

**SYNTHESE UND TESTUNG NICHTPEPTIDISCHER CYSTEIN-
PROTEASE-INHIBITOREN - ETACRYNSÄURE ALS LEITSTRUKTUR**



DISSERTATION

**ZUR ERLANGUNG DES NATURWISSENSCHAFTLICHEN DOKTORGRADES DER
BAYERISCHEN JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG**

vorgelegt von

Diplom-Pharmazeut

Ulrich Käppler

aus Öhringen-Cappel (Hohenlohekreis)

Würzburg 2004

Eingereicht am:
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Würzburg.

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 November 2000 bis Dezember 2004 am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg angefertigt.

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Originalarbeiten:

U. Kaeppler, T. Schirmeister

New non-peptidic inhibitors of papain derived from etacrynic acid. *Med. Chem.* eingereicht

Reviews:

T. Schirmeister, U. Kaeppler

Non-peptidic inhibitors of cysteine proteases, *Mini Rev. Med. Chem.* **2003**, 3, 4, 361-373

Abstracta:

Non-Peptidic inhibitors of cysteine proteases, U. Käppler, T. Schirmeister. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2002**, 335, Suppl. 1, 86. (DPhG-Jahrestagung 2002, Berlin).

DANKSAGUNGEN

An erster Stelle danke ich Frau Prof. Dr. Tanja Schirmeister für die Aufnahme in ihren Arbeitskreis und die Überlassung eines sehr reizvollen Themas. Danke dafür, dass Deine Tür immer offen stand, für Deine stetige Diskussionsbereitschaft, für viele Denkanstöße und für die Freiheiten, die Du mir bei meiner Arbeit gelassen hast.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SCHI-441/3-1) und dem Fonds der Chemische Industrie, die meine Arbeit finanziell unterstützt haben.

Weiterhin möchte ich folgenden Wissenschaftlern für ihre Kooperation und Unterstützung danken:

- PD Dr. John Ziebuhr, Institut für Virologie und Immunologie, Universität Würzburg, für die Überlassung der coronaviralen Proteasen TGEV-M^{pro} und SARS-CoV M^{pro}, sowie des Substrates für die HPLC- Assays,
- Prof. Dr. Philip Rosenthal, University of California, San Francisco, für die Überlassung des Falcipain-2-Plasmids und Prof. Dr. Rolf Hilgenfeld, Institut für Biochemie, Universität Lübeck, für die Expression von Falcipain-2 aus *Plasmodium falciparum*,
- Prof. Dr. James McKerrow University of California, San Francisco, für die Überlassung von Rhodesain aus *Trypanosoma brucei rhodesiense*,
- Dr. Nikolaus Stiefl und Joseph Scheiber vom Arbeitskreis PD Dr. Knut Baumann, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg, für die Durchführung der Docking-Experimente und die Erstellung der Grafiken,
- Dr. Werner Schmitz, Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften, Physiologie II, Universität Würzburg, für die Messungen der HR-ESI-Massenspektren,
- Prof. Dr. H. Moll und Prof. Dr. A. Ponte-Sucre, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg, für die Testung an *Leishmania major*,
- Dr. K. Ohlsen und Dr. W. Ziebuhr, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg, für die Testungen an *Staphylococcus sp.*,
- C.-P. Kneis und R. Schedl, Institut für Anorganische Chemie, Universität Würzburg, für die Durchführung der Elementaranalysen,
- Dr. M. Büchner und F. Dadrich, Institut für Organische Chemie, Universität Würzburg, für die Messung der EI-Massenspektren,

- Dipl.-Chem. Franziska Jenke, Institut für Pharmazie und LMC, Universität Würzburg, für die LC/MS-Messungen,
- Anagnostis Valotis und Michael Kraus, Institut für Pharmazie und LMC, Universität Würzburg, für die präparative HPLC-Trennung,
- Dipl.-Chem. Alexander Breuning und Dr. Radim Vičík, Institut für Pharmazie und LMC, Universität Würzburg, für die Durchführung des enzymatischen HPLC-Assays an den SARS- und TGEV M^{pro}s.

Mein besonderer Dank gilt meinem Laborkollegen Dr. Radim Vičík für die vier schönen Jahre zusammen in unserem Kellerlabor. Ich hoffe, Du hast von mir nicht nur Hohenlohisch, sondern auch wenigstens ein paar Brocken Hochdeutsch gelernt!

Ich danke auch den Mitgliedern meines Arbeitskreises Franziska Jenke, Dr. Birgit Vedder, Markus Schiller und Björn Degel für ihre Zusammenarbeit, Hilfe und das freundschaftliche Arbeitsklima.

Vielen Dank an meine Freundin Annette Klockow und Dr. Gemma Bruno, beide ehemalige Mitglieder unseres Arbeitskreises, für eine tolle Zeit. Danke, dass Ihr immer ein offenes Ohr hattet, für Eure Hilfe, Diskussionsbereitschaft und Eure Geduld mit mir.

Ich danke auch Frau Dr. Karin Achilles für ihre Freundschaft und dafür, dass sie mich noch zu Greifswalder Zeiten auf die Möglichkeit der Promotion bei meiner jetzigen Chefin hingewiesen hat.

Meinen Kollegen im Biochemie-Praktikum Meike Timmermann, Anagnostis Valotis, Angelika Schäfer, Christine Weber und unserem langjährigen Kollegen und „Chef“ Dr. Ralph Deubner danke ich für den Zusammenhalt, das wirklich kollegiale Arbeitsklima und die hervorragende Zusammenarbeit. Renate Hümpfner und Silke Günzelmann aus der Analytischen Ausgabe danke ich für ihre Kooperation und gute Zusammenarbeit. Es hat mit Euch allen Spaß gemacht.

Mein besonderer Dank geht weiterhin an Anagnostis „Noti“ Valotis. Danke für die vier tollen Jahre, für Deine Hilfe in so vielen Dingen und für Deine Freundschaft.

Danke auch den übrigen Mitgliedern des AK Högger, besonders Tanja „Tänscha“ Grimm und Roswitha Skraballa, ihr seid eine tolle Truppe.

Nicht unerwähnt lassen möchte ich auch die Mitglieder der Werkstatt Matthias Völker, Karl Vollmuth und Georg Walter. Vielen Dank für Eure Unterstützung bei so manchen Problemchen, besonders für den Bau unserer Heizeinheit für das Fluorimeter und viele Gespräche.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

abs.:	absolut	RT:	Raumtemperatur
AMC:	7-Amino-4-methylcumarin	s:	Singulett
Äq.:	Äquivalent	SC:	Säulenchromatographie
CB:	Cathepsin B	sext:	Sextett
d:	Dublett	t:	Triplett
dc:	dünnschichtchromatographisch	TEA:	<i>N,N,N</i> ,-Triethylamin
DCC:	Dicyclohexylcarbodiimid	THF:	Tetrahydrofuran
DIBAH:	Diisobutylaluminiumhydrid	TMDM:	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl- diaminomethan
DMAP:	4-(Dimethylamino)-pyridin	TMS:	Tetramethylsilan
DMF:	<i>N,N</i> -Dimethylformamid	Tris:	Tris(hydroxymethyl)amino- methan, Trometamol
DMSO:	Dimethylsulfoxid	wfr.:	wasserfrei
DTT:	Dithioerythritol	Z-:	Benzyloxycarbonyl-
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure		
EEDQ:	1-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy- 1,2-dihydrochinolin		
eV:	Elektronenvolt		
FP:	Falcipain 2		
ges.:	gesättigt		
HMBC:	Heteronuclear Multiple Bond Correlation (zweidimensionales NMR-Experiment)		
Hz:	Hertz		
LM:	Laufmittel		
m:	Multiplett		
MPLC:	Mitteldruckflüssigkeits- chromatographie		
M ^{pro} :	main protease		
MWCO:	molecular weight cut-off		
ppm:	parts per million		
q:	Quartett		
quin:	Quintett		
RD:	Rhodesain		
R _f :	Retentionsfaktor		
RP:	Reversed-phase		

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Vorkommen, Funktion und Bedeutung von Cystein-Proteasen	1
1.2	Aufbau und Struktur von Cystein-Proteasen des Papain-Clans	4
1.3	Katalysemechanismus von Cystein-Proteasen.....	5
1.4	Inhibitoren von Cystein-Proteasen	7
1.4.1	Nichtpeptidische Inhibitoren.....	8
1.4.2	Inhibitoren mit Michael-System	10
2	Zielstellung der Arbeit	13
3	Synthesen.....	14
3.1	Synthesen der Etacrynsäure und ihrer Strukturvarianten	14
3.1.1	Synthese der acylierten Phenoxyessigsäureethylester-Derivate III	17
3.1.2	Einführung des Michael-Systems.....	26
3.2	Synthese der Etacrynsäureamide.....	34
3.2.1	Amid-Kupplung mit Thionylchlorid.....	35
3.2.2	Amid-Kupplung mit DCC/ <i>N</i> -Hydroxysuccinimid.....	36
3.3	Variationen des Michael-Systems der Etacrynsäure	37
3.3.1	Synthese der Verbindungen mit deaktivierter elektrophiler Gruppe.....	38
3.3.2	Synthese der Verbindungen mit modifizierter Etacrynsäure- Partialstruktur	40
3.3.3	Synthese der Dehydroalanin-Derivate.....	42
3.4	Strukturübersicht über die in der Arbeit synthetisierten Zielverbindungen ...	44
4	Docking-Studien an Etacrynsäure-<i>tert</i>butylamid (VI-1f).....	47
5	Biochemische und biologische Untersuchungen	50
5.1	Enzymassays	50
5.1.1	Einführung	50
5.1.2	Charakterisierung zeitabhängiger Hemmung	52
5.1.3	Charakterisierung nicht-zeitabhängiger Hemmung	58
5.1.4	Durchführung der fluorimetrischen Enzymassays	60
5.1.5	Durchführung der photometrischen Enzymassays	61
5.1.6	Bestimmung der Hemmkonstanten der Inhibitoren	63
5.1.7	Ergebnisse der Enzymassays	67

5.1.8	Untersuchungen zur Hemmung von Serin-Proteasen durch Etacrynsäure-Derivate.....	71
5.1.9	Einfluss von niedermolekularen Thiolen im Puffer auf die Inhibitoren mit Michael-System.....	72
5.1.10	Dialyseversuche	73
5.1.11	Diskussion	75
5.2	Untersuchungen an coronaviralen Cystein-Proteasen.....	80
5.2.1	Einleitung.....	80
5.2.2	Enzymatischer HPLC-Assay.....	81
5.2.3	Fluorimetrischer Enzymassay mit der SARS-CoV M ^{pro}	84
5.3	Untersuchungen zur biologischen Aktivität	87
6	Diskussion der Ergebnisse und Struktur-Wirkungs- Beziehungen.....	92
6.1	Bewertung der erarbeiteten Synthesewege.....	92
6.2	Selektivität der getesteten Inhibitoren zwischen den Enzymen.....	95
6.3	Struktur-Wirkungs-Beziehungen	95
6.3.1	Bedeutung des aromatischen Ringes	96
6.3.2	Einfluss der Seitenkette an der Doppelbindung.....	96
6.3.3	Einfluss des Substitutionsmusters am aromatischen Ring.....	97
6.3.4	Einfluss des Substituenten am phenolischen Sauerstoff.....	98
6.3.5	Einfluss der unterschiedlichen Reste der Etacrynsäureamide	99
6.4	Bewertung der Docking-Experimente.....	100
6.5	Bewertung der Ergebnisse aus den biologischen Testungen.....	101
7	Zusammenfassung.....	104
8	Summary.....	107
9	Experimenteller Teil	110
9.1	Geräte und Arbeitsmittel.....	110
9.1.1	Schmelzpunktbestimmung und Elementaranalysen.....	110
9.1.2	Enzyme, Substrate und Synthesechemikalien	110
9.2	Analytische Methoden.....	111
9.2.1	Spektroskopische Methoden.....	111
9.2.2	Massenspektrometrie	112
9.2.3	Chromatographische Methoden	113
9.3	Arbeitsmethoden	113
9.4	Allgemeine Synthesevorschriften.....	114

9.4.1	Methode A - Allgemeine Vorschrift zur Methylierung von Phenolen.....	114
9.4.2	Methode B - Allgemeine Vorschrift zur Friedel-Crafts-Acylierung von Anisolen und anschließender Methyletherspaltung	114
9.4.3	Methode C - Allgemeine Vorschrift zur Veretherung von Phenolen mit Bromessigsäureethylester	115
9.4.4	Methode D – Allgemeine Vorschrift zur Synthese der α,β -ungesättigten Keto-Verbindungen	117
9.4.5	Methode E – Amidsynthesen	118
9.5	Synthesen der Phenoxyessigsäure-Derivate mit α,β -ungesättigter Keton-Struktur	120
9.5.1	[4-(2-Methylacryloyl)-phenoxy]-essigsäureethylester (IV-0a).....	120
9.5.2	Etacrynsäureethylester (IV-1a).....	122
9.5.3	[2,3-Dichlor-4-(2-methylbutyryl)-phenoxy]-essigsäureethylester (III-1b)	124
9.5.4	[2-Chlor-4-(2-methylacryloyl)-phenoxy]-essigsäureethylester (IV-2a) ...	126
9.5.5	[2-Chlor-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-essigsäureethylester (IV-2b)	129
9.5.6	[5-Chlor-2-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-essigsäureethylester (IV-3a).	132
9.5.7	[3-Methyl-4-(2-methylacryloyl)-phenoxy]-essigsäureethylester (IV-5a) .	136
9.5.8	[3-Methyl-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-essigsäureethylester (IV-5b)	139
9.6	Synthesen der Phenoxyessigsäuren.....	142
9.6.1	Synthese von Etacrynsäure (V-1a).....	142
9.6.2	Synthese von [2,3-Dichlor-4-(2-methylbutyryl)-phenoxy]-essigsäure (V-1b)	142
9.6.3	[2,3-Dimethyl-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-essigsäure (V-4a).....	144
9.7	Synthesen der Etacrynsäure-Amide	149
9.7.1	Synthese von (S)-2-{2-[2,3-Dichlor-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-acetyl-amino}-propionsäurebenzylester (VI-1a).....	149
9.7.2	Synthese von (R)-2-{2-[2,3-Dichlor-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-acetyl-amino}-propionsäurebenzylester (VI-1b)	150
9.7.3	Synthese von (S)-2-(2-{2-[2,3-Dichlor-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-acetylamino}-acetylamino)-propionamid (VI-1c).....	151
9.7.4	Synthese von (S)-2-(2-{2-[2,3-Dichlor-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-acetylamino}-acetylamino)-3-phenylpropionamid (VI-1d)	152

9.7.5	Synthese von Etacrynsäure-morpholinamid (VI-1e)	154
9.7.6	Synthese von Etacrynsäure- <i>tert</i> butylamid (VI-1f)	155
9.7.7	2-{2-[2,3-Dichlor-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]acetylamino}-2-methyl-propionamid (VI-1g)	156
9.7.8	Synthese von Etacrynsäure-(<i>N</i> -ethyl-piperazin)-amid (VI-1h).....	158
9.7.9	Synthese von Etacrynsäure- <i>n</i> -butylamid (VI-1i)	159
9.7.10	Synthese von Etacrynsäure- <i>N</i> -hexylamid (VI-1j)	160
9.7.11	Synthese von Etacrynsäure-benzylamid (VI-1k).....	162
9.7.12	Synthese von Etacrynsäure-anilid (VI-1l).....	163
9.8	Synthesen der Anisole mit α,β -ungesättigter Keton-Struktur	164
9.8.1	1-(3-Chlor-4-methoxyphenyl)-2-methyl-propenon (VII-2a)	164
9.8.2	1-(3-Chlor-4-methoxyphenyl)-2-methylenbutan-1-on (VII-2b)	166
9.8.3	1-(3-Chlor-4-methoxyphenyl)-2-methylen-4-(4-nitrophenyl)-butan-1-on (VII-2c).....	167
9.9	Synthesen der Dehydroalanin-Derivate	171
9.9.1	Synthese von <i>N-tert</i> Butyloxycarbonyl-2,3-dehydroalaninmethylester (IX-a)	171
9.9.2	Synthese von <i>N</i> -(<i>N</i> -Benzyloxycarbonyl-(<i>L</i> -)alanyl)-2,3-dehydroalaninmethylester (IX-b).....	172
9.10	Synthesen der Verbindungen mit Etacrynsäure-Partialstruktur.....	173
9.10.1	Synthese von 2-Methylen-1-phenylbutan-1-on (X-a)	173
9.10.2	1-Cyclohexyl-2-methylenbutan-1-on (X-d)	174
9.10.3	Synthese von Atropasäure (X-e)	177
9.11	Verschiedene Synthese-Zwischenstufen.....	178
9.11.1	Synthese von 1-(2-Hydroxy-3,4-dimethyl-5-propionylphenyl)-propan-1-on (II-4b).....	178
9.11.2	Synthese von 2,3-Dichlorphenoxyessigsäureethylester (III-1c)	179
9.11.3	Synthese von 3-[2-Methoxycarbonyl-2-(tritylamino)-ethoxycarbonyloxy]-2-(tritylamino)-propionsäuremethylester (X-i).....	179
10	Literaturverzeichnis.....	181
11	Lebenslauf.....	187
12	Veröffentlichungen.....	188

1 Einleitung

Proteasen sind Enzyme, welche die Spaltung von Peptidbindungen katalysieren. Nach dem IUBMB- oder EC-System (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) gehören sie zur Gruppe der Hydrolasen (EC 3.4). Die weitere Unterteilung erfolgt nach der Position der Spaltstelle des Substrat-Peptids in Endopeptidasen (EC 3.4.11-19) und Exopeptidasen (EC 3.4.21-99). Innerhalb dieser Untergruppen werden die Proteasen noch einmal nach dem Mechanismus der Katalyse in Aspartat-, Cystein-, Metallo-, Serin- und Threoninproteasen unterschieden.

Das parallel dazu existierende MEROPS-System^[1] gruppiert Enzyme, die aufgrund sehr ähnlicher Aminosäuresequenz als homolog eingestuft werden, zu Familien zusammen. Familien, die sich genetisch aus einem Ur-Protein entwickelt haben, werden in Clans zusammengefasst und nach einem Prototyp-Enzym benannt. Familien desselben Clans weisen ähnliche Tertiär- bzw. Quartärstrukturen auf.^[2] Die Bezeichnung jedes Clans besteht aus zwei Buchstaben, der erste bezeichnet den Katalysemechanismus (z. B. C für Cystein), der zweite wird fortlaufend vergeben. Cystein-Proteasen sind in der MEROPS-System-Datenbank^{*)} in sieben Clans aufgeteilt, wobei dem Papain-Clan (Clan CA) die meisten der bisher gefundenen Cystein-Proteasen angehören.

1.1 Vorkommen, Funktion und Bedeutung von Cystein-Proteasen

Cystein-Proteasen sind bei Pflanzen, Bakterien, Viren, Pilzen, Protozoen, Würmern und bei Säugetieren, also auch dem Menschen, weit verbreitet.^[3] Eine Auswahl der als pharmazeutische Targets wichtigsten Cystein-Proteasen zeigt Tab. 1.

Beim Menschen sind Cystein-Proteasen an einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt und nicht nur, wie zunächst angenommen wurde, für den unspezifischen Proteinabbau in der Zelle zuständig. Die Mehrzahl der humanen Cystein-Proteasen gehört zum Clan CA, wobei in die Familie C1, die lysosomalen Cathepsine, und die Familie C2, die cytoplasmatischen Calpaine, differenziert wird.

*) URL: <http://www.merops.sanger.ac.uk>

Tab. 1: Wichtige Cystein-Proteasen als pharmazeutische Targets nach Clans und Familien geordnet

Clan	Fam.	Subfam.	Protease	Herkunft	Spezifität d. Enzyms	Katalyse
CA	C1	C1A	Papain	<i>Carica papaya</i>	S2: lipophil z.B. Phe, Leu	Cys ⁻ , HisH ⁺
			Cathepsin B	<i>Homo sapiens</i>	S2: Arg	
			Cathepsine L, S, K, P, Q, X	<i>Homo sapiens</i>		
			Falcipain 1-3	<i>Plasmodium falciparum</i>	S2: lipophil z.B. Phe, Leu	
			Rhodesain	<i>Trypanosoma brucei</i>		
			Cruzipain 1+2	<i>Trypanosoma cruzi</i>		
C2	C10	C47	Calpain-2 (Ca ²⁺ -abhängig)	<i>Homo sapiens</i>	S2: Tyr, Met, Leu, Val, Arg	Cys ⁻ , HisH ⁺
			Streptopain	<i>Strept. pyogenes</i>	S2: lipophil	Cys ⁻ , HisH ⁺
			Staphopain A+B	<i>Staphylococcus aureus</i>	S2: lipophil	Cys ⁻ , HisH ⁺
			Clostripain	<i>Clostridium histolyticum</i>	S1: Arg	Cys ⁻ , HisH ⁺
CD	C11	C14	Caspase-1 = ICE	<i>Homo sapiens,</i> <i>Rattus norvegicus</i>	Asp X	Cys ⁻ , HisH ⁺
			Sortase A	<i>Staphylococcus aureus</i>	LPXT G	Cys, His, Arg
CL	C60	C60A C60B	Sortase B			
			Sortase A			
PA	C3	C3A	Poliovirus-type Picornain 3C	Humanes Poliovirus Typ 1		Cys, His
			C3E	HAV-Typ Picornain 3C	Hepatitis A-Virus	Q G
		C30	TGEV M ^{pro} SARS-CoV M ^{pro}	Porcine Transmissible Gastroenteritis Virus humanes SARS- Coronavirus	LQ A	Cys, His

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

Durch Überexpression oder Fehlregulation der Proteasen kann es zu unerwünscht hohen Aktivitäten der genannten Enzyme kommen. Dann werden auch körpereigene Strukturen abgebaut und es kommt zu pathologischen Zuständen. Vor allem die hochaktiven lysosomalen Cathepsine sind hier zu nennen. Die Ursachen dieser Überexpression sind weitgehend ungeklärt und werden intensiv beforscht. In Tumorgewebe z. B. wurden eine erhöhte Cathepsin-B-Expression und -sekretion nachgewiesen. Man glaubt, dass Cathepsin B eine wichtige Rolle bei der Tumordinvasion und der Metastasierung spielt.^[4]

Cathepsin B und L sind ubiquitär im menschlichen Körper vertreten, doch sind in den letzten Jahren auch gewebe- und funktionsspezifische Cathepsine, wie Cathepsin K in den

Osteoklasten, Cathepsin S in peripheren antigenpräsentierenden Zellen oder Cathepsin W in natürlichen Killerzellen, entdeckt worden.^[5]

Bei Parasiten spielen Cystein-Proteasen nicht nur für die Invasion in den Wirt und die Verbreitung innerhalb desselben oder den Schutz vor dessen Immunsystem eine wichtige Rolle. Die Erreger der Malaria, die Plasmodien, ernähren sich z. B. vom Proteinteil des menschlichen Hämoglobins und bauen diesen mit der Hilfe von Falcipainen ab.

In Tab. 2 sind eine Auswahl wichtiger humaner und parasitärer Cystein-Proteasen und deren physiologische und pathophysiologische Bedeutungen zusammengestellt.^{[3],[6],[5],[7],[8]}

Tab. 2: Humane und parasitäre Cystein-Proteasen und ihre physiologische und pathophysiologische Bedeutungen

Beteiligte(s) Enzym(e)	Physiologische Funktion	Pathophysiologischer Zustand
Humane Enzyme		
Cathepsin B + L	unspezifischer Proteinabbau, Endo- und Exopeptidaseaktivität (nur CB), TNF- α -vermittelte Apoptose von Hepatozyten, Hormonreifung	Tumorinvasion und Metastasierung? Muskuläre Dystrophie, chronische Entzündungen
Cathepsin K (B + L)	Knochenresorption, in Osteoklasten, Knorpelabbau in Gelenkfibroblasten	Beteiligung an Osteoporose, Beteiligung an Rheumatoider Arthritis
Cathepsin S + F + V	Abbau von Proteinen bei der Antigenpräsentation	Asthma, Autoimmunerkrankungen
Cathepsin S + K	Elastin-Abbau	Begünstigung der Arteriosklerose
Calpaine, Caspasen	Apoptose	Schlaganfall, Herzinfarkt, Katarakt, Alzheimer?
Parasitäre Cystein-Proteasen		
Protozoen		
Falcipaine 1-3 (<i>Plasmodium spec.</i>)		Malaria
Cruzipain (<i>Trypanosoma cruzi</i>)		Chagas-Krankheit
Rhodesain (<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>)		Schlafkrankheit
Cathepsin-L-like: Typ 1 + 2 Cathepsin-B-like: Typ 3 (<i>Leishmania spec.</i>)		Leishmaniose
23 Cystein-Proteasen (<i>Trichomonas vaginalis</i>)		Trichomoniasis
Amoebapain, Histolysin (<i>Entamoeba histolytica</i>)		Amöbenruhr
Plathelminthen (Plattwürmer)		
SmCL1, SmCL2 (CL-like), Sm31(CB-like) (<i>Schistosoma spec.</i>)		Bilharziose
Nematoden (Rundwürmer)		
Cathepsin L-like: TCCP1 (<i>Toxocara canis</i>)		Toxokariose

1.2 Aufbau und Struktur von Cystein-Proteasen des Papain-Clans

Die Gene der Cystein-Proteasen der Papain-Subfamilie werden zunächst zu Präproenzymen translatiert. Die Signal- oder Prä-Region besteht aus einem 15-21 Aminosäuren umfassenden Peptid. Diese Region ist dafür verantwortlich, dass das Präproenzym in das endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert werden kann. Dort wird das Signalpeptid abgespalten. Die Pro-Region ist für die korrekte Proteinfaltung, die Stabilisierung der Struktur im neutralen pH-Bereich des ER und den zielgerichteten Transport in das endosomal-lysosomale Kompartiment von Bedeutung.^[5] Die Größe des Propeptids ist sehr variabel, liegt aber bei den meisten Enzymen zwischen 95 und 108 Aminosäuren. Es stellt außerdem einen hochaffinen Inhibitor der katalytischen Domäne dar, damit eine Aktivierung des Enzyms auf dem Weg zu seinem Zielkompartiment verhindert wird. Dabei bindet die Propeptidkette in den Bindungsspalt, allerdings entgegengesetzt der normalen Substratbindungsrichtung und verhindert so die Bindung des Substrates. Die aktive katalytische Domäne schließlich umfasst zwischen 214 und 260 Aminosäuren.

Die meisten der Papain-ähnlichen Cystein-Proteasen (Subfamilie C1A) sind Monomere. Sie haben die Faltung des Papains gemeinsam (Abb. 1).

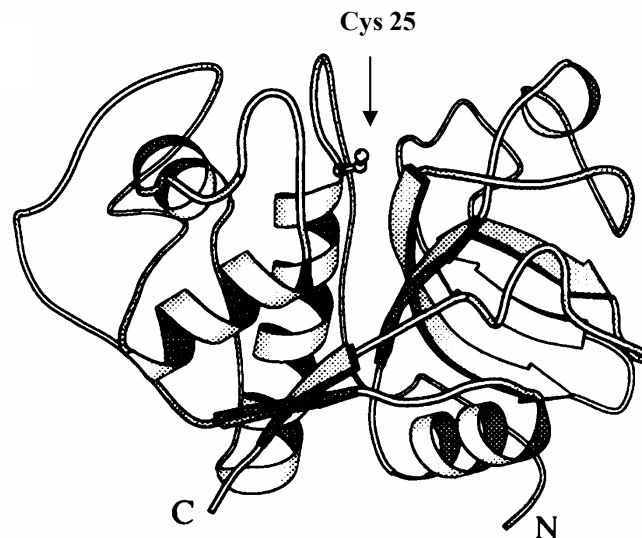


Abb. 1: 3D-Struktur von Papain, in der Mitte befindet sich der Spalt mit den katalytischen Aminosäuren

Die Papainfaltung ist in dieser Familie hoch konserviert. Das Enzym besteht aus zwei Domänen, die sich an der Oberseite in eine V-förmige Spalte teilen, die das aktive Zentrum enthält. Die linke (L-)Domäne enthält Cys25 in einer etwa 30 Aminosäuren umfassenden α -Helix, die rechte (R-)Domäne stellt His159.^[9] In dieser Spalte wird das Substrat zwischen beiden Domänen gebunden.

Eine Besonderheit, der sog. „occluding loop“ (Abb. 2, Mitte oben als Schleife zu erkennen), findet sich bei den Cathepsin B-like Proteasen. Er enthält zwei Histidin-Reste (His110 und His111), die für die zusätzliche Exopeptidaseaktivität dieser Proteasen verantwortlich sind. Wenn ein Substrat mit seinem C-terminalen Carboxylat daran bindet, so wird die Abspaltung eines Dipeptides ermöglicht (Dipeptidylcarboxypeptidase-Aktivität).

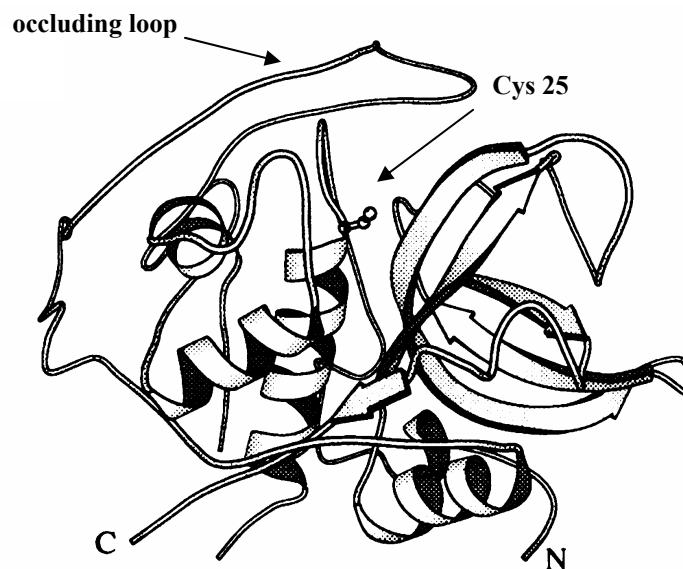
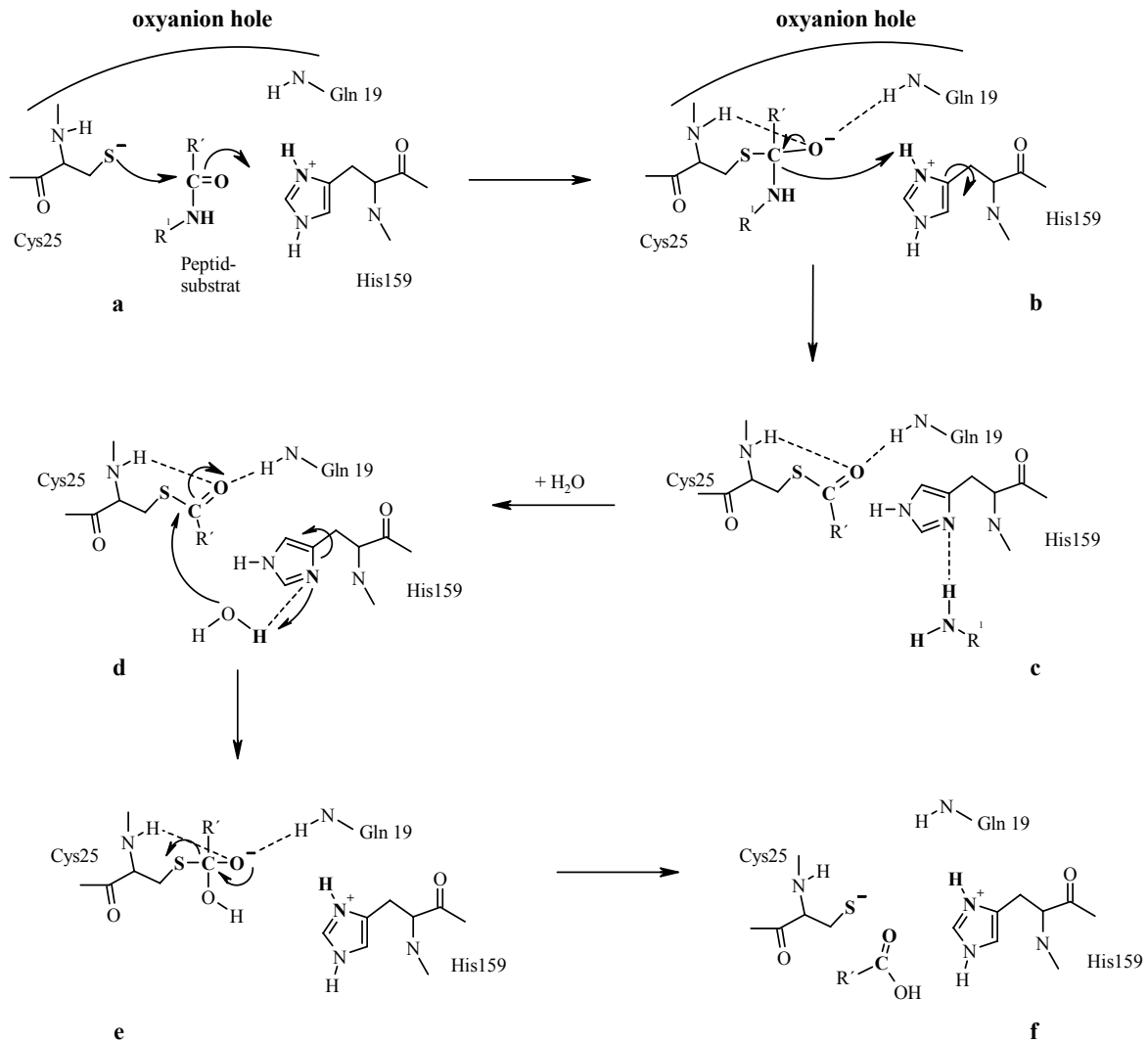


Abb. 2: Struktur von Cathepsin B mit dem occluding loop über dem katalytischen Spalt

1.3 Katalysemechanismus von Cystein-Proteasen

Die Aminosäurediade Cys25 und His159 (Papain-Nummerierung) bildet das katalytische Zentrum der Cystein-Proteasen. Im Unterschied zu z. B. den Serin-Proteasen liegt diese Diade schon präkatalytisch als Ionenpaar vor. Der Cystein-Rest liegt also als Thiolat-Anion vor und hat daher eine sehr viel höhere Nucleophilie im Vergleich zu Serin. Das Ionenpaar wird zusätzlich durch eine Wasserstoffbrücke zu Asn175 stabilisiert.^[6] Die

Thiolgruppe des Schwefels im Cystein hat normalerweise einen pK_s -Wert von 8, im aktiven Zentrum sinkt dieser auf etwa 3 bis 4 ab.^[10] Ursache hierfür ist wahrscheinlich das Dipolmoment der α -Helix im aktiven Zentrum, in der das Cystein vorliegt. Schema 1 zeigt den kovalenten Katalysemechanismus am Beispiel von Papain.



Schema 1: Katalysemechanismus von Cystein-Proteasen am Beispiel von Papain

Durch nucleophilen Angriff des Thiolats am Kohlenstoffatom der peptidischen Carboxylgruppe (**a**) entsteht ein negativ geladenes tetraedrisches Thiohalbacetal (**b**), das durch ein sog. „oxyanion hole“ stabilisiert wird. Es handelt sich dabei häufig um eine Tasche aus verschiedenen Wasserstoffbrückendonatoren des Proteinrückgrats oder benachbarter Aminosäureseitenketten, die im Falle von Papain durch die Seitenkette von Gln19 und der NH-Gruppe des Cys25-Rückgrats gebildet wird. Aus dem tetraedrischen Thiohalbacetal ent-

steht das an der Thiol-Gruppe acylierte Enzym (Thioester) (**c**), das durch Wasser und Basen-Katalyse des Histidins über einen zweiten tetraedrischen Übergangszustand zu regeneriertem Enzym und der Säure hydrolysiert (**d-f**) wird.^{[3],[6]}

Das pH-Optimum der meisten lysosomalen Cystein-Proteasen liegt im sauren Bereich, in neutralem bzw. schwach basischem Milieu werden sie rasch inaktiviert.^[11]

Nach der von Schechter und Berger etablierten Nomenklatur^[12] werden die Aminosäuren des Substrates von der Spaltstelle aus in Richtung des N-Terminus als P1, P2, P3... usw., in Richtung des C-Terminus als P1', P2', P3'... usw. bezeichnet. Die Bindungstaschen (sog. „subsites“) auf der Enzymseite werden entsprechend den Aminosäuren des Substrates, die sie binden, analog als S1, S2... bzw. S1', S2'... benannt.

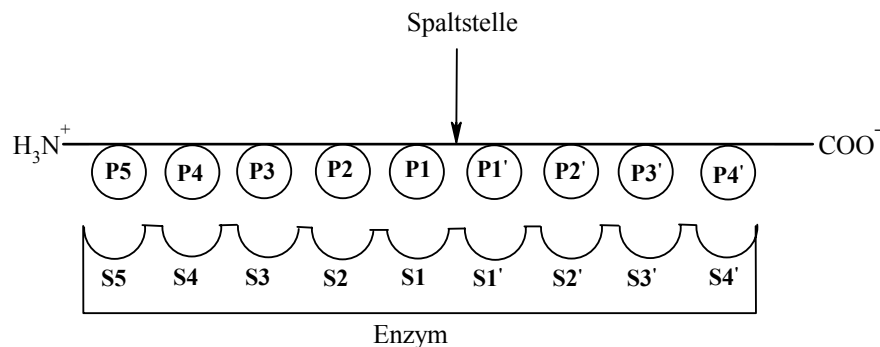


Abb. 3: Terminologie der Proteasespezifität nach Berger und Schechter

1.4 Inhibitoren von Cystein-Proteasen

Die meisten Inhibitoren von Cystein-Proteasen^{[3],[13]} wurden gemäß dem klassischen Substrat-basierten Prinzip für die Entwicklung von Proteasen synthetisiert. Sie haben generell eine reaktive (bei Cystein-Proteasen ist dies eine elektrophile) Kopfgruppe, ein sog. „warhead“, der mit einer Peptidkette verknüpft ist. Der Peptidteil ist die Erkennungssequenz für die entsprechende Protease und entspricht entweder der eines guten Substrats oder der eines natürlich vorkommenden peptidischen Inhibitors dieser Protease. Die elektrophile Kopfgruppe soll mit dem Cysteinat im aktiven Zentrum reagieren und die katalytische Fähigkeit des Enzyms blockieren.

Im Falle von Diazomethylketonen, Acyloxymethylketonen, *O*-Acyhydroxamaten oder Fluormethylketonen als elektrophiler Kopfgruppe kommt es zu einer irreversiblen Alkylier-

rung oder Acylierung. Werden Aldehyde, Ketone oder α -Ketosäuren verwendet, so kommt es durch Bildung eines Halbacetals bzw. -ketals zu einer reversiblen Hemmung, da die Halbacetalbildung reversibel ist. Dabei wird der tetraedrische Übergangszustand bei der Enzymkatalyse imitiert. Alle bisher erwähnten Verbindungen wirken durch kovalente Bindung an das Enzym. Bisher wurden nur wenige Inhibitoren beschrieben, die nicht-kovalent binden, unter ihnen die Peptidsulfone und Sulfonsäure-Derivate.^{[14],[15]}

Da Peptide als Arzneistoffe schlecht applizierbar sind und auch schnell von hydrolytischen Enzymen gespalten werden, geht die Entwicklung von Inhibitoren in eine peptidomimetische Richtung. Die Peptidkette wird z. B. durch Heterocyclen rigidisiert oder es werden unnatürliche Aminosäuren eingebaut, die zu einer besseren Stabilität gegen den hydrolytischen Abbau führen.

1.4.1 Nichtpeptidische Inhibitoren

Bisher wurden zwar sehr viele peptidische und immer mehr peptidomimetische Wirkstoffe synthetisiert, es sind jedoch vergleichbar wenige nichtpeptidische Wirkstoffe bekannt.^[16] Zu den irreversiblen Inhibitoren dieser Gruppe gehören die 3-Chlor-4-carboxamido-6-arylpyridazine (Abb. 4), die gegen das Interleukin Converting Enzyme (ICE, Caspase-1) gerichtet sind. Man vermutet, dass sie durch nucleophile Substitution des Chloratoms in Position 3 des Pyridazinrings durch das Thiolat des aktiven Zentrums wirken. Auch das als Hemmstoff der Alkoholdehydrogenase bekannte und zum Alkoholentzug eingesetzte Disulfiram wurde als Inhibitor der Caspasen 1 und 3 neu entdeckt. Disulfiram bildet mit dem Cystein im aktiven Zentrum ein gemischtes Disulfid.

Durch ein Screening entdeckt wurden die Homophthalimide, welche die 3C-Protease des humanen Rhinovirus (HRV) hemmen. Eine kovalente Bindung wurde massenspektrometrisch im Verhältnis 1:1 (Enzym/Inhibitor) nachgewiesen. Am wahrscheinlichsten ist der Angriff des Cysteins im aktiven Zentrum an der C₃-Carbonylgruppe.

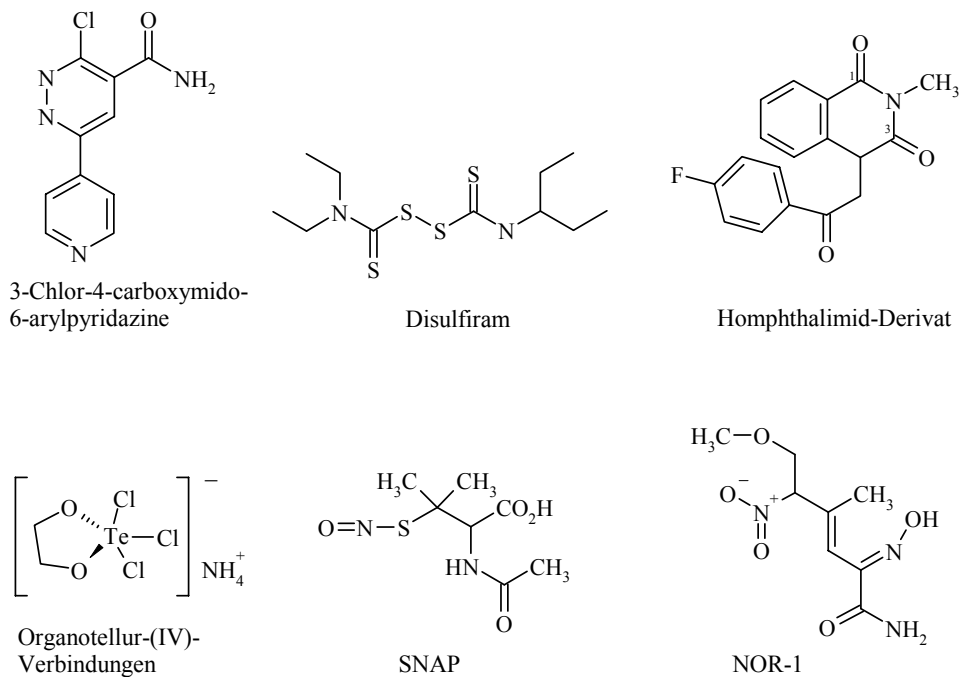


Abb. 4: Nichtpeptidische Cystein-Proteaseinhibitoren

Organotellur-(IV)-Verbindungen wurden als selektive irreversible Inhibitoren von Papain und Cathepsin B gegenüber Serin-, Aspartat- und Metalloproteasen gefunden, was durch eine Oxidation des aktiven Zentrums der Proteasen erklärt wird. Durch Thiolzusatz kann die katalytische Aktivität wieder hergestellt werden.

Ähnlich wirken auch die Stickstoffmonoxid-Donatoren wie *S*-Nitrosoglutathion (GSNO) oder *S*-Nitroso-*N*-acetylpenicillamin (SNAP). Neben der bekannten *S*-Nitrosylierung kommt es zur Ausbildung eines gemischten Disulfids zwischen dem Thiol des aktiven Zentrums und Glutathion bzw. *N*-Acetylpenicillamin. Auch hier kann die Wirkung durch Zusatz von Thiolen aufgehoben werden. Verbindungen wie NOR-1 oxidieren den Cysteinrest im aktiven Zentrum dagegen zur Sulfin- bzw. Sulfonsäure. Hier ist nur eine teilweise Regeneration mit Thiolen möglich.

Des Weiteren wurden noch verschiedene reversible nichtpeptidischen Inhibitoren synthetisiert, auf die an dieser Stelle nicht weiter eingegangen wird. Eine Übersicht geben ^[16] und ^[13].

1.4.2 Inhibitoren mit Michael-System

Die Gruppe der Inhibitoren mit Michael-System besteht aus unterschiedlichen Verbindungsklassen. Teilweise sind die Verbindungen peptidisch, teilweise peptidomimetisch, aber auch nichtpeptidische Verbindungen sind darunter.^[16] Gemeinsam ist diesen Verbindungen jedoch ihre elektrophile Gruppe, ein α,β -ungesättigtes System. Das β -Kohlenstoffatom der Doppelbindung kann mit dem Cysteinrest im aktiven Zentrum in einer Michael-Reaktion reagieren, wobei sich ein Thioether ausbildet, der stabil ist und das katalytische Zentrum irreversibel blockiert. Zu dieser Gruppe gehören die Peptidylvinylsulfone, Fumarsäure-Derivate oder Zimtsäure-Derivate.^[16] Unter diesen sind die Peptidylvinylsulfone eine der am weitesten entwickelten Inhibitorklassen. Sie sind stabil, relativ unreaktiv gegenüber anderen Nucleophilen und ihre Aktivierung wird erst durch die katalytische Aktivität der Cystein-Proteasen unterstützt. Aus Molecular-Modelling-Studien mit Cystein-Proteasen^[17] geht hervor, dass das Histidiniumion des aktiven Zentrums zu einem der Vinylsulfon-Sauerstoffatome eine Wasserstoffbrücke ausbildet. Diese polarisiert die Vinylgruppe, gibt dessen β -Kohlenstoffatom eine positive Teilladung und fördert so den nucleophilen Angriff durch das Cysteinat des aktiven Zentrums. Das andere Sauerstoffatom des Vinylsulfons kann eine weitere Wasserstoffbrücke zu einem Glutaminrest, der Teil des „oxyanion hole“ ist, ausbilden und unterstützt diese Reaktion. Bei dem nucleophilen Angriff des Cysteinats entsteht ein am α -C-Atom des Vinylsulfons negativ geladenes Addukt, das durch das Histidiniumion protoniert wird. Die hohe Differenz der pK_s -Werte des Histidins im aktiven Zentrum und des α -C-Atoms des Vinylsulfons führt dazu, dass das α -C-Atom nicht mehr deprotoniert werden kann. Dadurch wird die Reaktion irreversibel. Gleichzeitig bedingt dieser Mechanismus eine Selektivität gegenüber Serinproteasen, da deren Histidinrest im aktiven Zentrum nicht protoniert ist.^[17] Vinylsulfone sind weniger reaktiv gegenüber Nucleophilen als Vinylketone oder Vinyl-ester. Außerdem können sie sowohl in P- als auch in P²-Richtung modifiziert werden, was die Schaffung einer größeren Selektivität ermöglicht. Verschiedene Vinylsulfone wurden zur Hemmung von Cruzain, der Cathepsine K, V und S und vor allem von rhinoviralen 3C-Proteasen entwickelt.^[13]

Ein Vertreter der Vinylsulfone, CRA-3316 (Abb. 5), befindet sich gegenwärtig in Phase II der klinischen Prüfung gegen die Chagas-Krankheit.^{[18],[19],[20],†}

† URL: <http://www.celera.com>

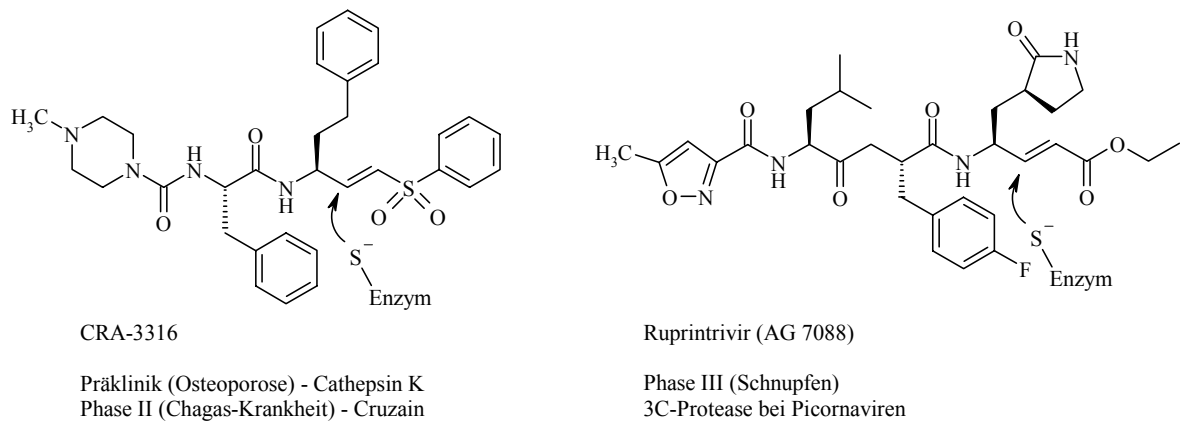


Abb. 5: Wirkstoffe mit Michael-System in klinischer Prüfung

Eine hochpotenter Vinylester ist Ruprintrivir (AG-7088) von Pfizer-Agouron.^[21] Er befindet sich gegenwärtig in Phase III der klinischen Prüfung als Nasenspray gegen Schnupfen. Ruprintrivir (Abb. 5) ist ein selektiver, irreversibler Inhibitor der rhinoviralen 3C-Protease^{[22],[23],[24]} und wurde auf der Basis von Röntgenkristallstrukturen des Enzyms mit vorhergehenden Inhibitoren rational entwickelt.

Auch Etacrynsäure, ein bekanntes Diuretikum,^{[25],[26]} besitzt aufgrund seines α,β -ungesättigten Ketons ein Michael-System. Die Verbindung sollte analog den Vinylsulfonen und Vinylestern in der Lage sein, Cystein-Proteasen durch eine Michael-Reaktion zu inaktivieren. Lange Zeit wurde vermutet, dass die diuretische Wirkung von Etacrynsäure auf einer kovalenten Bindung an Sulfhydrylgruppen von Tubulusproteinen in der Niere beruht.

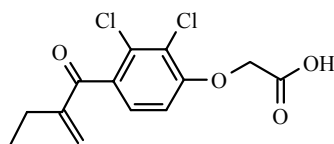


Abb. 6: Etacrynsäure

Neuere Untersuchungen^[27] weisen jedoch darauf hin, dass Etacrynsäure ein Prodrug ist und erst der Phase-II-Metabolit, das Cystein-Konjugat, die Wirkung ausübt. Man vermutet, dass das Konjugat einen ähnlichen Wirkungsmechanismus wie die Schleifendiuretika vom Furosemid-Typ hat. Diese hemmen den $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ -Transporter im aufsteigenden Schleifenschenkel von der Lumenseite her und verhindern die Resorption von Kalium-, Natrium- und Chloridionen. *In vitro* wurden eine hohe Affinität des Cystein-Konjugats der Etacrynsäure zu diesem Transporter nachgewiesen.

Physiologisch wird Glutathion durch Katalyse der Glutathion-S-Transferase (GST) an Etacrynsäure addiert und diese teilweise als Mercaptursäurederivat (*N*-Acetylcystein-S-

Konjugate) ausgeschieden. Etacrynsäure stellt tatsächlich ein gutes Substrat für die GST dar,^{[28],[29]} inhibiert das Enzym jedoch auch.^{[30],[31]}

Es wurde weiterhin berichtet, dass Etacrynsäure ein Inhibitor der Asparagin-Synthetase ist, die ebenfalls einen Cysteinrest im aktiven Zentrum besitzt.^[32] Die Substanz soll auch imstande sein, kaliumabhängige ATPasen von *Escherichia coli*^{[33],[34]} und Meerschweinchen^[35] zu inhibieren.

Von Kennedy *et al.* wurde Etacrynsäure auf die Wirkung bei Sichelzellanämie untersucht.^[36] Es stellte sich heraus, dass die Verbindung die Erythrozytenmembran durchquert und kovalent mit Sichelzellohämoglobin reagiert, was zu Destabilisierung des Polymers führt und die Blutviskosität erniedrigt. Außerdem erhöht Etacrynsäure allosterisch die Affinität von Hämoglobin zu Sauerstoff.

Bei einem Inhibitorscreening an Papain wurde festgestellt (T. Schirmeister, unveröffentlichte Ergebnisse), dass Etacrynsäure tatsächlich in der Lage ist, Cystein-Proteasen zu hemmen. Die Verbindung wurde daher als Leitstruktur für neue nichtpeptidische Cystein-Proteaseinhibitoren ausgewählt.

2 Zielstellung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Leitstruktur der Etacrynsäure an verschiedenen Positionen zu modifizieren (Abb. 7) und an unterschiedlichen Cystein-Proteasen zu testen. Dadurch sollte die Ableitung von Struktur-Wirkungsbeziehungen bezüglich einer Wirkungsverstärkung bzw. Selektivität gegenüber einzelnen Cystein-Proteasen ermöglicht werden, die dann als Grundlage für weiterführende Arbeiten dienen kann.

Dazu sollte zunächst die Länge der Seitenkette an der Doppelbindung variiert werden **(a)**. Ebenso sollte das Substitutionsmuster des aromatischen Ringes verändert und die Chloratome gegen andere Substituenten wie Methylgruppen ersetzt oder Verbindungen ohne Substituenten generiert werden **(b)**. Die Relevanz des aromatischen Ringes war zu untersuchen **(c)**, er sollte gegen einen cycloaliphatischen Rest ausgetauscht werden. Obwohl der angenommene Mechanismus der Inaktivierung die Anwesenheit eines α,β -ungesättigten Systems verlangt, sollte auch ein Derivat hergestellt werden, das an dieser Stelle eine Einfachbindung besitzt. So sollte überprüft werden, ob die Doppelbindung für die Wirkung essentiell ist **(d)**.

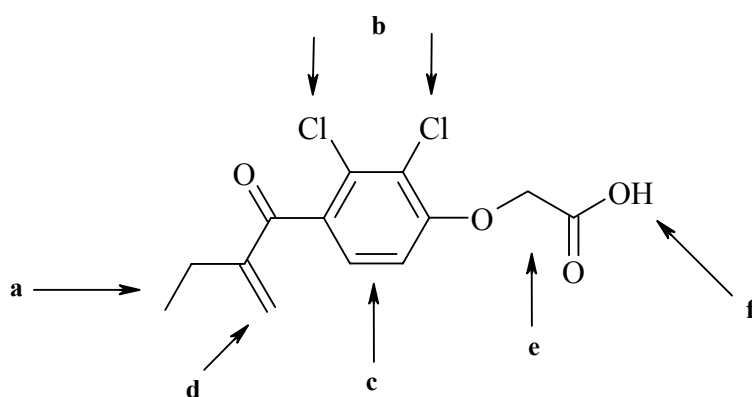


Abb. 7: Ansatzpunkte für Modifizierung der Etacrynsäure-Leitstruktur

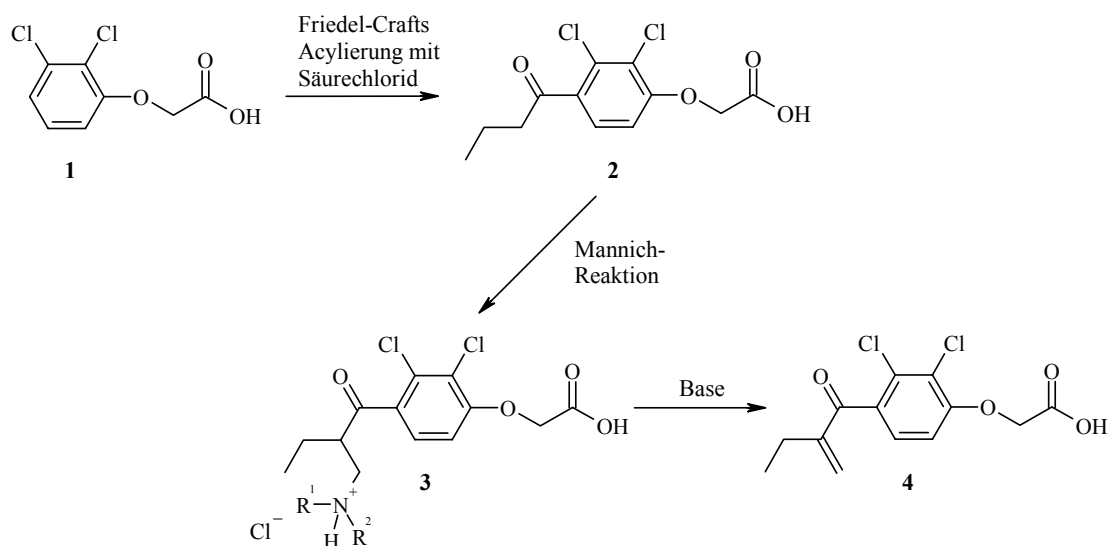
Es war weiterhin der Einfluss des Essigsäureteils **(e)** zu untersuchen. Dazu sollte dieser einerseits komplett durch eine Methylgruppe ersetzt werden, andererseits sollte untersucht werden, ob die Säurefunktion essentiell ist, oder ob Ester und/oder Amide eine bessere Wirkung aufweisen **(f)**.

Zur Verwirklichung dieser Ziele sollte ein Syntheseweg entwickelt werden, der eine Darstellung der Etacrynsäure und die Modifizierung der Leitstruktur an verschiedenen Positionen erlaubt.

3 Synthesen

3.1 Synthesen der Etacrynsäure und ihrer Strukturvarianten

Etacrynsäure wurde erstmals 1962 von Schultz *et al.*^[37] in der Literatur beschrieben (Schema 2). Der Syntheseweg geht aus von 2,3-Dichlorphenoxyessigsäure (**1**), die in einer Friedel-Crafts-Acylierung mit Buttersäurechlorid zur 2,3-Dichlor-4-butyrylphenoxyessigsäure (**2**) umgesetzt wird. Diese wird in einer Mannich-Reaktion in α -Position zur Keton-Gruppe aminomethyliert (**3**) und nachfolgend unter Abspaltung des Amins durch Behandlung mit einer Base zum α,β -ungesättigten Keton (**4**) olefiniert.



Schema 2: Synthese von Etacrynsäure nach Schultz *et al.*

Es werden keinerlei Angaben zu Reaktionsbedingungen gemacht, wohl hauptsächlich deshalb, da die Substanzklasse um Etacrynsäure im Jahre 1961 von der Fa. Merck & Co. zum Patent^[38] eingereicht wurde und es erst 1966 zur Offenlegung kam.

Im erwähnten Patent werden die Reaktionsbedingungen konkretisiert: Die Friedel-Crafts-Acylierung der Phenoxyessigsäure wird in Schwefelkohlenstoff und mit Aktivierung des Säurechlorids durch Aluminiumchlorid durchgeführt. Im zweiten Schritt werden für die Mannich-Reaktion Paraformaldehyd, trockenes Dimethylaminhydrochlorid und katalytische Mengen an Essigsäure eingesetzt. Es wird wasserfrei gearbeitet. Die Olefinierung geschieht in 10 %iger wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung bei erhöhter Tempera-

Für jede der synthetisierten Verbindungen wurde eine Kurzbezeichnung generiert. Dieser Code besteht aus drei Stellen. Die römische Ziffer an erster Stelle ordnet die Verbindung einer chemischen Stoffgruppe zu (Tab. 3).

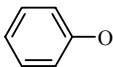
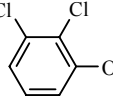
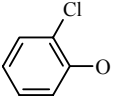
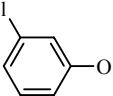
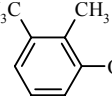
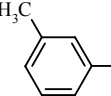
Tab. 3: Zuordnung zu einer chemischen Stoffgruppe

Nr.	Stoffgruppe
I	Anisole
II	acylierte Phenole
III	Phenoxyessigsäureethylester-Derivate
IV	Phenoxyessigsäureethylester-Derivate mit α,β -ungesättigter Keton-Struktur
V	Phenoxyessigsäuren (Etacrynsäure-Derivate)
VI	Etacrynsäure-Amide
VII	Anisole mit α,β -ungesättigter Keton-Struktur
VIII	acylierte Anisole

IX	Dehydroalanin-Derivate
X	verschiedene Verbindungen

Die arabische Ziffer an zweiter Position gibt das Substitutionsmuster des aromatischen Ringes der Gruppen I-VIII an (Tab. 4). Die letzte Stelle des Codes (a, b, ...) dient der fortlaufenden Nummerierung.

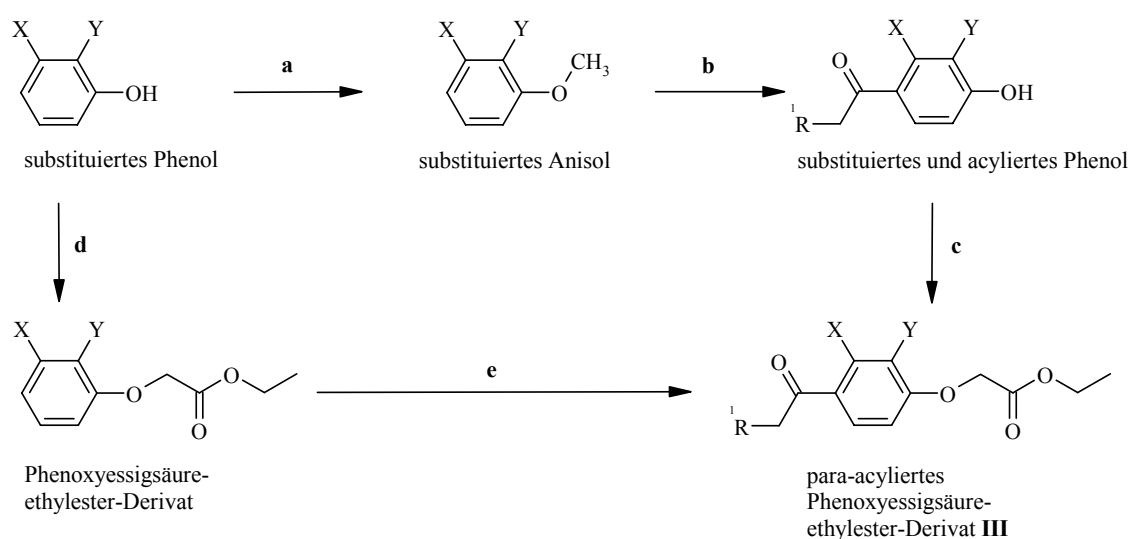
Tab. 4: Substitutionsmuster des aromatischen Ringes der Stoffgruppen I bis VIII

Nr.	0	1	2	3	4	5
Struktur						

Nachfolgend werden zunächst die Synthesen erörtert, die zu acylierten Phenoxyessigsäureethylester-Derivaten **III** führen. Anschließend werden die Möglichkeiten zur Einführung des α,β -ungesättigten Systems in diese Verbindungen zu den Zielverbindungsklassen **IV** und **V**, sowie die Synthesen zu Etacrynsäureamiden **VI** und Anisolen **VII** vorgestellt.

3.1.1 Synthese der acylierten Phenoxyessigsäureethylester-Derivate III

Um das Substitutionsmuster des aromatischen Ringes zu variieren, muss bereits zu Beginn der Synthese das entsprechend substituierte Phenol bzw. Anisol gewählt werden. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Phenole und einige Anisole waren kommerziell verfügbar. Die Gestalt der Seitenkette (R^1 in Schema 4) an der Doppelbindung wird bei der Friedel-Crafts-Acylierung durch eine entsprechend gebaute Carbonsäure bzw. das jeweilige Carbonsäurechlorid bestimmt.

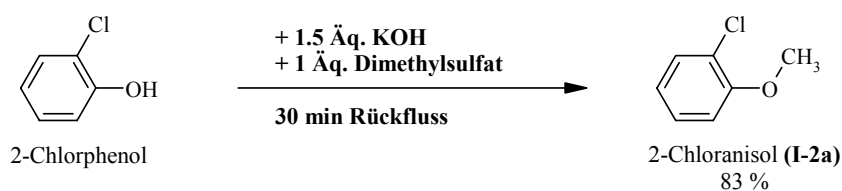


Schema 4: Syntheserouten von Phenol-Derivaten zu acylierten Phenoxyessigsäure-Derivaten III

Prinzipiell stehen zwei Wege zur Verfügung, um vom Phenol-Derivat zum entsprechend acylierten Phenoxyessigsäureethylester **III** zu gelangen (Schema 4). Das Phenol wird methyliert (**a**), dann wird der aromatische Ring acyliert und in derselben Reaktion anschließend der Methylether gespalten (**b**). Schließlich wird das acylierte Phenol mit Bromessigsäureethylester am Sauerstoff alkyliert (**c**).

Im zweiten Weg verethert man (**d**) das Phenol-Derivat mit Bromessigsäureethylester und acyliert nachfolgend (**e**) den Aromaten mit einem Säurechlorid zur Zielverbindung **III**.

3.1.1.1 Veretherung von Phenolen mit Dimethylsulfat



Schema 5: Methylierung von Phenolen mit Dimethylsulfat am Beispiel von 2-Chlorphenol

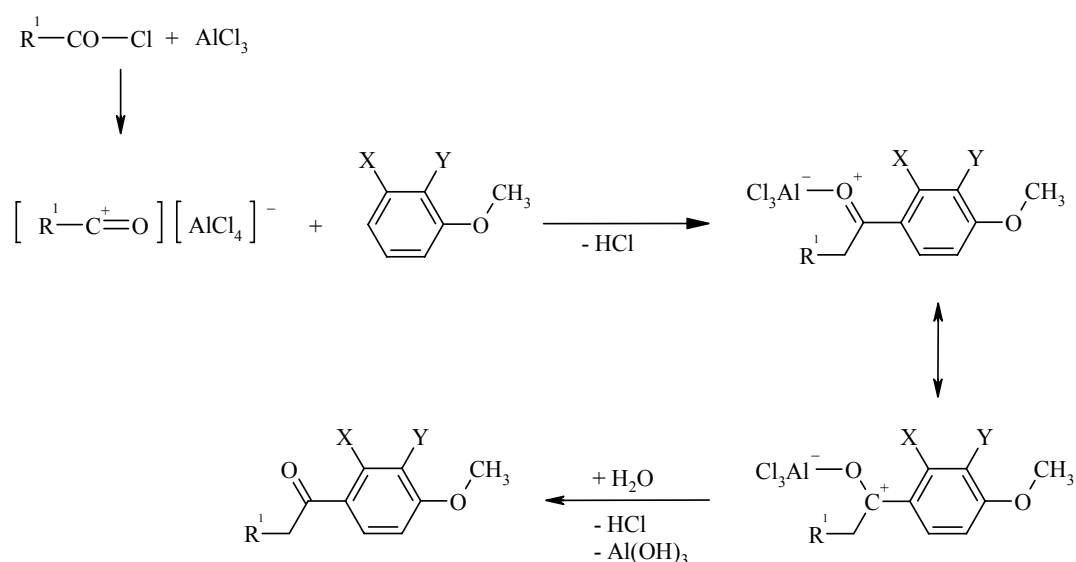
Man kann Phenole mit Iodmethan oder Dimethylsulfat methylieren. Iodmethan ist relativ teuer und auch stark flüchtig, weshalb Dimethylsulfat als Alkylans verwendet wurde. Die Alkylierung des 2-Chlorphenols verläuft in wässrig alkalischer Lösung mit Dimethylsulfat in sehr guten Ausbeuten (Schema 5). Ist das Phenol dagegen in para-Position acyliert, reduziert sich die Ausbeute um 10 bis 30 Prozent (Tab. 5).

Tab. 5: Ausbeuten der Methylierung verschiedener Phenole

Produkt	Struktur	Ausbeute
I-2a		83 %
VIII-2a		68 %
VIII-2b		53 %
I-4a		67 %

3.1.1.2 *Friedel-Crafts-Acylierung von Anisolen mit Säurechloriden und nachfolgende Etherspaltung mit Aluminiumchlorid*

Bei der Friedel-Crafts-Acylierung wird ein Aromat mit organischen Säurechloriden und einer Lewis-Säure wie z. B. Aluminiumchlorid oder Zinkchlorid in einem inerten Lösungsmittel in einer elektrophilen Substitutionsreaktion acyliert. Aus dem Säurechlorid und Aluminiumchlorid bildet sich in Abwesenheit von protischen Verbindungen ein Komplex mit einem reaktionsfähigen Kation am Carbonylkohlenstoff (Schema 6), das in der Lage ist, den Aromaten an der Stelle der höchsten Elektronendichte anzugreifen.^[39] Nach saurer Hydrolyse des entstandenen Komplexes erhält man ein gemischt aliphatisch-aromatisches Keton.

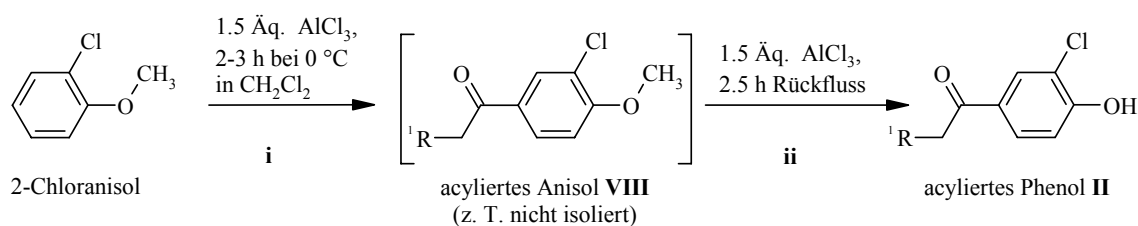


Schema 6: Reaktionsmechanismus der Friedel-Crafts-Acylierung

In der Literatur^[38] wird die Friedel-Crafts-Acylierung bei der Etacrynsäure-Synthese mit äquimolaren Mengen Aluminiumchlorid als Friedel-Crafts-Katalysator[‡] und mit Kohlenstoffdisulfid als Lösungsmittel durchgeführt. Kohlenstoffdisulfid hat den Vorteil, dass es nahezu keine Komplexbildung mit Aluminiumchlorid zeigt und der Katalysator fast vollständig der Reaktion zur Verfügung steht. Allerdings ist Kohlenstoffdisulfid wie die meisten apolaren Lösungsmittel nicht in der Lage, Aluminiumchlorid oder den Kom-

[‡] Der Begriff „Katalysator“ ist eigentlich falsch, da Aluminiumchlorid weder in katalytischen Mengen eingesetzt wird (sondern in mindestens äquimolaren) noch unverändert aus der Reaktion wieder hervorgeht.

plex aus Acylierungsprodukt und Aluminiumchlorid zu lösen.^[39] Man arbeitet daher in heterogener Phase. Aus diesem Grund und aufgrund der hohen Toxizität (Kohlenstoffdisulfid ist ein Nervengift) sowie der leichten Entflammbarkeit wurde auf dieses Lösungsmittel verzichtet. Es wurde, nach Woltersdorf *et al.*,^[40] Dichlormethan als Ersatz verwendet. Dies bringt zwar eine Reduktion der Ausbeuten durch Komplexbildung mit Aluminiumchlorid mit sich, die aufgrund der besseren Löslichkeit des Produkt-Komplexes, der geringeren Toxizität und besseren Handhabbarkeit jedoch in Kauf genommen wurde.



Schema 7: Friedel-Crafts-Acylierung von Anisolen mit Säurechloriden am Beispiel von 2-Chloranisol

Im ersten Schritt der Reaktion erfolgt die Acylierung (i, Schema 7). In welche Position der Acylrest bevorzugt dirigiert wird, hängt von den Substituenten am Aromaten ab. Man kann die Acylierungsstelle im ¹H-NMR-Spektrum erkennen. Ist der Aromat in ortho-Position zur phenolischen Hydroxylgruppe substituiert, so erscheint das Resonanzsignal für das Hydroxyl-Proton etwa zwischen 12 und 13 ppm, bei para-Substitution dagegen zwischen 5 und 6 ppm. Das liegt daran, dass sich bei ortho-Substitution eine Wasserstoffbrücke vom Phenol zum Carbonylsauerstoff des Acylrestes ausbilden kann (Abb. 8), welche

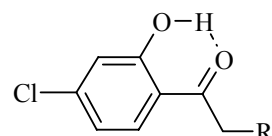


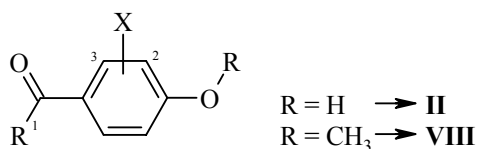
Abb. 8: H-Brückenbildung bei Acylierung in ortho-Position zur Hydroxylgruppe

zu einer Entschirmung des Protons und einer Tieffeldverschiebung des Resonanzsignals führt. Ist das Anisol in Position 2 des aromatischen Ringes substituiert oder in Position 2 und 3 disubstituiert, so kann man hauptsächlich das in para-Position zur Hydroxylgruppe acylierte Produkt isolieren (Tab. 6). Liegt dagegen eine 3-Substitution vor, so erhält man meist ein Gemisch aus ortho- und para-substituiertem Produkt in unterschiedlichen Verhältnissen, teilweise auch bisacylierte Verbindungen.

Ein gravierender Unterschied ergab sich bei der Acylierung von 2,3-Dimethylanisol mit Propionsäure- bzw. Buttersäurechlorid. Die Reaktion mit Propionsäurechlorid ergab lediglich eine 7 %ige Bisacylierung (Produkt II-4b, Tab. 6). Keines der Monoacylierungspro-

dukte konnte isoliert werden. Buttersäurechlorid lieferte dagegen nur 55 % para-Acylierung. Bei allen anderen Reaktionen wirkte sich die Länge des Acylrestes nicht aus.

Tab. 6: Ausbeuten der Friedel-Crafts-Acylierung bei unterschiedlichen Substitutionsmustern am Aromaten



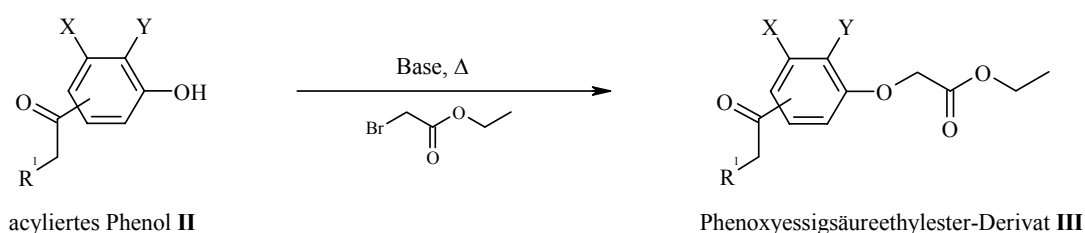
Ausbeute					
X	Position	o.-subst.	p.-subst.	o.- + p.-disubst.	R ¹
H			58 % (II-0a)		Et
Cl	2		76 % (II-2a)		Et
			70 % (II-2b)		Pr
			92 % (VIII-2c)		NiPr
Cl	3	43 % (II-3a)	11 % (II-3b)	3 % (II-3c)	Pr
	2 + 3		69 % (II-1a)		Pr
CH ₃	3	+ ^{*)}	42 % (II-5a)		Et
		+ ^{*)}	24 % (II-5b)		Pr
	2 + 3		3 % (II-4a) + 52 % (VIII-4a)	7 % (II-4b)	Pr Et

In einer Zeile stehen jeweils die Produkte eines Ansatzes mit einem Anisol; Et = Ethyl, Pr = Propyl, NiPr = 3-(4-Nitrophenyl)-propyl, MePr = 1-Methylpropyl; *): + = im ¹H-NMR-Spektrum nachweisbar, aber nicht isoliert.

Im zweiten Schritt (**ii**, Schema 7) wird erneut 1.5 Äq. Aluminiumchlorid zum Ansatz hinzugefügt und der Methylether durch Erhitzen unter Rückfluss gespalten. Diese Spaltung gelang nicht bei allen Verbindungen. So konnte bei 2,3-Dimethylanisol (**I-4a**) zwar eine Acylierung nachgewiesen werden, das acylierte Phenol **II-4a** konnte aber nur in einer Ausbeute von 3 % isoliert werden. Hauptprodukt dieser Reaktion war das acylierte Anisol **VIII-4a** mit 52 %. Auch bei der Acylierung von 2-Choranol mit 4-Nitrophenylbutyrylchlorid (**X-h**) konnte das erhaltene Anisol **VIII-2c** nicht zum Phenol gespalten werden.

Bei einigen Verbindungen war zu beobachten, dass das entstandene acylierte Phenol während der Demethylierungsreaktion durch überschüssiges Säurechlorid auch am Sauerstoffatom acyliert wurde. In diesem Falle konnte die Ausbeute des acylierten Phenols **II** durch Hydrolyse des Phenolesters mit wässriger Kaliumhydroxid-Lösung erhöht werden.

3.1.1.3 Veretherung von acylierten Phenolen mit Bromessigsäureethylester



Schema 8: Veretherung von Phenolen mit Bromessigsäureethylester

Um Phenole mit Bromessigsäureethylester zu verethern (Schema 8) arbeitet man in einem polaren Lösungsmittel und mit einer Base, um das nucleophilere Phenolat-Anion zu generieren. Hierbei gibt es mehrere Möglichkeiten (Tab. 7).

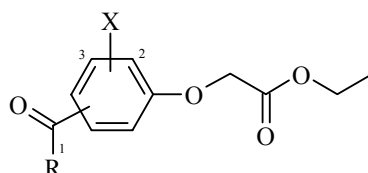
Tab. 7: Verfahren zur Veretherung von Phenolen mit Bromessigsäureethylester

Base	Lösungsmittel	Lit.
Natriumethanolat	Ethanol	[41]
Kaliumcarbonat	Aceton	[42],[43]
Kaliumcarbonat	DMF	[44],[45]
Kalium- <i>tert</i> butylat	THF	

Die klassische Williamson-Ethersynthese wurde wegen der aufwendigen Herstellung und problematischen Lagerung von Natriumethanolat nicht angewandt. Die anderen drei Verfahren wurden am acylierten Phenol **II-1a** untersucht (Tab. 8). Die Ausbeuten waren bei jedem der Verfahren zufrieden stellend. Für die Synthese der acylierten Phenoxyessigsäureethylester **III** wurde ein modifiziertes Verfahren mit Kalium-*tert*butylat als Base und mit

THF als Lösungsmittel erarbeitet, da der Einsatz von DMF aufgrund seiner Giftigkeit vermieden werden sollte. Außerdem ist wasserfreies THF leichter herzustellen als wasserfreies Aceton. Die Ausbeuten waren akzeptabel, sie lagen zwischen 52 und 78 %.

Tab. 8: Ausbeuten bei verschiedenen Verfahren zur Veretherung von acylierten Phenolen



Produkt	R ¹	X	Position	Verfahren	Ausbeute
III-1a	Pr	Cl	2 + 3	DMF/K ₂ CO ₃	75 %
				Aceton/K ₂ CO ₃	80 %
				THF/Kalium- <i>tert</i> butylat	60 %
III-0a	Et	H			78 %
III-1b	MePr	Cl	2 + 3		60 %
III-2a	Et	Cl	2		64 %
III-2b	Pr	Cl	2	THF/Kalium- <i>tert</i> butylat	73 %
III-3a	Pr	Cl	3		71 %
III-5a	Et	CH ₃	3		52 %
III-5b	Pr	CH ₃	3		77 %

Et = Ethyl, Pr = Propyl, MePr = 1-Methylpropyl

3.1.1.4 Veretherung von einfachen Phenolen mit Bromessigsäureethylester und Versuche zur anschließenden Friedel-Crafts-Acylierung

Die zweite Syntheseroute (Schema 4, Weg **d** und **e**), um zu acylierten Phenoxyessigsäureethylestern **III** zu kommen, beginnt mit der Veretherung von Phenolen mit Bromessigsäureethylestern und endet im zweiten Schritt mit der Friedel-Crafts-Acylierung des Phenoxyessigsäureethylesters. Die Alkylierung der einfachen Phenole mit Bromessigsäureethylester konnte in Ausbeuten von 67 % bei 2,3-Dimethylphenoxyessigsäure-

ethylester (**III-4a**) bis 91 % bei 2,3-Dichlorphenoxyessigsäureethylester (**III-1c**) mit den bereits beschriebenen Verfahren (Kapitel 3.1.1.3) erreicht werden.

Problematisch gestaltete sich die nachfolgende Friedel-Crafts-Acylierung. Bei 2,3-Dichlorsubstitution des Aromaten gelang die Acylierung nicht, weder mit Buttersäurechlorid noch mit Propionsäurechlorid. Bei 2,3-Dimethylphenoxyessigsäureethylester (**III-4a**) konnte bei der Acylierung mit 57 % dagegen eine ordentliche Ausbeute erzielt werden. Da die meisten substituierten Anisole kommerziell erhältlich waren und nicht erst aus den entsprechenden Phenolen synthetisiert werden mussten, wurde dieser Syntheseweg nicht weiter berücksichtigt.

3.1.1.5 Versuche zur Methyletherspaltung von acylierten Anisolen

Bei zwei der erhaltenen Friedel-Crafts-Acylierungsprodukten gelang es nicht, die Methylgruppe im zweiten Reaktionsschritt mit Aluminiumchlorid vollständig abzuspalten. Daher wurde nach anderen Wegen zur Methyletherspaltung gesucht. In der Literatur werden mehrere Verfahren beschrieben.^[46]

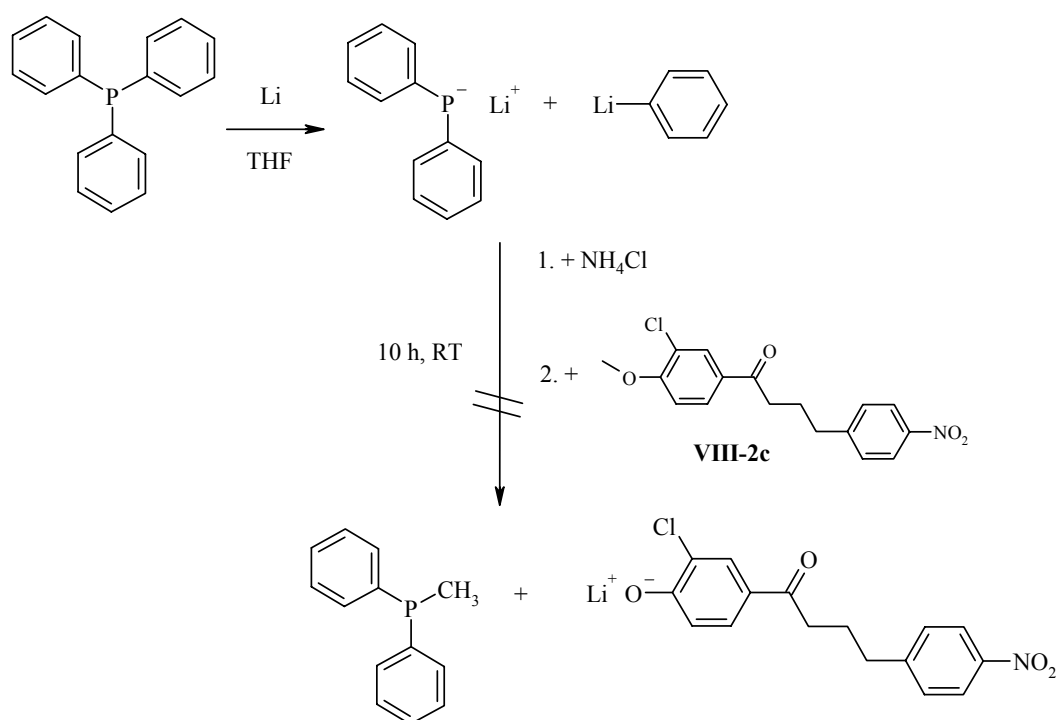
Zunächst wurde versucht beim acylierten Anisol **VIII-4a** durch Wechsel des Lösungsmittels eine Spaltung des Methylethers mit Aluminiumchlorid zu ermöglichen. Bisher wurde die Etherspaltung in Dichlormethan ausgeführt, das bei 41 °C siedet. Durch die Wahl von Chloroform mit einem Siedepunkt von 61 °C sollte die Reaktionstemperatur erhöht werden. Die Ausbeute konnte damit von 3 auf 15 Prozent verbessert werden (Tab. 9).

Tab. 9: Versuche zur Demethylierung von acylierten Anisolen

Edukt	Reagenz	Bedingungen	Lösungsmittel	Ausbeute	Lit.
VIII-4a	AlCl ₃	2.5 h Rückfluss	CH ₂ Cl ₂	3 % II-4a	[40]
	AlCl ₃	2.5 h Rückfluss	CHCl ₃	15 % II-4a	
	48 % HBr	16 h Rückfluss	Eisessig	0 %	[47],[48]
VIII-2c	AlCl ₃	2.5 h Rückfluss	CH ₂ Cl ₂	Spuren	[40]
	Triphenylphosphin, Lithium, NH ₄ Cl	RT, 10 h	THF	0 %	[49],[50]

Ein klassisches Verfahren ist die Etherspaltung mit Bromwasserstoff (HBr) in Eisessig. Auch nach 16-stündigem Erhitzen unter Rückfluss war $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch keine Umsetzung zu erkennen.

Nachdem das acylierte Phenol **VIII-2c** durch Aluminiumchlorid ebenfalls nicht in über den NMR-Maßstab hinausgehenden Mengen gespalten werden konnte, wurde in Anlehnung an Ireland^[49] und Mann^[50] die Spaltung mit Diphenylphosphin-Lithium in THF versucht (Schema 9).



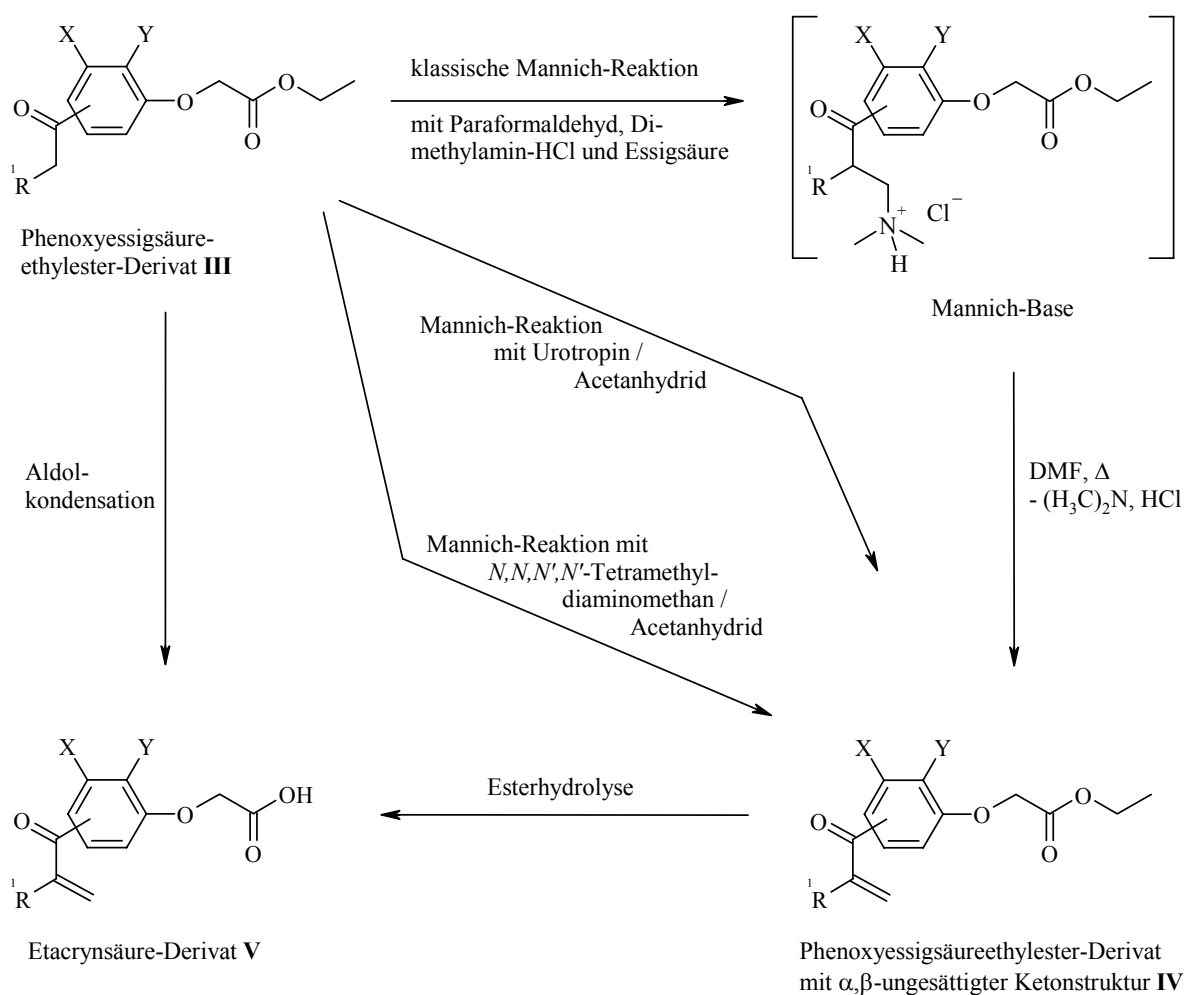
Schema 9: Versuch zur Demethylierung von VIII-2c mit Diphenylphosphin/Lithium in THF

Triphenylphosphin reagiert mit Lithium zu Lithiumdiphenylphosphid und Phenyllithium. Da befürchtet werden musste, dass das entstehende Phenyllithium in einer Art Grignard-Reaktion mit der Carbonylgruppe des Anisols weiterreagiert, wurde das Lithiumorganyl mit Ammoniumchlorid abgefangen. Nach Zugabe des zu spaltenden Anisols sollten sich Diphenylmethylphosphin und das Lithiumphenolat bilden. Auch dieses Verfahren führte leider nicht zum gewünschten Erfolg.

3.1.2 Einführung des Michael-Systems

Zur Einführung der Doppelbindung in die acylierten Phenoxyessigsäureethylester-Derivate **III** oder die acylierten Anisole **VIII** kann man sich prinzipiell zweier Verfahren bedienen (Schema 10).

1. Mannich-Reaktion^[51]: Man aminomethyliert die Methylengruppe in α -Position zum Keton in einer Mannich-Reaktion und eliminiert das Amin unter Ausbildung einer Doppelbindung. Es wurden drei Varianten dieser Reaktion getestet.
2. Aldolkondensation mit Formaldehyd: Formaldehyd wird an die α -Methylengruppe des Ketons addiert, durch Abspaltung von Wasser bildet sich das Michael-System aus.



Schema 10: Möglichkeiten zur Einführung des Michael-Systems am Beispiel der acylierten Phenoxyessigsäureethylester **III**

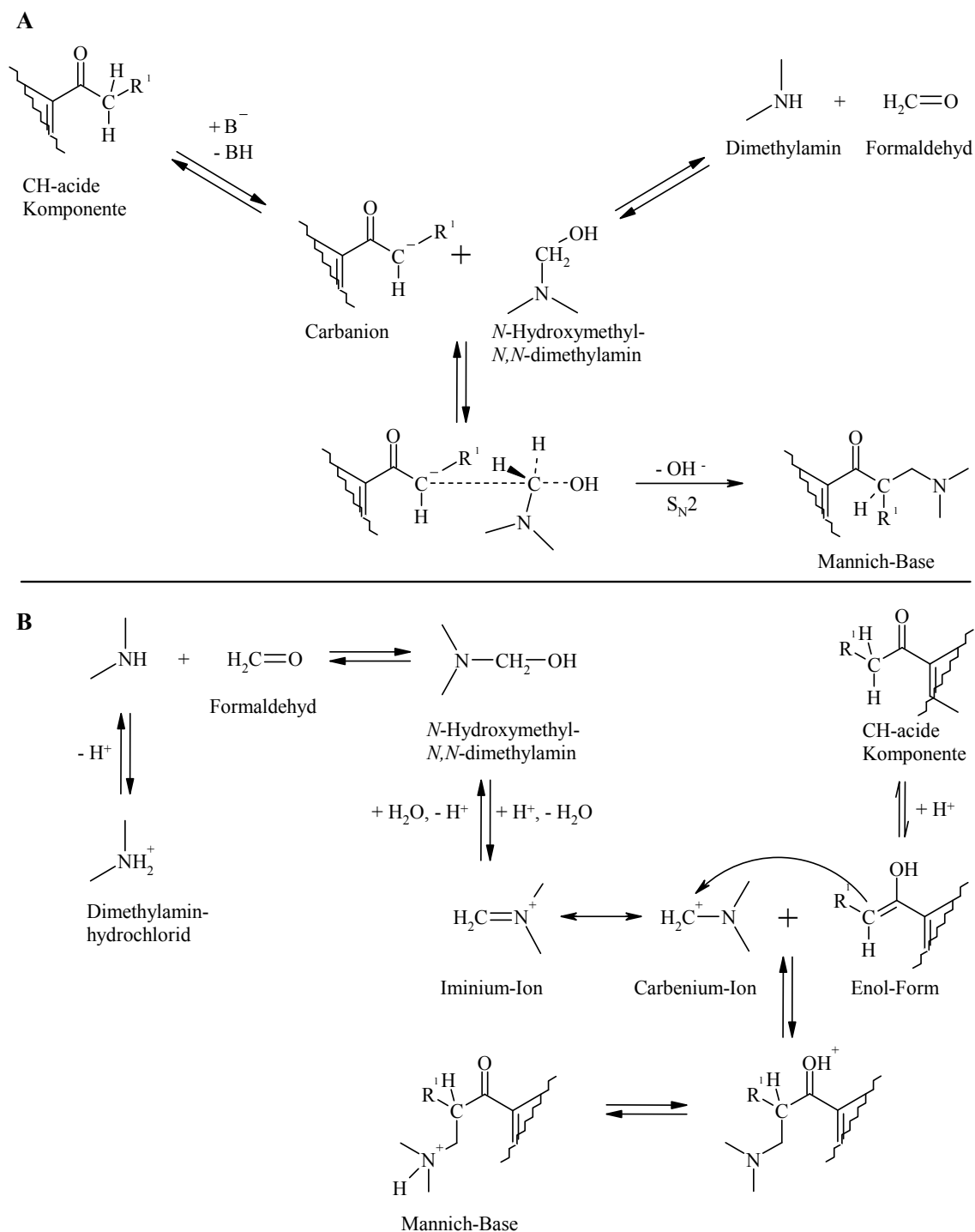
Bei der Mannich-Reaktion bleibt der Ethylester erhalten, unter den Bedingungen der Aldolkondensation wird er dagegen zur freien Säure hydrolysiert. Prinzipiell kann die Säure natürlich auch durch Hydrolyse des α,β -ungesättigten Ethylesters **IV** erhalten werden. Ein Anisol wird unter diesen Bedingungen nicht angegriffen.

3.1.2.1 *Versuche zur Mannich-Reaktion mit Dimethylaminhydrochlorid und Paraformaldehyd*

Es existiert eine Vielzahl an Untersuchungen zum Mechanismus der Mannich-Reaktion,^[52] wobei zwischen basischen und sauren Reaktionsbedingungen unterschieden wird.^[53] Schema 11 zeigt die postulierten Reaktionsmechanismen. Unter basischen Bedingungen (**A**) wird zunächst bei der CH-aciden Komponente durch die Base ein Carbanion generiert, das mit dem Additionsprodukt aus Dimethylamin und Formaldehyd in einer S_N2-Reaktion zur Mannich-Base reagiert. Dieser Schritt ist geschwindigkeitsbestimmend.

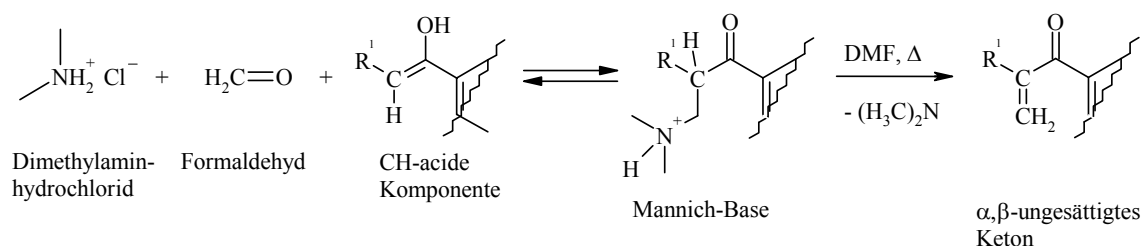
Unter sauren Bedingungen (**B**) wird die Bildung der Enolform der CH-aciden Komponente begünstigt. Dimethylamin steht mit seinem Hydrochlorid im Gleichgewicht und reagiert mit Formaldehyd zum Additionsprodukt *N*-Hydroxymethyl-*N,N*-dimethylamin. Dieses kann sauer katalysiert Wasser abspalten, wobei sich ein Carbenium-Iminium-Ion bildet. Durch nucleophilen Angriff der Enolform der CH-aciden Komponente an das Carbeniumion und anschließende Deprotonierung des Carbonylsauerstoffs entsteht schließlich die Mannich-Base.

Etacrynsäure wird in den Merck-Patenten unter leicht sauren Bedingungen mit Paraformaldehyd, Dimethylaminhydrochlorid und katalytischen Mengen Essigsäure^[38] ohne Lösungsmittel oder mit katalytischen Mengen Salzsäure in wasserfreiem Ethanol^[54] synthetisiert. Dabei wird die Mannich-Base als Hydrochlorid isoliert und in einer nachfolgenden Reaktion wird Dimethylamin mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung bei erhöhter Temperatur unter Ausbildung des α,β -ungesättigten Systems eliminiert. Es wurde versucht, diese Reaktion anzuwenden. Mit wasserfreiem Ethanol als Lösungsmittel konnten jedoch auch bei mehrstündigem (3 bis 4 h) Erhitzen weder die Mannich-Base noch das α,β -ungesättigte Kondensationsprodukt nachgewiesen werden.



Schema 11: Mechanismus der Mannich-Reaktion unter basischen (A) und sauren (B) Reaktionsbedingungen

Andere Autoren isolieren die Mannich-Base nicht, sondern eliminieren Dimethylamin in einem Folgeschritt durch Erhitzen mit DMF zum α,β -ungesättigten System.^[55] Dieses Verfahren (Schema 12) wurde am Beispiel von Etacrylsäureethylester getestet.



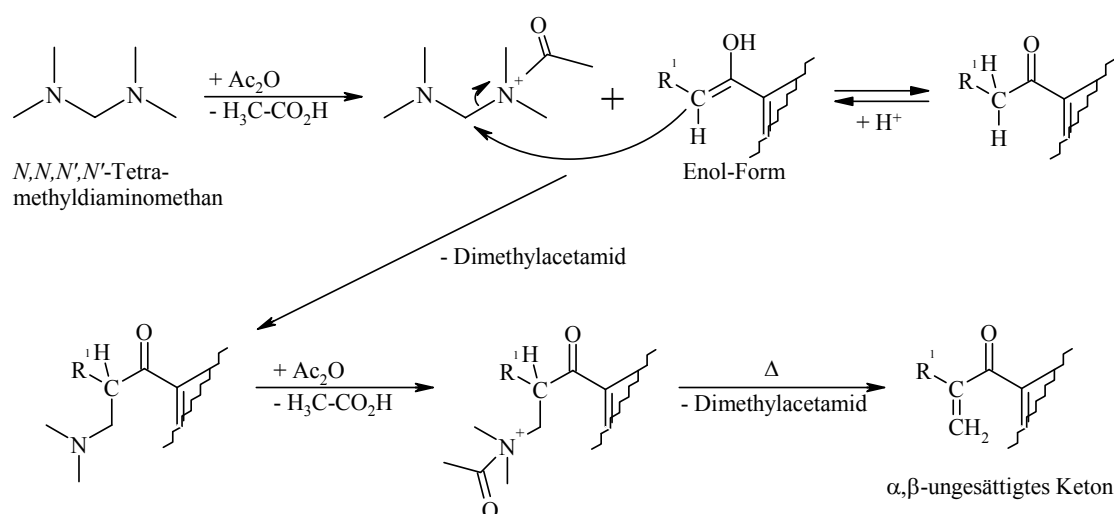
Schema 12: Mannich-Reaktion mit Dimethylaminhydrochlorid und Paraformaldehyd

Nach fünfstündigem Erhitzen bei 100 °C wurde DMF zum Reaktionsgemisch zugegeben und eine weitere Stunde erhitzt. ¹H-NMR-spektroskopisch konnte eine ca. 80 %ige Umsetzung zum gewünschten Produkt ermittelt werden. Probleme bereitete jedoch die Isolierung des Produkts, da das Edukt-Keton und das α,β -ungesättigte Produkt sehr ähnliche Löslichkeitseigenschaften haben. Weder durch Umkristallisation noch durch hydrostatische Säulenchromatographie konnten beide voneinander getrennt werden. Dieses Verfahren scheint eher für die in der Literatur beschriebenen Ansätze im 50- bis 100-Gramm-Maßstab geeignet zu sein.

Es wurde daraufhin nach Verfahren gesucht, die eine möglichst vollständige Umsetzung gewährleisten, um das Trennungsproblem zu umgehen. In den folgenden Kapiteln 3.1.2.2 und 3.1.2.3 werden zwei weitere Verfahren beschrieben, die dies ermöglichten.

3.1.2.2 *Mannich-Reaktion mit N,N,N',N'-Tetramethyldiaminomethan und Acetanhydrid*

Ein elegantes Verfahren zur Einführung der Doppelbindung ist die Mannich-Reaktion mit *N,N,N',N'*-Tetramethyldiaminomethan (TMDM) und Acetanhydrid.^[56] Die reaktive Zwischenstufe aus Formaldehyd und Dimethylamin liegt in dieser Verbindung bereits vor und wird durch Acylierung eines der beiden Stickstoffatome durch Acetanhydrid aktiviert (Schema 13). Es wird ein nucleophiler Angriff durch die α -Methylengruppe des Ketons an der positivierten Methylengruppe des TMDMs und die Ausbildung einer kovalenten Bindung postuliert. Durch eine Acylierung des zweiten Stickstoffes und nachfolgende Abspaltung von Dimethylacetamid kommt es zur Ausbildung des Michael-Systems.



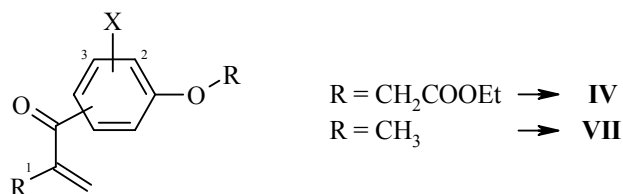
Schema 13: Mannich-Reaktion mit TMDM und Acetanhydrid

Der Verlauf der Reaktion kann $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch verfolgt werden. Eine vollständige Umsetzung konnte in den meisten, aber nicht in allen Fällen in angemessener Zeit (max. 14 d) erreicht werden. Die Ausbildung der Doppelbindung ist an der Zunahme der beiden Resonanzsignale der Methylengruppe meist deutlich zu verfolgen. Gleichzeitig nimmt das Signal der α -Methylengruppe im Keton ab. Letzteres ist jedoch häufig schwer zu sehen, da die Signale der Reagenzien diesen Bereich überlagern.

Bei der Aufarbeitung der Reaktionen soll zunächst Wasser zur Hydrolyse des überschüssigen Acetanhydrids zugegeben werden, dann das Produkt in Chloroform aufgenommen und die organische Phase mit Salzsäure gewaschen werden, um basische Verunreinigungen zu entfernen. Es stellte sich jedoch heraus, dass unter stärker sauren Bedingungen teilweise eine Retro-Aldolreaktion unter Abspaltung von Formaldehyd zur Ausgangsverbindung stattfindet und man so erneut das Problem der Trennung der beiden ähnlichen Substanzen hatte. Darum musste eine andere Aufarbeitungsmethode erarbeitet werden. Der Reaktionsansatz wurde mit wasserfreiem Chloroform verdünnt, dazu wurde gesättigte Kaliumhydrogencarbonat-Lösung gegeben. So wurde einerseits das überschüssige Acetanhydrid hydrolysiert und gleichzeitig entstandene Essigsäure abgefangen. Entstand kein Kohlenstoffdioxid mehr, wurden die festen Bestandteile abfiltriert und die braun gefärbte Lösung durch eine kurze Schicht von zuvor getrocknetem Kieselgel 60 filtriert. So konnten die meisten polaren und basischen Verunreinigungen entfernt werden und es entstand eine klare Lösung. Bei manchen Verbindungen war dennoch eine säulenchromatographische

Aufreinigung nicht zu vermeiden. Durch die aufwendige Reinigung lagen die Ausbeuten selten über 50 % (Tab. 10).

Tab. 10: Verbindungen, die mit TMDM / Acetanhydrid synthetisiert wurden



Produkt	R ¹	X	Position	Reaktionsdauer	Ausbeute
IV-1a	Et	Cl	2 + 3	7 d	24 %
IV-2a	Me	Cl	2	3 d	16 %
IV-2b	Et	Cl	2	3 d	33 %
IV-3a	Et	Cl	3	15 d	68 %
IV-5a	Me	CH ₃	3	3 d	14 %
IV-5b	Et	CH ₃	3	3 d	28 %
VII-2a	Me	Cl	2	14 d	21 %
VII-2b	Et	Cl	2	14 d	42 %
VII-2c	NiEt	Cl	2	7 d	46 %

Me = Methyl, Et = Ethyl, NiEt = 2-(4-Nitrophenyl)-ethyl.

3.1.2.3 Mannich-Reaktion mit Urotropin und Acetanhydrid

Bei einer kostengünstigeren Variante der Mannich-Reaktion wird das Mannich-Reagenz *N,N,N',N'*-Tetramethyldiaminomethan (TMDM) durch Urotropin (Hexamethylentetramin, Abb. 9) ersetzt.^[57] Der Reaktionsmechanismus ist derselbe wie der in Kapitel 3.1.2.2 beschriebene. Der Vorteil dieses Reagenzes ist die geringere Flüchtigkeit im Gegensatz zu TMDM und der geringere Preis. Die Verbindungen, die über dieses Verfahren synthetisiert wurden, zeigt Tab. 11. Die Ausbeuten unterscheiden sich nicht deutlich von der Methode mit TMDM. Vergleicht man die Reaktionszeiten der beiden Methoden, so verläuft die Reaktion mit Urotropin auf den ersten Blick schneller. Allerdings gelang das Verfahren nur bei den drei Verbindungen so schnell, die am benach-

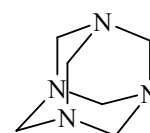
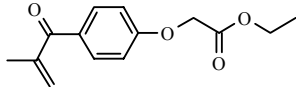
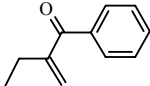
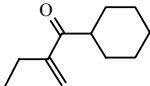


Abb. 9: Urotropin

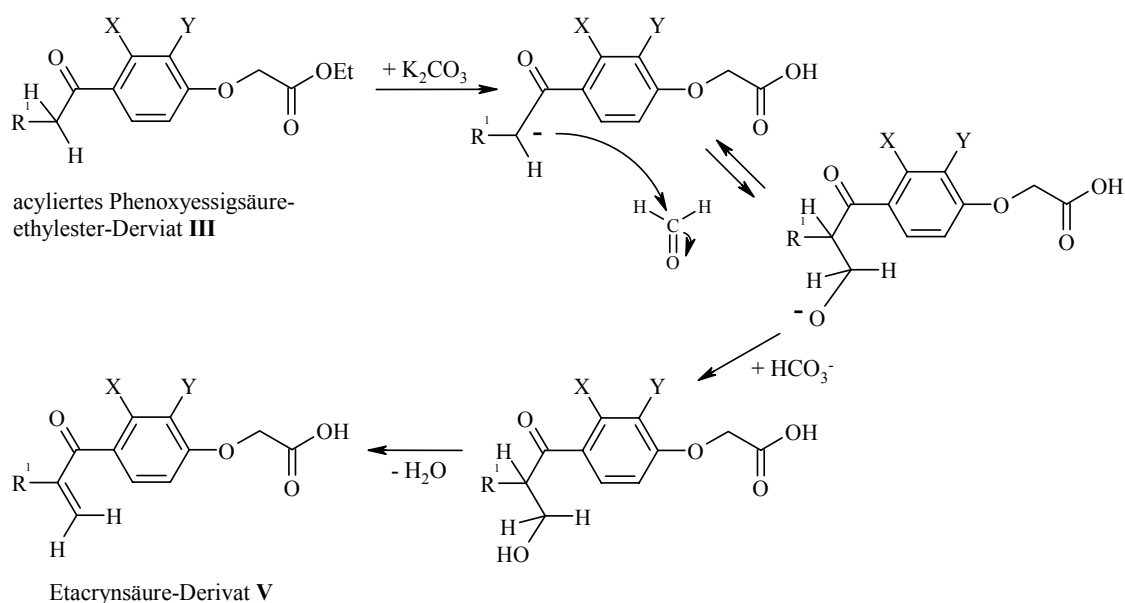
barten Ringsystem keine weiteren räumlich anspruchsvollen Substituenten trugen. Mit der Urotropin-Methode wurde auch versucht, die Verbindungen **VI-5a** und **VI-5b** zu synthetisieren, die in Position 3 des aromatischen Ringes eine Methylgruppe tragen. Nach 56 Stunden Reaktionsdauer war $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch nur eine geringe Umsetzung ($< 1\%$) zu sehen. Bei Zusatz von TMDM zu diesem Ansatz dagegen, startete die Reaktion unverzüglich. Da Urotropin im Vergleich zu TMDM sehr viel größer und raumgreifender ist, scheinen sterische Effekte den Angriff am α -C-Atom des aromatischen Ketons zu behindern. In solchen Fällen ist das kleinere TMDM als Reagenz zu bevorzugen.

Tab. 11: Mannich-Reaktion mit Urotropin/Acetanhydrid

Produkt	Struktur	Reaktionsdauer	Ausbeute
IV-0a		6 h	35 %
X-a		16 h	42 %
X-d		15 h	3 %

3.1.2.4 Aldolkondensation mit Formaldehyd

Ein völlig neuer Ansatz zur Einführung der Doppelbindung zu Etacrynsäure wurde 1970 in Deutschland zum Patent^[58] angemeldet. Der acylierte Phenoxyessigsäureethylester **III** wird in Ethanol mit Kaliumcarbonat als Base und wässriger Formaldehydlösung oder einer anderen Formaldehyd freisetzenden Verbindung wie z. B. Paraformaldehyd erhitzt. Unter diesen Bedingungen kommt es zur Spaltung des Ethylesters und zur Aldolreaktion, wobei Formaldehyd zunächst an die α -ständige Methylengruppe des aromatischen Ketons addiert wird und durch Wasserabspaltung schließlich das Michael-System entsteht (Schema 14). Dies geschieht leichter als bei aliphatischen Ketonen, da sich ein System konjugierter Doppelbindungen ausbilden kann.



Schema 14: Einführung der Doppelbindung über Aldolkondensation mit Formaldehyd

Nach diesem Verfahren wurden zwei Säuren hergestellt, Etacrynsäure (**V-1a**) und das 2,3-Dimethylderivat **V-4a** (Tab. 12). Auch hier ergab sich erneut das bereits erwähnte Trennproblem zwischen Eduktsäure und Produktsäure aufgrund der ähnlichen Struktur und damit nahezu gleichen Löslichkeitseigenschaften. Etacrynsäure konnte durch mehrfaches Umkristallisieren aus Benzen gereinigt werden. **V-4a** musste präparativ chromatographisch aufgereinigt werden.

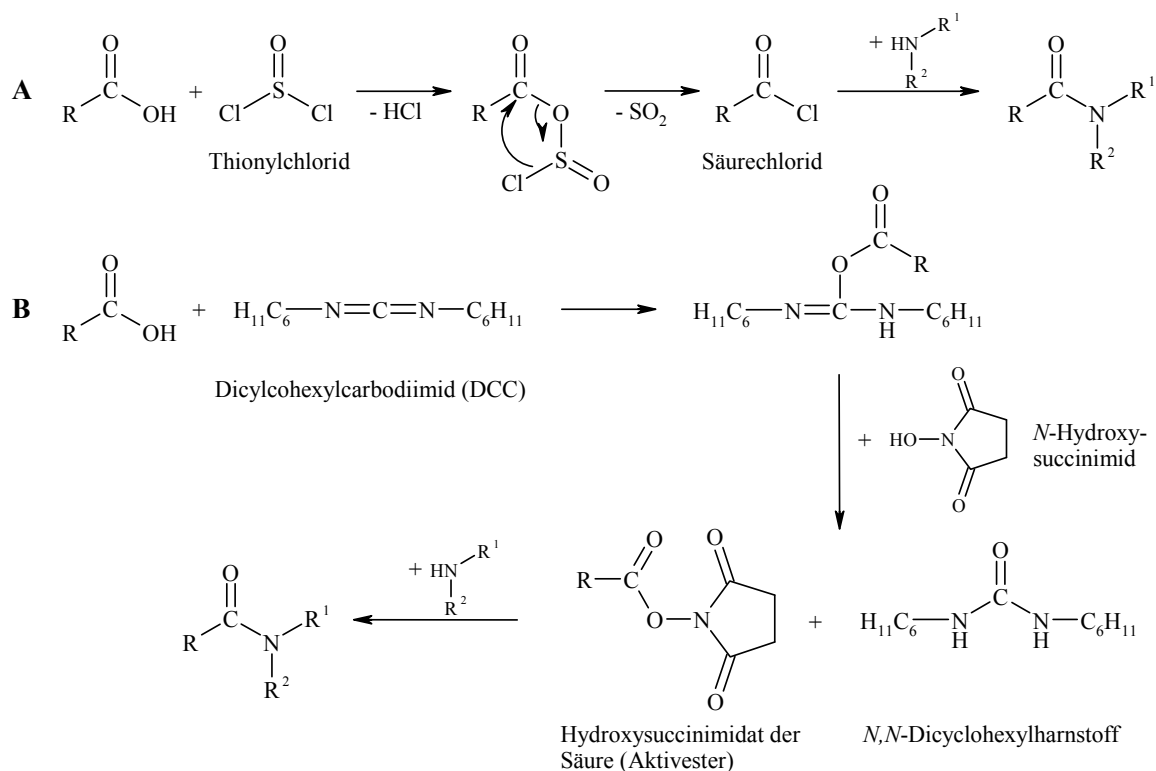
Tab. 12: Verbindungen, die durch Aldolkondensation mit Formaldehyd synthetisiert wurden

Produkt	Struktur	Reaktionsdauer	Ausbeute
V-1a		6 h	20 %
V-4a		8 h	15 %

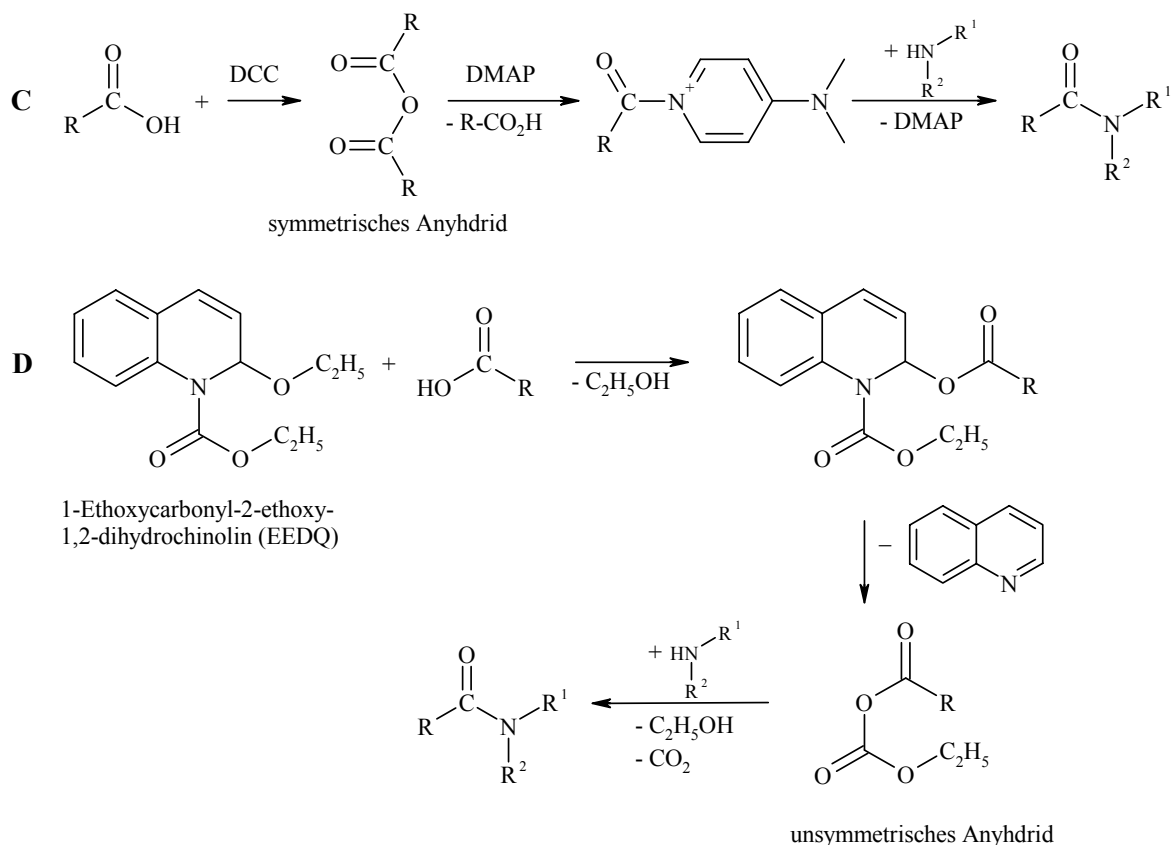
3.2 Synthese der Etacrynsäureamide

Da die Ausbildung der Amidbindung Energie benötigt und die Reaktion nicht bei beliebig hohen Temperaturen durchgeführt werden kann, muss für die Kupplung von Etacrynsäure mit Amiden entweder die Säure oder das Amin aktiviert werden. Aus der Peptidchemie ist eine Vielzahl von Syntheseverfahren bekannt.^[59] Da für die Aktivierung von Aminen bisher noch keine praktische Lösung gefunden worden ist, wird hauptsächlich die Aktivierung der Säurekomponente beschrieben. Einige der gängigsten Verfahren sind (Schema 15 und Schema 16):

1. die Aktivierung der Säure mit Thionylchlorid zum Säurechlorid (**A**),
2. die Synthese eines Aktivesters mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und *N*-Hydroxysuccinimid (**B**),
3. die Synthese über symmetrische Anhydride mit DCC und 4-*N,N*-Dimethylamino-pyridin (DMAP) (**C**) oder
4. die Synthese über unsymmetrische Anhydride mit z. B. EEDQ (**D**).



Schema 15: Mögliche Kupplungsmethoden von Etacrynsäure mit Aminen Teil 1



Schema 16: Mögliche Kupplungsmethoden von Etacrynsäure mit Aminen Teil 2

Für die Synthese von Etacrynsäureamiden wurden die Verfahren **A** und **B** getestet. Sie werden nachfolgend beschrieben.

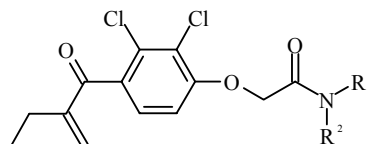
3.2.1 Amid-Kupplung mit Thionylchlorid

Da dieses Verfahren (Schema 15, **A**) in der Literatur bereits zur Synthese von Etacrynsäureamiden diente,^[60] wurde es zunächst an einem Amin (H-Gly-(*L*)-Ala-NH₂·HCl) getestet. Die Reaktion wurde in wasserfreiem THF ausgeführt, nach 3.5 Stunden Erhitzen unter Rückfluss wurde überschüssiges Thionylchlorid abdestilliert und zwei Äquivalente des Amins und die äquimolare Menge Triethylamin zur Freisetzung der Base zugegeben. Nach einer Stunde Rühren bei Raumtemperatur wurde nochmals 3 Stunden unter Rückfluss erhitzt und der Ansatz aufgearbeitet. Die Ausbeute des Amids **VI-1c** war mit 22 % nach Säulenchromatographie relativ gering. Deshalb wurde nach einer Alternative gesucht.

3.2.2 Amid-Kupplung mit DCC/*N*-Hydroxysuccinimid

Das Kupplungsverfahren über den Aktivester (Schema 15, **B**) ist relativ einfach durchzuführen und ist apparativ nicht aufwendig. Man legt die Säure sowie *N*-Hydroxysuccinimid in wasserfreiem Dichlormethan vor und gibt DCC langsam dazu, da die Reaktion u. U. heftig verlaufen kann. Der *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff beginnt sofort auszufallen. Man lässt die Reaktion über Nacht rühren und kann dann den Harnstoff abfiltrieren. Zu der Lösung gibt man das Amin, das ggf. mit Triethylamin aus dem Hydrochlorid freigesetzt wird, und lässt bei Raumtemperatur ein bis zwei Wochen rühren. Um Reste des *N,N'*-Dicyclohexylharnstoffs vollständig zu entfernen, wird das Rohprodukt nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum in wenig wasserfreiem Ethylacetat aufgenommen und etwa 1 Stunde gerührt. Der Harnstoff kristallisiert aus und kann abfiltriert werden. Ggf. wird die Prozedur wiederholt. Die Reaktion wurde zur Synthese von **VI-1a** und **VI-1e** getestet. Die Ausbeuten (Tab. 13) lagen zwischen 74 und 91 %, weshalb mit diesem Verfahren alle restlichen Etacrynsäureamide synthetisiert wurden.

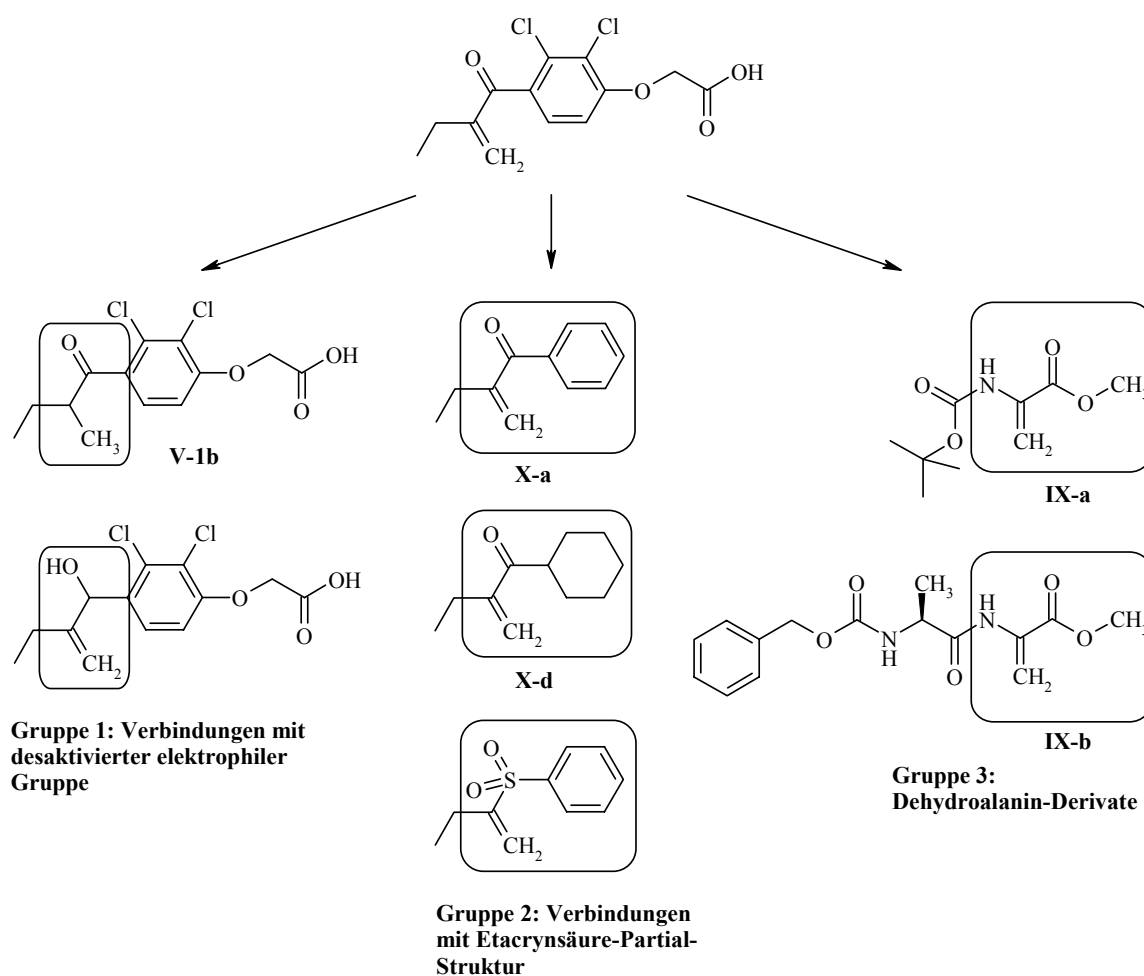
Tab. 13: Ausbeuten der Etacrynsäureamide



Produkt	-N(R ¹ R ²)	Ausbeute	Produkt	-N(R ¹ R ²)	Ausbeute
VI-1a	-(<i>L</i>)-Ala-OBzl	92 %	VI-1h		21 %
VI-1b	-(<i>D</i>)-Ala-OBzl	31 %	VI-1i		73 %
VI-1d	-Gly-(<i>L</i>)-Phe-NH ₂	55 %	VI-1j		91 %
VI-1e		74 %	VI-1k		71 %
VI-1f		70 %	VI-1l		82 %
VI-1g		27 %			

3.3 Variationen des Michael-Systems der Etacrynsäure

Die zur Variation des Michael-Systems synthetisierten Derivate wurden in drei Gruppen aufgeteilt, die strukturell ähnlich gebaut sind und die synthetisch meist auf ähnlichem oder gleichem Wege zugänglich waren (Schema 17). Zur ersten Gruppe gehören die Verbindungen, bei denen versucht wurde, entweder die Doppelbindung zu entfernen oder das α,β -ungesättigte Keton zum Alkohol zu reduzieren und so jeweils die elektrophile Gruppe zu deaktivieren. Diese Gruppe wird in Kapitel 3.3.1 behandelt.



Schema 17: Variationen des Michael-Systems von Etacrynsäure

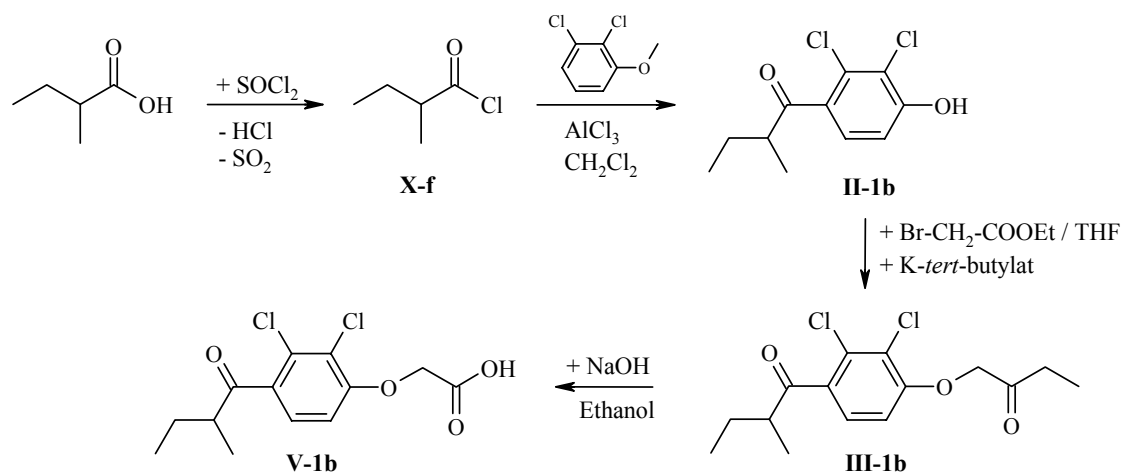
Zur zweiten Gruppe gehören Substanzen, bei denen die Etacrynsäure-Struktur auf den aromatischen Ring und das Michael-System reduziert wurden bzw. bei denen das aromatische Ringsystem gegen ein cycloaliphatisches ersetzt wurde oder das Keton gegen ein Sulfonyl getauscht werden sollte (Kapitel 3.3.2).

In der dritten Gruppe, die in Kapitel 3.3.3 behandelt wird, sind die Dehydroalanin-Derivate zusammengefasst, die das Michael-System ohne einen konjugierten Aromaten enthalten.

3.3.1 Synthese der Verbindungen mit desaktivierter elektrophiler Gruppe

3.3.1.1 Synthese von [2,3-Dichlor-4-(2-methylbutyryl)-phenoxy]-essigsäure (V-1b)

Die Synthese von [2,3-Dichlor-4-(2-methylbutyryl)-phenoxy]-essigsäure (**V-1b**) folgt dem Reaktionsweg der übrigen Etacrynsäure-Derivate. Zunächst wird 2-Methylbuttersäure mit Thionylchlorid in das Säurechlorid **X-f** überführt (Schema 18). Im zweiten Schritt wird nach Friedel-Crafts zum acylierten Phenol **II-1b** umgesetzt (s. Kapitel 3.1.1.2) und anschließend mit Bromessigsäureethylester zu Verbindung **III-1b** verethert (s. Kapitel 3.1.1.3).

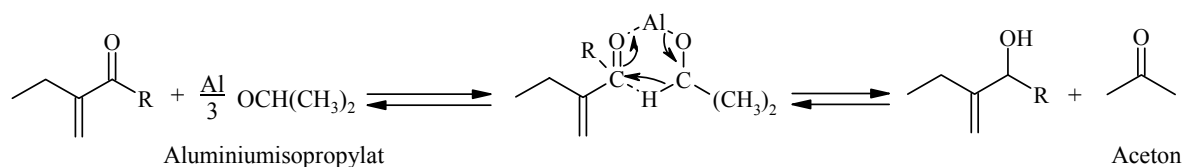


Schema 18: Syntheseweg zu [2,3-Dichlor-4-(2-methylbutyryl)-phenoxy]-essigsäure

Der erhaltene [2,3-Dichlor-4-(2-methylbutyryl)phenoxy]-essigsäureethylester (**III-1b**) wird schließlich mit Natriumhydroxid in Ethanol zur freien Säure verseift. Die Ausbeute betrug 56 % der freien Säure **V-1b** und 40 % des Natriumsalzes **V-1c**, das beim Abkühlen der Reaktionsmischung aus Ethanol ausfällt.

3.3.1.2 Versuche zur Synthese von Etacrynsäurealkohol

Um die Keton-Funktion der Etacrynsäure zum Alkohol zu reduzieren, wurde zunächst die sehr schonende Methode der Meerwein-Ponndorf-Verley-Reduktion getestet.^[61] Das Keton wird dabei mit Aluminiumisopropylat in wasserfreiem Isopropylalkohol erhitzt. Das Isopropylat soll in einer Gleichgewichtsreaktion zum Aceton oxidiert, das α,β -ungesättigte Keton zum Vinylalkohol reduziert werden. Durch destillative Entfernung des Acetons soll das Gleichgewicht auf die Seite des Vinylalkohols verschoben werden (Schema 19).^{[62],[63]}



Schema 19: Mechanismus der Meerwein-Ponndorf-Verley-Reduktion

Auch bei dreifachem Überschuss an Aluminiumisopropylat und 27-stündigem Abdestillieren konnte keine Reduktion festgestellt werden.

In einem zweiten Versuch wurde die Reduktion mit komplexen Hydriden getestet. Das Problem dabei ist, ein entsprechend mildes Reduktionsmittel zu finden, damit nur das α,β -ungesättigte Keton reduziert wird, und nicht die Säure oder die Doppelbindung.^[64] Nach Chaikin *et al.*^[65] können solche Ketone in alkalisch wässrigem Milieu mit Natriumborhydrid ($NaBH_4$) bei Raumtemperatur reduziert werden. Problematisch kann allerdings die Hydrolyse der als Zwischenstufe auftretenden Alkylborate sein und es erfordert u. U. mehrstündiges Erhitzen in konzentrierter Lauge. Auch dieser Versuch führte zu keinem Erfolg.

Auch ein biochemischer Ansatz wurde durchgeführt. Von Ohara *et al.* wurde bereits die Reduktion von Etacrynsäure durch Dihydrodiolreduktasen, die in humaner Leber vorkommen, beschrieben.^[66] Da Dihydrodiolreduktasen nicht verfügbar waren, wurde getestet, ob Etacrynsäure durch Alkoholdehydrogenase reduziert werden kann. Dazu wurden 495 μ mol Etacrynsäure (150 mg) mit 1485 μ mol Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, Dinatriumsalz (NADH) und 4400 U Alkoholdehydrogenase in 25 ml 500 mM Tris-Puffer pH 8.8 gelöst und 2 Tage lang bei 30 °C inkubiert. Nach Aufarbeitung konnte 1H -NMR-spektroskopisch keine Veränderung zum Edukt beobachtet werden. Die Alkoholdehydrogenase ist zwar

sehr unspezifisch in der Wahl ihres Substrates, doch ist Etacrynsäure vielleicht zu lipophil für eine Bindung an das aktive Zentrum oder der Aromat ist räumlich zu anspruchsvoll für die Substratbindungstasche des Enzyms.

Schließlich wurde eine weitere Hydrid-Reduktions-Methode getestet. Nach Dubuffet *et al.*^[67] können α,β -ungesättigte Ketone durch 3 Äquivalente Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAH) bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ in wasserfreiem Diethylether unter Stickstoffatmosphäre zum Vinylalkohol reduziert werden, ohne dass die Säurefunktion angegriffen wird. Nach 3 Stunden wird das Hydrid durch verdünnte Schwefelsäure zersetzt und der Ansatz aufgearbeitet. Ein entsprechender Ansatz wurde durchgeführt. $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch war zu sehen, dass die Reduktion stattgefunden hat. Offenbar wurde zum Teil die Säure aber ebenfalls reduziert, da auch ein Resonanzsignal für ein Aldehyd-Proton bei 9.9 ppm zu erkennen war. Es wurde versucht, die restliche Säure alkalisch auszuschütteln, was nicht gelang.

3.3.2 Synthese der Verbindungen mit modifizierter Etacrynsäure-Partialstruktur

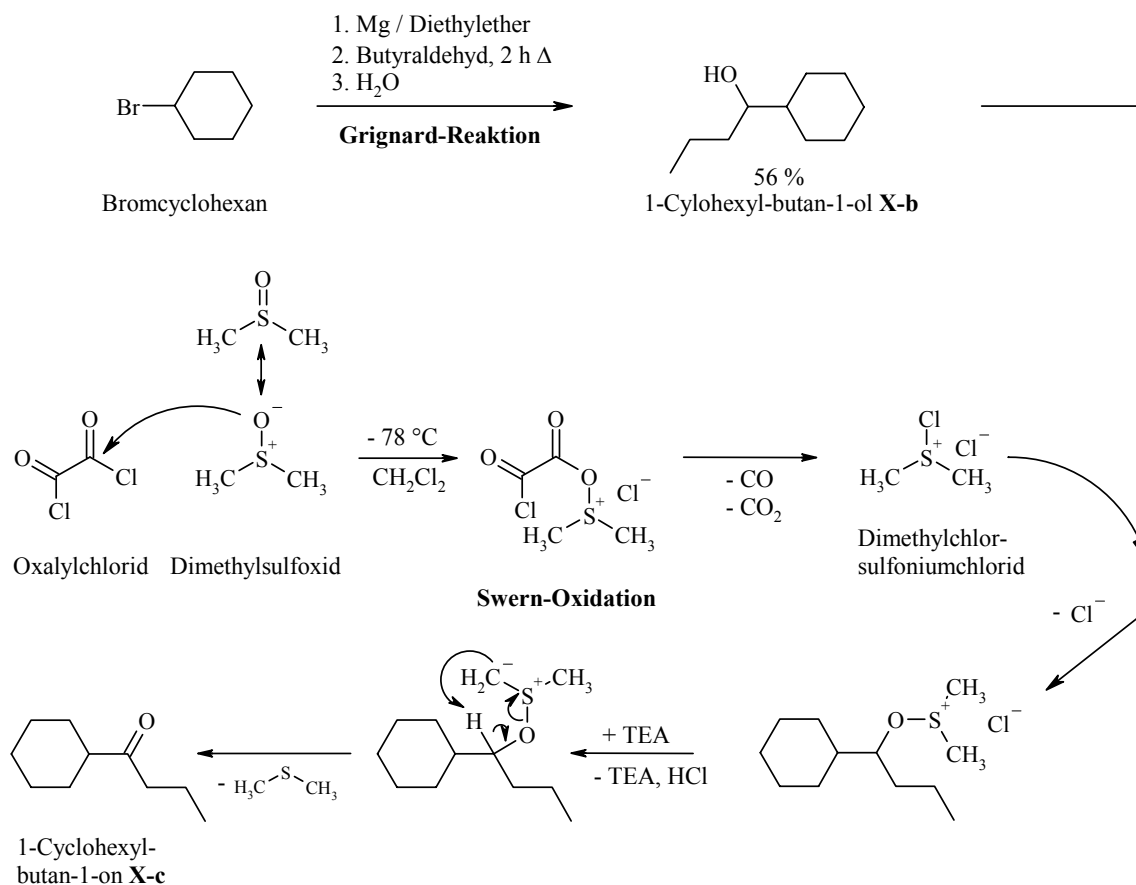
3.3.2.1 Synthese von 2-Methylenbutyrophenon (**X-a**)

2-Methylenbutyrophenon (**X-a**) wird durch Mannich-Reaktion aus Butyrophenon, das kommerziell erhältlich ist, synthetisiert. Es wurde der Syntheseweg mit Urotropin/Acetanhydrid (s. Kapitel 3.1.2.3) gewählt, wobei nach Destillation eine Ausbeute von 42 % erreicht wurde.

3.3.2.2 Synthese von 1-Cyclohexyl-2-methylenbutan-1-on (**X-d**)

Die Synthese von 1-Cyclohexyl-2-methylenbutan-1-on (**X-d**) ist in Schema 20 wiedergegeben. Man geht von Bromcyclohexan aus, das in einer Grignard-Reaktion mit Butryraldehyd zur Reaktion gebracht wird.^[68] Nach Hydrolyse und Destillation werden 56 % 1-Cyclohexyl-butan-1-ol (**X-b**) erhalten. Der Alkohol wird im zweiten Schritt in einer Swern-Oxidation^[69] mit Dimethylsulfoxid (DMSO) und Oxalylchlorid zum Keton oxidiert. Dabei bildet sich zunächst aus Oxalylchlorid und DMSO das Dimethylchlorsulfoniumchlorid.^[70] Dieses alkyliert zunächst den Alkohol am Sauerstoff und oxidiert ihn unter Katalyse von Triethylamin (TEA) in einer intramolekularen Reaktion zum Keton **X-c**.

Das Keton wird analog in der Mannich-Reaktion mit Urotropin/Acetanhydrid zum α,β -ungesättigten Keton **X-d** umgesetzt (s. Kapitel 3.1.2.3). Das Produkt musste säulenchromatographisch und destillativ gereinigt werden. Die Ausbeute der letzten Stufe betrug nur 3 %.

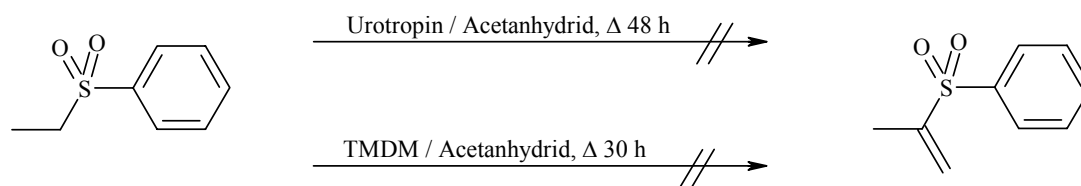


Schema 20: Synthese von 1-Cylohexyl-butan-1-on mittels Grignard-Reaktion und anschließender Swern-Oxidation

3.3.2.3 Versuche zur Einführung der Doppelbindung in Ethylphenylsulfon

Ethylphenylsulfon sollte über die Mannich-Reaktion analog den Ketonen in die α,β -ungesättigte Verbindung überführt werden (s. Kapitel 3.1.2.2 und 3.1.2.3). Der Reaktionsverlauf wurde $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch verfolgt. Bei einer Umsetzung sollte das Quartett der Methylengruppe nach und nach verschwinden und zwei neue Signale für die entstandene Doppelbindung erscheinen. Sowohl mit dem System Urotropin/Acetanhydrid als auch mit N,N,N',N' -Tetramethyldiaminomethan (TMDM) war auch nach 48 bzw. 30 Stunden keine

Umsetzung zu beobachten, was vermutlich auf die auch in der Literatur^[52] beschriebene geringe Reaktivität von Alkylarylsulfonen zurückzuführen ist.

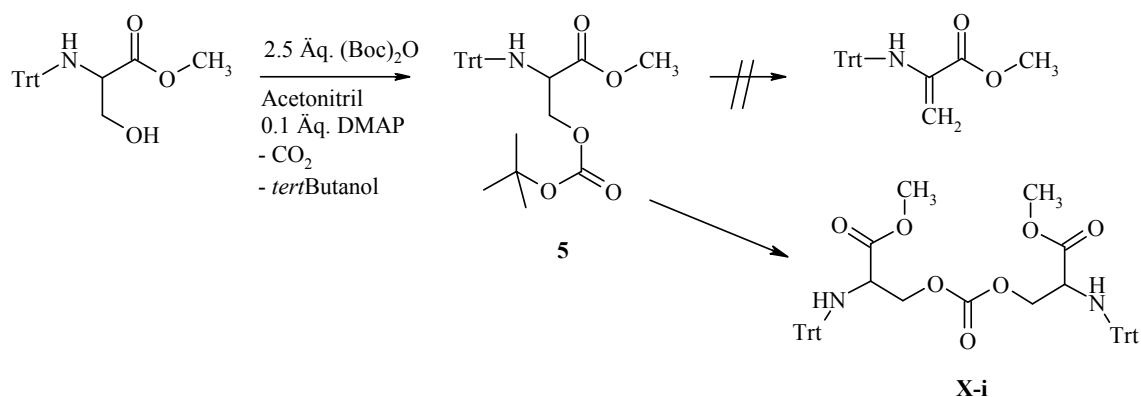


3.3.3 Synthese der Dehydroalanin-Derivate

2,3-Dehydroaminosäuren sind wichtige Zwischenstufen zur Synthese von unnatürlichen oder optisch reinen Aminosäuren. Ferreira *et al.* synthetisierten Dehydroalanin-Derivate durch β -Elimination ausgehend von *N*-geschützten *L*-Serin-Derivaten mit Di-*tert*butyldicarbonat in Acetonitril und mit DMAP als Katalysator mit sehr guten Ausbeuten.^{[71],[72]} Je größer der Rest an der Aminfunktion ist, desto leichter soll die β -Elimination möglich sein.^[71]

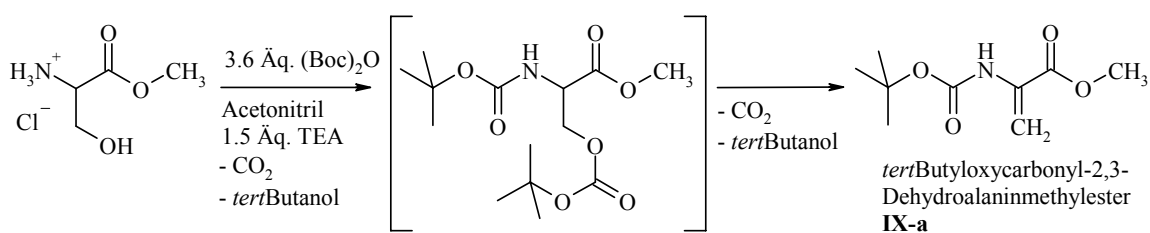
Das Verfahren wurde daher an *N*-Trityl-(*L*)-serinmethylester getestet. Es wurden 2.5 Äq. Di-*tert*butyldicarbonat und 0.1 Äq. DMAP eingesetzt. Sobald DMAP zu der Suspension zugesetzt wird, entsteht ein Gas. Nach ca. 4 Stunden Rühren bei Raumtemperatur war das Edukt nicht mehr nachweisbar. Da aber immer noch nicht alles gelöst war, wurde weitere 8 Stunden gerührt und schließlich gelinde erwärmt. Beim Erwärmen setzte erneut heftige Gasentwicklung ein. Als diese beendet war, wurde der Ansatz aufgearbeitet. Es konnten zwei Verbindungen isoliert werden (Schema 21), das am Hydroxyl-Sauerstoff des Serins mit dem *tert*Butyloxycarbonyl-Rest acylierte Derivat **5** und ein Dimer aus zwei *N*-Trityl-Serinmethylestern (**X-i**), die am Hydroxyl-Sauerstoff über ein Carbonat verbunden sind. Dafür, dass es sich um ein Dimer handelt, sprechen die NMR-spektroskopischen Daten (s. Kap. 9.11.3). Im ¹H-NMR-Spektrum war das Resonanzsignal der Hydroxyl-Funktion wie bei **5** verschwunden, das Signal der Methylengruppe, an welche das Hydroxyl-Sauerstoffatom gebunden ist, ändert sich im Vergleich zu **5** nicht. Aber es war kein Signal für den *tert*Butylrest zu erkennen. Im ¹³C-NMR-Spektrum trat im Vergleich zu **5** ein zusätzliches Resonanzsignal bei 154.68 ppm auf, das vom Kohlenstoffatom der Kohlensäurefunktion stammen muss. Dafür spricht auch das im HMBC auftretende, einzige Kreuz-

signal dieses Kohlenstoffatoms mit den beiden Protonen der Methylengruppe. Das gewünschte Produkt, das Dehydroalanin-Derivat, konnte jedoch nicht isoliert werden.



Schema 21: Versuch der Dehydratisierung von *N*-Trt-(*L*)-Ser-OMe

Da für die Dehydratisierungen auch von *tert*Butyloxycarbonyl-Schutzgruppen ausgegangen werden kann,^{[71],[72]} wurde ein Versuch mit ungeschütztem *L*-Serinmethylester durchgeführt. Es sollte gleichzeitig die Aminogruppe mit der *tert*Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe versehen werden und der Sauerstoff der Hydroxyfunktion acyliert werden (Schema 22). Für die Acylierung des Stickstoffes müssen 1.1 Äq. Di-*tert*butyldicarbonat zusätzlich veranschlagt werden. Da der *L*-Serinmethylester als Hydrochlorid eingesetzt wurde, musste eine äquimolare Menge Triethylamin zugesetzt werden, um das Amin freizusetzen. Auf den Einsatz von DMAP wurde verzichtet.



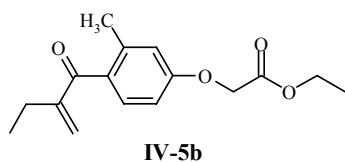
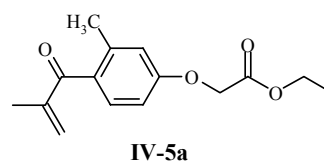
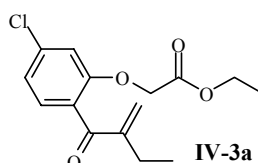
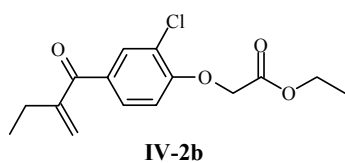
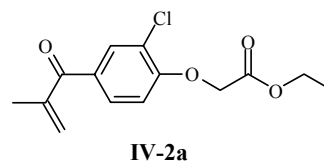
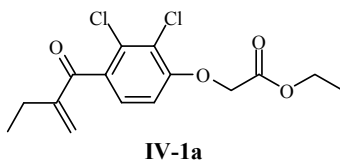
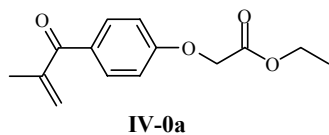
Schema 22: Dehydratisierung von (*L*)-Serin-Methylester

Die Reaktion gelang mit einer Ausbeute von 63 %, wobei die Funktion von DMAP ohne Probleme durch Triethylamin ersetzt wurde.

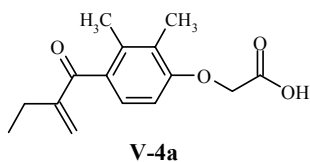
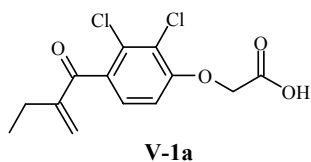
Nach demselben Verfahren wurde auch das Dipeptid *Z*-(*L*)-Ala-(*L*)-Ser-OMe in 29 %iger Ausbeute in das Dehydroalaninderivat **IX-b** überführt.

3.4 Strukturübersicht über die in der Arbeit synthetisierten Zielverbindungen

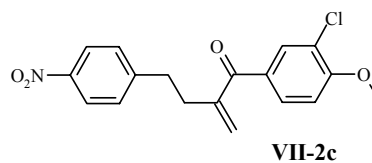
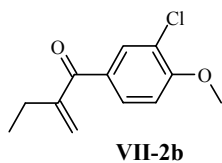
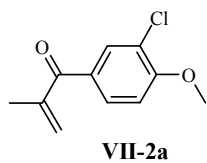
Acylierte Phenoxyessigsäureethylester mit α,β -ungesättigter Ketonfunktion III



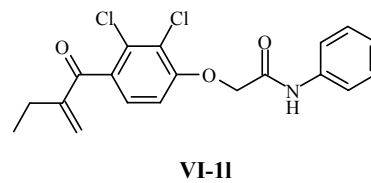
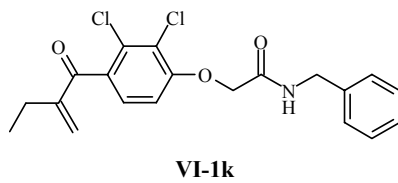
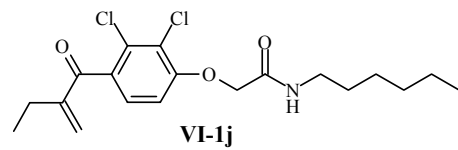
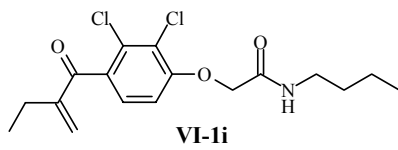
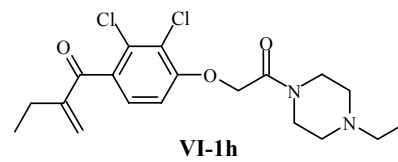
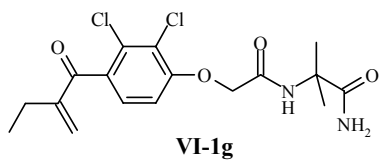
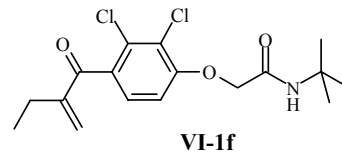
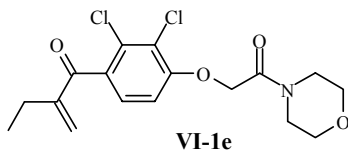
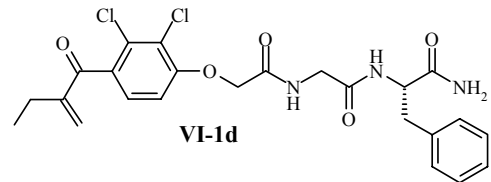
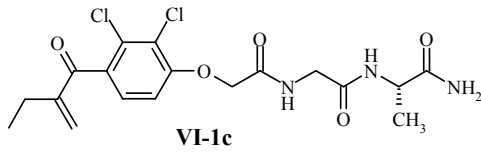
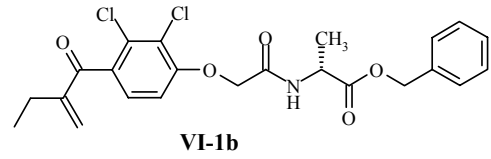
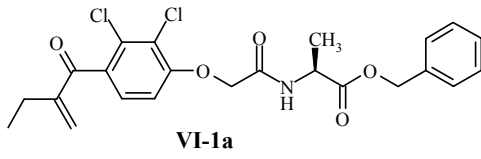
Etacrynsäure-Derivate V



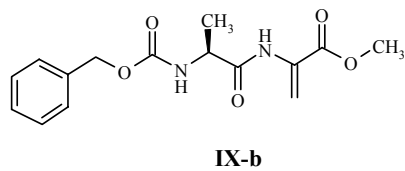
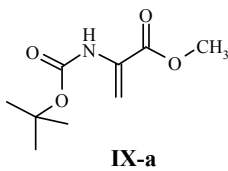
acylierte Anisole VII



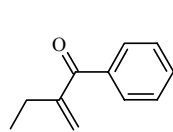
Etacrynsäureamide VI



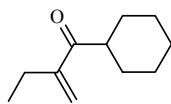
Dehydroalanin-Derivate IX



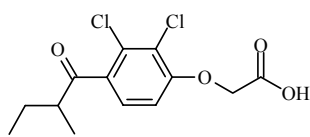
Verbindungen mit modifizierter Etacrynsäure-Partialstruktur



X-a



X-d



V-1b

4 Docking-Studien an Etacrynsäure-*tert*butylamid (VI-1f)

Etacrynsäure-*tert*butylamid (VI-1f) zeigte bei einem HPLC-basierten Screening Hemmaktivität (s. Kapitel 5.2.2) gegen die Hauptprotease (Main protease, M^{Pro}) des humanen SARS-Coronavirus (SARS-CoV). Um die relevanten Wechselwirkungen zwischen dem potentiellen Inhibitor und dem Enzym besser verstehen zu können, wurden im Arbeitskreis PD Dr. Knut Baumann Docking-Experimente der Verbindung an das aktive Zentrum der SARS-CoV M^{Pro} mit Hilfe des Computerprogramms FlexX^{®§} durchgeführt. Das aktive

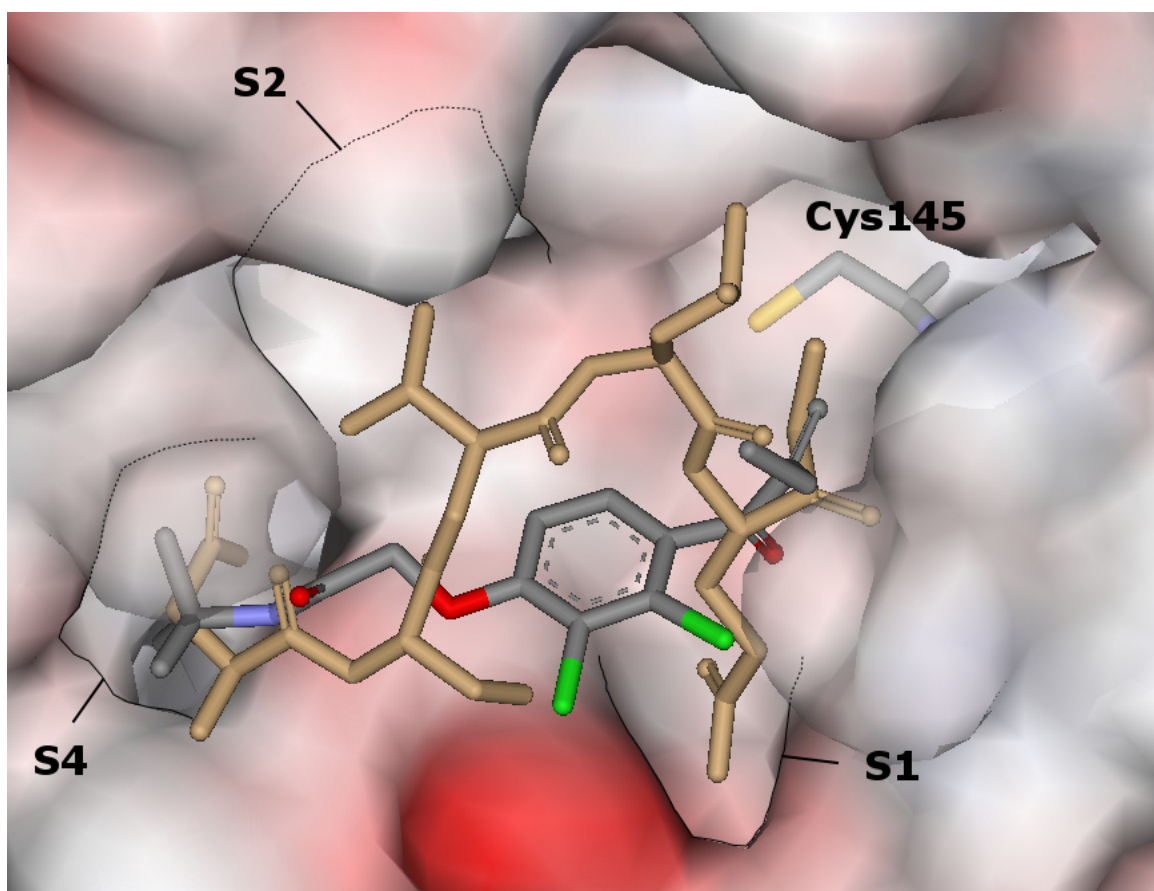


Abb. 10: Postulierter Bindungsmodus des Etacrynsäure-*tert*butylamids (grau). Der mit der SARS-M^{Pro} co-kristallisierte Ligand (braun) ist ebenfalls dargestellt.

Zentrum der SARS-CoV M^{Pro}, wie es in der Kristallstruktur des Enzym-Inhibitor-Komplexes von SARS CoV M^{Pro} mit dem kovalent gebundenen Liganden Cbz-Val-Asn-Ser-Thr-Leu-Gln-Chlormethylketon zu finden ist (PDB-Code^[73] 1UK4),^[74] ist sehr eng (Abb. 10). Bevor Etacrynsäure-*tert*butylamid gedockt werden konnte, musste daher die kovalente Bindung eliminiert und die Enzymstruktur minimiert werden. Dazu wurde das Compu-

§ FlexX[®] Version 1.12, BioSolveIT, An der Ziegelei 75, 53757 St. Augustin, Deutschland, 2003

terprogramm SYBYL 6.9** („hot region“: 6 Å; interessante Region: 12 Å; 5000 Schritte; Tripos Kraftfeld) verwendet. Als Bindungstasche wurde die Region definiert, die sich innerhalb eines Radius von 8 Å um den co-kristallisierten Liganden befand. Zur Interpretation wurden nur die Docking-Positionen berücksichtigt, die innerhalb dieser Bindungsregion lagen. Etacrynsäure-*tert*butylamid (**VI-1f**) zeigte einen Bindungsmodus, bei dem die reaktive Gruppe sehr nahe an Cys145 liegt. Im Gegensatz zum Chlormethylketon liegt das *tert*Butylamid quer in der Bindungstasche, wobei der *tert*Butylrest in der Bindungstasche S4 positioniert ist. Der Abstand zwischen dem Schwefel von Cys145 und dem Kohlenstoff der Doppelbindung liegt bei 3.40 Å.

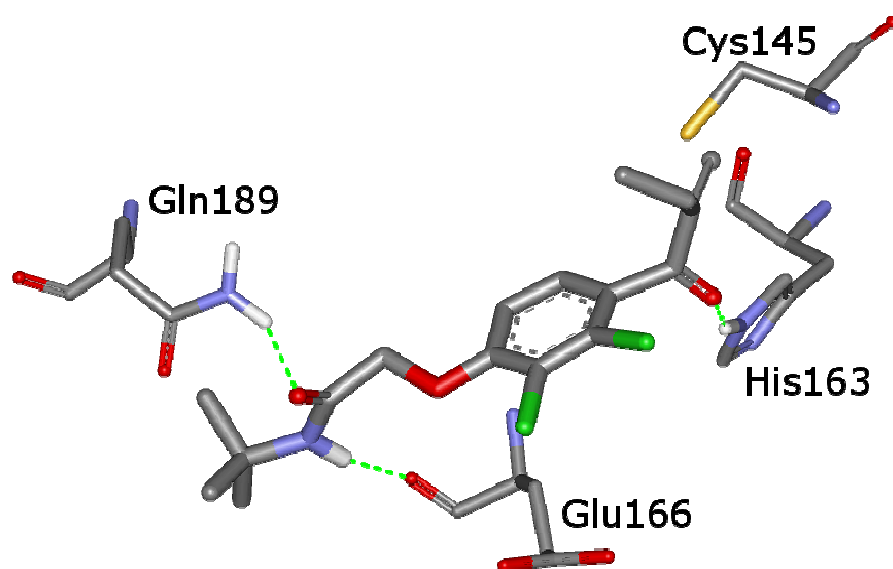


Abb. 11: Wasserstoffbrücken von Etacrynsäure-*tert*butylamid mit den Aminosäuren des aktiven Zentrums der SARS CoV M^{pro}

Bei näherer Betrachtung der Bindung stellte sich heraus, dass das *tert*Butylamid drei Wasserstoffbrücken mit Aminosäuren des aktiven Zentrums ausbilden kann (Abb. 11), mit His163, Glu166 und Gln189. Es wurde nun überlegt, wie die Struktur des Inhibitors modifiziert werden müsste, um einen Inhibitor zu erhalten, der noch besser ins aktive Zentrum binden kann. Es wurde gefunden, dass die Einführung eines H-Brücken-Akzeptors am *tert*Butylrest die Bindungsfähigkeit an das aktive Zentrum über zwei zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen erhöhen würde. Da die S4-Tasche groß genug ist, um auch einen größeren Rest aufzunehmen, wurde die Verbindung **VI-1g** in die oben definierte Bindungstasche gedockt (Abb. 12). Die Lage dieser Verbindung innerhalb der Bindungstasche

** SYBYL[®] Version 6.9, Tripos Associates, St. Louis, MO

ändert sich etwas im Vergleich zum *tert*Butylamid, der Abstand zwischen dem Schwefelatom des Cys145 und der reaktiven Gruppe beträgt jedoch nur 3.48 Å und ändert sich somit nicht wesentlich.

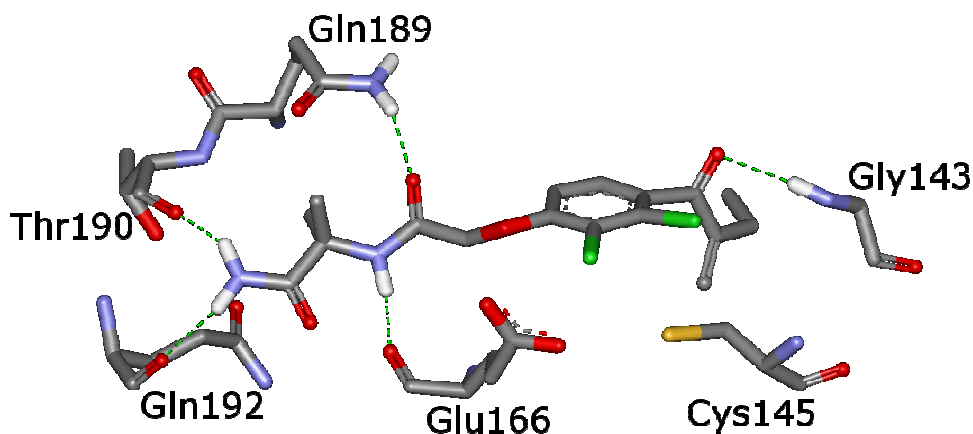


Abb. 12: Wasserstoffbrücken von Verbindung VI-1g mit den Aminosäuren des aktiven Zentrums der SARS CoV M^{pro}

Durch das Carbamid können sich zwei weitere Wasserstoffbrücken mit Thr190 und Gln192 aus dem Aminosäurenrückgrat ausbilden. Durch die leichte Drehung fällt die H-Brücke mit His143 weg und wird durch eine mit Gly143 ersetzt. Die Verbindung **VI-1g** wurde synthetisiert und getestet. Im enzymatischen HPLC-Assay zeigte sie im Vergleich zum *tert*Butylamid eine ähnliche Hemmstärke (Kapitel 5.2.2). Im Enzymassay zeigte sich eine geringfügig bessere Hemmung als beim *tert*Butylamid (Kapitel 5.2.3). Da keine Verminderung der Hemmstärke eintrat, werden die Docking-Ergebnisse durch die experimentellen Daten unterstützt.

5 Biochemische und biologische Untersuchungen

5.1 Enzymassays

5.1.1 Einführung

Etacrynsäure-Derivate sollten aufgrund ihrer α,β -ungesättigten Ketonstruktur in der Lage sein, mit dem Cysteinrest im aktiven Zentrum von Cystein-Proteasen eine kovalente Bindung einzugehen. Das Michael-System stellt ein elektrophiles System dar, welches durch das nucleophile Schwefel-Atom des aktiven Zentrums angegriffen werden kann. Ein Enzym hat zwar in der Regel nicht nur einen einzigen Cysteinrest im Molekül, da das Thiol im aktiven Zentrum jedoch meist als das noch stärker nucleophile Thiolat-Anion vorliegt,^{[75],[76]} sollten Elektrophile bevorzugt mit dieser Gruppe reagieren (s. auch Kap. 5.1.9). Das Enzym kann seine katalytische Funktion nicht mehr ausüben, es wird gehemmt. Ob die Hemmung irreversibel ist, hängt von der Art des Elektrophils ab. Bei Peptidylaldehyden z. B. bildet sich ein Halbacetal mit dem aktiven Zentrum aus, was über NMR-Spektroskopie und MS nachgewiesen wurde.^[77] Es handelt sich um eine kovalente Bindung, jedoch um eine reversible Hemmung, da die Bildung des Halbacetals reversibel ist. Das Michael-System der Etacrynsäure-Derivate lässt eine irreversible Hemmung erwarten, da bekannte Inhibitoren mit Michael-System wie z. B. die Peptidylvinylsulfone oder vinyloge Peptide (s. Kap. 1.4.2) ebenfalls irreversibel reagieren. Allerdings wären auch eine Retro-Michael-Reaktion und damit eine reversible Hemmung denkbar.

Man kann in den meisten Fällen eine reversible von einer irreversiblen Hemmung durch Dialyse, Gelfiltration oder Ultrafiltration unterscheiden. Dabei wird die Inhibitorkonzentration verringert, ein reversibel gebundener Inhibitor kann wieder dem Gleichgewicht gemäß abdiffundieren und die Enzymaktivität erholt sich wieder. Ein Nachteil dieser Methoden ist der Verlust an Enzymaktivität durch das Trennverfahren. Man sollte daher immer eine Kontrollprobe ohne Inhibitor auf die gleiche Weise behandeln, um so diese Verluste berücksichtigen zu können.

Hinweise auf reversible oder irreversible Hemmung erhält man auch durch die Betrachtung der Zeitabhängigkeit der Hemmung des Enzyms. Bei reversiblen Inhibitoren wird sich nach kurzer Zeit ein Gleichgewicht einstellen, bei dem die Enzymaktivität auf einen bestimmten Wert reduziert wird, der sich dann nicht mehr mit der Zeit verändert, also nichtzeitabhängig ist. Voraussetzung dafür sind allerdings immer steady-state-Bedingungen, d.

verschiedenen Möglichkeiten der Hemmung in Form von Reaktionsgleichungen zusammen.

Handelt es sich um einen nicht-kovalent reversiblen Inhibitor (1. Fall), dann wird man normalerweise eine nicht-zeitabhängige Hemmung beobachten. Liegt allerdings ein „tight-binding“ Inhibitor vor, d. h. die Rückreaktion verläuft sehr langsam, so erhält man eine zeitabhängige Hemmung.

Im 2. Fall, bei einem irreversiblen Inhibitor, beobachtet man eine zeitabhängige Hemmung, es sei denn der 2. Schritt verläuft sehr langsam. Dann wird man eine nicht-zeitabhängige Hemmung erhalten.

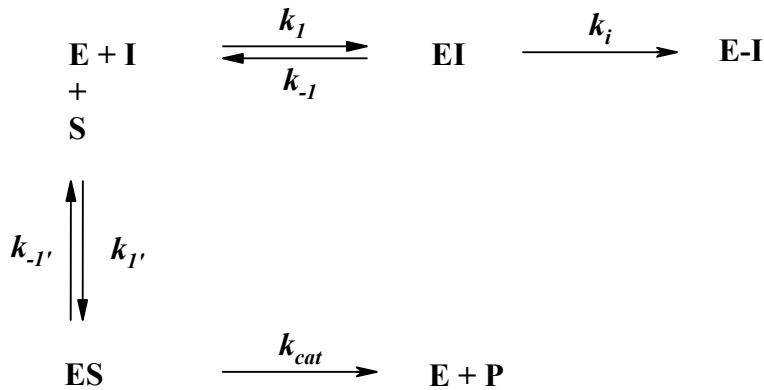
Im 3. Fall, bei einer kovalent reversiblen Hemmung, ergibt sich (z. B. bei den Peptidylaldehyden) normalerweise eine nicht-zeitabhängige Hemmung. Nur wenn die Rückreaktion des 2. Schritts sehr langsam verläuft, beobachtet man eine zeitabhängige, quasi-irreversible Hemmung.

Schließlich kommt es (4. Fall) bei „alternate-substrate-Inhibitoren“ (z. B. Acetylcholinesterase-Inhibitoren mit Carbamat-Struktur) zu einer zeitabhängigen Hemmung, da der 3. Schritt sehr langsam verläuft.

5.1.2 Charakterisierung zeitabhängiger Hemmung

Das Ausmaß der Hemmung eines Enzyms durch einen Inhibitor kann nur bestimmt werden, wenn die Enzymaktivität in Gegenwart eines Substrates gemessen wird. Zusätzlich zu den Reaktionen, die das Enzym mit dem Inhibitor eingeht, verläuft daher gleichzeitig eine weitere Reaktion: die Reaktion des Enzyms mit dem Substrat, was bei Inhibitoren, die an das aktive Zentrum binden (orthosterische Inhibitoren, „active-site directed inhibitor“), immer eine Konkurrenzreaktion darstellt (Schema 24).^[80]

Die Reaktion des Substrates mit dem Enzym wird durch die Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben. Die Michaelis-Konstante K_m ist ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat und diejenige Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit halbmaximal ist. Sie ist für ein Enzym-Substrat-Paar bei definierten Reaktionsbedingungen (Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke) unabhängig von der Substratkonzentration. Die Wechselzahl k_{cat} beschreibt die Geschwindigkeit des Substratumsatzes.



Schema 24: Reaktionsschema bei Bestimmung der Hemmung durch einen Inhibitor in Gegenwart eines Substrates am Beispiel irreversibler Hemmung

Für die Beschreibung der Reaktion eines irreversiblen oder quasi-irreversiblen Inhibitors mit dem Enzym werden die Hemmkonstanten k_i , K_i und k_{2nd} verwendet:

- k_i [min^{-1}] ist die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der Bildung des inaktivierten Enzyms E–I.
- K_i [M] ist die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes, die sich aus dem Massenwirkungsgesetz ergibt (Gl. 1):

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

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

Der 2. Schritt ist geschwindigkeitsbestimmend und so vereinfacht sich Gl. 1b zu Gl. 2:^[80]

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

- k_{2nd} [$\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] ist die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung der Inaktivierung des Enzyms. Sie berechnet sich nach Gl. 4:

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

Der k_{2nd} -Wert fasst also die Bildung des Assoziationskomplexes EI und die Geschwindigkeit der Inaktivierung zusammen. Eine schnelle Inaktivierung geht mit einem großen k_i -Wert in den Zähler der Gleichung ein. Eine gute Bindung des Inhi-

bitors an das Enzym und damit eine möglichst kleine Dissoziationskonstante K_i geht in den Nenner ein. Je größer k_{2nd} ist, desto besser inaktiviert der Hemmstoff das Enzym.

Wie aus Schema 24 ersichtlich ist, verteilt sich die Gesamtmenge des eingesetzten Enzyms $[E_0]$ auf die Enzymformen $[E]$ = Konzentration des freien Enzyms, $[EI]$ = Konzentration des an Inhibitor gebundenen Enzyms und $[E-I]$ = Konzentration an inaktiviertem Enzym (Gl. 5):

$$[E]_0 = [E] + [EI] + [E-I] \quad (5)$$

Da das Enzym im Assoziationskomplex EI noch nicht inaktiviert ist und der Inhibitor durch einen Überschuss an Substrat wieder aus der Bindung mit dem Enzym verdrängt werden kann, ist das Enzym in EI potentiell aktiv und kann zusammen mit dem freien Enzym E zum aktiven Enzym E_a zusammengefasst werden (Gl. 6).^[81]

$$[E]_a = [E] + [EI] \quad (6)$$

Wenn die Inhibitorkonzentration $[I] \gg \gg [E]_0$ ist, man also unter Bedingungen pseudoerster Ordnung arbeitet, ist die zeitliche Bildung der inaktiven Enzymform E-I proportional der Konzentration des reversiblen Komplexes $[EI]$ (Gl. 7), da die Bildung des Assoziationskomplexes EI sehr schnell im Vergleich zur Inaktivierung des Enzyms verläuft.

$$\frac{d[EI]}{dt} = k_i \cdot [EI] \quad (7)$$

Da die Gesamtkonzentration an Enzym $[E]_0$ aber konstant bleibt, entspricht die Bildung des Komplexes $[EI]$ der Abnahme an aktivem Enzym $[E]_a$ (Gl. 8).^[81]

$$-\frac{d[E]_a}{dt} = k_i \cdot [EI] \quad (8)$$

Aus dem Massenwirkungsgesetz erhält man durch Umformung von Gl. 1a und Einsetzen von Gl. 6 für $[EI]$ Gl. 9:

$$[EI] = \frac{[E]_a}{\left(1 + \frac{K_i}{[I]}\right)} \quad (9)$$

Durch Einsetzen von Gl. 9 in Gl. 8 ergibt sich für die Abnahme der Enzymaktivität Gl. 10:

$$-\frac{d[E]_a}{dt} = k_i \cdot \frac{[E]_a}{\left(1 + \frac{K_i}{[I]}\right)} \quad (10)$$

Integration über die Zeit t liefert Gl. 11:

$$\ln \frac{[E]_a}{[E]_0} = -\frac{k_i \cdot t}{\left(1 + \frac{K_i}{[I]}\right)} \quad (11)$$

Unter den Steady-state-Bedingungen folgt die Abnahme der Enzymaktivität pro Zeiteinheit einer Kinetik pseudo-erster Ordnung (Gl. 12):

$$\ln \left(\frac{[E]_a}{[E]_0} \right) = -k_{obs} \cdot t \quad (12)$$

Wenn man Gl. 11 und 12 gleichsetzt, ergibt sich mit Gl. 13 eine hyperbolische Funktion (Abb. 13):^[80]

$$-k_{obs} \cdot t = -\frac{k_i \cdot t}{\left(1 + \frac{K_i}{[I]}\right)} \Leftrightarrow k_{obs} = \frac{k_i \cdot [I]}{(K_i + [I])} \quad (13)$$

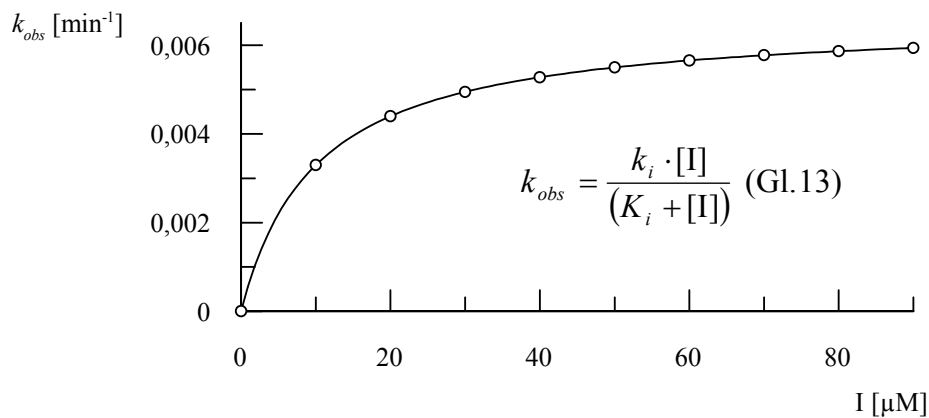


Abb. 13: Diagramm k_{obs} (aus Verdünnungs- oder kontinuierlichem Assay) gegen $[I]$ bei zeitabhängiger Hemmung, Bestimmung von k_i und K_i

Man kann erkennen, dass k_i und K_i unabhängig von der eingesetzten Enzymkonzentration sind. Für unterschiedliche Inhibitor-Konzentrationen können nun über verschiedene experimentelle Verfahren (s. Kap. 5.1.2.1 und 5.1.2.2) die k_{obs} -Werte ermittelt werden. Da von

Gl. 13 nur $[I]$ und k_{obs} bekannt sind und zwei unbekannte Variablen enthalten sind, können k_i und K_i nur durch nichtlineare Regression ermittelt werden.

Ist der Inhibitor schlecht löslich, die Geschwindigkeit der Inaktivierung zu schnell oder die Dissoziationskonstante K_i sehr hoch, dann kann nicht mehr unter Bedingungen pseudoerster Ordnung gearbeitet werden. Gl. 13 vereinfacht sich dann zu Gl. 14.^[80]

$$k_{obs} = \frac{k_i \cdot [I]}{K_i} \Leftrightarrow k_{2nd} = \frac{k_i}{K_i} = \frac{k_{obs}}{[I]} \quad (14)$$

Man kann die Hemmkonstanten k_i und K_i dann nicht mehr einzeln bestimmen, sondern berechnet näherungsweise die Geschwindigkeit 2. Ordnung k_{2nd} . Dazu trägt man ebenfalls k_{obs} gegen $[I]$ auf und erhält aus der Steigung der erhaltenen Geraden k_{2nd} .

Da, wie anfangs erwähnt, das Substrat als zweiter Ligand mit dem Inhibitor um die Bindung am Enzym konkurriert, müssen die Substratkonzentration und die Affinität des Substrates zum Enzym mit berücksichtigt werden. Man ermittelt im Experiment also scheinbare (apparente) K_i -Werte, K_{iapp} , die um den Term $(1 + [S]/K_m)$ zu den wahren K_i -Werten korrigiert werden müssen (Gl. 15).

$$K_{iapp} = K_i \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right) \quad (15)$$

Die k_{obs} -Werte zur Ermittlung der Hemmkonstanten k_i , K_i und k_{2nd} können entweder in einem kontinuierlichen Assay nach Tian und Tsou^[82] oder durch den Verdünnungsassay nach Kitz und Wilson^[81] bestimmt werden. Da zur Bestimmung der Hemmkonstanten ausschließlich der kontinuierliche Assay verwendet wurde, wird dieser im Folgenden ausführlicher erläutert, der Verdünnungsassay jedoch nur kurz beschrieben.

5.1.2.1 Kontinuierlicher Assay nach Tian und Tsou^[82]

Beim kontinuierlichen Assay werden Substrat, Enzym und jeweils eine Inhibitorkonzentration gemischt und die Produktzunahme mit der Zeit (60 min) registriert. Da aus oben genannten Gründen Steady-state-Bedingungen eingestellt werden (d.h. $[S] \gg [E]$ und $[I] \gg [E]$) nimmt die Produktzunahme bei einem irreversiblen Inhibitor exponentiell ab und nähert sich einer Produktkonzentration $[P]_{\infty}$ an (Abb. 14).

Es gilt Gl. 16:
$$P_t = P_{\infty} \cdot (1 - e^{-k_{obs} \cdot t}) \quad (16)$$

Bei jedem Versuch führt man eine Kontrolle ohne Inhibitor durch, bei der die Produktzunahme über den ganzen Messzeitraum linear verlaufen muss.

Durch nichtlineare Regressionsanalyse mit dem Enzymkinetikprogramm Grafit^{®††} werden für jede Inhibitorkonzentration die k_{obs} -Werte ermittelt. Trägt man diese gegen die Inhibitorkonzentration auf, so lassen sich gemäß Gl. 13 die Hemmkonstanten k_i , K_i und k_{2nd} bestimmen.

Anhand Gl. 14 lässt sich mit nur einem einzigen kontinuierlichen Versuch die Hemmwirkung eines Inhibitors über k_{2nd} abschätzen. Dies ermöglicht ein schnelles Screening vieler Verbindungen.

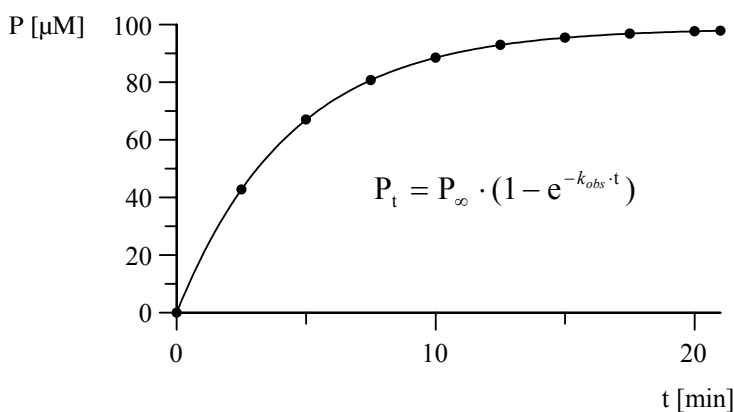


Abb. 14: Umsatz-Zeit-Diagramm eines kontinuierlichen Assays bei zeitabhängiger Hemmung, Bestimmung von k_{obs}

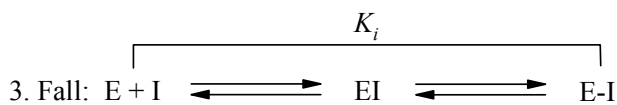
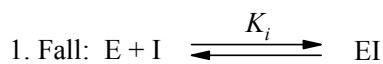
†† Grafit[®] V3.03 Erithacus Software Ltd., London, 1994

5.1.2.2 Verdünnungsassay nach Kitz und Wilson^[81]

Für den Verdünnungsassay wird eine konstante Enzymmenge $[E]_0$ mit einem 10-50-fachen Überschuss an Inhibitor inkubiert. Auch bei diesem Assay muss gelten $[I] \gg [E]_0$ und $[S] \gg [E]_0$, damit Bedingungen pseudo-erster Ordnung vorliegen. In bestimmten Zeitabständen (6-7 Werte innerhalb 30-60 min) wird ein Aliquot der Inkubationslösung entnommen, mindestens um den Faktor 10 verdünnt und durch Zugabe von Substrat die Rest-Enzymaktivität über 5 min bestimmt. Die Verdünnung ist nötig, um eine Hemmung durch nicht kovalente Assoziation des freien Inhibitoranteils an das Enzym auszuschließen. Trägt man die Steigungen der erhaltenen Geraden, die Enzymaktivitäten, gegen die gewählten Zeitabstände auf, so erhält man eine abfallenden Exponentialkurve $[E]_t = [E]_0 \cdot e^{-k_{obs} \cdot t}$, aus deren Steigung der Wert k_{obs} für die eingesetzte Inhibitorkonzentration ermittelt werden kann. Dieses Verfahren muss für mehrere Inhibitorkonzentrationen wiederholt werden, um die k_{obs} -Werte gegen die Inhibitorkonzentrationen $[I]$ auftragen zu können. Darin liegt auch der Nachteil des Verdünnungsassays, er benötigt viel mehr Zeit als der kontinuierliche Assay.

5.1.3 Charakterisierung nicht-zeitabhängiger Hemmung

Bei nicht-zeitabhängiger Hemmung stellt die Dissoziationskonstante K_i ein Maß für die Affinität des Inhibitors zum Enzym dar. Es kann aufgrund der Kinetik nicht unterschieden werden, ob ein nicht-kovalent reversibler Inhibitor (s. Schema 23 bzw. Schema 25, Fall 1) oder ein kovalent reversibler Inhibitor (Fall 3) vorliegt. Bei kovalent reversiblen Inhibitoren ist K_i die Gesamtdissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Adduktes.



Schema 25: Zustandekommen der K_i -Werte bei nicht-zeitabhängiger Hemmung

Man benutzt für die Auswertung den Dixon-Plot (Gl. 17):^[83]

$$v_i = \frac{v_0}{\left(1 + \frac{I}{K_i}\right)} \quad (17)$$

v_0 und v_i sind die Enzymaktivitäten mit oder ohne Inhibitor. Man bestimmt diese durch Ermittlung der Steigung der Umsatz-Zeit-Kurven in den ersten 10 bis maximal 20 min ohne bzw. mit Inhibitor. Durch Auftragung von v_0/v_i gegen $[I]$ wird der Dixon-Plot linearisiert und man kann aus der Steigung der erhaltenen Geraden den reziproken K_i -Wert erhalten. Dieses graphische Verfahren ist allerdings recht ungenau, weshalb K_i immer durch nicht-lineare Regression ermittelt wurde.

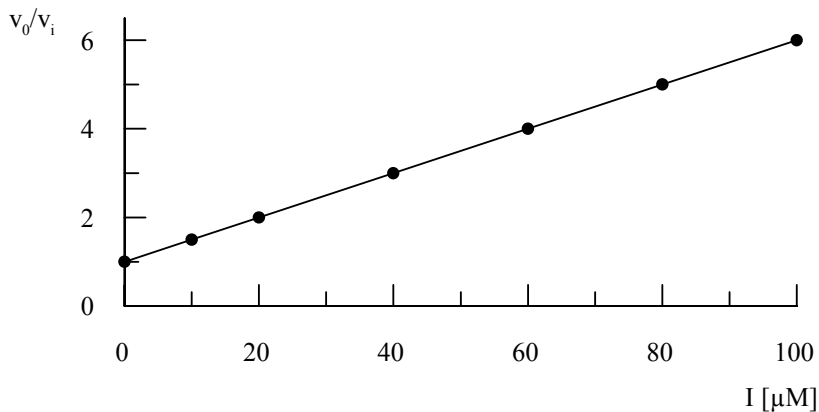


Abb. 15: Linearisierter Dixon-Plot bei zeitunabhängiger Hemmung, Ermittlung von K_i

Auch bei dieser Auswertung muss wieder die Konkurrenz des Substrats berücksichtigt werden, weshalb auch hier der ermittelte K_{iapp} -Wert mit dem Term nach Gl. 15 zu K_i korrigiert wurde. Der IC_{50} -Wert als Maß für die Aktivität eines Enzyminhibitors sollte nur bei reversibler nicht-zeitabhängiger Hemmung verwendet werden. Bei irreversiblen und/oder zeitabhängiger Hemmung ist dieser Wert eine unzulässige Größe, da er dann von der Inkubationszeit abhängt.^{[3],[78]}

5.1.4 Durchführung der fluorimetrischen Enzymassays

Zur Bestimmung der Hemmkonstanten der Inhibitoren wurde der kontinuierliche Assay nach Tian und Tsou (s. Kapitel 5.1.2.1) verwendet. Die Versuche wurden in weißen 96-Well-Mikrotiterplatten mit einem Cary Eclipse Fluorimeter der Fa. Varian bei 25 °C durchgeführt. Die Temperaturkonstanz wurde durch eine selbstgebaute Heizeinheit, bestehend aus Aluminiumplatte, Heizfolie mit Temperatursensor und Kontrolleinheit, sichergestellt. Als Substrat wurde Z-Phe-Arg-AMC (= *N*-Benzyloxycarbonyl-(*L*)-phenylalanyl-(*L*)-arginyl-7-amino-4-methylcumarin) verwendet, dessen hydrolytische Spaltung durch das Enzym über die Zunahme des entstehenden 7-Amino-4-methylcumarins fluorimetrisch verfolgt wurde. Die Anregungswellenlänge betrug 380 nm, die Emissionswellenlänge 460 nm. Tab. 14 zeigt die verwendeten Puffer, Enzym- und Substratkonzentrationen, sowie die verwendeten K_m -Werte. Die angegebenen Enzymkonzentrationen sind als Richtwerte zu verstehen, da die Proteinkonzentration im Allgemeinen nichts über die enzymatische Aktivität aussagt, welche von Charge zu Charge unterschiedlich hoch ist.

Tab. 14: Enzyme, K_m -Werte und Bedingungen für die fluorimetrischen Enzymassays

Enzym	Puffer	[E]	[S]	K_m ^{a)}	Lit.
Cathepsin B aus humaner Leber	Tris pH 6.5	0.302 ng/ml	80 µM	150 µM	[84]
Falcipain 2 aus <i>Plasmodium falciparum</i>	Acetat pH 5.5	0.4 mg/ml	40 µM	21.5 µM	[85]
Rhodesain aus <i>Trypanosoma brucei</i> <i>rhodesiense</i>	Acetat pH 5.5	1.33 µg/ml	40 µM	826.5 nM	[86]

^{a)} Die verwendeten K_m -Werte wurden im Arbeitskreis bereits bestimmt und wurden übernommen; Tris-Puffer pH 6.5: 50 mM Tris(hydroxymethylaminomethan), 5 mM EDTA, 2 mM DTT, 200 mM NaCl, 0.005 % Brij 35; Acetat-Puffer pH 5.5: 50 mM Natriumacetat, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 200 mM NaCl, 0.005 % Brij 35;

Von jedem Puffer wurden zwei Chargen hergestellt, eine für die Enzymlösungen und eine für den Assay. Sie unterschieden sich nur im Zusatz von Dithioerythritol (DTT) bzw. Brij 35. Das niedermolekulare Thiol DTT wurde nur den Enzym-Puffern zugesetzt. So sollen

reduktive Bedingungen hergestellt werden, die sicherstellen, dass der Cysteinrest im aktiven Zentrum nicht durch eine falsche Disulfidbrücke blockiert wird. Da das nucleophile Thiol der Enzymlösung in sehr hohen Konzentrationen zugesetzt werden muss, sind Interaktionen mit den elektrophilen Inhibitoren zu befürchten (s. Kapitel 5.1.9). Deshalb enthält der Assay-Puffer kein DTT. Beim Assay wird zugesetzte Enzymlösung genügend verdünnt, um diese Interaktion zu minimieren.

Um das schwer lösliche AMC-Substrat in Lösung zu halten, wird dem Assay-Puffer ein nichtionisches Tensid (Brij 35) zugegeben. Für die Herstellung der Enzymlösungen ist die Anwesenheit eines Tensids nicht notwendig. Allen Puffern wird Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) zugesetzt, um eventuell im Wasser vorhandene Schwermetallionen zu komplexieren und so eine partielle Denaturierung der Enzyme zu verhindern.

Die Inhibitoren wurden bei sieben verschiedenen Konzentrationen zwischen 50 und 1000 μM , je nach ihrer Stärke, getestet. Vom Substrat und den Inhibitoren wurden Stammlösungen in Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt. Die DMSO-Konzentration eines Ansatzes betrug maximal 10 % und beeinträchtigte die Enzymaktivität nicht.

Jeweils ein Ansatz, der anstatt der Inhibitorlösung DMSO enthielt, diente als Kontrolle.

Wichtig für die Vorbereitung der Ansätze ist die richtige Reihenfolge der Mischung der Komponenten. Zuerst wird die Enzymlösung mit Puffer vermischt, dann die DMSO-Lösungen zugegeben. Damit wird eine Denaturierung des Enzyms und Aktivitätsverlust durch eine kurzzeitig zu hohe DMSO-Konzentration vermieden. Ein typischer Reaktionsansatz enthält insgesamt 250 μl bestehend aus 10 μl Enzymlösung, 215 μl Assay-Puffer, 20 μl Inhibitorlösung in DMSO und 5 μl Substratlösung in DMSO.

5.1.5 Durchführung der photometrischen Enzymassays

Die Testungen an Papain wurden mit einem thermostatisierbaren Lambda EZ 210 Photometer der Fa. Perkin Elmer bei 30 °C durchgeführt. Als Substrat wurde *L*-BAPA (= N^α -Benzoyl-(*L*)-arginin-p-nitroanilid, Hydrochlorid) in 1.84 mM Endkonzentration verwendet. Die Spaltung des Substrats wurde durch die Absorptionzunahme, die das entstehende p-Nitrophenol bei 405 nm verursacht, verfolgt. Papain wurde in einer Endkonzentration von 12.5 $\mu\text{g/ml}$ verwendet, die Enzymstammlösung wurde in 50 mM Phosphatpuffer pH 6.5 mit 5 mM EDTA mit 5 mM Cystein hergestellt. Vor Beginn der Messung wurde die Enzymlösung 60 min bei Raumtemperatur inkubiert, um das Enzym zu reaktivieren. Der

Cysteinrest im aktiven Zentrum des Enzyms ist mit einer falschen Disulfidbrücke blockiert. Es handelt sich dabei um ein Artefakt, das bei der Isolierung des Enzyms entsteht. Diese Disulfidbrücke wird durch das dem Enzympuffer zugegebene Cystein wieder reduziert. Für den Assay wird Puffer ohne Cystein (aus den oben erwähnten Gründen, s. Kap. 5.1.4) verwendet. Der K_m -Wert von Papain für das verwendete Substrat beträgt 2.5 mM, er wurde im Arbeitskreis schon mehrfach bestimmt.^[84] Die Inhibitoren wurden in DMSO gelöst, die Endkonzentrationen betragen zwischen 10 und 2000 μM , je nach Stärke des Inhibitors. Der DMSO-Gehalt eines Ansatzes betrug maximal 12 %. Da die Messungen im Gegensatz zum fluorimetrischen Mikrotiterplatten-Verfahren nicht parallel durchgeführt werden konnten, wurde in einer Kontrolle ohne Inhibitor jeweils zu Beginn und Ende der Messungen überprüft, ob die Enzymaktivität am Ende der Messreihe noch erhalten war. Es wurden maximal 10 % Aktivitätsunterschied toleriert.

5.1.6 Bestimmung der Hemmkonstanten der Inhibitoren

In diesem Kapitel sind exemplarisch verschiedene Diagramme dargestellt, anhand derer die Ermittlung der Hemmkonstanten nach kontinuierlichem Assay veranschaulicht werden soll. Bei den Umsatz-Zeit-Diagrammen ist auf der Ordinate entweder die Absorption A oder die Fluoreszenz F angegeben.

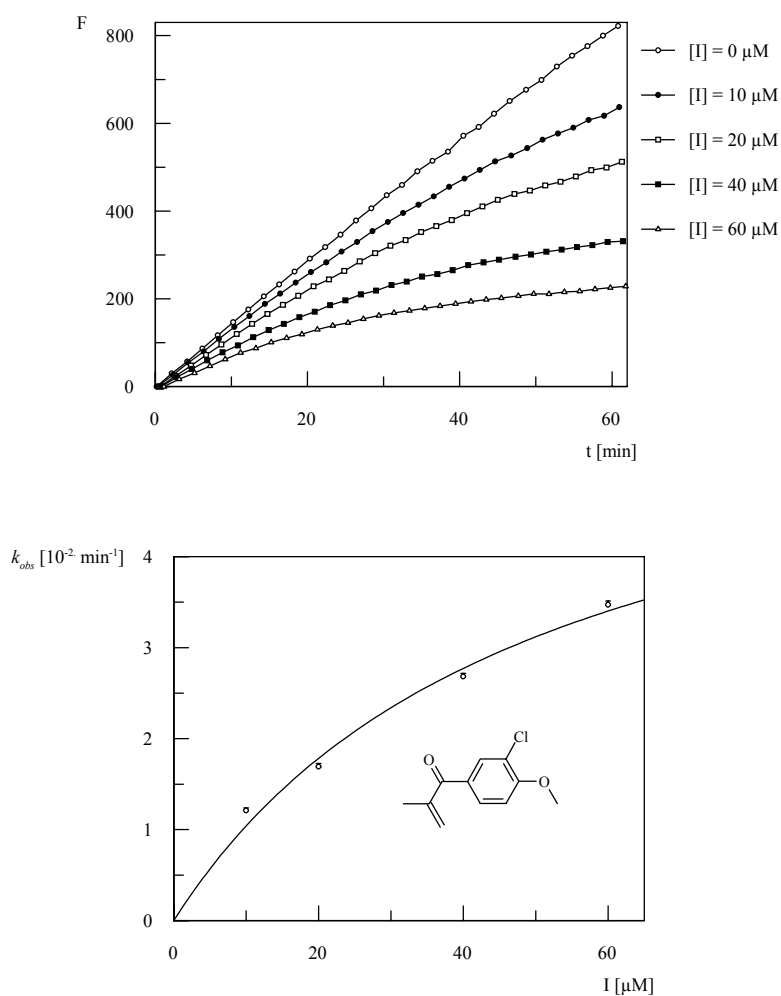


Abb. 16: Umsatz-Zeit-Diagramm (oben) und $k_{obs}/[I]$ -Diagramm der zeitabhängigen Hemmung von Cathepsin B durch 1-(3-Chlor-4-methoxy-phenyl)-2-methyl-propenon (VII-2a)

Ermittelte Hemmkonstanten: $k_i = 0.060 \pm 0.0049 \text{ min}^{-1}$
 $K_i = 28.9 \pm 7.4 \text{ } \mu\text{M}$
 $k_{2nd} = 2096 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

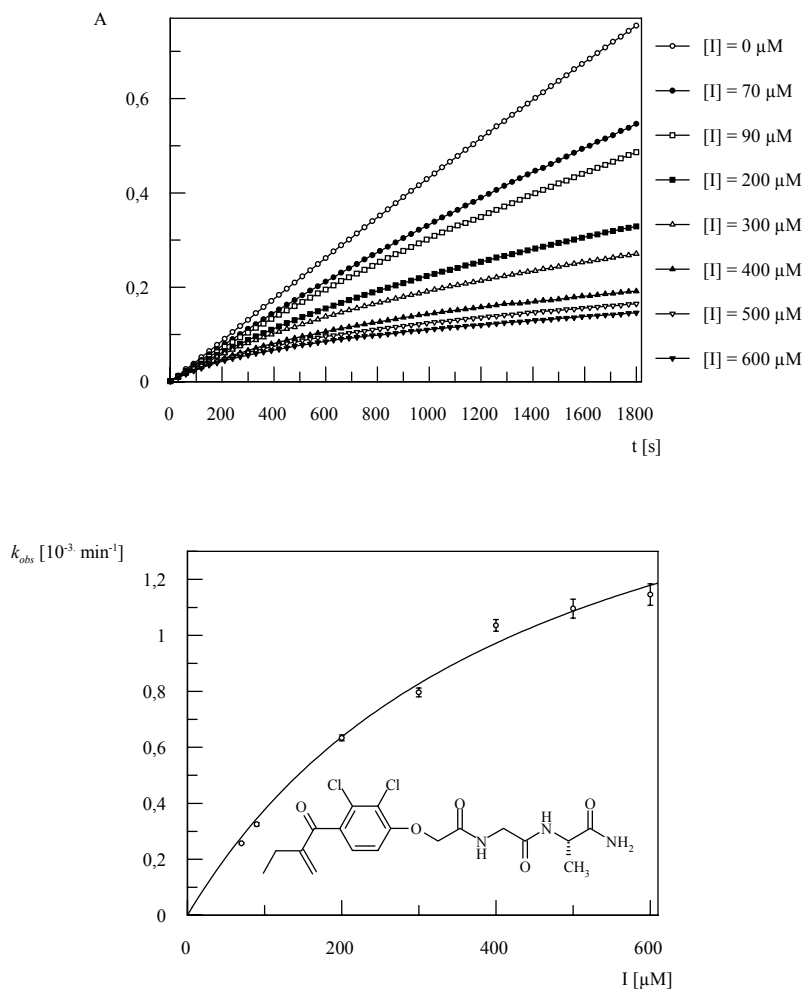


Abb. 17: Umsatz-Zeit-Diagramm (oben) und $k_{obs}/[I]$ -Diagramm der zeitabhängigen Hemmung von Papain durch (*S*)-2-(2-{2-[2,3-Dichlor-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-acetylamino}-acetylamino)-propionamid (VI-1c)

Ermittelte Hemmkonstanten: $k_i = 0.128 \pm 0.0052 \text{ min}^{-1}$

$K_i = 250.3 \pm 24.5 \mu\text{M}$

$k_{2nd} = 484 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

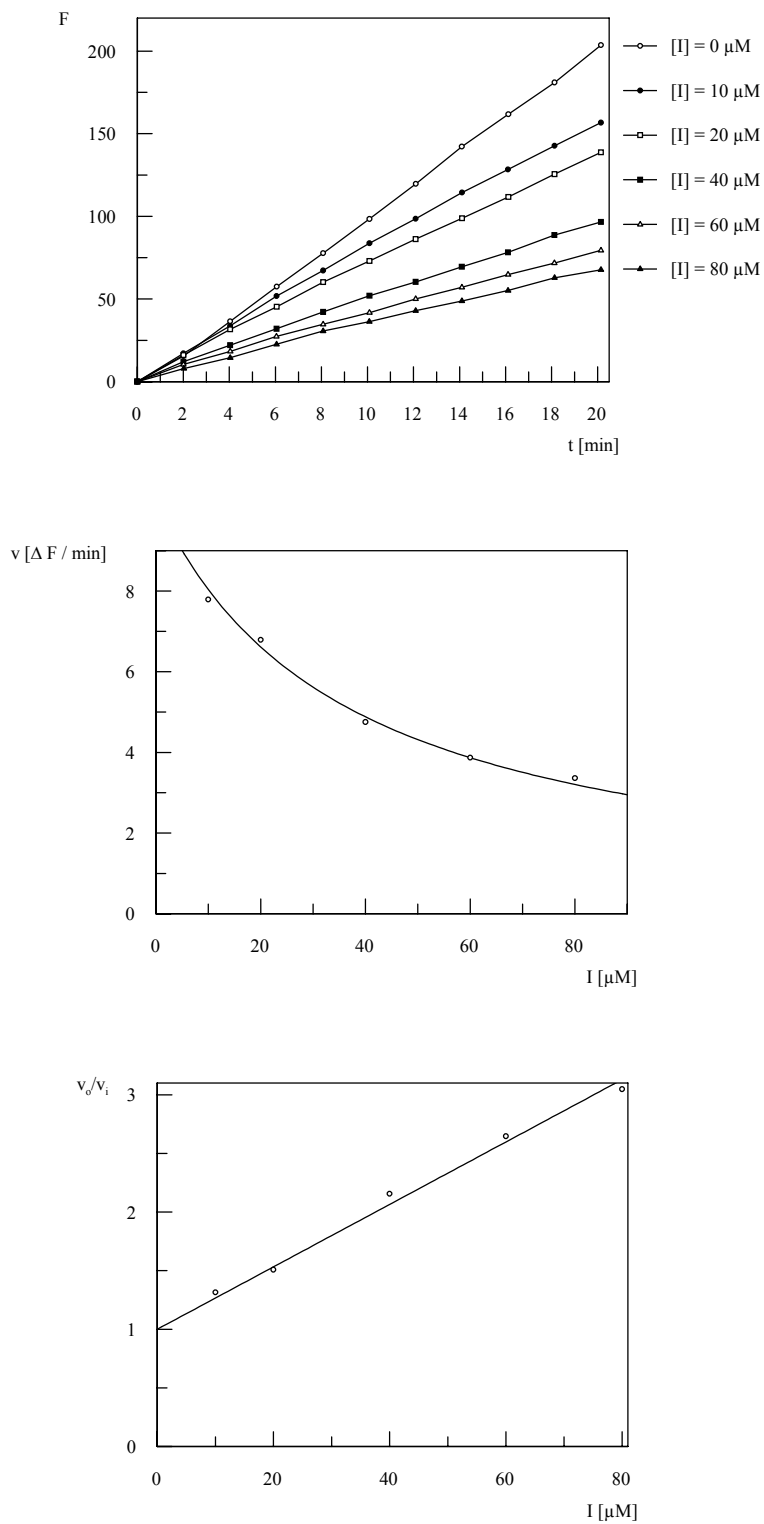


Abb. 18: Umsatz-Zeit-Diagramm (oben), nicht-linearisierter und linearisierter (unten) Dixon-Plot der nicht-zeitabhängigen Hemmung von Cathepsin B durch Etacrynsäureethylester (IV-1a)

Ermittelte Dissoziationskonstante: $K_i = 23.6 \pm 0.2 \mu\text{M}$

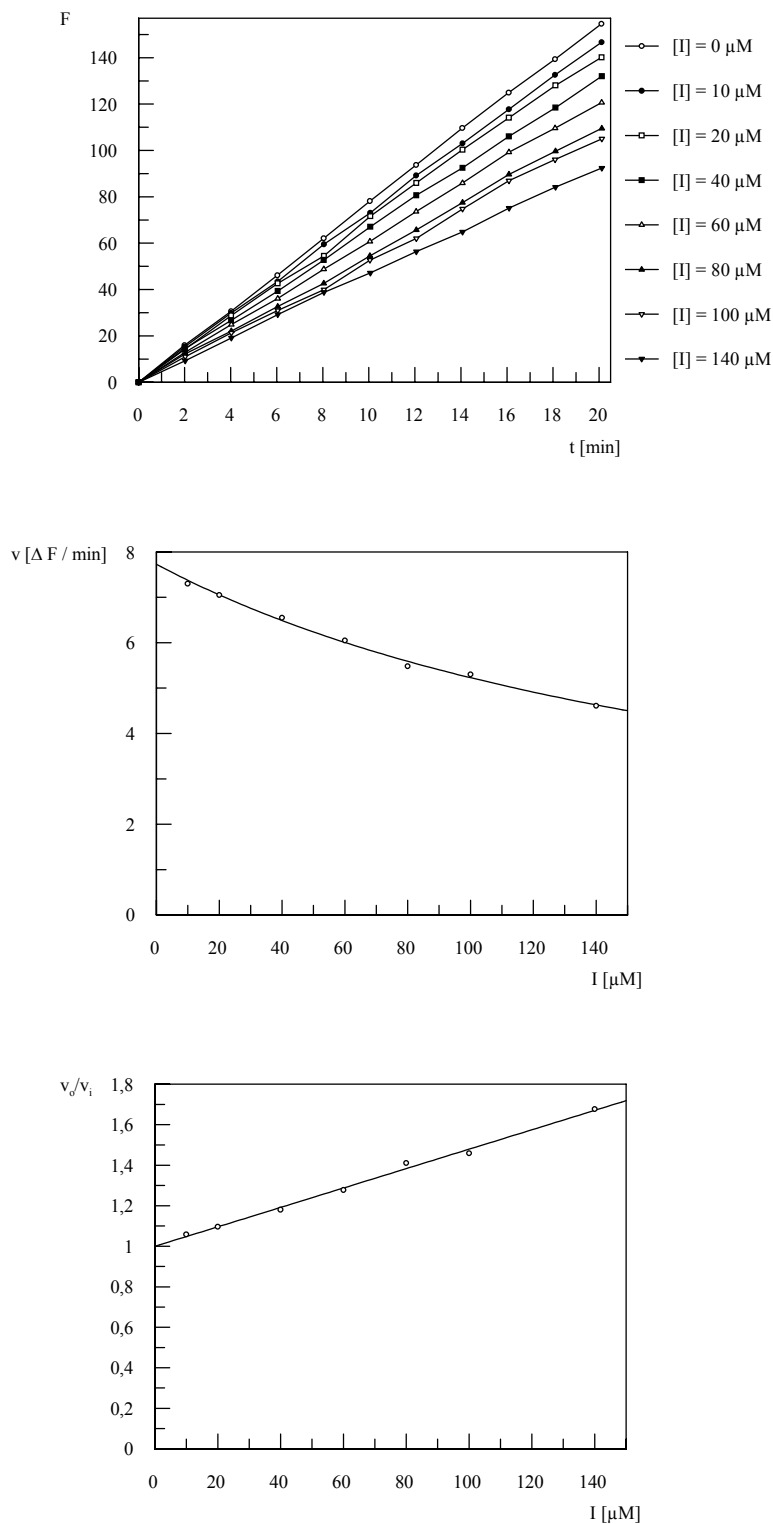


Abb. 19: Umsatz-Zeit-Diagramm (oben), nicht-linearisierter und linearisierter (unten) Dixon-Plot der nicht-zeitabhängigen Hemmung von Falcipain 2 durch Etacrynsäure-*n*-hexylamid (VI-1j)

Ermittelte Dissoziationskonstante: $K_i = 69.7 \pm 3.3 \mu\text{M}$

5.1.7 Ergebnisse der Enzymassays

Tab. 15: Dissoziationskonstanten K_i für die nicht-zeitabhängige Hemmung von Cathepsin B, Falcipain 2 und Rhodesain (Mittelwerte aus zwei Messreihen)

		Cathepsin B K_i [μ M]	Falcipain 2 K_i [μ M]	Rhodesain K_i [μ M]
IV-0a	[4-(2-Methylacryloyl)-phenoxy]-essigsäureethyl-ester	> 400	> 400	12.7 \pm 0.6
IV-1a	Etacrynsäureethylester	23.6 \pm 0.2	21.4 \pm 1.5	4.1 \pm 0.3
IV-2a	[2-Chlor-4-(2-methylacryloyl)-phenoxy]-essigsäureethylester	> 400	> 400	11.9 \pm 1.7
IV-2b	[2-Chlor-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-essigsäureethylester	263.5 \pm 21.8	174.1 \pm 27.1	12.0 \pm 1.1
IV-3a	[5-Chlor-2-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-essigsäureethylester	z.a.	38.6 \pm 15.3	4.0 \pm 0.7
IV-5a	[3-Methyl-4-(2-methylacryloyl)-phenoxy]-essigsäureethylester	> 400	299.7 \pm 34.2	28.3 \pm 0.2
IV-5b	[3-Methyl-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-essigsäureethylester	> 400	228.7 \pm 0.4	12.9 \pm 0.9
V-1a	Etacrynsäure	35.7 \pm 2.6	155.1 \pm 6.2	70.5 \pm 6.0
V-1b	[2,3-Dichlor-4-(2-methylbutyryl)-phenoxy]-essigsäure	366.0 ^a \pm 39.4	n.b.	n.b.
V-4a	[2,3-Dimethyl-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-essigsäure	> 400	n.b.	n.b.
VI-1a	Etacrynsäure-(L)-Ala-O-benzylester	z.a.	62.3 \pm 15.8	7.0 \pm 1.3
VI-1b	Etacrynsäure-(D)-Ala-O-benzylester	z.a.	57.7 \pm 6.1	9.5 \pm 0.4
VI-1c	Etacrynsäure-Gly-(L)-Ala-NH ₂	34.4 \pm 1.5	74.1 \pm 1.0	8.6 \pm 0.2
VI-1d	Etacrynsäure-Gly-(L)-Phe-NH ₂	17.7 \pm 0.9	84.6 \pm 15.3	7.8 \pm 1.6

Fortsetzung Tab. 15: Dissoziationskonstanten K_i für die nicht-zeitabhängige Hemmung von Cathepsin B, Falcipain 2 und Rhodesain (Mittelwerte aus zwei Messreihen)

		Cathepsin B K_i [μM]	Falcipain 2 K_i [μM]	Rhodesain K_i [μM]
VI-1e	Etacrynsäure-morpholinamid	34.6 \pm 3.3	107.4 \pm 14.0	23.2 \pm 2.0
VI-1f	Etacrynsäure- <i>tert</i> butylamid	z.a.	89.0 \pm 1.1	12.0 \pm 0.1
VI-1g	2-{2-[2,3-Dichlor-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]acetylamino}-2-methyl-propionamid	14.3 \pm 0.04	111.2 \pm 5.0	7.7 \pm 0.5
VI-1h	Etacrynsäure-(<i>N</i> -ethyl-piperazin)-amid	24.2 \pm 0.7	z.a.	10.2 \pm 0.1
VI-1i	Etacrynsäure- <i>n</i> -butylamid	z.a.	64.2 \pm 8.6	6.5 \pm 0.2
VI-1j	Etacrynsäure- <i>n</i> -hexylamid	135.8 \pm 9.0	69.7 \pm 3.3	> 400
VI-1k	Etacrynsäure-benzylamid	19.1 \pm 2.1	116.6 \pm 5.0	9.9 \pm 1.2
VI-1l	Etacrynsäure-anilid	z.a.	94.0 \pm 15.7	> 400
VII-2a	1-(3-Chlor-4-methoxy-phenyl)-2-methyl-propenon	z.a.	25.6 \pm 5.3	13.8 \pm 0.7
VII-2b	1-(3-Chlor-4-methoxy-phenyl)-2-methylenbutan-1-on	> 400	145.5 \pm 10.8	15.7 \pm 1.7
VII-2c	1-(3-Chlor-4-methoxyphenyl)-2-methylen-4-(4-nitrophenyl)-butan-1-on	389.3 \pm 11.0	188.0 \pm 3.8	> 400
IX-a	<i>N-tert</i> Butyloxycarbonyl-2,3-dehydroalaninmethylester	> 400	> 400	> 400
IX-b	<i>N</i> -(<i>N</i> -Benzylloxycarbonyl-(<i>L</i> -)alanyl)-2,3-dehydroalaninmethylester	> 400	> 400	12.1 \pm 0.2
X-a	2-Methylen-1-phenylbutan-1-on	170.0 \pm 0.4	n.b.	n.b.
X-d	1-Cyclohexyl-2-methylenbutan-1-on	> 400	n.b.	n.b.
X-e	Atropasäure	> 400	> 400	> 400

> 400: K_i -Wert ist größer als 400 μM oder die Verbindung zeigt keine Hemmung; n.b. = nicht bestimmt, z.a. = zeit-abhängige Hemmung (s. Tab. 16), ^a = IC_{50} -Wert, entspricht näherungsweise dem $K_{i,app}$ -Wert

Tab. 16: Hemmkonstanten für die zeitabhängige Inaktivierung von Papain, Falcipain 2 und Cathepsin B (Mittelwerte aus zwei Messreihen)

	Papain	k_i [min^{-1}]	K_i [μM]	k_{2nd} [$\text{M}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$]
IV-0a	[4-(2-Methylacryloyl)-phenoxy]-essigsäureethyl-ester	0.108	1960	55 ^b
IV-1a	Etacrynsäureethylester	0.016	13	1250 ^b
V-1a	Etacrynsäure	0.125 ± 0.02	375.0 ± 5.3	333 ± 13.0
V-4a	[2,3-Dimethyl-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-essigsäure	0.013	33	391 ^b
VI-1a	Etacrynsäure-(L)-Ala-O-benzylester			560 ^a
VI-1c	Etacrynsäure-Gly-(L)-Ala-NH ₂	0.128 ± 0.0052	250.3 ± 24.5	484 ± 2.5
VI-1d	Etacrynsäure-Gly-(L)-Phe-NH ₂	0.114 ± 0.012	188.2 ± 27.0	608 ± 22.0
VI-1e	Etacrynsäure-morpholinamid	0.088 ± 0.0035	204.0 ± 8.0	433 ± 33.0
VI-1f	Etacrynsäure- <i>tert</i> butylamid	0.015 ± 0.0003	3.2 ± 0.2	4583 ± 386.0
VI-1h	Etacrynsäure-(N-ethyl-piperazin)-amid	0.128 ± 0.018	412.5 ± 60.0	311 ± 3.0
VI-1i	Etacrynsäure- <i>n</i> -butylamid	0.0027 ± 0.00003	6.19 ± 0.04	2572 ± 43.0
VI-1j	Etacrynsäure- <i>n</i> -hexylamid			590 ^a
X-a	2-Methylen-1-phenylbutan-1-on	0.135 ± 0.005	778.0 ± 43.0	176 ± 3.0
X-d	1-Cyclohexyl-2-methylenbutan-1-on			29 ^a
Falcipain 2				
VI-1h	Etacrynsäure-(N-ethyl-piperazin)-amid	0.033 ± 0.004	50.4 ± 9.4	675 ± 47.5

Fortsetzung Tab. 16: Hemmkonstanten für die zeitabhängige Inaktivierung von Papain, Falcipain 2 und Cathepsin B (Mittelwerte aus zwei Messreihen)

	Cathepsin B	k_i [min^{-1}]	K_i [μM]	k_{2nd} [$\text{M}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$]
IV-3a	[5-Chlor-2-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-essigsäureethylester	0.064 ± 0.0046	11.0 ± 0.8	5782 ± 0.8
VI-1a	Etacrynsäure-(<i>L</i>)-Ala-O-benzylester			1636 ^a ± 64.3
VI-1b	Etacrynsäure-(<i>D</i>)-Ala-O-benzylester			1614 ^a ± 8.0
VI-1f	Etacrynsäure- <i>tert</i> butylamid	0.036	13.5	2673 ^b
VI-1i	Etacrynsäure- <i>n</i> -butylamid	0.042 ± 0.0075	13.7 ± 5.8	3129 ± 777.2
VI-1l	Etacrynsäure-anilid			609 ^a ± 68.7
VII-2a	1-(3-Chlor-4-methoxy-phenyl)-2-methyl-propenon	0.060 ± 0.0049	28.9 ± 7.4	2096 ± 368.3

^aabgeschätzt über $k_{obs}/[I]$, ^bnur eine Messreihe

5.1.8 Untersuchungen zur Hemmung von Serin-Proteasen durch Etacrynsäure-Derivate

Um nachzuweisen, dass die Etacrynsäure-Derivate nur Cystein-Proteasen, nicht jedoch Serin-Proteasen hemmen, wurde die Wirkung von Etacrynsäure (**V-1a**) und Etacrynsäure-*tert*butylamid (**VI-1f**) auf die Serin-Proteasen Trypsin und α -Chymotrypsin getestet.

Für beide Enzyme wurde ein 50 mM Tris-Puffer pH 8.0 mit 5 mM EDTA und 100 mM NaCl verwendet. Als Substrat dienten bei Trypsin 40 μ M Z-Phe-Arg-AMC, für α -Chymotrypsin dagegen 80 μ M Suc-Leu-Tyr-AMC (= Succinyl-(*L*)-leucyl-(*L*)-tyrosyl-7-amino-4-methyl). Etacrynsäure wurde in 1000 μ M Endkonzentration, Etacrynsäure-*tert*butylamid in 100 μ M Endkonzentration zugesetzt. Die DMSO-Konzentration der Ansätze betrug bei beiden Enzymen 10 %. Ein weiterer Ansatz wurde ohne Zusatz von Inhibitoren vermessen.

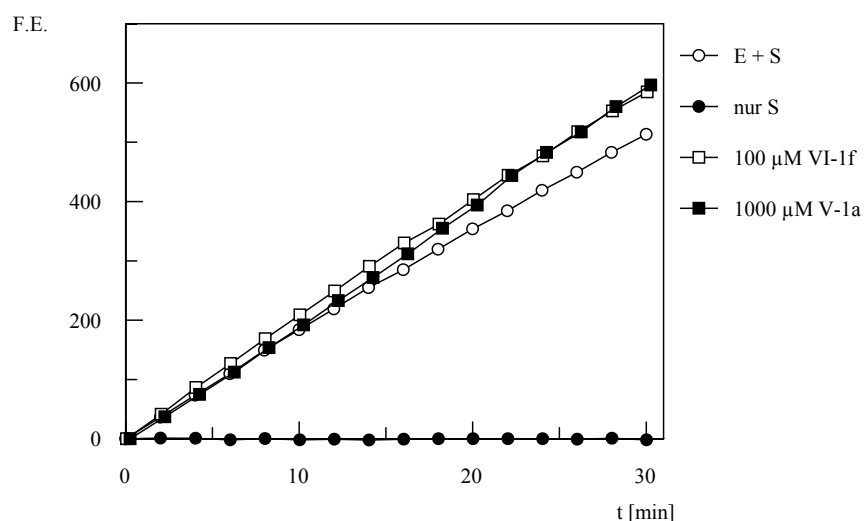


Abb. 20: Einfluss von Etacrynsäure (V-1a) und Etacrynsäure-*tert*butylamid (VI-1f) auf Trypsin

Die Abb. 20 und Abb. 21 zeigen, dass die getesteten Verbindungen keinerlei hemmenden Einfluss auf die Aktivitäten von Trypsin bzw. α -Chymotrypsin haben. Die Umsatz-Zeit-Kurven verlaufen nicht anders als ohne Inhibitor. Die Etacrynsäure-Derivate scheinen also selektiv gegenüber Cystein-Proteasen zu sein.

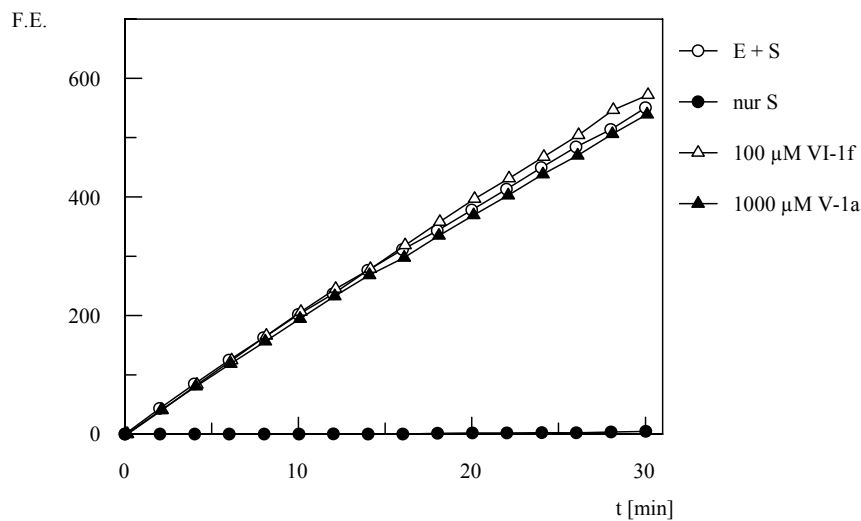


Abb. 21: Einfluss von Etacrynsäure (V-1a) und Etacrynsäure-*tert*butylamid (VI-1f) auf α -Chymotrypsin

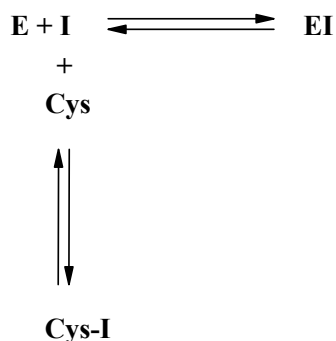
5.1.9 Einfluss von niedermolekularen Thiolen im Puffer auf die Inhibitoren mit Michael-System

Da Inhibitoren mit Michael-System wie die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen mit Nucleophilen reagieren können und bei Versuchen mit Cystein-Proteasen der Enzymlösung niedermolekulare Thiole wie Cystein oder Dithioerythritol zugesetzt werden müssen, stellte sich die Frage, ob die genannten Inhibitoren bereits mit dem in Puffer gelösten Thiolen in einer Michael-Addition reagieren und somit die Inhibitorkonzentration bereits vor Reaktion mit dem Enzym verringern können.

Von Etacrynsäure ist bekannt, dass sie sowohl *in vitro* als auch *in vivo* leicht Thiole wie Cystein addiert.^{[26],[35],[25]} Es wird für die Addition von Cystein eine Halbwertszeit von 0.8 min (RT, 0.1 M Phosphatpuffer pH 7.1) angegeben.^[35] Koechel *et al.* haben jedoch nachgewiesen, dass nach Einbringen des Etacrynsäure-Cystein-Addukts in ein thioolfreies Medium das addierte Cystein innerhalb von 30 min fast vollständig (85.5 %) wieder freigesetzt wird (RT, 0.1 M Phosphatpuffer pH 8.0).^[87]

Die Thiol-Gruppe im aktiven Zentrum von Cystein-Proteasen liegt als Thiolat-Anion vor und ist damit sehr viel nucleophiler als das Thiol des Puffers. Es ist daher anzunehmen, dass das Cysteinat des aktiven Zentrums bevorzugt mit dem Inhibitor reagiert. Vermutlich wird sich bei den Enzymassays ein reversibles Gleichgewicht zwischen freiem Inhibitor und Thiol-Inhibitor-Addukt einstellen (Schema 26). Aus diesem Gleichgewicht kann der

Inhibitor durch Reaktion mit dem Enzym entzogen werden und damit im Prinzip vollständig für die Hemmung des Enzyms zur Verfügung stehen.



Schema 26: Gleichgewichte bei Anwesenheit von niedermolekularen Thiolen in der Enzymlösung

Es wurde dennoch untersucht, ob die Anwesenheit von Cystein im Puffer einen Einfluss auf die Enzymkinetik hat. Dazu wurden zwei Versuchsreihen mit dem kontinuierlichen Assay mit Papain/(L)-BAPA und unterschiedlichen Etacrynsäurekonzentrationen durchgeführt. Dem Assay-Puffer wurden einmal 5 mM Cystein zugesetzt, im anderen Falle nicht. Die übrigen Versuchsbedingungen waren identisch. Der Puffer für die Papainlösung wurde für beide Versuche separat mit 5 mM Cystein hergestellt, da das Cystein für die Aktivierung des Enzyms essentiell

ist. Es konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich des Ausmaßes der Inhibition zwischen beiden Messreihen festgestellt werden. Die Cysteinkonzentration scheint also keinen Einfluss auf die Testungen zu haben. Dennoch wurden die Versuchsbedingungen so gewählt, dass die Cysteinkonzentration so niedrig wie möglich blieben.

5.1.10 Dialyseversuche

Bei den meisten der getesteten Verbindungen war in den Enzymassays eine nicht-zeitabhängige Inaktivierung der Enzyme zu beobachten. Um festzustellen, ob die beobachtete Hemmung durch die Etacrynsäure-Derivate reversibel oder irreversibel verläuft, wurden Dialyserversuche mit ausgewählten Verbindungen durchgeführt. Dazu wurden Etacrynsäure (**V-1a**), 4-(2-Methylbutyryl)-phenoxyessigsäure (**V-1b**) und Etacrynsäure-*tert*butylamid (**VI-1f**) jeweils in einer Konzentration von 800 μM mit Cathepsin B (2 mU/ml bzw. 10.8 ng/ml) in 50 mM Tris-Puffer pH 6.5 mit 200 mM Natriumchlorid, 2 mM DTT und 5 mM EDTA bei 25 °C inkubiert. Eine Referenz wurde parallel dazu ohne Inhibitor auf die gleiche Weise behandelt. Nach 60 min wurden jeweils die Rest-Enzymaktivitäten bestimmt und die Enzymlösungen in einen Dialyseschlauch (Serva Visking[®] 27/32, MWCO 12000 – 14000, Porendurchmesser 25 Å) überführt. Die Lösung wurde gegen einen 80-fachen Überschuss (80 ml) an Puffer für 60 min dialysiert, anschließend wurde erneut die Enzymaktivität bestimmt.

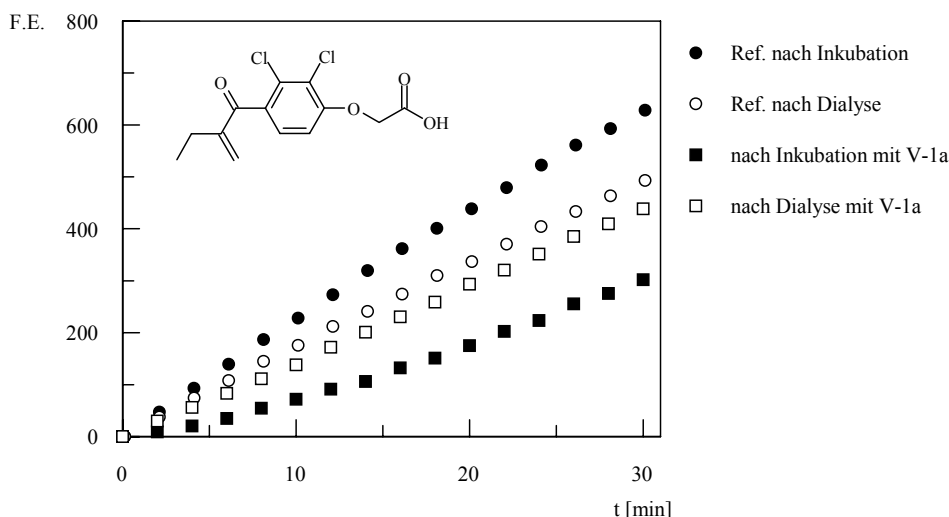


Abb. 22: Ergebnis des Dialyse-Assays mit Etacrynsäure (V-1a)

Betrachtet man die Änderung der Steigung der Umsatz-Zeit-Kurven (Abb. 22), so ergibt sich nach der Inkubation mit Etacrynsäure eine Reduktion der Enzymaktivität bei Cathepsin B um ca. 51 % gegenüber der Referenz. Nach der Dialyse erholt sie sich wieder auf ca. 90 % der Enzymaktivität, die das Enzym ohne Inkubation mit dem Inhibitor nach Dialyse hat.

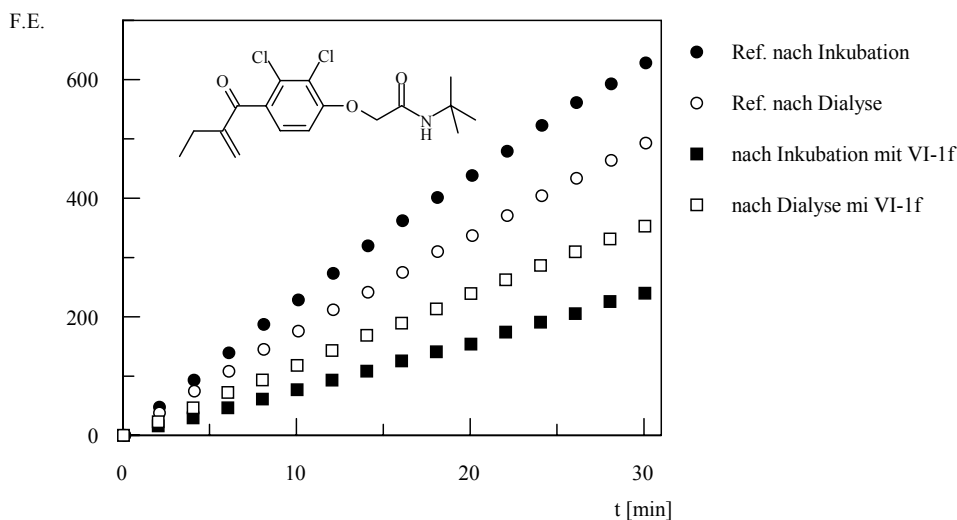


Abb. 23: Ergebnis des Dialyse-Assays mit Etacrynsäure-*tert*butylamid (VI-1f)

Bei Inkubation mit Etacrynsäure-*tert*butylamid (Abb. 23) ergibt sich eine Aktivitätsreduktion um 62 %, die sich nach Dialyse auf ca. 73 % der Ausgangsaktivität erholt.

Es wurden ebenfalls Versuche mit 4-(2-Methylenbutyryl)-phenoxyessigsäure (V-1b), dem die aktivierte Doppelbindung fehlt, durchgeführt (Abb. 24).

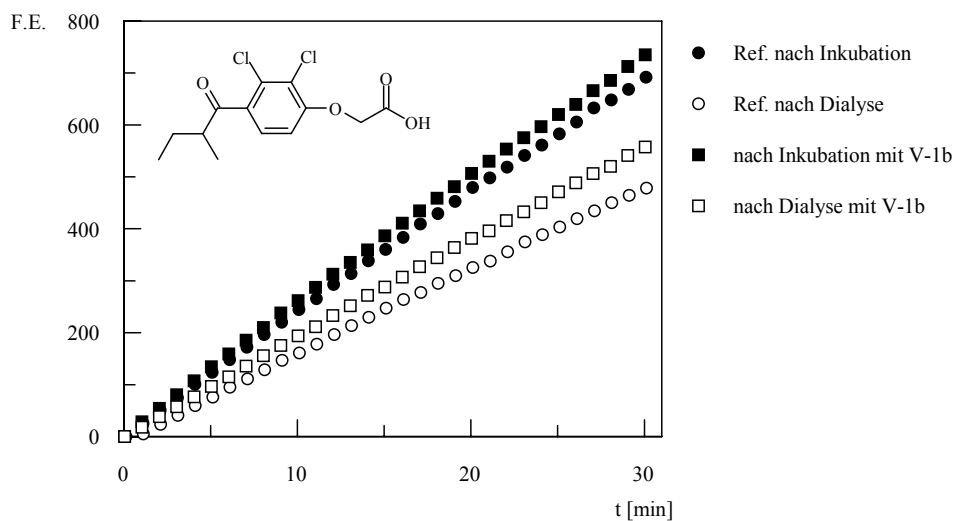


Abb. 24: Ergebnis des Dialyse-Assays mit 4-(2-Methylenbutyryl)-phenoxyessigsäure (V-1b)

Es konnte keine Hemmung des Enzyms festgestellt werden.

Wie erwartet reduzieren nur die Verbindungen mit α,β -ungesättigtem Keton die Enzymaktivität. Diese erholt sich nach Dialyse wieder, was zeigt, dass die Inhibitoren mit dem Enzym reversibel reagieren. Es gibt zwei Erklärungen für dieses Verhalten.

1. Die Inhibitoren reagieren nicht mit dem Enzym, sind also nicht-kovalente reversible Inhibitoren.
2. Es findet eine Retro-Michael-Reaktion statt, die Inhibitoren sind also kovalent reversibel.

Bedenkt man, dass von Etacrynsäure bekannt ist, dass sie unter Michael-Addition/Retro-Michael-Reaktion reversibel mit Thiolen reagiert (s. Kap. 5.1.9) und dass das Derivat ohne Doppelbindung unwirksam ist, kann man vermuten, dass die 2. Erklärung zutrifft. Ein endgültiger Nachweis der kovalenten Addukt-Bildung ist z. B. über massenspektrometrische Versuche möglich. Diese Versuche werden zurzeit durchgeführt.

5.1.11 Diskussion

Betrachtet man die Ergebnisse, die mit den verschiedenen Substraten (BAPA, Z-Phe-Arg-AMC) an den verschiedenen Proteasen (Papain, CB, FP, RD) erhalten wurden, so fällt auf, dass bei Papain/BAPA eine zeitabhängige, bei FP und CB/Z-Phe-Arg-AMC sowohl zeitabhängige als auch nicht-zeitabhängige Hemmung und bei RD/Z-Phe-Arg-AMC ausschließlich nicht-zeitabhängige Hemmung zu beobachten ist.

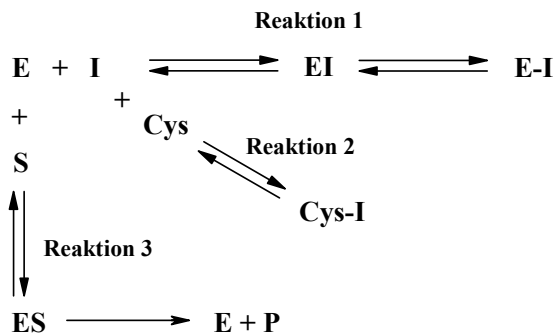
Um dies erklären zu können, muss man sich die K_m -Werte der Substrate betrachten (Tab. 17). BAPA ist für Papain ein ausgesprochen niedrig-affines Substrat mit einem sehr hohen K_m -Wert im millimolaren Bereich. CB besitzt für Z-Phe-Arg-AMC eine mittlere Affinität, FP eine hohe und RD eine sehr hohe Affinität im nanomolaren Bereich. D. h. der Unterschied in den Affinitäten der Enzyme zu ihren Substraten beträgt mehr als Faktor 3000.

Tab. 17: K_m -Werte für die verwendeten Enzym-Substrat-Paare

Enzym	Substrat	K_m [μM]
Papain	N^α -Benzoyl-(L)-arginin-p-nitroanilid (BAPA)	2500
Cathepsin B (CB)		150
Falcpain 2 (FP)	Z-(L)-Phe-(L)-Arg-AMC	21.5
Rhodesain (RD)		0.826

Dies heißt auch, dass bei den Versuchen mit Papain die Affinitäten der Inhibitoren zum Enzym wesentlich größer sind als die Affinität des Substrates BAPA zum Enzym, wohingegen bei den anderen Enzymen Substrat und Inhibitor etwa gleiche Affinität zum Enzym aufweisen, bzw. bei RD das Substrat sogar eine höhere Affinität zum Enzym besitzt als die Inhibitoren. Diese unterschiedlichen Affinitäten müssen natürlich bei der Berechnung der Hemmkonstanten berücksichtigt werden. Daher resultiert auch die Einführung des Faktors $(1 + [\text{S}]/K_m)$ zur Berechnung der K_i -Werte aus den gemessenen K_{iapp} -Werten (s. Kap. 5.1.2 und 5.1.3). In Fällen wie dem RD/Z-Phe-Arg-AMC-System wird das Enzym aus dem Gleichgewicht $\text{E} + \text{I} \rightleftharpoons \text{EI}$ -Komplex durch Komplexbildung mit dem Substrat zum ES-Komplex ($\text{E} + \text{S} \rightleftharpoons \text{ES}$) zu einem wesentlich größeren Teil entzogen als z. B. im System Papain/BAPA, so dass dann innerhalb der Messzeit keine Zeitabhängigkeit beobachtet werden kann. Eine Zeitabhängigkeit könnte möglicherweise erhalten werden, wenn die Reaktion über einen längeren Zeitraum beobachtet werden könnte. Dies ist jedoch nicht durchführbar, da dann die steady-state-Bedingungen nicht mehr erfüllt wäre, d. h. das Substrat nicht über den ganzen Messzeitraum im Überschuss vorhanden wäre und die Produktzunahme während der Reaktion alleine schon aufgrund der geringeren Substratkonzentration nicht mehr linear verlaufen würde.

Zusammenfassend kann für die hier getesteten Inhibitoren mit Michael-System eine kovalent reversible Hemmung postuliert werden, die im Falle des Papain/BAPA-Systems als quasi-irreversible Hemmung beobachtet wird. In den Enzymassays laufen drei Reaktionen gleichzeitig ab (Schema 27):



Schema 27: Reaktionen, die bei der Testung der Inhibitoren mit Michael-System auftreten

1. Eine kovalent reversible Reaktion des Inhibitors mit dem Enzym, die Reaktion der Enzymhemmung.
2. Die kovalent reversible Reaktion des Inhibitors mit dem Thiol des Puffers. Diese Reaktion ist wie die oben geschilderten Versuche gezeigt haben, vernachlässigbar, da die Reaktion des Inhibitors mit dem Enzym viel schneller verläuft.
3. Die Reaktion des Enzyms mit dem Substrat. Je nach Affinität des Substrates zum Enzym wird eine zeitabhängige oder nicht-zeitabhängige Hemmung durch die Inhibitoren beobachtet. Bei zeitabhängiger Hemmung können je nach Inhibitor alle drei Konstanten K_i , k_i und k_{2nd} oder in Näherung $k_{obs}/[I] = k_{2nd}$ bestimmt werden (s. Kap. 5.1.2). Bei nicht-zeitabhängiger Hemmung kann nur die Gesamtdissoziationskonstante des E-I-Adduktes K_i bestimmt werden (s. Kap. 5.1.3).

Vergleicht man Vinylsulfone und die in der vorliegenden Arbeit getesteten Derivate mit aktivierter Doppelbindung, fällt auf, dass erstere irreversible Inhibitoren sind, die Etacrynsäure-Derivate jedoch reversibel mit den Proteasen reagieren. Um dies zu erklären muss man sich nochmals den Mechanismus der Hemmung durch Vinylsulfone veranschaulichen (s. Kap. 1.4.2). Nur durch sofortige Protonierung des entstehenden Carbanions (in α -Position zur Sulfonyl-Gruppe) durch das Histidinium-Ion des aktiven Zentrums entsteht bei die-

sen eine irreversible Hemmung (Abb. 25). Dies wird dadurch begünstigt, dass das entstehende Carbanion im Vergleich zu Histidin eine sehr starke Base darstellt.

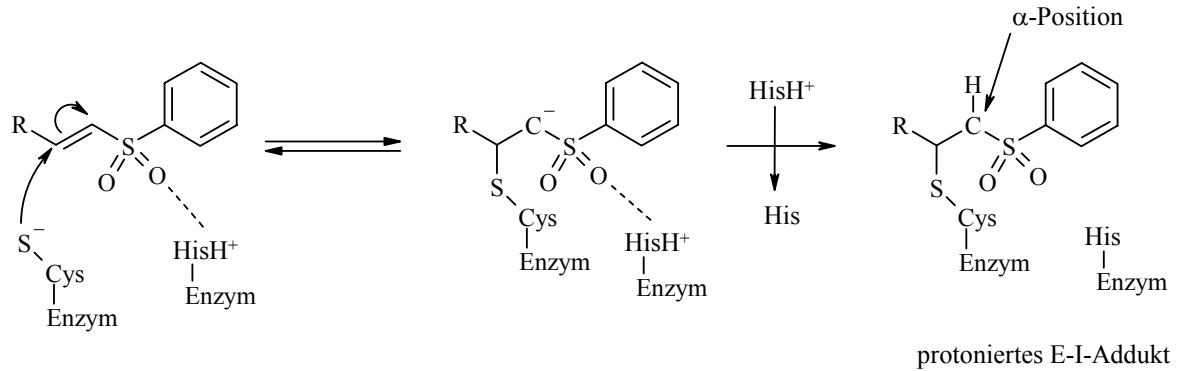


Abb. 25: Mechanismus der Inhibition von Cystein-Proteasen durch Vinylsulfone

Bei Angriff des Cysteinats des aktiven Zentrums an die Etacrynsäure-Derivate entsteht dagegen ein Carbanion, das mit seiner stabileren Enolat-Struktur im Gleichgewicht vorliegt, die schwerer zu protonieren ist als das Carbanion des Adduktes aus Cysteinat und Vinylsulfon. Hier ist eine Rückreaktion zu Michael-Systemen und Cysteinat wesentlich einfacher als bei den Vinylsulfonen (Abb. 26).

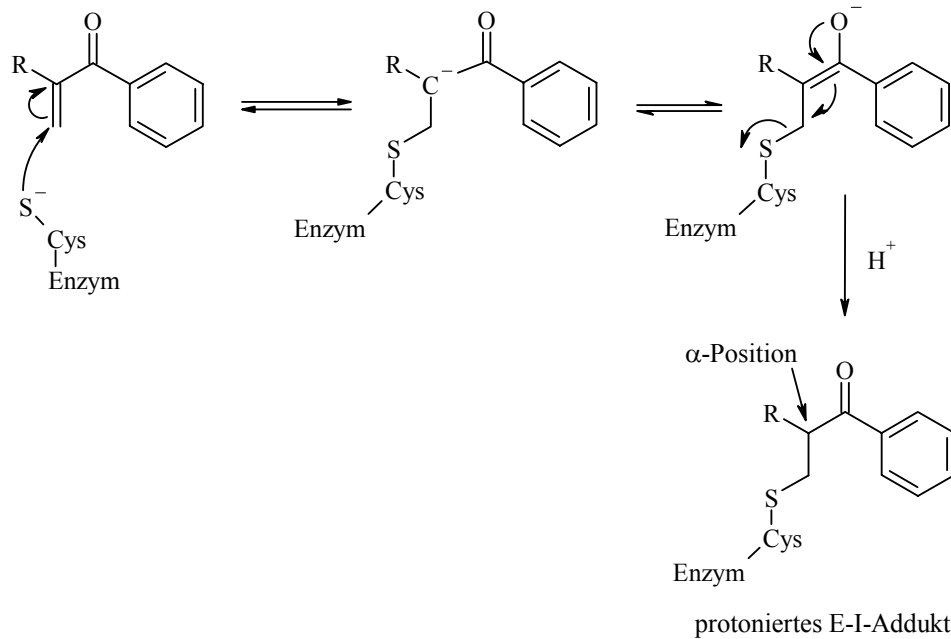


Abb. 26: Postulierter Mechanismus der Inhibition von Cystein-Proteasen durch Etacrynsäure-Derivate

Allgemeiner Teil – Enzymassays

Dies bedeutet, dass die unterschiedlichen Hemmmechanismen (irreversibel vs. reversibel) wahrscheinlich in den unterschiedlichen Basizitäten der entstehenden Carbanionen (bzw. bei der Etacrynsäure des Enolat-Anions) bzw. umgekehrt betrachtet in den unterschiedlichen Aziditäten der α -Positionen der protonierten Enzym-Inhibitor-Addukte (Sulfon vs. Keton) begründet sind.

Interessant wäre hier die Betrachtung der pH-Abhängigkeit der Hemmung. Durch ein saureres Medium könnte die Enolat-Form des Adduktes aus Etacrynsäure-Derivat und Enzym protoniert werden, was dann die Reaktion ebenfalls irreversibel machen müsste.

Ebenso stellt aufgrund dieser Überlegungen das Sulfon-Derivat (s. Kap. 3.3.2.3) eine interessante Zielstruktur für zukünftige Arbeiten dar.

5.2 Untersuchungen an coronaviralen Cystein-Proteasen

5.2.1 Einleitung

Bei den Coronaviren (CoV) finden sich eine Vielzahl tier- und humanpathogener Spezies, wie z. B. das „transmissible gastroenteritis virus“ (TGEV) beim Schwein oder das feline infektiöse Peritonitisvirus (FIPV). Bei Menschen gehören Coronaviren zu den häufigsten Erregern (20-30 %) akuter Atemwegserkrankungen. Auch das schwere akute Atemwegssyndrom (SARS = severe acute respiratory syndrom), eine schwere atypische Lungenentzündung, wird durch ein bisher unbekanntes Coronavirus (SARS-CoV) verursacht. Es handelt sich dabei um ein hochkontagiöses und hochvirulentes Virus, das von Februar bis Juni 2003 eine weltweite Epidemie ausgelöst hat und in etwa 10 % aller Fälle trotz intensivmedizinischer Behandlung durch fortschreitende alveolare Zerstörung der Lunge zum Tode führt.^{[88],[89],[90]} Es gibt ernstzunehmende Hinweise, dass das Virus von der südchinesischen Zibetkatze, in China eine beliebte Delikatesse, auf den Menschen übertragen wurde. Allerdings ist nicht klar, ob die Katze wirklich das natürliche Reservoir des Virus ist, oder ob sie eine von vielen Spezies ist, die das Virus in sich trägt.^[91]

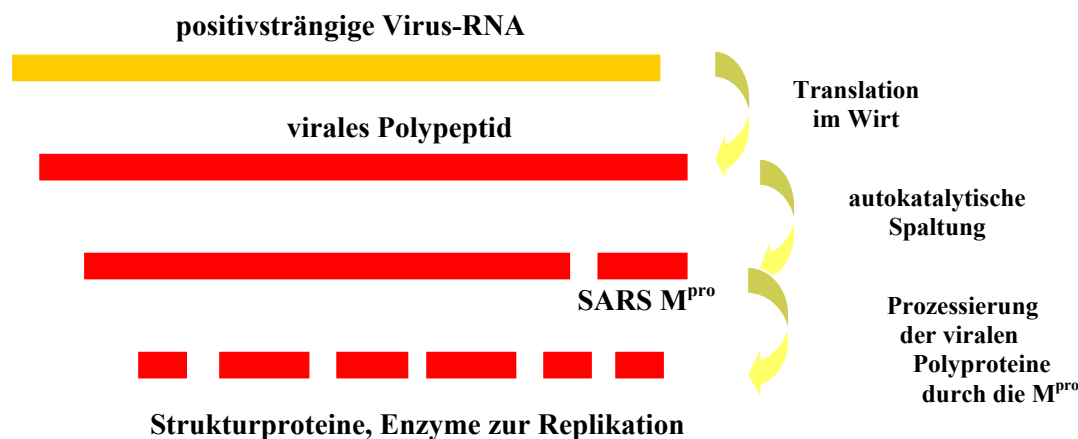


Abb. 27: Rolle der SARS-CoV M^{pro} bei der Replikation des Virus

Bei der Familie der *Coronaviridae* handelt es sich um umhüllte, positivsträngige RNA-Viren, d. h. die RNA kann unmittelbar in der Wirtszelle durch dessen Enzymausstattung in mehrere große Polyproteine translatiert werden. Alle Coronaviren besitzen eine sog. Hauptprotease (main protease, M^{pro}), die sich autokatalytisch von diesen Polyproteinen

abspaltet (Abb. 27) und für einen Großteil der weiteren Prozessierung der Proteine in Strukturproteine und Enzyme verantwortlich ist. Damit ist sie essentiell für den gesamten Replikationszyklus des Virus. Es handelt sich um eine Cystein-Protease mit einem Molekulargewicht von 33.1 kDa, die eine entfernt chymotrypsinähnliche Tertiärstruktur aufweist.^[92] Wie bei allen coronaviralen M^{pro}s ist im aktiven Zentrum eine katalytische Diade zu finden, die aus einem Cystein-Histidin-Paar besteht. Eine dritte Aminosäure wie bei anderen Cystein-Proteasen fehlt.^[93] Die Funktion des Wasserstoffbrücken-Akzeptors wird durch ein konserviertes Wassermolekül übernommen.^[94] Die SARS-CoV M^{pro} weist eine ausgeprägte Substratspezifität für Leu-Gln↓(Ala, Ser, Gly)-Sequenzen auf.^[95]

Da sich im menschlichen Organismus kein entsprechend analoges Enzym findet, und da bisher weder ein Impfstoff, geschweige denn ein Virustatikum zur Therapie der Erkrankung zur Verfügung stehen, stellt die SARS-CoV M^{pro} ein interessantes Target für Enzym-inhibitoren dar.

5.2.2 Enzymatischer HPLC-Assay

Um in der vorliegenden Arbeit synthetisierte Verbindungen auf inhibitorische Aktivität gegen coronavirale M^{pro}s zu screenen, wurde ein enzymatischer HPLC-Assay verwendet. Dazu wurden für die TGEV M^{pro} das Oligopeptid H₂N-V-S-Y-G-S-T-L-Q†A-G-L-R-K-M-A-CO₂H († gibt die Spaltstelle an) und für die SARS-CoV M^{pro} H₂N-V-S-V-N-S-T-L-Q†S-G-L-R-K-M-A-CO₂H als Substrat eingesetzt. Das erste Peptid stellt ein Fragment von Replikase-Polypeptiden des humanen Coronavirus 229E dar,^[93] das zweite Peptid entspricht der Spaltstelle bei der TGEV M^{pro}.^[96] Es hat sich gezeigt, dass letzteres Peptid auch durch die SARS-CoV M^{pro} gespalten wird^[95] und nun kommerziell als Substrat für die SARS-CoV M^{pro} erhältlich ist. Da die Sequenzen sehr ähnlich sind, können beide Peptide sowohl der TGEV M^{pro} als auch der SARS-CoV M^{pro} als Substrat dienen.

Bei den HPLC-Versuchen wurde ein Tris-Puffer (20 mM, pH 7.5) mit 16 % (V/V) Dimethylsulfoxid, 200 mM Natriumchlorid, 1 mM DTT und 1 mM EDTA verwendet. Das Gesamtvolumen jedes Ansatzes betrug 30 µl. Die Zusammensetzung eines Ansatzes zeigt Tab. 18.

Tab. 18: Aufbau des coronaviralen HPLC-Assays

	TGEV M ^{pro}	SARS-CoV M ^{pro}
Enzymmenge	0.05 µg	0.05 µg
Inhibitor	20 - 100 µM	20 -100 µM
Substrat	0.44 mM	0.50 mM

Bei den Versuchen mit der TGEV M^{pro} enthielt die Substratlösung z. T. zusätzlich *N-tert*-Butyloxycarbonyl-Phenylalanin (7.5 mM Endkonzentration) als internen Standard. Die Enzyme wurden zunächst 30 min bei 25 °C mit dem Inhibitor inkubiert, dann mit dem jeweiligen Substrat weitere 30 min bei der TGEV M^{pro} bzw. 60 min bei der SARS-CoV M^{pro}.^{[93],[96]} Die SARS-CoV M^{pro} muss länger inkubiert werden, da die Enzymaktivität bei dem gewählten Substrat geringer ist.

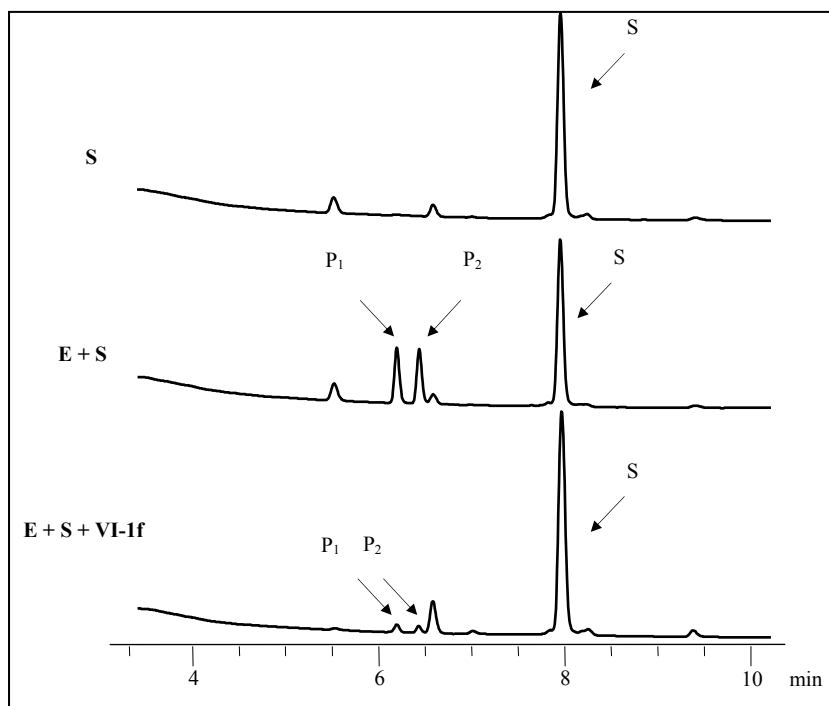


Abb. 28: HPLC-Chromatogramme mit Etacrynsäure-terbutylamid (VI-1f) (SARS-CoV M^{pro}), S = Substrat, P₁ und P₂ = Spaltprodukte, E = Enzym.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde den Ansätzen das gleiche Volumen 2 %ige Tri-fluoressigsäure-Lösung (TFA) zugegeben und das Gemisch unmittelbar in der HPLC auf einer Agilent Zorbax SB-Aq RP-C₁₈ Säule mit einem linearen Gradient von 5 % auf 90 %

Acetonitril in Wasser mit Zusatz von 0.1 % TFA über 20 min aufgetrennt. Detektiert wurde photometrisch bei 215 nm. In Abb. 28 sind gemessene HPLC-Chromatogramme am Beispiel des Etacrynsäure-*tert*butylamids (**VI-1f**) dargestellt.

Zur Berechnung des Ausmaßes der Hemmung wurden die Peak-Integrale der beiden Hydrolyseprodukte P1 und P2 und das Integral des Substratpeaks S zu den entsprechenden Integralen in Abwesenheit des Inhibitors ins Verhältnis gesetzt.^[93] Bei der TGEV M^{pro} wurden auch Versuche mit einem internen Standard durchgeführt, um zu überprüfen, ob dadurch eine genauere Bestimmung der Enzymhemmung möglich ist. Ein Vergleich der Versuche mit und ohne internem Standard zeigte jedoch, dass der Zusatz eines internen Standards nicht notwendig ist.

Je stärker der Inhibitor die Enzymaktivität hemmt, desto weniger Substrat wird in dem jeweiligen Zeitraum umgesetzt, desto weniger Produkte entstehen also.

Die getesteten Verbindungen sind aus Tab. 19 ersichtlich. Etacrynsäure-*tert*butylamid hemmt sowohl die M^{pro} des SARS-CoV als auch die des TGEV. Im HPLC-Assay sind keine Unterschiede zwischen den beiden getesteten Verbindungen zu erkennen. Allerdings ist eine genauere Differenzierung der Hemmwirkung durch die Ermittlung der Hemmkonstanten des Inhibitors mit diesem Verfahren nicht möglich, weil die Inaktivierung des Enzyms nicht über die Produkt-Zunahme wie in einem spektrometrischen Assay nach und nach verfolgt werden kann. Es kann daher nur der groben Einordnung und Vorselektion der Inhibitoren dienen.

Tab. 19: Hemmung der coronaviralen M^{pro}s der getesteten Inhibitoren

	SARS-CoV M ^{pro}						TGEV M ^{pro}	
	[I] = 100 μ M		[I] = 50 μ M		[I] = 20 μ M		[I] = 100 μ M	
		n		n		n		n
IX-a	–	3					++	1
IX-b	+	3					++	1
V-1a	+	1					+	1
VI-1f	+++	2	+++	3	++	3	+	1
VI-1g	+++	2	+++	3	++	3		

[I] = Inhibitorkonzentration; n = Anzahl der Bestimmungen; –: Hemmung < 10 %; +: Hemmung = 10-50 %; ++: Hemmung = 50-90 %; +++: Hemmung > 90 %;

5.2.3 Fluorimetrischer Enzymassay mit der SARS-CoV M^{pro}

Zur Ermittlung der Hemmkonstanten von Etacrynsäure-*tert*butylamid (**V-1f**) und dessen Derivat **V-1g** an der SARS-CoV M^{pro} wurde ein FRET-Assay (FRET = fluorescence resonance energy transfer) eingesetzt.^[97] Dabei wird ein Enzymsubstrat verwendet, das am einen Ende einen Fluoreszenz-Donor trägt, am anderen Ende einen Fluoreszenz-Akzeptor. Der Akzeptor absorbiert Licht bei derselben Wellenlänge, bei der der Donor fluoresziert (Abb. 29). Solange das Substrat intakt ist, beide Gruppen also in einem bestimmten Abstand zueinander vorliegen, absorbiert der Akzeptor das vom Donor emittierte Licht und unterdrückt somit die Fluoreszenz nach außen. Wenn das Substrat vom Enzym gespalten wird, können sich die beiden Gruppen voneinander entfernen und der Akzeptor kann die Fluoreszenz des Donors nicht mehr länger unterdrücken. Je mehr Substrat gespalten wird, desto höher steigt die messbare Fluoreszenz.

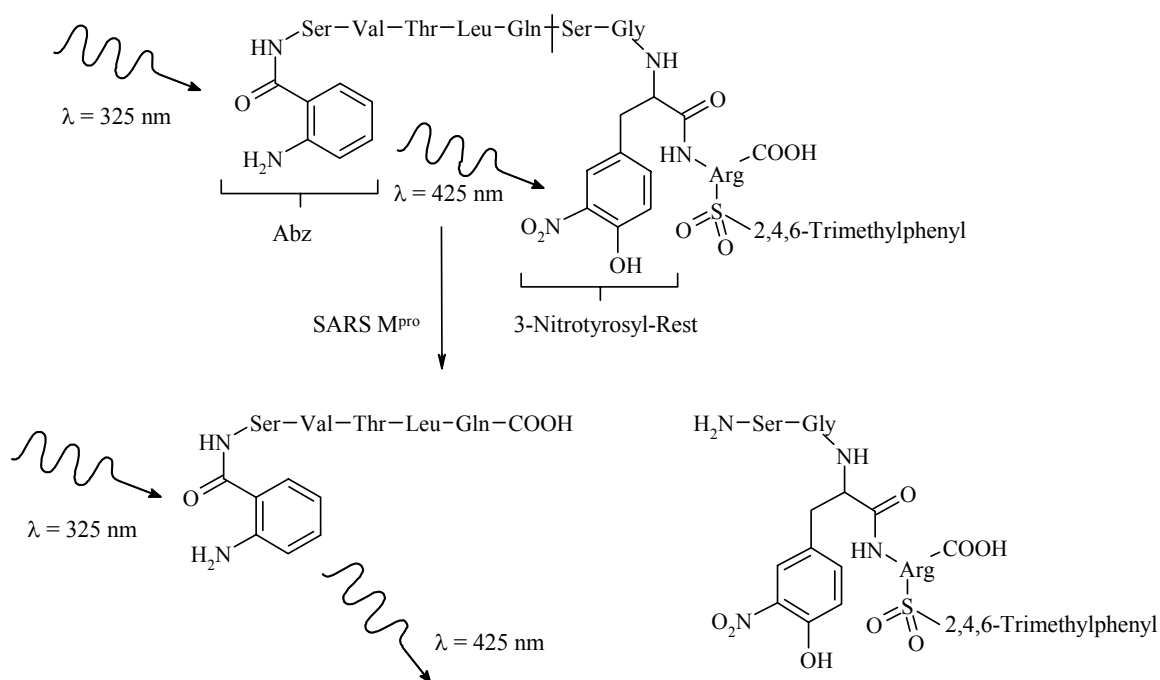


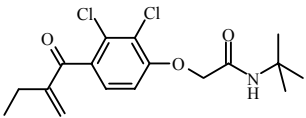
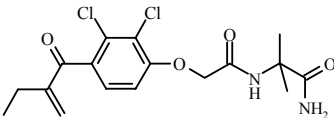
Abb. 29: Prinzip des FRET-Assays, Abz = 2-Aminobenzoessäure.

Als Donor-Akzeptor-Paar wurden Anthranilsäure (2-Aminobenzoessäure, Abz) und 3'-Nitrotyrosin verwendet.

Das Substrat Abz-Ser-Val-Thr-Leu-Gln-Ser-Gly-(3'-NO₂-Tyr)-(2,4,6-Trimethylphenylsulfonyl)-Arg-CO₂H wurde von Markus Schiller im Arbeitskreis am Festphasen-Peptid-synthesizer hergestellt. Der Assay wurde bei 25 °C in 20 mM Tris-Puffer pH 7.5 mit

0.1 mM EDTA, 1 mM DTT und 200 mM NaCl mit 12.5 % DMSO und 300 μM Substrat durchgeführt. Die Enzymkonzentration betrug dabei 8.5 ng/ μl pro Ansatz, die Inhibitor-konzentrationen betragen zwischen 10 und 140 μM . Bei der SARS-CoV M^{pro} war eine nicht-zeitabhängige Inaktivierung der Enzymaktivität zu beobachten, weshalb nur die Dissoziationskonstante K_i bestimmt wurde. Die erhaltenen Ergebnisse zeigt Tab. 20.

Tab. 20: Dissoziationskonstanten K_i für die Hemmung der SARS-CoV M^{pro}

	 VI-1f	 VI-1g
K_i [μM]	45.8 ± 3.2	35.3 ± 3.0

Die Michaelis-Konstante für das Substrat war nicht bekannt und musste bestimmt werden ($K_m=190 \mu\text{M}$). Dazu wurden Konzentrationen von 50 bis 300 μM Substrat mit dem Enzym vermessen und die initialen Umsatzgeschwindigkeiten über die ersten 10 min bestimmt.

Aufgrund des sog. inneren Filtereffektes beim FRET-Assay mussten die erhaltenen Werte korrigiert werden. Unter diesem Effekt versteht man das Phänomen, dass schon bei relativ niedrigen Substratkonzentrationen die Fluoreszenz des gespaltenen Produkts durch das noch intakte Substrat deutlich reduziert wird.^[97]

Zur Korrektur nach Liu^[98] wurde 100 μM Abz alleine als Referenz und zusammen mit 50-300 μM Substrat unter Assaybedingungen ohne Enzym für 10 min inkubiert und die Fluoreszenz bestimmt. Die erhaltenen Werte bei den verschiedenen Substratkonzentrationen wurden auf die Referenz bezogen. Es genügt nicht, die Fluoreszenzminderung bei nur einer Substratkonzentration zu vermessen, da sich diese mit steigender Substratkonzentration erhöht.

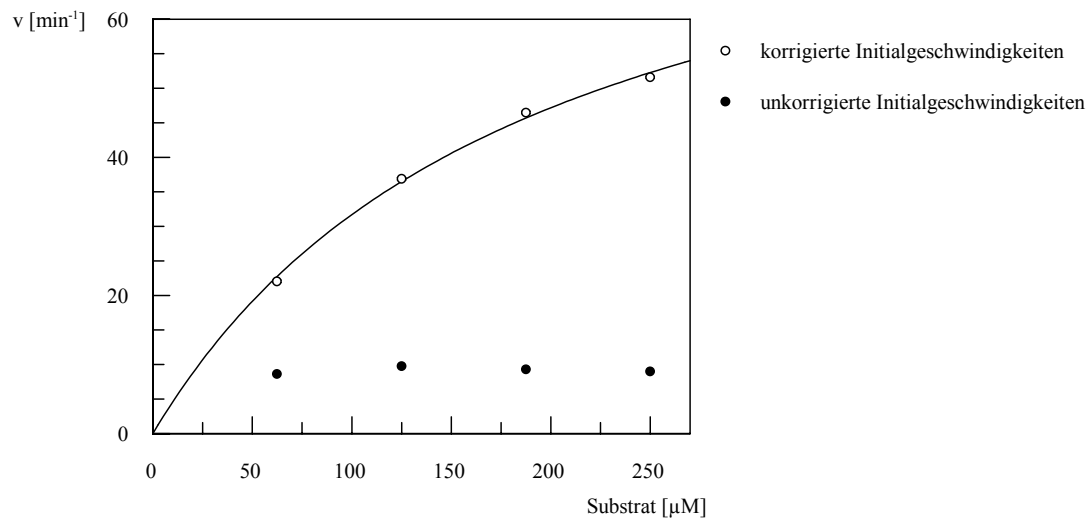


Abb. 30: Korrektur des inneren Filtereffektes bei der K_m -Wert-Bestimmung des FRET-Substrates für die SARS-Co M^{pro}

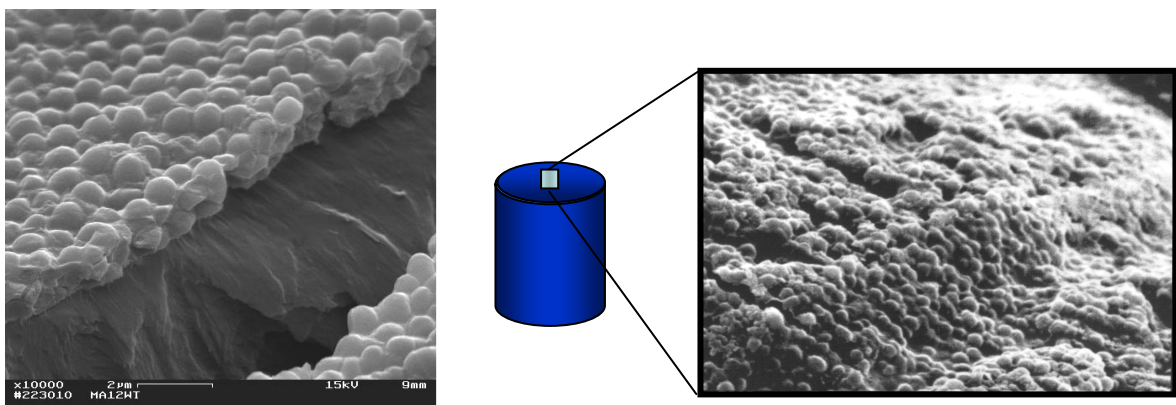
Mit den erhaltenen Korrekturfaktoren wurden die Anfangsgeschwindigkeiten für jede einzelne Substratkonzentration korrigiert (Abb. 30). Aus den berechneten Werten wurde der K_m -Wert durch nichtlineare Regression mit dem Enzymkinetikprogramm Grafit^{®‡‡} bestimmt.

5.3 Untersuchungen zur biologischen Aktivität

Die in der vorliegenden Arbeit synthetisierten Inhibitoren nehmen am biologischen Screening des SFB 630 (Sonderforschungsbereich 630 - Erkennung, Gewinnung und funktionale Analyse von Wirkstoffen gegen Infektionskrankheiten) gegen verschiedene Krankheitserreger teil.

Es wurden sog. Problemkeime untersucht, die im Krankenhaus bei immunsupprimierten Patienten zu nosokomialen Infektionen führen können. Dazu gehören die gramnegativen Erreger *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli*, sowie die grampositiven *Staphylococcus*-Arten *S. aureus* (Linie 325 und 8325) und *S. epidermidis* (Linie RP-62). Gegenstand der Untersuchungen war zunächst die Wachstumshemmung der Bakterien. Das Vermögen der Inhibitoren, das Bakterienwachstum zu hemmen, wird in der Minimalen Hemmkonzentration MHK ausgedrückt. Das ist diejenige minimale Inhibitorkonzentration, bei der kein Bakterienwachstum mehr stattgefunden hat. Für die Untersuchungen wurde definiert, dass eine Substanz nicht hemmt, wenn ihre MHK größer als 160 μM ist. Keine einzige der getesteten Verbindungen hat das Wachstum der beiden gramnegativen Keime gehemmt (Tab. 21). Die Verbindungen scheinen also selektiv für grampositive Keime zu sein.

Ein bedeutender Virulenzfaktor der Staphylokokken ist die Fähigkeit, unter externem Stress, wie hohen Temperaturen oder hoher Osmolarität, Biofilme auf polymeren Oberflächen zu bilden.



A – Biofilm auf einer Wunde

B – Biofilm auf der Innenseite eines Teflonkatheters

Abb. 31: Beispiele für Orte der Biofilmbildung

Durch den Biofilm ist es den Bakterien möglich, sich an Beatmungsschläuchen, Kathetern, auf Wundoberflächen oder an Implantaten festzusetzen (Abb. 31). Ein weiterer Vorteil für die Keime ist die bis zu 500-fach erhöhte Resistenz gegenüber Antibiotika, da der Biofilm ein Diffusionshindernis darstellt.

Nicht alle Staphylokokken sind in der Lage einen Biofilm auszubilden. Die Biofilmbildung bei *S. aureus* und *S. epidermidis* hängt von der Bildung von *Polysaccharid interzellulärem Adhäsion* (PIA) ab, das den Kontakt der Bakterienzellen untereinander vermittelt. PIA ist ein Polysaccharid, das aus einem β -1,6-glycosidisch verknüpften Glucosaminoglycan-Rückgrat besteht, das verschiedene Seitengruppen trägt.^{[99],[100]}

Zur Testung der Inhibitorwirkung auf die Biofilmbildung werden die Bakterien nach einem bekannten Verfahren^[99] über Nacht in Mikrotiterplatten kultiviert, am nächsten Tag mit Kristallviolett gefärbt, die optische Dichte des Biofilms bei 490 nm bestimmt und zu einer ohne Inhibitor behandelten Referenz ins Verhältnis gesetzt.

Unter den Verbindungen, die das Wachstum und die Biofilmbildung hemmen, sind hauptsächlich Etacrynsäureamide und Etacrynsäureethylester (**IV-1a**) mit MHKs zwischen 5 und 20 μ M (Tab. 21). Die Hemmung der Biofilmbildung war dabei noch in Konzentrationen zu beobachten, bei denen das Wachstum der Keime schon nicht mehr gehemmt wurde (bis zu 2.5 μ M). Das Target für die Biofilmhemmung ist noch nicht bekannt. Ein in Frage kommendes Enzym ist die Sortase, eine Cystein-Transpeptidase, die am Aufbau der Mureinschicht von grampositiven Bakterien beteiligt ist. Gegenwärtig laufen Untersuchungen mit den in der Arbeit vorgestellten Inhibitoren am rekombinant gewonnenen Enzym.

Bisher wurde nur eine Verbindung auf Hemmung von *Leishmania major*, dem Erreger der Leishmaniose (auch Kalar-Azar), getestet. Leishmanien sind intrazellulär parasitierende Protozoen, die von Sandmücken übertragen werden und v. a. Leber, Milz, Lymphknoten und das Knochenmark befallen. Betroffen sind in erster Linie Makrophagen, weshalb die Wirkung der Inhibitoren auch auf diese Zellen untersucht wird. Man ermittelt den EC_{50} -Wert, das ist diejenige Inhibitorkonzentration, bei der 50 % aller Erreger gehemmt werden. Etacrynsäure-*tert*butylamid (**VI-1f**) erreichte mit 3.4 μ M einen recht guten EC_{50} -Wert, die Verbindung schädigt Makrophagen aber zu sehr (EC_{50} = 29 μ M), um für weitere Testungen interessant zu sein. Mit beiden Werten liegt sie jedoch im Bereich des als Standard-

Tab. 21: Ergebnisse der Testungen auf Wachstums- und Biofilmhemmung an verschiedenen grampositiven und gramnegativen nosokomialen Keimen

Verb.	Mikrobouillondilutionstest – (Wachstumshemmtest)					Biofilm-Test		
	Minimale Hemmkonzentration (MHK) [μM] ^a					% Hemmung (μM)		
	<i>S. aur.</i> 325	<i>S. aur.</i> 8325	<i>S. epiderm.</i> RP 62	<i>E. coli</i> 536	<i>P. aerugin.</i> Nr. 3	<i>S. aur.</i> 325	<i>S. aur.</i> 8325	<i>S. epiderm.</i> RP 62
IV-0a	> 160	> 160	> 160	> 160	> 160	95 (160) 40 (80)	70 (160)	0 (160)
IV-1a	20	40	40	> 160	> 160	100 (20) ^b	100 (40) 20-40 (20) ^b	100 (160) 95 (40) 0 (< 20)
IV-2b	> 160	> 160	> 160	> 160	> 160	100 (160)	40 (160)	0 (160)
IV-5a	> 160	> 160	> 160	> 160	> 160	70 (160)	70 (160)	0 (160)
IV-5b	> 160	> 160	> 160	> 160	> 160	98 (80) 90 (40)	80 (160)	0 (160)
VI-1a	10	> 160	20	> 160	> 160	100 (160) 95 (2.5)	50 (160)	0 (160)
VI-1c	> 160	> 160	> 160	> 160	> 160	100 (160)	20 (160)	0 (160)
VI-1d	40	80	80	> 160	> 160	100 (40) 95 (10)	100 (160) ^b	100 (160)
VI-1e	40	160	80	> 160	> 160	100 (160) 90-100 (10)	100 (160)	0 (160)
VI-1f	n.g.	n.g.	> 160	> 160	> 160	98 (80)	0 (80)	0 (80)

Fortsetzung Tab. 21: Ergebnisse der Testungen auf Wachstums- und Biofilmhemmung an verschiedenen grampositiven und gramnegativen nosokomialen Keimen

Verb.	Mikrobouillondilutionstest – (Wachstumshemmtest)					Biofilm-Test		
	Minimale Hemmkonzentration (MHK) [μM] ^a					% Hemmung (μM)		
	<i>S. aur.</i> 325	<i>S. aur.</i> 8325	<i>S. epiderm.</i> RP 62	<i>E. coli</i> 536	<i>P. aerugin.</i> Nr. 3	<i>S. aur.</i> 325	<i>S. aur.</i> 8325	<i>S. epiderm.</i> RP 62
VI-1g	40	160	80	> 160	> 160	100 (20) 75 (10)	100 (160)	0 (160)
VI-1h	40	160	80	> 160	> 160	95 (160) ^b	0 (160)	0 (160)
VI-1i	80	80	80	> 160	> 160	100 (80)	100 (40)	100 (20)
VI-1j	5	20	10	> 160	> 160	100 (160) 95 (2.5)	100 (20) 50 (10)	0 (160)
VI-1k	10	20	20	> 160	> 160	100 (160) 95 (5) 85 (2.5)	100 (20)	95 (160) ^b
VI-1l	5	> 160	> 160	> 160	> 160	95 (5) 80 (2.5)	50 (160)	0 (160)
VII-2b	> 160	> 160	> 160	> 160	> 160	75 (160)	55 (160)	0 (160)
VII-2c	> 160	> 160	> 160	> 160	> 160	90-95 (5)	70 (80)	0 (160)
IX-a	> 160	> 160	> 160	> 160	> 160	0 (160)	20 (160)	0 (160)
IX-b	> 160	> 160	> 160	> 160	> 160	25 (160)	75 (160)	0 (160)

n.g. = noch nicht getestet, ^aEine MHK von > 160 μM wurde als nicht wachstumshemmend definiert; ^bbei subinhibitorischer Konzentration Biofilmhemmung proportional Wachstumshemmung;

therapeutikum eingesetzten Arzneistoffs Miltefosin^[101] (Abb. 32), der gegen *Leishmania major* einen EC_{50} -Wert von 33 μM , bei Makrophagen einen EC_{50} -Wert von 39 μM aufweist.

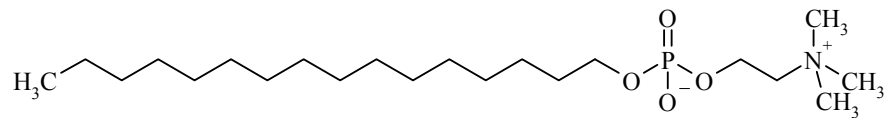


Abb. 32: Struktur von Miltefosin

6 Diskussion der Ergebnisse und Struktur-Wirkungs-Beziehungen

6.1 Bewertung der erarbeiteten Synthesewege

Der erste Syntheseschritt zur Darstellung von Etacrynsäure und ihrer Derivate ist die Friedel-Crafts-Acylierung von substituierten Phenoxyessigsäure-Derivaten **III** mit Aluminiumchlorid. Die Reaktion in Kohlenstoffdisulfid, wie sie in den Patenten beschrieben ist, wurde nicht getestet, da aus Gründen der Arbeitssicherheit auf das giftige und problematisch zu handhabende Lösungsmittel verzichtet werden sollte. Nach Ersatz des Lösungsmittels durch Dichlormethan gelang die Friedel-Crafts-Acylierung von Phenoxyessigsäure-Derivaten mit zwei Chlorsubstituenten am Aromaten nicht (s. Kap. 3.1.1.4), nur das Dimethylderivat konnte in moderater Ausbeute erhalten werden. Offenbar desaktivieren die Chlorsubstituenten im Gegensatz zu den Methylgruppen den Aromaten in diesem System so sehr, dass eine Acylierung nicht möglich ist.

Darum wurde dieser Syntheseweg verlassen und die Seitenkette mit Aluminiumchlorid in Dichlormethan zunächst an entsprechend substituierte Anisole **I** acyliert (s. Kap. 3.1.1.2). Diese Reaktion gelang in allen Fällen in ausreichenden bis guten Ausbeuten. Unterschiede ergeben sich jedoch im Acylierungsmuster der Verbindungen in Abhängigkeit vom Substitutionsmuster des Aromaten (p-Acylierung bei 2- und 2,3-Disubstitution, o-/p-Gemische bei 3-Substitution). Die gefundenen Ergebnisse lassen sich dadurch erklären, dass die Methoxygruppe des Anisols als gleichermaßen in ortho- und para-Position dirigiert. Der Chlorsubstituent desaktiviert das System zwar durch einen –I-Effekt, dirigiert einen neuen Substituenten aufgrund eines schwachen +M-Effektes aber ebenfalls in ortho- und p-Position. Befindet sich der Chlorsubstituent in Position 3 des Ringes, so werden die zur Methoxygruppe liegenden ortho- und para-Positionen also gleichermaßen begünstigt. Problematisch war bei zwei acylierten Anisolen die direkt angeschlossene Abspaltung der Methylgruppe mit einem weiteren Äquivalent Aluminiumchlorid zum entsprechenden Phenol. Eine offensichtliche Erklärung, für das Verhalten lässt sich nicht finden, da die beiden Verbindungen einmal in Position 2 mit einem Chloratom, einmal 2,3-dimethyl-substituiert waren.

Die anschließende Veretherung der acylierten Phenole **II** mit Bromessigsäureethylester zu den acylierten Phenoxyessigsäurederivaten **III** stellte kein Problem dar. Es wurden vier

verschiedene Base/Lösungsmittel-Paare getestet (s. Kap. 3.1.1.3), die alle bezüglich der erhaltenen Ausbeuten vergleichbar waren. Für die Synthese der meisten Derivate wurde das Verfahren mit Kalium-*tert*butylat/THF verwendet, da dies am einfachsten durchzuführen war.

Zur Einführung der Doppelbindung in die acylierten Phenoxyessigsäureethylester **III** existieren zwei Hauptverfahren, die Aldolkondensation oder die Mannich-Reaktion.

Die Aldolkondensation mit Formaldehyd und Kaliumcarbonat im Ethanol/Wasser-Gemisch (s. Kap. 3.1.2.4) bietet sich für die Synthese der Säure-Derivate **V** an, da der Ethylester unter den Reaktionsbedingungen gespalten wird. Anzuraten ist dabei, bei der Aufarbeitung auf zu stark saure Bedingungen möglichst zu verzichten, da es sonst zu einer Retro-Aldolreaktion kommen kann. Die Trennung der beiden Säuren (Produkt und Edukt) gestaltet sich aufgrund der geringen Struktur- und damit Löslichkeitsunterschiede in organischen Lösungsmitteln schwierig.

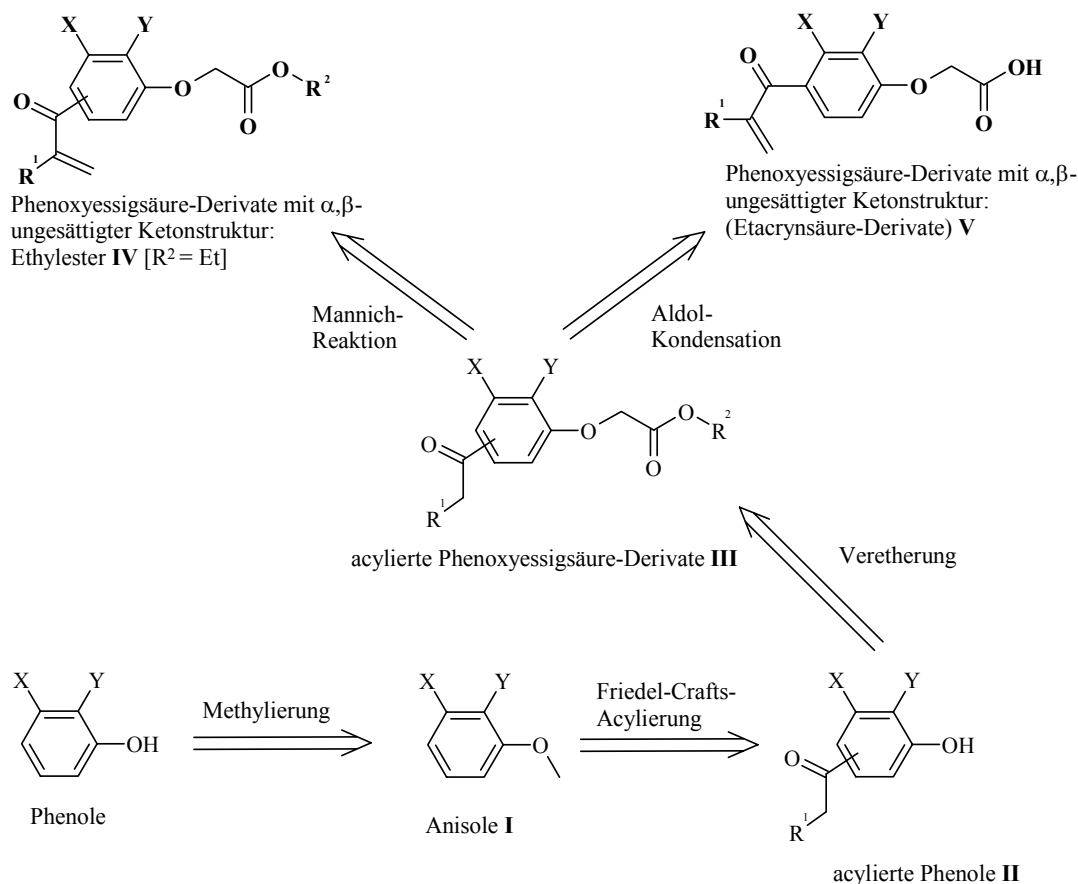
Die Mannich-Reaktion ist das Verfahren der Wahl für die Synthese der Produkt-Ethylester **IV**. Das in den Merck-Patenten beschriebene klassische Mannich-Verfahren mit Paraformaldehyd und Dimethylaminhydrochlorid mit anschließender Olefinierung mit einer Base wurde getestet (s. Kap. 3.1.2.1), es scheint aber für die Synthese im kleineren Maßstab nicht geeignet zu sein.

Es wurden in diesem Zusammenhang zwei alternative Verfahren untersucht. Die Mannich-Reaktionen unter wasserfreien Bedingungen mit *N,N,N',N'*-Tetramethyldiaminomethan (TMDM, s. Kap. 3.1.2.2) oder mit Urotropin (s. Kap. 3.1.2.3), bei denen die Aminomethyl-Zwischenstufe bereits im Reagenzmolekül vorliegt, erlauben die Darstellung der Zielverbindungen **IV** in befriedigenden Ausbeuten.

Urotropin zeigte bei großen Substituenten in *ortho*-Position zum acylierten Kohlenstoffatom keine Reaktion, was vermutlich auf eine sterische Hinderung zurückzuführen ist. In diesem Fällen ist TMDM das Mittel der Wahl.

Die TMDM-Methode ist jedoch ebenso vorteilhaft, bei Verbindungen, die am Aromaten einen kleinen oder keinen Substituenten tragen. Allerdings ist Urotropin kostengünstiger und weniger flüchtig als TMDM und sollte wenn möglich bevorzugt eingesetzt werden. In den meisten Fällen konnte eine vollständige bis nahezu vollständige Umsetzung erreicht werden, die Ausbeute wurde jedoch durch das aufwendige Aufreinigungsverfahren reduziert.

Eine Übersicht über die erarbeiteten Synthesewege zur Darstellung der Etacrynsäure-Derivate gibt Schema 28:



Schema 28: Erarbeitete Synthesewege zu den Etacrynsäure-Derivaten **IV** und **V**

Die Darstellung der Etacrynsäureamide **VI** bereitete keine Probleme. Als Methode der Wahl ist die Kupplung von Säure und Amin mit Dicyclohexylcarbodiimid/*N*-Hydroxysuccinimid zu nennen. Die Reaktion gelingt bei Raumtemperatur und ist einfach aufzuarbeiten.

6.2 Selektivität der getesteten Inhibitoren zwischen den Enzymen

Erfreulicherweise zeigen die Etacrynsäure-Derivate Selektivität für Cystein-Proteasen gegenüber Serin-Proteasen (s. Kap. 5.1.8). Weder Trypsin noch α -Chymotrypsin wurden in ihrer katalytischen Aktivität durch die getesteten Inhibitoren beeinflusst.

Die K_i -Werte der Inhibitoren für Rhodessain liegen im Gegensatz zu Falcipain 2 oder Cathepsin B, generell im unteren zwei- bis einstelligen mikromolaren Bereich. Dennoch kann keine allgemeine Selektivität der Inhibitoren für Papain, Cathepsin B oder die Cathepsin-L-ähnlichen Enzyme Rhodessain und Falcipain 2 festgestellt werden.

Einzelne Verbindungen zeigen jedoch eine gewisse Selektivität. So hemmen die Ethylester **IV-0a** und **IV-2a** ausschließlich Rhodessain mit K_i -Werten von 12.7 bzw. 11.9 μM , nicht aber die anderen getesteten Cystein-Proteasen. Beide Verbindungen unterscheiden sich nur in einem Chlorsubstituent am Aromaten. Dieser Unterschied scheint jedoch keinen Einfluss auf die Hemmaktivität zu haben. **IV-0a** inhibiert zwar in ganz geringem Ausmaß auch Papain, der K_i -Wert ist mit 1960 μM aber so hoch, dass dies vernachlässigt werden kann. Erstaunlich ist, dass **IV-2a** (2-Chlor-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxyessigsäureethylester) nur Rhodessain hemmt, das Derivat **IV-2b**, das sich von diesem nur um eine um ein Kohlenstoffatom längere Seitenkette des α,β -ungesättigten Ketons unterscheidet, dagegen auch CB und FP.

Auch das Dehydroalanin-Derivat **IX-b** hemmt nur Rhodessain ($K_i = 12.1 \mu\text{M}$), die um eine Aminosäure kürzere Verbindung **IV-a** zeigt dagegen an keinem Enzym eine Wirkung. Da keine weiteren strukturell ähnlichen Verbindungen zu Vergleichszwecken vorliegen, könnte über die Ursachen nur spekuliert werden.

6.3 Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Wie erwartet, ist die α,β -ungesättigte Ketonstruktur der Inhibitoren für die Inhibition von Cystein-Proteasen essentiell. Dies konnte durch Testung des Etacrynsäurederivats **V-1c**, bei dem die Doppelbindung zugunsten einer Einfachbindung ersetzt wurde (s. Kap. 5.1.10), nachgewiesen werden.

6.3.1 Bedeutung des aromatischen Ringes

Die Verbindungen **X-a** (2-Methylenbutyrophenon) und **X-d** (1-Cyclohexyl-2-methylenbutan-1-on) zeigen deutlich, dass ein aromatischer Ring in Nachbarschaft zum α,β -ungesättigten Keton außerordentlich wichtig ist. Verbindung **X-d** weist lediglich bei Papain eine ausgesprochen schwache Hemmung auf, bei Cathepsin B dagegen gar keine. Für **X-d** konnte dagegen bei CB eine Dissoziationskonstante von $K_i = 170 \mu\text{M}$ ermittelt werden. Durch Konjugation des α,β -ungesättigten Ketons mit dem Aromaten erhöht sich die Elektrophilie der Verbindung gegenüber dem aliphatischen Derivat. Die ebenfalls getestete Atropasäure (**X-e**), die auch einen Aromaten enthält, der mit dem Michael-System konjugiert ist, zeigt an allen Enzymen keine Hemmung. Das Molekül ist vermutlich zu klein, um spezifisch im aktiven Zentrum der Enzyme zu binden.

6.3.2 Einfluss der Seitenkette an der Doppelbindung

Ein Ethylrest in der Seitenkette hat gegenüber dem Methylrest in der Regel eine Verbesserung der Dissoziationskonstanten K_i zur Folge, was an den Verbindungspaaren **IV-2a/IV-2b** und **IV-5a/IV-5b** deutlich zu sehen ist (Tab. 22). Die Partner eines jeden Paares unterscheiden sich nur an der Seitenkette.

Tab. 22: Einfluss der Seitenkette an der Doppelbindung auf die Hemmwirkung an CB, FP und RD

Seitenkette		CB	FP	RD
		K_i [μM]	K_i [μM]	K_i [μM]
IV-2a	CH ₃	> 400	> 400	11.9
IV-2b	C ₂ H ₅	263.5	174.1	12.0
IV-5a	CH ₃	> 400	299.7	28.3
IV-5b	C ₂ H ₅	> 400	228.7	12.9
VII-2a	CH ₃	28.9	25.6	13.8
VII-2b	C ₂ H ₅	> 400	145.5	15.7

Bis auf einen Fall ist immer eine Verbesserung des K_i -Wertes von Methyl zu Ethyl zu erkennen. Für **IV-2a** und **IV-2b** wird für Rhodensain der gleiche K_i -Wert ermittelt, die Länge der Seitenkette spielt also bei diesem Enzym im Größenbereich Methyl/Ethyl keine Rolle. Da **IV-5a** und **IV-5b** CB nicht hemmen, kann hier keine Aussage getroffen werden.

Gänzlich umgekehrt ist das Verhältnis bei dem Anisol-Paar **VII-2a/VII-2b** hier scheint eine Methylgruppe im Falle von CB und FP günstiger zu sein. Bei Rhodensain sind die K_i -Werte wieder nicht signifikant unterschiedlich. Betrachtet man aber das ähnlich gebaute Anisol **VII-2c**, das als Seitenkette einen 2-(4-Nitrophenyl)-ethyl-Rest trägt, so ist offensichtlich, dass zumindest für RD die Seitenkette auch nicht zu groß sein darf.

6.3.3 Einfluss des Substitutionsmusters am aromatischen Ring

Wie bereits erwähnt, hemmt das unsubstituierte Derivat **IV-0a** lediglich Rhodensain und Papain nur sehr schwach.

Stellt man für jedes Enzym die insgesamt am besten hemmenden Inhibitoren mit aufsteigender Dissoziationskonstante auf (Tab. 23), so ist deutlich zu erkennen, dass die Etacrynsäure-Struktur fast ausschließlich vertreten ist. Zwei Chlorsubstituenten am Aromaten begünstigen die Hemmung erheblich.

Tab. 23: Aufstellung der bei Papain, CB, FP und RD jeweils am stärksten hemmenden Inhibitoren

Papain		CB		FP		RD	
K_i [μ M]		K_i [μ M]		K_i [μ M]		K_i [μ M]	
VI-1f	3.2	IV-3a	11.0	IV-1a	21.4	IV-3a	4.0
VI-1i	6.2	VI-1f	13.5	VII-2a	25.6	IV-1a	4.1
IV-1a	13.0	VI-1i	13.7	IV-3a	38.6	VI-1i	6.5
		VI-1g	14.3	VI-1h	50.4	VI-1a	7.0
		VI-1d	17.7	VI-1b	57.7	VI-1g	7.7

Eine viel versprechende Struktur stellt Verbindung **IV-3a** dar. Es handelt sich dabei um ein Derivat, bei dem sich das α,β -ungesättigte Keton in ortho-Position zum phenolischen Sauerstoff befindet. Hier ist der Aromat in Position 3 mit Chlor substituiert. Da es das einzige

Derivat mit dieser Strukturkonstellation ist, kann nicht mit Sicherheit bewertet werden, welchem Strukturteil die gute Hemmaktivität bevorzugt zuzuschreiben ist. Hier lohnt sich sicherlich eine weitere Untersuchung. Schließlich findet sich noch das Anisol **VII-2a** bei FP als zweitbeste Verbindung. Auch hier ist ein Chlorsubstituent am Aromaten, allerdings in Position 2.

Für die Hemmung CB ist eine Methylsubstitution in Position 2 des Aromaten offenbar nicht geeignet, was an den beiden Verbindungen **IV-5a** und **IV-5b** (s. Tab. 22) deutlich wird. Doch auch FP und RD werden im Vergleich zu anderen Verbindungen jeweils schlechter gehemmt. Ebenso zeigt das Dimethylderivat der Etacrynsäure **V-4a** bei CB keine Hemmung. Lediglich bei Papain weist sie einen guten K_i -Wert von 33 μM auf.

Die Chlorsubstituenten sind lipophile Strukturelemente, die mit Seitenketten von lipophilen Aminosäuren Van-der-Waals-Wechselwirkungen eingehen können. Sie sind größer als Methylgruppen und sind daher wahrscheinlich besser in der Lage Bindungstaschen im Enzym auszufüllen. Es ist jedoch nicht klar, ob die Chloratome deshalb eine so gute Wirkung ermöglichen, oder ob sie lediglich als elektronenziehender Rest von Bedeutung sind, der das Michaelssystem aktiviert. Erkennbar wäre dies durch eine Substitution der Chloratome gegen Fluoratome, die sehr klein und noch stärker elektronegativer sind. Ist die Lipophilie der ausschlaggebende Faktor, dann würde ein Derivat mit Iodatomen, die sehr groß und lipophil sind, eine bessere Hemmaktivität aufweisen. Auch Trifluormethylgruppen wären denkbar, sie vereinigen beide Eigenschaften auf sich.

6.3.4 Einfluss des Substituenten am phenolischen Sauerstoff

Wie aus Tab. 23 ersichtlich ist, weisen der Etacrynsäureethylester (**IV-1a**) bei allen und der ortho-substituierte Ethylester **IV-3a** bei CB, RD und FP gute Hemmaktivitäten auf. Ein Ethylester begünstigt die Hemmwirkung also. Hauptsächlich sind jedoch die Etacrynsäureamide unter den besten Verbindungen vertreten. Die Säuren **V-1a** und **V-4a** sind – wenn man von Papain absieht – bei allen Enzymen viel schlechter oder nicht wirksam. Das muss nicht an der Säurefunktion selbst liegen, es kann auch sein, dass die Verbindungen schlichtweg zu kurz sind. Diese Überlegung liegt nahe, da zwischen dem Etacrynsäureethylester und den Amidinen im Allgemeinen keine großen Wirkungsunterschiede bestehen.

Auch die Anisole findet man bis auf eine Ausnahme (VII-2a, s. o.) nicht bei den besten Verbindungen. Die Methoxygruppe scheint sich jedoch nicht generell nachteilig auf die Inhibition auszuwirken. Allerdings verkürzt sich das Molekül noch stärker als bei den Säuren.

6.3.5 Einfluss der unterschiedlichen Reste der Etacrynsäureamide

Generell scheint das Vorhandensein einer Amidgruppe, die Hemmwirkung positiv zu begünstigen. Das Amid stellt einen Wasserstoffbrücken-Donator da, der mit Sauerstoffatomen von Aminosäuren im Enzym H-Brücken ausbilden kann.

Bei Papain wirken sich vorwiegend der *tert*Butyl- und *n*-Butylrest positiv auf die Hemmwirkung aus (Tab. 24). Wächst die Größe des Restes darüber hinaus an, so steigen die K_i -Werte sofort deutlich.

Tab. 24: Aufstellung der am besten wirksamen Etacrynsäureamide an Papain, CB, FP und RD

Papain	K_i	CB	K_i	FP	K_i	RD	K_i
R =	μM	R =	μM	R =	μM	R =	μM
	3.2		13.5		50.4		6.5
	6.2		13.7	<i>D</i> -Ala-O-Bzl	57.7	Ala-O-Bzl	7.0
-Gly-Phe-NH ₂	188		14.3	<i>L</i> -Ala-O-Bzl	62.3		7.7
		-Gly-Phe-NH ₂	17.7		64.2	-Gly-Phe-NH ₂	7.8
			19.1	<i>n</i> -Hexylamid	69.7		8.6

Auch für CB sind die Amide mit diesen beiden Resten die besten Inhibitoren. CB toleriert jedoch auch größere Substituenten am Stickstoff ohne dass sich die Dissoziationskonstante drastisch ändern würde. Hier bietet sich für weiterführende Arbeiten als Modifizierung die Verlängerung des Restes bei gleichzeitiger Einführung weiterer H-Brücken-Donatoren oder Akzeptoren an.

FP wird von den Amiden insgesamt schwächer gehemmt als CB und RD, jedoch unterscheiden sich die K_i -Werte der Falcipainhemmung nicht sehr deutlich. Die Konfiguration der beiden Alanin-O-Benzylester hat keinen Einfluss auf die Hemmstärke. Auch die Amide mit längeren Ketten wie das *n*-Butylamid und das *n*-Hexylamid passen offenbar gut in das Enzym. Bei CB ist der K_i -Wert des Hexylamids eine Zehnerpotenz größer, bei Rhodesain ist keine Wirkung nachweisbar. Man könnte daher versuchen, durch Modifizierung der Kettenlänge eine gewisse Selektivität für FP gegenüber RD und CB zu erreichen.

Die Verbindungen, die RD am besten hemmen, sind teilweise dieselben wie bei CB. Hier ist es schwierig eine Möglichkeit zur Selektivitätsverbesserung vorzuschlagen. Der Hexylrest scheint, wie erwähnt, für CB vorteilhafter zu sein, ebenso das Anilid, das bei RD keine Hemmung zeigt.

6.4 Bewertung der Docking-Experimente

Betrachtet man sich den Bindungsmodus, den Etacrynsäure-*tert*butylamid (**VI-1f**), im aktiven Zentrum der SARS M^{pro} gezeigt hat (s. Kap. 4, Abb. 10), so fällt auf, dass Wechselwirkungen der Verbindung mit dem Enzym nur am *tert*Butylrest und mit der Ketonfunktion auftreten. Der aromatische Ring mit den zwei Chloratomen fungiert hier lediglich als Spacer. Auch beim synthetisierten Derivat **VI-1g** trifft dies zu. Da zwischen der S1- und der S2-Region des aktiven Zentrums noch verhältnismäßig viel Platz ist, sollte in weiterführenden Arbeiten die Größe dieses Spacers erhöht werden. Denkbar wären ein Naphthylrest oder sogar ein Anthracen-Derivat. Auch aliphatische Spacer könnten eingesetzt werden, wobei dann die Rigidität des Mittelstückes, die durch den aromatischen Ring verursacht wird, verloren geht. Auch die Ethyl-Seitenkette an der Doppelbindung könnte verlängert werden, jedoch dürfen hier in unmittelbarer Nähe des Michaelisystems keine sterisch anspruchsvollen Substituenten verwendet werden. Eine Reaktion mit dem aktiven Zentrum würde ansonsten erschwert. Sinnvoll wäre in diesem Zusammenhang, potentielle

Strukturen zuvor analog zu docken, um eine Vorstellung von der Lage der Moleküle im aktiven Zentrum zu bekommen und sich u. U. unnötige synthetische Arbeit zu ersparen.

6.5 Bewertung der Ergebnisse aus den biologischen Testungen

Im Wachstumshemmtest hatte keine der Verbindungen eine Wirkung auf die beiden gramnegativen Testkeime. Es existiert somit offenbar eine Selektivität für grampositive Erreger.

Etacrynsäureethylester (**IV-1a**) hemmte das Wachstum aller drei grampositiven Teststämme. Die anderen vier getesteten Esterderivate **IV** zeigten keine Wachstumshemmung, ebenso wie die getesteten Dehydroalanin-Derivate **IX** und die Anisole **VII** (s. Tab. 21).

Tab. 25: Aktivste Inhibitoren der Wachstumshemmung bei den getesteten Staphylokokken

MHK <i>S. aureus</i> 325		MHK <i>S. aureus</i> 8325		MHK <i>S. epidermidis</i>	
R=	μM	R=	μM	R=	μM
<i>n</i> -Hexylamid	5	<i>n</i> -Hexylamid	20	<i>n</i> -Hexylamid	10
	5			<i>L</i> -Ala-O-Bzl	20
	10		20		40
<i>L</i> -Ala-O-Bzl	10				
	20		40		40
	40				
-Gly-Phe-NH ₂	40				
	40				

Besonders gut wirkten hier, wie auch bei den Enzymassays, die Etacrynsäureamide, allen voran das Etacrynsäure-*n*-hexylamid (**VI-1j**) und das Benzylamid (**VI-1k**). Beide Verbindungen zeigten MHK-Werte von 5-20 μM bei allen drei getesteten Staphylokokken-Stämmen (s. Tab. 25, berücksichtigt wurden hier alle Verbindungen mit $\text{MHK} \leq 40 \mu\text{M}$). Bevorzugt wurde von den Etacrynsäureamiden **VI** die *Staphylococcus aureus*-Linie 325 gehemmt, hier zeigte das Etacrynsäureanilid (**VI-1l**) sogar Selektivität (s. Tab. 21).

Bei gleichen Inhibitorkonzentrationen war die Hemmung der Biofilmbildung noch besser als die Wachstumshemmung. Nahezu alle getesteten Verbindungen waren dazu bei den beiden *S. aureus*-Stämmen in der Lage. *S. epidermidis* wurde in seiner Biofilmbildung nur von wenigen Verbindungen behindert. Auch hier sind nur der Etacrynsäureethylester (**IV-1a**) und einige Etacrynsäureamide aktiv.

Bei Etacrynsäureethylester war bei beiden *S. aureus*-Stämmen noch Hemmung der Biofilmbildung bei Inhibitorkonzentrationen zu beobachten, als die Substanzen bereits keine Wachstumshemmung mehr zeigten. Generell waren die Etacrynsäureamide die besten Verbindungen (Tab. 26).

Tab. 26: Aktivste Inhibitoren der Biofilmbildung bei den getesteten Staphylokokken

% Hemmung der Biofilmbildung (μM)					
<i>S. aureus</i> 325		<i>S. aureus</i> 8325		<i>S. epidermidis</i>	
VI-1j	95 (2.5)	VI-1j	100 (20)	VI-1i	100 (20)
VI-1a	95 (2.5)	VI-1k	100 (20)	IV-1a	95 (40)
VI-1k	95 (5)	VI-1i	100 (40)	VI-1k	95 (160)
VI-1l	95 (5)	IV-1a	100 (40)		
VII-2c	95 (5)				

Die überragenden biofilmbildungshemmenden Verbindungen sind das Etacrynsäure-*n*-hexylamid (**VI-1j**), das Benzylamid (**VI-1k**), das Anilid (**VI-1l**), das Amid des *L*-Alanin-*O*-Benzylesters (**VI-1a**), aber auch das Anisol-Derivat 1-(3-Chlor-4-methoxyphenyl)-2-methylen-4-(4-nitrophenyl)-butan-1-on (**VII-2c**)

Da das Target für die Biofilmbildungshemmung noch nicht bekannt ist, kann über die strukturellen Anforderungen der Inhibitoren nur spekuliert werden. Die Testergebnisse legen nahe, dass sowohl für die Wachstumshemmung als auch für die Biofilmbildung ein

lipophiler Rest günstig ist. Dafür spricht sowohl die gute Hemmwirkung des Hexylamids als auch die des lipophilen Anisols **VII-2c**.

Eine Ester- oder Amidgruppe scheint ebenfalls positive Auswirkungen auf die Hemmwirkung zu haben. Deshalb sollte in weiteren Arbeiten hier mit größeren Amidgruppen gekoppelt werden. Problematisch könnte dann allerdings die Löslichkeit der Verbindungen werden. Das Etacrynsäure-*n*-hexylamid löst sich bereits jetzt schon sehr schlecht in Wasser. Langkettige aliphatische Diamine, z. B. Hexan-1,6-diamin, könnten hier einen Ausweg bieten. Gegenwärtig wird Etacrynsäure (**V-1a**) zum Vergleich getestet, um sehen zu können, ob das Amid bzw. der Ester für die Wirkung wichtig sind oder nicht.

Des Weiteren muss geklärt werden, ob das Michael-System für die Hemmwirkung auf Wachstum und Biofilmbildung essentiell ist. Dazu sollen gut wirksamen Inhibitoren analoge Derivate ohne Doppelbindung synthetisiert und getestet werden. Wenn auch diese Verbindungen eine Hemmwirkung ausüben, ist die diskutierte Beteiligung der Sortase, einer Cystein-Transpeptidase, an der Biofilmbildung sehr wahrscheinlich auszuschließen. Es gilt diese Versuche abzuwarten, bevor weitere Strukturvarianten generiert werden.

7 Zusammenfassung

Cystein-Proteasen sind in eine Vielzahl physiologischer und pathophysiologischen Prozesse involviert. Auch bei humanpathogenen Parasiten sind sie weit verbreitet und für das Überleben der Erreger essentiell. Substanzen, die diese Proteasen hemmen, könnten daher bei vielen Indikationen als neue Arzneistoffe eingesetzt werden. Es gibt bereits viele peptidische und peptidomimetische Hemmstoffe, jedoch nur sehr wenige nichtpeptidische.

In der vorliegenden Arbeit wurden nichtpeptidische Cystein-Proteaseinhibitoren synthetisiert, die als elektrophile Gruppe ein α,β -ungesättigtes Keton enthalten, und den Cysteinrest im aktiven Zentrum der Proteasen in einer Michael-Reaktion addieren. Als Leitstruktur diente das Diuretikum Etacrynsäure, dessen Struktur an verschiedenen Positionen modifiziert wurde (Abb. 33).

Phenoxyessigsäureethylester mit α,β -ungesättigter Ketonstruktur **IV**
 2,3-Dimethyl-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxyessigsäure **V-4a**

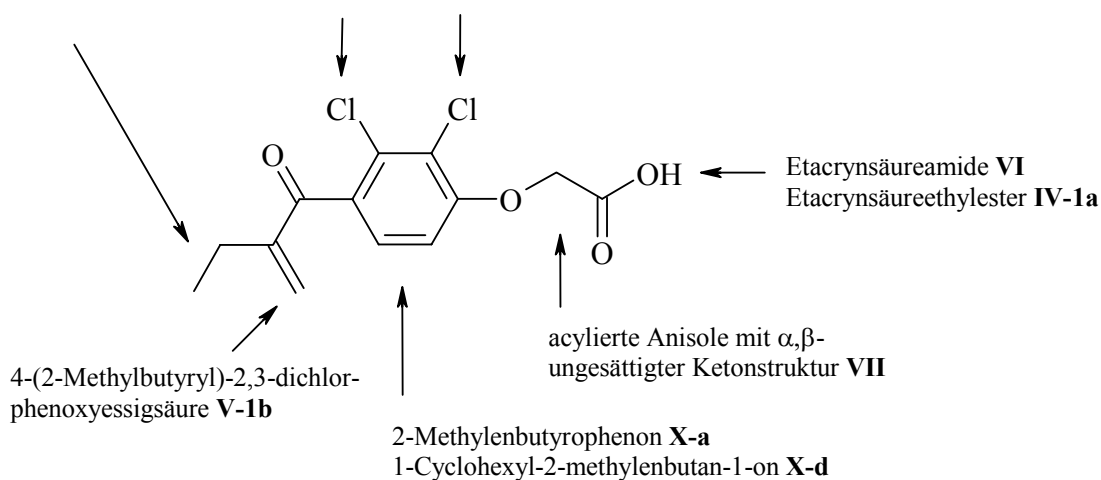


Abb. 33: Modifizierungsstellen der Etacrynsäure-Leitstruktur und dabei erhaltene Derivate

Dazu wurden die in Patenten beschriebenen Synthesewege zur Darstellung von Etacrynsäure und ihrer Derivate überprüft und modifiziert. Der Hauptsyntheseweg kann wie folgt beschrieben werden: Die Acylseitenkette gewünschter Kettenlänge wurde durch Friedel-Crafts-Acylierung mit Aluminiumchlorid in Dichlormethan in entsprechend substituierte Anisole **I** eingeführt. Die erhaltenen acylierten Anisole wurden in einer unmittelbar anschließenden Reaktion mit Aluminiumchlorid in Dichlormethan zu acylierten Phenolen **II** gespalten, die in einem Folgeschritt mit Kalium-*tert*butylat und Bromessigsäureethylester

in Tetrahydrofuran zu acylierten Phenoxyessigsäureethylestern **III** verethert wurden. In **III** wurde in α -Position zum Keton eine Doppelbindung eingeführt. Über eine Mannich-Reaktion mit *N,N,N',N'*-Tetramethyldiaminomethan/Acetanhydrid oder Urotropin/Acetanhydrid erhält man so die acylierten Phenoxyessigsäureethylester mit α,β -ungesättigter Ketonstruktur **IV**. Zur Darstellung der entsprechenden ungesättigten Säuren aus **III** bedient man sich einer basenkatalysierten Aldokondensation mit Formaldehyd in wässrigem Ethanol, unter deren Bedingungen der Ethylester zur Säure **V** gespalten wird. Kupplung von Etacrynsäure (**V-1a**) mit Aminen unter Aktivierung mit DCC/*N*-Hydroxysuccinimid führte zu den Etacrynsäureamiden **VI**.

Methylierung der acylierten Phenole **II** und anschließende Mannich-Reaktion, wie oben beschrieben, dient der Darstellung der acylierten Anisole mit α,β -ungesättigter Ketonstruktur **VII**. Auf diesem Syntheseweg wurden 28 Derivate mit Michael-System synthetisiert.

Diese wurden an den Cystein-Proteasen Papain, Cathepsin B (CB), Falcipain (FP) und Rhodesain (RD) getestet. Gegen Serin-Proteasen wurde keine Hemmung festgestellt. Die meisten Inhibitoren zeigten bei CB, FP und RD eine nicht-zeitabhängige Kinetik der Enzymaktivierung. Nur bei Papain wurde eine zeitabhängige Kinetik beobachtet. Die Substanzen wurden zwar als irreversible Inhibitoren konzipiert, Dialyseversuche beweisen jedoch eine reversible Hemmung. Da eine Vergleichssubstanz ohne aktivierte Doppelbindung unwirksam ist, kann von einer kovalenten Reaktion mit den Cystein-Proteasen ausgegangen werden.

Die Hemmkonstanten der synthetisierten Substanzen wurden für CB, FP und RD in einem kontinuierlichen fluorimetrischen Mikrotiterplatten-Assay bei Inhibitorkonzentrationen von 10 - 1000 μM ermittelt. Als Substrat diente Z-Phe-Arg-AMC. Für Papain wurde *L*-BAPA als Substrat in einem kontinuierlichen photometrischen Assay verwendet.

Bestimmt wurden die Dissoziationskonstanten K_i der Enzym-Inhibitor-Komplexe EI als Maß für die Affinitäten der Inhibitoren zum Enzym, sowie die Alkylierungsgeschwindigkeitskonstanten k_i der Reaktion zu modifiziertem Enzym E-I. Letzere konnten nur bei zeitabhängiger Hemmung bestimmt werden.

Eine allgemeine Selektivität für einzelne Enzyme konnte nicht gefunden werden. Die besten Inhibitoren ($K_i = 3.2 - 57.5 \mu\text{M}$) waren die Etacrynsäureamide **VI**, darunter v. a. das *tert*Butylamid (**VI-1f**), das *n*-Butylamid (**VI-1i**), das Amid des 2-Methylalaninamids (**VI-1g**) und das Amid des Alanin-*O*-Benzylesters (**VI-1a**), sowie der Etacrynsäureethylester (**IV-1a**) und der Ethylester **IV-3a**.

Die Analyse der Struktur-Wirkungs-Beziehungen ergab, dass wie erwartet das α,β -ungesättigte System essentiell für die Wirksamkeit an Cystein-Proteasen ist, ebenso ein aromatischer Ring. Eine längere Seitenkette an der Doppelbindung, die mindestens einen Ethylrest trägt, sowie zwei benachbarte Halogenatome am aromatischen Ring erwiesen sich als wirkungssteigernd. Ester und Amide zeigten generell bessere Hemmeigenschaften als die freien Säuren. Methoxy-Gruppen am Aromaten hatten keinen Wirkungsverlust zur Folge, senken aber die Löslichkeit in wässrigem Medium.

Viel versprechend ist auch Verbindung **IV-3a**, die das α,β -ungesättigte Doppelbindungssystem in ortho-Position zum phenolischen Sauerstoffatom trägt. Hier lassen weitere Derivate, in Kombination mit bereits genannten Strukturelementen eine Wirkungsverstärkung erwarten.

Innerhalb der Amide sind kurze, voluminöse Reste wie der *tert*Butylrest von Vorteil, eine gewisse Selektivität wird mit langkettigen Amiden wie dem *n*-Hexylamid für FP gegenüber CB und RD erreicht.

Im Rahmen des Z1-Projektes des Sonderforschungsbereichs 630 wurden die Verbindungen auf die Wachstumshemmung von grampositiven und gramnegativen Problemkeimen, sowie auf die Hemmung der Biofilmbildung grampositiver Erreger getestet.

Bei gramnegativen Keimen wurde das Wachstum nicht gehemmt. Bei den grampositiven Keimen *Staphylococcus aureus* und *S. epidermidis* wirkten ebenfalls der Etacrynsäureethylester (**IV-1a**) und die Etacrynsäureamide **VI-1j**, **-1k** und **1-l** am besten (MHK = 5 - 20 μ M). Die genannten Verbindungen zeigten auch die stärkste Hemmwirkung auf die Biofilmbildung (100 % bei 20 - 40 μ M bis zu 95 % bei 2.5 - 5 μ M an *S. aureus*).

Aufgrund positiver Screeningergebnisse in einem enzymatischen HPLC-Assays an der humanen SARS-Coronavirus Hauptprotease (SARS-CoV M^{pro}) wurden von der Arbeitsgruppe PD Dr. Knut Baumann Docking-Experimente mit Etacrynsäure-*tert*butylamid (**VI-1f**) an der humanen SARS-Coronavirus Hauptprotease (SARS-CoV M^{pro}) durchgeführt. Die Ergebnisse führten zur Synthese einer modifizierten Verbindung (**VI-1g**), die eine geringe Verbesserung der Enzyminhibition im fluorimetrischen Assay zeigte.

8 Summary

Cysteine proteases are involved in a variety of physiological and pathophysiological processes. They are wide-spread in pathogenic parasites as well and are essential for the survival of the pathogens. Compounds which inhibit these proteases could serve as new pharmaceuticals for many therapeutic indications. There are already many peptidic and peptidomimetic inhibitors, however, there are only a few non-peptidic ones.

In the present work non-peptidic cysteine protease inhibitors, which contain an α,β -unsaturated ketone as electrophilic group and which are able to add the cysteine residue of the proteases' active site in a Michael-type reaction, were synthesized.

The diuretic etacrynic acid was used as lead compound, its structure was modified in several positions (Fig. 34).

phenoxy acetic acid ethyl esters with α,β -unsaturated ketone moiety **IV**
2,3-dimethyl-4-(2-methylene-butyl)-phenoxy acetic acid **V-4a**

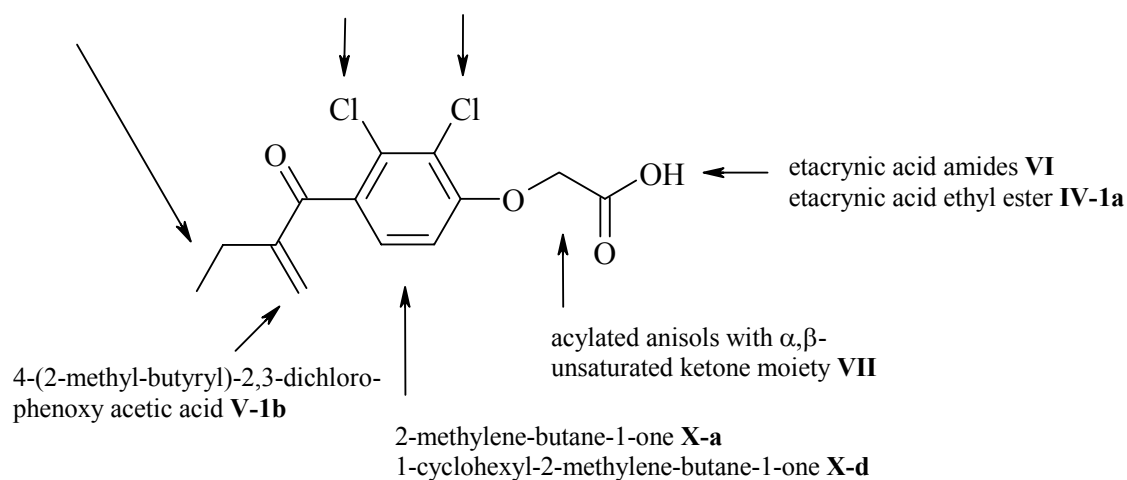


Fig. 34: Sites of modification of the etacrynic acid lead and synthesized derivatives

For this purpose the synthetic routes for the synthesis of etacrynic acid and its derivatives described in patents was re-examined and modified. The main synthetic pathway is as follows: the acyl side chain of the desired length was introduced in correspondingly substituted anisoles **I** *via* a Friedel-Crafts acylation with aluminium chloride in dichloromethane. The yielded acylated anisols were cleaved to the acylated phenols **II** in a consecutive reaction with aluminium chloride in dichloromethane. They were transferred

to the acylated phenoxy acetic acid esters **III** in a following step with potassium *tert*butylate and bromo acetic acid ethyl ester.

A double bond was introduced into **III** in α -position of the ketone. The acylated phenoxy acetic acid ethyl esters with an α,β -unsaturated ketone moiety **IV** are yielded *via* a Mannich reaction with *N,N,N',N'*-tetramethyl-diaminomethane/acetic acid anhydride or urotropine/acetic acid anhydride.

To synthesize the corresponding unsaturated acids out of **III** a base-catalyzed aldol condensation with formaldehyde in aqueous ethanol is used. Under these conditions the ethyl ester is cleaved to give the free acid **V**.

Coupling of etacrynic acid (**V-1a**) with amines by activation with DCC/*N*-hydroxy succinic imide led to the etacrynic acid amides **VI**.

Methylation of the acylated phenols **II** and consecutive Mannich reaction, as described above, leads to the acylated anisols with α,β -unsaturated ketone moiety **VII**.

Following this synthetic pathway 28 derivatives with a Michael system were synthesized.

These compounds were tested in the cysteine proteases papain, cathepsin B (CB), falcipain (FP) and rhodesain (RD). No inhibition of serine proteases was detected. Most of the inhibitors showed non-time-dependent kinetics for enzyme inactivation of CB, FP and RD.

Only with papain time-dependent kinetics are observed.

Although the compounds were planned as irreversible inhibitors, dialysis assays proved a reversible inhibitor. Since a comparative compound without a double bond is inactive, a covalent reaction with the cystein proteases can be assumed.

The inhibition constants of the synthesized compounds were determined in continuous fluorimetric microplate assays with inhibitor concentrations in a 10 to 1000 μM range. Z-Phe-Arg-AMC served as substrate. For papain *L*-BAPA was used as substrate in a continuous photometric assay.

Dissociation constants K_i of the enzyme-inhibitor-complexes EI were determined as a measurement of the affinities of the inhibitors towards the enzymes, as well as the alkylation velocity constants k_i of the reaction yielding the modified enzyme E-I. The latter could be determined only in cases of a time-dependent inhibition.

A general selectivity for single enzymes could not be found. The etacrynic acid amides **VI** were the best inhibitors ($K_i = 3.2 - 57.5 \mu\text{M}$). Amongst them were the *tert*butyl amide (**VI-1f**), the *n*-butyl amide (**VI-1i**), the amide with 2-methyl alanine amide (**VI-1g**) and the amide of alanine-*O*-benzyl ester (**VI-1a**), as well as etacrynic acid ethyl ester (**IV-1a**) and ethyl ester **IV-3a**.

The analysis of the structure-activity relationship showed, as expected, the α,β -unsaturated system being essential for activity in cysteine proteases. The same fact is true for the aromatic ring.

A longer side chain next to the double bond, which contains at least an ethyl moiety, as well as two vicinal halogen atoms at the aromatic ring proved to enhance the activity of the inhibitors. Generally, esters and amides showed better inhibition properties than the free acids. Methoxy groups at the aromatic ring did not result in a loss of inhibition but in a reduced solubility in aqueous media.

Compound **IV-3a**, which carries the α,β -unsaturated double bond system in ortho position to the phenolic oxygen atom, is also promising. Further derivatives combined with already mentioned structural elements let expect an enhanced activity.

Within the amides short voluminous moieties such as the *tert*butyl moiety are advantageous. A distinct selectivity for FP against CB and RD can be achieved with long-chain amides such as the *n*-hexyl amide.

Within the framework of the Z1 project of the Sonderforschungsbereich 630 the compounds were examined for growth inhibition of gram-positive and gram-negative pathogens as well as for inhibition of biofilm formation of gram-positive pathogens. The growth of gram-negative germs was not inhibited.

The gram-positive germs *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis* were inactivated best by etacrynic acid ethyl ester (**IV-1a**) and by the etacrynic acid amides **VI-1j**, **-1k** und **1-l** (MHK = 5 - 20 μ M). The mentioned compounds also showed the highest inhibition rate for biofilm formation (100 % at 20 - 40 μ M to 95 % at 2.5 - 5 μ M in *S. aureus*).

Due to positive screening results in a enzymatic HPLC-assay of human SARS coronavirus main protease (SARS-CoV M^{pro}) docking experiments were conducted on etacrynic acid *tert*butyl amide (**VI-1f**) by the group of PD Dr. Knut Baumann.

The results led to the synthesis of a modified compound (**VI-1g**) which showed weak improvement of enzyme inhibition in a fluorimetric assay.

9 Experimenteller Teil

9.1 Geräte und Arbeitsmittel

9.1.1 Schmelzpunktbestimmung und Elementaranalysen

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Schmelzpunktgerät 530 der Fa. Büchi, Flävil, Schweiz, in einer offenen Kapillare bestimmt und sind unkorrigiert.

Elementaranalysen wurden mit einem CHNS-932 der Fa. Leco, MI, USA, am Institut für Anorganische Chemie der Universität Würzburg durchgeführt.

9.1.2 Enzyme, Substrate und Synthesechemikalien

Enzyme

Papain	Fluka
Cathepsin B (humane Leber)	Calbiochem
Falcpain 2 (<i>Plasmodium falciparum</i>)	Prof. Dr. Hilgenfeld, Lübeck
Rhodesain (<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>)	Prof. Dr. J. McKerrow, UCSF, USA
SARS M ^{pro}	PD Dr. John Ziebuhr, Würzburg
Trypsin (boviner Pankreas)	Merck
α -Chymotrypsin (boviner Pankreas)	Fluka

Substrate

<i>N</i> ^α -Benzoyl-(<i>L</i>)-arginin-p-nitroanilid·HCl	Merck
Z-(<i>L</i>)-Phe-(<i>L</i>)-Arg-AMC	Bachem
Suc-(<i>L</i>)-Leu-(<i>L</i>)-Tyr-AMC	
H ₂ N-Anthranilsäure-Ser-Val-Thr-Leu-Gln-Ser-Gly-Tyr(NO ₂)-Arg(Mts)-OH, Trifluoracetat	hergestellt am Festphasen-Peptidsynthesizer im Arbeitskreis durch Markus Schiller

Syntheschemikalien

Aminosäuren, Dipeptide	Merck, Bachem
DCC; <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyldiaminomethan	Fluka
<i>N</i> -Hydroxysuccinimid	Aldrich
Anisole und Phenole	Fluka, Merck

9.2 Analytische Methoden**9.2.1 Spektroskopische Methoden****Kernresonanzspektren (NMR)**

Die NMR-Spektren wurden mit einem AVANCE 400 MHz Spektrometer der Fa. Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, aufgenommen. Die Arbeitsfrequenz betrug für ^1H -NMR-Spektren 400.13 MHz, für ^{13}C -NMR-Spektren 100.61 MHz. Es werden folgende Abkürzungen verwendet:

s, Singulett; d, Dublett; t, Triplett; q, Quartett; quin, Quintett; sext, Sextett; sept, Septett; dd, Dublett vom Dublett; m, Multiplett; arom. qC, aromatisches quartäres C-Atom;

Wurde TMS (Tetramethylsilan) als Standard verwendet, ist dies jeweils angegeben. In allen anderen Fällen dienten die Mitten der Resonanzsignale der Restprotonen des eingesetzten Lösungsmittels als Referenz. Die chemischen Verschiebungen werden in ppm, die Kopplungskonstanten J in Hz angegeben.

Infrarotspektren (IR)

Die IR-Spektren wurden mit einem PharmalyzIR FT-IR-Spektrometer der Fa. Bio-Rad, Cambridge, MA, USA mittels einer ATR-Einheit aufgenommen.

Polarimetrie

Die spezifischen Drehwerte $[\alpha_{\text{D}}^{\text{Temp.}}]$ wurden an einem 241 Polarimeter der Fa. Perkin-Elmer, MA, USA, ermittelt (Natrium-D-Linie: $\lambda = 589 \text{ nm}$).

Brechungsindex

Die Brechungsindices wurden mit einem Refraktometer der Fa. ATG GmbH, Aalen bestimmt.

Photometrie

Für die photometrischen Enzymassays wurde ein Lambda EZ 210 Photometer der Fa. PerkinElmer Inc., MA, USA, mit thermostatisierbarem Küvettenhalter verwendet. Es kamen Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke zum Einsatz.

Fluorimetrie

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, einem Temperaturcontroller mit Sensor und einem 12-Volt-Netzgerät bestand. Es kamen weiße 96-Well-Mikrotiterplatten der Fa. Nunc GmbH, Wiesbaden, zum Einsatz.

9.2.2 Massenspektrometrie

Hochauflösende (High Resolution) Elektronenstoß-Ionisation (HR-EI)

Die Bestimmung der exakten Massen mit EI wurde am Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg an einem Finnigan MAT 90 der Fa. Thermo Electron GmbH, Bremen, durchgeführt. Die Ionisierungsenergie betrug 70 eV.

Hochauflösende (High Resolution) Elektrospray-Ionisation (HR-ESI)

Zur Bestimmung der exakten Massen mittels ESI am Institut für Biochemie wurde ein FT-ICR-Massenspektrometer APEX II der Fa. Bruker, Rheinstetten, ausgestattet mit einem 7-T-Magneten und einer ESI-Ionenquelle von Apollo verwendet. Als Trockengas wurde N₂ mit einer Temperatur von 15 °C verwandt. Die Proben wurden als 0.1 bis 1.0 µM Lösung in Methanol/Wasser/Essigsäure (49.5/49.5/1) gemessen. Die Eichung erfolgte extern mit Hilfe der Fragmente des Peptides LHRH (Leu-His-Arg-His) bei einer Capillar-Exit-Spannung von 220 V. Die Messungen erfolgten bei einer Capillar-Exit-Spannung von 80 V. Dabei wurden 128 Scans nach einer Akkumulationszeit von 0.1 Sekunden im Hexapol adiert. Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit einem Messbereich zwischen 200 und 1200 m/z. Die typische Auflösung der einzelnen Signale betrug ca. die 50000 (d.h. Basislinientrennung von 2 Peaks mit einer Masse von 50000 und 50001 Dalton).

9.2.3 Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie (DC)

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

Säulenchromatographie (SC)

Als Säulenfüllung wurde Kieselgel 60 (0.063-0.2 mm bzw. 70-230 mesh) der Firmen Merck und Fluka verwendet. Die Säulen wurden mit organischem Lösungsmittel gepackt.

Mitteldruckflüssigchromatographie (MPLC)

Für die MPLC wurde eine Anlage der Fa. Büchi, Flävil, Schweiz, mit einem Maximaldruck von 40 bar mit LoBar-Säulen der Fa. Merck benutzt. Als Säulenfüllung wurde Kieselgel RP-18 der Fa. Merck verwendet. Als mobile Phase dienten Methanol-Wasser- bzw. Acetonitril-Wasser-Gemische.

Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Chromatographie-Säulen für analytische Trennungen:

Symmetry Kieselgel RP-18, Fa. Waters, Mileford, USA; Maße: 4.5 x 150 mm; Partikelgröße 5 µm; Flußrate: 0.8 ml/min.

Chromatographiesäule für präparative Trennung von Verbindung V-4a

Symmetry Kieselgel RP-18, Fa. Waters, Mileford, USA; Maße: 19 x 150 mm; Partikelgröße 7.5 µm; Flußrate 12 ml/min.

9.3 Arbeitsmethoden

Alle verwendeten Lösungsmittel wurden durch Destillation gereinigt und falls nötig mit geeigneten Trocknungsmitteln nach Literaturangaben von Wasser befreit.

Sofern bei Reaktionen Abwesenheit von Wasser gewährleistet werden musste, wurde unter Stickstoffatmosphäre gearbeitet. Das Stickstoffgas wurde zuvor durch Calciumchlorid getrocknet.

9.4 Allgemeine Synthesevorschriften

9.4.1 Methode A - Allgemeine Vorschrift zur Methylierung von Phenolen

Ein Äquivalent (Äq.) des Phenols wird in 1.25 Äq. Kaliumhydroxid (als 10 %ige wässrige Lösung) unter Rühren aufgelöst. Man lässt 1 Äq. Dimethylsulfat bei Raumtemperatur (RT) langsam zutropfen und verfolgt die Reaktion dünnschichtchromatographisch (dc). Erfolgt keine weitere Produktzunahme, erhitzt man das Gemisch 30 min unter Rückfluss zum Sieden, lässt den Ansatz abkühlen und trennt die organische Phase ab. Die wässrige Phase wird dreimal mit einer entsprechenden Menge Diethylether extrahiert und die Extrakte mit der organischen Phase vereinigt. Aus der wässrigen Phase kann nicht umgesetztes Edukt durch Ansäuern mit Salzsäure auf pH 1 und mehrmaliges Ausschütteln mit Diethylether wiedergewonnen werden. Man wäscht die vereinigten organischen Phasen dreimal mit Wasser, zweimal mit gesättigter Natriumchloridlösung und trocknet die Lösung mit Natriumsulfat. Nach Filtration wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Falls nötig, wird das erhaltene Produkt durch eine Kieselgelschicht mit Chloroform als Lösungsmittel filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit.

9.4.2 Methode B - Allgemeine Vorschrift zur Friedel-Crafts-Acylierung von Anisolen und anschließender Methyletherspaltung

Ein Äq. des entsprechenden Anisols wird zusammen mit 1.5 Äq. Carbonsäurechlorid gewünschter Kettenlänge in 50-100 ml wfr. Dichlormethan unter Stickstoffatmosphäre vorgelegt und unter Rühren im Eisbad auf 0-5 °C temperiert. Innerhalb von 30 min werden 1.5 Äq. Aluminiumchlorid nach und nach so zugegeben, dass die Innentemperatur nicht über 5 °C steigt. Man lässt den Ansatz 2-3 h bei 0-5 °C rühren. Anschließend werden 75-100 ml Dichlormethan abdestilliert und danach dieselbe Menge frisches wasserfreies Dichlormethan zugefügt. Diese Prozedur wird 2-mal wiederholt.

Es werden weitere 1.5 Äq. Aluminiumchlorid zugegeben und 2.5 – 3 h unter Rückfluss erhitzt. Man lässt den Ansatz abkühlen und schüttet ihn auf Eis. Man säuert mit konz. Salzsäure auf pH 1 an, gibt Weinsäure zur Komplexierung der Aluminiumionen zu bis die Lösung klar ist und schüttelt 3-mal mit einer ausreichenden Menge Diethylether aus. Die wässrige Phase wird verworfen, die organische Phase zunächst mit Wasser neutral gewaschen. Man schüttelt das Produkt 3-mal mit 10 %iger Kaliumhydroxid-Lösung aus und

säuert die wässrige Phase mit konz. Salzsäure an (die organische Phase wird wie unten beschrieben weiterbehandelt). Wenn das Produkt nicht ausfällt und abgesaugt werden kann, extrahiert man es mit Diethylether. Die Etherphase wird mit Wasser neutral und schließlich mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Man trocknet die Lösung mit Natriumsulfat und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Falls nötig, wird das Rohprodukt aus einem geeigneten Lösungsmittel umkristallisiert.

Die organische Phase nach alkalischer Extraktion des Produkt-Phenols enthält u. U. noch eine nicht unerhebliche Menge an doppelt (zusätzlich am phenolischen Sauerstoff) acyliertem Produkt. Dieses wird nach Entfernen des Diethylethers im Vakuum mit 1 Äq. Kaliumhydroxid (als 10 %ige wässrige Lösung) hydrolysiert. Man erhitzt so lange unter Rückfluss bis sich der gesamte Rückstand gelöst hat und lässt den Ansatz abkühlen. Nach 3-maliger Extraktion des Ansatzes mit Diethylether wird die wässrige Phase mit konz. Salzsäure auf pH 1 angesäuert und das monoacylierte Phenol mit Diethylether extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird das Rohprodukt aus einem geeigneten Lösungsmittel umkristallisiert.

9.4.3 Methode C - Allgemeine Vorschrift zur Veretherung von Phenolen mit Bromessigsäureethylester

9.4.3.1 Methode C1 - Veretherung mit Kaliumcarbonat in Aceton

Ein Äq. des entsprechend substituierten Phenols wird mit 2 Äq. Bromessigsäureethylester, 1.5 Äq. Kaliumcarbonat und einer katalytischen Menge (0.1 Äq.) Kaliumiodid in einer ausreichenden Menge trockenem Aceton 5-6 h unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktion wird verfolgt. Erfolgt keine weitere Produktzunahme, lässt man die Reaktionsmischung abkühlen. Die ungelösten Bestandteile werden abfiltriert und der Rückstand im Filter wiederholt mit heißem Aceton gewaschen. Das Filtrat und die Waschfraktionen werden vereinigt und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Man nimmt das Rohprodukt in einer ausreichenden Menge Diethylether auf und extrahiert nicht umgesetztes Edukt 3-mal mit 5 %iger Natriumhydroxid-Lösung. Man wäscht die Etherphase mit Wasser neutral und anschließend 2-mal mit gesättigter Kochsalz-Lösung. Die Etherphase wird mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Falls nötig wird das Rohprodukt aus einem geeigneten Lösungsmittel umkristallisiert.

9.4.3.2 *Methode C2 - Veretherung mit Kaliumcarbonat in Dimethylformamid (DMF)*

Ein Äq. des entsprechend substituierten Phenols wird in einer ausreichenden Menge wfr. DMF gelöst. Zu dieser Lösung werden 2 Äq. Bromessigsäureethylester, 2 Äq. Kaliumcarbonat und eine katalytische Menge (0.1 Äq.) Kaliumiodid zugegeben und unter Rühren für 1.5–2.5 h bei 55–60 °C erhitzt. Der Reaktionsverlauf wird dc verfolgt. Erfolgt keine weitere Produktzunahme, wird der Reaktionsansatz in das doppelte Volumen Wasser geschüttet, wobei sich das Produkt abscheidet. Man schüttelt mit Ethylacetat aus. Die Wasserphase wird verworfen. Die organische Phase wird 3-mal mit 10 %iger Kaliumhydroxid-Lösung und anschließend jeweils 3-mal mit Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Man trocknet mit Natriumsulfat und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Falls nötig wird das Produkt aus einem geeigneten Lösungsmittel umkristallisiert oder destilliert.

9.4.3.3 *Methode C3 - Veretherung mit Kalium-tertbutylat in Tetrahydrofuran (THF)*

Ein Äq. des entsprechend substituierten Phenols wird in einer ausreichenden Menge wfr. THF unter Stickstoffatmosphäre gelöst. Unter Rühren fügt man 1 Äq. Kalium-*tert*butylat, sowie eine katalytische Menge (0.1 Äq.) Kaliumiodid zu. Man erwärmt das Gemisch im Ölbad auf 60 °C und lässt 1.1 bis 2.0 Äq. Bromessigsäureethylester über einen Tropftrichter langsam zutropfen. Man lässt weitere 30–60 min bei dieser Temperatur rühren und verfolgt den Reaktionsverlauf dc. Erfolgt keine weitere Produktzunahme, wird der Ansatz in die doppelte Menge Wasser geschüttet, mit konz. Salzsäure auf pH 1 angesäuert und 3-mal mit einer entsprechenden Menge Diethylether ausgeschüttelt. Die Wasserphase wird verworfen, die Etherphase wird durch 3-maliges Ausschütteln mit 10 %iger Kaliumhydroxid-Lösung vom restlichen Edukt befreit. Man wäscht 3-mal mit Wasser und 2-mal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung und trocknet die organische Phase mit Natriumsulfat. Das Lösungsmittel und ggf. überschüssiger Bromessigsäureethylester werden im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird aus einem geeigneten Lösungsmittel umkristallisiert oder im Vakuum destilliert.

9.4.4 Methode D – Allgemeine Vorschrift zur Synthese der α,β -ungesättigten Keto-Verbindungen

9.4.4.1 Methode D1 – Mannich-Reaktion mit Acetanhydrid / Urotropin

Ein Äq. des entsprechend substituierten Phenoxyessigsäurederivates wird mit 1.5 Äq. Urotropin (Hexamethylentetramin) und 2 Äq. Acetanhydrid gemischt und unter Stickstoffatmosphäre bei 80 °C im Ölbad erhitzt. Der Reaktionsverlauf wird $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch verfolgt. Erfolgt keine weitere Umsetzung mehr, wird das Gemisch in Ethylacetat aufgenommen und mit einer ausreichenden Menge Wasser versetzt, um überschüssiges Acetanhydrid zu hydrolysieren. Anschließend wird die organische Phase jeweils 3-mal mit Wasser, 5 %iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung, erneut mit Wasser und zuletzt 2-mal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Man trocknet mit Natriumsulfat, filtert und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Das Produkt wird säulenchromatographisch gereinigt.

9.4.4.2 Methode D2 – Mannich-Reaktion mit *N,N,N',N'*-Tetramethyldiaminomethan

Ein Äq. des entsprechend substituierten Phenoxyessigsäurederivates wird mit 20 Äq. *N,N,N',N'*-Tetramethyldiaminomethan (TMDM) und 20 Äq. Acetanhydrid in einem Zweihalskolben gemischt. Der Kolben wird mit einem Rückflusskühler verschlossen und unter Rühren bei 85 °C im Ölbad erhitzt. Der Reaktionsverlauf wird $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch verfolgt. Falls nötig, wird TMDM zugegeben, um Reagenz zu ersetzen, das durch Verdunstung entweicht. Ist der Umsatz vollständig bzw. nahezu vollständig erfolgt, lässt man das Gemisch abkühlen. Der Reaktionsansatz wird in 200 ml wfr. Chloroform aufgelöst und man gibt so lange gesättigte Kaliumcarbonat-Lösung zu bis keine Gasentwicklung mehr zu sehen ist. Man filtert über Celite ab und trocknet das Filtrat mit Natriumsulfat. Es wird erneut filtert und die Lösung im Vakuum eingengt. Die braune Lösung wird durch Filtration durch Kieselgel 60, das zuvor im Vakuumtrockenschrank bei 120 °C und 100 mbar getrocknet wurde, und Spülen mit wfr. Chloroform entfärbt. Falls nötig, wird das Produkt säulenchromatographisch gereinigt.

9.4.4.3 *Methode D3 – Aldolkondensation mit gleichzeitiger Esterhydrolyse*

Ein Äq. des entsprechend substituierten Phenoxyessigsäurederivates wird mit 2 Äq. Formaldehyd (als 40 %ige wässrige Lösung) in 20 ml Ethanol gelöst, ggf. etwas erwärmt (Lösung 1). Ein Äq. Kaliumcarbonat wird in 5 ml Wasser gelöst und mit 6 ml Ethanol verdünnt (Lösung 2). In einem Dreihals-Kolben werden 10-20 ml Ethanol unter Rückfluss zum Sieden erhitzt und dazu die Lösungen 1 und 2 über jeweils einen Tropftrichter langsam zugetropft. Man erhitzt unter Rückfluss bis ¹H-NMR-spektroskopisch keine weitere Produktzunahme erkennbar ist.

Das Reaktionsgemisch wird in ein Gemisch aus 5 ml konzentrierter Salzsäure und ca. 80 ml Wasser gegossen und über Nacht kühl gelagert. Kristallisiert das Produkt nicht aus, wird mit Diethylether ausgeschüttelt und mit Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Produkt aus einem geeigneten Lösungsmittel umkristallisiert oder chromatographisch aufgereinigt.

9.4.5 *Methode E – Amidsynthesen*

9.4.5.1 *Methode E1 - mit Thionylchlorid*

455 mg (1.5 mmol) Etacrynsäure (**V-1a**) und 375 mg (3 mmol) Thionylchlorid werden in 10 ml wfr. THF gelöst und im Ölbad 3.5 h lang unter Rückfluss und unter Stickstoffatmosphäre erhitzt. Die flüssigen Bestandteile werden im Vakuum entfernt und der Rückstand in 10 ml wfr. THF aufgenommen. Zu dieser Lösung werden 3 mmol des gewünschtenamins oder ein Gemisch von 3 mmol Amin-HCl und 416 µl (3 mmol) Triethylamin in 5 ml wfr. THF zugegeben. Man lässt 1 h bei RT rühren und erhitzt dann 3 h unter Rückfluss. Nachdem das Reaktionsgemisch abgekühlt ist, filtriert man die festen Bestandteile ab und wäscht den Rückstand mit wfr. THF. Das Filtrat und die Waschfraktionen werden vereinigt und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt.

9.4.5.2 *Methode E2 - mit Dicyclohexylcarbodiimid / N-Hydroxysuccinimid*

500 mg (1.65 mmol) Etacrynsäure (**V-1a**) werden in 10 ml wfr. Dichlormethan unter Stickstoffatmosphäre gelöst. Man fügt 190 mg (1.65 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid zu und lässt bis zur vollständigen Lösung rühren (ca. 1 – 1.5 h). Ggf. muss etwas erwärmt werden. Man

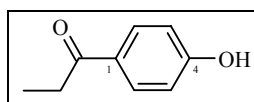
gibt 340 mg (1.65 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in kleinen Portionen nach und nach zu (ggf. Aufschäumen) und lässt 3 h bei RT rühren.

In einem Kolben werden 1.65 mmol des gewünschten Amins bzw. ein Gemisch aus 1.65 mmol Amin-HCl und 229 μ l (1.65 mmol) TEA in 5 ml wfr. THF vorgelegt. Die Lösung mit dem entstandenen Etacrynsäure-*N*-hydroxysuccinimidat wird in diese Lösung hineinfltriert. Der Rückstand wird mit wenig wfr. THF gewaschen und der Kolben verschlossen. Man lässt 2-3 Wochen bei RT rühren und kontrolliert den Reaktionsverlauf dc. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Man nimmt den Rückstand in wenig Ethylacetat auf und rührt bei RT 1 h, worauf sich überschüssiger Dicyclohexylharnstoff abscheidet und abfltriert werden kann. Das Filtrat wird im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt.

9.5 Synthesen der Phenoxyessigsäure-Derivate mit α,β -ungesättigter Keton-Struktur

9.5.1 [4-(2-Methylacryloyl)-phenoxy]-essigsäureethylester (IV-0a)

9.5.1.1 Synthese von 1-(4-Hydroxyphenyl)-propan-1-on (II-0a)



Methode B; Ansatz: 27.0 g (250 mmol) Anisol, 34.70 g (375 mmol) Propionsäurechlorid, 2x 50 g Aluminiumchlorid, 150 ml Dichlormethan;

Ausbeute: 21.69 g (144 mmol, 58 %), farbloser Feststoff

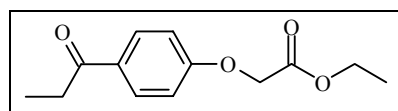
Schmelzpunkt: 143-146 °C (Ethanol), [Lit. ^[102]: 147 °C (Ethanol)]

Molare Masse: 150.18 g/mol

Summenformel: C₉H₁₀O₂

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 1.22 (3H, t, $J=7.33$ Hz, H₃C-CH₂); 2.95 (2H, q, $J=7.33$ Hz, H₃C-CH₂); 5.51 (1H, s, OH); 6.88 (2H, m, $J=2.02$ Hz, $J=8.84$ Hz, Ar-H); 7.92 (2H, m, $J=2.02$ Hz, $J=8.84$ Hz, Ar-H);

9.5.1.2 Synthese von (4-Propionylphenoxy)-essigsäureethylester (III-0a)



Methode C3; Ansatz: 12.77 g (85 mmol) II-0a, 9.54 g (85 mmol) Kalium-*tert*butylat, 15.61 g (93.5 mmol) Bromessigsäureethylester, 75 ml THF;

Ausbeute: 15.6 g (66 mmol, 78 %), farblose Nadeln^[103]

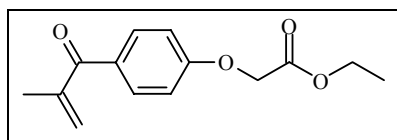
Schmelzpunkt: 31-32 °C (Chloroform)

Molare Masse: 236.27 g/mol

Summenformel: C₁₃H₁₆O₄

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): δ 1.21 (3H, t, $J=7.33$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-CO}$); 1.30 (3H, t, $J=7.07$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-O}$); 2.95 (2H, q, $J=7.33$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-CO}$); 4.28 (2H, q, $J=7.07$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-O}$); 4.68 (2H, s, $-\text{O-CH}_2-$); 6.94 (2H, m, $J=2.02$ Hz, $J=8.97$ Hz, arom. $H_2 + H_6$); 7.95 (2H, m, $J=2.02$ Hz, $J=8.97$ Hz, arom. $H_3 + H_5$);

9.5.1.3 Synthese von [4-(2-Methylacryloyl)-phenoxy]-essigsäureethylester (IV-0a)



Methode D1; Ansatz: 2.37 g (10 mmol) (4-Propionylphenoxy)-essigsäureethylester (**III-0a**), 2.10 g (15 mmol) Urotropin, 2.04 g (20 mmol) Acetanhydrid, Reaktionsdauer 6 h;

Ausbeute: 857 mg (3.45 mmol, 35 %)

Schmelzpunkt: 50-52 °C (Methanol)

Molare Masse: 248.28 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_4$

Elementaranalyse [%]: ber.: C 67.73, H 6.50; gef.: C 67.85, H 6.60;

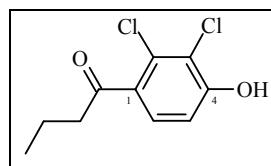
$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ 1.27 (3H, t, $J=7.07$ Hz, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$); 2.02 (3H, s, CH_3); 4.24 (2H, q, $J=7.07$ Hz, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$); 4.65 (2H, s, $\text{O-CH}_2\text{-CO}$); 5.51 (1H, s, $=\text{CH}$); 5.78 (1H, s, $=\text{CH}$); 6.90 (2H, d, $J=9.09$ Hz, arom. $H_2 + H_6$); 7.75 (2H, d, $J=9.09$ Hz, arom. $H_3 + H_5$);

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ 14.06 ($\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$); 18.89 (CH_3); 61.46 ($\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$); 65.15 ($\text{O-CH}_2\text{-CO}$); 113.99 (arom. $\text{C}_2 + \text{C}_6$, CH); 125.11 ($\text{C}=\text{CH}_2$); 130.93 (arom. $q\text{C}_4$); 131.72 (arom. $\text{C}_3 + \text{C}_5$, CH); 143.73 ($\text{C}=\text{CH}_2$); 160.98 (arom. $q\text{C}_1$); 168.21 ($\text{O-CH}_2\text{-C}=\text{O}$); 196.87 (Ar-C=O);

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 792$ (s, 1,4-disubst. Aromat); 1076 (s, $=\text{C-O-C}$); 1165, 1205 (s, CO_2R , C-O); 1570 (m, arom. C=C); 1599 (m, $\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{O}$); 1636 (m, C=O); 1754 (s, CO_2R , C=O); 2853, 2926, 2973 (w, C-H); 3068 (w, $=\text{C-H}$);

9.5.2 Etacrynsäureethylester (IV-1a)

9.5.2.1 Synthese von 1-(2,3-Dichlor-4-hydroxyphenyl)-butan-1-on (II-1a)



Methode B; Ansatz: 35.4 g (200 mmol) 2,3-Dichloranisol, 31.96 g (300 mmol) Buttersäurechlorid, 2x 40 g (300 mmol) Aluminiumchlorid, 150 ml Dichlormethan; nach Ausschütteln des acylierten Phenols ergibt sich eine Ausbeute von 50 %. Die nachfolgende Hydrolyse des zusätzlich *O*-acylierten Phenols erhöht diese um weitere 19 %.

Ausbeute: 45.46 g (195 mmol, 69 %), farbloser Feststoff

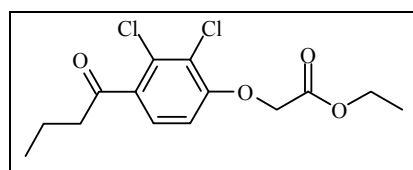
Schmelzpunkt: 107-108 °C (Methanol/Wasser), [Lit. ^[104]: 105-107 °C]

Molare Masse: 233.10 g/mol

Summenformel: C₁₀H₁₀Cl₂O₂

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 0.98 (3H, t, *J*=7.33 Hz; H₃C-CH₂-CH₂); 7.13 (2H, sext, *J*=7.33 Hz; H₃C-CH₂-CH₂); 2.89 (2H, t, *J*=7.33 Hz; H₃C-CH₂-CH₂); 5.93 (1H, s, OH); 7.00 (1H, d, *J*=8.59 Hz, arom. H₅); 7.39 (1H, d, *J*=8.59 Hz, arom. H₆);

9.5.2.2 Synthese von (4-Butyryl-2,3-dichlorphenoxy)-essigsäureethylester (III-1a)



Methode C1; Ansatz: 2.18 g (9.36 mmol) II-1a, 2.0 g (14.48 mmol) Kaliumcarbonat, 3.0 g (17.96 mmol) Bromessigsäureethylester, 20 ml wfr. Aceton;

Ausbeute: 2.38 g (7.46 mmol, 80 %), farbloser Feststoff

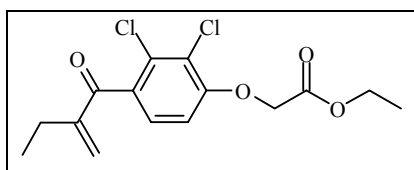
Schmelzpunkt: 55-56 °C (Ethanol) [Lit. ^[105]: 55-56 °C]

Molare Masse: 319.19 g/mol

Summenformel: C₁₄H₁₆Cl₂O₄

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): δ 0.98 (3H, t, $J=7.33$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$); 1.30 (3H, t, $J=7.07$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-O}$); 1.73 (2H, sext, $J=7.33$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$); 2.89 (2H, t, $J=7.33$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$); 4.28 (2H, q, $J=7.07$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-O}$); 4.75 (2H, s, $\text{O-CH}_2\text{-CO}$); 6.77 (1H, d, $J=8.59$ Hz, arom. H_6); 7.34 (1H, d, $J=8.59$ Hz, arom. H_5);

9.5.2.3 Synthese von Etacrynsäureethylester (IV-1a)



IUPAC: [2,3-Dichlor-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-essigsäureethylester

Methode D2; Ansatz: 3.20 g (10 mmol) (4-Butyryl-2,3-dichlorphenoxy)-essigsäureethylester (**III-1a**), insgesamt 6.3 g (61.7 mmol) N,N,N',N' -Tetramethyldiaminomethan, 5.4 g (52.9 mmol) Acetanhydrid, Reaktionsdauer 7 d; das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO_2 RP-18) mittels MPLC gereinigt, Gradient $\text{H}_2\text{O/Acetonitril}$ (95% \rightarrow 65 % Wasser in 60 min) und aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 788 mg (2.38 mmol, 24 %), leicht beige bis farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 39-40.5 °C (Ethanol) [Lit. ^[106]: 43-45 °C]

Molare Masse: 331.20 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{O}_4$

HR-EI-MS (70 eV, m/z , $[\text{M}]^+$): ber.: 166.13522; gef.: 166.13515

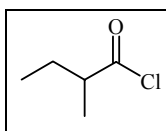
$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): δ 1.45 (t, 3H, $J=7.33$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-C}$); 1.30 (t, 3H, $J=7.20$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-O}$); 2.47 (q, 2H, $J=7.33$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-C}$); 4.28 (q, 2H, $J=7.20$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-O}$); 4.75 (s, 2H, $\text{O-CH}_2\text{-CO}$); 5.60 (s, 1H, C=CH_2); 5.94 (s, 1H, C=CH_2); 6.79 (d, 1H, $J=8.34$ Hz, arom. H_6); 7.14 (d, 1H, $J=8.34$ Hz, arom. H_5);

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ 12.32 ($\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-C}$); 14.05 ($\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-O}$); 23.35 ($\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-C}$); 61.67 ($\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-O}$); 66.26 ($\text{O-CH}_2\text{-CO}$); 110.77 (arom. C_6 , CH); 123.29 (arom. $q\text{C}_4$); 126.70 (arom. C_5 , CH); 128.54 ($=\text{CH}_2$); 131.38 (arom. $q\text{C}_3$, C-Cl); 133.78 (arom. $q\text{C}_2$, C-Cl); 150.10 ($\text{C}=\text{CH}_2$); 155.44 (arom. $q\text{C}_1$); 167.65 ($\text{O-CH}_2\text{-CO}$); 195,74 (Ar-CO);

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 1074$ (s, arom. C-Cl); 1206, 1293 (s, CO_2R , C-O); 1466 (m, arom. C=C); 1586 (m, $\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{O}$); 1661 (m-s, C=O); 1746 (m, CO_2R , C=O); 2940, 2972 (w, C-H);

9.5.3 [2,3-Dichlor-4-(2-methylbutyryl)-phenoxy]-essigsäureethylester (III-1b)

9.5.3.1 Synthese von 2-Methylbutyrylchlorid (X-f)



51.07 g (500 mmol) 2-Methylbuttersäure werden mit 89.22 g (750 mmol) Thionylchlorid unter Rückfluss und Feuchtigkeitsausschluss erhitzt bis die Gasentwicklung beendet ist (4 h). Man erhält das Produkt über fraktionierende Destillation bei Normaldruck.

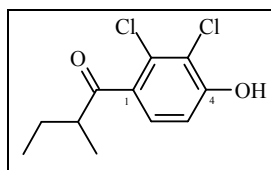
Ausbeute: 41.91 g (3447.5 mmol, 70 %), farblose Flüssigkeit

Brechungsindex: $n_D^{23} = 1.415$ [Lit. ^[107]: $n_D^{20} = 1.41695$]

Molare Masse: 120.58 g/mol

Summenformel: $\text{C}_5\text{H}_9\text{ClO}$

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): δ 0.98 (3H, t, $J=7.46$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2$); 1.28 (3H, d $J=6.82$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}$); 1.61 (1H, sept, $J=7.46$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2$); 1.83 (1H, sept, $J=7.21$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2$); 2.82 (1H, sext, $J=6.82$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}$);

9.5.3.2 *Synthese von 1-(2,3-Dichlor-4-hydroxyphenyl)-2-methylbutan-1-on (II-1b)*

Methode B; Ansatz: 17.73 g (100 mmol) 2,3-Dichloranisol, 18.09 g (150 mmol) 2-Methylbutyrylchlorid (**X-f**), 2x 20 g (300 mmol) Aluminiumchlorid, 100 ml Dichlormethan;

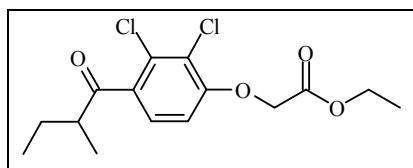
Ausbeute: 6.53 g (26.42 mmol, 26 %), leicht beige bis farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 92-95 °C (Diethylether) [Lit. ^[108]: 85-86 °C (Hexan)]

Molare Masse: 247.12 g/mol

Summenformel: C₁₁H₁₂Cl₂O₂

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 0.85 (3H, t, *J*=7.44 Hz, H₃C-CH₂-CH); 1.10 (3H, d, *J*=6.82 Hz, H₃C-CH); 1.37 (1H, m, H₃C-CH₂-CH); 1.71 (1H, m, H₃C-CH₂-CH); 3.13 (1H, sext, *J*=6.82 Hz, H₃C-CH); 6.16 (1H, s, OH); 6.92 (1H, d, *J*=8.59 Hz, arom. H₆); 7.20 (1H, d, *J*=8.59 Hz, arom. H₅);

9.5.3.3 *Synthese von [2,3-Dichlor-4-(2-methylbutyryl)-phenoxy]-essigsäureethylester (III-1b)*

Methode C3; Ansatz: 6.0 g (24.28 mmol) **II-1b**, 2.72 g (24.28 mmol) Kalium-*tert*butylat, 6.08 g (36.42 mmol) Bromessigsäureethylester, 30 ml THF;

Ausbeute: 4.85 g (14.55 mmol, 60 %), farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 46-48 °C (Ethanol)

Molare Masse: 333.21 g/mol

Summenformel: C₁₅H₁₈Cl₂O₄

HR-EI-MS (70 eV, m/z, [M]⁺): ber.: 332.05767; gef.: 332.05746

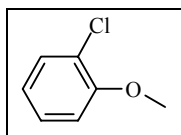
¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 0.92 (3H, t, *J*=7.33 Hz, *J*=7.58 Hz, H₃C-CH₂-CH); 1.16 (3H, d, *J*=6.82 Hz, H₃C-CH); 1.30 (3H, t, *J*=7.07 Hz, H₃C-CH₂-O); 1.44 (1H, m, *J*=7.07 Hz, *J*=7.33 Hz, H₃C-CH₂-CH); 1.78 (1H, m, *J*=7.33 Hz, H₃C-CH₂-CH); 3.19 (1H, sext, *J*=6.82 Hz, H₃C-CH); 4.28 (2H, q, *J*=7.07 Hz, H₃C-CH₂-O); 4.75 (2H, s, O-CH₂-CO); 6.77 (1H, d, *J*=8.59 Hz, arom. H₆); 7.24 (1H, d, *J*=8.59 Hz, arom. H₅);

¹³C-NMR (100.63 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 11.61 (H₃C-CH₂-CH); 14.14 (H₃C-CH₂-O); 15.63 (H₃C-CH); 26.01 (H₃C-CH₂-CH); 46.74 (H₃C-CH); 61.79 (H₃C-CH₂-O); 66.27 (O-CH₂-CO); 110.87 (arom. C₆, CH); 123.73 (arom. qC₄); 126.83 (arom. C₅, CH); 131.35 (arom. qC₃, C-Cl); 134.99 (arom. qC₂, C-Cl); 155.92 (arom. qC₁); 167.66 (O-CH₂-CO); 206.15 (Ar-CO);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 820 (w, 2 vicinale Ar-H); 1078 (m-s, Ar-Cl); 1209 (Ar-O-CH₂); 1580 (arom. C=C); 1690 (m-s, Ar-C=O); 1755 (s, CO₂R, C=O); 2797, 2936 (w, -C-H); 3082 (w, =C-H);

9.5.4 [2-Chlor-4-(2-methylacryloyl)-phenoxy]-essigsäureethylester (IV-2a)

9.5.4.1 Synthese von 2-Chloranisol (I-2a)



Methode A; Ansatz: 75.72 g (589 mmol) 2-Chlorphenol, 74.28 g (589 mmol) Dimethylsulfat, 736 mmol Kaliumhydroxid (414 ml einer 10 %igen Lösung); Filtration über Kieselgel mit Petrolether als Lösungsmittel;

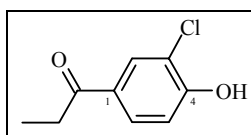
Ausbeute: 70 g (491 mmol, 83 %), farblose Flüssigkeit

Molare Masse: 142.59 g/mol

Summenformel: C₇H₇ClO

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): δ 3.83 (3H, s, O- CH_3); 6.83-6.88 (2H, m, arom. H); 7.15-7.20 (1H, m, $J=1.77$ Hz, arom. H); 7.32 (1H, dd, $J=1.77$ Hz, $J=7.83$ Hz, arom. H); [Lit. ^[109]]

9.5.4.2 *Synthese von 1-(3-Chlor-4-hydroxyphenyl)-propan-1-on (II-2a)*



Methode B; Ansatz: 33.69 g (236.4 mmol) 2-Chloranisol (**I-2a**), 32.81 g (354.7 mmol) Propionsäurechlorid, 2x 47.3 g (2x 354.7 mmol) Aluminiumchlorid, 100 ml Dichlormethan;

Ausbeute: 38.55 g (208.8 mmol, 88 %), farbloser Feststoff

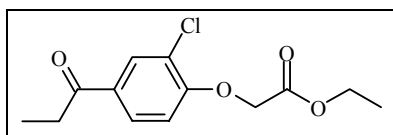
Schmelzpunkt: 112-114 °C (H_2O) [Lit. ^[110]: 114 °C (Essigsäure)]

Molare Masse: 184.62 g/mol

Summenformel: $\text{C}_9\text{H}_9\text{ClO}_2$

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): δ 1.22 (3H, t, $J=7.20$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2$); 2.94 (2H, q, $J=7.20$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2$); 7.07 (1H, d, $J=8.59$ Hz, arom. H_6); 7.82 (1H, dd, $J=2.02$, $J=8.59$ Hz, arom. H_5); 7.99 (1H, d, $J=7.02$ Hz, arom. H_3);

9.5.4.3 *(2-Chlor-4-propionylphenoxy)-essigsäureethylester (III-2a)*



Methode C3; Ansatz: 13.85 g (75 mmol) **II-2a**, 8.42 g (75 mmol) Kalium-*tert*butylat, 18.78 g (122.5 mmol) Bromessigsäureethylester, 75 ml THF;

Ausbeute: 13.0 g (48.02 mmol, 64 %), farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 125-126.5 °C (Ethanol)

Molare Masse: 270.72 g/mol

Summenformel: C₁₃H₁₅ClO₄

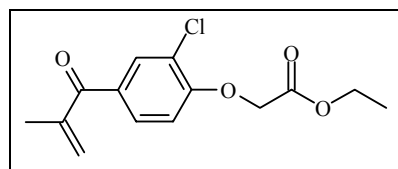
Elementaranalyse [%]: ber.: C 57.73, H 5.59; gef.: C 57.63, H 5.73;

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 1.20 (3H, t, *J*=7.33 Hz, H₃C-CH₂-CO); 1.29 (3H, t, *J*= 7.20 Hz, H₃C-CH₂-O); 2.93 (2H, q, *J*=7.33 Hz, H₃C-CH₂-CO); 4.27 (2H, q, *J*=7.20 Hz, H₃C-CH₂-O); 4.76 (2H, s, O-CH₂-CO); 6.84 (1H, d, *J*=8,58 Hz, arom. H₆); 7.83 (1H, dd, *J*=2.02 Hz, *J*=8.59 Hz, arom. H₅); 8.02 (1H, d, *J*=2.02 Hz, arom. H₃);

¹³C-NMR (100.61 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 8.23 (H₃C-CH₂-CO); 14.13 (H₃C-CH₂-O); 31.55 (H₃C-CH₂-CO); 61.74 (H₃C-CH₂-O); 65.96 (O-CH₂-CO); 112.52 (arom. C₆, CH); 123.49 (arom. qC₄ oder qC₂-Cl); 128.03 (arom. C₅, CH); 130.73 (arom. C₃, CH); 131.51 (arom. qC₄ oder qC₂-Cl); 156.96 (arom. qC₁); 167.70 (O-CH₂-CO); 198.32 (Ar-CO);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 795 (2 vicinale Ar-H); 1080 (m, Ar-Cl); 1211 (s, Ar-O-CH₂); 1593 (m, arom. C=C); 1672 (m, Ar-C=O); 1752 (s, CO₂R, C=O); 2815, 2913, 2979 (w, -C-H); 3071 (w, =C-H);

9.5.4.4 [2-Chlor-4-(2-methylacryloyl)-phenoxy]-essigsäureethylester (IV-2a)



Methode D2; Ansatz: 1.35 g (5 mmol) (2-Chlor-4-propionylphenoxy)-essigsäureethylester (**III-2a**), 766 mg (7.5 mmol) *N,N,N',N'*-Tetramethyldiaminomethan, 5.4 g (52.5 mmol) Acetanhydrid; Reaktionsdauer 3 d;

Ausbeute: 225 mg (0.8 mmol, 16 %), farblose Kristalle

Schmelzpunkt: 55-56 °C (Cyclohexan)

Molare Masse: 282.73 g/mol

Summenformel: C₁₄H₁₅ClO₄

Elementaranalyse [%]: ber.: C 59.48, H 5.35; gef.: C 59.26, H 5.34;

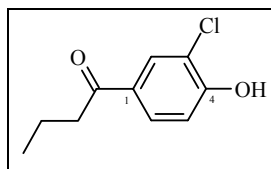
¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 1.30 (3H, t, *J*=7.16 Hz, -CH₂-CH₃); 2.05 (3H, s, CH₃); 4.29 (2H, q, *J*=7.16 Hz, -CH₂-CH₃); 4.77 (2H, s, O-CH₂-); 5.57 (1H, s, =C-H); 5.87 (1H, s, =C-H); 6.84 (1H, d, *J*=8.53 Hz, Ar-H); 7.66 (1H, dd, *J*=2.15 Hz, *J*=8.83 Hz, Ar-H); 7.85 (1H, d, *J*=2.15 Hz, Ar-H);

¹³C-NMR (100.61 MHz, CDCl₃, 300 K): δ 14.12 (-CH₂-CH₃); 18.81 (-CH₃); 61.70 (-CH₂-CH₃); 65.97 (-O-CH₂-); 112.37 (arom. C₆, CH); 123.13 (arom. C_{2/4}, q.); 125.99 (=CH₂); 129.59 (arom. C₅, CH); 131.74 (arom. *q*C_{2/4}); 132.12 (arom. C₃, CH); 143.46 (H₂C=C); 156.56 (arom. *q*C₁); 167.73 (-CH₂-CO-O-); 195.76 (-CO-Ar);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 799 (s, 2 benachbarte Ar-H); 1082 (s, arom C-Cl); 1197, 1217 (s, CO₂R, C-O); 1500 (m, arom. C=C); 1593 (m, C=C-C=O); 1653 (m-s, C=O); 1732 (s, CO₂R, C=O); 2958, 2988 (w, C-H);

9.5.5 [2-Chlor-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-essigsäureethylester (IV-2b)

9.5.5.1 Synthese von 1-(3-Chlor-4-hydroxyphenyl)-butan-1-on (II-2b)



Methode B; Ansatz: 33.69 g (236.4 mmol) 2-Chloranisol (**I-2a**), 37.78 g (354.7 mmol) Buttersäurechlorid, 2x 47.3 g (2x 354.7 mmol) Aluminiumchlorid, 100 ml Dichlormethan;

Ausbeute: 32.88 g (165.5 mmol, 70 %), farbloser Feststoff

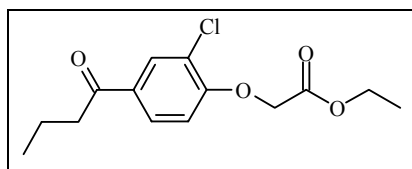
Schmelzpunkt: 119 – 120 °C (Ethanol) [Lit. ^[111]: 122 °C]

Molare Masse: 198.65 g/mol

Summenformel: C₁₀H₁₁ClO₂

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 1.00 (3H, t, *J*=7.58 Hz, H₃C-CH₂-CH₂); 1.76 (2H, sext, *J*=7.33 Hz, *J*=7.58 Hz, H₃C-CH₂-CH₂); 2.88 (2H, t, *J*=7.33 Hz, H₃C-CH₂-CH₂); 6.05 (1H, s, OH); 7.07 (1H, d, *J*=8.59 Hz, arom. H₅); 7.83 (1H, dd, *J*=2.02 Hz, *J*=8.59 Hz, arom. H₆); 7.99 (1H, d, *J*=2.02 Hz, arom. H₂);

9.5.5.2 Synthese von (4-Butyryl-2-chlorphenoxy)-essigsäureethylester (III-2b)



Methode C3; Ansatz: 9.93 g (50 mmol) **II-2b**, 5.61 g (50 mmol) Kalium-*tert*butylat, 9.18 g (55 mmol) Bromessigsäureethylester, 75 ml THF;

Ausbeute: 10.37 g (36.42 mmol, 73 %), farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 97-98 °C (Ethanol)

Molare Masse: 284.74 g/mol

Summenformel: C₁₄H₁₇ClO₄

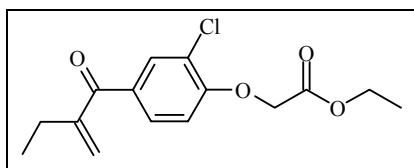
Elementaranalyse [%]: ber.: C 59.06, H 6.02; gef.: C 58.83, H 5.97;

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 1.00 (3H, t, *J*=7.46 Hz, H₃C-CH₂-CH₂); 1.30 (3H, t, *J*=7.20 Hz, H₃C-CH₂-O); 1.75 (2H, sext, *J*=7.33 Hz, 7.46 Hz, H₃C-CH₂-CH₂); 2.88 (2H, t, *J*=7.33 Hz, H₃C-CH₂-CH₂); 4.28 (2H, q, *J*=7.20 Hz, H₃C-CH₂-O); 4.77 (2H, s, O-CH₂-CO); 6.84 (1H, d, *J*=8.59 Hz, arom. H₆); 7.83 (1H, dd, *J*=2.27 Hz, *J*=8.59 Hz, arom. H₅); 8.02 (1H, d, *J*=2.27 Hz, arom. H₃);

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): δ 13.86 ($\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$); 14.14 ($\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-O}$); 17.79 ($\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$); 40.25 ($\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$); 61.74 ($\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-O}$); 65.97 ($\text{O-CH}_2\text{-CO}$); 112.52 (arom. C_6 , CH); 123.49 (arom. $q\text{C}_4$); 128.11 (arom. C_5 , CH); 130.80 (arom. C_3 , CH); 131.71 (arom. $q\text{C}_2$, C-Cl); 156.96 (arom. $q\text{C}_1$); 167.71 ($\text{O-CH}_2\text{-CO}$); 197.88 (Ar-CO);

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ = 808 (2 vicinale Ar-H); 1082 (m, Ar-Cl); 1205 (s, Ar-O-CH₂); 1592 (m, arom. C=C); 1665 (m, Ar-C=O); 1749 (s, CO_2R , C=O); 2938, 2966 (w, C-H); 3056 (w, =C-H);

9.5.5.3 *Synthese von [2-Chlor-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-essigsäureethylester (IV-2b)*



Methode D2; Ansatz: 2.85 g (10 mmol) (4-Butyryl-2-chlorphenoxy)-essigsäureethylester (**III-2b**), 9.53 g (93.23 mmol) *N,N,N',N'*-Tetramethyldiaminomethan, 10.8 g (105.8 mmol) Acetanhydrid; Reaktionsdauer: 3d;

Ausbeute: 990 mg (3.34 mmol, 33 %), farblose Flüssigkeit

Brechungsindex: $n_D^{22} = 1.5398$

Molare Masse: 296.75 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{ClO}_4$

Elementaranalyse [%]: ber.: C 60.71, H 5.77; gef.: C 60.33, H 5.80;

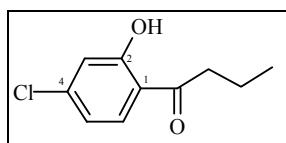
$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): δ 1.11 (3H, t, $J=7.45$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2$); 1.30 (3H, t, $J=7.08$ Hz, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$); 2.46 (2H, q, $J=7.45$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2$); 4.28 (2H, q, $J=7.08$ Hz, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$); 4.77 (2H, s, $\text{O-CH}_2\text{-CO}$); 5.52 (1H, s, =CH); 5.78 (1H, s, =CH); 6.84 (1H, d, $J=8.59$ Hz, arom. H_6); 7.68 (1H, dd, $J=2.27$ Hz, $J=8.59$ Hz, arom. H_5); 7.87 (1H, d, $J=2.27$ Hz, arom. H_3);

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ 12.28 ($\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-C=}$); 14.09 ($\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$); 25.42 ($\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-C=}$); 61.69 ($\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$); 65.94 ($\text{O-CH}_2\text{-CO}$); 112.33 (arom. C_6 , CH); 123.13 (C=CH_2 + arom. $q\text{C}_2$, C-Cl); 129.64 (arom. C_5 , CH); 132.02 (arom. $q\text{C}_4$); 132.13 (arom. C_3 , CH); 149.38 (C=CH_2); 156.64 (arom. $q\text{C}_1$); 167.71 ($\text{O-CH}_2\text{-C=O}$); 195.98 (Ar-C=O);

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ = 1080 (s, arom. C-Cl); 1196, 1281 (s, CO_2R , C-O); 1496 (m, arom. C=C); 1592 (m, C=C-C=O); 1652 (m-s, C=O); 1755 (m, CO_2R , C=O); 2938, 2971 (w, C-H);

9.5.6 [5-Chlor-2-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-essigsäureethylester (IV-3a)

9.5.6.1 Synthese von 1-(4-Chlor-2-hydroxy-phenyl)-butan-1-on (II-3a)



Methode B; Ansatz: 25.78 g (180 mmol) 3-Chloranisol, 28.9 g (271.23 mmol) Buttersäurechlorid, 2x 36.2 g (2x 271.23 mmol) Aluminiumchlorid, 100 ml Dichlormethan; bei der Extraktion des Phenols geht hauptsächlich das in ortho-Position zur Phenolgruppe acylierte Produkt in die alkalische Phase über. Nach Hydrolyse können zusätzlich sowohl das in para-Position (**II-3b**) als auch das in ortho- und para-Position bisacylierte Produkt (**II-3c**) erhalten werden. Man trennt das Gemisch der Verbindungen durch Säulenchromatographie auf Kieselgel 60 mit Chloroform als mobiler Phase.

R_f : 0.73

Ausbeute: 15.21 g (76.57 mmol, 43 %), farblose Kristalle

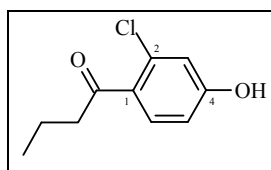
Schmelzpunkt: 45-46 °C (Chloroform) [Lit. ^[112]: 51 °C]

Molare Masse: 198.65 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{ClO}_2$

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): δ 1.02 (3H, t, $J=7.58$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$); 1.78 (2H, sext, $J=7.33$ Hz, $J=7.58$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$); 2.93 (2H, t, $J=7.33$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$); 6.87 (1H, dd, $J=2.02$ Hz, $J=8.59$ Hz, arom. H_5); 7.00 (1H, d, $J=2.02$ Hz, arom. H_3); 7.69 (1H, d, $J=8.59$ Hz, arom. H_6); 12.53 (1H, s, OH);

Nebenprodukt 1: 1-(2-Chlor-4-hydroxyphenyl)-butan-1-on (II-3b)



R_f : 0.04

Ausbeute: 4.06 g (20.44 mmol, 11 %), farblose Kristalle

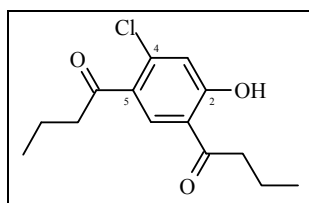
Schmelzpunkt: 77-79 °C (Cyclohexan) [Lit. ^[113]: 82.5-84 °C (Cyclohexan)]

Molare Masse: 198.65 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{ClO}_2$

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): δ 0.98 (3H, t, $J=7.46$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$); 1.74 (2H, sext, $J=7.46$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$); 2.95 (2H, t, $J=7.33$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$); 6.81 (1H, dd, $J=2.27$ Hz, $J=8.59$ Hz, arom. H_5); 6.94 (1H, d, $J=2.27$ Hz, arom. H_3); 7.02 (1H, s, OH); 7.51 (1H, d, $J=8.59$ Hz, arom. H_6);

Nebenprodukt 2: 1-(5-Butyryl-4-chlor-2-hydroxyphenyl)-butan-1-on (II-3c)



R_f : 0.51

Ausbeute: 1.42 g (5.28 mmol, 3 %), farblose Kristalle

Schmelzpunkt: 31-33 °C

Molare Masse: 268.74 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{ClO}_3$

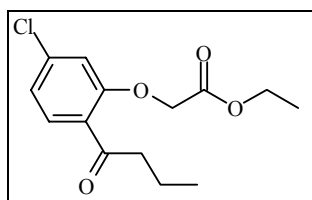
Elementaranalyse [%]: ber.: C 62.57, H 6.38; gef.: C 62.72, H 6.46;

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): δ 1.00 (3H, t, $J=7.46$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$); 1.03 (3H, t, $J=7.33$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$); 1.75 (2H, sext, $J=7.46$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$); 1.78 (2H, sext, $J=7.33$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$); 2.977 (2H, t, $J=7.33$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$); 2.983 (2H, t, $J=7.33$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$); 7.04 (1H, s, arom. H_3); 8.08 (1H, s, arom. H_6); 12.64 (1H, s, OH);

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, CDCl_3 , 300 K): 13.71 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$); 13.79 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$); 17.58 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$); 18.01 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$); 40.26 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$); 44.77 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$); 117.97 (arom. qC_1); 120.30 (arom. C_3 , CH); 130.18 (arom. qC_5); 132.50 (arom. C_6 , CH); 139.21 (arom. qC_4 , C-Cl); 164.31 (arom. qC_2 , C-OH); 200.78 (C=O); 206.14 (C=O);

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ = 1566 (m, arom. C=C); 1641, 1670 (s, Ar-C=O); 2874, 2900, 2930, 2965 (w-m, -C-H); 3067 (w, =C-H);

9.5.6.2 *Synthese von (2-Butyryl-5-chlorphenoxy)-essigsäureethylester (III-3a)*



Methode C3; Ansatz: 9.48 g (47.7 mmol) **II-3a**, 8.35 g (50 mmol) Bromessigsäureethylester, 5.35 g (47.7 mmol) Kalium-*tert*butylat, 75 ml THF;

Ausbeute: 9.62 g (33.79 mmol, 71 %), farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 51-52 °C (Ethanol)

Molare Masse: 284.74 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{ClO}_4$

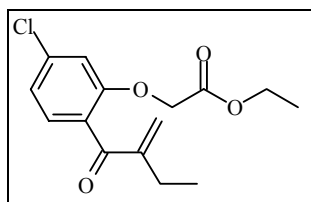
Elementaranalyse [%]: ber.: C 59.06, H 6.02; gef.: C 59.24, H 6.03;

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 0.96 (3H, t, *J*=7.46 Hz, H₃C-CH₂-CH₂); 1.32 (3H, t, *J*=7.20 Hz, H₃C-CH₂); 1.71 (2H, sext, *J*=7.46 Hz, H₃C-CH₂-CH₂); 3.04 (2H, t, *J*=7.20 Hz, H₃C-CH₂-CH₂); 4.30 (2H, q, *J*=7.20 Hz, H₃C-CH₂); 4.70 (2H, s, O-CH₂-CO); 6.81 (1H, d, *J*=1.77 Hz, arom. H₂); 7.03 (1H, dd, *J*=1.77 Hz, *J*=8.34 Hz, arom. H₄); 7.66 (1H, d, *J*=8.34 Hz, arom. H₅);

¹³C-NMR (100.61 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 13.86 (H₃C-CH₂-CH₂); 14.16 (H₃C-CH₂-O); 17.73 (H₃C-CH₂-CH₂); 45.80 (H₃C-CH₂-CH₂); 61.71 (H₃C-CH₂-O); 65.71 (O-CH₂-CO); 112.89 (arom. C₆, CH); 122.12 (arom. C₄, CH); 127.62 (arom. qC₅, C-Cl); 131.79 (arom. C₃, CH); 138.77 (arom. qC₂); 156.99 (arom. qC₁); 167.58 (O-CH₂-C=O); 201.40 (Ar-C=O);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 1237 (s, Ar-O-CH₂); 1567, 1586 (m, arom. C=C); 1665 (s, Ar-C=O); 1732 (s, CO₂R, C=O); 2873, 2933, 2960 (w, -C-H); 3045, 3108 (w, =C-H);

9.5.6.3 Synthese von [5-Chlor-2-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-essigsäureethylester (IV-3a)



Methode D2; Ansatz: 2.85 g (10 mmol) (2-Butyryl-5-chlorphenoxy)-essigsäureethylester (**III-3a**), insgesamt 19.75 g (193.3 mmol) *N,N,N',N'*-Tetramethyldiaminomethan, 16.2 g (158.7 mmol) Acetanhydrid; Reaktionsdauer: 15 d; das Rohprodukt wird nach Filtration durch Kieselgel mit Chloroform, säulenchromatographisch auf Kieselgel 60 isokratisch mit einem Cyclohexan/Ethylacetat-Gemisch gereinigt.

Ausbeute: 2.0 g (6.75 mmol, 68 %), farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 25-26 °C (Cyclohexan/Ethylacetat)

Molare Masse: 296.75 g/mol

Summenformel: C₁₅H₁₇ClO₄

Elementaranalyse [%]: ber.: C 60.71, H 5.77; gef.: C 60.45, H 5.78;

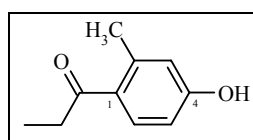
¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 1.12 (3H, t, *J*=7.46 Hz, H₃C-CH₂); 1.28 (3H, t, *J*=7.20 Hz, H₃C-CH₂-O); 2.45 (2H, q, *J*=7.46 Hz, H₃C-CH₂); 4.25 (2H, q, *J*=7.20 Hz, H₃C-CH₂-O); 4.59 (2H, s, O-CH₂-CO); 5.67 (1H, s, C=CH₂); 5.87 (1H, s, C=CH₂); 6.81 (1H, d, *J*=1.77 Hz, arom. H₂); 7.03 (1H, dd, *J*=1.77 Hz, *J*=8.08 Hz, arom. H₄); 7.21 (1H, d, *J*=8.08 Hz, arom. H₅);

¹³C-NMR (100.63 MHz, CDCl₃, 300 K): δ 12.41 (H₃C-CH₂); 14.09 (H₃C-CH₂-O); 23.51 (H₃C-CH₂); 61.48 (H₃C-CH₂-O); 65.91 (O-CH₂-CO); 113.22 (arom. C₂, CH); 121.66 (arom. C₄, CH); 127.13 (qC=CH₂); 128.65 (arom. qC₆); 130.13 (arom. C₅, CH); 136.60 (arom. qC₃, C-Cl); 150.70 (qC=CH₂); 155.90 (arom. qC₁); 167.86 (O-CH₂-CO); 196.91 (Ar-CO);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 800 (m, 2 vicinale Ar-H); 1196 (s, Ar-O-CH₂); 1292 (CO₂R, C-O); 1592 (s, C=O-C=C); 1662 (s, C=O-C=C); 1755 (s, CO₂R, C=O); 2936, 2970 (w, -C-H); 3094 (w, =C-H);

9.5.7 [3-Methyl-4-(2-methylacryloyl)-phenoxy]-essigsäureethylester (IV-5a)

9.5.7.1 Synthese von 1-(4-Hydroxy-2-methylphenyl)-propan-1-on (II-5a)



Methode B; Ansatz: 24.43 g (200 mmol) 3-Methylansiol, 19.43 g (215 mmol) Propionsäurechlorid, 2x 40 g (2x 300 mmol) Aluminiumchlorid, 150 ml Dichlormethan; das Produkt wurde nach einmaliger Umkristallisation ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt umgesetzt. Die zu ca. 30 % anfallende in ortho-Position acylierte Verbindung wurde nicht isoliert.

Ausbeute: 13.7 g (83.4 mmol, 42 %), leicht beige bis farbloser Feststoff

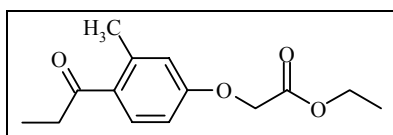
Schmelzpunkt: 100-105 °C (Ethanol/H₂O) [Lit. ^[114]: 114 °C (Ethanol/H₂O)]

Molare Masse: 164.21 g/mol

Summenformel: C₁₀H₁₂O₂

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): δ 1.19 (3H, t, $J=7.33$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2$); 2.52 (3H, s, Ar- CH_3); 2.91 (2H, q, $J=7.33$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2$); 5.89 (1H, s, OH); 6.71-6.73 (2H, m, arom. H); 7.69 (1H, d, $J=9.09$ Hz, arom. H);

9.5.7.2 *Synthese von (3-Methyl-4-propionylphenoxy)-essigsäureethylester (III-5a)*



Methode C3; Ansatz: 13.70 g (83.43 mmol) **II-5a**, 9.23 g (84 mmol) Kalium-*tert*butylat, 20.9 g (125.1 mmol) Bromessigsäureethylester, 75 ml THF;

Ausbeute: 10.75 g (43.0 mmol, 52 %), farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 33-34 °C (Ethanol)

Molare Masse: 250.30 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$

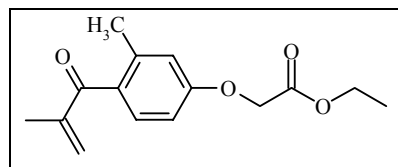
Elementaranalyse [%]: ber.: C 67.18, H 7.25; gef.: C 66.95, H 7.26;

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): δ 1.18 (3H, t, $J=7.33$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-O}$); 1.30 (3H, t, $J=7.07$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-C}$); 2.53 (3H, s, Ar- CH_3); 2.90 (2H, q, $J=7.33$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-O}$); 4.28 (2H, q, $J=7.07$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-C}$); 4.65 (2H, s, $\text{-O-CH}_2\text{-}$); 6.75 (2H, m, arom. $\text{H}_2 + \text{H}_6$); 7.70 (1H, d, $J=8.34$ Hz, arom. H_5);

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): δ 8.59 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CO}$); 14.17 ($\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$); 22.27 (Ar- CH_3); 34.01 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CO}$); 61.53 ($\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$); 65.13 ($\text{O-CH}_2\text{-CO}$); 111.09 (arom. C_2 oder C_6 , CH); 118.10 (arom. C_2 oder C_6 , CH); 131.22 (arom. $q\text{C}_3$); 132.16 (arom. C_5 , CH); 141.82 (arom. $q\text{C}_4$); 159.70 (arom. $q\text{C}_1$); 168.42 ($\text{O-CH}_2\text{-CO}$); 202.74 (Ar-CO);

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ = 795 (m, 2 benachbarte Ar-H); 1088 (m, $=\text{C-O-C}$); 1175, 1204 (s, CO_2R , C-O); 1568, 1605 (m, arom. C=C); 1674 (m, Ar-C=O); 1753 (m, CO_2R , C=O); 2938, 2980 (w, C-H);

9.5.7.3 *Synthese von [3-Methyl-4-(2-methylacryloyl)-phenoxy]-essigsäureethylester (IV-5a)*



Methode D2; Ansatz: 1.31 g (5 mmol) (3-Methyl-4-propionylphenoxy)-essigsäureethylester (**III-5a**), 1.40 g (13.6 mmol) *N,N,N',N'*-Tetramethyldiaminomethan, 5.4 g (52.5 mmol) Acetanhydrid; Reaktionsdauer: 3 d; das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch auf Kieselgel 60 (Cyclohexan/Ethylacetat 10+1 V/V, isokratisch) aufgereinigt.

Ausbeute: 179 mg (0.68 mmol, 14 %), farblose Flüssigkeit

Brechungsindex : $n_D^{22} = 1.5240$

Molare Masse: 262.31 g/mol

Summenformel: $C_{15}H_{18}O_4$

HR-EI-MS (70 eV, m/z, [M]⁺): ber.: 262.11996; gef.: 262.12011

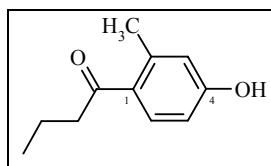
¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 1.30 (3H, t, $J=7.07$ Hz, CH₂-CH₃); 2.03 (3H, s, H₃C-C=CH₂); 2.33 (3H, s, Ar-CH₃); 4.28 (2H, q, $J=7.07$ Hz, -CH₂-CH₃); 4.64 (2H, s, O-CH₂-CO-); 5.54 (1H, s, =CH₂); 5.90 (1H, s, =CH₂); 6.70 (1H, dd, $J=2.40$ Hz, $J=8.48$ Hz, arom. H₆); 6.77 (1H, d, $J=2.40$ Hz, arom. H₂); 7.27 (1H, d, $J=8.48$ Hz, arom. H₅);

¹³C-NMR (100.61 MHz, CDCl₃, 300 K): δ 14.18 (O-CH₂-CH₃); 17.68 (H₃C-C=CH₂); 20.32 (Ar-CH₃); 61.47 (O-CH₂-CH₃); 65.26 (O-CH₂-CO); 100.63 (arom. C₆, CH); 117.26 (arom. C₂, CH); 128.57 (=CH₂); 130.64 (arom. C₅, CH); 132.23 (arom. qC₄); 139.47 (H₃C-C=CH₂); 145.42 (arom. qC₁); 158.95 (O-CH₂-CO); 168.59 (Ar-CO-);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu} = 800$ (m, 2 benachbarte Ar-H); 1169, 1201 (s, CO₂R, C-O); 1080 (=C-O-C); 1571 (m, arom. C=C); 1603 (m, C=C-C=O); 1655 (m, C=O); 1758 (m, CO₂R, C=O); 2927, 2982 (w, C-H);

9.5.8 [3-Methyl-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-essigsäureethylester (IV-5b)

9.5.8.1 *Synthese von 1-(4-Hydroxy-2-methylphenyl)-butan-1-on (II-5b)*



Methode B; Ansatz: 24.43 g (200 mmol) 3-Methylanisol, 31.97 g (300 mmol) Buttersäurechlorid, 2x 40 g (2x 300 mmol) Aluminiumchlorid, 150 ml Dichlormethan;

Ausbeute: 8.54 g (47.64 mmol, 24 %), farbloser Feststoff

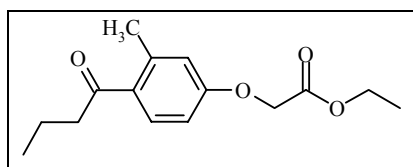
Schmelzpunkt: 97-98 °C (Benzen) [Lit. ^[115]: 97-98 °C]

Molare Masse: 179.23 g/mol

Summenformel: C₁₁H₁₄O₂

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 0.98 (3H, t, *J*=7.58 Hz, H₃C-CH₂-CH₂-); 1.73 (2H, sext, *J*=7.58 Hz, *J*=7.33 Hz, H₃C-CH₂-CH₂); 2.51 (3H, s, Ar-CH₃); 2.85 (2H, t, *J*=7.33 Hz, H₃C-CH₂-CH₂-); 5.44 (1H, s, OH), 6.70-6.72 (2H, m, arom. H₃ und H₅); 7.67 (1H, d, *J*=9.09 Hz, arom. H₆);

9.5.8.2 *Synthese von (4-Butyryl-3-methylphenoxy)-essigsäureethylester (III-5b)*



Methode C3; Ansatz: 8.02 g (45 mmol) **II-5b**, 5.05 g (45 mmol) Kalium-*tert*butylat, 8.26 g (49.5 mmol) Bromessigsäureethylester; die Verbindung wurde säulenchromatographisch auf Kieselgel 60 (Cyclohexan/Ethylacetat 9+1 V/V, isokratisch) gereinigt.

Ausbeute: 9.2 g (34.8 mmol, 77 %), farblose, fruchtig riechende Flüssigkeit

Brechungsindex: $n_D^{22} = 1.5200$

Molare Masse: 264.32 g/mol

Summenformel: $C_{15}H_{20}O_4$

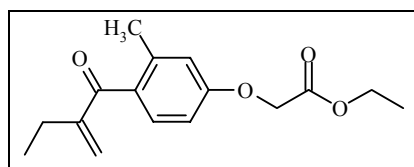
Elementaranalyse [%]: ber.: C 68.16, H 7.63; gef.: C 67.92, H 7.47;

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): δ 0.97 (3H, t, $J=7.33$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$); 1.30 (3H, t, $J=7.08$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-O}$); 1.72 (2H, sext, $J=7.33$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$); 2.52 (3H, s, Ar- CH_3); 2.84 (2H, t, $J=7.33$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$); 4.28 (2H, q, $J=7.08$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-O}$); 4.65 (2H, s, O- $\text{CH}_2\text{-CO}$); 6.73-6.76 (2H, m, arom. $H_2 + H_6$); 7.69 (1H, d, $J=8.34$ Hz, arom. H_5);

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ 13.77 ($\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$); 14.06 ($\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-O}$); 17.98 ($\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$); 22.05 (Ar- CH_3); 42.81 ($\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$); 61.40 ($\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-O}$); 65.01 (O- $\text{CH}_2\text{-CO}$); 110.97 (arom. C_2 , CH); 117.98 (arom. C_6 , CH); 131.16 (arom. C_5 , CH); 131.32 (arom. qC_4); 141.60 (arom. qC_3 , C- CH_3); 159.58 (arom. qC_1); 168.32 (O- $\text{CH}_2\text{-CO}$); 202.38 (Ar-CO);

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 1134$ (m, =C-O-C); 1175, 1202 (s, CO_2R , C-O); 1569, 1603 (m, arom. C=C); 1676 (m, Ar-C=O); 1758 (m, CO_2R , C=O); 2874, 2932, 2963 (w, C-H);

9.5.8.3 Synthese von [3-Methyl-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-essigsäureethylester (IV-5b)



Methode D2; Ansatz: 1.38 g (5 mmol) (4-Butyryl-3-methylphenoxy)-essigsäureethylester (**III-5b**), 1.40 g (13.6 mmol) *N,N,N',N'*-Tetramethyldiaminomethan, 5.4 g (52.5 mmol) Acetanhydrid; Reaktionsdauer: 3 d; das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch auf Kieselgel 60 (Cyclohexan/Ethylacetat 9+1 V/V, isokratisch) gereinigt.

Ausbeute: 390 mg (1.4 mmol, 28 %), farblose Flüssigkeit

Brechungsindex: $n_D^{22} = 1.5243$

Molare Masse: 276.34 g/mol

Summenformel: C₁₆H₂₀O₄

HR-EI-MS (70 eV, m/z, [M]⁺): ber.: 276.13561; gef.: 276.113567

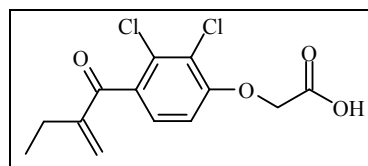
¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 1.13 (3H, t, $J=7.46$ Hz, H₃C-CH₂); 1.31 (3H, t, $J=7.07$ Hz, H₃C-CH₂-O); 2.34 (3H, s, Ar-CH₃); 2.46 (2H, q, $J=7.46$ Hz, H₃C-CH₂); 4.28 (2H, q, $J=7.07$ Hz, H₃C-CH₂-O); 4.64 (2H, s, O-CH₂-CO); 5.53 (1H, s, =CH); 5.82 (1H, s, =CH); 6.70 (1H, dd, $J=2.53$ Hz, $J=8.71$ Hz, arom. H₆); 6.77 (1H, d, $J=2.53$ Hz, arom. H₂); 7.28 (1H, d, $J=8.71$ Hz, arom. H₅);

¹³C-NMR (100.61 MHz, CDCl₃, 300 K): δ 12.51 (H₃C-CH₂); 14.15 (H₃C-CH₂-O); 20.38 (Ar-CH₃); 24.17 (H₃C-CH₂); 61.46 (H₃C-CH₂-O); 65.23 (O-CH₂-CO); 110.62 (arom. C₆, CH); 117.20 (arom. C₂, CH); 126.23 (=CH₂); 130.87 (arom. C₅, CH); 132.47 (arom. qC₄); 139.64 (arom. qC₃, C-CH₃); 151.33 (qC=CH₂); 158.98 (arom. qC₁); 168.56 (O-CH₂-CO); 199.61 (Ar-CO);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu} = 799$ (m, 2 benachbarte Ar-H); 1169, 1200 (s, CO₂R, C-O); 1570 (m, arom. C=C); 1603 (m, C=C-C=O); 1653 (m, C=O); 1757 (m, CO₂R, C=O); 2969 (w, C-H);

9.6 Synthesen der Phenoxyessigsäuren

9.6.1 Synthese von Etacrynsäure (V-1a)



IUPAC: [2,3-Dichlor-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-essigsäure

Methode D3; Ansatz: 3.19 g (10 mmol) (4-Butyryl-2,3-dichlorphenoxy)-essigsäureethylester (**III-1a**), 1000 μ l 40 %ige Formaldehydlösung (13.33 mmol Formaldehyd), 1.38 g (10 mmol) Kaliumcarbonat; Reaktionsdauer: 6 h; das Rohprodukt wurde aus Benzen umkristallisiert.

Ausbeute: 600 mg (1.98 mmol, 20 %), farbloser Feststoff

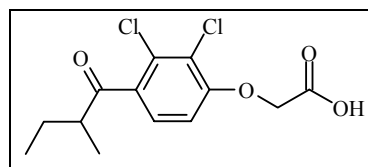
Schmelzpunkt: 112-114°C (Benzen) [Lit. ^[38]: 118.5-120.5 °C]

Molare Masse: 303.14 g/mol

Summenformel: C₁₃H₁₂Cl₂O₄

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 1.15 (3H, t, $J=7.45$ Hz, H₃C-CH₂); 2.47 (2H, q, $J=7.45$ Hz, H₃C-CH₂); 4.81 (2H, s, O-CH₂-CO); 5.60 (1H, s, =CH₂); 5.95 (1H, s, =CH₂); 6.82 (1H, d, $J=8.47$ Hz, arom. H₆); 7.16 (1H, d, $J=8.47$ Hz, arom. H₅);

9.6.2 Synthese von [2,3-Dichlor-4-(2-methylbutyryl)-phenoxy]-essigsäure (V-1b)



2.0 g (6.0 mmol) [2,3-Dichlor-4-(2-methylbutyryl)-phenoxy]-essigsäureethylester (**III-1b**) in 25 ml Ethanol werden mit 0.32 g (8 mmol) Natriumhydroxid in 25 ml Wasser versetzt und bei 90 °C im Ölbad für 10 h unter Rückfluss erhitzt und über Nacht stehen gelassen. Das Natriumsalz **V-1c** fällt dabei aus und kann über eine Fritte abgesaugt werden. Man

wäscht das Salz mit wasserfreiem Ethanol und trocknet es. Die Mutterlauge wird mit konzentrierter Salzsäure auf pH 1 angesäuert und 3mal mit Diethylether ausgeschüttelt, mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Man kristallisiert die Säure aus Methanol um.

Ausbeute: 1017 mg (3.33 mmol, 56 %), farbloser Feststoff

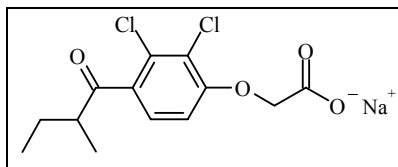
Schmelzpunkt: 136-138 °C (Methanol) [Lit. ^[116]: 141.5-142.5 °C]

Molare Masse: 305.16 g/mol

Summenformel: C₁₃H₁₄Cl₂O₄

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 0.93 (3H, t, *J*=7.33 Hz, *J*=7.58 Hz, H₃C-CH₂); 1.17 (3H, d, *J*=6.82 Hz, H₃C-CH); 1.44 (1H, m, *J*=7.07 Hz, *J*=7.33 Hz, *J*=6.82 Hz, H₃C-CH₂); 1.78 (1H, m, *J*=7.33 Hz, *J*=7.58 Hz, H₃C-CH₂); 3.19 (1H, sext, *J*=6.82 Hz, H₃C-CH); 4.80 (2H, s, O-CH₂-CO₂H); 6.33 (1H, s, CO₂H); 6.80 (1H, d, *J*=8.59 Hz, arom. H₆); 7.26 (1H, d, *J*=8.59 Hz, arom. H₅);

Nebenprodukt [2,3-Dichlor-4-(2-methylbutyryl)-phenoxy]-essigsäure, Na-Salz (V-1c)



Ausbeute: 786 mg (2.4 mmol, 40 %), farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 219-220 °C (Ethanol/Wasser)

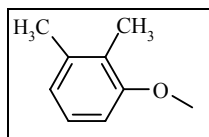
Molare Masse: 327.14 g/mol

Summenformel: C₁₃H₁₃Cl₂O₄Na

¹H-NMR (400.13 MHz, DMSO-d₆, 300 K): δ 0.83 (3H, t, *J*=7.46 Hz, H₃C-CH₂); 1.05 (3H, d, *J*=6.82 Hz, H₃C-CH); 1.34 (1H, sept, *J*=6.82 Hz, *J*=7.46 Hz, H₃C-CH₂); 1.64 (1H, sept, *J*=6.82 Hz, *J*=7.46 Hz, H₃C-CH₂); 3.20 (1H, sext, *J*=6.82 Hz, H₃C-CH); 4.33 (2H, s, O-CH₂-CO); 6.87 (1H, d, *J*=8.59 Hz, arom. H₆); 7.49 (1H, d, *J*=8.59 Hz, arom. H₅);

9.6.3 [2,3-Dimethyl-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-essigsäure (V-4a)

9.6.3.1 Synthese von 2,3-Dimethylanisol (I-4a)



Methode A; Ansatz: 40 g (327.4 mmol) 2,3-Dimethylphenol, 23 g (410 mmol) Kaliumhydroxid, 41.4 g (328 mmol) Dimethylsulfat;

Ausbeute: 29.96 g (220 mmol, 67 %), beiger Feststoff

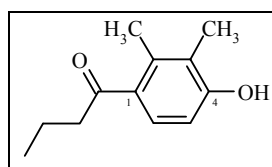
Schmelzpunkt: 25-26°C [Lit. ^[117]: 27-29 °C]

Molare Masse: 136.20 g/mol

Summenformel: C₉H₁₂O

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 2.14 (3H, s, CH₃); 2.27 (3H, s, CH₃); 3.81 (3H, s, O-CH₃); 6.71 (1H, d, J=8.08 Hz, arom. H); 6.77 (1H, d, J=7.71 Hz, arom. H); 7.05 (1H, t, J=7.71 Hz, J=8.08 Hz, arom. H₅);

9.6.3.2 Synthese von 1-(4-Hydroxy-2,3-dimethylphenyl)-butan-1-on (II-4a)



Methode B; Ansatz: 13.5 g (99.1 mmol) 2,3-Dimethylanisol (**I-4a**), 15.84 g (148.8 mmol) Buttersäurechlorid, 2x 19.8 g (148.6 mmol) Aluminiumchlorid, 100 ml Dichlormethan; nach Aufarbeitung wurden 393 mg (2.04 mmol, 2 %) des para-acylierten Phenols erhalten. Die Etherphase enthielt hauptsächlich das para-acylierte Anisol **VIII-4a**. Die Etherphase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und nochmals mit 19.8 g (148.6 mmol) Aluminiumchlorid in 100 ml Dichlormethan 2.5 h unter Rückfluss erhitzt.

Gesamtausbeute: 596 mg (3.10 mmol, 3 %)

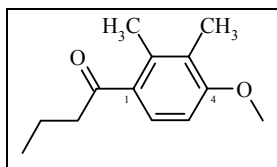
Schmelzpunkt: 98-100 °C (Ethylacetat) [Lit. ^[118]: 100-102 °C]

Molare Masse: 192.26 g/mol

Summenformel: C₁₂H₁₆O₂

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 0.97 (3H, t, *J*=7.33 Hz, H₃C-CH₂-CH₂); 1.72 (2H, sext, *J*=7.33 Hz, H₃C-CH₂-CH₂); 2.19 (3H, s, Ar-CH₃); 2.37 (3H, s, Ar-CH₃); 2.81 (2H, t, *J*=7.33 Hz, H₃C-CH₂-CH₂); 5.02 (1H, s, OH); 6.65 (1H, d, *J*=8.59 Hz, arom. H₅); 7.34 (1H, d, *J*=8.59 Hz, arom. H₆);

Nebenprodukt: 1-(4-Methoxy-2,3-dimethylphenyl)-butan-1-on (VIII-4a)



Ausbeute: 10.57 g (51.24 mmol, 52 %), leicht beige bis farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 35-37 °C (Petrolether)

Molare Masse: 206.29 g/mol

Summenformel: C₁₃H₁₈O₂

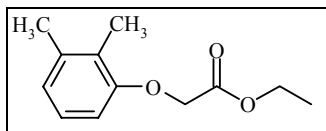
Elementaranalyse [%]: ber.: C 75.69, H 8.80; gef.: C 75.31, H 8.80;

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 0.97 (3H, t, *J*=7.33 Hz, H₃C-CH₂-CH₂); 1.72 (2H, sext, *J*=7.33 Hz, H₃C-CH₂-CH₂); 2.17 (3H, s, Ar-CH₃); 2.37 (3H, s, Ar-CH₃); 2.82 (2H, t, *J*=7.33 Hz, H₃C-CH₂-CH₂); 3.85 (3H, s, O-CH₃); 6.71 (1H, d, *J*=8.59 Hz, arom. H₅); 7.44 (1H, d, *J*=8.59 Hz, arom. H₆);

¹³C-NMR (100.61 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 11.70 (arom. C₂-CH₃); 13.88 (H₃C-CH₂-CH₂); 16.98 (arom. C₃-CH₃); 18.29 (H₃C-CH₂-CH₂); 43.95 (H₃C-CH₂-CH₂); 55.52 (O-CH₃); 106.57 (arom. C₅, CH); 126.61 (arom. *q*C₂, C-CH₃); 127.06 (arom. C₆, CH); 132.66 (arom. *q*C₁); 137.81 (arom. *q*C₃, C-CH₃); 159.33 (arom. *q*C₄); 205.04 (C=O);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 818 (s, zwei vicinale Ar-H); 1101, 1225 (s, C-O-R, =C-O-C.); 1569 (m, arom. C=C); 1670 (m, Ar-C=O); 2873, 2907, 2931, 2960 (m-w, C-H); 3005, 3092 (=C-H);

9.6.3.3 *Synthese von 2,3-Dimethylphenoxyessigsäureethylester (III-4a)*



Methode C3; Ansatz: 24.44 g (200 mmol) 2,3-Dimethylphenol, 22.44 g (200 mmol) Kalium-*tert*butylat, 66.8 g (400 mmol) Bromessigsäureethylester, 100 ml THF; das Rohprodukt wurde bei 200°C auf dem Ölbad im Vakuum destilliert. Bei 12 mbar ging das Produkt als farblose Flüssigkeit über und erstarrte bei kühler Lagerung zu einem farblosen Feststoff.

Ausbeute: 27.91 g (134 mmol, 67 %), farbloser Feststoff

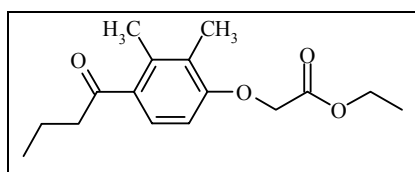
Schmelzpunkt: 32-34 °C

Molare Masse: 208.26 g/mol

Summenformel: C₁₂H₁₆O₃

Elementaranalyse: ber.: C 69.21, H 7.74; gef.: C 69.27, H 8.14;

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K): δ 1.28 (3H, t, $J=7.07$ Hz, H₃C-CH₂-O); 2.21 (3H, s, Ar-CH₃); 2.26 (3H, s, Ar-CH₃); 4.25 (2H, q, $J=7.07$ Hz, H₃C-CH₂-O); 4.60 (2H, s, O-CH₂-CO); 6.58 (1H, d, $J=7.90$ Hz, arom. H); 6.80 (1H, d, $J=7.90$ Hz, arom. H); 7.01 (1H, t, $J=7.90$ Hz, arom. H₅);

9.6.3.4 *Synthese von (4-Butyryl-2,3-dimethylphenoxy)-essigsäureethylester (III-4b)*

Methode B; Ansatz: 5.0 g (24 mmol) 2,3-Dimethylphenoxyessigsäureethylester (**III-4a**), 3.84 g (36 mmol) Buttersäurechlorid, 4.8 g (36 mmol) Aluminiumchlorid, 25 ml Dichlormethan; das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch auf Kieselgel 60 (Cyclohexan/Ethylacetat 9+1 V/V, isokratisch) gereinigt.

Ausbeute: 3.84 g (13.8 mmol, 57 %), leicht gelblich bis farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 55-56 °C (Cyclohexan/Ethylacetat)

Molare Masse: 279.35 g/mol

Summenformel: C₁₆H₂₂O₄

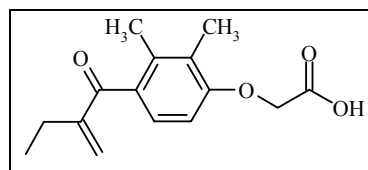
Elementaranalyse [%]: ber.: C 69.04, H 7.97; gef.: C 68.93, H 7.64;

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 0.97 (3H, t, *J*=7.33 Hz, H₃C-CH₂-CH₂); 1.30 (3H, t, *J*=7.07 Hz, H₃C-CH₂-O); 1.71 (2H, sext, *J*=7.33 Hz, H₃C-CH₂-CH₂); 2.25 (3H, s, Ar-CH₃); 2.36 (3H, s, Ar-CH₃); 2.80 (2H, t, *J*=7.33 Hz, H₃C-CH₂-CH₂); 4.27 (2H, q, *J*=7.07 Hz, H₃C-CH₂-O); 4.66 (2H, s, O-CH₂-CO); 6.58 (1H, d, *J*=8.59 Hz, arom. H₆); 7.37 (1H, d, *J*=8.59 Hz, arom. H₅);

¹³C-NMR (100.61 MHz, CDCl₃, 300 K): δ 11.90 (arom. C₂-CH₃); 13.82 (H₃C-CH₂-CH₂); 14.14 (H₃C-CH₂-O); 16.96 (arom. C₃-CH₃); 18.14 (H₃C-CH₂-CH₂); 44.06 (H₃C-CH₂-CH₂); 61.36 (H₃C-CH₂-O); 65.62 (O-CH₂-CO); 107.69 (arom. C₆, CH); 126.58 (arom. C₅, CH); 127.29 (arom. *q*C₂, C-CH₃); 133.78 (arom. *q*C₄); 138.09 (arom. *q*C₃, C-CH₃); 157.44 (arom. *q*C₁); 168.70 (O-CH₂-C=O); 205.19 (Ar-C=O);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 812 (zwei vicinale Ar-H); 1121 (s, =C-O-C + CO₂R, C-O-R); 1205 (CO₂R, C-O-R); 1571 (m, arom. C=C); 1670 (m, Ar-C=O); 1754 (s, CO₂R, C=O); 2853, 2922, 2959 (m-w, C-H);

9.6.3.5 *Synthese von [2,3-Dimethyl-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-essigsäure (V-4a)*



Methode D3; Ansatz: 0.85 g (3 mmol) (4-Butyryl-2,3-dimethylphenoxy)-essigsäureethyl-ester (**III-4b**), 500 μ l 40 %ige Formaldehydlösung (6.66 mmol Formaldehyd), 0.5 g (3.6 mmol) Kaliumcarbonat; Reaktionsdauer: nach 85 min ist der Ester hydrolysiert, die Aldolkondensation dauert 8 h; der Versuch, das Produkt aus Methylcyclohexan umzukristallisieren, scheiterte. Das Rohprodukt wurde chromatographisch auf einer präparativen Symmetry-Säule gereinigt. Es wurde ein Methanol-Wasser-Gradient (45 % \rightarrow 75 % \rightarrow 90 % Methanol) verwendet. Die Flussrate betrug 12 ml/min.

Ausbeute: 116 mg (0.44 mmol, 15 %), farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 78-79 °C (Methanol/Wasser) [Lit. ^[37]: 83.5-84.5°C]

Molare Masse: 262.31 g/mol

Summenformel: C₁₅H₂₈O₄

Elementaranalyse [%]: ber.: C 68.69, H 6.92; gef.: C 68.50, H 7.05;

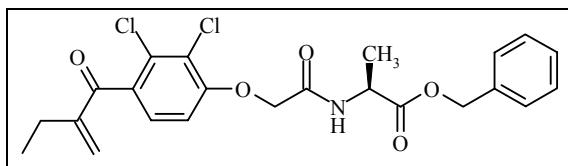
¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K): δ 1.13 (3H, t, $J=7.33$ Hz, H₃C-CH₂); 2.19 (3H, s, Ar-CH₃); 2.21 (3H, s, Ar-CH₃); 2.46 (2H, q, $J=7.33$ Hz, H₃C-CH₂); 4.65 (2H, s, O-CH₂-CO); 5.20 (1H, s, CO₂H); 5.57 (1H, s, =CH₂); 5.85 (1H, s, =CH₂); 6.58 (1H, d, $J=8.34$ Hz, arom. H₆); 7.04 (1H, d, $J=8.34$ Hz, arom. H₅);

¹³C-NMR (100.61 MHz, CDCl₃, 300 K): δ 11.78 (arom. C₂-CH₃); 12.54 (H₃C-CH₂); 17.13 (arom. C₃-CH₃); 23.77 (H₃C-CH₂); 65.49 (O-CH₂-); 107.88 (arom. C₆, CH); 126.54 (arom. C₅, CH); 126.67 (arom. qC₂, C-CH₃); 127.64 (qC=CH₂); 133.78 (arom. qC₄); 136.92 (arom. qC₃, C-CH₃); 151.42 (qC=CH₂); 156.53 (arom. qC₁); 172.90 (CO₂H); 200.80 (Ar-C=O);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 792 (m, zwei vicinale Ar-H); 1125, 1246 (s, Ar-O-C); 1579 (m, arom. C=C); 1651 (m, Ar-C=O); 1725 (s, C=O, CO₂H); 2875, 2785, 2959 (w, C-H); 2916 (w, br, O-H, CO₂H); 3038 (w, =C-H);

9.7 Synthesen der Etacrynsäure-Amide

9.7.1 Synthese von (S)-2-{2-[2,3-Dichlor-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-acetyl-amino}-propionsäurebenzylester (VI-1a)



Methode E2; Ansatz: 356 mg (1.65 mmol) *L*-Alanin-*O*-Benzylester, Hydrochlorid; Reaktionsdauer 3 d; das Produkt wurde säulenchromatographisch auf Kieselgel 60 (Cyclohexan/Ethylacetat 1+1 V/V, isokratisch) gereinigt.

Ausbeute: 707 mg (1.52 mmol, 92 %), farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 59-61 °C (Ethylacetat)

Drehwert: $\alpha_D^{25} = -11.89^\circ$ (Methanol, $c = 0.90$ g/100 ml)

Molare Masse: 464.35 g/mol

Summenformel: $C_{23}H_{23}Cl_2NO_5$

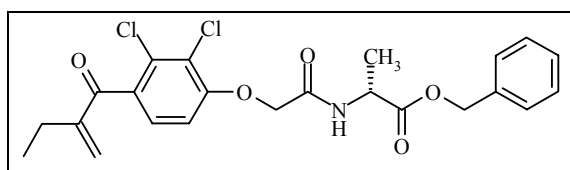
Elementaranalyse [%]: ber.: C 59.49, H 4.99, N 3.02; gef.: C 59.61, H 5.04, N 2.98;

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): δ 1.15 (3H, t, $J=7.32$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2$); 1.51 (3H, d, $J=7.32$ Hz, Ala- CH_3); 2.48 (2H, q, $J=7.33$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2$ -); 4.58 (2H, dd, $J=2.02$ Hz, $J=14.40$ Hz, -O- CH_2 -); 4.73 (1H, q, $J=7.32$ Hz, Ala- CH); 5.21 (2H, dd, $J=2.28$ Hz, $J=12.25$ Hz, Benzyl- CH_2); 5.58 (1H, s, = CH_2); 5.95 (1H, s, = CH_2); 6.85 (1H, d, $J=8.47$ Hz, arom. H_6); 7.17 (1H, d, $J=8.47$ Hz, arom. H_5); 7.32-7.40 (6H, m, Benzyl- CH , NH);

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): δ 12.41 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2$); 18.39 (Ala- CH_3); 23.43 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2$ -); 48.04 (Ala- CH); 67.37 (Benzyl- CH_2); 68.19 (-O- $\text{CH}_2\text{-CO-}$); 110.98 (arom. C_6 , CH); 123.22 (arom. $\text{C}_{2/3}$, C-Cl); 127.15 (arom. C_5 , CH); 128.23 (arom. Benzyl- CH); 128.56 (arom. Benzyl- CH); 128.69 (C= CH_2); 131.55 (arom. $\text{C}_{2/3}$, C-Cl); 134.30 (arom. $q\text{C}_4$); 135.19 (arom. Benzyl- $q\text{C}_1$); 150.23 (C= CH_2); 154.56 (arom. $q\text{C}_1$); 166.34 (-CO-NH); 172.04 (-CO-O-Benzyl); 195.56 (-CO-Ar);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 696, 731 (m, monosubst. Aromat); 1079 (w, Ar-Cl); 1203, 1250 (m-s, CO₂R, C-O); 1466 (m, arom. C=C); 1550 (m, CO-NH); 1584 (m, C=C-C=O); 1663 (s, C=C-C=O); 1739 (m-s, CO₂R, C=O); 2826, 2938, 2961 (w, C-H); 3032, 3098 (w, =C-H); 3304 (w, br, N-H);

9.7.2 Synthese von (*R*)-2-{2-[2,3-Dichlor-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-acetyl-amino}-propionsäurebenzylester (VI-1b)



Methode E2; Ansatz: 590 mg (1.65 mmol) *D*-Alanin-*O*-Benzylester, *p*-Toluolsulfonsäuresalz; Reaktionsdauer 7d; das Produkt wurde säulenchromatographisch auf Kieselgel 60 (Cyclohexan/Ethylacetat 1+1 V/V, isokratisch) gereinigt.

Ausbeute: 203 mg (0.52 mmol, 31 %), leicht gelbliche Flüssigkeit

Drehwert: $\alpha_D^{25} = +11.95^\circ$ (Methanol, $c = 2.18$ g/100 ml)

Molare Masse: 464.35 g/mol

Summenformel: C₂₃H₂₃Cl₂NO₅

Elementaranalyse [%]: ber.: C 59.49, H 4.99, N 3.02; gef.: C 59.54, H 5.19, N 3.15;

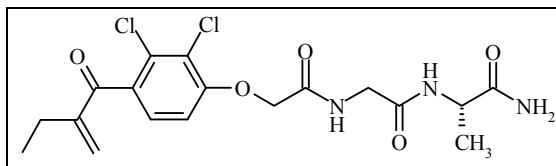
HR-EI-MS (70 eV, m/z, [M]⁺): ber.: 428.1259; gef.: 428.1261

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 1.15 (3H, t, $J=7.33$ Hz, H₃C-CH₂); 1.51 (3H, d, $J=7.33$ Hz, Ala-CH₃); 2.48 (2H, q, $J=7.33$ Hz, H₃C-CH₂); 4.58 (dd, $J=2.02$ Hz, $J=14.40$ Hz, O-CH₂-CO-NH); 4.73 (1H, q, $J=7.07$ Hz, $J=7.33$ Hz, Ala-CH); 5.21 (dd, $J=2.28$ Hz, $J=12.25$ Hz, Benzyl-CH₂); 5.58 (1H, s, C=CH₂); 5.95 (1H, s, C=CH₂); 6.85 (1H, d, $J=8.46$ Hz, arom. H₆), 7.17 (1H, d, $J=8.46$ Hz, arom. H₅); 7.34-7.40 (6H, m, Benzyl-CH, NH);

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ 12.40 ($\text{H}_3\text{C-CH}_2$); 18.39 (Ala- CH_3); 23.42 ($\text{H}_3\text{C-CH}_2$); 48.02 (Ala-CH); 67.26 (Benzyl- CH_2); 68.18 (O- $\text{CH}_2\text{-CO-NH}$); 110.96 (arom. C_6 , CH); 123.71 (arom. $q\text{C}_3$, C-Cl oder arom. $q\text{C}_4$); 127.13 (arom. C_5 , CH); 128.21 (arom. Benzyl-CH); 128.55 (arom. Benzyl-CH); 128.67 ($q\text{C-CH}_2$); 131.54 (arom. $q\text{C}_3$, C-Cl oder arom. $q\text{C}_4$); 134.29 (arom. $q\text{C}_2$, C-Cl); 135.17 (arom. $q\text{C}_1$, Benzyl); 150.21 ($q\text{C=CH}_2$); 154.53 (arom. $q\text{C}_1$); 166.31 (O- $\text{CH}_2\text{-CO-NH}$); 172.02 (Ala-CO); 195.54 (Ar-CO);

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 697, 733$ (m, monosubst. Aromat); 1058 (s, Ar-Cl); 1203, 1259 (m-s, CO_2R , C-O); 1468 (m, arom. C=C); 1524 (m, CO-NH); 1585 (m, C=C-C=O); 1665 (s, C=C-C=O); 1740 (m-s, CO_2R , C=O); 2880, 2936, 2968 (w, C-H); 3034, 3068 (w, =C-H); 3307 (w, br, N-H);

9.7.3 Synthese von (*S*)-2-(2-{2-[2,3-Dichlor-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-acetyl-amino}-acetylamino)-propionamid (VI-1c)



Methode E1; Ansatz: 545 mg (3 mmol) (*S*)-H-Gly-Ala-NH₂, Hydrochlorid; das Produkt wurde säulenchromatographisch auf Kieselgel 60 (Chloroform/Methanol 9+1 V/V, isokratisch) gereinigt.

Ausbeute: 140 mg (0.33 mmol, 22 %), farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 177-179 °C (Chloroform)

Drehwert: $\alpha_D^{25} = -10.30^\circ$ (Methanol, $c = 1.00$ g/100 ml)

Molare Masse: 430.29 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_5$

Elementaranalyse [%]: ber.: C 50.25, H 4.92, N 9.77; gef.: C 50.32, H 4.98, N 9.59;

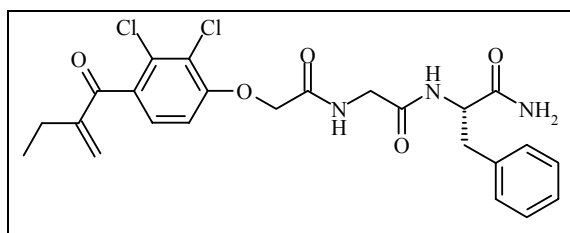
HR-ESI-MS (m/z , $[\text{M}+\text{H}]^+$): ber.: 430.0937; gef.: 430.0926

¹H-NMR (400.13 MHz, DMSO-d₆, 300 K): δ 1.07 (3H, t, *J*=7.33 Hz, H₃C-CH₂-C); 1.19 (3H, d, *J*=7.07 Hz, Ala-CH₃, 2.36 (2H, q, *J*=7.33 Hz, H₃C-CH₂-C); 3.81 (2H, m, *J*=5.56 Hz, *J*=11.00 Hz, Gly-CH₂); 4.21 (1H, quin, *J*=7.07 Hz, *J*=7.45 Hz Ala-CH); 4.78 (2H, s, O-CH₂-CO); 5.56 (1H, s, H-C=C); 6.06 (1H, s, H-C=C); 7.00 (1H, s, CO-NH₂); 7.14 (1H, d, *J*=8.72 Hz, arom. H₆); 7.30 (1H, s, CO-NH₂); 7.32 (1H, d, *J*=8.72 Hz, arom. H₅); 8.06 (1H, d, *J*=7.45 Hz, CO-NH-Ala); 8.18 (1H, t, *J*=5.56 Hz, CO-NH-Gly)

¹³C-NMR (100.61 MHz, DMSO-d₆, 300 K): δ 12.41 (H₃C-CH₂); 18.23 (Ala-CH₃); 22.98 (H₃C-CH₂); 41.85 (Gly-CH₂); 48.02 (Ala-CH); 67.81 (O-CH₂-CO); 112.14 (arom. C₆, CH); 121.20 (arom. *q*C₄ oder *q*C₃, C-Cl); 127.58 (arom. C₅, CH); 129.41 (arom. *q*C₂, C-Cl); 129.54 (H₂C=C); 132.63 (arom. *q*C₄ oder *q*C₃, C-Cl); 149.40 (C=CH₂); 155.36 (arom. *q*C₁); 167.02 (O-CH₂-CO); 167.90 (Gly-CO-NH); 174.14 (Ala-CO-NH₂); 195.21 (Ar-CO)

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 1464 (m, arom. C=C); 1552 (m, CO-NH); 1584 (m, C=C-C=O); 1638 (s, C=C-C=O); 1680 (m, C=O-NH); 2810, 2934 (w, C-H); 3074 (w, =C-H); 3208 (w, NH₂); 3315 (m, br, N-H); 3418 (w, NH₂);

9.7.4 Synthese von (*S*)-2-(2-{2-[2,3-Dichlor-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-acetylamino}-acetylamino)-3-phenylpropionamid (VI-1d)



Methode E2; Ansatz: 425 mg (1.65 mmol) (*S*)-H-Gly-Phe-NH₂, Hydrochlorid; Reaktionsdauer 4 d; das Produkt wurde säulenchromatographisch auf Kieselgel 60 (Chloroform/Methanol 9+1 V/V, isokratisch) gereinigt.

Ausbeute: 457 mg (0.9 mmol, 55 %), farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 146-148 °C (Methanol)

Drehwert: $\alpha_D^{25} = + 7.27^\circ$ (Methanol, $c = 1.10$ g/100 ml)

Molare Masse: 506.36 g/mol

Summenformel: $C_{24}H_{25}Cl_2N_3O_5$

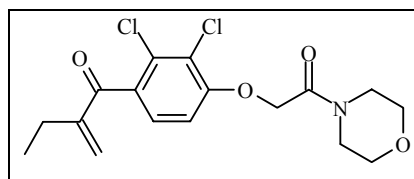
HR-ESI-MS (m/z, [M+H]⁺): ber.: 506.1250; gef.: 506.1258

¹H-NMR (400.13 MHz, DMSO-d₆, 300 K): δ 1.07 (3H, t, $J=7.33$ Hz, H_3C-CH_2); 2.36 (2H, q, $J=7.33$ Hz, H_3C-CH_2); 2.76 (1H, m, $J=13.64$ Hz, Phe- CH_2); 3.02 (1H, m, $J=13.64$ Hz, Phe- CH_2); 3.67 (1H, dd, $J=5.56$ Hz, $J=16.65$ Hz, Gly- CH_2); 3.83 (1H, dd, $J=5.56$ Hz, $J=16.65$ Hz, Gly- CH_2); 4.44 (1H, m, $J=4.30$ Hz, $J=4.80$ Hz, Phe-CH); 4.75 (2H, s, O- CH_2-CO); 7.09 (1H, s, Phe- NH_2); 7.12 (1H, d, $J=8.59$ Hz, arom. H_6); 7.14-7.26 (5H, m, arom. H (Phe)); 7.30 (1H, d, $J=8.59$ Hz, arom. H_5); 7.43 (1H, s, Phe- NH_2); 8.11 (1H, d, $J=5.56$ Hz, Gly- NH); 8.14 (1H, d, $J=8.34$ Hz, Phe- NH);

¹³C-NMR (100.61 MHz, DMSO-d₆, 300 K): δ 12.32 (H_3C-CH_2); 22.89 (H_3C-CH_2); 37.54 (Phe- CH_2); 41.67 (Gly- CH_2); 53.78 (Phe-CH); 67.75 (O- CH_2-CO); 112.04 (arom. C_6 , CH); 121.09 (arom. qC_4); 126.19 (arom. C_4 , Phe-CH); 127.48 (arom. C_5 , CH); 128.01 (arom. Phe-CH); 129.08 (arom. Phe-CH); 129.30 (arom. qC_3 , C-Cl); 129.40 (C= CH_2); 132.53 (arom. qC_2 , C-Cl); 137.91 (arom. qC_1); 149.30 ($qC=CH_2$); 155.28 (arom. qC_1); 166.86 (O- CH_2-CO); 168.00 (Gly-CO); 172.75 (Phe-CO); 195.07 (Ar-CO);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu} = 1466$ (w, arom. C=C); 1522, 1552 (w, CO-NH); 1584 (m, $\underline{C=C-C=O}$); 1644 (s, C=C-C \equiv O); 1669 (s, C \equiv O-NH); 2939 (w, C-H); 3074 (w, =C-H); 3208 (w, NH_2); 3315 (w-m, br, N-H); 3418 (w, NH_2);

9.7.5 Synthese von Etacrynsäure-morpholinamid (VI-1e)



IUPAC: 1-[2,3-Dichlor-4-(2-morpholin-4-yl-2-oxo-ethoxy)-phenyl]-2-methylenbutan-1-on

Methode E2; Ansatz: 144 mg (1.65 mmol) Morpholin; Reaktionsdauer: 23 d; das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch auf Kieselgel 60 (100 % Ethylacetat) gereinigt.

Ausbeute: 468 mg (1.26 mmol, 74 %), farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 113-115 °C (Ethylacetat)

Molare Masse: 372.25 g/mol

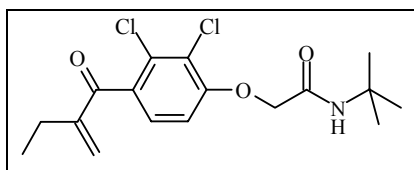
Summenformel: C₁₇H₁₉Cl₂NO₄

Elementaranalyse [%]: ber.: C 54.85, H 5.14, N 3.76; gef.: C 55.25, H 5.30, N 3.99;

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 1.15 (3H, t, *J*=7.46 Hz, H₃C-CH₂); 2.47 (2H, q, *J*=7.46 Hz, H₃C-CH₂); 3.66 (8H, m, Morpholin-CH₂-); 4.83 (2H, s, O-CH₂-CO-); 5.60 (1H, s, C=CH₂); 5.94 (1H, s, C=CH₂); 6.98 (1H, d, *J*=8.47 Hz, arom. H₆); 7.15 (1H, d, *J*=8.47 Hz, arom. H₅);

¹³C-NMR (100.61 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 12.40 (H₃C-CH₂); 23.43 (H₃C-CH₂); 42.60 (Morpholin-CH₂); 46.10 (Morpholin-CH₂); 66.79 (Morpholin-CH₂); 68.68 (O-CH₂-CO); 110.71 (arom. C₆, CH); 122.81 (arom. *q*C₂, C-Cl oder arom. *q*C₄); 127.09 (arom. C₅, CH); 128.64 (C=CH₂); 131.46 (arom. *q*C₃, C-Cl); 133.86 (arom. *q*C₂, C-Cl oder arom. *q*C₄); 150.21 (*q*C=CH₂); 155.10 (arom. *q*C₁); 165.29 (O-CH₂-CO); 195.73 (Ar-CO);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 1035, 1082 (m, Ar-Cl); 1240 (s, Ar-O-CH₂); 1476 (m, arom. C=C); 1587 (m, C=C-C=O); 1654 (s, C=C-C=O + C=O-NR₂); 2867, 2928, 2957 (w, C-H);

9.7.6 Synthese von Etacrynsäure-*tert*butylamid (VI-1f)

IUPAC: *N-tert*Butyl-2-[2,3-dichlor-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]acetamid

Methode E2; Ansatz: 479 mg (1.58 mmol) Etacrynsäure, 116 mg (1.58 mmol) *tert*Butylamin; Reaktionsdauer 22 d; das Produkt wurde säulenchromatographisch auf Kieselgel 60 (Cyclohexan/Ethylacetat 1+1 V/V, isokratisch) gereinigt.

Ausbeute: 397 mg (1.1 mmol, 70 %), farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 94-96 °C (Cyclohexan/Ethylacetat)

Molare Masse: 358.27 g/mol

Summenformel: C₁₇H₂₁Cl₂NO₃

Elementaranalyse [%]: ber.: C 56.99, H 5.91, N 3.91; gef.: C 57.11, H 5.99, N 3.98;

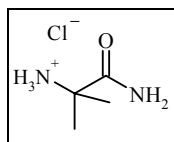
¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 1.15 (3H, t, *J*=7.45 Hz, H₃C-CH₂); 1.43 (9H, s, C-(CH₃)₃); 2.48 (2H, q, *J*=7.45 Hz, H₃C-CH₂); 4.45 (2H, s, O-CH₂-CO-); 5.58 (1H, s, H₂C=C-); 5.95 (1H, s, H₂C=C); 6.66 (1H, s, NH); 6.85 (1H, d, *J*=8.47 Hz, arom. H₆); 7.19 (1H, d, *J*=8.47 Hz, arom. H₅);

¹³C-NMR (100.61 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 12.41 (H₃C-CH₂); 23.44 (H₃C-CH₂); 28.74 (qC(CH₃)₃); 51.47 (qC(CH₃)₃); 68.46 (O-CH₂-CO); 110.95 (arom. C₆, CH); 122.89 (arom. qC₄ oder arom. qC₂, C-Cl); 127.26 (arom. C₅, CH); 128.64 (qC=CH₂); 131.47 (arom. qC₃, C-Cl); 134.10 (arom. qC₄ oder arom. qC₂, C-Cl); 150.25 (qC=CH₂); 154.59 (arom. qC₁); 165.63 (O-CH₂-CO); 195.55 (Ar-CO);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 1082 (m, Ar-Cl); 1264 (m Ar-O-CH₂); 1466 (m, arom. C=C); 1567 (m, C=C-C=O); 1658 (s, C=C-C=O); 2792, 2929, 2965 (w, C-H); 3088 (w, =C-H); 3265 (w, br, N-H);

9.7.7 2-{2-[2,3-Dichlor-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]acetylamino}-2-methylpropionamid (VI-1g)

9.7.7.1 Synthese von 2-Methylalaninamid, Hydrochlorid (X-g)



IUPAC: 2-Amino-2-methylpropionsäureamid, Hydrochlorid

2.03 g (10 mmol) *tert*Butyloxycarbonyl-aminoisobuttersäure und 1.15 g (10 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid werden in 10 ml Dichlormethan gelöst. Man muss ggf. etwas erwärmen. Zu dieser Lösung werden 2.06 g (10 mmol) DCC portionsweise zugegeben (Vorsicht, schäumt!) und über Nacht unter Stickstoffatmosphäre bei RT rühren gelassen. Man filtriert ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab und fügt dem Filtrat 5 ml einer gesättigten Lösung von Ammoniak in Methanol hinzu. Man lässt 3 d bei RT rühren und filtriert das ausgefallene *N*-Hydroxysuccinimid ab. Das Filter wird mit Dichlormethan gewaschen und die Waschfraktionen mit dem Filtrat vereinigt. Man kühlt die Lösung im Eisbad und leitet Chlorwasserstoff-Gas ein. Dabei wird die *tert*Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe abgespalten und das Produkt scheidet sich als Hydrochlorid ab. Das Salz wird abgesaugt, mit Dichlormethan gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 1.0 g (7.22 mmol, 72 %), farbloser Feststoff

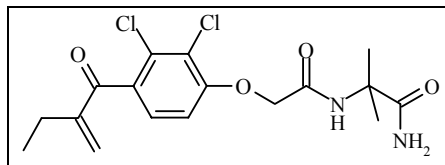
Schmelzpunkt: 238 °C (Zers.) (Dichlormethan) [Lit. ^[119]: 245-247 °C (Ethanol)]

Molare Masse: 138.60 g/mol

Summenformel: C₄H₁₁N₂ClO

¹H-NMR (400.13 MHz, DMSO-d₆, 300 K): 1.45 (6 H, s, 2x CH₃); 7.48 (1H, s, CO-NH); 7.81 (1H, s, CO-NH); 8.23 (3H, s, -NH₃⁺);

9.7.7.2 *Synthese von 2-{2-[2,3-Dichlor-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-acetyl-amino}-2-methylpropionamid (VI-1g)*



Methode E2; Ansatz: 229 mg (1.65 mmol) 2-Methylalaninamid, Hydrochlorid (**IX-g**); Reaktionsdauer 6 d; das Produkt wurde säulenchromatographisch auf Kieselgel 60 (Cyclohexan/Ethylacetat 1+9 V/V, isokratisch) gereinigt. Dabei konnte ein Gemisch aus Edukt und Produkt erhalten werden. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in 10 ml Ethylacetat aufgenommen. Die organische Lösung wurde 3mal mit 5 ml gesättigter Kaliumcarbonat-Lösung ausgeschüttelt. Nach Trocknen mit Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 170 mg (0.44 mmol, 27 %), farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 157-158 °C (Ethylacetat)

Molare Masse: 387.27 g/mol

Summenformel: C₁₇H₂₀Cl₂N₂O₄

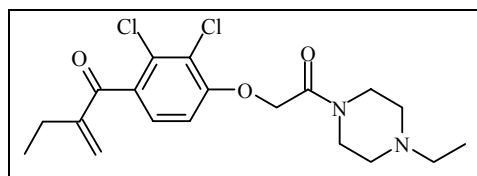
Elementaranalyse [%]: ber.: C 52.73, H 5.21, N 7.23; gef.: C 53.06, H 5.52, N 6.83;

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 1.15 (3H, t, *J*=7.47 Hz, H₃C-CH₂); 1.67 (6H, s, C-(CH₃)₂); 2.47 (2H, q, *J*=7.47 Hz, H₃C-CH₂); 4.54 (2H, s, O-CH₂-CO-); 5.58 (1H, s, C=CH₂); 5.63 (1H, s, CO-NH₂); 5.95 (1H, s, C=CH₂); 6.44 (1H, s, CO-NH₂); 6.87 (1H, d, *J*=8.49 Hz, arom. H₆); 7.19 (1H, d, *J*=8.49 Hz, arom. H₅); 7.45 (1H, s, CO-NH-);

¹³C-NMR (100.61 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 12.38 (H₃C-CH₂); 23.40 (H₃C-CH₂); 25.16 (C-(CH₃)₂); 57.25 (*q*C-(CH₃)₂); 68.24 (O-CH₂-CO); 110.90 (arom. C₆, CH); 123.04 (arom. *q*C₂, C-Cl oder *q*C₄); 127.16 (arom. C₅, CH); 128.73 (=CH₂); 131.54 (arom. *q*C₃, C-Cl); 134.28 (arom. *q*C₂, C-Cl oder *q*C₄); 150.17 (*q*C=CH₂); 154.37 (arom. *q*C₁); 166.59 (O-CH₂-CO); 176.08 (CO-NH₂); 195.53 (Ar-CO);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 1078 (m, Ar-Cl); 1246 (m Ar-O-CH₂); 1470 (m, arom. C=C); 1545 (m, CO-N-H); 1587 (m, C=C-C=O); 1662 (s, C=C-C=O, C=O-N-H); 2853, 2934 (w, C-H); 3071 (w, =C-H); 3283, 3422 (m, br, N-H);

9.7.8 Synthese von Etacrynsäure-(*N*-ethyl-piperazin)-amid (VI-1h)



IUPAC: 1-{2,3-Dichloro-4-[2-(4-ethylpiperazin-1-yl)-2-oxo-ethoxy]-phenyl}-2-methylenbutan-1-on

Methode E2; Ansatz: 377 mg (3.30 mmol) *N*-Ethylpiperazin; Reaktionsdauer 21 d; das Produkt wurde säulenchromatographisch auf Kieselgel 60 (Chloroform/Methanol 19+1 V/V, isokratisch) gereinigt.

Ausbeute: 138 mg (0.35 mmol, 21 %), farbloser, wachsartiger Feststoff

Schmelzpunkt: 71-73 °C (Chloroform/Methanol)

Molare Masse: 399.32 g/mol

Summenformel: C₁₉H₂₄Cl₂N₂O₃

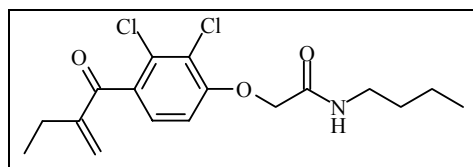
HR-EI-MS (70 eV, m/z, [M]⁺): ber.: 398.1164; gef.: 398.1165

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 1.09 (3H, t, $J=7.20$ Hz, N-CH₂-CH₃); 1.15 (3H, t, $J=7.33$ Hz, H₃C-CH₂); 2.40-2.50 (8H, m, H₃C-CH₂-N-CH₂; H₃C-CH₂, H₃C-CH₂-N-CH₂); 3.65 (4H, t, $J=5.05$ Hz, CO-N-CH₂); 4.83 (2H, s, O-CH₂-CO); 5.60 (1H, s, qC=CH₂); 5.94 (1H, s, qC=CH₂); 6.97 (1H, d, $J=8.59$ Hz, arom. H₆); 7.15 (1H, d, $J=8.59$ Hz, arom. H₅);

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): δ 11.89 (N- $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 12.41 ($\text{H}_3\text{C-CH}_2$); 23.44 ($\text{H}_3\text{C-CH}_2$); 42.24 (CO-N- CH_2); 45.47 (CO-N- CH_2); 52.18 ($\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-N}$); 52.30 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-CH}_2\text{-CH}_3$); 52.94 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-CH}_2\text{-CH}_3$); 68.74 (O- $\text{CH}_2\text{-CO}$); 110.80 (arom. C_6 , CH); 122.85 (arom. $q\text{C}_4$ oder $q\text{C}_2$, C-Cl); 127.07 (arom. C_5 , CH); 128.59 ($q\text{C}=\text{CH}_2$); 131.39 (arom. $q\text{C}_3$, C-Cl); 133.70 (arom. $q\text{C}_4$ oder $q\text{C}_2$, C-Cl); 150.24 ($q\text{C}=\text{CH}_2$); 155.32 (arom. $q\text{C}_1$); 165.06 (O- $\text{CH}_2\text{-CO}$); 195.82 (Ar-CO);

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ = 1016 (m, Ar-Cl); 1239 (m-s, Ar-O- CH_2); 1474 (m, arom. C=C); 1583 (m, $\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{O}$); 1649 (s, $\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{O}$); 2809, 2853, 2932, 2967 (m, C-H); 3087 (w, =C-H);

9.7.9 Synthese von Etacrynsäure-*n*-butylamid (VI-1i)



IUPAC: *N*-Butyl-2-[2,3-dichlor-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-acetamid

Methode E2; Ansatz: 120.6 mg (1.65 mmol) *n*-Butylamin; Reaktionsdauer 20 d; das Produkt wurde säulenchromatographisch auf Kieselgel 60 (Cyclohexan/Ethylacetat 1+1 V/V, isokratisch) gereinigt. Da noch Dicyclohexylharnstoff enthalten war, wurde das Produkt in wenig Ethylacetat aufgelöst und filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt getrocknet.

Ausbeute: 429 mg (1.20 mmol, 73 %), farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 95-96 °C (Ethylacetat)

Molare Masse: 358.27 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{Cl}_2\text{NO}_3$

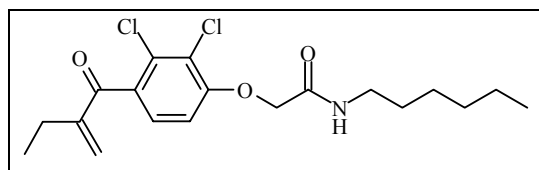
Elementaranalyse [%]: ber.: C 56.99, H 5.91, N 3.91; gef.: C 57.15, H 5.97, N 4.00;

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 0.96 (3H, t, *J*=7.33 Hz, CH₂-CH₂-CH₃); 1.15 (3H, t, *J*=7.46 Hz, H₃C-CH₂); 1.40 (2H, sext., *J*=7.33 Hz, CH₂-CH₂-CH₃); 1.57 (2H, quin., *J*=7.08 Hz, *J*=7.33 Hz, CH₂-CH₂-CH₃); 2.48 (2H, q, *J*=7.46 Hz, H₂C-CH₂); 3.39 (2H, q, *J*=7.07 Hz, NH-CH₂); 4.57 (2H, s, O-CH₂-CO); 5.59 (1H, s, C=CH₂); 5.96 (1H, s, C=CH₂); 6.76 (1H, s, NH); 6.87 (1H, d, *J*=8.59 Hz, arom. H₆); 7.19 (1H, d, *J*=8.59 Hz, arom. H₅);

¹³C-NMR (100.61 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 12.41 (H₃C-CH₂); 13.70 (CH₂-CH₂-CH₃); 20.01 (CH₂-CH₂-CH₃); 23.43 (H₃C-CH₂); 31.49 (CH₂-CH₂-CH₃); 38.91 (NH-CH₂); 68.27 (O-CH₂-CO); 110.93 (arom. C₆, CH); 122.94 (arom. qC₄); 127.26 (arom. C₅, CH); 128.68 (qC=CH₂); 131.51 (arom. qC₃, C-Cl); 134.19 (arom. qC₂, C-Cl); 150.24 (qC=CH₂); 154.57 (arom. qC₁); 166.54 (O-CH₂-CO); 195.52 (Ar-CO);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 1091 (m, Ar-Cl); 1244 (m-s, Ar-O-CH₂); 1468 (m, arom. C=C); 1555 (m-s, CO-N-H); 1586 (m, C=C-C=O); 1660 (s, C=C-C=O); 2872, 2936, 2958 (m, C-H); 3078 (w, =C-H); 3292 (m, br, N-H);

9.7.10 Synthese von Etacrynsäure-*N*-hexylamid (VI-1j)



IUPAC: 2-[2,3-Dichloro-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-*N*-hexyl-acetamid

Methode E2; Ansatz: 167 mg (1.65 mmol) *N*-Hexylamin; Reaktionsdauer 25 d; das Produkt wurde säulenchromatographisch auf Kieselgel 60 (Cyclohexan/Ethylacetat 1+1 V/V, isokratisch) gereinigt. Da noch Dicyclohexylharnstoff enthalten war, wurde das Produkt in wenig Ethylacetat aufgelöst und filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt getrocknet.

Ausbeute: 577 mg (1.49 mmol, 91 %), farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 63-65 °C (Ethylacetat)

Molare Masse: 386.32 g/mol

Summenformel: C₁₉H₂₅Cl₂NO₃

Elementaranalyse [%]: ber.: C 59.07, H 6.52, N 3.63; gef.: C 59.38, H 6.62, N 3.79;

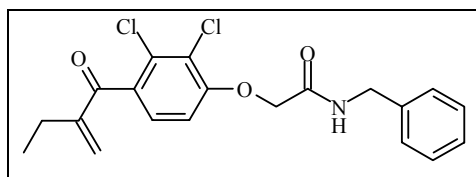
HR-EI-MS (70 eV, m/z, [M]⁺): ber.: 385.1206; gef.: 385.1206

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 0.90 (3H, t, *J*=6.82 Hz, CH₂-CH₂-CH₃); 1.15 (3H, t, *J*=7.46 Hz, H₃C-CH₂); 1.29-1.40 (6H, m, NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃); 1.58 (2H, quin., *J*=6.74 Hz, *J*=7.33 Hz, NH-CH₂-CH₂); 2.47 (2H, q, *J*=7.46, H₃C-CH₂); 3.38 (2H, q, *J*=6.74 Hz, NH-CH₂-CH₂); 4.57 (2H, s, O-CH₂-CO); 5.59 (1H, s, qC=CH₂); 5.96 (1H, s, qC=CH₂); 6.78 (1H, s, NH); 6.87 (1H, d, *J*=8.47 Hz, arom. H₆); 7.19 (1H, d, *J*=8.47 Hz, arom. H₅);

¹³C-NMR (100.61 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 12.42 (CH₃-CH₂-C=CH₂); 13.99 (CH₃-CH₂-CH₂); 22.56 (CH₃-CH₂-CH₂-); 23.44 (CH₃-CH₂-C=CH₂); 26.50 (NH-CH₂-CH₂-CH₂); 29.39 (NH-CH₂-CH₂); 31.41 (CH₃-CH₂-CH₂-); 39.19 (NH-CH₂-CH₂); 68.27 (O-CH₂-CO); 110.92 (arom. C₆, CH); 122.93 (arom. qC₄ oder arom. qC₂; C-Cl); 127.27 (arom. C₅, CH); 128.66 (qC=CH₂); 131.50 (arom. qC₃, C-Cl); 134.18 (arom. qC₄ oder arom. qC₂; C-Cl); 150.24 (qC=CH₂); 154.58 (arom. qC₁); 166.52 (O-CH₂-CO-); 195.50 (Ar-CO-);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 1092 (m, Ar-Cl); 1252 (m-s, Ar-O-CH₂); 1468 (m, arom. C=C); 1555 (m-s, CO-N-H); 1586 (m, C=C-C=O); 1661 (s, C=C-C=O); 2857, 2929 (m, C-H); 3090 (w, =C-H); 3301 (m, br, N-H);

9.7.11 Synthese von Etacrynsäure-benzylamid (VI-1k)



IUPAC: *N*-Benzyl-2-[2,3-dichlor-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-acetamid

Methode E2; Ansatz: 177 mg (1.65 mmol) Benzylamin; Reaktionsdauer 7 d; das Produkt wurde säulenchromatographisch auf Kieselgel 60 (Cyclohexan/Ethylacetat 7+3 V/V, isokratisch) gereinigt und aus Cyclohexan umkristallisiert.

Ausbeute: 460 mg (1.17 mmol, 71 %), farbloser, flockiger Feststoff

Schmelzpunkt: 90-92°C (Cyclohexan)

Molare Masse: 392.29 g/mol

Summenformel: C₂₀H₁₉Cl₂NO₃

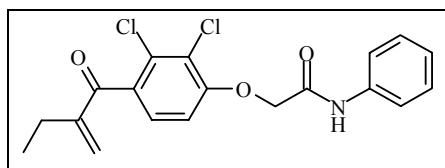
Elementaranalyse [%]: ber.: C 61.24, H 4.88, N 3.57; gef.: C 61.43, H 5.16, N 3.86;

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 1.15 (3H, t, *J*=7.46 Hz, H₃C-CH₂); 2.47 (2H, q, *J*=7.46 Hz, H₃C-CH₂); 4.58 (2H, d, *J*=6.07 Hz, Benzyl-CH₂); 4.63 (2H, s, O-CH₂-CO); 5.57 (1H, s, C=CH₂); 5.95 (1H, s, C=CH₂); 6.87 (1H, d, *J*=8.47 Hz, arom. H₆); 7.07 (1H, s, NH); 7.18 (1H, d, *J*=8.47 Hz, arom. H₅); 7.28-7.38 (5H, m, arom. H Benzylrest);

¹³C-NMR (100.61 MHz, CDCl₃, 300 K): δ 12.38 (H₃C-CH₂); 23.40 (H₃C-CH₂); 43.13 (Benzyl-CH₂-); 68.32 (-O-CH₂-CO); 110.97 (arom. C₆, CH); 123.00 (arom. qC₄); 127.18 (arom. C₅, CH); 127.54 (arom. Benzyl-CH); 127.72 (arom. Benzyl-CH); 128.66 (qC=CH₂); 128.82 (arom. Benzyl-CH); 131.50 (arom. qC₃, C-Cl); 134.27 (arom. qC₂, C-Cl); 137.46 (arom. Benzyl-qC₁); 150.19 (qC=CH₂); 154.48 (arom. qC₁); 166.61 (O-CH₂-CO); 195.46 (Ar-CO);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 1062 (m, Ar-Cl); 1285 (m-s, Ar-O-CH₂); 1471 (m, arom. C=C); 1553 (m-s, CO-N-H); 1586 (m, C=C-C=O); 1662 (s, C=C-C=O); 2926, 2969 (m, C-H); 3030, 3073 (w, =C-H); 3307 (m, br, N-H);

9.7.12 Synthese von Etacrynsäure-anilid (VI-11)



IUPAC: 2-[2,3-Dichlor-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy]-*N*-phenylacetamid

Methode E2; Ansatz: 154 mg (1.65 mmol) Anilin; Reaktionsdauer 12 d; das Produkt wurde säulenchromatographisch auf Kieselgel 60 (Cyclohexan/Ethylacetat 8+2 V/V, isokratisch) gereinigt.

Ausbeute: 512 mg (1.53 mmol, 82 %), farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 125-126 °C (Cyclohexan/Ethylacetat) [Lit. ^[120]: 145-147 °C]

Molare Masse: 378.26 g/mol

Summenformel: C₁₉H₁₇Cl₂NO₃

HR-EI-MS (70 eV, m/z, [M]⁺): ber.: 377.0580; gef.: 377.0580

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 1.16 (3H, t, *J*=7.33 Hz, H₃C-CH₂); 2.48 (2H, q, *J*=7.33 Hz, H₃C-CH₂); 4.70 (2H, s, O-CH₂-CO); 5.60 (1H, s, C=CH₂); 5.97 (1H, s, C=CH₂); 6.93 (1H, d, *J*=8.34 Hz, arom. H₆); 7.18 (1H, t, *J*=7.58 Hz, arom. H₄, Anilid-Rest); 7.22 (1H, d, *J*=8.34 Hz, arom. H₅); 7.39 (2H, t, *J*=7.58 Hz, arom. H₃, + arom. H₅, Anilid-Rest); 7.62 (2H, d, *J*=7.58 Hz, arom. H₂ + arom. H₆, Anilid-Rest); 8.53 (1H, s, NH);

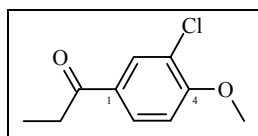
¹³C-NMR (100.61 MHz, CDCl₃, 300 K): δ 12.40 (H₃C-CH₂); 23.42 (H₃C-CH₂); 68.38 (O-CH₂-CO); 111.20 (arom. C₆, CH); 120.01 (arom. C₂ + C₆, CH, Anilid-Rest); 123.07 (arom. qC₄); 125.11 (arom. C₄, CH, Anilid-Rest); 127.33 (arom. C₅, CH); 128.79 (qC=CH₂); 129.21 (arom. C₃ + C₅, CH, Anilid-Rest); 131.64 (arom. qC₃, C-Cl); 134.60 (arom. qC₂, C-Cl); 136.71 (arom. qC₁, Anilid-Rest); 150.22 (qC=CH₂); 154.31 (arom. qC₁); 164.56 (O-CH₂-CO); 195.43 (Ar-CO);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 1062 (s, Ar-Cl); 1283 (m, Ar-O-CH₂); 1444 (m, arom. C=C); 1528 (m-s, CO-N-H); 1586 (m, C=C-C=O); 1660 (m, C=C-C=O); 1681 (m, CO-NH); 2853, 2922, 2957 (m-s, C-H); 3071 (w, =C-H); 3394 (w, br, N-H);

9.8 Synthesen der Anisole mit α,β -ungesättigter Keton-Struktur

9.8.1 1-(3-Chlor-4-methoxyphenyl)-2-methyl-propenon (VII-2a)

9.8.1.1 Synthese von 1-(3-Chlor-4-methoxyphenyl)-propan-1-on (VIII-2a)



Methode A; Ansatz: 3.69 g (20 mmol) **II-2a**, 2.52 g (20 mmol) Dimethylsulfat, 11.22 ml 10 %ige Kaliumhydroxid-Lösung (20 mmol);

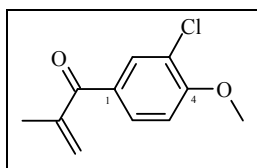
Ausbeute: 2.70 g (13.6 mmol, 68 %), farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 85-86.5 °C (Chloroform) [Lit. ^[121]: 89-90 °C (Ethanol)]

Molare Masse: 198.65 g/mol

Summenformel: C₁₀H₁₁ClO₂

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 1.21 (3H, t, $J=7.20$ Hz, H₃C-CH₂-); 2.94 (2H, q, $J=7.20$, H₃C-CH₂); 3.97 (3H, s, O-CH₃); 6.96 (1H, d, $J=5.89$ Hz, arom. H₅); 7.88 (1H, dd, $J=2.02$ Hz, $J=5.89$ Hz, arom. H₆); 8.00 (1H, d, $J=2.02$ Hz, arom. H₂);

9.8.1.2 *Synthese von 1-(3-Chlor-4-methoxyphenyl)-2-methyl-propenon (VII-2a)*

Methode D2; Ansatz: 1.98 g (10 mmol) **VIII-2a**, 11.42 g (112 mmol) *N,N,N',N'*-Tetramethyldiaminomethan, 16.2 g (158 mmol) Acetanhydrid; Reaktionsdauer: 14 d; das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch auf Kieselgel 60 (Cyclohexan/Ethylacetat 19+1 V/V, isokratisch) aufgereinigt.

Ausbeute: 433 mg (2.1 mmol, 21 %), farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 49-50 °C (Cyclohexan/Ethylacetat)

Molare Masse: 210.66 g/mol

Summenformel: C₁₁H₁₁ClO₂

HR-EI-MS (70 eV, m/z, [M]⁺): ber.: 210.04421; gef.: 210.04413

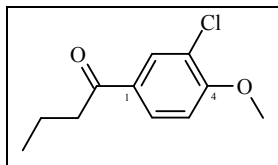
¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 2.06 (3H, s, CH₃); 3.97 (3H, s, O-CH₃); 5.56 (1H, s, C=CH₂); 5.85 (1H, s, C=CH₂); 6.96 (1H, d, *J*=8.59 Hz, arom. H₆); 7.72 (1H, dd, *J*=2.02 Hz, *J*=8.59 Hz, arom. H₅); 7.85 (1H, d, *J*=2.02 Hz, arom. H₃);

¹³C-NMR (100.63 MHz, CDCl₃, 300 K): δ 18.91 (CH₃); 56.34 (O-CH₃); 111.08 (arom. C₅, CH); 122.47 (arom. qC₄); 125.54 (qC=CH₂); 129.98 (arom. C₆, CH); 130.66 (arom. qC₂, C-Cl); 131.81 (arom. C₃, CH); 143.56 (qC=CH₂); 158.22 (arom. qC₁); 195.92 (Ar-CO);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 1059 (s, arom. C-Cl); 1275 (s, =C-O-C); 1495 (m arom. C=C); 1589 (s, C=C-C=O); 1640 (m-s, C=O); 2853, 2923, 2953 (m, C-H); 3002 (w, =C-H);

9.8.2 1-(3-Chlor-4-methoxyphenyl)-2-methylenbutan-1-on (VII-2b)

9.8.2.1 Synthese von 1-(3-Chlor-4-methoxy-phenyl)-butan-1-on (VIII-2b)



Methode A; Ansatz: 3.97 g (20 mmol) **II-2b**, 2.52 g (20 mmol) Dimethylsulfat, 11.22 ml 10 %ige Kaliumhydroxid-Lösung (20 mmol);

Ausbeute: 2.24 g (10.5 mmol, 53 %), farbloser Feststoff

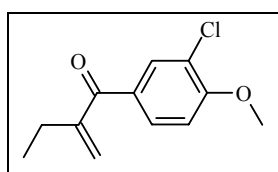
Schmelzpunkt: 71-72 °C (Chloroform) [Lit. ^[111]: 71 °C]

Molare Masse: 212.68 g/mol

Summenformel: C₁₁H₁₃ClO₂

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K): δ 1.00 (3H, t, *J*=7.33 Hz, H₃C-CH₂-CH₂); 1.76 (2H, sext, *J*=7.33 Hz, H₃C-CH₂-CH₂); 2.88 (2H, t, *J*=7.33 Hz, H₃C-CH₂-CH₂); 3.97 (3H, s, O-CH₃); 6.96 (1H, d, *J*=8.84 Hz, arom. H₅); 7.88 (1H, dd, *J*=2.27 Hz, *J*=8.84 Hz, arom. H₆); 8.00 (1H, d, *J*=2.27 Hz, arom. H₂);

9.8.2.2 Synthese von 1-(3-Chlor-4-methoxy-phenyl)-2-methylenbutan-1-on (VII-2b)



Methode D2; Ansatz: 2.13 g (10 mmol) **VIII-2b**, 9.21 g (90 mmol) *N,N,N',N'*-Tetramethyldiaminomethan, 16.2 g (158 mmol) Acetanhydrid; Reaktionsdauer: 14 d; das Rohprodukt wurde noch einmal säulenchromatographisch auf Kieselgel 60 (100 % Chloroform) aufgereinigt.

Ausbeute: 941 mg (4.19 mmol, 42 %), farblose Flüssigkeit

Brechungsindex: $n_D^{22} = 1.5620$

Molare Masse: 224.69 g/mol

Summenformel: $C_{12}H_{13}ClO_2$

HR-EI-MS (70 eV, m/z, [M]⁺): ber.: 224.05986; gef.: 224.05963

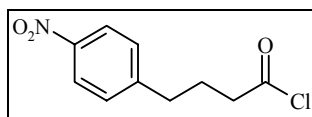
¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 1.12 (3H, t, $J=7.33$ Hz, CH₂-CH₃); 2.47 (2H, q, $J=7.33$ Hz, CH₂-CH₃); 3.97 (3H, s, O-CH₃); 5.51 (1H, s, =CH); 5.76 (1H, s, =CH); 6.96 (1H, d, $J=8.58$ Hz, arom. H₅); 7.73 (1H, dd, $J=2.02$ Hz, $J=8.58$ Hz, arom. H₆); 7.86 (1H, d, $J=2.02$ Hz, arom. H₂);

¹³C-NMR (100.63 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): 12.33 (H₃C-CH₂-); 25.56 (H₃C-CH₂-); 56.37 (O-CH₃); 111.11 (arom. C₅, CH); 122.52 (arom. qC₁); 122.71 (=CH₂); 130.08 (arom. C₆, CH); 131.00 (arom. qC₃, C-Cl); 131.85 (arom. C₂, CH); 149.51 (C=CH₂, q); 158.34 (arom. qC₄); 196.20 (Ar-CO);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu} = 1061$ (s, arom. C-Cl); 1267 (s, =C-O-C); 1499 (m arom. C=C); 1592 (s, C=C-C=O); 1651 (m-s, C=O); 2844, 2938, 2968 (w, C-H); 3088 (w, =C-H);

9.8.3 1-(3-Chlor-4-methoxyphenyl)-2-methylen-4-(4-nitrophenyl)-butan-1-on (VII-2c)

9.8.3.1 Synthese von 4-(4-Nitrophenyl)-butyrylchlorid (X-h)



4.50 g (21.5 mmol) 4-(4-Nitrophenyl)-buttersäure werden mit 3.84 g (32.26 mmol) Thionylchlorid in 25 ml Dichlormethan unter Feuchtigkeitsausschluss und unter Rückfluss erhitzt bis die Gasentwicklung beendet ist. Nach Ende der Reaktion werden die flüssigen

Bestandteile bei 85 °C auf dem Ölbad abdestilliert. Der Rückstand wird ¹H-NMR-spektroskopisch untersucht und ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt weiter verarbeitet.

Ausbeute: laut NMR vollständige Umsetzung

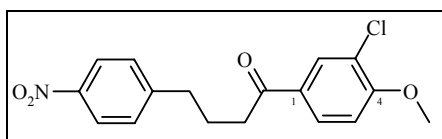
Schmelzpunkt: nicht bestimmt, sofort umgesetzt zu **VIII-2c** [Lit. ^[122]: 56-57 °C]

Molare Masse: 227.65 g/mol

Summenformel: C₁₀H₁₀ClNO₃

¹H-NMR: (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): 2.09 (2H, quin., *J*=7.08 Hz, 7.71 Hz, CH₂-CH₂-COCl); 2.82 (2H, t, *J*= 7.71 Hz, Ar-CH₂-CH₂-); 2.96 (2H, t, *J*=7.08 Hz, CH₂-CH₂-COCl); 7.36 (2H, d, *J*=8.59 Hz, arom. *H*₂ und *H*₆); 8.15 (2H, d, *J*=8.59 Hz, arom. *H*₃ und *H*₅);

9.8.3.2 Synthese von 1-(3-Chlor-4-methoxyphenyl)-4-(4-nitrophenyl)-butan-1-on (VIII-2c)



Methode B; Ansatz: 1.90 g (13.3 mmol) 2-Chloranisol (**I-2a**), 4.89 g (21.5 mmol) 4-(4-Nitro-phenyl)-butyrylchlorid (**X-h**), 2x 2.66 g (2x 20 mmol) Aluminiumchlorid, 50 ml Dichlormethan; das Rohprodukt wurde aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 4.09 g (12.25 mmol, 92 %), gelbe Kristalle

Schmelzpunkt: 84-85 °C (Ethanol)

Molare Masse: 333.77 g/mol

Summenformel: C₁₇H₁₆ClNO₄

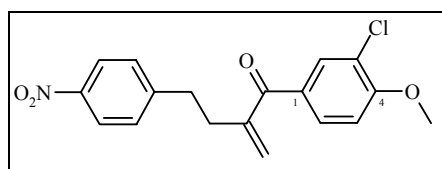
Elementaranalyse [%]: ber.: C 61.18, H 4.83, N 4.20; gef.: C 60.97, H 4.89, N 4.18;

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 2.11 (2H, quin., *J*=7.71 Hz, *J*=7.08 Hz, -CH₂-CH₂-CO-); 2.82 (2H, t, *J*=7.71 Hz, CH₂-CH₂-CH₂-CO); 2.94 (2H, t, *J*=7.08 Hz, -CH₂-CO); 3.97 (3H, s, O-CH₃); 6.96 (1H, d, *J*=8.79 Hz, arom. *H*₃); 7.37 (2H, d, *J*=8.72 Hz, arom. *H*₂ + *H*₆); 7.84 (1H, dd, *J*=2.09 Hz, *J*=8.79 Hz, arom. *H*₆); 7.96 (1H, d, *J*=2.09 Hz, arom. *H*₂); 8.16 (2H, d, *J*=8.72 Hz, arom. *H*₃ + *H*₅);

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ 25.13 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}$); 35.00 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}$); 36.98 ($-\text{CH}_2-\text{CO}$); 56.37 ($\text{O}-\text{CH}_3$); 111.31 (arom. C_5 , CH); 122.92 (arom. $q\text{C}_3$, C-Cl); 123.71 (arom. $\text{C}_{3'}$ + C_5 , CH); 128.35 (arom. C_6 , CH); 129.24 (arom. $\text{C}_{2'}$ + $\text{C}_{6'}$, CH); 130.31 (arom. C_2 , CH); 130.39 (arom. $q\text{C}_1$); 146.50 (arom. $q\text{C}_4$); 149.54 (arom. $q\text{C}_1$); 158.80 (arom. $q\text{C}_4$); 196.94 ($\text{C}=\text{O}$);

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ = 1053 (m, $=\text{C}-\text{O}-\text{C}$); 1339, 1456 (s, NO_2); 1502, 1593 (m-s, arom. $\text{C}=\text{C}$); 1686 (m, $\text{Ar}-\text{C}=\text{O}$); 2953 (w, $\text{C}-\text{H}$);

9.8.3.3 *Synthese von 1-(3-Chlor-4-methoxyphenyl)-2-methylen-4-(4-nitrophenyl)butan-1-on (VII-2c)*



Methode D2; Ansatz: 1.67 g (5 mmol) **VIII-2c**, 4.46 g (40.9 mmol) N,N,N',N' -Tetramethyldiaminomethan, 5.4 g (52.9 mmol) Acetanhydrid; Reaktionsdauer 7 d; nach Filtration wurde das Produkt noch einmal säulenchromatographisch auf Kieselgel 60 (100 % Chloroform) gereinigt.

Ausbeute: 789 mg (2.28 mmol, 46 %), gelbe Kristalle

Schmelzpunkt: 86-87 °C (Chloroform)

Molare Masse: 345.79 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{ClNO}_4$

HR-EI-MS (70 eV, m/z , $[\text{M}]^+$): ber.: 345.07624; gef.: 345.07685

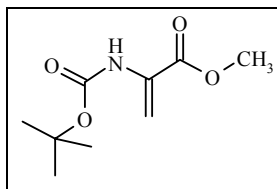
¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 2.82 (2H, t, $J=7.64$ Hz, Ar-CH₂-CH₂-); 2.95 (2H, t, $J=7.64$ Hz, Ar-CH₂-CH₂-); 3.98 (3H, s, O-CH₃); 5.58 (1H, s, =CH₂); 5.76 (1H, s, =CH₂); 6.95 (1H, d, $J=8.59$ Hz, arom. H_5); 7.35 (2H, d, $J=8.72$ Hz, arom. $H_{2'}$ + $H_{6'}$); 7.65 (1H, dd, $J=2.27$, $J=8.59$ Hz, arom. H_6); 7.78 (1H, d, $J=2.27$ Hz, arom. H_2); 8.15 (2H, d, $J=8.72$ Hz, arom. $H_{3'}$ + $H_{5'}$);

¹³C-NMR (100.61 MHz, CDCl₃, 300 K): δ 33.87 (Ar-CH₂-CH₂); 34.19 (Ar-CH₂-CH₂); 56.38 (O-CH₃); 111.12 (arom. C_6 , CH); 122.61 (arom. qC_2 , C-Cl); 123.67 (arom. $C_{3'}$ + $C_{5'}$, CH); 125.70 (=CH₂); 129.37 (arom. $C_{2'}$ + $C_{6'}$, CH); 130.02 (arom. C_5 , CH); 130.50 (arom. qC_4); 131.85 (arom. C_3 , CH); 146.07 ($qC=CH_2$); 146.54 (arom. $qC_{4'}$); 148.98 (arom. $qC_{1'}$); 158.52 (arom. $qC_{1'}$); 195.26 (Ar-CO);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 1057 (s, arom C-Cl); 1262 (s, =C-O-C); 1344 (s, symmetr. N=O); 1492 (m, arom. C=C); 1510 (s, asym. N=O); 1589 (m, C=C-C=O); 1643 (m, C=O); 2841, 2943 (w, C-H); 3069 (w, =C-H);

9.9 Synthesen der Dehydroalanin-Derivate

9.9.1 Synthese von *N*-*tert*Butyloxycarbonyl-2,3-dehydroalaninmethylester (IX-a)



IUPAC: 2-*tert*Butyloxycarbonylamino-acrylsäuremethylester

7.78 g (50 mmol) (*S*)-Serin-*O*-Methylester, Hydrochlorid werden mit 7.59 g (75 mmol) TEA in 25 ml Acetonitril gelöst. Man fügt 39.29 g (180 mmol) Di-*tert*butyldicarbonat hinzu und rührt bei RT bis die Gasentwicklung aufgehört hat (ca. 6 h). Man entfernt das Lösungsmittel im Vakuum und nimmt den Rückstand in 15 ml Diethylether auf. Die Etherphase wird nacheinander 3malig mit 5 ml Wasser, 5 %iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Man trocknet die organische Phase mit Natriumsulfat und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch auf Kieselgel 60 (n-Hexan/Diethylether 8+2 V/V, isokratisch) gereinigt. Es kann das Produkt mit Ninhydrin als gelber Fleck detektiert werden (R_f um 0.40).

Ausbeute: 6.29 g (31.24 mmol, 63 %), farblose Flüssigkeit

Brechungsindex: $n_D^{22} = 1.4401$

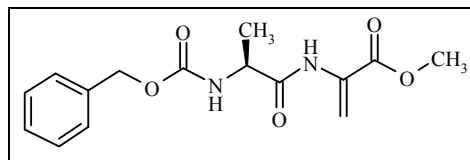
Molare Masse: 201.22 g/mol

Summenformel: $C_9H_{15}NO_4$

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): δ 1.49 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 3.83 (3H, s, O-CH_3); 5.72 (1H, s, $=\text{CH}_2$); 6.16 (1H, s, $=\text{CH}_2$); 7.02 (1H, s, NH); [Lit. ^[72]]

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.63 MHz, CDCl_3 , 300 K): 28.15 (CH_3); 52.74 (O-CH_3); 80.56 (C-CH_3); 105.05 ($=\text{CH}_2$); 131.23 ($\text{C}=\text{CH}_2$); 152.45 (CO-NH); 165.34 (CO-OCH_3);

9.9.2 Synthese von *N*-(*N*-Benzyloxycarbonyl-(*L*)-alanyl)-2,3-dehydroalaninmethylester (IX-b)



IUPAC: 2-(*S*)-(2-Benzyloxycarbonylamino-propionylamino)-acrylsäuremethylester

1.62 g (5 mmol) *Z*-(*L*)-Ala-(*L*)-Ser-OMe, 2.73 g (12.5 mmol) Di-*tert*butyldicarbonat und 253 mg (2.5 mmol) TEA werden in 10 ml Acetonitril bei RT unter Luftausschluss in einem mit Blasenähler verschlossenen Kolben 72 h gerührt. Man entfernt das Lösungsmittel im Vakuum, nimmt den Rückstand in Benzen auf und reinigt das Rohprodukt durch Filtration über eine 5 cm dicke Kieselgelschicht. Dabei werden nur die Verunreinigungen eluiert. Man eluiert das Produkt mit Ethylacetat und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum.

Ausbeute: 440 mg (1.43 mmol, 29 %), gelblicher Feststoff

Schmelzpunkt: 200 °C unter Zersetzung [Lit. ^[123]: 200°C (Zers.)]

Drehwert: $\alpha_D^{25} = -46.98^\circ$ (Chloroform, $c = 0.89$ g/100 ml)

Molare Masse: 306.32 g/mol

Summenformel: C₁₅H₁₈N₂O₅

HR-ESI-MS (m/z , [M+H]⁺): ber.: 307.1299; gef.: 307.1293

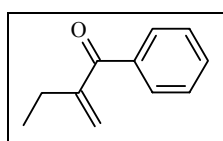
¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 1.43 (3H, d, $J=7.07$ Hz, Ala-CH₃); 3.84 (3H, s, O-CH₃); 4.33 (1H, t, $J=5.55$ Hz, Ala-CH); 5.14 (2H, dd, $J=12.16$ Hz, $J=5.81$ Hz, Ar-CH₂); 5.27 (1H, s, Ala-NH); 5.92 (1H, d, $J=1.01$ Hz, C=CH); 6.60 (1H, s, C=CH); 7.35 (5H, m, Ar-H); 8.30 (1H, s, Ser-NH);

¹³C-NMR (100.61 MHz, CDCl₃, 300 K): δ 18.31 (Ala-CH₃); 51.41 (Ala-CH); 53.01 (O-CH₃); 67.27 (Ar-CH₂-O); 109.47 (C=CH₂); 128.14 (arom. CH); 128.26 (arom. CH); 128.57 (arom. CH); 130.73 (C=CH₂); 136.06 (arom. *qC*); 155.96 (Ar-CH₂-O-CO-); 164.26 (CO-OCH₃); 170.98 (Ala-CO);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 697, 737 (m-s, monosubst. Aromat); 1067 (w, -C-O-C); 1239 (s, br, CO-O-CH₃); 1445 (w, arom. C=C); 1507 (s, br, C=O-NH-); 1684 (s, br, C=O-NH-); 2853, 2925, 2955 (w, C-H); 3033 (w, =C-H); 3318 (w, br, N-H);

9.10 Synthesen der Verbindungen mit Etacrynsäure-Partialstruktur

9.10.1 Synthese von 2-Methylen-1-phenylbutan-1-on (X-a)



9.88 g (66.67 mmol) Butyrophenon werden mit 14.02 g (100 mmol) Hexamethylen-tetramin und 13.61 g (133.34 mmol) Acetanhydrid gemischt und unter Stickstoffatmosphäre bei 80 °C im Ölbad erhitzt. Nach 16 h lässt man das Gemisch abkühlen und gießt unter Rühren ein Gemisch von 75 ml 0.2 M Natronlauge und 75 ml Dichlormethan dazu. Die organische Phase wird abgetrennt, zuerst mit 3x 15 ml einer 1 M Salzsäure, dann mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Man trocknet die organische Phase mit Natriumsulfat. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird das Rohprodukt durch eine Vakuumdestillation bei 70 °C und 0.1 mbar gereinigt.

Ausbeute: 4.53 g (28.3 mmol, 42 %), farblose bis leicht gelbliche Flüssigkeit

Brechungsindex: $n_D^{22} = 1.5339$

Molare Masse: 160.22 g/mol

Summenformel: C₁₁H₁₂O

Elementaranalyse [%]: ber.: C 82.46, H 7.55; gef.: C 82.21, H 7.72;

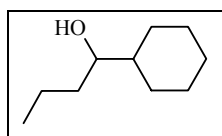
¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 1.13 (3H, t, $J=7.45$ Hz, H₃C-CH₂); 2.49 (2H, q, $J=7.45$ Hz, H₃C-CH₂); 5.57 (1H, s, =CH₂); 5.82 (1H, s, =CH₂); 7.43 (2H, m, arom. H₃ + H₅); 7.53 (1H, m, arom. H₄); 7.75 (2H, d, $J=8.58$ Hz, arom. H₂ + H₆);

¹³C-NMR (100.61 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 12.42 (H₃C); 25.22 (H₃C-CH₂); 124.20 (=CH₂); 128.16 (arom. C₃ + C₅); 129.48 (arom. C₂ + C₆); 132.13 (arom. C₄); 138.00 (arom. qC_1); 149.74 ($qC=CH_2$); 198.51 (Ar-C=O);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 693 + 751 (s, monosubst. Aromat); 1598 (m, arom. C=C); 1624 (m, C=C-CO); 1655 (s, C=O); 2877, 2934, 2968 (w, C-H); 3063 (w, =C-H);

9.10.2 1-Cyclohexyl-2-methylenbutan-1-on (X-d)

9.10.2.1 Synthese von 1-Cyclohexyl-butan-1-ol (X-b)



12.16 g (500 mmol) Magnesiumspäne werden mit 50 ml wfr. Diethylether überschichtet. Unter Rühren fügt man langsam und vorsichtig 4 g von insgesamt 81.53 g (500 mmol) Cyclohexylbromid zu. Wenn der Ether gelinde siedet, hat die Reaktion begonnen (ggf. wird leicht erhitzt). Man tropft über einen Tropftrichter das restliche Cyclohexylbromid in 125 ml Diethylether so zu, dass der Ether weiterhin nur gelinde siedet. Man erhitzt dann so lange bis sich das Magnesium vollständig gelöst hat (ggf. mehr Cyclohexylbromid zugeben). Ist eine Lösung entstanden, werden langsam 28.84 g (400 mmol) Butyraldehyd zutropft. Vorsicht, exotherme Reaktion!

Man erhitzt 2 h unter Rückfluss, gibt 50 g zerstoßenes Eis zur Reaktionsmischung und fügt so lange 6 M Salzsäure zu bis sich der Niederschlag gerade wieder gelöst hat. Die Etherphase wird abgetrennt und die wässrige Phase noch 2mal mit jeweils 20 ml Ether extrahiert. Die vereinigten Etherphasen werden nacheinander mit 3mal 20 ml 38-40 %iger Bisulfid-Lauge, mit 3mal 20 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und mit 3mal 10 ml Wasser gewaschen. Man trocknet die Etherphase mit Natriumsulfat und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Das Rohprodukt wird im Vakuum destilliert (200 mbar, 215 °C).

Ausbeute: 43.9 g (281 mmol, 56 %), farblose Flüssigkeit

Brechungsindex: $n_D^{23.5} = 1.4630$ [Lit. ^[124]: $n_D^{22} = 1.4652$]

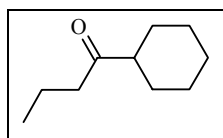
Molare Masse: 156.27 g/mol

Summenformel: C₁₀H₂₀O

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 0.93 (3H, t, *J*=6.83 Hz, CH₃); 0.96-1.81 (16 H, m, CH₂, CH, OH); 3.36 (1H, m, CH-OH);

¹³C-NMR (100.61 MHz, CDCl₃, 300 K): δ 14.18 (CH₃); 19.15 (CH₂); 26.26 (CH₂); 26.42 (CH₂); 26.61 (CH₂); 27.75 (CH₂); 29.31 (CH₂); 36.38 (CH₂); 43.67 (CH); 75.95 (CH-OH);

9.10.2.2 Synthese von 1-Cyclohexyl-butan-1-on (X-c)



20.66 g (162.8 mmol) Oxalylchlorid werden in 75 ml wfr. Dichlormethan in einem 250-ml-Kolben mit Rührer, Thermometer und Stickstoffaufsatz vorgelegt und im Dewar-Gefäß auf mindestens -60 °C abgekühlt. 25.44 g (325.6 mmol) Dimethylsulfoxid werden in 25 ml Dichlormethan so langsam durch einen Tropftrichter zugegeben, dass die Temperatur nicht über -50 °C steigt. Man lässt so lange rühren bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten ist. 25.33 g (148 mmol) 1-Cyclohexyl-butan-1-ol (**X-b**) werden in 25 ml Dichlormethan innerhalb von 5 min zugetropft, dann weitere 15 min rühren gelassen. Man fügt 74.88 g (740 mmol) TEA zu, rührt weitere 5 min und lässt das Gemisch dann langsam auf RT erwärmen. Die Reaktionsmischung wird mit 3x 50 ml Wasser, 3x 50 ml 1 %iger Schwefelsäure, 3x 50 ml 5 % Natriumhydrogencarbonat-Lösung und schließlich mit 50 ml konz. Natriumchloridlösung gewaschen. Man trocknet mit Natriumsulfat und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Das Produkt wird destillativ gereinigt (125 °C, 20 mbar).

Ausbeute: 9.41 g (61 mmol, 40 %), leicht gelbliche Flüssigkeit

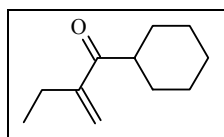
Molare Masse: 154.25 g/mol

Summenformel: C₁₀H₁₈O

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 0.90 (3H, t, $J=7.33$ Hz; H₃C-CH₂-CH₂); 1.18.-1.37 (5H, m, CH₂); 1.58 (2H, sext, $J=7.33$ Hz, H₃C-CH₂-CH₂); 1.65-1.68 (1H, m, CH₂); 1.73-1.83 (4H, m, CH₂); 2.29-2.36 (1H, m, CH); 2.41 (2H, t, $J=7.33$ Hz, H₃C-CH₂-CH₂);

¹³C-NMR (100.61 MHz, CDCl₃, 300 K): δ 13.66 (H₃C); 17.00 (CH₂); 25.57 (CH₂); 25.77 (CH₂); 28.34 (CH₂); 42.39 (CH₂); 50.66 (CH); 213.95 (C=O);

9.10.2.3 Synthese von 1-Cyclohexyl-2-methylenbutan-1-on (X-d)



5.87 g (34.88 mmol) 1-Cyclohexyl-butan-1-on (**X-c**) werden mit 14.02 g (100 mmol) Hexamethylentetramin und 13.61 g (133.34 mmol) Acetanhydrid gemischt und unter Stickstoffatmosphäre bei 80 °C im Ölbad erhitzt. Nach 15 h lässt man das Gemisch abkühlen und gießt unter Rühren ein Gemisch von 75 ml 0.2 M Natronlauge und 75 ml Dichlormethan dazu. Die organische Phase wird abgetrennt, zuerst mit 3x 15 ml einer 1 M Salzsäure, mit 3x 15 ml 5 %ige Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zuletzt mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Man trocknet die organische Phase mit Natriumsulfat. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird das Rohprodukt bei 80 °C und 10 mbar destilliert. Man muß zusätzlich säulenchromatographisch auf Kieselgel 60 (Cyclohexan/Ethylacetat 99+1 V/V, isokratisch) reinigen.

Ausbeute: 150 mg (0.9 mmol, 2.6 %), klare, gelbliche Flüssigkeit

Brechungsindex: $n_D^{22} = 1.4719$

Molare Masse: 166.27 g/mol

Summenformel: C₁₁H₁₈O

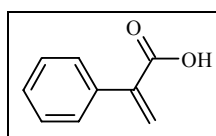
HR-EI-MS (70 eV, m/z, [M]⁺): ber.: 166.1352; gef.: 166.1351

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): δ 1.01 (3H, t, $J=7.46$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2$); 1.20-1.40 (5H, m, CH_2); 1.68-1.71 (1H, m, CH_2); 1.75-1.81 (4H, m, CH_2); 2.28 (2H, q, $J=7.46$ Hz, $\text{H}_3\text{C-CH}_2$); 2.95-3.01 (1H, m, CH); 5.67 (1H, s, C=CH_2); 5.92 (1H, s, C=CH_2);

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ 12.70 ($\text{H}_3\text{C-CH}_2$); 24.17 ($\text{H}_3\text{C-CH}_2$); 25.83 (CH_2); 25.92 (CH_2); 29.52 (CH_2); 45.09 (CH); 121.54 (C=CH_2); 149.65 ($q\text{C=CH}_2$); 205.78 (C=O);

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 993$ (s, C=C-CO); 1627 (w, C=C-CO); 1671 (s, C=O); 2855 (m, C-H); 2930 (s, C-H); 3094 (w, $=\text{C-H}$);

9.10.3 Synthese von Atropasäure (X-e)



IUPAC: 2-Phenylacrylsäure

Atropasäure wurde freundlicherweise von Frau Petra Kapkova und Dr. Eberhard Heller vom Arbeitskreis Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe, Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt. Die Verbindung wurde nach Raper et al. synthetisiert.^[125]

Schmelzpunkt: 102-102.5 °C

Molare Masse: 148.16 g/mol

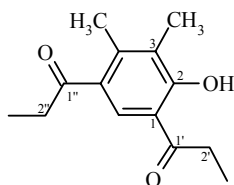
Summenformel: $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2$

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): δ 6.03 (1H, s, $=\text{CH}$); 6.54 (1H, s, $=\text{CH}$); 7.35-7.45 (5H, m, arom. CH); 11.00 (1H, s, CO_2H);

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ 128.15 (arom. $\text{C}_3 + \text{C}_5$, CH); 128.36 (arom. C_4 , CH); 128.44 (arom. $\text{C}_2 + \text{C}_6$, CH); 129.37 ($=\text{CH}_2$); 136.10 (C=CH_2); 140.55 (arom. $q\text{C}$); 171.59 (CO_2H);

9.11 Verschiedene Synthese-Zwischenstufen

9.11.1 Synthese von 1-(2-Hydroxy-3,4-dimethyl-5-propionylphenyl)-propan-1-on (II-4b)



Methode B; Ansatz: 13.62 g (100 mmol) 2,3-Dimethylanisol (**I-4a**), 13.88 g (150 mmol) Propionsäurechlorid, 40 g (300 mmol) Aluminiumchlorid, 100 ml Dichlormethan;

Ausbeute: 1.54 g (6.57 mmol, 7 %), farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 58-60 °C (H₂O)

Molare Masse: 234.30 g/mol

Summenformel: C₁₄H₁₈O₃

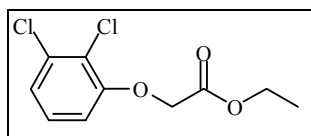
Elementaranalyse [%]: ber.: C 71.77, H 7.74; gef.: C 71.46, H 7.63;

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 1.21 (3H, t, *J*=7.33 Hz, H₃C-CH₂-CO, C_{3''}); 1.26 (3H, t, *J*=7.33 Hz, H₃C-CH₂-CO, C₃); 2.21 (3H, s, arom. C₃-CH₃); 2.41 (3H, s, arom. C₄-CH₃); 2.89 (2H, q, *J*=7.33 Hz, H₃C-CH₂-CO, C_{2''}); 3.05 (2H, q, *J*=7.33 Hz, H₃C-CH₂-CO, C₂); 7.88 (1H, s, Ar-*H*); 13.02 (1H, s, OH);

¹³C-NMR (100.61 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 8.29 (C₃, CH₃); 8.70 (C_{3''}, CH₃); 11.27 (C₃-CH₃); 17.91 (C₄-CH₃); 31.36 (C₂, CH₂); 35.13 (C_{2''}, CH₂); 115.48 (arom. *q*C₃, C-CH₃); 127.41 (arom. C₆, CH); 127.51 (arom. *q*C_{1'}); 130.89 (arom. *q*C_{5'}); 145.00 (arom. *q*C_{4'}); 162.26 (arom. *q*C_{2'}); 204.34 (C_{1''}, C=O); 206.56 (C₁, C=O);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 824 (s, isoliertes Ar-H); 1148 (s, C-OH); 1568 (m, arom. C=C); 1628 (m-s, C=O mit H-Brücke); 1680 (m-s, C=O); 2728 (s, br, O-H mit H-Brücke); 2905, 2938, 2980 (w, -C-H);

9.11.2 Synthese von 2,3-Dichlorphenoxyessigsäureethylester (III-1c)



Methode C2; Ansatz: 34.1 g (209.2 mmol) 2,3-Dichlorphenol, 66.8 g (400 mmol) Bromessigsäureethylester, 55.30 g (400 mmol) Kaliumcarbonat, 100 ml DMF;

Ausbeute: 47.6 g (191.3 mmol, 91 %), farblose, flockige Kristalle

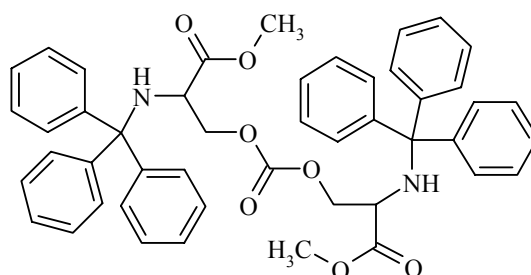
Schmelzpunkt: 66-67 °C (Ethanol) [Lit. ^[126]: 67 °C (Ethanol)]

Molare Masse: 249.10 g/mol

Summenformel: C₁₀H₁₀Cl₂O₃

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 1.29 (3H, t, *J*=7.20 Hz, H₃C-CH₂); 4.27 (2H, q, *J*=7.20 Hz, H₃C-CH₂); 4.71 (2H, s, O-CH₂-CO); 6.75 (1H, m_c, arom. *H*); 7.12 (1H, d, *J*=1.01 Hz, arom. *H*); 7.13 (1H, s, arom. *H*);

9.11.3 Synthese von 3-[2-Methoxycarbonyl-2-(tritylamino)-ethoxycarbonyloxy]-2-(tritylamino)-propionsäuremethylester (X-i)



3.61 g (10 mmol) Trityl-(*S*)-Serinmethylester, 5.45 g (25 mmol) Di-*tert*butyldicarbonat und 122 mg (1 mmol) DMAP werden in 10 ml Acetonitril gelöst. Es setzt Gasentwicklung ein. Man lässt 4 Stunden bei Raumtemperatur rühren und erwärmt 1.5 Stunden gelinde (50 °C Ölbadtemperatur). Der Ansatz wird in 200 ml Diethylether aufgenommen und die Lösung nacheinander jeweils mit 3 x 50 ml 1 M Kaliumhydrogensulfat-Lösung, 1 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung und gesättigter Natriumchlorid-Lösung ausgeschüttelt. Die

organische Phase wird mit Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Man reinigt das Rohprodukt säulenchromatographisch auf Kieselgel 60 (Hexan/Diethylether 6+1 V/V, isokratisch).

Ausbeute: 224 mg (0.299 mmol, 3 %), farblose Kristalle

Schmelzpunkt: 139-141 °C (Hexan/Diethylether)

Molare Masse: 748.88 g/mol

Summenformel: C₄₄H₄₇N₂O₇

Elementaranalyse [%]: ber.: C 75.38, H 5.92, N 3.74; gef.: C 75.28, H 6.20, N 3.66;

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 2.79 (2H, d, *J*=10.35 Hz, NH); 3.18 (6H, s, OCH₃); 3.63 (2H, m, CH); 4.21 (2H, dd, *J*=10.61 Hz, *J*=5.18 Hz, CH₂); 4.21 (2H, dd, *J*=10.61 Hz, *J*=6.56 Hz, CH₂); 7.16 (6H, t, *J*=7.33 Hz, arom. H); 7.24 (12H, t, *J*=7.45 Hz, arom. H); 7.48 (12H, d, *J*=7.33 Hz, arom. H);

¹³C-NMR (100.61 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ 52.00 (O-CH₃); 55.45 (CH); 69.47 (CH₂); 70.95 (Trt-*qC*); 126.55 (arom. C, CH); 127.92 (arom. C, CH); 128.70 (arom. C, CH); 145.49 (arom. *qC*); 154.68 (C=O, Carbonat); 172.67 (C=O, CO₂CH₃);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 707 (s, monosubst. Aromat); 1237 (m, H-NR₂); 1727, 1744, 1759 (m, COOR, C=O); 2802, 2879, 2947 (w, C-H); 3033, 3254, 3344 (w, =C-H);

10 Literaturverzeichnis

- [1] Rawlings, N. D.; Tolle, D. P. and Barrett, A. J. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, D160-D164.
- [2] Rawlings, N. D. and Barrett, A. J. *Biochem. J.* **1993**, *290*, 205-218.
- [3] Otto, H. H. and Schirmeister, T. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 133-171.
- [4] Frosch, B. A.; Berquin, I.; Emmert-Buck, M. R.; Moin, K. and Sloane, B. F. *Apmis* **1999**, *107*, 28-37.
- [5] Bromme, D. and Kaleta, J. *Curr. Pharm. Design* **2002**, *8*, 1639-1658.
- [6] Lecaille, F.; Kaleta, J. and Bromme, D. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4459-4488.
- [7] Leung-Toung, R.; Li, W. R.; Tam, T. F. and Karimian, K. *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 979-1002.
- [8] Turk, B.; Turk, D. and Turk, V. *Biochim. Biophys. Acta Prot. Struct. Mol. Enzymol.* **2000**, *1477*, 98-111.
- [9] Turk, D. and Guncar, G. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2003**, *59*, 203-213.
- [10] Pinitglang, S.; Watts, A. B.; Patel, M.; Reid, J. D.; Noble, M. A.; Gul, S.; Bokth, A.; Naeem, A.; Patel, H.; Thomas, E. W. *et al. Biochemistry* **1997**, *36*, 9968-9982.
- [11] Turk, B.; Dolenc, I.; Turk, V. and Bieth, J. G. *Biochemistry* **1993**, *32*, 375-380.
- [12] Schechter, I. and Berger, A. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **1967**, *27*, 157-162.
- [13] Powers, J. C.; Asgian, J. L.; Ekici, O. D. and James, K. E. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4639-4750.
- [14] Palmer, J. T.; Rasnick, D. and Klaus, J. L. *Patent WO 9630353*; **1996**; 92 S.
- [15] Klaus, J. L.; Rasnick, D.; Palmer, J. T. and Kuo, E. Y.-L. *Patent WO 9640737*; **1996**; 79 S.
- [16] Schirmeister, T. and Kaeppler, U. *Mini Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 361-373.
- [17] Rasnick, D. *Perspect. Drug Discov.* **1996**, *6*, 47-63.
- [18] Engel, J. C.; Doyle, P. S.; Hsieh, I. and McKerrow, J. H. *J. Exp. Med.* **1998**, *188*, 725-734.
- [19] Brinen, L. S.; Hansell, E.; Cheng, J. M.; Roush, W. R.; McKerrow, J. H. and Fletterick, R. J. *Struct. Fold. Des.* **2000**, *8*, 831-840.
- [20] CRA-3316, *Drug Data Report* **2002**, *24*, 356.

- [21] Matthews, D. A.; Dragovich, P. S.; Webber, S. E.; Fuhrman, S. A.; Patick, A. K.; Zalman, L. S.; Hendrickson, T. F.; Love, R. A.; Prins, T. J.; Marakovits, J. T. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1999**, *96*, 11000-11007.
- [22] Graul, A. and Castaner, J. *Drugs Fut.* **2000**, *25*, 9-15.
- [23] Graul, A. and Castaner, J. *Drugs Fut.* **2001**, *26*, 62.
- [24] Patick, A. K.; Binford, S. L.; Brothers, M. A.; Jackson, R. L.; Ford, C. E.; Diem, M. D.; Maldonado, F.; Dragovich, P. S.; Zhou, R.; Prins, T. J. *et al. Antimicrob. Agents Ch.* **1999**, *43*, 2444-2450.
- [25] Beyer, K. H.; Baer, J. E.; Michaels, Jk and Russo, H. F. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1965**, *147*, 1-22.
- [26] Sprague, J. M. *Top. Med. Chem.* **1986**, *2*, 1-63.
- [27] Palfrey, H. C. and Leung, S. *Am. J. Physiol.* **1993**, *264*, C1270-C1277.
- [28] Mukanganyama, S.; Widersten, M.; Naik, Y. S.; Mannervik, B. and Hasler, J. A. *Int. J. Cancer* **2002**, *97*, 700-705.
- [29] Harwaldt, P.; Rahlfs, S. and Becker, K. *Biol. Chem.* **2002**, *383*, 821-830.
- [30] Ploemen, J. H.; van Ommen, B. and van Bladeren, P. J. *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *40*, 1631-1635.
- [31] Ploemen, J. H.; van Ommen, B.; Bogaards, J. J. and van Bladeren, P. J. *Xenobiotica* **1993**, *23*, 913-923.
- [32] Jayaram, H. N.; Cooney, D. A.; Milman, H. A.; Homan, E. R.; King, V. M. and Cragoe, E. J. *Biochem. Pharmacol.* **1975**, *24*, 1787-1792.
- [33] Gunther, T.; Pellnitz, W. and Mariss, G. *Z. Naturforsch. [C]* **1974**, *29*, 54-59.
- [34] Gunther, T.; Dorn, F.; Haug, M. and Pellnitz, W. *N-S Arch. Pharmacol.* **1974**, *282*, 97-107.
- [35] Duggan, D. E. and Noll, R. M. *Arch. Biochem. Biophys.* **1965**, *109*, 388-396.
- [36] Kennedy, P. E.; Williams, F. L. and Abraham, D. J. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 103-105.
- [37] Schultz, E. M.; Bicking, J. B.; Sprague, J. M.; Cragoe, E. J. and Bolhofer, W. A. *J. Med. Pharmaceut. Ch.* **1962**, *5*, 660-662.
- [38] Schultz, E. M. and Sprague, J. M. *Patent US 3255241*; **1966**; 48 S.
- [39] Schellhammer, C.-W. in *Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie*; Thieme Verlag, Stuttgart; Bd. VIII, 2a; S. 15 ff.
- [40] Woltersdorf, O. W.; Robb, C. M.; Bicking, J. B.; Watson, L. S. and Cragoe, E. J. *J. Med. Chem.* **1976**, *19*, 972-975.

- [41] Conrad, M. and Brückner, C. *Chem. Ber.* **1891**, 24, 3001.
- [42] Barry, V. C. and Twomey, D. *Proc. Roy. Irish Acad.* **1950**, 53B, 55-59.
- [43] Dean, F. M.; Evans, C. A.; Francis, T. and Robertson, A. *J. Chem. Soc.* **1957**, 1577-1582.
- [44] Bicking, J. B.; Holtz, W. J.; Watson, L. S. and Cragoe, E. J. *J. Med. Chem.* **1976**, 19, 530-535.
- [45] Nuhrich, A.; Lablanche, C.; Devaux, G.; Carpy, A.; Dufour, P.; Nguyenba, C. and Roquebert, J. *Eur. J. Med. Chem.* **1981**, 16, 551-555.
- [46] Bhatt, M. V. and Kulkarni, S. U. *Synthesis* **1983**, 249-282.
- [47] Hajos, A. *Acta Chim. Hung.* **1985**, 118, 63-70.
- [48] Buehler, C. A. and Pruett, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 5506.
- [49] Ireland, R. E. and Walba, D. M. *Org. Synth.* **1988**, 50-9, 567-570.
- [50] Mann, F. G. and Pragnell, M. J. *J. Chem. Soc.* **1965**, 4120-4127.
- [51] Mannich, C. *Arch. Pharm.* **1917**, 255, 261-276.
- [52] Thompson, B. B. *J. Pharm. Sci.* **1968**, 57, 715-733.
- [53] Cummings, T. F. and Shelton, J. R. *J. Org. Chem.* **1960**, 25, 419-423.
- [54] *Patent NL 6507709*; **1965**; 26 S.
- [55] Abraham, D. J.; Mehanna, A. S.; Williams, F. S.; Cragoe, E. J. and Woltersdorf, O. *W. J. Med. Chem.* **1989**, 32, 2460-2467.
- [56] 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. *et al. J. Med. Chem.* **1986**, 29, 825-841.
- [57] Bhattacharya, A.; Segmuller, B. and Ybarra, A. *Synth. Commun.* **1996**, 26, 1775-1784.
- [58] Korosi, J.; Szabo, G. and Lay, A. *Patent DE 1929731*; **1970**; 8 S.
- [59] Han, S. Y. and Kim, Y. A. *Tetrahedron* **2004**, 60, 2447-2467.
- [60] Schultz, E. M. and Sprague, J. M. *Patent DE 1810053*; **1970**; 30 S.
- [61] Ponndorf, W. *Angew. Chem.* **1926**, 39, 138-143.
- [62] Moulton, W. N.; Ruch, R. R. and Vanatta, R. E. *J. Org. Chem.* **1961**, 26, 290-292.
- [63] Wilds, A. L. *Org. React.* **1944**, 2, 178-223.
- [64] Brown, H. C. and Krishnamurthy, S. *Tetrahedron* **1979**, 35, 567-607.
- [65] Chaikin, S. W. and Brown, W. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71, 122-125.
- [66] Ohara, H.; Miyabe, Y.; Deyashiki, Y.; Matsuura, K. and Hara, A. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, 50, 221-227.

- [67] Dubuffet, T.; Bidon, C.; Martinet, P.; Sauvetre, R. and Normant, J. F. *J. Organomet. Chem.* **1990**, *393*, 161-172.
- [68] Levene, P. A. and Marker, R. E. *J. Biol. Chem.* **1932**, *97*, 379-391.
- [69] Mancuso, A. J.; Huang, S. L. and Swern, D. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2480-2482.
- [70] Tidwell, T. T. *Org. React.* **1990**, *39*, 297-572.
- [71] Ferreira, P. M. T.; Maia, H. L. S. and Monteiro, L. S. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 9575-9578.
- [72] Ferreira, P. M. T.; Maia, H. L. S.; Monteiro, L. S. and Sacramento, J. *J. Chem. Soc. Perk. T. 1* **1999**, 3697-3703.
- [73] Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N. and Bourne, P. E. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235-242.
- [74] 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. *et al. P. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13190-13195.
- [75] Keillor, J. W. and Brown, R. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5114-5116.
- [76] Keillor, J. W. and Brown, R. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7983-7989.
- [77] Lewis, C. A. and Wolfenden, R. *Biochemistry* **1977**, *16*, 4890-4895.
- [78] Knight, C. G. *Research Monographs in Cell and Tissue Physiology* **1986**, *12*, 23-51.
- [79] Krantz, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 1327-1334.
- [80] Bisswanger, H., *Enzymkinetik - Theorie und Methoden*, 2. Aufl., **1994**; VCH, Weinheim.
- [81] Kitz, R. and Wilson, I. B. *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 3245-3249.
- [82] Tian, W. X. and Tsou, C. L. *Biochemistry* **1982**, *21*, 1028-1032.
- [83] Dixon, M. *Biochem. J.* **1953**, *55*, 170-171.
- [84] Schirmeister, T. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 560-572.
- [85] Shenai, B. R.; Sijwali, P. S.; Singh, A. and Rosenthal, P. J. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 29000-29010.
- [86] Caffrey, C. R.; Hansell, E.; Lucas, K. D.; Brinen, L. S.; Hernandez, A. A.; Cheng, J. N.; Gwaltney, S. L.; Roush, W. R.; Stierhof, Y. D.; Bogyo, M. *et al. Mol. Biochem. Parasit.* **2001**, *118*, 61-73.
- [87] Koechel, D. A. and Cafruny, E. J. *J Med Chem* **1973**, *16*, 1147-1152.
- [88] 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. *et al. New Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 1967-1976.

- [89] 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. *et al. New Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 1953-1966.
- [90] Lee, N.; Hui, D.; Wu, A.; Chan, P.; Cameron, P.; Joynt, G. M.; Ahuja, A.; Yung, M. Y.; Leung, C. B.; To, K. F. *et al. New Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 1986-1994.
- [91] Enserink, M. *Science* **2003**, *300*, 1351.
- [92] Ziebuhr, J.; Snijder, E. J. and Gorbalenya, A. E. *J. Gen. Virol.* **2000**, *81*, 853-879.
- [93] Ziebuhr, J.; Heusipp, G. and Siddell, S. G. *J. Virol.* **1997**, *71*, 3992-3997.
- [94] Anand, K.; Palm, G. J.; Mesters, J. R.; Siddell, S. G.; Ziebuhr, J. and Hilgenfeld, R. *EMBO J.* **2002**, *21*, 3213-3224.
- [95] Anand, K.; Ziebuhr, J.; Wadhvani, P.; Mesters, J. R. and Hilgenfeld, R. *Science* **2003**, *300*, 1763-1767.
- [96] Hegyi, A. and Ziebuhr, J. *J. Gen. Virol.* **2002**, *83*, 595-599.
- [97] Blanchard, J. E.; Elowe, N. H.; Huitema, C.; Fortin, P. D.; Cechetto, J. D.; Eltis, L. D. and Brown, E. D. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1445-1453.
- [98] Liu, Y. Y.; Kati, W.; Chen, C. M.; Tripathi, R.; Molla, A. and Kohlbrenner, W. *Anal. Biochem.* **1999**, *267*, 331-335.
- [99] Rachid, S.; Ohlsen, K.; Witte, W.; Hacker, J. and Ziebuhr, W. *Antimicrob. Agents Ch.* **2000**, *44*, 3357-3363.
- [100] Mack, D.; Fischer, W.; Krokotsch, A.; Leopold, K.; Hartmann, R.; Egge, H. and Laufs, R. *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 175-183.
- [101] Escobar, P.; Matu, S.; Marques, C. and Croft, S. L. *Acta. Trop.* **2002**, *81*, 151-157.
- [102] Nakazawa, K.; Matsuura, S. and Kusuda, K. *Yakugaku Zasshi* **1954**, *74*, 495-497.
- [103] De Cointet, P.; Loppinet, V.; Sornay, R.; Morinere, J. L.; Boucherle, A.; Renson, F. J.; Voegelin, H. and Dumont, C. *Chim. Ther.* **1973**, *8*, 574-587.
- [104] *Patent DE 1929732; 1970; 6 S.*
- [105] *Patent NL 6604297; 1966; 44 S.*
- [106] Cragoe, E. J., Jr. *Patent US 3478085; 1969; 7 S.*
- [107] Leimu, R. *Chem. Ber.* **1937**, *70B*, 1040-1053.
- [108] *Patent NL 6502682; 1965; 42 S.*
- [109] Bovicelli, P.; Mincione, E.; Antonioletti, R.; Bernini, R. and Colombari, M. *Synth. Commun.* **2001**, *31*, 2955-2963.
- [110] Buu-Hoi, N. P.; Xuong, N. D. and Lavit, D. *J. Chem. Soc.* **1954**, 1034-1038.
- [111] Nguyen, H. and Buu, H. *Compt. rend.* **1947**, *224*, 1363.

- [112] Pawar, R. A.; Shingte, R. D. and Gogte, V. N. *Indian J. Chem.* **1970**, *8*, 522-525.
- [113] Schultz, E. M. and Sprague, J. M. *Patent Be 612755*; **1962**; 162 S.
- [114] Robertson, A. *J. Chem. Soc. Abstracts* **1932**, 1380-1388.
- [115] Coulthard, C. E.; Marshall, J. and Payman, F. L. *J. Chem. Soc. Abstracts* **1930**, 280-91.
- [116] Woltersdorf, O. W.; Desolms, S. J.; Schultz, E. M. and Cragoe, E. J. *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 1400-1408.
- [117] Babayan, V. O.; Grigoryan, L. G. and Martirosyan, F. A. *Zh. Org. Khim.* **1970**, *6*, 1972-1975.
- [118] *Patent NL 6601140*; **1966**; 41 S.
- [119] Pinchuk, A. M.; Kosinskaya, I. M. and Shevchenko, V. I. *Zh. Obshch. Khim.* **1967**, *37*, 856-859.
- [120] Diago-Meseguer, J.; Palomo-Coll, A. L.; Fernandez-Lizarbe, J. R. and Zugaza-Bilbao, A. *Synthesis* **1980**, 547-551.
- [121] Ziegler, E.; Schredt, H. and Gitschthaler, K. *Monatsh. Chem.* **1954**, *85*, 1234-1239.
- [122] *Anon Patent BE 560859*; **1957**; S.
- [123] Berti, F.; Ebert, C. and Gardossi, L. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 8145-8148.
- [124] Pineau *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1936**, *5*, 2195.
- [125] Raper, H. S. *J. Chem. Soc.* **1923**, *123*, 2557-2559.
- [126] Nuhrich, A.; Beranger, M.; Devaux, G.; Cambar, J.; Dorian, C. and Carpy, A. *Eur. J. Med. Chem.* **1986**, *21*, 49-54.

11 Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Ulrich Käppler
Geburtstag: 31.12.1975
Geburtsort: Schwäbisch Hall
Beruf: Apotheker
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulbildung:

1982 bis 1986: Grundschule in Michelbach am Wald
1986 bis 1995: Hohenlohegymnasium in Öhringen
Allgemeine Hochschulreife am 22.06.1995

Weitere Ausbildung:

Nov. 1995 – Juli 1999: Studium der Pharmazie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
29.08.1997: Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
08.11.1999: Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Okt. 1999 – Mai 2000: Diplomarbeit mit dem Titel: „Neue semicyclische Aminoguanidin-Derivate als potentielle NOS-Inhibitoren“ und Pharmaziepraktikum bei PD Dr. Olaf Morgenstern am Institut für Pharmazie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Mai 2000 – Nov. 2000: Pharmaziepraktikum bei Dr. Peter Müller in der Hirsch-Apotheke in Öhringen
11.12.2000: Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
13.12.2000: Approbation als Apotheker
seit Nov. 2000: Doktorarbeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Prof. Dr. Tanja Schirmeister am Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

12 Veröffentlichungen

PUBLIKATIONEN:

New non-peptidic inhibitors of papain derived from etacrynic acid. U. Kaeppler, T. Schirmeister, *Med. Chem.* eingereicht

Non-peptidic inhibitors of cysteine proteases. T. Schirmeister, U. Kaeppler, *Mini Rev. Med. Chem.* **2003**, 3, 4, 361-373

Non-Peptidic inhibitors of cysteine proteases. U. Käßler, T. Schirmeister. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2002**, 335, Suppl. 1, 86. (DPhG-Jahrestagung 2002, Berlin).

POSTERPRÄSENTATIONEN:

Nichtpeptidische Cystein-Protease-Inhibitoren.

U. Käßler, T. Schirmeister. DPhG-Jahrestagung, **2002**, Berlin.

Nichtpeptidische Cysteinprotease-Inhibitoren mit Etacrynsäure als Grundstruktur.

U. Käßler T. Schirmeister. DPhG-Jahrestagung, **2003**, Würzburg.

Non-peptidic inhibitors of cysteine proteases derived from etacrynic acid.

U. Kaeppler, T. Schirmeister. 3rd General Meeting of the IPS (International Proteolysis Society) associated with the ICPI (International Conference on Protease Inhibitors), **2003**, Nagoya, Japan.

Etacrynic acid amides as non-peptidic inhibitors of parasitic and viral cysteine proteases.

U. Kaeppler, N. Stiefl, K. Baumann, J. Ziebuhr, T. Schirmeister. DPhG-Jahrestagung, **2004**, Regensburg.

Screening of electrophilic compounds as potential irreversible M^{pro} Inhibitors.

A. Breuning, R. Vicik, U. Kaeppler, N. Stiefl, K. Baumann, C. Schmuck, J. Ziebuhr, T. Schirmeister. SARS-Kongress, **2004**, Lübeck.

Screening of electrophilic compounds as potential irreversible inhibitors of coronaviral M^{pro}s. A. Breuning, M. Schiller, U. Kaeppler, F. Jenke, B. Degel, R. Vicik, N. Stiefl, K. Baumann, C. Schmuck, J. Ziebuhr, T. Schirmeister. DPhG-Jahrestagung, **2004**, Regensburg.

EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation

**SYNTHESE UND TESTUNG VON NICHTPEPTIDISCHEN CYSTEIN-PROTEASE-INHIBITOREN -
ETACRYNSÄURE ALS LEITSTRUKTUR**

selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den urkundlich vorgelegten und anerkannten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Ulrich Käppler