS03**), 0.43 g (3.09 mmol) Kaliumcarbonat, 0.03 g (0.21 mmol) Kaliumiodid, 0.80 g (4.12 mmol) Bromessigsäure-*tert*-butylamid, 10 mL Aceton, Reaktionszeit: 4 h Erhitzen unter Rückfluss.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt. (SiO₂, Cy/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 450 mg (1.26 mmol, 61 %) weißer Feststoff

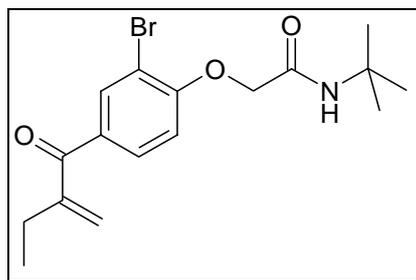
Schmelzpunkt: 130 – 131 °C (Cyclohexan/ Ethylacetat)

Molare Masse: 356.26 g/mol

Summenformel: C₁₆H₂₂BrNO₃

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃): δ = 0.99 (t, 3H, ³J = 7.3 Hz, H₃CCH₂CH₂), 1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.76 (sextett, 2H, ³J = 7.3 Hz, H₃CCH₂CH₂), 2.88 (t, 2H, ³J = 7.3 Hz, H₃CCH₂CH₂), 4.46 (s, 2H, OCH₂CO), 6.74 (br s, 1H, NH), 6.88 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, Ar-H), 7.92 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, Ar-H), 8.20 (s, 1H, Ar-H).

¹³C-NMR (100.61 MHz, CDCl₃): δ = 13.8 (H₃CCH₂CH₂), 17.8 (H₃CCH₂CH₂), 28.8 (C(CH₃)₃), 40.3 (H₃CCH₂CH₂), 51.4 (C(CH₃)₃), 68.0 (OCH₂CO), 112.3 (Ar-qC), 112.5 (Ar-CH), 129.4 (Ar-CH), 132.3 (Ar-qC), 133.5 (Ar-CH), 156.8 (Ar-qC), 165.6 (qC, CONH), 197.6 (qC, C=O).

2-[2-Brom-4-(2-methylen-buteryl)-phenoxy]-*N*-*tert*-butyl-acetamid (MS42)

Methode D2; Ansatz: 250 mg (0.702 mmol) 2-[2-Brom-4-butyrylphenoxy]-*N*-*tert*-butyl-acetamid (**MS33**), 1.43 g (14.0 mmol) *N,N,N',N'*-Tetramethyldiaminomethan (TMDM), 1.43 g (14.0 mmol) Essigsäureanhydrid. Die Reaktion wird im Parallelsyntheseautomat „Synthesis 1“ der Firma Heidolph durchgeführt (Heiztemperatur 80 °C, 250 rpm), Reaktionszeit: 20 h Schütteln bei 75-80 °C, weitere 3 d bei RT. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Cy/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 203 mg (0.551 mmol, 79 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 106 °C

Molare Masse: 368.27 g/mol

Summenformel: C₁₇H₂₂BrNO₃

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.11 (t, 3H, ³J = 7.4 Hz, CH₂CH₃), 1.43 (s, 9H, (CH₃)₃), 2.46 (q, 2H, ³J = 7.4 Hz, CH₂CH₃), 4.46 (s, 2H, OCH₂CO), 5.51 (s, 1H, C=CH), 5.79 (s, 1H, C=CH), 6.75 (br s, 1H, NH), 6.87 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, Ar-H), 7.75 (dd, 1H, ³J = 8.5 Hz, ⁴J = 2.0 Hz, Ar-H), 8.05 (d, 1H, ³J = 2.0 Hz, Ar-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 12.3 (CH₂CH₃), 25.4 (CH₂CH₃), 28.8 (C(CH₃)₃), 51.4 (C(CH₃)₃), 68.1 (OCH₂CO), 112.0 (Ar-qC), 112.3 (Ar-CH), 123.4 (C=CH₂), 131.0 (Ar-CH), 132.7 (Ar-qC), 134.8 (Ar-CH), 149.4 (C=CH₂), 156.5 (Ar-qC), 165.6 (qC, CONH), 195.8 (qC, C=O).

IR (cm⁻¹) $\tilde{\nu}$ = 3311, 2964, 1697, 1664, 1589, 1552, 1489, 1450, 1392, 1360, 1325, 1296, 1263, 1242, 1174, 1078, 997, 945, 901, 791, 744, 671.

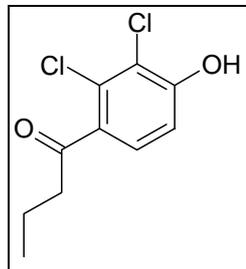
LC-MS m/z: 368 (98) [M+H]⁺, 370 (100)

R_t (min): 25.0

Reinheit: 100 %

8.5.5 Synthese der Etacrynsäurederivate

1-(2,3-Dichlor-4-hydroxyphenyl)butan-1-on (MS02)



Methode B1; Ansatz: 10.0 g (56.5 mmol) 2,3-Dichloranisol, 9.03 g (84.7 mmol) Buttersäurechlorid, 2 x 11.3 g (2 x 84.7 mmol) Aluminiumchlorid, 47.8 g (169 mmol) Rochelle-Salz, 100 mL wasserfreies Dichlormethan. Ausbeute: 8.42 g.

Aus der zurückbehaltenen Etherphase der KOH-Extraktion wird nun das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der verbliebene Rückstand wird zur Spaltung des als Nebenprodukt gebildeten acylierten Butyryl-Esters mit 1 Äq KOH (eingesetzt als 10%ige wässrige Lösung) versetzt und 6 h refluxiert. Anschließend wird die Mischung dreimal mit Diethylether gewaschen. Nach Ansäuern mit konz. HCl fällt ein Feststoff aus, der abgesaugt werden kann. Der Feststoff wird mit Wasser gewaschen und im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Ausbeute: 2.64 g.

Ausbeute: 11.06 g (47.4 mmol, 84 %) weißer Feststoff

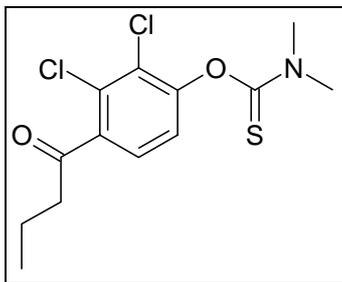
Schmelzpunkt: 109 – 110 °C

Molare Masse: 233.09 g/mol

Summenformel: C₁₀H₁₀Cl₂O₂

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.96 (t, 3H, ³J = 7.3 Hz, CH₃), 1.72 (sextett, 2H, ³J = 7.3 Hz, CH₂CH₂CO), 2.88 (t, 2H, ³J = 7.3 Hz, CH₂CO), 5.94 (br s, 1H, OH), 6.98 (d, 1H, ³J = 8.5 Hz, Ar-H), 7.37 (d, 1H, ³J = 8.5 Hz, Ar-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 13.7 (CH₃), 17.9 (CH₂CH₂CO), 44.6 (CH₂CO), 114.2 (Ar-CH), 120.5 (Ar-qC, CCl), 128.3 (Ar-CH), 130.4 (Ar-qC, CCl), 133.3 (Ar-qC), 154.3 (Ar-qC), 201.8 (qC, C=O).

O-4-Butyryl-2,3-dichlorphenyl-N,N-dimethylcarbamothioat (MS11)^[78]

5.00 g (21.5 mmol) 1-(2,3-Dichlor-4-hydroxyphenyl)butan-1-on (**MS02**) werden zusammen mit 4.45 mg (32.2 mmol) Kaliumcarbonat in ca. 10 mL DMF vorgelegt und 30 min bei RT gerührt. Anschließend werden 5.30 g (42.9 mmol) Dimethylaminothiocarbonylchlorid, gelöst in ca. 5 ml DMF, zugegeben und die Mischung 4 h bei 75 °C gerührt.

Zur Aufarbeitung wird der Ansatz auf Eis gegeben und dreimal mit Diethylether extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und je dreimal mit KOH-Lsg. (5%), Wasser und ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Anschließend wird filtriert, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Man erhält das Rohprodukt als orangefarbenen Feststoff. Dieser wird säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, Cy/EtOAc 3:1).

Ausbeute: 5.45 g (17.0 mmol, 79 %) schwach gelber Feststoff

Schmelzpunkt: 71 °C

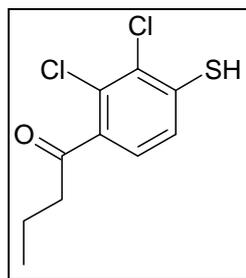
Molare Masse: 320.24 g/mol

Summenformel: C₁₃H₁₅Cl₂NO₂S

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.98 (t, 3H, ³J = 7.4 Hz, CH₂CH₃), 1.74 (sextett, 2H, ³J = 7.3 Hz, CH₂CH₃), 2.90 (t, 2H, ³J = 7.2 Hz, CH₂CO), 3.39 (s, 3H, NCH₃), 3.46 (s, 3H, NCH₃), 7.14 (d, 1H, ³J = 8.3 Hz, Ar-H), 7.33 (d, 1H, ³J = 8.3 Hz, Ar-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 13.7 (CH₂CH₃), 17.6 (CH₂CH₃), 39.0 (NCH₃), 43.5 (NCH₃), 44.9 (CH₂CO), 123.6 (Ar-CH), 126.0 (Ar-CH), 128.5 (Ar-qC), 130.4 (Ar-qC), 139.1 (Ar-qC), 152.1 (Ar-qC), 185.4 (qC, C=S), 202.4 (qC, C=O).

ESI-MS (Loop) m/z: 301 (100), 303 (34), 320 (62) [M+H]⁺, 322 (45), 324 (9)

1-(2,3-Dichlor-4-mercaptophenyl)butan-1-on (MS12)

Umlagerung: 660 mg (2.06 mmol) *O*-4-Butyryl-2,3-dichlorphenyl-*N,N*-dimethylcarbamothioat (**MS11**) werden unter Argonatmosphäre für 45 min im Sandbad auf 200 °C erhitzt. Nach Abkühlen zeigt das ¹H-NMR-Spektrum vollständige Umsetzung.

Carbamatspaltung: Das bernsteinfarbene Umlagerungsprodukt wird zusammen mit 720 mg (12.8 mmol) Kaliumhydroxid und 3.79 g (118 mmol) Methanol fünf Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen und Stehenlassen über Nacht wird mit Diethylether gewaschen und anschließend die wässrige Phase mit konz. HCl angesäuert (pH 1). Danach wird mit Diethylether extrahiert und die organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhält man das Thiophenol als gelbbraunen Feststoff, der ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt wird.

Ausbeute: 504 mg (2.02 mmol, 98 %) gelbbrauner Feststoff

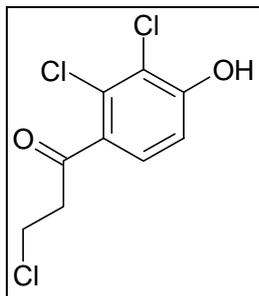
Molare Masse: 249.16 g/mol

Summenformel: C₁₀H₁₀Cl₂OS

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.96 (t, 3H, ³J = 7.4 Hz, CH₂CH₃), 1.71 (sextett, 2H, ³J = 7.4 Hz, CH₂CH₃), 2.86 (t, 2H, ³J = 7.2 Hz, CH₂CO), 4.09 (s, 1H, SH), 7.16 (d, 1H, ³J = 8.3 Hz, Ar-H), 7.27 (d, 1H, ³J = 8.1 Hz, Ar-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 13.7 (CH₂CH₃), 17.7 (CH₂CH₃), 44.8 (CH₂CO), 126.2 (Ar-CH), 127.0 (Ar-CH), 130.3 (Ar-qC), 130.8 (Ar-qC), 137.6 (Ar-qC), 138.4 (Ar-qC), 202.3 (qC, C=O).

ESI-MS (Loop) m/z: 249 (14) [M+H]⁺, 251 (7)

3-Chlor-1-(2,3-dichlor-4-hydroxyphenyl)propan-1-on (MS04)

Methode B1; Ansatz: 21.0 g (119 mmol) 2,3-Dichloranisol, 22.6 g (178 mmol) 3-Chlorpropionsäurechlorid, 2 x 23.6 g (2 x 177 mmol) Aluminiumchlorid, 142.2 g (504 mmol) Rochelle-Salz, 60 mL wasserfreies Dichlormethan. Da die DC-Kontrolle ungenügende Umsetzung anzeigte, werden zu obigem Ansatz vor der Aufarbeitung nochmals 20.0 g (150 mmol) Aluminiumchlorid zugegeben und weitere 4 h unter Rückfluss erhitzt. Nach der Aufarbeitung konnte das Rohprodukt aus kaltem Diethylether durch Zugabe von Toluol ausgefällt und abgesaugt werden. Es wird ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

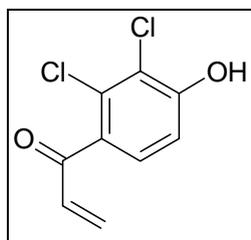
Ausbeute: 17.0 g (67.2 mmol, 56 %) hellbrauner Feststoff

Schmelzpunkt: 106 – 107 °C

Molare Masse: 253.51 g/mol

Summenformel: C₉H₇Cl₃O₂

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 3.20 (t, 2H, ³J = 5.4 Hz, COCH₂CH₂Cl), 4.00 (t, 2H, ³J = 5.3 Hz, COCH₂CH₂Cl), 6.17 (s, 1H, OH), 7.01 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, Ar-H), 7.51 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, Ar-H).

1-(2,3-Dichlor-4-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-on (MS10)

1.00 g (3.90 mmol) 3-Chlor-1-(2,3-dichloro-4-hydroxyphenyl)propan-1-on (**MM07**) werden zusammen mit 383 mg (3.90 mmol) Kaliumacetat in 20 mL Methanol gelöst und 2 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen und Zugabe von Chloroform bildet sich ein

weißer Niederschlag. Dieser wird abfiltriert und in Dichlormethan aufgenommen. Man wäscht zweimal mit Wasser und trocknet anschließend über Natriumsulfat. Nach Filtration und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhält man das Rohprodukt, welches ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt wird.

Ausbeute: 610 mg (2.81 mmol, 72 %)

Schmelzpunkt: 137 – 138 °C

Molare Masse: 217.05 g/mol

Summenformel: C₉H₆Cl₂O₂

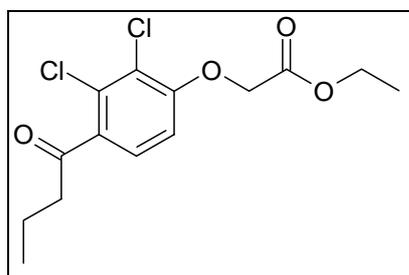
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 6.01 (m, 2H, COCH=CH, OH), 6.19 (d, 1H, ³J = 17.5 Hz, COCH=CH), 6.78 (dd, 1H, ³J = 17.4 Hz, ³J = 17.5 Hz, COCH=CH₂), 7.01 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, Ar-H), 7.51 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, Ar-H).

LC-MS m/z: 217 (100) [M+H]⁺, 219 (68), 221 (10)

R_t (min): 15.7

Reinheit: 99 %

Ethyl-2-(4-butyryl-2,3-dichlorphenoxy)-acetat (MS22)



Methode C; Ansatz 500 mg (2.15 mmol) 1-(2,3-Dichlor-4-hydroxyphenyl)butan-1-on (MS02), 445 mg (3.22 mmol) Kaliumcarbonat, 36 mg (0.215 mmol) Kaliumiodid, 430 mg (2.57 mmol) Bromessigsäureethylester, 15 mL Aceton, Reaktionszeit: 4 h Erhitzen unter Rückfluss.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt. (SiO₂, Cy/EtOAc 3:1).

Ausbeute: 581 mg (1.82 mmol, 85 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 55 °C

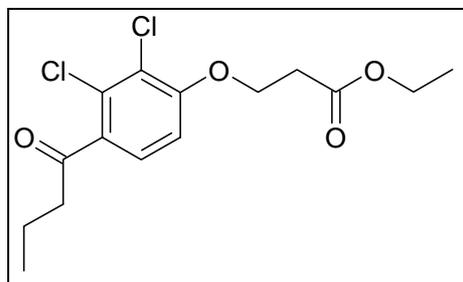
Molare Masse: 319.19 g/mol

Summenformel: C₁₄H₁₆Cl₂O₄

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.96 (t, 3H, ³J = 7.4 Hz, CH₂CH₂CH₃), 1.29 (t, 3H, ³J = 7.4 Hz, OCH₂CH₃), 1.71 (sextett, 2H, ³J = 7.3 Hz, COCH₂CH₂CH₃), 2.88 (t, 2H, ³J =

7.3 Hz, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 4.27 (q, 2H, $^3J = 7.2$ Hz, OCH_2CH_3), 4.74 (s, 2H, OCH_2CO), 6.76 (d, 1H, $^3J = 8.7$ Hz, Ar-H), 7.33 (d, 1H, $^3J = 8.7$ Hz, Ar-H).

Ethyl-3-(4-butyryl-2,3-dichlor-phenoxy)-propionat (MS23)



Methode C; Ansatz 10.0 g (42.9 mmol) 1-(2,3-Dichlor-4-hydroxyphenyl)butan-1-on (**MS02**), 7.72 g (55.9 mmol) Kaliumcarbonat, 927 mg (5.59 mmol) Kaliumiodid, 9.33 g (51.5 mmol) 3-Brompropionsäureethylester, 75 mL Aceton, Reaktionszeit: 3 h Erhitzen unter Rückfluss.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt. (SiO_2 , Cy/EtOAc 3:1).

Ausbeute: 21 mg (0.063 mmol, <1 %) hell gelber Feststoff

Schmelzpunkt: 67 °C

Molare Masse: 333.21 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{O}_4$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.96$ (t, 3H, $^3J = 7.5$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.27 (t, 3H, $^3J = 7.2$ Hz, OCH_2CH_3), 1.71 (sextett, 2H, $^3J = 7.3$ Hz, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.87 (m, 4H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{COOEt}$), 4.19 (q, 2H, $^3J = 7.3$ Hz, OCH_2CH_3), 4.35 (t, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{COOEt}$), 6.90 (d, 1H, $^3J = 8.6$ Hz, Ar-H), 7.36 (d, 1H, $^3J = 8.6$ Hz, Ar-H).

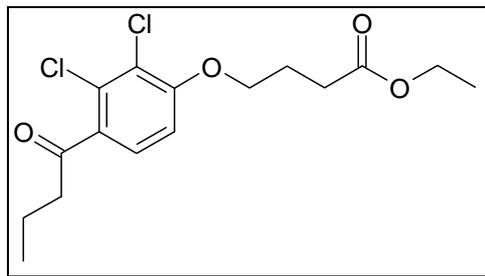
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 13.7$ ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 14.2 (OCH_2CH_3), 17.9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 34.3 (OCH_2CH_2), 44.8 ($\text{CH}_2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CO}$), 61.0 (OCH_2CH_3), 65.2 (OCH_2CH_2), 110.8 (Ar-CH), 123.5 (Ar-qC), 127.4 (Ar-CH), 131.2 (Ar-qC), 133.9 (Ar-qC), 156.8 (Ar-qC), 170.5 (qC, COOEt), 202.1 (qC, C=O).

IR (cm^{-1}) $\tilde{\nu} = 3091, 2964, 2935, 2873, 1724, 1699, 1589, 1475, 1452, 1402, 1379, 1354, 1290, 1269, 1221, 1192, 1126, 1041, 1022, 947, 901, 858, 818, 739, 669$.

LC-MS **m/z**: 333 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 355 (78), 335 (68)

R_t (min): 24.9

Reinheit: 98 %

Ethyl-4-(4-butyryl-2,3-dichlor-phenoxy)-butanoat (MS24)

Methode C; Ansatz 5.00 g (21.5 mmol) 1-(2,3-Dichlor-4-hydroxyphenyl)butan-1-on (**MS02**), 4.45 g (32.2 mmol) Kaliumcarbonat, 360 mg (2.15 mmol) Kaliumiodid, 5.02 g (25.7 mmol) 4-Brombuttersäureethylester, 20 mL Aceton, Reaktionszeit: 5 h Erhitzen unter Rückfluss.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt. (SiO₂, Cy/EtOAc 3:1).

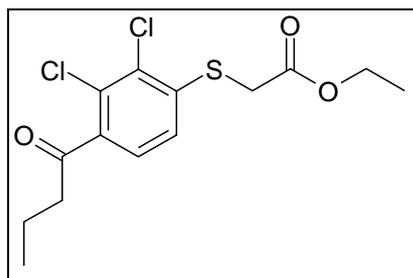
Ausbeute: 5.88 g (16.9 mmol, 79 %) gelbe Flüssigkeit

Molare Masse: 347.24 g/mol

Summenformel: C₁₆H₂₀Cl₂O₄

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.95 (t, 3H, ³J = 7.5 Hz, CH₂CH₂CH₃), 1.24 (t, 3H, ³J = 7.2 Hz, OCH₂CH₃), 1.70 (sextett, 2H, ³J = 7.4 Hz, COCH₂CH₂CH₃), 2.16 (quint, 2H, ³J = 6.6 Hz, OCH₂CH₂CH₂), 2.55 (t, 2H, ³J = 7.3 Hz, CH₂CH₂COOEt), 2.87 (t, 2H, ³J = 7.2 Hz, COCH₂CH₂CH₃), 4.12 (m, 4H, OCH₂CH₃, OCH₂CH₂CH₂), 6.85 (d, 1H, ³J = 8.5 Hz, Ar-H), 7.35 (d, 1H, ³J = 8.5 Hz, Ar-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 13.7 (CH₂CH₂CH₃), 14.2 (OCH₂CH₃), 17.9 (CH₂CH₂CH₃), 24.3 (CH₂CH₂CH₂), 30.4 (OCH₂CH₂), 44.7 (CH₂CH₃CH₂CO), 60.5 (OCH₂CH₃), 68.4 (OCH₂CH₂), 110.4 (Ar-CH), 123.3 (Ar-qC), 127.5 (Ar-CH), 131.2 (Ar-qC), 133.5 (Ar-qC), 157.0 (Ar-qC), 172.9 (qC, COOEt), 202.0 (qC, C=O).

Ethyl-2-(4-butyryl-2,3-dichlorphenylsulfanyl)-acetat (MS25)

Methode C; Ansatz 4.00 g (16.1 mmol) 1-(2,3-Dichlor-4-mercaptophenyl)butan-1-on (**MS12**), 3.33 g (24.1 mmol) Kaliumcarbonat, 266 mg (0.16 mmol) Kaliumiodid, 3.22 g (19.3 mmol) Bromessigsäureethylester, 15 mL Aceton, Reaktionszeit: 5 d Rühren bei RT. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt. (SiO₂, Cy/EtOAc 3:1).

Ausbeute: 4.57 g (13.6 mmol, 85 %)

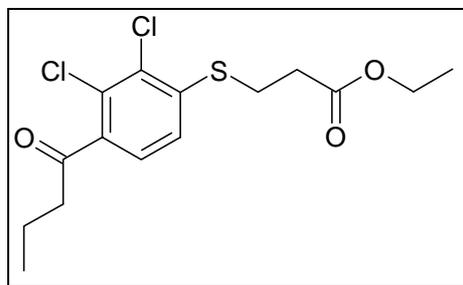
Molare Masse: 335.25 g/mol

Summenformel: C₁₄H₁₆Cl₂O₃S

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.98 (t, 3H, ³J = 7.5 Hz, CH₂CH₂CH₃), 1.27 (t, 3H, ³J = 7.2 Hz, OCH₂CH₃), 1.73 (sextett, 2H, ³J = 7.3 Hz, COCH₂CH₂CH₃), 2.88 (t, 2H, ³J = 7.2 Hz, COCH₂CH₂CH₃), 3.74 (s, 2H, SCH₂), 4.22 (q, 2H, ³J = 7.1 Hz, OCH₂CH₃), 7.27 (d, 1H, ³J = 7.1 Hz, Ar-H), 7.30 (d, 1H, ³J = 7.1 Hz, Ar-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 13.6 (CH₂CH₂CH₃), 14.0 (OCH₂CH₃), 17.6 (CH₂CH₂CH₃), 34.6 (SCH₂), 44.7 (CH₂CH₃CH₂CO), 62.0 (OCH₂CH₃), 124.6 (Ar-CH), 126.3 (Ar-CH), 130.0 (Ar-qC), 131.4 (Ar-qC), 138.4 (Ar-qC), 140.4 (Ar-qC), 168.4 (qC, COOEt), 202.2 (qC, C=O).

Ethyl-3-(4-butyryl-2,3-dichlor-phenylsulfanyl)-propionat (**MS26**)



Methode C; Ansatz 4.00 g (16.1 mmol) 1-(2,3-Dichlor-4-mercaptophenyl)butan-1-on (**MS12**), 3.33 g (24.1 mmol) Kaliumcarbonat, 266 mg (0.16 mmol) Kaliumiodid, 3.47 g (19.3 mmol) 3-Brompropionsäureethylester, 15 mL Aceton, Reaktionszeit: 5 d Rühren bei RT.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt. (SiO₂, Cy/EtOAc 3:1).

Ausbeute: 4.37 g (12.5 mmol, 78 %)

Molare Masse: 349.28 g/mol

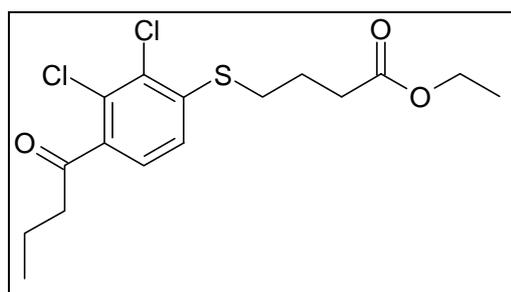
Summenformel: C₁₅H₁₈Cl₂O₃S

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.97 (t, 3H, ³J = 7.5 Hz, CH₂CH₂CH₃), 1.26 (t, 3H, ³J = 7.1 Hz, OCH₂CH₃), 1.72 (sextett, 2H, ³J = 7.3 Hz, COCH₂CH₂CH₃), 2.69 (t, 2H, ³J = 7.5 Hz, SCH₂CH₂), 2.87 (t, 2H, ³J = 7.2 Hz, COCH₂CH₂CH₃), 3.23 (t, 2H, ³J = 7.5 Hz,

SCH₂CH₂), 4.17 (q, 2H, ³J = 7.2 Hz, OCH₂CH₃), 7.17 (d, 1H, ³J = 8.1 Hz, Ar-H), 7.28 (d, 1H, ³J = 8.1 Hz, Ar-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 13.7 (CH₂CH₂CH₃), 14.2 (OCH₂CH₃), 17.7 (CH₂CH₂CH₃), 27.2 (SCH₂CH₂), 33.3 (SCH₂CH₂), 44.8 (CH₂CH₃CH₂CO), 61.1 (OCH₂CH₃), 124.1 (Ar-CH), 126.3 (Ar-CH), 130.2 (Ar-qC), 131.7 (Ar-qC), 138.0 (Ar-qC), 141.2 (Ar-qC), 171.1 (qC, COOEt), 202.4 (qC, C=O).

Ethyl-4-(4-butyryl-2,3-dichlor-phenylsulfanyl)-butanoat (MS27)



Methode C; Ansatz 738 mg (2.96 mmol) 1-(2,3-Dichlor-4-mercaptophenyl)butan-1-on (MS12), 491 mg (3.55 mmol) Kaliumcarbonat, 49 mg (0.30 mmol) Kaliumiodid, 693 mg (3.55 mmol) 4-Brombuttersäureethylester, 15 mL Aceton, Reaktionszeit: 7 d Rühren bei RT.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt. (SiO₂, Cy/EtOAc 3:1).

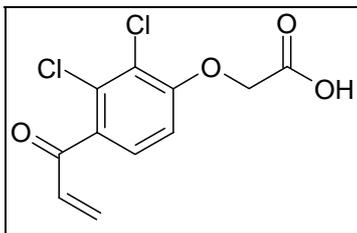
Ausbeute: 1.01 g (2.78 mmol, 94 %) hellgelber Feststoff

Molare Masse: 363.31 g/mol

Summenformel: C₁₆H₂₀Cl₂O₃S

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.96 (t, 3H, ³J = 7.3 Hz, CH₂CH₂CH₃), 1.25 (t, 3H, ³J = 7.2 Hz, OCH₂CH₃), 1.71 (sextett, 2H, ³J = 7.3 Hz, CH₂CH₂CH₃), 2.02 (quintett, 2H, ³J = 7.2 Hz, SCH₂CH₂CH₂), 2.48 (t, 2H, ³J = 7.1 Hz, SCH₂CH₂CH₂), 2.86 (t, 2H, ³J = 7.3 Hz, CH₂CH₂CH₃), 3.01 (t, 2H, ³J = 7.3 Hz, SCH₂), 4.14 (q, 2H, ³J = 7.2 Hz, OCH₂CH₃), 7.20 (d, 1H, ³J = 8.3 Hz, Ar-H), 7.28 (d, 1H, ³J = 8.3 Hz, Ar-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 13.7 (CH₂CH₂CH₃), 14.2 (OCH₂CH₃), 17.7 (CH₂CH₂CH₃), 23.5 (CH₂CH₂CH₂), 31.3 (SCH₂), 32.9 (SCH₂CH₂CH₂), 44.8 (CH₂CH₂CH₃), 60.6 (OCH₂CH₃), 123.7 (Ar-CH), 126.4 (Ar-CH), 130.1 (Ar-qC), 131.2 (Ar-qC), 137.5 (Ar-qC), 141.9 (Ar-qC), 172.6 (qC, COOEt), 202.4 (qC, C=O).

(4-Acryloyl-2,3-dichlor-phenoxy)-essigsäure (MS21)

400 mg (1.84 mmol) 1-(2,3-Dichlor-4-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-on (**MS10**) werden zusammen mit 255 mg (1.84 mmol) Kaliumcarbonat in 5 mL wasserfreiem Aceton 30 min bei RT gerührt. Anschließend werden 256 mg (1.84 mmol) Bromessigsäure, gelöst in 5 mL wasserfreiem Aceton, mit einer Spritze zugegeben und 12 h unter Rückfluss erhitzt.

Nach Ende der Reaktionszeit wird der Ansatz auf Eis gestellt, kalt filtriert und der Feststoff mit Aceton gewaschen. Nach Lösen des erhaltenen Feststoffes in 10 mL Wasser und Ansäuern mit konz. HCl (pH 1) fällt ein feiner weißer Niederschlag aus.

Zur Isolierung wird die saure wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan (20 mL) extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen werden mit Wasser (3 x 20 mL) und ges. NaCl-Lsg. (1 x 20 mL) gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat, Filtration und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird das gewünschte Produkt als blassgelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 134 mg (0.487 mmol, 26 %) schwach gelber Feststoff

Schmelzpunkt: 100 °C

Molare Masse: 275.09 g/mol

Summenformel: C₁₁H₈Cl₂O₄

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 4.81 (s, 2H, OCH₂COOH), 6.03 (dd, 1H, ³J = 10.6 Hz, ²J = 0.8 Hz, O=CCH=CH), 6.16 (dd, 1H, ³J = 17.4 Hz, ²J = 0.8 Hz, O=CCH=CH), 6.76 (dd, 1H, ³J = 17.4 Hz, ³J = 10.6 Hz, O=CHC=CH), 6.82 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, Ar-H), 7.32 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, Ar-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 65.6 (OCH₂COOH), 110.9 (Ar-CH), 123.7 (Ar-qC), 127.9 (Ar-CH), 131.9 (HC=CH₂), 132.1 (Ar-qC), 133.4 (Ar-qC), 135.9 (HC=CH₂), 155.8 (Ar-qC), 171.6 (COOH), 192.6 (C=O).

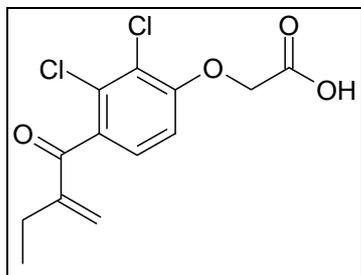
IR (cm⁻¹) $\tilde{\nu}$ = 2962, 1738, 1709, 1668, 1583, 1473, 1435, 1396, 1298, 1242, 1080, 1030, 993, 974, 802, 783, 700.

LC-MS m/z: 275.2 (100) [M+H]⁺, 277.0 (78), 278.9 (11)

R_t (min): 14.7

Reinheit: 93 %

Etacrynsäure, [2,3-Dichlor-4-(2-methylen-butyryl)-phenoxy]-essigsäure (MS37)



Methode D1; Ansatz 500 mg (1.57 mmol) Ethyl-2-(4-butyryl-2,3-dichlorphenoxy)-acetat (**MS22**), 217 mg (1.57 mmol) Kaliumcarbonat, 94 mg (3.13 mmol) Formaldehyd (\cong 313 mg 30 %ige Lsg.); Reaktionszeit: 5 h Erhitzen unter Rückfluss.

Das Rohprodukt wird aus Benzol umkristallisiert.

Ausbeute: 189 mg (0.623 mmol, 40 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 121 °C

Molare Masse: 303.14 g/mol

Summenformel: $C_{13}H_{12}Cl_2O_4$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.14 (t, 3H, $^3J = 7.4$ Hz, CH_2CH_3), 2.46 (q, 2H, $^3J = 7.4$ Hz, CH_2CH_3), 4.80 (s, 2H, OCH_2CO), 5.59 (s, 1H, $C=CH$), 5.94 (s, 1H, $C=CH$), 6.81 (d, 1H, $^3J = 8.6$ Hz, Ar-H), 7.15 (d, 1H, $^3J = 8.6$ Hz, Ar-H), 9.98 (br s, 1H, COOH).

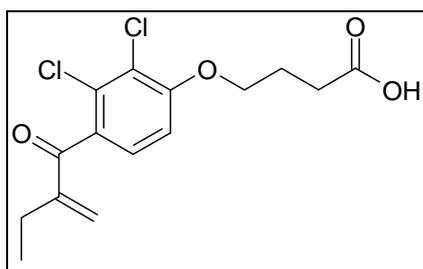
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 12.4 (CH_2CH_3), 23.4 (CH_2CH_3), 65.7 (OCH_2CO), 110.9 (Ar-CH), 123.5 (Ar-qC), 126.8 (Ar-CH), 128.2 ($C=CH_2$), 131.7 (Ar-qC), 134.3 (Ar-qC), 150.2 ($C=CH_2$), 155.0 (Ar-qC), 171.7 (COOH), 195.8 ($C=O$).

LC-MS m/z : 303.2 (100) $[M+H]^+$, 305.0 (71), 307.0 (10)

R_t (min): 18.9

Reinheit: 92 %

4-[2,3-Dichlor-4-(2-methylen-butyryl)-phenoxy]-buttersäure (MS38)



Methode D1; Ansatz 1.00 g (2.88 mmol) Ethyl-4-(4-Butyryl-2,3-dichlor-phenoxy)-butanoat (**MS24**), 398 mg (2.88 mmol) Kaliumcarbonat, 173 mg (5.76 mmol) Formaldehyd (\cong 432 mg 40 %ige Lsg.); Reaktionszeit: 6 h Erhitzen unter Rückfluss.

Ausbeute: 918 mg (2.77 mmol, 96 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 84 – 86 °C

Molare Masse: 331.20 g/mol

Summenformel: C₁₅H₁₆Cl₂O₄

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.14 (t, 3H, ³J = 7.4 Hz, CH₂CH₃), 2.19 (quintett, 2H, ³J = 6.4 Hz, CH₂CH₂CH₂), 2.46 (q, 2H, ³J = 7.4 Hz, CH₂CH₃), 2.65 (t, 2H, ³J = 7.0 Hz, CH₂CO), 4.14 (t, 2H, ³J = 6.0 Hz, OCH₂), 5.58 (s, 1H, C=CH), 5.91 (s, 1H, C=CH), 6.85 (d, 1H, ³J = 8.4 Hz, Ar-H), 7.14 (d, 1H, ³J = 8.4 Hz, Ar-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 12.4 (CH₂CH₃), 23.5 (CH₂CH₃), 24.1 (CH₂CH₂CH₂), 30.1 (CH₂COOH), 68.2 (OCH₂), 110.3 (Ar-CH), 123.0 (Ar-qC), 127.0 (Ar-CH), 128.3 (C=CH₂), 131.3 (Ar-qC), 132.9 (Ar-qC), 150.3 (C=CH₂), 156.3 (Ar-qC), 178.1 (COOH), 196.0 (C=O).

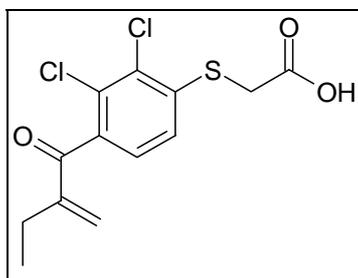
IR (cm⁻¹) $\tilde{\nu}$ = 2962, 2889, 1699, 1662, 1585, 1464, 1433, 1412, 1385, 1327, 1288, 1267, 1211, 1113, 1049, 1001, 962, 931, 820, 781, 764, 658.

LC-MS m/z: 331.2 (100) [M+H]⁺, 333.0 (64), 335.0 (9)

R_t (min): 20.4

Reinheit: 70 %

Thioetacrynsäure, [2,3-Dichlor-4-(2-methylen-butyryl)-phenylsulfanyl]-essigsäure (**MS39**)



Methode D1; Ansatz 2.10 g (6.26 mmol) Ethyl-2-(4-Butyryl-2,3-dichlorphenylsulfanyl)-acetat (**MS25**), 1.04 mg (7.52 mmol) Kaliumcarbonat, 376 mg (12.5 mmol) Formaldehyd (\cong 941 mg 40 %ige Lsg.); Reaktionszeit: 5 h Erhitzen unter Rückfluss. Das Rohprodukt wird als braunes Öl erhalten. Die weitere Aufreinigung erfolgte über präparative HPLC (Wasser+0.1% Ameisensäure / Acetonitril+0.1% Ameisensäure 60 / 40).

Ausbeute: 19 mg (0.060 mmol, 1%) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 126 – 127 °C

Molare Masse: 319.21 g/mol

Summenformel: C₁₃H₁₂Cl₂O₃S

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.14 (t, 3H, ³J = 7.5 Hz, CH₂CH₃), 2.46 (q, 2H, ³J = 7.5 Hz, CH₂CH₃), 3.77 (s, 2H, CH₂COOH), 5.60 (s, 1H, C=CH), 5.97 (s, 1H, C=CH), 7.13 (d, 1H, ³J = 8.2 Hz, Ar-H), 7.27 (d, 1H, ³J = 8.2 Hz, Ar-H).

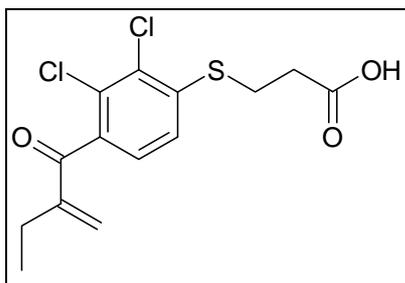
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 12.4 (CH₂CH₃), 23.3 (CH₂CH₃), 34.3 (SCH₂), 125.1 (Ar-CH), 126.5 (Ar-CH), 129.2 (C=CH₂), 130.6 (Ar-qC), 131.8 (Ar-qC), 138.2 (Ar-qC), 138.4 (Ar-qC), 149.9 (C=CH₂), 172.2 (COOH), 195.5 (C=O).

LC-MS m/z: 319 (66) [M+H]⁺, 321 (45)

R_t (min): 21.4

Reinheit: 100 %

3-[2,3-Dichlor-4-(2-methylen-butyryl)-phenylsulfanyl]-propionsäure (MS40)



Methode D1; Ansatz 2.50 g (7.16 mmol) Ethyl-3-(4-Butyryl-2,3-dichlor-phenylsulfanyl)-propionat (**MS26**), 1.19 g (8.59 mmol) Kaliumcarbonat, 430 mg (14.3 mmol) Formaldehyd (≅ 1.08 g 40 %ige Lsg.); Reaktionszeit: 5 h Erhitzen unter Rückfluss.

Das Rohprodukt wird aus Toluol umkristallisiert.

Ausbeute: 866mg (2.60 mmol, 36 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 132 – 135 °C

Molare Masse: 333.24 g/mol

Summenformel: C₁₄H₁₄Cl₂O₃S

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.14 (t, 3H, ³J = 7.4 Hz, CH₂CH₃), 2.46 (q, 2H, ³J = 7.4 Hz, CH₂CH₃), 2.77 (t, 2H, ³J = 7.3 Hz, CH₂COOH), 3.25 (t, 2H, ³J = 7.3 Hz, SCH₂), 5.61 (s, 1H, C=CH), 5.96 (s, 1H, C=CH), 7.13 (d, 1H, ³J = 8.2 Hz, Ar-H), 7.20 (d, 1H, ³J = 8.2 Hz, Ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 12.4$ (CH_2CH_3), 23.3 (CH_2CH_3), 27.1 (SCH_2), 33.2 (SCH_2CH_2), 124.6 (Ar-CH), 126.3 (Ar-CH), 129.0 ($\text{C}=\text{CH}_2$), 130.6 (Ar-qC), 132.0 (Ar-qC), 137.7 (Ar-qC), 139.4 (Ar-qC), 150.0 ($\text{C}=\text{CH}_2$), 176.5 (COOH), 195.7 ($\text{C}=\text{O}$).

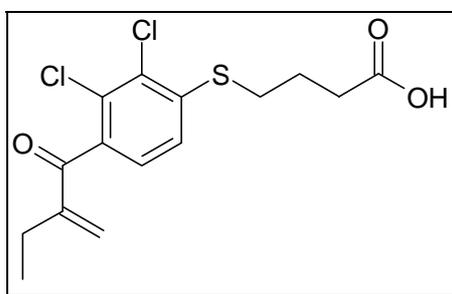
IR (cm^{-1}) $\tilde{\nu} = 2968, 1703, 1664, 1574, 1429, 1410, 1362, 1296, 1271, 1205, 1149, 1095, 999, 943, 866, 783$.

LC-MS **m/z:** 333.2 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 335.0 (69), 337.0 (14)

R_t (min): 21.0

Reinheit: 100 %

4-[2,3-Dichlor-4-(2-methylen-buteryl)-phenylsulfanyl]-buttersäure (MS41)



Methode D1; Ansatz 1.01 g (2.78 mmol) Ethyl-4-(4-Butyryl-2,3-dichlor-phenylsulfanyl)-butanoat (**MS27**), 461 mg (3.34 mmol) Kaliumcarbonat, 167 mg (5.56 mmol) Formalehyd ($\cong 417$ mg 40 %ige Lsg.); Reaktionszeit: 6 h Erhitzen unter Rückfluss.

Ausbeute: 717 mg (2.06 mmol, 74 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 104 – 106 °C

Molare Masse: 347.26 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{O}_3\text{S}$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.14$ (t, 3H, $^3J = 7.4$ Hz, CH_2CH_3), 2.05 (quintett, 2H, $^3J = 7.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.46 (q, 2H, $^3J = 7.4$ Hz, CH_2CH_3), 2.58 (t, 2H, $^3J = 7.1$ Hz, CH_2CO), 3.04 (t, 2H, $^3J = 7.3$ Hz, SCH_2), 5.61 (s, 1H, $\text{C}=\text{CH}$), 5.95 (s, 1H, $\text{C}=\text{CH}$), 7.12 (d, 1H, $^3J = 8.2$ Hz, Ar-H), 7.20 (d, 1H, $^3J = 8.2$ Hz, Ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 12.4$ (CH_2CH_3), 23.3 (CH_2CH_3), 23.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 31.4 (CH_2COOH), 32.4 (SCH_2), 124.0 (Ar-CH), 126.3 (Ar-CH), 128.9 ($\text{C}=\text{CH}_2$), 130.5 (Ar-qC), 131.3 (Ar-qC), 137.1 (Ar-qC), 140.3 ($\text{C}=\text{CH}_2$), 150.0 (Ar-qC), 178.0 (COOH), 195.8 ($\text{C}=\text{O}$).

IR (cm^{-1}) $\tilde{\nu} = 2970, 1705, 1660, 1570, 1435, 1363, 1325, 1244, 1203, 1173, 1149, 1093, 995, 933, 908, 870, 831, 796, 744, 671$.

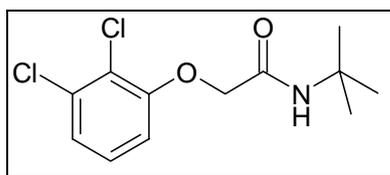
LC-MS **m/z:** 347.2 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 349.0 (70), 351.0 (13)

R_t (min): 21.8

Reinheit: 97 %

8.5.6 Synthese der Amide/Ester ohne Michael-System

N-*tert*-Butyl-2,3-dichlorphenoxyacetamid (MS08)



Methode C; Ansatz 420 mg (2.58 mmol) 2,3-Dichlorphenol, 534 mg (3.86 mmol) Kaliumcarbonat, 43 mg (0.258 mmol) Kaliumiodid, 1.00 g (5.15 mmol) Bromessigsäure-*tert*butylamid, 30 mL Aceton, Reaktionszeit: 5 h Erhitzen unter Rückfluss, anschließend 3d bei RT. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt. (SiO₂, Cy/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 540 mg (1.96 mmol, 76 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 123 °C

Molare Masse: 276.16 g/mol

Summenformel: C₁₂H₁₅Cl₂NO₂

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.41 (s, 9H, CH₃), 4.41 (s, 2H, OCH₂CO), 6.69 (br s, 1H, NH), 6.80 (dd, 1H, ³J = 7.7 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, Ar-H), 7.13 – 7.20 (m, 2H, Ar-H).

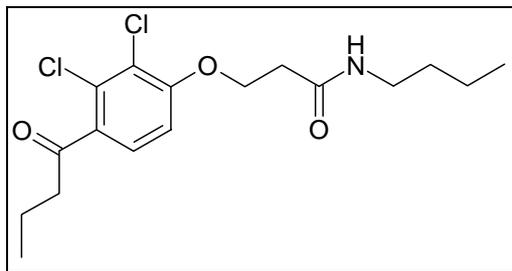
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 28.7 (CH₃), 51.4 (C(CH₃)₃), 68.5 (OCH₂CO), 111.7 (Ar-CH), 121.9 (Ar-qC, CCl), 123.6 (Ar-CH), 127.8 (Ar-CH), 134.1 (Ar-qC, CCl), 154.1 (Ar-qC), 166.1 (qC, CONH).

IR (cm⁻¹) $\tilde{\nu}$ = 3290, 3087, 2970, 1657, 1558, 1460, 1435, 1362, 1315, 1259, 1236, 1113, 1074, 1051, 945, 858, 766, 735, 704.

LC-MS m/z: 298 (100) [M+Na]⁺, 276 (88) [M+H]⁺, 278 (57)

R_t (min): 23.5

Reinheit: 100 %

***N*-Butyl-3-(4-butyryl-2,3-dichlorphenoxy)-propionamid (MS28)**

Methode C; Ansatz 1.00 g (4.29 mmol) 1-(2,3-Dichlor-4-hydroxyphenyl)butan-1-on (**MS02**), 889 mg (6.44 mmol) Kaliumcarbonat, 71 mg (0.429 mmol) Kaliumiodid, 1.40 g (8.58 mmol) 3-Chlorpropionsäure-*n*-butylamid, 15 mL Aceton, Reaktionszeit: 8 h Erhitzen unter Rückfluss. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt. (SiO₂, Gradienten-Elution: Cy/EtOAc 2:1 → EtOAc 100%).

Ausbeute: 132 mg (0.366 mmol, 9 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 77 °C

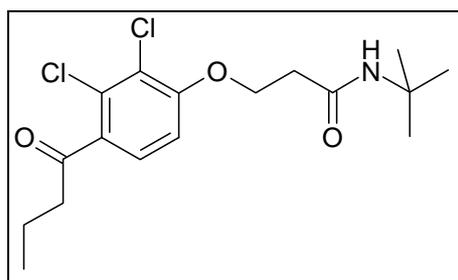
Molare Masse: 360.28 g/mol

Summenformel: C₁₇H₂₃Cl₂NO₃

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.91 (t, 3H, ³J = 7.2 Hz, *n*-butyl-CH₃), 0.97 (t, 3H, ³J = 7.4 Hz, butyryl-CH₃), 1.33 (sextett, 2H, ³J = 7.1 Hz, *n*-butyl-CH₂CH₃), 1.50 (quintett, 2H, ³J = 7.3 Hz, NHCH₂CH₂), 1.72 (sextett, 2H, ³J = 7.3 Hz, butyryl-CH₂CH₃), 2.71 (t, 2H, ³J = 6.0 Hz, OCH₂CH₂), 2.88 (t, 2H, ³J = 7.2 Hz, COCH₂CH₂CH₃), 3.28 (q, 2H, ³J = 7.1 Hz, NHCH₂CH₂), 4.35 (t, 2H, ³J = 6.0 Hz, OCH₂CH₂), 5.91 (br s, 1H, NH), 6.90 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, Ar-H), 7.37 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, Ar-H).

IR (cm⁻¹) $\tilde{\nu}$ = 3303, 2960, 2931, 2871, 1687, 1645, 1585, 1543, 1475, 1458, 1385, 1300, 1273, 1223, 1194, 1043, 945, 810, 758, 665.

ESI-MS (Loop) m/z: 360 (100) [M+H]⁺, 362 (72), 364 (10)

***N*-tert-Butyl-3-(4-butyryl-2,3-dichlorphenoxy)-propionamid (MS29)**

Methode C; Ansatz 1.00 g (4.29 mmol) 1-(2,3-Dichlor-4-hydroxyphenyl)butan-1-on (**MS02**), 889 mg (6.44 mmol) Kaliumcarbonat, 71 mg (0.429 mmol) Kaliumiodid, 1.40 g (8.58 mmol) 3-Chlorpropionsäure-*tert*-butylamid, 15 mL Aceton, Reaktionszeit: 6 h Erhitzen unter Rückfluss. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt. (SiO₂, Gradienten-Elution: Cy/EtOAc 2:1 → EtOAc 100%).

Ausbeute: 94 mg (0.261 mmol, 6 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 112 °C

Molare Masse: 360.28 g/mol

Summenformel: C₁₇H₂₃Cl₂NO₃

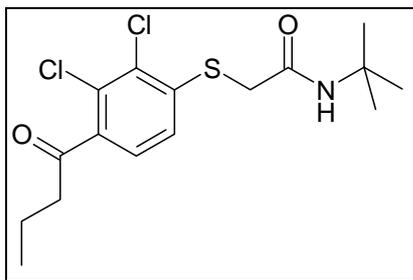
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.96 (t, 3H, ³J = 7.4 Hz, CH₂CH₃), 1.35 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.71 (sextett, 2H, ³J = 7.3 Hz, CH₂CH₃), 2.62 (t, 2H, ³J = 5.8 Hz, OCH₂CH₂), 2.88 (t, 2H, ³J = 7.3 Hz, COCH₂CH₂CH₃), 4.33 (t, 2H, ³J = 5.8 Hz, OCH₂CH₂), 5.70 (br s, 1H, NH), 6.90 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, Ar-H), 7.37 (d, 1H, ³J = 8.8 Hz, Ar-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 13.7 (CH₂CH₃), 17.9 (CH₂CH₃), 28.8 (C(CH₃)₃), 37.7 (OCH₂CH₂), 44.7 (COCH₂), 51.5 (C(CH₃)₃), 66.1 (OCH₂CH₂), 110.5 (Ar-CH), 123.1 (Ar-qC), 127.6 (Ar-CH), 131.2 (Ar-qC), 133.8 (Ar-qC), 156.6 (Ar-qC), 169.1 (qC, CONH), 202.0 (C=O).

IR (cm⁻¹) $\tilde{\nu}$ = 3344, 2960, 2931, 2873, 1684, 1645, 1577, 1545, 1452, 1410, 1381, 1362, 1292, 1273, 1211, 1078, 1036, 947, 910, 812, 760.

ESI-MS (Loop) m/z: 360 (100) [M+H]⁺, 362 (68), 364 (10)

N-tert-Butyl-(4-butyryl-2,3-dichlorphenylsulfanyl)-acetamid (**MS30**)



Methode C; Ansatz 300 mg (1.20 mmol) 1-(2,3-Dichlor-4-mercaptophenyl)butan-1-on (**MS12**), 250 mg (1.81 mmol) Kaliumcarbonat, 20 mg (0.120 mmol) Kaliumiodid, 467 mg (2.41 mmol) Bromessigsäure-*tert*-butylamid, 10 mL Aceton, Reaktionszeit: 5 d Rühren bei RT.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt. (SiO₂, Cy/EtOAc 3:1).

Ausbeute: 308 mg (0.850 mmol, 71 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 96 °C

Molare Masse: 362.32 g/mol

Summenformel: C₁₆H₂₁Cl₂NO₂S

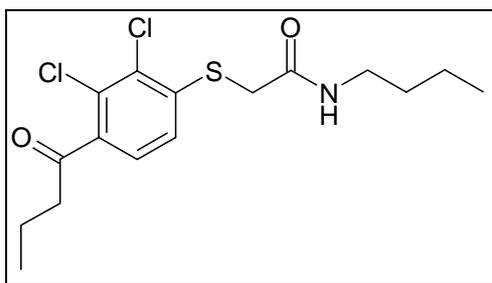
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.97 (t, 3H, ³J = 7.3 Hz, CH₂CH₃), 1.27 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.71 (sextett, 2H, ³J = 7.3 Hz, CH₂CH₃), 2.86 (t, 2H, ³J = 7.2 Hz, COCH₂CH₂CH₃), 3.59 (s, 2H, SCH₂), 6.36 (br s, 1H, NH), 7.11 (d, 1H, ³J = 8.3 Hz, Ar-H), 7.28 (d, 1H, ³J = 8.4 Hz, Ar-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 13.7 (CH₂CH₃), 17.7 (CH₂CH₃), 28.4 (C(CH₃)₃), 36.8 (SCH₂), 44.8 (COCH₂CH₂CH₃), 51.7 (C(CH₃)₃), 123.8 (Ar-CH), 126.5 (Ar-CH), 130.2 (Ar-qC), 131.1 (Ar-qC), 138.6 (Ar-qC), 139.9 (Ar-qC), 165.7 (qC, CONH), 202.2 (C=O).

IR (cm⁻¹) $\tilde{\nu}$ = 3309, 3074, 2966, 1699, 1678, 1651, 1547, 1452, 1400, 1360, 1325, 1271, 1221, 1155, 1009, 808, 754.

ESI-MS (Loop) m/z: 362.6 (100) [M+H]⁺, 364 (96), 365 (4)

***N*-Butyl-(4-butyryl-2,3-dichlorphenylsulfanyl)-acetamid (MS31)**



Methode C; Ansatz 300 mg (1.20 mmol) 1-(2,3-Dichlor-4-mercaptophenyl)butan-1-on (**MS12**), 200 mg (1.44 mmol) Kaliumcarbonat, 20 mg (0.120 mmol) Kaliumiodid, 467 mg (2.41 mmol) Bromessigsäure-*n*-butylamid, 10 mL Aceton, Reaktionszeit: 24 h Rühren bei RT.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt. (SiO₂, Cy/EtOAc 3:1).

Ausbeute: 366 mg (1.01 mmol, 84 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 105 °C

Molare Masse: 362.32 g/mol

Summenformel: C₁₆H₂₁Cl₂NO₂S

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.84 (t, 3H, ³J = 7.3 Hz, NH(CH₂)₃CH₃), 0.97 (t, 3H, ³J = 7.4 Hz, COCH₂CH₂CH₃), 1.21 (sext, 2H, ³J = 7.4 Hz, NHCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.40 (quint, 2H, ³J = 7.3 Hz, NHCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.71 (sextett, 2H, ³J = 7.3 Hz, COCH₂CH₂CH₃), 2.85 (t, 2H, ³J = 7.3 Hz, COCH₂CH₂CH₃), 3.23 (q, 2H, ³J = 6.7 Hz,

NHCH₂), 3.68 (s, 2H, SCH₂), 6.56 (br s, 1H, NH), 7.09 (d, 1H, ³J = 8.3 Hz, Ar-H), 7.27 (d, 1H, ³J = 8.3 Hz, Ar-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 13.6 (*n*-butyl-CH₃), 13.7 (CH₂CH₃), 17.7 (CH₂CH₃), 19.9 (NHCH₂CH₂CH₂CH₃), 31.4 (NHCH₂CH₂CH₂CH₃), 36.0 (SCH₂), 39.7 (NHCH₂), 44.8 (COCH₂CH₂CH₃), 123.6 (Ar-CH), 126.6 (Ar-CH), 130.2 (Ar-qC), 131.0 (Ar-qC), 138.6 (Ar-qC), 139.7 (Ar-qC), 166.3 (qC, CONH), 202.1 (C=O).

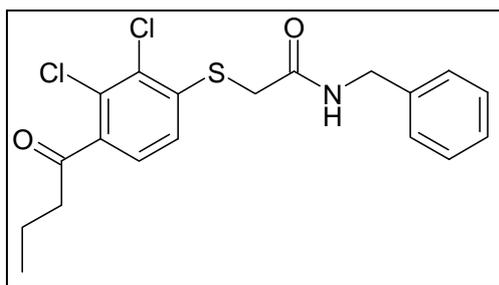
IR (cm⁻¹) $\tilde{\nu}$ = 3275, 3091, 2960, 2931, 2873, 1664, 1639, 1556, 1463, 1351, 1306, 1232, 1155, 1083, 1012, 903, 850, 812, 752.

LC-MS m/z: 362.4 (100) [M+H]⁺, 364.1 (71), 366.0 (14)

R_t (min): 22.8

Reinheit: 100 %

N-Benzyl-(4-butyryl-2,3-dichlorphenylsulfanyl)-acetamid (MS32)



Methode C; Ansatz 400 mg (1.61 mmol) 1-(2,3-Dichlor-4-mercaptophenyl)butan-1-on (MS12), 266 mg (1.93 mmol) Kaliumcarbonat, 27 mg (0.16 mmol) Kaliumiodid, 439 mg (1.93 mmol) Bromessigsäure-benzylamid, 10 mL Aceton, Reaktionszeit: 24 h Rühren bei RT.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt. (SiO₂, Cy/EtOAc 3:1). Ein Teil des Produkts wird zusätzlich aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 572 mg (1.44 mmol, 90 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 106 °C

Molare Masse: 396.34 g/mol

Summenformel: C₁₉H₁₉Cl₂NO₂S

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.98 (t, 3H, ³J = 7.5 Hz, CH₂CH₃), 1.73 (sextett, 2H, ³J = 7.4 Hz, CH₂CH₃), 2.85 (t, 2H, ³J = 7.3 Hz, COCH₂CH₂CH₃), 3.74 (s, 2H, SCH₂), 4.42 (d, 2H, ³J = 6.1 Hz, NHCH₂), 6.85 (br s, 1H, NH), 7.10 (m, 2H, 2 x Ar-H), 7.25 (m, 5H, 5 x Ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 13.7$ (CH_2CH_3), 17.7 (CH_2CH_3), 36.0 (SCH_2), 43.9 (NHCH_2), 44.8 ($\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 123.8 (Ar-CH), 126.6 (Ar-CH), 127.6 (2 Ar-CH), 127.7 (Ar-CH), 128.7 (2 Ar-CH), 130.2 (Ar-qC), 131.2 (Ar-qC), 137.4 (Ar-qC), 138.7 (Ar-qC), 139.5 (Ar-qC), 166.5 (qC, CONH), 202.1 (C=O).

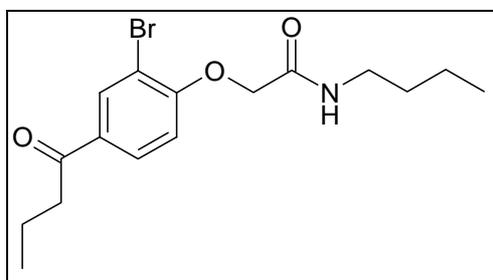
IR (cm^{-1}) $\tilde{\nu} = 3265, 3068, 3032, 2960, 2929, 2871, 1662, 1635, 1550, 1454, 1427, 1360, 1306, 1228, 1157, 1078, 1009, 903, 852, 808, 744, 694.$

LC-MS **m/z:** 396.5 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 398.1 (80), 400.1 (13)

R_t (min): 22.9

Reinheit: 100 %

(2-Brom-4-butyrylphenoxy)-*N*-butyl-acetamid (MS34)



Methode C; Ansatz: 0.50 g (2.06 mmol) 1-(3-Brom-4-hydroxy-phenyl)-butan-1-on (**MS03**), 0.43 g (3.09 mmol) Kaliumcarbonat, 0.07 g (0.42 mmol) Kaliumiodid, 0.80 g (4.12 mmol) Bromessigsäure-*n*-butylamid, 10 mL Aceton, Reaktionszeit: 4 h Erhitzen unter Rückfluss. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt. (SiO_2 , Cy/EtOAc 2:1) und im Anschluss aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 160 mg (0.45 mmol, 22 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 82 – 83 °C (Methanol)

Molare Masse: 356.26 g/mol

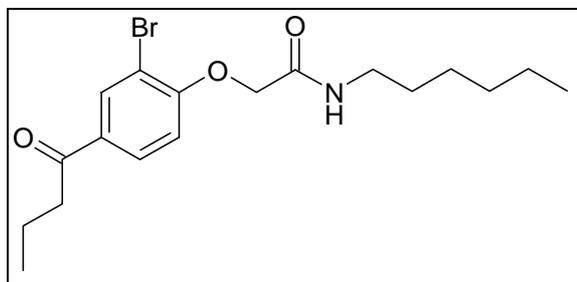
Summenformel: $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{BrNO}_3$

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.94$ (t, 3H, $^3J = 7.3$ Hz, $\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$), 0.99 (t, 3H, $^3J = 7.3$ Hz, $\text{H}_3\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.40 (sextett, 2H, $^3J = 7.3$ Hz, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.56 (quint, 2H, $^3J = 7.3$ Hz, $^3J = 8.4$ Hz, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.76 (sextett, 2H, $^3J = 7.3$ Hz, $\text{H}_3\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.88 (t, 2H, $^3J = 7.3$ Hz, $\text{H}_3\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 3.39 (q, 2H, $^3J = 6.3$ Hz, NHCH_2), 4.57 (s, 2H, OCH_2CO), 6.81 (br s, 1H, NH), 6.90 (d, 1H, $^3J = 8.6$ Hz, Ar-H), 7.91 (d, 1H, $^3J = 8.6$ Hz, Ar-H), 8.20 (s, 1H, Ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, CDCl_3): $\delta = 13.7$ ($\text{H}_3\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 13.8 ($\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$), 17.7 ($\text{H}_3\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 20.0 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 31.4 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 38.9 (NH–

CH₂), 40.3 (H₃CCH₂CH₂CO), 67.9 (OCH₂CO), 112.3 (Ar-qC), 112.5 (Ar-CH), 129.4 (Ar-CH), 132.4 (Ar-qC), 133.6 (Ar-CH), 156.7 (Ar-qC), 166.6 (CONH), 197.6 (qC, C=O).

(2-Brom-4-butyrylphenoxy)-*N*-hexyl-acetamid (MS35)



Methode C; Ansatz: 0.50 g (2.06 mmol) 1-(3-Brom-4-hydroxy-phenyl)-butan-1-on (**MS03**), 0.43 g (3.09 mmol) Kaliumcarbonat, 0.03 g (0.21 mmol) Kaliumiodid, 0.92 g (4.12 mmol) Bromessigsäure-*n*-hexylamid, 10 mL Aceton, Reaktionszeit: 4 h Erhitzen unter Rückfluss. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt. (SiO₂, Cy/EtOAc 2:1) und im Anschluss aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 380 mg (0.99 mmol, 48 %) hell gelber Feststoff

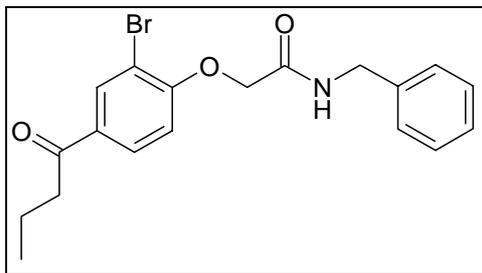
Schmelzpunkt: 69 – 70 °C (Methanol)

Molare Masse: 384.31 g/mol

Summenformel: C₁₈H₂₆BrNO₃

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃): δ = 0.88 t, (3H, ³J = 6.6 Hz, NH(CH₂)₅CH₃), 0.99 (t, 3H, ³J = 7.4 Hz, H₃CCH₂CH₂CO), 1.25–1.42 (m, 6H, 3 x CH₂), 1.55 (quint, 2H, ³J = 4.3 Hz, ³J = 7.5 Hz, NHCH₂CH₂), 1.76 (sextett, 2H, ³J = 7.3 Hz, H₃CCH₂CH₂CO), 2.88 (t, 2H, ³J = 7.3 Hz, H₃CCH₂CH₂CO), 3.38 (q, 2H, ³J = 6.0 Hz, ³J = 7.1 Hz, NHCH₂), 4.57 (s, 2H, OCH₂CO), 6.81 (br s, 1H, NH), 6.90 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, Ar-H), 7.93 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, Ar-H), 8.20 (s, 1H, Ar-H).

¹³C-NMR (100.61 MHz, CDCl₃): δ = 13.8 (H₃CCH₂CH₂CO), 14.0 (NH(CH₂)₅CH₃), 17.8 (H₃CCH₂CH₂CO), 22.6 (NH(CH₂)₄CH₂CH₃), 26.5 (CH₂), 29.3 (CH₂), 31.4 (NHCH₂CH₂), 39.2 (NHCH₂), 40.3 (H₃CCH₂CH₂CO), 67.9 (OCH₂CO), 112.3 (Ar-qC), 112.5 (Ar-CH), 129.4 (Ar-CH), 133.6 (Ar-qC), 156.8 (Ar-CH), 161.5 (Ar-qC), 168.7 (CONH), 199.6 (qC, C=O).

***N*-Benzyl-2-(2-brom-4-butyrylphenoxy)-acetamid (MS36)**

Methode C; Ansatz: 0.50 g (2.06 mmol) 1-(3-Brom-4-hydroxy-phenyl)-butan-1-on (**MS03**), 0.43 g (3.09 mmol) Kaliumcarbonat, 0.03 g (0.21 mmol) Kaliumiodid, 0.94 g (4.12 mmol) Bromessigsäurebenzylamid, 10 mL Aceton, Reaktionszeit: 4 h Erhitzen unter Rückfluss.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt. (SiO₂, Cy/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 270 mg (0.69 mmol, 34 %) weißer Feststoff

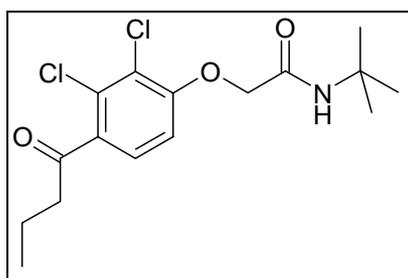
Schmelzpunkt: 110 – 111 °C

Molare Masse: 390.28 g/mol

Summenformel: C₁₉H₂₀BrNO₃

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃): δ = 0.99 (t, 3H, ³J = 7.3 Hz, H₃CCH₂), 1.75 (sextett, 2H, ³J = 7.3 Hz, H₃CCH₂), 2.87 (t, 2H, ³J = 7.0 Hz, H₃CCH₂CH₂), 4.57 (d, 2H, ³J = 6.0 Hz, NHCH₂), 4.64 (s, 2H, OCH₂CO), 6.91 (d, 1H, ³J = 8.5 Hz, Ar-H), 7.13 (br s, 1H, NH), 7.25-7.36 (5H, m, Ar-H), 7.90 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, Ar-H), 8.17 (s, 1H, Ar-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 13.8 (CH₂CH₃), 17.7 (CH₂CH₃), 40.3 (CH₂CH₂CH₃), 43.2 (NHCH₂), 68.0 (OCH₂CO), 112.4, (Ar-qC), 112.6 (Ar-CH), 127.6 (2 Ar-CH), 127.7 (2 Ar-CH), 128.8 (Ar-CH), 129.3 (Ar-CH), 132.5 (Ar-qC), 133.6 (Ar-CH), 137.5 (Ar-qC), 156.7 (Ar-qC), 166.6 (qC, CONH), 197.6 (qC, C=O).

***N*-tert-Butyl-2-(4-butyryl-2,3-dichlorphenoxy)-acetamid (MS43)**

Methode E1; Ansatz: 500 mg (1.72 mmol) 4-Butyryl-2,3-dichlor-phenoxyessigsäure, 198 mg (1.72 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid, 354 mg (1.72 mmol) DCC, 251 mg (3.43 mmol)

tert-Butylamin, 15 mL Dichlormethan, Reaktionszeit: 21 d. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Cy/EtOAc 1:1).

Ausbeute: 374 mg (1.08 mmol, 63 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 129 °C

Molare Masse: 346.25 g/mol

Summenformel: C₁₆H₂₁Cl₂NO₃

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.97 (t, 3H, ³J = 7.4 Hz, CH₂CH₃), 1.41 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.72 (sextett, 2H, ³J = 7.3 Hz, CH₂CH₃), 2.88 (t, 2H, ³J = 7.2 Hz, COCH₂CH₂CH₃), 4.44 (s, 2H, OCH₂), 6.62 (br s, 1H, NH), 6.84 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, Ar-H), 7.38 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, Ar-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 13.7 (CH₂CH₃), 17.8 (CH₂CH₃), 28.7 (C(CH₃)₃), 44.7 (COCH₂), 51.5 (C(CH₃)₃), 68.4 (OCH₂), 111.1 (Ar-CH), 123.2 (Ar-qC), 127.6 (Ar-CH), 131.4 (Ar-qC), 134.9 (Ar-qC), 155.2 (Ar-qC), 165.5 (qC, CONH), 201.8 (C=O).

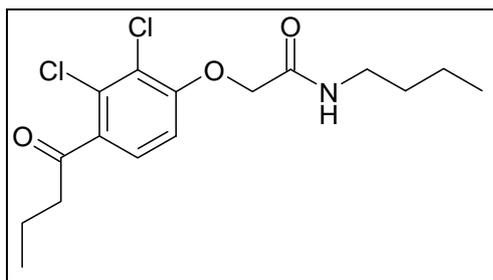
IR (cm⁻¹) $\tilde{\nu}$ = 3265, 3086, 2964, 2933, 2873, 1699, 1655, 1585, 1568, 1468, 1433, 1381, 1362, 1315, 1263, 1225, 1130, 1105, 1080, 1024, 945, 802, 742.

LC-MS m/z: 346 (100) [M+H]⁺, 348 (65), 350 (10)

R_t (min): 24.7

Reinheit: 100 %

N-Butyl-2-(4-butyryl-2,3-dichlorphenoxy)-acetamid (MS44)



Methode E1; Ansatz: 500 mg (1.72 mmol) 4-Butyryl-2,3-dichlor-phenoxyessigsäure, 198 mg (1.72 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid, 354 mg (1.72 mmol) DCC, 251 mg (3.43 mmol) *n*-Butylamin, 15 mL Dichlormethan, Reaktionszeit: 21 d. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Cy/EtOAc 1:1).

Ausbeute: 270 mg (0.880 mmol, 45 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 76 °C

Molare Masse: 346.25 g/mol

Summenformel: C₁₆H₂₁Cl₂NO₃

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.92 – 0.98 (m, 6H, NH(CH₂)₃CH₃, COCH₂CH₂CH₃), 1.38 (sext, 2H, ³J = 7.4 Hz, NHCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.55 (quint, 2H, ³J = 7.3 Hz, NHCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.72 (sextett, 2H, ³J = 7.3 Hz, COCH₂CH₂CH₃), 2.88 (t, 2H, ³J = 7.3 Hz, COCH₂CH₂CH₃), 3.37 (q, 2H, ³J = 6.7 Hz, NHCH₂), 4.55 (s, 2H, OCH₂), 6.72 (br s, 1H, NH), 6.85 (d, 1H, ³J = 8.8 Hz, Ar-H), 7.38 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, Ar-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 13.7 (*n*-butyl-CH₃, CH₂CH₃), 17.8 (CH₂CH₃), 20.0 (NHCH₂CH₂CH₂CH₃), 31.5 (NHCH₂CH₂CH₂CH₃), 38.9 (NHCH₂), 44.8 (COCH₂CH₂CH₃), 68.2 (OCH₂), 111.0 (Ar-CH), 123.3 (Ar-qC), 127.6 (Ar-CH), 131.4 (Ar-qC), 135.0 (Ar-qC), 155.1 (Ar-qC), 166.4 (qC, CONH), 201.8 (C=O).

IR (cm⁻¹) $\tilde{\nu}$ = 3379, 3024, 2960, 2933, 2873, 1697, 1672, 1589, 1537, 1466, 1446, 1406, 1387, 1298, 1265, 1223, 1130, 1055, 916, 802, 758, 725.

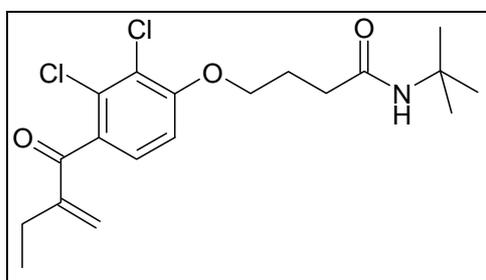
LC-MS m/z: 346 (100) [M+H]⁺, 348 (68), 350 (9)

R_t (min): 23.6

Reinheit: 100 %

8.5.7 Synthese der Etacrynsäureamid-Derivate

N-tert-Butyl-4-[2,3-dichlor-4-(2-methylen-butyryl)-phenoxy]-butanamid (MS45)



Methode E1; Ansatz: 150 mg (0.453 mmol) 4-[2,3-Dichlor-4-(2-methylen-butyryl)-phenoxy]-buttersäure (**MS38**), 52 mg (0.453 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid, 93 mg (0.453 mmol) DCC, 33 mg (0.453 mmol) *tert*-Butylamin, 10 mL Dichlormethan, 5 mL THF, Reaktionszeit: 20 d. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Cy/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 89 mg (0.230 mmol, 51 %) farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 100 °C

Molare Masse: 386.32 g/mol

Summenformel: C₁₉H₂₅Cl₂NO₃

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.13 (t, 3H, ³J = 7.5 Hz, CH₂CH₃), 1.29 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.15 (quintett, 2H, ³J = 6.5 Hz, OCH₂CH₂CH₂), 2.35 (t, 2H, ³J = 7.0 Hz, OCH₂CH₂CH₂), 2.45 (q, 2H, ³J = 7.5 Hz, CH₂CH₃), 4.12 (t, 2H, ³J = 6.0 Hz, OCH₂CH₂CH₂), 5.36 (br s, 1H, NH), 5.57 (s, 1H, C=CH), 5.91 (s, 1H, C=CH), 6.87 (d, 1H, ³J = 8.5 Hz, Ar-H), 7.14 (d, 1H, ³J = 8.5 Hz, Ar-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 12.4 (CH₂CH₃), 23.5 (CH₂CH₃), 24.8 (CH₂CH₂CH₂), 28.8 (C(CH₃)₃), 33.2 (CH₂CONH), 51.2 (C(CH₃)₃), 68.4 (OCH₂), 110.5 (Ar-CH), 122.7 (Ar-qC), 127.2 (Ar-CH), 128.2 (C=CH₂), 131.2 (Ar-qC), 132.7 (Ar-qC), 150.3 (C=CH₂), 156.4 (Ar-qC), 171.3 (CONH), 196.0 (C=O).

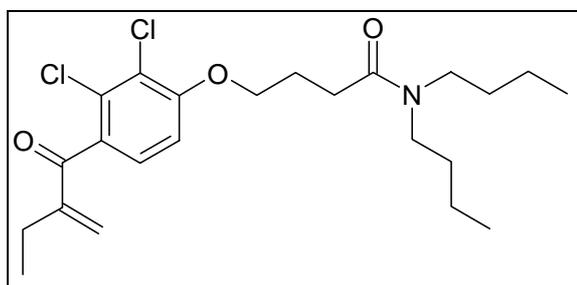
IR (cm⁻¹) $\tilde{\nu}$ = 3356, 2966, 2927, 1664, 1641, 1591, 1545, 1460, 1385, 1360, 1335, 1298, 1259, 1217, 1119, 1092, 1034, 1005, 957, 825, 804, 764, 698.

LC-MS m/z: 386.4 (100) [M+H]⁺, 388.1 (68), 390.1 (11)

R_t (min): 23.8

Reinheit: 94 %

N,N-Dibutyl-4-[2,3-dichlor-4-(2-methylen-butyryl)-phenoxy]-butanamid (MS46)



Methode E1; Ansatz: 150 mg (0.453 mmol) 4-[2,3-Dichlor-4-(2-methylen-butyryl)-phenoxy]-buttersäure (**MS38**), 52 mg (0.453 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid, 93 mg (0.453 mmol) DCC, 33 mg (0.255 mmol) Dibutylamin*, 10 mL Dichlormethan, 5 mL THF, Reaktionszeit: 20 d. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Cy/EtOAc 2:1).

* Das Dibutylamin war von Herstellerseite fälschlicherweise als *n*-Butylamin deklariert. Die Masse der Einwaage an Dibutylamin entspricht einem Äquivalent *n*-Butylamin.

Ausbeute: 50 mg (0.113 mmol, 44 %) farbloser viskoser Feststoff

Molare Masse: 442.43 g/mol

Summenformel: C₂₃H₃₃Cl₂NO₃

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.91 (m, 6H, 2 x N(CH₂)₃CH₃), 1.13 (t, 3H, ³J = 7.5 Hz, CH₂CH₃), 1.29 (m, 4H, 2 x N(CH₂)₂CH₂), 1.50 (m, 4H, 2 x NCH₂CH₂), 2.19 (quintett, 2H,

$^3J = 6.5$ Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.46 (q, 2H, $^3J = 7.5$ Hz, CH_2CH_3), 2.59 (t, 2H, $^3J = 7.0$ Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.23 (t, 2H, $^3J = 7.7$ Hz, NCH_2), 3.30 (t, 2H, $^3J = 7.6$ Hz, NCH_2), 4.14 (t, 2H, $^3J = 6.0$ Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 5.57 (s, 1H, $\text{C}=\text{CH}$), 5.90 (s, 1H, $\text{C}=\text{CH}$), 6.88 (d, 1H, $^3J = 8.5$ Hz, Ar-H), 7.14 (d, 1H, $^3J = 8.5$ Hz, Ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 12.4$ (CH_2CH_3), 13.8 ($\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$), 13.9 ($\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$), 20.1 ($\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$), 20.3 ($\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$), 23.5 (CH_2CH_3), 24.8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 28.7 (CH_2CONH), 30.0 (NCH_2CH_2), 31.2 (NCH_2CH_2), 45.8 (NCH_2), 47.8 (NCH_2), 68.7 (OCH_2), 110.3 (Ar-CH), 122.7 (Ar-qC), 127.2 (Ar-CH), 128.2 ($\text{C}=\text{CH}_2$), 131.1 (Ar-qC), 132.5 (Ar-qC), 150.4 ($\text{C}=\text{CH}_2$), 156.5 (Ar-qC), 171.5 (CONH), 196.0 ($\text{C}=\text{O}$).

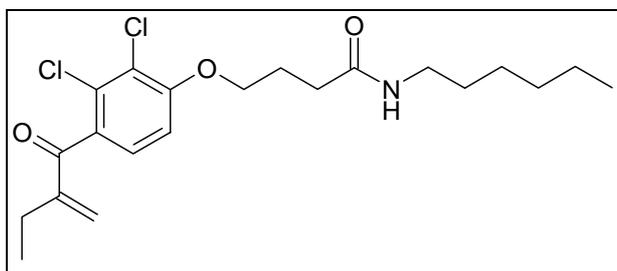
IR (cm^{-1}) $\tilde{\nu} = 2958, 2929, 2871, 1637, 1585, 1460, 1383, 1288, 1259, 1209, 1115, 1038, 964, 806, 769$.

LC-MS **m/z**: 442.5 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 444.1 (62), 446.2 (10)

R_t (min): 29.2

Reinheit: 99 %

4-[2,3-Dichlor-4-(2-methylen-butyryl)-phenoxy]-*N*-hexyl-butanamid (MS47)



Methode E1; Ansatz: 150 mg (0.453 mmol) 4-[2,3-Dichlor-4-(2-methylen-butyryl)-phenoxy]-buttersäure (**MS38**), 52 mg (0.453 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid, 93 mg (0.453 mmol) DCC, 46 mg (0.453 mmol) *n*-Hexylamin, 10 mL Dichlormethan, 5 mL THF, Reaktionszeit: 20 d. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO_2 , Cy/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 47 mg (0.113 mmol, 25 %) weißer viskoser Feststoff

Molare Masse: 414.38 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{Cl}_2\text{NO}_3$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.85$ (t, 3H, $^3J = 7.1$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.13 (t, 3H, $^3J = 7.3$ Hz, CH_2CH_3), 1.24 (m, 6H, 3 x CH_2), 1.44 (m, 2H, CH_2), 2.18 (quintett, 2H, $^3J = 6.5$ Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.42 (m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, CH_2CH_3), 3.21 (q, 2H, $^3J = 6.6$ Hz,

NCH₂), 4.12 (t, 2H, ³J = 5.9 Hz, OCH₂CH₂CH₂), 5.57 (s, 1H, C=CH), 5.64 (br s, 1H, NH), 5.90 (s, 1H, C=CH), 6.86 (d, 1H, ³J = 8.5 Hz, Ar-H), 7.13 (d, 1H, ³J = 8.5 Hz, Ar-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 12.4 (CH₂CH₃), 14.0 (N(CH₂)₅CH₃), 22.5 (CH₂), 23.5 (CH₂CH₃), 24.8 (CH₂CH₂CH₂), 26.5 (CH₂), 29.5 (CH₂), 31.4 (CH₂), 32.4 (CH₂CONH), 39.6 (NHCH₂), 68.4 (OCH₂), 110.4 (Ar-CH), 122.7 (Ar-qC), 127.2 (Ar-CH), 128.2 (C=CH₂), 131.1 (Ar-qC), 132.7 (Ar-qC), 150.3 (C=CH₂), 156.3 (Ar-qC), 171.9 (CONH), 195.9 (C=O).

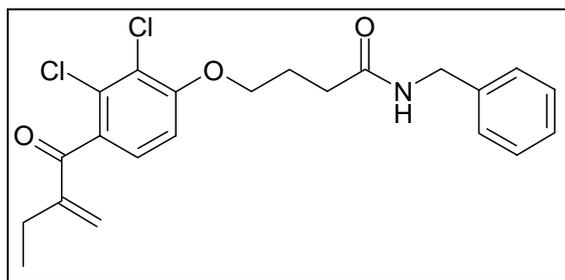
IR (cm⁻¹) $\tilde{\nu}$ = 3311, 2960, 2929, 1732, 1666, 1641, 1585, 1545, 1462, 1385, 1336, 1288, 1201, 1117, 1038, 962, 802, 764.

LC-MS m/z: 414 (100) [M+H]⁺, 416 (67), 418 (10)

R_t (min): 26.4

Reinheit: 94 %

N-Benzyl-4-[2,3-dichlor-4-(2-methylen-butyryl)-phenoxy]-butanamid (MS48)



Methode E1; Ansatz: 150 mg (0.453 mmol) 4-[2,3-Dichlor-4-(2-methylen-butyryl)-phenoxy]-buttersäure (**MS38**), 52 mg (0.453 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid, 93 mg (0.453 mmol) DCC, 49 mg (0.453 mmol) Benzylamin, 15 mL Dichlormethan, Reaktionszeit: 14 d. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Cy/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 100 mg (0.238 mmol, 53 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 112 °C

Molare Masse: 420.34 g/mol

Summenformel: C₂₂H₂₃Cl₂NO₃

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.14 (t, 3H, ³J = 7.5 Hz, CH₂CH₃), 2.22 (quintett, 2H, ³J = 6.4 Hz, OCH₂CH₂CH₂), 2.49 (m, 4H, OCH₂CH₂CH₂, CH₂CH₃), 4.12 (t, 2H, ³J = 6.0 Hz, OCH₂CH₂CH₂), 4.43 (d, 2H, ³J = 5.5 Hz, NCH₂), 5.58 (s, 1H, C=CH), 5.83 (br s, 1H, NH), 5.91 (s, 1H, C=CH), 6.84 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, Ar-H), 7.13 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, Ar-H), 7.27 (m, 5H, C₆H₅).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 12.4$ (CH_2CH_3), 23.5 (CH_2CH_3), 24.8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 32.4 (CH_2CONH), 43.7 (NHCH_2), 68.3 (OCH_2), 110.4 (Ar-CH), 122.8 (Ar-qC), 127.2 (Ar-CH), 127.6 (Ar-CH), 127.8 (2 x CH , Ar-CH), 128.2 ($\text{C}=\text{CH}_2$), 128.7 (2 x CH , Ar-CH), 131.2 (Ar-qC), 132.8 (Ar-qC), 138.1 (Ar-qC), 150.4 ($\text{C}=\text{CH}_2$), 156.3 (Ar-qC), 171.7 (CONH), 196.0 ($\text{C}=\text{O}$).

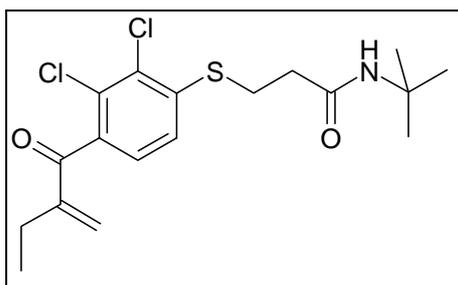
IR (cm^{-1}) $\tilde{\nu} = 3300, 3033, 2966, 2925, 2879, 1653, 1630, 1585, 1531, 1458, 1379, 1282, 1265, 1205, 1115, 1041, 1003, 960, 947, 806, 783, 748, 698$.

LC-MS m/z : 420 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 422 (70), 424 (10)

R_t (min): 24.0

Reinheit: 100 %

N-tert-Butyl-3-[2,3-dichlor-4-(2-methylen-butyryl)-phenylsulfanyl]-propionamid
(MS49)



Methode E1; Ansatz: 120 mg (0.360 mmol) 3-[2,3-Dichlor-4-(2-methylen-butyryl)-phenylsulfanyl]-propionsäure (**MS40**), 41 mg (0.360 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid, 74 mg (0.360 mmol) DCC, 26 mg (0.360 mmol) *tert*-Butylamin, 15 mL Dichlormethan, Reaktionszeit: 14 d. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO_2 , Cy/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 79 mg (0.203 mmol, 57 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 97 °C

Molare Masse: 388.36 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{Cl}_2\text{NO}_2\text{S}$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.13$ (t, 3H, $^3J = 7.5$ Hz, CH_2CH_3), 1.34 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.45 (m, 4H, SCH_2CH_2 , CH_2CH_3), 3.25 (t, 2H, $^3J = 7.3$ Hz, SCH_2CH_2), 5.35 (br s, 1H, NH), 5.60 (s, 1H, $\text{C}=\text{CH}$), 5.95 (s, 1H, $\text{C}=\text{CH}$), 7.11 (d, 1H, $^3J = 8.2$ Hz, Ar-H), 7.22 (d, 1H, $^3J = 8.2$ Hz, Ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 12.4$ (CH_2CH_3), 23.3 (CH_2CH_3), 28.0 (SCH_2), 28.8 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 36.1 (SCH_2CH_2), 51.6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 124.1 (Ar-CH), 126.3 (Ar-CH), 129.0

(C=CH₂), 130.4 (Ar-qC), 131.3 (Ar-qC), 137.1 (Ar-qC), 140.3 (Ar-qC), 150.0 (qC, C=CH₂), 169.3 (qC, CONH), 195.8 (qC, C=O).

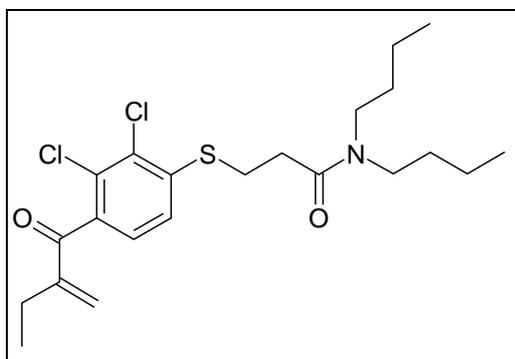
IR (cm⁻¹) $\tilde{\nu}$ = 3392, 2964, 2927, 1678, 1651, 1574, 1523, 1452, 1362, 1267, 1223, 1153, 1095, 993, 949, 868, 825, 795, 764.

LC-MS **m/z:** 388.3 (100) [M+H]⁺, 390.1 (73), 392.1 (13)

R_t (min): 24.8

Reinheit: 86 %

***N,N*-Dibutyl-3-[2,3-dichlor-4-(2-methylen-buteryl)-phenylsulfanyl]-propionamid
(MS50)**



Methode E1; Ansatz: 120 mg (0.360 mmol) 3-[2,3-Dichlor-4-(2-methylen-buteryl)-phenylsulfanyl]-propionsäure (**MS40**), 41 mg (0.360 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid, 74 mg (0.360 mmol) DCC, 26 mg (0.201 mmol) Dibutylamin*, 15 mL Dichlormethan, Reaktionszeit: 14 d. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Cy/EtOAc 2:1).

* Das Dibutylamin war von Herstellerseite fälschlicherweise als *n*-Butylamin deklariert. Die Masse der Einwaage an Dibutylamin entspricht einem Äquivalent *n*-Butylamin.

Ausbeute: 56 mg (0.126 mmol, 63 %) farbloser viskoser Feststoff

Molare Masse: 444.47 g/mol

Summenformel: C₂₂H₃₁Cl₂NO₂S

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.91 (m, 6H, 2 x N(CH₂)₃CH₃), 1.14 (t, 3H, ³J = 7.5 Hz, CH₂CH₃), 1.29 (m, 4H, 2 x N(CH₂)₂CH₂), 1.50 (m, 4H, 2 x NCH₂CH₂), 2.45 (q, 2H, ³J = 7.4 Hz, CH₂CH₃), 2.68 (t, 2H, ³J = 7.3 Hz, SCH₂CH₂), 3.14 – 3.33 (m, 6H, SCH₂CH₂, 2 x NCH₂), 5.60 (s, 1H, C=CH), 5.94 (s, 1H, C=CH), 7.12 (d, 1H, ³J = 8.2 Hz, Ar-H), 7.21 (d, 1H, ³J = 8.2 Hz, Ar-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 12.4 (CH₂CH₃), 13.77 (N(CH₂)₃CH₃), 13.84 (N(CH₂)₃-CH₃), 20.1 (N(CH₂)₂CH₂), 20.3 (N(CH₂)₂CH₂), 23.3 (CH₂CH₃), 27.9 (SCH₂), 29.9

(NCH₂CH₂), 31.2 (NCH₂CH₂), 32.0 (SCH₂CH₂), 46.0 (NCH₂), 47.7 (NCH₂), 123.6 (Ar-CH), 126.4 (Ar-CH), 128.8 (C=CH₂), 130.4 (Ar-qC), 130.9 (Ar-qC), 136.9 (Ar-qC), 140.7 (Ar-qC), 150.0 (qC, C=CH₂), 169.7 (qC, CONH), 195.8 (qC, C=O).

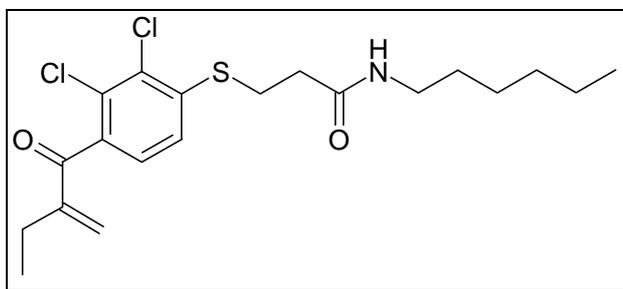
IR (cm⁻¹) $\tilde{\nu}$ = 2958, 2929, 2871, 1637, 1572, 1427, 1360, 1288, 1261, 1147, 997, 870, 793.

LC-MS **m/z:** 444.6 (100) [M+H]⁺, 446.2 (61), 448.2 (12)

R_t (min): 29.5

Reinheit: 91 %

3-[2,3-Dichlor-4-(2-methylen-buteryl)-phenylsulfanyl]-*N*-hexyl-propionamid (MS51)



Methode E1; Ansatz: 120 mg (0.360 mmol) 3-[2,3-Dichlor-4-(2-methylen-buteryl)-phenylsulfanyl]-propionsäure (**MS40**), 41 mg (0.360 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid, 74 mg (0.360 mmol) DCC, 36 mg (0.360 mmol) *n*-Hexylamin, 15 mL Dichlormethan, Reaktionszeit: 14 d.

Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Cy/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 84 mg (0.202 mmol, 56 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 77 °C

Molare Masse: 416.41 g/mol

Summenformel: C₂₀H₂₇Cl₂NO₂S

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.87 (t, 3H, ³J = 6.9 Hz, NH(CH₂)₅CH₃), 1.14 (t, 3H, ³J = 7.4 Hz, CH₂CH₃), 1.28 (m, 6H, 3 x CH₂), 1.48 (m, 2H, CH₂), 2.46 (q, 2H, ³J = 7.4 Hz, CH₂CH₃), 2.52 (t, 2H, ³J = 7.4 Hz, SCH₂CH₂), 3.25 (q, 2H, ³J = 7.1 Hz, NHCH₂), 3.28 (t, 2H, ³J = 7.4 Hz, SCH₂CH₂), 5.56 (br s, 1H, NH), 5.60 (s, 1H, C=CH), 5.95 (s, 1H, C=CH), 7.12 (d, 1H, ³J = 8.1 Hz, Ar-H), 7.21 (d, 1H, ³J = 8.1 Hz, Ar-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 12.4 (CH₂CH₃), 14.0 (NH(CH₂)₅CH₃), 22.5 (CH₂), 23.3 (CH₂CH₃), 26.6 (CH₂), 28.0 (SCH₂), 29.5 (CH₂), 31.4 (CH₂), 35.4 (SCH₂CH₂), 39.8 (NHCH₂), 124.0 (Ar-CH), 126.4 (Ar-CH), 129.0 (C=CH₂), 130.4 (Ar-qC), 131.3 (Ar-qC), 137.1 (Ar-qC), 140.2 (Ar-qC), 150.0 (qC, C=CH₂), 169.9 (qC, CONH), 195.7 (qC, C=O).

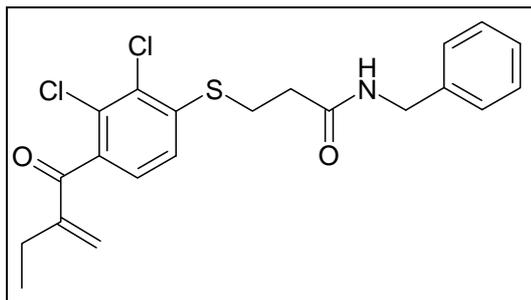
IR (cm⁻¹) $\tilde{\nu}$ = 3300, 2929, 2852, 1658, 1639, 1576, 1543, 1464, 1415, 1358, 1294, 1259, 1198, 1151, 1092, 995, 945, 862, 823, 789.

LC-MS **m/z:** 833 (100) [2M+H]⁺, 416 (59) [M+H]⁺, 418 (39)

R_t (min): 27.0

Reinheit: 93 %

***N*-Benzyl-3-[2,3-dichlor-4-(2-methylen-butyryl)-phenylsulfanyl]-propionamid (MS52)**



Methode E1; Ansatz: 120 mg (0.360 mmol) 3-[2,3-Dichlor-4-(2-methylen-butyryl)-phenylsulfanyl]-propionsäure (**MS40**), 41 mg (0.360 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid, 74 mg (0.360 mmol) DCC, 39 mg (0.360 mmol) Benzylamin, 15 mL Dichlormethan, Reaktionszeit: 14 d.

Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Cy/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 100 mg (0.237 mmol, 66 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 123 °C

Molare Masse: 422.38 g/mol

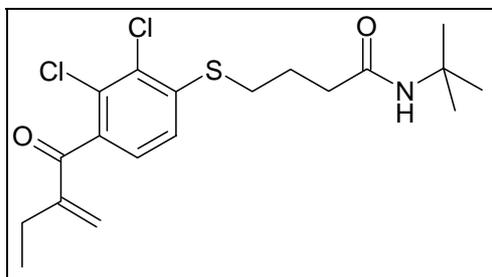
Summenformel: C₂₁H₂₁Cl₂NO₂S

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.14 (t, 3H, ³J = 7.5 Hz, CH₂CH₃), 2.46 (q, 2H, ³J = 7.4 Hz, CH₂CH₃), 2.58 (t, 2H, ³J = 7.2 Hz, SCH₂CH₂), 3.32 (t, 2H, ³J = 7.3 Hz, SCH₂CH₂), 4.45 (q, 2H, ³J = 5.5 Hz, NHCH₂), 5.60 (s, 1H, C=CH), 5.80 (br s, 1H, NH), 5.95 (s, 1H, C=CH), 7.11 (d, 1H, ³J = 8.0 Hz, Ar-H), 7.21 (d, 1H, ³J = 8.1 Hz, Ar-H), 7.28 (m, 5H, C₆H₅).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 12.4 (CH₂CH₃), 23.3 (CH₂CH₃), 28.0 (SCH₂), 35.3 (SCH₂CH₂), 43.9 (NHCH₂), 124.1 (Ar-CH), 126.4 (Ar-CH), 127.7 (Ar-CH), 127.9 (2 x Ar-CH), 128.8 (2 x Ar-CH), 129.0 (C=CH₂), 130.5 (Ar-qC), 131.4 (Ar-qC), 137.3 (Ar-qC), 137.8 (Ar-qC), 140.0 (Ar-qC), 150.0 (qC, C=CH₂), 169.9 (qC, CONH), 195.7 (qC, C=O).

IR (cm⁻¹) $\tilde{\nu}$ = 3276, 2925, 2850, 1657, 1633, 1570, 1545, 1456, 1414, 1360, 1292, 1259, 1200, 1151, 1090, 989, 945, 864, 829, 795, 744, 694.

LC-MS **m/z:** 845 (100) [2M+H]⁺, 422 (99) [M+H]⁺, 424 (66)

R_t (min): 24.6**Reinheit:** 89 %***N*-tert-Butyl-4-[2,3-dichlor-4-(2-methylen-butyryl)-phenylsulfanyl]-butanamid (MS53)**

Methode E1; Ansatz: 120 mg (0.346 mmol) 4-[2,3-Dichlor-4-(2-methylen-butyryl)-phenylsulfanyl]-buttersäure (**MS41**), 41 mg (0.346 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid, 74 mg (0.346 mmol) DCC, 25 mg (0.346 mmol) *tert*-Butylamin, 15 mL Dichlormethan, Reaktionszeit: 14 d.

Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Cy/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 50 mg (0.124 mmol, 36 %) farbloser viskoser Feststoff

Molare Masse: 402.39 g/mol

Summenformel: C₁₉H₂₅Cl₂NO₂S

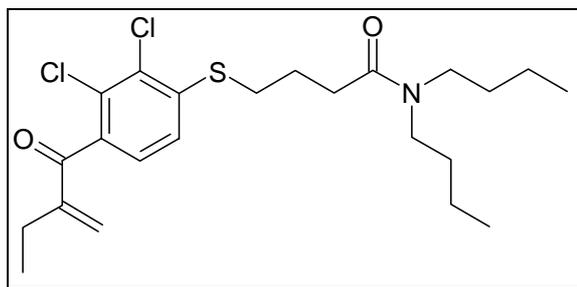
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.14 (t, 3H, ³J = 7.5 Hz, CH₂CH₃), 1.34 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.04 (quintett, 2H, ³J = 7.0 Hz, CH₂CH₂CH₂), 2.28 (t, 2H, ³J = 6.9 Hz, SCH₂CH₂CH₂), 2.46 (q, 2H, ³J = 7.5 Hz, CH₂CH₃), 3.02 (t, 2H, ³J = 7.1 Hz, SCH₂CH₂CH₂), 5.28 (br s, 1H, NH), 5.61 (s, 1H, C=CH), 5.95 (s, 1H, C=CH), 7.12 (d, 1H, ³J = 8.3 Hz, Ar-H), 7.21 (d, 1H, ³J = 8.3 Hz, Ar-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 12.4 (CH₂CH₃), 23.3 (CH₂CH₃), 24.0 (CH₂CH₂CH₂), 28.8 (C(CH₃)₃), 31.6 (SCH₂), 35.6 (SCH₂CH₂CH₂), 51.4 (C(CH₃)₃), 123.7 (Ar-CH), 126.4 (Ar-CH), 128.9 (C=CH₂), 130.3 (Ar-qC), 130.9 (Ar-qC), 136.8 (Ar-qC), 140.8 (Ar-qC), 150.0 (qC, C=CH₂), 170.9 (qC, CONH), 195.8 (qC, C=O).

IR (cm⁻¹) $\tilde{\nu}$ = 3313, 2966, 2927, 2360, 1649, 1570, 1452, 1390, 1360, 1292, 1259, 1221, 1149, 997, 870, 795.

LC-MS **m/z:** 402.2 (100) [M+H]⁺, 404.2 (82), 406.1 (14)

R_t (min): 25.3**Reinheit:** 90 %

***N,N*-Dibutyl-4-[2,3-dichlor-4-(2-methylen-butyryl)-phenylsulfanyl]-butanamid (MS54)**

Methode E1; Ansatz: 120 mg (0.346 mmol) 4-[2,3-Dichlor-4-(2-methylen-butyryl)-phenylsulfanyl]-buttersäure (**MS41**), 41 mg (0.346 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid, 74 mg (0.346 mmol) DCC, 25 mg (0.193 mmol) Dibutylamin*, 15 mL Dichlormethan, Reaktionszeit: 14 d.

Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Cy/EtOAc 2:1).

* Das Dibutylamin war von Herstellerseite fälschlicherweise als *n*-Butylamin deklariert.

Die Masse der Einwaage an Dibutylamin entspricht einem Äquivalent *n*-Butylamin.

Ausbeute: 72 mg (0.157 mmol, 81 %) farbloser viskoser Feststoff

Molare Masse: 458.49 g/mol

Summenformel: C₂₃H₃₃Cl₂NO₂S

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.91 (m, 6H, 2 x N(CH₂)₃CH₃), 1.14 (t, 3H, ³J = 7.5 Hz, CH₂CH₃), 1.30 (m, 4H, 2 x N(CH₂)₂CH₂), 1.51 (m, 4H, 2 x NCH₂CH₂), 2.08 (quintett, 2H, ³J = 7.0 Hz, CH₂CH₂CH₂), 2.50 (m, 4H, SCH₂CH₂CH₂, CH₂CH₃), 3.07 (t, 2H, ³J = 7.1 Hz, SCH₂CH₂CH₂), 3.20 (t, 2H, ³J = 7.3 Hz, NCH₂), 3.30 (t, 2H, ³J = 7.3 Hz, NCH₂), 5.60 (s, 1H, C=CH), 5.94 (s, 1H, C=CH), 7.13 (d, 1H, ³J = 8.3 Hz, Ar-H), 7.27 (d, 1H, ³J = 8.3 Hz, Ar-H).

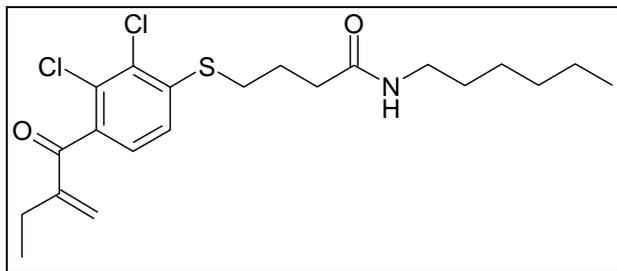
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 12.4 (CH₂CH₃), 13.8 (N(CH₂)₃CH₃), 13.9 (N(CH₂)₃-CH₃), 20.1 (N(CH₂)₂CH₂), 20.3 (N(CH₂)₂CH₂), 23.4 (CH₂CH₃), 23.9 (CH₂CH₂CH₂), 30.0 (NCH₂CH₂), 31.2 (NCH₂CH₂), 31.2 (SCH₂CH₂CH₂), 31.7 (SCH₂), 45.8 (NCH₂), 47.7 (NCH₂), 123.7 (Ar-CH), 126.4 (Ar-CH), 128.8 (C=CH₂), 130.3 (Ar-qC), 130.7 (Ar-qC), 136.6 (Ar-qC), 141.0 (Ar-qC), 150.1 (qC, C=CH₂), 171.0 (qC, CONH), 195.8 (qC, C=O).

IR (cm⁻¹) $\tilde{\nu}$ = 2958, 2929, 2871, 1635, 1572, 1427, 1362, 1292, 1259, 1217, 1149, 997, 795.

LC-MS m/z: 458.5 (100) [M+H]⁺, 460.2 (67), 462.2 (12)

R_t (min): 29.5

Reinheit: 92 %

4-[2,3-Dichlor-4-(2-methylen-butyryl)-phenylsulfanyl]-*N*-hexyl-butanamid (MS55)

Methode E1; Ansatz: 120 mg (0.346 mmol) 4-[2,3-Dichlor-4-(2-methylen-butyryl)-phenylsulfanyl]-buttersäure (**MS41**), 41 mg (0.346 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid, 74 mg (0.346 mmol) DCC, 35 mg (0.346 mmol) *n*-Hexylamin, 15 mL Dichlormethan, Reaktionszeit: 14 d.

Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Cy/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 92 mg (0.214 mmol, 62 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 70 °C

Molare Masse: 430.44 g/mol

Summenformel: C₂₁H₂₉Cl₂NO₂S

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.87 (t, 3H, ³J = 6.7 Hz, NH(CH₂)₅CH₃), 1.14 (t, 3H, ³J = 7.5 Hz, CH₂CH₃), 1.27 (m, 6H, 3 x CH₂), 1.48 (m, 2H, CH₂), 2.07 (quintett, 2H, ³J = 7.0 Hz, CH₂CH₂CH₂), 2.35 (t, 2H, ³J = 7.0 Hz, SCH₂CH₂CH₂), 2.46 (q, 2H, ³J = 7.5 Hz, CH₂CH₃), 3.03 (t, 2H, ³J = 7.1 Hz, SCH₂CH₂CH₂), 3.24 (q, 2H, ³J = 7.0 Hz, NHCH₂), 5.44 (br s, 1H, NH), 5.60 (s, 1H, C=CH), 5.94 (s, 1H, C=CH), 7.12 (d, 1H, ³J = 8.1 Hz, Ar-H), 7.22 (d, 1H, ³J = 8.1 Hz, Ar-H).

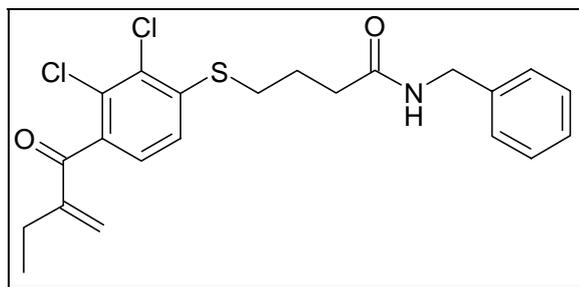
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 12.4 (CH₂CH₃), 14.0 (NH(CH₂)₅CH₃), 22.6 (CH₂), 23.4 (CH₂CH₃), 24.0 (CH₂CH₂CH₂), 26.6 (CH₂), 29.6 (CH₂), 31.5 (CH₂), 31.6 (SCH₂), 34.8 (SCH₂CH₂CH₂), 39.7 (NHCH₂), 123.8 (Ar-CH), 126.4 (Ar-CH), 128.9 (C=CH₂), 130.4 (Ar-qC), 131.0 (Ar-qC), 136.8 (Ar-qC), 140.7 (Ar-qC), 150.1 (qC, C=CH₂), 171.4 (qC, CONH), 195.8 (qC, C=O).

IR (cm⁻¹) $\tilde{\nu}$ = 3288, 3084, 2958, 2924, 2856, 1639, 1550, 1458, 1437, 1360, 1331, 1296, 1255, 1151, 1090, 995, 951, 864, 823, 783, 704.

LC-MS m/z: 861.3 (100) [2M+H]⁺, 430.3 (42) [M+H]⁺, 432.2 (28), 434.2 (4)

R_t (min): 27.0

Reinheit: 99 %

***N*-Benzyl-4-[2,3-dichlor-4-(2-methylen-butyryl)-phenylsulfanyl]-butanamid (MS56)**

Methode E1; Ansatz: 120 mg (0.346 mmol) 4-[2,3-Dichlor-4-(2-methylen-butyryl)-phenylsulfanyl]-buttersäure (**MS41**), 41 mg (0.346 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid, 74 mg (0.346 mmol) DCC, 37 mg (0.346 mmol) Benzylamin, 15 mL Dichlormethan, Reaktionszeit: 14 d.

Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Cy/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 72 mg (0.165 mmol, 48 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 106 °C

Molare Masse: 436.40 g/mol

Summenformel: C₂₂H₂₃Cl₂NO₂S

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.14 (t, 3H, ³J = 7.5 Hz, CH₂CH₃), 2.10 (quint, 2H, ³J = 7.0 Hz, CH₂CH₂CH₂), 2.41 (t, 2H, ³J = 7.0 Hz, SCH₂CH₂CH₂), 2.46 (q, 2H, ³J = 7.6 Hz, CH₂CH₃), 3.04 (t, 2H, ³J = 7.1 Hz, SCH₂CH₂CH₂), 4.44 (q, 2H, ³J = 5.6 Hz, NHCH₂), 5.61 (s, 1H, C=CH), 5.75 (br s, 1H, NH), 5.95 (s, 1H, C=CH), 7.11 (d, 1H, ³J = 8.2 Hz, Ar-H), 7.20 (d, 1H, ³J = 8.2 Hz, Ar-H), 7.27 (m, 5H, C₆H₅).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 12.4 (CH₂CH₃), 23.3 (CH₂CH₃), 24.0 (CH₂CH₂CH₂), 31.6 (SCH₂), 34.7 (SCH₂CH₂CH₂), 43.8 (NHCH₂), 123.8 (Ar-CH), 126.4 (Ar-CH), 127.6 (Ar-CH), 127.8 (2 x CH₂), 128.8 (2 x CH₂), 128.9 (C=CH₂), 130.4 (Ar-qC), 131.0 (Ar-qC), 136.8 (Ar-qC), 138.1 (Ar-qC), 140.6 (Ar-qC), 150.0 (qC, C=CH₂), 171.4 (qC, CONH), 195.8 (qC, C=O).

IR (cm⁻¹) $\tilde{\nu}$ = 3307, 3030, 2922, 1655, 1633, 1570, 1529, 1462, 1431, 1362, 1294, 1263, 1234, 1182, 1151, 1092, 995, 947, 864, 827, 789, 748, 696.

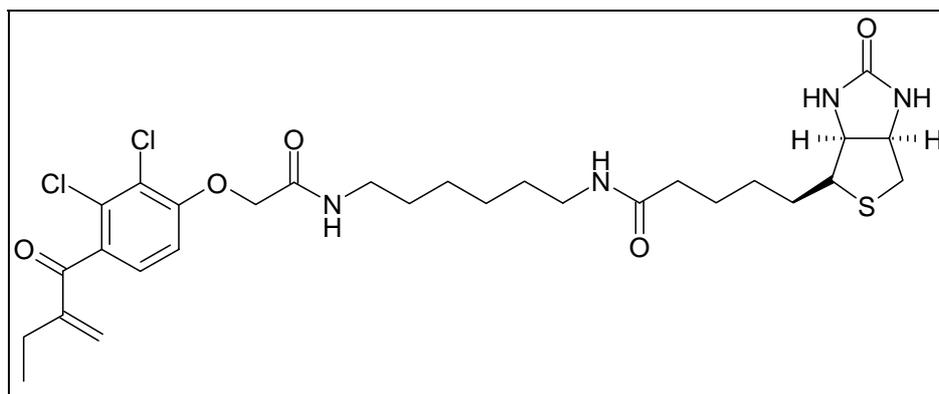
LC-MS m/z: 436.2 (100) [M+H]⁺, 438.1 (68), 440.1 (12)

R_t (min): 24.7

Reinheit: 97 %

8.5.8 Synthese markierter Etacrynsäurederivate

5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-Oxo-hexahydro-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)-pentansäure-(6-{2-[2,3-dichlor-4-(2-methylen-butyryl)-phenoxy]-acetyl-amino}-hexyl)-amid (MS57)



(A) Kupplung von Boc-Diaminohexan an D-Biotin

Methode E2; Ansatz: 443 mg (2.05 mmol) Boc-Diaminohexan, 500 mg (2.05 mmol) D-Biotin, 620 mg (2.25 mmol) DPPA, 229 mg (2.25 mmol) Triethylamin, 45 mL absolutes DMF; Reaktionsdauer: 8 Tage Rühren bei 4 °C. Zur Aufarbeitung werden 25 mL Dichlormethan zugegeben und die organische Phase zweimal mit Zironensäure (10%) gewaschen. Bei Zugabe von Wasser fällt aus der organischen Phase das Amid als weißer FS aus, der abgesaugt wird.

(B) Boc-Entschützung

Der aus (A) erhaltene Feststoff wird in 9 mL Dichlormethan suspendiert und bei 0 °C mit 3 mL TFA versetzt und gerührt. Zur Entfernung überschüssiger TFA wird wiederholt im Vakuum eingengt und erneut mit Dichlormethan versetzt. Die vollständige Entfernung der Boc-Schutzgruppe wird NMR-spektroskopisch kontrolliert.

(C) Amid-Kupplung an Etacrynsäure

Methode E3; Ansatz: 175 mg (0.383 mmol) Biotin-(6-Amino)-hexylamid (TFA-Salz), 232 mg (0.767 mmol) Etacrynsäure (MS37), 190 mg (0.767 mmol) EEDQ, 39 mg (0.383 mmol) Triethylamin, 2 mL DMF. Reaktionsdauer: 14 d Rühren bei RT. Bei der Aufarbeitung scheidet sich das Produkt beim Ausschütteln mit Natriumcarbonat-Lösung (2%) als weißer Feststoff ab, der abfiltriert wird.

Ausbeute: 62 mg (0.0988 mmol) 5 % weißer Feststoff (über 3 Stufen)

Schmelzpunkt: 167 °C (Zers.)

Molare Masse: 627.64 g/mol

Summenformel: C₂₉H₄₀Cl₂N₄O₅S

¹H-NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO): δ = 1.07 (t, 3H, ³J = 7.4 Hz, CH₂CH₃), 1.23 – 1.57 (m, 14H, CH₂), 2.03 (t, 2H, ³J = 7.2 Hz, CH₂), 2.36 (q, 2H, ³J = 7.4 Hz, CH₂CH₃), 2.56 (d, 1H, ³J = 12.3 Hz, SCH), 2.80 (dd, 1H, ³J = 12.4 Hz, ²J = 4.8 Hz, SCH), 2.97 – 3.12 (m, 5H, 2 NHCH₂, SCH), 4.11 (m, 1H, NHCH), 4.29 (m, 1H, NHCH), 4.70 (s, 2H, OCH₂CO), 5.55 (s, 1H, C=CH), 6.06 (s, 1H, C=CH), 6.33 (s, 1H, Biotin-NH), 6.39 (s, 1H, Biotin-NH), 7.07 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, Ar-H), 7.32 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, Ar-H), 7.70 (br s, 1H, CONH), 8.01 (br s, 1H, CONH).

¹³C-NMR (100 MHz, *d*₆-DMSO): δ = 12.3 (CH₃), 22.9 (CH₂CH₃), 25.3 (CH₂), 26.0 (CH₂), 26.0 (CH₂), 28.0 (CH₂), 28.2 (CH₂), 28.9 (CH₂), 29.1 (CH₂), 35.2 (CH₂), 38.2 (CH₂), 38.3 (CH₂), 39.8 (SCH₂), 55.4 (SCH), 59.2 (NHCH), 61.0 (NHCH), 67.9 (OCH₂CO), 111.9 (Ar-CH), 121.2 (Ar-qC), 127.4 (Ar-CH), 129.3 (C=CH₂), 129.9 (Ar-qC), 132.4 (Ar-qC), 149.3 (qC, C=CH₂), 155.5 (Ar-qC), 162.6 (qC, NHCONH), 166.3 (qC, CONH), 171.7 (qC, CONH), 195.1 (qC, C=O).

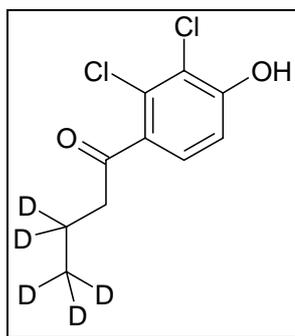
IR (cm⁻¹) $\tilde{\nu}$ = 3286, 2937, 2860, 1701, 1657, 1633, 1585, 1543, 1464, 1381, 1308, 1263, 1242, 1165, 1095, 933.

LC-MS m/z : 628 (100) [M+H]⁺

R_t (min): 17.6

Reinheit: 99 %

*d*₅-1-(2,3-Dichlor-4-hydroxyphenyl)-butan-1-on (MS58)



Methode B3; Ansatz: 2.00 g (21.0 mmol) *d*₇-Buttersäure, 5.00 g (42.0 mmol) Thionylchlorid, 2.46 g (13.9 mmol) 2,3-Dichloranisol, 2 x 2.81 g (2 x 21.0 mmol) Aluminiumchlorid, 2 x 5.94 g (21.0 mmol) Rochelle-Salz, 10 mL wasserfreies Dichlormethan.

Ausbeute: 2.08 g (8.71 mmol, 63 %) hell brauner Feststoff

Schmelzpunkt: 109 – 111 °C

Molare Masse: 238.13 g/mol

Summenformel: C₁₀H₅D₅Cl₂O₂

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.87 (s, 2H, CH₂CO), 5.92 (br s, 1H, OH), 6.99 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, Ar-H), 7.38 (d, 1H, ³J = 8.5 Hz, Ar-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 44.4 (CH₂CD₂CD₃), 114.2 (Ar-CH), 120.5 (Ar-qC, CCl), 128.3 (Ar-CH), 130.4 (Ar-qC, CCl), 133.4 (Ar-qC), 154.2 (Ar-qC), 201.7 (qC, C=O).
(Signale bei 13.7 (CD₃), 17.9 (CD₂CH₂CO) nur im HMBC als Fernkopplung sichtbar)

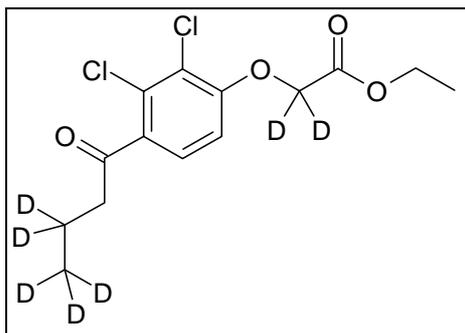
IR (cm⁻¹) $\tilde{\nu}$ = 3278, 2222, 2069, 1666, 1587, 1552, 1396, 1311, 1259, 1211, 1113, 1045, 972, 922, 822, 741, 694.

LC-MS m/z: 238.2 (100) [M+H]⁺, 240.0 (81), 242.0 (13)

R_t (min): 18.6

Reinheit: 99 %

*d*₇-Ethyl-2-(4-Butyryl-2,3-dichlorphenoxy)-acetat (MS59)



Methode C; Ansatz 1.35 g (5.66 mmol) *d*₅-1-(2,3-Dichlor-4-hydroxyphenyl)-butan-1-on (MS58), 1.17 g (8.49 mmol) Kaliumcarbonat, 94 mg (0.566 mmol) Kaliumiodid, 1.15 mg (6.79 mmol) *d*₂-Bromessigsäureethylester, 30 mL Aceton, Reaktionszeit: 7 h Erhitzen unter Rückfluss.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt. (SiO₂, Cy/EtOAc 3:1).

Ausbeute: 1.70 g (5.20 mmol, 92 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 55 – 56 °C

Molare Masse: 326.23 g/mol

Summenformel: C₁₄H₉D₇Cl₂O₄

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.29 (t, 3H, ³J = 7.1 Hz, OCH₂CH₃), 2.86 (s, 2H, COCH₂CD₂CD₃), 4.27 (q, 2H, ³J = 7.2 Hz, OCH₂CH₃), 6.76 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, Ar-H), 7.33 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, Ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 14.1$ (CH_2CH_3), 44.5 ($\text{COCH}_2\text{CD}_2\text{CD}_3$), 61.8 (CH_2CH_3), 110.8 (Ar-CH), 123.7 (Ar-qC), 127.1 (Ar-CH), 131.4 (Ar-qC), 134.7 (Ar-qC), 156.1 (Ar-qC), 167.6 (COOEt), 202.1 ($\text{C}=\text{O}$). (Die an Deuterium gebundenen Kohlenstoff-Atome sind im ^{13}C -NMR-Spektrum nicht sichtbar, im HMBC sind aber die entsprechenden Kopplungen zu beobachten.)

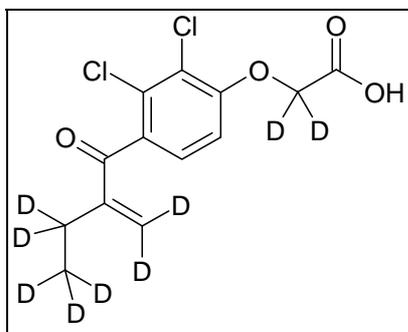
IR (cm^{-1}) $\tilde{\nu} = 2979, 2222, 1759, 1680, 1579, 1554, 1462, 1410, 1383, 1298, 1223, 1136, 1107, 1016, 818, 706$.

LC-MS **m/z:** 326.5 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ (100), 328.1 (78), 330.1 (12)

R_t (min): 23.2

Reinheit: 100 %

***d*₉-[2,3-Dichlor-4-(2-methylen-butryl)-phenoxy]-essigsäure, *d*₉-Etacrynsäure
(MS60)**



Methode D1; Ansatz 1.60 g (4.90 mmol) *d*₇-Ethyl-2-(4-Butyryl-2,3-dichlorphenoxy)-acetat (**MS59**), 678 mg (4.90 mmol) Kaliumcarbonat, 314 mg (9.80 mmol) *d*₂-Formaldehyd ($\cong 1047$ mg 30 %ige Lsg. in D_2O), 15 mL Ethanol, 6 mL D_2O ; Reaktionszeit: 8 h Erhitzen unter Rückfluss.

Das Rohprodukt wird aus Benzol umkristallisiert. Im Produkt sind noch ca. 10% Edukt-Ester enthalten. Das Rohprodukt wird daher durch präparative HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 1.012 g (3.24 mmol, 66 %) weißer kristalliner Feststoff

Schmelzpunkt: 124 °C

Molare Masse: 312.20 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{13}\text{H}_3\text{D}_9\text{Cl}_2\text{O}_4$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 6.80$ (d, 1H, $^3J = 8.6$ Hz, Ar-H), 7.15 (d, 1H, $^3J = 8.6$ Hz, Ar-H), 8.31 (br s, 1H, COOH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 110.9$ (Ar-CH), 123.5 (Ar-qC), 126.8 (Ar-CH), 131.6 (Ar-qC), 134.2 (Ar-qC), 149.9 ($\text{C}=\text{CD}_2$), 155.0 (Ar-qC), 172.2 (COOH), 195.9 ($\text{C}=\text{O}$).

(Die an Deuterium gebundenen Kohlenstoff-Atome sind im ^{13}C -NMR-Spektrum nicht sichtbar, im HMBC sind aber die entsprechenden Kopplungen zu beobachten.)

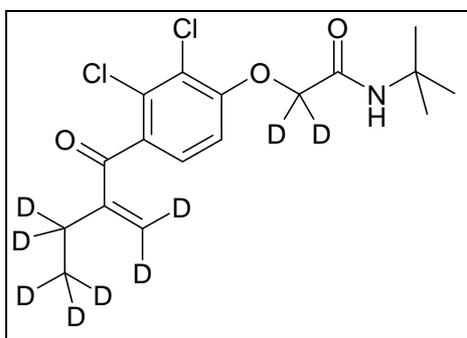
IR (cm^{-1}) $\tilde{\nu} = 2995, 2879, 2694, 2551, 2224, 2160, 2112, 1722, 1668, 1655, 1583, 1468, 1385, 1281, 1228, 1155, 1134, 1111, 1078, 1059, 1014, 951, 926, 843, 810, 779, 746, 696, 661.$

LC-MS **m/z:** 312.3 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 314.1 (59), 316.1 (8)

R_t (min): 18.7

Reinheit: 100 %

***d*₉-*N*-*tert*-Butyl-[2,3-dichlor-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-acetamid (MS61)**



Methode E1; Ansatz: 110 mg (0.352 mmol) *d*₉-Etacrynsäure (**MS60**), 41 mg (0.352 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid, 73 mg (0.352 mmol) DCC, 26 mg (0.352 mmol) *tert*-Butylamin, 15 mL Dichlormethan, Reaktionszeit: 28 d. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO_2 , Cy/EtOAc 3:1).

Ausbeute: 99 mg (0.270 mmol, 77 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 88 – 90 °C

Molare Masse: 367.32 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{D}_9\text{Cl}_2\text{NO}_3$

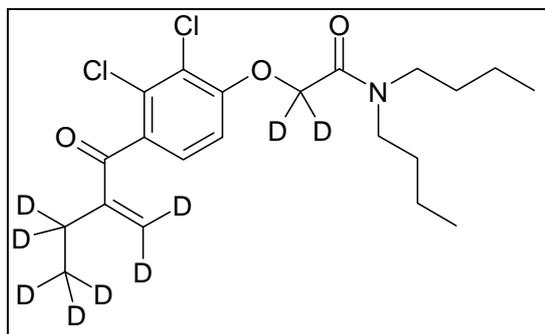
^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.42$ (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 6.64 (br s, 1H, NH), 6.84 (d, 1H, $^3J = 8.5$ Hz, Ar-H), 7.18 (d, 1H, $^3J = 8.5$ Hz, Ar-H).

IR (cm^{-1}) $\tilde{\nu} = 3267, 3086, 2968, 2929, 2224, 1655, 1585, 1566, 1466, 1383, 1362, 1313, 1292, 1271, 1225, 1147, 1132, 1109, 1059, 1014, 943, 903, 806, 781, 766, 750, 712.$

LC-MS **m/z:** 367.3 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 369.1 (57), 371.1 (8)

R_t (min): 24

Reinheit: 96 %

***d*₉-*N,N*-Dibutyl-[2,3-dichlor-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-acetamid (MS62)**

Methode E1; Ansatz: 110 mg (0.352 mmol) *d*₉-Etacrynsäure (**MS60**), 41 mg (0.352 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid, 73 mg (0.352 mmol) DCC, 26 mg (0.201 mmol) Dibutylamin*, 15 mL Dichlormethan, Reaktionszeit: 30 d. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Cy/EtOAc 3:1).

* Das Dibutylamin war von Herstellerseite fälschlicherweise als *n*-Butylamin deklariert. Die Masse der Einwaage an Dibutylamin entspricht einem Äquivalent *n*-Butylamin.

Ausbeute: 71 mg (0.168 mmol, 83 %) farbloser viskoser Feststoff

Molare Masse: 423.43 g/mol

Summenformel: C₂₁H₂₀D₉Cl₂NO₃

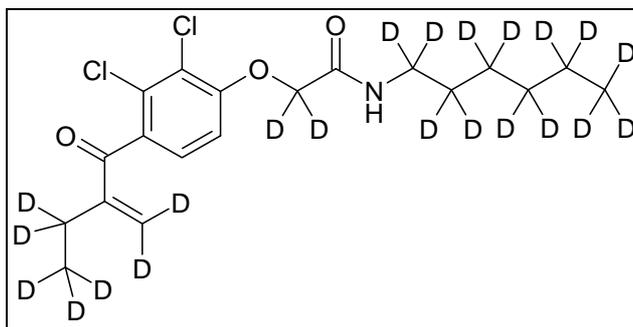
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.93 (m, 6H, 2 x N(CH₂)₃CH₃), 1.34 (m, 4H, 2 x N(CH₂)₂CH₂), 1.50 (m, 4H, 2 x NCH₂CH₂), 3.32 (m, 4H, 2 x NCH₂), 6.95 (d, 1H, ³J = 8.5 Hz, Ar-H), 7.12 (d, 1H, ³J = 8.5 Hz, Ar-H).

IR (cm⁻¹) $\tilde{\nu}$ = 2958, 2929, 2871, 2225, 1657, 1583, 1466, 1381, 1290, 1097, 1024, 802.

LC-MS m/z: 423.5 (5) [M+H]⁺, 470.4 (100)

R_t (min): 27.4

Reinheit: 100 %

***d*₂₂-[2,3-Dichlor-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-*N*-hexyl-acetamid (MS63)**

Methode E1; Ansatz: 284 mg (0.910 mmol) *d*₉-Etacrynsäure (**MS60**), 105 mg (0.910 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid, 188 mg (0.910 mmol) DCC, 104 mg (0.910 mmol) *d*₁₃-*n*-Hexylamin, 15 mL Dichlormethan, Reaktionszeit: 28 d. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Cy/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 221 mg (0.541 mmol, 60 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 63 – 64 °C

Molare Masse: 408.45 g/mol

Summenformel: C₁₉H₃D₂₂Cl₂NO₃

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 6.72 (br s, 1H, NH), 6.85 (d, 1H, ³*J* = 8.5 Hz, Ar-H), 7.18 (d, 1H, ³*J* = 8.5 Hz, Ar-H).

IR (cm⁻¹) $\tilde{\nu}$ = 3253, 3074, 2925, 2210, 2094, 1651, 1585, 1562, 1466, 1383, 1315, 1290, 1217, 1169, 1140, 1113, 1095, 1012, 958, 796, 750.

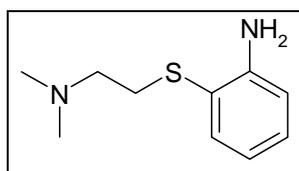
LC-MS m/z: 408.4 (100) [M+H]⁺, 410.3 (48), 412.3 (5)

R_t (min): 25.9

Reinheit: 98 %

8.5.9 Synthese der Cinaserin-Derivate

2-(2-Dimethylaminoethylsulfanyl)-phenylamin (MS64)



Methode F (anstelle von Triethylamin wird ein weiteres Äquivalent NaOMe zur Freisetzung der Base aus dem Hydrochlorid verwendet); Ansatz: 5.00 g (39.9 mmol) 2-Aminothiophenol, 4.32 g (79.8 mmol) Natriummethanolat, 5.75 g (39.9 mmol) *N*-(2-Chlorethyl)-dimethylammoniumchlorid, 30 mL Isopropanol, 100 mL Toluol; Reaktionszeit: 6 h Erhitzen unter Rückfluss. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt (Eluent: Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 → Dichlormethan/Methanol 9:1).

Ausbeute: 4.79 g (24.4 mmol, 63 %) braunes Öl

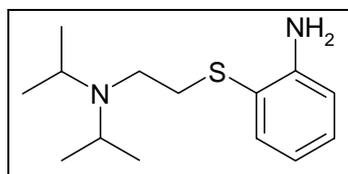
Molare Masse: 196.32 g/mol

Summenformel: C₁₀H₁₆N₂S

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 2.23 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2.46 (t, 2H, ³J = 7.1 Hz, NCH₂), 2.84 (t, 2H, ³J = 7.2 Hz, SCH₂), 4.29 (br s, 2H, NH₂), 6.66 (td, 1H, ³J = 7.4 Hz, ⁴J = 1.2 Hz, Ar-H), 6.69 (d, 1H, ³J = 8.0 Hz, Ar-H), 7.09 (td, 1H, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, Ar-H), 7.37 (dd, 1H, ³J = 7.7 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, Ar-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 32.9 (SCH₂), 45.2 (N(CH₃)₂), 58.6 (NCH₂), 114.8 (Ar-CH), 117.6 (Ar-qC), 118.4 (Ar-CH), 129.7 (Ar-CH), 136.0 (Ar-CH), 148.6 (Ar-qC).

2-(2-Diisopropylaminoethylsulfanyl)-phenylamin (MS65)



Methode F (anstelle von Triethylamin wird ein weiteres Äquivalent NaOMe zur Freisetzung der Base aus dem Hydrochlorid verwendet); Ansatz: 5.00 g (39.9 mmol) 2-Aminothiophenol, 4.32 g (79.8 mmol) Natriummethanolat, 7.99 g (39.9 mmol) 2-Diisopropylamino-1-chlorethan*HCl, 30 mL Isopropanol, 100 mL Toluol; Reaktionszeit: 6 h Erhitzen unter Rückfluss. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt (Eluent: Cyclohexan/Ethylacetat 4:1).

Ausbeute: 439 mg (1.74 mmol, 4 %) braunes Öl

Molare Masse: 252.42 g/mol

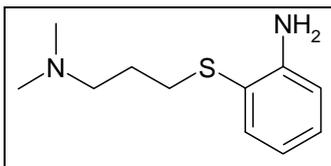
Summenformel: C₁₄H₂₄N₂S

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 0.94 (d, 12H, ³J = 6.6 Hz, N(CH(CH₃)₂)₂), 2.58 – 2.62 (m, 2H, NCH₂), 2.74 – 2.78 (m, 2H, SCH₂), 2.96 (septett, 2H, ³J = 6.6 Hz, N(CH(CH₃)₂)₂), 4.34 (br s, 2H, NH₂), 6.64 – 6.70 (m, 2H, Ar-H), 7.08 (td, 1H, ³J = 7.7 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, Ar-H), 7.37 (dd, 1H, ³J = 7.7 Hz, ⁴J = 1.4 Hz, Ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 20.6$ ($\text{N}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)_2$), 36.0 (SCH_2), 45.7 (NCH_2), 49.3 ($\text{N}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)_2$), 114.8 (Ar-CH), 117.9 (Ar-qC), 118.3 (Ar-CH), 129.3 (Ar-CH), 135.5 (Ar-CH), 148.0 (Ar-qC).

IR (cm^{-1}) $\tilde{\nu} = 3456, 3352, 2962, 1604, 1477, 1446, 1381, 1362, 1304, 1203, 1157, 1026, 744.$

2-(3-Dimethylamino-propylsulfanyl)-phenylamin (MS66)



Methode F; Ansatz: 5.00 g (39.9 mmol) 2-Aminothiophenol, 2.16 g (39.9 mmol) Natrium-methanolat, 6.94 g (43.9 mmol) *N*-(3-Chlorpropyl)dimethylammoniumchlorid, 4.45 g (43.9 mmol) Triethylamin, 30 mL Isopropanol, 100 mL Toluol; Reaktionszeit: 7 h Erhitzen unter Rückfluss, 3 d Rühren bei RT. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt (Eluent: Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 → Dichlormethan/Methanol 9:1).

Ausbeute: 1.27 g (6.04 mmol, 15 %) bernsteinfarbenes Öl

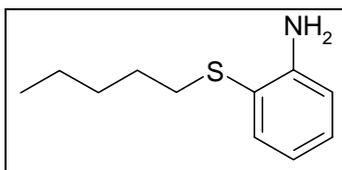
Molare Masse: 210.34 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{S}$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.69$ (quint, 2H, $^3J = 7.3$ Hz, NCH_2CH_2), 2.17 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.33 (t, 2H, $^3J = 7.2$ Hz, SCH_2), 2.74 (t, 2H, $^3J = 7.2$ Hz, NCH_2), 4.46 (br s, 2H, NH_2), 6.64 (td, 1H, $^3J = 7.6$ Hz, $^4J = 1.2$ Hz, Ar-H), 6.68 (d, 1H, $^3J = 8.1$ Hz), 7.06 (td, 1H, $^3J = 8.5$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz Ar-H), 7.33 (dd, 1H, $^3J = 7.7$ Hz, $^4J = 1.4$ Hz, Ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 27.4$ (NCH_2CH_2), 32.4 (NCH_2), 45.3 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 58.2 (SCH_2), 114.7 (Ar-CH), 117.7 (Ar-qC), 118.3 (Ar-CH), 129.4 (Ar-CH) 135.6 (Ar-CH), 148.1 (Ar-qC).

2-Pentylsulfanylphenylamin (MS67)



Methode F; Ansatz: 5.00 g (39.9 mmol) 2-Aminothiophenol, 2.16 g (39.9 mmol) Natrium-methanolat, 6.03 g (39.9 mmol) 1-Brompentan, 30 mL Isopropanol, 100 mL Toluol; Reak-

tionszeit: 6 h Erhitzen unter Rückfluss. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt (Eluent: Cyclohexan/Ethylacetat 9:1).

Ausbeute: 1.69 g (8.66 mmol, 22 %) bernsteinfarbenes Öl

Molare Masse: 195.33 g/mol

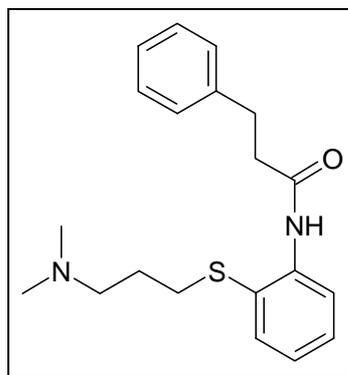
Summenformel: C₁₁H₁₇NS

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.87 (t, 3H, ³J = 7.0 Hz, CH₃), 1.25 – 1.40 (m, 4H, 2 CH₂) 1.57 (quint, 2H, ³J = 7.3 Hz, CH₂), 2.73 (t, 2H, ³J = 7.4 Hz, SCH₂), 4.13 (br s, 2H, NH₂), 6.66 – 6.72 (m, 2H, Ar-H), 7.10 (td, 1H, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, Ar-H), 7.36 (dd, 1H, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.2 Hz, Ar-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 13.9 (CH₃), 22.2 (CH₂), 29.3 (CH₂), 30.9 (CH₂), 34.8 (CH₂), 114.8 (Ar-CH), 118.40 (Ar-qC), 118.43 (Ar-CH), 129.3 (Ar-CH) 135.5 (Ar-CH), 148.0 (Ar-qC).

IR (cm⁻¹) $\tilde{\nu}$ = 3456, 3354, 3064, 2954, 2925, 2856, 1604, 1477, 1446, 1301, 1157, 1024, 744.

N-[2-(3-Dimethylamino-propylsulfanyl)-phenyl]-3-phenyl-propionamid (MS68)



Ansatz: 401 mg (2.38 mmol) Phenylpropionsäurechlorid wird in wasserfreiem Dichlormethan (ca. 30 mL) vorgelegt und unter Rühren eine Lösung von 500 mg (2.38 mmol) 2-(3-Dimethylaminopropylsulfanyl)-phenylamin (**MS66**) in 10 mL wasserfreiem Dichlormethan zugegeben. Es wird eine Stunde unter Rückfluss erhitzt und nach Abkühlen das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wird in Dichlormethan aufgenommen, mit 481 mg (4.76 mmol) Triethylamin versetzt und bei RT gerührt. Anschließend wird das LM im Vakuum entfernt und der braune viskose Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (DCM / MeOH / NH₃ (25%) 19:1:0.2).

Ausbeute: 570 mg (1.66 mmol, 70 %) farbloses Öl

Molare Masse: 342.51 g/mol

Summenformel: C₂₀H₂₆N₂OS

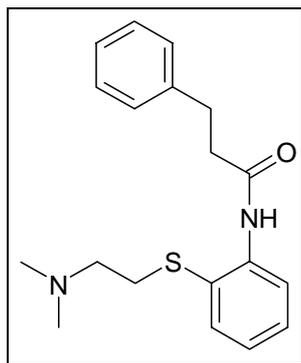
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.64$ (quint, 2H, $^3J = 7.1$ Hz, NCH_2CH_2), 2.15 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.29 (t, 2H, $^3J = 7.1$ Hz, NCH_2), 2.66 (t, 2H, $^3J = 7.1$ Hz, SCH_2), 2.73 (t, 2H, $^3J = 7.7$ Hz, CH_2CO), 3.07 (t, 2H, $^3J = 7.7$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 7.01 (t, 1H, $^3J = 7.1$ Hz, Ar-H), 7.17 – 7.32 (m, 6H, Ar-H), 7.47 (dd, 1H, $^3J = 7.9$ Hz, $^4J = 1.3$ Hz, Ar-H), 8.38 (br d, 1H, $^3J = 8.0$ Hz, Ar-H), 8.45 (br s, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 27.3$ (NCH_2CH_2), 31.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 33.9 (SCH_2), 39.6 (CH_2CO), 45.3 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 58.1 (NCH_2), 120.2 (Ar-CH), 122.6 (Ar-qC, S-C), 123.9 (Ar-CH), 126.3 (Ar-CH), 128.3 (2 Ar-CH), 128.6 (2 Ar-CH), 129.6 (Ar-CH), 135.0 (Ar-CH), 139.4 (Ar-qC, NH-C), 140.5 (Ar-qC, C- CH_2), 170.2 (qC, C=O).

IR (cm^{-1}) $\tilde{\nu} = 3336, 3026, 2939, 2858, 2816, 2765, 1687, 1577, 1508, 1454, 1431, 1294, 1159, 1074, 1038, 752, 698$.

ESI-MS (Loop) m/z : 343.3 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$

***N*-[2-(2-Dimethylaminoethylsulfanyl)phenyl]-3-phenylpropionamid (MS69)**



Ansatz: 429 mg (2.55 mmol) Phenylpropionsäurechlorid wird in wasserfreiem Dichlormethan (ca. 30 mL) vorgelegt und unter Rühren eine Lösung von 500 mg (2.55 mmol) 2-(2-Dimethylaminoethylsulfanyl)-phenylamin (**MS64**) in 10 mL wasserfreiem Dichlormethan zugetropft. Es wird eine Stunde unter Rückfluss erhitzt, nach Abkühlen mit 515 mg (5.09 mmol) Triethylamin versetzt und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wird das LM im Vakuum entfernt und der braune viskose Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (DCM / MeOH / NH_3 (25%) 19:1:0.2).

Ausbeute: 737 mg (2.24 mmol, 88 %) braunes Öl

Molare Masse: 328.48 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{OS}$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.18$ (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.27 (t, 2H, $^3J = 6.3$ Hz, NCH_2), 2.69 (t, 2H, $^3J = 7.8$ Hz, CH_2CO), 2.79 (t, 2H, $^3J = 6.3$ Hz, SCH_2), 3.09 (t, 2H, $^3J = 8.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 7.04 (td, 1H, $^3J = 7.6$ Hz, $^4J = 1.3$ Hz, Ar-H), 7.18 – 7.36 (m, 6H, Ar-H),

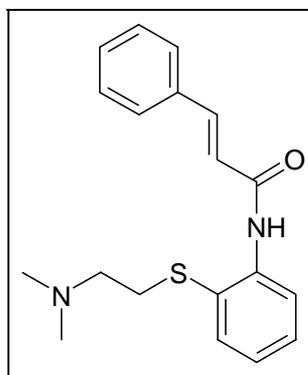
7.54 (dd, 1H, $^3J = 7.7$ Hz, $^4J = 1.4$ Hz, Ar-H), 8.24 (d, 1H, $^3J = 8.1$ Hz, Ar-H), 9.80 (br s, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 31.6$ ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 35.0 (SCH_2), 39.3 (CH_2CO), 44.8 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 56.7 (NCH_2), 121.6 (Ar-CH), 122.5 (Ar-qC, S-C), 124.1 (Ar-CH), 126.2 (Ar-CH), 128.3 (2 Ar-CH), 128.5 (2 Ar-CH), 129.9 (Ar-CH), 136.6 (Ar-CH), 141.0 (Ar-qC, C- CH_2), 141.4 (Ar-qC, NH-C), 170.5 (qC, C=O).

IR (cm^{-1}) $\tilde{\nu} = 3026, 2941, 2860, 2819, 2777, 1687, 1579, 1514, 1456, 1433, 1369, 1292, 1153, 1038, 1011, 889, 754, 698$.

ESI-MS (Loop) m/z : 329.4 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$

(E)-N-[2-(2-Dimethylaminoethylsulfanyl)-phenyl]-3-phenylacrylamid (MS70)



Ansatz: 426 mg (2.55 mmol) Zimtsäurechlorid (hergestellt nach Methode E4 aus 5.00 g (33.7 mmol) Zimtsäure, 6.02 g (50.6 mmol) Thionylchlorid) werden in wasserfreiem Dichlormethan (ca. 30 mL) vorgelegt und unter Rühren eine Lösung von 500 mg (2.55 mmol) 2-(2-Dimethylaminoethylsulfanyl)-phenylamin (**MS64**) in 10 mL wasserfreiem Dichlormethan zugetropft. Es wird eine Stunde unter Rückfluss erhitzt, nach Abkühlen mit 515 mg (5.09 mmol) Triethylamin versetzt und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wird das LM im Vakuum entfernt und der schwach bräunliche viskose Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (DCM / MeOH / NH_3 (25%) 19:1:0.2).

Ausbeute: 722 mg (2.21 mmol, 87 %) farbloses viskoses Öl

Molare Masse: 326.46 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{OS}$

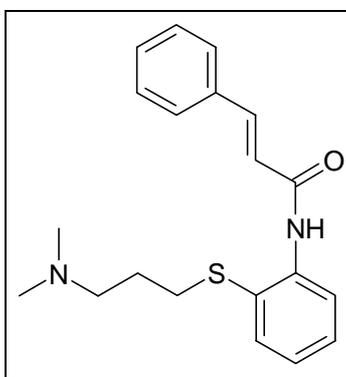
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.26$ (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.33 (t, 2H, $^3J = 6.2$ Hz, NCH_2), 2.88 (t, 2H, $^3J = 6.2$ Hz, SCH_2), 6.62 (d, 1H, $^3J = 15.7$ Hz, CHCHCO), 7.06 (td, 1H, $^3J = 7.5$ Hz, $^4J = 1.3$ Hz, Ar-H), 7.35 – 7.42 (m, 4H, Ar-H), 7.55 – 7.61 (m, 3H, Ar-H), 7.75 (d, 1H, $^3J = 15.7$ Hz, CHCHCO), 8.46 (d, 1H, $^3J = 8.1$ Hz, Ar-H), 10.19 (br s, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 35.3$ (SCH_2), 44.9 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 56.6 (NCH_2), 121.2 (Ar-CH), 121.7 (CHCO), 122.3 (Ar-qC, S-C), 124.3 (Ar-CH), 127.8 (2 Ar-CH), 128.9 (2 Ar-CH), 129.8 (Ar-CH), 130.2 (Ar-CH), 135.0 (Ar-qC, C-CHCHCO), 136.9 (Ar-CH), 141.5 (CHCHCO), 141.9 (Ar-qC, NH-C), 164.1 (qC, C=O).

IR (cm^{-1}) $\tilde{\nu} = 3236, 2943, 2860, 2819, 2777, 1680, 1630, 1577, 1510, 1458, 1433, 1335, 1286, 1238, 1171, 1061, 1038, 976, 858, 762, 708.$

ESI-MS (Loop) $m/z: 327.5$ (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$

(*E*)-*N*-[2-(3-Dimethylamino-propylsulfanyl)-phenyl]-3-phenyl-acrylamid, Cinanserin (MS71)



Ansatz: 396 mg (2.38 mmol) Zimtsäurechlorid (hergestellt nach Methode E4 aus 5.00 g (33.7 mmol) Zimtsäure, 6.02 g (50.6 mmol) Thionylchlorid) werden in wasserfreiem Dichlormethan (ca. 30 mL) vorgelegt und unter Rühren eine Lösung von 500 mg (2.38 mmol) 2-(3-Dimethylaminopropylsulfanyl)-phenylamin (**MS66**) in 10 mL wasserfreiem Dichlormethan zugetropft. Es wird eine Stunde unter Rückfluss erhitzt, nach Abkühlen mit 481 mg (4.76 mmol) Triethylamin versetzt und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wird das LM im Vakuum entfernt und der schwach bräunliche viskose Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (DCM / MeOH / NH_3 (25%) 19:1:0.2).

Ausbeute: 123 mg (0.361 mmol, 15 %) bernsteinfarbenes Öl

Molare Masse: 340.49 g/mol

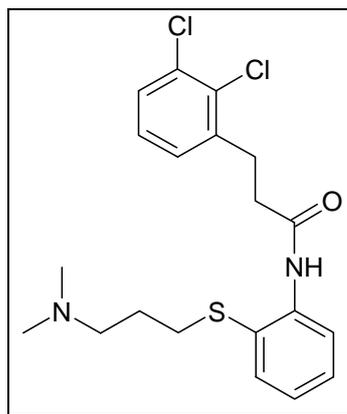
Summenformel: $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{OS}$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.72$ (quint, 2H, $^3J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_2), 2.16 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.34 (t, 2H, $^3J = 7.1$ Hz, NCH_2), 2.80 (t, 2H, $^3J = 7.1$ Hz, SCH_2), 6.60 (d, 1H, $^3J = 15.4$ Hz, CHCHCO), 7.05 (td, 1H, $^3J = 7.6$ Hz, $^4J = 1.3$ Hz, Ar-H), $7.32 - 7.41$ (m, 4H, Ar-H), $7.51 - 7.57$ (m, 3H, Ar-H), 7.75 (d, 1H, $^3J = 15.4$ Hz, CHCHCO), 8.51 (d, 1H, $^3J = 7.8$ Hz, Ar-H), 8.73 (br s, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 27.4 (NCH_2CH_2), 34.2 (SCH_2), 45.3 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 58.1 (NCH_2), 120.5 (Ar-CH), 121.0 (CHCO), 122.9 (Ar-qC , S-C), 124.1 (Ar-CH), 128.0 (2 Ar-CH), 128.8 (2 Ar-CH), 129.7 (Ar-CH), 130.0 (Ar-CH), 134.6 (Ar-qC , C-CHCHCO), 135.1 (Ar-CH), 139.6 (Ar-qC , NH-C), 142.4 (CHCHCO), 163.8 (qC , C=O).

ESI-MS (Loop) m/z : 341.4 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$

3-(2,3-Dichlor-phenyl)-N-[2-(3-dimethylaminopropylsulfanyl)-phenyl]-propionamid (MS72)



Ansatz: 564 mg (2.38 mmol) 3-(2,3-Dichlorphenyl)propionsäurechlorid (hergestellt nach Methode E4 aus 1.50 g (6.85 mmol) 3-(2,3-Dichlorphenyl)propionsäure, 1.22 g (10.3 mmol) Thionylchlorid) werden in wasserfreiem Dichlormethan (ca. 30 mL) vorgelegt und unter Rühren eine Lösung von 500 mg (2.38 mmol) 2-(3-Dimethylaminopropylsulfanyl)-phenylamin (**MS66**) in 10 mL wasserfreiem Dichlormethan zugetropft. Es wird eine Stunde unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen wird die Lösung mit 481 mg (4.76 mmol) Triethylamin versetzt und bei RT über Nacht gerührt. Anschließend wird das LM im Vakuum entfernt und der braune viskose Rückstand säulenchromatographisch gereinigt ($\text{DCM} / \text{MeOH} / \text{NH}_3$ (25%) 19:1:0.2).

Ausbeute: 289 mg (0.702 mmol, 30 %) hellbrauner Feststoff

Schmelzpunkt: 59 °C

Molare Masse: 411.40 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{OS}$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.66 (quint, 2H, $^3J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_2), 2.16 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.31 (t, 2H, $^3J = 7.1$ Hz, NCH_2), 2.70 (t, 2H, $^3J = 7.3$ Hz, SCH_2), 2.74 (t, 2H, $^3J = 7.7$ Hz, CH_2CO), 3.22 (t, 2H, $^3J = 7.7$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 7.02 (t, 1H, $^3J = 7.1$ Hz, Ar-H), 7.11 (t, 1H, $^3J = 7.7$ Hz, Ar-H), 7.21 – 7.34 (m, 3H, 3 Ar-H), 7.47 (dd, 1H, $^3J = 7.9$ Hz, $^4J = 1.3$ Hz, Ar-H), 8.35 (br d, 1H, $^3J = 8.1$ Hz, Ar-H), 8.47 (br s, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 27.4 (NCH_2CH_2), 30.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 34.0 (SCH_2), 37.2 (CH_2CO), 45.3 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 58.1 (NCH_2), 120.2 (Ar-CH), 122.7 (Ar-qC , S-C), 124.1 (Ar-CH), 127.4 (Ar-CH), 128.8 (Ar-CH), 128.9 (Ar-CH), 129.6 (Ar-CH), 132.1 (Ar-qC), 133.3 (Ar-qC), 135.0 (Ar-CH), 139.2 (Ar-qC), 140.5 (Ar-qC), 169.7 (qC , C=O).

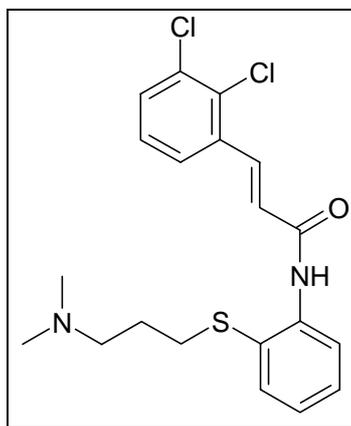
IR (cm^{-1}) $\tilde{\nu}$ = 3278, 2937, 2819, 2769, 1657, 1585, 1520, 1471, 1448, 1414, 1375, 1300, 1244, 1186, 1099, 1076, 1045, 972, 881, 779, 746.

LC-MS **m/z**: 411.6 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 413 (59), 415 (12)

R_t (min): 3.0

Reinheit: 95 %

**(E)-3-(2,3-Dichlorphenyl)-N-[2-(3-dimethylaminopropylsulfanyl)-phenyl]-acrylamid
(MS73)**



Ansatz: 560 mg (2.38 mmol) 3-(2,3-Dichlorphenyl)acryloylchlorid (hergestellt nach Methode E4 aus 1.50 g (6.91 mmol) 3-(2,3-Dichlorphenyl)acrylsäure, 1.23 g (10.4 mmol) Thionylchlorid) werden in wasserfreiem Dichlormethan (ca. 30 mL) vorgelegt und unter Rühren eine Lösung von 500 mg (2.38 mmol) 2-(3-Dimethylaminopropylsulfanyl)-phenylamin (**MS66**) in 10 mL wasserfreiem Dichlormethan zugetropft. Es wird eine Stunde unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen wird die Lösung mit 481 mg (4.76 mmol) Triethylamin versetzt und bei RT über Nacht gerührt. Anschließend wird das LM im Vakuum entfernt und der braune viskose Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (DCM / MeOH / NH_3 (25%) 19:1:0.2).

Ausbeute: 344 mg (0.840 mmol, 35 %) brauner Feststoff

Schmelzpunkt: 92 °C

Molare Masse: 409.38 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{OS}$

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.72 (quint, 2H, ³J = 7.2 Hz, NCH₂CH₂), 2.17 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2.34 (t, 2H, ³J = 7.1 Hz, NCH₂), 2.81 (t, 2H, ³J = 7.3 Hz, SCH₂), 6.58 (d, 1H, ³J = 15.6 Hz, CHCO), 7.07 (td, 1H, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.2 Hz, Ar-H), 7.23 (t, 1H, ³J = 7.8 Hz, Ar-H), 7.36 (td, 1H, ³J = 7.8 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, Ar-H), 7.47 – 7.57 (m, 3H, 3 Ar-H), 8.13 (d, 1H, ³J = 15.7 Hz, CHCHCO), 8.52 (br d, 1H, ³J = 7.3 Hz, Ar-H), 8.81 (br s, 1H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 27.5 (NCH₂CH₂), 34.3 (SCH₂), 45.4 (N(CH₃)₂), 58.1 (NCH₂), 120.2 (Ar-CH), 122.9 (Ar-qC, S-C), 124.4 (Ar-CH), 125.2 (CHCO), 125.8 (Ar-CH), 127.3 (Ar-CH), 129.8 (Ar-CH), 131.3 (Ar-CH), 133.0 (Ar-qC), 134.0 (Ar-qC), 135.3 (Ar-qC), 135.4 (Ar-CH), 138.2 (CHCHCO), 139.4 (Ar-qC), 163.1 (qC, C=O).

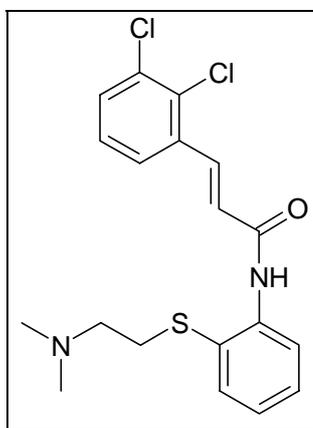
IR (cm⁻¹) $\tilde{\nu}$ = 3224, 2958, 2816, 2756, 1655, 1620, 1577, 1533, 1466, 1435, 1412, 1333, 1273, 1248, 1180, 1103, 1068, 1043, 1005, 966, 862, 773, 727, 679.

LC-MS **m/z:** 409.6 (100) [M+H]⁺, 411 (63), 413 (11)

R_t (min): 11.7

Reinheit: 100 %

**(E)-3-(2,3-Dichlorphenyl)-N-[2-(2-dimethylaminoethylsulfanyl)-phenyl]-acrylamid
(MS74)**



Ansatz: 300 mg (1.27 mmol) 3-(2,3-Dichlorphenyl)acryloylchlorid (hergestellt nach Methode E4 aus 1.50 g (6.91 mmol) 3-(2,3-Dichlorphenyl)acrylsäure, 1.23 g (10.4 mmol) Thionylchlorid) werden in wasserfreiem Dichlormethan (ca. 30 mL) vorgelegt und unter Rühren eine Lösung von 250 mg (1.27 mmol) 2-(2-Dimethylaminoethylsulfanyl)-phenylamin (**MS64**) in 10 mL wasserfreiem Dichlormethan zugetropft. Es wird eine Stunde unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen wird die Lösung mit 258 mg (2.55 mmol) Triethylamin versetzt und bei RT über Nacht gerührt. Anschließend wird das LM im Vakuum entfernt

und der braune viskose Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (DCM / MeOH / NH₃ (25%) 19:1:0.2).

Ausbeute: 195 mg (0.493 mmol, 39 %) braunes viskoses Öl

Molare Masse: 395.35 g/mol

Summenformel: C₁₉H₂₀Cl₂N₂OS

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.24 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2.33 (t, 2H, ³J = 6.1 Hz, NCH₂), 2.88 (t, 2H, ³J = 6.1 Hz, SCH₂), 6.60 (d, 1H, ³J = 15.4 Hz, CHCO), 7.08 (td, 1H, ³J = 7.4 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, Ar-H), 7.23 (t, 1H, ³J = 7.8 Hz, Ar-H), 7.39 (td, 1H, ³J = 7.8 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, Ar-H), 7.47 (dd, 1H, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.4 Hz, Ar-H), 7.53 (d, 1H, ³J = 7.8 Hz, Ar-H), 7.60 (dd, 1H, ³J = 7.7 Hz, ⁴J = 1.4 Hz, Ar-H), 8.13 (d, 1H, ³J = 15.7 Hz, CHCHCO), 8.45 (d, 1H, ³J = 7.8 Hz, Ar-H), 10.27 (br s, 1H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 35.3 (SCH₂), 44.9 (N(CH₃)₂), 56.5 (NCH₂), 121.4 (Ar-CH), 122.4 (Ar-qC, S-C), 124.6 (Ar-CH), 125.6 (Ar-CH), 125.8 (CHCO), 127.3 (Ar-CH), 130.2 (Ar-CH), 131.0 (Ar-CH), 133.0 (Ar-qC), 134.1 (Ar-qC), 135.7 (Ar-qC), 136.9 (Ar-CH), 137.6 (CHCHCO), 141.6 (Ar-qC), 163.2 (qC, C=O).

IR (cm⁻¹) $\tilde{\nu}$ = 3234, 2941, 2819, 2777, 1678, 1631, 1579, 1514, 1450, 1435, 1410, 1333, 1286, 1248, 1173, 1103, 1041, 974, 893, 860, 777, 754.

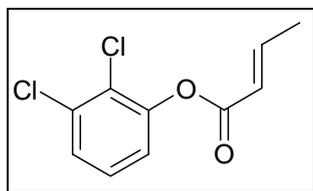
LC-MS m/z: 395.5 (100) [M+H]⁺, 397 (76), 398 (6)

R_t (min): 3.0

Reinheit: 97 %

8.5.10 Weitere Verbindungen

(E)-2,3-Dichlorphenyl-but-2-enoat (MS09)



Ansatz: 5.00 g (30.7 mmol) 2,3-Dichlorphenol, 3.21 g (30.7 mmol) Crotonylchlorid, 2.43 g (30.7 mmol) Pyridin, 45 mL wasserfreies Dichlormethan. Zu einer Lösung von 2,3-Dichlorphenol und Pyridin in 40 mL wasserfreiem Dichlormethan werden unter Eiskühlung 3.21 g Crotonylchlorid gelöst in 5 mL wasserfreiem Dichlormethan zugetropft und anschließend 18 h bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wird die Reaktionsmischung auf Eis

gegeben und nach Ansäuern auf pH 1 mit konz. HCl mit Diethylether extrahiert. Die organischen Phasen werden je zweimal mit Wasser, KOH-Lösung (5%) und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels erhält man das Produkt als hellbraunes Öl.

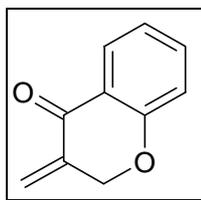
Ausbeute: 3.54 g (15.3 mmol, 50 %) hellbraunes Öl

Molare Masse: 231.08 g/mol

Summenformel: C₁₀H₈Cl₂O₂

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.98 (dd, 3H, ³J = 6.8 Hz, ⁴J = 1.7 Hz, CH₃), 6.07 (dq, 1H, ³J = 13.9 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, COCH=CH), 7.08 (dd, 1H, ³J = 8.1 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, Ar-H), 7.19 – 7.30 (m, 2H, Ar-H, CHCH₃), 7.35 (dd, 1H, ³J = 8.1 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, Ar-H).

3-Methylenchroman-4-on (MS75)



Methode D2; Ansatz 3.61 g (24.4 mmol) 4-Chromanon, 27.8 mL (204 mmol, 8.4 Äq) TMDM, 27.8 mL (294 mmol, 12 Äq) Acetanhydrid; Reaktionszeit: 3d Rühren bei RT.

Ausbeute: 120 mg (0.749 mmol, 3.1 %) schwach gelbe Flüssigkeit

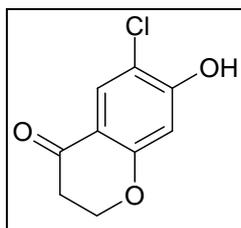
Molare Masse: 160.17 g/mol

Summenformel: C₁₀H₈O₂

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.00 (s, 2H, OCH₂), 5.57 (s, 1H, C=CH), 6.30 (s, 1H, C=CH), 6.97 (d, 1H, ³J = 7.4 Hz, Ar-H), 7.05 (t, 1H, ³J = 7.4 Hz, Ar-H), 7.48 (td, 1H, ³J = 7.4 Hz, Ar-H), 7.99 (dd, 1H, ³J = 7.4 Hz, Ar-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 71.2 (OCH₂), 118.1 (Ar-CH), 121.87 (Ar-qC), 121.93 (Ar-CH), 122.4 (C=CH₂), 128.0 (Ar-CH), 136.0 (Ar-CH), 138.9 (Ar-qC), 161.9 (qC, C=CH₂), 182.0 (qC, C=O).

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.^[124]

6-Chlor-7-hydroxy-4-chromanon (MS76)

250 mg (1.73 mmol) 4-Chlorresorcin und 188 mg (1.73 mmol) Chlorpropionsäure werden unter Argon eingewogen. Nach Zugabe von 2.60 g (17.3 mmol) Trifluormethansulfonsäure wird die Mischung für 4.5 h bei 80 °C gerührt.

Zur Aufarbeitung wird der Ansatz auf Eis gegeben und dreimal mit Diethylether extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, dreimal mit Wasser und dreimal mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Anschließend wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Als Rückstand erhält man ein dunkelrotes Öl.

Dieses wird mit 22 mL NaOH-Lösung (2 M) versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wird mit konz. HCl auf pH 1 angesäuert und dreimal mit Diethylether extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, dreimal mit Wasser und dreimal mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Anschließend wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

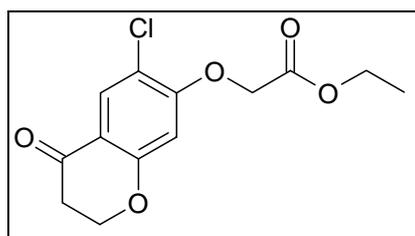
Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, Cy/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 122 mg (0.614 mmol, 36 %) schwach gelber Feststoff

Molare Masse: 198.61 g/mol

Summenformel: C₉H₇ClO₃

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.75 (t, 2H, ³J = 6.4 Hz, CH₂CH₂O), 4.51 (t, 2H, ³J = 6.4 Hz, CH₂CH₂O), 6.00 (br s, 1H, OH), 6.60 (s, 1H, Ar-H), 7.90 (s, 1H, Ar-H).

Ethyl-2-(6-Chlor-4-oxo-chroman-7-yloxy)-acetat (MS77)

Methode C; Ansatz 122 mg (0.641 mmol) 6-Chloro-7-hydroxy-chroman-4-on (**MS76**), 127 mg (0.921 mmol) Kaliumcarbonat, 10 mg (0.061 mmol) Kaliumiodid, 123 mg

(0.737 mmol) Bromessigsäureethylester, 5 mL Aceton, Reaktionszeit: 3 h Erhitzen unter Rückfluss, anschließend 12 h Rühren bei RT.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt. (SiO₂, Cy/EtOAc 2:1).

Ausbeute: 75 mg (0.263 mmol, 43 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 126 °C

Molare Masse: 284.70 g/mol

Summenformel: C₁₃H₁₃ClO₅

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.30 (t, 3H, ³J = 7.2 Hz, CH₂CH₃), 2.75 (t, 2H, ³J = 6.4 Hz, CH₂CH₂O), 4.28 (q, 2H, ³J = 7.2 Hz, CH₂CH₃), 4.51 (t, 2H, ³J = 6.4 Hz, CH₂CH₂O), 4.71 (s, 2H, OCH₂CO), 6.33 (s, 1H, Ar-H), 7.91 (s, 1H, Ar-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 14.1 (CH₂CH₃), 37.1 (O=CCH₂CH₂), 61.8 (CH₂CH₃), 65.9 (OCH₂CO), 67.6 (O=CCH₂CH₂), 101.5 (Ar-CH), 116.0 (Ar-qC), 117.2 (Ar-qC), 128.6 (Ar-CH), 159.0 (Ar-qC), 161.9 (Ar-qC), 167.3 (qC, COOEt), 189.4 (qC, O=CCH₂CH₂).

IR (cm⁻¹) $\tilde{\nu}$ = 2993, 2916, 1763, 1674, 1603, 1570, 1485, 1429, 1387, 1338, 1261, 1234, 1205, 1086, 1020, 916, 870, 831, 787, 739, 660.

LC-MS m/z: 285.2 (100) [M+H]⁺, 287.0 (33)

R_t (min): 17.4

Reinheit: 100 %

9 Literaturverzeichnis

- [1] Rawlings N. D., Barrett A. J., "Evolutionary Families of Peptidases." *Biochem. J.* **1993**, *290*, 205-218.
- [2] Rawlings N. D., Tolle D. P., Barrett A. J., "MEROPS: the peptidase database." *Nucleic Acids Research* **2004**, *32*, D160-D164.
- [3] Schomburg I., Chang A., Ebeling C., Gremse M., Heldt C., Huhn G., Schomburg D., "BRENDA, the enzyme database: updates and major new developments." *Nucleic Acids Research* **2004**, *32*, D431-D433.
- [4] Otto H. H., Schirmeister T., "Cysteine proteases and their inhibitors." *Chem. Rev.* **1997**, *97* (1), 133-171.
- [5] Turk B., Turk D., Turk V., "Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers." *Biochim. Biophys. Acta Prot. Struct. Mol. Enzymol.* **2000**, *1477* (1-2), 98-111.
- [6] Conus S., Simon H. U., "Cathepsins: Key modulators of cell death and inflammatory responses." *Biochemical Pharmacology* **2008**, *76* (11), 1374-1382.
- [7] Dubey V. K., Pande M., Singh B. K., Jagannadham M. V., "Papain-like proteases: Applications of their inhibitors." *Afr. J. Biotechnol.* **2007**, *6* (9), 1077-1086.
- [8] Lecaille F., Kaleta J., Brömme D., "Human and Parasitic Papain-Like Cysteine Proteases: Their Role in Physiology and Pathology and Recent Developments in Inhibitor Design." *Chem. Rev.* **2002**, *102* (12), 4459-4488.
- [9] Cazzulo J. J., Stoka V., Turk V., "The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: A valid target for chemotherapy of Chagas disease." *Curr. Pharm. Design* **2001**, *7* (12), 1143-1156.
- [10] Barretto N., Jukneliene D., Ratia K., Chen Z., Mesecar A. D., Baker S. C., "The Papain-Like Protease of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Has Deubiquitinating Activity." *J. Virology* **2005**, *79* (24), 15189-15198.
- [11] Mazmanian S. K., Liu G., Jensen E. R., Lenoy E., Schneewind O., "Staphylococcus aureus sortase mutants defective in the display of surface proteins and in the pathogenesis of animal infections." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97* (10), 5510-5515.
- [12] Tong L., "Viral proteases." *Chem. Rev.* **2002**, *102* (12), 4609-4626.
- [13] Rudenskaya G. N., Pupov D. V., "Cysteine proteinases of microorganisms and viruses." *Biochemistry* **2008**, *73* (1), 1-13.

- [14] Vicik R., "Synthese und Eigenschaften *N*-acylierter Aziridin-2,3-Dicarboxylate als selektive, peptidomimetische Inhibitoren von Cystein-Proteasen der Cathepsin-L-Subfamilie." *Dissertation* **2004**, Universität Würzburg.
- [15] Schechter I., Berger A., "On Size of Active Site in Proteases, I. Papain." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, 27 (2), 157-162.
- [16] Ksiazek T. G., Erdman D., Goldsmith C. S., Zaki S. R., Peret T., Emery S., Tong S. X., Urbani C., Comer J. A., Lim W., Rollin P. E., Dowell S. F., Ling A. E., Humphrey C. D., Shieh W. J., Guarner J., Paddock C. D., Rota P., Fields B., DeRisi J., Yang J. Y., Cox N., Hughes J. M., LeDuc J. W., Bellini W. J., Anderson L. J., Grp S. W., "A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome." *N. Engl. J. Med.* **2003**, 348 (20), 1953-1966.
- [17] Drosten C., Gunther S., Preiser W., van der Werf S., Brodt H. R., Becker S., Rabenau H., Panning M., Kolesnikova L., Fouchier R. A. M., Berger A., Burguiere A. M., Cinatl J., Eickmann M., Escriou N., Grywna K., Kramme S., Manuguerra J. C., Muller S., Rickerts V., Sturmer M., Vieth S., Klenk H. D., Osterhaus A. D. M. E., Schmitz H., Doerr H. W., "Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome." *N. Engl. J. Med.* **2003**, 348 (20), 1967-1976.
- [18] Marra M. A., Jones S. J. M., Astell C. R., Holt R. A., Brooks-Wilson A., Butterfield Y. S. N., Khattra J., Asano J. K., Barber S. A., Chan S. Y., Cloutier A., Coughlin S. M., Freeman D., Girn N., Griffith O. L., Leach S. R., Mayo M., McDonald H., Montgomery S. B., Pandoh P. K., Petrescu A. S., Robertson A. G., Schein J. E., Siddiqui A., Smailus D. E., Stott J. E., Yang G. S., Plummer F., Andonov A., Artsob H., Bastien N., Bernard K., Booth T. F., Bowness D., Czub M., Drebot M., Fernando L., Flick R., Garbutt M., Gray M., Grolla A., Jones S., Feldmann H., Meyers A., Kabani A., Li Y., Normand S., Stroher U., Tipples G. A., Tyler S., Vogrig R., Ward D., Watson B., Brunham R. C., Kraiden M., Petric M., Skowronski D. M., Upton C., Roper R. L., "The genome sequence of the SARS-associated coronavirus." *Science* **2003**, 300 (5624), 1399-1404.
- [19] Guan Y., Zheng B. J., He Y. Q., Liu X. L., Zhuang Z. X., Cheung C. L., Luo S. W., Li P. H., Zhang L. J., Guan Y. J., Butt K. M., Wong K. L., Chan K. W., Lim W., Shortridge K. F., Yuen K. Y., Peiris J. S. M., Poon L. L. M., "Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in Southern China." *Science* **2003**, 302 (5643), 276-278.
- [20] Wu D. L., Tu C. C., Xin C., Xuan H., Meng Q. W., Liu Y. G., Yu Y. D., Guan Y. T., Jiang Y., Yin X. N., Cramer G., Wang M. P., Li C. W., Liu S. W., Liao M., Feng L., Xiang H., Sun J. F., Chen J. D., Sun Y. W., Gu S. L., Liu N. H., Fu D. X., Eaton B. T., Wang L. F., Kong X. G., "Civets are equally susceptible to experimental infection by two different severe acute respiratory syndrome coronavirus isolates." *J. Virology* **2005**, 79 (4), 2620-2625.
- [21] Shi Z. L., Hu Z. H., "A review of studies on animal reservoirs of the SARS coronavirus." *Virus Research* **2008**, 133 (1), 74-87.
- [22] Lau S. K. P., Woo P. C. Y., Li K. S. M., Huang Y., Tsoi H. W., Wong B. H. L., Wong S. S. Y., Leung S. Y., Chan K. H., Yuen K. Y., "Severe acute respiratory

- syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102* (39), 14040-14045.
- [23] Li W. D., Shi Z. L., Yu M., Ren W. Z., Smith C., Epstein J. H., Wang H. Z., Crameri G., Hu Z. H., Zhang H. J., Zhang J. H., McEachern J., Field H., Daszak P., Eaton B. T., Zhang S. Y., Wang L. F., "Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses." *Science* **2005**, *310* (5748), 676-679.
- [24] Li W. H., Wong S. K., Li F., Kuhn J. H., Huang I. C., Choe H., Farzan M., "Animal origins of the severe acute respiratory syndrome coronavirus: Insight from ACE2-S-protein interactions." *J. Virology* **2006**, *80* (9), 4211-4219.
- [25] Hof H., Dörries R., "Medizinische Mikrobiologie." **2005**, *3. Auflage*, Thieme-Verlag, Stuttgart.
- [26] Groneberg D. A., Hilgenfeld R., Zabel P., "Molecular mechanisms of severe acute respiratory syndrome (SARS)." *Respir. Res.* **2005**, *6*, 8.
- [27] Eickmann M., Becker S., Klenk H. D., Doerr H. W., Stadler K., Censini S., Guidotti S., Masignani V., Scarselli M., Mora M., Donati C., Han J. H., Song H. C., Abrignani S., Covacci A., Rappuoli R., "Phylogeny of the SARS coronavirus." *Science* **2003**, *302* (5650), 1504-1505.
- [28] Snijder E. J., Bredenbeek P. J., Dobbe J. C., Thiel V., Ziebuhr J., Poon L. L. M., Guan Y., Rozanov M., Spaan W. J. M., Gorbalenya A. E., "Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage." *J. Mol. Biol.* **2003**, *331* (5), 991-1004.
- [29] Prentice E., McAuliffe J., Lu X. T., Subbarao K., Denison M. R., "Identification and characterization of severe acute respiratory syndrome coronavirus replicase proteins." *J. Virology* **2004**, *78* (18), 9977-9986.
- [30] Bartlam M., Xue X., Rao Z., "The search for a structural basis for therapeutic intervention against the SARS coronavirus." *Acta Cryst. Section A* **2008**, *64*, 204-213.
- [31] Bartlam M., Yang H., Rao Z., "Structural insights into SARS coronavirus proteins." *Curr. Op. Struct. Biol.* **2005**, *15* (6), 664-672.
- [32] Yang H. T., Yang M. J., Ding Y., Liu Y. W., Lou Z. Y., Zhou Z., Sun L., Mo L. J., Ye S., Pang H., Gao G. F., Anand K., Bartlam M., Hilgenfeld R., Rao Z. H., "The crystal structures of severe acute respiratory syndrome virus main protease and its complex with an inhibitor." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100* (23), 13190-13195.
- [33] Chen H., Wei P., Huang C. K., Tan L., Liu Y., Lai L. H., "Only one protomer is active in the dimer of SARS 3C-like proteinase." *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (20), 13894-13898.

- [34] Chou C. Y., Chang H. C., Hsu W. C., Lin T. Z., Lin C. H., Chang G. G., "Quaternary structure of the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus main protease." *Biochemistry* **2004**, *43* (47), 14958-14970.
- [35] Open-Source PyMOL 0.99rc6, DeLano Scientific LLC., **2006**.
- [36] Barrett A. J., Rawlings N. D., Woessner J. F., "Handbook of Proteolytic Enzymes, Vol. 2." **2004**, *2nd Edition*, Elsevier Academic Press, Amsterdam, Boston, Heidelberg.
- [37] Ziebuhr J., Snijder E. J., Gorbalenya A. E., "Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales." *J. Gen. Virol.* **2000**, *81*, 853-879.
- [38] Ziebuhr J., "The coronavirus replicase." *Coronavirus Replication and Reverse Genetics* **2005**, *287*, 57-94.
- [39] Hegyi A., Ziebuhr J., "Conservation of substrate specificities among coronavirus main proteases." *J. Gen. Virol.* **2002**, *83*, 595-599.
- [40] Harcourt B. H., Jukneliene D., Kanjanahaluethai A., Bechill J., Severson K. M., Smith C. M., Rota P. A., Baker S. C., "Identification of severe acute respiratory syndrome coronavirus replicase products and characterization of papain-like protease activity." *J. Virology* **2004**, *78* (24), 13600-13612.
- [41] Saikatendu K. S., Joseph J. S., Subramanian V., Clayton T., Griffith M., Moy K., Velasquez J., Neuman B. W., Buchmeier M. J., Stevens R. C., Kuhn P., "Structural basis of severe acute respiratory syndrome coronavirus ADP-ribose-1 "-phosphate dephosphorylation by a conserved domain of nsp3." *Structure* **2005**, *13* (11), 1665-1675.
- [42] Ratia K., Saikatendu K. S., Santarsiero B. D., Barretto N., Baker S. C., Stevens R. C., Mesecar A. D., "Severe acute respiratory syndrome coronavirus papain-like protease: Structure of a viral deubiquitinating enzyme." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103* (15), 5717-5722.
- [43] Powers J. C., Asgian J. L., Ekici O. D., James K. E., "Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases." *Chem. Rev.* **2002**, *102* (12), 4639-4750.
- [44] Anand K., Ziebuhr J., Wadhwani P., Mesters J. R., Hilgenfeld R., "Coronavirus main proteinase (3CL(pro)) structure: Basis for design of anti-SARS drugs." *Science* **2003**, *300* (5626), 1763-1767.
- [45] Shie J. J., Fang J. M., Kuo T. H., Kuo C. J., Liang P. H., Huang H. J., Wu Y. T., Jan J. T., Cheng Y. S. E., Wong C. H., "Inhibition of the severe acute respiratory syndrome 3CL protease by peptidomimetic alpha,beta-unsaturated esters." *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13* (17), 5240-5252.
- [46] Yang H. T., Xie W. Q., Xue X. Y., Yang K. L., Ma J., Liang W. X., Zhao Q., Zhou Z., Pei D. Q., Ziebuhr J., Hilgenfeld R., Yuen K. Y., Wong L., Gao G. X., Chen S. J., Chen Z., Ma D. W., Bartlam M., Rao Z., "Design of wide-spectrum inhibitors targeting coronavirus main proteases." *PLoS Biology* **2005**, *3* (10), 1742-1752.

- [47] Xue X. Y., Yu H. W., Yang H. T., Xue F., Wu Z. X., Shen W., Li J., Zhou Z., Ding Y., Zhao Q., Zhang X. J. C., Liao M., Bartlam M., Rao Z., "Structures of two coronavirus main proteases: Implications for substrate binding and antiviral drug design." *J. Virology* **2008**, 82 (5), 2515-2527.
- [48] Lee C. C., Kuo C. J., Ko T. P., Hsu M. F., Tsui Y. C., Chang S. C., Yang S., Chen S. J., Chen H. C., Hsu M. C., Shih S. R., Liang P. H., Wang A. H. J., "Structural Basis of Inhibition Specificities of 3C and 3C-like Proteases by Zinc-coordinating and Peptidomimetic Compounds." *J. Biol. Chem.* **2009**, 284 (12), 7646-7655.
- [49] Regnier T., Sarma D., Hidaka K., Bacha U., Freire E., Hayashi Y., Kiso Y., "New developments for the design, synthesis and biological evaluation of potent SARS-CoV 3CL(pro) inhibitors." *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19 (10), 2722-2727.
- [50] Lee T.-W., Cherney M. M., Huitema C., Liu J., James K. E., Powers J. C., Eltis L. D., James M. N. G., "Crystal Structures of the Main Peptidase from the SARS Coronavirus Inhibited by a Substrate-like Aza-peptide Epoxide." *J. Mol. Biol.* **2005**, 353 (5), 1137-1151.
- [51] Chen C. N., Lin C. P. C., Huang K. K., Chen W. C., Hsieh H. P., Liang P. H., Hsu J. T. A., "Inhibition of SARS-CoV 3C-like protease activity by theaflavin-3,3'-digallate (TF3)." *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2005**, 2 (2), 209-215.
- [52] Kuo C. J., Chi Y. H., Hsu J. T. A., Liang P. H., "Characterization of SARS main protease and inhibitor assay using a fluorogenic substrate." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, 318 (4), 862-867.
- [53] Hsu J. T. A., Kuo C. J., Hsieh H. P., Wang Y. C., Huang K. K., Lin C. P. C., Huang P. F., Chen X., Liang P. H., "Evaluation of metal-conjugated compounds as inhibitors of 3CL protease of SARS-CoV." *FEBS Letters* **2004**, 574 (1-3), 116-120.
- [54] Liu Y. C., Huang V., Chao T. C., Hsiao C. D., Lin A., Chang M. F., Chow L. P., "Screening of drugs by FRET analysis identifies inhibitors of SARS-CoV 3CL protease." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 333 (1), 194-199.
- [55] Chen L., Gui C., Luo X., Yang Q., Günther S., Scandella E., Drosten C., Bai D., He X., Ludewig B., Chen J., Luo H., Yang Y., Yang Y., Zou J., Thiel V., Chen K., Shen J., Shen X., Jiang H., "Cinanserin Is an Inhibitor of the 3C-Like Proteinase of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus and Strongly Reduces Virus Replication In Vitro." *J. Virology* **2005**, 79 (11), 7095-7103.
- [56] Wu C. Y., Jan J. T., Ma S. H., Kuo C. J., Juan H. F., Cheng Y. S. E., Hsu H. H., Huang H. C., Wu D., Brik A., Liang F. S., Liu R. S., Fang J. M., Chen S. T., Liang P. H., Wong C. H., "Small molecules targeting severe acute respiratory syndrome human coronavirus." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101 (27), 10012-10017.
- [57] Ludewig S., Kossner M., Schiller M., Baumann K., Schirmeister T., "Enzyme Kinetics and Hit Validation in Fluorimetric Protease Assays." *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, accepted for publication.

- [58] Chou C. Y., Chien C. H., Han Y. S., Prebanda M. T., Hsieh H. P., Turk B., Chang G. G., Chen X., "Thiopurine analogues inhibit papain-like protease of severe acute respiratory syndrome coronavirus." *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *75* (8), 1601-1609.
- [59] Ratia K., Pegan S., Takayama J., Sleeman K., Coughlin M., Baliji S., Chaudhuri R., Fu W. T., Prabhakar B. S., Johnson M. E., Baker S. C., Ghosh A. K., Mesecar A. D., "A noncovalent class of papain-like protease/deubiquitinase inhibitors blocks SARS virus replication." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105* (42), 16119-16124.
- [60] Förster T., "Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz." *Ann. Physik* **1948**, *437* (1-2), 55-75.
- [61] Grum-Tokars V., Ratia K., Begaye A., Baker S. C., Mesecar A. D., "Evaluating the 3C-like protease activity of SARS-Coronavirus: Recommendations for standardized assays for drug discovery." *Virus Research* **2008**, *133* (1), 63-73.
- [62] Bacha U., Barrila J., Velazquez-Campoy A., Leavitt S. A., Freire E., "Identification of novel inhibitors of the SARS coronavirus main protease 3CL(pro)." *Biochemistry* **2004**, *43* (17), 4906-4912.
- [63] Kao R. Y., To A. P. C., Ng L. W. Y., Tsui W. H. W., Lee T. S. W., Tsoi H. W., Yuen K. Y., "Characterization of SARS-CoV main protease and identification of biologically active small molecule inhibitors using a continuous fluorescence-based assay." *FEBS Letters* **2004**, *576* (3), 325-330.
- [64] Blanchard J. E., Elowe N. H., Huitema C., Fortin P. D., Cechetto J. D., Eltis L. D., Brown E. D., "High-throughput screening identifies inhibitors of the SARS coronavirus main proteinase." *ChemBiol.* **2004**, *11* (10), 1445-1453.
- [65] Kaeppler U., Stiefl N., Schiller M., Vicik R., Breuning A., Schmitz W., Rupprecht D., Schmuck C., Baumann K., Ziebuhr J., Schirmeister T., "A new lead for nonpeptidic active-site-directed inhibitors of the severe acute respiratory syndrome coronavirus main protease discovered by a combination of screening and docking methods." *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (22), 6832-6842.
- [66] Kuang W. F., Chow L. P., Wu M. H., Hwang L. H., "Mutational and inhibitive analysis of SARS coronavirus 3C-like protease by fluorescence resonance energy transfer-based assays." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *331* (4), 1554-1559.
- [67] Liu Y. Y., Kati W., Chen C. M., Tripathi R., Molla A., Kohlbrenner W., "Use of a fluorescence plate reader for measuring kinetic parameters with inner filter effect correction." *Anal. Biochem.* **1999**, *267* (2), 331-335.
- [68] Palfrey H. C., Leung S., "Inhibition of Na-K-2Cl Cotransport and Bumetanide Binding by Ethacrynic-Acid, its Analogs, and Adducts." *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **1993**, *264* (5), C1270-C1277.
- [69] Harwaldt P., Rahlfs S., Becker K., "Glutathione S-transferase of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*: Characterization of a potential drug target." *Biol. Chem.* **2002**, *383* (5), 821-830.

- [70] Ploemen J. H. T. M., Vanommen B., Vanbladeren P. J., "Inhibition of Rat and Human Glutathione-S-Transferase Isoenzymes by Ethacrynic-Acid and Its Glutathione Conjugate." *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *40* (7), 1631-1635.
- [71] Käppler U., "Synthese und Testung nichtpeptidischer Cystein-Protease-Inhibitoren - Etacrynsäure als Leitstruktur " *Dissertation* **2004**, *Universität Würzburg*.
- [72] unpublizierte Ergebnisse, AK Prof. Dr. E. Snijder, Universität Leiden.
- [73] unpublizierte Ergebnisse, AK Prof. Dr. J. Ziebuhr, Queen's University Belfast.
- [74] Wang Q. M., Johnson R. B., Sommergruber W., Shepherd T. A., "Development of in vitro peptide substrates for human rhinovirus-14 2A protease." *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *356* (1), 12-18.
- [75] Schultz E. M., Sprague J. M., Merck & Co. Inc., "(2-Alkylidene acyl)phenoxy-and (2-alkylidene acyl)phenylmercaptocarboxylic acids." **1966**, *Patent US3255241*.
- [76] Bicking J. B., Inc. M. C., "4-(2-Methylenealkanoyl)phenylsulfinyl alcanoic acids." **1968**, *Patent US3419606*.
- [77] Laue T., Plagens A., "Namen- und Schlagwortreaktionen in der Organischen Chemie." *Teubner Studienbücher Chemie Stuttgart* **1998**.
- [78] Cragoe E. J., Woltersdorf O. W., Gould N. P., Pietruszkiewicz A. M., Ziegler C., Sakurai Y., Stokker G. E., Anderson P. S., Bourke R. S., Kimelberg H. K., Nelson L. R., Barron K. D., Rose J. R., Szarowski D., Popp A. J., Waldman J. B., "Agents for the Treatment of Brain Edema .2. [(2,3,9,9a-Tetrahydro-3-Oxo-9a-Substituted-1H-Fluoren-7-Yl)Oxy]Alkanoic Acids and Some of Their Analogs." *J. Med. Chem.* **1986**, *29* (5), 825-841.
- [79] McOmie J. F. W., Watts M. L., West D. E., "Demethylation of Aryl Methyl Ethers by Boron Tribromide." *Tetrahedron* **1968**, *24* (5), 2289-2292.
- [80] Chakraborti A. K., Sharma L., Nayak M. K., "Demand-based thiolate anion generation under virtually neutral conditions: Influence of steric and electronic factors on chemo- and regioselective cleavage of aryl alkyl ethers." *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (18), 6406-6414.
- [81] Abraham D. J., Mehanna A. S., Williams F. S., Cragoe E. J., Woltersdorf O. W., "Design, Synthesis, and Testing of Potential Antisickling Agents .7. Ethacrynic-Acid Analogs." *J. Med. Chem.* **1989**, *32* (11), 2460-2467.
- [82] Newman M. S., Karnes H. A., "Conversion of Phenols to Thiophenols Via Dialkylthiocarbamates." *J. Org. Chem.* **1966**, *31* (12), 3980-3984.
- [83] Kwart H., Evans E. R., "Vapor Phase Rearrangement of Thioncarbonates and Thioncarbamates." *J. Org. Chem.* **1966**, *31* (2), 410-413.

- [84] Zonta C., De Lucchi O., Volpicelli R., Cotarca L., "Thione-thiol rearrangement: Miyazaki-Newman-Kwart rearrangement and others." *Top. Curr. Chem.* **2007**, 275, 131-161.
- [85] Miyazaki K., "The Thermal Rearrangement of Thionocarbamates to Thiolcarbamates." *Tetrahedron Lett.* **1968**, 9 (23), 2793-2798.
- [86] Dude M. A., Kaeppler U., Herb M., Schiller M., Schulz F., Vedder B., Heppner S., Pradel G., Gut J., Rosenthal P. J., Schirmeister T., Leippe M., Gelhaus C., "Synthesis and Evaluation of Non-peptidic Cysteine Protease Inhibitors of *P. falciparum* derived from Etacrynic Acid." *Molecules* **2009**, 14, 19-35.
- [87] Herb M., "Synthese und Testung von Fluor-Derivaten der Etacrynsäure als potentielle Inhibitoren der SARS-Coronavirus-Hauptprotease." *Diplomarbeit* **2006**, Universität Würzburg.
- [88] Taylor E. C., Shvo Y., "Heterocyclic Syntheses from O-Aminonitriles, XXX. Synthesis of Some Diaza Steroids." *J. Org. Chem.* **1968**, 33 (5), 1719-1727.
- [89] deSolms S. J., "*N,N,N',N'*-Tetramethylmethanediamine - Simple, Effective Mannich Reagent." *J. Org. Chem.* **1976**, 41 (15), 2650-2651.
- [90] Shioiri T., Yamada S., Ninomiya K., "Diphenylphosphoryl Azide - New Convenient Reagent for a Modified Curtius Reaction and for Peptide Synthesis." *JACS* **1972**, 94 (17), 6203-6205.
- [91] Belleau B., Malek G., "A New Convenient Reagent for Peptide Syntheses." *JACS* **1968**, 90 (6), 1651-1652.
- [92] Krapcho J., Fried J., Turk C. F., Spitzmiller E. R., "Serotonin Inhibitors .2. 2]-(3-Dimethylaminopropylthio)Cinnamanilide + Related Compounds." *J. Med. Chem.* **1964**, 7 (3), 376-377.
- [93] Butler T. W., Blake J. F., Bordner J., Butler P., Chenard B. L., Collins M. A., DeCosta D., Ducat M. J., Eisenhard M. E., Menniti F. S., Pagnozzi M. J., Sands S. B., Segelstein B. E., Volberg W., White W. F., Zhao D. Y., "(3R,4S)-3-[4-(4-fluorophenyl)-4-hydroxypiperidin-1-yl]chroman-4,7-diol: A conformationally restricted analogue of the NR2B subtype-selective NMDA antagonist (1S,2S)-1-(4-hydroxyphenyl)-2(4-hydroxy-4-phenylpiperidino)-1-propanol." *J. Med. Chem.* **1998**, 41 (7), 1172-1184.
- [94] Vicik R., Busemann M., Baumann K., Schirmeister T., "Inhibitors of cysteine proteases." *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, 6 (4), 331-353.
- [95] Bisswanger H., "Enzymkinetik - Theorie und Methoden." **1994**, 2. Auflage, VCH Weinheim.
- [96] Tian W. X., Tsou C. L., "Determination of the Rate-Constant of Enzyme Modification by Measuring the Substrate Reaction in the Presence of the Modifier." *Biochemistry* **1982**, 21 (5), 1028-1032.

- [97] Dixon M., "The Determination of Enzyme Inhibitor Constants." *Biochem. J.* **1953**, *55* (1), 170-171.
- [98] GraFit Version 5.0.13, Erithacus Software Ltd., London, **2006**.
- [99] Yang Q. G., Chen L. L., He X. C., Gao Z. T., Bai D. L., "Design and synthesis of cinanserin analogs as severe acute respiratory syndrome coronavirus 3CL protease inhibitors." *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, *56* (10), 1400-1405.
- [100] Christensen G. D., Baddour L. M., Simpson W. A., "Phenotypic Variation of Staphylococcus-Epidermidis Slime Production In vitro and In vivo." *Infection and Immunity* **1987**, *55* (12), 2870-2877.
- [101] Huber W., Koella J. C., "A comparison of three methods of estimating EC₅₀ in studies of drug resistance of malaria parasites." *Acta Trop.* **1993**, *55*, 257-261.
- [102] Heppner S., "Zellphysiologische Wirkung von Cysteinprotease-Inhibitoren auf intraerythrocytäre Stadien des Malariaerregers *Plasmodium falciparum*." *Diplomarbeit* **2007**, Universität Kiel.
- [103] Vicik R., Busemann M., Gelhaus C., Stiefl N., Scheiber J., Schmitz W., Schulz F., Mladenovic M., Engels B., Leippe M., Baumann K., Schirmeister T., "Aziridide-based inhibitors of cathepsin L: Synthesis, inhibition activity, and docking studies." *ChemMedChem* **2006**, *1* (10), 1126-1141.
- [104] Gelhaus C., Vicik R., Hilgenfeld R., Schmidt C. L., Leippe M., Schirmeister T., "Synthesis and antiplasmodial activity of a cysteine protease-inhibiting biotinylated aziridine-2,3-dicarboxylate." *Biol. Chem.* **2004**, *385* (5), 435-438.
- [105] Zumbusch A., Holtom G. R., Xie X. S., "Three-Dimensional Vibrational Imaging by Coherent Anti-Stokes Raman Scattering." *Phys. Rev. Lett.* **1999**, *82* (20), 4142-4145.
- [106] Thomas B. E., Kollman P. A., "An ab Initio Molecular Orbital Study of the First Step of the Catalytic Mechanism of Thymidylate Synthase: The Michael Addition of Sulfur and Oxygen Nucleophiles." *J. Org. Chem.* **1995**, *60* (26), 8375-8381.
- [107] Kunakbaeva Z., Carrasco R., Rozas I., "An approximation to the mechanism of inhibition of cystein proteases: nucleophilic sulphur addition to Michael acceptors type compounds." *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **2003**, *626*, 209-216.
- [108] Schulz V., "Hochelektrophile Aziridin-2,3-dicarbonsäure-Derivate als Bausteine für neue Inhibitoren von Cystein-Proteasen." *Diplomarbeit* **2007**, Universität Würzburg.
- [109] Buback V., Mladenovic M., Engels B., Schirmeister T., "Rational Design of Improved Aziridine-Based Inhibitors of Cysteine Proteases." *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113* (15), 5282-5289.

- [110] Vicik R., Helten H., Schirmeister T., Engels B., "Rational design of aziridine-containing cysteine protease inhibitors with improved potency: Studies on inhibition mechanism." *ChemMedChem* **2006**, *1* (9), 1021-1028.
- [111] Helten H., Schirmeister T., Engels B., "Model Calculations about the Influence of Protic Environments on the Alkylation Step of Epoxide, Aziridine, and Thiirane Based Cysteine Protease Inhibitors." *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108* (38), 7691-7701.
- [112] Helten H., Schirmeister T., Engels B., "Theoretical Studies about the Influence of Different Ring Substituents on the Nucleophilic Ring Opening of Three-Membered Heterocycles And Possible Impications for the Mechanisms of Cysteine Protease Inhibitors." *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 233-237.
- [113] Klamt A., Schüürmann G., "COSMO: A New Approach to Dielectric Screening in Solvents with Explicit Expressions for the Screening Energy and its Gradient." *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1993**, *2*, 799-805.
- [114] Huang C. K., Wei P., Fan K. Q., Liu Y., Lai L. H., "3C-like proteinase from SARS coronavirus catalyzes substrate hydrolysis by a general base mechanism." *Biochemistry* **2004**, *43* (15), 4568-4574.
- [115] TURBOMOLE Vers. 5.8, Quantum Chem. Group, University of Karlsruhe, Germany, **2005**.
- [116] Bihovsky R., "Reactions of Alpha,Beta-Epoxy Carbonyl-Compounds with Methanethiolate - Regioselectivity and Rate." *J. Org. Chem.* **1992**, *57* (3), 1029-1031.
- [117] Böhme A., Thaens D., Paschke A., Schüürmann G., "Kinetic Glutathione Chemoassay To Quantify Thiol Reactivity of Organic Electrophiles-Application to alpha,beta-Unsaturated Ketones, Acrylates, and Propiolates." *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22* (4), 742-750.
- [118] Pospisil J., Travnicek M., Potacek M., "Influence of *N*-substituents of carbamoyl-stabilized azomethine ylides in 1,3-dipolar cycloadditions." *Arkivoc* **2001**, (ii), 146-162.
- [119] Park L., Keum G., Kang S. B., Kim K. S., Kim Y., "Indium-mediated reductive dehalogenation of alpha-halocarbonyl compounds in water." *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2000**, *24*, 4462-4463.
- [120] Easton C. J., Love S. G., Wang P., "Acyloxylation at the 4-Position of Azetidines." *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1990**, (2), 277-282.
- [121] Hanefeld W., "1,3-Thiazines .7. Reactions of Derivatives of 3-Thiocyanatopropionic Acid with Amines." *Arch. Pharm.* **1977**, *310* (4), 344-348.
- [122] Schlesinger A. H., Prill E. J., "*N*-Substituted-Amides." *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78* (23), 6123-6127.

- [123] Nguyen-Hoan, Buu-Hoi, "*Chimie Organique - Sur Les Cetones Derivees Des Anisols Et Phenetols Ortho-Halogenes." *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **1947**, 224 (19), 1363-1365.
- [124] Crich D., Chen C., Hwang J. T., Yuan H. W., Papadatos A., Walter R. I., "Photoinduced Free-Radical Chemistry of the Acyl Tellurides - Generation, Intermolecular and Intramolecular Trapping, and ESR Spectroscopic Identification of Acyl Radicals." *JACS* **1994**, 116 (20), 8937-8951.

10 Veröffentlichungen

PUBLIKATIONEN:

“A New Lead for Nonpeptidic Active-Site-Directed Inhibitors of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Main Protease Discovered by a Combination of Screening and Docking Methods.”

Käppler U., Stiefl N., Schiller M., Vicik R., Breuning A., Schmitz W., Rupprecht D., Schmuck C., Baumann K., Ziebuhr J., Schirmeister T.; *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (22), 6832-6842.

“Screening of Electrophilic Compounds Yields an Aziridinyl Peptide as New Active-Site Directed SARS-CoV Main Protease Inhibitor.”

Martina E., Stiefl N., Degel B., Schulz F., Breuning A., Schiller M., Vicik R., Baumann K., Ziebuhr J., Schirmeister T.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15* (24), 5365-5369.

“Synthesis and Evaluation of Non-peptidic Cysteine Protease Inhibitors of *P. falciparum* derived from Etacrynic Acid.“

Dude M. A., Kaeppler U., Herb M., Schiller M., Schulz F., Vedder B., Heppner S., Pradel G., Gut J., Rosenthal P. J., Schirmeister T., Leippe M., Gelhaus C.; *Molecules* **2009**, *14*, 19-35.

„Enzyme Kinetics and Hit Validation in Fluorimetric Protease Assays.“

Ludewig S., Kossner M., Schiller M., Baumann K., Schirmeister T.; *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, *accepted for publication*.

POSTERPRÄSENTATIONEN:

“Screening of electrophilic compounds as potential irreversible inhibitors of coronaviral M^{pro}s.“ A. Breuning, M. Schiller, U. Käppler, F. Jenke, B. Degel, R. Vicik, N. Stiefl, K. Baumann, C. Schmuck, J. Ziebuhr, T. Schirmeister. DPhG-Jahrestagung, **2004**, Regensburg (Oral poster presentation).

“Synthesis and Testing of New Cysteine Protease Inhibitors designed for SARS Co-V M^{pro}.” A. Breuning, E. Martina, M. Schiller, J. Ziebuhr, T. Schirmeister. DPhG-Jahrestagung, **2005**, Mainz.

“Antiviral activity of SARS coronavirus main protease inhibitors.” M. Schiller, A. Breuning, B. Degel, S. Rohrer, K. Baumann, J. Ziebuhr, T. Schirmeister. International Workshop on Discovery of Antiviral Compounds, **2006**, Lübeck.

“Influence of subinhibitory concentrations of the streptogramin antibiotic Synercid® on global gene expression in a biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* isolate.” H. Kränzler, M. Schiller, T. Schirmeister, W. Ziebuhr. 1st International symposium: Novel agents against infectious diseases - An interdisciplinary approach, **2006**, Würzburg.

“Global gene expression of *Staphylococcus epidermidis* in response to low concentrations of quinupristin / dalfopristin.” W. Ziebuhr, H.-M. Kraenzler, M. Schiller, T. Schirmeister. Second Joint PhD Students Meeting of the SFBs 544 and 630, **2006**, Heidelberg; 2nd FEMS-Congress of European Microbiologists, **2006**, Madrid, Spain; 12th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Diseases, **2006**, Maastricht, The Netherlands.

“Biofilm formation in nosocomial staphylococci: Effect of low-dosage streptogramin antibiotics and search for novel anti-biofilm compounds.” W. Ziebuhr, H.-M. Kränzler, S. Kozitskaya, E. Katzovitsch, U. Hentschel, M. Schiller, T. Schirmeister, T. Gulder, G. Bringmann. 19. Irseer Naturstofftage, **2007**, Irsee.

“Antiviral Activity of SARS Coronavirus Main Protease Inhibitors.” M. Schiller, M. Stempka, Q. Ye, M. Kossner, K. Baumann, J. Ziebuhr, T. Schirmeister. 5th General Meeting of the International Proteolysis Society (IPS), **2007**, Patras, Griechenland.

“Antiviral Activity of SARS Coronavirus Main Protease Inhibitors.” M. Schiller, M. Stempka, Q. Ye, M. Kossner, K. Baumann, J. Ziebuhr, T. Schirmeister. Chem-SyStM (Chemie-Symposium der Studierenden Mainfrankens), **2007**, Würzburg.