

**Theoretische und experimentelle Wirkstoffsuche
an den Zielproteinen SARS-Coronavirus-Papain-like-Protease
und Elongin-C**



Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Apotheker Armin Welker

aus Herzogenaurach

Würzburg 2013

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am

Gutachter der schriftlichen Arbeit

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums

Doktorurkunde ausgehändigt am

Die experimentellen Arbeiten der vorliegenden Dissertation wurden in der Zeit von September 2008 bis Januar 2012 am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg angefertigt.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Chefin, **Frau Prof. Tanja Schirmeister** für ihre kollegiale Betreuung, die interessante Themastellung, die Freiräume bei der Bearbeitung und die Ermöglichung zweier Auslandsaufenthalte. Ebenso möchte ich **Herrn Prof. Christoph Sotriffer** ganz besonders für die gastfreundschaftliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis danken. So bekam ich die Möglichkeit, mich zusätzlich in das Gebiet der computergestützten Wirkstoffsuche einzuarbeiten und an die Aufgabenstellung mit „anderen Augen“ heranzugehen. Danke auch für die permanente Bereitstellung eines Arbeitsplatzes mit leistungsfähigem Computer in Deinen Räumen.

Außerdem verdienen folgende Personen dankende Erwähnung:

Prof. Andrei Yudin und Arbeitskreis für den unkomplizierten und lehrreichen Auslandsaufenthalt am Chemistry Department der University of Toronto, Canada.

Prof. Grasso, Prof. Zappala und Arbeitskreis, besonders Nick, für den abwechslungsreichen Auslandsaufenthalt an der Università di Messina und die kulinarischen Hochgenüsse Siziliens.

Prof. Caroline Kisker, Martin Stempka und Uwe Dietzel für die Bereitstellung des Enzyms SARS-CoV-PL^{Pro} und für die Versuche zur Kristallisation.

Prof. Petra Högger für die Möglichkeit, meine Tätigkeit als Assistent in das abwechslungsreiche Fach der klinischen Pharmazie zu legen.

Boris Nowotny, Dr. Bodem und Dr. Kirschner für die Kooperation im HIV-Projekt und für die Testung der bestellten Substanzen.

Cornelia Heindl und Anna Kucharski für die Durchführung der fluorimetrischen Assays.

Mein Abzugsnachbar Thomas Schneider für die stets gute Laune, der produktiven Diskussionen und dem Nachschub bei Lösungsmittel und sauberen Kolben,

Monika Nocker und Martin Sippel für die Diskussionsbereitschaft im Feld der Computerchemie,

Dr. Stefan Ries und Andreas Kesel für die lehrreichen chemischen Fachgespräche,

Dr. Christian Markl für die Synthese von Naphthyloxoessigsäureaniliden, einer interessanten Substanzklasse, die leider wegen fehlender Aktivität in dieser Arbeit keinen Platz mehr fand,

Michael Völker für die Diskussionsfreude im analytisch-chemischen Bereich,

Monika Herb und Caroline Schad für das fleißige tägliche Messen von NMRs in den letzten Jahren, sowie Sarah Wehle, Johannes Wiest, Ines Schmidt, Georg Hiltensperger und Eberhard Heller für weitere NMR-Messungen,

Thomas Schmidt und Max Rieger für die Zusammenarbeit im HIV-Protease-Projekt, welchem in dieser Arbeit jedoch auch kein Platz eingeräumt werden konnte.

Die ehemaligen Mitglieder des AK Schirmeister, die da waren: Caro, Moni, Verena, Conny, Thomas S. & Thomas P., Martin St., Markus, Maggie, Matthias, Christian und Radim, es waren coole Zeiten im alten Pharmaziegebäude mit dem fensterlosen „Kafferaum“. Und natürlich alle derzeitigen Mitglieder des AK Schirmeister: Ferdi, Christoph, Hongmei, Simon, Philipp, Steven und Swarna, es war mit euch allen eine unterhaltsame Zeit!

Die Mitglieder meines Gastarbeitskreises AK Sotriffer: Moni, Martin, Manuel, Michael H., Daniel C., Benni S., Uli, David, Raphael, Steffen, Thomas W., Benni M., Yogesh, Daniel S. und Sarah. Die Möglichkeit mit euch in einem Theoretikerarbeitskreis zu sein, hat meine Zeit maximal abwechslungsreich gestaltet!

Ebenso danke ich meinem super engagierten Klinpharm-Team aus dem AK Högger: Mirjam, Bea, Daniel B., Martin H. und Lisa. Danke für die lustige Zeit. Auch ein herzliches Dankeschön für die gemeinsame Zeit geht an die weiteren Mitgliedern des AK Högger: Klaus, Max, Melanie, Freddi und Roswitha.

Der Werkstatt unserer Pharmazie mit Herrn Walter, Matthias Völker und Karl Vollmuth für die stete technische Unterstützung.

Meine beiden Wahlpflichtfachstudenten Daniel Schuster und Steffen Uebel für ihr herausragendes Engagement bei den angegangenen Projekten.

Ihnen allen gebührt mein herzlicher Dank!

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	XI
Einleitung.....	1
1. Biologischer Hintergrund	3
1.1. SARS-Projekt: SARS-CoV-PL ^{pro} als Zielprotein.....	3
1.2. HIV-Projekt: Elongin-C als Zielprotein	7
1.3. Aufgabenstellung der Arbeit	13
2. Computerbasierte Untersuchungen im SARS-Projekt.....	15
2.1. Analyse des Ligand-Bindemodus der Struktur 3E9S	15
2.2. Relibase-Recherche	18
2.3. Bindetaschenanalyse mit GRID	20
2.4. Flexibilität der Bindetasche und Modelling einer alternativen Loop-Konformation.....	22
2.5. Virtuelles Screening	24
2.5.1. Hintergrund zu Docking und Scoring.....	24
2.5.2. Redocking des Liganden der Kristallstruktur	28
2.5.3. Evaluation von Scoring- und Rescoringfunktion.....	31
2.5.4. Die Problematik des Scorings – für virtuelle Screeningprojekte relevante Aspekte	35
2.5.5. Virtuelles High-Throughput-Screening (vHTS).....	37
2.5.6. Substanzauswahl und Testergebnisse im enzymatischen Assay	43
2.6. Entwicklung kovalent-irreversibler Inhibitoren mit Aziridin-Baustein.....	47
2.6.1. Vorüberlegungen	47
2.6.2. Inhibitor-design mit Ethylendiamin-Spacer.....	49
2.6.3. Inhibitor-design mit Piperazin-Spacer	50
3. Entwicklung und Synthese von Inhibitoren im SARS-Projekt.....	51
3.1. Synthese erster Verbindungen und Struktur-Wirkungsbeziehungen.....	52
3.2. Variationen an der Benzoesäure.....	59
3.2.1. Substitutionen in 2-Position	59
3.2.2. Weitere abgeleitete Verbindungen	62
3.3. Variationen am Naphthylethanamin.....	68
3.3.1. Nitro- und Aminoderivat am Naphthalin-Gerüst.....	68
3.3.2. Hydroxyderivat am Naphthalin-Gerüst	70
3.3.3. Fluorderivate der Seitenkette.....	72
3.3.4. Hydroxy- und Azidoderivate der Seitenkette	76
3.4. Indolderivate.....	80
3.5. Naphthylethylsäureamide und 2-Naphth-1-ylpropansäureamide	82

3.6. Diphenylpropanamide	87
3.7. Tetrahydrochinolinderivate	88
3.8. Sulfonamide	90
3.9. Isoindoline und davon abgeleitete Amine	93
3.9.1. Überlegungen zur 2-Methyl-Substitution und Molekülflexibilität	93
3.9.2. Isoindoline mit verschiedener Methyl-Substitution.....	95
3.9.3. Ein 6-Ring-Derivat sowie 4-Fluor-, 4-Chlor- und 5-Hydroxy-Isoindoline	99
3.9.4. Weitere Isoindoline mit Amino-, Nitro- und Hydroxy-Substitution.....	102
3.9.5. Struktur-Wirkungsbeziehungen der Isoindoline	105
3.9.6. Vom Isoindolin zum acyclischen, sekundären Amin	106
3.10.Synthese von Aziridinderivaten	107
4. Enzymkinetik im SARS-Projekt	111
4.1. Einführung.....	111
4.2. Biochemische Bestimmungsmethoden.....	112
4.3. Diskussion	113
5. Computerbasierte Wirkstoffsuche im HIV-Projekt.....	115
5.1. Auswahl geeigneter Proteinstrukturen	115
5.2. Virtuelles Screening	117
5.3. Substanzauswahl	119
5.4. Testergebnisse und Diskussion	124
6. Zusammenfassung	126
7. Summary	130
8. Experimenteller Teil.....	134
8.1. Enzymatischer Assay	134
8.2. Geräte und Materialien.....	134
8.3. Allgemeine Methoden	136
8.4. Darstellung der Substanzen	139
Strukturformelverzeichnis der getesteten Substanzen	243
Literaturverzeichnis.....	247

Abkürzungsverzeichnis

Abb. Abbildung

Abs. absolut

Ac Acetyl

ACE2 Angiotensin-converting enzyme 2

AU Arbitrary Units

A3G Apobec3G

berücks. berücksichtigt

ber. berechnet

Bn Benzyl

Boc *tert*-Butoxycarbonyl

CoV Coronavirus

d Tag

DC Dünnschicht-Chromatographie

DCC Dicyclohexylcarbodiimid

DIC Diisopropylcarbodiimid

DIBAL-H Diisobutylaluminiumhydrid

DMF Dimethylformamid

DMSO Dimethylsulfoxid

DTT D/L-Dithiothreitol

ee enantiomeric excess

EloBC Elongin-BC

eq. Äquivalent

Et Ethyl

Et₃N Triethylamin

EtOAc Ethylacetat

et al. und andere

exp. experimentell

HAUSP Herpes virus-associated ubiquitin-specific protease

HBTU 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat

hCoV-EMC Humanes Coronavirus-Erasmus Medical Center

HCV Hepatitis-C-Virus

HOBT 1-Hydroxybenzotriazol

HTS High throughput screening

HX-MS Hydrogen-Exchange-Mass-Spectrometry

IFN Interferon

InhA Isonicotinsäurehydrazid Enoyl-Acyl-Carrier-Protein-Reduktase

IRF3 Interferon regulatory factor 3

ITC Isothermale Titrationskalorimetrie

i. Vak. im Vakuum
J Kopplungskonstante
kat. katalytisch
konz. konzentriert
LC-MS Liquid chromatography mass spectrometry
Me Methyl
MeCN Acetonitril
MM-PBSA Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area
NBS *N*-Bromsuccinimid
NMM *N*-Methylmorpholin
NMR Kernresonanz
NOESY Nuclear-Overhauser-Enhancement-Spectroscopy
nsp Nichtstrukturprotein
Pd/C Palladium auf Aktivkohle
PDB protein database
PL^{pro} Papain-like-Protease
PPA cyclisches Propylphosphonsäureanhydrid
PPI Protein-Protein-Interaktion
ppm parts per million
THF Tetrahydrofuran
TsOH *p*-Toluolsulfonsäure
R_f Retentionsfaktor
RT Raumtemperatur
s. siehe
SARS Severe acute respiratory syndrome
SC Säulenchromatographie
Sdp. Siedepunkt
Smp. Schmelzpunkt
SOCS Suppressor of cytokine signaling
Tab. Tabelle
tert tertiär
TFA Trifluoressigsäure
THF Tetrahydrofuran
TMSCl Trimethylsilylchlorid
USP Ubiquitin-specific protease
verd. verdünnt
vHTS virtuelles Hochdurchsatz-Screening
Vif Virion infectivity factor
wt Wildtyp
Δ Deletion

Einleitung

Die vorliegende Dissertation beschreibt die Suche nach potentiellen Wirkstoffen gegen die Krankheitserreger SARS-Coronavirus und HI-Virus. Allgemein betrachtet kann die Wirkstoffsuche in der Tier- und Pflanzenwelt beginnen und das Ziel bei diesem Ansatz ist, einen wirksamen Bestandteil aus einem Stoffgemisch natürlicher Herkunft zu identifizieren und zu isolieren. Ein anderer Ansatz beginnt mit einem synthetisch erzeugten Reinstoff, der an lebenden Modellsystemen (z. B. an Krankheitserregern oder Organpräparaten) auf pharmakologische Effekte untersucht wird. Diese erfolgreichen Wege konnten in den letzten 30 Jahren um einen weiteren Ansatz bereichert werden, der auch in dieser Arbeit Anwendung fand. Dabei wird ein molekularbiologisch erforshtes Protein (z. B. ein Enzym oder Rezeptor) als konkretes „Angriffsziel“ („target“) für den zukünftigen Wirkstoff ausgewählt. Der erste Schritt in der Wirkstoffentwicklung („drug design“) besteht nun darin, organische Moleküle („Liganden“) zu suchen oder maßgeschneidert zu synthetisieren, die dieses Zielprotein „angreifen“ (adressieren), worunter eine Interaktion zu verstehen ist, die zu einer bestimmten Funktionsänderung des Proteins führt. In jüngster Zeit ermöglichte der zusätzliche Einsatz computerbasierter Methoden eine effizientere Wirkstoffsuche und Wirkstoff-Weiterentwicklung. Die Reaktion zwischen Ligand und Protein kann vorausberechnet werden und dank Röntgenstrukturanalyse existieren reale Abbilder der molekularen Strukturen.

Ein Blick in die Vergangenheit zeigt, dass auch schon in den Anfängen der organischen Chemie enzymatische Reaktionen umfassend untersucht wurden: Der Würzburger Chemiker Emil Fischer entdeckte unter anderem den Einfluss der Stereoisomerie bei Substratmolekülen auf die Reaktionsfähigkeit mit Enzymen. Dieser zur damaligen Zeit erstaunliche Fund erweckte in Fischer das erstmals 1894 beschriebene Bild, dass sich Substrat und Enzym gegenseitig so ergänzen, wie es von Schlüssel und Schloss bekannt ist: Sie müssen geometrisch exakt ineinander passen, um miteinander interagieren und reagieren zu können^[1].

Inzwischen ist von vielen Enzymen bzw. Proteinen die molekulare, dreidimensionale Struktur bekannt und das Bild von Schlüssel und Schloss an vielerlei Punkten ungeeignet, um weitere Erklärungen davon abzuleiten. Trotzdem bleibt es eine Hilfe zur Veranschaulichung komplexerer Sachverhalte. Aus einer aufgeklärten Proteinstruktur ist damit – übertragen ins Schlüssel-Schloss-Modell – die genaue Stellung der Stifte des Schlosses ersichtlich. Ein Wirkstoff-Molekül, das die Proteinfunktion blockiert („Inhibitor“), entspräche dann einem Schlüssel, der sich mit den Stiften des Schlosses so gut verklemmt (oder verbindet), dass man ihn weder herausziehen noch das Schloss damit aufschließen kann.

Die computergestützte Entwicklung eines solchen Schlüssels könnte man – um in der Bildersprache zu bleiben – als 3D-Puzzle beschreiben. Der zu entwickelnde Schlüssel muss wie bei einem Puzzle durch räumliches Drehen und Wenden in eine Kavität des Proteins eingepasst werden. Eine Substanzbibliothek hält dafür einige Millionen „Puzzle-Stücke“ auf Vorrat. Außerdem kann das „Puzzle-Stück“ auch selbst entworfen werden, ein naheliegender Vergleich wäre das Feilen eines passenden Schlüssels. Jedoch ist man bei der Gestaltung des molekularen Schlüssels an die Gesetze der Chemie gebunden. Der Computer kann viele Molekül-Vorschläge geben, die alle in die Kavität passen sollten. Auch können eigene Molekül-Ideen sofort am Computer auf „Passgenauigkeit“ überprüft werden. Die Schwierigkeit besteht nun darin, ein Molekül zu entwickeln, welches sowohl in die Kavität passt, als auch möglichst lange in dieser verweilt. Ein Molekül muss also zur Protein-Kavität („Bindetasche“) eine möglichst hohe Affinität haben, um eine Wirkung entfalten zu können. Ist ein Protein an einem Krankheitsverlauf, oder wie bei dieser Arbeit,

an der Vermehrung von Viren beteiligt, kann die Behinderung der Proteinfunktion durch Wirkstoff-Moleküle zu einer Verminderung der Virus-Replikation und damit Besserung der Krankheit führen.

Die Arbeit lässt sich thematisch in die zwei Projekte SARS und HIV einteilen. Beim SARS-Projekt sollten Wirkstoffe gegen das SARS-Coronavirus entwickelt werden, die ihre Wirkung über die Inhibition des viralen Enzyms SARS-Coronavirus-Papain-like-Protease entfalten. Aus dem HIV-Projekt sollten Leitsubstanzen hervorgehen, die über einen indirekten und in Kapitel 1.2 näher erläuterten Mechanismus ihre Wirkung entfalten.

Im SARS-Projekt griffen die Arbeitsschritte a) der computergestützten Wirkstoffsuche, b) die chemische Synthese potentieller Wirkstoffmoleküle und c) die biochemische Testung dieser Moleküle auf ihre tatsächliche Wirkung, kontinuierlich ineinander. Beispielsweise wird ein laut Computer vielversprechendes Molekül anschließend im Labor hergestellt und daraufhin am Protein als wirkungslos getestet. Das Testergebnis bestimmt das weitere Vorgehen, im angesprochenen Fall ist die Modellvorstellung von Struktur und Wirkung zu korrigieren und zukünftige Moleküle werden in entsprechend anderer Gestalt hergestellt.

Das erste Kapitel dieser Arbeit beschreibt den biologischen Hintergrund und die geplante Vorgehensweise in den beiden Projekten SARS und HIV. In Kapitel 2 wird die Vorarbeit am Computer und die Wirkstoffsuche in freien Substanzbibliotheken vorgestellt. Kapitel 3 behandelt die computergestützte Entwicklung eigener Moleküle und deren präparative Synthese, und das 4. Kapitel erläutert die biochemische Testung und Enzymkinetik. Es erschien günstig, die zu den Verbindungen aus Kapitel 2 und 3 zugehörigen Testergebnisse direkt an entsprechender Stelle anzugeben, um sie anschließend interpretieren und diskutieren zu können. So bleibt dem Leser der Bezug zu den zuvor beschriebenen strukturellen Modifikationen erhalten. Die Erkenntnisse sind dabei immer als Ergänzung bisheriger Struktur-Wirkungsbeziehungen zu verstehen. Neben dem primären Ziel, ein möglichst affines Molekül zu entwickeln, wurde damit das sekundäre Ziel verfolgt, das Wissen über dieses virale Enzym und dessen Interaktion mit Liganden systematisch zu erweitern. Darüberhinaus kann die aufgezeigte Diskrepanz zwischen Theorie und Praxis zu einem besseren Verständnis von Protein-Ligand-Wechselwirkungen beitragen.

Die im HIV-Projekt angestellten Computerarbeiten werden in Kapitel 5 vorgestellt. Dieses Projekt ist Teil einer Kooperation mit dem Virologischen Institut der Universität Würzburg, das die biochemische Testung an HIV-infizierten Zellen übernahm.

In den Kapiteln 6 und 7 folgt die Zusammenfassung der Arbeit in deutscher und englischer Sprache. Abschließend wird im 8. Kapitel, dem Experimentalteil, auf die Synthese und Charakterisierung der Verbindungen eingegangen, die im Rahmen des SARS-Projekts dargestellt wurden.

1. Biologischer Hintergrund

1.1. SARS-Projekt: SARS-CoV-PL^{pro} als Zielprotein

Die Krankheit SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome) wurde im November 2002 erstmals in der chinesischen Provinz Guangdong beobachtet. Die Ausbreitung erfolgte rasch, und die Erkrankten steckten mittels Tröpfcheninfektion Personen in nächster Nähe an, sodass besonders Ärzte, Pflegepersonal und Angehörige infiziert wurden. Die Symptome reichen von denen einer Influenza-Infektion bis zu denen einer atypischen Lungenentzündung. Antibiotika konnten den Krankheitsverlauf nicht bessern und der Verdacht fiel schnell auf eine virale Infektion. Im April 2003 wurde dann von der WHO das neue Coronavirus als Ursache für die Erkrankungen bestätigt^[2]. Das SARS-Coronavirus steht seitdem im Mittelpunkt molekularbiologischer und medizinisch-chemischer Forschung.

Insgesamt forderte die Epidemie 2002/2003 bei 8.000 infizierten Personen ca. 800 Opfer, die letzten vereinzelten Krankheitsfälle ereigneten sich im Winter 2003/2004^[3]. SARS-CoV-ähnliche Coronaviren lassen sich jedoch weltweit in Fledermäusen nachweisen, von denen sie vermutlich auch initial auf den Menschen oder einen Zwischenwirt, wie die in China zum Verzehr gehaltene Schleichkatze, übertragen wurden^[4]. Eine neue Lungen- und Nierenkrankheit wurde im Juni 2012 bei wenigen Patienten im mittleren Osten beobachtet und auf den neuartigen Coronavirus hCoV-EMC zurückgeführt^[5]. Es ist daher von einer bestehenden Bedrohung durch den erneuten Ausbruch von SARS-like-CoV assoziierten Krankheiten auszugehen.

Aufbau und Eigenschaften des SARS-Coronavirus

Das SARS-Coronavirus zählt zur Familie der Coronaviridae in der Ordnung Nidovirales. Es ist von einer Membran umhüllt, in welche das S-Glykoprotein (= Spike-Protein, Molekulargewicht 139 kDa, s. Abb. 1-1) sowie das Membran- und Hüllprotein eingebettet sind^[3].

Das vierte Strukturprotein befindet sich im Inneren, es ist das Nukleokapsid. Dieses umgibt das Genom des Virus, eine ca. 30.000 Basen lange, einzelsträngige +RNA. Das Genom kodiert die angesprochenen vier Strukturproteine, acht akzessorische Proteine (unterstützen Replikation und erhöhen Pathogenität) und 16 Nichtstrukturproteine, die sog. „Replikaseprodukte“^[6]. Die weitgehend unklaren Funktionen der akzessorischen Proteine werden von McBride und Fielding^[7]

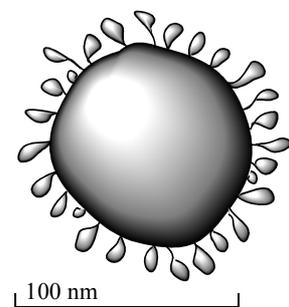


Abb. 1-1: Skizziertes Coronavirus: Das große Spike-Protein erscheint im Elektronenmikroskop als Corona.

diskutiert: Über verschiedene Mechanismen erhöhen sie vermutlich die Replikation und Pathogenität der Viren.

Die Infektion von Pneumocyten oder Enterozyten beginnt mit dem Anheften des Spike-Proteins an ACE2^[8]. Nach Aufnahme des Virus in das Cytosol werden durch Translation der viralen +ssRNA an Ribosomen die beiden Replikase-Polyproteine ppla und pplab erzeugt. Darin befinden sich zwei Proteasen, die Main-Protease und die Papain-like-Protease (im Unterschied zu anderen Coronaviren besitzt das SARS-CoV nur eine statt zwei Papain-like-Proteasen), und diese setzen durch proteolytisches Prozessieren des viralen Polyproteins die 16 Nichtstrukturproteine nsp1 bis nsp16 frei. Diese Nichtstrukturproteine ordnen sich auf Vesikeln an und bilden damit die virale Replikase (RNA-Polymerase, bzw. „Replikase-Komplex“). So wird die Replikation großer Mengen viraler +ssRNA ermöglicht. Translatierte Nukleokapsid-Proteine lagern sich dann mit der viralen +ssRNA zusammen, durchqueren

eine Membran („Budding“) im Bereich des Prä-Golgi- oder Golgi-Apparats und erhalten dabei ihre Hülle. Als Golgi-Vesikel werden die neuen Viren dann aus der Zelle ausgeschleust^[9].

Die beiden Proteasen Main-Protease (M^{pro}) und Papain-like-Protease (PL^{pro}) nehmen folglich eine Schlüsselrolle zur Replikation des SARS-CoV ein und sind damit potentielle Zielproteine zur Entwicklung antiviraler Wirkstoffe („drug targets“). Erwähnt sei auch nsp13, die virale Helicase: Sie trennt doppelsträngige RNA und wird auch als potentielles „drug target“ angesehen^[10].

Das SARS-Coronavirus ist für ein umhülltes Virus relativ widerstandsfähig, einige Antiseptika zeigen in der üblichen Verdünnung keine Wirkung, und Viren bleiben in eiweißhaltigen Medien wie Sputum über 96 Stunden infektiös^[11]. Damit ist neben der Tröpfcheninfektion auch die Schmierinfektion als Übertragungsweg wahrscheinlich.

Therapie

Die Behandlung der SARS-Patienten erfolgte 2002/2003 hauptsächlich symptomatisch: Fiebersenkung und künstliche Beatmung stabilisierten die intensivmedizinisch betreuten Patienten. Therapieversuche mit Antibiotika, Interferon-alpha, HIV-Protease-Inhibitoren, Ribavirin und Glucocorticoiden wurden unternommen, deren Wirkung war jedoch fragwürdig und im Nachhinein betrachtet zum Teil sogar schädlich (v.a. Ribavirin und Glucocorticoide)^[12]. Die Begrenzung der Epidemie konnte schließlich nur durch besondere Vorsichtsmaßnahmen beim Pflegepersonal und durch strikte Quarantäne aller Verdachtsfälle erreicht werden.

Im Rahmen einer Impfstoffentwicklung ist es bisher gelungen, gegen das SARS-CoV-Spike-Protein im Mausmodell Antikörper hervorzurufen: Sowohl transgene Tomaten- und Tabakpflanzen, welche das Spike-Protein produzierten, führten nach oraler Aufnahme zur Antikörperproduktion^[13], als auch die sublinguale Verabreichung rekombinanter Adenoviren, denen das Gen für das Spike-Protein zugefügt wurde^[14].

Die Entwicklung von antiviralen Wirkstoffen ist für die viralen Zielproteine Helicase^[15], Main-Protease^[16] und Papain-like-Protease^[17,18,19,20,21] in der Literatur beschrieben. Abbildung 1-2 gibt eine Übersicht über die publizierten Inhibitoren der SARS-CoV-Papain-like-Protease. Typische Cysteinprotease-Inhibitoren (E64, Cystatin, Leupeptin, u.a.) zeigen dagegen keine Hemmwirkung^[22].

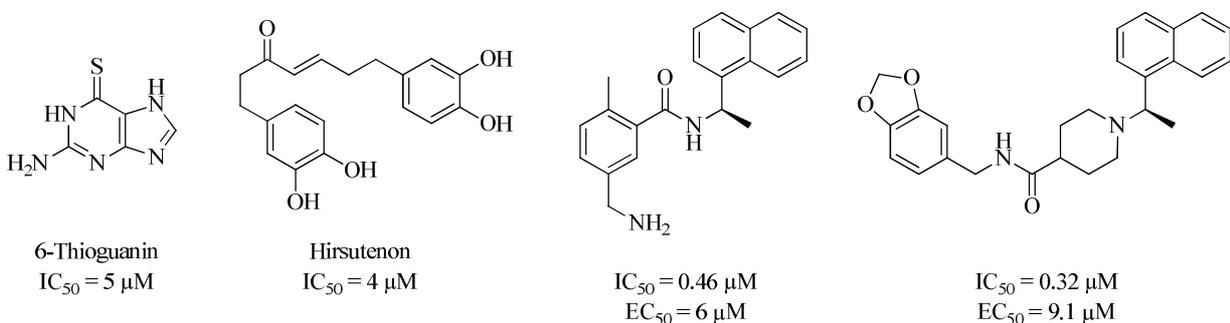


Abb. 1-2: Inhibitoren der SARS-CoV- PL^{pro} : Abgebildet ist jeweils der affinste Vertreter seiner Substanzklasse: Thiopurine, Diarylheptanoide, Benzamide, Piperidincarboxamide. Die antivirale Aktivität (EC_{50}) wurde an Vero-E6-Zellen nach Infektion durch SARS-CoV-Urbani bestimmt.

Eigenschaften und Funktionen der SARS-CoV-PL^{pro}

Die Papain-like-Protease des SARS-Coronavirus ist eine Cysteinprotease und gehört dem Clan CA an. In diesem werden alle Papain-ähnlich gefalteten Cysteinproteasen zusammengefasst und weiter in Familien untergliedert^[23]. In der Familie C1, der sogenannten „Papain-Familie“, findet sich das aus *Carica papaya* isolierbare Papain wieder, sowie die Cathepsine (außer Cathepsin D) und einige für Parasiten relevante Cysteinproteasen wie Falcipain (*Plasmodium falciparum*), Rhodesain (*Trypanosoma brucei*) und Cruzipain (*Trypanosoma cruzi*). Zur Familie C16 zählt die SARS-CoV-PL^{pro}, sowie etwa 40 weitere Papain-like-Proteasen von anderen Coronaviren^[23]. Diese sind als Endopeptidasen an der Prozessierung des viralen Polyproteins beteiligt. Weiterhin ist in diesem Zusammenhang noch Familie C19 erwähnenswert, zu dieser gehören über 60 humane Ubiquitinhydrolasen, wie beispielsweise USP7 (auch „HAUSP“ genannt)^[24]. Die SARS-CoV-Papain-like-Protease hat ebenfalls wie die USPs deubiquitinierende Aktivität^[25] und ist diesen in der Faltung ähnlich (ein sog. Fingerbereich bildet die Ubiquitin-Bindedomäne), obwohl diese Proteasen nur eine geringe Sequenz-Ähnlichkeit besitzen.

Eine Veranschaulichung der Papain-ähnlichen Faltung gibt Abbildung 1-3 links; dort wurden die drei erwähnten parasitären Cysteinproteasen überlagert, die im übrigen auch Cathepsin-L-ähnlich sind. Die katalytische Triade besteht bei diesen aus Cystein, Histidin und Asparagin. Rechts ist die 35 kDa schwere SARS-CoV-PL^{pro} abgebildet, bei ihr wird die katalytische Triade von Cystein-112, Histidin-273 und Asparaginsäure-287 gebildet.

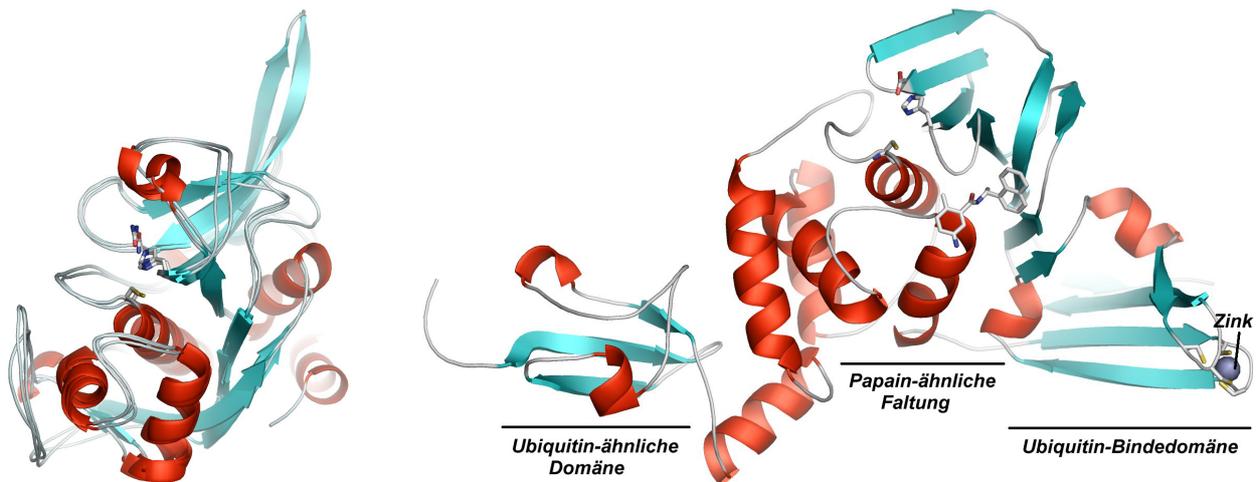
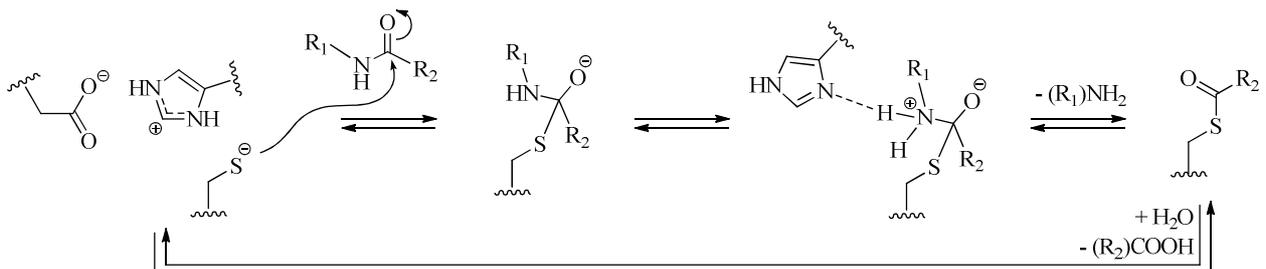


Abb. 1-3: Links: Überlagerung von Falcipain, Rhodesain und Cruzipain. Rechts: SARS-CoV-Papain-like-Protease (Struktur 3E9S mit Inhibitor).

Bei der SARS-CoV-PL^{pro} liegt das katalytisch aktive Cystein-112 präkatalytisch mit Histidin-273 als Ionenpaar vor^[22]. Das peptidische Substrat wird im ersten Schritt vom Cystein-Thiolat nukleophil angegriffen. Es bildet sich ein tetraedrischer Übergangszustand mit Oxyanion, der nach Abgang des neuen N-Terminus (R₁) das vom C-Terminus (R₂) acylierte Enzym ergibt. Hydrolyse des Thioesters setzt den C-Terminus frei und regeneriert das Enzym^[26]:



Schema 1-1: Katalytischer Mechanismus von Papain-ähnlichen Proteasen mit katalytischer Triade. Die dritte Aminosäure kann Asn oder Asp sein.

Die Hauptfunktion^[6] der SARS-CoV-PL^{pro} ist die Spaltung des viralen Polyproteins an den folgenden drei Schnittstellen: nsp1↓nsp2↓nsp3↓nsp4. Dabei befindet sich die Protease selbst innerhalb des 213 kDa nsp3-Replikaseprodukts, von dort aus erkennt die Protease das Motif LXGG und schneidet nach diesem, am Beispiel nsp1↓nsp2: ₁₇₇LNGG↓AVT₁₈₃. Das Polyprotein lagert sich dazu vor der Spaltung mit seiner Erkennungssequenz an die Enzymoberfläche an (vgl. Schlüssel-Schloss-Prinzip) und geht dabei günstige Wechselwirkungen (hydrophile, lipophile, ionische) mit dem Protein ein. Oft ist der Anlagerungsbereich eine konkave Furche auf der Proteinoberfläche und wird als „active site cleft“ bezeichnet.

Am aktiven Zentrum (Cystein-112) findet die Peptidhydrolyse statt (s. Abb. 1-4). In der Terminologie nach Schechter und Berger^[27] werden ausgehend von der Schnittstelle die Aminosäuren der Peptidsequenz mit P1, P2, usw. (Richtung N-Terminus) und P1', P2', usw. (Richtung C-Terminus) bezeichnet. Die komplementären Bereiche des Proteins werden als Substratbindetaschen bezeichnet und entsprechend mit S1, S2, usw. durchnummeriert. Die Substrat-Spaltung erfolgt dann wie zuvor erläutert durch das aktive Zentrum.

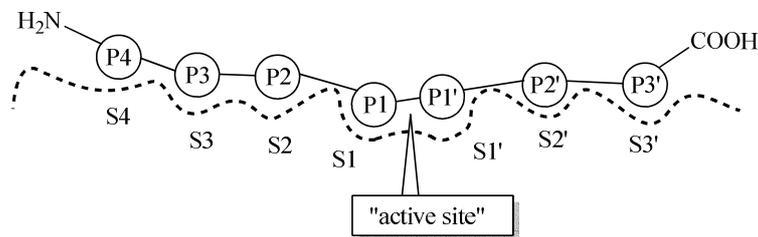


Abb. 1-4: Terminologie nach Schechter und Berger

Auf der Suche nach weiteren Funktionen der SARS-CoV-Papain-like-Protease wurde deren hohe Deubiquitinase-Aktivität näher charakterisiert^[25,28]. Bis heute ließ sich jedoch kein zelluläres Substrat finden, das von der PL^{pro} deubiquitiniert wird. Nachdem jedoch polyubiquitinierte Proteine dem Proteasom zugeführt werden, wurde die Theorie aufgestellt, dass die PL^{pro} den viralen Replikase-Komplex dadurch schützen könnte, indem sie diesen bei eventueller Ubiquitinierung wieder deubiquitiniert^[29]. Dafür spricht der Umstand, dass nsp3 (beinhaltet die PL^{pro}) als membranständiges Protein sich in der Nähe oder auf den selben Vesikeln befindet, auf denen auch der Replikase-Komplex ist. Außerdem wurde von Alvarez et al.^[30] die Koloaliation von nsp3 und Hüllprotein E im perinukleären Bereich sowie deren direkte Interaktion nachgewiesen. Nach Alvarez et al. ergibt sich damit die mögliche Funktion, dass nsp3 das Hüllprotein einfängt und in die Nähe des Replikase-Komplexes transportiert. Weiterhin ist das Hüllprotein auch in ubiquitiniert Form beobachtet worden, sodass eine Aufgabe der PL^{pro} sein könnte, dieses Ubiquitin wieder abzuspalten. Diese Überlegungen werden jedoch von Alvarez et al. damit relativiert, dass das Hüllprotein E für die Infektivität des Virus nicht relevant ist.

Eine weitere Beobachtung bei SARS-CoV-infizierten Zellen ist die Unterdrückung einer Interferon-Antwort. Das SARS-Coronavirus kodiert mindestens 7 Interferon-antagonistische Gene, wobei auch nsp3 an der IFN-Suppression beteiligt ist, indem es entweder die Aktivierung von IRF3 oder dessen Signalweg antagonisiert^[31]. Die Ubiquitin-ähnliche Domäne der PL^{pro} (s. Abb. 1-3) scheint dafür mitverantwortlich zu sein, obwohl sie alleine nicht dazu in der Lage ist. Die katalytische Aktivität der PL^{pro} ist dabei zur IFN-Suppression nicht nötig, da die C112A-Mutante ebenso die IFN-Antwort unterdrückt. Einzelne Mutation anderer Aminosäuren (D287A, W94A) führen hingegen zum Verlust der IFN-antagonistischen Aktivität^[31] – in diesen Fällen wird vermutlich die Tertiärstruktur der PL^{pro} durch die Mutation verändert, sodass entscheidende Protein-Protein-Kontakte nicht zustande kommen. Neuere

Untersuchungen von Sun et al.^[32] konnten zeigen, dass die Interaktion zwischen SARS-CoV-PL^{pro} und dem STING-Protein (Stimulator of Interferon Genes) eine bedeutende Rolle spielt: STING ist an der Erkennung viraler RNA beteiligt, bei der Aktivierung von STING dimerisiert es und wird ubiquitiniert. Im Komplex mit weiteren Proteinen wird daraufhin der Transkriptionsfaktor IRF3 aktiviert, der die IFN-Antwort auslöst. Eine direkte Interaktion zwischen PL^{pro} und STING ist wahrscheinlich, nachdem Immunopräzipitation von STING (getagged mit Flag) die PL^{pro} copräzipitiert und auch mittels Konfokalmikroskopie deren intrazelluläre Colokalisation gezeigt wurde^[32]. Durch die PL^{pro}/STING-Interaktion soll die Aktivierung von STING blockiert sein, sodass IRF3 nicht aktiviert wird und damit die IFN-Antwort nicht ausgelöst wird. Inwiefern die katalytische Aktivität der PL^{pro} bei der Blockade der STING-Dimerisierung und/oder STING-Ubiquitinierung benötigt wird, ist noch nicht widerspruchsfrei geklärt.

1.2. HIV-Projekt: Elongin-C als Zielprotein

Das HI-Virus führt bei infizierten Personen nach einer oft mehrjährigen Inkubationszeit zu einem Verlust von Immunabwehrzellen (CD4-T-Helferzellen). Das schwächer werdende Immunsystem kann ab etwa 200 CD4-Helferzellen pro Mikroliter opportunistische Krankheitserreger nicht mehr ausreichend abwehren^[33] und man spricht vom erworbenen Immundefizienzsyndrom (AIDS). Der AIDS-Patient stirbt letztlich an den sich ungehindert vermehrenden Krankheitserregern der Sekundärinfektion.

Nach Schätzung des RKI^[34] lebten Ende 2012 in Deutschland rund 78.000 HIV-Infizierte (63.000 Männer, 15.000 Frauen und 200 Kinder). Im Jahr 2012 steckten sich 3.400 Menschen neu an und 550 verstarben. Weltweit betrachtet liegt die HIV-Prävalenz jedoch bei etwa 0.8%^[35]. Zu den Pandemie-Regionen mit hoher Prävalenz (>1%) zählen die afrikanischen Länder südlich der Sahara, die Karibik und Russland.

Trotz intensiver Forschung wurde noch keine Therapie gefunden, die den HIV-Patienten vollständig vom HI-Virus befreit und damit heilt.

Aufbau und Eigenschaften des Humanen Immundefizienz Virus

Das HI-Virus ist wie das SARS-Coronavirus ein RNA-Virus, gehört jedoch der Familie der Retroviridae an (Gattung *Lentivirus*). Aus der Virus-Hüllmembran ragen einige wenige Spikes heraus^[36] (vgl. Abb. 1-5). Ein Spike besteht aus drei Molekülen Oberflächen-Glykoprotein gp120 und drei Transmembran-Molekülen gp41. Weiterhin sind in die Hüllmembran Proteine des Wirts eingelagert und an der Innenseite befinden sich Matrixproteine^[37].

Im Virus-Innern befinden sich weitere Wirtsproteine, die HIV-Protease (eine Aspartat-Protease) und das keulenförmige Viruskapsid. Das Viruskapsid beinhaltet akzessorische Proteine, die Reverse Transkriptase, die Integrase und zwei Kopien des 9.200 Basen langen +ssRNA Genoms, assoziiert mit dem Nukleokapsid-Protein. Das Virusgenom kodiert die drei lentiviralen Hauptgene Gag, Pol und Env, sowie regulatorische Gene (Tat, Rev) und Gene für akzessorische Proteine (Nef, Vif, Vpr, Vpu und Vpx)^[38].

In der menschlichen Population sind zwei verschiedene Arten HI-Viren verbreitet: HIV-1 und HIV-2. Diese können weiter in Subgruppen und Subtypen untergliedert werden, die verschiedene Prävalenzen je nach Region und Patientengruppe aufweisen^[39].

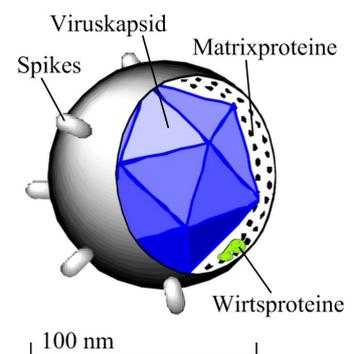


Abb. 1-5: Skizziert HI-Virus

Das HI-Virus befällt CD4-positive Zellen (dies sind vor allem T-Helferzellen und Monocyten), der Zelleintritt (Fusion) wird durch die Interaktion mit dem viralen gp120 und dem zellmembranständigen CD4-Protein ermöglicht, und die virale Membran verschmilzt mit der zellulären. Die +ssRNA der Retroviren wird nicht wie bei normalen RNA-Viren von Ribosomen translatiert, sondern muss zunächst von der Reversen Transkriptase in DNA umgeschrieben werden, die dann von der viralen Integrase in das menschliche Genom integriert wird. Die integrierte DNA („Provirus“) wird im Zellkern zu mRNA transkribiert und diese von Ribosomen im Cytosol zu viralen Vorläuferproteinen translatiert. Die Vorläuferproteine lagern sich mit den anderen, am Virus-Aufbau beteiligten Proteinen zusammen und bilden unreife Virione. Die Reifung geschieht durch das Zusammenspiel von zahlreichen Proteinen, unter anderem prozessiert die HIV-Protease dabei die viralen Vorläuferproteine. Morphologisch schnüren sich die Viruspartikel währenddessen von der Zellmembran ab und gelangen als infektiöse Partikel in Blut- und Lymphbahn^[40].

Die Mutationsfähigkeit der HI-Viren geht hauptsächlich auf die hohe Fehlerrate (1:10.000) der Reversen Transkriptase zurück, sodass die Viren einer beschleunigten Evolution unterliegen^[41]. Die Umweltstabilität des HI-Virus ist ausgesprochen hoch, kontaminiertes „Spritzbesteck“ bleibt ein bis zwei Monate infektiös^[42], kann aber durch Spülen mit Isopropanol (70% V/V) oder 0.5%iger Natriumhypochlorit-Lösung sicher desinfiziert werden^[43].

Therapie

Man erhofft sich von einem wirksamen Impfstoff die größte Erfolgschance auf Heilung, doch die Impfstoffentwicklung scheitert seit der Entdeckung des Virus an dessen hoher Wandlungsfähigkeit^[44].

Dagegen wurden bereits zahlreiche niedermolekulare Wirkstoffe gegen Zielstrukturen des Virus entwickelt und werden zur medikamentösen Langzeittherapie eingesetzt. Kein Wirkstoff ist jedoch in der Lage, die Virusreplikation vollständig zu verhindern. Hinzu kommt, dass befallene CD4-Zellen das virale Genom als Provirus in ihrer DNA tragen und damit ein Reservoir darstellen, das nicht mittels Wirkstoffen erreicht werden kann. Eine Übersicht über verschiedene, antiretrovirale Wirkstoffe gibt Abbildung 1-6.

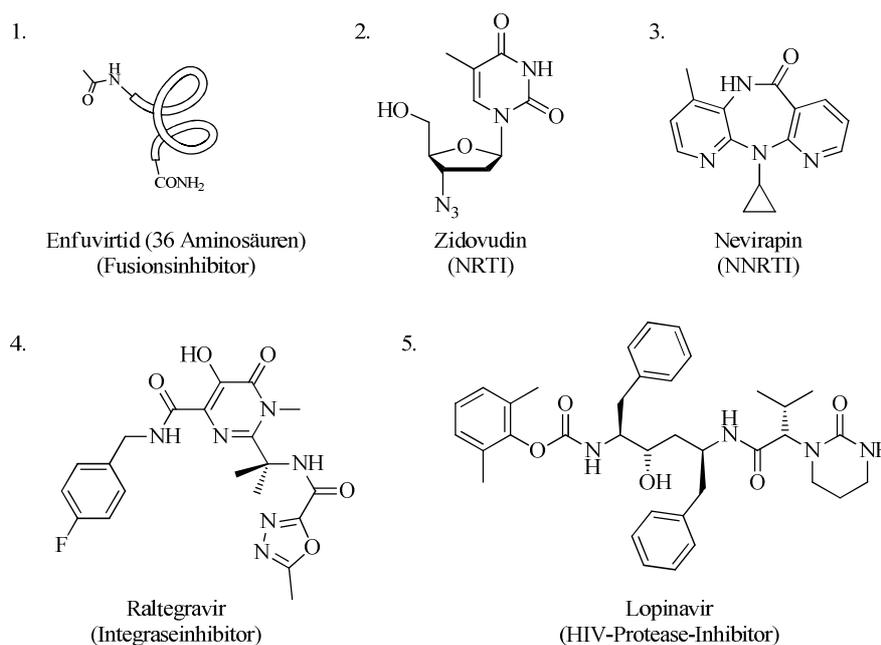


Abb. 1-6: Auswahl zugelassener, antiretroviraler Wirkstoffe

Die Einteilung der Wirkstoffe erfolgt durch ihren Wirkmechanismus. So verhindern Fusionsinhibitoren das Verschmelzen von Virus- und Wirtszellmembran, indem sie die rezeptorvermittelte Anlagerung von Virus und Wirtszelle blockieren. Nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) werden nach dreifacher Phosphorylierung als falsche DNA-Bausteine in das reverse Transkript eingebaut und unterbrechen die Reverse Transkriptase-Reaktion. Ein anderer Mechanismus liegt den nichtnukleosidischen Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI) zugrunde: Sie binden alloster an die Reverse Transkriptase und hemmen dadurch die enzymatische Aktivität. Das Enzym HIV-Integrase wird von Integraseinhibitoren gehemmt, sodass diese Wirkstoffe die Integration des reversen Transkripts in die menschliche DNA verhindern. Schließlich binden HIV-Protease-Inhibitoren als Übergangszustandsmimetika am aktiven Zentrum der HIV-Protease und verhindern so die Prozessierung viraler Vorläuferproteine^[45].

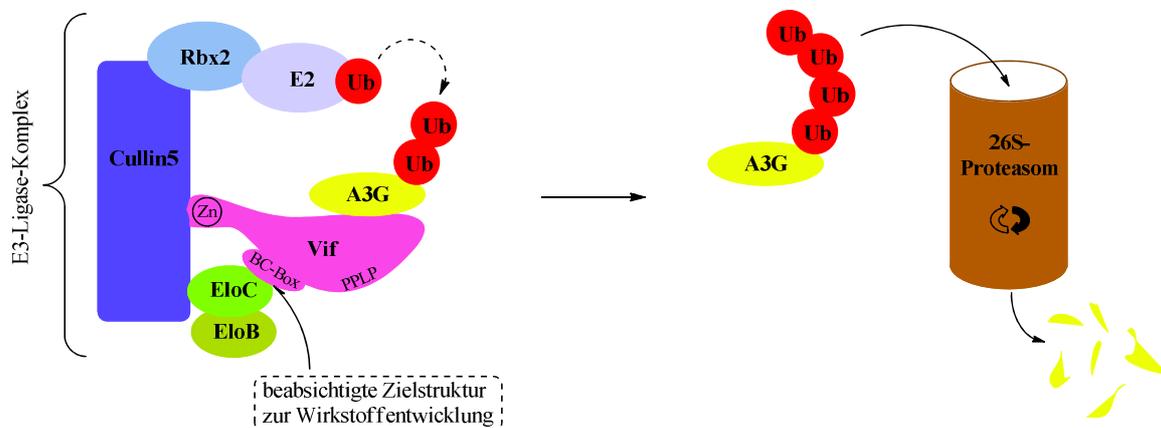
Der HIV-Protease-Inhibitor Ritonavir wird außerdem in geringer Dosis (100 mg) als „Booster“ eingesetzt. Dessen starke Cytochrom P450 3A4-Hemmung verstärkt die Wirkung anderer, gleichzeitig verabreichter HIV-Protease-Inhibitoren, da deren Elimination durch die CYP3A4-Hemmung deutlich verlangsamt wird^[46].

Die übliche Langzeittherapie ist die HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy). Bei ihr werden mehrere antiretrovirale Wirkstoffe kombiniert, beispielsweise zwei nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren (2x NRTI) und ein HIV-Protease-Inhibitor (PI). Die Viruslast wird dadurch über lange Zeit unter die Detektionsgrenze gesenkt und somit die Zerstörung des Immunsystems um viele Jahre aufgeschoben. Gleichzeitig wird die Resistenzentwicklung der Viren verlangsamt^[46].

Elongin-C: Ein neuer Ansatz

Das HI-Virus nützt mehrere Möglichkeiten, um dem Immunsystem zu entkommen („immune evasion“). Die hohe Mutationsfähigkeit (Variation der viralen Epitope) und die stark glykosylierten Proteine („glycan shield“^[47]) der Lipidhülle zählen dabei zu den bedeutendsten Methoden^[40].

Eines der zellulären Viren-Abwehrsysteme ist das Apobec3G-Enzym^[48] (A3G): Es wird mit in den Virus inkorporiert und editiert in diesem bei der reversen Transkription auf dem erzeugten –ssDNA-Strang Cytosin zu Uracil (Desaminierung). Als Folge wird entweder die virale –ssDNA abgebaut, oder bei der Synthese des +ssDNA-Strangs die Mutation G → A realisiert. Außerdem wird eine direkte Blockade der Reversen Transkriptase durch A3G diskutiert. HIV-1 hat jedoch einen Mechanismus entwickelt, um der „Hypermuation“ durch A3G zu entgehen: Das HIV-1 Vif-Protein („Virion Infectivity Factor“, ein strukturell ungeordnetes Protein^[49] mit 192 Aminosäuren) führt A3G an den E3-Komplex des Ubiquitin-Pathways, A3G wird von diesem polyubiquitiniert und damit für den proteasomalen Abbau markiert:



Schema 1-2: HIV-1 Vif schleust A3G in den Ubiquitin-Pathway ein. (In Anlehnung an Bergeron et al.^[50])

Als mögliche Zielstrukturen zur Entwicklung eines niedermolekularen Protein-Protein-Interaktionsinhibitors kommen damit nach Schema 1-2 die Proteinkontakte von Cullin5/EloC, EloC/Vif, und Vif/A3G in Frage. Bergeron et al.^[50] beschreiben einen weiteren Kontakt zwischen EloB und dem PPLP-Motif von Vif (Untersuchung mittels ¹⁵N-NMR), der nur zur Rekrutierung von Cullin5 eine Rolle spielt, zur Ausbildung des EloBC/Vif-Komplexes aber abkömmlich ist: Die ΔPPLP-Mutante von Vif bleibt bei Gelfiltration an EloBC gebunden und bindet außerdem mit gleicher Affinität an EloBC, wie Wildtyp-Vif.

Prinzipiell wäre ein Ligand vielversprechend, der nur die Ausbildung der Tertiärstruktur von Vif stört, ohne die anderen Proteinkontakte zu behindern. Nachteil einer direkten Adressierung von Vif ist allerdings, dass vermutlich das Virus durch geeignete Punktmutation in Vif dem Wirkstoff ausweichen wird (Resistenzentwicklung). Ein an den humanen Proteinen angreifender Wirkstoff kann dagegen nicht durch Punktmutation in Vif umgangen werden, es sei denn, die Affinität von Vif ließe sich noch durch Mutation steigern und der Wirkstoff würde kompetitiv verdrängt.

Von den angesprochenen Proteinkontakten ist strukturell nur der EloBC/Vif₁₄₀₋₁₅₆-Komplex bekannt (Stanley et al.^[51], Struktur 3DCG), daher wurde der Proteinkontakt zwischen Elongin-C und der BC-Box von Vif zur strukturbasierten Wirkstoffentwicklung ausgewählt (s. Schema 1-2 und Kapitel 5). Ein Inhibitor dieser Protein-Protein-Interaktion sollte auf der Oberfläche des humanen Elongin-C binden und es damit blockieren, sodass der

Vif/A3G-Komplex nicht mehr mit dem E3-Ligase-Komplex in Verbindung treten kann und folglich keine Ubiquitinierung von A3G stattfindet.

Neben einer Serie von Zink-Chelatoren sind bisher drei Substanzklassen bekannt^[52,53,54], die über verschiedene Mechanismen die Konzentration von A3G in Vif-exprimierenden Zellen aufrechterhalten (s. Abb. 1-7). Für RN-18, IMB-26 und IMB-35 wird eine Störung der A3G-Vif-Wechselwirkung oder eine Herunterregulation von Vif diskutiert. Nach Untersuchungen des Virologischen Instituts Würzburg (B. Nowotny) konnte für RN-18 kein selektiver Wirkmechanismus über A3G/Vif festgestellt werden und die Verbindungen IMB-26 und IMB-35 wurden als toxisch charakterisiert (Daten bisher unveröffentlicht). Die 2012 veröffentlichte Verbindung VEC-5 soll dagegen die Protein-Protein-Interaktion zwischen EloBC und Vif inhibieren und neben erhöhten A3G- und Vif-Konzentrationen wurde als therapierelevanter Effekt auch die Infektivität des HI-Virus durch VEC-5 gesenkt.

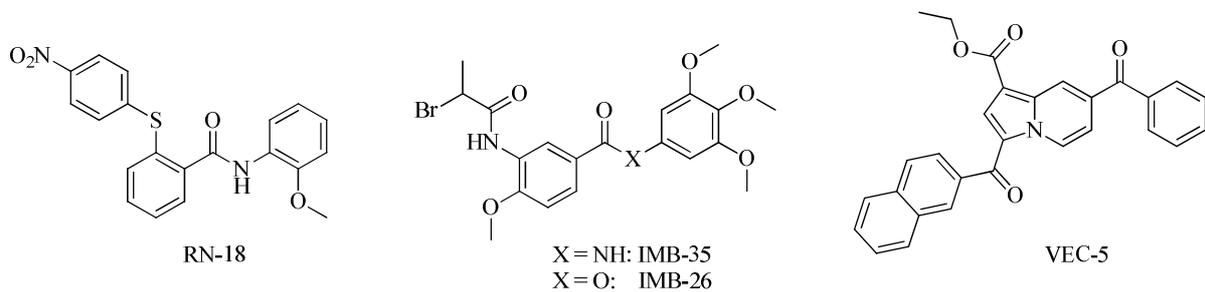


Abb. 1-7: Literaturbekannte Substanzen mit Vif-antagonistischer Aktivität

Kürzlich publizierten Monajemi et al.^[55] einen Artikel, in welchem sie die antiretrovirale Funktion von A3G bezweifeln: Zwar führe Vif-Defizienz bei gleichzeitiger Überexpression von A3G zu lethaler Hypermutation im retroviralen Genom, bei normaler A3G Expression sei es jedoch unklar, inwiefern A3G tatsächlich antiretroviral wirkt, oder durch moderate Mutation die Anpassungsfähigkeit der Viren erhöht. Weiterhin senkt die Vif-Expression nicht die A3G-Aktivität vollständig ab, sondern erzeugt einen A3G-Level mit ca. einem Enzym pro Virus. Somit wird den Viren neben der fehlerbehafteten reversen Transkription ein weiterer Mechanismus zur Mutation eröffnet. Daher schreiben Monajemi et al. Vif eine regulatorische Funktion zu, die es erlaubt, den A3G-Level so zu steuern, dass er der Virenvermehrung am besten dient. Ein reales Beispiel dazu liefert die Beobachtung von Vif-K22H-Mutanten, die bei therapieresistenten HI-Viren aus Patienten nachgewiesen wurden. Die Vif-K22H-Mutante besitzt niedrigere Aktivität hinsichtlich des A3G-Abbaus und wurde vermutlich unter dem Selektionsdruck der Arzneistofftherapie vom Virus evolviert, um durch gesteigerte A3G-Inkorporation die Mutations- und damit Anpassungsfähigkeit zu erhöhen^[55].

Aus diesen Überlegungen heraus kann nicht vorhergesagt werden, welche Auswirkung ein Elongin-C-Interaktionsinhibitor schließlich auf den HIV-1-Replikationszyklus haben würde. Doch unabhängig vom ursprünglichen Gedanken, einen Wirkstoff gegen HIV-1 zu entwickeln, stellt Elongin-C ein interessantes „drug target“ dar: Ein zellulärer Bindepartner von Elongin-C sind die sog. SOCS-Proteine (Suppressor Of Cytokine Signalling), die an der Unterdrückung einer durch Cytokine ausgelösten inflammatorischen Antwort (bspw. Interferone, Interleukine) beteiligt sind. Ein Mechanismus der SOCS-Proteine ist dabei, den von Cytokin aktivierten JAK/STAT-Rezeptor-Komplex dem proteasomalen Abbau zuzuführen. Diesen Mechanismus der SOCS-Proteine könnte man mit einem Elongin-C-Inhibitor blockieren. Auch hier besteht das Potenzial zur antiviralen Wirkung:

Akhtar und Benveniste^[56] fassen in ihrer Übersichtsarbeit zusammen, welche Viren eine Induktion von SOCS1-3 auslösen, um damit die zelluläre Interferonantwort zu unterdrücken (bspw. HCV, HIV-1, Influenza).

Eine Überexpression von Elongin-C wurde von Porkka et al.^[57] bei Prostata- und Brustkrebszellen festgestellt, wobei die pathobiochemische Beteiligung von Elongin-C noch unklar ist.

Cai et al.^[58] fanden über das beim Kaposi-Sarcom stark exprimierte LANA-1 heraus, dass LANA-1 an Elongin-C und an die Tumorsuppressor-Proteine p53 und p65 bindet und letztlich beide proteasomal abgebaut werden.

Ein weiterer Bindepartner von Elongin-C ist das zelluläre Tumorsuppressor-Protein VHL (Von Hippel Lindau), welches den pro-angiogenetischen Transkriptionsfaktor HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor) dem proteasomalen Abbau zuführt. Da VHL nur an oxidiertes HIF-1 α bindet und somit HIF-1 α einer Sauerstoff-abhängigen Regulation unterliegt, erscheint es jedoch kritisch, mittels Elongin-C/VHL-Blockade darauf Einfluss zu nehmen. Von der VHL-Krankheit ist bekannt, dass Patienten mit nicht-funktionsfähigem VHL-Protein eine gesteigerte Häufigkeit von Nierenzellkarzinomen und anderen Krankheiten aufweisen, was mit der fehlenden Regulation von HIF-1 α in Verbindung gebracht wird^[59]. VHL besitzt allerdings auch E3-Ligase-unabhängige Funktionen, der Interaktion mit Fibronectin wird beispielsweise auch eine tumorverhindernde Wirkung zugeschrieben^[60]. Außerdem würde ein niedermolekularer Elongin-C-Inhibitor nur zu einer vorübergehenden Herunterregulation des VHL-vermittelten HIF-1 α -Abbaus führen und kann nicht mit einem VHL-Gendefekt verglichen werden.

1.3. Aufgabenstellung der Arbeit

In dieser Arbeit sollen gegen die beiden Zielproteine SARS-CoV-Papain-like-Protease und Elongin-C niedermolekulare Inhibitoren entwickelt werden. Beide Proteine sind strukturell bekannt, sodass sich ein strukturbasiertes Vorgehen anbietet. Mittels computerbasierter Untersuchungen werden die Bindetaschen der Zielproteine analysiert und daraufhin virtuelle Screeningprojekte durchgeführt. Verbindungen, die im Docking gute Bindemodi in den Bindetaschen ergeben, können daraufhin erworben und im Bioassay auf Aktivität geprüft werden.

Beim SARS-Projekt sollen außerdem Inhibitoren durch chemische Synthese dargestellt werden. Sobald weitere Struktur-Wirkungsbeziehungen ermittelt sind, können auch Strukturen vom virtuellen Screening so abgewandelt und dann dargestellt werden, dass sie diese Struktur-Wirkungsbeziehungen besser erfüllen. Es bietet sich auch an, die literaturbekanntesten Inhibitoren vom Benzamid-Typ auf Basis von Docking- und Scoringmethoden in ihren Interaktionen zur Bindetasche zu verbessern. Eine weitere Herangehensweise stellt die Entwicklung kovalent reagierender Inhibitoren mit Aziridinbaustein dar (Kap. 2.6 und 3.10). Dabei wird beabsichtigt, das aktive Zentrum des Enzyms durch Alkylierung zu blockieren. Aufgrund der Ähnlichkeit deubiquitinierender Enzyme wäre es wünschenswert, durch geeignetes Inhibitor-Design auch andere Deubiquitinasen mehr oder weniger selektiv zu inhibieren: Deubiquitinasen sind mit zahlreichen Krankheiten und Tumorentstehung in Verbindung zu bringen und werden als zukünftige „drug targets“ angesehen^[24,61].

Beim HIV-Projekt liegt das Ziel darin, einen Protein-Protein-Interaktionsinhibitor von Elongin-C zu finden. Die biologischen Untersuchungen werden dabei vom Virologischen Institut Würzburg übernommen. Zunächst steht die Ermittlung einer Bindung an Elongin-C und einer davon abgeleiteten anti-HIV-Wirkung durch den verhinderten Abbau von A3G im Vordergrund biologischer Untersuchungen. Doch nachdem Elongin-C integraler Bestandteil des zellulären E3-Ligase-Komplexes ist, könnte dessen Blockade zu mehr Effekten als dem reinen HIV-1 Vif-Antagonismus führen. Der Eingriff in den Ubiquitin-Pathway wird bereits vom Proteasom-Inhibitor Bortezomib therapeutisch ausgenutzt und neben der Beeinflussung von Krebszellen wird auch eine Beteiligung des Ubiquitin-Pathways an der Pathogenität von Viren diskutiert, wobei im Speziellen Elongin-C durch den Vif-vermittelten Abbau von A3G (im Falle HIV-1) und den SOCS-vermittelten Abbau von JAK/STAT (im Falle zahlreicher Viren^[56]) ein interessantes Zielprotein ist. Therapeutisch nützliche Effekte ließen sich dann mit einem Elongin-C-Inhibitor durch geeignete Experimente ermitteln.

2. Computerbasierte Untersuchungen im SARS-Projekt

2.1. Analyse des Ligand-Bindemodus der Struktur 3E9S

2008 wurde die Röntgenkristallstruktur 3E9S von Ratia et al.^[18] veröffentlicht. In der Publikation wurde der exakte Bindemodus des damals besten Liganden aufgeklärt. Diese 3D-Proteinstruktur ist der Ausgangspunkt für das im Folgenden beschriebene, strukturbasierte Wirkstoffdesign. Die Wechselwirkungen des Liganden (Inhibitors) mit der Bindestelle können der Abbildung 2-1 entnommen werden.

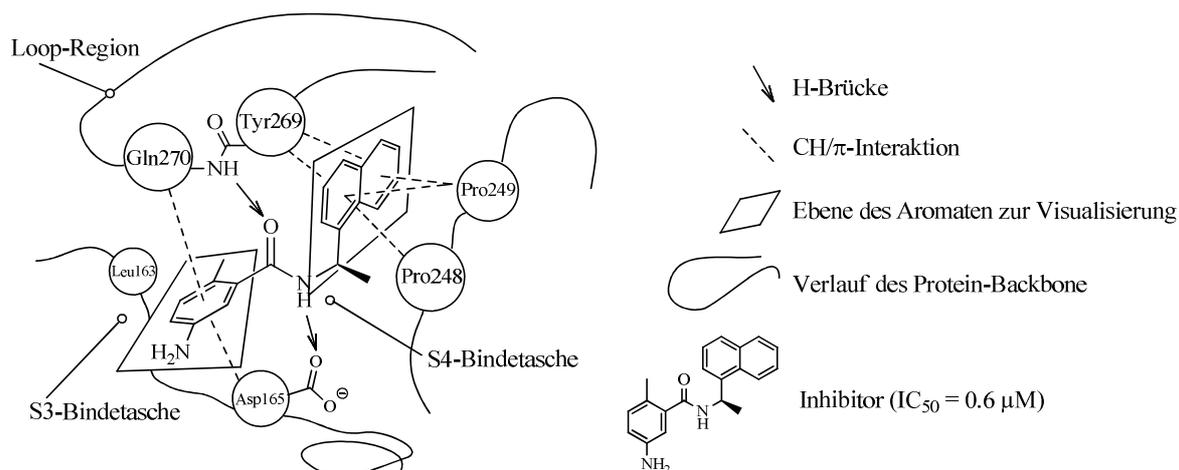


Abb. 2-1: Vereinfachte Darstellung des gebundenen Inhibitors in der Struktur 3E9S

Der Inhibitor ist 8 - 15 Å vom aktiven Zentrum (Cys112) entfernt im Bereich der S3- und S4-Bindetasche gebunden. Seine aromatischen Strukturelemente liegen in lipophiler Umgebung und die Amidgruppe bildet H-Brücken zum Backbone der Loop-Region (Gln270) und zur Seitenkette von Asp165^[18].

Streng genommen sollte nicht von lipophilen „Taschen“ gesprochen werden, da beide lipophilen Bereiche von nahezu allen Seiten solvenszugänglich sind. Der Ligand wird eher zwischen Loop-Region und gegenüberliegender Region „eingeklammert“, wobei alle aromatischen Ringe des Liganden geometrisch ideale CH/π-Interaktionen eingehen. Diese Interaktionsart wird von Nishio^[62] auch zu den H-Brücken-Bindungen gezählt. Die CH/π-Wasserstoffbrücken-Bindungen von Tyr269 mit dem Naphthyl-Rest können auch als „T-shape aromatic interactions“^[62] zweier Aromaten bezeichnet werden. Nach Nishio^[62] und Suezawa et al.^[63] wird die Bindungsenthalpie von CH/π-Interaktionen sowohl durch elektronenziehende Gruppen am Kohlenstoff der CH-Bindung verstärkt, als auch durch Erhöhung der Ladungsdichte im π-System. Funktionelle Gruppen mit +M oder -M Effekt sollten daher Einfluss auf die lipophilen Interaktionen (CH/π-Bindungen) des Liganden haben und die Affinität entsprechend erhöhen respektive erniedrigen. Dieser Zusammenhang wird von den in Abbildung 2-2 gegenübergestellten Inhibitoren bestätigt.

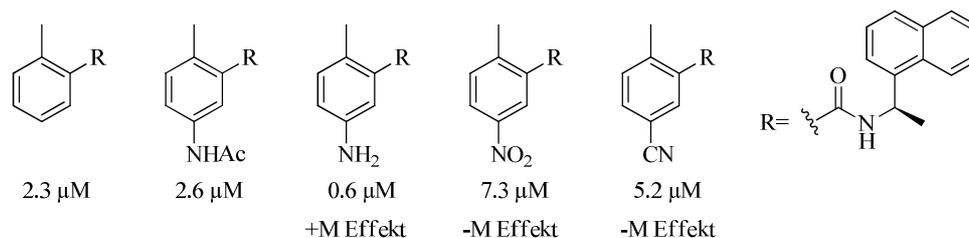


Abb. 2-2: Vergleich der IC_{50} -Werte publizierter Inhibitoren^[18,19]

Eine Erhöhung der Elektronendichte im Ring verstärkt die CH/ π -Interaktion und erhöht damit die Affinität des Inhibitors zum Enzym, verringerte Elektronendichte erniedrigt die Affinität der Inhibitoren (Abb. 2-2). Die acetylierte 5-Aminogruppe zeigt dabei wie erwartet keine affinitätsverändernde Wirkung im Vergleich zum unsubstituierten Derivat. Demnach kann angenommen werden, dass der Substituent in 5-Position auf die Affinität der Verbindung durch seinen intramolekularen, mesomeren Effekt Einfluss nimmt. In der Literatur^[18] wird die Affinitätssteigerung durch die 5-Aminogruppe stattdessen mit der H-Brücken-Donorfähigkeit zu umliegenden H-Akzeptoren erklärt. Eine nähere Auseinandersetzung mit den möglichen H-Brücken der 5-Aminogruppe erfolgt im nächsten Abschnitt dieses Kapitels.

In Abbildung 2-3 wird der gebundene Ligand aus einem anderem Blickwinkel betrachtet, wobei eine weitere Interaktion mit Tyr265 erkennbar ist, die in obiger Abbildung nicht dargestellt werden konnte:

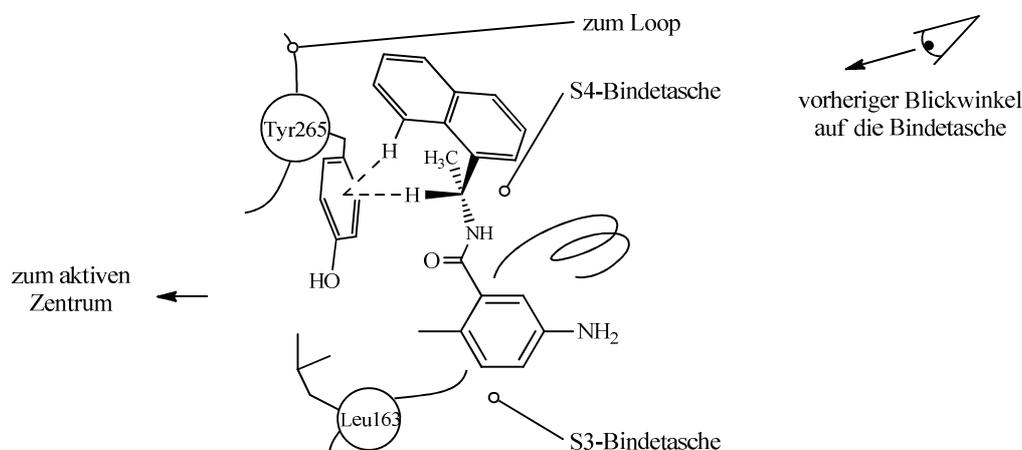


Abb. 2-3: Vereinfachte Darstellung, Blick von oben auf zwei zuvor verdeckte CH/ π -Interaktionen

Die Abbildung 2-3 zeigt in ihrer Mitte zwei CH/ π -Interaktionen, bei denen der Ligand H-Donor ist und das π -System von Tyr265 den H-Akzeptor stellt. Aus dem Blickwinkel von Abbildung 2-3 wird auch deutlich, dass am Chiralitätszentrum der Amin-Komponente bei diesem Bindemodus allein das *R*-Enantiomer toleriert wird, da das *S*-Enantiomer zu einer Überlappung mit Tyr265 führen würde („Clash“). Der Aktivitätsverlust durch *S*-Konfiguration wurde bereits von Ratia et al. mit einem 2-Naphthyl-substituierten Benzamid gezeigt^[18] und wird in Kapitel 3 ausführlicher aufgegriffen.

Genauere Betrachtung der Ligand-Interaktion zu Gln270

Um die Bindung eines Liganden an ein Protein besser verstehen zu können und Derivate mit gesteigerter Affinität zu entwickeln, muss vor allem denjenigen Strukturänderungen Beachtung geschenkt werden, die bisher zu einer Affinitätssteigerung der Inhibitoren führten. Die aromatische Aminogruppe in 5-Position des Benzamid-Inhibitors konnte den IC_{50} -Wert der Leitstruktur von $2.3 \mu\text{M}$ auf $0.6 \mu\text{M}$ verbessern^[18]. Die aromatische Aminogruppe verändert nicht nur die Ladungsdichte im Benzoesäure-Aromaten, sondern ist auch zu direkten Wechselwirkungen mit der Bindetasche fähig. Auf diese wird im Folgenden eingegangen.

Ratia et al.^[18] interpretierten die 5-Aminogruppe als H-Brücken-Donor zu den umliegenden H-Brücken-Akzeptoren Gln270, Glu168 oder Tyr269. Die räumliche Position der 5-Aminogruppe lässt laut Kristallstruktur 3E9S nur eine H-Brücke zum ϵ -Sauerstoff der Loop-Aminosäure Gln270 zu. Um diese zu veranschaulichen, wurde die Struktur 3E9S in MOE^[64] protoniert und die aromatische Aminogruppe manuell um 90° aus der Aromatenebene herausgedreht (Abb. 2-4). Angewandte Computermethoden (Kraftfeldminimierung in MOE, Docking in GOLD) ließen diese Rotation nicht zu und generierten zum Aromaten coplanare Geometrie, womit diese Konformation und diese H-Brücke zunächst als unwahrscheinlich erscheinen. Doch tatsächlich liegt laut Wang et al.^[65] die NH_2 -Ebene von Anilin bereits um 40° gedreht zur Aromatenebene vor. Die

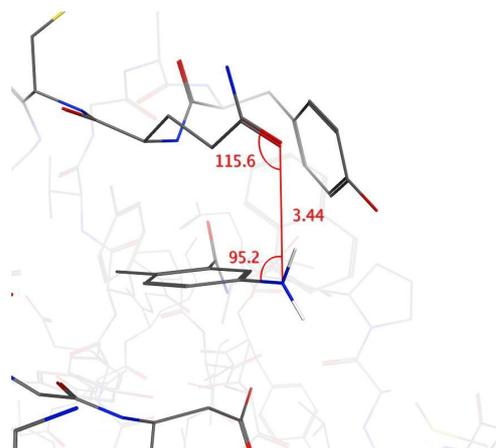


Abb. 2-4: Veranschaulichung der H-Brücke zu Gln270, Angabe von Winkeln ($^\circ$) und Abstand (\AA)

Rotationsbarriere beträgt 3.7 kcal/mol und ist damit im Bereich der Bindungsenthalpie einer neu gebildeten H-Brücke (im Modellsystem Anilin/ H_2O $3.6 - 4.8 \text{ kcal/mol}$ ^[66]). Jedoch zeigt dieser energetische Vergleich nur, dass es sich um eine ähnliche Größenordnung handelt, von einer gegenseitigen enthalpischen Kompensation kann nur begrenzt gesprochen werden, denn die aromatische Aminogruppe steht auch schon vor Ligandbindung in H-Brücken-Wechselwirkung zum Solvens und ist damit abgesättigt. Diese Solvensmoleküle können allerdings bei Protein-Ligand-Bindung freigesetzt werden und so wird über den Entropie-Term ein weiterer, günstiger Beitrag zur freien Ligand-Bindungsenthalpie (ΔG) erhalten, der die energetisch ungünstige Konformationsänderung ermöglichen könnte. Insgesamt muss die freie Ligand-Bindungsenthalpie nur um 0.5 kcal/mol verbessert werden, um die Affinität von $2.3 \mu\text{M}$ auf $0.6 \mu\text{M}$ zu steigern ($\Delta 1.4 \text{ kcal/mol}$ ändern die Affinität um eine Zehnerpotenz^[67]).

Aus der Röntgenkristallstruktur des Protein-Ligand-Komplexes kann jedoch weder die Position der H-Atome der 5-Aminogruppe, noch die Zuordnung von Sauerstoff und Stickstoff der endständigen Gln270-Amidgruppe entnommen werden. Daher stellt diese Interpretation der Röntgenstrukturdaten nur eine von mehreren plausiblen Möglichkeiten dar.

Eine weitere mögliche Annahme wäre, dass die aromatische Aminogruppe protoniert als Anilinium-Kation ($pK_a = 4.6$) vorliegt und die endständige Gln270-Amidgruppe als H-Brücken-Donor adressiert. Auch spräche dafür die räumliche Nähe zu den negativen Ladungen von Asp165 (5.4 \AA) und Glu168 (4.4 \AA).

Auf den Protonierungszustand der aromatischen Aminogruppe ließe sich schließen, falls die Röntgenkristallstruktur höher aufgelöst wäre. Szatyłowicz^[66] beschreibt die Abhängigkeit des Kohlenstoff-Stickstoff-Abstands aromatischer Aminogruppen von ihrer Protonierung. Demnach liegen die C-N-Abstände von Anilin als H-Donor und H-Akzeptor zwischen $1.37 - 1.42 \text{ \AA}$ und für das Anilinium-Kation (nur H-Donor) bei $1.44 - 1.48 \text{ \AA}$, erhoben aus Röntgen-

strukturen der CSD^[66]. Die Auflösung der Proteinstruktur 3E9S beträgt nur 2.5 Å, womit noch keine einzelnen Atome beobachtet werden können. Aus dem C-N-Bindungsabstand ($d_{\text{CN}} = 1.34 \text{ \AA}$) dieser Röntgenkristallstruktur darf kein Rückschluss auf den Protonierungszustand gezogen werden, da er vom verwendeten Kraftfeld beim Refinement stammt.

Abbildung 2-4 (s. oben) ist zu entnehmen, dass sich der Gln270-Carbonyl-Sauerstoff etwa orthogonal (95.2°) über der 5-Aminogruppe befindet, sodass die NH-Bindung nicht exakt auf den Carbonyl-Sauerstoff zeigt. Für H-Brücken ist dies eine suboptimale Geometrie. Eine andere Situation entsteht, wenn man in der endständigen Gln270-Amidgruppe NH_2 und Carbonyl vertauscht: Dann zeigt die Gln270-NH-Bindung senkrecht auf die aromatische Aminogruppe. Um ein realitätsnahes Modell zu erhalten, wird diese manuell veränderte Struktur ab dem β -Kohlenstoff von Gln270 und beim Ligand im Benzoessäure-Teil mit MOE energieminimiert (Abb. 2-5). Nach Wang et al.^[65]

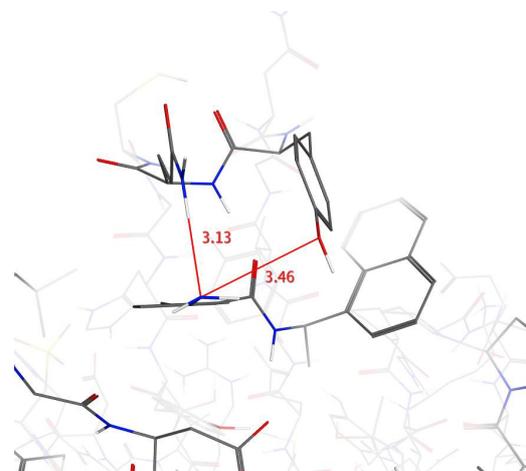


Abb. 2-5: Modelling der neuen H-Brücken-Geometrie mit Anilin als H-Akzeptor (Kraftfeld MMFF94s)

besitzt der Stickstoff in Anilin pyramidale Geometrie. Daher wurde nicht das Standard-Kraftfeld MMFF94x (planarer Stickstoff), sondern das Kraftfeld MMFF94s (pyramidaler Stickstoff) gewählt. In der energieminimierten Struktur von Abbildung 2-5 wird erkennbar, dass die 5-Aminogruppe im Komplex auch H-Brücken-Akzeptor sein kann. Die Geometrie der H-Brücke ist in diesem Fall annähernd ideal, darüberhinaus könnte ein Proton der Aminogruppe mit Tyr269 eine schwache H-Brücke eingehen. In Kapitel 2.2 werden folglich die in der PDB beobachteten Geometrien von H-Brücken mit Anilinderivaten untersucht.

2.2. Relibase-Recherche

Relibase^[68] ist eine Datenbank, in der alle Protein-Ligand-Komplexe der PDB als Bindetaschenausschnitt mit gebundenem Ligand hinterlegt sind und nach verschiedenen Eigenschaften durchsucht werden können. Eine Recherche in der Relibase sollte zeigen, ob die im vorherigen Kapitel angesprochene Geometrie der aromatischen Aminogruppe orthogonal unterhalb der endständigen Gln270-Amidgruppe eher für Anilin als H-Donor, oder als H-Akzeptor spricht.

Durchführung der Recherche

Die Recherche erfolgte mit Relibase+, Version 3.0 (2009). Es wurde nach allen Komplexen gesucht, die einen Ligand mit aromatischer Aminogruppe beinhalten und bei denen in bis zu 3.5 \AA Abstand zum Anilin-N ein H-Brücken-Donor oder -Akzeptor anwesend ist. Von 281 ausgegebenen Strukturen wurden diejenigen ausgewählt, bei denen sich der H-Brücken-Donor oder -Akzeptor etwa orthogonal über dem Anilin-N befindet (vgl. Struktur 3E9S). Komplexe mit seitlichen H-Brücken, also in der Aromaten-Ebene liegend, wurden gelöscht. Die verbleibenden Komplexe wurden so übereinandergelagert, dass die jeweiligen Anilin-Fragmente der Liganden zur Deckung kamen. Zur Erstellung der Abbildungen 2-6 und 2-7 wurden irrelevante Aminosäuren der Bindetaschen ausgeblendet. Von den Liganden wird jeweils nur ein einzelnes Anilinfragment angezeigt, um damit die H-Brückengeometrie veranschaulichen zu können.

Auswertung

Die Ergebnisse lassen sich in vier Gruppen einteilen:

- Das aromatische Amin ist sicher H-Donor, wenn die H-Brücke zu einem Carbonyl-Backbone oder zu einer endständigen Carboxylat-Gruppe von Glutamat oder Aspartat ausgebildet wird. Eine Carboxylat-Gruppe könnte zwar in Proteinen auch protoniert vorliegen, doch sollte eine in Nachbarschaft gebrachte, schwach basische Aminogruppe die Carbonsäure deprotonieren und damit eine ladungsgestützte, starke H-Brücke^[69,70] zum Carboxylat-Anion ausbilden.
- Die aromatische Aminogruppe ist sicher H-Akzeptor, wenn ein Amid-NH-Backbone auf sie zeigt.
- Die aromatische Aminogruppe steht in Wechselwirkung mit Seitenketten von Glutamin (siehe 3E9S) oder Asparagin, die Rolle als H-Donor oder H-Akzeptor kann dann nicht zugewiesen werden.
- Die Interaktionspartner sind Wassermoleküle, womit die Rollenverteilung ebenso nicht klärbar ist.

Da lediglich in den ersten beiden Klassen die Rolle der aromatischen Aminogruppe als H-Donor oder H-Akzeptor sicher ist, werden nur diese nachfolgend abgebildet.

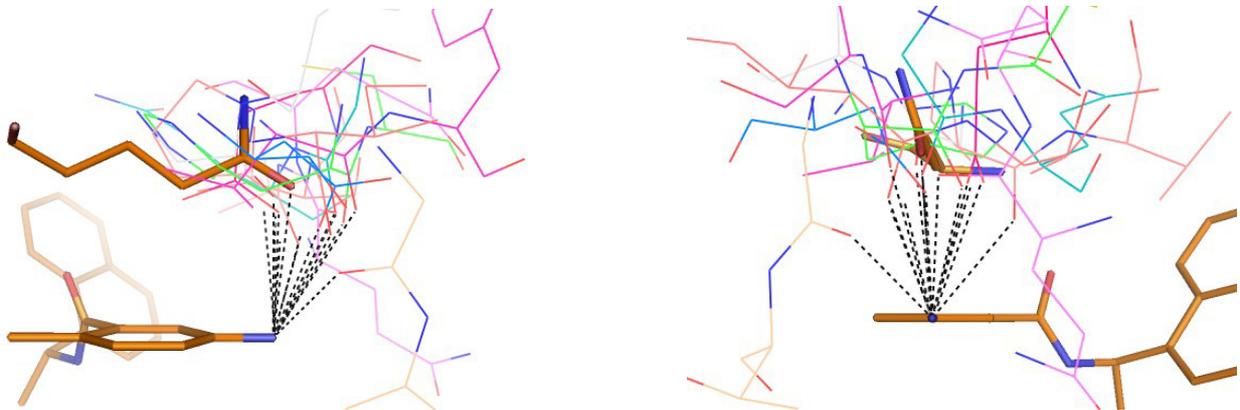


Abb. 2-6: Die aromatische Aminogruppe ist H-Donor, Seitenansicht und Frontalansicht. Die Struktur 3E9S ist zum besseren Vergleich zugefügt (orange), zählt aber nicht zu dieser Klasse, da vom Interaktionspartner Glutamin keine Donor/Akzeptor Zuweisung getroffen werden kann. Übereinandergelegte Strukturausschnitte von 1EAT, 1GRQ, 1HKN, 1LEE, 1NF4, 1U1W, 2AMT, 2FIX, 2HDR, 2HOC.

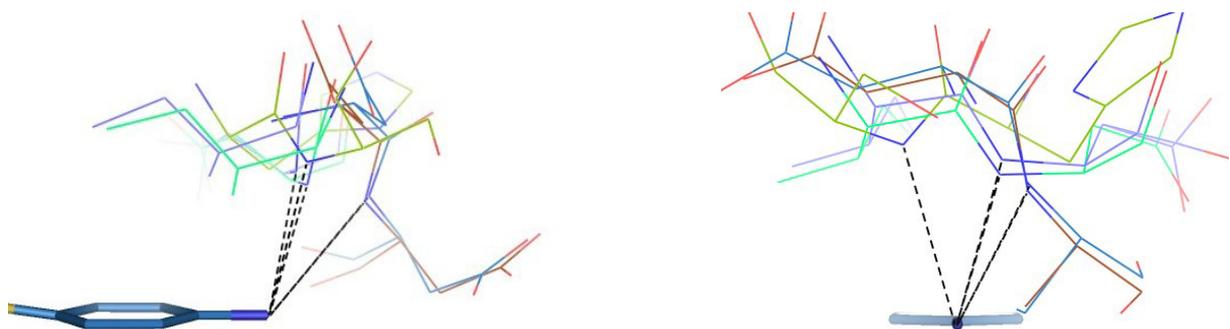


Abb. 2-7: Die aromatische Aminogruppe ist H-Akzeptor, Seitenansicht und Frontalansicht. Übereinandergelegte Strukturausschnitte von 1T3R, 3CJ3, 3E7V, 3EBZ, 3F2N.

Zwischen den Abbildungen 2-6 und 2-7 ist kein auffälliger Unterschied in den Geometrien festzustellen, demnach kann aus der H-Brücken-Geometrie kein Rückschluss auf die Rolle von Anilin als H-Donor oder H-Akzeptor gezogen werden. Festzuhalten ist, dass orthogonale Positionierungen von Interaktionspartnern „oberhalb“ der aromatischen Aminogruppe in der PDB vorkommen. Über die jeweilige H-Brückenstärke kann keine Aussage getroffen werden.

2.3. Bindetaschenanalyse mit GRID

Mit dem Programm GRID^[71] (Version 22) können in Protein-Kavitäten „Hotspots“ berechnet werden. Ein Hotspot ist eine energetisch günstige Position für eine bestimmte funktionelle Gruppe. Mit der Kenntnis von Hotspots können wiederum bestehende Liganden optimiert werden. Es lassen sich mit dieser Information aber auch dreidimensionale Filter erstellen, um Moleküldatenbanken nach neuen Liganden zu durchsuchen, die die erwünschten Hotspots erfüllen (= Pharmakophor-Suche).

Um den Begriff „Hotspot“ zu verstehen, soll kurz auf die Funktionsweise des Programms eingegangen werden: Zuerst wird ein dreidimensionales Gitter einstellbarer Maschenweite durch die Bindetasche gelegt. Eine frei wählende funktionelle Gruppe („Sonde“) wird dann nacheinander an jedem Gitterpunkt platziert und die zugehörige Energie berechnet, die sich aus der Interaktion der Sonde mit den umliegenden Protein-Atomen ergibt (Kraftfeldbasiert). Durch die Eingabe eines willkürlichen Energie-Schwellenwerts (Cutoff) kann dann eine Grenzfläche im Raum erstellt werden, die die Bereiche ober- und unterhalb dieses Schwellenwerts voneinander abgrenzt. Die von der Grenzfläche eingeschlossenen, energetisch günstigeren Bereiche als der Schwellenwert sind dann die Hotspots.

Sonden: Flat-NH und Carbonyl-O

Mit der Flat-NH-Sonde wird vereinfacht ausgedrückt eine günstige Position für einen H-Brücken-Donor aufgespürt und mit der Carbonyl-O-Sonde jene für einen H-Brücken-Akzeptor. In Abbildung 2-8 sind die gefundenen Hotspots mit Gitternetz-Oberfläche dargestellt und zur besseren Zuordnung durchnummeriert.

Hotspot 1: Dies wäre die ideale Position für die Amid-NH-Gruppe, der kristallisierte Ligand liegt mit seinem NH etwas weiter rechts, sodass die H-Brücke zum Aspartat mit 140° einen stumpferen Winkel ergibt.

Hotspot 2: Das Carbonyl-Sauerstoffatom des Inhibitors liegt in diesem Hotspot.

Hotspot 3: Ein H-Akzeptor könnte an dieser Stelle von Tyr265 (rechts vom Hotspot) eine H-Brücke empfangen.

Hotspot 4: Ein H-Donor könnte den Carbonyl-Backbone von Leu163 adressieren.

Hotspot 5: Dieser Bereich stellt die günstige Position für einen H-Akzeptor dar, der mit Lys158 wechselwirken könnte.

Hotspot 6: Hier sind H-Akzeptor und -Donor günstig, da Asp165, Asp303, Thr302 und Tyr274 den Bereich hydrophil flankieren. In der Kristallstruktur sind dort drei Wassermoleküle konserviert.

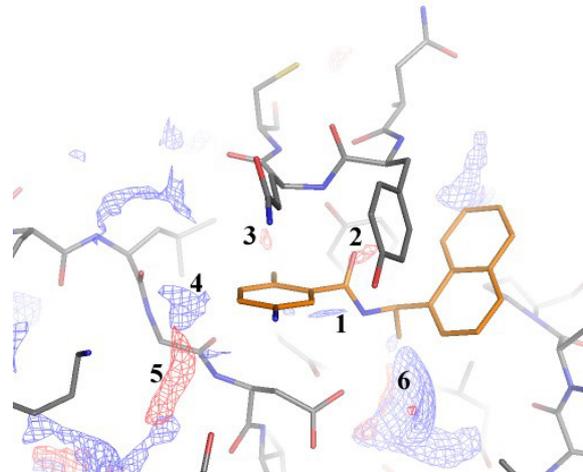


Abb. 2-8: GRID-Bindetaschenanalyse von 3E9S
Blau: Hotspots der Sonde Flat-NH (Cutoff -6.55 kcal/mol)
Rot: Hotspots der Sonde Carbonyl-O (Cutoff -6.09 kcal/mol)

Sonde: Methyl

Die Methyl-Sonde zeigt Bereiche, die besonders mit aliphatischen Gruppen adressiert werden sollten. Andere lipophile Sonden liefern ein vergleichbares Ergebnis, sodass man die in Abbildung 2-9 gezeigten Bereich auch allgemein als lipophile Hotspots auffassen kann.

Hotspot 7: Dort befindet sich die am stärksten vergrabene lipophile Stelle in der Bindetasche. Die 2-Methylgruppe des Benzamid-Liganden liegt in diesem energetisch günstigen Bereich.

Hotspot 8: Ein kleiner lipophiler Bereich liegt zwischen Tyr274 und Thr302. In diesem Bereich platziert der Ligand seine Methylgruppe der chiralen Amin-Komponente.

Hotspot 9: Der bereits mit Hotspot 6 (s. oben) als hydrophil erkannte Bereich wird nun von der Methyl-Sonde als lipophil beschrieben. Dies ist ein Beispiel für einen sehr vergrabenen Bereich, der unabhängig von der Sonde immer ein niedriges Potenzial ergibt. Wie erwähnt, binden in diesem Bereich laut Kristallstruktur bereits drei Wassermoleküle.

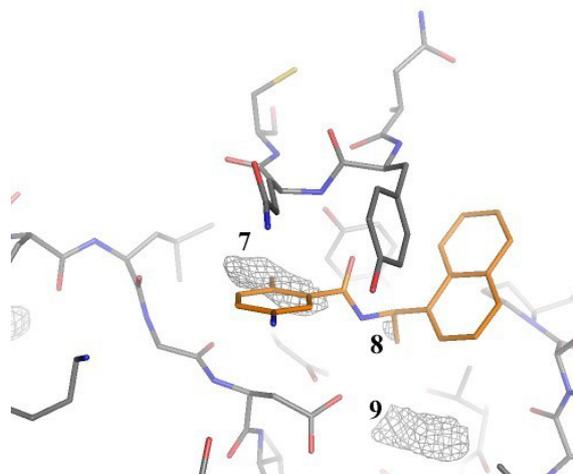


Abb. 2-9: GRID-Bindetaschenanalyse von 3E9S
Grau: Hotspots der Sonde Methyl (Cutoff -3.9 kcal/mol)

Diskussion

Mit GRID wurden Hotspots berechnet, die ein potenzieller Ligand adressieren sollte. GRID konnte dabei ohne Ligand-Information alle Hotspots (1, 2, 7 und 8) vorhersagen, die an der Bindung der Benzamide beteiligt sind: Die Hotspots 1 und 2 werden von der Amidgruppe des kristallisierten Benzamid-Liganden erfüllt (s. Abb. 2-8, bei weniger strengem Schwellenwert liegt das NH in Hotspot 1), und wie später in Kapitel 3 gezeigt wird, ist die lipophile Adressierung von Hotspot 7 und 8 für eine hohe Affinität zum Enzym unerlässlich.

Die aromatische 5-Aminogruppe des Liganden der Kristallstruktur liegt bei den angezeigten Energieschwellenwerten in keinem H-Donor- oder H-Akzeptor-Hotspot. Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass die Wechselwirkung der 5-Aminogruppe mit dem Enzym eine eher geringe Bedeutung besitzt und die Affinitätserhöhung vielmehr von einer intramolekularen Interaktion (Ladungsverteilung im Aromat, +M-Effekt) bewirkt wird (s. Kap. 2.1). Für die von Benzoessäure- und Naphthylaromaten adressierten S3- und S4-Taschen werden beim eingestellten Schwellenwert noch keine lipophilen Hotspots ausgegeben (s. Abb. 2-9). Hierin spiegelt sich die „offene“ Taschenform wider: Die S3- und S4-Bindebereiche sind solvenszugänglich und nicht vergraben.

Die bisher nicht adressierten Hotspots 3 - 6 geben Hinweise, an welchen Positionen der Benzamid-Ligand um weitere polare Strukturelemente erweitert werden könnte. Wie die Methyl-Sonde zeigt, sind schon alle lipophilen Hotspots adressiert und die Bindetasche gibt keine weitere Möglichkeit, den Liganden sinnvoll lipophil zu vergrößern. Im zukünftigen Inhibitor-Design sollen daher die hydrophilen Hotspots 3 - 6 mittels H-Brücken adressiert werden. Nachdem die lipophile Interaktionsfläche mit den Aromaten des Benzamid-Liganden schon maximal erscheint, wird versucht, durch Verwendung anderer lipophiler Strukturelemente („Scaffolds“) die Interaktion zu variieren und damit möglicherweise dennoch zu verbessern.

2.4. Flexibilität der Bindetasche und Modelling einer alternativen Loop-Konformation

Je nach Tertiärstruktur sind Proteine stärker oder weniger stark durch intramolekulare Wasserstoffbrücken fixiert und damit in ihrer Flexibilität eingeschränkt. Zu den flexiblen Bereichen zählen im Allgemeinen alle stark Solvens-exponierten Aminosäurereste im Außenbereich eines Proteins und bestimmte Loop-Regionen oder Domänen, die aufgrund mechanistischer Funktionen flexibel sein müssen. Die Proteinflexibilität (Molekulardynamik, MD) kann aus Röntgenstrukturen und NMR-Lösungsstrukturen erahnt werden (Unterscheidung strukturierter / unstrukturierter Regionen). Dagegen erlauben MD-Simulationen die Beobachtung von Bewegungen auf der molekularen Zeitskala. Auch die Ligandbindung kann Konformationsänderungen bei Aminosäureresten oder im Peptidrückgrat auslösen, man spricht vom „induced-fit“-Effekt. Zu Beginn dieses Projektes standen die Strukturen 2FE8^[72] (Apoenzym, kristallisiert mit drei Enzymen pro asymmetrischer Einheit) und 3E9S^[18] (ligandgebunden, ein Enzym pro asymmetrischer Einheit) zur Verfügung, sodass diese vier Konformationen ansatzweise eine Abschätzung der Proteinflexibilität zulassen. Die drei Konformationen des Apoenzym und die Konformation des ligandgebundenen Enzyms werden überlagert und auf Unterschiede untersucht:

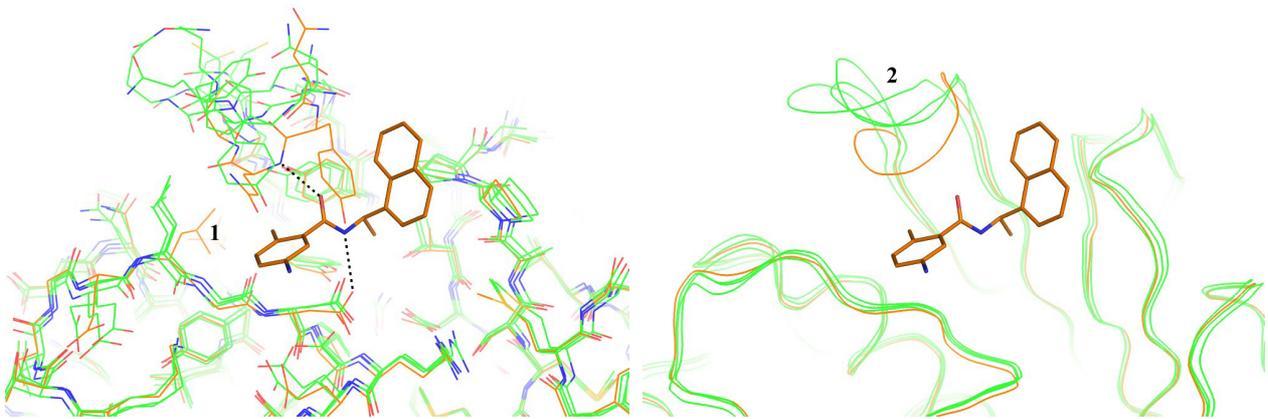


Abb. 2-10: Überlagerung der 3 Konformationen aus Struktur 2FE8 (grün) und der ligandgebundenen Struktur 3E9S (orange): Blick auf die S3- und S4-Bindetaschen. Links: Darstellung der Aminosäure-Seitenketten, Rechts: Darstellung des Proteinrückgrats.

Aus Abbildung 2-10 ist erkennbar, dass die Protease bei allen Strukturen in gleicher Konformation vorliegt, ausgenommen Leu163 (Markierung 1) und die Loop-Region (Markierung 2). Die Bindung des Benzamid-Inhibitors führt zum Einklappen von Leu163 und dem „Schließen“ des Loops^[18]. Innerhalb der Apoform (grün) nehmen nur die Aminosäuren der Loop-Region (Asn268 bis Cys271) verschiedene Konformationen ein. Demnach kann man aus den vier Proteinstrukturen eine gewisse Flexibilität der Loop-Region folgern, wobei durch induced-fit Mechanismen größere Konformationsänderungen möglich sind.

Aufgrund der Loopflexibilität wurde nun die Hypothese aufgestellt, dass ein anderer, fiktiver Inhibitor den Loop in einer anderen Konformation schließen und stabilisieren könnte. Dieser fiktive Inhibitor sollte am ehesten binden, wenn er hohe Ähnlichkeit zum bisher bekannten Benzamid-Inhibitor aufweist. So wurde als Änderung hinsichtlich der Interaktion zum Loop eine „Umpolung“ des Ligand-Carbonyls in Erwägung gezogen, etwa durch Ersatz mit einer Hydroxy- oder Aminogruppe, sodass an dieser Stelle eine H-Brücken-Donor-Eigenschaft gegenüber dem Loop erreicht wird. Der Loop muss dann gegenüber dem Ligand H-Brücken-Akzeptor sein. Um diese Akzeptor-Eigenschaft zu erreichen, wurde der Loop vom Protein getrennt und die Bindung zwischen Backbone-Carbonyl und C-alpha von Tyr269 um 180° gedreht (Ψ -Winkel). Der nun verdrehte Loop wurde durch eine weitere Drehung um 180° zwischen Backbone NH und C-alpha von Gln270 (Φ -Winkel) und weitere kleine Drehungen im Peptidrückgrat weitgehend zur vorherigen Konformation in Deckung gebracht und wieder mit dem Protein verknüpft (Abb. 2-11,

links). Um innere Spannungen im Backbone abzubauen, wurde eine Energieminimierung (Kraftfeld MMFF94x) des Loops mit MOE durchgeführt. Dabei erwies sich als vorteilhaft, vor der Energieminimierung einen erdachten Ligand in der Bindestelle zu platzieren, der die Loop-Adressierung und Stabilisierung mittels Wasserstoffbrücke und Naphthylgruppe vornimmt, wie man es auch von einem tatsächlich bindenden Liganden erwarten würde. So wurde das Strukturmodell aus Abbildung 2-11 (rechts) im Dezember 2009 erhalten.

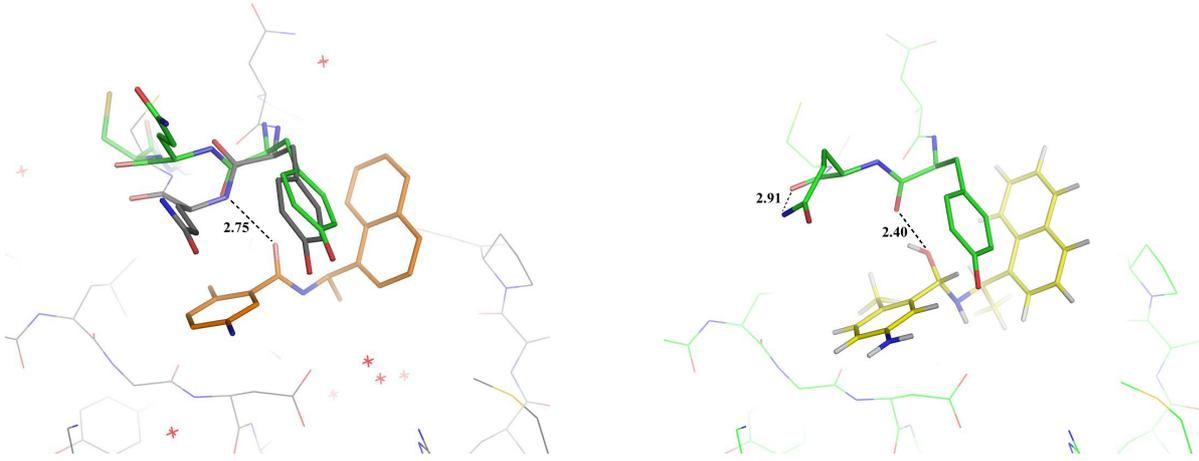


Abb. 2-11: Links: Die Loop-Konformation von 3E9S (grau) wurde zwischen Tyr269 und Gln270 manuell geändert (grün). Rechts: Die neue Konformation wurde in Anwesenheit eines fiktiven Halbaminall-Liganden (gelb) energieminimiert.

Im Juli 2010 wurde von Ghosh et al.^[20] eine weitere Kristallstruktur (3MJ5) mit neuem Inhibitor publiziert, welche nachträglich die Richtigkeit der modellierten Loop-Konformation experimentell bewiesen hat. Der neue Inhibitor (Abb. 2-12, violett) adressiert dabei den Loop als H-Brücken-Donor, und der Loop reagiert wie vorhergesagt mit einer Verdrehung im Peptidrückgrat zwischen Tyr269 und Gln270. In späteren accelerated-MD-Simulationen von Chaudhuri et al.^[73] konnte diese 180° Φ - Ψ -Diederrotation reproduziert und weiter untersucht werden.

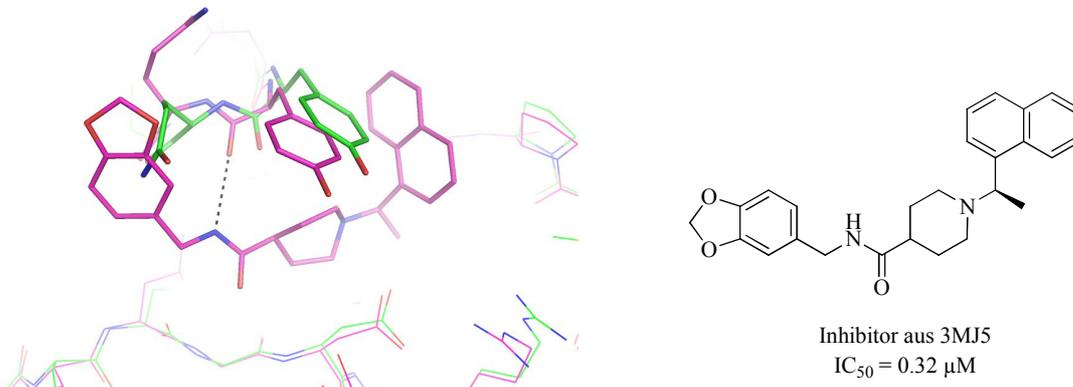


Abb. 2-12: Links: Überlagerung der eigenen, modellierten Proteinstruktur (grün) mit der publizierten Struktur 3MJ5 (violett). Rechts: Darstellung des in Struktur 3MJ5 gebundenen Inhibitors.

Der Bindemodus des Piperidincarboxamid-Inhibitors unterscheidet sich von den Benzamid-Inhibitoren durch die nicht-aromatische Adressierung der S3-Tasche sowie den unbesetzt gebliebenen Methyl-Hotspot bei Leu163. Außerdem ist das Stereozentrum der Amin-Komponente nicht mehr so differenzierend: so führt S-Konfiguration bei zwei Piperidincarboxamid-Inhibitoren in beiden Fällen nur zu einer Halbierung der Affinität, nicht aber zum Affinitätsverlust^[20].

Zur Kristallstruktur 3MJ5 muss noch erwähnt werden, dass dort zwei Protein-Konformationen direkt mit ihrer Bindetasche aneinander grenzen, wobei eine Seite des 1,2-Methylenedioxybenzols von Gln270 und die andere Seite

vom Nachbarprotein (nicht abgebildet) lipophil flankiert werden. Möglicherweise sind dadurch die beiden Konformationen des 1,2-Methylenedioxybenzol-Fragments und Gln270 durch die Kristallpackung verändert und entsprechen nicht der Konformation in Lösung.

2.5. Virtuelles Screening

Um neue Substanzklassen mit inhibitorischer Aktivität gegen das Target SARS-CoV-PL^{pro} zu finden, wurden mehrere virtuelle Screeningprojekte durchgeführt. Diejenigen Arbeiten, die maßgeblich zum Erwerb von Screening-Substanzen beitrugen, werden in diesem Kapitel vorgestellt.

Allgemein ist ein virtuelles Screening so aufgebaut, dass man mit einer großen Substanzbibliothek (bis zu einigen Millionen Molekülen) beginnt und diese mit Computerprogrammen schrittweise verkleinert. Die angewandte Methodik kann dabei sehr vielfältig sein, von der Eingrenzung durch physikalisch-chemische Eigenschaften bis hin zu Docking, doch immer wird beabsichtigt, potenziell affine Moleküle anzureichern. Am Ende erfolgt durch möglichst präzises Docking der Moleküle in das Target eine Vorhersage ihrer Bindemodi. Durch geeignetes Scoring dieser Bindemodi wird eine Rangliste nach freier Ligand-Bindungsenthalpie (oder eines sinngemäßen Wertes ohne Einheit) aufgestellt, welche den Wirkstoffentwickler in der Beurteilung der postulierten Bindemodi auf Plausibilität unterstützt. Die Moleküle, die nach visueller Betrachtung nicht verworfen wurden und in der Rangliste laut Scoring hochplatziert sind, werden zur experimentellen Testung bestellt.

Weiterhin kann bei hochplatzierten Molekülen manchmal ein bestimmtes Strukturfragment oder eine funktionelle Gruppe erkannt werden, die maßgeblich zu der hohen Affinitäts-Vorhersage beitrug. Solche Strukturelemente können dann an andere Liganden mit bekannter inhibitorischer Wirkung angeknüpft werden, um diese ebenso in ihrer Wechselwirkung zur Bindetasche zu verbessern. Falls solch ein neu geschaffenes Molekül nach Docking und Scoring dann auch als „verbessert“ bewertet wird, sollte es synthetisiert und auf inhibitorische Wirkung getestet werden. Dieser vom virtuellen Screening inspirierte Wirkstoff-Entwicklungsprozess wird in den experimentellen Arbeiten von Kapitel 3 ausgeführt.

2.5.1. Hintergrund zu Docking und Scoring

In diesem Abschnitt wird auf die Funktionsweise des angewendeten Dockingprogramms GOLD^[74,75] eingegangen. Unter Docking ist allgemein das Einpassen eines Moleküls in eine Protein-Kavität zu verstehen. Der so erhaltene theoretische Bindemodus soll dabei demjenigen entsprechen, den das Molekül tatsächlich in der Bindetasche einnimmt, bzw. einnehmen würde. Der Dockingprozess lässt sich bei GOLD in drei Teile zerlegen^[75]:

- Ein nichtdeterministischer Suchalgorithmus erzeugt die Ligand-Konformationen und optimiert diese.
- Jede Ligand-Konformation wird mittels Ausgleichsrechnung (Fitting) in der Bindetasche platziert.
- Eine Scoringfunktion bewertet die platzierten Liganden in der Bindetasche.

In einem iterativen, zyklischen Prozess verändert der Suchalgorithmus die Ligand-Konformation und die Platzierung in der Bindetasche dahingehend, dass die Scoringfunktion höhere Werte erzielt. Nach zahlreichen Durchläufen wird schließlich der Dockingprozess abgebrochen und der höchst-bewertete Bindemodus als Ligand-Protein-Komplex mit zugehörigem Ergebnis der Scoringfunktion ausgegeben. Bei Bedarf kann der Bindemodus noch durch eine andere, am Dockingprozess unbeteiligte Scoringfunktion „unabhängig“ bewertet werden – dies nennt sich dann Rescoring. Nachdem der Dockingprozess auf einem nichtdeterministischen Suchalgorithmus beruht, lässt man ihn von GOLD

mehrmals ausführen, beispielsweise 10- oder 100-mal. Die Ergebnisse können sich dabei unterschiedlich stark voneinander unterscheiden. Da durch einen einzelnen Durchlauf die Konvergenz zum globalen Minimum nicht sichergestellt werden kann, wird so die Wahrscheinlichkeit erhöht, das globale Minimum zu finden. Die 100 „runs“ ergeben also 100 Dockinglösungen (100 Bindemodi), die dann visuell miteinander verglichen werden können. Im Folgenden werden die drei Programmbestandteile Suchalgorithmus, Fitting und Scoring näher erläutert.

Suchalgorithmus

In GOLD wird ein „genetischer Algorithmus“^[74] zur Suche nach dem besten Bindemodus angewendet. Für den genetischen Algorithmus wird ein Ligand-Bindemodus durch ein Chromosom ausgedrückt. Im Chromosom sind kodiert und damit veränderbar: Die Diederwinkel der rotierbaren Bindungen des Liganden, die vom Liganden adressierten Fitting-Points, die Diederwinkel der Hydroxy- und Aminogruppen des Proteins, sowie optional die Diederwinkel von Aminosäure-Seitenketten (falls als flexibel eingestellt) und optional berücksichtigte Wassermoleküle.

Zu Beginn wird eine Population von zufälligen Chromosomen erzeugt („Seeding“). Diese erhalten durch die Scoringfunktion eine Bewertung (Fitness-Score) und können in einer Rangliste angeordnet werden. Anschließend werden von Chromosomen erster Generation durch genetische Operationen Chromosomen n-ter Generation abgeleitet. Bei der genetischen Operation „Crossover“ wird zusätzlich ein Selektionsdruck aufgebaut, indem die zufällige Auswahl von Eltern-Chromosomen mit einem Bias Richtung höherer Rangordnung erfolgt. Die in der Rangordnung am schlechtesten bewerteten Chromosomen (= Bindemodi mit niedrigstem Fitness-Score) werden dann von besser bewerteten Kinder-Chromosomen ersetzt („survival of the fittest“, zu deutsch: „Überleben des Bestangepassten“). Jones et al.^[76] erweiterten den genetischen Algorithmus um Inseln und Nischen, eine Übersicht gibt Abbildung 2-13.

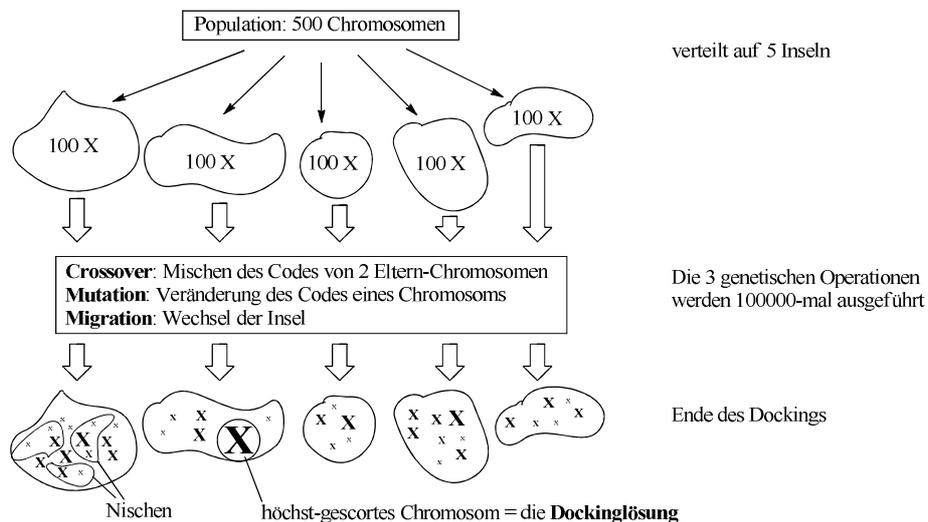


Abb. 2-13: Der genetische Algorithmus in GOLD. Die Chromosom-Größe soll die Bewertung laut Scoringfunktion widerspiegeln.

Die Population wird anfangs gleichmäßig auf 5 Inseln verteilt. Die genetischen Operationen Crossover und Mutation finden nur innerhalb einer Inselpopulation statt, während die selten angewendete Migration (5%) den Chromosom-Austausch auch zwischen Inseln ermöglicht. Die Inselbildung verhindert vorzeitige Konvergenz des Suchalgorithmus. Nischen sind Chromosom-Gruppen mit gleichem Bindemodus (RMSD der gebildeten H-Brücken

< 1.0 Å). Ein neu erzeugtes Kind-Chromosom wird mit allen Chromosomen seiner Insel verglichen und bildet dann entweder eine eigene Nische oder wird einer bestehenden zugeordnet. So kann es nur das schlechteste Chromosom der zugeordneten Nische ersetzen und das „survival of the fittest“-Prinzip wird nicht auf die gesamte Population angewendet, wodurch ähnlich wie bei der Inselbildung die Vielfältigkeit erhöht wird.

Die Rahmenbedingungen (Populationsgröße, Anzahl genetischer Operationen, Inselzahl, Nischengröße, Selektionsdruck, usw.) verändern die Genauigkeit und den Aufwand der Suche und werden normalerweise von GOLD automatisch festgesetzt. Für ein virtuelles Screeningprojekt sollte der Zeitaufwand des einzelnen Docking-runs möglichst gering sein. Der Prozess lässt sich verkürzen, indem man die „search efficiency“ niedriger einstellt. Dadurch wird die Anzahl genetischer Operationen abhängig von Ligand- und Bindetaschengröße verringert und damit der Dockingprozess früher abgebrochen. Falls der Suchalgorithmus den „richtigen“ Bindemodus leicht findet, d. h. nach wenigen genetischen Operationen, hat diese Verkürzung praktisch keinen Einfluss auf das Ergebnis.

Fitting

Wie das Programm GRID erstellt auch GOLD in der Bindetasche Hotspots, die hier Fitting-Points genannt werden. So wird eine Fitting-Map erhalten, die günstige Aufenthaltsorte für H-Brücken-Donoren, -Akzeptoren und CH-Gruppen des Liganden angibt. Im Chromosom sind die Interaktionen mit den Fitting-Points kodiert und über die Methode der kleinsten Quadrate (= Fitting) werden dann Akzeptor- und Donor-Punkte von Protein und Ligand übereinandergelegt – damit ist der Ligand in der Bindetasche platziert.

Scoring

Die Pose des Liganden in der Bindetasche wird von einer Fitness-Funktion bewertet. In GOLD stehen dazu die Gold-, Chemscore-, ChemPLP- und ASP-Fitness-Funktion zur Verfügung.

$$\text{Gold-Fitness} = S_{hb_ext} + S_{vdw_ext} + S_{hb_int} + S_{vdw_int} \quad (1)$$

$$\text{Goldscore} = S_{hb_ext} + S_{vdw_ext} \quad (2)$$

Zur Evaluation von Ligandposen im Docking wird die Gold-Fitness-Funktion (1) angewendet. Diese errechnet sich durch Addition von 4 kraftfeldbasierten Score-Beiträgen: Die H-Brücken-Bindungsenthalpien des Ligand-Protein-Komplexes werden durch S_{hb_ext} repräsentiert, die van-der-Waals-Wechselwirkungen fließen über den Term S_{vdw_ext} ein, H-Brücken innerhalb des Liganden können optional durch Zuschalten von S_{hb_int} berücksichtigt werden und S_{vdw_int} beschreibt die innere Spannung (Deformation) des Liganden. Die Gold-Fitness-Funktion wurde darauf trainiert, experimentell bestimmte Bindemodi möglichst präzise wiederzugeben, kann nach Weglassen der internen Terme aber auch Bindungsaffinitäten als Goldscore (2) relativ gut vorhersagen^[75].

Die Chemscore-Funktion (3) benötigt kein Kraftfeld und wurde empirisch aufgestellt. Trainiert wurde die ursprüngliche Funktion $\Delta G_{binding}$ (4) in erster Linie zur Vorhersage von Affinitäten, sie beschreibt also die Änderung der freien Enthalpie bei Ligandbindung. Um die Funktion in GOLD zum Docking verwenden zu können, wurden drei weitere Energieterme zugefügt (E_{clash} , E_{int} , E_{cov})^[75].

$$\text{Chemscore} = \Delta G_{binding} + E_{clash} + E_{int} + E_{cov} \quad (3)$$

$$\Delta G_{binding} = \Delta G_0 + \Delta G_{hbond} + \Delta G_{metal} + \Delta G_{lipo} + \Delta G_{rot} \quad (4)$$

Die Terme E_{clash} und E_{int} bestrafen ungünstig nahe Protein-Kontakte („Clash“) und intramolekulare Spannung (Deformation und „intramolekularer Clash“). E_{cov} beschreibt bei kovalentem Docking die kovalente Bindung zum Protein.

In die Berechnung der freien Ligand-Bindungsenthalpie $\Delta G_{binding}$ fließen H-Brücken, Metall-Kontakte, lipophile Wechselwirkungen und eine Abschätzung zum Entropieverlust (ΔG_{rot}) ein. Bis auf ΔG_0 lässt sich jeder Term ΔG_x zu $\Delta G_x = v_x P_x$ weiter zerlegen, wobei P_x jeweils für eine Formel steht, die den physikalischen Zusammenhang beschreibt (z. B. Anzahl und Güte der H-Brücken-Bindungen). Die durch multilineare Regression eingeführten Koeffizienten v_x wichten die Terme, sodass $\Delta G_{binding}$ mit experimentell bestimmten Affinitäten korreliert^[77].

Die ChemPLP-Funktion^[78] (5) ist ähnlich dem Chemscore eine empirische Scoringfunktion. Zum Docking in GOLD wurde die ursprüngliche PLP-Funktion f_{PLP} um drei Terme zur abstands- und winkelabhängigen Beschreibung von H-Brücken und Metall-Kontakten erweitert^[79]:

$$fitness_{ChemPLP} = f_{PLP} + f_{chem-hb} + f_{chem-cho} + f_{chem-met} \quad (5)$$

$$f_{PLP} = plp(r, A, B, C, D, E, F) + rep(r, A, B, E, F) \quad (6)$$

Die PLP-Funktion (6) beschreibt die sterische Komplementarität zwischen Ligand und Protein, indem paarweise die Abstände r zwischen Ligand- und Protein-Atomen bestimmt werden. In den beiden Termen plp (für repulsive und attraktive Interaktionen) und rep (für repulsive Interaktion) werden 5 verschiedene Potenziale E und ihr y-Achsenabschnitt F in willkürliche Scorebeiträge abstandsabhängig umgerechnet. Die 5 Potenziale repräsentieren die Interaktionsarten H-Bindung, Metall-Kontakt, Vergrabenheit, lipophile Interaktion und Repulsion. Der plp -Term beschreibt dabei die ersten 4 Interaktionen und der rep -Term die letztgenannte Repulsion. Die für jede Interaktionsart verschieden definierten Referenzabstände A bis D ergeben für den plp -Term 5 Kategorien ($r < A$, $A \leq r < B$, usw. bis $r > D$) und für den rep -Term 3 Kategorien ($r < A$, $A \leq r \leq B$ und $r > B$). Innerhalb dieser Kategorien finden dann jeweils verschiedene, lineare Funktionen zur abstandsabhängigen Skalierung der Potenziale Anwendung. Daher die Bezeichnung „piecewise linear potential“ (PLP), zu deutsch: stückweise lineares Potenzial.

Die letzte, verwendete Scoringfunktion ist die ASP-Fitness-Funktion^[80] (Astex-Statistic-Potential). Bei ihr werden auch paarweise Atom-Atom-Potenziale zwischen Ligand- und Protein-Atomen berechnet:

$$ASP-Fitness = - C_s \sum_p \sum_l StatScore(p, l, r_{pl}) - E_{int} - E_{clash} \quad (7)$$

Der $StatScore$ -Term beschreibt das Verhältnis beobachteter Ligand-Protein-Kontakte für die einzelnen Atomtypen von Protein p und Ligand l im Abstand r_{pl} zu einem „reference state“. Der „reference state“ stellt die aus Röntgenkristallstrukturen statistisch ermittelte, durchschnittliche Häufigkeit solcher Kontakte dar. Die $StatScore$ -Potenziale werden für alle Atomtypen p und l im jeweiligen Umkreis bis 6 Å aufsummiert und mit dem Korrekturfaktor $C_s = 0.2$ multipliziert. Die zusätzlichen, empirischen Terme E_{int} und E_{clash} mussten zugefügt werden, damit die Funktion als Fitness-Funktion im Docking angewendet werden kann. Die Terme stammen von der Chemscore-Funktion und bestrafen ungünstige Ligand-Konformation (E_{int}) und nahe Protein-Kontakte (E_{clash}). Nachdem der $StatScore$ -Term auf rein statistischen Daten beruht, zählt die ASP-Fitness-Funktion zu den wissenschaftlichen Scoringfunktionen.

2.5.2. Redocking des Liganden der Kristallstruktur

Bei einem virtuellen Screeningprojekt muss vor allem das im letzten Schritt durchgeführte Docking und Scoring verlässliche Ergebnisse liefern, denn auf der Grundlage des Bindemodus und dessen abgeschätzter Affinität wird die Entscheidung getroffen, eine Verbindung für die Testung am Target zu bestellen oder zu verwerfen. In diesem und dem folgenden Unterkapitel wird daher auf die Möglichkeit zur Kontrolle von Docking- und Scoring-Ergebnis eingegangen.

Die Richtigkeit des durch Docking erhaltenen Bindemodus kann beim Liganden einer Kristallstruktur durch Redocking überprüft werden. Dazu wird der Ligand aus der Röntgenstruktur entfernt, um ihn anschließend mit einem Dockingprogramm wieder „einzudocken“. Die quantitative Beurteilung des Ergebnisses erfolgt durch Vergleich der Atomkoordinaten (RMSD aller nicht-Wasserstoffatome) zwischen experimenteller Pose und gedockter Pose. Liegt der RMSD unter 2 Å wird im Allgemeinen von einem korrekt wiedergegebenen Bindemodus gesprochen. Alle RMSD-Berechnungen werden in dieser Arbeit mit dem Programm FCONV^[81] durchgeführt.

Redocking mit 100% Search-Efficiency

Die Struktur 3E9S wird zunächst mittels MOE protoniert, dabei führt MOE selbstständig einen Flip des endständigen Carboxamids von Gln270 durch, da das Programm diese Konformation als begünstigt ansieht. Zum Redocking löscht man den gebundenen Ligand und dockt ihn anschließend mit GOLD in die freie Bindetasche. Es werden mit 100% Search-Efficiency 100 Docking-runs ausgeführt; Scoringfunktion: Chemscore; gebundene Wassermoleküle werden nicht berücksichtigt.

In Abbildung 2-14 ist die höchst-gescorte Dockinglösung (blau) mit der Kristallstruktur-Pose (orange) überlagert. Die gezeigte Dockingpose erzielt einen Chemscore von 41.6, der RMSD zur Kristallstruktur ist mit 0.46 Å klein und steht für eine gute Vorhersage des tatsächlichen Bindemodus.

Bei genauer Betrachtung fällt auf, dass der Benzoesäure-Aromat leicht gedreht in die S3-Tasche positioniert wurde. Dies liegt daran, dass GOLD die aromatische 5-Aminogruppe trigonal-planar behandelt und keine Torsion zulässt. Nach Analyse der Chemscore-Terme (Einzelbeiträge zum Gesamtscore) stellt sich heraus, dass von der 5-Aminogruppe zwar keine H-Brücke zu Gln270 ausgeht, dafür aber zum phenolischen OH von Tyr269 (N-O-Abstand 2.9 Å, siehe angedeutete H-Brücke in Abb. 2-14).

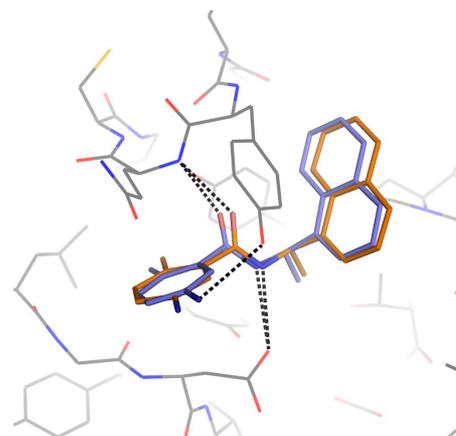


Abb. 2-14: Redocking des Liganden der Kristallstruktur 3E9S. Orange: Experimentell beobachteter Bindemodus. Blau: Dockinglösung

Einen Überblick über die 100 Docking-runs gibt Abbildung 2-15: Im linken Diagramm sind die 100 Lösungen nach fallendem Chemscore-Wert sortiert, das rechte Diagramm gibt die RMSD-Werte der sortierten Lösungen an. Man kann aus den Diagrammen schließen, dass das Docking konvergent ist: 74 Posen entsprechen dem selben, korrekten Bindemodus (RMSD zur experimentellen Pose < 2 Å), außerdem erhalten die meisten Dockinglösungen einen Chemscore um 40, womit diese Docking-runs alle sehr nahe am globalen Minimum liegen.

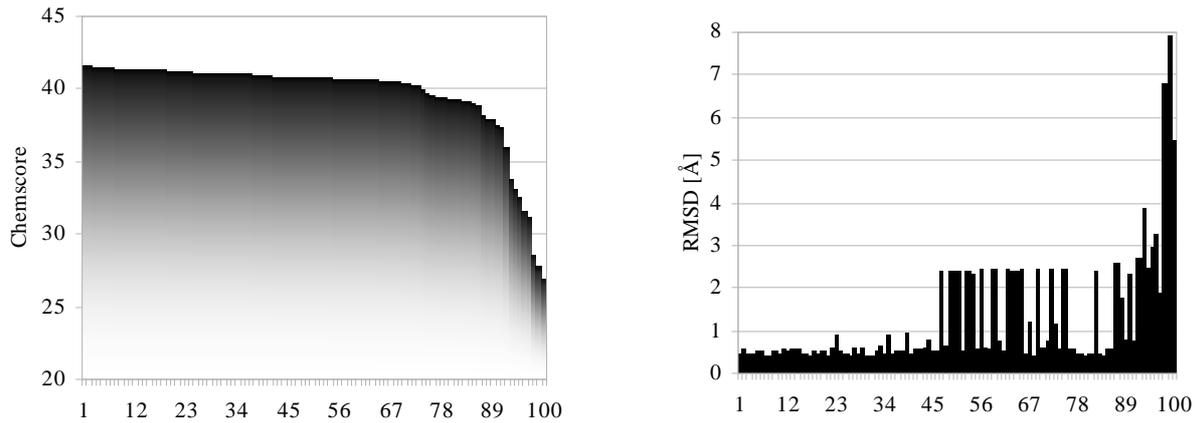


Abb. 2-15: Links: 100 Docking-runs sortiert nach Chemscore. Rechts: RMSD der sortierten Lösungen zur exp. Pose. Rechenzeit 177 Sekunden.

Weiterhin zeigt das RMSD-Diagramm (Abb. 2-15, rechts) einen definierten, alternativen Bindemodus mit $\text{RMSD} = 2.4 \text{ \AA}$, dessen höchstgescorter Vertreter einen Chemscore-Wert von 40.8 erreicht. Der Bindemodus ist in Abbildung 2-16 gezeigt, er unterscheidet sich in der Orientierung des Naphthyl-Gerüsts. Bei der Beurteilung dieser alternativen Orientierung sollte man bedenken, dass die CH/π -Interaktionen für GOLD nicht bekannt sind und daher die Positionierung des Naphthyls nach Komplementarität der Oberfläche Naphthyl / S4-Tasche erfolgt. Es kann also von einem insgesamt erfolgreichen Redocking gesprochen werden, und die Möglichkeit von geringfügig falsch orientierten Aromaten sollte beim Docking zukünftiger, anderer Liganden bedacht werden.

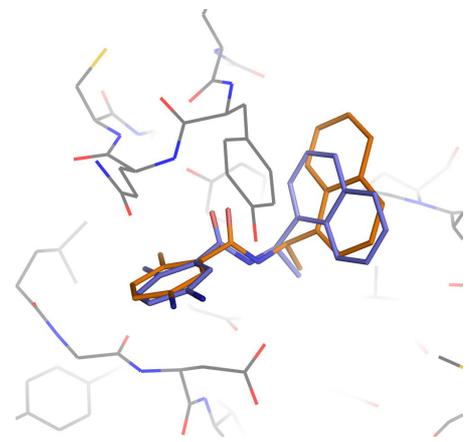


Abb. 2-16: Blau: Alternativer Bindemodus

Verringerung der Search-Efficiency

Im Hinblick auf die geplanten virtuellen Screeningprojekte soll ein weniger zeitaufwändiges Docking-Protokoll entwickelt werden. Inwiefern der Suchalgorithmus dann noch den Bindemodus findet, zeigt Abbildung 2-17:

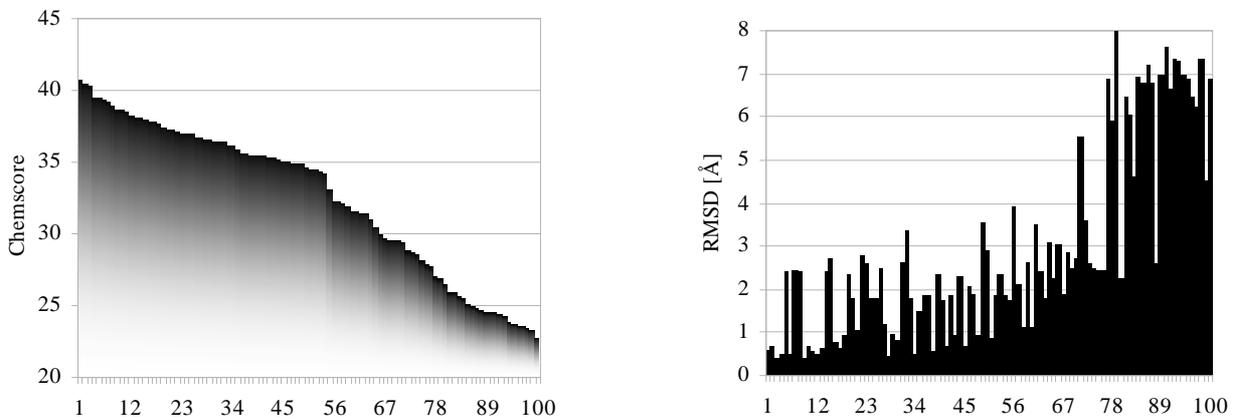


Abb 2-17: 100 Docking-runs mit 10% Search-Efficiency, Angabe von Chemscore und RMSD der sortierten Lösungen. Rechenzeit 38 Sekunden.

Das Docking mit 10% Search-Efficiency konnte die Rechenzeit für 100 runs von 177 auf 38 Sekunden verkürzen. Im linken Diagramm von Abbildung 2-17 erkennt man, dass die meisten Posen von der Scoringfunktion nur suboptimal bewertet werden. Das rechte Diagramm zeigt jedoch, dass dennoch viele der erzeugten Ligandposen der experimentellen Pose entsprechen (42 Lösungen haben einen RMSD $< 2.0 \text{ \AA}$). Der Bindemodus wird also gefunden, für die Vorhersage der Affinität durch die Scoringfunktion müsste er aber besser optimiert sein.

Eine Möglichkeit wäre, die Search-Efficiency auf Kosten der Rechenzeit wieder zu erhöhen. Damit würde die Anzahl genetischer Operationen vergrößert und es bestünde höhere Wahrscheinlichkeit, das globale Minimum innerhalb eines Docking-runs zu finden. Eine andere Möglichkeit ist, dem Suchalgorithmus wichtige Startinformation mitzuteilen: Wenn das Programm „weiß“, welche Interaktionen in der Bindetasche favorisiert werden sollten, erfolgt die Konformations-Suche mit Bias Richtung der favorisierten Interaktionen. Die Suche wird also fokussiert, ohne dass die Anzahl genetischer Operationen und damit die Rechenzeit vergrößert wird. In GOLD werden dazu folgende Einstellungen gewählt: 100 runs mit 10% Search-Efficiency, Scoringfunktion Chemscore, keine Berücksichtigung von Wasser, vier Constraints: zwei H-Brücken zum Backbone NH von Gln270 und Carboxylat-Sauerstoff von Asp165, außerdem je ein hydrophobes Volumen-Constraint in den S3- und S4-Bindetaschen mit Radius 3 \AA . Diese vier Constraints belohnen in der Konformations-Suche das Zustandekommen der genannten Interaktionen mit einem zusätzlichen Score-Beitrag. Der Bindemodus wird dadurch schneller gefunden, sodass ab dann die restlichen genetischen Operationen diesen optimieren. Abbildung 2-18 gibt den Überblick über dieses Docking:

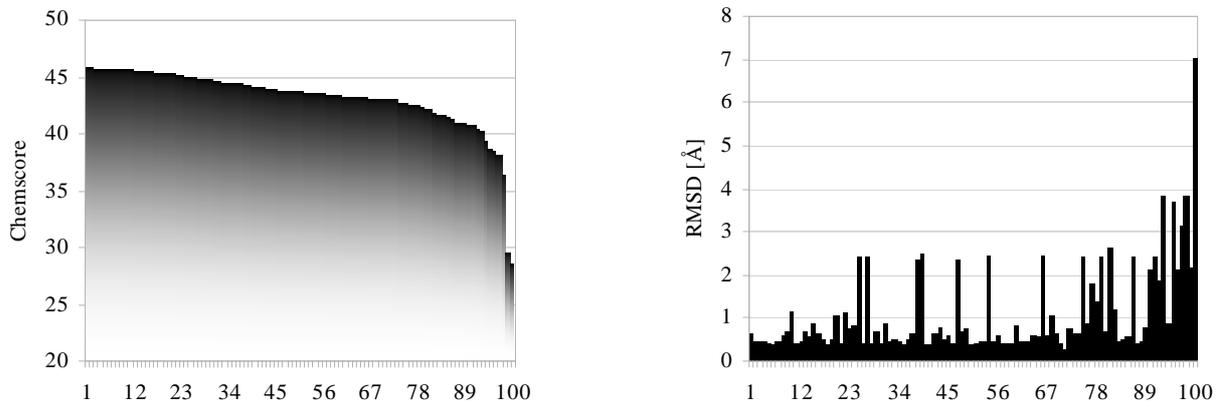


Abb 2-18: 100 Docking-runs mit 10% Search-Efficiency und 4 Constraints. Rechenzeit 41 Sekunden.

Das linke Diagramm zeigt, dass die meisten Dockinglösungen mit einem Chemscore zwischen 40 und 45 bewertet werden (aufgrund des Constraint-Beitrags fällt der Chemscore höher aus). Im RMSD-Diagramm besitzen 80 Dockinglösungen einen RMSD $< 2 \text{ \AA}$. Das Docking ist damit vergleichbar konvergent, wie wenn es mit 100% Search-Efficiency durchgeführt wird.

Fazit

Das Docking-Protokoll mit 10% Search-Efficiency und vier Constraints eignet sich zum virtuellen Screening großer Substanzbibliotheken. Es soll als erster Filterschritt dienen, um die Ligandenanzahl für anschließende, genauere und Constraint-freie Docking-Rechnungen zu verringern. Werden beispielsweise drei Docking-runs je Ligand ausgeführt, lässt sich damit eine Substanzbibliothek von 100.000 Liganden in 2 - 3 Tagen screenen (1 Core, AMD Athlon X2).

In einem nächsten Schritt können dann z. B. die 1000 besten Liganden einem ausführlicheren Docking-Protokoll unterzogen werden.

2.5.3. Evaluation von Scoring- und Rescoringfunktion

Ein Anspruch an eine geeignete Scoringfunktion ist das korrekte Ranking verschiedener Liganden nach ihrer tatsächlichen Affinität, damit im virtuellen Screening potenziell bindende Liganden unter den ausgegebenen „Treffern“ angereichert und gleichzeitig wenig- bis nicht-affine Moleküle ausgeschlossen werden können. Dieses korrekte Ranking wird überprüft, indem die Affinitäten bekannter Liganden mit den vom Docking erhaltenen Score-Werten verglichen werden:

Es wurden die 20 von Ghosh et al.^[19] publizierten Inhibitoren gedockt und deren Score mit den dazu publizierten IC₅₀-Werten korreliert (umgerechnet in pIC₅₀). Da die IC₅₀-Werte aus dieser Veröffentlichung unter gleichen Assaybedingungen gemessen wurden, sind sie ein adäquater Ersatz für die nicht verfügbaren Bindungsaffinitäten (K_i -Werte). Anmerkung: Zwei der 20 Inhibitoren besitzen eine benzyllische Aminogruppe und wurden daher zusätzlich in kationischer Form erstellt, sodass 22 Ligandstrukturen gedockt wurden. Außerdem sind 6 inaktive Verbindungen bekannt^[18,19] und ebenso gedockt worden, können jedoch aus Ermangelung eines IC₅₀-Wertes nicht mit in die Korrelationen einbezogen werden. Stattdessen erfolgt die Diskussion ihrer Dockingposen und Score-Werte am Ende des Kapitels.

Auswahl einer geeigneten Kombination von Scoring- und Rescoringfunktion

Um Einstellungen in GOLD zu finden, die eine möglichst gute Korrelation zwischen Score und pIC₅₀ ergeben, wurden die Scoringfunktionen für das Docking systematisch variiert. Zusätzlich wurde ein Rescoring mit weiteren, in GOLD verfügbaren Scoringfunktionen durchgeführt. Beim Rescoring ergeben sich zwei Möglichkeiten:

- Entweder man „rescored“ nur die von der ersten Scoringfunktion als beste bewertete Pose,
- oder man „rescored“ alle Lösungen des Liganden und gibt den besten erhalten Rescore-Wert an.

Im Programm GOLD ist letzterer Fall implementiert, da so der Rescoringfunktion mehrere geringfügig unterschiedliche Posen zur Verfügung stehen, die nicht unbedingt mit gleichem Score bewertet werden, auch wenn für das Rescoring eine lokale Optimierung der Ligand-Konformation durchgeführt wird. Der erste Fall muss manuell für jeden Ligand durchgeführt werden und wurde testweise beim Rescoring mit ChemPLP durchgeführt: Es ergab sich mit $R^2 = 0.6$ ein geringfügig schlechterer Korrelationskoeffizient (Korrelation Score mit pIC₅₀) als beim Rescoring aller Lösungen ($R^2 = 0.63$), daher werden zukünftig alle Dockinglösungen eines Liganden dem Rescoring zugeführt.

Wie beim Redocking im vorherigen Kapitel gezeigt wurde, ist das Docking des Liganden der Kristallstruktur konvergent, nahezu alle erzeugten Lösungen zeigen den korrekten Bindemodus und erhalten Chemscore-Werte um 40. Daher wurde die Anzahl an Docking-runs pro Ligand auf 10 gesetzt, was sich in den meisten Fällen als ausreichend herausgestellt hat. Für das Docking der publizierten Inhibitoren wird die Loop-Aminosäure Gln270 als begrenzt flexibel gesetzt, um polare Substituenten der zu dockenden Liganden besser adressieren zu können. Dazu wird eine zweite Konformation der Seitenkette von Gln270 erzeugt, bei welcher das endständige Carboxamid um 180° gedreht wurde. Außerdem wird am Chi1- und Chi3-Winkel von Gln270 eine Drehbarkeit um 30° erlaubt, sodass sich die Seitenkette besser an den gedockten Liganden anpassen kann.

In Tabelle 2-1 sind verschiedene Kombinationen von Scoringfunktionen für Docking und Rescoring aufgeführt. Es wurden die 24 Moleküle (s. oben) gedockt und die Korrelation zwischen Score und pIC₅₀ in den Feldern angegeben. Auf der Winkelhalbierenden (Docking- und Scoringfunktion identisch) befindet sich der Korrelationskoeffizient der Scoringfunktion, die zum Docking verwendet wurde.

Tab. 2-1: Angabe der Korrelationskoeffizienten (R²) in Abhängigkeit von Scoring- und Rescoringfunktion

Scoring	Rescoring			
	Chemscore	ChemPLP	ASP	Goldscore
Chemscore	0.63	0.63	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
ChemPLP	0.70	0.68	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
ASP	0.61	nicht durchgeführt	0.37	nicht durchgeführt
Gold-Fitness	0.55	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt	0.52

Einstellungen in GOLD: 100% search efficiency, 10 runs (außer Gold-Fitness & ASP: 20 runs), Gln270 flexibel (s. oben), normal: kein Wasser

Die Scoringfunktion ChemPLP liefert mit R² = 0.68 im Docking die beste Korrelation von Score und pIC₅₀ und das Rescoring mit Chemscore konnte die Korrelation nochmals auf R² = 0.7 verbessern. Beim virtuellen Screening größerer Datenbanken generierte die ChemPLP-Funktion jedoch Fehler, sodass sie nur als Rescoringfunktion eingesetzt werden konnte.

Die nächstbeste Korrelation liefert Chemscore im Dockingprozess, sie wird daher für zukünftige virtuelle Screeningprojekte ausgewählt. Rescoring mit ChemPLP hat die Korrelation weder verbessert noch verschlechtert. Um aber neue Liganden mit einem unabhängigen, zweiten Score bewerten zu können, wird das Rescoring mit ChemPLP beibehalten.

Die Scoringfunktionen Gold-Fitness und ASP sind bei dieser Bindetasche dem Chemscore und ChemPLP unterlegen, es wird daher von ihrer Verwendung abgesehen. Als Nachteile sind anzuführen, dass die beiden Funktionen mindestens 20 Docking-runs benötigen, um repräsentative Bindemodi unter den Lösungen zu erhalten. Außerdem benötigt die Gold-Fitness-Funktion die gebundenen Wassermoleküle in der S4-Tasche, da ansonsten der Naphthyl-Ring im Aufenthaltsraum der Wassermoleküle positioniert wird.

Solange also beim Docking eine geeignete Scoringfunktion eingesetzt wird, gelingt die Vorhersage von Affinitäten innerhalb der untersuchten Inhibitoren vom Benzamid-Typ hervorragend. Allerdings sind sich diese Inhibitoren strukturell relativ ähnlich und unterscheiden sich vorwiegend im Substitutionsmuster des Benzoesäure-Aromaten (verschiedene Methyl-, Methoxy- und Aminosubstitutionen); inwiefern die Affinitätsvorhersage auch bei anderen Substanzklassen, oder größeren strukturellen Änderungen, gelingt, kann aus den wenigen Daten noch nicht abgeschätzt werden. Der nächste Abschnitt zeigt aber, dass auch geringe Strukturvariationen zu einem unerwarteten Affinitätsverlust führen können.

Schwach bis nicht-bindende Substanzen

In der Literatur^[18,19] mit sehr geringer Affinität beschriebene Verbindungen („IC₅₀ > 200 μM“) wurden aus Ermangelung eines exakten Wertes mit inaktiven, d. h. nicht-bindenden Substanzen gleichgesetzt und nicht in die obigen Korrelationen einbezogen. Die Kenntnis nicht-bindender Moleküle ist dann besonders wertvoll, wenn die Verbindungen „überraschenderweise“ nicht binden, d. h. wenn sie mit aktiven Molekülen nahezu identisch sind,

jedoch keine Affinität zum Target besitzen. Dieser Fall zeigt, an welchen Punkten Struktur-Wirkungsbeziehungen noch unverstanden sind. Außerdem ist die Kenntnis von inaktiven Liganden wertvoll, die aus einem virtuellen Screeningprojekt als falsch-positive „Treffer“ (d. h. Fehlauswahl) hervorgegangen sind. Die genaue Auseinandersetzung mit den möglichen Ursachen ist hier unerlässlich, um an dem untersuchten Target Grenzen der Computermethoden zu erfahren. Die literaturbekannten, inaktiven Verbindungen sind in Abbildung 2-19 aufgeführt:

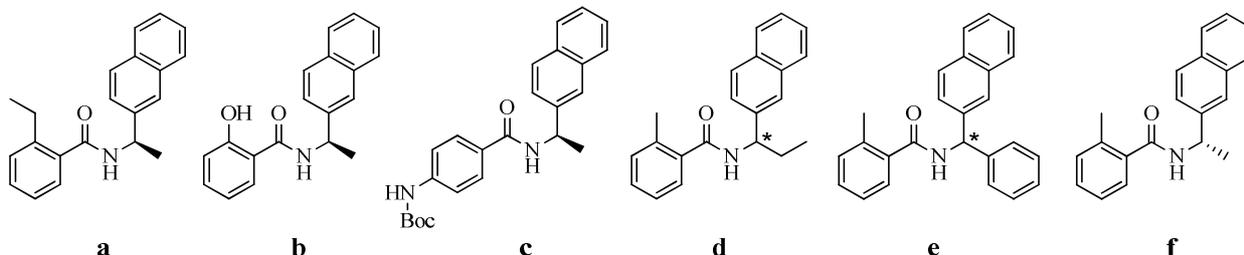


Abb. 2-19: Übersicht über literaturbekannte Verbindungen ohne inhibitorische Aktivität an SARS-CoV-PL^{pro}

Es soll nun untersucht werden, inwiefern mittels Docking die Inaktivität der Verbindungen **a - f** vorhergesagt werden kann. Dazu werden sie unter verschiedenen Scoring-Rescoring-Kombinationen (s. Tab. 2-1, oben) gedockt, die Ergebnisse sind wie folgt:

- a.** Das 2-Ethylbenzamid erzielt im Docking mit dem besten Bindemodus einen Chemscore von 41.6, woraus sich ein pIC_{50} von etwa 6 berechnen lässt (lineare Regression). Demnach wird die ungünstige Ethylgruppe, die zum Affinitätsverlust führt, nicht im Docking und Scoring als ungünstig erkannt. Der Diederwinkel der Ethylgruppe ist bei den Ligandposen $51^\circ - 53^\circ$. Dieser Winkel liegt laut Brameld et al.^[82] noch in einem Bereich, der in Kristallstrukturen der PDB relativ häufig beobachtet wird, wenn auch die häufigste Geometrie ein Diederwinkel von 90° ist (PDB und CSD). Es muss daher angenommen werden, dass entweder der 90° -Diederwinkel (Energiminimum) eine Ligandbindung verhindert (sterische Überlappung, „Clash“) und die Rotationsbarriere nicht überwunden werden kann, oder dass die sterischen Verhältnisse beim „Methyl-Hotspot“ von den Scoringfunktionen nicht richtig beschrieben werden und selbst die Konformation mit um 50° gedrehter Ethylgruppe zu einer ungünstigen Wechselwirkung führt. Zum Beispiel könnten die nahen Aminosäurereste in Lösung aufgrund von Eigenbewegung den Raum für den Methyl-Hotspot im Vergleich zur Kristallstruktur einschränken und so eher einen „Clash“ verursachen als angenommen.
- b.** Nach Docking und Scoring wird der Verbindung ein pIC_{50} von 4 - 5 zugewiesen, was eine annehmbar niedrige Bewertung ist. In einem virtuellen Screeningprojekt würde man solch niedrig gescorte Verbindungen nicht zur Testung auswählen. Dass sie jedoch keine messbare Hemmung zeigt, könnte an einer starken intramolekularen Wasserstoffbrücke zwischen der 2-Hydroxy-Funktion und dem Carbonyl liegen, was das Molekül in einer Konformation fixiert, in der es nicht an das Protein binden kann. Für Salicylamid wird von Rios und Rodriguez^[83] eine Enthalpie von 19 - 22 kcal/mol für die intramolekulare H-Brücke angegeben.
- c.** Die Vorhersage ergibt auch hier einen niedrigen pIC_{50} zwischen 4.5 - 5, und im Chemscore-Rescoring nach Gold-Fitness-Docking wird sogar ein pIC_{50} von nur 2.5 vorhergesagt. Der Grund liegt bei letzterem jedoch daran, dass die Gold-Fitness-Funktion im Docking eine ungünstige Konformation der Boc-Gruppe erstellt: Die Carbamat-Gruppe erhält eine planare Geometrie zum Benzamid-Aromaten, sodass sie keine

Wasserstoffbrücken zu Proteinresten eingehen kann und die Pose schließlich vom Chemscore-Rescoring als besonders niederaffin bewertet wird. Wie später in Kapitel 3 gezeigt wird, kann eine 4-(Boc-Amino)-Substitution jedoch auch günstig sein (Verbindung **8**, $pIC_{50} = 5.8$). Die Inaktivität der Substanz **c** ist daher nicht erklärbar, zumal die ebenso publizierte, homologe Verbindung ohne Boc-Gruppe einen pIC_{50} von 4.3 erzielt und damit mäßig aktiv ist^[19].

- d. Mit einem berechneten pIC_{50} von etwa 5 - 5.5 wird auch diese Verbindung als affin im „einstelligen mikromolaren Bereich“ bewertet. Im Docking kann die endständige Methylgruppe der Amin-Komponente entweder vom Protein weg oder zum Protein hin zeigen. Zeigt die Methylgruppe zum Protein hin, verbleibt noch ein Ligand-Protein C-C-Abstand von 3.2 Å, was sich in Chemscore lediglich durch einen leicht erhöhten Clash-Term (0.4) bemerkbar macht. Ein Gold-Fitness-Docking unter Berücksichtigung der dort gebundenen Wassermoleküle ist möglich, dann wird allerdings nur die Pose mit Methylgruppe „zum Protein hin“ generiert, um einen „Clash“ mit Wassermolekülen zu vermeiden. Da die Verbindung jedoch inaktiv ist, muss davon ausgegangen werden, dass diese lipophile Verlängerung der Amin-Komponente sterisch zu anspruchsvoll ist, obwohl laut Kristallstruktur und Docking der Platz vorhanden wäre.
- e. Die Substanz wurde mit einem berechneten pIC_{50} von 5.5 - 6 als affin bewertet (Docking ohne gebundene Wassermoleküle). Werden die drei gebundenen Wassermoleküle der S4-Tasche beim Docking (Gold-Fitness) miteinbezogen, verdrängt der Phenylring der Amin-Komponente eines davon. Falls ein Wassermolekül verdrängt werden könnte, würde davon die freie Ligand-Bindungsenthalpie durch die Entropiezunahme profitieren. Das Rescoring mit Chemscore bewertet allerdings den von der Gold-Fitness-Funktion erzeugten Bindemodus als ungünstig und führt zu einem berechneten pIC_{50} von 3.2: Grund ist hier der empfindliche Clash-Term des Chemscores, er bestraft die von der Gold-Fitness-Funktion erlaubte Nähe zu den verbleibenden zwei Wassermolekülen (C-O-Abstände 2.5 und 2.9 Å). Bei zukünftigen Screeningprojekten sollte daher ein möglicher „Clash“ mit gebundenem Wasser bedacht werden.
- f. Zur *S*-konfigurierten Verbindung wird ein pIC_{50} von 4 - 4.5 berechnet (Chemscore 36, ohne Wasser), sie wird damit schlechter als ihr aktives *R*-Konformer bewertet (berechneter $pIC_{50} = 5 - 5.5$, Chemscore 39, tatsächlicher $pIC_{50} = 5.1$), sodass die Bevorzugung der *R*-Konfiguration mittels Docking erkannt wird. Die Zusammensetzung des Chemscore-Werts aus seinen Einzelbeiträgen lässt bei Verbindung **f** einen schwachen „Clash“ zwischen der *S*-Methylgruppe und Tyr265 erkennen (C-C-Abstand 3.5 Å). Der „Internal-Torsion-Term“ ist etwas auffälliger: Sein Wert von 2.5 ist deutlich größer als bei anderen, vergleichbaren, aber affinen Liganden (Werte um 1.5).

In einem virtuellen Screening sollte eine Scoringfunktion nicht-bindenden Molekülen niedrige Affinitäten zuweisen, sodass diese „nicht-Binder“ herausgefiltert werden. Um zu entscheiden, ob diese Aufgabe erfolgreich erfüllt wird, sind zunächst weitere Sachverhalte zu erklären: Von den „inaktiven“ Molekülen ist aus den Publikationen^[18,19] nur bekannt, dass ihr IC_{50} über 200 μ M liegt ($pIC_{50} < 3.7$). Enzymrestaktivitäten bei 200 μ M InhibitorKonzentration sind nicht angegeben, doch andererseits wären Hemmwerte bei dieser hohen Konzentration nicht sicher interpretierbar, da je nach Löslichkeit der Verbindungen diese Konzentration nicht erreicht wird. Wenn man weiterhin bei einer Scoringfunktion eine Vorhersagegenauigkeit von einer Zehnerpotenz beim K_i -Wert annimmt, kann von einer erfolgreichen Affinitätsvorhersage gesprochen werden, wenn die inaktiven Moleküle mit einem berechneten $pIC_{50} < 4.7$ beschrieben werden.

Demnach konnten die Verbindungen **b**, **c**, **e** und **f** erfolgreich als niederaffin (bzw. „inaktiv“) vorhergesagt werden. Bei den Verbindungen **a** und **d** ist dies nicht gelungen, und **e** stellt einen Grenzfall dar, der die Wichtigkeit der Berücksichtigung von gebundenen Wassermolekülen betont. Zusammengefasst scheint bei **a** und **d** eine mangelhafte Beschreibung des verfügbaren Raumes in der Bindetasche und des Platzbedarfs der Liganden für die falsche Affinitätsvorhersage verantwortlich zu sein. Außerdem wird bei **a** und **d** bei Ligandbindung eine zuvor rotierbare Ethylgruppe räumlich fixiert, was entropisch ungünstig ist und somit den Betrag der freien Ligand-Bindungsenthalpie verringert. Bei Verbindung **e** stellt sich die Schwierigkeit, dass die Ligandbindung die Verdrängung von Wassermolekülen erfordert, die in ein Netzwerk von mehreren H-Brücken eingebunden sind. Zwar ist dieser Vorgang entropisch günstig, doch zum einen ist die nötige Desolvatationsenergie nur schwer abschätzbar und zum andern kann die dabei platzierte Ligandgruppe, ein Phenylring, keine neuen H-Brücken ausbilden, sodass die Bildung des Protein-Ligand-Komplexes mit Verbindung **e** enthalpisch ungünstig ist.

Fazit

Die Beispiele **a** - **f** konnten zeigen, in welchen Fällen die Inaktivität von Leitstruktur-ähnlichen Molekülen durch Scoring und visuelle Beurteilung erkannt werden kann. Die Verbindungen **a**, **d** und **e** liefern dabei wertvolle Informationen, um rational noch nicht begründbare und daher vom Docking und Scoring abweichende Struktur-Wirkungsbeziehungen aufzustellen:

1. Der Methyl-Hotspot der S3-Tasche konnte nicht durch eine Ethylgruppe adressiert werden.
2. Der Methyl-Hotspot der S4-Tasche konnte nicht durch eine Ethylgruppe adressiert werden.
3. Die gebundenen Wassermoleküle in der S4-Tasche lassen sich nicht mit einem Phenylring verdrängen.

Diese Struktur-Wirkungsbeziehungen sind folglich bei der subjektiven Bewertung von Bindemodi zu bedenken, aber auch bei anderen Substanzklassen auf ihre Gültigkeit zu prüfen und gegebenenfalls zu korrigieren.

2.5.4. Die Problematik des Scorings – für virtuelle Screeningprojekte relevante Aspekte

Der Mangel, nicht-bindende Moleküle sicher als niederaffin zu bewerten, stellt im Scoring ein grundsätzliches Problem dar. Um diesen Fehler bei der Abschätzung der freien Ligand-Bindungsenthalpie zu quantifizieren, sei folgendes Beispiel angeführt: In Abhängigkeit vom experimentellen Assay können schwach affine Liganden ab einer Affinität von etwa $K_i > 300 \mu\text{M}$ nicht mehr als „bindend“ erkannt werden und gelten dann als nicht-bindend. Erfährt nun eine aktive Leitstruktur wie die literaturbekannte Verbindung **2** (K_i ca. $3 \mu\text{M}$, entspricht einer freien Ligand-Bindungsenthalpie von $\Delta G^\circ = -7.4 \text{ kcal/mol}$) nach Derivatisierung einen „vollständigen Affinitätsverlust“ – wie so häufig in Kapitel 3 der Fall – ist genau genommen von einem 100-fachen, oder mehr als 100-fachen Affinitätsverlust zu sprechen. Bezogen auf die freie Ligand-Bindungsenthalpie entspricht dieser Affinitätsverlust einer Änderung von nur $\Delta\Delta G = 2.8 \text{ kcal/mol}$, womit die Schwierigkeit einer Affinitätsvorhersage verständlicher wird. Für eine Verbindung, die im virtuellen Screening vom Scoring als vielversprechend identifiziert wird, im anschließenden Experiment aber als inaktiv getestet wird, bedeutet das, dass man nicht weiß, ob diese Verbindung lediglich 100-fach schwächer an das Protein bindet als vorhergesagt, oder ob sie 10^4 -fach schwächer bindet. In beiden Fällen wird man die Substanzklasse verwerfen, obwohl im ersten Fall eine Leitstrukturoptimierung vielleicht gelingen könnte.

Weiterhin kommt hinzu, dass eine Scoringfunktion die Ligandbindung mittels eines vereinfachten, statisch-mechanischen Modells beschreibt. Die anziehenden und abstoßenden Kräfte im Komplex können zwar relativ gut

mittels Lennard-Jones- und Coulomb-Potenzial berechnet werden, die Aussagekraft über Prozesse *während* der Ligandbindung ist jedoch sehr gering. Zu diesen Prozessen zählen schon geringe Änderungen der Protein-Konformation, die Desolvatation polarer Gruppen von Ligand und Protein (große enthalpische und entropische Beiträge) und der Verlust an Freiheitsgraden aufgrund Ligandbindung.

Erschwerend für die Weiterentwicklung von Scoringfunktionen ist außerdem, dass diese primär dadurch trainiert werden, indem sie für die Vorhersage der Affinität publizierter Protein-Ligand-Komplexe optimiert werden. Von einem „falsch-positiven Treffer“, also einem Molekül das im Docking einen gut bewerteten Bindemodus erhält, ohne Affinität zur Bindetasche zu besitzen, gibt es jedoch keinen „nicht-affinen“ Protein-Ligand-Komplex und somit wird die Scoringfunktion nicht für diesen Fall trainiert, d. h. es werden bisherige Mängel nicht automatisch entdeckt.

Ein weiteres Problem ergibt sich bereits beim Erstellen der Ligand-Konformation durch das Dockingprogramm. Ungenügende Parametrisierungen bestimmter funktioneller Gruppen (wie z. B. acylierte Hydrazone, aromatische Sulfonamide) führen manchmal zu unwahrscheinlichen Ligandgeometrien, die jedoch vom Anwender leicht erkannt werden können und vermutlich daher stammen, dass Rotationsbarrieren in das Dockingprogramm geringfügig bis gar nicht implementiert wurden. Doch während ein in diesem Fall größerer Konformationsraum nur zusätzliche Ligandposen bedeutet, ist auch der umgekehrte Fall möglich, dass bei ausbleibender Rotation um eine bestimmte Bindung eine „Lücke“ im Konformationsraum entsteht und damit eine möglicherweise relevante Interaktion nicht ausgebildet wird. Ein Beispiel für eine „Lücke“ im Konformationsraum ist die starre und coplanare Behandlung von primären, aromatischen Aminogruppen (siehe Kapitel 2.1).

Beim virtuellen Screening wird schließlich die Scoringfunktion mit dem Problem konfrontiert, dass sich in einer großen Substanzbibliothek mittels Docking eine Vielzahl von Liganden finden lassen, die chemisch plausible Interaktionen zur Bindetasche ausbilden können und daher einen hohen Score erzielen. Viele dieser „virtuellen Treffer“ zeigen jedoch nach experimenteller Testung keine Aktivität: anhand einer vereinfachten Beispielrechnung schätzt Seifert^[84] die durchschnittliche Quote von richtig-positiven zu falsch-positiven Treffern sogar auf 1 zu 5900! Dieses Verhältnis ist allerdings stark abhängig von der Definition einer „schwach affinen“ Verbindung und ihrer Häufigkeit in der Substanzbibliothek. Die Gründe für fälschlich hohes Scoring von Verbindungen ohne tatsächliche Affinität liegen dabei, wie erwähnt, in den Schwierigkeiten bei der Beschreibung der Protein-Ligand-Komplexe.

Ein möglicher Ansatz, Fehlantworten aufgrund fälschlich hohen Scorings nachträglich zu verringern, ist die sorgfältige, visuelle Beurteilung der Moleküle und ihrer Bindemodi. So werden alle Moleküle mit subjektiv nicht-plausiblen Bindemodus oder unwahrscheinlicher Konformation von der Auswahl gestrichen. Weiterhin können bei der subjektiven Bewertung von Bindemodi bereits bekannte Struktur-Wirkungsbeziehungen miteinfließen.

Ein weiterer Ansatz kann darin bestehen, durch rechenaufwändigere Verfahren wie MD-Simulation die Stabilität der Protein-Ligand-Komplexe zu untersuchen. Proctor et al.^[85] beschreiben beispielsweise, dass sie mittels MD-Simulation die Verweildauer (residence time) von gedockten Ligandposen bestimmen: dazu werden von jeder Pose 100 „discrete-MD“-Simulationen (Anmerkung: „discrete-MD“: diskrete statt kontinuierliche Potenziale) gestartet, die bis zum Verlust der ursprünglichen Ligand-Konformation laufen („pose exit“). Nachdem die Wahrscheinlichkeit zum „pose exit“ Poisson-verteilt ist, kann aus der erhaltenen Statistik die mittlere Verweildauer des Bindemodus berechnet werden. Auf diese Weise konnten Proctor et al. korrekte Bindemodi von Kinase-Inhibitoren identifizieren, die sich zuvor beim Scoring als problematisch herausgestellt hatten (Docking & Scoring mit „MedusaDock“).

Die freie Ligand-Bindungsenthalpie lässt sich auch direkt aus einem thermodynamischen Kreisprozess berechnen: dafür werden zunächst die freien Enthalpien von Protein, Ligand und Komplex z. B. über einen MM-PBSA-Ansatz

bestimmt und schließlich die freien Enthalpien von Protein und Ligand von der des Komplexes abgezogen^[86]. Resultierende freie Ligand-Bindungsenthalpien korrelieren zwar laut Rastelli et al.^[87] erfreulich gut mit einem Ligand-Ranking nach Affinitäten, doch im zitierten Anwendungsbeispiel (Target: *Plasmodium falciparum*-Dihydrofolatreduktase) wird auch klar auf die Grenzen dieser Methode hingewiesen: die Fehler absoluter, freier Ligand-Bindungsenthalpien sind so groß, dass die Absolutwerte keine Aussagekraft besitzen; die relativen Standardabweichungen sind bei den Ligand-Bindungsenthalpien mit ca. 2 kcal/mol zwar gut, doch beim Entropieterm mit ca. 8 kcal/mol so schlecht, dass dessen Berücksichtigung die Korrelation im Ligand-Ranking sogar verschlechtert. So bleibt die Abschätzung der Entropie weiterhin eine der schwierigsten Aufgaben bei der Vorhersage von Affinitäten.

2.5.5. Virtuelles High-Throughput-Screening (vHTS)

Zunächst wird das bereits angesprochene vHTS-Protokoll mit 10% Search-Efficiency und vier Constraints evaluiert. Ratia et al.^[18] führten 2008 ein experimentelles HTS mittels Roboter durch, bei welchem zwei Leitstrukturen gefunden wurden, die nach synthetischer Optimierung zu den Röntgenkristallstrukturen 3E9S und 3MJ5 führten. Das HTS erfolgte mit der Substanzbibliothek „Chembridge-Diverset“ (50.080 Substanzen). Nachdem laut Publikation^[18] von 17 ersten Hits eine weitere Untersuchung nur die besagten zwei Leitstrukturen übrig ließ, darf davon ausgegangen werden, dass unter den ca. 50.000 Substanzen nur die eine Substanz (Abb. 2-20) enthalten ist, die an die 3E9S-Protein-Konformation bindet und das Enzym dadurch inhibiert. Ein virtuelles HTS mit den 50.000 Substanzen soll nun zeigen, ob GOLD die aktive Verbindung findet. Der andere HTS-Hit mit Piperidincarboxamid-Struktur^[20] wird nicht berücksichtigt, da dieser ein separates vHTS an der 3MJ5-Proteinstruktur benötigen würde.

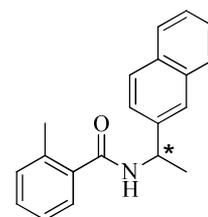


Abb. 2-20: HTS-Screening-Hit
IC₅₀ = 20 μM

Die Substanzbibliothek „Chembridge-Diverset“ muss zunächst aufbereitet werden. Mit dem Programm OMEGA/FLIPPER^[88] werden von allen Moleküleinträgen alle denkbaren Stereoisomere erzeugt (bis zu 12 je Eintrag), danach werden diese mit OMEGA^[88] in energieminierte 3D-Strukturen übersetzt. Man erhält eine in GOLD verwendbare mol2-Datenbank mit 81492 Einträgen. Das vHTS dieser Datenbank liefert folgendes Ergebnis:

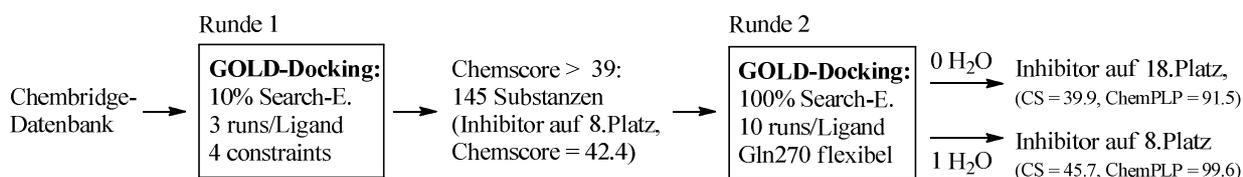


Abb. 2-21: Flussdiagramm zur Veranschaulichung des virtuellen Screenings der Chembridge-Datenbank in zwei Runden. Die Score-Werte sind beim Docking mit einem Wassermolekül aufgrund dessen H-Brückenbeitrags 3 - 6 Punkte im Chemscore höher (10 Punkte beim ChemPLP).

In der Rangliste nach Docking-Runde 1 findet sich der Inhibitor auf Platz 8 von 81492. Der Ligand wird aus dem Datensatz mittels verkürztem Suchalgorithmus also hoch platziert und damit ist das Ziel bereits erreicht. Es wird eine zweite Docking-Runde mit den besten 145 „Treffern“ (0.18% der Eingangsdatenbank) durchgeführt, dadurch wird ein rechenaufwändigeres, Constraint-freies Docking (ohne Bias) gewährleistet. Im Ergebnis von Runde 2 landet der Inhibitor auf Platz 18. Wird das Docking von Runde 2 unter Einbezug des am tiefsten vergrabenen Wassermoleküls (zwischen Tyr274 und Asp303) durchgeführt, führt bei einigen Liganden die vom Wasser verkleinerte S4-Tasche zu einem erhöhten Clash-Term und der Inhibitor erreicht wieder den 8.Platz.

Die „Anreicherung“ von aktiven Verbindungen in einem Datensatz durch Screening-Methoden kann mit den Kennzahlen Enrichment-Factor (*EF*) und Hit-Rate (*HR*) beschrieben werden^[89,90]:

$$EF = (H_s / N_s) / (H_t / N_t) \quad (7)$$

H: Anzahl aktiver Verbindungen N: Anzahl aller Verbindungen
Index s: im Subset (Ausgabe) Index t: im Total (Eingabe)

$$HR = (H_s / H_t) 100\% \quad (8)$$

Deren zu Fehlinterpretation verleitende Bedeutung soll durch folgende Beispielrechnung veranschaulicht werden, das ideale Subset hat dabei die Größe 8, sodass die aktive Verbindung „gerade noch“ in die Auswahl gelangt:

$$EF = (1 / 8) / (1 / 81492) = 10186.5$$

$$HR = (1 / 1) 100\% = 100\%$$

Dieses „hervorragende“ Ergebnis könnte auf ein hoch zuverlässiges virtuelles Screening schließen lassen, bei dem generell inaktive Verbindungen mit großer Sicherheit niedrige Score-Werte erhalten und umgekehrt aktive Verbindungen hohe Score-Werte. Zwar fällt wegen des einzigen, an der Proteinstruktur 3E9S bindenden Liganden das Ergebnis besonders deutlich aus, doch auch wenn 10 aktive Inhibitoren im Datensatz wären und nur der eine Inhibitor beim Subset der 8 Besten identifiziert würde, beträgt der *EF* noch 1019. Das angewendete Screening-Protokoll funktioniert also tatsächlich gut. Der *EF* sagt dabei aber nur aus, um wieviel die Wahrscheinlichkeit erhöht ist, bei zufälliger Auswahl eines Liganden aus Subset und Chembridge-Datenbank einen aktiven Liganden zu finden. Die Wahrscheinlichkeit zu richtigem Scoring liegt innerhalb des Subsets nur bei 1/8 – stellt aber dennoch ein gutes Ergebnis dar. Die folgenden Screeningprojekte werden zeigen, dass sich in großen Substanzbibliotheken viele Moleküle finden lassen, die einen guten Bindemodus und hohen Score-Wert ergeben, ohne tatsächlich aktiv zu sein.

Virtuelles High-Throughput-Screening der Specs-Datenbank an 3E9S

Bei der Frage nach der zu wählenden Screening-Datenbank fiel die Wahl auf den niederländischen Anbieter Specs. Dieser bietet eine ca. 200.000 Substanzen umfassende, diversifizierte „Screening-Compound“-Datenbank an. Es wurde die von Zinc^[91] aufbereitete Specs-Datenbank mit 361.671 Moleküleinträgen verwendet (Version 2009). Sie umfasst „drug-like“ Moleküle, ist jedoch nicht streng nach den Lipinski-Rules-Of-Five^[92] gefiltert (Specs: Grenze Molekulargewicht 600 g/mol, keine Grenze bei berechnetem cLogP-Wert). Auf eine Filterung wird *bewusst* verzichtet: Sollten unter den endgültigen Screening-Hits Verbindungen mit hydrolysierbaren, reaktiven oder zu vielen polaren Gruppen sein, können diese auch noch am Ende von der Auswahl gestrichen werden. In erster Linie gilt es, Verbindungen mit gutem Bindemodus und hohem Score-Wert zu identifizieren. Abgeschätzte Eigenschaften zu Pharmakokinetik, Permeabilität o.ä. sind in diesem ersten Schritt der Wirkstofffindung unbedeutend.

Das Screening-Protokoll von Abbildung 2-21 wird für das Screening der Specs-Datenbank um eine zwischen-geschobene Docking-Runde erweitert (s. Abb. 2-22). So sollte ein noch gründlicheres Durchsuchen der Datenbank ermöglicht werden und das Constraint-basierte Docking der ersten Runde dient nur noch als grober Filter. Neben der Aminosäure Gln270 wird nun auch Tyr269 leicht flexibel eingestellt, um einem neuartigen Ligand in der S4-Tasche eine ideale Oberflächenkomplementarität zu ermöglichen. Das tiefste, gebundene Wassermolekül wird im Docking beibehalten. Das Screening der Chembridge-Datenbank zeigte, dass dieses eine Wassermolekül bereits die ungünstigen „S4-Wasser-Clasher“ der Datenbank ausschließen konnte. Die weiteren zwei Wassermoleküle werden

daher nicht berücksichtigt, um die Möglichkeit offen zu halten, dass ein neuer Ligand in diesem Aufenthaltsraum eine polare Gruppe platziert. Im folgenden Flussdiagramm ist das Screening der Specs-Datenbank dargestellt:

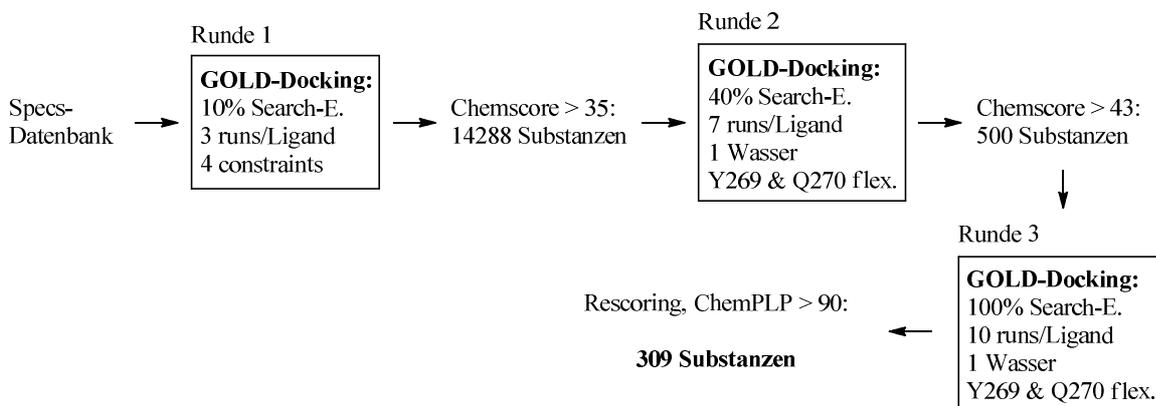


Abb. 2-22: Flussdiagramm zur Veranschaulichung des virtuellen Screenings der Specs-Datenbank an Proteinstruktur 3E9S in drei Runden.

Die Ausgabe von Runde 3 wird nach Rescoring ChemPLP > 90 gefiltert, sodass 309 „Treffer“ erhalten werden, die von beiden Scoringfunktionen (Chemscore und ChemPLP) gut bewertete Bindemodi liefern. Die Ligandposen der 309 Moleküle werden mit MOE zu Gruppen mit ähnlichem Bindemodus geclustert. Dazu werden in der Bindetasche der 3E9S-Proteinstruktur drei Pharmakophor-Modelle erstellt, welche die unterschiedliche Anordnung von Donor- und Akzeptor-Atomen bei verschiedenen Bindemodi differenzieren sollen. Der Datensatz mit 309 Molekülen wird dann sequenziell gefiltert, wobei die gedockten Ligandposen starr und mit absoluter Position behandelt werden:

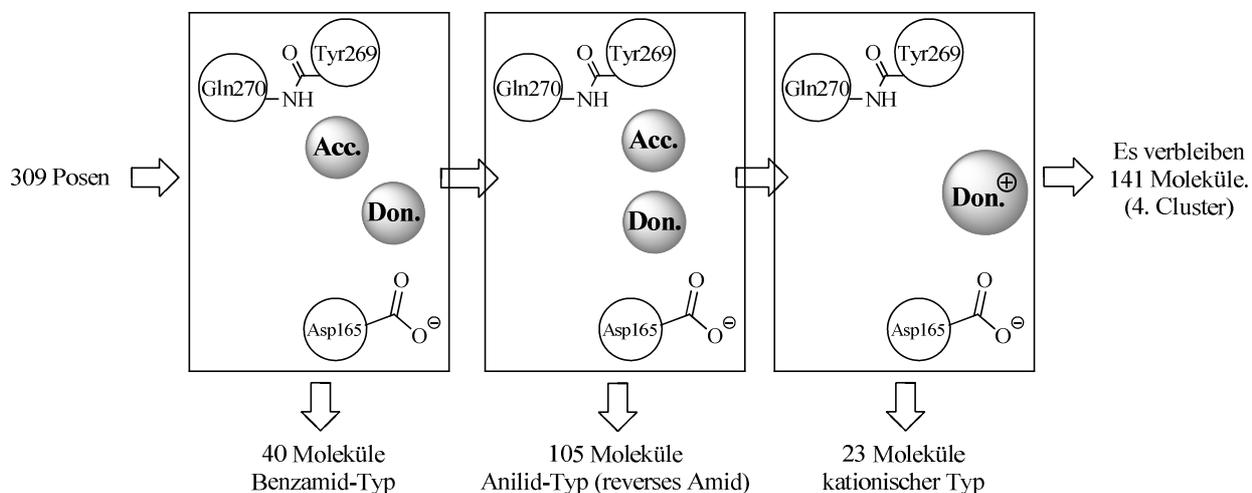


Abb 2-23: Sequenzielles Clustering durch drei Pharmakophor-Modelle, die auf die starren Ligandposen angewendet wurden.

Es werden durch die Pharmakophor-Filterung drei Cluster gebildet, die Moleküle mit ähnlichen Bindemodi enthalten. Die nicht von den Pharmakophor-Modellen erfassten Ligandposen bilden schließlich den 4. Cluster. Durch die Cluster-Einteilung lassen sich die Moleküle besser visuell auswerten, da dann die Unterschiede zwischen ähnlichen Molekülen eher erkannt werden.

Bei der Substanzauswahl werden zwei Aspekte berücksichtigt: erstens sollen alle Verbindungen bestellt werden, die einen plausiblen und sehr gut bewerteten Bindemodus haben; zweitens soll von den verschiedenen, gefundenen Substanzklassen („Scaffolds“) mindestens je ein Vertreter bestellt werden, um möglichst viele, neuartige Scaffolds

auf Hemmwirkung untersuchen zu können. Eine Strukturformelübersicht der aus den Clustern ausgewählten Verbindungen findet sich im anschließenden Kapitel 2.5.6.

Vom Cluster des Benzamid-Typs wurden keine Benzamide ausgewählt, da zum Zeitpunkt der Bestellung bereits Benzamide synthetisiert waren, die bessere Interaktionen als die virtuellen Screening-Hits eingehen sollten. Die Verbindung B16 stellt im Hinblick auf ihren Bindemodus einen Ligand vom Benzamid-Typ dar, der jedoch das Benzamid-Pharmakophor nicht erfüllte und daher im 4. Cluster landete. Wegen des leicht anderen Bindemodus (verglichen mit anderen Benzamiden) wurde B16 dennoch zur Bestellung ausgewählt. Im Benzamid-Cluster fand sich auch ein Imidazol-Derivat (B3), welches aufgrund seines guten Bindemodus dann als einziger Vertreter dieses Benzamid-Clusters bestellt wurde. Die restlichen Imidazol-Derivate (B4, B6, B7, B9) sind durch die Pharmakophor-Filterung nicht erfasst worden und finden sich dadurch im 4. Cluster wieder.

Fünf Substanzen (B14, B19, B20, B21, B23) sind vom 2. Cluster ausgewählt worden (Anilid-Typ). Die Anilide B19, B20 und B21 binden wie die publizierten Benzamid-Inhibitoren^[18,19] in der S3-Tasche mit einem in 2-Position Methyl- oder Chlor-substituierten Aromaten. Da die H-Brücken-Interaktion des Amid-„Kernfragments“ der Anilide zum Loop-Gln270 und zu Asp165 prinzipiell dieselbe ist wie bei den Benzamiden und lediglich die Positionen von Amino- und Säuregruppe vertauscht sind, können diese Verbindungen auch als „reverse Amide“ bezeichnet werden (siehe dazu auch Kap. 3.5).

Vom 3. Cluster wurden sechs Substanzen (B2, B8, B11, B13, B18, B24) ausgewählt (kationischer Typ). Deren bei physiologischem pH-Wert protonierte Aminogruppe kann dadurch eine ladungsgestützte H-Brücke zu Asp165 ausbilden. Die sekundären Amine von B2, B8, B11 und B18 können die H-Brücke zu Asp165 bereits im unprotonierten Zustand ausbilden, das freie Elektronenpaar des Stickstoffs kann dann zusätzlich gegenüber Tyr274 als H-Brücken-Akzeptor auftreten. Im protonierten Zustand empfängt dann der Phenolsauerstoff von Tyr274 das zweite H-Atom der geladenen Ammoniumgruppe. Die beiden tertiären Amine B13 und B24 haben einen 2-Hydroxypropyl-Spacer gemeinsam, dessen Hydroxygruppe zu Asp165 eine weitere H-Brücke ausbildet und gleichzeitig von der polaren Umgebung der S4-Tasche adressiert werden könnte (denkbar sind H-Brücken zu Tyr274 und zu den in der S4-Tasche gebundenen Wassermolekülen).

Schließlich wurden sechs Substanzen (B4, B6, B7, B9, B12, B16) des 4. Clusters ausgewählt. Es handelt sich dabei um Imidazol-Derivate (B4, B6, B7, B9), um ein Chinolin-4-carboxamid (B16) und um ein Hydrazo-substituiertes Pyrazolon (B12).

Virtuelles High-Throughput-Screening der Specs-Datenbank an 3MJ5

Ähnlich wie im vorherigen Abschnitt wird nun ein virtuelles Screening an der Proteinstruktur 3MJ5 durchgeführt, da sich auch an dieser Protein-Konformation Verbindungen finden lassen sollten, die den Loop wie die Piperidincarboxamid-Inhibitoren^[20] adressieren. Für das Docking in Runde 1 werden dazu die vier Constraints an die neue Struktur angepasst und in Runde 2 wird Tyr269 flexibel eingestellt (15° Schwenkbereich an Chi1 und Chi2). Außerdem wird Leu163 flexibel eingestellt (20° Schwenkbereich an Chi1 und Chi2) und Gln270 wird starr gehalten, da es bei der 3MJ5-Loop-Konformation nach oben weg zeigt (vermutlich artifiziell aufgrund der Kristallpackung). Um das Screening-Protokoll im Vergleich zum vorherigen Screening (Abb. 2-22) zu verkürzen, wird nach der Constraint-basierten Runde 1 direkt das präzise Docking in Runde 2 durchgeführt (s. Abb. 2-24). Dadurch kommt dem Constraint-basierten Docking aus Runde 1 wieder eine größere Bedeutung hinsichtlich des Rankings zu, und ob Runde 1 diese Anforderung auch hier erfüllt, wird durch eine Kontroll-Runde kontrolliert. In dieser werden

suboptimale Liganden (Chemscore 37 - 44) von Runde 1 etwas präziser gedockt, sodass kontrolliert werden kann, ob diese suboptimalen Liganden in Runde 1 repräsentative Bindemodi und Score-Werte erhalten haben.

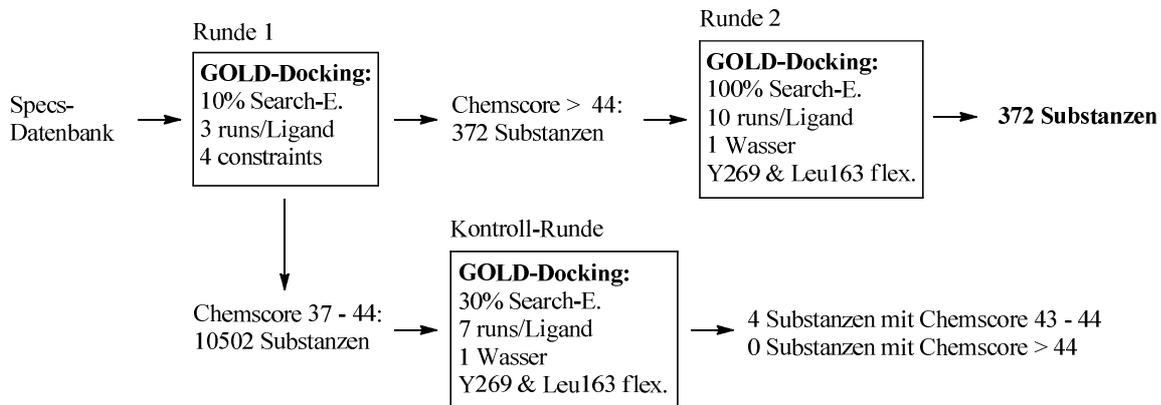


Abb. 2-24: Flussdiagramm zur Veranschaulichung des virtuellen Screenings der Specs-Datenbank an Proteinstruktur 3MJ5 in 2 Runden.

Die Kontroll-Runde konnte zeigen, dass das Subset der „10502 nächst-schlechteren“ Substanzen tatsächlich keine weiteren Verbindungen enthält, die zu gut bewerteten Bindemodi führen. Die Bindemodi der in Runde 2 präzise gedockten 372 Screening-Hits wurden anschließend visuell ausgewertet und davon 6 Verbindungen bestellt: B1, B5, B10, B15, B17, B22 (Strukturen s. Kap. 2.5.6).

Bei der Substanzauswahl wurde darauf geachtet, dass die Liganden die Tyr269-Carbonylgruppe des invertierten Loop-Backbones adressieren. Wieder zeigt sich die Amid-Gruppe als geeignetes Kernfragment, ihr Sauerstoff ist dann allerdings nicht zum Loop, sondern „nach unten“ gerichtet (an Asp165 vorbei). Dadurch wird eine H-Brücke mit Tyr274 ausgebildet (siehe B1 und B10).

Bei Verbindung B5 findet sich abermals das Imidazol-Scaffold: an der Loop-invertierten Struktur 3MJ5 kann es als protoniertes Kation gleichzeitig Loop und Asp165 als H-Donor adressieren.

Ein interessantes Scaffold weisen die Piperazin-Derivate B15, B17 und B22 auf: Ihr Piperazin-Scaffold ermöglicht einen ähnlichen Bindemodus wie ihn auch der Piperidincarboxamid-Inhibitor in Struktur 3MJ5 besitzt. Die in der S4-Tasche liegende Methylgruppe ist bei den Screening-Hits B15 und B17 jedoch eine Carbonyl-Gruppe, welche laut Dockingpose von Tyr274 eine H-Brücke empfängt:

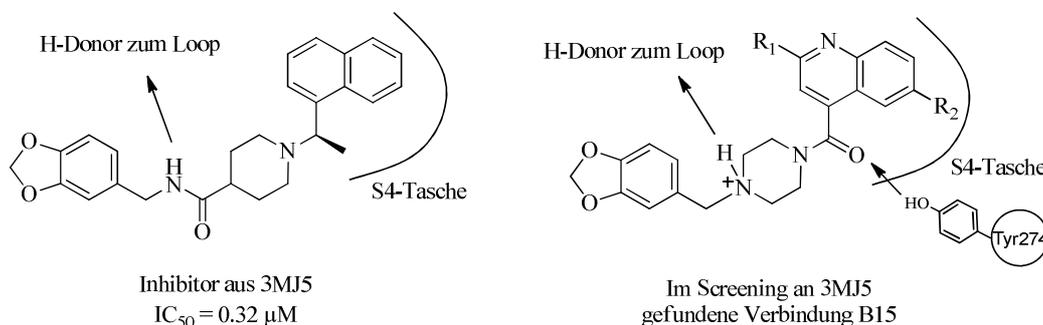


Abb. 2-25: Gegenüberstellung der Strukturformeln von bekanntem Inhibitor (Kristallstruktur 3MJ5) und virtuellem Screening-Hit B15.

Virtuelles High-Throughput-Screening der Zinc-clean-drug-like-T90-Datenbank an 3E9S

Es wurden neben den virtuellen Screenings der Specs-Datenbank noch weitere Screening-Projekte durchgeführt, die nicht an einen einzigen Anbieter gebunden waren. Eines davon soll im Folgenden vorgestellt werden. Als weitere Substanzbibliothek erscheint zunächst die Zinc-drug-like-Datenbank sinnvoll, sie repräsentiert den gesamten, erwerbbaaren „chemischen Raum“ mit „drug-like“ Eigenschaften. Sie umfasste jedoch zum damaligen Zeitpunkt bereits etwa 10 Millionen Einträge, was zeitlich zu umfangreich gewesen wäre. Von der Zinc-drug-like-Datenbank existiert weiterhin eine gefilterte Version, die Zinc-clean-drug-like-Datenbank, bei welcher Substanzen mit „problematischen Gruppen im Assay“ herausgefiltert wurden^[91]. Diese Datenbank ist auch in einer geclusterten Version verfügbar, der „Zinc-drug-like-T90“-Datenbank mit 536.708 Einträgen. Hier wurden strukturell ähnliche Moleküle zum Tanimoto-Koeffizient = 0.9 zu Clustern mit einzelnen „Vertreter-Molekülen“ zusammengefasst, sodass der molekulare Raum unter weitgehendem Beibehalt seiner „Diversität“ verkleinert und für rechenaufwändige Screeningverfahren wie Docking besser zugänglich gemacht wurde.

Das Screening wurde in zwei Runden an der Struktur 3E9S durchgeführt und die Ausgabe mit den bereits erwähnten Pharmakophor-Modellen geclustert.

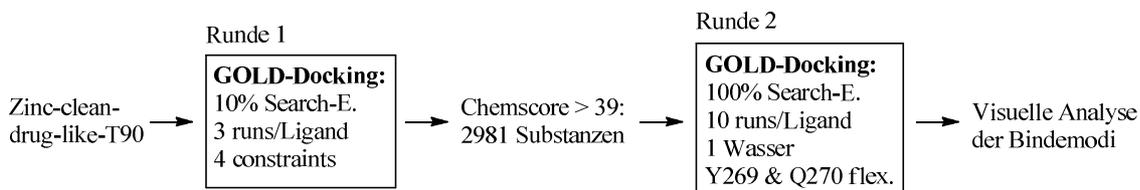


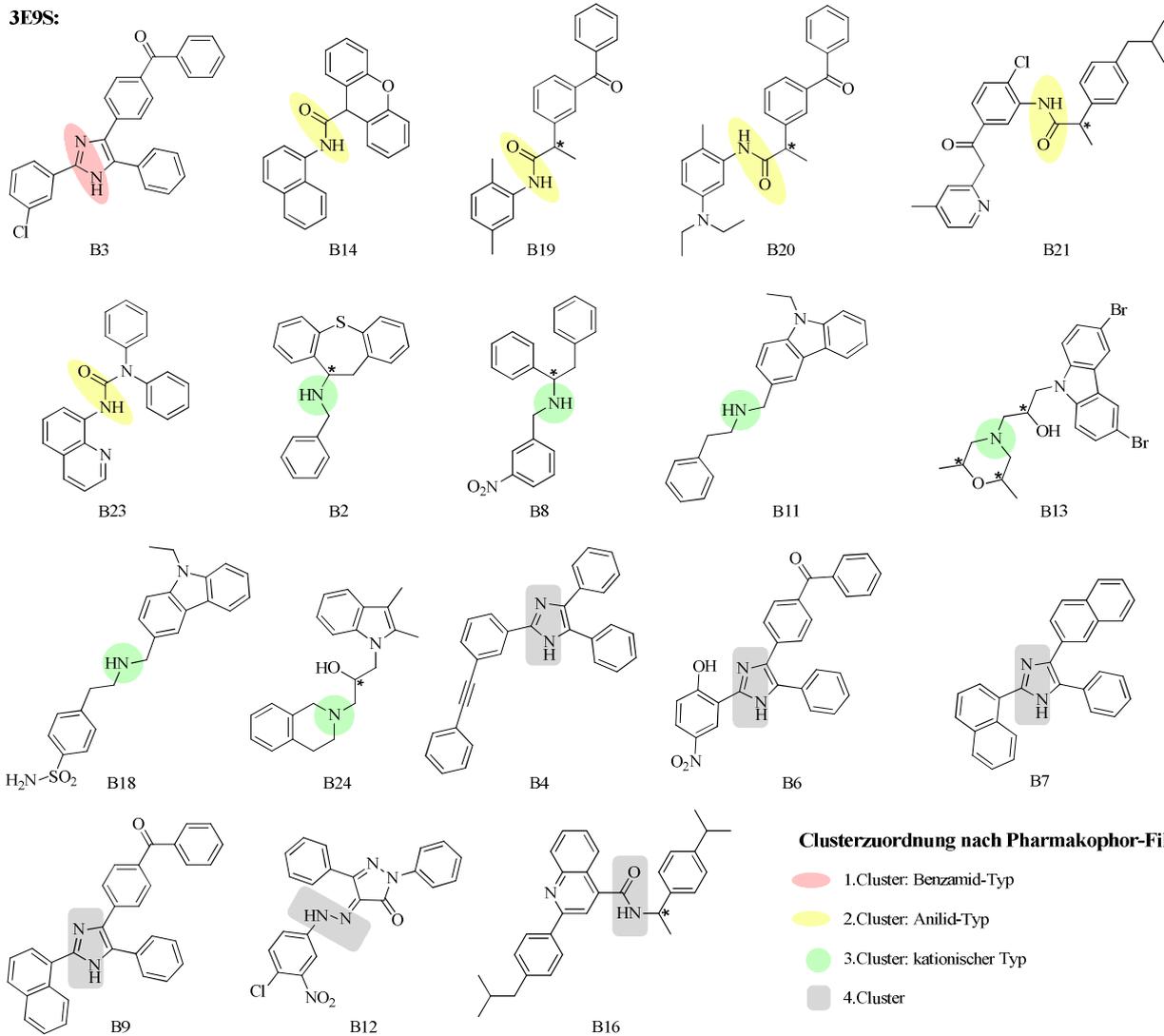
Abb. 2-26: Flussdiagramm zur Veranschaulichung des virtuellen Screenings der Zinc-clean-druglike-T90-Datenbank an 3E9S in zwei Runden.

Dieses Screeningprojekt diente vor allem dazu, weitere Scaffolds mit hohem Scoring zu entdecken und ihre Interaktionen zu studieren. Auf umgesetzte Ideen wird im 3. Kapitel an den entsprechenden Stellen eingegangen.

2.5.6. Substanzauswahl und Testergebnisse im enzymatischen Assay

Vom Screeningprojekt an der Proteinstruktur 3E9S wurden nach visueller Inspektion 18 Substanzen und vom Screeningprojekt an 3MJ5 6 Substanzen erworben. Bei der folgenden Strukturformelübersicht sind die für die Clusterzuordnung verantwortlichen Strukturelemente farblich gekennzeichnet:

3E9S:



3MJ5:

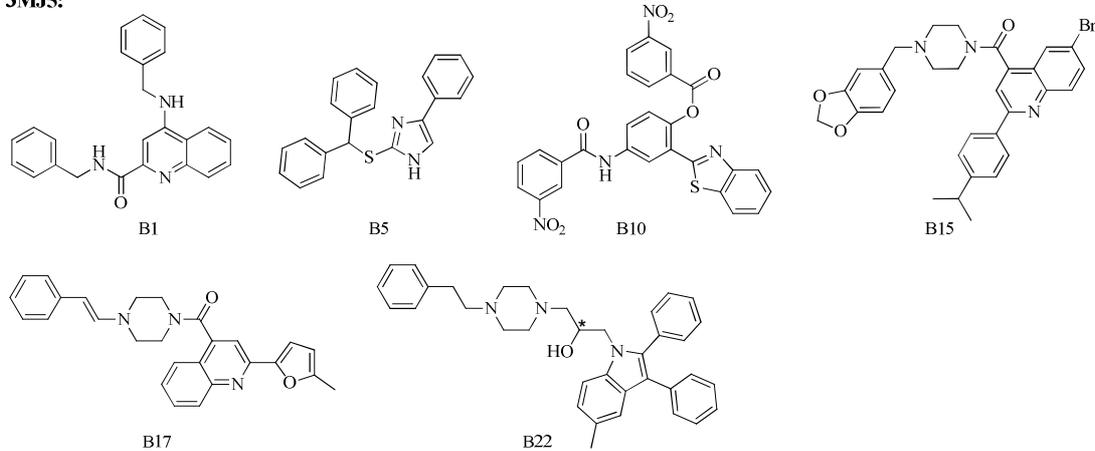


Abb. 2-27: Übersicht über die 24 kommerziell erworbenen Virtual-Screening-Hits.

Testergebnisse der Enzymassays

Die erworbenen Substanzen B1 - B24 wurden über einen fluorimetrischen Assay am Enzym SARS-CoV-PL^{pro} auf inhibitorische Wirkung untersucht (zur Durchführung siehe Kapitel 4). Als Substanzkonzentration wurde beim ersten „Screening“ 100 µM gewählt, sodass auch schwache Inhibition erkannt werden kann. Verbindungen, die unter diesen Bedingungen weniger als 25% Enzymhemmung zeigen, werden im Rahmen dieser Arbeit als inaktiv bezeichnet, da diese geringen Aktivitäten häufig keine klare Unterscheidung zu DMSO-Vergleichsmessungen zulassen und aufgrund des Assaydesigns zum Teil auch artifiziell beobachtet werden. Zwar könnte eine Nachuntersuchung mit höherer Substanzkonzentration angestellt werden, doch dann ergäben sich häufig Löslichkeitsprobleme der Verbindungen im wässrigen Assaypuffer.

In Abbildung 2-28 ist die prozentuale Enzymhemmung der getesteten Verbindungen als Balkendiagramm dargestellt:

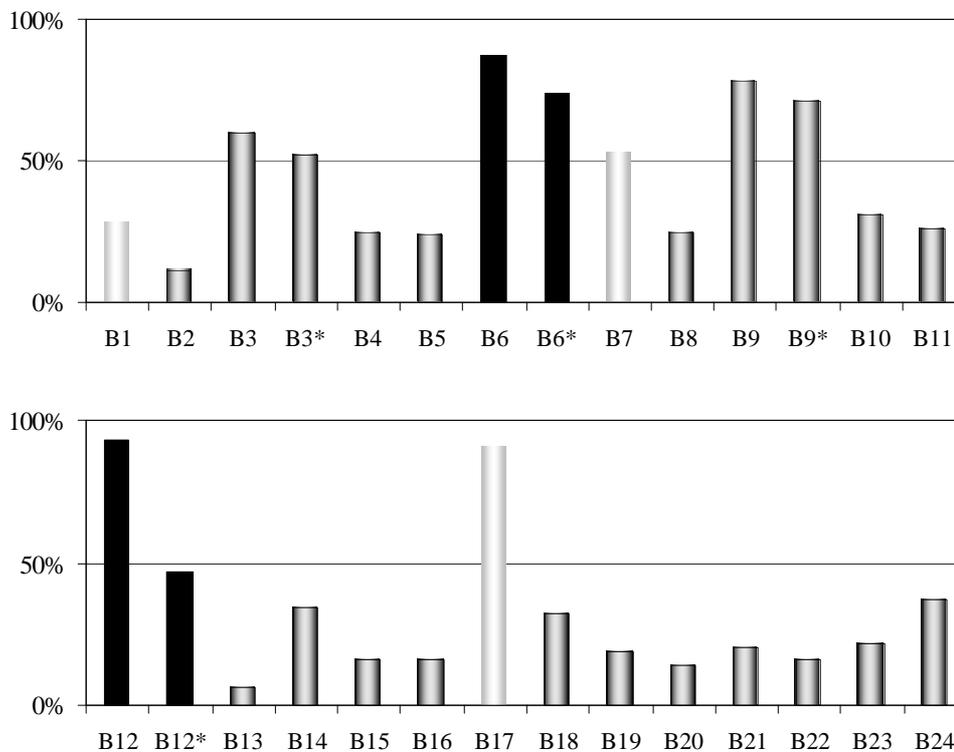


Abb. 2-28: Prozentuale Hemmung der SARS-CoV-PL^{pro} durch 100 µM Substanzkonzentration. *Hemmwerte nach Korrektur des inneren Filtereffekts (quenchede Verbindungen). Schwarze Balken: Starkes Quenching (< 80% Fluoreszenz-Intensität zum Zeitpunkt 0 im Vergleich zur DMSO-Referenz – diesen Hemmwerten sollte trotz Korrektur misstraut werden). Hellgraue Balken: Verbindungen zeigen Eigenfluoreszenz.

Bei der Auswertung der im Assay gemessenen Fluoreszenz-Werte fallen einige Verbindungen als „Quencher“ auf, welche die AMC-Fluoreszenz mehr oder weniger stark unterdrücken. Von diesen Verbindungen wird ein jeweiliger Korrekturfaktor bestimmt und das korrigierte Ergebnis (*) mitangegeben. Die schwarzen Balken kennzeichnen starkes Quenching, sodass deren tatsächliche Hemmung relativ unsicher ist. Außerdem sind drei Substanzen mit Eigenfluoreszenz aufgefallen (hellgraue Balken), wovon die scheinbar gut inhibierende Verbindung B17 noch näher erläutert wird. Den Testergebnissen nach zeigen die Verbindungen B6, B9, B12 und B17 eine deutliche Enzyminhibition (> 60% Hemmung bei 100 µM). Von ihnen werden IC₅₀-Werte bestimmt, um die Affinität zum Enzym exakter beschreiben zu können (siehe Tab. 2-2).

Tab. 2-2: IC₅₀-Werte der aktiven Verbindungen (± Standardabweichung)

Verbindung	B6	B6*	B9	B9*	B12	B12*	B17
IC ₅₀ [μM]	31 ± 4	46 ± 7	46 ± 10	54 ± 16	20 ± 9	104 ± 8	68 ± 6

*Basierend auf korrigierten Enzymaktivitäten bei Quenching

Die korrigierten IC₅₀-Werte von B6 und B9 betragen 46 ± 7 μM und 54 ± 16 μM. Diese Verbindungen haben mit B3, B4 und B7 ein Imidazol-Scaffold gemeinsam, es wurde damit eine neue Substanzklasse zur Inhibition der SARS-CoV-PL^{pro} gefunden. Zur Untersuchung des lediglich Triphenyl-substituierten Imidazol-Grundgerüsts wird in Kapitel 3.1 dessen Synthese und Testung behandelt (Verbindung **19**). Der durch Docking erhaltene Bindemodus von B6 ist in Abbildung 2-29 gezeigt:

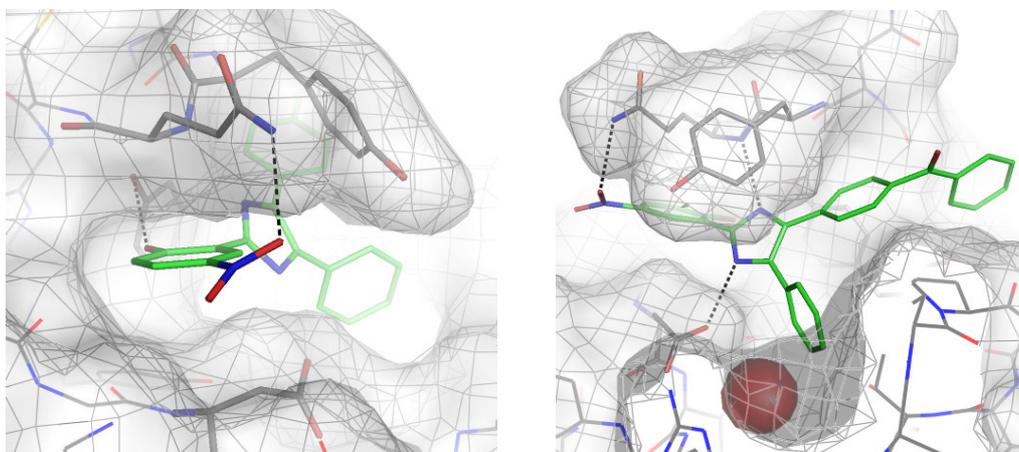


Abb. 2-29: Dockinglösung von B6. Links: S3-Tasche, Rechts: S4-Tasche mit dem gebundenen Wasser als dunkelrote Sphäre.

Der Bindemodus von B6 wird mit Chemscore = 49 und ChemPLP = 94 sehr gut bewertet. Im linken Bild ist eine H-Brücke der Nitrogruppe des Inhibitors zum Loop-Gln270 zu sehen, sowie die H-Brücke zu Tyr265 (im Hintergrund). Der Inhibitor wird aufgrund des aciden *p*-Nitrophenols als Phenolat-Anion behandelt, bei der H-Brücke vom Tyrosin-265 ist der Inhibitor dadurch H-Brücken-Akzeptor. Die H-Brücke eines Phenols (Tyrosin) zu einem Anion wie Acetat besitzt laut Reynisson und McDonald^[70] mit 25 kcal/mol eine hohe H-Brücken-Enthalpie, beim System Phenol / Formaldehyd beträgt diese nur 3.9 kcal/mol. So könnte auch hier eine starke, ladungsgestützte H-Brücke zwischen Tyrosin-265 und dem *p*-Nitrophenolat-Anion ausgebildet werden. Aufgrund Solvation des *p*-Nitrophenolat-Sauerstoffs vor Ligand-Bindung kann die freiwerdende oder aufzubringende Enthalpie (Entfernen der Hydrathülle) beim Zustandekommen der H-Brücke jedoch nicht abgeschätzt werden, die Freisetzung gebundener Wassermoleküle sollte aber über den Entropie-Term die freie Bindungsenthalpie günstig beeinflussen.

Im rechten Bild blickt man auf die S4-Tasche, deren Asp165 vom Imidazol-NH mit einer H-Brücke adressiert wird. Außerdem ist die H-Brücke zwischen Loop-Gln270-NH und Imidazol-N zu sehen. Beim Docking wurde das abgebildete Wassermolekül (dunkelrote Sphäre) berücksichtigt, zu diesem besteht kein „Clash“ mit dem Phenyling des Inhibitors laut Clash-Term. Jedoch würde das nächst-nähere Wassermolekül (nicht berücksichtigt, nicht gezeigt) mit 2.1 Å Abstand eine Überlappung („Clash“) verursachen, wenn es sich nicht verdrängen ließe.

Der Benzophenon-Substituent des Inhibitors ragt weit über die S4-Tasche hinaus und liegt in einer lipophilen Furche zwischen Pro249 und Gly267. Die Loop-Aminosäure Tyr269 wird vom Inhibitor B6 nicht durch CH/π-Interaktion

stabilisiert, wie es von Naphthyl-Substituenten bekannt ist. Die tatsächliche Konformation der Seitenkette von Tyr269 stellt bei nicht-Naphthyl-Liganden eine ungeklärte Frage dar. Beim obigen Benzophenon-Substituent ist ein shiftet- π -Stacking mit dessen mittlerem Phenylring denkbar (nicht abgebildet). Die anderen Imidazolderivate gehen ähnliche Wechselwirkungen wie B6 mit der Bindetasche ein.

Die fluoreszierende Verbindung B17 erscheint im Screening und laut IC_{50} -Bestimmung (Verdünnungsreihe) als Enzyminhibitor. In Abbildung 2-30 (links) ist der Fluoreszenzverlauf im Assay mit B17 gezeigt, die Eigenfluoreszenz erhöht das absolute Fluoreszenz-Signal (Zeitpunkt 0 min), beeinflusst aber nicht die Steigung (Maß für die Enzymaktivität). Ein eventuell zusätzliches Quenching kann durch die Abhängigkeit des Fluoreszenz-Signals von steigender Konzentration B17 unter Anwesenheit von $1 \mu\text{M}$ AMC untersucht werden (Abb. 2-30, rechts).

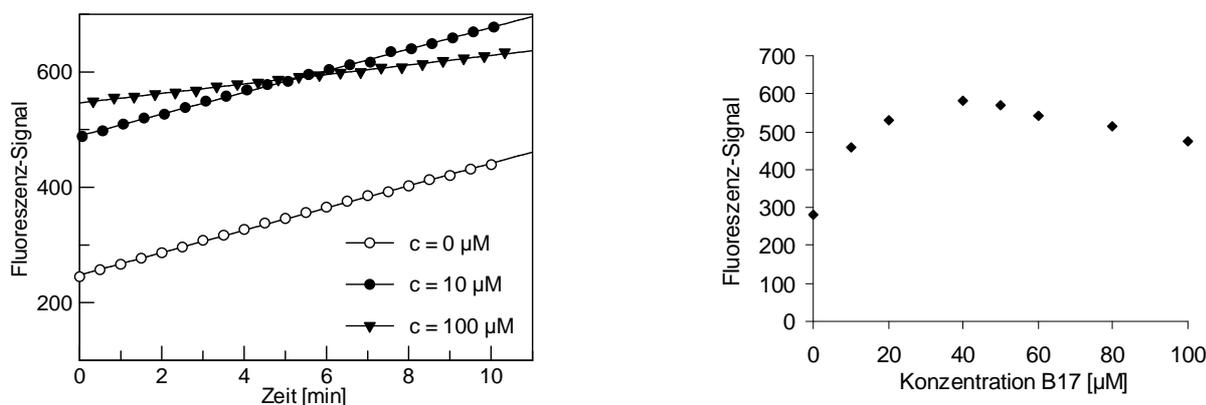


Abb. 2-30: Links: Verlauf des Fluoreszenz-Signals im Assay (SARS-CoV-PL^{pro}) mit 10 und 100 μM B17 im Vergleich zur DMSO-Referenz. Rechts: Fluoreszenz von $1 \mu\text{M}$ AMC + variable Konzentration B17.

Zum AMC-Background-Signal ($c_{B17} = 0 \mu\text{M}$, $y = 280 \text{ AU}$) addiert sich bis zu einem Maximum bei $c_{B17} = 40 \mu\text{M}$ die B17-Eigenfluoreszenz nicht-linear hinzu, höhere Konzentration B17 führt dann zu einem verminderten Fluoreszenz-Signal. Die Verbindung besitzt also neben der Eigenfluoreszenz auch einen konzentrationsabhängigen, „inneren Filtereffekt“ (Quenching). Damit ist die gemessene, schwache Enzymhemmung anzuzweifeln, sie wird vermutlich aufgrund des Fluoreszenzlicht-Quenchings durch B17 vorgetäuscht und B17 ist kein Enzyminhibitor.

So bleiben schließlich von den 24 erworbenen Verbindungen zwei affine Screening-Hits: B6 und B9. Ihr relativ hohes Gewicht (526 g/mol und 548 g/mol) und die großen Substituenten am Imidazol-„Kernscaffold“ zeichnen B6 und B9 jedoch als eher „ineffiziente“ Liganden aus (Ligandeffizienz = Affinität / Anzahl nicht-Wasserstoffatome^[93]). In Kapitel 3.1 wird daher ein synthetisiertes, kleineres Imidazol-Derivat vorgestellt. Die anderen kommerziell erworbenen Verbindungen zeigten entweder vernachlässigbare Hemmung oder interferierten mit der AMC-Fluoreszenz. Vor dem Hintergrund, dass das von Ratia et al. durchgeführte, experimentelle HTS mittels Roboter nach Testung von 50.000 Substanzen auch nur zwei Screening-Hits ergab^[18,20], kann die Entdeckung der inhibitorisch wirksamen Imidazol-Substanzklasse als Ergebnis des vHTS durchaus als Erfolg aufgefasst werden.

2.6. Entwicklung kovalent-irreversibler Inhibitoren mit Aziridin-Baustein

2.6.1. Vorüberlegungen

Eine weitere Möglichkeit zur Proteasehemmung bietet die kovalente Reaktion der katalytisch aktiven, nukleophilen Aminosäure mit einem Substratmimetikum. Das Substratmimetikum muss dazu eine ausreichend elektrophile, reaktive Gruppe besitzen und sollte vor und während des Übergangszustands möglichst gut in die Bindetasche passen, d. h. eine ausreichend hohe Affinität zur Bindetasche haben. Dies kann ansatzweise durch kovalentes und nicht-kovalentes Docking überprüft werden. Dazu wird beim kovalenten Docking das Reaktionsprodukt des Inhibitors mit angesetztem Schwefelatom in GOLD eingeladen, bei der Konformationsuche werden dann Protein- und Inhibitor-Schwefelatom übereinandergelegt und der Ligand damit fixiert. Durch nicht-kovalentes Docking soll dagegen der Bindemodus „kurz vor der Enzymreaktion“ untersucht werden, wobei dann das Protein-Schwefelatom durch ein Wasserstoffatom zu ersetzen ist. Andernfalls würde der Inhibitor zu weit ($> 3 \text{ \AA}$) vom aktiven Zentrum entfernt gedockt, sodass daraus nicht die Geometrie des Übergangszustands abgeschätzt werden könnte. Die übrigen Einstellungen beim Docking mit GOLD entsprechen den Standardeinstellungen (Scoringfunktion: Chemscore).

Von Aziridinen ist die Reaktionsfähigkeit mit Cysteinproteasen bekannt und untersucht^[94,95]. Daher wurde als reaktive „Kopfgruppe“ („warhead“) der Aziridinring gewählt. Die Gestaltung des an das Aziridin geknüpften Rests musste sich an den räumlichen Gegebenheiten in der Bindetasche orientieren. Ohne Hinzuziehen struktureller Information kann aus Studien zur Substratentwicklung für die SARS-CoV-PL^{pro} folgendes geschlossen werden^[96]:

- Die Bindetasche bietet an S1 und S2 wenig Platz, da nur Glycin toleriert wird.
- An der S3-Bindestelle scheint größere Toleranz hinsichtlich der P3-Aminosäure zu bestehen, es werden besonders die basischen Aminosäure Arginin und Lysin bevorzugt, doch auch Leucin ist günstig.
- Die S4-Bindestelle ist lipophil und kann nur mit Leucin adressiert werden.

Nach Untersuchungen von Drag et al.^[96] zur Substratumsetzung sind die obigen Aussagen für eine Inhibitor-entwicklung nicht zwingend gültig: Ein nicht umgesetztes Substrat könnte auch ein bindender Inhibitor sein. Für die vermutete, räumliche Restriktion spricht außerdem, dass typische Cysteinprotease-Inhibitoren (E64, Cystatin, Leupeptin, Antipain, Chymostatin) die SARS-CoV-PL^{pro} nicht hemmen^[22]. Die obigen drei Annahmen können durch die Kristallstruktur 2FE8 (Apoform) gestützt werden, wenn man das Substrat LKGG kovalent in das Enzym dockt und dann den Bindemodus untersucht. Vom C-terminalen P1-Glycin wurde das im Übergangszustand gebildete Oxy-Anion entfernt, nachdem dessen Orientierung in der Bindetasche aufgrund von Überlappung die Konformationsuche stark behinderte.

Aus Abbildung 2-31 wird ein „Bindetunnel“ von P1 bis zum N-Terminus von P2 ersichtlich, der demnach nur für Glycin Platz bietet. Weiterhin liegt die P3-Aminosäure Lysin im „Außenbereich“ auf der Enzymoberfläche und ihr Bindebereich ist nicht taschenförmig. Dies erklärt die oben geäußerte Toleranz der S3-Bindestelle. Die S4-Bindetasche ist auf dem rechten Bild von Abbildung 2-31 erkennbar, sie hat lipophilen Charakter und das P4-Leucin wird daher auch als „hydrophober Anker“^[72] bezeichnet. Weiterhin fällt auf, dass alle Amidgruppen des Substrats H-Brücken zum Protein ausbilden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die bisher noch nicht mit Substratanaloga kristallisierte SARS-CoV-PL^{pro} bereits als Apoenzym in der katalytisch aktiven Konformation vorliegt^[72] und nicht wie beispielsweise die Deubiquitinase HAUSP^[97] erst durch Substrat-Bindung die zur Katalyse

notwendige Konformation einnimmt. Damit eignet sich die kristallisierte Apoform 2FE8 als Grundlage zur struktur-basierten Entwicklung von Substratmimetika.

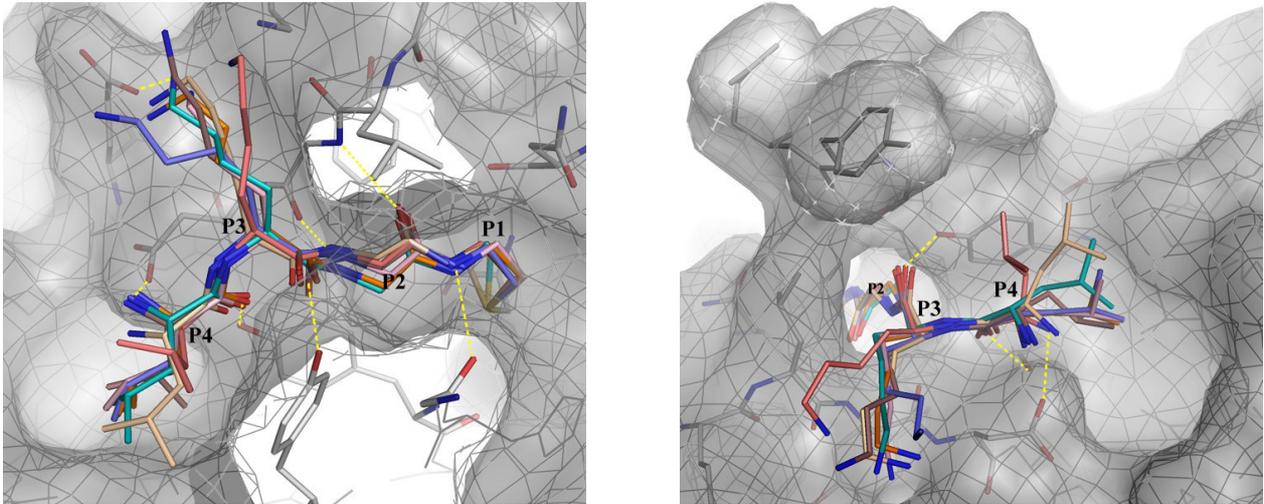


Abb. 2-31: Links: Sicht von oben auf die Bindetasche, Loop-Aminosäuren wurden zur besseren Sicht entfernt. Es sind 7 Dockingposen des kovalent gebundenen Substrats LKGG übereinandergelagert. H-Brücken sind durch die gelb-gestrichelten Linien angedeutet. Rechts: Sicht von außen auf die Bindetasche, der obere Bereich ist die Loop-Region.

Außerdem zeigt sich beim Vergleich des erhaltenen Substrat-Proteinkomplexes (Abb. 2-31) mit Kristallstrukturen anderer Deubiquitinase-Ligand Komplexe^[97,98] (Liganden Ubiquitinaldehyd oder Ubiquitinvinylsulfon), dass die Bindemodi mit den Dockinglösungen aus Abbildung 2-31 vergleichbar sind.

Beim Inhibitor-Design ist folglich an das erwähnte Aziridin ein möglichst linearer Spacer anzuknüpfen, der am Ende eine lipophile Gruppe trägt, um in der S4-Bindetasche zu binden. Nachdem das Substrat zahlreiche H-Brücken zum Protein ausbildet, sollte ein Inhibitor so entworfen werden, dass auch er einige dieser H-Brücken-Bindungen eingehen kann. Es soll also ein Inhibitor entwickelt werden, der den in Abbildung 2-32 gezeigten Hemmechanismus besitzt:

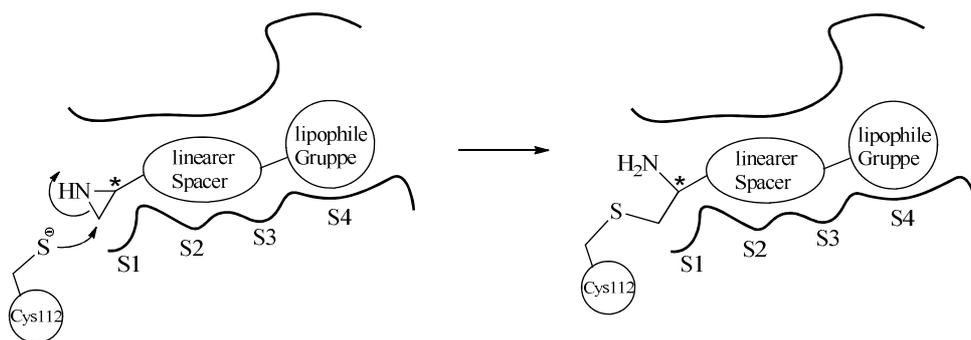


Abb. 2-32: Skizzierter Hemmechanismus eines Inhibitors mit Aziridinring

Ferner ist zu bedenken, dass Ubiquitinasen und Deubiquitinasen das Motif LXGG und besonders LRGG und LKGG binden. Ein LXGG-Mimetikum mit reaktiver Gruppe sollte daher auf Selektivität zu anderen Enzymen überprüft werden. Bei Kreuzreaktivität könnte in einem nächsten Schritt die in der S4-Tasche platzierte, „lipophile Gruppe“ (s. Abb. 2-32) zur Erhöhung der Selektivität für SARS-CoV-PL^{Pro} an deren große S4-Bindetasche angepasst werden.

2.6.2. Inhibitor-Design mit Ethylendiamin-Spacer

Beim Entwurf von Inhibitoren wurde so vorgegangen, dass als erstes das kleine Aziridin an Position P1' oder an P1 gesetzt wurde. Von diesem Startpunkt aus wurden Substituenten manuell erstellt. Der dem Substrat ähnlichste, nichtpeptidische Spacer ist die Ethylendiamin-Einheit, sie kann als Glycin ohne Carbonyl aufgefasst werden und soll bei nebenstehender Strukturformel (Abb. 2-33) das P2-Glycin ersetzen. Die *N,N*-Dibenzylsubstitution ist für die S3- und S4-Tasche gedacht. Beim nicht-kovalenten und kovalenten Docking des Moleküls in 2FE8 (Abb. 2-34) stellte sich heraus, dass das Aziridin als C3-Körper sowohl P1 als auch P2 ersetzt und das Ethylendiamin eher den Platz von P3 einnimmt.

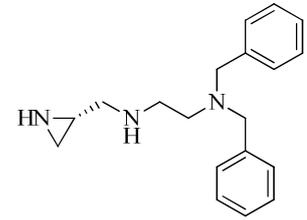


Abb. 2-33: Potenzieller Inhibitor

Der Bindemodus ist damit vom Substrat verschieden, wird aber hoch gescored (Chemscore 42). Wie das linke Bild von Abbildung 2-34 zeigt, sollten aufgrund der hohen Flexibilität des Spacers (frei von Amidbindungen) H-Brücken zum Protein auch während des Reaktionspfades möglich sein. Die Benzylgruppen füllen in manchen Dockinglösungen die S3- und S4-Tasche, beim hier gezeigten Bindemodus (höchstes Scoring) liegen dagegen beide Aromaten in der S4-Tasche.

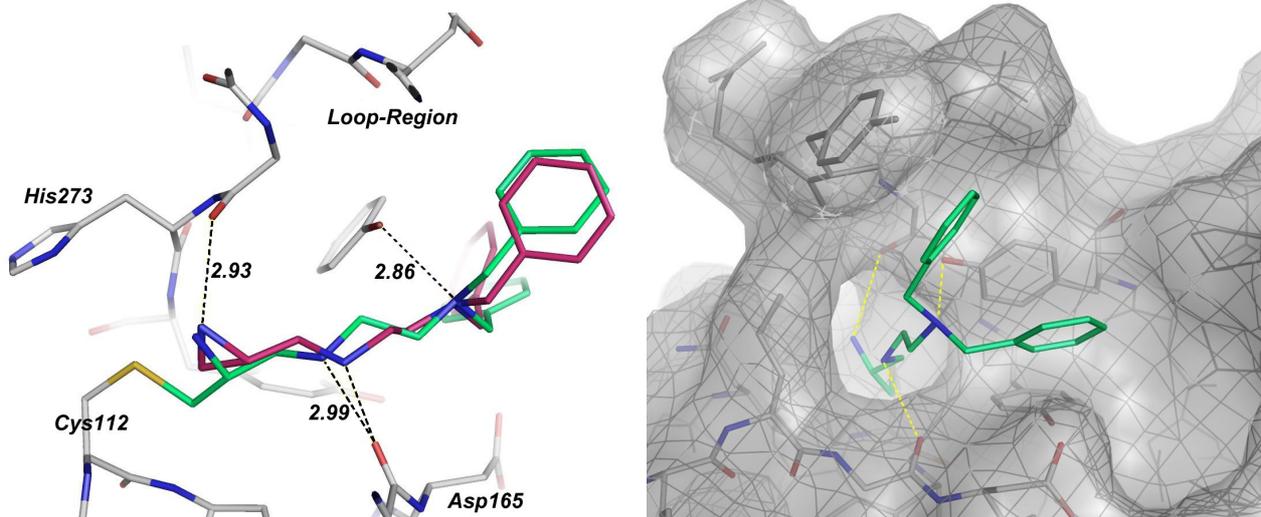


Abb. 2-34: Links: Potenzieller Aziridin-Inhibitor gedockt in 2FE8. Der violette Ligand entspricht dem Zustand vor der Reaktion mit intaktem Aziridin, der grüne Ligand jenem nach Angriff des katalytischen Zentrums (geöffneter Dreiring). Rechts: Außenansicht des kovalent gebundenen Inhibitors. H-Brücken sind mit gestrichelten Linien angedeutet.

Den Dockinglösungen sind die folgenden Interaktionen zu entnehmen:

- Das Aziridin-NH geht vor und nach der enzymatischen Reaktion eine H-Brücke ein.
- Vom Ethylendiamin-NH geht ebenfalls immer eine H-Brücke aus.
- Das tertiäre Amin von Ethylendiamin ist H-Brücken-Akzeptor.
- Die Phenylringe von *N,N*-Dibenzyl interagieren über π -Stacking mit Tyr265 und Loop-Tyr269.

Demnach geht der oben abgebildete, erdachte Inhibitor drei H-Brücken ein, und durch Docking konnten plausible Bindemodi wie in Abbildung 2-34 erhalten werden.

2.6.3. Inhibitor-Design mit Piperazin-Spacer

Zwischen Aziridinring und lipophilem Molekülbereich wird nun Piperazin als Spacer gewählt, welches dem offenkettigen Ethylendiamin grundsätzlich ähnlich ist und ebenso günstige Interaktionen zur Bindetasche ermöglichen sollte (s. Abb. 2-35).

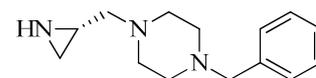


Abb. 2-35: Potenzieller Inhibitor

Das Piperazin lässt nun nicht-kovalentes Docking nicht mehr zu, da GOLD den 6-Ring wegen des sterischen Raumanpruchs nicht in die Bindestelle platziert. Ein kovalentes Docking zwingt jedoch den Inhibitor in die Bindetasche, wobei dennoch ein akzeptabler Chemscore von 38 erreicht wird (s. Abb. 2-36). Der Phenylring des Inhibitors kann im Docking aufgrund der weit offenen Loop-Konformation und damit sehr großen S4-Tasche nahezu in jede Richtung gedreht werden:

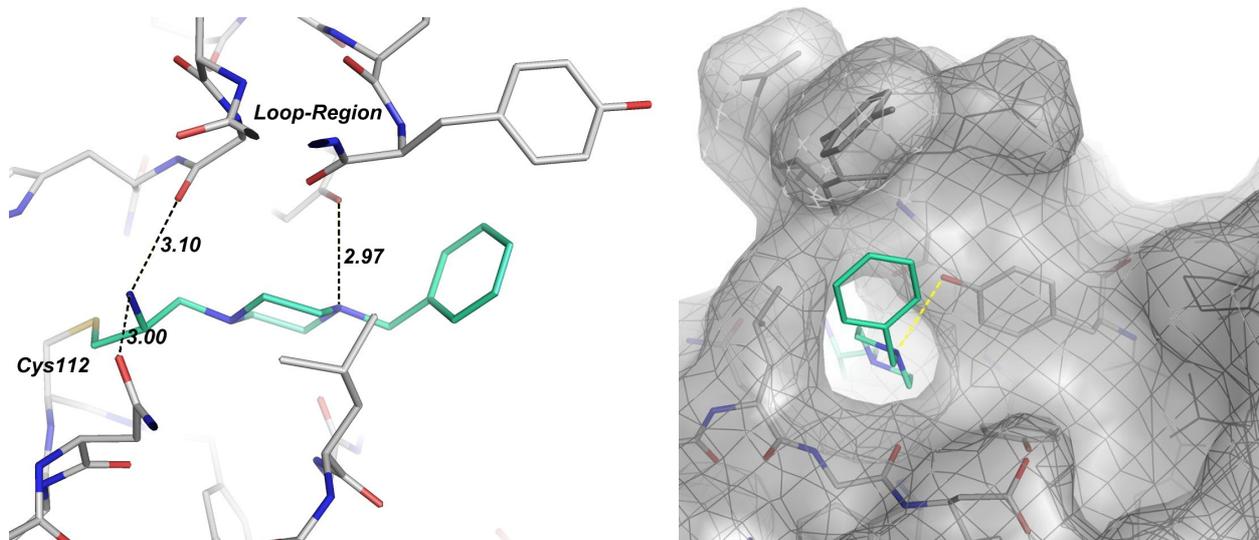


Abb. 2-36: Links: Potenzieller Aziridin-Inhibitor kovalent gedockt in 2FE8. Rechts: Außenansicht des kovalent gebundenen Inhibitors.

Die Erweiterung dieser Benzylsubstitution zu einem *N,N*-Diphenylmethan müsste sowohl die Flexibilität einschränken als auch die lipophile Interaktionsfläche erhöhen. Die Benzhydryl-Substitution wird in Kapitel 3.10 behandelt.

3. Entwicklung und Synthese von Inhibitoren im SARS-Projekt

In diesem dritten Kapitel werden die synthetisierten Verbindungen vorgestellt und Überlegungen genannt, warum sie synthetisiert wurden. Enzymatische Testergebnisse und deren Diskussion werden abschnittsweise an geeigneten Stellen angeführt, damit der Bezug zu den Strukturformeln und Überlegungen erhalten bleibt.

Mit den in **Kapitel 3.1** genannten Verbindungen werden zunächst Struktur-Wirkungsbeziehungen erschlossen, um den Variationsspielraum bei der weiteren Wirkstoffsuche einzugrenzen. Anschließend folgt in den weiteren Kapiteln die systematische Wirkstoffsuche, deren Gliederung sich aus den verschiedenen Substanzklassen ergibt:

In **Kapitel 3.2** werden Amid-Derivate verschiedener Benzolcarbonsäuren unter Beibehalt der Amin-Komponente (*R*)-Naphthylethanamin vorgestellt und in **Kapitel 3.3** Amid-Derivate verschiedener Naphthylalkylamine unter Beibehalt der Säure-Komponente 2-Methylbenzoesäure. Mit diesem Vorgehen sollte systematisch das optimale Scaffold zur Adressierung der S3- und S4-Tasche gesucht werden.

Bei einem virtuellen Screeningprojekt der Zinc-drug-like-Datenbank wurden Amid-Derivate des 1-(Indol-3-yl)ethanamins als vielversprechendes Scaffold identifiziert, sodass deren Synthese und Testung in **Kapitel 3.4** behandelt wird.

Ziel wäre bis zu diesem Punkt gewesen, in einem nächsten Schritt diejenige Säure- und Amin-Komponente zu kombinieren, die zuvor die höchste Affinität in ihrer Serie zeigte. Leider waren alle dargestellten Inhibitoren der literaturbekannten Leitstruktur **2** bzw. deren Weiterentwicklung^[18] **12** unterlegen, sodass eine Rekombination der neuen Säure- und Amin-Komponenten nicht sinnvoll erschien.

Weiterhin erzielten im virtuellen Screening zahlreiche Naphthylethansäureamide hohe Score-Werte, sodass Vertreter dieser Substanzklasse synthetisiert wurden (**Kapitel 3.5**). Das 3,3-Diphenylpropansäure-Scaffold sowie alkylierte Tetrahydrochinoline sind ebenso als neuartige Bausteine zur Adressierung der S4-Bindestelle im virtuellen Screening gefunden worden, deren Synthese und Testung wird in **Kapitel 3.6** und **3.7** besprochen.

Eine zu den bisher dargestellten Amid-Verbindungen verwandte Substanzklasse sind die Sulfonamide, die im virtuellen Screening mit hohen Score-Werten und ausgezeichneter H-Brücken-Geometrie den für die Bindung relevanten Amid-Bindemodus zwischen Loop und Asp165 nachahmen. Darüberhinaus zeigen die Dockingposen eine zusätzliche H-Brücke der Sulfonamidgruppe zum Tyr274, womit Verbindungen vom Sulfonamid-Typ interessante Abkömmlinge zu den inhibierenden Amid-Verbindungen sind und folglich deren Synthese durchgeführt wurde (**Kapitel 3.8**).

Die nächste bearbeitete Substanzklasse sind die Isoindoline und davon abgeleitete Amine (**Kapitel 3.9**). Sie besitzen keine Amidgruppe und verzichten damit auf das für wichtig befundene Kernfragment aller bisherigen Verbindungen. Stattdessen nimmt ihr im wässrigen protoniertes Ammonium-Kation die Rolle des Amid-NH als H-Brücken-Donor ein, wobei die elektrostatische Anziehung zum Carboxylat von Asp165 diese Wasserstoffbrücke zusätzlich verstärkt. Die rigidere Molekülstruktur erlaubt, den Einfluss der von den Benzamiden wichtig erachteten 2-Methyl-Substitution zu untersuchen: Deren lipophile Interaktion soll von einer intramolekularen Beeinflussung der Ligand-Konformation differenziert werden.

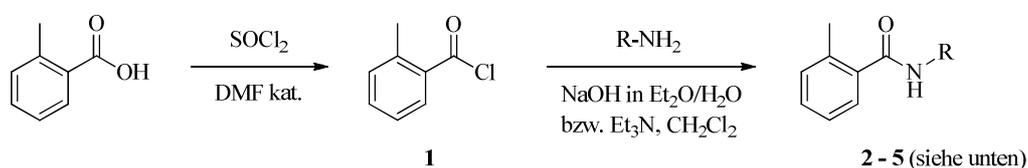
Schließlich wird in **Kapitel 3.10** die Synthese und Testung der Aziridin-Derivate als potenzielle kovalente Inhibitoren vorgestellt.

3.1. Synthese erster Verbindungen und Struktur-Wirkungsbeziehungen

Bisherige Publikationen^[18,19] aus den Jahren 2008 und 2009 beschreiben die Entdeckung und Weiterentwicklung der Inhibitoren vom Benzamid-Typ. Die durchgeführten Strukturvariationen blieben allerdings immer sehr nahe am ursprünglichen *N*-(1-Naphth-1-ylethyl)benzamid (s. Leitstruktur **2**). Dies sollte auch der Grund dafür sein, warum die in Kapitel 2.5.3 vorgestellte Korrelation zwischen Affinitätsvorhersage und tatsächlichem IC₅₀ so gut ausfiel.

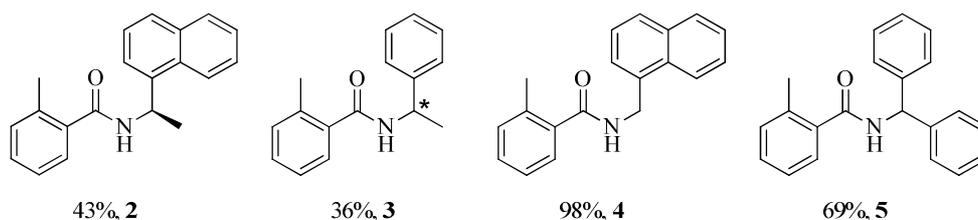
In diesem Kapitel 3.1 werden größere Strukturvariationen vorgenommen, um die Kenntnisse zum biologisch aktiven Scaffold-Raum an der SARS-CoV-PL^{pro} auszuweiten. So können dann Struktur-Wirkungsbeziehungen aufgestellt werden, die sich auf eine größere Inhibitorvielfalt stützen: Die Verbindungen **3 - 5** sind dabei in der Amin-Komponente abgewandelt, und die Verbindungen **6, 8, 9, 11 - 17** besitzen im Vergleich zu Leitstruktur **2** eine andere Säure-Komponente.

Zu Beginn wurde das 2-Methylbenzoesäurechlorid **1** in ausreichender Menge dargestellt, um daraus 2-Methylbenzamide mit den verschiedenen Amin-Komponenten synthetisieren zu können:



Schema 3-1: Darstellung des Säurechlorids **1** zur Synthese zukünftiger Verbindungen vom Benzamid-Typ

Aus dem Säurechlorid **1** wurde als erstes die von Ratia et al.^[18] entwickelte Leitstruktur **2** nachsynthetisiert und deren gute Hemmwirkung an der SARS-CoV-PL^{pro} bestätigt (IC₅₀ hier 3.3 μM, Literatur: IC₅₀ = 2.3 μM). Mit den am Amin abgewandelten Verbindungen **3 - 5** (Schema 3-2) sollte dann der Spielraum in der weiteren Inhibitor-entwicklung ermittelt werden:

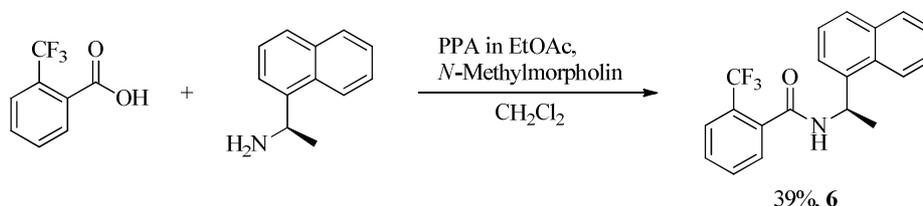


Schema 3-2: Leitstruktur **2** und abgeleitete Verbindungen mit Angabe der jeweiligen Ausbeute

Wie in Kapitel 2.3 beschrieben wurde, weist die Bindetasche einige Hotspots auf, deren Adressierung die Affinität des Liganden maßgeblich beeinflussen sollten. Jene beiden Hotspot-Interaktionen, die die Leitstruktur **2** jeweils mit einer Methylgruppe adressiert, werden durch Weglassen dieser Methylgruppen (Verbindungen **4** und **13**) oder „Vergrößern“ (Verbindungen **6** und **14**) genauer untersucht. Weiterhin wird die zur Hotspot-Adressierung nötige Stereochemie der Amin-Komponente studiert, indem mit Verbindung **18** nun eine 1-Naphthylverknüpfung in *S*-Konfiguration vorliegt, wohingegen Ratia et al.^[18] die *S*-Konfiguration nur bei der unterlegenen 2-Naphthylverknüpften Amin-Komponente als nicht inhibitorisch wirksam charakterisierten.

Darstellung von Verbindung 6: Ein 2-Trifluormethylbenzamid

Durch eine Amidkupplung mittels Aktivierungsreagenz PPA (cyclisches Propylphosphonsäureanhydrid) wird das 2-Trifluormethylbenzamid **6** erhalten, welches am zu untersuchenden, lipophilen Hotspot in der Bindetasche einen negativ polarisierten und sterisch geringfügig anspruchsvolleren Substituenten als die Methylgruppe trägt:

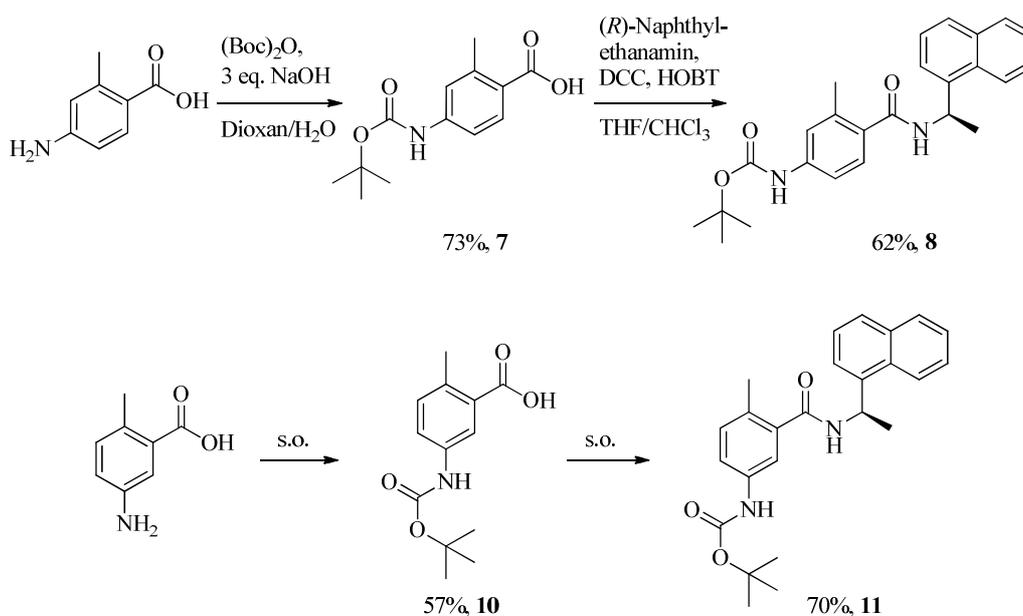


Schema 3-3: Darstellung des 2-Trifluormethylbenzamids **6**

Darstellung von Verbindung 9 und 12: 4-Amino- und 5-Amino-Substituenten an der Benzoesäure

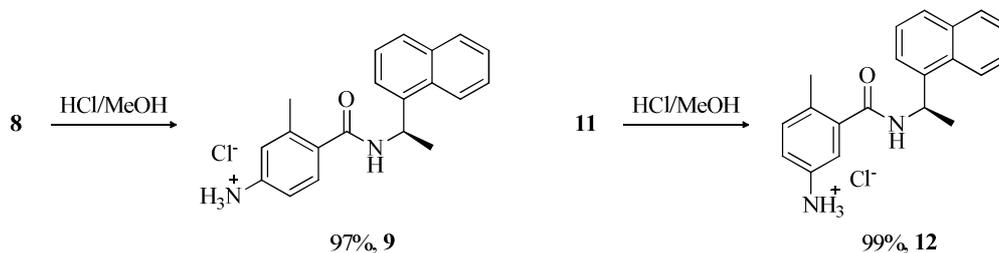
Die affinitätserhöhende Wirkung der 5-Amino-Substitution in der Säure-Komponente soll durch Variation zur 4-Amino-Substitution untersucht werden. Dadurch wird die Loop-Interaktion zu Gln270 verändert, wobei der +M-Effekt bestehen bleibt. Zusätzlich sollte die 4-Aminogruppe eine H-Brücke zum Backbone von Leu163 eingehen und damit einen weiteren Hotspot adressieren. Im Docking erzielt die Leitstruktur **2** einen Chemscore von 40, das 5-Amino-Derivat 41.6 (Verbindung **12**) und das 4-Amino-Derivat 43.0 (Verbindung **9**), was die günstige Interaktion zu Leu163 bestätigt.

Zur Synthese wird 4-Amino-2-methylbenzoesäure am Stickstoff Boc-geschützt (Verbindung **7**) und in das Amid **8** überführt. Analog wird das *N*-Boc-5-Amino-substituierte Benzamid **11** dargestellt:



Schema 3-4: Routen zu den Boc-geschützten, 4- und 5-Amino-substituierten Benzamiden **8** und **11**

Die Boc-Schutzgruppen werden nun von den Amiden **8** und **11** entfernt, man erhält die Hydrochloride des 4-Aminobenzamids **9** und der literaturbekannten Leitstruktur **12**:



Schema 3-5: Darstellung der ungeschützten 4- und 5-Aminobenzamide **9** und **12**

Darstellung weiterer, einfacher Amide

Auf ähnliche Weise wie bisher geschildert, werden die in Abbildung 3-1 gezeigten Verbindungen **13-18** aus den Säurechloriden oder Säuren nach Aktivierung mit Kupplungsreagenz synthetisiert:

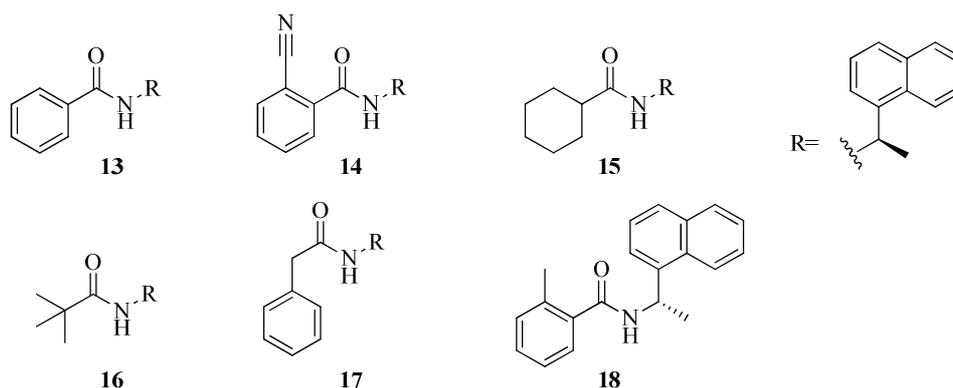
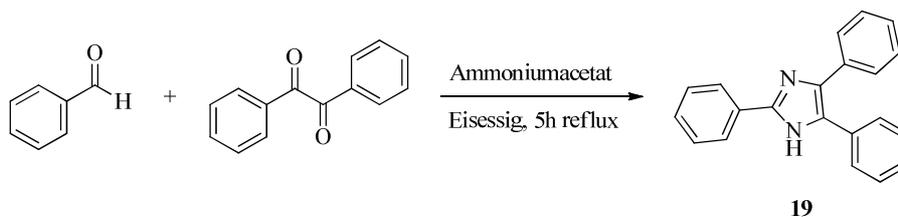


Abb. 3-1: Weitere dargestellte Amide, mit denen der biologisch aktive Raum ermittelt werden sollte

Synthese von 2,4,5-Triphenylimidazol

Von den im virtuellen Screening gefundenen Imidazol-Derivaten besaßen alle einen mehr oder weniger ausgeprägten „inneren Filtereffekt“. Mit der Synthese von 2,4,5-Triphenylimidazol (Trivialname Lophin, Verbindung **19**) soll die Affinität des minimal-substituierten Imidazol-Scaffolds untersucht werden.

Triphenyl-substituierte Imidazole sind aufgrund ihrer Eigenfluoreszenz in fluorimetrischen Assays prinzipiell problematisch, Lophin jedoch stört den fluorimetrischen Assay nicht, da es Excitations- und Emissionswellenlängen von 311 und 386 nm aufweist^[99] und gegenüber der AMC-Fluoreszenz kein innerer Filtereffekt beobachtet wurde. Lophin bildet sich beim Erhitzen von Benzaldehyd, Benzil und Ammoniumacetat in Eisessig^[99] (Schema 3-6).



Schema 3-6: Darstellung des von Screening-Hits abgeleiteten Imidazols **19** (Lophin)

Testergebnisse und Diskussion

Die bisher dargestellten Verbindungen werden mittels fluorimetrischem Assay am Enzym SARS-CoV-PL^{pro} auf Enzymhemmung untersucht, die prozentuale Hemmung ist im Balkendiagramm von Abbildung 3-2 wiedergegeben:

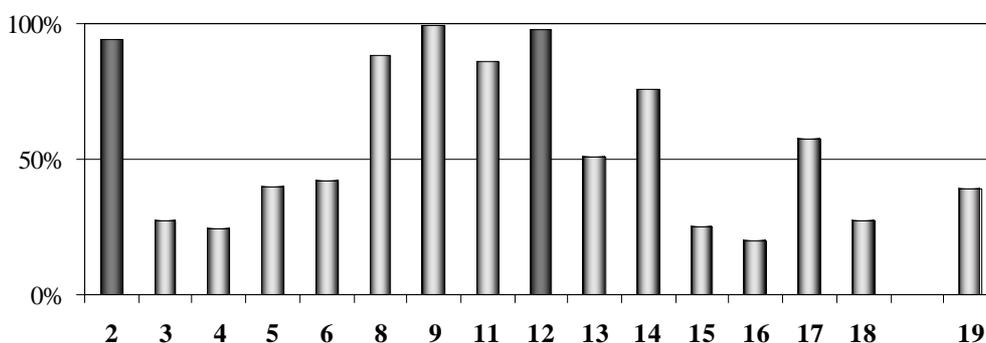


Abb. 3-2: Screeningergebnisse (100 μM) an SARS-CoV-PL^{pro}. Dunkelgraue Balken: Literaturbekannte Inhibitoren.

Tab. 3-1: IC₅₀-Werte ausgewählter, aktiver Verbindungen

Verbindung	2*	8	9	11	12*	13	14
IC ₅₀ [μM]	3.3 ± 0.1	1.6 ± 0.3	1.2 ± 0.1	4.6 ± 0.4	1.1 ± 0.1	62 ± 5	18 ± 2

*Literaturbekannte Inhibitoren

Die IC₅₀-Werte der beiden literaturbekannten Verbindungen **2** und **12** liegen im erwarteten Bereich, der hier durchgeführte Assay liefert also verlässliche Werte. Verbindung **12** zeigt zwar eine etwas schwächere Affinität (IC₅₀ = 1.1 μM), als von Ratia et al. publiziert (IC₅₀ = 0.6 μM)^[18], jedoch verwendet Ratias Arbeitsgruppe als Substrat RLRGG-AMC, während in unserer Arbeitsgruppe das N-terminal geschützte Z-RLRGG-AMC eingesetzt wird.

Die zu **12** konstitutionsisomere 4-Amino-Verbindung **9** zeigt einen ebenso guten IC₅₀-Wert (1.2 μM) und könnte demnach von der im Docking postulierte Interaktion mit dem Backbone-Carbonyl von Leu163 profitieren.

Die Verbindungen **8** und **11** sind die Boc-geschützten Vorstufen von **9** und **12**, wobei **8** in seiner Affinität dem ungeschützten aromatischen Amin **9** gleicht (IC₅₀ = 1.6 μM vs. 1.2 μM). Dagegen zeigt **11** eine schwächere Inhibition als sein ungeschütztes aromatisches Amin **12** (IC₅₀ = 4.6 μM vs. 1.1 μM). Durch die Boc-Schutzgruppe bei **11** wird einerseits der +M-Effekt der Aminogruppe vermindert (möglicherweise Abschwächung der CH/π-Interaktion) und andererseits die planare Carbamat-Gruppe mit dem endständigen *tert*-Butyl an der Enzymoberfläche platziert (dabei denkbare Repulsion zu Aminosäureresten). Außerdem kann die Boc-geschützte, aromatische 5-Aminogruppe bei planarer Carbamat-Geometrie keine H-Brücke zu Gln270 des Loops ausbilden.

Die Boc-geschützte Verbindung **8** verliert zwar laut Docking ihre H-Brücke zu Leu163 (Abstand 3.61 Å), doch wie in Abbildung 3-3 zu erkennen ist, könnte die H-Brücke bei einer näheren Platzierung des Liganden zu Leu163 dennoch zustandekommen. Ein Docking an starre Proteine ist an diesem Punkt zu unpräzise, um den tatsächlichen Bindemodus vorherzusagen. Eine weitere H-Brücke besteht zwischen dem Ether-Sauerstoff der Boc-Gruppe und Lys158. Keine H-Brücke besteht zwischen der Loop-Aminosäure Gln270 und dem Carbonyl-Sauerstoff der Boc-Gruppe, ihr Abstand würde allerdings nach Flipping der endständigen Amidgruppe von Gln270 eine schwache H-Brücke ermöglichen (Nachteil: ungünstige Geometrie).

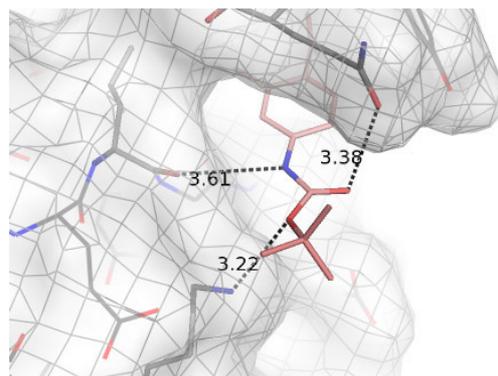


Abb. 3-3: Bindemodus von Verbindung **8** laut Docking

Die am Benzoessäure-Aromat unsubstituierte Verbindung **13** weist eine nur schwache Affinität auf, demnach ist die 2-Methylgruppe an der Benzoessäure (z. B. Verbindung **2**) für eine gute Bindung nötig. Diese Methylgruppe könnte die zur Bindung nötige Konformation (Amidgruppe out-of-plane zum Aromaten) begünstigen und liegt zudem in einem lipophilen Hotspot (s. GRID-Bindetaschenanalyse, Kap. 2.3).

Das aktive 2-Cyanobenzamid **14** zeigt darüberhinaus, dass der Substituent in 2-Position auch linear um ein Atom verlängert sein darf, wohingegen eine seitliche Raumausdehnung nicht toleriert wird: Verbindung **6** mit 2-Trifluormethyl-Gruppe, als auch das literaturbekannte 2-Ethylbenzamid-Derivat (s. Kap. 2.5.3) zeigen vernachlässigbare Enzymhemmungen. Im Docking wird jedoch nur die 2-Trifluormethyl-Gruppe als unvorteilhaft erkannt (Verbindung **6** mit erhöhtem Clash-Term: Chemscore 33.6, 2-Ethylbenzamid-Derivat: Chemscore 41.0).

Die nahezu inaktiven Verbindungen **3 - 5** zeigen, dass eine Variation in der Amin-Komponente weg vom Naphthylethanamin nicht toleriert wird. Bereits das Fehlen der Methylgruppe beim Naphthylmethylamin-Derivat (Verbindung **4**) führt zu einem Verlust der Aktivität: Der Methyl-Hotspot in der S4-Tasche muss also adressiert werden; gleichzeitig ist auch eine konformelle Stabilisierung des Bindemodus durch die im Hotspot liegende Methylgruppe plausibel.

Das 1-Naphthyl-verknüpfte *S*-Enantiomer **18** erweist sich ebenso als inaktiv und steht damit im Einklang mit der von Ratia et al. geäußerten Struktur-Wirkungsbeziehung zur Präferenz einer *R*-Konfiguration^[18].

Die beiden aliphatischen Carboxamide **15** und **16** zeigen keine Inhibition, demnach favorisiert der lipophile Bereich zwischen Loop-Gln270 und Asp165 eine aromatische Gruppe des Liganden. Dies bekräftigt die bereits in Kapitel 2.1 geäußerte Theorie, dass hier gerichtete CH/ π -Interaktionen den Aromaten in der Bindetasche fixieren. Bei der zukünftigen Inhibitorentwicklung werden daher nur noch Aromaten zur Bindung in der S3-Tasche geplant.

Das Phenyllessigsäureamid **17** verursacht eine schwache Enzymhemmung und wird im nächsten Kapitel um einen Aromaten erweitert, um die lipophile Interaktionsfläche zu vergrößern.

Das Triphenylimidazol **19** führt bei 100 μ M zu 40% Enzymhemmung und besitzt unter den Assaybedingungen keinen „inneren Filtereffekt“. Die niedrige Affinität dieses Imidazol-„Kernscaffolds“, die ebenso nur schwach affinen aber stärker substituierten Screening-Hits (B6, B9) und fehlgeschlagene Versuche, durch Docking Substitutionen zu finden, die die Oberflächenkomplementarität zur S4-Tasche verbessern, führte dann insgesamt zu der Entscheidung, keine weiteren Imidazol-Derivate zu synthetisieren.

Zusammenfassend lassen sich nun Struktur-Wirkungsbeziehungen aufstellen, die das weitere Ligandendesign bestimmen:

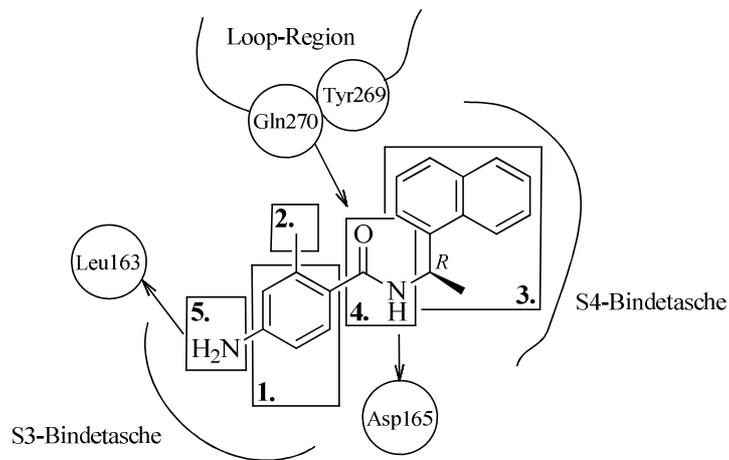


Abb. 3-4: Orientierungshilfe zu den Struktur-Wirkungsbeziehungen am Beispiel von Inhibitor **9**

1. In der S3-Bindetasche muss der Ligand mit einem Aromaten binden.
2. Ist dieser Aromat ein Benzamid, wird die Hemmung durch einen Substituent in 2-Position verstärkt. Dessen ideale bzw. maximal tolerierte Größe soll durch weitere Derivate geklärt werden.
3. Die S4-Bindetasche sollte von (*R*)-Naphthylethylamin erfüllt werden, Variationen in der Amin-Komponente führten bisher zum Verlust der Hemmung, sollten aber weiterhin durchgeführt werden.
4. Bisherige Liganden adressieren mittels H-Brücken den Backbone des Loops, als auch die Seitenkette von Asp165. Durch die H-Brücke zum Loop wird dieser vermutlich fixiert und die Bindetasche der Kristallstruktur 3E9S somit stabilisiert. Die Amidgruppe als Kernfragment im Ligand ist dazu gut geeignet.
5. Die Ausbildung einer weiteren H-Brücke zum Backbone-Carbonyl von Leu163 scheint mit den Verbindungen **8** und **9** gelungen. Demnach könnten auch zukünftige Liganden von dieser H-Brücke eine Affinitätssteigerung erfahren.

Mit der Absicht einen möglichst affinen Liganden zu entwickeln, werden in den folgenden Kapiteln die aus diesen Überlegungen hervorgegangenen Strukturvariationen vorgestellt. Die Gültigkeit der Struktur-Wirkungsbeziehungen wird dabei überprüft.

Diskussion der *S*-Konfiguration in Verbindung 18

Die Verbindung **18** besitzt eine 1-Naphthylverknüpfung in *S*-Konfiguration. Bisher ist bekannt, dass eine 2-Naphthylverknüpfung in *S*-Konfiguration zum Affinitätsverlust führt (s. Abb. 2-19, Verbindung **f**), wobei die naheliegendste Erklärung wäre, dass die *S*-Methylgruppe direkt auf Tyr265 zeigt und somit zu einer sterischen Repulsion führt. Allerdings ist ein 1-Naphthyl-verknüpftes, achirales Dimethylderivat bekannt, welches einen IC_{50} von 11 μM aufweist^[19], siehe dazu Abbildung 3-5 (blauer Ligand).

Diese Dimethyl-Substitution kann man als gleichzeitige *R*- und *S*-Konfiguration in *einem* Molekül verstehen und die Affinität zum Enzym beweist damit, dass unter 1-Naphthylverknüpfung eine Pose eingenommen werden kann, die zu keiner Repulsion zwischen dem Enzym und der Methylgruppen führt. Das Docking des Dimethylderivats (Abb. 3-5) gibt einen Vorschlag zu dieser möglichen Pose. Die in *S*-Konfiguration befindliche Methylgruppe zeigt dabei in einen freien Bereich zwischen Tyr265 und Tyr274 (linke Methylgruppe des blauen Liganden).

Sowohl die in Abbildung 3-5 gezeigte cyan-farbene Verbindung als auch die 1-Naphthyl-verknüpfte Verbindung **18** sollten dieselbe Pose wie das nebenstehende, aktive Dimethylderivat einnehmen können. Doch im enzymatischen Test sind die *S*-konfigurierten Methyl-derivate quasi inaktiv (Verbindung **18**: 27% Hemmung bei 100 μM).

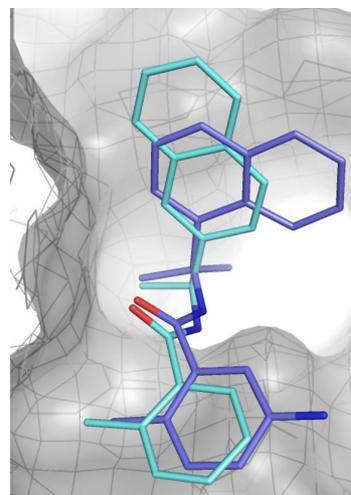
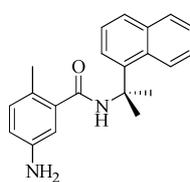


Abb. 3-5: Überlagerte Dockingposen des aktiven Dimethylderivats (blau) und des inaktiven Monomethylderivats (cyan)

Hinweis:

Eudismische Verhältnisse lassen sich nur bis zum Grad der Enantiomerenreinheit bestimmen, die geringe Hemmung (27%) des *S*-Enantiomers **18** resultiert hier möglicherweise von der Verunreinigung mit dem anderen, *R*-konfigurierten Enantiomer: Das kommerziell erworbene (*S*)-Naphthylethanamin enthält das *R*-Enantiomer zu 2% (Herstellerangabe 98% ee), das dann auch im Amid **18** als aktives *R*-Enantiomer **2** zu 2% enthalten ist

(also 2 μM Verbindung **2**). Mit den 2% Verunreinigung durch Inhibitor **2** würde eine Enzymhemmung von etwa 50% resultieren, bei kleinerer Enzymhemmung wie hier liegt dann entsprechend weniger *R*-Enantiomer vor, d. h. das Amin-Ausgangsmaterial hat einen höheren Enantiomer-Überschuss als 98%.

Man sollte also davon ausgehen, dass die *S*-konfigurierte Verbindung **18** keine, oder nur vernachlässigbare Affinität besitzt. Der Grund für die fehlende Affinität *S*-konfigurierter Verbindungen (**18** und **f**, s. Abb. 2-19) kann jedoch nicht eine „zu kleine S4-Tasche“ sein, da das Dimethylderivat an das Protein bindet.

Eine spekulative Ursache könnte sein, dass die einzige Methylgruppe in *S*-Konfiguration die Konformation des Liganden (v. a. der Naphthylgruppe) so stark vorgibt, dass die zur Bindung nötige Konformation in Lösung nicht vorliegt.

Bezug zur Kristallstruktur 3MJ5

In Kapitel 2.4 wurde bereits die von Ghosh et al.^[20] veröffentlichte, neue Kristallstruktur 3MJ5 angesprochen. Auf die an die 3MJ5-Konformation bindenden Piperidincarboxamid-Inhibitoren sind die Struktur-Wirkungsbeziehungen der Inhibitoren vom Benzamid-Typ nur begrenzt anwendbar. Abbildung 3-6 gibt eine Auswahl von Piperidincarboxamiden, die im Widerspruch zu den Struktur-Wirkungsbeziehungen der Benzamide stehen.

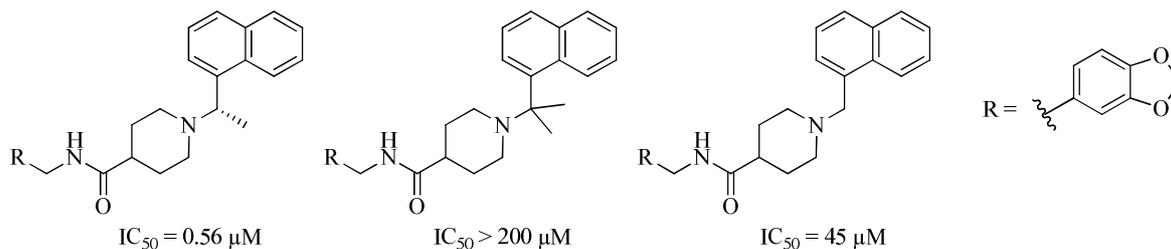


Abb. 3-6: Auswahl publizierter Piperidinecarboxamid-Inhibitoren

Bei dieser Substanzklasse wird demnach *S*-Konfiguration toleriert. Zweifache Methyl-Substitution wird nicht toleriert und das Piperidinecarboxamid ohne Methyl-Substitution besitzt Affinität. Dagegen war das Benzamid-Analogon (Verbindung **4**) ohne Methyl-Substitution *ohne* Affinität. Damit haben die Benzamide zu den Piperidinecarboxamiden überraschenderweise genau gegensätzliche Struktur-Wirkungsbeziehungen! Von diesen Beobachtungen ausgehend, sollten bei der SARS-CoV-PL^{pro} Struktur-Wirkungsbeziehungen nur innerhalb einer Substanzklasse diskutiert werden. Zur Übertragung von Struktur-Wirkungsbeziehungen auf andere Substanzklassen müssen die entsprechenden Analoga synthetisiert und getestet werden, eine rein theoretische Diskussion erscheint aussichtslos.

3.2. Variationen an der Benzoessäure

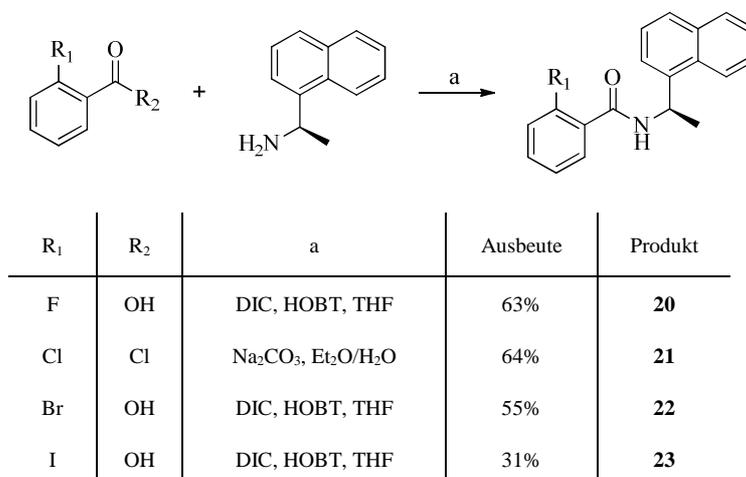
Von Ghosh et al.^[19] war bekannt, dass das Enzym SARS-CoV-PL^{pro} zahlreiche Substituenten an der Benzoessäure toleriert, und in Kapitel 2.5.3 konnte gezeigt werden, dass die publizierten Affinitäten (IC_{50} -Werte) durch Docking gut reproduziert werden können. Daher erschien eine computergestützte und von rationalen Überlegungen geleitete Optimierung des Substitutionsmusters an der Benzoessäure aussichtsreich, um eine weitere Affinitätssteigerung zu erreichen.

3.2.1. Substitutionen in 2-Position

Die 2-Position der Benzoessäure hat einen entscheidenden Einfluss auf die Affinität der Benzamide. Aus der Kristallstruktur 3E9S ist bekannt, dass die Methylgruppe auf die Enzymoberfläche zeigt, genau genommen auf einen freien Bereich zwischen Leu163 und Tyr265, sodass die Umgebung bis auf den Tyrosin-Phenol-Sauerstoff lipophil ist. Von Ratia et al.^[18] ist bekannt, dass eine 2-Chlor-Substitution der 2-Methyl-Substitution geringfügig unterlegen ist ($IC_{50} = 15 \mu\text{M}$ vs. $9 \mu\text{M}$), wobei die Amin-Komponente bei den angesprochenen Derivaten die ungünstigere 2-Naphthylverknüpfung besaß. Weiterhin ist bekannt, dass die 2-Ethyl-Substitution zu einem Affinitätsverlust führt, obwohl laut Docking (s. Kap. 2.5.3) ausreichend Platz für die Ethylgruppe existiert. Die 2-Ethyl-Substitution stellt bis jetzt die kritische Grenze dar, ab welcher eine Gruppe in 2-Position einen Affinitätsverlust auslöst, ohne dass dies durch Docking vorhersehbar ist.

Mit der Synthese der folgenden vier 2-Halogenderivate (Verbindungen **20** - **23**) und des 2-Mercaptoderivats (Verbindung **27**) wird systematisch nach weiteren Substituenten gesucht, um die lipophile Interaktion in der Bindestelle zu optimieren und die Hypothese eines „kritischen Raumanspruchs“ in 2-Position zu prüfen.

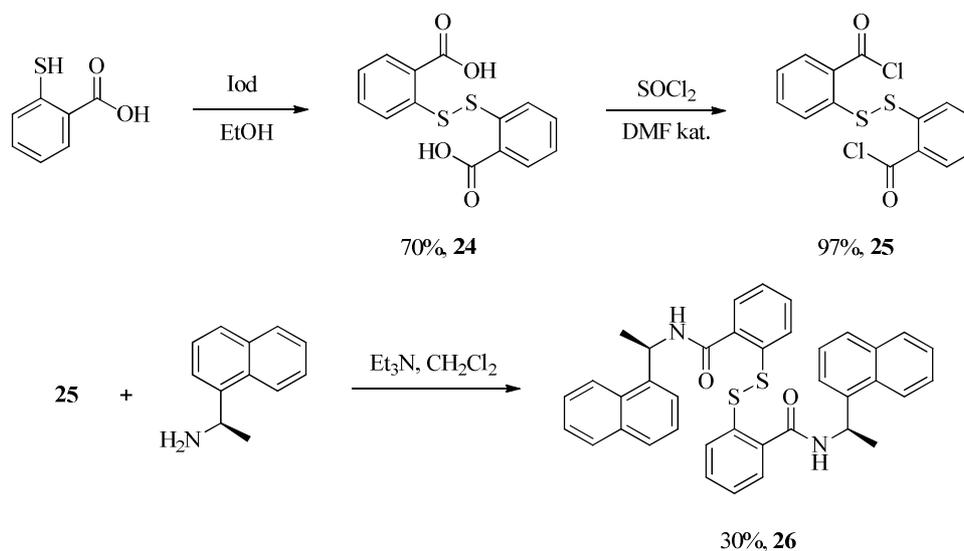
Die Synthese der 2-Halogenbenzamide erfolgte mit dem Peptid-Kupplungsreagenz Diisopropylcarbodiimid (DIC), die 2-Chlorbenzoesäure war als Säurechlorid kommerziell erhältlich und wurde als solches unter Schotten-Baumann Bedingungen zum Amid umgesetzt (s. Schema 3-7).



Schema 3-7: Darstellung der 2-Halogenserie mit 1-Naphthyl-verknüpftem Amin (Verbindungen **20 - 23**)

Das 2-Mercaptobenzamid **27** (s. Schema 3-9) sollte ausgehend von der Thiosalicylsäure dargestellt werden. Ein erster Versuch zur direkten Verknüpfung von Thiosalicylsäure mit dem Amin unter Verwendung des Peptid-Kupplungsreagenz HBTU führte nicht zum gewünschten Amid. Nachdem die Thiosalicylsäure selbst als Nukleophil reagieren kann, wurde sie daher im nächsten Versuch geschützt eingesetzt. Als geeignet erschien die von Sengar et al.^[100] gewählte Strategie, die Thiosalicylsäure durch Oxidation in ihr Disulfid zu überführen.

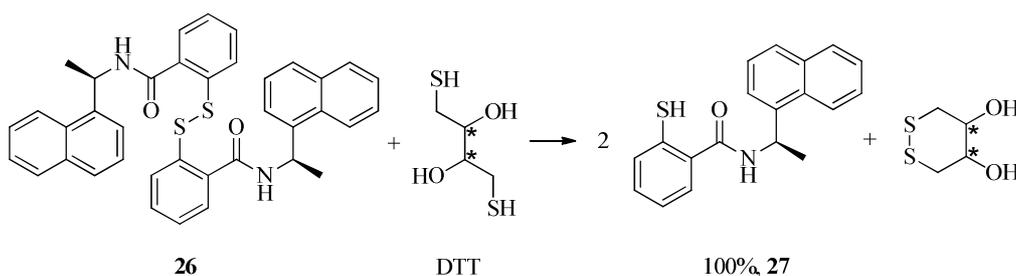
Analog zu Sengar et al. wurde daher die Thiosalicylsäure durch Oxidation mit Iod in ihr Disulfid **24** überführt, mit Thionylchlorid zum Säurechlorid **25** aktiviert und nach Zugabe von (*R*)-Naphthylethanamin das Amid **26** erhalten:



Schema 3-8: Darstellung des dimeren Amids **26**

Die reduktive Spaltung der Disulfidgruppe in Verbindung **26** wurde wie bei Sengar et al. mit NaBH₄ unter Argon versucht. Der Ansatz geschah allerdings nicht wie bei Sengar et al. im Gramm-Maßstab, sondern ab Verbindung **26** im Halbmikro- bis Mikromaßstab, um chirales (*R*)-Naphthylethanamin zu sparen. Die Reduktion von 33 mg **26** hat neben Wasserstoffentwicklung einen für Thiole typischen Geruch wahrnehmen lassen, der nach der Aufarbeitung jedoch wieder verschwunden war. Laut ¹H-NMR-Spektrum wurde verunreinigtes Disulfid-Edukt **26** isoliert, was das Dünnschichtchromatogramm auch schon vermuten ließ. Das am Geruch wahrgenommene, intermediär entstandene Thiol **27** wurde vermutlich aufgrund Luftzutritt bei der Aufarbeitung zum Disulfid **26** rücoxidiert. Die Tatsache, dass in 1 ml Luft bereits 9 µmol Sauerstoff enthalten sind und pro Molekül O₂ vier Moleküle Thiol zu zwei Disulfid-Molekülen oxidiert werden, bedeutet für den 54 µmol-Ansatz demnach, dass mit 3 ml Luft bereits das gesamte Thiol wieder rücoxidiert werden kann.

Nachdem also eine Aufarbeitung nach Reduktion aufgrund des Luftzutritts beim Ausschütteln nicht erfolgen kann, wurde als Reduktionsmittel D/L-Dithiothreitol (DTT, Cleland's Reagenz^[101]) gewählt, sodass der Ansatz ohne Aufarbeitung die Stammlösung für den Enzymassay darstellt. So wird das Disulfid **26** mit 6 eq. DTT in DMSO über eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (Schema 3-8), die vollständige Umwandlung in die Zielverbindung **27** wurde mittels LC-MS kontrolliert. Ein möglicher Einfluss der damit erhöhten DTT-Konzentration wird über eine zu testende DTT-Referenzstammlösung ohne Inhibitor bestimmt.



Schema 3-9: Reduktion des Disulfids **26** zum 2-Mercaptobenzamid **27**

Bisherige Testergebnisse und Diskussion

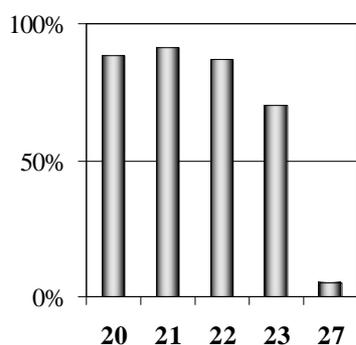


Abb. 3-7: Screening an SARS-CoV-PI^{Pro} (100 µM)

Tab. 3-2: IC₅₀-Werte der aktiven Verbindungen

Verbindung	20 Fluor	21 Chlor	22 Brom	23 Iod
IC ₅₀ [µM]	9 ± 1	6.5 ± 0.8	11 ± 2	25 ± 3

Die Halogenreihe von 2-Fluor bis 2-Iod-substituierten Benzamiden (**20** - **23**) zeigt ein Optimum bei der 2-Chlor-Substitution (Verbindung **21**), kann jedoch die 2-Methyl-substituierte Leitstruktur **2** nicht übertreffen (IC₅₀ = 3.3 µM). Die 2-Mercapto-Verbindung **27** besitzt bei 100 µM keine messbare Enzymhemmung.

Die vom Chlor- zum Iod-Derivat abnehmende Affinität bestätigt die Hypothese eines kritischen Raumannspruchs. Über den Einfluss der Elektrostatik kann lediglich gesagt werden, dass der Austausch von Methyl gegen Chlor die Affinität halbiert. Die unterschiedlich stark polarisierten Substituenten Fluor und Brom führen dagegen zu Verbindungen vergleichbarer Affinität.

Die halogenierten Verbindungen zeigen darüberhinaus, dass sich die Verminderung der Ladungsdichte im Aromaten durch den –I-Effekt nicht merklich auf die CH/ π -Bindungsstärke auswirkt, bzw. dies durch andere Effekte kompensiert wird, da die Affinität zum Fluor hin nicht deutlich abnimmt.

Die Inaktivität von Verbindung **27** erscheint unerklärlich. Der Atomradius von Schwefel ist mit dem von Brom vergleichbar und auch bei Berücksichtigung der seitlichen Ausdehnung (S-H Bindungslänge = 1.34 Å, nach Steiner^[102]) ist kein konkurrierender Raumannspruch in der Bindetasche zu erwarten. Eine Erklärung über die intramolekulare H-Brücke wie beim Salicylamid-Derivat (s. Kap. 2.5.3) ist hier unwahrscheinlich: Schaefer et al.^[103] führten NMR-Konformationsanalysen an Thiosalicylsäuremethylester in CCl₄ und C₆D₆ durch. Dabei zeigt sich lösemittelabhängig ein *cis* / *trans*-Verhältnis von 1:1.7 respektive 1:2. Die freie Enthalpie der *trans*-Konformation liegt damit um 1.6 ± 0.7 kJ/mol unter derjenigen der *cis*-Konformation (s. Abb. 3-8). Die intramolekulare H-Brücke ist demnach zu vernachlässigen und sollte nicht die zur Bindung nötige Konformation verhindern.

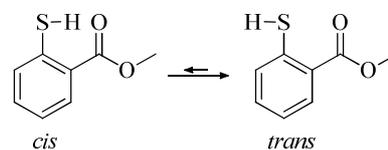
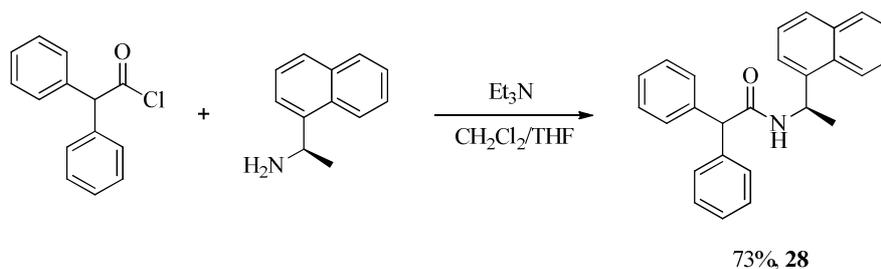


Abb. 3-8: Thiosalicylsäuremethylester

3.2.2. Weitere abgeleitete Verbindungen

Vergrößerung des Phenyllessigsäure-Scaffolds von Inhibitor **17**

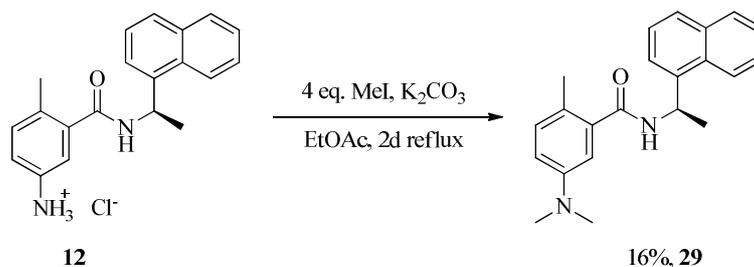
Nachdem das Phenylacetamid **17** eine schwache Aktivität zeigte, wurde die Struktur um einen Phenylring erweitert. Verbindung **28** könnte in der S3-Tasche über eine größere lipophile Interaktionsfläche binden.



Schema 3-10: Darstellung des Diphenylacetamids **28**

Derivatisierung des literaturbekannten Inhibitors **12**

Der Inhibitor **12** wird an seiner affinitätssteigernden, aromatischen 5-Aminogruppe modifiziert: Man alkyliert mit Methyljodid zu Verbindung **29** (Schema 3-11). Die niedrige Ausbeute könnte an unvollständiger Umsetzung liegen (Verflüchtigung des Methyljodids) oder an Verlusten bei der Aufarbeitung an die wässrige Phase (Ansatzgröße lediglich 66 mg).



Schema 3-11: Darstellung des *N,N*-Dimethylaminobenzamids **29**

Derivatisierung von Inhibitor **9**

Die vermutete H-Brücke von Verbindung **9** zu Leu163 soll durch Variation zum NH-aciden 4-Methylsulfonamido-Derivat **30** verstärkt werden. Außerdem kann laut Docking ein Sulfon-Sauerstoff eine weitere H-Brücke zu Lys158 ausbilden und **30** erhält einen beachtlich hohen Chemscore von 47.4 (Verbindung **9**: Chemscore 43.0).

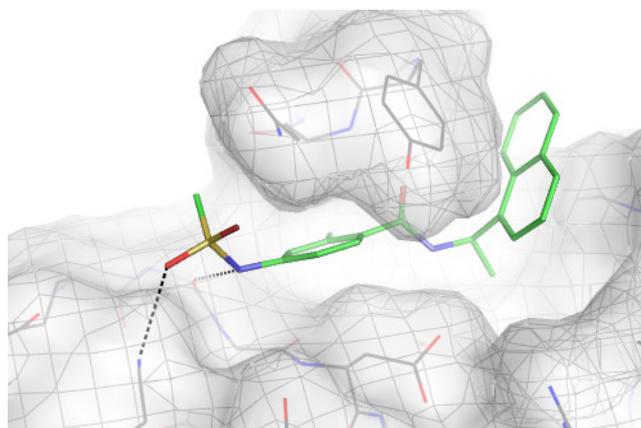
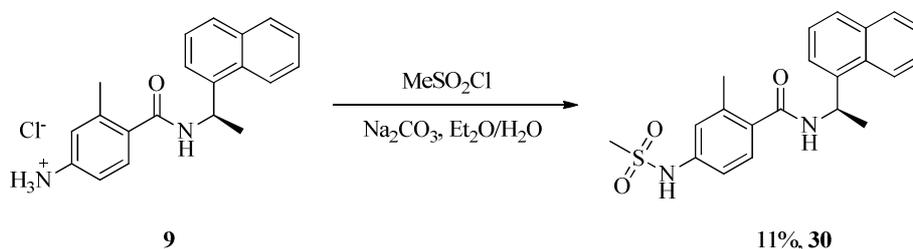


Abb 3-9: Bindemodus von **30** laut Docking

Die Synthese erfolgt ausgehend von **9** mit Methansulfonsäurechlorid bei Raumtemperatur:

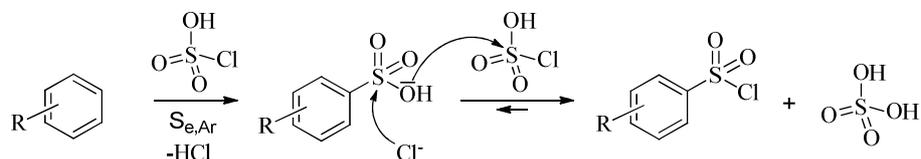


Schema 3-12: Darstellung des Methylsulfonamidobenzamids **30**

Einführung eines Aminosulfon-Substituenten in Position 5 des Benzamid-Scaffolds

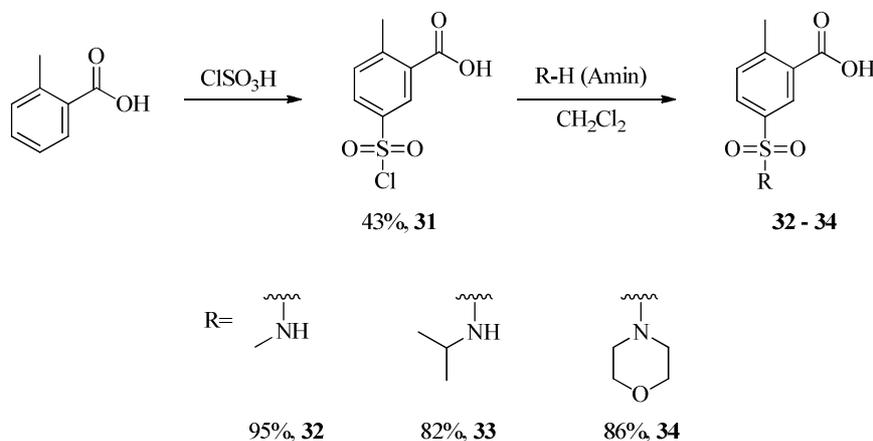
Mit Chlorsulfonsäure kann die Chlorsulfongruppe in den aromatischen Kern eingeführt werden. Im ersten Schritt findet eine elektrophile Substitution am Aromaten statt, es reagiert das im Gleichgewicht vorliegende Schwefeltrioxid, wodurch als Zwischenprodukt die aromatische Sulfonsäure gebildet wird. Substituenten besitzen

dabei dirigierende Wirkung, aus Benzoesäurederivaten entsteht so das *meta*-Produkt. Dieses wird von einem weiteren Äquivalent Chlorsulfonsäure im zweiten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in das Sulfonsäurechlorid überführt^[104]. Da dieser zweite Schritt eine Gleichgewichtsreaktion darstellt, wird die Reaktion im Überschuss Chlorsulfonsäure durchgeführt. Die Reaktion ist in Schema 3-13 allgemein formuliert:



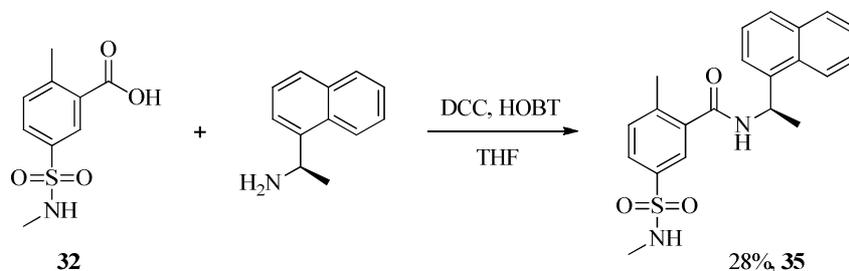
Schema 3-13: Chlorsulfonierung am Aromaten

Die 2-Methylbenzoesäure wurde mit Chlorsulfonsäure zu **31** derivatisiert, anschließende Umsetzung mit Alkylaminen liefert die neuen Benzoesäure-Bausteine **32 - 34**:



Schema 3-14: Darstellung der Aminosulfonylbenzoesäure-Bausteine **32 - 34**

Von ihnen wurde nur **32** in das Amid **35** überführt (siehe Schema 3-15). Da die Affinität durch die Methylaminosulfonylgruppe in Verbindung **35** gegenüber der unsubstituierten Leitstruktur **2** etwas abnahm, wurde auf die Synthese von Amiden aus den Bausteinen **33** und **34** verzichtet.



Schema 3-15: Darstellung des Methylaminosulfonylbenzamids **35**

Der Inhibitor **35** nimmt laut Docking einen Bindemodus ein, der zu einem sehr hohen Chemscore-Wert von 48.2 führt (s. Abb. 3-10). Die Sulfonamid-Sauerstoffatome bilden H-Brücken zu Tyr269 und Gln270, während das

Sulfonamid-NH in einer H-Brücke zu Glu168 gebunden ist. Der Diederwinkel zwischen Aromat und Sulfon entspricht dabei demjenigen, der auch von Stahl et al.^[82] in Kristallstrukturen (PDB und CSD) am häufigsten beobachtet wurde.

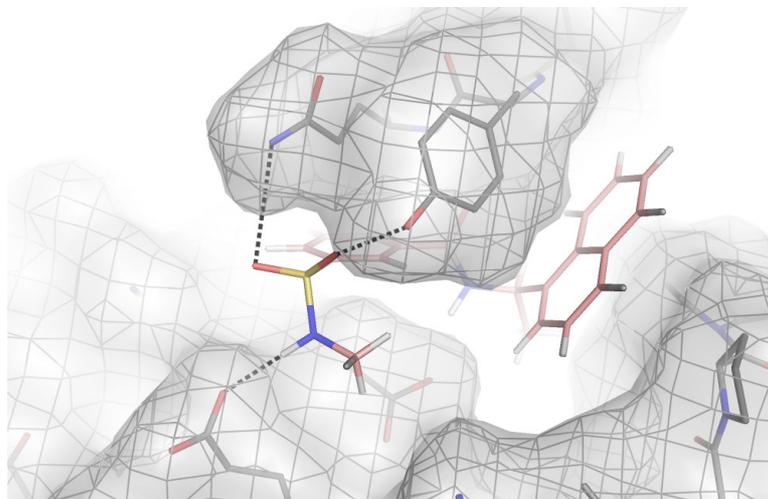
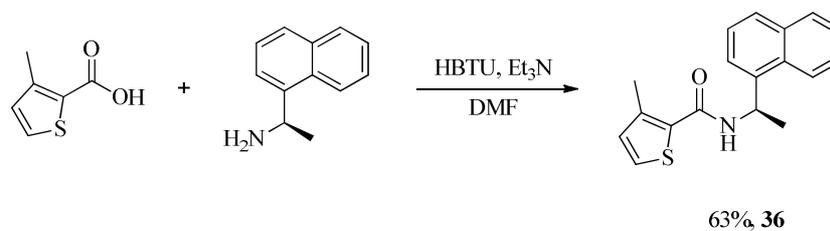


Abb. 3-10: Bindemodus von **35** laut Docking (Ligand mit H-Atomen dargestellt)

Ersatz der 2-Methylbenzoesäure durch ihr bioisosteres Thiophen-Analogon

Mit Verbindung **36** wird der bisher übliche Benzoesäure-Aromat durch den 3-Methylthiophen-2-carbonsäure-Baustein ersetzt. Die Synthese von **36** erfolgt durch Aktivierung der Säure mit dem Peptid-Kupplungsreagenz HBTU in Gegenwart von Triethylamin, anschließend wird die Amin-Komponente zugegeben:



Schema 3-16: Darstellung des Thiophencarboxamids **36**

Ableitung einer Verbindung mit Amidinogruppe

Es erschien plausibel, das Amid-Kernfragment der Benzamid-Inhibitoren durch ein Amidin-Kernfragment auszutauschen. Im ungeladenen Zustand sollte es, wie das Amid-Carbonyl, vom Gln270-NH-Backbone eine H-Brücke als H-Akzeptor empfangen. Im protonierten Zustand könnte es aber auch als H-Donor an die Loop-Konformation der Struktur 3MJ5 binden. Abbildung 3-11 zeigt die Bindung der beiden Protonierungsstufen des Amidin-Kernfragments und deren Vergleich mit den Bindemodi der Liganden von 3E9S und 3MJ5:

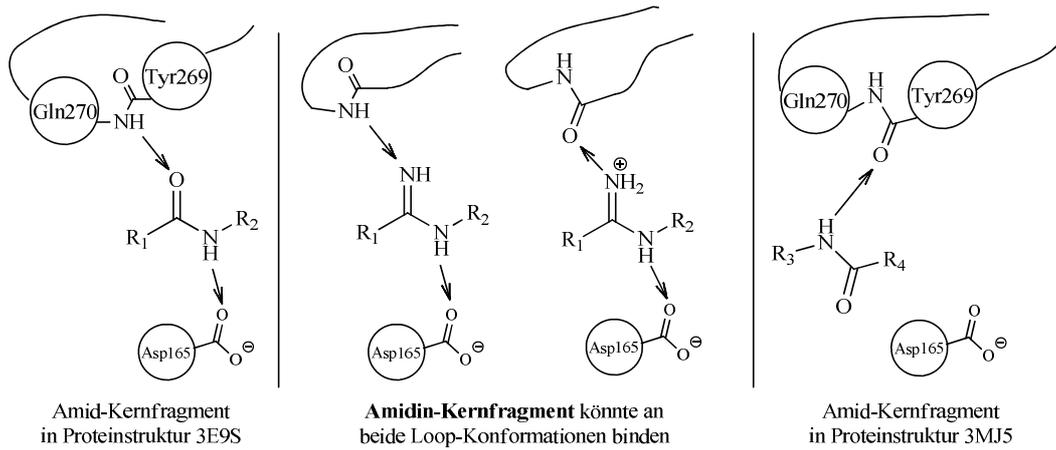
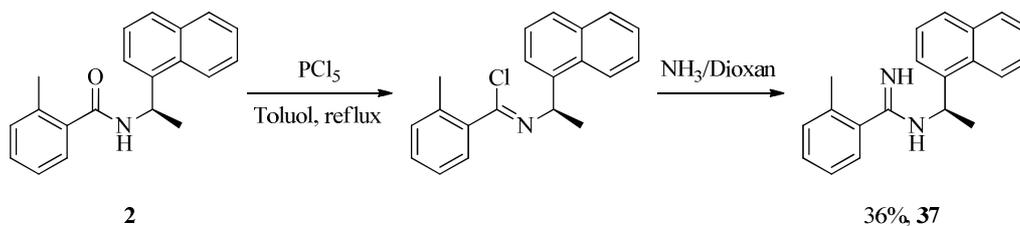


Abb. 3-11: Ableitung des Amidin-Kernfragments aus den Bindemodi der 3E9S- und 3MJ5-Liganden.

Die Synthese erfolgt in Anlehnung an eine Vorschrift von Crimmin et al.^[105], das Benzamid **2** wird dazu mit Phosphorpentachlorid in das Imidoylchlorid überführt, Zugabe von Ammoniak in Dioxan ergibt das Amidin **37**:



Schema 3-17: Darstellung des Amidins **37**

Testergebnisse und Diskussion

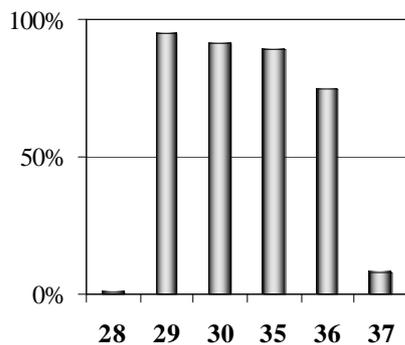


Abb. 3-12: Screening an SARS-CoV-2-PP1r0 (100 μM)

Tab. 3-3: IC₅₀-Werte der aktiven Verbindungen

Verbindung	29	30	35	36
IC ₅₀ [μM]	4.0 ± 0.2	4.8 ± 0.3	4.0 ± 0.3	14 ± 1

Das Diphenyllessigsäureamid **28** besitzt im Gegensatz zum schwach aktiven Phenyllessigsäureamid **17** keine inhibitorische Wirkung, die Vergrößerung der lipophilen Interaktionsfläche ist so nicht möglich. Auch das Amidin **37** zeigt keine inhibitorische Wirkung gegenüber der Protease. Das Thiophen-Derivat **36** ist inhibitorisch wirksam, besitzt jedoch deutlich geringere Affinität als die Leitstruktur **2**.

In Abbildung 3-13 werden die Strukturformeln und IC₅₀-Werte der weiteren, getesteten Inhibitoren gegenübergestellt, um die anschließende Diskussion zu erleichtern:

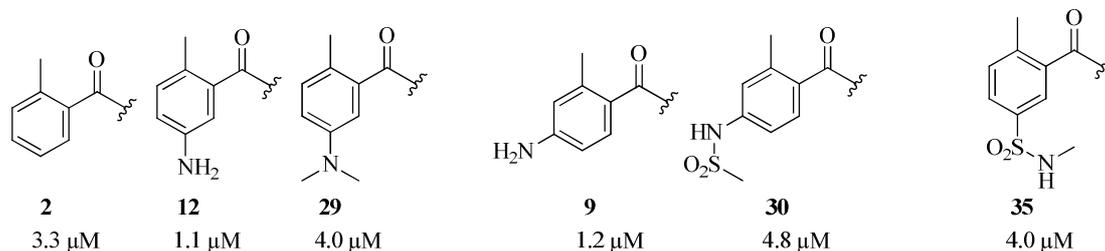


Abb. 3-13: Gruppierte Übersicht über die diskutierten Benzamid-Derivate mit IC₅₀-Werten

Die 5-Aminogruppe von **12** kann wie in Kapitel 2.1 erläutert, H-Brücken-Donor oder -Akzeptor sein, bei Verbindung **29** kann sie im neutralen Zustand nur H-Brücken-Akzeptor sein. Mit dem *N,N*-Dimethylderivat **29** wurde die Leitstruktur **12** in ihrer Affinität verschlechtert, **29** besitzt einen IC₅₀-Wert, der der Leitstruktur **2** ohne aromatische Aminogruppe ähnlich ist. Für die gute Affinität von **12** wäre damit eher nicht der +M-Effekt der 5-Aminogruppe verantwortlich, sondern deren H-Brücken-Donorfähigkeit. Allerdings könnte bei **29** auch eine Repulsion zwischen einer *N*-Methylgruppe und dem nahen Tyr269 vorliegen, die die Affinität von **29** vermindert.

Der 4-Methylsulfonamido-Inhibitor **30** stellt mit einem IC₅₀ von 4.8 μM eine Verschlechterung der Ausgangsverbindung **9** dar (IC₅₀ = 1.2 μM). Nachdem im Docking die Sulfonamidgruppe ein gutes H-Brücken-netzwerk bildet, der Inhibitor jedoch nicht in seiner Affinität gegenüber **9** davon profitiert, könnten hier Desolvation bei Ligandbindung und / oder Verminderung des +M-Effekts der aromatischen Aminogruppe (Sulfonamid) die niedrigere Affinität erklären. Solche Einflüsse werden vom Dockingprogramm GOLD nicht berücksichtigt.

Auch Verbindung **35** ist nicht affiner als die Leitstruktur **2**, obwohl günstige H-Brücken-Interaktionen vom Sulfonamid ausgehen sollten. So schlug auch hier die computergeleitete Strukturoptimierung fehl. Als mögliche Gründe können dieselben wie zuvor genannt werden: Unbekannte Energiedifferenz bei Desolvation des polaren Sulfonamids sowie verminderte Ladungsdichte im Aromaten durch den -M-Effekt des Sulfonamids. Hinzu kommt, dass je nach Pyramidalität des Sulfonamid-Stickstoffs eine sterische Überlappung der angeknüpften Methylamino-Gruppe mit dem nahen Asp165 denkbar wird, die sich jedoch im Docking aufgrund der von GOLD angenommenen Bindungswinkel nicht zeigt. Aus dem Grund wäre die Affinität eines analogen Inhibitors ohne Methyl-Substituent am 5-Aminosulfon interessant.

3.3. Variationen am Naphthylethanamin

Bisher durchgeführte Variationen an der Amin-Komponente der Benzamide (Verbindungen 3 - 5) führten zu einem nahezu vollständigen Verlust der Hemmung. Der weitere Variationsspielraum zur Adressierung der S4-Tasche wird daher auf nur geringfügige Änderungen am Naphthylethanamin beschränkt.

Die einzigen, bisher von Ratia et al.^[18,19] bekannten Benzamid-Inhibitoren mit Variationen in der Amin-Komponente sind in Abbildung 3-14 nochmal zusammengestellt:

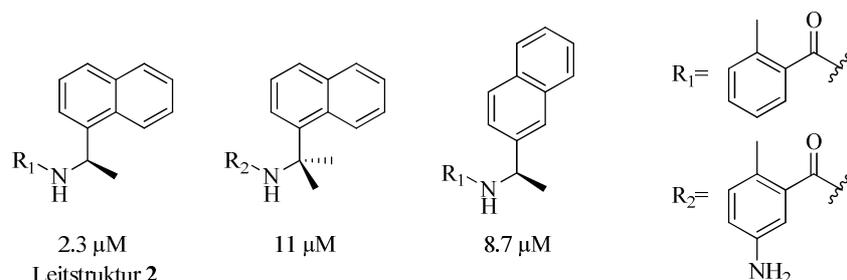


Abb. 3-14: Bisher bekannte Variationen am Naphthylethanamin mit Hemmwirkung (IC₅₀-Werte)

Es sind keine substituierten Naphthylethanamine kommerziell erhältlich, somit besteht nur die Möglichkeit einer Abwandlung des erworbenen (*R*)-Naphthylethanamins oder der Synthese über abgewandelte Naphthylketon-Vorstufen, die durch reduktive Aminierung in ihr Naphthylalkylamin überführt werden können. Diese beiden Wege werden in den folgenden Unterkapiteln begangen. Abbildung 3-15 gibt einen Überblick über den chemischen Zugang zu diesen Naphthyl-Derivaten, angegeben ist jeweils die Startverbindung, bei welcher die Syntheserouten beginnen.

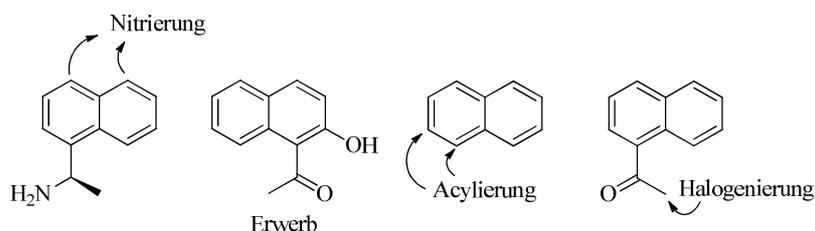


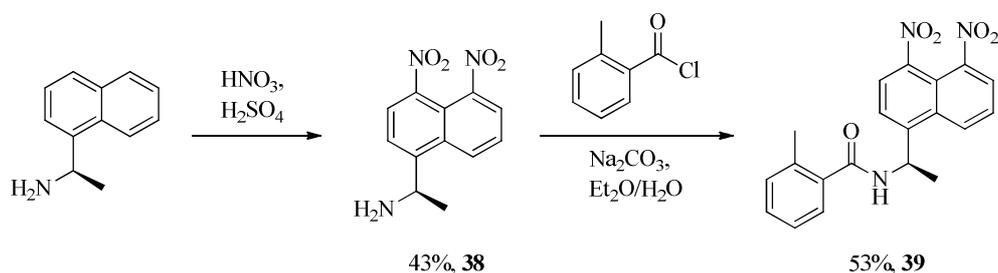
Abb. 3-15: Möglichkeiten zur Gewinnung derivatisierter Naphthylalkylamine

3.3.1. Nitro- und Aminoderivat am Naphthalin-Gerüst

Die Wechselwirkung des Naphthalin-Gerüsts mit der Bindetasche ist geprägt durch ein T-Stacking zu Tyr269 und drei weiteren CH/ π -Interaktionen (α -CH von Pro248, δ -CH₂ von Pro249) von der anderen Seite (s. Kapitel 2.1). Weiterhin zeigen die Positionen 4, 5 und 6 des 1-Naphthylsubstituenten in das Solvens. So eignen sich diese Positionen für die Einführung von Substituenten mit +M-Effekt, um die Elektronendichte im aromatischen System und damit die Stärke der CH/ π -Interaktionen zu erhöhen^[62].

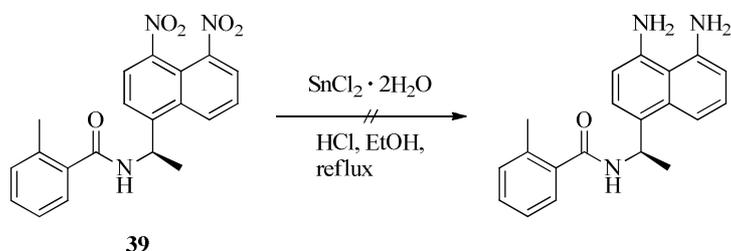
Es bietet sich an, dem Naphthyl-Gerüst durch Nitrierung eine Nitrogruppe anzufügen, die dann zur Aminogruppe reduziert werden kann. Außerdem würde die Affinitätsbestimmung des am Naphthyl-Gerüst nitrierten Inhibitors zeigen, ob sich die Nitrogruppe mit ihrem -M-Effekt nachteilig auf die Affinität auswirkt.

Die Umsetzung des (*R*)-Naphthylethanamins mit Nitriersäure sollte in Anlehnung an eine von Blinco et al.^[106] publizierte Nitrierung eines ähnlichen Naphthalin-Derivats zum Eintritt der Nitrogruppe in Position 4 oder 5 führen. Eine Dinitrierung in 4- und 5-Position ist bei deren Edukt für Reaktionsbedingungen von 60 °C über 6 Stunden beschrieben. Aufgrund der geplanten Reaktion im Halbmikromaßstab wurde eine Dinitrierung beabsichtigt, da bei einer Mononitrierung eine Mischung zwischen 4-Nitro- und 5-Nitro-Produkt gebildet werden müsste, was die Ausbeute weiter vermindert. Die Nitrierung wurde daher mit 65%iger Salpetersäure in konz. Schwefelsäure bei 0 °C begonnen und mittels Loop-MS die Umsetzung kontrolliert. Bei der ersten Messung nach 15 Minuten war bereits nur noch Dinitroprodukt nachzuweisen, sodass die Reaktion nicht erwärmt werden musste. Mittels NMR-Spektroskopie konnte dem Dinitroprodukt die Struktur **38** zugewiesen werden. Im Anschluss wird mit 2-Methylbenzoesäurechlorid in das Amid **39** überführt:



Schema 3-18: Darstellung des 4,5-Dinitronaphthylethanamins **38** und anschließende Amidbildung zu **39**

Die Reduktion von Nitrogruppen kann mit verschiedenen Reagenzien erfolgen. Häufige Verwendung zur Reduktion durch Wasserstoff finden Zn/HCl , $\text{Pd}/\text{C}/\text{H}_2$ und Raney-Nickel. Mit SnCl_2 steht ein Reduktionsmittel ohne Wasserstoffbeteiligung zur Verfügung, die Reaktion erfordert gewöhnlich salzsaure Bedingungen und Siedehitze. Aus einem früheren, katalytischen Hydrierversuch von Leitstruktur **2** mit $\text{Pd}/\text{C}/\text{H}_2$ (14 bar) war bekannt, dass das Naphthalin-Gerüst dabei selbst eine partiellen Hydrierung erfährt. Um diese mögliche Nebenreaktion zu vermeiden, wurde die Dinitroverbindung **39** ohne Metallkatalyse reduziert. Ein Versuch in verdünnter, ethanolischer Salzsäure mit SnCl_2 zu reduzieren, führte jedoch nicht zum gewünschten Produkt (Schema 3-19). Das Diaminoprodukt konnte auch nicht in Spuren mittels LC-MS nachgewiesen werden. Da nur 73 mg **39** zur Verfügung standen und aus dem Ansatz kein Dinitroedukt rückgewonnen werden konnte, ließ sich der Versuch nicht mehr mit einem anderen Reduktionsmittel wiederholen.



Schema 3-19: Versuchte Reduktion von **39** mit SnCl_2

Testergebnis und Diskussion

Verbindung **39** ist an der SARS-CoV-PL^{Pro} inhibitorisch aktiv, der IC₅₀-Wert beträgt $8 \pm 1 \mu\text{M}$. Der nitrierte Inhibitor ist also schwächer affin, als die nicht-nitrierte Leitstruktur **2** (IC₅₀ = 3.3 μM). Im Assay zeigt **39** trotz Nitrogruppen keinen Fluoreszenzlicht-quencheden Effekt.

Die Affinitätsabnahme im Vergleich zu **2** steht im Einklang mit der Theorie, dass der -M-Effekt der Nitrogruppen die CH/ π -Interaktionen zur Bindetasche abschwächt.

3.3.2. Hydroxyderivat am Naphthalin-Gerüst

Anhand von Dockingstudien konnte die 2-Position des Naphthalin-Gerüsts als günstiger Ort für eine Hydroxygruppe erkannt werden. Abbildung 3-16 zeigt den Bindemodus des Liganden, das Docking erfolgte unter Einbeziehung der drei Wassermoleküle der S4-Tasche und man erkennt, wie sich die Hydroxygruppe des Liganden in das H-Brückennetzwerk einfügt:

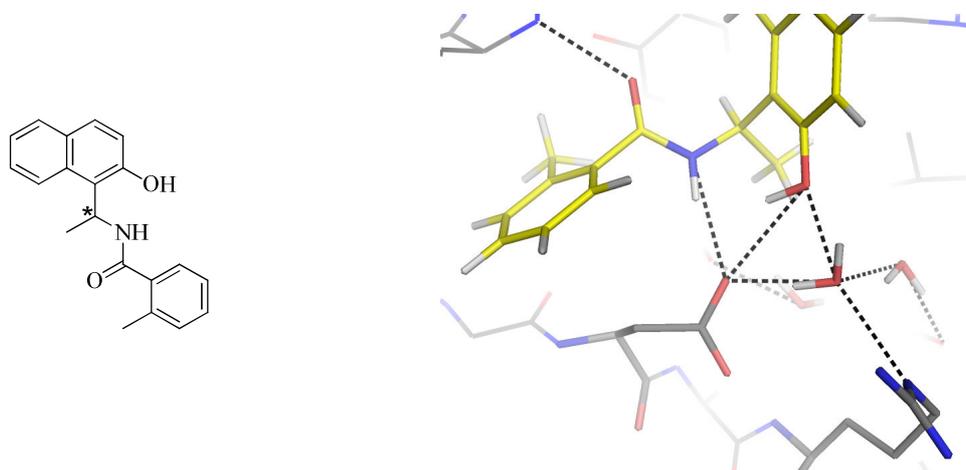
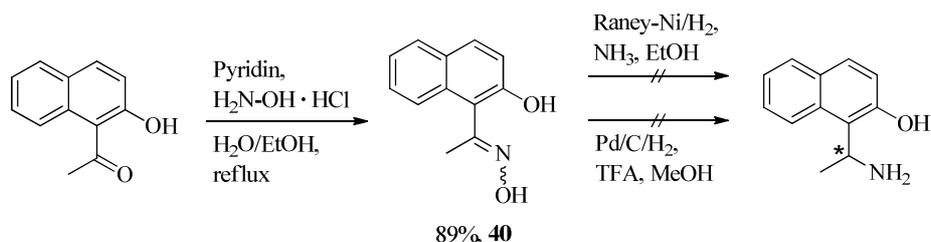


Abb. 3-16: Links: Strukturformel des geplanten Liganden. Rechts: Bindemodus laut Docking, H-Atome bei Ligand und Wasser angezeigt.

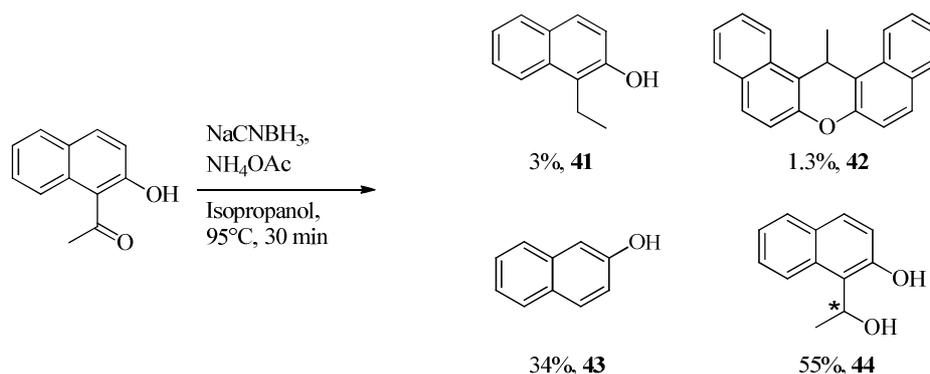
Zur Synthese des geplanten Liganden muss zunächst die Hydroxy-substituierte Amin-Komponente dargestellt werden. Deren Syntheseroute beginnt mit dem kommerziell erhältlichen 2'-Hydroxy-1-acetonaphthon, das nach Anlehnung an eine Vorschrift von Lehr^[107] in das Oxim **40** überführt wird. Die Reduktion von Oximen zu Aminen kann nach Lehr mit Zn/Eisessig/Natriumacetat erfolgen, darüber hinaus wird die Oximreduktion von Brown und Moudachirou^[108] in wässrigem NH₃/EtOH mit Raney-Nickel/H₂ und von Pirkle und Simmons^[109] in wasserfreiem HCl/EtOH mit Pd/C/H₂ beschrieben.

Die größte Ähnlichkeit des Oxims **40** besteht zu demjenigen von Brown und Moudachirou, weshalb nach deren Vorschrift weiter verfahren wird. Das benötigte Raney-Nickel wird für die Hydrierung frisch aus der Ni-Al-Legierung freigesetzt, wobei die von Adkins und Billica^[110] entwickelte Vorschrift zur Gewinnung der Reaktivitätsstufe W-7 angewandt wird. Die Waschprozedur des frischen Katalysators wird, abweichend von der Vorschrift, lediglich mit Wasser und nicht Ethanol beendet, da keine längere Lagerung beabsichtigt wird. Die Hydrierung von Oxim **40** im Autoklav (15 bar H₂) zum primären Amin ist jedoch weder im Basischen mit dem hergestellten Raney-Nickel gelungen, noch in einem zweiten Versuch im Sauren mit Pd/C (s. Schema 3-20).



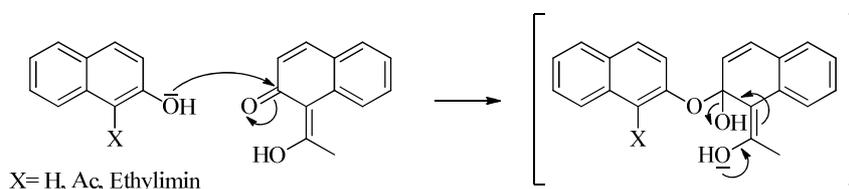
Schema 3-20: Darstellung des Oxims **40** und versuchte Hydrierungen mit Raney-Ni und Pd/C

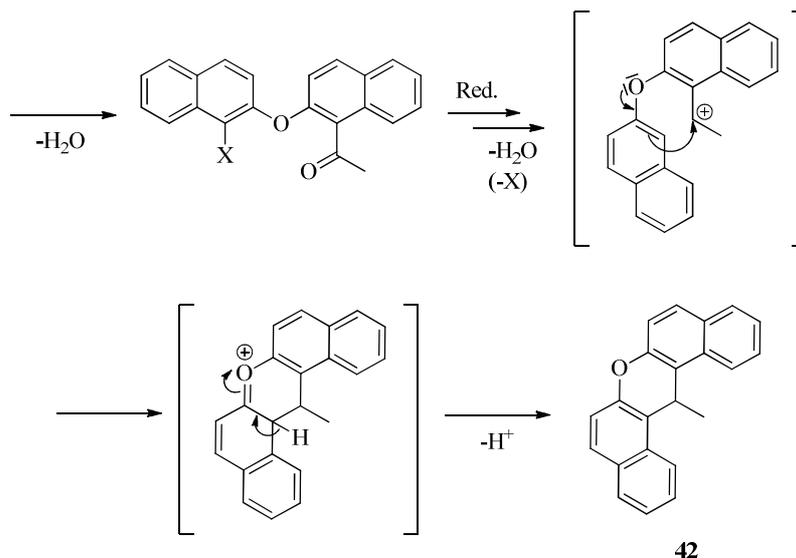
Ein weiterer Versuch das primäre Amin darzustellen, bestand in der reduktiven Aminierung des Ausgangsmaterials 2'-Hydroxy-1-acetonaphthon mit NaCNBH₃/Ammoniumacetat. Gewöhnlich wird im Überschuss Ammoniumacetat (10 - 40 eq.) gearbeitet, das NaCNBH₃ reduziert das intermediär gebildete Imin zum Amin^[111,112]. Im Versuch wurde jedoch nicht das Amin, sondern überwiegend der Alkohol **44** gebildet (Schema 3-21). Weiterhin konnten mittels Säulenchromatographie drei lipophilere Substanzen als der Alkohol aus dem Ansatz isoliert werden (Verbindungen **41** - **43**). Die Strukturaufklärung durch NMR-Spektroskopie konnte bei allen Reaktionsprodukten erfolgreich durchgeführt werden:



Schema 3-21: Misslungene reduktive Aminierung von 2'-Hydroxy-1-acetonaphthon mit Bildung der Nebenprodukte **41** - **44**

Demnach erfolgte an der Ketofunktion sowohl eine Reduktion zum Alkohol **44** als auch in geringer Menge zum Alkan **41**. Mit dem Naphthol **43** wurde ein Zersetzungsprodukt isoliert, das möglicherweise durch säurekatalysierte Deacylierung¹¹³ gebildet wurde. Der Ablauf dieser Reaktion unter den gegebenen, neutralen Bedingungen ist allerdings erstaunlich. Das Dimer **42** stellt ein komplexeres Kondensationsprodukt dar: Van Allan et al.^[114] beschrieben bereits die Darstellung dieses Dibenzoxanthens durch Umsetzung von 2-Naphthol mit Acetaldehydiethylacetal in Ethanol und konz. Salzsäure. Im hier durchgeführten Versuch ist zwar 2-Naphthol in ausreichender Menge entstanden, jedoch liegen weder Acetaldehyd noch stark saure Bedingungen vor, um das Kondensationsprodukt **42** nach Van Allan et al. zu erzeugen. Ein anderer, plausibler Reaktionsmechanismus könnte, wie in Schema 3-22 postuliert, abgelaufen sein und zum Kondensationsprodukt **42** geführt haben:





Schema 3-22: Möglicher Reaktionsmechanismus der Kondensation zu Verbindung **42**

Im ersten Schritt kondensiert das Edukt entweder mit sich selbst oder einem Naphthol-Derivat (2-Naphthol oder das Ethylimin des Edukts). Nach der Elimination von Wasser und Rearomatisierung müsste anschließend die Gruppe X abgespalten werden, falls nicht 2-Naphthol ($X = H$) das Nukleophil im ersten Schritt darstellte. Im nächsten Schritt wird das Keton von NaCNBH_3 zum Alkohol reduziert. Dieser Alkohol kann aufgrund seiner benzylicchen Position säurekatalysiert Wasser eliminieren und damit das benzyliche Kation als Intermediat freisetzen. Analog zu den bekannten Kern-Alkylierungen von Phenol-Derivaten in ortho- und para-Position^[115,116] sollte die Cyclisierung durch C-C-Verknüpfung der ortho-Position neben dem Naphthoether mit dem Carbokation erfolgen. Die Abspaltung eines Protons ermöglicht schließlich die Rearomatisierung zum symmetrischen Dibenzoxanthen-Produkt **42**.

3.3.3. Fluorderivate der Seitenkette

Ghosh et al.^[19] versuchten bereits durch Abwandlung der Seitenkette der Amin-Komponente eine Affinitätssteigerung zu erreichen, doch die publizierten Ethyl- und Phenyl-Derivate erzielten keine inhibitorische Aktivität (Strukturen siehe Abbildung 3-17). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Methylgruppe der Amin-Komponente für die Affinität nötig ist (Kap. 3.1, Verbindung **4**). In diesem Kapitel 3.3.3 soll die Methylgruppe nur um Fluoratome vergrößert werden.

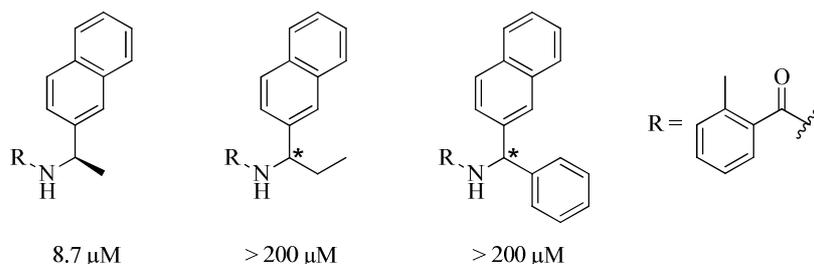


Abb. 3-17: Auswahl bisher bekannter Variationen der Seitenkette mit IC_{50} -Werten

Eine fluorierte Methylgruppe sollte neben dem veränderten elektrostatischen Potential in der Bindetasche keinen deutlichen Einfluss auf Sterik und Platzbedarf des Liganden haben. Nocker et al.^[117] berechneten den Einfluss elektronenziehender und -schiebender Gruppen in Nachbarschaft zu H-Donoren und H-Akzeptoren: Analog würde der vom Fluor ausgeübte –I-Effekt die Acidität des Amid-NH-Protons etwas erhöhen, wodurch dann eine stärkere H-Brücke zu Asp165 gebildet wird. Die CH-Bindung am sekundären Kohlenstoff in β -Position zum Fluor unterliegt ebenso einer stärkeren Polarisierung, was zu einer verbesserten CH/ π -Interaktion dieses Protons mit den aromatischen π -Elektronen von Tyr265 führen sollte^[62,63]. Abbildung 3-18 zeigt die polaren Interaktionen eines trifluorierten und eines monofluorierten Liganden laut Docking:

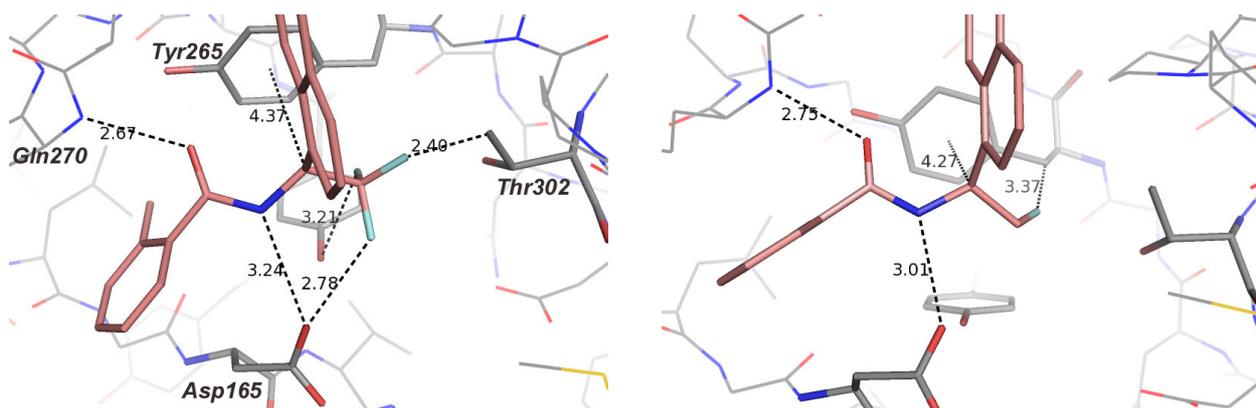


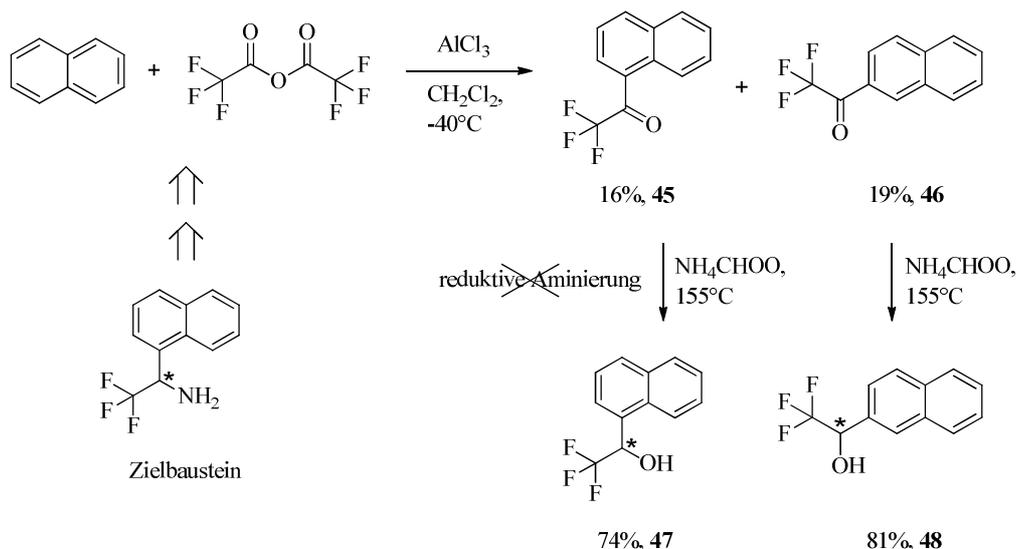
Abb. 3-18: Postulierte Bindemodi des trifluorierten (links) und des monofluorierten Liganden (rechts).

Im linken Bild ist ein konkurrierender Raumananspruch des rechten, oberen Fluoratoms mit Thr302 zu sehen (Abstand 2.49 Å). Doch falls sich die Seitenkette dieses Threonins etwas wegdreht, würde die Repulsion vermieden und gleichzeitig wäre eine polare Interaktion des Threonin-OH zu Fluor denkbar. Das untere Fluoratom ist mit 2.78 Å allerdings auch relativ nahe an Asp165.

Im rechten Bild bestehen keine ungünstigen, sterischen Überlappungen und der typische Benzamid-Bindemodus sollte eingenommen werden können. Das einzelne Fluoratom könnte eine schwache Interaktion mit der CH₂-Gruppe von Tyr265 eingehen (siehe rechtes Bild), oder in den hier „freien“ Raum der S4-Tasche zeigen und mit den dort gebundenen Wassermolekülen interagieren (nicht abgebildet).

Versuchte Synthese des Trifluorderivats

Zur Darstellung des Trifluorderivats muss zunächst die Amin-Komponente aufgebaut werden: Friedel-Crafts Acylierung von Naphthalin mit Trifluoressigsäureanhydrid ergibt die beiden in 1- und 2-Position acylierten Ketone **45** und **46**. Durch eine reduktive Aminierung sollen die Ketone in die Amine überführt werden. Kato et al.^[118] wendeten hierzu bereits die Leuckart-Wallach-Reaktion erfolgreich auf Verbindung **45** an und erhielten das Amin mit 51% Ausbeute. In dieser Arbeit ist die beschriebene reduktive Aminierung jedoch nicht gelungen, es erfolgten lediglich die Reduktionen von **45** und **46** zu den Alkoholen **47** und **48** in hoher Ausbeute (s. Schema 3-23).

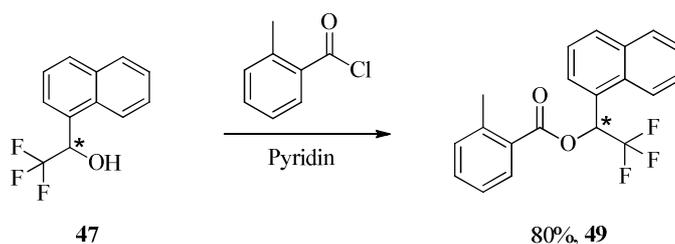


Schema 3-23: Darstellung der Trifluoroacetophthone **45** und **46** und versuchte reduktive Aminierung

Alternative: Synthese des Trifluoesters **49**

Von Ghosh et al.^[19] ist bekannt, dass eine *N*-Methylierung der Amidgruppe von Leitstruktur **2** zwar zu einer 10-fachen Verminderung der Affinität führt ($\text{IC}_{50} = 23 \mu\text{M}$ statt $2.3 \mu\text{M}$), das Molekül aber trotz der fehlenden H-Brücke zu Asp165 weiterhin bindet. Es könnte daher sein, dass auch Ester eine Affinität zur Bindetasche haben: Dem Ester fehlt ebenso die Interaktion zu Asp165, doch er hat laut Docking den Vorteil gegenüber dem *N*-methylierten Inhibitor, dass er Asp165 nicht zu nahe kommt.

Mit den Verbindungen **47** und **48** liegen nun Alkohole vor, mit welchen man die Hypothese der Affinität von Estern überprüfen kann. Daher wird Verbindung **47** mit Verbindung **1** (2-Methylbenzoesäurechlorid) in einer Einhorn-Reaktion in den Benzoesäureester **49** überführt (Schema 3-24). Die Einhorn-Reaktion (Lösungsmittel Pyridin) wurde durchgeführt, nachdem unter Schotten-Baumann Bedingungen nur der Alkohol wiedergewonnen wurde.



Schema 3-24: Darstellung von Verbindung **49** über die Einhorn-Reaktion

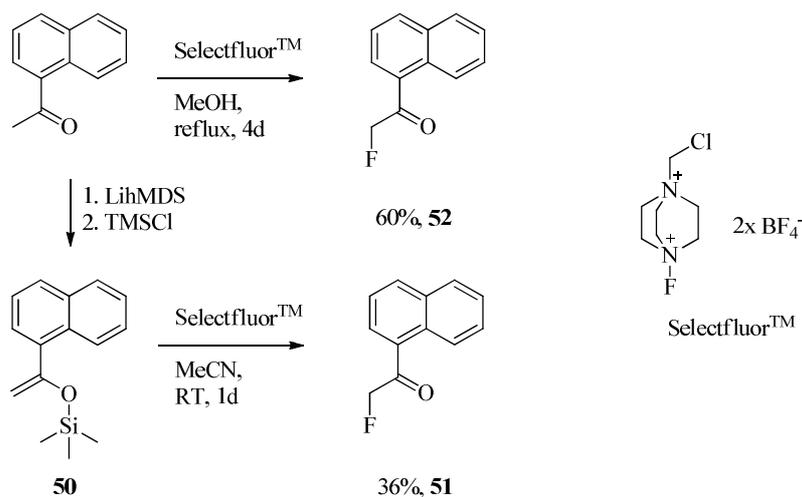
Testergebnisse und Diskussion

Die Verbindung **49** zeigt im Screening an SARS-CoV-PL^{pro} lediglich 18% Hemmung ($100 \mu\text{M}$) und ist damit als nicht aktiv zu bewerten. Der aufgeworfenen Frage, ob Ester eine Affinität zur Bindestelle besitzen, wurde nicht mehr weiter nachgegangen.

Synthese des einfach fluorierten Inhibitors 54

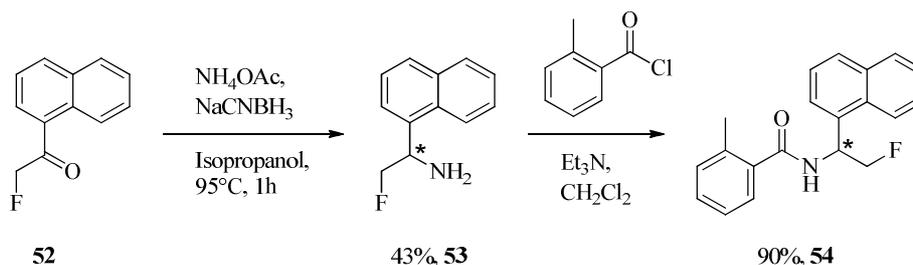
Wie zuvor beim Trifluorderivat soll die Amin-Komponente aus der einfach fluorierten Acetonaphthon-Vorstufe erhalten werden. Die Einführung von Fluor bei Acetophenon-Derivaten in α -Stellung zum Keton wurde von Fuglseth et al. ausführlich untersucht^[119]. Eine elektrophile Fluorierung gelingt demnach mit SelectfluorTM sowohl über den mit Lithiumhexamethyldisilazan/TMSCl erzeugten Silylenolether, als auch direkt in Methanol (s. Schema 3-25). Die Fluorierung in Methanol benötigt laut Fuglseth Siedehitze, Reaktionszeiten von mehreren Tagen und verläuft unter Bildung ringfluorierter Nebenprodukte, die chromatographisch nicht abtrennbar sein sollen. Eine nukleophile Fluorierung wird mit 2-Bromacetophenon-Derivaten und Tetrabutylammoniumhydrogenbifluorid beschrieben.

Die Fluorierung von Acetonaphthon und anschließende reduktive Aminierung mit Methylamin/NaCNBH₃ wurde in einer weiteren Publikation von Fuglseth et al. beschrieben^[120]. Die Route über den Silylenolether **50** lieferte bei Fuglseth die Verbindung **51** in 29% Ausbeute, die Reinheit sei jedoch höher als bei direkter Fluorierung in Methanol. Deshalb wurde auch in dieser Arbeit als Erstes die Silylenolether-Route gewählt (s. Schema 3-25). Als nochmals 2-Fluoracetophenon synthetisiert werden musste, wurde die direkte Fluorierung in Methanol versucht, wobei das Fluorketon in höherer Ausbeute isoliert werden konnte (Verbindung **52**). Die tatsächliche Bildung ringfluorierter Nebenprodukte konnte an zusätzlichen Signalen für CH_2F im ¹H-NMR-Spektrum festgestellt werden (ca. 15mol%).



Schema 3-25: Darstellung des 2-Fluoracetophenons durch elektrophile Fluorierung über zwei Synthesewege

Anschließend wird das Fluorketon **52** durch reduktive Aminierung in das β -Fluoramin **53** überführt, aus welchem mit 2-Methylbenzoesäurechlorid der Inhibitor **54** fertiggestellt wird:



Schema 3-26: Darstellung des fluorierten Inhibitors 54

Die angesprochene Ringfluorierung im Naphthalin-Gerüst zeigt sich auch noch bei der Amid-Endstufe **54**: Nach säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel ergibt die Reinheitsbestimmung mittels LC-MS als auch NMR noch 9% Verunreinigung durch ein zusätzlich ringfluoriertes, homologes Benzamid (siehe dazu Kap. 8, Experimenteller Teil).

Testergebnisse und Diskussion

Die Verbindung **54** führt bei 100 μM im Screening an SARS-CoV-PL^{pro} zu 86% Hemmung, ihr IC_{50} -Wert wird zu $7 \pm 2 \mu\text{M}$ bestimmt. Nachdem **54** als Racemat vorliegt und vermutlich auch bei diesem Stoff die Bindung ans Enzym enantioselektiv erfolgt, sollte der IC_{50} -Wert des aktiven Enantiomers um 3 μM liegen. Nebenbei bemerkt besitzt das Enantiomer mit Geometrie der *R*-Leitstruktur **2** hier *S*-Konfiguration, wohingegen das vermutlich inaktive Enantiomer von **54** dann *R*-konfiguriert ist (Priorität von Fluor bei CIP-Nomenklatur).

Die einfache Fluorierung hat sich im Vergleich zur nichtfluorierten Leitstruktur **2** ($\text{IC}_{50} = 3.3 \mu\text{M}$) also nicht auf die Affinität zur Bindetasche ausgewirkt. Zu Beginn des Kapitels 3.3.3 wurden Überlegungen angestellt, die demnach durch die Ergebnisse mit dem Monofluorderivat weder bestätigt noch widerlegt werden, da die Fluorsubstitution entweder keinen Einfluss auf die Affinität hat, oder sich Effekte gegenseitig kompensieren. Es wäre daher interessant, mit höher fluorierten Derivaten einen stärkeren $-I$ -Effekt auf den benachbarten Amid-Stickstoff und das CH-Proton auszuüben. Jedoch besteht bei Vergrößerung dieser Seitenkette die anfangs angesprochene Gefahr einer repulsiven Wechselwirkung mit Thr302 und Asp165.

3.3.4. Hydroxy- und Azidoderivate der Seitenkette

In diesem Teilprojekt wird die Seitenkette der Amin-Komponente um eine Hydroxygruppe verlängert, da die OH-Gruppe zum einen mit Tyr274, Thr302, oder mit den gebundenen Wassermolekülen der S4-Tasche interagieren könnte (s. Abb. 3-19). Zum anderen ist die Frage zu klären, ob die im Vergleich zur Leitstruktur **2** hydroxylierte Verbindung überhaupt noch eine Affinität zur Bindetasche besitzt, oder ebenso wie die von Ghosh et al.^[19] um ein Kohlenstoffatom verlängerte Verbindung ihre Affinität verliert, entgegen der Erwartung laut Docking und Scoring. Danach sollte noch das dem Hydroxyderivat analoge Aminoderivat synthetisiert werden, da aufgrund der Nähe zu Asp165 eine positiv geladene Gruppe im Liganden dessen Bindungsstärke erhöhen müsste.

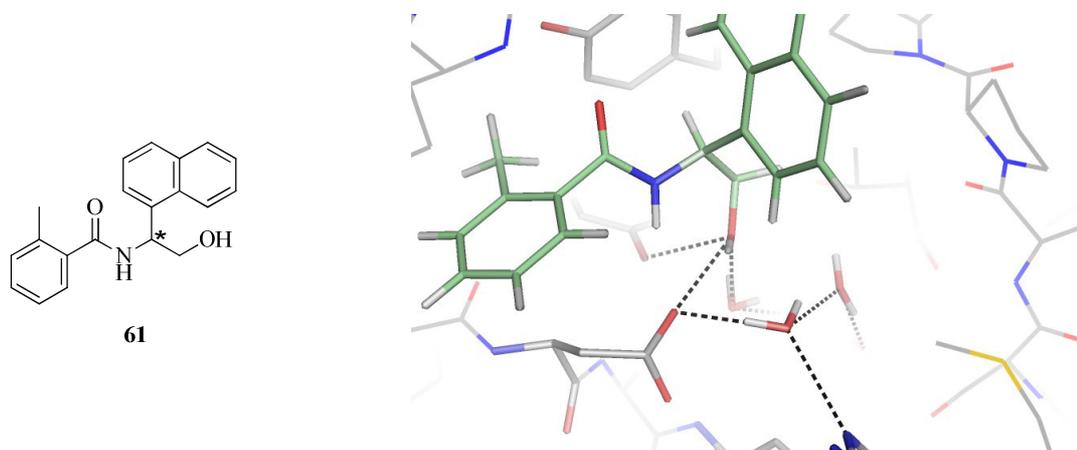
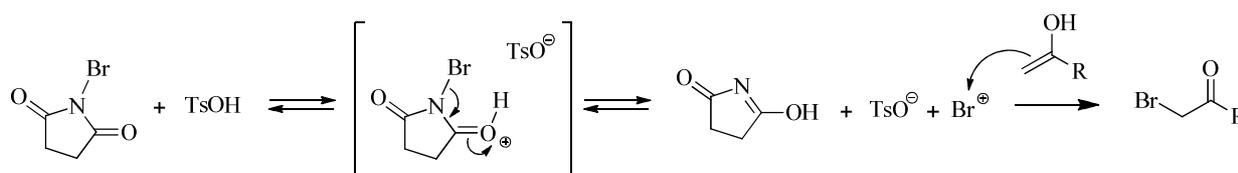


Abb. 3-19: Links: Strukturformel des gedockten Inhibitors. Rechts: Bindemodus laut Docking, H-Atome bei Ligand und Wasser sind angezeigt.

Synthese des Hydroxyderivats 61

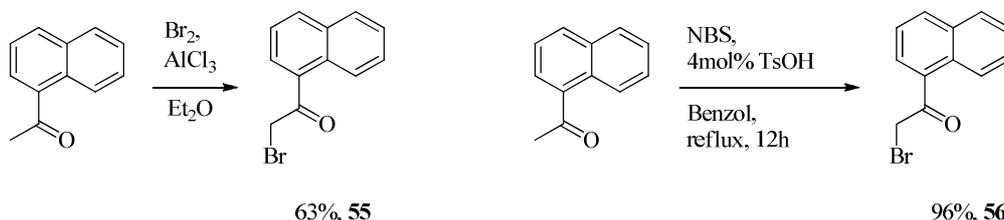
Ausgehend von Acetonaphthon wurde das 2-Brom-Derivat **55** durch elementares Brom und AlCl_3 nach Crank und Khan^[121] synthetisiert (Schema 3-28). Die Umsetzung erfolgte zu 63%, wobei das nicht-umgesetzte Edukt aufgrund gleichen R_f -Werts mittels Säulenchromatographie nicht entfernt werden konnte.

Es wurde daher eine alternative Methode versucht: Nach Vorschrift von Pravst et al.^[122] lassen sich aromatische α -Bromketone aus einer Schmelze von Keton und *N*-Bromsuccinimid unter Katalyse durch *p*-Toluolsulfonsäure erhalten. Adhikari und Samant^[123] beschreiben den Mechanismus dieser säurekatalysierten, elektrophilen α -Bromierung folgendermaßen:



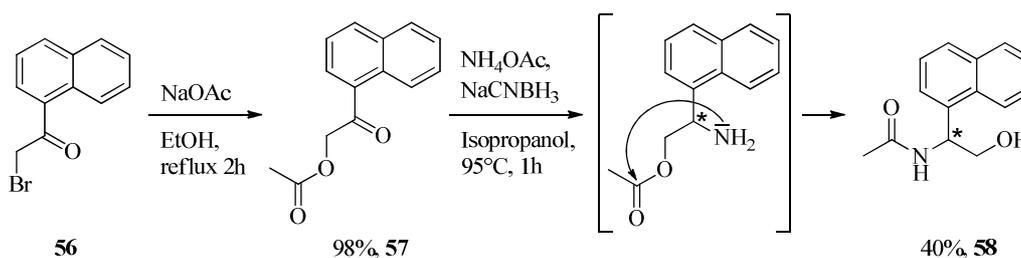
Schema 3-27: Elektrophile Bromierung mit NBS unter Katalyse von TsOH

Die α -Bromierung wurde mit Acetonaphthon als Edukt durchgeführt, jedoch nicht nach Vorschrift in der Schmelze, sondern in benzolischer Lösung. Aufgrund der exzellenten Ausbeute bedurfte es keiner weiteren Aufreinigung. Zur Unterscheidung erhält das über den letztgenannten Weg gewonnene Produkt die Nummer **56**:



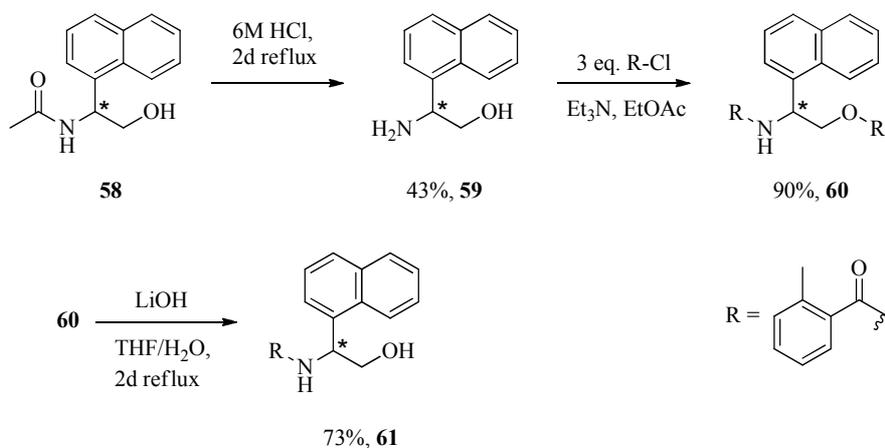
Schema 3-28: Übersicht über die zwei Synthesewege zum 2-Bromacetophenon

Das 2-Bromketon **56** wird im nächsten Schritt durch nukleophilen Angriff mit Natriumacetat in den Ester **57** überführt, auch hier erübrigt die hohe Ausbeute eine Aufreinigung des Produkts. Die reduktive Aminierung mit $\text{NH}_4\text{OAc}/\text{NaCNBH}_3$ ergibt das primäre Amin, welches intramolekular den Ester angreift und eine Aminolyse zum freien Alkohol **58** veranlasst (Schema 3-29). Die Auswertung der NMR-Spektren von Verbindung **58** zeigt dabei eindeutig, dass die Aminogruppe im isolierten Reaktionsprodukt als acetyliertes Amid vorliegt.



Schema 3-29: Darstellung des Esters **57** und anschließende reduktive Aminierung mit postulierter Umlagerung zu **58**

Im nächsten Schritt muss nun die Acetylgruppe vom Stickstoff entfernt werden, um die gewünschte Amin-Komponente freizusetzen. Dazu wird die Amidgruppe in Verbindung **58** mit halbkonz. Salzsäure in der Siedehitze hydrolysiert, wobei der mit der Isolierung desamins **59** verbundene Ausbeuteverlust vermutlich unvollständigem organischen Extrahieren des sehr polaren Produkts zuzuschreiben ist (Schema 3-30). Die Reaktion von **59** mit einem Überschuss (3 eq.) 2-Methylbenzoesäurechlorid führt zur zweifach acylierten Verbindung **60**. Die alkalische Hydrolyse der Estergruppe in **60** gelang nur unter ungewöhnlich drastischen Bedingungen, was auf eine sterische Abschirmung durch die in 2-Position Methyl-substituierte Benzoesäure schließen lässt. Dies steht in Einklang mit der anderweitig erfolgten Beobachtung, dass das 2-Methylbenzoesäureanhydrid ausgesprochen hydrolysestabil ist. So wurde über 6 Stufen die in der Seitenkette hydroxylierte Zielverbindung **61** mit einer Gesamtausbeute von 11% erhalten (Schemata 3-28 bis 3-30).



Schema 3-30: Letzte Stufen der Darstellung von Zielverbindung **61**

Testergebnis und Diskussion

Im Screening an SARS-CoV-PL^{pro} zeigt die racemische Verbindung **61** lediglich 50% Enzymhemmung bei 100 μ M Inhibitorkonzentration, auf eine Verdünnungsreihe zur exakten Bestimmung des IC₅₀-Wertes wurde daher verzichtet. Unter der Annahme, dass auch hier nur ein Enantiomer an das Enzym binden kann, würde man damit den IC₅₀-Wert des aktiven Enantiomers auf etwa 50 μ M schätzen.

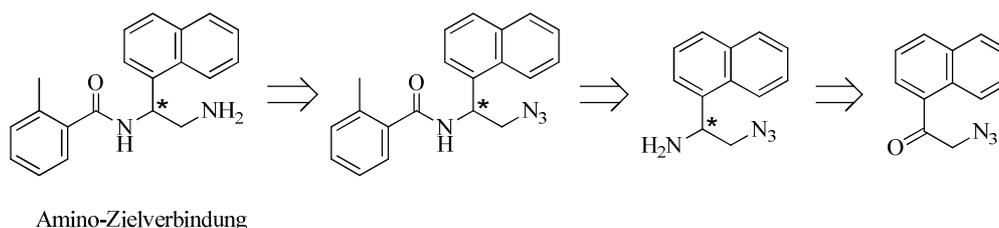
Die polare Hydroxygruppe in der Seitenkette der Amin-Komponente führt also ähnlich wie die unpolare Erweiterung durch eine Ethyl- oder Phenylgruppe (Ghosh et al.^[19]) zu einem Verlust an Affinität. Ein Erklärungsversuch ist, dass in der S4-Tasche an dieser Stelle entgegen computerbasierter Berechnungen kein Platz besteht, um größere Substituenten als Wasserstoff oder Fluor unterzubringen.

Da die Verbindung **61** aber eine gewisse, wenn auch schwache, Affinität zur Bindetasche besitzt und auf Grundlage der Kristallstruktur und Docking genügend Platz für die Hydroxygruppe besteht, soll noch die folgende Diskussion angestellt werden: Die Hydroxygruppe kann sich laut Dockingpose von Abbildung 3-19 in das H-Brückennetzwerk einfügen und erhält damit einen sehr hohen Chemscore von 60.9 (Docking mit Wasser). Vor Ligandbindung ist die Hydroxygruppe des Inhibitors aber bereits von Solvens hydratisiert, sodass die Dehydrationsenthalpie der Hydroxygruppe vermutlich großteils deren Beitrag zur Ligand-Bindungsenthalpie kompensiert. Allerdings sind im Komplex diejenigen Wassermoleküle freigesetzt, die zuvor die Hydroxygruppe solvatisierten (entropischer Vorteil). Doch insgesamt gelingt GOLD die Affinitätsvorhersage trotz Berücksichtigung der Wassermoleküle nicht.

Syntheseversuche zum Amino-Derivat der Verbindung 61

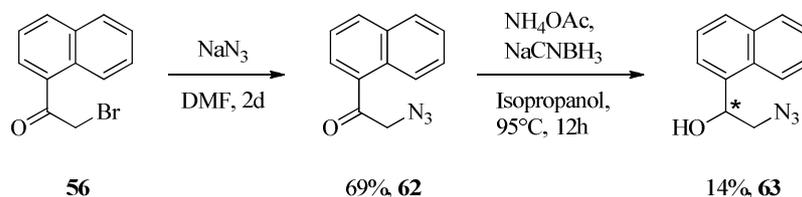
Wie anfangs in Kapitel 3.3.4 erwähnt, sollte eine Aminogruppe in der Seitenkette einen günstigen Effekt auf die Affinität der Inhibitoren mit Benzamid-Struktur haben.

Mit Verbindung **61** war die Synthese der in der Seitenkette hydroxylierten Leitstruktur gelungen und die Derivatisierung zum analogen Aminoderivat ist naheliegend, es steht jedoch nach 6 Stufen nicht genug Substanz zur Verfügung, um die Route ausgehend von **61** linear zu verlängern. Daher wurde retrosynthetisch eine neue Route entworfen, die auf ein Azidoketon zurückführt, das aus noch zur Verfügung stehendem Bromketon **56** synthetisiert werden kann:



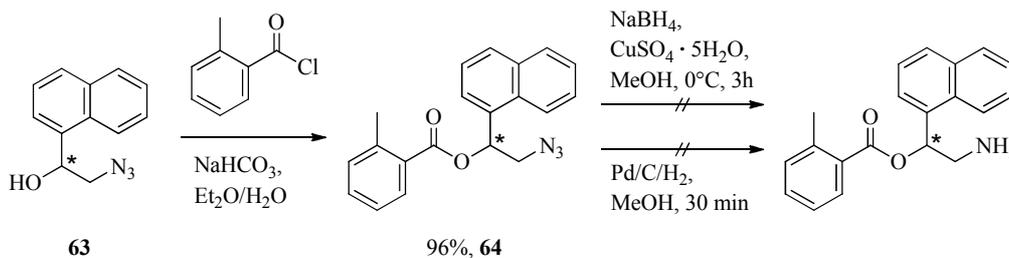
Schema 3-31: Retrosynthese der Amino-Zielverbindung

Im ersten Schritt wird also das Bromketon **56** durch nukleophile Substitution mit NaN_3 in DMF in das 2-Azidoacetanaphthon **62** umgewandelt (Schema 3-32). Die versuchte reduktive Aminierung zum Azidoamin ergab jedoch neben rückgewonnenem Edukt und einigen farbigen Fraktionen lediglich den Azidoalkohol **63** als unerwünschtes Nebenprodukt:



Schema 3-32: Darstellung des Azidoketons **62** und versuchte reduktive Aminierung

Die Synthese wird dennoch mit dem Azidoalkohol **63** fortgeführt, um auf der Stufe des Azidoesters **64** Testreaktionen zur Reduktion von Naphthylalkylaziden durchzuführen:



Schema 3-33: Darstellung des Azidoesters **64** und versuchte Reduktionen

In einem ersten Versuch sollte die Azidgruppe nach Surya und Siva^[124] mit $\text{NaBH}_4/\text{CuSO}_4$ reduziert werden, wobei nur Esterspaltung eintrat und der Azidoalkohol **63** isoliert wurde. Im zweiten Versuch wurde katalytisch mit Pd/C im Autoklav hydriert (15 bar H_2), nach 30 Minuten war bereits kein Edukt mehr im DC zu erkennen. Jedoch ließen sich aus diesem Ansatz keine mittels NMR interpretierbaren Verbindungen isolieren. Die ursprünglich geplante Route wurde an diesem Punkt beendet.

3.4. Indolderivate

Im virtuellen Screening wurden *N*-benzylierte Indolderivate als Naphthyl-Analoga zur Bindung in der S4-Tasche entdeckt. Abbildung 3-20 zeigt den Bindemodus eines entsprechend angepassten Benzamid-Inhibitors mit Indol-Scaffold. Das Indol-Gerüst nimmt dieselbe Position wie das Naphthyl-Gerüst der bisherigen Inhibitoren ein. Die *N*-Benzylgruppe liegt dabei der Protein-Oberfläche auf, jedoch in einer lipophilen Furche zwischen Pro249 und Gly267. Dies ähnelt der Positionierung des Benzophenon-Substituenten von B6 (Imidazol-Inhibitor, s. Kap. 2.5.6). Der Bindemodus des Inhibitors **68** wird mit einem Chemscore von 43.2 relativ gut bewertet.

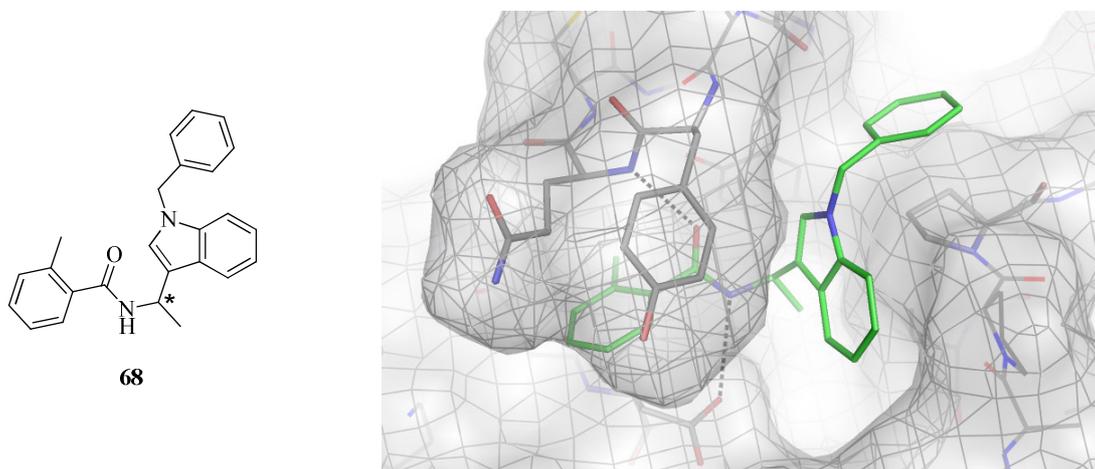
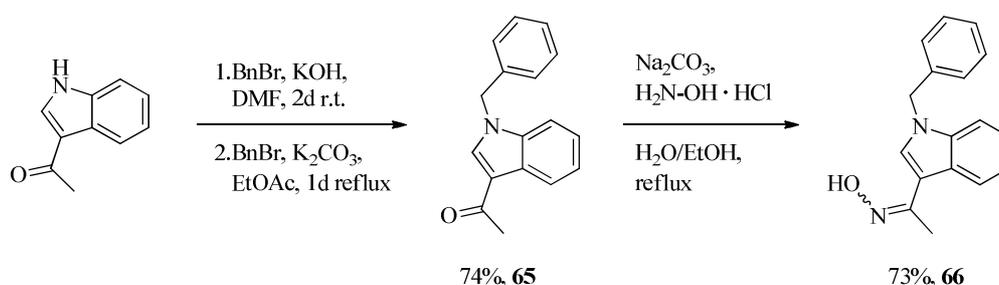


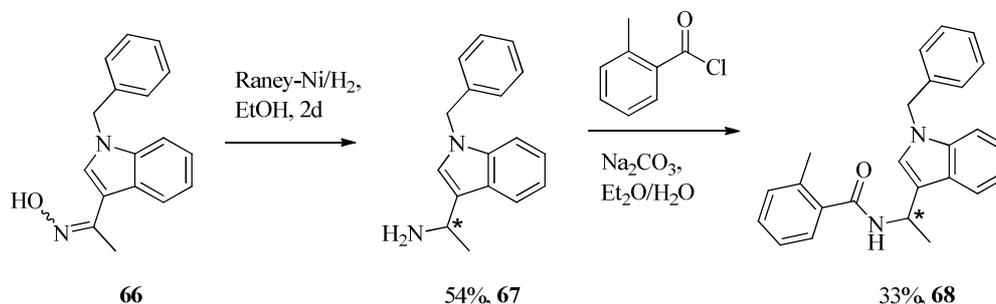
Abb. 3-20: Links: Struktur von Inhibitor **68**. Rechts: Bindemodus des Inhibitors laut Docking.

Zur Synthese von **68** wird zunächst kommerziell erworbenes 3-Acetylindol nach Vorschrift von Corbel et al.^[125] benzyliert. Aufgrund unvollständiger Umsetzung wird nach Isolierung des Produkt-Edukt-Gemischs die Reaktion in siedendem Ethylacetat weitergeführt, sodass das *N*-benzylierte Produkt **65** in guter Ausbeute erhalten wird. Anschließend wurde daraus nach der Vorschrift von Pirkle und Simmons^[109] das Oxim **66** synthetisiert:



Schema 3-34: Darstellung der Verbindungen **65** und **66**

Die Hydrierung des Oxims **66** wird mit dem in Kapitel 3.3.2 erwähnten, selbst hergestellten Raney-Nickel W-7 im Autoklav bei 15 bar H₂-Druck durchgeführt. Aus dem Amin **67** wird schließlich mit 2-Methylbenzoesäurechlorid die Zielverbindung **68** dargestellt.



Schema 3-35: Darstellung des Amins **67** durch Reduktion, dann Umsetzung zur Zielverbindung **68**

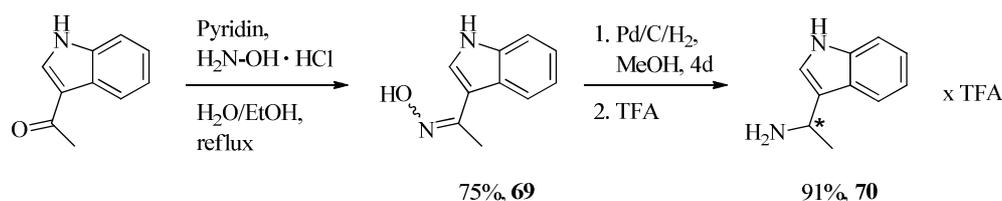
Testergebnis und Diskussion

Die racemische Verbindung **68** erzeugt im Screening an SARS-CoV-PL^{pro} bei 100 µM Inhibitor-Konzentration 50% Enzymhemmung. Ihr IC₅₀-Wert wurde anschließend zu 105 ± 8 µM bestimmt. Das *N*-Benzylindol-Scaffold ist damit entgegen dem Scoring-Ergebnis ein relativ ungünstiger Baustein, um die S4-Tasche zu adressieren.

Versuchte Synthese eines weiteren Indolderivats

Der Inhibitor **68** soll nun ohne *N*-Benzylgruppe am Indol synthetisiert werden, um die Affinität des unsubstituierten Indols zur S4-Tasche herauszufinden. Es ist bekannt, dass eine katalytische Hydrierung der N-C-Bindung von *N*-Benzylindol-Derivaten oftmals schlecht funktioniert, was in dieser Arbeit bei **68** unter Anwendung von Pd/C/H₂ in Methanol bestätigt werden konnte. Watanabe et al.^[126] beschreiben die Debenzylierung *N*-benzylierter Indole durch Anlagerung von AlCl₃ an den Indol-Stickstoff, das Lösemittel Benzol spaltet dann die Benzylgruppe durch nukleophilen Angriff an deren aktivierter Methylengruppe ab, es resultieren Diphenylmethan und der Indol-Aluminiumkomplex. Diese Reaktion ergab mit Verbindung **68** jedoch auch nicht das debenzylierte Indolderivat.

Daher wurde die Route bei 3-Acetylindol neu begonnen und daraus das Oxim **69** synthetisiert, diesmal nach der Vorschrift von Lehr^[107] mit Pyridin, da dort ein vergleichbares, am Indol-Stickstoff unsubstituiertes 3-Acylindol-Derivat in sein Oxim verwandelt wurde. Die Reduktion des Oxims **69** zum Amin **70** wurde im Autoklav mit Pd/C unter 15 bar H₂ erzielt:



Schema 3-36: Darstellung des Oxims **69**, dann Reduktion zum Amin **70**

Die weitere Umsetzung von **70** mit einem Überschuss 2-Methylbenzoesäurechlorid (Schotten-Baumann-Reaktion) und anschließende alkalische Hydrolyse des möglicherweise gebildeten Acyl-Indols ergaben nicht das erwünschte Benzamid. Stattdessen wurde mittels LC-MS dem Hauptprodukt die Masse 272.4 [M+H]⁺ zugewiesen (Masse des erwünschten Produkts: 278.1). Die Route wurde nicht weiter fortgesetzt.

3.5. Naphthylessigsäureamide und 2-Naphth-1-ylpropansäureamide

Im virtuellen Screening (Kap. 2.5.5 und 2.5.6) wurden zahlreiche Verbindungen vom Anilid-Typ (= „reverses Amid“, s. Abb. 3-21) mit guten Bindemodi gefunden, von denen auch fünf (B14, B19, B20, B21, B23) kommerziell verfügbar waren. Diese zeigten jedoch keine inhibitorische Aktivität.

Um in der Substanzklasse der „reversen Amide“ systematisch nach affinen Verbindungen zu suchen, sind die Verbindungen dieses Kapitels näher an der ursprünglichen Benzamid-Leitstruktur belassen. In der S4-Tasche bindet also die bekannte Naphthylgruppe, die über einen Essigsäure-Spacer an den in der S3-Tasche bindenden Molekülteil angeknüpft ist.

Der Leitstruktur **2** am ähnlichsten sind die 2-Naphth-1-ylpropansäureamide wie Verbindung **84**, da diese am entsprechenden Hotspot in der S4-Tasche die Methylgruppe ihrer Seitenkette positionieren. Die Adressierung dieses Hotspots führte bisher bei zu großem Substituent zum Verlust der Affinität, daher ist es theoretisch denkbar, dass die „reversen Amide“ mit ihren eigenen, unbekanntem Struktur-Wirkungsbeziehungen keine Methylgruppe an dieser Position haben dürfen. Es werden daher zunächst die unsubstituierten Naphthylessigsäureamide **72** - **80** dargestellt.

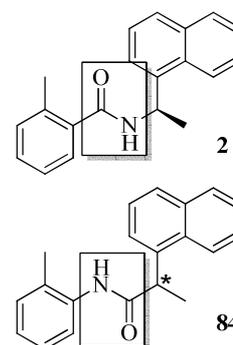
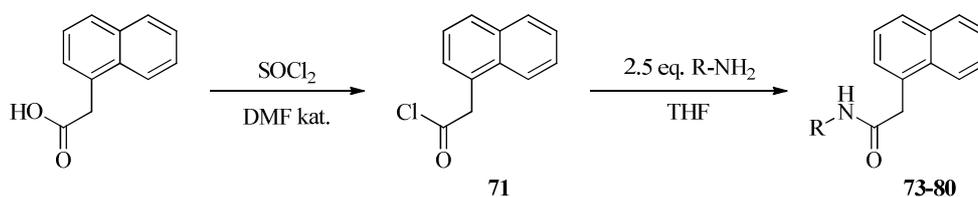


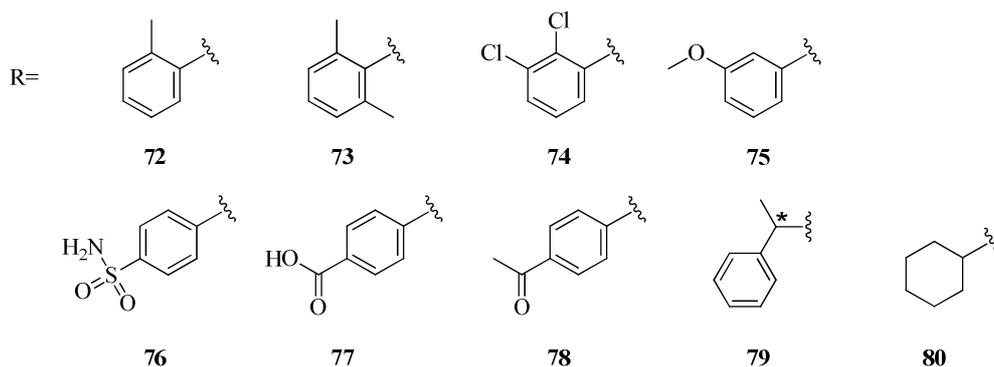
Abb. 3-21: Amid und „reverses Amid“

In der S3-Tasche soll durch Substituenten in 2-Position der Anilin-Komponente der lipophile Methyl-Hotspot adressiert werden. Dieser Substituent sollte darüberhinaus die Torsion des Amids für die benötigte Bindekonformation begünstigen (intramolekulare Repulsion; wie auch bei den Benzamiden vermutet). Allerdings ist vom Acetanilid bekannt, dass die Ebene des Amids nicht coplanar zum Anilin-Aromaten liegt, sondern gedreht um etwa 50-60° (Diederwinkel), wobei je nach experimenteller Bestimmungsmethode auch andere Winkel gemessen wurden^[127]. Diese Torsion zum Erreichen der Bindekonformation sollte daher bei den Aniliden kein Problem darstellen. Mit den 2,6-Dimethyl-substituierten Anilinderivaten **73** und **85** wird die Bindekonformation dann sogar durch zwei *o*-Methylgruppen erzwungen. Die Anilinderivate mit Substituenten in 4-Position der Anilin-Komponente sollen Interaktionen zu Gln270, einem gebundenen Wassermolekül bei Lys158 oder zu Leu163 ermöglichen.

Synthese von Amid der Naphthylessigsäure

Naphthylessigsäure wird mit Thionylchlorid in ihr Säurechlorid **71** überführt und daraus die in Schema 3-37 abgebildeten Amide synthetisiert. Das Amid **72** wurde über Kupplung mit DCC dargestellt.

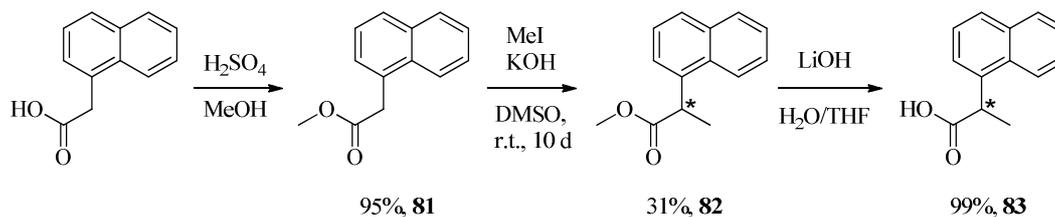




Schema 3-37: Synthese und Übersicht zu den Naphthylessigsäureamiden **72-80**

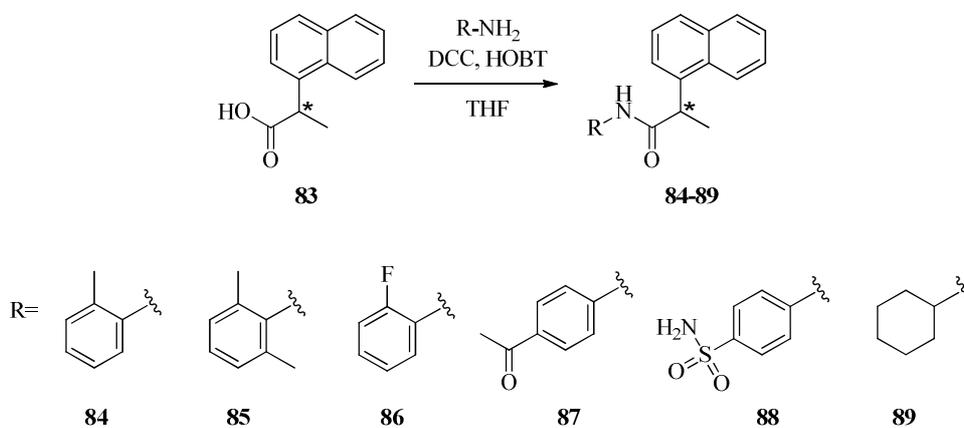
Synthese von Amiden der 2-Naphth-1-ylpropansäure

Zunächst wird die Säure-Komponente 2-Naphth-1-ylpropansäure synthetisiert, um im Anschluss die geplanten Amide darstellen zu können. Naphthylessigsäure wird dazu in ihren Methylester **81** überführt und anschließend mit Methyljodid alkyliert (Schema 3-38). Die Ausbeute der Reaktion lag zwischen 60-70%, es konnten jedoch wegen ähnlichen Retentionsverhaltens von Edukt und Produkt an Kieselgel nur 31% Produkt sauber isoliert werden. Anschließende Verseifung liefert die freie Säure **83**:



Schema 3-38: Darstellung der 2-Naphth-1-ylpropansäure (Verbindung **83**)

Die weitere Umsetzung von **83** geschieht nach Aktivierung durch DCC/HOBT mit verschiedenen Aminen zu den in Schema 3-39 abgebildeten Amiden **84-89**:



Schema 3-39: Darstellung der 2-Naphth-1-ylpropansäureamide **84-89**

Synthese von Verbindung 94: Computergeleitete Erhöhung der polaren Interaktionen

Die Kombination der substituierten Anilin-Aromaten von Verbindung **84** und **88** soll zu einer neuen Verbindung (**94**) führen, die sowohl am Anilin die 2-Methylgruppe besitzt als auch eine 4-Aminosulfongruppe. Letztere könnte drei H-Brücken zu Leu163, Lys158 und der Loop-Aminosäure Gln270 ausbilden (s. Abb. 3-22). Es wurde eine Propylaminosulfon-Substitution gewählt, da sich die Propylkette im Docking den Methylengruppen von Gln270 „anschiebt“ und damit weitere, wasserzugängliche Enzymoberfläche minimiert. In der gezeigten Ligandpose von Abbildung 3-22 wurde **94** von GOLD so positioniert, dass die 2-Methylgruppe nicht in die S3-Tasche zeigt und Loop-Gln270 keine H-Brücke zum oberen Sulfon-Sauerstoff ausbildet. Die Score-Werte sind mit Chemscore = 45.9 und ChemPLP = 92.7 sehr gut.

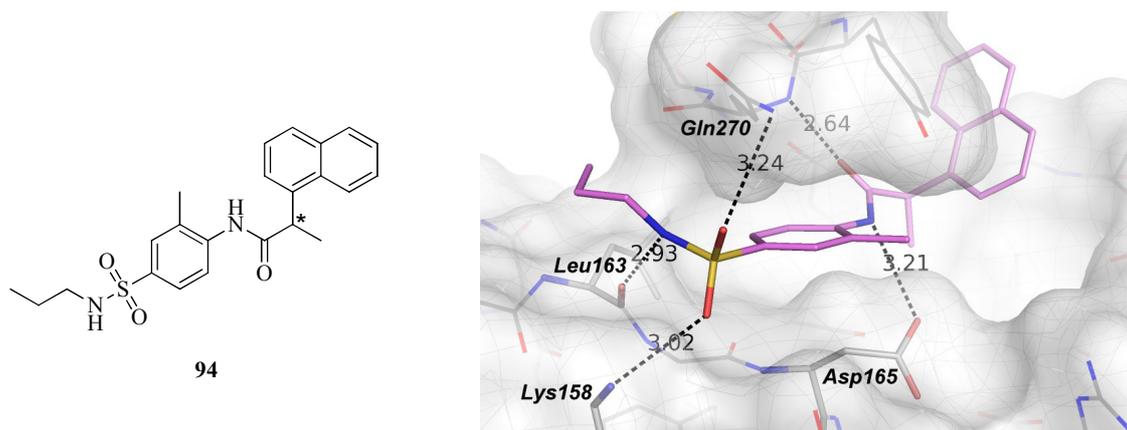
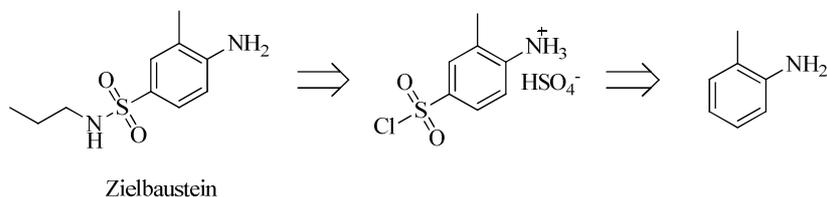


Abb 3-22: Links: Struktur der Zielverbindung **94**. Rechts: Möglicher Bindemodus von **94** laut Docking.

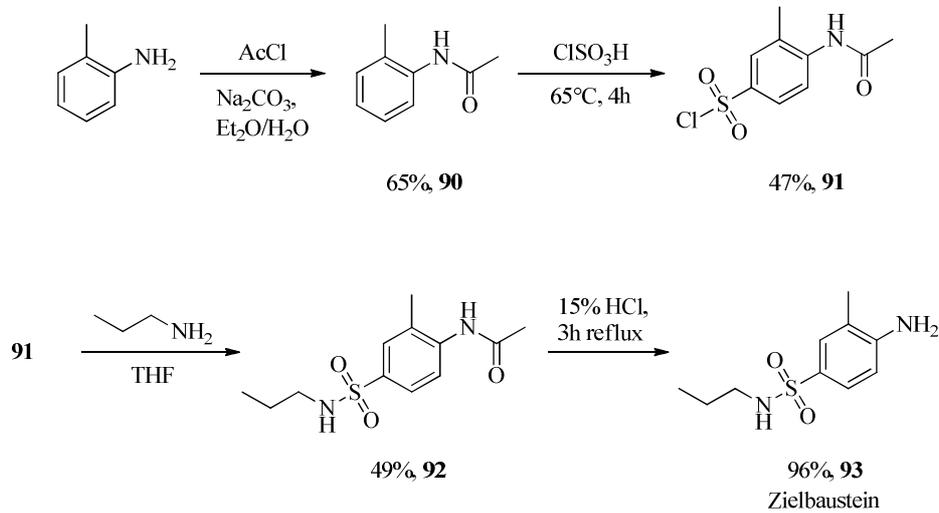
Zur Synthese von Verbindung **94** wird der Anilin-Zielbaustein aus Schema 3-40 benötigt. Dessen mögliche Retrosynthese führt zu *o*-Toluidin als Startmaterial. Ausgehend vom *o*-Toluidin sollte die Chlorsulfonierung das angegebene Anilinium-Salz erzeugen. Zwischenzeitlich wird mit der aromatischen Aminogruppe ein Hydrochlorid gebildet, doch die bei der Reaktion gebildete konz. Schwefelsäure vertreibt die Salzsäure aus ihrem Salz und es bildet sich das Hydrogensulfat. Falls das Anilinium-Salz bei der wässrigen Aufarbeitung präzipitiert, könnte man es abtrennen und anschließend im Überschuss Propylamin zur Neutralform deprotonieren, sowie das Propylaminosulfon erhalten.



Schema 3-40: Retrosynthese des Zielbausteins

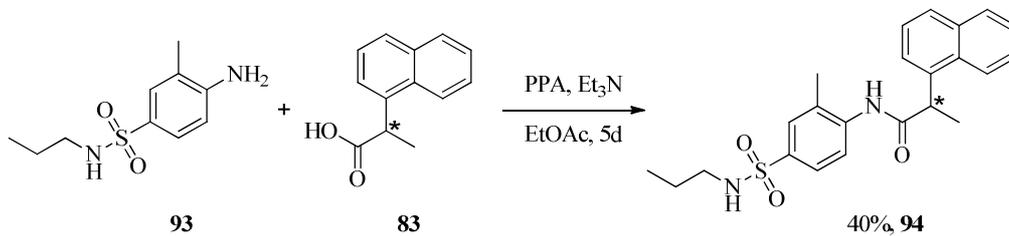
Bei der so geplanten Synthese können sich zwei Probleme ergeben: Das Anilinium-Salz präzipitiert nicht in Wasser, sondern bleibt ionisch in Lösung. Dann besteht keine Möglichkeit der Isolierung. Das andere Problem stellt die Sulfonamid-Bildung dar: Sobald der Anilinium-Stickstoff zum Anilin deprotoniert wird, existiert ein weiteres Nukleophil und kann zu Propylamin in Konkurrenz treten.

Aus diesen Gründen wird die geplante Synthese um eine Schutzfunktion (*N*-Acetyl) am aromatischen Amin erweitert. Die Route zum Zielbaustein beginnt dann mit der Acetylierung von *o*-Toluidin zu **90**, dessen Chlorsulfonierung **91** liefert, das nach Reaktion mit Propylamin Aminosulfon **92** ergibt. Anschließend wird die *N*-Acetylgruppe durch salzsaures Verkochen abgespalten und man erhält den Zielbaustein **93**:



Schema 3-41: Darstellung des Zielbausteins **93**

Nun kann der fertige Zielbaustein **93** mit 2-Naphth-1-ylpropansäure **83** zur Amid-Endstufe **94** verknüpft werden:



Schema 3-42: Darstellung des 2-Naphth-1-ylpropansäureamids **94**

Testergebnisse und Diskussion

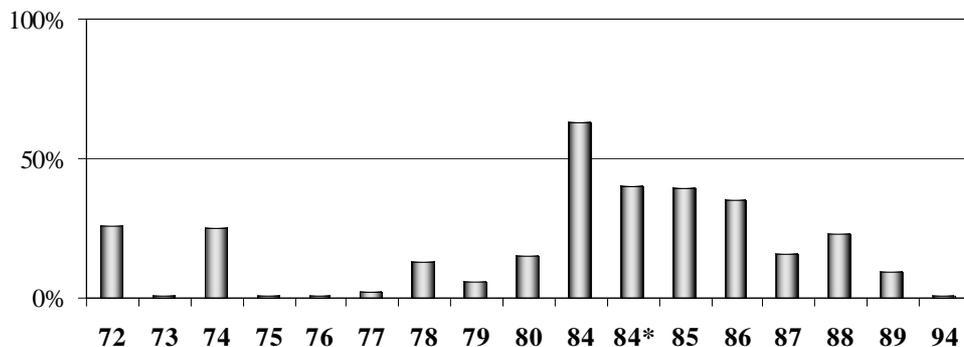


Abb. 3-23: Übersicht über die Enzymhemmung (%) an SARS-CoV-PL^{pro} bei 100 µM Substanzkonzentration.

84*: Assay mit Verbindung **84** und zusätzlicher Zugabe von 0.005% Brij 35.

Die Naphthylessigsäureamide **72** - **80** besitzen keine inhibitorische Aktivität an der SARS-PL^{pro} (s. Abb. 3-23).

Die Verbindungen **84**, **85** und **86** zeigen dagegen eine schwache Enzyminhibition von 35% bis 63% bei 100 μM Substanzkonzentration. Es sind Naphthylpropansäureamide, die in Position 2 des Anilins einen Substituenten tragen. Demnach hat es den Anschein, dass die Struktur-Wirkungsbeziehungen der Benzamide auch auf diese Substanzklasse zutreffen: Es ist je ein Substituent am Hotspot der S3- und der S4-Bindetasche nötig. Dagegen zeigt die laut Docking beste Verbindung **94** jedoch keine Hemmung! Von der aktivsten Verbindung dieser Serie (**84**) wurden IC₅₀-Bestimmungen durchgeführt, um deren Hemmwirkung näher zu untersuchen:

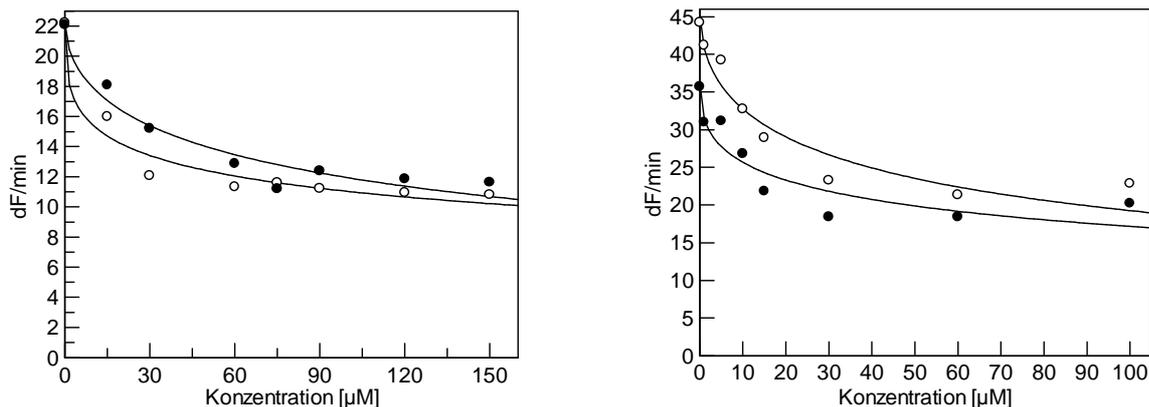


Abb. 3-24: Links: Enzymhemmung durch Verbindung **84**, zwei Messreihen. Die an die Messwerte gefitteten Kurven ergäben IC₅₀-Werte von $95 \pm 32 \mu\text{M}$ und $130 \pm 30 \mu\text{M}$.

Rechts: Enzymhemmung durch **84** unter Zusatz von 0.005% Brij 35: Die Enzymhemmung wird von Brij nicht verhindert.

Die Enzymhemmung durch Verbindung **84** zeigt in beiden Diagrammen zwischen 30 und 60 μM ein Plateau mit ca. 50% Hemmung, die weitere Konzentrationserhöhung führt zu keiner stärkeren Hemmung (s. Abb. 3-24). Das rechte Diagramm zeigt, dass unter Zusatz von 0.005% Brij 35 die Hemmwirkung nicht verändert wird. Demnach könnte man annehmen, dass die Verbindung *nicht* als Aggregator ein falsch-positives Hemmergebnis liefert, sondern tatsächlich durch Ligandbindung das Enzym inhibiert. Das in beiden Fällen beobachtete Plateau ließe sich erklären, wenn **84** im Assaypuffer eine Sättigungskonzentration von 30 - 60 μM besitzen würde. Außerdem wäre die Verbindung einigermaßen affin, da die Enzymaktivität zwischen 30 - 60 μM **84** auf die Hälfte abgesenkt wird – die berechneten Hemmkurven (Abb. 3-24) besitzen wegen des Plateaus keine Aussagekraft. Um dieses Plateau aufgrund von Substanzsättigung erklären zu können, wurde die Löslichkeit von **84** in Assaypuffer (+ 10% DMSO, Assaybedingungen) untersucht:

Die Sättigungskonzentration lässt sich bestimmen, indem man den Fällungsvorgang durch Konzentrationserhöhung beobachtet. In einer Glasküvette wird hierzu Assaypuffer mit 10% DMSO vorgelegt und der Inhibitor in DMSO zupipettiert. Zunächst führt dies zu einer lokalen Fällung, die sich unterhalb der Sättigungskonzentration durch Mischen wieder auflöst. Die Trübung ist gut erkennbar, indem die Felder A-B-A (s. Abb. 3-25) gegen dunklen Hintergrund verglichen werden. Eine Verdünnungsreihe von 1 - 10 μM ergab, dass **84** ab 8 μM eine permanente Trübung erzeugt, die Verbindung ist damit in Assaypuffer (+ 10% DMSO) schlecht löslich und präzipitiert schon weit unterhalb des zuvor vermuteten Sättigungsplateaus. Die Wiederholung des Versuchs unter Anwesenheit von 0.005% Brij 35 hatte keinen Einfluss auf die Löslichkeit.

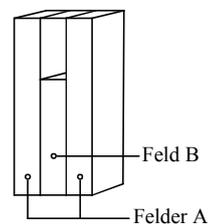


Abb. 3-25: Glasküvette 0.5 ml
Feld A: Glas massiv
Feld B: Prüflösung

Nachdem die Löslichkeitsgrenze von **84** also nicht mit dem im Assay beobachteten Plateau zusammenfällt, muss davon ausgegangen werden, dass die Verbindung durch unspezifische Aggregation von Präzipitat und Enzym diese Hemmung verursacht. Die Zugabe des oberflächenaktiven Brij 35 konnte die Adsorption von Enzym an Präzipitat nicht verhindern, sodass ohne genauerer Untersuchung die *falsche* Annahme gemacht worden wäre, dass die Enzymhemmung nicht auf Aggregation beruht.

Dass Verbindung **84** keine Affinität besitzt, steht wiederum im Einklang mit der fehlenden Hemmung der polareren Verbindung **94**, die unter den Bedingungen nicht präzipitiert. Abschließend sind damit die Substanzklassen der Naphthylessig- und Naphthylpropansäureamide als nicht inhibitorisch wirksam an SARS-CoV-PL^{pro} zu bewerten. Ob von einer generellen Inaktivität des „reversen Amid“-Kernfragments auszugehen ist, sollen die folgenden Verbindungen in Kapitel 3.6 und 3.7 mit verschiedenen Säure- und Amin-Komponenten am „reversen Amid“ zeigen.

3.6. Diphenylpropanamide

Beim virtuellen Screening der Zinc-drug-like-Datenbank wurden Liganden gefunden, die in der S4-Bindetasche mit einer Diphenylgruppe binden. Diese Gruppe ist dann über einen Propansäureamid-Spacer mit dem Rest des Moleküls verknüpft. Das Diphenylpropanamid-Scaffold zeigt in Abbildung 3-26 die gute Oberflächenkomplementarität zur S4-Bindetasche (Chemscore: 42.1):

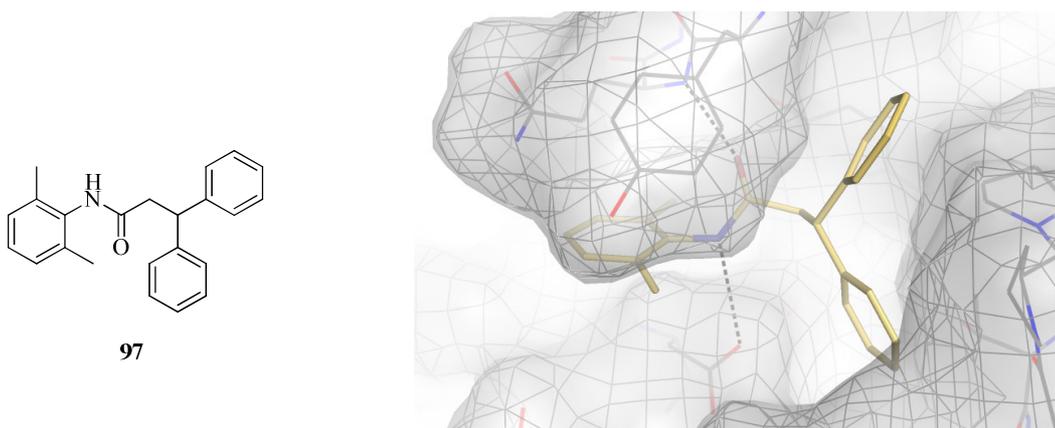
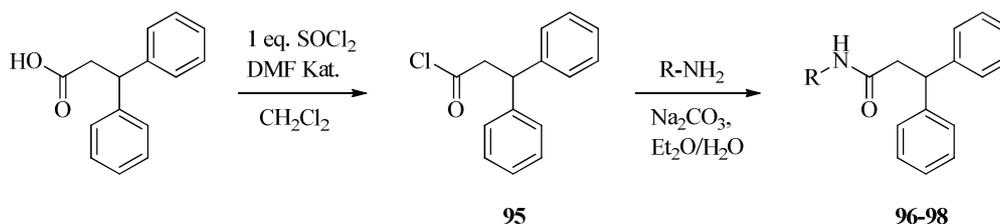
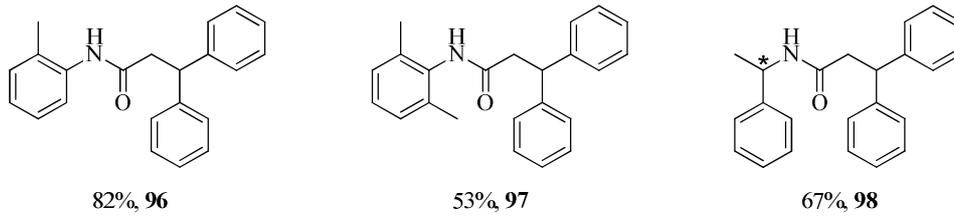


Abb. 3-26: Links: Strukturformel von Verbindung **97**. Rechts: Bindemodus laut Docking, keine Berücksichtigung gebundenen Wassers.

Verbindung **96** und **97** sollen wie in Abbildung 3-26 an die Proteinstruktur 3E9S binden, wohingegen mit Verbindung **98** ein Molekül zur Adressierung der „geflippten“ Loop-Konformation von 3MJ5 entwickelt wurde.

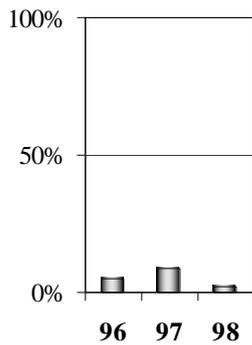
Zur Synthese wird die 3,3-Diphenylpropansäure in Dichlormethan mit äquimolarer Menge Thionylchlorid in ihr Säurechlorid **95** verwandelt und anschließend Lösungen der entsprechenden Amine zugesetzt:





Schema 3-43: Darstellung der Diphenylpropanamide **96-98**

Testergebnisse und Diskussion



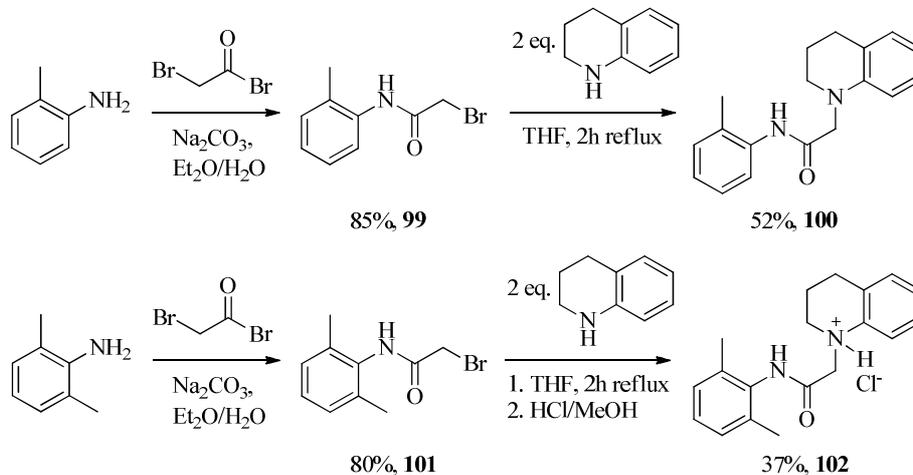
Keines der Diphenylpropanamide führt zu einer Enzymhemmung. Damit besitzen die „reversen Amide“ in Kombination mit dem Diphenyl-Scaffold entgegen der Bewertung im Docking keine nennenswerte Affinität zur Bindetasche.

Abb. 3-27: Screening an SARS-CoV-PI^{pro} (100 μM)

3.7. Tetrahydrochinolinderivate

Wie die Substanzklasse des vorherigen Kapitels, wurden auch Tetrahydrochinolin-Derivate im virtuellen Screening als potenzielle Liganden gefunden. Ihr Tetrahydrochinolin bindet dabei wie die Naphthylgruppe in der S4-Tasche des Enzyms. Das Ringsystem ist über einen Acetamid-Spacer mit dem in der S3-Tasche bindenden Aromaten verknüpft. Als Anilin-Komponente wird wie in den vorherigen Kapiteln das *o*-Toluidin und 2,6-Dimethylanilin eingesetzt.

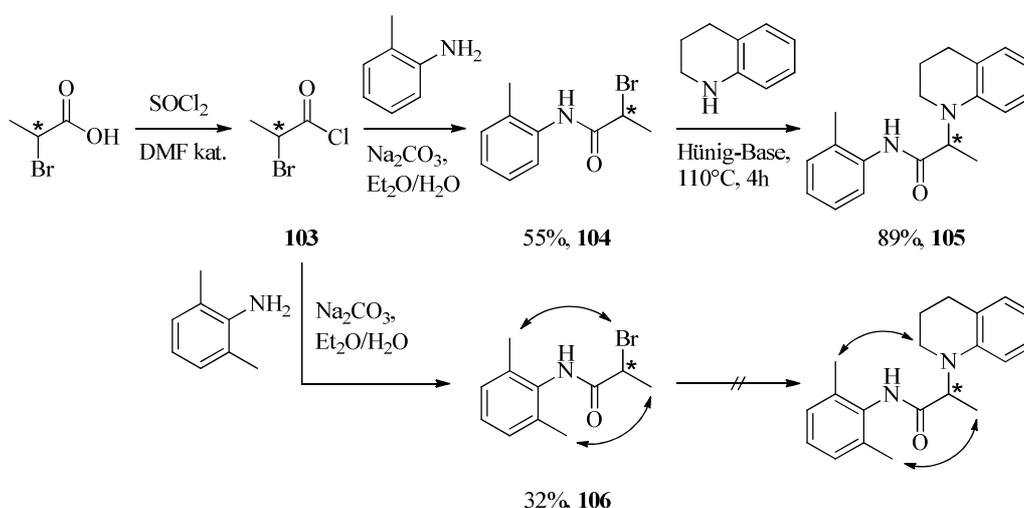
Es werden mit 2-Bromessigsäurebromid die Verbindungen **99** und **101** erhalten, die über eine nukleophile Substitution Tetrahydrochinolin alkylieren und die potenziellen Liganden **100** und **102** liefern:



Schema 3-44: Routen zu den Verbindungen **100** und **102**

Analog zu den bisherigen Überlegungen hinsichtlich der Notwendigkeit einer Methylgruppe zur Adressierung des Methyl-Hotspots in der S4-Bindetasche – bzw. zur konformellen Stabilisierung des Ringgerüsts – sollen auch hier Liganden mit dieser Methylgruppe dargestellt werden.

Dazu wird die 2-Brompropansäure mit Thionylchlorid zum Säurechlorid **103** aktiviert und mit den Anilinderivaten zu den 2-Bromamiden **104** und **106** umgesetzt (Schema 3-45). Das einfach Methyl-substituierte **104** zeigte bereits ausgeprägte Reaktionsträgheit bei der nukleophilen Substitution von Bromid durch Tetrahydrochinolin und konnte nur unter deutlich erhöhter Temperatur (Ölbad, 110 °C) zur Reaktion gebracht werden. Das zweifach Methyl-substituierte **106** zeigte sich jedoch unter diesen Bedingungen gegenüber Tetrahydrochinolin geradezu inert. Eine Erklärung der beobachteten Reaktionsträgheit von **104** und der ausbleibenden Reaktion bei **106** kann die sterische Abschirmung des elektrophilen, Brom-substituierten Kohlenstoffs sein. Im Reaktionsschema sind die sich intramolekular nahe stehenden Atome zur Verdeutlichung mit Pfeilen gekennzeichnet:



Schema 3-45: Route zu Verbindung **105** und Kennzeichnung der sich intramolekular nahe stehenden Atome bei **106**

In Abbildung 3-28 ist das Kugel-Stäbchen-Modell des 2-Bromamids **106** nach Energieminimierung mit MOE (Kraftfeld TAFF) gezeigt. Je nach Konformation wird das elektrophile Zentrum sterisch von einer aromatischen Methylgruppe, von der endständigen, aliphatischen Methylgruppe, oder dem Carbonyl-Sauerstoff abgeschirmt: Die S_{N2} -Reaktion mit dem räumlich anspruchsvollen Tetrahydrochinolin war nicht möglich.

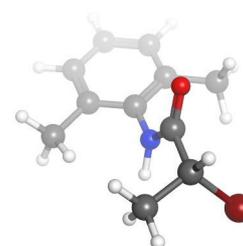
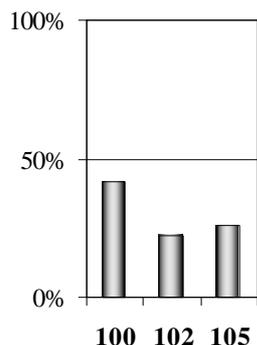


Abb. 3-28: Konformation von **106**

Testergebnisse und Diskussion



Von den „reversen Amid“ mit alkyliertem Tetrahydrochinolin-Scaffold lässt Verbindung **100** mit 42% Enzymhemmung bei 100 μ M eine schwache inhibitorische Aktivität vermuten.

Abb. 3-29: Ergebnis des Screenings an SARS-CoV-PI^{pro} (100 μ M)

3.8. Sulfonamide

Die Substanzklasse der Sulfonamide wurde beim virtuellen Screening der Zinc-drug-like-Datenbank gefunden: Beim Filtern der Ligandposen mit Pharmakophoren fiel die eigenartige H-Brücken-Interaktion beider Sulfon-Sauerstoffatome zu Tyr265, Gln270, Tyr274 und des aciden NH-Protons zu Asp165 auf (s. Abb. 3-30).

Es wurden daher Sulfonamid-Liganden modelliert, die in ihren die S3- und S4-Tasche adressierenden Gruppen den Inhibitoren vom Benzamid-Typ möglichst nahe kommen. Die modellierten Sulfonamide wurden gedockt und diejenigen mit hohem Score-Wert synthetisiert. In Abbildung 3-30 ist eines der entworfenen und synthetisierten Sulfonamide dargestellt, dieses bildet außerdem eine H-Brücke zu Glu168 aus und erzielt einen Chemscore von 43:

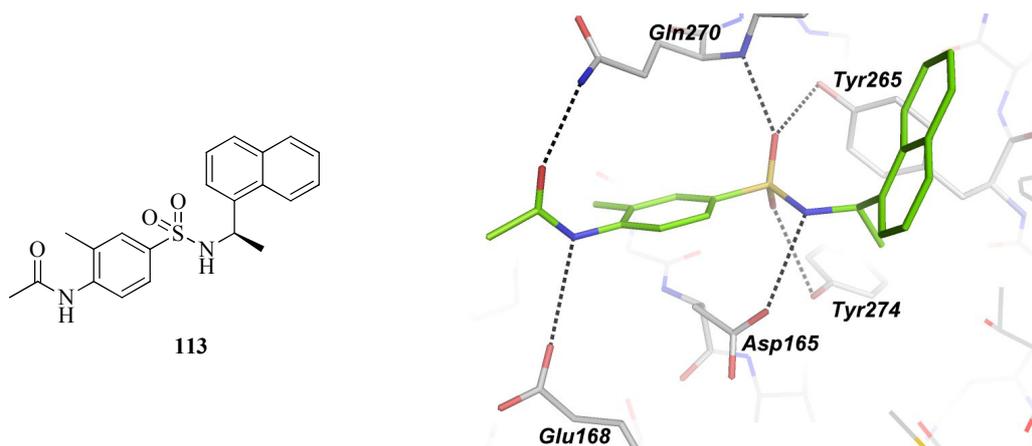
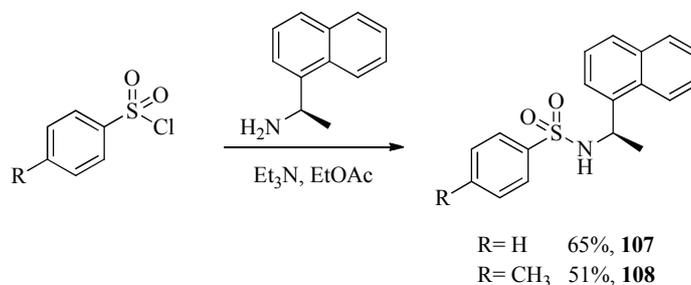


Abb. 3-30: Links: Strukturformel von Verbindung 113. Rechts: Bindemodus laut Docking.

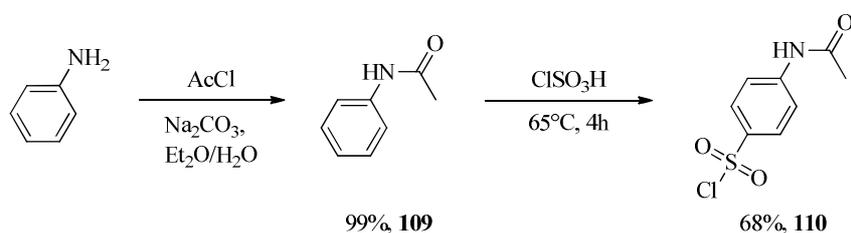
Als erstes werden die Sulfonamide **107** und **108** aus den entsprechenden Sulfonsäurechloriden synthetisiert:

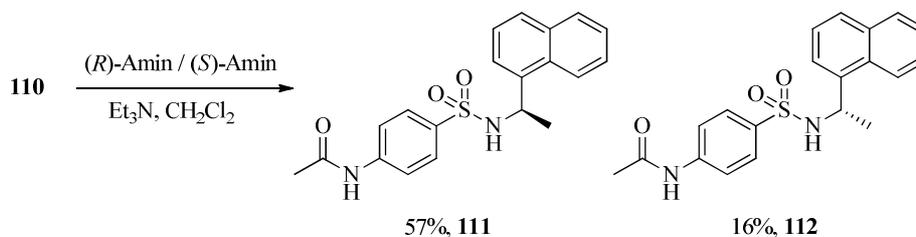


Schema 3-46: Darstellung der Sulfonamide **107** und **108** aus ihren kommerziell verfügbaren Sulfonylchloriden

Laut Docking ist eine Acetylamino-Substitution in *para*-Position zum Sulfon günstig (s. Abb. 3-30), so werden H-Brücken zu den naheliegenden Aminosäuren Lys158, Glu168 und Gln270 denkbar.

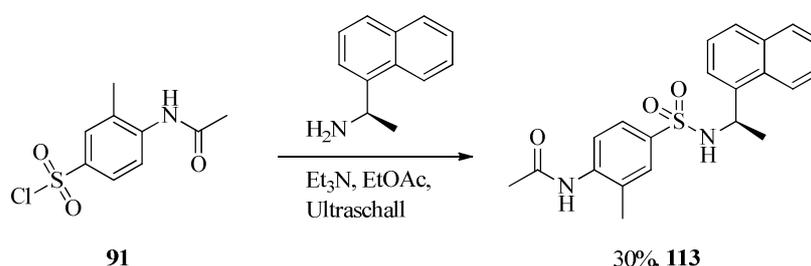
Zunächst werden die beiden Enantiomere **111** und **112** mit dieser *p*-Acetylamino-Substitution synthetisiert:





Schema 3-47: Route zu den beiden 4-Acetylamino-substituierten Enantiomeren **111** und **112**

Die Überlegung, mittels benachbarter Methylgruppe die zur Ausbildung der H-Brücke nötige Rotation des *p*-Acetylamino-Substituenten zu erleichtern (intramolekulare Repulsion), wurde mit Verbindung **113** umgesetzt. Das benötigte Chlorsulfon **91** ist bereits von Kapitel 3.5 bekannt:



Schema 3-48: Darstellung des Sulfonamids **113**

Aufgrund des zu den Benzamid-Inhibitoren leicht veränderten Bindemodus der Sulfonamide – vor allem der Phenylsulfon-Aromat zur Adressierung der S3-Tasche liegt anders positioniert in dieser – wurde bisher auf die 2-Methylgruppe verzichtet. Von strukturbasierter Seite würde diese 2-Methylgruppe den Hotspot in der S3-Tasche auch nicht adressieren, die 2-Position des Phenylsulfons zeigt eher Richtung Leu163.

Bei ligandbasierter Herangehensweise wird diese Struktur-Wirkungsbeziehung der 2-Methylgruppe von den Benzamid-Inhibitoren einfach auf die Sulfonamide übertragen und daher ebenso die Methylgruppe in 2-Position angebracht. Außerdem wird eine weitere „Strukturverbesserung“ am Phenylsulfon-Aromat vorgenommen: Durch ein anneliertes Lactam sollen H-Brücken zu Leu163, Lys158 und der Loop-Aminosäure Gln270 möglich werden. Beim gezeigten Bindemodus von **116** in Abbildung 3-30 ist der Abstand zum Carboxamid von Gln270 mit 3.7 Å allerdings für eine H-Brücke zu groß:

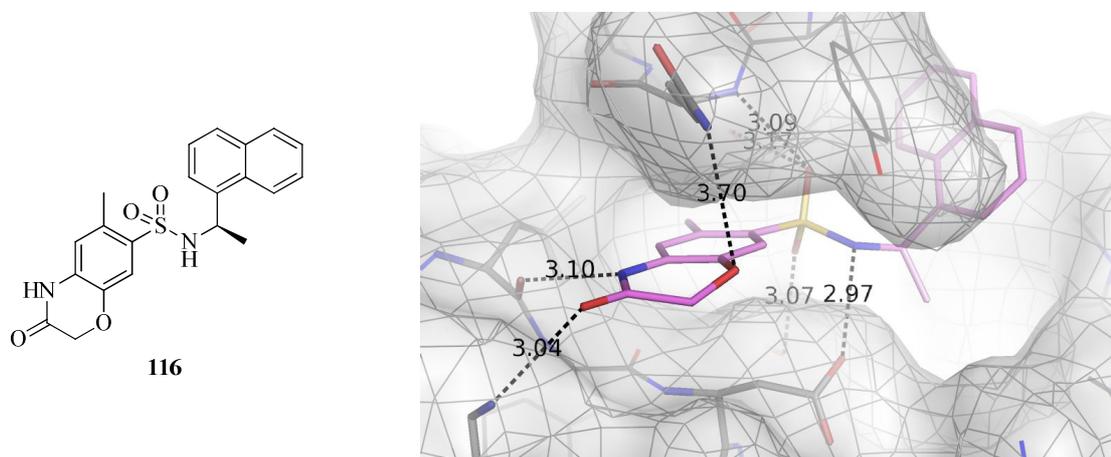
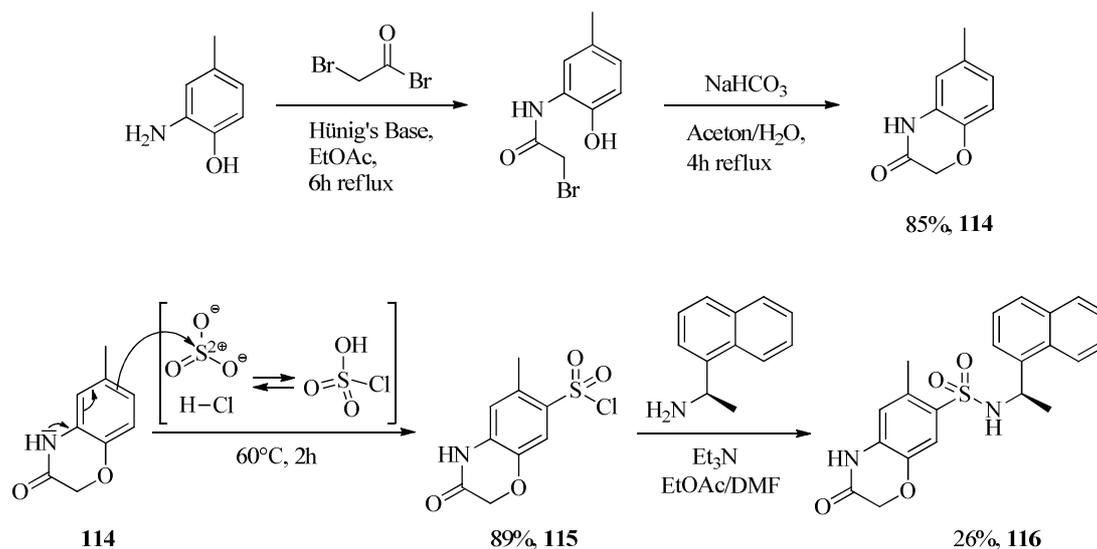


Abb. 3-30: Links: Strukturformel von Verbindung **116**. Rechts: Bindemodus laut Docking. (Chemscore der gezeigten Ligandpose: 41.2)

Der Schlüsselschritt in der Synthese der Zielverbindung **116** ist die Chlorsulfonierung des Benzoxazinons **114**. Das Benzoxazinon **114** wird in Anlehnung an eine Vorschrift von Wantoch-Rekowski et al.^[128] hergestellt und anschließend chlorsulfoliert: Nachdem ausgehend vom Sauerstoff in Verbindung **114** die *para*-Position von der Methylgruppe blockiert ist, setzte sich bei der Reaktion die nach *para* dirigierende Acyl-NH-Gruppe durch, ohne dass *ortho*-Substitution neben dem Phenoether beobachtet wird. So wird Sulfonylchlorid **115** wie erwünscht erhalten, die weitere Umsetzung mit der Amin-Komponente liefert dann die Sulfonamid-Zielverbindung **116**:



Schema 3-49: Darstellung des Benzoxazinon **114**, dessen Chlorsulfonierung zu **115**, Reaktion zu **116**

Testergebnisse und Diskussion

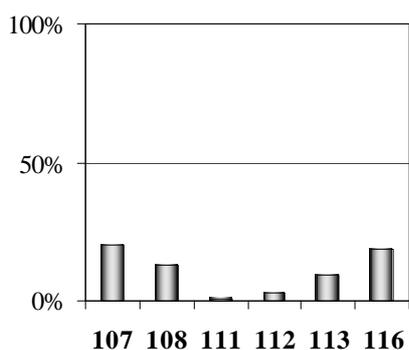


Abb. 3-31: Ergebnis des Screenings an SARS-CoV-PI^{pro} (100 µM)

Keines der dargestellten Sulfonamide zeigt eine relevante Enzymhemmung an der SARS-CoV-PL^{pro}. Der Widerspruch von Praxis und Theorie laut Docking kann bei dieser Substanzklasse mehrere Ursachen haben: Die im Docking angenommene und für die Bindung nötige Konformation könnte zu einer zu hohen Spannungsenergie führen. Auch könnte der Raumbedarf des tetraedrischen Sulfonamids bei einer von der Dockinpose abweichenden Konformation so groß sein, dass das Sulfonamid nicht zwischen Loop und Asp165 platzierbar ist. Andererseits ist der Loop flexibel und sollte zumindest nach oben ausweichen können, um in diese Richtung zusätzlichen Raum freizugeben. Eine weitere Ursache für die fehlende Affinität kann die starke Hydratisierung der polaren Sulfonamidgruppe sein: die Anzahl und Stärke der zum Protein gebildeten H-Brücken ist möglicherweise niedriger, als im solvatisierten Zustand.

3.9. Isoindoline und davon abgeleitete Amine

3.9.1. Überlegungen zur 2-Methyl-Substitution und Molekülflexibilität

Bei den Inhibitoren vom Benzamid-Typ wurde die Substitution in Position 2 der Benzoesäure als wichtiges Strukturelement zur Affinitätssteigerung erachtet. Die 2-Methylgruppe adressiert zum einen den von GRID als Hotspot erkannten, energetisch günstigen Bereich in der S3-Tasche (Kap. 2.3). Zum andern kann angenommen werden, dass räumlich anspruchsvolle *ortho*-Substituenten die Bindekonformation begünstigen: die Carboxamid-Gruppe ist bereits im Energieminimum aufgrund intramolekularer Abstoßung aus der Aromatenebene gedreht, sodass die bei Ligandbindung aufzubringende Torsionsenthalpie geringer ausfällt (Rotationsbarriere beim unsubstituierten Benzamid: 2.9 kcal/mol^[129]). Eine 2,6-Dimethyl-Substitution führt im organischen Kristall beispielsweise zu einem Diederwinkel von 64° zwischen Aromat und Estergruppe (bei 4-Methoxy-2,6-dimethylbenzoesäuremethylester, Mugnoli et al.^[130]). Es stellt sich demnach die Frage, ob die lipophile Wechselwirkung von *ortho*-Substituenten mit dem Hotspot in der S3-Tasche überhaupt von Bedeutung ist.

Um die Funktion der 2-Methylgruppe hinsichtlich einer eventuellen „konformellen Stabilisierung“ näher zu untersuchen, wurde ein HH-NOESY-NMR-Spektrum von Verbindung **2** in DMSO-*d*₆ bei Raumtemperatur aufgenommen (s. Abb. 3-32). Es zeigt keine Bevorzugung bestimmter Konformationen: Sämtliche Kreuzpeaks der 2-Methylgruppe zu anderen Protonen im Molekül weisen auf intramolekulare Rotationen hin. Auf Grundlage des NOESY-Spektrums kann demnach von keiner „konformellen Stabilisierung“ durch die 2-Methylgruppe gesprochen werden.

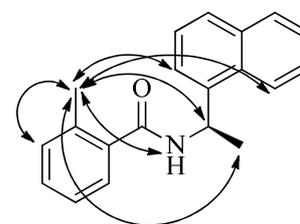


Abb. 3-32: Kopplungen der Methylgruppe im NOESY-Spektrum

In einem weiteren Ansatz soll die lipophile Wechselwirkung der 2-Methylgruppe untersucht werden. Dazu müsste die Benzamid-Leitstruktur in ihrer aktiven Konformation „eingefroren“ werden – dann könnte die Affinität mit und ohne 2-Methylgruppe verglichen werden. Einfrieren bedeutet, dass die Benzamid-Leitstruktur an irgendeiner Stelle cyclisiert werden muss. Überlegungen zur Rigidisierung von Leitstruktur **2** führten zu einem Makrozyklus und zu dem 5-Ring-cyclisierten Benzamid „ohne Amid“, dem Isoindolin (s. Abb. 3-33). Beide Verbindungen können wahlweise mit und ohne 2-Methylgruppe synthetisiert und auf Hemmung getestet werden.

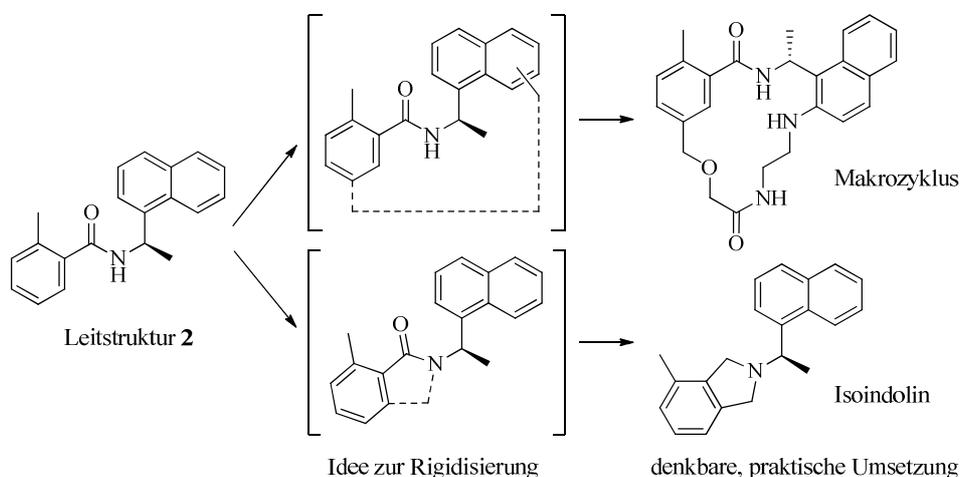


Abb. 3-33: Überlegungen zur Rigidisierung von Leitstruktur **2**

Die Bindemodi der rigidisierten Strukturen sind in Abbildung 3-34 wiedergegeben. Der Makrozyklus bildet zu Asp165 zwei H-Brücken aus, eine weitere ist zu Arg167 denkbar, wenn sich die Arginin-Seitenkette geringfügig anders orientieren würde (im Docking starr belassen). Das Entfernen der Carbonylgruppe beim 5-Ring-Lactam (Abb. 3-33) war nach Auswertung von Docking-Rechnungen notwendig, um einen sinnvollen Bindemodus zu erzielen. Das resultierende Isoindolin geht in der Bindetasche nur noch eine einzige H-Brücke ein:

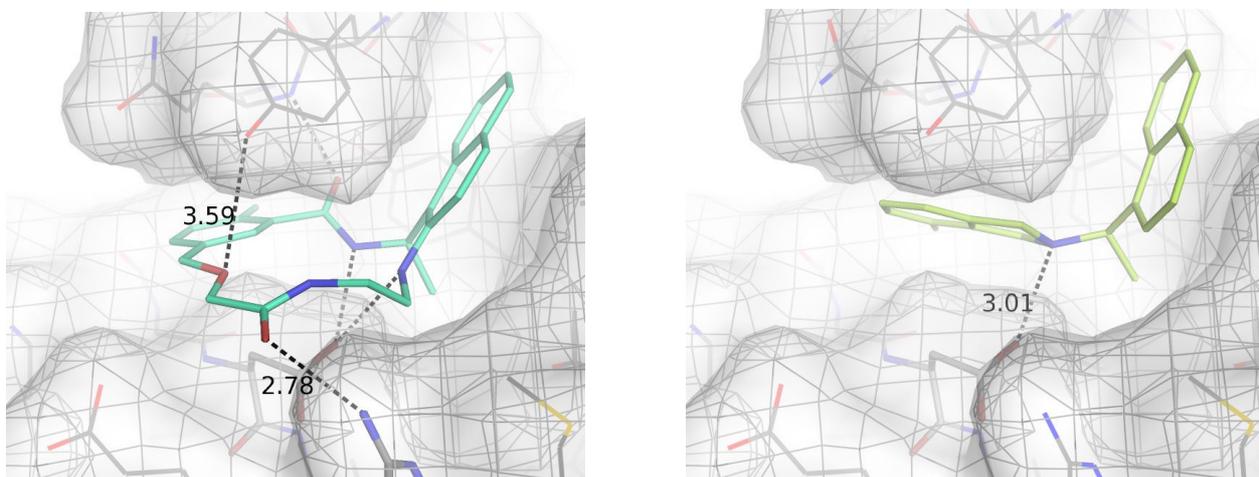


Abb. 3-34: Bindemodi von Makrozyklus (links) und Isoindolin (Verbindung **124**, rechts) laut Docking

Die Schwierigkeit des synthetischen Zugangs zum Makrozyklus hängt vor allem vom Design des Spacers ab und so wurde im Rahmen dieser Arbeit die synthetisch schneller zugängliche Isoindolin-Struktur ausgewählt, um auf die anfängliche Frage eine Antwort zu finden. Die Cyclisierung zum Isoindolin führt nun zu einem Verlust der Drehbarkeit zwischen Isoindolin-Stickstoff und „ehemaligem“ Benzoesäure-Aromat, wodurch das Molekül rigider wird als Leitstruktur **2** (s. Abb. 3-35, A & B). Ein HH-NOESY-NMR-Spektrum von Isoindolin **124** (Hydrochlorid, gelöst in DMSO- d_6) konnte zeigen, dass die aromatische Methylgruppe nur noch zu den drei benachbarten Protonen durch den Raum koppelt (s. Abb. 3-35, C), wohingegen das Benzamid **2** mehr Freiheitsgrade laut HH-NOESY-Spektrum aufweist: die 2-Methylgruppe koppelt sogar bis zu Position 2 und 8 des Naphthylgerüsts (s. Abb. 3-32).

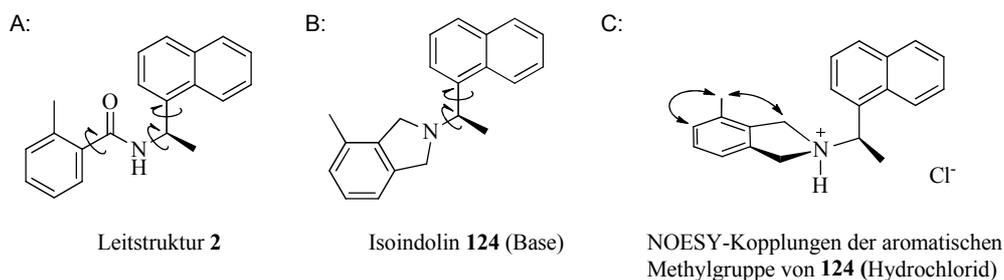


Abb. 3-35: A & B: Kennzeichnung drehbarer Bindungen. C: Interpretation des HH-NOESY-NMR-Spektrums

Beim Isoindolin ist das Gerüst starr und besitzt die gewünschte Bindekonformation. Nun sollte ein eventueller Unterschied zwischen den Affinitäten von **124** und **118** nur vom Beitrag der freien Ligand-Bindungsenthalpie herrühren, der der Adressierung des Methyl-Hotspots zuzuschreiben ist, sodass die Frage nach der Bedeutung dieses lipophilen Hotspots geklärt werden kann.

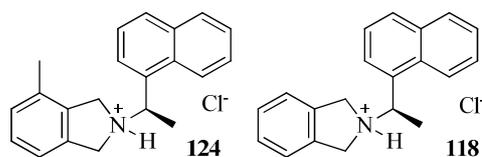
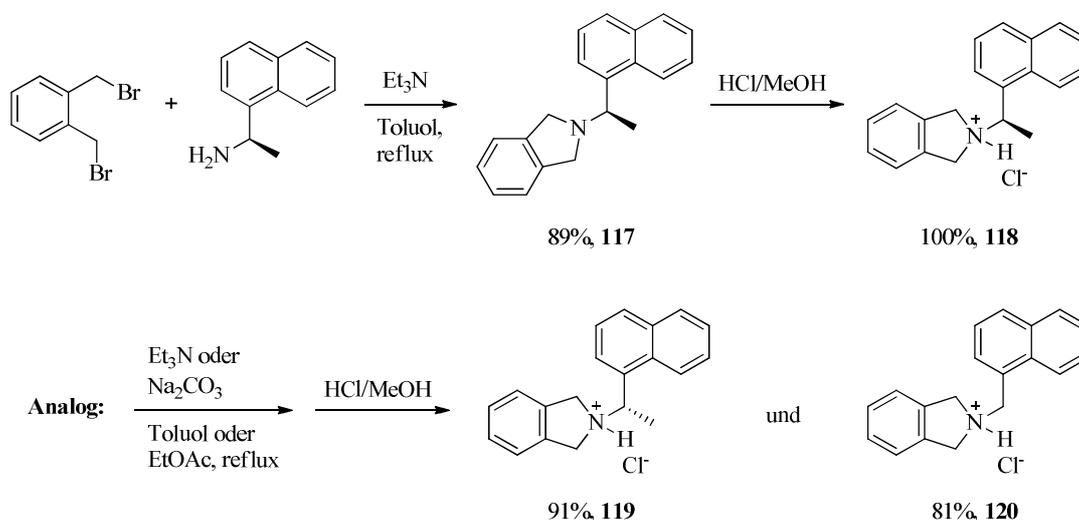


Abb. 3-36: Zu vergleichende Liganden

3.9.2. Isoindoline mit verschiedener Methyl-Substitution

Im folgenden Abschnitt wird auf die Synthese von 4-Methyl-substituierten und unsubstituierten Isoindolin-derivaten eingegangen. Die 2-Methylgruppe der 2-Methylbenzamide entspricht im Isoindol-System (Zählbeginn im 5-Ring) der 4-Position, daher die gewählte Bezeichnung „4-Methylgruppe“. Außerdem werden die jeweiligen *S*-Enantiomere und ein Derivat ohne Methyl-Substituent in der Amin-Komponente synthetisiert, um die Übertragbarkeit bisheriger Struktur-Wirkungsbeziehungen auf diese Substanzklasse beurteilen zu können.

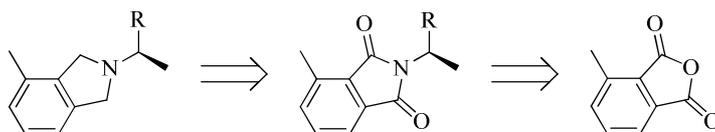
Die Synthese von Isoindolin-Base **117** erfolgt durch zweifache nukleophile Substitution von Brom am entsprechenden Dibromxytol mit (*R*)-Naphthylethanamin (s. Schema 3-50). Die erhaltene, ölige Base wird mit HCl/MeOH in ihr kristallines Hydrochlorid **118** überführt. Analog werden das Isoindolin **119** mit *S*-Konfiguration und das Isoindolin **120** ohne Methylgruppe an der Amin-Komponente dargestellt.



Schema 3-50: Darstellung von Isoindolin **117** als Base und Überführen ins Hydrochlorid **118**,
Synthese der weiteren Derivate **119** und **120** erfolgt analog.

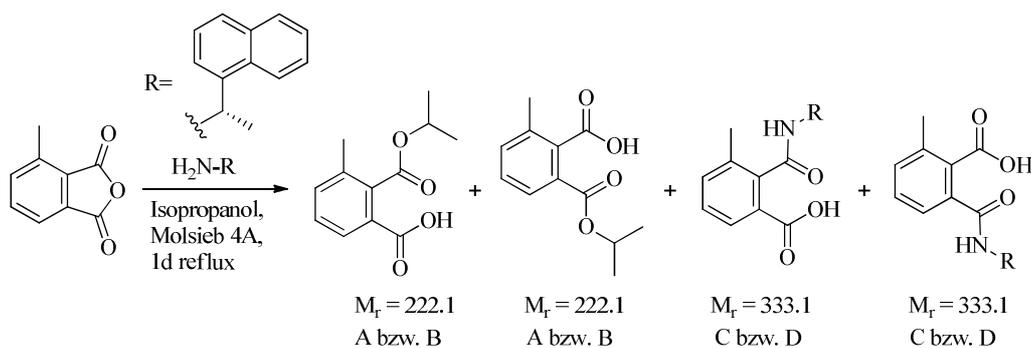
Zur Synthese der am Isoindolin-Gerüst 4-Methyl-substituierten Verbindungen musste dagegen eine andere Route gewählt werden, da das entsprechende, zweifach bromierte Trimethylbenzol-Derivat kommerziell nicht verfügbar ist und dessen Syntheseversuch mittels Wohl-Ziegler-Bromierung wie erwartet zu einem Produktgemisch verschiedenster Brom-Substitutionen an den drei Methylgruppen führte.

Die neue Route verwendet ein Phthalimid als Zwischenstufe, das nach Hou et al.^[131] mit LiAlH_4 zum Isoindolin reduziert werden kann:

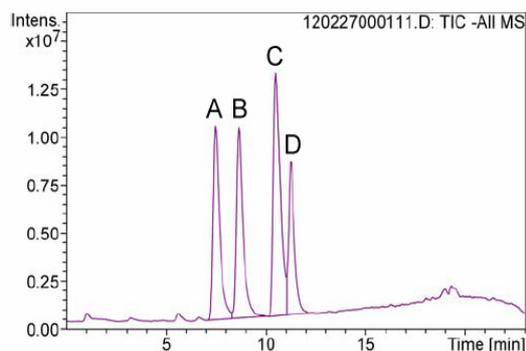


Schema 3-51: Retrosynthese substituerter Isoindoline

Zur Entwicklung der Synthese wurden zuerst Versuche mit dem *S*-Enantiomer der Base durchgeführt, da dieses noch in größerer Menge zur Verfügung stand. Zur Darstellung des Phthalimids wurde nach Vorschrift von Oliveira et al.^[132] verfahren, in deren Publikation sollen jeweils die Umsetzungen von Phthalanhydrid und 1,8-Naphthalanhydrid mit Benzylamin in siedendem Ethanol das entsprechende Imid ergeben. Die Reaktion wurde in dieser Arbeit nicht in Ethanol, sondern im weniger nukleophilen Isopropanol durchgeführt, da eine Esterbildung als Nebenreaktion erwartet wurde. Wie Schema 3-52 und Abbildung 3-37 zeigen, trat diese Esterbildung auch ein, jedoch ohne dass Imid gebildet wurde:



Schema 3-52: Versuchte Darstellung des Phthalimids nach Vorschrift von Oliveira et al.^[132]



Peakzuweisung, Angabe von *m/z*:

A: 221.1 [M-H]⁻ 3-Methylphthalsäureisopropylester

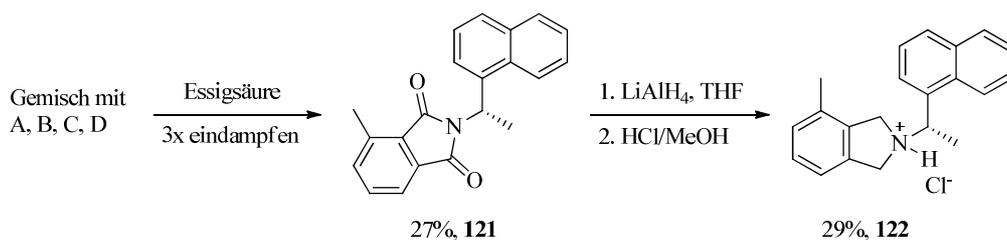
B: 221.1 [M-H]⁻ 3-Methylphthalsäureisopropylester

C: 332.2 [M-H]⁻ *N*-(1-Naphth-1-ylethyl)-3-methylphthalimid

D: 332.2 [M-H]⁻ *N*-(1-Naphth-1-ylethyl)-3-methylphthalimid

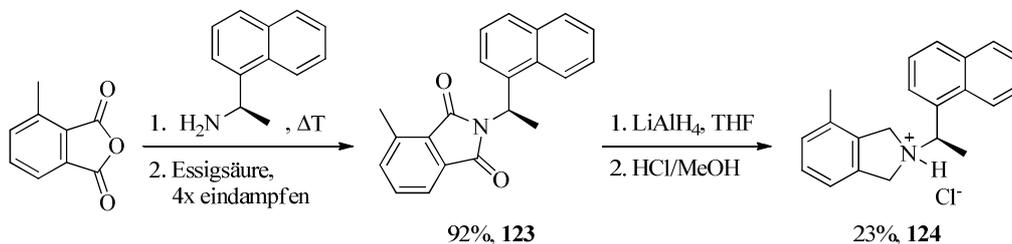
Abb. 3-37: LC-MS Chromatogramm des Produktgemischs, negative Ionenspur, Methode Gem6

Nachdem aufgeklärt war, was bei der versuchten Phthalimid-Synthese nach Oliveira et al.^[132] tatsächlich entstand, wurde das Produktgemisch mehrmals in Eisessig aufgenommen und zwischendurch eingedampft. So gelang eine Wasserabspaltung bei C und D und das Phthalimid **121** wurde nach chromatographischer Aufreinigung kristallin erhalten. Anschließende Reduktion mit LiAlH₄ führte zum gewünschten Isoindolin **122**.



Schema 3-53: Erfolgreiche Umsetzung des Gemischs zum Imid **121** und Reduktion zum Isoindolin **122**

Die entwickelte Imid-Synthese ist insofern praktisch, als dass sie nur kurze Reaktionszeit benötigt. Orzeszko et al.^[133] berichten beispielsweise über die Synthese von Phthalimiden in refluxierendem DMF mit drei Stunden Reaktionszeit. Das entsprechende *R*-Enantiomer **124** wurde dann unter Verwendung von (*R*)-Naphthylethanamin über die eigene Vorschrift synthetisiert:



Schema 3-54: Darstellung des Imids **123** nach eigener Vorschrift und Reduktion zum Isoindolin **124**

Im Übrigen zeigen protonierte tertiäre Amine bei NMR-spektroskopischer Untersuchung „pseudo-enantiomeres“ Verhalten, wenn die Inversion des am Stickstoffatom gebildeten Chiralitätszentrums auf der NMR-Zeitskala „langsam“ ist^[134]. Bei chiralen Isoindolin Hydrochloriden werden durch dieses zusätzliche Chiralitätszentrum am protonierten Stickstoffatom mit dem asymmetrischen Kohlenstoff Diastereomere gebildet, sodass der Signalsatz im NMR (zum Teil) verdoppelt wird. Als Beispiel sind in Abbildung 3-38 Ausschnitte aus ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **124** abgebildet:

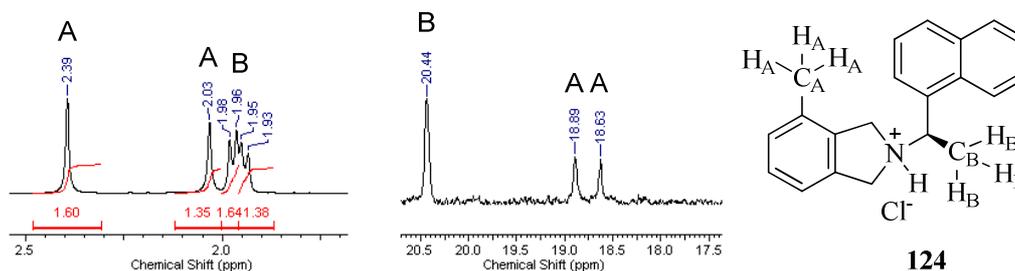


Abb. 3-38: Ausschnitte aus ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **124** als Hydrochlorid in MeOD

Testergebnisse und Diskussion

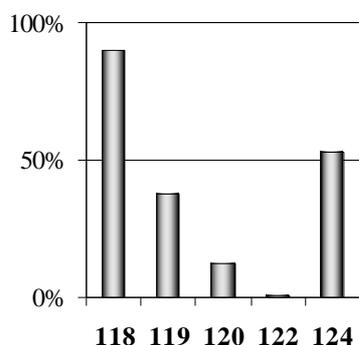


Abb. 3-39: Screening an SARS-CoV-PI^{Pro} („100 μM“, jedoch begrenzte Löslichkeiten!)

Tab. 3-4: IC₅₀-Werte

Verbindung	118 (<i>R</i> -Enantiomer)	119 (<i>S</i> -Enantiomer)
IC ₅₀ [μM]	2.9 ± 0.2	nicht bestimmbar

Verbindung **118** zeigt mit einem IC₅₀ von 2.9 μM eine gute Enzymhemmung. Die Rigidisierung hin zum Isoindolin hat demnach einen potenten Inhibitor ergeben, der zur Bindetasche nur eine einzige H-Brücke zu Asp165 ausbildet und mit dem Loop lediglich lipophil interagiert. Das Isoindolin **118** trägt bis auf das *N*-Alkyl keinen weiteren Substituenten und stellt damit eine gute Leitstruktur dar, die in ihrer Affinität noch weiter optimierbar sein sollte.

Das schwach inhibierende *S*-Enantiomer **119** führt bei „100 μM Inhibitorkonzentration“ zu 38% Enzymhemmung. Im Assay mit Verdünnungsreihe resultiert ein Plateau, das dem von Verbindung **84** ähnlich ist. Die Bestimmung der Löslichkeit von **119** ergab eine Präzipitation zwischen 20 - 30 μM (in Assaypuffer + 10% DMSO). Die Wiederholung des Assays bei 20 μM **119** führte zu einer Hemmung von 24% (unter Zusatz von 0.005% Brij 35), es ist daher von einer schwachen Aktivität des *S*-konfigurierten Inhibitors auszugehen. Nachdem die Konzentration unter diesen Bedingungen nicht erhöht werden kann, kann kein IC_{50} -Wert ermittelt werden. Das *R*-Enantiomer **118** führte bei 20 μM zu 87% Hemmung, basierend auf den Hemmwerten bei 20 μM würde das eudismische Verhältnis *R* / *S* ca. 3.6 betragen. Allerdings muss auch hier, wie schon bei Verbindung **18**, bedacht werden, dass in **119** die mögliche Verunreinigung durch 2% *R*-Enantiomer (ee = 98% beim chiralen Edukt laut Herstellerangabe) bestehen kann. Bei 20 μM **119** wären dies bis zu 0.4 μM **118**, was beim Blick auf die Hemmkurve von **118** (s. Kapitel 4) die 20% Hemmung bei Verbindung **119** erklären kann.

Die Verbindung **120** besitzt keine inhibitorische Aktivität. Ihr fehlt die Methylgruppe in der Seitenkette der Amin-Komponente, die wie auch schon bei den Benzamid-Inhibitoren zur Bindung an das Enzym nötig ist. Diese Struktur-Wirkungsbeziehung gilt demnach für die Substanzklasse der Benzamide wie auch für die der Isoindoline.

Die *S*-konfigurierte Verbindung **122** besitzt laut Assay keine inhibitorische Aktivität und entspricht damit der Erwartung und bisherigen Struktur-Wirkungsbeziehungen. Verbindung **124** ist das *R*-konfigurierte Enantiomer zu **122**, dessen Enzymhemmung fiel mit etwa 50% Hemmung überraschend niedrig aus, sollte sie doch mit ihrer Methylgruppe in 4-Position den lipophilen Hotspot der S3-Tasche adressieren und daher *besser* als **118** binden! Die Löslichkeitsuntersuchung ergab, dass **124** zwischen 10 - 20 μM (in Assaypuffer + 10% DMSO) ausfällt. Der Assay wurde mit 10 μM **124** unter Zugabe von 0.005% Brij 35 wiederholt, es resultieren dann 45% Enzymhemmung. Damit sollte der IC_{50} -Wert von **124** zwischen 10 - 20 μM liegen.

Die 4-Methylgruppe wirkt sich beim Isoindolin-Scaffold also affinitätsvermindernd aus. Dies relativiert die Bedeutung des Methyl-Hotspots in der S3-Bindetasche: Ein konformell stabilisiertes Molekül wie das Isoindolin **118** bindet *ohne* 4-Methylgruppe mit höherer Affinität als sein Derivat **124 mit** 4-Methylgruppe. Dagegen erhöht ein *ortho*-Substituent bei den Benzamiden die Affinität – möglicherweise durch einen niedrigeren Betrag aufzuwendender Torsionsenthalpie bei Ligandbindung (Vorspannung der Konformation). Abbildung 3-40 fasst die zur Diskussion relevanten Strukturen und Bindemodi nochmal zusammen. Die Chemscore-Werte der gedockten Posen von **118** und **124** sind mit 36.0 und 37.1 relativ niedrig, es zeigt sich darin die Abhängigkeit des Score-Werts von der Anzahl ausgebildeter H-Brücken. (Score-Werte mit 1 Wasser: 43.3 und 43.6)

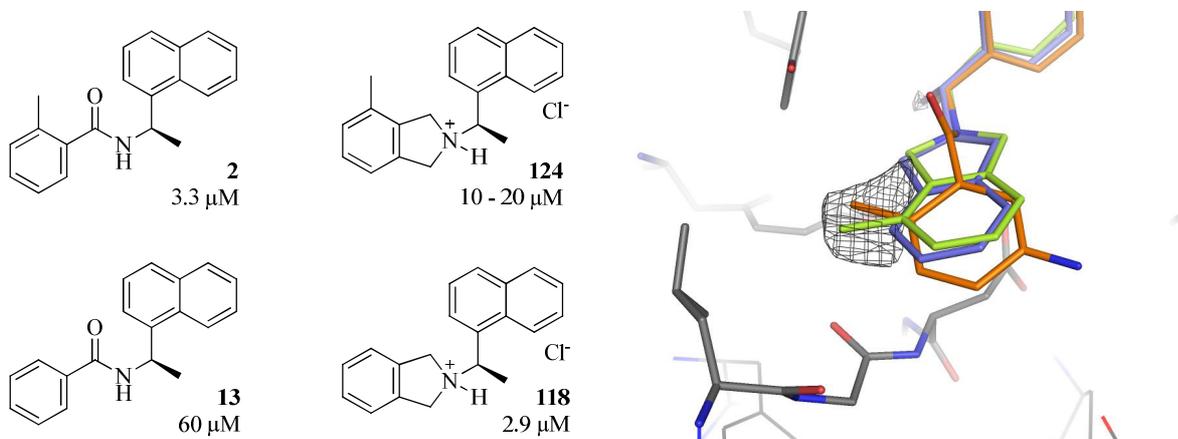


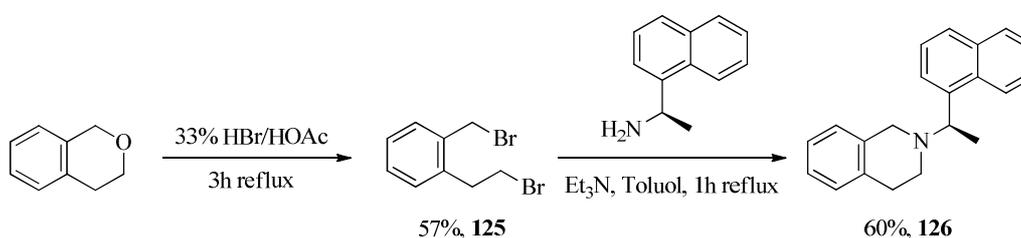
Abb. 3-40: Links: Übersicht über die zur Hotspot-Diskussion relevanten Inhibitoren mit IC_{50} . Rechts: Kristallstruktur 3E9S mit gebundenem Inhibitor (orange). Überlagert sind die Dockingposen von **118** (blau), **124** (grün) und der mit GRID berechnete Methyl-Hotspot (graus Netz)

3.9.3. Ein 6-Ring-Derivat sowie 4-Fluor-, 4-Chlor- und 5-Hydroxy-Isoindoline

Da mit dem Isoindolin **118** eine neue Leitstruktur gefunden wurde, werden weitere Isoindoline und abgeleitete Amine mit der Absicht synthetisiert, in dieser Substanzklasse eine Affinitätssteigerung zu erzielen.

Vom Isoindolin-5-Ring zum 6-Ring

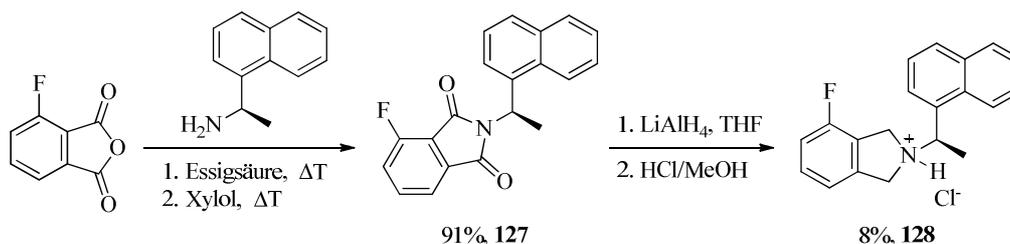
Zunächst wird der 5-Ring im Isoindolin zum 6-Ring erweitert, man gelangt strukturell zu einem Tetrahydroisochinolin-Derivat mit sehr ähnlichem Bindemodus. Das zur Synthese benötigte Dibromid **125** ist nicht kommerziell erhältlich und wird daher nach Salman und Ray^[135] durch Etherspaltung von Isochroman dargestellt. Aus dem Dibromid **125** kann dann der 6-Ring aufgebaut werden, man erhält mit (*R*)-Naphthylethanamin das Tetrahydroisochinolin-Derivat **126**:



Schema 3-55: Darstellung des Tetrahydroisochinolin-Derivats **126**

Halogensubstitution in Position 4: Fluor

Das 4-Fluor-Derivat **128** wird über die bereits vorgestellte Phthalimid-Route dargestellt, allerdings mit der Variation dass diesmal anschließend Xylol zugegeben und abgedampft wird:

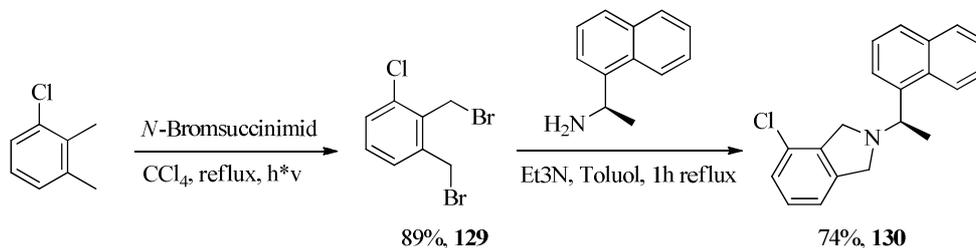


Schema 3-56: Darstellung des 4-Fluorphthalimids **127** und Reduktion zum 4-Fluor-Isoindolin-Derivat **128**

Die auffallend niedrigen Ausbeuten bei den Imid-Reduktionen mit $LiAlH_4$ (Verbindungen **122**, **124**, **128**) haben möglicherweise ihre Ursache in den mit zwei Stunden relativ kurz gewählten Reaktionszeiten.

Halogensubstitution in Position 4: Chlor

Ausgehend vom 1-Chlor-2,3-dimethylbenzol wird über eine Wohl-Ziegler-Bromierung das benzylic bromierte Produkt **129** erhalten, aus welchem durch nukleophile Substitution das 4-Chlor-Isoindolin **130** synthetisiert wird:



Schema 3-57: Darstellung von **129** und Umsetzung zum 4-Chlor-Isoindolin-Derivat **130**

Hydroxysubstitution in Position 5

Mittels Docking wurde untersucht, mit welchen weiteren Substituenten am Isoindolin-Gerüst die Interaktion mit dem Enzym verbessert werden kann. Von phenolischen Hydroxygruppen ist bekannt, dass sie als H-Donoren starke H-Brücken ausbilden^[136]. Am Isoindolin bietet sich die 5-Position für die Hydroxygruppe an, so kann zum NH-Backbone von Leu163 eine H-Brücke ausgebildet werden. Eine vergleichbar bewertete Dockinglösung (Chemscore 36 - 37) lässt die Hydroxygruppe eine H-Brücke zum Loop-Gln270 ausbilden, beide Posen wurden daher in Abbildung 3-41 überlagert:

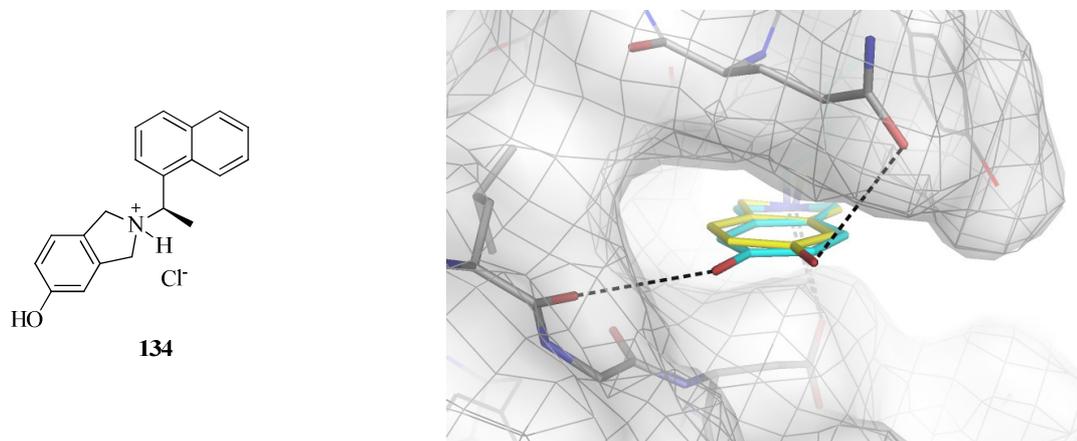
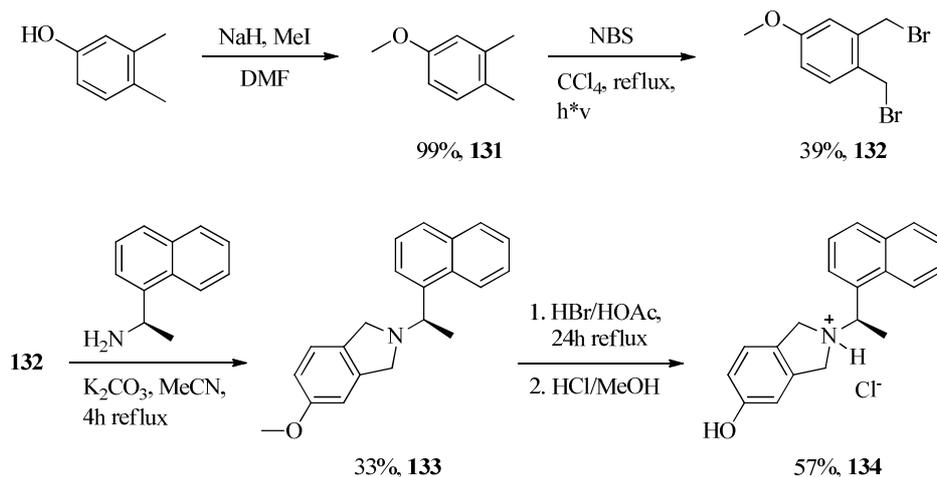


Abb. 3-41: Links: Strukturformel des 5-Hydroxy-Isoindolin-Derivats. Rechts: Bindemodi zweier überlagerter Dockinglösungen von **134**.

Die Synthese dieses 5-Hydroxy-Derivats erfolgt ähnlich wie das zuvor dargestellte 4-Chlor-Derivat **130**, doch muss das 3,4-Dimethylphenol-Edukt vor der radikalischen Bromierung am Kern desaktiviert werden, was durch Methylierung geschah. Das erhaltene Methoxy-Derivat **131** wird zum benzylicen Bromid **132** umgesetzt, woraus mit (*R*)-Naphthylethanamin das 5-Methoxy-Isoindolin **133** aufgebaut wird. Diesmal wird zur Isoindolin-Synthese die Vorschrift von Hou et al.^[131] in Acetonitril/ K_2CO_3 ausprobiert, doch zumindest bei diesem Derivat liefert sie mit 33% keine überzeugende Ausbeute. Anschließende Etherspaltung ergibt das 5-Hydroxy-Isoindolin **134** (s. Schema 3-58).



Schema 3-58: Darstellung der 5-Hydroxy Zielverbindung **134**

Testergebnisse und Diskussion

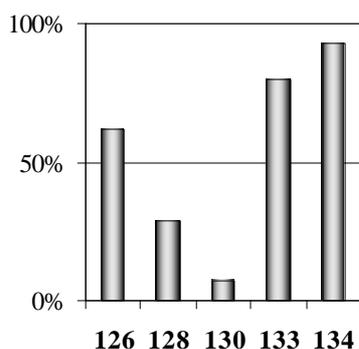


Abb. 3-42: Screening an SARS-CoV-2-PP1^{pro} („100 µM“, begrenzte Löslichkeiten!)

Tab. 3-5: IC₅₀-Werte

Verbindung	126	133	134
IC ₅₀ [µM]	< 20 (s. Text)	14 ± 1	4.5 ± 0.4

Das Tetrahydroisochinolin **126** erreichte bei „100 µM Inhibitorkonzentration“ nur 62% Hemmung (s. Abb. 3-42). Die begrenzte Löslichkeit bisheriger Isoindoline konnte auch für **126** bestätigt werden: Die Verbindung präzipitiert zwischen 20 - 30 µM in Assaypuffer (+ 10% DMSO). Ein weiterer Assay bei 20 µM **126** unter Zusatz von 0.005% Brij 35 führte dann zu 68% Hemmung. Auf die Bestimmung eines IC₅₀-Werts wurde verzichtet, da die Hemmung wegen der Sättigungskonzentration nicht weiter erhöht werden kann (aus einem Ausschnitt der Hemmkurve wäre der IC₅₀-Wert nur ungenau bestimmbar). Es bleibt festzuhalten, dass das Tetrahydroisochinolin **126** mit seinem 6-Ring-Gerüst eine etwas niedrigere Affinität zum Enzym besitzt, als das Isoindolin **118** mit 5-Ring. Daher werden keine weiteren Tetrahydroisochinoline dargestellt.

Die beiden halogenierten Verbindungen **128** und **130** besitzen unter den Assaybedingungen eine besonders schlechte Löslichkeit (pH des Assaypuffers 7.5). Die bisherige angewandte Methode zur Löslichkeitsabschätzung ergab, dass bereits zwischen 3 bis 5 µM eine so schwache Trübung wahrgenommen wird, dass man nicht genau beurteilen kann, ob nicht auch schon bei niedrigerer Konzentration Fällung eintritt. Eine versuchte UV-VIS spektrometrische Konzentrationsbestimmung nach Abzentrifugieren scheiterte an den niedrigen Absorptionen. Es ist damit nicht bekannt, welche Konzentration gelöst vorliegt; schließlich wurde für **128** der Assay mit „10 µM Inhibitorkonzentration“ unter Zusatz von 0.005% Brij 35 durchgeführt. Verbindung **128** verursacht dann 22%

Hemmung. Eine Bestimmung von konzentrationsabhängigen Hemmwerten zu **128** und **130** ist unter diesen Bedingungen nicht möglich. Ein weiterer Versuch zur pH-abhängigen Löslichkeit zeigte folgendes Ergebnis:

- pH 5.5: **128** und **130** ergeben bei 40 μM klare Lösungen (20 mM Acetat-Puffer + 10% DMSO)
- pH 6.0: **128** und **130** ergeben bei 40 μM trübe Lösungen (20 mM Phosphat-Puffer + 10% DMSO)
- pH 6.5: Trübung durch **128** und **130** ist stärker als bei pH 6.0 (20 mM Phosphat-Puffer + 10% DMSO)

Die Verbindungen sind demnach nur bei pH = 5.5 als geladenes Salz ausreichend löslich, höhere pH-Werte lassen die Basen ausfallen. Zukünftig könnte damit der Versuch vielversprechend sein, den Enzymassay auf einen Assaypuffer mit pH 5.5 umzustellen, sodass die basischen Isoindoline in Lösung protoniert vorliegen.

Es ist prinzipiell auch denkbar, dass bisherige Isoindoline wie **118** unter sauren Assaybedingungen noch höhere Affinität zeigen, da dann der Anteil an protonierter Form in Lösung größerer ist (pH-Wert im Assay bisher 7.5).

Das 5-Methoxy Isoindolin **133** stellt mit einem IC_{50} von 14 μM eine Verschlechterung gegenüber der unsubstituierten Verbindung **118** dar. Die demethylierte 5-Hydroxy Verbindung **134** besitzt wieder eine höhere Affinität ($\text{IC}_{50} = 4.5 \mu\text{M}$) als ihre Vorstufe **133**, die postulierte H-Brücke zu Leu163 oder Gln270 sollte von **134** ausgebildet werden können. Dennoch stellt **134** keine Verbesserung von **118** dar. Demnach kann die Desolvatationsenthalpie lediglich von der Bildungsenthalpie der neuen H-Brücke und dem Entropiegewinn (Freisetzung der Wassermoleküle) kompensiert werden, in Summe bleibt die freie Ligand-Bindungsenthalpie dabei unverändert.

3.9.4. Weitere Isoindoline mit Amino-, Nitro- und Hydroxy-Substitution

Mit der Synthese eines 4-Amino-Isoindolins (**137**) wird ein polarer Substituent an der „kritischen“ 4-Position angebracht. Laut Docking (s. Abb. 3-43) kann die 4-Aminogruppe sowohl zum Enzym hin, als auch weg zeigen. Es resultieren dabei Chemscore-Werte von 36.0 respektive 35.4 – jedoch wird in keinem Fall eine H-Brücke von der 4-Aminogruppe zum Enzym gebildet.

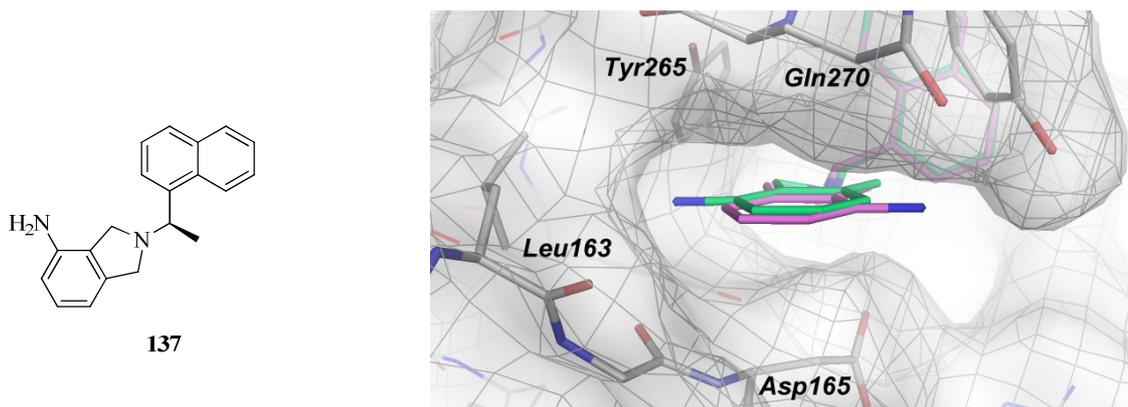
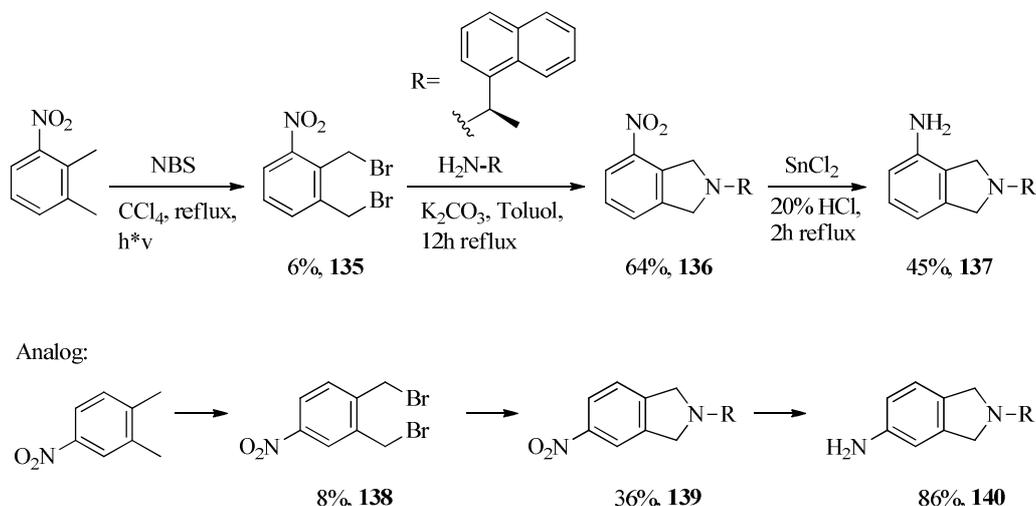


Abb. 3-43: Strukturformel des 4-Amino-Isoindolin-Derivats. Rechts: Bindemodi zweier überlagerter Dockinglösungen von **137**.

Zusätzlich soll dem 5-Hydroxy-Derivat **134** ein 5-Amino-Derivat (**140**) gegenübergestellt werden. Dieses kann wie **134** eine H-Brücke zu Leu163 ausbilden und ist mit seiner aromatischen Aminogruppe dem 4-Amino-Benzamid **9** ($\text{IC}_{50} = 1.2 \mu\text{M}$) ähnlich.

Die Synthesen der 4- und 5-Amino-substituierten Isoindoline erfolgten ausgehend von den Nitrobenzol-Edukten. Die Aufreinigungen der Produktgemische nach Wohl-Ziegler-Bromierung gestalteten sich als schwierig (Koelution

bromierter Nebenprodukte) und bedingen aufgrund enger Fraktionsauswahl die niedrigen Ausbeuten. Umsetzung der Dibromide **135** und **138** mit (*R*)-Naphthylethanamin ergab die Nitro-Isoindoline **136** und **139**, die in halbkonz. Salzsäure mit Zinnchlorid zu den aromatischen Aminen reduziert wurden:

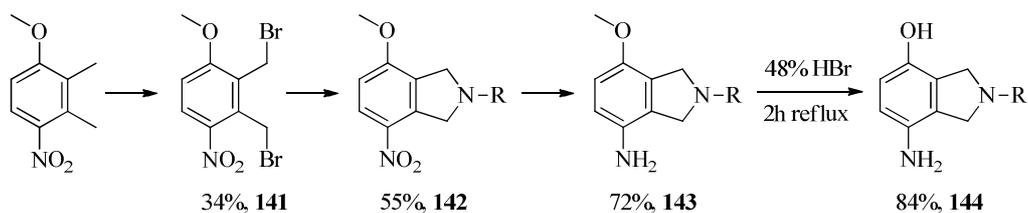


Schema 3-59: Darstellung des 4-Amino-Derivats **137** und des 5-Amino-Derivats **140**

Synthese eines 7-Amino-4-Hydroxy-Isoindolin-Derivats

Ergänzend zum 4-Amino-substituierten Isoindolin **137** wird ein Derivat mit Hydroxygruppe in *para*-Position zur Aminogruppe synthetisiert: Dieses 7-Amino-4-hydroxy-substituierte Isoindolin **144** kann zwar im Docking keine zusätzliche H-Brücke ausbilden, doch bei geringfügig veränderter Bindetaschengeometrie wird eine H-Brücke zu Tyr265 möglich. Dieser Bindemodus entspräche dann ungefähr demjenigen der im virtuellen Screening gefundenen Verbindung B6 (s. Abb. 2-29).

Ausgehend vom entsprechenden Edukt wird analog Schema 3-59 Verbindung **143** erhalten. Diese wird mit 48%iger Bromwasserstoffsäure in das Aminophenol-Zielprodukt **144** verwandelt:

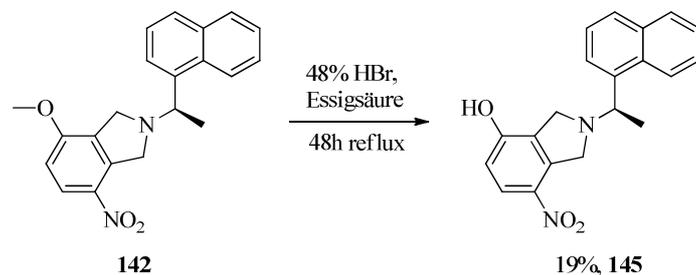


Schema 3-60: Darstellung des Isoindolins **143** analog Schema 3-59, dann Umsetzung zur Zielverbindung **144**

Synthese eines 7-Nitro-4-Hydroxy-Isoindolin-Derivats

Aus der Zwischenstufe **142** wird das 7-Nitro-4-Hydroxy-Derivat **145** synthetisiert (s. Schema 3-61). Dieses stellt als *para*-Nitrophenol-Derivat einen besonders guten H-Brücken-Donor dar^[70] und sollte Tyr265 mit einer stärkeren H-Brücke als das vorherige *para*-Aminophenol-Derivat **144** adressieren. Andererseits kann **145** als *p*-Nitrophenolat auch als H-Brücken-Akzeptor gegenüber Tyr265 auftreten, das Oxy-Anion von **145** liegt dann wie das Oxy-Anion von B6 im Bereich von Hotspot 3 (s. Abb. 2-8).

Zur Synthese von **145** muss lediglich die Methoxygruppe von **142** abgespalten werden. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von **142** in 48%iger HBr wird Essigsäure als Kosolvens zugegeben, die nötige Reaktionsdauer wurde vermutlich durch diese „Verdünnung“ verlängert.



Schema 3-61: Darstellung der *p*-Nitrophenol-Zielverbindung **145**

Testergebnisse und Diskussion

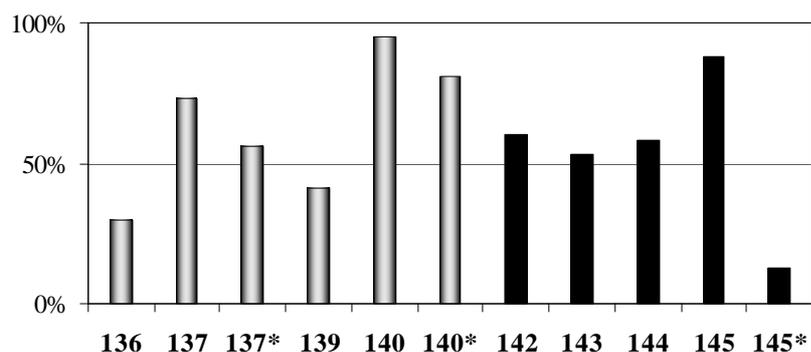


Abb. 3-44: Screening an SARS-CoV-PI^{pro} („100 µM“, Löslichkeiten nicht überprüft). Die Verbindungen **136**, **137**, **139** und **140** zeigen gegenüber der AMC-Fluoreszenz schwaches Quenching. Die Verbindungen **142** - **145** sind moderat bis stark Fluoreszenz-quenchend (Kennzeichnung durch schwarze Balken). *Hemmwerte nach Korrektur des inneren Filtereffekts

Tab. 3-6: IC₅₀-Werte

Verbindung	137	137*	140
IC ₅₀ [µM]	31 ± 2	32 ± 2	4.9 ± 0.3

*Basierend auf korrigierten Enzymaktivitäten

Die beiden 4-Amino und 5-Amino Isoindoline **137** und **140** sind im Assay bei 100 µM schwach Fluoreszenzlicht- quenchend, in der Verdünnungsreihe tritt diese Eigenschaft bei **137** nur noch geringfügig und bei **140** gar nicht auf (Quenching von Konzentration abhängig). Die 4-Aminogruppe von **137** verschlechtert die Affinität gegenüber der unsubstituierten Verbindung **118** (IC₅₀ = 32 µM vs. 3 µM), obwohl die Chemscore-Werte gleich ausfallen. Wie bereits erwähnt, kann die 4-Aminogruppe laut Docking keine H-Brücke eingehen. Die Desolvation der polaren Gruppe bei Ligandbindung wird demnach vom Chemscore in diesem Fall nicht ausreichend „bestraft“. Das 5-Amino-Isoindolin **140** ist dagegen in seiner Affinität vergleichbar mit dem 5-Hydroxy Isoindolin **134** (IC₅₀ = 4.5 µM), beide scheinen von der möglichen H-Brücke zu Leu163 nicht zu profitieren und besitzen eine etwas geringere Affinität als die Leitstruktur **118**.

Die Verbindungen **143** und **144** zeigen im Screening nur schwache Hemmung und haben zudem einen moderaten inneren Filtereffekt, obwohl sie keine Nitrogruppe besitzen. Die 7-Amino-4-Hydroxy-Substitution von **144** führt also entgegen dem berechneten Bindemodus zu einer verminderten Affinität. Gleichzeitig zeigt die Verbindung aber, dass ein polares Atom in 4-Position toleriert wird: Entweder die Hydroxy- oder die gegenüberliegende Aminogruppe müssen im vergrabenen, lipophilen Hotspot zu liegen kommen (im Fall **137** könnte dagegen die polare

4-Aminogruppe auch vom Enzym weg zeigen). Bei den Benzamiden waren die polaren 2-Hydroxy- und 2-Thio-Derivate, wie bereits erwähnt, inaktiv. Dies stützt die Hypothese der intramolekularen H-Brücke beim Salicylamid-Derivat als Ursache der Inaktivität.

Das *p*-Nitrophenol-Derivat **145** ist stark AMC-Fluoreszenz-quenchend, sowohl bei 100 μ M, als auch bei 20 μ M (nicht abgebildet). Die Korrektur des inneren Filtereffekts zeigt hier, dass die im Assay beobachtete, erniedrigte Fluoreszenz-Zunahme alleine durch das Quenching durch Verbindung **145** erklärt werden kann. Verbindung **145** ist demnach kein Enzyminhibitor.

3.9.5. Struktur-Wirkungsbeziehungen der Isoindoline

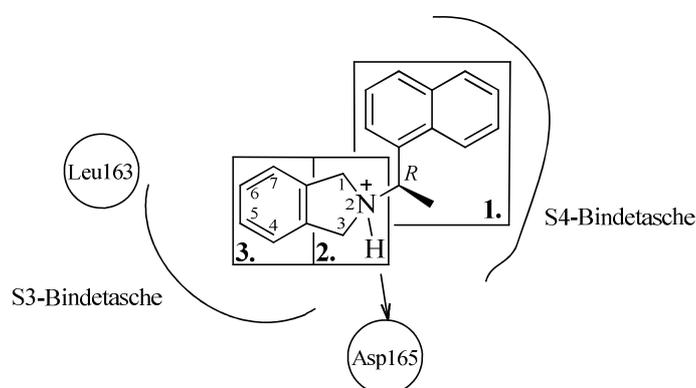


Abb. 3-45: Orientierungshilfe zu den Struktur-Wirkungsbeziehungen am Beispiel Inhibitor **118**

1. Die Struktur-Wirkungsbeziehung der Benzamid-Inhibitoren ist hier übertragbar: Die Amin-Komponente muss *R*-konfiguriert sein und benötigt die Methylgruppe der Seitenkette.
2. Das Kern-Fragment ist das tertiäre Amin im 5-Ring, das 6-Ring-Derivat (**126**) ist dagegen weniger affin.
3. In die S3-Bindetasche bindet nach bisherigen Erkenntnissen ein unsubstituierter Aromat am besten.

In diesem dritten Punkt (S3-Bindetasche) bestehen unerwartete Unterschiede im Vergleich zum Benzamid-Scaffold:

- Die Substitution in 5-Position mittels Hydroxy- oder Aminogruppe wird lediglich toleriert, die Affinität durch die möglichen H-Brücken zu Leu163 oder Loop-Gln270 aber nicht gesteigert (vgl. Benzamid **9**).
- Die Substitution in 4-Position mit Methyl führt zu einer Affinitätsabnahme. Polare Gruppen (OH, NH₂, NO₂) führen in 4- und 7-Position zu starker Affinitätsabnahme (vgl. dazu Isoindolin **137** mit Benzamid **12**).

Diese letztgenannte Diskrepanz zu den Struktur-Wirkungsbeziehungen der Benzamide kann hier bei den polaren Substituenten so erklärt werden, dass keine H-Brücken zum Loop-Gln270 möglich sind (s. Abb. 3-43). Doch die Tatsache, dass eine Methylgruppe in 4-Position des Isoindolins die Affinität erniedrigt, ist unerwartet und mittels Docking nicht erklärbar. Weshalb der Isoindolin-Bindemodus durch die Methylgruppe destabilisiert wird, ist unklar und widerspricht der Annahme eines Methyl-Hotspots. Möglicherweise hat der Methyl-Hotspot keine Bedeutung. Leider kann über die Auswirkung einer Halogen-Substitution in 4-Position des Isoindolins keine Aussage getroffen werden, da die Halogenderivate **128** und **130** eine zu niedrige Löslichkeit im Assaypuffer aufweisen.

3.9.6. Vom Isoindolin zum acyclischen, sekundären Amin

Um die initiale Idee der Rigidisierung zu überprüfen, wurde die Cyclisierung zum Isoindolin wieder aufgehoben, ohne jedoch bis zurück zum Amid der Leitstruktur zu gehen. Man erhält das acyclische Analogon, welches strukturell ein sekundäres Amin (*N*-Benzyl-Derivat) darstellt und mit vier nicht-endständigen, rotierbaren Bindungen flexibler als das Isoindolin ist:

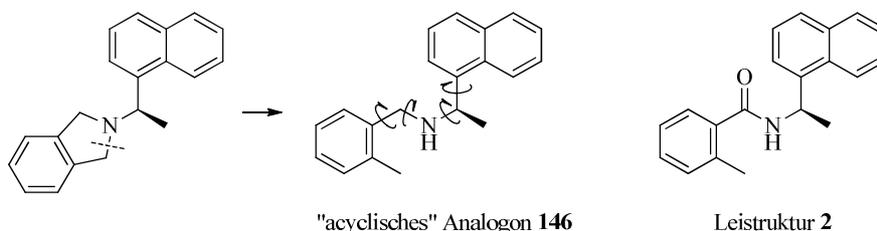
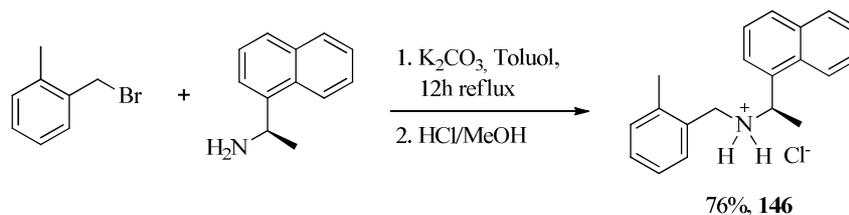


Abb. 3-46: Gegenüberstellung des Isoindolin-Scaffolds, des acyclischen Benzylderivats **146** und Leitstruktur **2**

Die Synthese des „acyclischen“ Isoindolin-Analogons **146** erfolgt durch Umsetzung des entsprechenden Bromxylols mit (*R*)-Naphthylethanamin:



Schema 3-62: Darstellung des sekundären Amins **146**

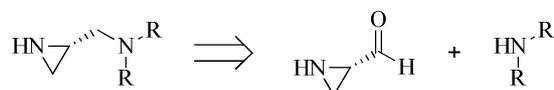
Testergebnis und Diskussion

Bei 100 μ M Inhibitorkonzentration führt **146** zu 55% Hemmung an der SARS-CoV-PL^{pro}. Das acyclische Amin **146** besitzt damit deutlich geringere Affinität als das rigide Isoindolin **118**.

Nachdem **146** laut Docking einen ähnlichen Bindemodus mit ionischer H-Brücke wie **118** einnehmen kann, aber nur geringe inhibitorische Aktivität zeigt, ist die hohe Affinität von **118** vermutlich hauptsächlich der rigiden Isoindolin-Struktur zuzuschreiben. Die erhöhte Anzahl Freiheitsgrade bei **146** wirkt sich wie erwartet auf die freie Ligand-Bindungsenthalpie ungünstig aus, da die Ligandbindung einen hohen Entropieverlust mit sich bringt.

3.10. Synthese von Aziridinderivaten

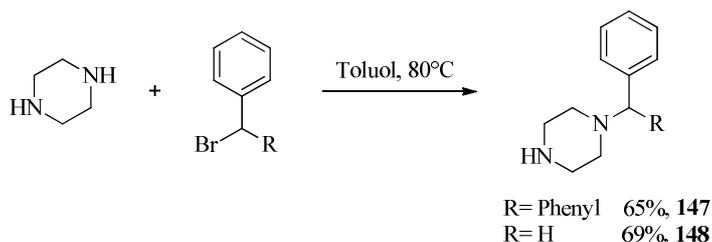
Die theoretischen Überlegungen zum Inhibitor-Design mit Aziridinring wurden in Kapitel 2.6 vorgestellt. Eine mögliche Retrosynthese der Verbindungen ist in Schema 3-63 gezeigt. Der Substituent am Aziridin wird dabei durch reduktive Aminierung an (*S*)-Aziridin-2-carboxaldehyd angefügt.



Schema 3-63: Retrosynthese der Aziridin-Derivate

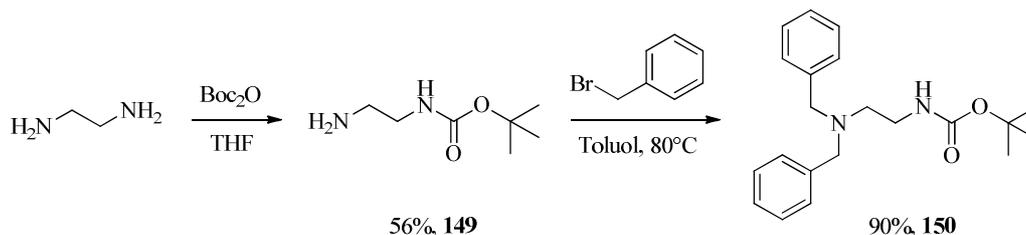
Darstellung der Amin-Komponenten

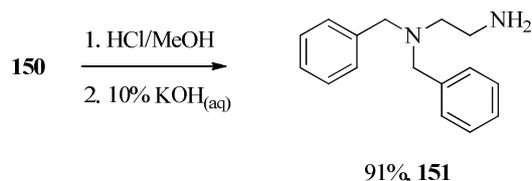
Alkylierung von Piperazin mit Diphenylbrommethan liefert das *N*-Benzhydrylpiperazin **147**. Als Nebenprodukt wird trotz Piperazin-Überschuss (4 eq.) das dialkylierte Piperazin erhalten, das jedoch wegen seiner schlechten Löslichkeit in Ethylacetat gut abgetrennt werden konnte. Die Reaktion von Piperazin mit Benzylbromid führt ebenso zu mono- und dialkyliertem Piperazin, wobei das *N*-Benzylpiperazin **148** mittels Kugelrohrdestillation aus dem Ansatz isoliert wurde.



Schema 3-64: Alkylierung von Piperazin zu den Amin-Komponenten **147** und **148**

Die Amin-Komponente mit Ethylendiamin-Einheit sollte durch Benzylierung des einfach Boc-geschützten Ethylendiamins erhalten werden (s. Schema 3-65). Im ersten Schritt wurde dazu Ethylendiamin nach Vorschrift von Saari et al.^[137] einfach Boc-geschützt. Nach Ausschütteln wurde weißer Feststoff und nicht wie bei Saari et al. klares Öl erhalten, doch mittels Kugelrohrdestillation konnte dann aus dem Ansatz das ölige *N*-Boc-ethylendiamin **149** isoliert werden. Die weitere Umsetzung von **149** mit Benzylbromid lieferte in guter Ausbeute das *N,N*-Dibenzyl-Derivat **150**, das anschließend mit methanolischer HCl entschützt wurde. Aus dem erhaltenen Hydrochlorid wurde mit 10%iger Kaliumhydroxid-Lösung das Amin **151** freigesetzt.

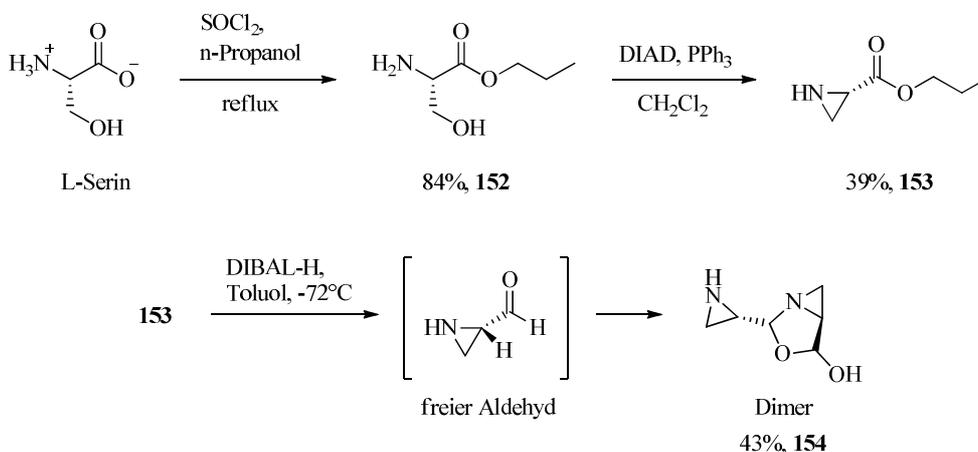




Schema 3-65: Synthese der Amin-Komponente **151**

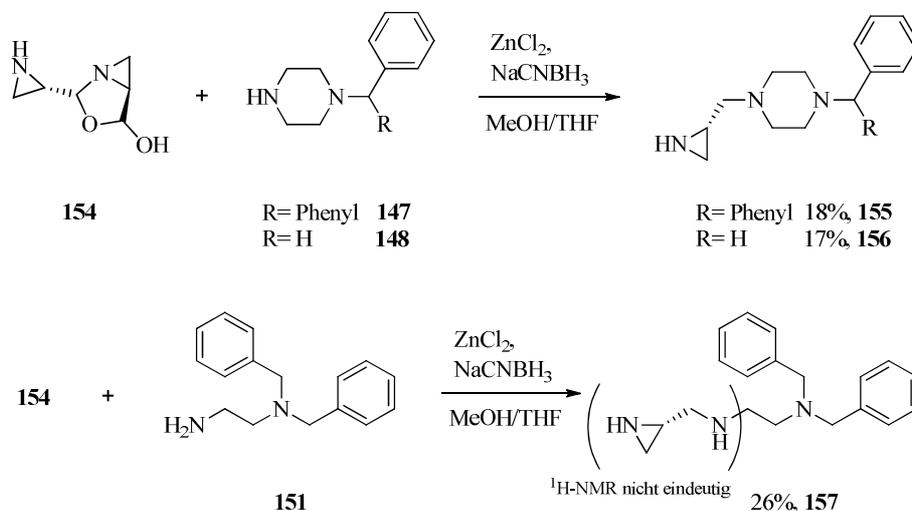
Darstellung der Aziridin-Komponente

Der zur reduktiven Aminierung benötigte Aziridin-2-carboxaldehyd-Baustein wurde nach Vorschriften von Hili et al.^[138] und Assem et al.^[139] dargestellt: Im ersten Schritt wird L-Serin mit *n*-Propanol zu **152** verestert, um anschließend über eine Mitsunobu-Reaktion den (*S*)-Aziridin-2-carbonsäureester **153** zu erhalten. Dieser wird mit DIBAL-H zum Aldehyd reduziert, der nach Aufarbeitung als Dimer **154** anfällt.



Schema 3-66: Darstellung des (*S*)-Aziridin-2-carboxaldehyds als Dimer **154**

Die reduktive Aminierung des Dimers **154** mit den Aminen **147**, **148** und **151** führt zu den gewünschten Verbindungen mit Aziridin-Baustein:



Schema 3-67: Reduktive Aminierung von **154** zu den Zielverbindungen **155**, **156** und **157**

Die Ausbeuten der reduktiven Aminierungen fielen sehr niedrig aus. Möglicherweise wurden die polaren Verbindungen aus der Wasserphase nicht vollständig extrahiert. Weiterhin war die Aufreinigung der sehr polaren Verbindung **157** wegen der niedrigen Trennleistung an Kieselgel und RP-18 (HPLC) schwierig, sodass letztlich kein Reinstoff erhalten wurde und die Reinheit auf 50-90% geschätzt werden muss (siehe Experimentaltel, Kap. 8). Die vorläufig angegebene Struktur von **157** ist noch nicht endgültig gesichert, denn obwohl ESI-MS und ^{13}C -NMR-Spektrum für dieses Reaktionsprodukt sprechen, ist das ^1H -NMR-Spektrum widersprüchlich: Die charakteristischen Aziridin-Protonen für die CH- und CH_2 -Gruppe des Rings liegen nicht bei 2.1 ppm und 1.4 - 1.8 ppm, sondern bei 2.6 ppm und 1.8 - 2.1 ppm.

Die niedrige Reinheit muss bei der Bestimmung der inhibitorischen Aktivität wie folgt bedacht werden: Hemmwerte werden im Allgemeinen logarithmisch interpretiert, ein „Konzentrationsfehler“ um Faktor zwei beeinflusst die Bewertung als aktive oder inaktive Substanz praktisch nicht. Problematisch daran ist allerdings, dass bei Enzymhemmung eine der unbekanntenen Verunreinigungen für die Hemmung verantwortlich sein könnte und so eine Fehlinterpretation von Struktur und Wirkung geschehen würde. Ist das Stoffgemisch jedoch im enzymatischen Test inaktiv, so trifft dies für alle Hauptbestandteile des Stoffgemischs zu.

Testergebnisse und Diskussion

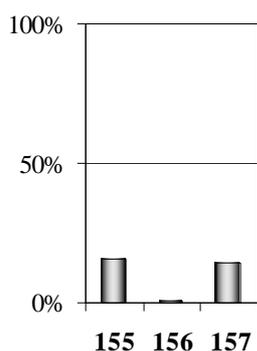


Abbildung 3-47 ist zu entnehmen, dass keines der dargestellten Aziridine eine Enzymhemmung an SARS-CoV-PL^{pro} aufweist. Der Versuch, mit dem aktiven Zentrum kovalent reagierende Inhibitoren zu entwickeln, ist damit noch nicht gelungen. Die Verbindungen könnten sterisch noch zu anspruchsvoll sein und nicht in die tunnelförmige Bindestelle passen, die sonst den linear angeordneten Substratabschnitt Gly-Gly aufnimmt. Möglicherweise ist auch die Affinität zum Protein noch zu gering.

Abb. 3-47: Screening an SARS-CoV-PL^{pro} (100 μM)

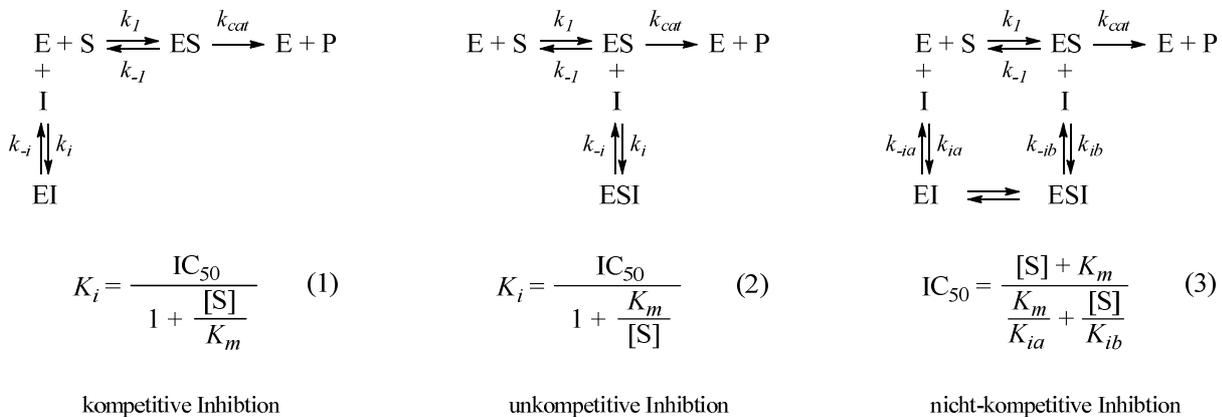
4. Enzymkinetik im SARS-Projekt

4.1. Einführung

Enzyme sind Biokatalysatoren, die die Aktivierungsenergie einer chemischen Reaktion herabsetzen und damit die Reaktionsgeschwindigkeit erhöhen. Auf der Enzymoberfläche erlaubt die molekulare Struktur die Ausbildung von Bindetaschen, mit denen die Enzyme das Substrat für die Reaktion geeignet ausrichten und binden. Es werden aber auch reaktionsbegünstigende, lokale Bedingungen in der Nähe des Reaktionszentrums geschaffen, die sonst in Lösung nicht möglich wären (bspw. hydrophobe Regionen oder Polarisierung des Substrats). Dank der Enzyme besitzt die lebende Zelle eine ganze „Chemiefabrik“, die Reaktionen bereits bei moderaten Temperaturen (0 - 40 °C) durchzuführen vermag.

Unter Enzyminhibition ist die Verminderung der Umsetzungsgeschwindigkeit einer Enzym-Substrat-Reaktion zu verstehen. Der Enzyminhibitor bindet dabei entweder an freies Enzym oder an den Enzym-Substrat-Komplex. Wenn die Bindung kovalent erfolgt, zeigt sich dies nach Inhibitor-Zugabe in einer Zunahme der Inhibition über die Zeit (zeitabhängige Hemmung). Der mit dem Enzym kovalent reagierende Inhibitor kann irreversibel oder reversibel binden, je nachdem ob eine Rückreaktion möglich ist. Kovalent-reversible Inhibitoren können allerdings bei schneller Rückreaktion auch nicht-zeitabhängige Hemmung zeigen.

Ein nicht-kovalent bindender Inhibitor bindet dagegen meist nicht-zeitabhängig (Ausnahme „slow-binding“) und immer reversibel. Man unterscheidet dabei die drei Inhibitionsmechanismen „kompetitiv“, „unkompetitiv“ und „nicht-kompetitiv“^[140]:



Schema 4-1: Reversible Inhibition: Übersicht über die drei Inhibitionsmechanismen.

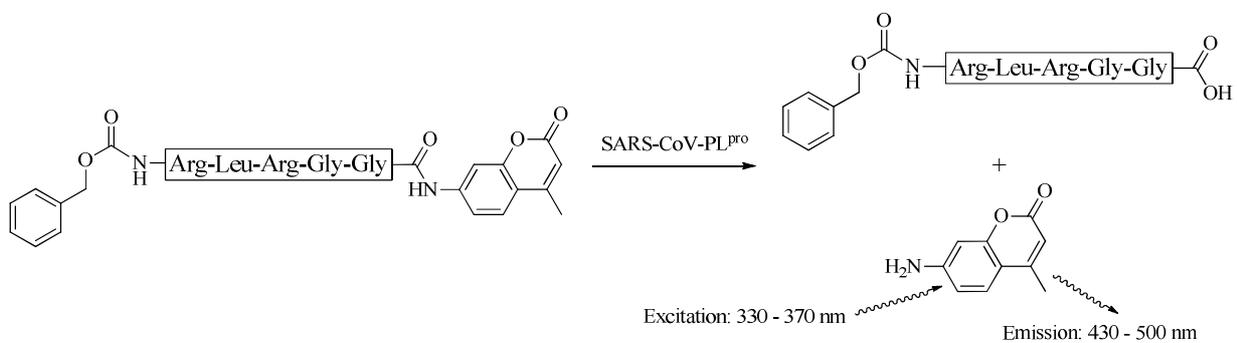
Die Gleichungen (1) und (2) beschreiben dabei den Zusammenhang zwischen K_i und IC_{50} (Cheng-Prusoff-Beziehung). Die nicht-kompetitive Inhibition stellt eine Mischung zwischen den beiden anderen dar und wird auch als gemischte Inhibition bezeichnet. Während die Inhibitionskonstante K_i die Affinität zwischen Enzym und Inhibitor beschreibt und vom Massenwirkungsgesetz ($K_i = k_{-i} / k_i$) stammt, ist der IC_{50} -Wert nur eine Näherung für die Affinität und wird durch das verwendete Substrat (K_m), dessen Konzentration $[S]$ und die Enzymkonzentration beeinflusst. Bei der kompetitiven Inhibition wird allerdings $K_i = IC_{50}$ bei $[S] \ll K_m$.

Der IC_{50} -Wert wird experimentell bestimmt, indem man diejenige Inhibitorkonzentration ermittelt, die zu einer Halbierung der Enzym-Substrat-Reaktionsgeschwindigkeit führt. Der K_I -Wert kann auf ähnliche Weise erhalten werden, doch muss dazu die Versuchsreihe bei verschiedenen Substratkonzentrationen wiederholt werden.

Beispielsweise erhält man für das Isoindolin **118** nach Gleichung (1) einen K_I -Wert von 2.7 μM ($IC_{50} = 2.9 \mu\text{M}$). Bei entsprechenden Assaybedingungen und Hemmechanismus kann also der Unterschied zwischen K_I - und IC_{50} -Wert vernachlässigbar klein sein, sodass der IC_{50} -Wert eine ausreichend genaue Schätzung für den experimentell aufwändiger zu bestimmenden K_I -Wert ist.

4.2. Biochemische Bestimmungsmethoden

Die Enzym-Substrat-Reaktion lässt sich in einem biochemischen Assay untersuchen. Dazu wird das Enzym in wässriger Lösung (Assaypuffer) vorgelegt und mit Substrat versetzt. Bei Proteasen sind die Substrate meist Oligopeptide und besitzen die natürliche „Erkennungssequenz“, die dann zwischen P1 und P1' vom Enzym hydrolysiert wird. Die entstehenden zwei Hydrolyseprodukte können durch HPLC bestimmt werden, jedoch muss dafür zu bestimmten Zeitpunkten eine Probe entnommen werden, oder parallele Ansätze nacheinander „abgestoppt“ werden. Eine kontinuierliche Beobachtung der Enzym-Substrat-Reaktion erlauben die fluorimetrischen Assays, man verwendet dann als Substrat ein Oligopeptid, das beispielsweise an den Enden eine FRET-Donor- und FRET-Akzeptorgruppe trägt (FRET-Substrat), sodass die Spaltung des Substrats eine Zunahme der Fluoreszenz bewirkt. Weiterhin kann ein Fluoreszenz-Substrat verwendet werden, das an Stelle der P1'-Aminosäure mit einem peptidisch angeknüpften Fluoreszenzfarbstoff wie 7-Amino-4-methylcumarin (AMC) C-terminal abschließt. Die Protease spaltet dann bei der Enzym-Substrat-Reaktion das AMC ab und dessen Konzentration wird fluorimetrisch erfasst:



Schema 4-2: Fluorimetrischer Assay: Spaltung des Fluoreszenz-Substrats durch die SARS-CoV-Papain-like-Protease.

Man misst also die Fluoreszenzzunahme über die Zeit und die Steigung dieser Geraden (dF/min) ist das Maß für die Enzymaktivität. Die Zugabe eines Inhibitors mit nicht-zeitabhängigem Inhibitionsmechanismus führt zu Geraden flacherer Steigung (s. Abb. 4-1 links). Werden die von verschiedener Inhibitorkonzentration erhaltenen Steigungen (Enzymaktivitäten) gegen die Konzentration aufgetragen, erhält man eine Kurve wie in Abbildung 4-1 rechts, aus der der IC_{50} -Wert des Inhibitors ermittelt werden kann.

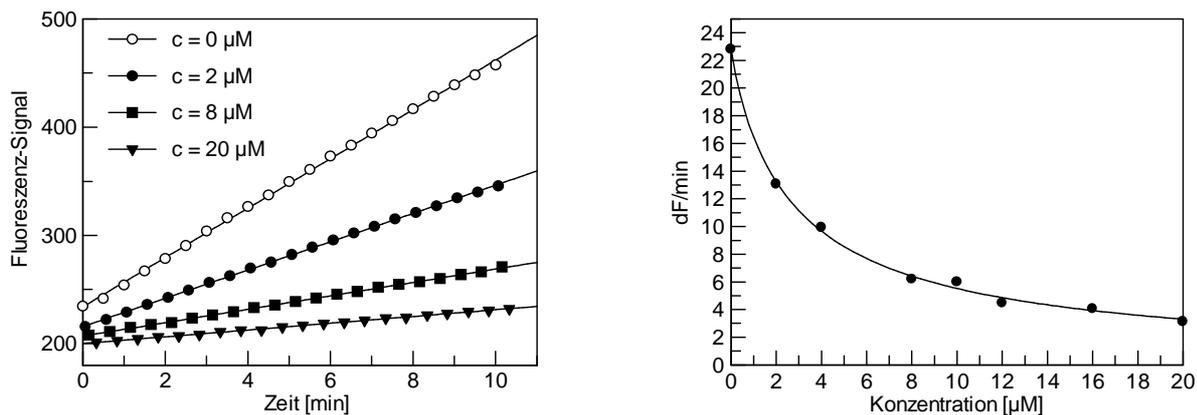


Abb. 4-1: Links: Fluoreszenzzunahme über die Zeit während der Inkubation von SARS-CoV-PLpro bei verschiedenen Konzentrationen von **118**. Rechts: Resultierende, konzentrationsabhängige Hemmkurve des Inhibitors **118**.

Zur Bestimmung des IC_{50} -Werts wird die konzentrationsabhängige Hemmkurve von Abbildung 4-1 durch nichtlineare Regression mit dem Programm GraFit^[141] berechnet. Dabei erfolgt ein 4-Parameter- oder 3-Parameter-Fit an die Hill-Gleichung^[142]:

$$\text{Enzymaktivität} = \text{Min} + \frac{\text{Max} - \text{Min}}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^h} \quad (4)$$

$$\text{Enzymaktivität} = \frac{\text{Max}}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^h} \quad (5)$$

Die konzentrationsabhängigen Enzymaktivitäten stammen aus der experimentellen Bestimmung mittels Bioassay und die Parameter „Min“, „Max“, IC_{50} und h werden durch den Fit gewählt ($[I]$: Inhibitorkonzentration). Unter „Min“ ist das Background-Signal bei vollständiger Enzymhemmung zu verstehen und „Max“ ist die maximale Enzymaktivität ohne Inhibitor. Der Exponent h wird als „slope“ oder auch als Hill-Koeffizient bezeichnet. Wenn kein Background-Signal existiert, kann auch Gleichung (5) zur Bestimmung des IC_{50} -Werts verwendet werden, der Fit erfolgt dann nur an 3 Parameter („Min“ = 0).

Hat ein Inhibitor Fluoreszenzlicht-quenchende Eigenschaft („innerer Filtereffekt“), gibt eine Absenkung des Fluoreszenz-Signals zum Zeitpunkt 0 (s. Abb. 4-1 links) im Vergleich zu einem nicht-quenchenden Inhibitor Auskunft über die Stärke des Quenchens. Bei korrigierten Messungen wird das Fluoreszenz-Signal durch den Faktor geteilt, um den der quenchende Inhibitor die Fluoreszenz von freiem AMC proportional vermindert. Im Korrekturfaktor bleibt die Änderung der AMC-Konzentration während dem Assayverlauf unberücksichtigt, es handelt sich also nur um eine Abschätzung und eignet sich nicht für die Fälle, in denen ein starkes Quenching vorliegt.

4.3. Diskussion

Die Experimente zur Enzymhemmung hatten die Aufgabe zu erfüllen, von neu synthetisierten Verbindungen die inhibitorische Potenz zu bestimmen. Nachdem die vorliegende Arbeit ihren Schwerpunkt auf der Findung neuer Wirkstoffstrukturen und deren Optimierung hat, waren die angestellten fluorimetrischen Bestimmungen von Enzym-Restaktivitäten und IC_{50} -Werten ausreichend, um den Einfluss von Strukturvariationen quantitativ zu erfassen. Von zwei literaturbekannten Inhibitoren^[18] (eigene Nummerierung: Verbindungen **2** und **12**) wurden die IC_{50} -Werte

bestimmt. Beide Inhibitoren **2** und **12** wurden durch den in dieser Arbeit durchgeführten Assay mit einer etwa 1.5-fach schwächeren Affinität charakterisiert, als von Ratia et al.^[18] publiziert wurde. Dies ist vermutlich auf das von Ratia et al. verwendete, andere Substrat zurückzuführen (näheres siehe Kapitel 3.1, Diskussion). Ansonsten erwies sich der Assay als sehr gut reproduzierbar, was sich auch in den niedrigen Standardabweichungen der IC₅₀-Werte widerspiegelt. Im Rahmen der enzymatischen Testung könnte man über die Ermittlung von IC₅₀-Werten hinaus noch weitere Untersuchungen anstellen:

Von Ratia et al.^[18] war bekannt, dass die Benzamid-Inhibitoren kompetitiv, reversibel, nicht-kovalent und nicht-zeitabhängig binden. Dies wurde bei den in dieser Arbeit dargestellten Benzamid- und Isoindolin-Derivaten nicht erneut kontrolliert, da die nicht-zeitabhängigen Hemmkurven keinen Anlass gaben, an dem reversiblen Mechanismus zu zweifeln. Außerdem besitzen die meisten dargestellten Verbindungen keine reaktiven Gruppen (bis auf das Benzonitril **14**, das Thiol **27** und die Aziridine), sodass ein kovalenter Hemmechanismus unwahrscheinlich ist. Diesen könnte man mittels Verdünnungs-Assay oder Dialyse-Experiment bei den dargestellten Verbindungen experimentell ausschließen.

Weiterhin können die Inhibitoren durch eine experimentelle Bestimmung der Affinitätskonstante K_i näher charakterisiert werden, es müssten dazu Inkubationen bei verschiedenen Inhibitor- und Substratkonzentrationen durchgeführt werden. Eine andere Möglichkeit zur direkten Bestimmung von K_i läge in der isothermalen Titrationskalorimetrie (ITC).

Ein fluorimetrischer Assay ist grundsätzlich empfindlich gegen Störungen des Fluoreszenzsignals durch die getesteten Wirkstoffe. Innerer Filtereffekt und Eigenfluoreszenz sind als bekannte Probleme zu nennen^[143]. In dieser Arbeit erwiesen sich vor allem kommerziell erworbene Screening-Substanzen als Fluoreszenzlicht-quenchend oder fluoreszierend. Korrekturmessungen zur Fehlerabschätzung wurden durchgeführt und sind an den entsprechenden Stellen erläutert. Die Hemmstärke der „problematischen“ Verbindungen war jedoch vor und nach Korrektur relativ niedrig (IC₅₀ etwa 50 µM), sodass von ihrer strukturellen Weiterentwicklung abgesehen wurde. Wenn stärker wirksame Enzyminhibitoren mit ausgeprägter Störung der Fluoreszenzmessung gefunden werden, sollte deren Affinität durch einen anderen Assay bestimmt werden. Beispielsweise könnten die nach Enzymreaktion freigesetzten Substrat-Spaltprodukte mittels HPLC quantifiziert werden.

Eine weitere Information zum Hemmechanismus würde die Surface-Plasmon-Resonanz (SPR) liefern: Mittels SPR-Experiment ließen sich die k_{on} - und k_{off} -Werte einzelner Inhibitoren bestimmen und damit deren Hemmkinetik näher charakterisieren. Nachdem Ratia et al.^[18] durch Röntgenstrukturanalyse zeigen konnten, dass die Inhibitorbindung von einer Konformationsänderung in der Loop-Region begleitet wird, wäre die Bestimmung von k_{on} - und k_{off} -Werten besonders interessant. Luckner et al.^[144] konnten am Enzym InhA (bakterielle Fettsäuresynthese des Erregers *Mycobacterium tuberculosis*) zeigen, wie ein hochaffiner Inhibitor einen Loop strukturell stabilisiert und dadurch die Halbwertszeit des Protein-Inhibitor-Komplexes stärker verlängert, als man es von der Affinitätszunahme des Inhibitors im Vergleich zu homologen Derivaten erwartet hätte. So könnten möglicherweise auch am Enzym SARS-CoV-PL^{pro} durch Bestimmung von k_{on} - und k_{off} -Werten Inhibitoren vom „slow-binding“ Typ erkannt werden, die ihre Affinität dann eher von einer erschwerten Abdissoziation (k_{off} klein, lange Halbwertszeit) als von einer guten Assoziation (k_{on} groß, schnelle Komplexbildung) erhalten. Außerdem stellt dies einen Störfaktor für die computer-gestützte Affinitätsabschätzung dar, denn diese beschreibt nur die Ligand-Interaktion zu einer starren Protein-Konformation. Kommt es jedoch zu Rearrangements in einer Region der Bindetasche, wird auch vom Protein Energie freigesetzt oder aufgebraucht, die aufgrund ähnlicher Größenordnung von Torsionsenergie zu Wechselwirkungsenergie erheblichen Einfluss auf die Affinität nimmt und deren Vorhersage damit unmöglich macht^[145].

5. Computerbasierte Wirkstoffsuche im HIV-Projekt

5.1. Auswahl geeigneter Proteinstrukturen

Bei einer strukturbasierten Ligand-Suche müssen zunächst eine oder mehrere Proteinstrukturen ausgewählt werden, welche eine mögliche Bindestelle für niedermolekulare Liganden beinhalten. Solange für eine solche Bindestelle noch keine Ligandbindung mittels Röntgenstruktur gezeigt wurde, stellt die Konformation der Bindetasche im möglichen Komplex eine das Screening verkomplizierende Unsicherheit dar. Im Falle der HIV-1 Vif-Bindestelle auf Elongin-C zeigt die Röntgenstruktur 3DCG die Adressierung der Bindestelle durch das Vif₁₄₀₋₁₅₆-Fragment und sollte aufgrund einer lipophilen Haupttasche geeignet für virtuelles Screening sein. In Abbildung 5-1 ist diese Protein-Protein-Interaktion zu sehen. Vom Vif-Fragment binden Leucin-145 in der lipophilen Haupttasche und Valin-142 in einer lipophilen Nebentasche (rote Oberflächen); weitere H-Brücken-Wechselwirkungen und das zur Bindung relevante ₁₄₄SLQ₁₄₆-Motif sind gekennzeichnet:

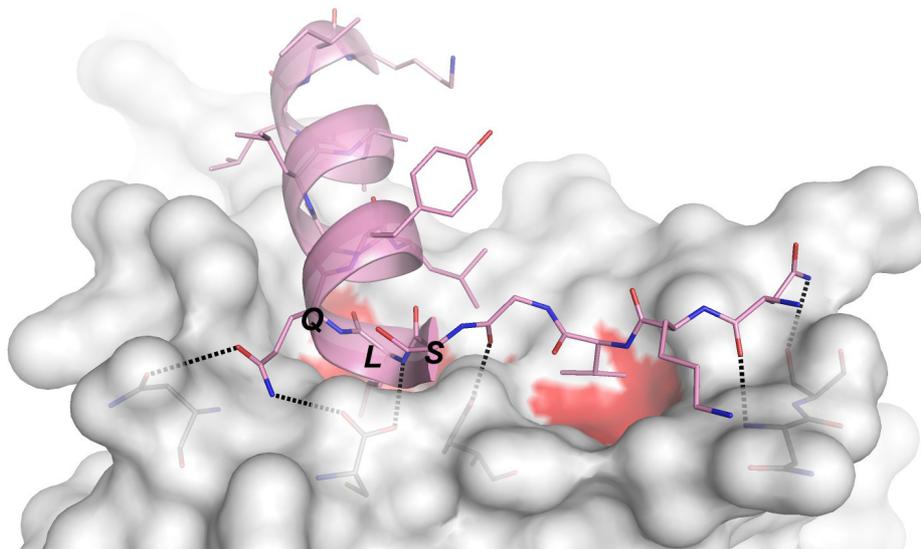


Abb. 5-1: Proteinstruktur 3DCG, abgebildet ist die Interaktion zwischen Elongin-C und dem Vif-Fragment.

Beurteilung der Proteinflexibilität

Nach Marcsisin und Engen^[146] liegen im EloBC-Komplex EloB geordnet und EloC ungeordnet vor, im gebundenen Zustand mit Vif erfährt EloC dann eine strukturelle Ordnung (laut Geschwindigkeitsunterschieden in Deuterierungsexperimenten). Die Komplexbildung von Vif mit EloBC wird je nach Experiment mit einem K_d von $1.9 \mu\text{M}$ ^[146] und $1.2 \mu\text{M}$ ^[50] beschrieben (HX-MS mit wtVif und ITC mit wtVif₁₃₉₋₁₇₆). Die zur Bindung essentielle Vif-Sequenz ist ₁₄₄SLQ₁₄₆, die Triple-Alanin-Mutante zeigt im ITC-Experiment entsprechend keine Bindung^[50]. Auf eine gewisse Proteinflexibilität deutet auch die NMR-Struktur 2JZ3^[147] hin, bei der ein Komplex von humanem EloBC und murinem SOCS3 NMR-spektroskopisch untersucht wurde. Der Vergleich der 20 NMR-Lösungsstrukturen ergibt, dass bei Elongin-C im SOCS3-Bindebereich die Aminosäuren Tyr76 und Cys112 (C-Terminus) mit verschiedenen Konformationen im Ensemble der 20 Strukturen hinterlegt wurden. Weiterhin beschreiben die Autoren, dass die SOCS3-nahe Loop-Region Ser87 bis Phe93 aufgrund Peakverbreiterung nur unvollständig zugewiesen werden konnte und der Loop damit unstrukturiert ist.

Die Konformation von Elongin-C unterscheidet sich etwas zwischen der NMR-Struktur 2JZ3 und der Röntgenstruktur 3DCG: Die beiden lipophilen Taschen sind bei vielen NMR-Einzelstrukturen miteinander verbunden und es ergibt sich dadurch eine insgesamt größere Interaktionsfläche zwischen Ligand und Elongin-C.

Für das virtuelle Screening werden daher die Kristallstruktur 3DCG und drei Konformationen der NMR-Lösungsstruktur von 2JZ3 ausgewählt (State08, State15 und State18). Bei der Auswahl der Konformationen wurde darauf geachtet, dass sich die Bindetaschen möglichst voneinander unterscheiden, sodass die Vielfalt der 20 plausiblen NMR-Strukturmodelle repräsentiert wird. Es ergeben sich damit vier unabhängige vHTS-Projekte: aus jedem Projekt sollen dabei Liganden hervorgehen, die die jeweilige Protein-Konformation adressieren. Dadurch soll die Chance erhöht werden, eine möglichst affine, bzw. in ihrer Affinität weiter steigerbare Leitstruktur zu finden.

In Abbildung 5-2 sind die drei ausgewählten Konformationen mit dem durch NMR-Spektroskopie aufgelösten Teil des SOCS3-Peptids gezeigt (Sequenz: VATLQ). Die Oberflächen veranschaulichen, wie unterschiedlich die Bereiche der Protein-Protein-Interaktion gestaltet sein können. Im virtuellen Screening werden daher niedermolekulare Liganden gesucht, die an diese NMR-Strukturmodelle möglichst gut binden und sie damit stabilisieren.

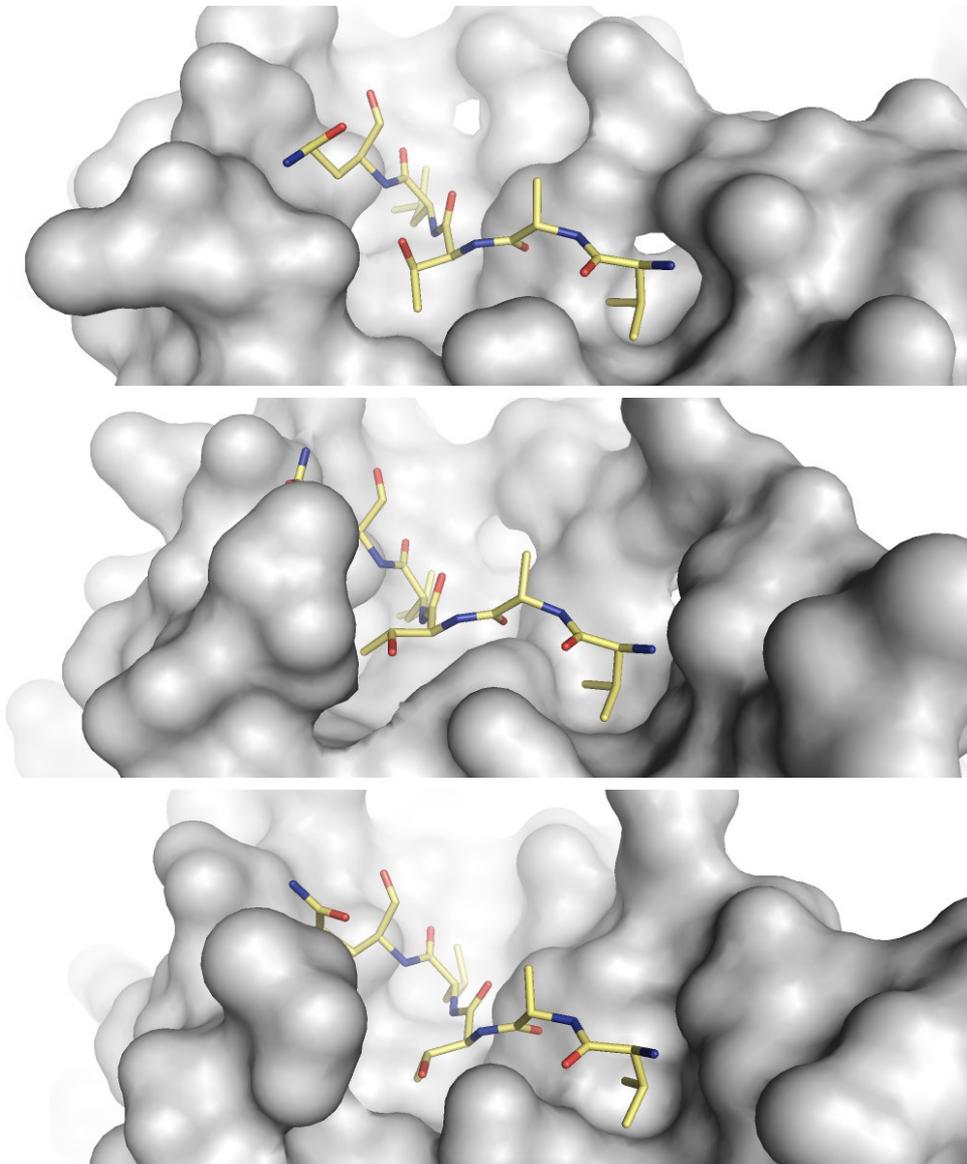


Abb. 5-2: Von oben nach unten: State08, State15 und State18 der NMR-Struktur 2JZ3,jeweils mit dem gebundenen SOCS3-Fragment

5.2. Virtuelles Screening

Die wichtigste Wechselwirkung zu Elongin-C ist laut Ala-Scan die Adressierung einer lipophilen Tasche, die von allen SOCS-Proteinen und Vif durch Leucin adressiert wird. Bei SOCS3 führt bereits der Austausch dieses Leucins mit Alanin zum vollständigen Verlust der Affinität zu EloBC, wohingegen ein einzelner Austausch der anderen Aminosäuren die Affinität nur mindert^[147]. Bei der Suche nach neuen Liganden wird daher dieser lipophilen Tasche besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Ansonsten sollte noch die Tasche des Valins adressierbar sein und der Ligand sollte dazu günstige H-Brücken eingehen, so wie auch Vif einige H-Brücken ausbildet (s. Abb. 5-1).

Als Datenbank wird diesmal die von Kapitel 2.5.5 bekannte Specs-Datenbank vorgefiltert. Bei einem Testdocking mit der etwa 20.000 Moleküle umfassenden Zinc-Clean-drug-like-T70-Datenbank an der Struktur 3DCG ergaben nur Liganden mit hohem cLogP-Wert und hohem Molekulargewicht hoch gescorte Bindemodi. Folglich kann die Rechenzeit der vier Screeningprojekte dadurch verkürzt werden, dass kleine und hydrophile Moleküle im Vorfeld aus der Datenbank herausgefiltert werden. Dazu wird mit dem Programm OMEGA/FILTER^[88] der cLogP von 1.5 bis 6.0 und ein Molekulargewicht von 350 bis 600 g/mol festgelegt, was die Datenbank von 361.671 auf 187.232 Moleküleinträge verkleinerte.

Das Dockingprogramm GOLD wurde wie beim SARS-Projekt eingesetzt. In einer ersten Runde wird die Substanzbibliothek mit wenig rechenaufwändigen Einstellungen gedockt. Dabei werden zwei lipophile Constraints in den beiden lipophilen Taschen (s. Abb. 5-1, rote Bereiche) sowie weitere H-Brücken-Constraints definiert, um die Ligandstrukturen nach möglichst wenigen genetischen Operationen in einen plausiblen Bindemodus zu zwingen. In der nächsten Runde wird nur noch ein Teil der Ergebnisse gedockt, dafür mit erhöhtem Rechenaufwand pro Molekül und flexiblen Aminosäureresten (s. Abb. 5-3). An der Protein-Konformation 2JZ3 State18 wurde das Screening testweise mit 3 Runden durchgeführt, dabei stellte sich jedoch diese 2. Runde („Zwischenrunde“ mit etwas erhöhtem Suchaufwand) als entbehrlich heraus.

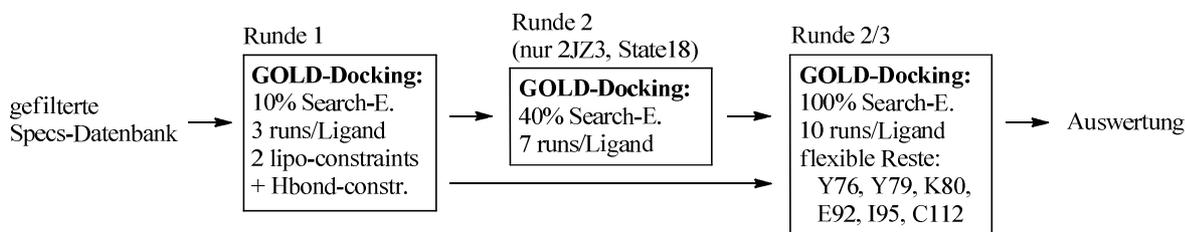


Abb. 5-3: Flussdiagramm zur Veranschaulichung der 4 virtuellen Screeningprojekte an den Strukturen 3DCG und 2JZ3 State 08, 15, 18

Zur Auswertung werden neben den von GOLD ausgegebenen Chemscore- und ChemPLP-Werten noch die pK_i -Werte nach SFCscore-Rescoring herangezogen (SFCscore 290m^[148]). Weiterhin erlaubt das SFCscore-Rescoring eine genauere Analyse der am Score beteiligten Deskriptoren, sodass die Ergebnislisten auch nach den Beiträgen von H-Brückenbindung, vergrabene Oberfläche und dem Verhältnis vergrabene/exponierte Oberfläche sortiert werden können. Gerade die Vergrabenheit des Liganden stellt hier eine besonders zu berücksichtigende Eigenschaft dar, denn wie man in Abbildung 5-1 erkennen kann, ist der Bindebereich bei der Kristallstruktur 3DCG relativ „offen“ und damit entsprechend schwierig mittels kleiner Liganden zu adressieren. Die Interaktionsoberflächen bei den Lösungsstrukturen von 2JZ3 sind dagegen „taschenförmiger“ und damit besser adressierbar (siehe dazu Abb. 5-2).

Nachdem bei diesem Projekt Protein-Protein-Interaktionsinhibitoren gefunden werden sollen, werden im folgenden Abschnitt die Besonderheiten von Protein-Protein-Interaktionen und die daraus folgenden Konsequenzen für die Substanzauswahl erklärt.

Strategien bei der Suche nach Protein-Protein-Interaktionsinhibitoren („PPI-Inhibitoren“)

Protein-Protein-Kontakte sind häufig von großer Oberfläche ($> 1000 \text{ \AA}$) und von recht verschiedener Gestalt: sie können eher flach sein, eher verzahnt (oberflächenkomplementär), weniger oder mehr lipophil, hydratisiert und plastisch (= formbar)^[149]. Es wird angenommen, dass die Affinität zwischen zwei Proteinen oftmals von der Interaktion einer kleinen, lipophilen Core-Region stammt, wohingegen die restliche Kontaktfläche, die sog. Rim-Region, nur gering zur Bindung beiträgt^[149,150]. Übertragen auf Elongin-C wird die Core-Region von der lipophilen Haupttasche (s. Abb. 5-4, linke, rote Mulde; s. auch Abb. 5-1) gebildet, die das für die Affinität notwendige ${}_{144}\text{SLQ}_{146}$ -Motif von Vif aufnimmt. Ein virtuelles Screening an der Kristallstruktur sollte daher primär auf die Adressierung der lipophilen Haupttasche abzielen. Der möglichen Plastizität der Kontaktfläche wird durch separates Screening an drei ausgewählten Konformationen der 20 NMR-Strukturmodelle Rechnung getragen (s. Abb. 5-4, rechts).

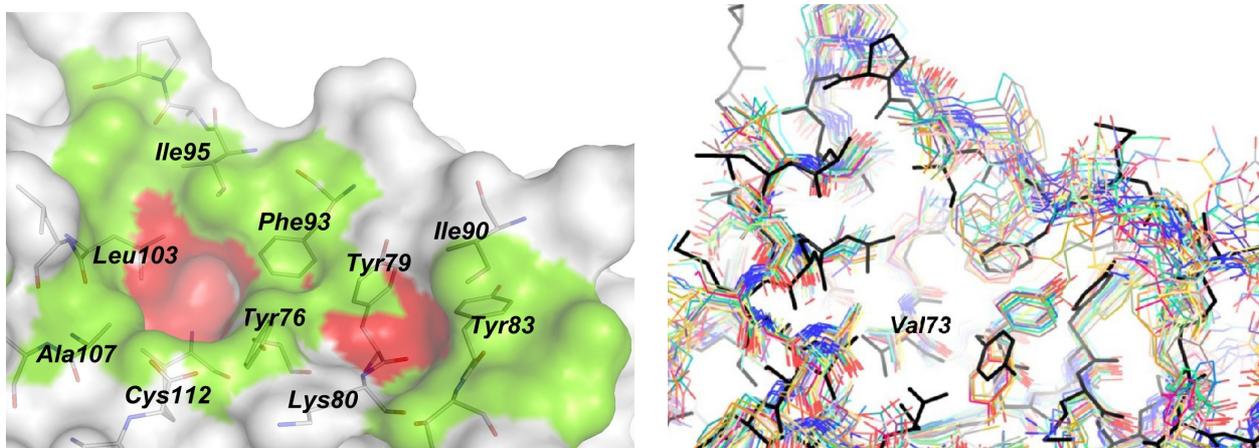


Abb. 5-4: Links: Kristallstruktur 3DCG, PPI-Oberfläche auf Elongin-C. Rot: Core-Region, Grün: Rim-Region.

Rechts: Überlagerung der Elongin-C-Konformationen von Kristallstruktur 3DCG (schwarz) und NMR-Strukturensemble 2JZ3 (bunt).

Grundsätzlich führen bei PPI-Inhibitoren dieselben Wechselwirkungen zur Protein-Ligandbindung, wie bei den bisher in Kapitel 2 und 3 behandelten Protease-Inhibitoren. Es überrascht daher nicht, dass neben der schwachen Tendenz zu größeren Molekülen die Ligandeffizienzen (freie Ligand-Bindungsenthalpie pro nicht-Wasserstoffatom) nur geringfügig schlechter als bei Liganden für „herkömmliche“ Targets ausfallen und mit denen von Protease-Inhibitoren vergleichbar sind^[150]. Auch wenn bisher noch wenig über die Erfolgchancen virtueller Screeningprojekte zur PPI-Inhibitorsuche bekannt ist (eine Übersicht geben Zhong et al.^[151]), sollten die an den „herkömmlichen“ Targets etablierten Computermethoden hier ebenso einsetzbar sein. Bei den Scoringfunktionen könnte aber eine wissensbasierte Scoringfunktion wegen der Unterrepräsentation von PPI-Ligand-Komplexen im Trainingssatz eher versagen. Schwieriger gestaltet sich jedoch die Wahl einer adäquaten Substanzbibliothek. Während historisch gewachsene Substanzbibliotheken vorwiegend zur Adressierung von „herkömmlichen“ Targets (Rezeptoren) synthetisiert wurden, sind die dabei eingesetzten „alten“ Scaffolds womöglich weniger geeignet, um hohe Affinitäten an den Bindestellen von Protein-Protein-Kontakten zu erzielen^[149,150]. Um den für PPI-Inhibitoren zukünftig benötigten chemischen Raum von den „alten“ Substanzbibliotheken abzugrenzen, stellten Morelli et al.^[152] eine „Rule-of-Four“ auf: Molekulargewicht $> 400 \text{ g/mol}$, LogP-Wert > 4 , Anzahl der Ringe > 4 , Anzahl der H-Brücken-Akzeptoren > 4 . Die verwendete Specs-Datenbank sollte wegen ihrer größeren und lipophileren Verbindungen demnach auch die geeignetere Substanzbibliothek sein, als beispielsweise eine rein nach „drug-likeness“ (d. h. „Rule-of-Five“^[92]) zusammengestellte Substanzbibliothek.

Die visuelle Beurteilung der Bindemodi von virtuellen Screening-Hits erfolgt schließlich wie im SARS-Projekt. Die Bindetasche(n) bringen nun jedoch mit sich, dass viele Liganden stark solvens exponiert gedockt werden, und damit ist unvermeidlich, auch Liganden mit geringerer Vergrabenheit auszuwählen. Besonderes Augenmerk wird auf Liganden gelegt, die einzelne, sehr vergrabene Interaktionen ausbilden, wie z. B. eine günstig positionierte Methylgruppe an einem Aromaten, oder eine H-Brücke in einer tiefen Tasche. Aufgrund der Oberflächengegebenheit der Kristallstruktur 3DCG sind diese vergrabenen Interaktionen nur bei den NMR-Strukturmodellen zu erwarten. Wells und McClendon^[150] berichten in diesem Zusammenhang über besonders hohe Affinität bei PPI-Inhibitoren, die abweichend vom physiologischen Protein-Protein-Kontakt eine Konformation stabilisieren, bei der sogar eine neue, vergrabene Tasche durch den Ligand geöffnet wurde („Cryptic Pocket“). Die bekannte Flexibilität von Elongin-C (s. oben) lässt damit auch diese Möglichkeit zur Optimierung von PPI-Inhibitoren offen.

5.3. Substanzauswahl

Kristallstruktur 3DCG

Die lipophile Haupttasche der Struktur 3DCG wird von den Aminosäuren Val73, Tyr76, Phe93, Ile95, Leu103, Leu104, Ala107 und Cys112 gebildet. Die Carboxy-Gruppe von Cys112 und der Phenolsauerstoff von Tyr76 eignen sich dabei zur Adressierung mittels H-Brücken. Diese beiden Aminosäuren Cys112 und Tyr76, sowie das entferntere Gln108, sind auch H-Brücken-Bindungspartner gegenüber dem ₁₄₄SLQ₁₄₆-Motif (s. Abb. 5-1), auf ihre Adressierung sollte daher bei der Ligandauswahl möglichst geachtet werden. Die gemischt lipophil-polare Nebentasche (sonst adressiert von Valin) bilden die Aminosäuren Tyr76, Tyr79, Lys80, Thr84 und Ile90. In den folgenden Abbildungen sind die kommerziell erworbenen Moleküle nach ähnlicher Struktur gruppiert, wobei zur Hervorhebung diejenigen Molekülteile grau hinterlegt wurden, die laut Dockingpose in der lipophilen Haupttasche binden.

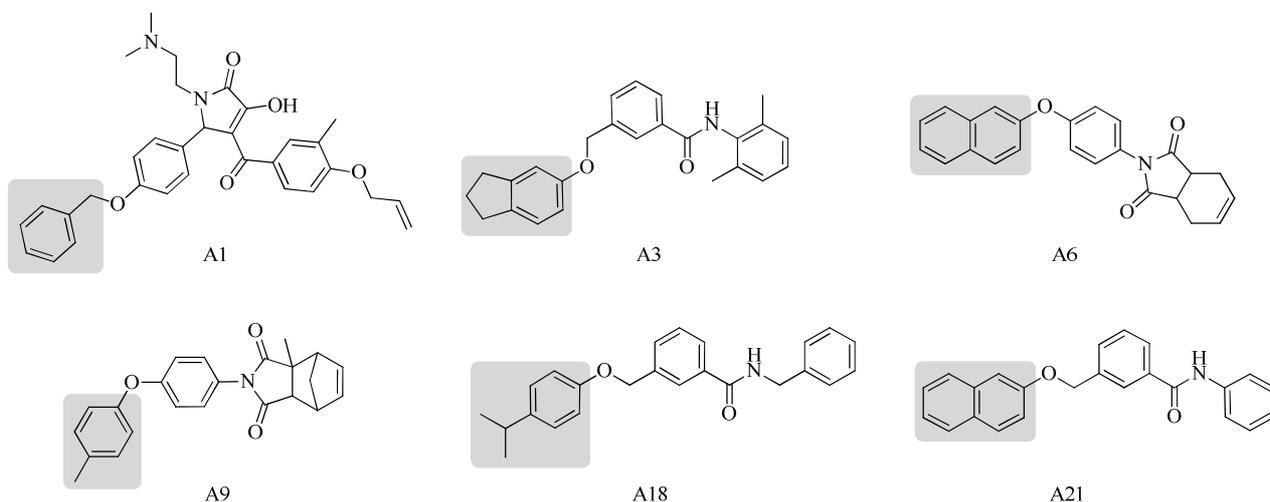


Abb. 5-5: Die lipophile Haupttasche wird hier über Ether-verknüpfte Kohlenwasserstoffe adressiert.

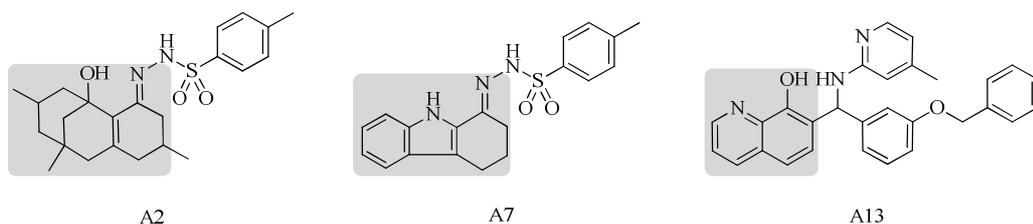


Abb. 5-6: Diese Substanzen adressieren die Carboxygruppe von Cys112 mit einer H-Brücke.

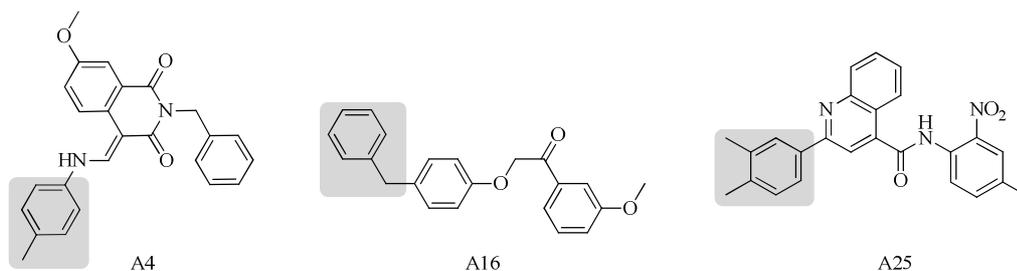


Abb. 5-7: Weitere kommerziell erworbene Verbindungen

Bis auf A2 adressieren alle Verbindungen die lipophile Haupttasche mit einer aromatischen Gruppe. So bilden diese Aromaten π/π -Interaktionen zu Tyr76 aus, da der Phenylring von Tyr76 eine „Seitenwand“ dieser Tasche darstellt. Als Beispiele sind in Abbildung 5-8 die Bindemodi von A6 und A13 gezeigt (links und Mitte). Zum Vergleich ist rechts die Pose der literaturbekannten Verbindung VEC-5 abgebildet (Struktur s. Abb. 1-7, Kapitel 1.2).

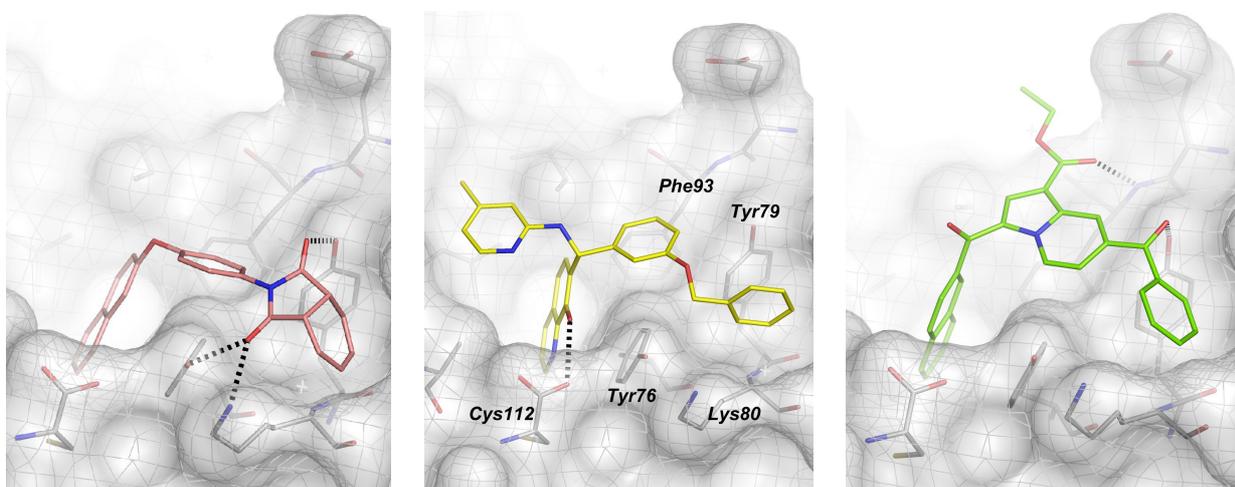


Abb. 5-8: Links: A6 (Chemscore 43, SFCscore 8.2). Mitte: A13 (Chemscore 41, SFCscore 8.5). Rechts: VEC-5 (Chemscore 45).

Verbindung A6 bindet laut Docking mit der Naphthylgruppe in der lipophilen Haupttasche (Core-Region). Der mittlere Phenylring von A6 ist dabei ein rigider Spacer, der auf der Oberfläche zwischen Tyr76 und Tyr79 zu liegen kommt und den rechten Molekülteil, das Tetrahydrophthalimid, in der lipophilen Nebentasche positioniert. Die vordere Carbonylgruppe des Tetrahydrophthalimids bildet dabei H-Brücken zu Tyr76 und Lys80 aus, die hintere Carbonylgruppe bildet eine H-Brücke zu Tyr79. Die freie Ligand-Bindungsenthalpie sollte neben der vom Bindemodus ersichtlichen, guten Oberflächenkomplementarität zur Bindetasche, auch davon profitieren, dass das Molekül relativ rigide ist. Es besitzt nur drei rotierbare Bindungen, wobei sperrige Aromaten deren Drehbarkeit weiter einschränken. Außerdem kann angenommen werden, dass die beiden H-Brücken zur vorderen Carbonylgruppe des Liganden enthalpisch sehr günstig sind: die H-Brücken-Donoren sind acide (pK_s , etwa 10) und die Geometrie ist ideal.

Verbindung A13 (Abb. 5-8, Mitte) bindet mit seiner 8-Hydroxychinolin-Gruppe in der lipophilen Haupttasche, wobei die 8-Hydroxygruppe eine ideale H-Brücke zur Carboxygruppe von Cys112 ausbildet (C-Terminus von Elongin-C). Das 4-Methylpyridin und der mittlere Phenylring werden T-förmig ausgebreitet und überspannen dabei einen Teil der lipophilen Rim-Region. Die rechte Benzylgruppe bindet schließlich in der lipophilen Nebentasche. Beim 2012 publizierten Referenzliganden VEC-5^[54] werden laut dessen Dockingpose ganz ähnliche Interaktionen mit Elongin-C gebildet (dies ist jedoch noch nicht mittels einer Kristallstruktur belegt!). Die Naphthongruppe bindet

in der lipophilen Haupttasche und geht mit Tyr76 eine π/π -Interaktion ein, so wie auch alle bisher vorgestellten Screening-Hits diese π/π -Interaktion bilden (außer Verbindung A2). Der Bereich um Tyr76, Phe93 und Ile95 (Rim-Region) wird vom Indolizin-Baustein und dessen Ethylcarboxylat-Substituenten bedeckt, wobei die Carbonylgruppe des Esters eine H-Brücke mit dem NH-Backbone von Phe93 eingeht. Schließlich adressiert die Phenongruppe die lipophile Nebentasche und ihre Carbonylgruppe bildet eine H-Brücke zu Tyr79 aus. Darüberhinaus ist der Ligand VEC-5 wegen seines zweifach acylierten Indolizin-Grundkörpers und der Estergruppe vermutlich relativ planar und rigide (Konjugation), sodass bei Ligandbindung kein großer Entropieverlust zu erwarten ist. Wie groß jedoch die Rotationsenthalpie ist, um die Naphthongruppe in die lipophile Haupttasche zu drehen, kann nicht so leicht abgeschätzt werden.

NMR-Strukturmodell 2JZ3, State08

Die NMR-Strukturen unterscheiden sich, wie erwähnt, im Bereich der PPI-Bindestelle. Da es sich um NMR-Modelle handelt und die Loop-Region (Ser87 bis Phe93) wegen Peakverbreiterung nur unzulänglich aufgeklärt werden konnte^[147], sind die Protein-Konformationen vorsichtig als „spekulativ“ zu bezeichnen. Mit einem „ideal passenden“ Liganden könnte es jedoch möglich sein, eine solche Konformation zu stabilisieren.

Bei State08 gibt es keine lipophile Haupt- und Nebentasche, stattdessen liegen die Liganden immer deutlich vergraben in einer Art „Binfurche“. Beim Screening an State08 wurde nur eine Verbindung zur Bestellung und Testung ausgewählt:

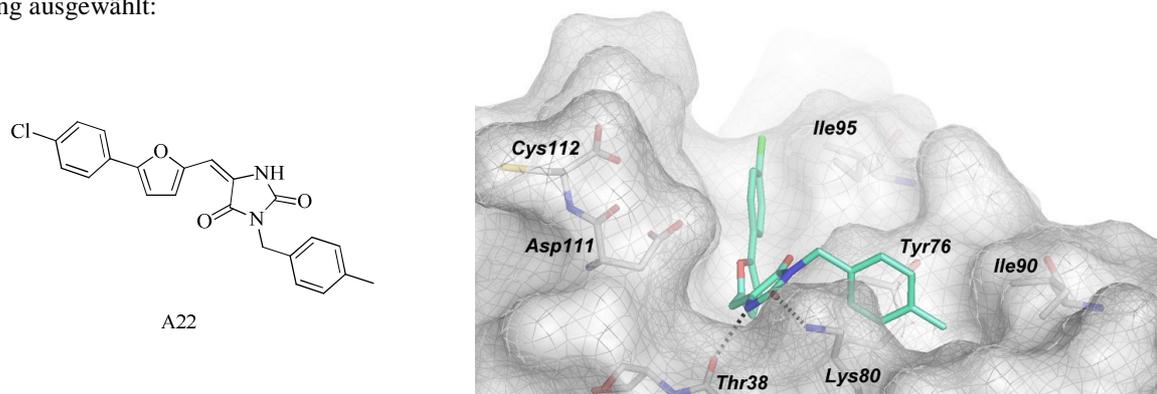


Abb. 5-9: Struktur von Verbindung A22 und Bindemodus laut Docking (Chemscore 34, SFCscore 7.7).

Das Imidazolidindion von A22 stellt gewissermaßen das Kernfragment dar, welches gegenüber Thr38 als H-Brücken-Donor und gegenüber Lys80 als H-Brücken-Akzeptor auftritt. Die 4-Methylbenzyl-Gruppe liegt zwischen Tyr76 (π/π -Interaktion) und der Alkylkette von Lys80. Die 4-Methylgruppe wird dabei unterhalb von Ile90 in einem vergrabenen, lipophilen Bereich positioniert. Der 4-Chlorphenylfuran-Rest wird von den Aminosäuren Val73, Phe93, Ile95, Leu103, Ala107 umgeben. Das Furan ist mit dem Imidazolidindion über eine ungesättigte Bindung verknüpft, jedoch besteht keine Information über die *E/Z*-Isomerie (*E*-Isomer bei Dockingpose). Außerdem ist bei dem abgebildeten Bindemodus eine gewisse Torsion an der ungesättigten Bindung nötig. Der Betrag der bei Ligandbindung aufzuwendenden Torsionsenthalpie ist jedoch wegen des räumlichen Anspruchs von Furan und Carbonylgruppe nur schwer abschätzbar. Es könnte sogar sein, dass das Molekül aus der Synthese nur als *Z*-Isomer anfällt, da bei diesem eine intramolekulare H-Brücke zwischen dem Furan-Sauerstoff und dem NH des Imidazolidindions möglich ist. In diesem Fall könnte die vom Dockingprogramm angenommene Ligand-Konformation nicht eingenommen werden.

NMR-Strukturmodell 2JZ3, State15

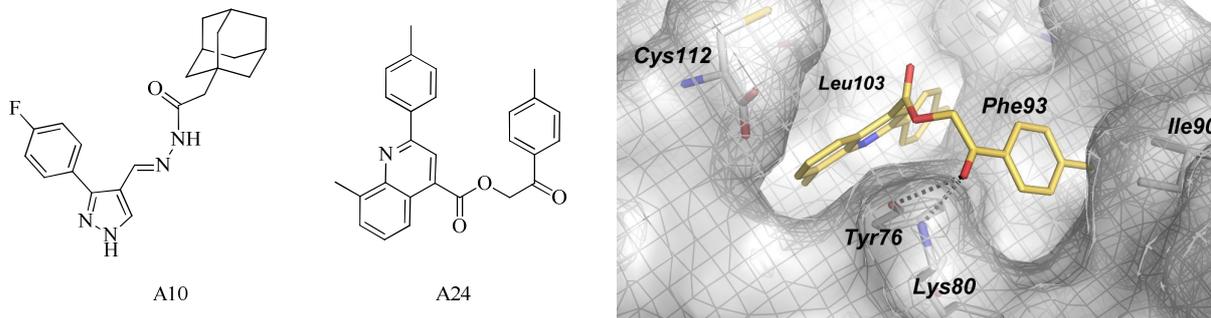
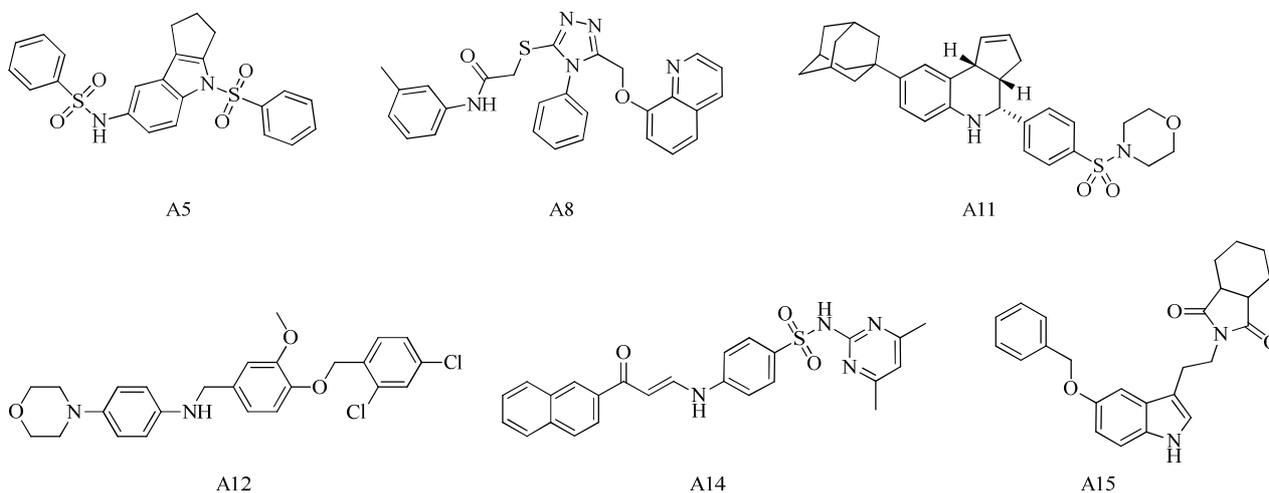


Abb. 5-10: Ausgewählte Verbindungen vom Screening an State15. Rechts: Bindemodus von A24 laut Docking (Chemscore 38, SFCscore 8.5).

Verbindung A24 bildet mit ihrer Carbonylgruppe je eine H-Brücke zu Tyr76 und Lys80 aus. Die 4-Methylphenon-Gruppe adressiert in Abbildung 5-10 (rechter Bereich) eine lipophile Tasche zwischen Phe93 und Ile90. Ein beachtlicher Bindemodus wird dabei vom rigiden Phenylchinolin-Gerüst eingenommen: Es liegt nicht nur in einer großen, lipophilen Bindetasche; während die Chinolin-Gruppe die bereits häufig angesprochene π/π -Interaktion zu Tyr76 ausbildet, werden dessen 8-Methyl- und 2-(4-Methylphenyl)-Substituent an zwei besonders tief vergrabenen Stellen dieser Bindetasche positioniert. Die 4-Methylphenyl-Gruppe liegt dabei zwischen Leu103 und Phe93 und reicht mit ihrer Methylgruppe sogar bis Lys72. Über ihr befindet sich dabei die Aminosäure Ile95. Die Stabilisierung dieser Elongin-C-Protein-Konformation mit dem Phenylchinolin-Gerüst, wie hier laut Dockingpose am NMR-Strukturmodell postuliert, wäre auf Grundlage der Kristallstruktur wohl nicht denkbar gewesen. Die großvolumige Bindetasche und ihre mögliche Erweiterung durch die 4-Methylgruppe bis Lys72 würde bei tatsächlicher Affinität ein typisches Beispiel für eine „Cryptic Pocket“ (s. oben) darstellen.

NMR-Strukturmodell 2JZ3, State18

State18 unterscheidet sich von State15 vor allem dadurch, dass bei State15 die Aminosäure Tyr76 (wie auch bei der Kristallstruktur 3DCG) die Proteinoberfläche in zwei Teile teilt – bei State18 ist Tyr76 stattdessen zu Phe93 „hinübergeklappt“ (wie auch bei State08 der Fall). Damit wird wie bei State08 eine lange, L-förmige „Bindefurche“ erzeugt. Die folgende Abbildung 5-11 zeigt die Substanzauswahl des vHTS-Projekts an State18:



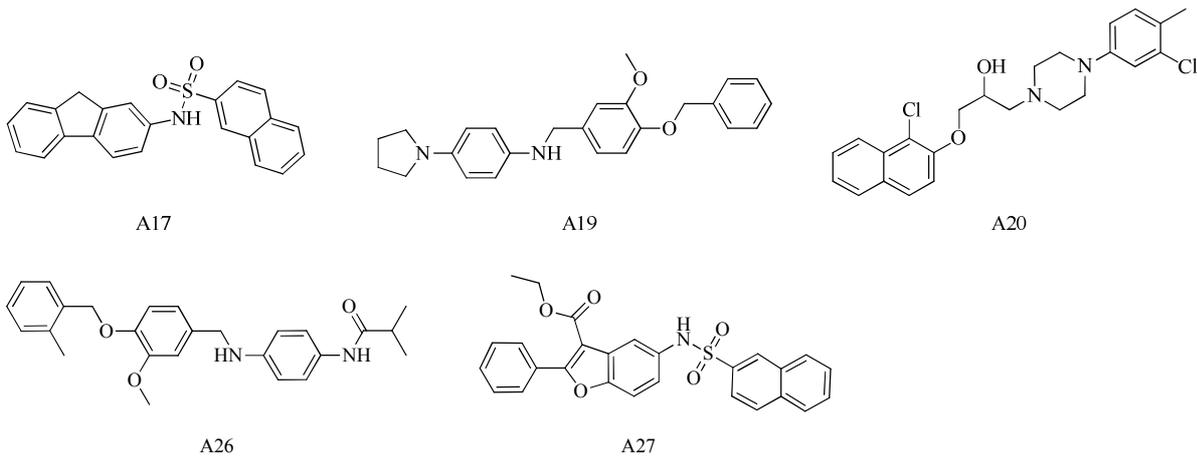


Abb. 5-11: Substanzauswahl nach Screening an State18.

Auch hier würde es zu weit führen, alle ausgewählten Verbindungen mit ihren Bindemodi zu diskutieren. Die Vielfältigkeit der Adressierung von State18 kann aber mit den folgenden zwei Beispielen verdeutlicht werden:

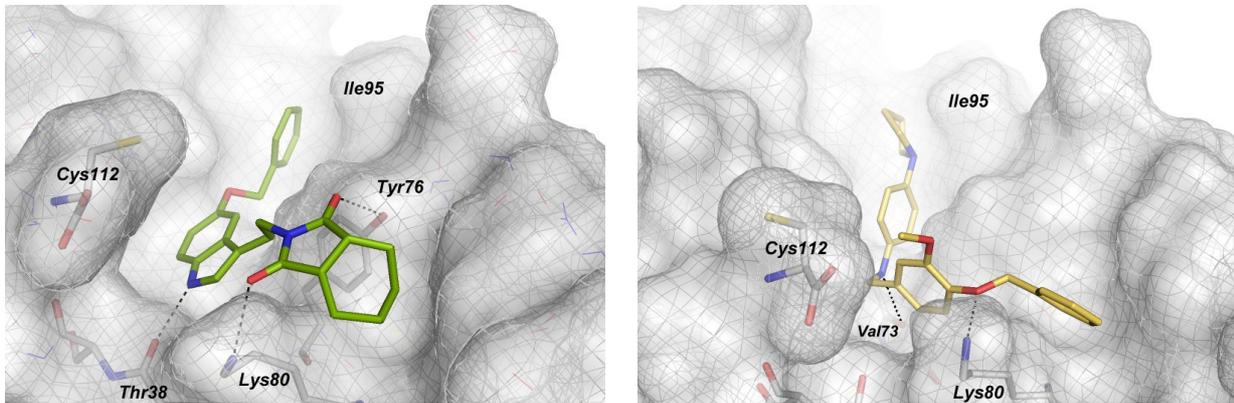


Abb. 5-12: Bindemodi von A15 (links, Chemscore 40) und A19 (rechts, Chemscore 43) als Beispiel.

Die Hexahydrophthalimid-Gruppe von Verbindung A15 nimmt einen der Verbindung A6 ähnlichen Bindemodus ein (s. Abb. 5-8, links), nur dass hier Tyr76 das „hintere“ Carbonyl adressiert, da Tyr76 bei State18 „nach hinten“ geklappt ist. Ein flexibler Ethylspacer positioniert das 5-Benzyloxyindol-Gerüst dann in der großen lipophilen Tasche, die wie beim State08 hauptsächlich von Val73, Phe93, Ile95, Leu103 und Ala107 gebildet wird. Eine weitere H-Brücke wird vom Indol-NH zu Thr38 ausgebildet.

Verbindung A19 (s. Abb. 5-12, rechts) erreicht den L-förmigen Bindemodus durch die flexible Benzylanilin-Verknüpfung in der Mitte des Moleküls. Der 1,4-Diamino-Aromat empfängt dabei mit seinem π -System eine CH/ π -Bindung von Tyr76 und gleichzeitig ist er H-Donor gegenüber Phe93 (ebenfalls CH/ π -Bindung). Der Pyrrolidin-Ring liegt in einem lipophilen Bereich zwischen Ile95 und Leu103. Die sekundäre, aromatische Aminogruppe des 1,4-Diamino-Aromaten bildet eine H-Brücke zum Carbonyl-Backbone von Val73 (siehe dazu auch Abb. 5-13 mit A12 als Ligand). Diese Interaktion stellt den größten Unterschied dieser Substanzklasse zu den anderen gefundenen Liganden dar, da mit dieser H-Brücke „am Grunde“ der ansonsten lipophilen Haupttasche eine vergrabene, polare

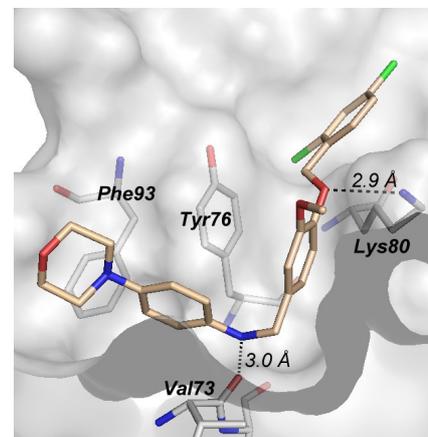


Abb. 5-13: Dockingpose von A12

Stelle adressiert wird (ansonsten bildet noch A11 diese H-Brücke). Der zweifach Alkoxy-substituierte Aromat von A19 und A12 befindet sich im π/π -Stacking mit Tyr76 und empfängt am benzylierten Ether-Sauerstoff eine H-Brücke von Lys80. Die endständige Benzylgruppe von A19 liegt schließlich in einem lipophilen Bereich zwischen Tyr76, Ile90 und der Alkylkette von Lys80. Aus Abbildung 5-13 geht außerdem hervor, dass auch eine 1,4-Dichlor-Substitution an der Benzylgruppe günstige Interaktionen der Chloratome in stärker vergrabenen Bereichen ermöglicht.

5.4. Testergebnisse und Diskussion

Mitarbeiter des Instituts für Virologie Würzburg führten mit den kommerziell erworbenen Verbindungen Zell-Assays durch, um auf eine Blockade von Elongin-C indirekt zurückzuschließen. Von Boris Nowotny wurde hierzu ein Assay entwickelt, bei welchem A3G als Fusionsprotein mit einem fluoreszierenden Protein (EYFP) und Vif exprimiert werden. Die Expression von Vif unterliegt dabei einer Regulation durch Doxycyclin (+Dox: Vif wird reprimiert; -Dox: Vif wird exprimiert). Normalerweise wird EYFP-A3G von Vif dem proteosomalen Abbau über EloBC zugeführt und es wird kein Fluoreszenzsignal gemessen (d. h. man misst lediglich die Grundfluoreszenz: weißer Balken, -Dox). Wird jedoch die Anlagerung zwischen EloBC und Vif durch eine Substanz verhindert, sollte EYFP-A3G nicht abgebaut werden und damit ein Fluoreszenzsignal erzeugen (die zu erwartende Signalhöhe wird durch Repression von Vif ermittelt, weißer Balken, +Dox). Drei Beispiele geben die Diagramme aus Abbildung 5-14, sie zeigen von links nach rechts die Typen „nicht wirksam & toxisch“, „wirksam & toxisch“ und „wirksam & nicht toxisch im wirksamen Konzentrationsbereich“. Es gibt auch noch weitere Kombinationen, sowie konzentrationsabhängige Übergänge zwischen diesen Typen, die hier nicht behandelt werden.

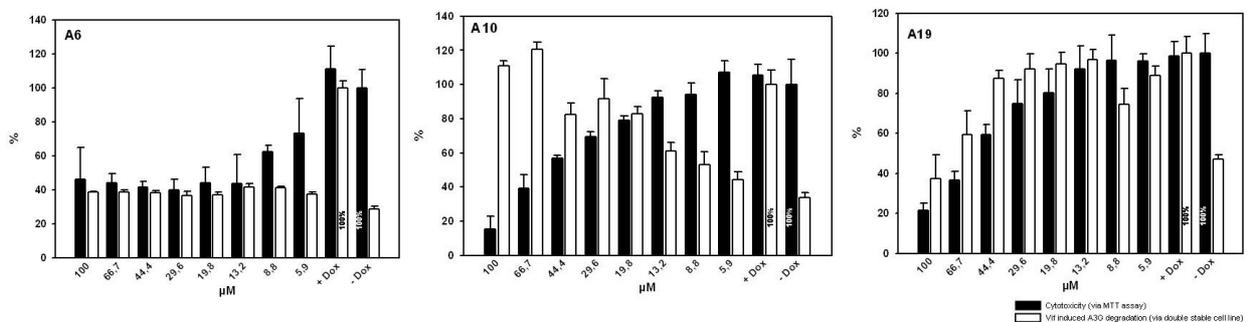


Abb. 5-14: Drei typische Diagramme, die die konzentrationsabhängige Cytotoxizität (schwarz) und die Aufrechterhaltung von EYFP-A3G zeigen (weiß). Maximale Fluoreszenz von EYFP-A3G wird in Abwesenheit von Vif gemessen (+Dox), der Vif-induzierte Abbau von EYFP-A3G senkt dessen Fluoreszenz-Signal (-Dox). Die Toxizität wurde mittels MTT-Assay bestimmt. Die Diagramme wurden von Boris Nowotny, Institut für Virologie, Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt.

Dem linken Diagramm (Verbindung A6) entnimmt man einen konzentrationsabhängigen, cytotoxischen Effekt ohne Effekt auf den Vif-induzierten EYFP-A3G-Abbau. Das mittlere Diagramm (Verbindung A10) zeigt eine Hemmung des Vif-induzierten EYFP-A3G-Abbaus (weiße Balken: Fluoreszenz-Signal von EYFP-A3G), wobei im MTT-Assay gleichzeitig ein toxischer Effekt beobachtet wird (schwarze Balken). Das rechte Diagramm (Verbindung A19) zeigt bereits bei der kleinsten Inhibitor-Konzentration (5.9 µM) eine Hemmung des EYFP-A3G-Abbaus (Aufrechterhaltung der Fluoreszenz), wobei toxische Effekte laut MTT-Assay erst ab 40 µM eintreten.

Die Verbindungen A4, A5, A11 und A24 zeigten keinen Effekt, während alle anderen Verbindungen einen Einfluss auf die EYFP-A3G-Fluoreszenz und/oder metabolische Aktivität (MTT-Assay) hatten.

Einen vergleichbaren Effekt wie A19 erzeugte auch dessen strukturverwandtes Derivat A12, sowie die Verbindungen A7, A13 und A15. Diese Verbindungen führten jedoch erst bei höheren Konzentrationen (zwischen 10 und 20 μM) zu einer Aufrechterhaltung der EYFP-A3G-Fluoreszenz. Sie hemmen demnach auch den Vif-induzierten Abbau von EYFP-A3G, jedoch weniger potent als A19. Die Verbindung A7 besaß bis 100 μM keine toxische Wirkung. Verbindung A22 konnte wegen Unlöslichkeit nicht getestet werden.

Die Verbindung A19 wurde daraufhin in der Arbeitsgruppe von Dr. Bodem an HI-Viren auf Replikationshemmung getestet. Die in diesen Assays zunächst gefundene Herabsetzung der Infektivität neu erzeugter Viren war jedoch nicht reproduzierbar.

Diskussion

Beim ersten Zellassay hatten viele Verbindungen einen Einfluss auf das gemessene EYFP-A3G-Fluoreszenzsignal, wobei sich die meisten Fluoreszanzantworten nicht sinnvoll deuten ließen. Wenn ein überlagerter, toxischer Effekt wie in Abbildung 5-14 (mittig) beispielsweise den proteasomalen Abbau hemmt, die Zelle aber gleichzeitig noch EYFP-A3G exprimiert, würde ein falsch-positives Ergebnis entstehen. Auch führt eine Steigerung der Proteinexpression zu einem falsch-positiven Ergebnis, wobei dies zum Teil an deutlich höheren Fluoreszenzwerten ($> 100\%$) erkannt werden kann. Eine Hemmung der Vif-Expression würde ebenso ein falsch-positives Ergebnis erzeugen, ohne dass die Verbindung dabei Elongin-C blockiert.

Sämtliche Substanz-induzierten Effekte, auch toxische, sind prinzipiell auf die getestete Substanz und ihr unbekanntes Angriffsziel zurückzuführen. Eine Blockade von Elongin-C könnte dabei möglicherweise auch einen toxischen Effekt bedeuten. Bisher ist lediglich berichtet worden, dass die Deletion des Elongin-C Gens bei Grünalgen die Transkription der sog. umgekehrten Wiederholungsregion (Region der DNA, die für ribosomale RNA codiert) begünstigt^[153]. Doch ob eine der biologisch aktiven Verbindungen über eine Blockade von Elongin-C wirkt, kann in diesem Zellassay nicht bestimmt werden.

Der zweite Zellassay hatte die Absicht, die von Apobec3G „vermutlich“ ausgehende Infektivitätsminderung zu untersuchen. Wie in Kapitel 1.2 erläutert, ist die einst vermutete, antiretrovirale Funktion von Apobec3G inzwischen umstritten^[55]. Falls Apobec3G keine antiretrovirale Funktion einnimmt, ist ein Zellassay zur Infektivitätsminderung von HI-Viren nicht in der Lage, eine Elongin-C-Hemmung zu messen. Allerdings wurde von dem 2012 publizierten Elongin-C-Inhibitor VEC-5 eine Infektivitätsminderung beschrieben^[54], was wiederum *für* eine antiretrovirale Funktion von Apobec3G spricht. Bei der Inkubation HIV-infizierter Zellen mit A19 zeigten hier nur manche Versuchsansätze eine starke Infektivitätsminderung. Die Verbindung A19 ist demnach nicht als antiretroviral wirksam zu bewerten.

Die bisher vom Institut für Virologie Würzburg durchgeführten Zellassays brachten also alle das Problem mit sich, dass sie zu keiner konkreten Aussage über die getesteten Verbindungen führten. Ein FRET-basierter Assay mit je markiertem Elongin-C und Vif zur direkten PPI-Bestimmung wurde zwar entworfen, konnte jedoch nicht funktionsfähig umgesetzt werden. Es mangelt also bisher an einem selektiven Assay, dessen Messsignal mit größerer Sicherheit die Hemmung der Protein-Protein-Interaktion zwischen Elongin-C und Vif anzeigt. Ob die Verbindungen A1 bis A27 an Elongin-C binden, sollte daher durch weitere Experimente (ITC, Surface-Plasmon-Resonanz, Thermophorese) ermittelt werden.

6. Zusammenfassung

Die beiden Krankheitserreger SARS-Coronavirus und HI-Virus sind bis auf ihre Gemeinsamkeit, zu den RNA-Viren zu zählen, sehr unterschiedlich. Das hochansteckende SARS-Coronavirus stellte im Winter 2002/2003 eine akute Bedrohung der Menschheit dar, ein pandemischer Ausbruch konnte aber durch strikte Quarantäne verhindert werden. Dagegen geschah die Verbreitung des HI-Virus aufgrund der langen Latenzzeit und geringen Ansteckungswahrscheinlichkeit nahezu unbemerkt bis in alle Teile der Welt. Die Entwicklung von neuen Wirkstoffen gegen die im Tierreservoir vorkommenden SARS-like-Coronaviren und gegen die unter Menschen verbreiteten HI-Viren wird durch multidisziplinäre Forschung angestrebt. Die vorliegende Dissertation ist ein Beitrag aus der pharmazeutisch-chemischen Forschung und hatte das Ziel, neue antivirale Wirkstoffe zu finden und weiterzuentwickeln.

Bei der computergestützten Suche nach neuen SARS-CoV-PL^{pro}-Inhibitoren wurde zunächst die strukturell bekannte Ligand-Bindetasche analysiert, und nach Evaluation des Dockingprozesses wurden mehrere Screeningprojekte an den Röntgenkristallstrukturen 3E9S und 3MJ5 durchgeführt. Dafür wurde jeweils eine 200.000 verschiedene Moleküle umfassende Substanzdatenbank durch Docking schrittweise gefiltert, bis wenige hundert Verbindungen übrig blieben, die gute Bindemodi aufwiesen. 24 dieser Verbindungen wurden kommerziell erworben und am Enzym SARS-CoV-PL^{pro} auf ihre enzymhemmende Eigenschaft getestet. Von den 24 Verbindungen riefen 7 eine Störung des beim Enzymassay gemessenen Fluoreszenzsignals hervor (Quenching bzw. Eigenfluoreszenz). Letztlich konnte den beiden inhibitorisch aktiven Imidazolderivaten B6 und B9 je ein IC₅₀-Wert von etwa 50 µM zugewiesen werden (s. Abb. 6-1). Das Imidazolscaffold eröffnet damit eine neue Substanzklasse zur Inhibition der SARS-CoV-PL^{pro}, wenn auch gesagt werden muss, dass diese „Screening-Hits“ nur schwache Affinität besitzen.

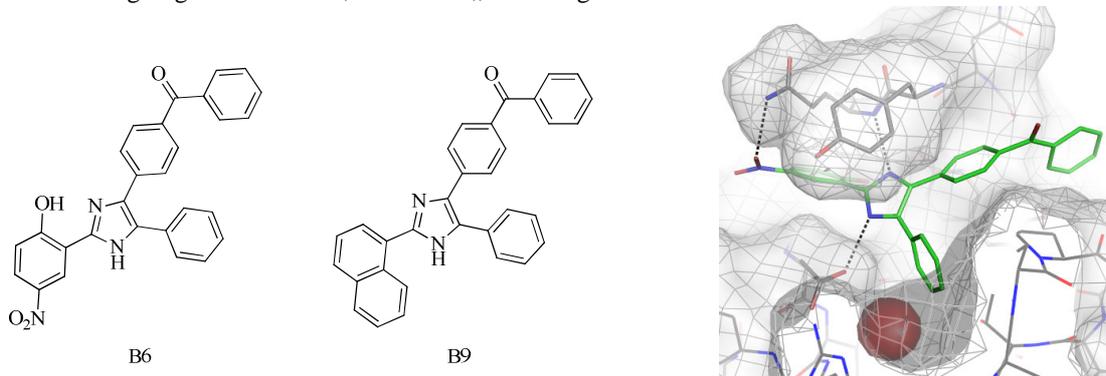


Abb. 6-1: Links: Strukturformeln von B6 und B9. Rechts: Dockinglösung von B6, S4-Tasche mit gebundenen Wasser als dunkelrote Sphäre.

Im präparativ-chemischen Teil des SARS-Projekts wurden im ersten Schritt Struktur-Wirkungsbeziehungen zu den bekannten Inhibitoren vom Benzamid-Typ aufgestellt, indem diese Substanzklasse durch eine Serie entscheidender Strukturvariationen um – allerdings überwiegend inaktive – Verbindungen ergänzt wurde. Eine gute Inhibition zeigten dabei die 4-Aminobenzamide **8** und **9**, die IC₅₀-Werte von 1.6 µM respektive 1.2 µM erzielten. Mittels computergestützter Arbeiten wurde daraufhin versucht, die Substanzklasse der Benzamide in ihrer Affinität zur Bindetasche zu steigern, wobei jedoch entgegen der Erwartung immer eine Affinitätsverminderung festgestellt werden musste (Kapitel 3.2 und 3.3). Interessant ist an den Ergebnissen dennoch, dass eine Thiol-Gruppe in 2-Position der Benzoessäure (Verbindung **27**) nicht toleriert wird, wohingegen die Halogenderivate IC₅₀-Werte zwischen 9 bis 25 µM erzielten. Außerdem zeigte die Fluorsubstitution in der Seitenkette der Amin-Komponente von Verbindung **54** keinen Einfluss auf die Affinität im Vergleich zur Leitstruktur **2** (IC₅₀ = 3 µM), wohingegen die über 6 Stufen synthetisierte Seitenketten-Hydroxy-substituierte Verbindung **61** einen 15-fachen Affinitätsverlust mit sich brachte. Gemäß Docking hätte sich die Hydroxygruppe ideal in das H-Brückennetzwerk der S4-Bindetasche

einfügen sollen. Der Irrtum bei der Vorhersage der Affinität zeigt hier vermutlich die Schwierigkeit, die zur Desolvatation nötige Enthalpie von polaren Ligand-Atomen mit der bei Enzymbindung freiwerdenden Enthalpie und der Entropieänderung zu verrechnen.

Die Substanzklassen, die in den Kapiteln 3.4 bis 3.8 beschrieben sind, wurden ursprünglich beim virtuellen Screening als vielversprechende Scaffolds gefunden. Sie wurden daher aufgegriffen und an die relativ strikten Struktur-Wirkungsbeziehungen angepasst, anschließend wurden die Bindemodi der angepassten Strukturen mittels Docking überprüft und daraufhin im Labor synthetisiert. Von den dargestellten Verbindungen konnte lediglich für die racemische Verbindung **68** 50% Enzyminhibition, und für die Verbindung **100** 42% Enzyminhibition bei 100 μM Substanzkonzentration nachgewiesen werden. Die anderen Verbindungen zeigten keine inhibitorische Aktivität.

Die Derivate der Naphthylessigsäure und 2-Naphthylpropansäure (Kap. 3.5) stellten dabei als „reverse Amide der Benzamide“ die am engsten verwandten Benzamid-Abkömmlinge dar. Die zunächst als inhibitorisch wirksam vermutete Verbindung **84** führte dazu, dass am Computer das Derivat **94** entwickelt wurde, welches anhand optimierter Interaktion laut Scoring einen IC_{50} von deutlich unter 1 μM aufweisen sollte. Die Synthese führte über 5 Stufen zum erwünschten Derivat, doch es zeigte keine Enzymhemmung. Weitere Untersuchungen ließen dann auf die Unwirksamkeit dieser Substanzklasse schließen: Verbindung **84** ergibt im Enzymassay wegen niedriger Löslichkeit eine kolloidale Trübung, die durch Proteinadsorption eine konzentrationsabhängige Enzymhemmung verursacht. Die Zugabe von Tensid (Brij 35) hatte zuvor keine Auswirkung auf den Hemmkurvenverlauf bewirkt und somit erschien **84** nicht als „Aggregator“.

Die mit „Bleistift und Papier“ entwickelte Substanzklasse der Isoindoline (Kap. 3.9) führte zur Synthese von Verbindungen, die ein rigideres Gerüst mit lediglich zwei drehbaren Bindungen besitzen. Tatsächlich konnte innerhalb dieser Substanzklasse Enzymhemmung erzielt werden, obwohl die Prognose laut Scoring zu Anfang gegen die Darstellung dieser Substanzklasse sprach (es wurden bisher Moleküle mit deutlich höheren Score-Werten dargestellt). Die Verbindung **118** erzielt mit einem IC_{50} von 2.9 μM vergleichbare Affinität wie das Benzamid **2**. Es wurden weitere Derivate mit der Absicht synthetisiert, das „kleine“ Isoindolin **118** durch Zufügen funktioneller Gruppen, oder Ringerweiterung zum Tetrahydroisochinolin in seiner Affinität zum Enzym zu steigern. Diese Derivate besaßen zwar alle schlechtere Affinität, doch konnte beim Vergleich von Verbindung **124** mit **2**, **13**, und **118** eine interessante Beobachtung gemacht werden: (siehe auch Kap. 3.9.2)

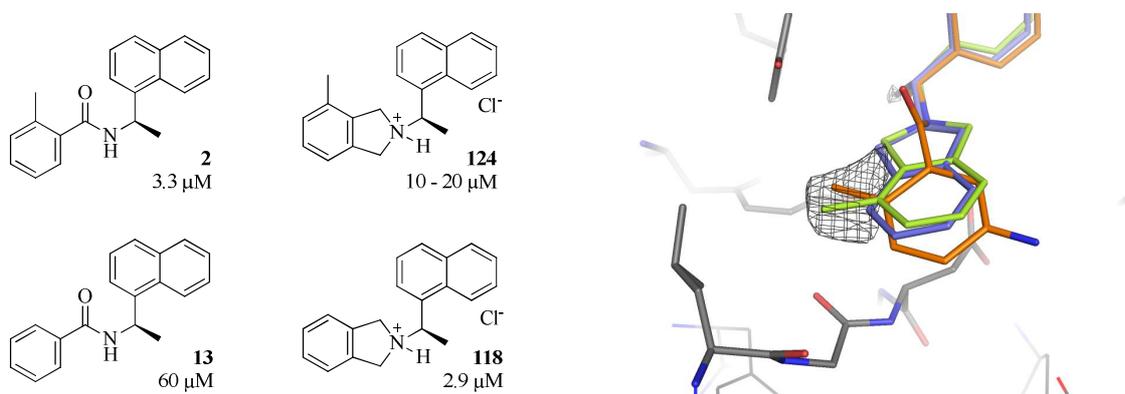


Abb. 6-2: Links: Übersicht über die zur Hotspot-Diskussion relevanten Inhibitoren mit IC_{50} . Rechts: Kristallstruktur 3E9S mit gebundenem Inhibitor (orange). Überlagert sind die Dockingposen von **118** (blau), **124** (grün) und der mit GRID berechnete Methyl-Hotspot (graues Netz).

Die Methylgruppe im linken Molekülteil der Inhibitoren (Abb. 6-2) führt beim Benzamid-Scaffold zu einer 20-fachen Affinitätserhöhung, beim Isoindolin-Scaffold jedoch zu einer 5-fachen Affinitätserniedrigung. Laut Docking liegen beide Methylgruppen von Verbindung **2** und **124** in dem von GRID als Methyl-Hotspot

beschriebenen Bereich. Diese beim Benzamid-Scaffold beobachtete Affinitätssteigerung durch Substituenten in 2-Position (bspw. Methyl, Nitril, Halogen) könnte auch dadurch erklärt werden, dass *ortho*-Substituenten den bei Ligandbindung aufzuwendenden Betrag an Torsionsenthalpie verringern (die sterische Abstoßung zwingt die Carboxamidgruppe aus der Aromatenebene). Dagegen besitzt das rigide Isoindolin **118** bereits im energie-minimierten Zustand die zur Bindung nötige Konformation, und die Adressierung des Methyl-Hotspots durch Verbindung **124** wirkt sich – entgegen der Erwartung – affinitätsvermindernd aus. Es ist also mit den rigideren Isoindolinen gelungen, die lipophile Wechselwirkung der *ortho*-Methylgruppe von der intramolekularen Konformationsbeeinflussung zu trennen.

Schließlich wiesen die zur kovalenten Inhibition gedachten Aziridine **155**, **156** und **157** keine Enzymhemmung auf.

Bei der Suche nach einem Wirkstoff gegen HIV-1 wurde die neue Zielstruktur Elongin-C zur Inhibition durch niedermolekulare Liganden ausgewählt. Vier virtuelle Screeningprojekte an den Strukturen 3DCG und 2JZ3 führten zur Bestellung von 27 Verbindungen. Die vom Virologischen Institut Würzburg durchgeführten Untersuchungen lassen noch keine abschließende Beurteilung der Ergebnisse zu, und der bisherige Zellassay wird noch durch spezifischere Methoden zur Bestimmung einer Ligandbindung an Elongin-C ergänzt werden. Falls es gelingt, einer der Verbindungen Elongin-C-blockierende Aktivität nachzuweisen, sind aufgrund des Eingriffs in einen zellulären Mechanismus neben der anti-HIV-Wirkung noch weitere pharmakologische Effekte denkbar, und das therapeutische Potenzial eines solchen Stoffs könnte in zukünftigen Experimenten erforscht werden.

Schlussfolgerung

Im Rahmen der computerbasierten Arbeiten sind mehrere Mängel bzw. die Grenzen der Modelling- und Docking-Programme aufgefallen: Kraftfeldbasierte Energieminimierungen führen bei unsubstituierten aromatischen Aminogruppen zu fälschlich coplanarer Geometrie und auch bei acyliertem Anilin werden coplanare Geometrien angenommen, die nicht in Einklang mit der Wirklichkeit stehen. Bei der 2,6-Dimethyl-substituierten Verbindung **106** (Abb. 3-28) konnte lediglich das TAFF-Kraftfeld den Diederwinkel zwischen Amid- und Aromatenebene realitätsnah beschreiben. Wenn auch solche von der Wirklichkeit abweichenden Geometrien von den Entwicklern der Kraftfelder vielleicht bewusst in Kauf genommen wurden, sollte der Anwender diese Beschränkungen zumindest bei der Erstellung energieminimierter Konformationen im Hinterkopf behalten.

Die fehlende Affinität der literaturbekannten Verbindungen **a** und **d** (s. Abb. 2-19) ließ sich mittels Docking und Scoring nicht erklären: **a** und **d** unterscheiden sich von der bindenden Leitstruktur nur durch eine Verlängerung einer Methylgruppe zur Ethylgruppe an zwei Stellen im Molekül und erhalten nach Docking günstige Bindemodi mit guter Bewertung. Da es sich um nahe Ligand-Protein-Wechselwirkungen handelt, könnte man vermuten, dass die bei Raumtemperatur vorhandene Eigenbewegung die Komplexbildung aufgrund Repulsion verhindert (d. h. eine Bindung wäre auch entropisch sehr ungünstig). Eine flexible Behandlung von Aminosäureresten ist vor diesem Hintergrund sogar kritisch zu betrachten, da dann flexible Aminosäuren bei „zu großen“ Liganden im Docking ausweichen können und damit noch mehr Liganden gefunden werden, die vom Dockingprogramm als „passend“ bzw. hochaffin beschrieben werden.

Weiterhin ist die Eignung der verwendeten Scoringfunktionen (Chemscore, ChemPLP) zur computergeleiteten Strukturverbesserung fraglich. So führten alle Strukturvariationen zu einem Verlust an Affinität, obwohl laut Scoring eine deutliche Affinitätssteigerung erwartet wurde. Da diese Variationen in der Absicht vorgenommen wurden, die Anzahl der H-Brücken zum Protein zu erhöhen und daher polare Gruppen in die Wirkstruktur eingeführt wurden,

besteht dabei die grundsätzliche Schwierigkeit, die Beiträge von Desolvatationsenthalpie, Entropiegewinn und Ligand-Interaktionsenthalpie richtig abzuschätzen. Möglicherweise wird die Ausbildung weiterer H-Brücken auch deswegen im Scoring überbewertet, weil die Scoringfunktionen an publizierten Ligand-Enzym-Komplexen trainiert werden, die überwiegend hohe Affinitäten aufweisen. Eine Verbindung wie **61**, die trotz der möglichen Positionierung ihrer Hydroxygruppe in ein H-Brückennetzwerk einen starken Affinitätsverlust erfährt („activity cliff“), wird wohl eher nicht mit Protein kokristallisiert und als Röntgenkristallstruktur mit zugehöriger Bindungskonstante veröffentlicht werden. Möglicherweise entziehen sich dadurch Strukturvariationen mit affinitätsvermindernden „activity cliffs“ einer statistischen Berücksichtigung („publication bias“) und die Erhöhung der Anzahl von H-Brückenbindungen zum Enzym wird bzgl. der Affinitätssteigerung überbewertet.

Wie in Kapitel 2.5.3 gezeigt wurde, konnten die Scoringfunktionen die Affinitäten von 20 publizierten Benzamid-Inhibitoren äußerst gut vorhersagen ($R^2= 0.6$ bis 0.7) und auch für das Isoindolin **118** gelingt die Vorhersage der Affinität mit einem Fehler von 0.5 bis 1.5 pIC₅₀-Einheiten noch relativ gut (abhängig von Einstellungen beim Docking). Dessen Chemscore-Wert von 43 wirft jedoch zwei Fragen auf: Wo soll der Score-Cutoff bei einem virtuellen Screeningprojekt gesetzt werden, um neuartige Scaffolds nicht zu übersehen? Sind Scoringfunktionen, die zur Vorhersage der Affinität tatsächlich bindender Moleküle entwickelt wurden, überhaupt geeignet, um in einem virtuellen Screeningprojekt eingesetzt zu werden?

Die erste Frage kann mit Blick auf die hohe Anzahl an Molekülen mit Chemscore > 43 (500 , s. Abb. 2-22, Kap. 2.5.5) dahingehend beantwortet werden, als dass sich der Cutoff nach der Geduld des Auswerters richtet, der die entsprechend große Trefferliste dann sorgfältig durchsehen muss. Die bei dieser Arbeit willkürlich angesetzten Cutoffs (etwa Chemscore > 43) wurden so gewählt, dass wenige hundert Moleküle zur visuellen Auswertung als Treffer erhalten wurden. Im Nachhinein hätte der Cutoff (zufällig) ausgereicht, um damit das Isoindolin **118** zu finden, wenn es im Datensatz enthalten gewesen wäre. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der visuellen Analyse einer großen Trefferliste, die bloße Auswahl nach hohem Score ist nicht sinnvoll. Denn vor allem die in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen haben gezeigt, wie wenig zuverlässig der Score-Wert wird, wenn man die Benzamid-Inhibitoren vergrößert oder von diesem Scaffold abweicht. Eine mögliche Umgehung eines zu starken Einflusses der Anzahl der H-Brücken auf den Chemscore-Wert könnte bei der Auswertung eines Screeningprojekts geschehen, indem man ein Clustering nach der Anzahl der H-Brücken durchführt. Ein Vergleich von Bindemodi erfolgt dann nur innerhalb eines Clusters und diejenigen Liganden mit wenigen (ein oder zwei) H-Brücken-Interaktionen treten aus der Menge der Moleküle mit komplexeren Bindemodi hervor.

Eine Antwort auf die zweite Frage liefern die beiden erfolgreichen virtuellen Screeningprojekte von Kapitel 2.5.5: Der HTS-Hit von Ratia et al.^[18] konnte durch Docking von 50.000 Verbindungen auf Platz 8 sortiert werden und das Screening der Specs-Datenbank ergab als „echte“ Treffer die schwach inhibitorisch wirksamen Imidazol-Verbindungen B6 und B9. Dennoch könnte es zukünftig aussichtsreich erscheinen, eine Scoring- bzw. Rescoringfunktion speziell für virtuelles Screening zu entwickeln: Diese erhebt dann nicht den Anspruch, freie Ligand-Bindungsenthalpien möglichst exakt vorherzusagen, sondern bindende von nicht-bindenden Molekülen zu unterscheiden. Dazu müssten alle „hoch scorenden“ Treffer eines vHTS-Projekts mit nachweislich fehlender, bzw. sehr geringer Affinität (bspw. die Trefferliste vom erwähnten vHTS der Chembridge-Datenbank) in ihren Bindemodi und Interaktionen untersucht werden, damit die Gründe für die fälschlich gute Bewertung erkannt und daraufhin behoben werden können.

7. Summary

The two pathogens SARS-coronavirus and HI-virus are both RNA-viruses, but with completely different etiopathogenesis. While the highly infective SARS-coronavirus posed an acute threat for mankind during winter 2002/2003, strict quarantine prevented the pandemic outbreak. In contrast, pandemic spreading of the HI-virus is going on largely unnoticed for several decades, due to its long period of latency and comparatively low rate of transmission. The development of new antiviral drugs against SARS-like-coronaviruses (still common in animals, such as bats) and the HI-virus is a major task of multidisciplinary research. This PhD thesis is a contribution to this research from the medicinal chemistry view. The objective was to find and develop new ligands for proteins involved in the replication of the two viruses.

The computer-aided search for new SARS-CoV-PL^{pro} inhibitors began with the analysis of the structurally known ligand binding pocket. After evaluation of the docking process, several virtual screening projects were performed with the X-ray structures 3E9S and 3MJ5. Therefore a molecular database containing 200,000 commercially available compounds was filtered stepwise by docking, until a few hundred compounds with good binding modes were left. Of these, 24 compounds were purchased and tested for enzyme inhibition against SARS-CoV-PL^{pro}. The fluorimetric assay was affected by 7 of the 24 compounds (quenching or fluorescence), and finally two screening hits, the imidazole derivatives B6 and B9, were found to be active with IC₅₀ values around 50 μM (Fig. 7-1). Although the affinity is very low, this imidazole scaffold opens up a novel class of substances displaying inhibitory activity against SARS-CoV-PL^{pro}.

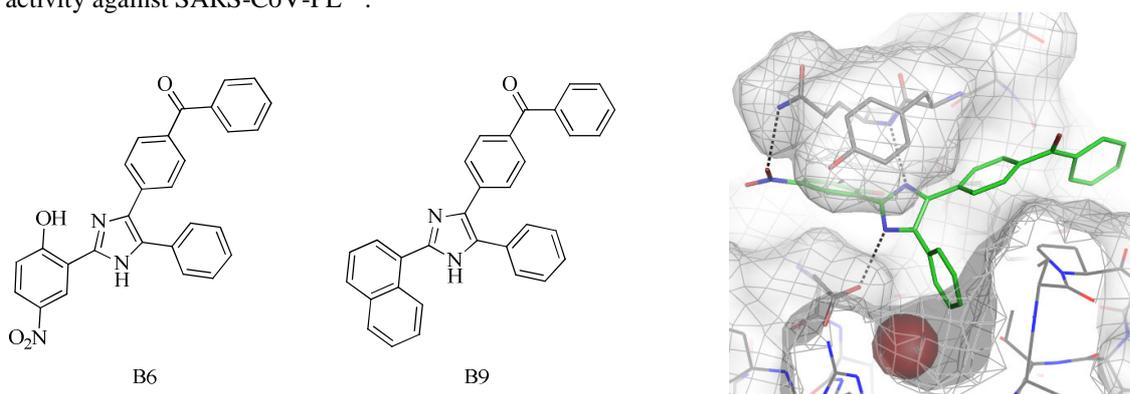


Fig. 7-1: Left: Structures of B6 and B9. Right: Docking solution of B6, S4 pocket with bound water (represented as red sphere).

In the preparative chemical part of the SARS project, first structure-activity relationships were set up by amending the literature-known benzamide inhibitors with newly synthesized derivatives bearing decisive variations. These led mainly to loss of activity, but with this information the prospective course regarding structural variations could be planned. In a computer-assisted development process efforts were undertaken to increase the affinity of the benzamides, but against all odds each of the synthesized compounds displayed lower affinity (chapters 3.2 and 3.3). Nevertheless, some synthesized compounds lead to interesting results: Compound **27** has a thiol group in position 2 at the benzoic acid, which seems to prohibit binding, although a substitution of this position was possible with halogens leading to IC₅₀ values between 9 and 25 μM. Furthermore, substitution of the side chain (amine part of the benzamide) with fluorine (compound **54**) had no influence on affinity, compared to the lead structure **2**. In contrast, the side chain hydroxylated compound **61** led to a 15-fold loss in affinity. According to the docking results, this hydroxy group should fit well into a network of H-bonds and water molecules at the S4 binding site. This error in the prediction of the affinity might represent the challenge of charging the desolvation energy of polar ligand atoms against the energy of newly formed H-bonds and the change in entropy.

The substance classes of chapters 3.4 to 3.8 were originally found during virtual screening: The promising scaffolds were selected and thereupon modified to fulfill the quite strict structure-activity relationships. After successful docking, molecules were synthesized in the lab and tested for enzyme inhibition. Only the racemic compound **68** and compound **100** have shown 50%, respectively 42% inhibition at 100 μM substance concentration. All other compounds displayed no inhibitory activity.

The derivatives of naphthyl acetic acid and 2-naphthyl propionic acid (chapter 3.5) are structurally the closest analogues to the benzamide inhibitors, as they can be considered as “reverse amides”. Initially compound **84** was supposed to be active, because in the assay it displayed enzyme inhibition of SARS-CoV-PL^{pro}. Consequently, a more complex and optimized molecule was designed: Compound **94** should interact with more H-bonds and was predicted to have an IC_{50} value of lower than 1 μM according to docking and scoring. Synthesis led to the desired molecule over 5 steps, but it was inactive. Then, further investigations were able to discard the assumption of **84** being active through specific enzyme-ligand binding: Compound **84** is poorly soluble in assay buffer and precipitates as a colloid when diluted into the assay solution. The adsorption of protein on the colloid causes the concentration dependent enzyme inhibition. Addition of tenside (Brij 35) had no influence on the progress curve and thus compound **84** was not identified as an “aggregator” initially.

With “pen and paper” the next substance class was designed: A more rigid scaffold only containing two rotatable bonds and ideal geometry due to a pyramidal nitrogen was considered as an intriguing new scaffold. Therefore, in chapter 3.9 the synthesis and testing of this isoindoline scaffold is discussed. Indeed, isoindoline **118** displays inhibitory potency comparative to the benzamide inhibitor **2** ($\text{IC}_{50} = 3 \mu\text{M}$), despite only one H-bonding interaction and a not very promising score value (all designed molecules score much higher). Further derivatives with additional functional groups as well as ring extension to a tetrahydroisoquinoline were synthetically realized, but the affinity of the small isoindoline compound **118** could not be boosted. Comparison of the affinities of compound **124** with **2**, **13**, and **118** revealed an interesting discovery: (also see chapter 3.9.2)

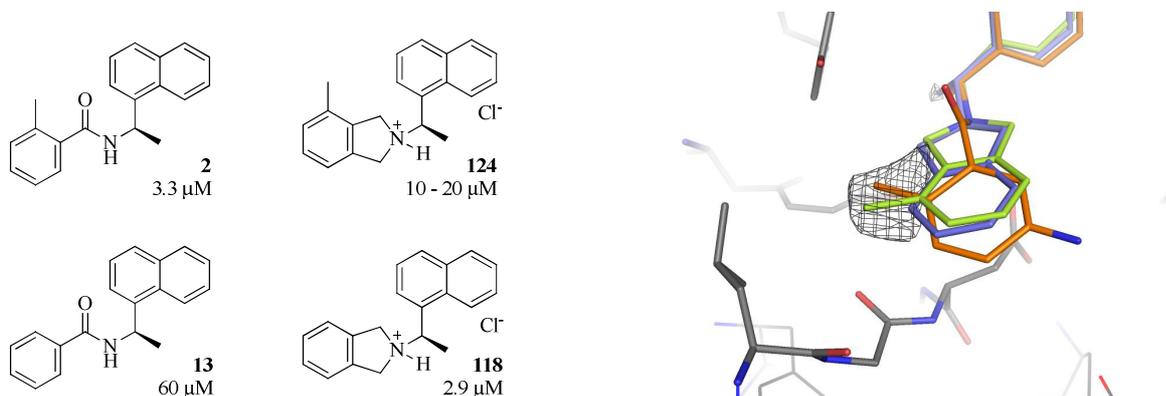


Fig. 7-2: Left: Relevant inhibitors (with IC_{50}) for hotspot discussion. Right: Crystal structure 3E9S with bound inhibitor (orange). Additionally shown are the docking poses of **118** (blue), **124** (green) and the methyl hotspot (gray mesh), which was calculated by GRID (chapter 2.3).

The methyl group in the “left part” of the molecules (Fig. 7-2) leads to a 20-fold increase of affinity in the benzamide scaffold. However, the isoindoline loses affinity 5-fold by attaching this methyl group to the scaffold. According to the docking results, both methyl groups of compounds **2** and **124** are placed into the hotspot region (Fig. 7-2, right, gray mesh, calculated with GRID). In the benzamide scaffold, many *ortho*-substituents (e.g. methyl, nitril, halogen) increase the affinity of the ligands, which could be explained either by the substituent addressing this lipophilic hotspot, or possibly by decreasing the torsional strain upon ligand binding (benzamides with *ortho*-substituents are not planar and thus are closer to the binding conformation). In contrast, the rigid isoindoline **118** is already in the

binding conformation at its energy minimum and for this reason cannot profit from the methyl group. The methyl group of **124**, being able to bind at the methyl hotspot, surprisingly leads to a decrease of affinity. This gives reason to doubt the positive aspect of addressing that hotspot. In conclusion, with the isoindolines it was possible to separate the lipophilic interaction of the *ortho*-methyl group from its intramolecular influence on the ligand conformation.

Finally, the aziridines **155**, **156** and **157**, which were designed as covalent inhibitors, did not display inhibitory activity.

In the HIV project elongin-C was chosen as a new target protein and small molecules were searched to inhibit the protein-protein interaction interface of elongin-C. Four virtual screening projects (protein structures 3DCG and 2JZ3) led to 27 commercially available compounds. The results of the cell assays performed by the Institute of Virology, Wuerzburg, do not yet allow a concluding judgement and will be extended through further investigation. If one of the compounds displays elongin-C blocking activity, several pharmacological effects besides the anti-HIV action should be considered, as elongin-C is part of the cellular mechanism. Thus, further experiments could explore the therapeutic potential of a drug blocking cellular elongin-C.

Conclusion

Within the computer-based work several deficits of the modeling- and docking-programs were noticed: Performing force field energy minimizations, the unsubstituted aromatic amino group is erroneously set planar, and acylated aromatic amines are assigned coplanar, regarding the dihedral angle between the aromatic ring and the amide. Concerning the 2,6-disubstituted compound **106** (Fig. 3-28), only the TAFF force field described the dihedral angle (aromate-amide) correctly. Even though these drawbacks in the parametrization of the geometries were accepted by the force field developers, the user has to be aware of these inconsistencies between energy minimized and real conformation.

The absent affinity of the literature-known compounds **a** and **d** (Fig. 2-19) could not be explained by docking and scoring: Regarding the benzamide inhibitors, inactive compounds **a** and **d** only differ in the elongation of a methyl group to an ethyl group, and according to docking and scoring, these compounds should have high affinity. As the ethyl groups are quite near to the protein surface, one could speculate that the proper motion of the enzyme and the ligand hinders complexation due to repulsion (hence, a higher loss of entropy would occur upon binding). Against this background, docking with flexible amino acid side chains in virtual screening projects has to be balanced precisely, because in general the program would tolerate more “too big” molecules by adjusting the protein cavity.

Furthermore, the suitability of the applied scoring functions (Chemscore, ChemPLP) for computer-assisted ligand optimization has to be questioned. All structural variations led to a loss of affinity, although pursuant to scoring an improvement of affinity was expected. As these variations intended to increase the binding enthalpy by increasing the number of H-bonds to the protein, polar atoms were incorporated in the molecules. Binding of polar atoms is basically problematic, as they are solvated before binding and, thus, the calculations have to deal with the already mentioned difficulties of estimating the energy of desolvation, the gain in entropy, and the energy of newly formed H-bonds to the protein. Possibly, formation of further H-bonds is overrated by the scoring functions, because scoring functions were trained with published ligand-enzyme complexes, which show mainly good interactions, respectively optimizations within one structural series. A compound like **61**, that suffers from a big loss of affinity despite its hydroxy group fitting into a network of H-bonds, might probably never be cocrystallized with protein, and, thus the compound will not show up in the protein database with its binding mode and affinity. In that way, some structural

modifications (like increasing the number of H-bonds with the effect of decreasing affinity) could systematically get lost by statistical analysis of published data (“publication bias”). As a consequence, affinity prediction is influenced by high affinity complexes.

As shown in chapter 2.5.3, the scoring functions were able to predict the affinities of 20 published benzamide inhibitors very precisely ($R^2 = 0.6 - 0.7$) and also for the isoindoline **118** the affinity prediction turns out to be acceptable, with an error of 0.5 to 1.5 pIC₅₀-units (depending on the set up of docking). This compound’s chemscore value of 43 raises two questions: What cutoff in score should be chosen to not overlook novel scaffolds in a virtual screening project? And secondly: As scoring functions were trained to predict the affinity of binding and not non-binding, are they actually suited for filtering a large database of mostly non-binding molecules?

The first question can be answered in regard to the high number of molecules with Chemscore > 43 (500, see Fig. 2-22, chapter 2.5.5). Visual inspection of all ligand poses of a large hit list is a crucial, but time consuming step and, thus, the hit list size depends on the endurance of the scientist. In this work, score cutoffs were chosen arbitrarily to result in hit lists of a few hundred different molecules. Retrospectively, the cutoff in the above mentioned screening project would have selected the isoindoline **118** for visual inspection (incidentally), if the compound had been in the database. This emphasizes the importance of visually inspecting a large hit list – the selection of only the highest ranked compounds, misguided by the aspiration of discovering a correctly predicted compound with “nanomolar affinity”, is unwise. Especially the synthesized compounds in this work have shown how unreliable the score turns, if the benzamide inhibitors are increased in size (“optimized”), or if the scaffold is varied. The influence of the number of H-bond interactions on the score could be circumvented by clustering all hit ligands in regard to this number. Then, only binding modes with similar number of H-bond interactions are compared and molecules with one or two H-bonds are not overruled by more sophisticated-looking and thus higher scoring molecules.

The second question is answered by the two successful virtual screening projects of chapter 2.5.5: Ratia et al.’s HTS-Hit^[18] was ranked on position 8 by docking the 50,000 compounds containing library, which Ratia initially used for roboter-assisted HTS. The second successful screening project yielded the two active imidazole derivatives B6 and B9. As scoring functions predict binding free energy, the inference is correct, that low scoring is comparable to non-binding. Nevertheless, designing a scoring function particularly for virtual screening could be a promising task. Such a scoring function should not be focused on predicting the correct affinity, but on differentiation between binding and non-binding molecules. For this purpose all high scoring molecules of a virtual screening project with verifiable inactivity (e.g. the hit list of the above mentioned virtual screening of an initially roboter-assisted HTS) should be precisely analyzed. When the reasons for erroneous high scoring are identified for each singular case, the docking and scoring process might be improved more efficiently in the future.

8. Experimenteller Teil

8.1. Enzymatischer Assay

Der fluorimetrische Enzym-Assay wurde in einem Fluorimeter des Typs Cary Eclipse (Firma Varian) mit weißen 96-Well-Mikrotiterplatten bei 25 °C durchgeführt. Beim Screening wird eine Inhibitorkonzentration von 100 µM im Assay als Duplikat angesetzt. Zur Bestimmung der Referenz-Enzymaktivität wird statt Inhibitor nur DMSO zupipettiert. Verdünnungsreihen werden ebenso im Duplikat angesetzt.

Anregungswellenlänge: 360 nm

Detektionswellenlänge 460 nm

Substrat: Z-Arg-Leu-Arg-Gly-Gly-AMC als Acetat-Salz, $K_m = 850 \mu\text{M}$

Substratlösung: 1 mM in DMSO (0.849 mg/ml)

Enzym: SARS-CoV-Papain-like-Protease in Enzympuffer

Enzympuffer: 20 mM Tris-Puffer pH 7.5 mit 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT und 200 mM NaCl

Assaypuffer: 20 mM Tris-Puffer pH 7.5 mit 0.1 mM EDTA und 200 mM NaCl

Pipettierreihenfolge Screening: 170 µl Puffer, 10 µl Enzymlösung, 10 µl Inhibitor 2 mM, 10 µl Substratlösung

Pipettierreihenfolge Verdünnungsreihe: 175 µl Puffer, 10 µl Enzymlösung, 5 µl Inhibitor, 10 µl Substratlösung

Es wird pro Well ein Gesamtvolumen von 200 µl erhalten.

8.2. Geräte und Materialien

NMR-Spektroskopie

NMR-Spektren (^1H , ^{13}C , DEPT, HHCOSY, HMQC, HMBC) wurden an den Geräten Bruker Avance 400 (Würzburg und Toronto) sowie Varian Mercury 400 (Toronto) aufgenommen. Als Lock-Substanzen und Referenz für die chemische Verschiebung (ppm) dienen die Signale der verwendeten Lösemittel. Die Multiplizität der Signale wird durch die gängigen Abkürzungen wiedergegeben: br = breit, s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, dd = Dublett von Dublett, ddd = Dublett von Dublett von Dublett (usw.). Die Signalzuweisung der Protonen und Kohlenstoffkerne erfolgt unter Zuhilfenahme von 2D-Korrelationsspektren.

Infrarotspektroskopie

FT-IR-Spektren wurden an dem Gerät Jasco FT/IR-6100 aufgenommen, das als Messtechnik die abgeschwächte Totalreflexion (ATR) nützt.

Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden an den Messgeräten Stuart SMP10 oder Mettler FP51 in offener Kapillare gemessen und wurden nicht korrigiert.

LC-MS-Analytik

Als LC-MS-Anlage wurde das LC-MS-System 1100 von Agilent mit Ionenfalle verwendet. Es besteht aus den Komponenten Degasser, BinPump, ALS, DAD und MSD Trap SL. Bei Reinheitsbestimmungen wurde im HPLC-Chromatogramm die Fläche des Substanzpeaks (UV-Signal) in das Verhältnis zu den restlichen Peaks gesetzt.

Säule: Phenomenex Gemini 5 μ C18 110A (150 x 2.00 mm, 5 μ M)

Mobile Phase A: 0.1% Ameisensäure in Wasser

Mobile Phase B: 0.1% Ameisensäure in Methanol

Verwendete LC-MS-Methoden:

Methode 5% B:	Flussrate: 0.3 ml/min	Methode 5Bshort:	Flussrate: 0.4 ml/min
	Zeit [min]		Zeit [min]
	% B		% B
	0		0
	5		5
	3		10
	5		100
	10		13
	100		100
	13		100
	100		
Methode Gem3:	Flussrate: 0.3 ml/min	Methode Gem4:	Flussrate: 0.4 ml/min
	Zeit [min]		Zeit [min]
	% B		% B
	0		0
	30		60
	7		100
	100		100
	10		8
	100		100
Methode Gem5:	Flussrate: 0.4 ml/min	Methode Gem6:	Flussrate: 0.3 ml/min
	Zeit [min]		Zeit [min]
	% B		% B
	0		0
	30		50
	1		1
	30		50
	15		15
	100		100
	18		18
	100		100
Methode Gem7:	Flussrate: 0.3 ml/min	Methode Gem8:	Flussrate: 0.3 ml/min
	Zeit [min]		Zeit [min]
	% B		% B
	0		0
	15		65
	1		1
	15		65
	12		10
	70		100
	13		13
	100		100
	16		100
	100		

Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden DC-Fertigfolien aus Aluminium verwendet, Schichtdicke 0.2 mm Kieselgel 60 („Alugram Xtra Sil G/UV₂₅₄“, Firma Macherey-Nagel). Die Detektion von Substanzen erfolgte durch die Fluoreszenzlöschung bei 254 nm, Eigenfluoreszenz bei 366 nm, Anfärben mit Iod-Dampf, oder Eintauchen in Kaliumpermanganat-Lösung.

Säulenchromatographie

Bei der Säulenchromatographie wurde als Füllmaterial Kieselgel 60 „M“ (Korngröße 0.040 - 0.063 mm) von Macherey-Nagel verwendet. Die Zusammensetzungen der Laufmittel sind in Volumenteilen angegeben.

Lösungsmittel

Die Lösungsmittel Diethylether, Pentan, Petrolether, Cyclohexan, Ethylacetat, Dichlormethan, Aceton und Methanol wurden von der Chemikalienausgabe Würzburg in der niedrigsten erhältlichen Reinheit bezogen und durch Destillation am Rotationsverdampfer von schwerflüchtigen Verunreinigungen befreit. Die Lösungsmittel Acetonitril, Toluol, Chloroform, THF und DMF wurden in der Reinheitsstufe p.a. bezogen. Absolutes THF wurde durch Trocknung über Natrium erhalten.

Reagenzien

Eingesetzte Reagenzien wurden entweder direkt von den Firmen Sigma-Aldrich, Alfa Aesar, Acros und Merck, oder von den Beständen der Chemikalienausgabe Würzburg bezogen.

8.3. Allgemeine Methoden

Vorschriften Aa und Ab: Amidbildung aus Säurechloriden (2-Phasen-System)

Zur Amidbildung aus Säurechloriden wird eine abgewandelte Vorschrift nach Schotten-Baumann angewendet. Im Becherglas werden in 50 ml Diethylether 1.0 eq. Amin gelöst, 10 ml 10%ige Natriumcarbonatlösung hinzugegeben und daraufhin unter schnellem Rühren etwa 1.1 - 1.3 eq. Säurechlorid langsam zugetropft. Dabei ergeben sich zwei Möglichkeiten der Aufarbeitung:

- a) Das gebildete Amid ist in Diethylether schlecht löslich und fällt aus. Der komplette Ansatz wird über eine Glasfritte abfiltriert, mit 2 ml Diethylether und 2x 10 ml Wasser nachgewaschen und der Filtrückstand im evakuierten Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet. (**Vorschrift Aa**)
- b) Das gebildete Amid ist in Diethylether merklich löslich. Dann werden zum Ansatz 10 ml Ethylacetat gegeben, die wässrige Phase abgetrennt und die organische Phase 3x mit 10 ml halbgesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. (**Vorschrift Ab**)

Vorschrift Ac: Amidbildung aus Säurechloriden (1-Phasen System)

Zu 5 ml THF werden mindestens 2.0 eq. Amin gegeben und unter Rühren 1.0 eq. Säurechlorid zugetropft. Innerhalb weniger Minuten fällt ein Teil desamins als Hydrochlorid aus. Nach 2 Tagen wird der Ansatz zu 30 ml 0.05 M Salzsäure gegeben und mit 30 ml Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird mit je 20 ml halbgesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. von Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Feststoff wird aus einem geeigneten Lösungsmittel umkristallisiert.

Vorschrift B: Einführung der Boc-Schutzgruppe

In 50 ml Dioxan-Wasser Gemisch (2:1) werden zuerst 1.0 eq. Amin gelöst und unter Rühren 1.1 eq. Boc-Anhydrid zugegeben, danach werden langsam 2.0 eq. NaOH hinzugegeben. Falls es sich bei der Aminkomponente um eine Verbindung mit zusätzlicher Carbonsäurefunktion handelt, werden zur Neutralisation der letzteren insgesamt 3.0 eq. NaOH eingesetzt. Die weitere Aufarbeitung ist im Speziellen beschrieben.

Vorschrift C: Amidbildung mit DCC

In einem geeigneten Lösungsmittel werden 1.0 eq. Carbonsäure und 1.1 eq. HOBT-Hydrat gelöst, wobei die 1.1 eq. HOBT-Hydrat in Bezug auf die molare Masse des wasserfreien HOBTs (135.1 g/mol) als 1.43 eq. zu berechnen sind, da das HOBT-Hydrat etwa 12% Wasser (w/w) enthält. Man kühlt den Ansatz im Eisbad, gibt 1.1 eq. DCC unter Rühren zu und lässt dann auf Raumtemperatur erwärmen. Nach 15 Minuten wird 1.0 eq. Amin zugegeben und bei Raumtemperatur ein Tag gerührt. Ausgefallener Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert. Die weitere Aufarbeitung des Filtrats erfolgt wie im Speziellen angegeben

Vorschrift D: Amidbildung mit DIC

Es werden in 1 ml THF 1.2 eq. Carbonsäure sowie 1.7 eq. HOBT-Hydrat gelöst, der Ansatz daraufhin im Eisbad abgekühlt und unter Rühren 1.2 eq. Diisopropylcarbodiimid zupipettiert. Nach 30 Minuten wird 1.0 eq. Amin zugegeben, der Ansatz aus dem Eisbad genommen und bis zum nächsten Tag gerührt. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt, der Rückstand in 5 ml Ethylacetat gelöst und 3x mit 2 ml 10%ige Natriumcarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und daraufhin i. Vak. von Lösungsmittel befreit. Die weitere Aufarbeitung erfolgt wie im Speziellen angegeben.

Vorschrift E: Photobromierung nach Wohl-Ziegler

Das Methylbenzolderivat wird in 30 ml Tetrachlormethan gelöst und je Methylgruppe, die zu bromieren ist, etwa 1.0 eq. *N*-Bromsuccinimid zugegeben. Die Suspension wird zum Rückfluss erhitzt und dabei von der Seite mit einer 100 Watt Glühbirne bestrahlt, die im Abstand von 1 cm zum Rundkolben angebracht ist und zur Lichtbündelung mit einem Schirm aus Aluminiumfolie versehen wurde (Vorsicht, die Lampenfassung muss seitlich und nicht oberhalb der Lampe/Heizpilz liegen, da sonst Fassung und Kabel überhitzen). Alle 30 Minuten ist eine Reaktionskontrolle mittels DC durchzuführen. Nach ein bis vier Stunden ist die Reaktion meist ausreichend vorangeschritten (4 Spots, Eduktspot im DC am schwächsten und besitzt i. Allg. den größten R_f -Wert, es folgen monobromiertes Dimethylbenzolderivat und mehrfach bromierte Verunreinigungen). Zur Aufarbeitung wird der Ansatz 3x mit 30 ml Wasser und 30 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. von Tetrachlormethan befreit. Die bromierten Nebenprodukte besitzen dem Produkt sehr ähnliche R_f -Werte, daher muss der erhaltene Rückstand durch mehrmalige Säulenchromatographie (nur Petrolether oder im Gemisch mit Ethylacetat) aufgereinigt werden.

Vorschrift F: Dialkylierung primärer Amine mit Bis(brommethyl)benzol-Derivaten (Isoindolin-Synthese)

Zu 30 ml Toluol werden 1.0 eq. primäres Amin und > 2.0 eq. Triethylamin pipettiert, sowie 1.0 - 1.2 eq. Bis(brommethyl)benzol-Derivat hinzugegeben und für eine Stunde zum Rückfluss erhitzt. Zur Aufarbeitung wird das Toluol weitgehend i. Vak. entfernt, der Rückstand in 30 ml Ethylacetat aufgenommen und 2x mit 30 ml 10%iger Natriumcarbonatlösung, dann mit 30 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und daraufhin i. Vak. von Lösemittel und Triethylamin befreit. Der erhaltene Rückstand wird säulenchromatographisch aufgereinigt (z. B. Petrolether/Ethylacetat = 4:1).

Vorschrift G: Reduktion *N*-alkylierter Phthalimid-Derivate zu Isoindolin-Derivaten

In 20 ml abs. THF werden unter Argon 1.0 eq. Phthalimid-Derivat gelöst und etwa 3 - 5 eq. Lithiumaluminiumhydrid zugegeben. Der großzügige Überschuss ist aufgrund der geringen Ansatzgröße zur Erhöhung der Ausbeute angezeigt und unproblematisch. Es wird über 2 Stunden zum Reflux erhitzt und nach Abkühlen auf Raumtemperatur erst einige Tropfen Ethanol und Wasser (Quenchen des Hydrids), dann 2 ml gesättigte Kaliumcarbonatlösung zugegeben. Es bildet sich ein voluminöser Niederschlag von Aluminiumsalzen, der über eine Glasfritte abfiltriert und 2x mit 10 ml THF nachgewaschen wird. Das Filtrat wird i. Vak. von Lösemittel befreit, in 20 ml Ethylacetat aufgenommen und mit 20 ml 0.1 M Natronlauge sowie 10 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wird säulenchromatographisch (Petrolether/Ethylacetat = 4:1) aufgereinigt.

Vorschrift H: Reduktion aromatischer Nitrogruppen zu Anilin-Derivaten

Es werden 1 mmol aromatische Nitroverbindung und 3 mmol Zinn(II)-chlorid-Dihydrat mit 20 ml halbkonzentrierter Salzsäure über 2 Stunden zum Reflux erhitzt. Der Ansatz wird nach Abkühlen auf Raumtemperatur mit 2x 20 ml Diethylether extrahiert und die organische Phase verworfen. Die wässrige Phase wird über einen Papierfilter filtriert und mit 20%iger Natronlauge auf pH > 10 eingestellt. Man extrahiert 3x mit 20 ml Ethylacetat, trocknet die organische Phase über Natriumsulfat, entfernt das Lösemittel am Rotationsverdampfer und bewahrt unter Argon auf.

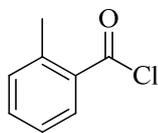
Vorschrift J: Reduktive Aminierung von Aziridin-2-carboxaldehyd aus seiner dimeren Form

Es werden 1.0 eq. Aziridincarboxaldehyd-Dimer in wenig Methanol gelöst und zu einer Lösung von Amin in THF gegeben. Im Anschluss werden dem Ansatz unter Rühren 1.1 eq. Natriumcyanoborhydrid und 2.2 eq. Zinkchlorid zugegeben. Nach 6 Stunden wird am Rotationsverdampfer eingeengt (Abzug, Blausäure!), dann 50 ml Ethylacetat zugegeben und je 2x mit 20 ml halbgesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 20 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. von Lösemittel befreit. Der erhaltene Rückstand wird säulenchromatographisch über Kieselgel aufgereinigt.

8.4. Darstellung der Substanzen

2-Methylbenzoesäurechlorid (1)

Struktur



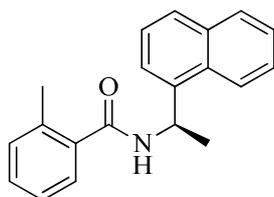
Laborkürzel AWBz0
 Summenformel C₈H₇ClO
 Molare Masse 154.59

Vorschrift In 30 ml (49 g, 0.41 mol) Thionylchlorid werden 20 g (0.147 mol) 2-Methylbenzoesäure suspendiert, 5 Tropfen DMF zugegeben und mittels Heizpilz unter Argon zum Rückfluss erhitzt. Nach 2 Stunden zeigt der aufgesetzte Blasenähler keine Gasentwicklung mehr an. Man erhält eine leicht gelbe, klare Lösung, die i. Vak. bei 50 °C unter Rühren von Thionylchlorid befreit wird. Das flüssige, gelblich eingefärbte Säurechlorid wird unter Argon im Schlenkrohr aufbewahrt.

Ausbeute 21.6 g (0.14 mmol, 95%) blassgelbes Öl

2-Methyl-N-[(1R)-1-naphth-1-ylethyl]benzamid (2)

Struktur



Laborkürzel AWLit1
 Summenformel C₂₀H₁₉NO
 Molare Masse 289.37

Vorschrift Allgemeine Vorschrift Aa, testweiser Einsatz von NaOH statt Na₂CO₃
 0.64 g (4.2 mmol) 2-Methylbenzoesäurechlorid (1)
 0.5 ml (0.55 g, 3.2 mmol) (1R)-1-Naphth-1-ylethanamin
 Waschen des abfiltrierten Produkts löste den Feststoff merklich und erniedrigte die Ausbeute.

Ausbeute 394 mg (1.36 mmol, 43%) weißer Feststoff

R_f 0.48 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.81 (d, J=6.82 Hz, 3 H, CH₃CH), 2.45 (s, 3 H, CH₃), 5.97 (d, J=7.33 Hz, 1 H, NH), 6.06 - 6.23 (m, 1 H, CHCH₃), 7.09 - 7.22 (m, 2 H), 7.23 - 7.32 (m, 2 H), 7.41 - 7.63 (m, 4 H), 7.83 (d, J=8.08 Hz, 1 H), 7.87 - 7.92 (m, 1 H), 8.26 (d, J=8.34 Hz, 1 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 19.73, 20.60, 44.89, 122.58, 123.56, 125.15, 125.66, 125.96, 126.54, 126.61, 128.53, 128.80, 129.82, 130.94, 131.22 (quartär), 133.99 (quartär), 136.07 (quartär), 136.40 (quartär), 137.99 (quartär), 168.96 (CO)

FT-IR λ⁻¹ (cm⁻¹) = 3290, 2926, 1628, 1519, 1326, 1268, 1119, 892, 797, 778, 746, 677

Smp. 160 °C

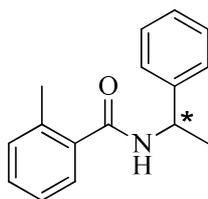
ESI-MS m/z = 290.3 [M+H]⁺, 312.2 [M+Na]⁺, ber.: 289.15

LC Reinheit > 99% (300 nm), R_t = 6.1 min, Methode Gem8

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur^[18].

2-Methyl-N-(1-phenylethyl)benzamid (3)

Struktur



Laborkürzel AWBz2
 Summenformel C₁₆H₁₇NO
 Molare Masse 239.31

Vorschrift Die Reaktion wird testweise in Diethylether mit Triethylamin als Hilfsbase durchgeführt. Außerdem wird die Relevanz der Reihenfolge der Eduktzugabe untersucht. Es werden zu 5 ml Diethylether 1.5 ml (1.1 g, 11 mmol) Triethylamin und 1 ml (1.2 g, 8 mmol) 2-Methylbenzoesäurechlorid (1) pipettiert. Der Ansatz verfärbt sich über grün nach schwarz, dann bildet sich ein Niederschlag. Langsam werden 0.7 ml (0.67 g, 5.5 mmol) 1-Phenylethanamin zugetropft, es setzt sofort Sieden ein. Daher wird der Ansatz mit 10 ml Ethylacetat verdünnt und das restliche Amin zugetropft. Nach 1 Stunde wird 3x mit 10 ml 0.1 M Salzsäure extrahiert, dann mit je 10 ml 5%iger Natriumcarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. von Lösemittel befreit. Der erhaltene schwarzbraune Feststoff wird aus Methanol/Wasser umkristallisiert.

Ausbeute 480 mg (2.0 mmol, 36%) blassgelbe, nadelförmige Kristalle

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.59 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H, CH₃CH), 2.42 (s, 3 H), 5.26 - 5.38 (m, 1 H, CH₃CH), 6.13 (d, *J*=7.07 Hz, 1 H, NH), 7.14 - 7.24 (m, 2 H), 7.26 - 7.42 (m, 7 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 19.65 (CH₃-Phenyl), 21.73 (CH₃CH), 48.96 (CHCH₃), 125.61, 126.12 (2 C), 126.55, 127.34, 128.65 (2 C), 129.72, 130.88, 135.95 (quartär), 136.43 (quartär), 143.07 (quartär), 169.08 (CO)

FT-IR λ⁻¹ (cm⁻¹) = 3273, 1631, 1538, 1450, 1325, 1277, 1130, 771, 749, 702

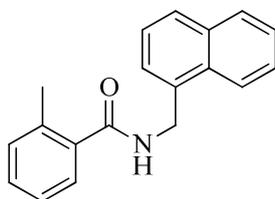
Smp. 110 °C

ESI-MS *m/z* = 240.3 [M+H]⁺, 262.1 [M+Na]⁺, ber.: 239.13

LC Reinheit > 99% (215 nm), R_t = 4.0 min, Methode Gem4

2-Methyl-N-(naphth-1-ylmethyl)benzamid (4)

Struktur



Laborkürzel AWBz3
 Summenformel C₁₉H₁₇NO
 Molare Masse 275.34

Vorschrift Allgemeine Vorschrift Aa, testweiser Einsatz von NaOH statt Na₂CO₃

0.8 g (5.2 mmol) 2-Methylbenzoesäurechlorid (1)

0.5 ml (3.18 mmol) 1-Naphthylmethylamin

Ausbeute 0.863 g (3.13 mmol, 98%) feinkristalliner, weißer Feststoff

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 2.48 (s, 3 H, CH₃), 5.10 (d, *J*=5.31 Hz, 2 H, CH₂NH), 5.98 (br. s., 1

H, NH), 7.14 (td, $J=7.58$, 0.51 Hz, 1 H, Pos. 5 Benzoessäure), 7.20 (d, $J=7.58$ Hz, 1 H, Pos. 3 Benzoessäure), 7.28 (td, $J=7.58$, 1.26 Hz, 2 H, Pos. 4 Benzoessäure), 7.32 (dd, $J=7.58$, 1.01 Hz, 1 H, Pos. 6 Benzoessäure), 7.39 - 7.49 (m, 1 H), 7.49 - 7.64 (m, 3 H), 7.85 (d, $J=8.08$ Hz, 1 H), 7.87 - 7.96 (m, 1 H), 8.15 (d, $J=8.59$ Hz, 1 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 19.82, 42.19, 123.62, 125.39, 125.69, 126.10, 126.63, 126.71, 126.95, 128.82 (2 C), 129.93, 131.03, 131.43 (quartär), 133.46 (quartär), 133.95 (quartär), 136.18 (quartär), 136.21 (quartär), 169.63 (CO)

FT-IR λ⁻¹ (cm⁻¹) = 3279, 1634, 1527, 1257, 1009, 796, 780, 723, 683

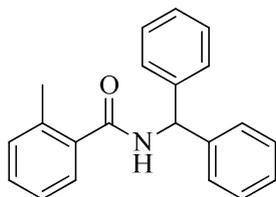
Smp. 134 °C

ESI-MS m/z = 573.3 [2M+Na]⁺, 276.2 [M+H]⁺, 298.2 [M+Na]⁺ ber.: 275.13

LC Reinheit > 99% (300 nm), R_t = 11.4 min, Methode Gem6

N-(Diphenylmethyl)-2-methylbenzamid (5)

Struktur



Laborkürzel

AWBz

Summenformel

C₂₁H₁₉NO

Molare Masse

301.38

Vorschrift Zu 10 ml Dichlormethan werden 53.7 µl (57.2 mg, 0.312 mmol) 1,1-Diphenylmethanamin und 100 µl (78 mg, 0.77 mmol) Triethylamin pipettiert, anschließend werden 50 µl (60 mg, 0.39 mmol) 2-Methylbenzoesäurechlorid (**1**) zugetropft. Die organische Phase wird 3x mit 5 ml 1 M Salzsäure gewaschen und anschließend i. Vak. von Lösemittel befreit. Der erhaltene Rückstand wird säulenchromatographisch (Petrolether/Ethylacetat = 5:1) aufgereinigt.

Ausbeute 65 mg (0.22 mmol, 69%) weißer Feststoff

R_f 0.62 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 2.45 (s, 3 H, CH₃), 6.35 (d, $J=7.78$ Hz, 1 H, NHCH), 6.47 (d, $J=8.03$ Hz, 1 H, NHCH), 7.19 - 7.25 (m, 2 H), 7.28 - 7.40 (m, 11 H), 7.41 - 7.45 (m, 1 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 19.86, 57.24, 125.76, 126.63, 127.41 (2 C), 127.55 (2 C), 128.74 (2 C), 130.04, 131.12, 136.09 (quartär), 136.41 (quartär), 141.45 (2 C, quartär), 169.01 (CO)

FT-IR λ⁻¹ (cm⁻¹) = 3292, 1642, 1525, 936, 750, 723, 688

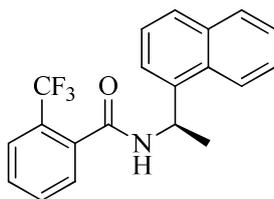
Smp. 179 °C

ESI-MS m/z = 625.4 [2M+Na]⁺, 302.2 [M+H]⁺, ber.: 301.15

LC Reinheit 93.9% (254 nm), R_t = 12.1 min, Methode Gem6

N-[(1R)-1-Naphth-1-ylethyl]-2-(trifluormethyl)benzamid (6)

Struktur



Laborkürzel

AWBz4

Summenformel

C₂₀H₁₆F₃NO

Molare Masse

343.34

Vorschrift Zu 10 ml Dichlormethan werden nacheinander unter Rühren 237 mg (1.25 mmol) 2-Trifluormethylbenzoesäure, 792 mg (1.25 mmol) PPA in Ethylacetat (50% w/w), 200 µl (1.25 mmol) (1R)-1-Naphth-1-ylethanamin und 126 mg (1.25 mmol) NMM gegeben. Da am nächsten Tag die Umsetzung laut DC nur zum Teil erfolgt war und durch Hydrolyse des PPA sich ein pH von 3 eingestellt hatte, werden weitere 150 mg (1.48 mmol) NMM zugegeben. Am folgenden Tag wird mit 30 ml Dichlormethan verdünnt und 3x mit 20 ml 10%iger Natriumcarbonatlösung, dann 1x mit 10 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Es wird aus Dichlormethan/Petrolether = 1:2 umkristallisiert.

Ausbeute 168 mg (0.489 mmol, 39%) weißer Feststoff

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.81 (d, *J*=6.57 Hz, 3 H, CH₃CH), 5.99 (d, *J*=7.58 Hz, 1 H, NH), 6.07 - 6.23 (m, 1 H, CHCH₃), 7.40 - 7.65 (m, 7 H), 7.65 - 7.74 (m, 1 H), 7.83 (d, *J*=8.34 Hz, 1 H), 7.86 - 7.94 (m, 1 H), 8.24 (d, *J*=8.59 Hz, 1 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 19.96, 45.34, 122.77, 123.41, 124.98 (quartär), 125.16, 126.00, 126.34 (q, *J*=5.85 Hz, CHCCF₃), 126.69, 127.14 (quartär), 128.53, 128.65, 128.79, 129.78, 132.36 (quartär, q, *J*=278.83 Hz, CF₃), 131.94 (br. s.), 135.84 (quartär), 135.87 (quartär), 137.45 (quartär), 166.63 (CO)

Aufgrund der niedrigen Intensität von durch Fluor aufgespaltener aromatischer Signale konnte die C-F-Kopplung nur bei einem aromatischen Kohlenstoffkern beobachtet werden.

FT-IR λ⁻¹ (cm⁻¹) = 3280, 1635, 1530, 1312, 1273, 1171, 1111, 1055, 1034, 800, 780, 765, 674

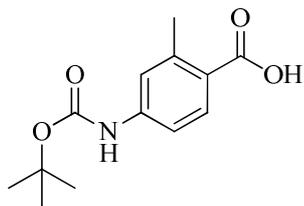
Smp. 161 °C

ESI-MS *m/z* = 344.2 [M+H]⁺, 366.2 [M+Na]⁺, ber.: 343.12

LC Reinheit 98.7% (254 nm), R_t = 12.2 min, Methode Gem6

4-[(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]-2-methylbenzoesäure (7)

Struktur



Laborkürzel AWBz6
 Summenformel C₁₃H₁₇NO₄
 Molare Masse 251.28

Vorschrift

Allgemeine Vorschrift B

0.5 g (3.3 mmol) 4-Amino-2-methylbenzoesäure

0.79 g (3.6 mmol) Boc-Anhydrid

0.4 g (9.9 mmol) NaOH

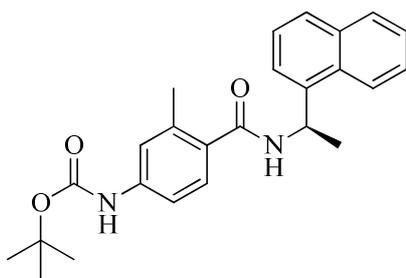
Während der Reaktion fällt ein weißer Niederschlag aus, der nach Zugabe von 20 ml Wasser wieder in Lösung geht. Nach 2 Stunden säuert man mit 10%iger Citronensäurelösung an und extrahiert 3x mit 50 ml Dichlormethan. Die organische Phase wird mit 30 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

Ausbeute 602 mg (2.40 mmol, 73%) dunkelgelber Feststoff

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.50 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.65 (s, 3 H, CH₃-Aromat), 6.67 (br. s., 1 H, NH_{Boc}), 7.24 - 7.27 (m, 1 H), 7.32 (d, J=1.52 Hz, 1 H), 8.04 (d, J=8.59 Hz, 1 H), 11.37 (br. s., 1 H, COOH)

(*R*)-*tert*-Butyl (3-Methyl-4-((1-(naphth-1-yl)ethyl)carbamoyl)phenyl)carbammat (8)

Struktur



Laborkürzel AWBz8
 Summenformel C₂₅H₂₈N₂O₃
 Molare Masse 404.50

Vorschrift

Allgemeine Vorschrift C, Lösemittelgemisch THF/Chloroform (1:1)

0.2 g (0.8 mmol) 4-[(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]-2-methylbenzoesäure (7)

0.14 g (0.8 mmol) (*1R*)-1-Naphth-1-ylethanamin

Das Filtrat wird i. Vak. von Lösemittel befreit und das erhaltene Rohprodukt durch Säulen-chromatographie (Petrolether/Ethylacetat = 1:1) aufgereinigt.

Ausbeute 0.2 g (0.49 mmol, 62%) weißer Feststoff

R_f 0.65 (Petrolether/Ethylacetat = 1:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.51 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.79 (d, J=6.82 Hz, 3 H, CH₃CH), 2.43 (s, 3 H, CH₃-Aromat), 5.97 (d, J=8.34 Hz, 1 H, NHCH), 6.06 - 6.17 (m, 1 H, CHCH₃), 6.51 (br. s., 1 H, NH_{Boc}), 7.11 (dd, J=8.34, 2.02 Hz, 1 H), 7.18 - 7.25 (m, 2 H), 7.42 - 7.62 (m, 4 H), 7.82 (d,

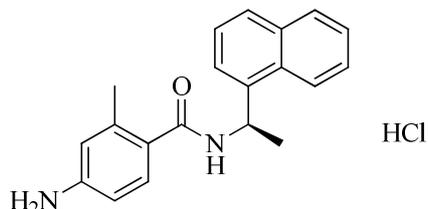
$J=8.08$ Hz, 1 H), 7.85 - 7.92 (m, 1 H), 8.23 (d, $J=8.59$ Hz, 1 H)

ESI-MS $m/z = 405.3$ [M+H]⁺, ber.: 404.21

LC Reinheit 99.1% (254 nm), $R_t = 13.9$ min, Methode Gem6

(R)-4-Amino-2-methyl-N-(1-(naphth-1-yl)ethyl)benzamid Hydrochlorid (9)

Struktur



Laborkürzel

AWBz11

Summenformel

C₂₀H₂₁ClN₂O

Molare Masse

340.85

Vorschrift 140 mg (0.35 mmol) der Boc-geschützten Verbindung **8** werden in Methanol gelöst und mit 1 ml methanolischer HCl (4 M) versetzt. Nach zwei Stunden wird das Lösemittel i. Vak. entfernt. Die anfangs weiße Substanz wird nach einigen Monaten ockerfarben.

Ausbeute 116 mg (0.34 mmol, 97%) weißer Feststoff

R_f (Base) 0.21 (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, MeOD: δ (ppm) = 1.72 (d, $J=6.97$ Hz, 3 H, CHCH₃), 2.39 (s, 3 H, CH₃), 6.06 (q, $J=6.97$ Hz, 1 H, CHCH₃), 7.21 - 7.29 (m, 2 H), 7.43 - 7.66 (m, 5 H), 7.82 (d, $J=8.16$ Hz, 1 H), 7.91 (dd, $J=8.41, 1.00$ Hz, 1 H), 8.25 (d, $J=8.53$ Hz, 1 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, MeOD: δ (ppm) = 19.74, 21.41, 46.62, 121.53, 123.93, 124.36, 126.14, 126.58, 126.93, 127.47, 129.25, 130.07, 130.12, 132.50 (quartär), 133.05 (quartär), 135.65 (quartär), 139.19 (quartär), 139.82 (quartär), 140.22 (quartär), 170.55 (C=O)

FT-IR λ^{-1} (cm⁻¹) = 3266, 2850, 2597, 1632, 1536, 1433, 1338, 1124, 770

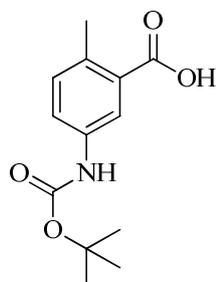
Smp. 231 °C

ESI-MS $m/z = 305.2$ [M+H]⁺, ber.: 304.16

LC Reinheit 99.0% (300 nm), $R_t = 7.3$ min, Methode Gem6

5-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]-2-methylbenzoesäure (10)

Struktur



Laborkürzel

AWBz7

Summenformel

C₁₃H₁₇NO₄

Molare Masse

251.28

Vorschrift Allgemeine Vorschrift B

0.25 g (1.66 mmol) 5-Amino-2-methylbenzoesäure

0.40 g (1.83 mmol) Boc-Anhydrid

0.20 g (5.1 mmol) NaOH

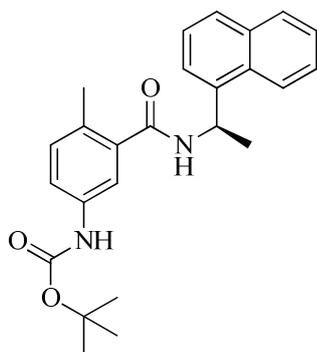
Diesmal wird die Isolierung des Produkts durch Ausfällen versucht: Zur Aufarbeitung wird der Ansatz mit 20 ml Wasser verdünnt und 3x mit 20 ml Dichlormethan ein Teil des Dioxans extrahiert. Aus der wässrigen Phase wird mit 0.1 M Salzsäure die Carbonsäure unter Rühren ausgefällt, wobei der pH nicht unter 2 fallen soll. Der Niederschlag wird über einem Glasfiltertiegel abgesaugt, mit 10 ml kalter Salzsäure (0.1 M) nachgewaschen und im evakuierten Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet. Diese Aufarbeitungsmethode erweist sich gegenüber der von Verbindung **7** in ihrer Ausbeute als unterlegen, mögliche Ursachen sind nicht vollständiges Ausfällen der Carbonsäure oder teilweises Anlösen beim Waschen.

Ausbeute 236 mg (0.94 mmol, 57%) weißer Feststoff

¹H-NMR 400.13 MHz, MeOD: δ (ppm) = 1.52 (s, 9 H), 2.50 (s, 3 H), 7.16 (d, $J=8.34$ Hz, 1 H), 7.47 (dd, $J=8.34, 1.77$ Hz, 1 H), 7.94 (d, $J=2.27$ Hz, 1 H)

(*R*)-*tert*-Butyl (4-Methyl-3-((1-(naphth-1-yl)ethyl)carbamoyl)phenyl)carbamate (**11**)

Struktur



Laborkürzel

AWBz9

Summenformel

C₂₅H₂₈N₂O₃

Molare Masse

404.50

Vorschrift Allgemeine Vorschrift C, Lösemittelgemisch 30 ml THF + 10 ml Chloroform

0.1 g (0.4 mmol) 5-[(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]-2-methylbenzoesäure (**10**)

64 μ l (68 mg, 0.4 mmol) (*1R*)-1-Naphth-1-ylethanamin

Das Filtrat wird i. Vak. von Lösemittel befreit und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch (Petrolether/Ethylacetat = 2:1) aufgereinigt.

Ausbeute 114 mg (0.28 mmol, 70%) weißer Feststoff

R_f 0.6 (Petrolether/Ethylacetat = 1:1)

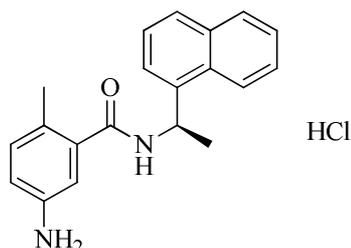
¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.48 (s, 9 H), 1.80 (d, $J=6.40$ Hz, 3 H, CH₃CH), 2.36 (s, 3 H, CH₃-Aromat), 6.02 - 6.19 (m, 2 H, NHCHCH₃), 7.10 (d, $J=8.28$ Hz, 1 H), 7.19 - 7.34 (m, 2 H), 7.43 - 7.65 (m, 4 H), 7.82 (d, $J=8.16$ Hz, 1 H), 7.85 - 7.93 (m, 1 H), 8.02 (s, 1 H, NHBoc), 8.23 (d, $J=8.53$ Hz, 1 H)

ESI-MS m/z = 405.3 [M+H]⁺, ber.: 404.21

LC Reinheit 99.0% (254 nm), R_t = 14.1 min, Methode Gem6

(R)-5-Amino-2-methyl-N-(1-(naphth-1-yl)ethyl)benzamid Hydrochlorid (12)

Struktur



Laborkürzel AWBz12 / AWLit2
 Summenformel C₂₀H₂₁ClN₂O
 Molare Masse 340.85

Vorschrift 110 mg (0.27 mmol) der Boc-geschützten Verbindung **11** werden in Methanol gelöst und mit 1 ml methanolischer HCl (4 M) versetzt. Nach zwei Stunden wird das Lösemittel i. Vak. entfernt. Die anfangs schwach gelbe Substanz färbt sich nach einigen Monaten bräunlich (RT, Tageslicht).

Ausbeute 92 mg (0.27 mmol, 99%) blassgelber Feststoff

R_f (Base) 0.18 (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, MeOD: δ (ppm) = 1.73 (d, *J*=6.88 Hz, 3 H, CHCH₃), 2.37 (s, 3 H, CH₃), 6.07 (q, *J*=6.88 Hz, 1 H, CHCH₃), 7.28 - 7.44 (m, 3 H), 7.45 - 7.62 (m, 3 H), 7.65 (d, *J*=7.15 Hz, 1 H), 7.82 (d, *J*=8.28 Hz, 1 H), 7.91 (d, *J*=7.65 Hz, 1 H), 8.25 (d, *J*=8.41 Hz, 1 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, MeOD: δ (ppm) = 19.33, 21.40, 46.59, 122.81, 124.01, 124.32, 125.31, 126.59, 126.93, 127.51, 129.27, 129.60 (quartär), 130.12, 132.47 (quartär), 133.63, 135.62 (quartär), 138.17 (quartär), 139.99 (quartär), 140.12 (quartär), 170.18 (C=O)

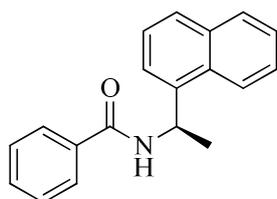
ESI-MS *m/z* = 305.0 [M+H]⁺, ber.: 304.16

LC Reinheit 95.5% (300 nm), R_t = 8.1 min, Methode Gem3

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur^[18].

N-[(1R)-1-Naphth-1-ylethyl]benzamid (13)

Struktur



Laborkürzel AWBz10
 Summenformel C₁₉H₁₇NO
 Molare Masse 275.34

Vorschrift Allgemeine Vorschrift C, Lösemittel 15 ml THF
 50 mg (0.41 mmol) Benzoesäure
 50 µl (55 mg, 0.32 mmol) (1R)-1-Naphth-1-ylethanamin
 Das Filtrat wird i. Vak. von Lösemittel befreit und das erhaltene Rohprodukt durch Säulen-
 chromatographie (Petrolether/Ethylacetat = 3:1) aufgereinigt.

Ausbeute 34 mg (0.12 mmol, 38%) weißer Feststoff

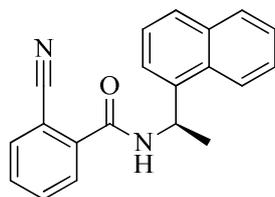
R_f 0.40 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.80 (d, *J*=6.78 Hz, 3 H, CHCH₃), 6.06 - 6.21 (m, 1 H, CHCH₃), 6.40 (d, *J*=7.53 Hz, 1 H, NH), 7.35 - 7.43 (m, 2 H), 7.43 - 7.58 (m, 4 H), 7.61 (d, *J*=7.15 Hz, 1 H), 7.70 - 7.78 (m, 2 H), 7.83 (d, *J*=8.16 Hz, 1 H), 7.86 - 7.92 (m, 1 H), 8.19 (d, *J*=8.28 Hz, 1 H)

¹³ C-NMR	100.61 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 20.64, 45.21, 122.67, 123.42, 125.18, 125.89, 126.65, 126.91 (2 C), 128.50 (3 C), 128.77, 131.21 (quartär), 131.44, 133.97 (quartär), 134.46 (quartär), 138.14 (quartär), 166.39 (<u>CO</u>)
FT-IR	λ ⁻¹ (cm ⁻¹) = 3309, 2970, 1626, 1577, 1524, 1488, 1272, 802, 778
Smp.	195 °C
ESI-MS	m/z = 276.2 [M+H] ⁺ , 298.2 [M+Na] ⁺ , ber.: 275.13
LC	Reinheit 98.6% (254 nm), R _t = 11.5 min, Methode Gem6

(R)-2-Cyano-N-(1-(naphth-1-yl)ethyl)benzamid (14)

Struktur



Laborkürzel	AWBz15
Summenformel	C ₂₀ H ₁₆ N ₂ O
Molare Masse	300.35

Vorschrift Allgemeine Vorschrift D

110 mg (0.75 mmol) 2-Cyanobenzoesäure

100 µl (107 mg, 0.62 mmol) (1R)-1-Naphth-1-ylethanamin

Das Rohprodukt wird in wenig Ethylacetat gelöst und mit Pentan ausgefällt. Der Niederschlag wird abfiltriert und i. Vak. getrocknet.

Ausbeute 90 mg (0.30 mmol, 48%) weißer Feststoff

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.83 (d, J=6.82 Hz, 3 H, CHCH₃), 6.15 (qd, J=7.07, 6.82 Hz, 1 H, CHCH₃), 6.56 (d, J=7.07 Hz, 1 H, NH), 7.41 - 7.66 (m, 6 H), 7.66 - 7.77 (m, 2 H), 7.82 (d, J=8.34 Hz, 1 H), 7.88 (d, J=8.08 Hz, 1 H), 8.20 (d, J=8.34 Hz, 1 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 20.58 (CH3), 45.88 (CH), 110.43 (quartär, Pos. 2 Cyanobenzoesäure), 117.48 (quartär, CN), 122.87, 123.25, 125.25, 125.95, 126.77, 128.61, 128.65, 128.84, 130.90, 131.03 (quartär), 132.78, 133.89, 133.94 (quartär), 137.56 (quartär), 138.49 (quartär), 164.15 (CO)

FT-IR λ⁻¹ (cm⁻¹) = 3279, 2968, 2227, 1630, 1530, 1453, 1346, 1170, 800, 778, 759

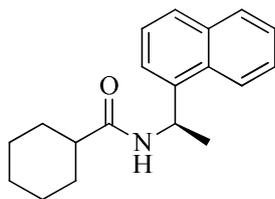
Smp. 181 °C

ESI-MS m/z = 301.1 [M+H]⁺, 323.2 [M+Na]⁺, ber.: 300.13

LC Reinheit 98.7% (254 nm), R_t = 9.9 min, Methode Gem6

***N*-[(1*R*)-1-Naphth-1-ylethyl]cyclohexancarboxamid (15)**

Struktur



Laborkürzel AWBz19

Summenformel C₁₉H₂₃NO

Molare Masse 281.39

Vorschrift Allgemeine Vorschrift D

96 mg (0.75 mmol) Cyclohexancarbonsäure

100 µl (107 mg, 0.62 mmol) (1*R*)-1-Naphth-1-ylethanamin

Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (Pentan/Ethylacetat = 3:1 + 1% Isopropylamin) aufgereinigt.

Ausbeute 93 mg (0.33 mmol, 53%) weißer Feststoff

R_f 0.51 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.16 - 1.65 (m, 6 H), 1.67 (d, *J*=6.57 Hz, 3 H, CH₃), 1.70 - 1.91 (m, 4 H), 2.04 (tt, *J*=11.75, 3.41 Hz, 1 H, CHCO), 5.64 (d, *J*=7.58 Hz, 1 H, NH), 5.79 - 6.04 (m, 1 H, CHCH₃), 7.43 - 7.58 (m, 4 H), 7.81 (d, *J*=8.08 Hz, 1 H), 7.84 - 7.91 (m, 1 H), 8.08 (d, *J*=8.34 Hz, 1 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 20.56 (CH₃CH), 25.66, 25.68, 25.68, 29.57, 29.70, 44.23 (CHCH₃), 45.62 (CHCO), 122.46, 123.61, 125.12, 125.85, 126.45, 128.32, 128.69, 131.21 (quartär), 133.93 (quartär), 138.41 (quartär), 174.81 (CO)

FT-IR λ⁻¹ (cm⁻¹) = 3271, 2923, 2850, 1629, 1535, 1442, 1369, 1253, 1212, 956, 793, 774, 689

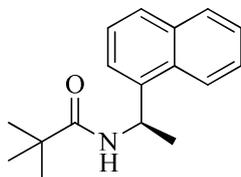
Smp. 170 °C

ESI-MS *m/z* = 585.4 [2M+Na]⁺, 282.2 [M+H]⁺, ber.: 281.18

LC Reinheit 98.3% (254 nm), R_t = 13.0 min, Methode Gem6

(*R*)-*N*-(1-(naphth-1-yl)ethyl)pivalamid (16)

Struktur



Laborkürzel AWBz20

Summenformel C₁₇H₂₁NO

Molare Masse 255.35

Vorschrift Allgemeine Vorschrift Ab

91.6 µl (90.2 mg, 0.75 mmol) Pivaloylchlorid

100 µl (107 mg, 0.62 mmol) (1*R*)-1-Naphth-1-ylethanamin

Das Rohprodukt wird in wenig Diethylether aufgenommen, mit Pentan ausgefällt und der Niederschlag über einen Glasfaltertiegel abgesaugt. Man wäscht 2x mit 5 ml Wasser nach und trocknet im evakuierten Exsikkator über Schwefelsäure.

Ausbeute 74 mg (0.29 mmol, 47%) weißer Feststoff

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.18 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.67 (d, *J*=6.53 Hz, 3 H, CHCH₃), 5.83 (d,

$J=6.65$ Hz, 1 H, NH), 5.87 - 5.95 (m, 1 H, CHCH₃), 7.43 - 7.57 (m, 4 H), 7.81 (d, $J=7.91$ Hz, 1 H), 7.84 - 7.91 (m, 1 H), 8.04 - 8.09 (m, 1 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 20.54 (CH₃), 27.50 (3 C), 38.63 (quartär), 44.52 (CH), 122.41, 123.52, 125.11, 125.82, 126.39, 128.28, 128.68, 131.23 (quartär), 133.93 (quartär), 138.50 (quartär), 177.16 (CO)

FT-IR λ^{-1} (cm⁻¹) = 3309, 2969, 1629, 1531, 1209, 798, 776

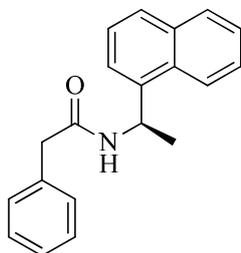
Smp. 131 °C

ESI-MS m/z = 533.3 [2M+Na]⁺, 256.2 [M+H]⁺, ber.: 255.16

LC Reinheit 99.4% (254 nm), R_t = 11.6 min, Methode Gem6

N-[(1R)-1-Naphth-1-ylethyl]-2-phenylacetamid (17)

Struktur



Laborkürzel	AWBz21
Summenformel	C ₂₀ H ₁₉ NO
Molare Masse	289.37

Vorschrift Allgemeine Vorschrift Ab

99 μ l (116 mg, 0.75 mmol) Phenyllessigsäurechlorid

100 μ l (107 mg, 0.62 mmol) (1R)-1-Naphth-1-ylethanamin

Das Rohprodukt wird in wenig Diethylether aufgenommen, mit Pentan ausgefällt und der Niederschlag über einen Glasfildertiegel abgesaugt. Da noch der Geruch von Phenyllessigsäure wahrgenommen werden kann, wird der Niederschlag mit einem Pentan/Toluol Gemisch (5:1) gewaschen und über 2 Tage i. Vak. getrocknet.

Ausbeute 150 mg (0.52 mmol, 84%) weißer Feststoff

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.50 (d, $J=6.78$ Hz, 3 H, CHCH₃), 3.47 (d, $J=1.76$ Hz, 2 H, CH₂CO), 5.63 (d, $J=7.15$ Hz, 1 H, NH), 5.78 - 5.87 (m, 1 H, CHCH₃), 7.10 - 7.33 (m, 7 H), 7.37 - 7.45 (m, 2 H), 7.68 (d, $J=8.03$ Hz, 1 H), 7.74 - 7.78 (m, 1 H), 7.93 - 7.98 (m, 1 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 20.77 (CH₃), 43.78 (CH₂), 44.89 (CH), 122.34, 123.37, 125.08, 125.79, 126.44, 127.20, 128.26, 128.71, 128.88 (2 C), 129.26 (2 C), 130.97 (quartär), 133.87 (quartär), 134.83 (quartär), 138.16 (quartär), 169.79 (CO)

FT-IR λ^{-1} (cm⁻¹) = 3244, 3045, 1631, 1530, 1348, 1159, 1120, 799, 772, 733, 699

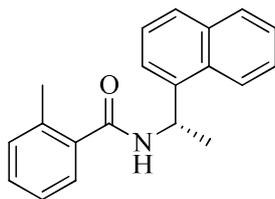
Smp. 130 °C

ESI-MS m/z = 601.4 [2M+Na]⁺, 290.2 [M+H]⁺, ber.: 289.15

LC Reinheit 98.3% (254 nm), R_t = 12.0 min, Methode Gem6

2-Methyl-N-[(1S)-1-naphth-1-ylethyl]benzamid (18)

Struktur



Laborkürzel AWLit1S

Summenformel C₂₀H₁₉NO

Molare Masse 289.37

Vorschrift Zu 2 ml Dichlormethan werden 50 µl (53.4 mg, 0.312 mmol) (1S)-1-Naphth-1-ylethanamin und 100 µl (78 mg, 0.77 mmol) Triethylamin pipettiert, anschließend werden 50 µl (60 mg, 0.39 mmol) 2-Methylbenzoesäurechlorid (**1**) zugetropft, woraufhin ein weißer Niederschlag entsteht. Nach 1 Stunde wird vom Niederschlag abfiltriert, das Filterpapier sorgfältig mit Dichlormethan nachgewaschen und daraufhin das Filtrat mit Druckluft von Lösemittel befreit. Der Rückstand in 10 ml Ethylacetat aufgenommen, 3x mit 5 ml 10%iger Citronensäurelösung und anschließend mit 5 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wird i. Vak. von Lösemittel befreit und der erhaltene Feststoff 2x aus Ethylacetat umkristallisiert.

Ausbeute 61 mg (0.21 mmol, 68%) weißer Feststoff

R_f 0.48 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.81 (d, *J*=6.65 Hz, 3 H, CHCH₃), 2.45 (s, 3 H, CH₃), 5.99 (d, *J*=7.78 Hz, 1 H, NH), 6.09 - 6.24 (m, 1 H, CHCH₃), 7.09 - 7.22 (m, 2 H), 7.24 - 7.31 (m, 2 H), 7.43 - 7.65 (m, 4 H), 7.83 (d, *J*=8.16 Hz, 1 H), 7.86 - 7.95 (m, 1 H), 8.26 (d, *J*=8.53 Hz, 1 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 19.72, 20.59, 44.86, 122.57, 123.55, 125.15, 125.64, 125.95, 126.53, 126.59, 128.51, 128.79, 129.80, 130.93, 131.21, 133.98 (quartär), 136.06 (quartär), 136.40 (quartär), 138.00 (quartär), 168.93 (CO)

FT-IR λ⁻¹ (cm⁻¹) = 3290, 1628, 1598, 1520, 1446, 1326, 1268, 1119, 1091, 892, 797, 778, 746, 677, 658

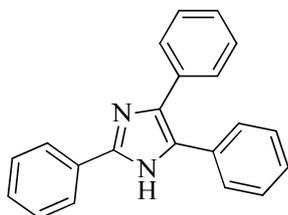
Smp. 160 °C

ESI-MS *m/z* = 601.4 [2M+Na]⁺, 290.2 [M+H]⁺, ber.: 289.15

LC Reinheit 98.6% (254 nm), R_t = 12.0 min, Methode Gem6

2,4,5-Triphenyl-1H-imidazol (19)

Struktur



Laborkürzel AWIm1

Summenformel C₂₁H₁₆N₂

Molare Masse 296.37

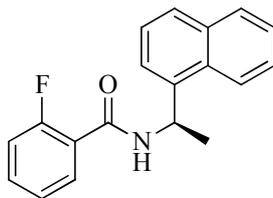
Vorschrift Zu 60 ml Eisessig werden 1.0 g (4.8 mmol) Benzil, 0.51 g (4.8 mmol) Benzaldehyd und 5 g Ammoniumacetat gegeben. Es wird über 5 Stunden zum Rückfluss erhitzt, nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Lösung in 100 ml Eiswasser gegossen und der ausgefallene Feststoff abfiltriert. Eine Umkristallisation erfolgt aus Ethylacetat.

Ausbeute 830 mg (2.8 mmol, 58%) grünlich schimmernder, weißer Feststoff

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 7.28 - 7.74 (m, 13 H), 7.87 - 8.03 (m, 2 H)
FT-IR λ⁻¹ (cm⁻¹) = 3038, 1488, 1461, 1128, 1071, 966, 916, 766, 735, 696
ESI-MS m/z = 297.2 [M+H]⁺, ber.: 296.13
LC Reinheit 99.2% (254 nm), R_t = 3.9 min, Methode Gem6
Die analytischen Daten entsprechen der Literatur^[9918].

2-Fluor-N-[(1R)-1-naphth-1-ylethyl]benzamid (20)

Struktur



Laborkürzel AWBz16
Summenformel C₁₉H₁₆FNO
Molare Masse 293.33

Vorschrift Allgemeine Vorschrift D
105 mg, (0.75 mmol) 2-Fluorbenzoesäure
100 µl (107 mg, 0.62 mmol) (1R)-1-Naphth-1-ylethanamin
Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Pentan/Ethylacetat = 2:1 + 1% Isopropylamin) aufgereinigt.

Ausbeute 115 mg (0.39 mmol, 63%) blassgelber Feststoff

R_f 0.45 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.80 (d, J=6.82 Hz, 3 H, CHCH₃), 6.16 - 6.25 (m, 1 H, CHCH₃), 7.00 - 7.09 (m, 1 H), 7.09 - 7.18 (m, 1 H, NH), 7.24 (td, J=7.58, 1.01 Hz, 1 H), 7.42 (dddd, J=8.27, 7.33, 5.24, 1.89 Hz, 1 H), 7.46 - 7.65 (m, 4 H), 7.82 (d, J=8.08 Hz, 1 H), 7.86 - 7.93 (m, 1 H), 8.12 (td, J=7.83, 1.77 Hz, 1 H), 8.23 (d, J=8.34 Hz, 1 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 21.09, 45.37, 115.83 (d, J=24.58 Hz, CCF, Pos. 3 Fluorbenzoesäure), 121.05 (d, J=11.74 Hz, quartär, FCC-CO, Pos. 1 Fluorbenzoesäure), 122.45, 123.20, 124.64 (d, J=3.30 Hz), 125.19, 125.70, 126.40, 128.23, 128.72, 130.90 (quartär), 131.87 (d, J=2.20 Hz), 133.09 (d, J=9.17 Hz), 133.88 (quartär), 138.27 (quartär), 160.45 (d, J=247.22 Hz, quartär, CF, Pos. 2 Fluorbenzoesäure), 162.23 (d, J=2.94 Hz, quartär, CO)

FT-IR λ⁻¹ (cm⁻¹) = 3285, 2968, 1612, 1523, 1325, 1227, 800, 776, 756

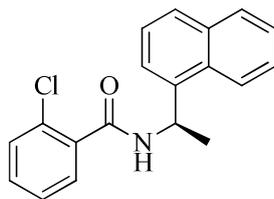
Smp. 135 °C

ESI-MS m/z = 609.3 [2M+Na]⁺, 294.1 [M+H]⁺, ber.: 293.12

LC Reinheit 97.5% (254 nm), R_t = 12.1 min, Methode Gem6

2-Chlor-N-[(1R)-1-naphth-1-ylethyl]benzamid (21)

Struktur



Laborkürzel AWBzCh
 Summenformel C₁₉H₁₆ClNO
 Molare Masse 309.79

Vorschrift Allgemeine Vorschrift Ab

182 mg (1.04 mmol) 2-Chlorbenzoesäurechlorid

119 mg (0.694 mmol) (1R)-1-Naphth-1-ylethanamin

Der erhaltene Feststoff wird säulenchromatographisch (Petrolether/Ethylacetat = 3:1) aufgereinigt.

Ausbeute 138 mg (0.445 mmol, 64%) weißer Feststoff

R_f 0.33 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.82 (d, *J*=6.78 Hz, 3 H), 6.09 - 6.23 (m, 1 H), 6.42 (d, *J*=7.28 Hz, 1 H), 7.22 - 7.40 (m, 3 H), 7.44 - 7.64 (m, 5 H), 7.82 (d, *J*=8.28 Hz, 1 H), 7.86 - 7.94 (m, 1 H), 8.24 (d, *J*=8.53 Hz, 1 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 20.63, 45.56, 122.71, 123.55, 125.18, 125.91, 126.57, 127.01, 128.51, 128.77, 129.97, 130.15, 130.68 (quartär), 131.10 (quartär), 131.18, 133.95 (quartär), 135.17 (quartär), 137.78 (quartär), 165.46 (C=O)

FT-IR λ⁻¹ (cm⁻¹) = 3282, 1632, 1521, 1452, 1344, 1052, 800, 778, 749

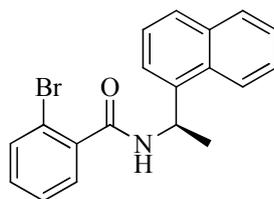
Smp. 133 °C

ESI-MS *m/z* = 310.2 [M+H]⁺, ber.: 309.09

LC Reinheit 98.0% (254 nm), R_t = 11.9 min, Methode Gem6

2-Brom-N-[(1R)-1-naphth-1-ylethyl]benzamid (22)

Struktur



Laborkürzel AWBz17
 Summenformel C₁₉H₁₆BrNO
 Molare Masse 354.24

Vorschrift Allgemeine Vorschrift D

150 mg, (0.75 mmol) 2-Brombenzoesäure

100 µl (107 mg, 0.62 mmol) (1R)-1-Naphth-1-ylethanamin

Zur Abtrennung von Diisopropylharnstoff und 2-Brombenzoesäure wird das Rohprodukt in wenig Methanol gelöst, zum Sieden erhitzt und 10 ml heißes Wasser zugegeben, wobei weißer Feststoff ausfällt. Man heizt erneut für etwa 30 Sekunden zum Sieden (Heißluftfön) und führt zügig eine Heißfiltration durch. Der abfiltrierte Feststoff wird im evakuierten Exsikkator getrocknet.

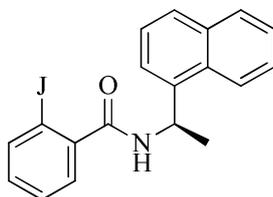
Ausbeute 120 mg (0.339 mmol, 55%) beiger Feststoff

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.83 (d, *J*=6.53 Hz, 3 H), 6.10 - 6.19 (m, 1 H), 6.19 - 6.26 (m, 1

	H), 7.20 - 7.26 (m, 1 H), 7.30 (td, $J=7.47$, 1.25 Hz, 1 H), 7.45 - 7.63 (m, 6 H), 7.83 (d, $J=8.16$ Hz, 1 H), 7.86 - 7.92 (m, 1 H), 8.26 (d, $J=8.66$ Hz, 1 H)
$^{13}\text{C-NMR}$	100.61 MHz, CDCl_3 : δ (ppm) = 20.46, 45.47, 119.28 (quartär, $\underline{\text{CBr}}$), 122.77, 123.63, 125.16, 125.94, 126.61, 127.47, 128.55, 128.76, 129.44, 131.14 (quartär), 131.16, 133.30, 133.94 (quartär), 137.64 (quartär), 137.79 (quartär), 166.50 ($\underline{\text{CO}}$)
FT-IR	λ^{-1} (cm^{-1}) = 3276, 2925, 1632, 1523, 1450, 1372, 1343, 1259, 1088, 1025, 800, 779, 747, 684
Smp.	153 °C
ESI-MS	m/z = 354.1 und 356.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 353.04 (mit Isotop ^{79}Br)
LC	Reinheit 99.3% (254 nm), R_t = 11.9 min, Methode Gem6

2-Iod-N-[(1R)-1-naphth-1-ylethyl]benzamid (23)

Struktur



Laborkürzel

AWBz18

Summenformel

$\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{INO}$

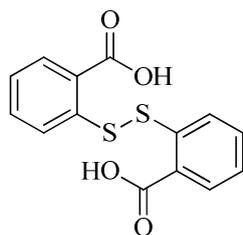
Molare Masse

401.24

Vorschrift	Allgemeine Vorschrift D 186 mg, (0.75 mmol) 2-Iodbenzoesäure 100 μl (107 mg, 0.62 mmol) (1R)-1-Naphth-1-ylethanamin Die Aufarbeitung erfolgt wie bei Verbindung 22 angegeben.
Ausbeute	76 mg (0.19 mmol, 31%) beiger Feststoff
$^1\text{H-NMR}$	400.13 MHz, CDCl_3 : δ (ppm) = 1.85 (d, $J=6.78$ Hz, 3 H), 6.01 (d, $J=7.65$ Hz, 1 H), 6.08 - 6.20 (m, 1 H), 7.05 (ddd, $J=8.03$, 6.34, 2.82 Hz, 1 H), 7.28 - 7.35 (m, 2 H), 7.48 (dd, $J=8.03$, 7.40 Hz, 1 H), 7.50 - 7.57 (m, 1 H), 7.58 - 7.63 (m, 2 H), 7.80 - 7.91 (m, 3 H), 8.28 (d, $J=8.41$ Hz, 1 H)
$^{13}\text{C-NMR}$	100.61 MHz, CDCl_3 : δ (ppm) = 20.34, 45.36, 92.36 (quartär, $\underline{\text{CI}}$), 122.84, 123.71, 125.14, 125.96, 126.69, 128.08, 128.19, 128.60, 128.76, 131.05, 131.19 (quartär), 133.94 (quartär), 137.53 (quartär), 139.85, 142.04 (quartär), 168.18 ($\underline{\text{CO}}$)
FT-IR	λ^{-1} (cm^{-1}) = 3267, 1631, 1525, 1343, 1121, 1015, 801, 779, 748, 676
Smp.	161 °C
ESI-MS	m/z = 402.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 401.03
LC	Reinheit 93.8% (254 nm), R_t = 12.2 min, Methode Gem6

2,2'-Disulfandiyldibenzoesäure (24)

Struktur



Laborkürzel AWBz24_2

Summenformel C₁₄H₁₀O₄S₂

Molare Masse 306.36

Vorschrift Zu einer Lösung von 1.50 g (9.74 mmol) Thiosalicylsäure in 100 ml Ethanol werden etwa 5 ml einer gesättigten, ethanolischen Iodlösung gegeben, sodass sich eine schwache Gelbfärbung des Ansatzes einstellt. Es wird über 30 Minuten gerührt, dabei fällt weißer Niederschlag aus, der nach Abfiltrieren und Waschen mit wenig Ethanol i. Vak. getrocknet wird.

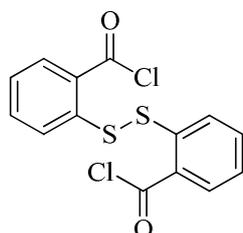
Ausbeute 1.040 g (3.39 mmol, 70%) weißer Feststoff

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 7.34 (td, *J*=7.43, 1.19 Hz, 2 H), 7.51 - 7.66 (m, 4 H), 8.02 (dd, *J*=7.65, 1.38 Hz, 2 H)

Das ¹H-NMR-Spektrum entspricht der Literatur^[100].

2,2'-Disulfandiyldibenzoylchlorid (25)

Struktur



Laborkürzel AWBz25

Summenformel C₁₄H₈Cl₂O₂S₂

Molare Masse 343.25

Vorschrift Zu 6 ml Thionylchlorid werden 1.04 g (3.39 mmol) 2,2'-Disulfandiyldibenzoesäure (**24**) und 1 Tropfen DMF gegeben. Man heizt 6 Stunden unter Rückfluss und entfernt daraufhin das Thionylchlorid i. Vak. (Kühlfalle!). Man erhält gelben, feinkristallinen Feststoff mit angenehm fruchtigem Geruch, der im gut verschlossenen Rundkolben unter Argon aufbewahrt wird. Dennoch zeigt er nach wenigen Tagen Klumpenbildung.

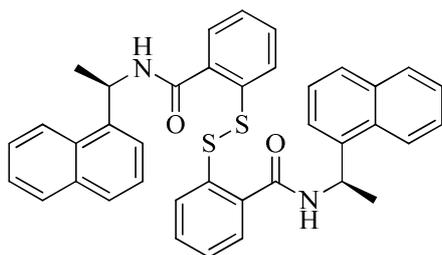
Ausbeute 1.129 g (3.29 mmol, 97%) gelber, kristalliner Feststoff

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 7.39 (ddd, *J*=8.09, 7.22, 1.13 Hz, 2 H), 7.52 - 7.60 (m, 2 H), 7.78 (dd, *J*=8.09, 1.07 Hz, 2 H), 8.40 (dd, *J*=7.91, 1.38 Hz, 2 H)

Das ¹H-NMR-Spektrum entspricht der Literatur^[100].

2,2'-Disulfandiylbis(*N*-((*R*)-1-(naphth-1-yl)ethyl)benzamid) (26)

Struktur



Laborkürzel

AWBz26

Summenformel

C₃₈H₃₂N₂O₂S₂

Molare Masse

612.80

Vorschrift Unter Rühren werden zu 5 ml Dichlormethan 300 mg (1.75 mmol) (*1R*)-1-Naphth-1-ylethanamin, 366 µl (263 mg, 2.61 mmol) Triethylamin und 300 mg (0.87 mmol) 2,2'-Disulfandiyl-dibenzoylchlorid (**25**) gegeben. Nach 2 Tagen werden 50 ml Ethylacetat zugegeben und 3x mit 20 ml 0.1 M Salzsäure extrahiert, ungelöster Feststoff der Zwischenphase wird dabei in die organische Phase mitgenommen. Zur besseren Phasentrennung werden der organischen Phase 20 ml Diethylether zugefügt und mit 50 ml halbgesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Man trocknet über Natriumsulfat und filtriert das Natriumsulfat mitsamt dem feinen Niederschlag ab. Das klare Filtrat wird i.Vak. von Lösemittel befreit, man erhält 197 mg gelbes Öl als Rohprodukt. Zur weiteren Aufreinigung wird eine Säulenchromatographie (Petrolether/ Ethylacetat = 4:1) durchgeführt.

Ausbeute 161 mg (0.263 mmol, 30%) gelbes Öl

R_f 0.46 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.93 (d, *J*=6.67 Hz, 6 H, 2x CHCH₃), 6.76 (q, *J*=6.67 Hz, 2 H, 2x CHCH₃), 7.32 - 7.43 (m, 4 H), 7.43 - 7.61 (m, 8 H), 7.77 (d, *J*=7.15 Hz, 2 H), 7.84 - 7.97 (m, 4 H), 8.09 (d, *J*=7.91 Hz, 2 H), 8.11 - 8.18 (m, 2 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 18.52, 48.33, 120.42, 123.22, 124.11, 124.82, 125.09 (quartär), 125.28, 126.16, 126.60, 127.24, 128.77, 129.72, 131.50, 133.30 (quartär), 133.81 (quartär), 135.42 (quartär), 140.73 (quartär), 164.54 (2x C=O)

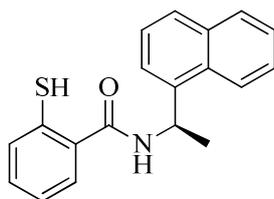
FT-IR λ⁻¹ (cm⁻¹) = 1645, 1509, 1445, 1303, 1236, 1186, 807, 778, 737, 670

ESI-MS *m/z* = 306.0 [M/2]⁺, ber.: 612.19

LC Reinheit 99.6% (254 nm), R_t = 13.2 min, Methode gem6

N-[(*1R*)-1-Naphth-1-ylethyl]-2-sulfanylbenzamid (27)

Struktur



Laborkürzel

AWBz27_2

Summenformel

C₁₉H₁₇NOS

Molare Masse

307.41

Vorschrift Nachdem die Isolierung als Reinstoff im Mikromaßstab nicht gelang, wird eine Stammlösung des Disulfids (**26**) mit DTT *in situ* reduziert. Das Produkt bleibt dabei in dieser Lösung ausreichend lange (über 1 Woche bei -30 °C, laut HPLC) in reduzierter Form stabil.

40 mM Stammlösung Edukt: Es werden 50.0 mg (0.0815 mmol) 2,2'-Disulfandiylobis(*N*-((*R*)-1-(naphthn-1-yl)ethyl)benzamide) in ein Eppendorf-Cap eingewogen und 2.038 ml DMSO zupipettiert.

80 mM Stammlösung DTT: Es werden 21.3 mg (0.138 mmol) DTT in ein Eppendorf-Cap eingewogen und 1.727 ml DMSO zupipettiert.

Reaktionsansatz:

In ein leeres Eppendorf-Cap werden 50 µl Stammlösung Edukt (40 mM) und 150 µl Stammlösung DTT (80 mM) pipettiert und am Vortex vermischt. Nach Inkubation über 1 Stunde bei Raumtemperatur zeigt die Reaktionskontrolle mittels HPLC vollständige Umsetzung. Diese neue Produkt-Stammlösung enthält das *N*-[(1*R*)-1-Naphth-1-ylethyl]-2-sulfanylbenzamid (Verbindung **27**) in einer Konzentration von 20 mM sowie 60 mM DTT in teils oxidierte Form.

Referenzansatz:

Möglicherweise führt der Zusatz von DTT im Assay zu einer geringfügigen Beeinflussung der Aktivität, daher wird eine Referenzlösung mit DTT ohne Inhibitor angesetzt:

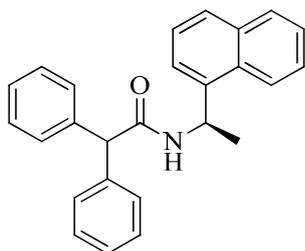
In ein leeres Eppendorf-Cap werden 50 µL DMSO und 150 µL Stammlösung DTT (80 mM) pipettiert und am Vortex vermischt. Diese Referenzlösung enthält 60 mM DTT in DMSO.

Beim Assay sind gewöhnlich 50 µM DTT anwesend, mittels dieser Referenzlösung kann die DTT-Konzentration im Assay auf 350 µM erhöht werden, um gleiche Bedingungen wie bei der Testung von Verbindung **27** zu schaffen.

Ausbeute	Es erfolgt keine Isolierung des Reinstoffs, wegen der Oxidationsempfindlichkeit (s. oben) wird in DMSO/DTT gelöst aufbewahrt: 200 µL gelbe Lösung, Substanzkonzentration 20 mM in DMSO
ESI-MS	$m/z = 308.0 [M+H]^+$, ber.: 307.10
LC	Reinheit 96.5% (300 nm), $R_t = 11.6$ min, Methode Gem6

(*R*)-*N*-(1-(Naphth-1-yl)ethyl)-2,2-diphenylacetamid (**28**)

Struktur



Laborkürzel	AWBz31
Summenformel	C ₂₆ H ₂₃ NO
Molare Masse	365.47

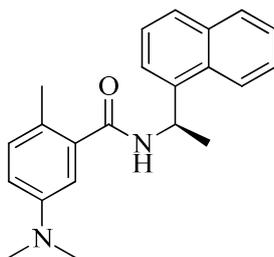
Vorschrift In 5 ml Dichlormethan werden 161.7 mg (0.63 mmol, lt. Herstellerangabe "90% technisch rein") Diphenylacetylchlorid suspendiert und daraufhin soviel THF zugegeben, bis die Substanz gelöst ist (etwa 5 ml). In die Lösung werden unter Rühren 100 mg (0.58 mmol) (1*R*)-1-Naphth-1-ylethanamin und 88 mg (0.87 mmol) Triethylamin gegeben. Nach einem Tag wird der Ansatz aufgearbeitet, indem zunächst das Lösemittel i. Vak. weitestgehend entfernt wird, dann nimmt man den erhaltenen Rückstand in 20 ml Ethylacetat auf und extrahiert 3x mit 20 ml 10%iger Kaliumhydrogensulfatlösung und 1x mit 10 ml gesättigter Natriumchloridlösung. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, i. Vak. von Lösemittel befreit und der erhaltene

Rückstand säulenchromatographisch (Petrolether/Ethylacetat = 4:1) aufgereinigt.

Ausbeute	168 mg (0.460 mmol, 73%) beiger Feststoff
¹ H-NMR	400.13 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 1.59 (d, <i>J</i> =6.78 Hz, 3 H, CHCH ₃), 4.90 (s, 1 H, CH-Diphenyl), 5.97 (qd, <i>J</i> =7.17, 6.96 Hz, 1 H, CHCH ₃), 6.19 (d, <i>J</i> =5.65 Hz, 1 H, NH), 7.18 - 7.36 (m, 11 H), 7.40 (t, <i>J</i> =7.59 Hz, 1 H), 7.46 - 7.57 (m, 2 H), 7.79 (d, <i>J</i> =8.03 Hz, 1 H), 7.83 - 7.91 (m, 1 H), 8.01 - 8.14 (m, 1 H)
¹³ C-NMR	100.61 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 20.55 (CH ₃), 44.92 (CHCH ₃), 58.66 (CHCO), 122.31, 123.36, 124.98, 125.67, 126.26, 126.97, 127.00, 128.07, 128.45, 128.47 (2 C), 128.58, 128.72 (2 C), 128.79 (2 C), 130.88 (quartär), 133.75 (quartär), 138.17 (quartär), 139.27 (quartär, 2 C), 170.65 (CO)
FT-IR	λ ⁻¹ (cm ⁻¹) = 3298, 3030, 1634, 1527, 1495, 1446, 1214, 795, 774, 723, 696
Smp.	152 °C
ESI-MS	m/z = 366.3 [M+H] ⁺ , ber.: 365.18
LC	Reinheit 96.4% (215 nm), R _t = 14.3 min, Methode Gem6

(R)-5-(Dimethylamino)-2-methyl-N-(1-(naphth-1-yl)ethyl)benzamid (29)

Struktur



Laborkürzel AWBz12DM

Summenformel C₂₂H₂₄N₂O

Molare Masse 332.44

Vorschrift Zu 10 ml Ethylacetat werden 66 mg (0.19 mmol) (R)-5-Amino-2-methyl-N-(1-(naphth-1-yl)ethyl)benzamid Hydrochlorid (Verbindung **12**), 48 µl (110 mg, 0.77 mmol) Methyljodid und 1.0 g (7.2 mmol) Kaliumcarbonat gegeben und über 2 Tage zum Reflux erhitzt. Zur Aufarbeitung wird 3x mit 10 ml 10%iger Natriumcarbonatlösung gewaschen, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet, i. Vak. von Lösemittel befreit und der erhaltene Rückstand säulenchromatographisch (Petrolether/Ethylacetat = 3:1) aufgereinigt. Der anfangs beige Feststoff verfärbt sich innerhalb einiger Monate über gelb nach orange (Lagerung bei RT, Tageslicht).

Ausbeute 10 mg (0.030 mmol, 16%) beiger Feststoff

R_f 0.21 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1), 0.28 (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.80 (d, *J*=6.78 Hz, 3 H, CHCH₃), 2.22 - 2.38 (m, 3 H, Phenyl-CH₃), 2.86 (s, 6 H, N(CH₃)₂), 5.99 (d, *J*=7.91 Hz, 1 H, NH), 6.07 - 6.20 (m, 1 H, CHCH₃), 6.64 - 6.75 (m, 2 H), 7.03 (d, *J*=8.16 Hz, 1 H), 7.43 - 7.62 (m, 4 H), 7.82 (d, *J*=8.03 Hz, 1 H), 7.86 - 7.91 (m, 1 H), 8.26 (d, *J*=8.53 Hz, 1 H)

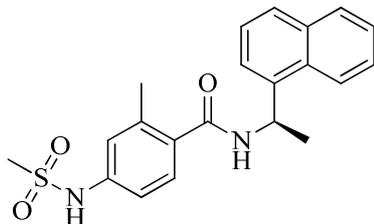
¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 18.50 (CH₃-Aromat), 20.69 (CH₃CH), 40.80 (2 C, N(CH₃)₂), 44.97 (CH), 111.25, 114.45, 122.56, 123.20 (br. s., quartär), 123.64, 125.14, 125.88, 126.48, 128.42, 128.76, 131.16 (quartär), 131.53 (s, 1 C), 133.96 (quartär), 137.01 (quartär), 138.15 (quartär), 148.67 (quartär), 169.60 (CO)

FT-IR λ⁻¹ (cm⁻¹) = 3285, 1639, 1608, 1507, 1352, 1130, 769

Smp.	130 °C
ESI-MS	m/z = 333.2 [M+H] ⁺ , ber.: 332.19
LC	Reinheit 93% (300 nm), R _t = 12.9 min, Methode Gem5

2-Methyl-4-[(methylsulfonyl)amino]-N-[(1R)-1-naphth-1-ylethyl]benzamid (30)

Struktur



Laborkürzel	AWBz11SA
Summenformel	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₃ S
Molare Masse	382.48

Vorschrift

Allgemeine Vorschrift Ab

110.4 mg (0.324 mmol) Verbindung 9

200 µl (292 mg, 2.55 mmol) Methansulfonsäurechlorid

Reaktionsdauer 1 Stunde, die Aufarbeitung erfolgte wie in allgemeiner Vorschrift Ab beschrieben. Das ¹H-NMR-Spektrum des Rohprodukts zeigte jedoch noch Methansulfonsäurechlorid an, daher wird zu dessen vollständiger Hydrolyse das ölige Produktgemisch in 1 ml Methanol aufgenommen und mit 1 ml 5%iger Natriumcarbonatlösung über Nacht gerührt. Der Ansatz wird mit 10%iger Citronensäurelösung neutralisiert, mit 20 ml Ethylacetat versetzt und mit 20 ml Wasser, dann 20 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak von Lösemittel befreit. Der erhaltene Rückstand wird zweifach säulenchromatographisch (Petrolether/Ethylacetat/Ameisensäure = 1:1:0.05) aufgereinigt. Bei der zweiten SC eluiert das Produkt als erstes, die zweite kurz darauf eluierende Substanz ist Edukt. Damit ist die geringe Ausbeute in einer evtl. nur teilweisen Umsetzung, oder in einer im Alkalischen stattfindenden Sulfonamidhydrolyse, und/oder in einem Produktverlust an die wässrige Phase beim Ausschütteln (Substanz sehr polar) erklärbar.

Ausbeute

14 mg (0.0366 mmol, 11%) weißer Feststoff

R_f

0.22 (Petrolether/Ethylacetat/Ameisensäure = 1:1:0.05)

¹H-NMR

400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.79 (d, J=6.65 Hz, 3 H, CHCH₃), 2.37 (s, 3 H, CH₃-Aromat), 2.93 (s, 3 H, CH₃SO₂), 6.05 - 6.14 (m, 1 H, CHCH₃), 6.18 (d, J=8.28 Hz, 1 H, NHCO), 6.89 - 7.01 (m, 2 H), 7.20 (d, J=8.16 Hz, 1 H), 7.26 (br. s., 1 H, NHSO₂), 7.41 - 7.63 (m, 4 H), 7.80 (d, J=8.28 Hz, 1 H), 7.84 - 7.91 (m, 1 H), 8.19 (d, J=8.28 Hz, 1 H)

¹³C-NMR

100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 19.86 (CH₃-Aromat), 20.58 (CH₃CH), 39.40 (CSO₂), 45.18 (CH), 116.79, 121.94, 122.60, 123.31, 125.17, 125.96, 126.62, 128.19, 128.55, 128.85, 131.07 (quartär), 132.69 (quartär), 133.94 (quartär), 137.77 (quartär), 138.24 (quartär), 138.31 (quartär), 168.59 (CO)

FT-IR

λ⁻¹ (cm⁻¹) = 3315, 1631, 1521, 1368, 1312, 1146, 969, 873, 802, 780

Smp.

166 °C

ESI-MS

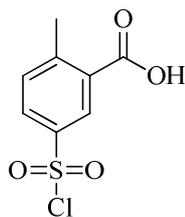
m/z = 383.6 [M+H]⁺, ber.: 382.14

LC

Reinheit > 99% (254 nm), R_t = 4.1 min, Methode gem4

5-(Chlorsulfonyl)-2-methylbenzoesäure (31)

Struktur



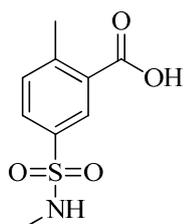
Laborkürzel AWDS1
 Summenformel $C_8H_7ClO_4S$
 Molare Masse 234.66

Vorschrift In einem mittels Eisbad gekühltem Rundkolben werden unter Argon 3.0 g (22 mmol) 2-Methylbenzoesäure vorgelegt und unter Rühren 6 ml (10.5 g, 90 mmol) Chlorsulfonsäure langsam und vorsichtig zugegeben. Lebhaft Gasentwicklung! Nach beendeter Zugabe wird auf die Glasapparatur eine Olive gesetzt, um den entstehenden Chlorwasserstoff in einer Waschflasche mit gesättigter Natriumcarbonatlösung zu binden. Man lässt auf Raumtemperatur auftauen und erwärmt dann im Ölbad auf 100 °C für 4 Stunden. Der Kolben wird aus dem Ölbad genommen und beim Abkühlen geschwenkt, sodass man erkennen kann, bis zu welcher Temperatur die zunehmende Viskosität der öligen Lösung noch ein Ausgießen zulässt. Bei etwa 40 °C wird der Ansatz in ein Becherglas mit 200 ml gestoßenem Eis gegossen. Währenddessen wird mit dem Glasstab gerührt und ausgefallener Feststoff verteilt, sodass sich keine Hitzenester bilden (abreagierende Chlorsulfonsäure). Der ausgefallene kristalline Feststoff wird mittels Glasfiltertiegel abfiltriert, mit 10 ml Eiswasser gewaschen, auf der Fritte am geöffnetem Vakuum möglichst trocken gesaugt und sofort im evakuierten Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet. Die Substanz wird unmittelbar weiter umgesetzt.

Ausbeute 2.227 g (9.490 mmol, 43%) weißer Feststoff

2-Methyl-5-(methylsulfamoyl)benzoesäure (32)

Struktur



Laborkürzel AWDS3_0
 Summenformel $C_9H_{11}NO_4S$
 Molare Masse 229.25

Vorschrift Es werden 300 mg (1.28 mmol) 5-(Chlorsulfonyl)-2-methylbenzoesäure (31) in 2 ml Ethylacetat gelöst und 0.2 g 40%ige Methylaminlösung (2.6 mmol Methylamin) unter Rühren zugegeben. Am nächsten Tag wird mit 1 ml 40%ige Ameisensäure angesäuert und 3x mit 5 ml Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. von Lösemittel befreit. Um Ameisensäure vollständig zu entfernen, wird 2 Tage unter Vakuum aufbewahrt.

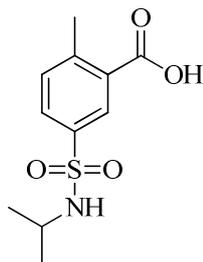
Ausbeute 278 mg (1.21 mmol, 95%) weißer Feststoff

¹H-NMR 400.13 MHz, MeOD: δ (ppm) = 2.53 (s, 3 H), 2.67 (s, 3 H), 7.50 (d, $J=8.16$ Hz, 1 H), 7.85 (dd, $J=8.03, 2.01$ Hz, 1 H), 8.34 (d, $J=2.01$ Hz, 1 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, MeOD: δ (ppm) = 21.96 ($\underline{C}H_3$ -Aromat), 29.34 ($NH\underline{C}H_3$), 130.55, 131.13, 132.65, 133.79, 138.59, 146.36, 169.56 (COOH)

5-(*N*-Isopropylsulfonyl)-2-methylbenzoesäure (33)

Struktur



Laborkürzel

AWDS5

Summenformel

C₁₁H₁₅NO₄S

Molare Masse

257.31

Vorschrift Es werden 200 mg (0.85 mmol) 5-(Chlorsulfonyl)-2-methylbenzoesäure (**31**) in 2 ml Ethylacetat gelöst und 230 µl (160 mg, 2.7 mmol) Isopropylamin in 1 ml Dichlormethan unter Rühren zugegeben. Am nächsten Tag wird mit 10%iger Citronensäurelösung angesäuert und 3x mit 5 ml Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. von Lösemittel befreit.

Ausbeute 180 mg (0.70 mmol, 82%) weißer Feststoff

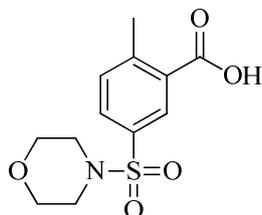
¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.05 (d, *J*=6.53 Hz, 6 H, CH(CH₃)₂), 2.63 (s, 3 H, CH₃), 3.34 - 3.51 (m, 1 H, CH(CH₃)₂), 5.34 (br. s., 1 H, NH), 7.35 (d, *J*=8.16 Hz, 1 H), 7.84 - 7.89 (m, 1 H), 8.43 (d, *J*=2.01 Hz, 1 H)

ESI-MS *m/z* = 258.2 [M+H]⁺, ber.: 257.07

LC Reinheit 93.0% (TIC+), *R*_t = 5.8 min, Methode Gem6

2-Methyl-5-(morpholin-4-ylsulfonyl)benzoesäure (34)

Struktur



Laborkürzel

AWDS4

Summenformel

C₁₂H₁₅NO₅S

Molare Masse

285.32

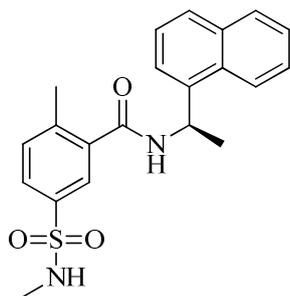
Vorschrift Es werden 200 mg (0.85 mmol) 5-(Chlorsulfonyl)-2-methylbenzoesäure (**31**) in 2 ml Ethylacetat gelöst und 0.22 ml (0.2 g, 2.3 mmol) Morpholin in 1 ml Dichlormethan unter Rühren zugegeben. Am nächsten Tag wird mit 10%iger Citronensäurelösung angesäuert und 3x mit 5 ml Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. von Lösemittel befreit.

Ausbeute 208 mg (0.73 mmol, 86%) beiger Feststoff

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 2.76 (s, 3 H), 2.98 - 3.10 (m, 4 H), 3.72 - 3.82 (m, 4 H), 7.49 (d, *J*=8.16 Hz, 1 H), 7.83 (dd, *J*=8.03, 2.01 Hz, 1 H), 8.42 (d, *J*=2.13 Hz, 1 H), 9.49 (br. s., 1 H, COOH)

2-Methyl-5-(methylsulfamoyl)-*N*-[(1*R*)-1-naphth-1-ylethyl]benzamid (35)

Struktur



Laborkürzel

AWDS3_1

Summenformel

C₂₁H₂₂N₂O₃S

Molare Masse

382.48

Vorschrift

Allgemeine Vorschrift C, Lösemittel 2 ml THF

60 mg (0.26 mmol) 2-Methyl-5-(methylsulfamoyl)benzoesäure (32)

70 mg (0.4 mmol) (1*R*)-1-Naphth-1-ylethanamin

Das Filtrat wird i. Vak. von Lösemittel befreit und das erhaltene Rohprodukt aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute

28 mg (0.073 mol, 28%) weißer Feststoff

¹H-NMR

400.13 MHz, MeOD: δ (ppm) = 1.72 (d, *J*=6.90 Hz, 3 H, CHCH₃), 2.40 (s, 3 H, Phenyl-CH₃), 2.49 (s, 3 H, NHCH₃), 6.07 (q, *J*=6.90 Hz, 1 H, CHCH₃), 7.39 - 7.66 (m, 5 H), 7.71 - 7.78 (m, 2 H), 7.82 (d, *J*=8.16 Hz, 1 H), 7.91 (d, *J*=7.65 Hz, 1 H), 8.26 (d, *J*=8.41 Hz, 1 H)

¹³C-NMR

100.61 MHz, MeOD: δ (ppm) = 19.77 (CH₃-Aromat), 21.45 (CHCH₃), 29.29 (NHCH₃), 46.67 (CHCH₃), 123.94, 124.37, 126.58, 126.78, 126.94, 127.49, 129.25, 129.27, 130.11, 132.49 (quartär), 132.60, 135.65 (quartär), 138.37 (quartär), 139.22 (quartär), 140.21 (quartär), 142.07 (quartär), 170.51 (CO)

FT-IR

λ⁻¹ (cm⁻¹) = 3282, 1631, 1520, 1325, 1168, 776, 694, 665

Smp.

184 °C

ESI-MS

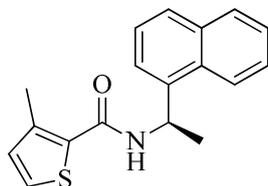
m/z = 383.2 [M+H]⁺, ber.: 382.14

LC

Reinheit 93.6% (254 nm), R_t = 10.3 min, Methode Gem6

3-Methyl-*N*-[(1*R*)-1-naphth-1-ylethyl]thiophen-2-carboxamid (36)

Struktur



Laborkürzel

AWBz23

Summenformel

C₁₈H₁₇NOS

Molare Masse

295.40

Vorschrift

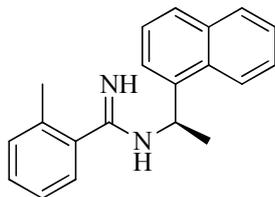
In 2 ml DMF werden 88.8 mg (0.625 mmol) 3-Methylthiophen-2-carbonsäure und 237 mg (0.625 mmol) HBTU gelöst, anschließend werden 63.2 µl (0.625 mmol) Triethylamin unter Rühren zupipettiert. Nach 5 Minuten werden 100 µl (0.624 mmol) (1*R*)-1-Naphth-1-ylethanamin zugegeben und über Nacht gerührt. Zur Aufarbeitung verdünnt man mit 8 ml Wasser, wobei sich eine hellgelbe Trübung einstellt. Am nächsten Tag haben sich daraus hellgelbe Schuppen abgeschieden. Man filtriert den Feststoff ab, wäscht 3x mit 5 ml 5%iger Ammoniaklösung und

trocknet den Rückstand im evakuierten Exsikkator über Calciumchlorid.

Ausbeute	117 mg (0.396 mmol, 63%) blassgelber, schuppiger bis körniger Feststoff
R _f	0.82 (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1)
¹ H-NMR	400.13 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 1.78 (d, <i>J</i> =6.65 Hz, 3 H, CHCH ₃), 2.48 (s, 3 H, CH ₃), 5.97 - 6.15 (m, 2 H, NHCH ₂ CH ₃ und NHCHCH ₃), 6.87 (d, <i>J</i> =4.89 Hz, 1 H, CH Pos. 4 Thiophen), 7.24 (d, <i>J</i> =5.02 Hz, 1 H, CH Pos. 5 Thiophen), 7.45 - 7.61 (m, 4 H), 7.83 (d, <i>J</i> =8.16 Hz, 1 H), 7.87 - 7.91 (m, 1 H), 8.19 (d, <i>J</i> =8.53 Hz, 1 H)
¹³ C-NMR	100.61 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 15.68 (CH ₃), 21.02 (CHCH ₃), 45.31 (CH), 122.60, 123.42, 125.22, 125.89 (CH Pos. 5 Thiophen), 126.33, 126.61, 128.47, 128.81, 130.86 (quartär, C Pos. 2 Thiophen), 131.08 (quartär), 131.99 (CH Pos. 4 Thiophen), 134.01 (quartär), 138.23 (quartär, C Pos. 1 Naphthyl), 141.19 (quartär, CH Pos. 3 Thiophen), 162.09 (CO)
FT-IR	λ ⁻¹ (cm ⁻¹) = 3280, 1621, 1526, 1288, 1180, 771, 720
Smp.	120 °C
ESI-MS	<i>m/z</i> = 613.3 [2M+Na] ⁺ , 296.1 [M+H] ⁺ , ber.: 295.10
LC	Reinheit > 99% (254 nm), R _t = 12.0 min, Methode Gem6

2-Methyl-*N*-[(1*R*)-1-naphth-1-ylethyl]benzocarboximidamid (37)

Struktur



Laborkürzel	AWAm2
Summenformel	C ₂₀ H ₂₀ N ₂
Molare Masse	288.39

Vorschrift In einem Rundkolben werden 2 ml Dichlormethan vorgelegt, darin 102 mg (0.353 mmol) 2-Methyl-*N*-[(1*R*)-1-naphth-1-ylethyl]benzamid (**2**) gelöst und 20 ml Toluol hinzugegeben. Unter Rühren werden 81 mg (0.39 mmol) Phosphorpentachlorid zugesetzt und anschließend für 30 Minuten zum Rückfluss erhitzt. Nachdem der Ansatz wieder auf Raumtemperatur abgekühlt ist, werden 5 ml gesättigte Ammoniaklösung in Dioxan zugegeben, die zuvor durch Einleiten von Ammoniak (nach Freisetzung aus Ammoniakwasser mit Natriumhydroxid und anschließender Trocknung mittels Kaliumhydroxid gefülltem Glasrohr) in Dioxan hergestellt wurde. Am nächsten Tag wird am Rotationsverdampfer das Lösungsmittel weitgehend entfernt, 5 ml 20% Natronlauge zugegeben und 3x mit 20 ml Ethylacetat extrahiert. Nach Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat und Entfernen des Lösemittels i. Vak. erhält man ein klares Öl, das einen dem Benzaldehyd ähnlichen Geruch aufweist.

Ausbeute	37 mg (0.12 mmol, 36%) farbloses Öl
R _f	0 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)
¹ H-NMR	400.13 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ : δ (ppm) = 2.00 (d, <i>J</i> =6.78 Hz, 3 H, CHCH ₃), 2.48 (s, 3 H, CH ₃), 3.48 (br. s., 2 H, 2x NH unter H ₂ O-Signal), 6.17 (q, <i>J</i> =6.78 Hz, 1 H, CHCH ₃), 7.38 (t, <i>J</i> =7.91 Hz, 1 H, Pos. 5 Phenyl), 7.46 (d, <i>J</i> =7.78 Hz, 1 H, Pos. 3 Phenyl), 7.51 - 7.58 (m, 2 H, Pos. 3 & 6 Naphthyl), 7.58 - 7.61 (m, 1 H, Pos. 4 Phenyl), 7.61 - 7.66 (m, 1 H, Pos. 7 Naphthyl), 7.70 - 7.83 (m, 2 H, Pos. 8

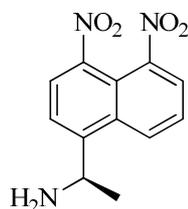
Phenyl & Pos. 2 Naphthyl), 7.93 (d, $J=8.16$ Hz, 1 H, Pos. 4 Naphthyl), 7.96 - 8.00 (m, 1 H, Pos. 5 Naphthyl), 8.27 (d, $J=8.53$ Hz, 1 H, Pos. 8 Naphthyl)

$^{13}\text{C-NMR}$ 100.61 MHz, DMSO- d_6 : δ (ppm) = 19.88 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 24.66 ($\text{C}\underline{\text{H}}\text{CH}_3$), 55.03 ($\underline{\text{C}}\text{HCH}_3$), 111.70 (quartär, Pos. 1 Phenyl), 118.03 (quartär, Amidin- $\underline{\text{C}}\text{N}$), 123.32 (Pos. 8 Naphthyl), 123.73 (Pos. 2 Naphthyl), 125.41 (Pos. 3 Naphthyl), 125.92 (Pos. 6 Naphthyl), 126.49 (Pos. 7 Naphthyl), 126.61 (Pos. 5 Phenyl), 128.73 (Pos. 5 Naphthyl), 129.00 (Pos. 4 Naphthyl), 129.93 (quartär, Pos. 8a Naphthyl), 130.35 (Pos. 3-Phenyl), 132.48 (Pos. 6 Phenyl), 133.15 (Pos. 4 Phenyl), 133.39 (quartär, Pos. 4a Naphthyl), 137.48 (quartär, Pos. 1 Naphthyl), 141.47 (quartär, Pos. 2 Phenyl)

Beim Versuch die Verbindung mit methanolischer HCl in ihr Hydrochlorid zu überführen, trat Schwarzfärbung und Zersetzung ein.

(1R)-1-(4,5-Dinitronaphth-1-yl)ethanamin (38)

Struktur



Laborkürzel

AWN1

Summenformel

$\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_4$

Molare Masse

261.23

Vorschrift Es werden 150 μl (144 mg, 0.84 mmol) (1R)-1-Naphth-1-ylethanamin in 1 ml Dichlormethan gelöst, auf dem Eisbad abgekühlt und unter Rühren 2 ml konz. Schwefelsäure zugegeben. Die Base fällt dabei gelblich zäh aus, die oben (!) befindliche Dichlormethanphase wird mittels Druckluft abgeblasen. Unter weiterer Kühlung werden 0.5 ml 65%ige Salpetersäure zugetropft, der Ansatz verfärbt sich dabei schwarz. Nach 15 Minuten wird auf 100 ml gestoßenes Eis gegossen, mit 20%iger Natronlauge ein pH > 10 eingestellt und 3x mit 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird mit 50 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Kaliumcarbonat getrocknet und anschließend das Lösemittel i. Vak. entfernt. Die Untersuchung mit Loop-MS zeigt Mono- und Dinitroprodukt an. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Ethylacetat/Methanol 3:1) erhält man die Dinitroverbindung als Hauptprodukt.

Ausbeute 95 mg (0.36 mmol, 43%) gelbes Öl

R_f 0.17 (Ethylacetat/Methanol = 9:1)

$^1\text{H-NMR}$ 400.13 MHz, MeOD: δ (ppm) = 1.55 (d, $J=6.78$ Hz, 3 H, CHCH_3), 5.02 (q, $J=6.78$ Hz, 1 H, CHCH_3), 7.84 (dd, $J=8.53, 7.78$ Hz, 1 H, Pos. 7 Naphthyl), 7.99 (d, $J=8.03$ Hz, 1 H, Pos. 2 Naphthyl), 8.31 (dd, $J=7.53, 0.75$ Hz, 1 H, Pos. 6 Naphthyl), 8.32 (d, $J=8.28$ Hz, 1 H, Pos. 3 Naphthyl), 8.66 (d, $J=8.78$ Hz, 1 H, Pos. 8 Naphthyl)

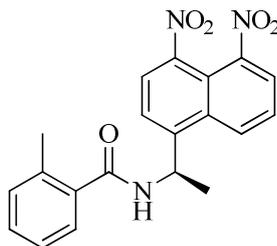
$^{13}\text{C-NMR}$ 100.61 MHz, MeOD: δ (ppm) = 25.26 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 48.13 ($\underline{\text{C}}\text{H}$), 118.04 (quartär, Pos. 4a Naphthyl), 124.14 (Pos. 2 Naphthyl), 127.51, 127.83, 127.91, 130.60 (Pos. 8 Naphthyl), 133.89 (quartär, Pos. 8a Naphthyl), 146.04 (quartär, Pos. 4 Naphthyl), 147.84 (quartär, Pos. 5 Naphthyl), 151.90 (quartär, Pos. 1 Naphthyl)

ESI-MS $m/z = 262.0$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, ber.: 261.07

LC Reinheit > 99% (300 nm), $R_t = 1.6$ min, Methode Gem5

N-[(1R)-1-(4,5-Dinitronaphth-1-yl)ethyl]-2-methylbenzamid (39)

Struktur



Laborkürzel

AWN2

Summenformel

C₂₀H₁₇N₃O₅

Molare Masse

379.37

Vorschrift

Allgemeine Vorschrift Ab

95 mg (0.36 mmol) (1R)-1-(4,5-Dinitronaphth-1-yl)ethanamin (**38**)

300 mg (2 mmol) 2-Methylbenzoesäurechlorid (**1**)

Der erhaltene Rückstand wird zweimal säulenchromatographisch (Gradient Petrolether/Ethylacetat = 4:1 nach Ethylacetat) aufgereinigt.

Ausbeute

73 mg (0.19 mmol, 53%) roter Feststoff

R_f

0.49 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)

¹H-NMR

400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.81 (d, *J*=6.78 Hz, 3 H, CHCH₃), 2.44 (s, 3 H, CH₃), 6.10 (d, *J*=7.91 Hz, 1 H, NH), 6.15 - 6.25 (m, 1 H, CHCH₃), 7.18 - 7.26 (m, 2 H), 7.30 - 7.37 (m, 2 H), 7.79 - 7.86 (m, 2 H), 8.28 (d, *J*=7.91 Hz, 1 H), 8.33 (dd, *J*=7.53, 1.00 Hz, 1 H), 8.71 (dd, *J*=8.78, 0.88 Hz, 1 H)

ESI-MS

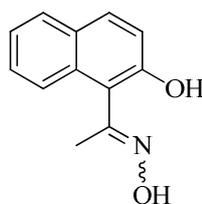
m/z = 380.6 [M+H]⁺, ber.: 379.12

LC

Reinheit 95.6% (254 nm), R_t = 4.1 min, Methode Gem4

1-(N-Hydroxyethanimidoyl)naphthalin-2-ol (40)

Struktur



Laborkürzel

AWBz28

Summenformel

C₁₂H₁₁NO₂

Molare Masse

201.22

Vorschrift

Zu 100 ml Ethanol werden 4.00 g (21.5 mmol) 1-(2-Hydroxynaphth-1-yl)ethanon, 2.986 g (43.0 mmol) Hydroxylamin Hydrochlorid, gelöst in 5 ml Wasser, sowie 3.64 ml (3.56 g, 45.1 mmol) Pyridin gegeben. Man erhitzt zum Rückfluss über Nacht, am nächsten Tag wird eine klare, hellgrüne Lösung vorgefunden. Zur Aufarbeitung wird der Ansatz am Rotationsverdampfer weitestgehend eingeengt, in 50 ml Ethylacetat aufgenommen und 3x mit 10% Kaliumhydrogensulfatlösung, dann mit gesättigter Natriumchloridlösung extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. von Lösemittel befreit. Man erhält 4.244 g öligen Rückstand, der mittels SC (Gradient Petrolether/Ethylacetat = 4:1 nach 1:1) aufgereinigt wird.

Ausbeute

3.86 g (19.2 mmol, 89%) durchsichtige, farblose Kristalle

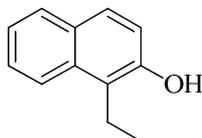
R_f

E/Z-Isomere, 0.28 und 0.35 (Cyclohexan:Ethylacetat:Ameisensäure = 1:1:0.01)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 2.34 (s, 27% CH₃CNOH vermutlich E-Isomer), 2.46 (s, 73% CH₃CNOH vermutlich Z-Isomer), 7.18 - 7.23 (m, 1 H, Pos. 3 Naphthyl), 7.31 - 7.86 (m, 6 H)

1-Ethynaphth-2-ol (41)

Struktur



Laborkürzel AWF20F1

Summenformel C₁₂H₁₂O

Molare Masse 172.22

Vorschrift Zu 20 ml Isopropanol werden 9.7 g (126 mmol) Ammoniumacetat, 1.185 g (18.86 mmol) Natriumcyanoborhydrid und 1.171 g (6.289 mmol) 1-(2-Hydroxynaphth-1-yl)ethanon gegeben und die Suspension unter Rühren im Ölbad auf 95 °C erhitzt. Reaktionskontrolle mittels DC zeigt nach 30 Minuten nahezu vollständige Umsetzung an, nach weiteren 30 Minuten im Ölbad wird der Ansatz am Rotationsverdampfer eingengt (Abzug! Blausäure!). Die erhaltene Suspension wird mit 20%iger Kalilauge auf pH = 9 eingestellt und 3x mit 20 ml Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird mit 10 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 10 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Das Lösemittel wird i. Vak. entfernt und man erhält 1.391 g Rohprodukt, das noch nach Blausäure riecht (Abzug!). Der Rückstand wird säulenchromatographisch (Gradient Petrolether/Ethylacetat = 8:1 nach Ethylacetat) aufgereinigt. Bei dieser SC eluierte die hier charakterisierte Verbindung, sowie die folgenden 3 beschriebenen Stoffe.

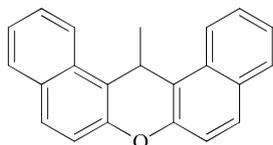
Im wässrigen Abfall wird das Cyanid durch Zugabe von Natriumhypochloritlösung zerstört.

Ausbeute 36 mg (0.21 mmol, 3%) farblose, nadelförmige Kristalle

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.30 (t, *J*=7.62 Hz, 3 H, CH₃), 3.08 (q, *J*=7.62 Hz, 2 H, CH₂CH₃), 4.86 (br. s., 1 H, OH), 7.07 (d, *J*=8.78 Hz, 1 H), 7.34 (ddd, *J*=8.03, 6.90, 1.00 Hz, 1 H), 7.50 (ddd, *J*=8.44, 6.87, 1.38 Hz, 1 H), 7.64 (d, *J*=8.78 Hz, 1 H), 7.79 (d, *J*=8.78 Hz, 1 H), 7.96 (d, *J*=8.66 Hz, 1 H)

14-Methyl-14H-dibenzo[*a,j*]xanthen (42)

Struktur



Laborkürzel AWF20_2

Summenformel C₂₂H₁₆O

Molare Masse 296.36

Vorschrift Die hier charakterisierte Verbindung ist bei vorheriger Reaktion (Verbindung **41**) als Nebenprodukt entstanden und wurde aus dem Ansatz säulenchromatographisch isoliert.

Ausbeute 25 mg (0.084 mmol, 1.3%) blassrote, schuppenförmige Kristalle

R_f 0.53 (Petrolether/Ethylacetat = 8:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.65 (d, *J*=6.78 Hz, 3 H, CHCH₃), 5.46 (q, *J*=6.78 Hz, 1 H, CHCH₃), 7.40 (d, *J*=9.03 Hz, 2 H, 2x OCCH, Pos. 6 & 8), 7.48 (t, *J*=7.15 Hz, 2 H, Pos. 3 & 11),

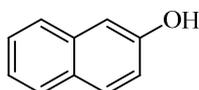
7.65 (t, $J=7.28$ Hz, 2 H, Pos. 2 & 12), 7.79 (d, $J=8.78$ Hz, 2 H, Pos. 5 & 9), 7.89 (d, $J=8.03$ Hz, 2 H, Pos. 4 & 10), 8.26 (d, $J=8.28$ Hz, 2 H, Pos. 1 & 13)

$^{13}\text{C-NMR}$ 100.61 MHz, CDCl_3 : δ (ppm) = 23.42 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 26.30 ($\underline{\text{C}}\text{H}$), 117.80 (2 C, 2x $\text{OC}\underline{\text{C}}\text{H}$, Pos. 6 & 8), 118.20 (quartär, 2 C, 2x $\underline{\text{C}}\text{CHCH}_3$, Pos. 13b & 14a), 122.16 (2 C, Pos. 1 & 13), 124.08 (2 C, Pos. 3 & 11), 126.70 (2 C, Pos. 2 & 12), 128.15 (2 C, Pos. 5 & 9), 128.84 (2 C, Pos. 4 & 10), 130.98 (quartär, 2 C, Pos. 4a & 9a), 131.27 (quartär, 2 C, Pos. 13a & 14b), 148.78 (quartär, 2 C, 2x $\underline{\text{C}}\text{O}$, Pos. 6a & 7a)

Hinweis: Im Dibenzo[*a,j*]xanthen-Gerüst wird in einem annelierten Benzolring mit Position 1 zu zählen begonnen, der Sauerstoff erhält damit die Position 7. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur^[114].

2-Naphthol (43)

Struktur



Laborkürzel AWF20_5

Summenformel $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}$

Molare Masse 144.17

Vorschrift Die hier charakterisierte Verbindung ist bei vorherig beschriebener Reaktion (Verbindung **41**) als Nebenprodukt entstanden und wurde aus dem Ansatz säulenchromatographisch isoliert.

Ausbeute 305 mg (2.11 mmol, 34%) beiger Feststoff

R_f 0.30 (Petrolether/Ethylacetat = 4:1)

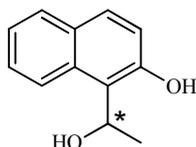
$^1\text{H-NMR}$ 400.13 MHz, CDCl_3 : δ (ppm) = 5.04 (br. s., 1 H, OH), 7.12 (dd, $J=8.78$, 2.51 Hz, 1 H), 7.16 (d, $J=2.51$ Hz, 1 H), 7.35 (ddd, $J=8.16$, 6.84, 1.19 Hz, 1 H), 7.45 (ddd, $J=8.16$, 6.90, 1.25 Hz, 1 H), 7.70 (dd, $J=8.16$, 0.50 Hz, 1 H), 7.78 (t, $J=7.97$ Hz, 2 H)

$^{13}\text{C-NMR}$ 100.61 MHz, CDCl_3 : δ (ppm) = 109.48, 117.70, 123.62, 126.34, 126.52, 127.75, 128.95 (quartär), 129.84, 134.57 (quartär), 153.31 (quartär, $\underline{\text{C}}\text{OH}$)

Die NMR-Spektren sind identisch mit den aufgenommenen Spektren von erworbenem 2-Naphthol.

1-(1-Hydroxyethyl)naphth-2-ol (44)

Struktur



Laborkürzel AWF20sp

Summenformel $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_2$

Molare Masse 188.22

Vorschrift Die hier charakterisierte Verbindung ist bei vorherig beschriebener Reaktion (Verbindung **41**) als Nebenprodukt entstanden und wurde als letzte Fraktion (Spülen der Säule mit Methanol) nur in verunreinigter Form erhalten, daher konnte keine ausführliche Charakterisierung mit Zuweisung aller Signale im NMR erfolgen.

Ausbeute 652 mg (ca. 3.46 mmol, 55%) weißer Feststoff, verunreinigt laut NMR

$^{13}\text{C-NMR}$ 100.61 MHz, CDCl_3 : δ (ppm) = 24.49 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 24.46 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$, möglicherweise Isomer), 64.68 ($\underline{\text{C}}\text{HOH}$),

65.05 (CHOH, möglicherweise Isomer), 151.75 (quartär, COH, phenolisch)

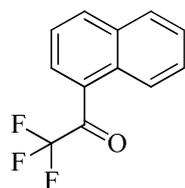
Von 108 ppm bis 132 ppm befinden sich zahlreiche Signale, es überlagern Verunreinigungen.

Die angegebenen charakteristischen Signale für den sekundären, an Sauerstoff gebundenen Kohlenstoff (64.68 ppm), den quartären, an die Phenolgruppe gebundenen Kohlenstoff (151.75 ppm) und die übereinstimmende Masse im negativen Ionisationsmodus stellen bei dem isolierten Stoff die angegebene Struktur hinreichend unter Beweis.

ESI-MS $m/z = 187.2$ [M-H]⁻, ber.: 188.08

2,2,2-Trifluor-1-naphth-1-ylethanon (45)

Struktur



Laborkürzel

AWFC2_10

Summenformel

C₁₂H₇F₃O

Molare Masse

224.18

Vorschrift In 30 ml Dichlormethan werden 4.0 g (31 mmol) Naphthalin gelöst und mittels Trockeneis-Isopropanolbad auf -40 °C abgekühlt. Unter Rühren werden 4.2 g (31 mmol) Aluminiumchlorid zugegeben, es tritt erst rote, dann blaue Färbung auf. Anschließend werden 4.34 ml (6.56 g, 31 mmol) Trifluoressigsäureanhydrid zugetropft, wobei ein Farbumschlag nach grün erfolgt. Nach 4 h bei -40 °C wird der Ansatz über Nacht bei -28 °C in das Eisfach gestellt. Am nächsten Tag werden 30 ml Chloroform zugegeben und die organische Phase mit 30 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird dann mit 30 ml halbgesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. von Lösemittel befreit. Der erhaltene Rückstand wird durch zweifache Säulenchromatographie (Gradient Cyclohexan nach Cyclohexan/Ethylacetat = 8:1) aufgereinigt.

Ausbeute 1.084 g (4.835 mmol, 16%) oranges Öl

R_f 0.36 (Cyclohexan)

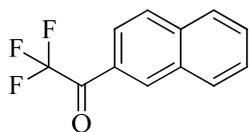
¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 7.53 - 7.67 (m, 2 H), 7.67 - 7.77 (m, 1 H), 7.94 (d, *J*=8.03 Hz, 1 H), 8.16 (d, *J*=8.16 Hz, 1 H), 8.19 - 8.31 (m, 1 H), 8.86 (d, *J*=8.53 Hz, 1 H, Pos. 2 Naphthyl)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 116.64 (q, *J*=292.95 Hz, CF₃), 124.13, 125.20, 126.36, 127.13, 128.98, 129.48, 131.19, 131.64 (q, *J*=3.79 Hz), 133.96, 136.15, 182.31 (q, *J*=33.75 Hz, COCF₃)

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur^[154].

2,2,2-Trifluor-1-naphth-2-ylethanon (46)

Struktur



Laborkürzel	AWFC2_21
Summenformel	C ₁₂ H ₇ F ₃ O
Molare Masse	224.18

Vorschrift Die Substanz entsteht als Nebenprodukt bei der Darstellung von 2,2,2-Trifluor-1-naphth-1-ylethanon (**45**). Bei der säulenchromatischen Aufreinigung des 1-Naphthylderivats **45** wird **46** als später eluierende Substanz mit der Verunreinigung **45** erhalten.

Ausbeute 1.671 g Gemisch als oranges Öl, entsprechend bei 77% Reinheit (s. u.) 1.29 g (5.75 mmol, 19%)

R_f 0.27 (Cyclohexan)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 7.53 - 7.77 (m, 3 H), 7.88 - 7.99 (m, 1 H), 8.02 (d, *J*=8.16 Hz, 1 H), 8.08 (dd, *J*=8.78, 0.88 Hz, 1 H), 8.64 (s, 1 H, Pos. 1 Naphthyl)

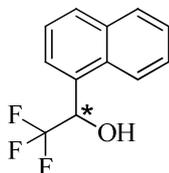
¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 116.87 (q, *J*=291.60 Hz, CF₃), 124.17 (q, *J*=1.47 Hz), 127.19, 127.41, 127.89, 129.08, 130.04, 130.18, 132.17, 133.16 (q, *J*=2.81 Hz), 136.46, 180.46 (q, *J*=34.85 Hz, COCF₃)

Reinheit 77% bezogen auf das Flächenverhältnis im ¹H-NMR zwischen 8.64 ppm und 8.86 ppm (Isomere bei 1- bzw. 2-Naphthylsubstitution)

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur^[155].

2,2,2-Trifluor-1-(naphth-1-yl)ethanol (47)

Struktur



Laborkürzel	AWFC6
Summenformel	C ₁₂ H ₁₀ F ₃ N
Molare Masse	226.19

Vorschrift Die folgende Vorschrift beschreibt den Versuch der reduktiven Aminierung, die jedoch zum hier charakterisierten Alkohol führte.

Das benötigte Ammoniumformiat wird zunächst durch Neutralisation von 10 ml 26%iger Ammoniaklösung mit Ameisensäure dargestellt, indem die erhaltene neutrale Lösung auf einer Porzellanschale im Trockenschrank bei 120 °C eingengt wird. Nach 3 Stunden wird die Porzellanschale entnommen, das geschmolzene Ammoniumformiat erstarrt beim Abkühlen auf Raumtemperatur zu einem weiß-kristallinen Feststoff.

In einem Rundkolben mit Stickstoffaufsatz und Rückflusskühler werden 515 mg (2.30 mmol) 2,2,2-Trifluor-1-naphth-1-ylethanon (**45**) und 500 mg (7.9 mol) Ammoniumformiat vermengt. Mittels Ölbad wird 3 Stunden auf 145 °C und anschließend eine Stunde auf 155 °C unter Argon erhitzt, der Ansatz verfärbt sich dabei schwarz. Reaktionskontrolle (DC, Fließmittel Cyclohexan) zeigt neben dem Edukt eine weitere Substanz mit R_f = 0 (Startlinie). Im Stickstoffaufsatz beobachtet man resublimiertes Ammoniumformiat sowie einkondensiertes Öl vom Reaktions-

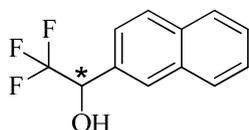
ansatz, daher werden nochmals 100 mg (1.6 mmol) Ammoniumformiat zum Ansatz gegeben und eine weitere Stunde auf 155 °C geheizt. Zur Aufarbeitung wird die in den Stickstoffaufsatz gelangte Substanz mit Wasser und Ethylacetat in den Rundkolben gespült. Die organische Phase wird mit gesättigter Natriumchloridlösung extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. von Lösemittel befreit. Der erhaltene Rückstand wird säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat = 4:1) aufgereinigt.

Ausbeute	387 mg (1.71 mmol, 74%) gelbes Öl
R _f	0.58 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)
¹ H-NMR	400.13 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 2.63 (d, <i>J</i> =4.64 Hz, 1 H, <u>OH</u>), 5.88 - 5.95 (m, 1 H, <u>CHCF</u> ₃), 7.52 - 7.62 (m, 3 H), 7.86 (d, <i>J</i> =7.15 Hz, 1 H), 7.89 - 7.98 (m, 2 H), 8.08 (d, <i>J</i> =8.41 Hz, 1 H)
¹³ C-NMR	100.61 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 69.04 (q, <i>J</i> =32.28 Hz, <u>CHOHCF</u> ₃), 122.79 (q, <i>J</i> =1.10 Hz), 124.67 (q, <i>J</i> =282.80 Hz, <u>CF</u> ₃), 125.19, 125.79 (d, <i>J</i> =1.47 Hz), 125.93, 126.84, 129.01, 129.96 (quartär), 130.19, 131.10 (quartär), 133.69 (quartär)
ESI-MS	m/z = 209.2 [M-OH] ⁺ , ber.: 226.06 Anmerkung: Verlust der benzylichen OH-Gruppe während der ESI-MS-Messung.
LC	R _t = 10.5 min, Methode Gem6

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur^[156].

2,2,2-Trifluor-1-(naphth-2-yl)ethanol (48)

Struktur



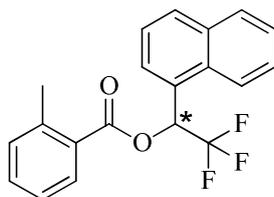
Laborkürzel	AWFC7
Summenformel	C ₁₂ H ₉ F ₃ O
Molare Masse	226.19

Vorschrift	Die Synthese erfolgt analog Verbindung 47 820 mg (Reinheit 77%) Produktgemisch 46 , entsprechend 631 mg (2.82 mmol) Reinstoff 46 800 mg (12.7 mmol) Ammoniumformiat, zwischendurch weitere Zugabe von 200 mg (3.2 mmol)
Ausbeute	622 mg, entsprechend bei 83% Reinheit (s. u.) 516 mg (2.28 mmol, 81%) Produkt, gelbes Öl
R _f	0.62 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)
¹ H-NMR	400.13 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 2.64 (s, 1 H, <u>OH</u>), 5.21 (q, <i>J</i> =6.65 Hz, 1 H, <u>CHCF</u> ₃), 7.51 - 7.62 (m, 3 H), 7.84 - 7.95 (m, 3 H), 7.97 (s, 1 H)
Reinheit	83% bezogen auf das Flächenverhältnis im ¹ H-NMR zwischen 5.21 ppm und 5.93 ppm (Isomere bei 1/2-Naphthylsubstitution)

Das ¹H-NMR-Spektrum entspricht der Literatur^[157].

2,2,2-Trifluor-1-naphth-1-ylethyl 2-methylbenzoat (49)

Struktur



Laborkürzel

AWFC10

Summenformel

C₂₀H₁₅F₃O₂

Molare Masse

344.33

Vorschrift Zu 5 ml Pyridin werden 200 mg (0.88 mmol) 2,2,2-Trifluor-1-naphth-1-ylethanol (**47**) und 230 mg (1.49 mmol) 2-Methylbenzoesäurechlorid (**1**) gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wird daraufhin i. Vak. eingengt und die erhaltene Suspension in 10 ml Diethylether aufgenommen. Um Pyridinreste zu entfernen werden ca. 3 g Kieselgel zugegeben und 5 Minuten gerührt. Man filtriert das Kieselgel ab, wäscht mit 5 ml eines Gemischs aus Pentan und Diethylether (1:1) nach und entfernt das Lösemittel des Filtrats am Rotationsverdampfer. Man erhält ein klares Öl, das am DC zwei beieinanderliegende Spots ($R_f = 0.73$ und 0.80 , Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1) zeigt. Die säulenchromatische Aufreinigung (Petrolether/Dichlormethan = 5:2) lässt den Ester zuerst eluieren, danach eluiert als Nebenprodukt 2-Methylbenzoesäureanhydrid. Die gepoolten Fraktionen des Esters ergeben nach Entfernen des Lösemittels i. Vak. ein farbloses Öl, das nach einigen Tagen weiß auskristallisiert.

Ausbeute 242 mg (0.70 mmol, 80%) weißer Feststoff.

R_f 0.53 (Petrolether/Dichlormethan = 5:2)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 2.63 (s, 3 H, CH₃), 7.22 - 7.40 (m, 3 H), 7.44 - 7.61 (m, 3 H), 7.66 (ddd, $J=8.50, 7.00, 1.32$ Hz, 1 H), 7.87 (d, $J=7.28$ Hz, 1 H), 7.94 (t, $J=8.22$ Hz, 2 H), 8.14 (dd, $J=7.78, 1.25$ Hz, 1 H), 8.28 (d, $J=8.53$ Hz, 1 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 21.83 (CH₃), 68.44 (q, $J=33.75$ Hz, CHCF₃), 122.80, 123.83 (q, $J=280.97$ Hz, CF₃), 125.10, 125.99, 126.09, 126.65, 127.17, 127.57 (quartär), 127.81 (quartär), 128.99, 130.53, 131.06, 131.23 (quartär), 131.95, 132.95, 133.69 (quartär), 141.25 (quartär), 164.95 (CO)

FT-IR λ^{-1} (cm⁻¹) = 1724, 1353, 1236, 1185, 1126, 1077, 903, 780, 768, 732, 697, 661

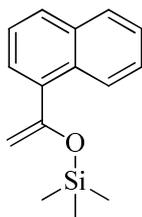
Smp. 71 °C

ESI-MS $m/z = 367.1$ [M+Na]⁺, ber.: 344.10

LC Reinheit > 99% (254 nm), $R_t = 12.2$ min, Methode Gem8

1-(1-Trimethylsilyloxyvinyl)naphthalin (50)

Struktur



Laborkürzel	AWF1
Summenformel	C ₁₅ H ₁₈ OSi
Molare Masse	242.39

Vorschrift In einem 250 ml Rundkolben werden unter Argon 80 ml absolutiertes THF vorgelegt und 13.0 ml (12.9 mmol) einer 1 M Lösung von Lithium-bis(trimethylsilyl)amid zugegeben. Bei Raumtemperatur wird über 30 Minuten unter Rühren eine Lösung von 2.0 g (12 mmol) 1-Acetonaphthon in 25 ml abs. THF zugetropft. Nach 15 Minuten wird eine Lösung von 1.5 ml Trimethylsilylchlorid in 10 ml abs. THF zugetropft und eine weitere Stunde gerührt. Zur Aufarbeitung wird das THF i. Vak. entfernt, es werden 10 ml Dichlormethan zugegeben und für 10 Minuten im Kühlschrank (1 °C) gekühlt. Dabei bildet sich ein feiner, gelber Niederschlag, den man abfiltriert. Das Lösemittel des Filtrats wird i. Vak. entfernt und der erhaltene ölige Rückstand über Nacht bei 10 mbar von weiteren Lösemittelrückständen befreit.

Ausbeute 2.94 g Rohprodukt (12 mmol, Reinheit unklar, s. u., damit Ausbeute unklar) als dunkelorange Öl

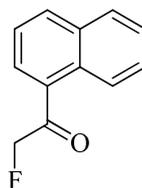
¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 0.16 (s, 9 H, Si(CH₃)₃), 4.63 (d, *J*=0.75 Hz, 1 H), 4.76 (d, *J*=0.75 Hz, 1 H), 7.38 - 7.52 (m, 4 H), 7.77 - 7.87 (m, 2 H), 8.32 (dd, *J*=8.53, 1.13 Hz, 1 H)

Reinheit 55mol% laut NMR, bezogen auf das Flächenverhältnis im ¹H-NMR-Spektrum der Peaks bei 8.32 ppm (Produkt) und 8.76 ppm (Edukt). Da im Spektrum kein Signal des Deuteriochloroform-Restwassers zu beobachten ist, wurde offensichtlich ein Teil des Produkts im NMR-Röhrchen hydrolysiert. Damit ist die Reinheit des Rohprodukts nicht bestimmbar.

Eine chromatographische Aufreinigung ist erst auf der nächsten Stufe (Fluorketon) möglich, aufgrund des größeren strukturellen Unterschieds und der damit verbundenen unterschiedlichen Adsorption an Kieselgel allerdings erst auf der übernächsten Stufe (β-Fluoramin) zu empfehlen.

2-Fluor-1-naphth-1-ylethanon (51)

Struktur



Laborkürzel	AWF2
Summenformel	C ₁₂ H ₉ FO
Molare Masse	188.20

Vorschrift In 50 ml Acetonitril werden 1.764 g (4.979 mmol) Selectfluor™ gelöst und unter Argon eine Lösung von 1.006 g (4.15 mmol) 1-(1-Trimethylsilyloxyvinyl)naphthalin (50) in 5 ml Acetonitril zugetropft. Es stellt sich eine gelbgrüne Färbung und Trübung ein. Reaktionskontrolle mittels DC zeigt nach 1 Stunde unvollständige Umsetzung, daher werden weitere 300 mg (0.85 mmol) Selectfluor™ als Feststoff zugegeben und der Ansatz über Nacht gerührt. Zur Aufarbeitung wird

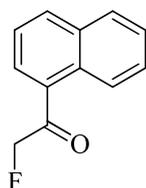
das Gemisch am Rotationsverdampfer weitgehend eingengt, 20 ml Wasser zugegeben und mit 30 ml Diethylether extrahiert. Die organische Phase wird nochmals mit 20 ml Wasser und 20 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, dann über Natriumsulfat getrocknet und daraufhin das Lösemittel i. Vak. entfernt. Vom Versuch einer säulenchromatischen Aufreinigung wird abgesehen, da im DC (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1) nur unzureichende Trennung von Produkt ($R_f = 0.51$) und Edukt 1-Acetonaphthon ($R_f = 0.59$) erzielt wird und die nächste Stufe (β -Fluoramin) erwartungsgemäß besser aufzureinigen sein sollte. Darüberhinaus wurde das hier beschriebene Fluorketon mit einer alternativen Synthese (s. u.) in höherer Reinheit und Ausbeute dargestellt.

Ausbeute	0.694 g Rohprodukt (unter Berücks. der Reinheit: 1.48 mmol, 36% über 2 Stufen), gelbliches Öl, laut Literatur weißer Feststoff, Smp. 44 °C ^[120] .
R_f	0.51 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)
$^1\text{H-NMR}$	400.13 MHz, CDCl_3 : δ (ppm) = 5.53 (d, $J=47.18$ Hz, 2 H, CH_2F), 7.44 - 8.15 (m, 6 H), 8.71 (d, $J=8.78$ Hz, 1 H)
Reinheit	Aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum lässt sich über das Flächenverhältnis der Peaks bei 8.71 ppm und 8.75 ppm (Produkt zu Edukt 1-Acetonaphthon, $x/y = 0.604$) mittels linearem Gleichungssystem ($188 \text{ g/mol} * x + 170 \text{ g/mol} * y = 0.694 \text{ g}$) eine Stoffmenge von $x = 1.48$ mmol Produkt errechnen, was einer Reinheit von 41 mol% bzw. 40% (w/w) entspricht.

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum entspricht der Literatur^[120].

2-Fluor-1-naphth-1-ylethanon (52)

Struktur



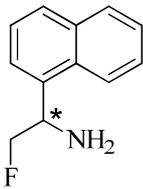
Laborkürzel	AWF5
Summenformel	$\text{C}_{12}\text{H}_9\text{FO}$
Molare Masse	188.20

Vorschrift	In einen 50 ml Rundkolben werden 170 mg (1.00 mmol) 1-Acetonaphthon eingewogen, 15 ml Methanol zugegeben und darin 709 mg (2.00 mmol) Selectfluor TM suspendiert. Unter Rühren wird für 6 Stunden zum Reflux erhitzt. Reaktionskontrolle mittels DC zeigt bereits entstandenes Produkt an. Man refluxiert 3 weitere Tage, jedoch lässt sich im DC immer noch Edukt nachweisen. Da laut Literatur die reaktive Zwischenstufe das Acetal mit Methanol darstellt, werden 5 Tropfen TFA als Katalysator zugegeben und ein weiterer Tag refluxiert, was jedoch nichts am Aussehen der DC-Reaktionskontrolle änderte. Zur Aufarbeitung wird das Methanol i. Vak. entfernt, 30 ml Ethylacetat, 20 ml Wasser und 5 Tropfen 10%ige Salzsäure zugegeben und über 2 Stunden intensiv gerührt. Die organische Phase wird abgetrennt, mit 20 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen und schließlich i. Vak. von Lösemittel befreit.
Ausbeute	151 mg Rohprodukt (unter Berücks. der Reinheit: 0.603 mmol, 60% über 1 Stufe), gelbliches Öl
R_f	0.51 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)
$^1\text{H-NMR}$	400.13 MHz, CDCl_3 : δ (ppm) = 5.53 (d, $J=47.18$ Hz, 2 H, CH_2F), 7.50 - 7.69 (m, 3 H), 7.82 (d, $J=7.28$ Hz, 1 H), 7.91 (d, $J=8.78$ Hz, 1 H), 8.08 (d, $J=8.28$ Hz, 1 H), 8.71 (d, $J=8.78$ Hz, 1 H)

ESI-MS	$m/z = 189.0 [M+H]^+$, ber.: 188.06
LC	$R_t = 10.7$ min, Methode Gem5
Reinheit	Wie vorherig beschrieben, lässt sich auch hier aus dem dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bei 8.71 ppm und 8.75 ppm (Produkt zu Edukt 1-Acetonaphthon, $x/y = 2.72$) mittels linearem Gleichungssystem ($188 \text{ g/mol} * x + 170 \text{ g/mol} * y = 0.151 \text{ g}$) eine Stoffmenge von $x = 0.603 \text{ mmol}$ für das Produkt berechnen, was einer Reinheit von 73mol% entspricht.

Die auf diese Weise erhaltene Verbindung **52** ist mit der Verbindung **51** identisch.

2-Fluor-1-naphth-1-ylethanamin (**53**)

Struktur		Laborkürzel	AWF16
		Summenformel	$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{FN}$
		Molare Masse	189.23

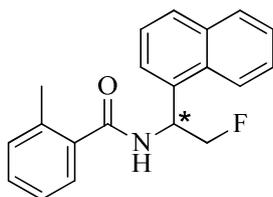
Vorschrift Zu 10 ml Isopropanol werden 3.08 g (40.0 mmol) Ammoniumacetat, 150.7 mg (2.40 mmol) Natriumcyanoborhydrid und 151 mg (unter Berücks. der Reinheit: 0.603 mmol) 2-Fluor-1-naphth-1-ylethanon (**52**) gegeben und unter Rühren im Ölbad eine Stunde auf 95 °C erhitzt (schwacher Reflux, Siedepunkterhöhung des Isopropanols aufgrund Ammoniumacetat). Im Anschluss wird das Lösemittel weitgehend am Rotationsverdampfer (Abzug! Blausäure!) entfernt und der gallertige Rückstand mit 20 ml Wasser gelöst, mit 20%iger Kalilauge auf $\text{pH} > 10$ eingestellt und mit 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird mit 10 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. von Lösemittel befreit. Der erhaltene Rückstand wird säulenchromatographisch (Petrolether/Ethylacetat/Triethylamin = 1:1:0.05) aufgereinigt.

Im wässrigen Abfall wird das Cyanid durch Zugabe von Natriumhypochloritlösung zerstört.

Ausbeute	50 mg (0.26 mmol, 43%) farbloses Öl
R_f	0.19 (Petrolether/Ethylacetat/Triethylamin = 1:1:0.05)
$^1\text{H-NMR}$	400.13 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = 2.01 (s, 2 H, NH_2), 4.47 (dt, $J=48.25, 9.03, 8.47$ Hz, 1 H, CHHF), 4.73 (ddd, $J=47.02, 9.07, 3.51$ Hz, 1 H, CHHF), 5.20 (ddd, $J=14.65, 8.44, 3.39$ Hz, 1 H, CHCH_2F), 7.48 - 7.61 (m, 3 H), 7.75 (d, $J=7.15$ Hz, 1 H), 7.82 (d, $J=8.28$ Hz, 1 H), 7.88 - 7.93 (m, 1 H), 8.15 (d, $J=8.53$ Hz, 1 H)
$^{13}\text{C-NMR}$	100.61 MHz, CDCl_3 ; δ (ppm) = 51.10 (d, $J=19.81$ Hz, CCF), 87.76 (d, $J=174.23$ Hz, CF), 122.33, 123.84 (d, $J=1.10$ Hz), 125.47, 125.63, 126.37, 128.27, 129.05, 130.92 (quartär), 133.78 (quartär), 135.58 (d, $J=8.07$ Hz, quartär, CCCCF)
ESI-MS	$m/z = 173.2 [M-(\text{NH}_2)]^+$, ber.: 189.10

N-(2-Fluor-1-naphth-1-ylethyl)-2-methylbenzamid (54)

Struktur



Laborkürzel

AWF19B

Summenformel

C₂₀H₁₈FNO

Molare Masse

307.36

Vorschrift In 5 ml Dichlormethan werden 50 mg (0.26 mmol) 2-Fluor-1-naphth-1-ylethanamin (**53**) gelöst und unter Rühren 100 µl (78 mg, 0.77 mmol) Triethylamin, sowie 100 µl (120 mg, 0.78 mmol) 2-Methylbenzoesäurechlorid (**1**) zupipettiert. Nach 2 Tagen wird zur Aufarbeitung mit 10 ml gesättigter Ammoniumchloridlösung gewaschen, die wässrige Phase mit 10 ml Dichlormethan nachextrahiert und die vereinigte organische Phase auf Kieselgel aufgezogen und der gebundene Stoff säulenchromatographisch (Petrolether/Ethylacetat = 6:1 mit 0.5% Triethylamin) aufgereinigt.

Ausbeute 72 mg (0.23 mmol, 90%) beiger Feststoff

R_f 0.23 (Petrolether/Ethylacetat = 6:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 2.46 (br. s., 3 H, CH₃), 4.92 (ddd, *J*=28.11, 9.54, 4.39 Hz, 1 H, CHHF), 5.04 (ddd, *J*=28.99, 9.54, 4.27 Hz, 1 H, CHHF), 6.21 - 6.36 (m, 1 H, CHCH₂F), 6.43 (d, *J*=8.28 Hz, 1 H, NH), 7.16 (t, *J*=7.47 Hz, 1 H), 7.21 (d, *J*=7.65 Hz, 1 H), 7.27 - 7.33 (m, 1 H), 7.35 (dd, *J*=7.53, 1.00 Hz, 1 H), 7.44 - 7.66 (m, 4 H), 7.86 (d, *J*=8.16 Hz, 1 H), 7.88 - 7.94 (m, 1 H), 8.19 (d, *J*=8.53 Hz, 1 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 19.72, 49.04 (d, *J*=19.44 Hz, CCF), 83.94 (d, *J*=175.33 Hz, CF), 122.96, 124.13 (d, *J*=2.93 Hz), 125.15, 125.69, 126.04, 126.69, 126.87, 128.99 (d, *J*=2.20 Hz), 130.07, 131.00, 131.08 (quartär), 133.31 (quartär), 133.33 (quartär), 133.96 (quartär), 135.79 (quartär), 136.21 (quartär), 169.41 (CO)

FT-IR λ⁻¹ (cm⁻¹) = 3283, 1632, 1518, 1276, 1008, 799, 779, 760, 685

Smp. 143 °C

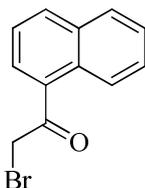
ESI-MS *m/z* = 308.1 [M+H]⁺, 330.0 [M+Na]⁺, ber.: 307.14

LC Reinheit 90.9% (280 nm), R_t = 11.2 min, Methode Gem6

Bei den 9% Verunreinigung (LC) handelt es sich um eine mittels Kieselgel nicht abtrennbare, am Naphthyl zusätzlich fluorierte Verbindung mit ansonsten gleicher Struktur, Masse: 326.1 [M+H]⁺ (ber.: 325.13), R_t = 12.1 min. Zudem findet sich im ¹H-NMR-Spektrum bei 8.15 ppm ein sauber integrierbares Verunreinigungs-Dublett der Fläche 9mol%, was die mittels LC bestimmte Reinheit von 91% bestätigt. Fuglseth et al. hatten von Ringfluorierung bei der Reaktion zu Verbindung **52** berichtet^[119].

2-Brom-1-naphth-1-ylethanon (55)

Struktur



Laborkürzel AWF3
Summenformel C₁₂H₉BrO
Molare Masse 249.10

Vorschrift In 50 ml abs. Diethylether werden unter Argon 3.00 g (17.6 mmol) 1-Acetonaphthon vorgelegt, 2.35 g (17.6 mmol) Aluminiumchlorid portionsweise zugegeben und daraufhin 0.9 ml (2.8 g, 18 mmol) Brom zugetropft. Die Lösung bleibt klar, wird vom Brom aber tiefrot eingefärbt, wobei sie sich 5 Minuten nach beendeter Bromzugabe wieder nach hellgelb entfärbt. Dabei beobachtet man eine zweite, am Kolbenboden abgeschiedene, klare und intensiv hellrote Phase. Reaktionskontrolle aus der oberen Phase zeigt im DC (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1) nur eine Substanz mit R_f = 0.60, jedoch besitzt das unbromierte Edukt unter diesen Bedingungen auf der DC-Platte den gleichen R_f-Wert.

Zur Aufarbeitung wird mit 5 ml 40% Bisulfitlauge gequench und die organische Phase mit weiteren 30 ml Wasser gewaschen. Die gelbe Wasserphase wird mit 30 ml Ethylacetat nachextrahiert und die organischen Phasen vereinigt. Nach Trocknen über Magnesiumsulfat wird das Lösemittel i. Vak. entfernt. Die chromatographische Aufreinigung des laut NMR (siehe Reinheit) verunreinigten Rückstands wird ausgesetzt, da kein Fließmittel gefunden wurde, um das Gemisch zu trennen.

Ausbeute 3.818 g Rohprodukt (unter Berücks. der Reinheit 11.1 mmol, 63%) klares, dunkelbraunes Öl

R_f 0.63 - 0.68 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1), Verunreinigung im Produktpot nicht sichtbar

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 4.59 (s, 2 H, CH₂Br), 7.47 - 7.72 (m, 3 H), 7.86 - 7.99 (m, 2 H), 8.06 (d, J=8.28 Hz, 1 H), 8.60 - 8.69 (m, 1 H)

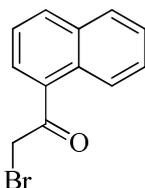
ESI-MS m/z = 249.1 und 251.0 [M+H]⁺, ber.: 247.98

Reinheit Aus dem dem ¹H-NMR-Spektrum lässt sich das Verhältnis der Peakflächen bei 8.61 ppm und 8.75 ppm (Produkt zu Edukt 1-Acetonaphthon, x/y = 1.77) mittels linearem Gleichungssystem (249 g/mol * x + 170 g/mol * y = 3.818 g) eine Stoffmenge von x = 11.1 mmol für das Produkt berechnen, was einer Reinheit von 64mol%, bzw. 72% (w/w) entspricht.

Das ¹H-NMR-Spektrum entspricht der Literatur^[158].

2-Brom-1-naphth-1-ylethanon (56)

Struktur



Laborkürzel AWF3neu
Summenformel C₁₂H₉BrO
Molare Masse 249.10

Vorschrift Zu 40 ml Benzol werden 5.458 g (32.07 mmol) 1-Acetonaphthon, 6.278 g (35.27 mmol) N-Bromsuccinimid und 244 mg (4mol%, 1.28 mmol,) p-Toluolsulfonsäure-Monohydrat (Katalysator)

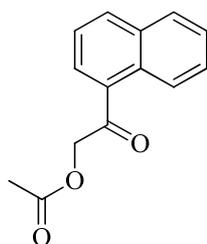
gegeben und über Nacht refluxiert. Zur Aufarbeitung wird mit 30 ml Ethylacetat verdünnt und die organische Phase 3x mit 50 ml 5%iger Natriumcarbonatlösung und mit 50 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Magnesiumsulfat wird das Lösemittel i. Vak. entfernt.

Ausbeute	8.134 g Rohprodukt (Reinheit 94.3% w/w), enthaltend 7.669 g Produkt (30.8 mmol, Ausbeute 96%) als dunkles, klar durchscheinendes Öl
R _f	0.68 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1), 0.81 (Dichlormethan)
¹ H-NMR	400.13 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 4.58 (s, 2 H, <u>CH</u> ₂ Br), 7.52 (dd, J=8.16, 7.28 Hz, 1 H), 7.55 - 7.60 (ddd, J=8.03, 6.78, 1.25 Hz, 1 H), 7.64 (ddd, J=8.50, 6.93, 1.51 Hz, 1 H), 7.90 (m, 1 H), 7.93 (dd, J=7.28, 1.13 Hz, 1 H), 8.05 (d, J=8.16 Hz, 1 H), 8.61 - 8.67 (m, 1 H)
¹³ C-NMR	100.61 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 33.82, 124.18, 125.65, 126.78, 128.47, 128.53 (2 C), 130.61 (quartär), 132.30 (quartär), 133.89, 134.00 (quartär), 194.28 (<u>CO</u>)
Reinheit	Wie vorherig beschrieben, lässt sich aus dem ¹ H-NMR-Spektrum über das Verhältnis der Peakflächen bei 8.61 ppm und 8.75 ppm (Produkt zu Edukt 1-Acetonaphthon, x/y = 22.8) eine Reinheit von 96mol% abschätzen. Wird die Reinheit aus dem Eduktsignal bei 2.76 ppm bestimmt (x/y = 11.1), ergibt die Berechnung 30.8 mmol Produkt, entsprechend 92mol% bzw. 94% (w/w) Reinheit. Unberücksichtigt bleibt dabei die unbekannte Verunreinigung, die sich hinter dem Singulett bei 7.37 ppm (Fläche 0.10) verbirgt. Das Signal wäre typisch für R- <u>CH</u> Br ₂ und eine Überbromierung durch N-Bromsuccinimid ist bei langen Reaktionszeiten auch plausibel.

Die auf diese Weise erhaltene Verbindung **56** ist mit der Verbindung **55** identisch.

2-Naphth-1-yl-2-oxoethylacetat (**57**)

Struktur



Laborkürzel	AWF11
Summenformel	C ₁₄ H ₁₂ O ₃
Molare Masse	228.24

Vorschrift In 5 ml Wasser werden 3.12 g (22.9 mmol) Natriumacetat-Trihydrat gelöst, 2.15 g (unter Berücks. der Reinheit von 94% (w/w): 2.02 g, 8.11 mmol) 2-Brom-1-naphth-1-ylethanon (**56**) sowie 30 ml Ethanol zugegeben und für 2 Stunden zum Reflux erhitzt. Zur Aufarbeitung wird das Lösemittel i. Vak. weitestgehend entfernt und der Rückstand mit 50 ml Diethylether und 30 ml Wasser ausgeschüttelt. Man wäscht die organische Phase nochmals mit 30 ml Wasser, dann mit 30 ml gesättigter Natriumchloridlösung und trocknet über Natriumsulfat. Nach Entfernen des Lösemittels i. Vak. wird die Verbindung als öliger Rückstand erhalten.

Ausbeute	1.891 g (unter Berücks. der Reinheit: 7.946 mmol, 98%) farbloses Öl
R _f	0.51 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)
¹ H-NMR	400.13 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 2.26 (s, 3 H, <u>CH</u> ₃), 5.32 (s, 2 H, <u>CH</u> ₂ O), 7.52 (dd, J=8.16, 7.28 Hz, 1 H), 7.57 (ddd, J=8.16, 6.78, 1.25 Hz, 1 H), 7.62 (ddd, J=8.28, 6.78, 1.51 Hz, 1 H), 7.86 (dd,

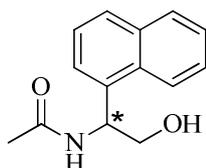
$J=7.22, 1.19$ Hz, 1 H), 7.88 - 7.92 (m, 1 H), 8.05 (d, $J=8.28$ Hz, 1 H), 8.63 (d, $J=9.03$ Hz, 1 H)

Reinheit Wie vorherig beschrieben, kann auch hier aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum über ein Peakflächenverhältnis bei 2.26 ppm (Produkt) und 2.76 ppm (1-Acetonaphthon) mit $x/y = 17.6$ eine exakte Produktstoffmenge (eingesetzt in $228.2 \text{ g/mol} * x + 170.2 \text{ g/mol} * y = 1.891 \text{ g}$) von $x = 7.946 \text{ mmol}$ berechnet werden, was einer Reinheit von 96% (w/w) entspricht.

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum entspricht der Literatur^[159].

***N*-(2-Hydroxy-1-naphth-1-ylethyl)acetamid (58)**

Struktur



Laborkürzel

AWF17

Summenformel

$\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_2$

Molare Masse

229.27

Vorschrift Zu 20 ml Isopropanol werden unter Rühren 4.2 g (55 mmol) Ammoniumacetat, 0.517 g (8.23 mmol) Natriumcyanoborhydrid und 0.626 g (unter Berücks. der Reinheit: 0.601 g, 2.63 mmol) 2-Naphth-1-yl-2-oxoethylacetat (**57**) gegeben und über eine Stunde im Ölbad auf 95 °C erhitzt. Im Anschluss wird das Lösemittel am Rotationsverdampfer (Abzug! Blausäure!) weitestgehend entfernt, man erhält einen orange-farbenen Feststoff. Um den vermeintlichen Essigsäureester nicht zu hydrolysieren, wird auf eine alkalische Extraktion verzichtet und stattdessen der orange Feststoff in 20 ml Ethylacetat suspendiert, die überstehende Lösung abgenommen und mit 20 ml Petrolether verdünnt, was zu einer weißen Fällung führt. Der Feststoff wird abfiltriert, die NMR-spektroskopische Untersuchung des Filtrats ergab kein interpretierbares Ergebnis. Der Feststoff wird in Ethylacetat gelöst und auf eine kurze Kieselgelsäule aufgetragen. Nachdem mit 50 ml Ethylacetat eluiert wurde, wird mit Methanol fortgefahren. Nun eluiert eine sehr polare Verbindung, die nach Entfernen des Methanols i. Vak. gut verschlossen im Abzug aufbewahrt wird, da noch Blausäuregeruch davon wahrnehmbar ist. Diesem relativ schlecht löslichen Stoff konnte die hier angegebene Struktur zugewiesen werden, es erfolgte also nach gelungener reduktiver Aminierung eine intramolekulare Aminolyse des Esters zum Amid..

Ausbeute 239 mg (1.04 mmol, 40%) schlecht löslicher, weißer Feststoff

R_f 0 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)

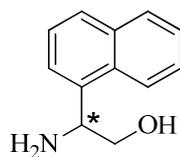
$^1\text{H-NMR}$ 400.13 MHz, $\text{DMSO-}d_6$: δ (ppm) = 1.89 (s, 3 H, $\underline{\text{CH}_3}$), 3.55 - 3.66 (m, 1 H, $\underline{\text{CHHOH}}$), 3.69 - 3.79 (m, 1 H, $\underline{\text{CH}_2\text{OH}}$), 4.95 (t, $J=5.71$ Hz, 1 H, $\underline{\text{CH}_2\text{OH}}$), 5.67 (td, $J=7.81, 5.08$ Hz, 1 H, $\underline{\text{NHCH}}$), 7.44 - 7.62 (m, 4 H), 7.82 (d, $J=7.91$ Hz, 1 H), 7.91 - 7.96 (m, 1 H), 8.16 (d, $J=8.03$ Hz, 1 H), 8.40 (d, $J=8.28$ Hz, 1 H, $\underline{\text{NH}}$)

$^{13}\text{C-NMR}$ 100.61 MHz, $\text{DMSO-}d_6$: δ (ppm) = 22.69 ($\underline{\text{CH}_3}$), 51.06 ($\underline{\text{NHCH}}$), 63.94 ($\underline{\text{CH}_2\text{OH}}$), 123.02, 123.64, 125.30, 125.49, 126.08, 128.59, 168.78 ($\underline{\text{CONH}}$)

Aufgrund zu niedriger Signalintensität werden im Aromatenbereich nur 6 der 10 Kohlenstoffkerne beobachtet, die Struktur wird mit den charakteristischen Signalen von $\underline{\text{NHCH}}$ und $\underline{\text{CH}_2\text{OH}}$ eindeutig belegt.

2-Amino-2-naphth-1-ylethanol (59)

Struktur



Laborkürzel AWF17b
 Summenformel C₁₂H₁₃NO
 Molare Masse 187.24

Vorschrift Zu 10 ml halbkonz. Salzsäure werden 149 mg (0.650 mmol) *N*-(2-Hydroxy-1-naphth-1-ylethyl)acetamid (**58**) gegeben und 2 Tage unter Rückfluss erhitzt. Zur Aufarbeitung wird vorsichtig mit Kaliumhydroxid-Plätzchen neutralisiert und ein pH > 10 eingestellt. Die erhaltene Lösung wird 3x mit 20 ml Ethylacetat extrahiert, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. von Lösemittel befreit. Aufgrund der relativ hohen Polarität des Produkts liegt der Ausbeuteverlust vermutlich im unvollständigen Extrahieren begründet.

Ausbeute 52 mg (0.28 mmol, 43%) gelblicher Feststoff

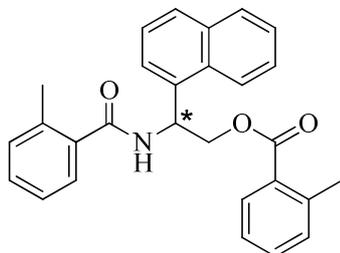
¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 2.59 (br. s., 3 H, NH₂ und OH), 3.66 (dd, *J*=10.85, 8.09 Hz, 1 H, CHH), 3.93 (dd, *J*=10.92, 3.64 Hz, 1 H, CHH), 4.89 (dd, *J*=7.47, 3.20 Hz, 1 H, CHNH₂), 7.42 - 7.55 (m, 3 H), 7.55 - 7.62 (m, 1 H), 7.73 - 7.80 (m, 1 H), 7.85 - 7.91 (m, 1 H), 8.10 (d, *J*=7.91 Hz, 1 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 52.61 (CHNH₂), 67.19 (CH₂OH), 122.53, 122.79, 125.37, 125.53, 126.14, 127.72, 128.91, 130.82 (quartär), 133.72 (quartär), 138.18 (quartär)

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur^[160].

2-(2-Methylbenzamido)-2-(naphth-1-yl)ethyl-2-methylbenzoat (60)

Struktur



Laborkürzel AWF25
 Summenformel C₂₈H₂₅NO₃
 Molare Masse 423.50

Vorschrift Zu 1 ml Ethylacetat werden 52 mg (0.28 mmol) 2-Amino-2-naphth-1-ylethanol (**59**), 200 µl (156 mg, 1.54 mmol) Triethylamin und 100 µl (120 mg, 0.78 mmol) 2-Methylbenzoesäurechlorid (**1**) gegeben. Nach einem Tag wird mit 10 ml Ethylacetat verdünnt und 3x mit 10 ml 10%iger Natriumcarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. von Lösemittel befreit. Die weitere Umsetzung (s. u.) erfolgt ohne Aufreinigung, das Rohprodukt zeigt im ¹H-NMR Signale unbekannter Verunreinigung, sodass keine Reinheitsabschätzung angestellt werden kann.

Ausbeute 107 mg Rohprodukt (0.25 mmol, 90%) ocker-farbener Feststoff

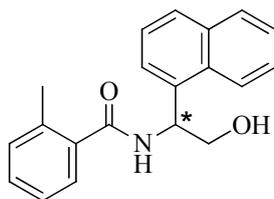
R_f 0.51 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 2.37 (s, 3 H, CH₃), 2.57 (s, 3 H, CH₃), 4.82 - 4.95 (m, 2 H, CH₂), 6.44 (d, *J*=8.03, 1 H, NH), 6.48 - 6.56 (m, 1 H, CH), 7.12 - 7.35 (m, 6 H), 7.41 (td, *J*=7.53, 1.25 Hz, 1 H), 7.46 - 7.68 (m, 4 H), 7.87 (d, *J*=8.28 Hz, 1 H), 7.89 - 7.95 (m, 2 H), 8.35 (d, *J*=8.41 Hz, 1 H)

ESI-MS *m/z* = 422.3 [M-H]⁻, ber.: 423.18

N-(2-Hydroxy-1-naphth-1-ylethyl)-2-methylbenzamid (61)

Struktur



Laborkürzel AWF26

Summenformel C₂₀H₁₉NO₂

Molare Masse 305.37

Vorschrift Es werden 107 mg (0.25 mmol) (*R*)-2-(2-Methylbenzamido)-2-(naphth-1-yl)ethyl-2-methylbenzoat (**60**) und 210 mg (5.0 mmol) Lithiumhydroxid-Monohydrat in 30 ml THF/Wasser (3:1) gelöst. Reaktionskontrolle mittels Loop-MS zeigt erst nach vierstündigem Reflux geringe Umsetzung. Der sterisch abgeschirmte Ester wird daher weiter zum Sieden erhitzt, bis nach 2 Tagen vollständige Umsetzung angezeigt wird. Zur Aufarbeitung wird der Ansatz am Rotationsverdampfer weitestgehend eingengt und die verbleibende wässrige Lösung 3x mit 10 ml Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. von Lösemittel befreit. Der erhaltene Rückstand wird säulenchromatographisch aufgereinigt (Petrolether/Ethylacetat = 2:1).

Ausbeute 56 mg (0.18 mmol, 73%) beiger Feststoff

R_f 0.31 (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 2.45 (s, 3 H, CH₃), 2.98 (br. s., 1 H, OH), 4.05 - 4.21 (m, 2 H, CH₂OH), 6.08 (dt, *J*=7.28, 5.08 Hz, 1 H, NCH), 6.61 (d, *J*=7.28 Hz, 1 H, NH), 7.11 - 7.26 (m, 2 H), 7.28 - 7.61 (m, 6 H), 7.82 (d, *J*=7.91 Hz, 1 H), 7.86 - 7.93 (m, 1 H), 8.16 (d, *J*=8.41 Hz, 1 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 19.82 (CH₃), 51.97 (NCH), 65.57 (CH₂OH), 122.90, 123.46, 125.13, 125.70, 125.99, 126.70, 126.74, 128.67, 128.99, 130.08, 130.90 (quartär), 131.03, 134.05 (quartär), 134.38 (quartär), 135.85 (quartär), 136.24 (quartär), 170.49 (CO)

FT-IR λ⁻¹ (cm⁻¹) = 3287, 1639, 1537, 1306, 1172, 1028, 799, 774

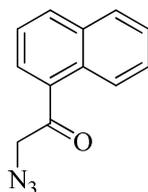
Smp. 97 °C

ESI-MS *m/z* = 306.1 [M+H]⁺, ber.: 305.14

LC Reinheit 97.9% (300 nm), R_t = 13.5 min, Methode Gem5

2-Azido-1-naphth-1-ylethanon (62)

Struktur



Laborkürzel AWF12

Summenformel C₁₂H₉N₃O

Molare Masse 211.22

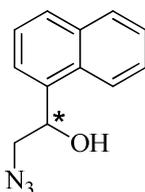
Vorschrift In 10 ml DMF werden 1.18 g (4.74 mmol) 2-Brom-1-naphth-1-ylethanon (**56**) und 339 mg (5.21 mmol) Natriumazid gelöst und 2 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Man versetzt mit 50 ml Wasser und extrahiert mit 30 ml Ethylacetat. Die organische Phase wird 2x mit 20 ml Wasser, dann mit 20 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. erhält man dunkelroten Rückstand, der

säulenchromatographisch (Petrolether/Ethylacetat = 5:1, Edukt eluiert zuerst) aufgereinigt wird. Das hellrote Öl wird im Kühlschrank (1 °C) aufbewahrt, wo es nach wenigen Tagen feinkörnig erstarrt.

Ausbeute	690 mg (3.27 mmol, 69%) hellrotes Öl, erstarrt im Kühlschrank zu rotem Feststoff
R _f	0.62 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)
¹ H-NMR	400.13 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 4.60 (s, 2 H, <u>CH</u> ₂ N ₃), 7.53 (dd, <i>J</i> =8.16, 7.28 Hz, 1 H), 7.59 (ddd, <i>J</i> =8.03, 6.78, 1.25 Hz, 1 H), 7.66 (ddd, <i>J</i> =8.50, 6.93, 1.51 Hz, 1 H), 7.83 (dd, <i>J</i> =7.28, 1.13 Hz, 1 H), 7.88 - 7.94 (m, 1 H), 8.08 (d, <i>J</i> =8.16 Hz, 1 H), 8.69 - 8.81 (m, 1 H)
ESI-MS	<i>m/z</i> = 234.0 [M+Na] ⁺ , ber.: 211.07

2-Azido-1-naphth-1-ylethanol (63)

Struktur



Laborkürzel	AWF18
Summenformel	C ₁₂ H ₁₁ N ₃ O
Molare Masse	213.24

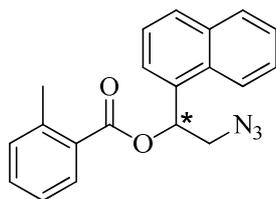
Vorschrift Zu 50 ml Isopropanol werden 5.0 g (65 mmol) Ammoniumacetat, 610 mg (9.71 mmol) Natriumcyanoborhydrid und 684 mg (3.24 mmol) 2-Azido-1-naphth-1-ylethanon (**62**). Man erhitzt über Nacht im Ölbad auf 95 °C. Anschließend wird das Lösemittel am Rotationsverdampfer (Abzug! Blausäure!) weitestgehend entfernt und die erhaltene Suspension mit 20 ml 0.1 M Natronlauge verdünnt, dann 3x mit 20 ml Dichlormethan und 2x mit 20 ml Ethylacetat extrahiert. Da das Produkt als Azidoamin erwartungsgemäß sehr polar sein sollte, ist fünffaches Extrahieren mit verschiedenen Lösemitteln gerechtfertigt. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 20 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und anschließend mit Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak wird der erhaltene, orange Rückstand säulenchromatographisch (Petrolether/Ethylacetat = 4:1) aufgereinigt. Neben nicht-umgesetztem Edukt konnte nur der Azidoalkohol isoliert werden. Es eluierten zwar auch polarere Produkte als der Azidoalkohol, doch waren deren ¹H-NMR-Spektren nicht interpretierbar.

Im wässrigen Abfall wird das Cyanid durch Zugabe von Natriumhypochloritlösung zerstört.

Ausbeute	96 mg (0.45 mmol, 14%) gelbes Öl
R _f	0.50 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)
¹ H-NMR	400.13 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 2.70 (br. s., 1 H, <u>OH</u>), 3.47 - 3.70 (m, 2 H, <u>CH</u> ₂ N ₃), 5.65 (t, <i>J</i> =4.89 Hz, 1 H, <u>CHOH</u>), 7.47 - 7.58 (m, 3 H), 7.72 (d, <i>J</i> =7.15 Hz, 1 H), 7.83 (d, <i>J</i> =8.28 Hz, 1 H), 7.88 - 7.92 (m, 1 H), 7.96 - 8.02 (m, 1 H)
¹³ C-NMR	100.61 MHz, MeOD: δ (ppm) = 58.61 (<u>CH</u> ₂ N ₃), 71.31 (<u>CHOH</u>), 123.82, 124.89, 126.57, 126.77, 127.41, 129.45, 130.12, 131.78 (quartär), 135.40 (quartär), 138.72 (quartär)

2-Azido-1-naphth-1-ylethyl 2-methylbenzoat (64)

Struktur



Laborkürzel

AWF21

Summenformel

C₂₀H₁₇N₃O₂

Molare Masse

331.37

Vorschrift Allgemeine Vorschrift Ab

Variation: Wässrige Phase ist gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung.

96 mg (0.45 mmol) 2-Azido-1-naphth-1-ylethanol (63)

0.3 g (2 mmol) 2-Methylbenzoesäurechlorid (1)

In der DC-Reaktionskontrolle weisen Azidoalkohol und der Produkt-Ester gleiche R_f-Werte auf (Fließmittel Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1). Der nach Aufarbeitung erhaltene Rückstand muss säulenchromatographisch (Petrolether/Ethylacetat = 4:1) lediglich vom Überschuss 2-Methylbenzoesäure befreit werden.

Ausbeute 143 mg (0.43 mmol, 96%) farbloses Öl

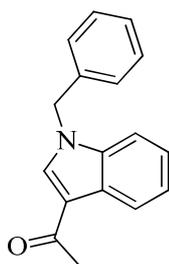
R_f 0.50 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 2.68 (s, 3 H, CH₃), 3.57 - 3.74 (m, 2 H, CH₂N₃), 5.71 (dd, *J*=7.78, 3.89 Hz, 1 H, OCHCH₂), 7.28 - 7.32 (m, 2 H), 7.44 - 7.59 (m, 4 H), 7.75 (d, *J*=7.28 Hz, 1 H), 7.84 (d, *J*=8.28 Hz, 1 H), 7.88 - 7.94 (m, 1 H), 8.02 (d, *J*=8.41 Hz, 1 H), 8.08 (dd, *J*=8.22, 1.32 Hz, 1 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 22.06 (CH₃), 57.50 (CH₂N₃), 70.58 (OCHCH₂), 122.32, 123.53, 125.48, 125.80, 125.84, 126.53, 128.24 (quartär), 128.81, 129.13, 130.05 (quartär), 131.54, 131.91, 132.90, 133.74 (quartär), 135.97 (quartär), 141.33 (quartär), 172.38 (CO)

1-(1-Benzyl-1*H*-indol-3-yl)ethanon (65)

Struktur



Laborkürzel

AWIn4

Summenformel

C₁₇H₁₅NO

Molare Masse

249.31

Vorschrift Es werden 2.00 g (12.6 mmol) 3-Acetylundol in 10 ml DMF unter Rühren gelöst und 710 mg (12.7 mmol) Kaliumhydroxid als Plätzchen zugegeben. Man pipettiert 1.49 ml (2.15 g, 12.6 mmol) Benzylbromid hinzu, woraufhin sich nach wenigen Minuten eine bräunliche Trübung einstellt. Da am nächsten Tag die Kaliumhydroxidplätzchen noch nicht vollständig gelöst sind, werden weitere 10 ml DMF zugegeben und einen weiteren Tag gerührt. Zur Aufarbeitung gießt man in 100 ml Wasser, extrahiert mit 100 ml Ethylacetat und wäscht die organische Phase 3x mit 50 ml Wasser sowie mit 50 ml gesättigter Natriumchloridlösung. Die DC-Reaktionskontrolle zeigt lediglich teilweise Umsetzung: Nach der Aufarbeitung kann das Edukt 3-Acetylundol (R_f = 0.1, Cyclohexan/

Ethylacetat = 3:1) in der DC eindeutig identifiziert werden. Um das noch nicht umgesetzte Edukt zu benzylieren, wird die organische Ethylacetatphase separiert und mit 1.0 g (7.2 mmol) Kaliumcarbonat und weiteren 1.5 ml (13 mmol) Benzylbromid versetzt. Man erhitzt zum Reflux. Reaktionskontrolle zeigt nach 2 Stunden, dass in der Hitze neben dem Produkt keine Nebenprodukte gebildet werden. Daher lässt man weiter refluxieren, nach 18 Stunden ist die Umsetzung laut DC vollständig. Man filtriert vom Feststoff ab, engt das Filtrat i. Vak. weitgehend ein und versetzt mit 10 ml Pentan. Es fällt hellgelber Niederschlag aus, der über eine Glasfritte abfiltriert und 3x mit 20 ml Pentan nachgewaschen wird. Man lässt im Abzug vom Pentan abdampfen und erhält schließlich das saubere Produkt als weiße, feinkristalline Substanz.

Ausbeute 2.33 g (9.35 mmol, 74%) weißer Feststoff

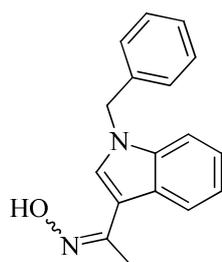
R_f 0.33 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 2.53 (s, 3 H, CH₃), 5.37 (s, 2 H, CH₂), 7.14 - 7.22 (m, 2 H), 7.27 - 7.40 (m, 6 H), 7.77 (s, 1 H), 8.38 - 8.45 (m, 1 H)

Das ¹H-NMR-Spektrum entspricht der Literatur^[161].

1-(1-Benzyl-1*H*-indol-3-yl)-*N*-hydroxyethanimin (**66**)

Struktur



Laborkürzel

AWIn7

Summenformel

C₁₇H₁₆N₂O

Molare Masse

264.32

Vorschrift In einem 100 ml Rundkolben werden 5 ml Wasser vorgelegt, 556 mg (8.00 mmol) Hydroxylamin Hydrochlorid darin gelöst, 1.0 g (4.0 mmol) 1-(1-Benzyl-1*H*-indol-3-yl)ethanon (**65**) und 1.0 g (9.4 mmol) Natriumcarbonat zugegeben und mit 30 ml Ethanol versetzt. Es wird über Nacht zum Reflux erhitzt, da am nächsten Tag jedoch laut DC noch Edukt vorhanden ist, werden weitere 200 mg (2.9 mmol) Hydroxylamin Hydrochlorid in 1 ml Wasser zugegeben und nochmals 12 Stunden refluxiert. Beim Abkühlen auf Raumtemperatur scheidet sich das Produkt kristallin ab, man verdünnt daher mit 50 ml Wasser, was zu einem voluminösen Niederschlag führt, der über eine Glasfritte abfiltriert und 3x mit 10 ml kaltem Wasser nachgewaschen wird. Der Filterrückstand wird zunächst im Abzug über Nacht vorgetrocknet und daraufhin im evakuierten Exsikkator über Schwefelsäure nachgetrocknet.

Ausbeute 1.036 g (Unter Berücks. der Reinheit von 74mol%: 2.901 mmol, 73% Ausbeute) beiger Feststoff

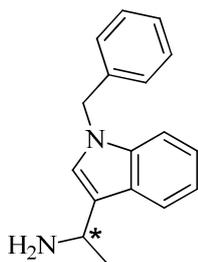
R_f 0.47 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 2.31 und 2.54 (2x s, gesamt 3H, CH₃, E/Z Isomerie am Oxim), 5.34 und 5.37 (2x s, gesamt 2H, CH₂N, E/Z Isomerie am Oxim), 7.01 (br. s., 1 H), 7.11 - 7.39 (m, 8 H), 8.22 - 8.31 (m, 1 H)

Reinheit Im ¹H-NMR-Spektrum addiert sich die Signalfäche oberhalb 7 ppm auf 14.8 Protonen, wobei vom Produkt 11 Protonen stammen, der Rest ist demnach aromatische Verunreinigung, die jedoch nicht vom Edukt stammen. Die abgeschätzte Reinheit errechnet sich zu 11/14.8 = 74mol%.

1-(1-Benzyl-1*H*-indol-3-yl)ethanamin (67)

Struktur



Laborkürzel	AWIn8
Summenformel	C ₁₇ H ₁₈ N ₂
Molare Masse	250.34

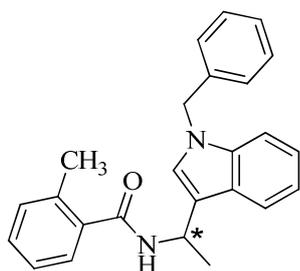
Vorschrift In 20 ml Ethanol werden 0.467 g (1.77 mmol) 1-(1-Benzyl-1*H*-indol-3-yl)-*N*-hydroxyethanamin (**66**) gelöst, in einen Autoklav überführt und etwa 300 mg in Wasser aufgeschlämmtes Raney-Nickel (ehemals Reaktivität W-7, 2 Wochen bei 1 °C im Kühlschrank unter Wasser gealtert) zugegeben. Man hydriert bei 15 bar Wasserstoff über 2 Tage. Zur Aufarbeitung wird nach Entspannen des Autoklav vom Nickel abfiltriert (Lagerung in Metalldose, pyrophor!), das Ethanol am Rotationsverdampfer weitgehend entfernt, der erhaltene Rückstand mit 20 ml einer Mischung aus Ethylacetat/Diethylether (1:1) versetzt und mit 30 ml 2%iger Salzsäure extrahiert. Die wässrige Phase wird mit weiteren 20 ml Diethylether gewaschen und daraufhin mit 20%iger Natronlauge auf pH > 10 eingestellt. Man extrahiert 2x mit 20 ml Diethylether und trocknet die vereinigte organische Phase über Natriumsulfat. Nach Entfernen des Lösemittels i. Vak. wird das Produkt als viskoses Öl erhalten, das unter Argon aufbewahrt wird.

Ausbeute 240 mg (0.959 mmol, 54%) gelbliches Öl

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.55 (d, *J*=6.53 Hz, 3 H, CHCH₃), 1.59 (br. s., 2 H, NH₂), 4.50 (q, *J*=6.53 Hz, 1 H, CHCH₃), 5.29 (s, 2 H, CH₂), 7.06 (s, 1 H), 7.08 - 7.16 (m, 3 H), 7.19 (td, *J*=7.56, 1.19 Hz, 1 H), 7.27 - 7.36 (m, 4 H), 7.72 (d, *J*=7.53 Hz, 1 H)

N-(1-(1-Benzyl-1*H*-indol-3-yl)ethyl)-2-methylbenzamid (68)

Struktur



Laborkürzel	AWIn9
Summenformel	C ₂₅ H ₂₄ N ₂ O
Molare Masse	368.47

Vorschrift Allgemeine Vorschrift Ab

240 mg (0.959 mmol) 1-(1-Benzyl-1*H*-indol-3-yl)ethanamin (**67**)

0.3 g (2 mmol) 2-Methylbenzoesäurechlorid (**1**)

Die Aufreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie. (Petrolether/Ethylacetat = 3:1)

Ausbeute 115 mg (0.312 mmol, 33%) beiger Feststoff

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.75 (d, *J*=6.78 Hz, 3 H, CHCH₃), 2.48 (s, 3 H, CH₃), 5.31 (s, 2 H, NCH₂), 5.64 - 5.79 (m, 1 H, CHCH₃), 5.93 (d, *J*=8.28 Hz, 1 H, NH), 7.10 (d, *J*=0.50 Hz, 1 H, CH

Pos. 2 Indol), 7.11 - 7.26 (m, 6 H), 7.27 - 7.36 (m, 6 H), 7.78 (dt, $J=7.81$, 0.99 Hz, 1 H)

$^{13}\text{C-NMR}$ 100.61 MHz, CDCl_3 : δ (ppm) = 19.76 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-Phenyl}$), 20.52 ($\text{CH}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 42.13 ($\text{N}\underline{\text{C}}\text{HCH}_3$), 50.09 ($\text{N}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 109.90, 117.35 (quartär), 119.68 (2 C), 122.33, 125.28, 125.64, 126.59, 126.73 (quartär), 126.85 (2 C), 127.73, 128.82 (2 C), 129.67, 130.89, 136.00 (quartär), 136.75 (quartär), 137.06 (quartär), 137.24 (quartär), 169.11 ($\underline{\text{C}}\text{O}$)

FT-IR λ^{-1} (cm^{-1}) = 3249, 1627, 1538, 1452, 1337, 1179, 749

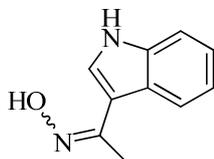
Smp. 159 °C

ESI-MS m/z = 391.5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 759.6 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 368.19

LC Reinheit > 99% (254 nm), R_t = 6.3 min, Methode Gem4

N-Hydroxy-1-(1H-indol-3-yl)ethanimin (69)

Struktur



Laborkürzel	AWIn3
Summenformel	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$
Molare Masse	174.20

Vorschrift Zu 50 ml Ethanol werden 2.00 g (12.6 mmol) 3-Acetylindol, 1.746 g (25.12 mmol) Hydroxylamin Hydrochlorid, 2.09 g (26.5 mmol) Pyridin und 5 ml Wasser gegeben. Man erhitzt zum Rückfluss über Nacht. Die anfangs ockerfarbene Lösung ist am nächsten Tag schwarzblau. Zur Aufarbeitung wird der Ansatz am Rotationsverdampfer weitestgehend eingengt, in 50 ml Ethylacetat aufgenommen und 3x mit 10% Kaliumhydrogensulfatlösung, dann mit gesättigter Natriumchloridlösung extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und daraufhin i. Vak. von Lösemittel befreit.

Ausbeute 1.64 g (9.41 mmol, 75%) dunkelgrüner Feststoff (farblose Kristalle laut Literatur^[162])

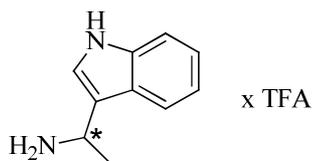
R_f 0.60 (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1)

$^1\text{H-NMR}$ 400.13 MHz, MeOD: δ (ppm) = 2.27 (s, 3 H, $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{NOH}$), 7.05 (ddd, $J=8.16$, 7.03, 1.00 Hz, 1 H), 7.13 (ddd, $J=8.09$, 7.03, 1.19 Hz, 1 H), 7.35 (dt, $J=8.06$, 0.86 Hz, 1 H), 7.51 (s, 1 H), 8.16 (dt, $J=8.03$, 1.00 Hz, 1 H)

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum entspricht der Literatur^[162].

1-(1H-Indol-3-yl)ethanamin trifluoracetat (70)

Struktur



Laborkürzel	AWIn5
Summenformel	$\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2$
Molare Masse	274.24

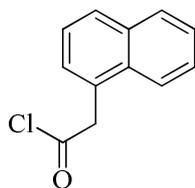
Vorschrift In Methanol werden 557 mg (2.87 mmol) N-Hydroxy-1-(1H-indol-3-yl)ethanimin (69) mit 60 mg Palladium-Kohle als Katalysator unter 15 bar Wasserstoff hydriert. Reaktionskontrolle nach einem Tag zeigt im DC (Fließmittel Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1) neben dem Edukt eine weitere

Substanz mit $R_f = 0$ (Startlinie). Man hydriert weitere 3 Tage bei 15 bar Wasserstoff, bis kein Edukt mehr mittels DC nachgewiesen wird. Zur Aufarbeitung wird von Pd-Kohle abfiltriert und das Filtrat i. Vak. von Lösemittel befreit. Es wird ein dunkelgelbes, viskoses Öl mit üblem, indolähnlichen Geruch erhalten. Durch Zugabe von 5 ml TFA wird in das Salz überführt wird. Der Überstand TFA wird i. Vak. entfernt und man erhält ein rotes, hochviskoses Öl.

Ausbeute	716 mg (2.61 mmol, 91%) rotes, viskoses Öl
$^1\text{H-NMR}$	400.13 MHz, MeOD: δ (ppm) = 1.77 (d, $J=6.90$ Hz, 3 H, CHCH_3), 4.81 (q, $J=6.90$ Hz, 1 H, CHCH_3), 7.10 (ddd, $J=8.03, 6.90, 1.00$ Hz, 1 H), 7.17 (ddd, $J=8.09, 7.09, 1.13$ Hz, 1 H), 7.38 - 7.50 (m, 2 H), 7.69 (dt, $J=7.94, 0.99$ Hz, 1 H)
$^{13}\text{C-NMR}$	100.61 MHz, MeOD: δ (ppm) = 20.32, 45.50, 112.91, 113.75 (quartär), 119.22, 120.81, 123.39, 124.30, 126.68 (quartär), 138.28 (quartär)

Naphth-1-ylacetylchlorid (71)

Struktur

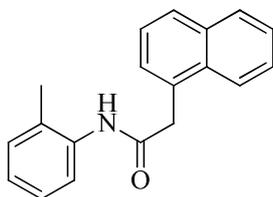


Laborkürzel	AWNE1
Summenformel	$\text{C}_{12}\text{H}_9\text{ClO}$
Molare Masse	204.65

Vorschrift In 30 ml (49 g, 0.41 mol) Thionylchlorid werden 10 g (53.7 mmol) Naphthyleessigsäure suspendiert, 1 Tropfen DMF zugegeben und mittels Heizpilz unter Argon zum Rückfluss erhitzt. Nach 4 Stunden zeigt der aufgesetzte Blasenähler keine Gasentwicklung mehr an. Die Lösung wird im Wasserstrahlpumpenvakuum bei 50 °C unter Rühren von Thionylchlorid befreit. Das flüssige Säurechlorid wird unmittelbar nach Herstellung mittels Spritze den Folgeansätzen zugegeben. (Verbindungen **73 - 80**)

N-(2-Methylphenyl)-2-naphth-1-ylacetamid (72)

Struktur



Laborkürzel	AWNE13
Summenformel	$\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{NO}$
Molare Masse	275.34

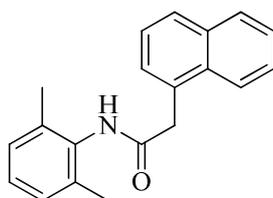
Vorschrift Allgemeine Vorschrift C, Lösungsmittel 2 ml THF
300 mg (1.61 mmol) Naphthyleessigsäure
189 μl (189 mg, 1.77 mmol) *o*-Toluidin
Nach Abfiltrieren des Dicyclohexylharnstoffs wird mit 5 ml Ethylacetat nachgewaschen und zum Filtrat 0.5 ml Isopropylamin zugegeben, um HOBT als Salz auszufällen. Der Niederschlag wird abfiltriert und das Filtrat i. Vak. von Lösemittel befreit. Der erhaltene Rückstand wird

säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1) aufgereinigt.

Ausbeute	274 mg (1.0 mmol, 62%) weißer Feststoff
¹ H-NMR	400.13 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 1.53 (s, 3 H, <u>CH</u> ₃), 4.25 (s, 2 H, <u>CH</u> ₂ CO), 6.83 (br. s., 1 H, <u>NH</u>), 6.94 - 7.02 (m, 2 H), 7.11 - 7.20 (m, 1 H), 7.46 - 7.63 (m, 4 H), 7.84 (d, <i>J</i> =8.08 Hz, 1 H), 7.87 - 7.96 (m, 2 H), 8.07 (d, <i>J</i> =7.83 Hz, 1 H)
¹³ C-NMR	100.61 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 16.64 (<u>C</u> H ₃), 42.81 (<u>C</u> H ₂ CO), 122.07, 123.77, 124.89, 125.66, 126.45, 126.69, 127.13, 128.16 (quartär), 128.58, 128.89 (2 C), 130.21, 130.89 (quartär), 131.98 (quartär), 134.04 (quartär), 135.41 (quartär), 168.81 (<u>C</u> O)
FT-IR	λ ⁻¹ (cm ⁻¹) = 3255, 1653, 1585, 1525, 1454, 1340, 1253, 1195, 967, 775, 754
Smp.	181 °C
ESI-MS	m/z = 276.3 [M+H] ⁺ , 298.2 [M+Na] ⁺ , ber.: 275.13
LC	Reinheit 96.5% (254 nm), R _t = 11.4 min, Methode Gem6

N-(2,6-Dimethylphenyl)-2-naphth-1-ylacetamid (73)

Struktur



Laborkürzel	AWNE2
Summenformel	C ₂₀ H ₁₉ NO
Molare Masse	289.37

Vorschrift Das tiefrot gefärbte 2,6-Dimethylanilin wird zunächst unter vermindertem Druck destilliert, man erhält eine schwach rosa eingefärbte, klare Flüssigkeit. Diese wird für weitere Ansätze unter Argon aufbewahrt.

Allgemeine Vorschrift Ac

2 ml (2 g, 17 mmol) 2,6-Dimethylanilin

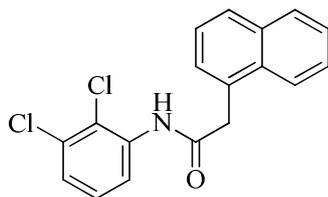
0.60 g (2.9 mmol) Naphth-1-ylacetylchlorid (71)

Das rosa eingefärbte Produkt wird aus Ethylacetat umkristallisiert.

Ausbeute	450 mg (1.55 mmol, 54%) weißer Feststoff
¹ H-NMR	400.13 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 1.95 (s, 6 H, 2x <u>CH</u> ₃), 4.25 (s, 2 H, <u>CH</u> ₂ CO), 6.50 (br. s., 1 H, <u>NH</u>), 6.92 - 7.05 (m, 3 H), 7.49 - 7.65 (m, 4 H), 7.83 - 7.97 (m, 2 H), 8.15 (d, <i>J</i> =8.34 Hz, 1 H)
¹³ C-NMR	100.61 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 18.12 (2x <u>C</u> H ₃), 42.09 (<u>C</u> H ₂ CO), 123.98, 125.70, 126.45, 126.99, 127.31, 128.08 (2 C), 128.44, 128.79, 128.88, 131.36 (quartär), 132.08 (quartär), 133.42 (quartär), 134.08 (quartär), 135.20 (quartär, 2x <u>C</u> CH ₃), 169.17 (<u>C</u> O)
FT-IR	λ ⁻¹ (cm ⁻¹) = 3248, 2922, 1638, 1523, 1463, 1341, 1229, 979, 783, 767
Smp.	220 °C
ESI-MS	m/z = 290.3 [M+H] ⁺ , ber.: 289.15
LC	Reinheit 97.2% (254 nm), R _t = 11.7 min, Methode Gem6

N-(2,3-Dichlorphenyl)-2-naphth-1-ylacetamid (74)

Struktur



Laborkürzel AWNE15
 Summenformel C₁₈H₁₃Cl₂NO
 Molare Masse 330.21

Vorschrift Allgemeine Vorschrift Ac

1 g (6 mmol) 2,3-Dichloranilin

0.60 g (2.9 mmol) Naphth-1-ylacetylchlorid (71)

Bei der Aufarbeitung wird statt Diethylether Chloroform eingesetzt. Die Umkristallisation erfolgt aus Ethylacetat.

Ausbeute 540 mg (1.64 mmol, 56%) weißer Feststoff

¹H-NMR 400.13 MHz, CD₂Cl₂: δ (ppm) = 4.24 (s, 2 H, CH₂CO), 7.07 - 7.22 (m, 2 H, Pos. 4 & 5 Anilin), 7.50 - 7.61 (m, 4 H), 7.69 (br. s., 1 H, NH), 7.87 - 7.97 (m, 2 H), 8.00 - 8.06 (m, 1 H), 8.28 (dd, *J*=7.96, 1.89 Hz, 1 H, Pos. 6 Anilin)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CD₂Cl₂: δ (ppm) = 43.49 (CH₂CO), 119.63 (Pos. 6 Anilin), 121.81 (CCl, Pos. 2 Anilin), 124.18, 125.63, 126.32, 126.91, 127.57, 128.28, 129.25, 129.46 (2 C), 130.96 (quartär), 132.63 (quartär), 132.99 (quartär), 134.71 (CCl, Pos. 3 Anilin), 136.78 (quartär), 169.49 (CO)

FT-IR λ⁻¹ (cm⁻¹) = 3263, 1669, 1577, 1523, 1455, 1411, 1337, 1290, 1182, 1052, 914, 783

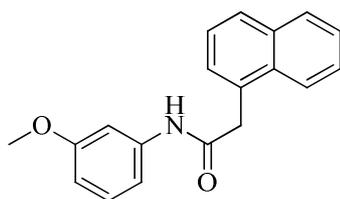
Smp. 151 °C

ESI-MS *m/z* = 330.2 [M+H]⁺, 352.1 [M+Na]⁺, ber.: 329.04

LC Reinheit > 99% (300 nm), R_t = 14.7 min, Methode Gem6

N-(3-Methoxyphenyl)-2-naphth-1-ylacetamid (75)

Struktur



Laborkürzel AWNE7
 Summenformel C₁₉H₁₇NO₂
 Molare Masse 291.34

Vorschrift Allgemeine Vorschrift Ac

1 g (8 mmol) 3-Anisidin

0.60 g (2.9 mmol) Naphth-1-ylacetylchlorid (71)

Die Umkristallisation erfolgt aus Cyclohexan/Ethylacetat (1:1).

Ausbeute 320 mg (1.1 mmol, 38%) grau-metallisch glänzende Nadeln

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 3.74 (s, 3 H, OCH₃), 4.16 (s, 2 H, CH₂CO), 6.61 (dd, *J*=8.34, 2.02 Hz, 1 H), 6.75 (ddd, *J*=8.02, 1.83, 0.76 Hz, 1 H), 7.07 - 7.17 (m, 2 H), 7.21 (br. s., 1 H, NH), 7.45 - 7.60 (m, 4 H), 7.82 - 7.98 (m, 2 H), 7.98 - 8.09 (m, 1 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 42.78 (CH₂CO), 55.21 (OCH₃), 105.62 (Pos. 2 Anilin), 110.20,

111.93, 123.62, 125.63, 126.29, 127.01, 128.42, 128.77, 128.85, 129.44, 130.58 (quartär), 132.01 (quartär), 134.00 (quartär), 138.72 (quartär, Pos. 1 Anilin), 160.00 (quartär, $\underline{\text{COCH}}_3$, Pos. 3 Anilin), 169.06 ($\underline{\text{CONH}}$)

FT-IR λ^{-1} (cm^{-1}) = 3276, 1661, 1599, 1529, 1493, 1414, 1339, 1262, 1217, 1152, 1039, 838, 783, 685

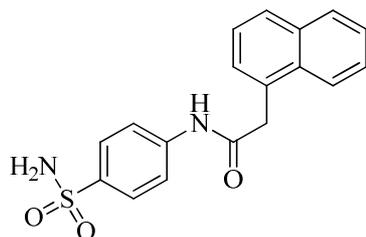
Smp. 135 °C

ESI-MS m/z = 605.3 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, 292.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 291.13

LC Reinheit 98.1% (280 nm), R_t = 11.6 min, Methode Gem6

2-Naphth-1-yl-N-(4-sulfamoylphenyl)acetamid (76)

Struktur



Laborkürzel AWNE4

Summenformel $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$

Molare Masse 340.40

Vorschrift Es werden 2.5 g (14.5 mmol) Sulfanilamid in 10 ml THF gelöst und unter Rühren 1.0 g (4.86 mmol) Naphth-1-ylacetylchlorid (**71**) zugegeben. Nach einer Stunde wird ein ausgefallener, weißer Feststoff abfiltriert und mit Ethylacetat, dann Ethanol gewaschen. Der Filtrerrückstand wird dabei nicht merklich angelöst. Daraufhin gibt man ihn in einen Scheidetrichter und schüttelt mit 100 ml 0,05 M Salzsäure gegen Ethylacetat aus. Nach der Phasentrennung befindet sich der weiße Feststoff an der Phasengrenze, daher filtriert man die Wasserphase mitsamt des Feststoffs. Der Filtrerrückstand wird im evakuierten Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet. Die Substanz ist in unpolaren Lösemitteln ausgesprochen schlecht löslich.

Ausbeute 1.384 g (4.07 mmol, 84%) blassgelber Feststoff

$^1\text{H-NMR}$ 400.13 MHz, $\text{DMSO-}d_6$: δ (ppm) = 4.20 (s, 2 H, $\underline{\text{CH}}_2\text{CO}$), 7.24 (s, 2 H, $\text{SO}_2\underline{\text{NH}}_2$), 7.44 - 7.61 (m, 4 H), 7.77 (s, 4 H), 7.86 (dd, $J=7.47$, 1.69 Hz, 1 H), 7.92 - 7.99 (m, 1 H), 8.11 (d, $J=8.16$ Hz, 1 H), 10.65 (s, 1 H, $\underline{\text{NH}}\text{CO}$)

$^{13}\text{C-NMR}$ 100.61 MHz, $\text{DMSO-}d_6$: δ (ppm) = 40.63 ($\underline{\text{CH}}_2\text{CO}$), 118.66 (2 C), 124.11, 125.53, 125.71, 126.14, 126.70 (2 C), 127.33, 127.89, 128.44, 131.97 (quartär), 132.08 (quartär), 133.36 (quartär), 138.36 (quartär), 142.08 (quartär), 169.63 ($\underline{\text{CONH}}$)

FT-IR λ^{-1} (cm^{-1}) = 3313, 1678, 1592, 1534, 1325, 1150, 780

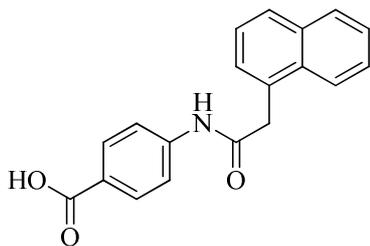
Smp. 280 °C mit Zersetzung (entspricht der Literatur^[163])

ESI-MS m/z = 341.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 339.1 $[\text{M}-\text{H}]^-$, ber.: 340.09

LC Reinheit 98.3% (254 nm), R_t = 7.4 min, Methode Gem6

4-[(Naphth-1-ylacetyl)amino]benzoesäure (77)

Struktur



Laborkürzel AWNE5
 Summenformel C₁₉H₁₅NO₃
 Molare Masse 305.33

Vorschrift In 10 ml THF werden 1.1 g (8.0 mmol) p-Aminobenzoesäure gelöst und unter Rühren 0.75 g (3.66 mmol) Naphth-1-ylacetylchlorid (**71**) zugegeben. Daraufhin werden langsam 0.81 g (8.0 mmol) Triethylamin zugetropft. Am nächsten Tag wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand in 50 ml Ethylacetat aufgenommen, wobei eine trübe Emulsion entsteht. Diese wird 3x mit 20 ml 0,05 M Salzsäure gewaschen, die organische Phase bleibt währenddessen getrübt. Man entfernt das Lösungsmittel im Vakuum, nimmt den Rückstand in 50 ml 10% Natriumcarbonatlösung auf und extrahiert 3x mit 20 ml Dichlormethan. Die gelblich klare wässrige Phase wird unter Rühren aufgeköcht und mit 0.1 g Aktivkohle entfärbt. Man lässt auf Raumtemperatur abkühlen und filtriert die Aktivkohle ab. Das Filtrat wird mit konz. Salzsäure angesäuert, der ausgefallene weiße Feststoff abfiltriert und im Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet.

Ausbeute 636 mg (2.08 mmol, 57%) hellgrauer Feststoff

¹H-NMR* 400.13 MHz, D₂O: δ (ppm) = 3.71 (s, 2 H, CH₂CO), 7.04 - 7.21 (m, 6 H), 7.41 (d, J=7.58 Hz, 1 H), (Na-Salz) 7.47 (d, J=7.58 Hz, 1 H), 7.57 - 7.74 (m, 3 H)

¹³C-NMR* 100.61 MHz, D₂O: δ (ppm) = 40.46 (CH₂CO), 120.41 (2 C), 123.28, 125.51, 125.81, 126.40, NMR* 127.90, 128.23, 128.54, 129.78 (2 C), 130.64 (quartär), 131.65 (quartär), 132.57 (quartär), 133.37 (Na-Salz) (quartär), 139.39 (quartär), 172.43 (CONH), 174.69 (COO)

FT-IR λ⁻¹ (cm⁻¹) = 1671, 1595, 1521, 1406, 1293, 1178, 856, 780

Smp. Zersetzung ab 270 °C

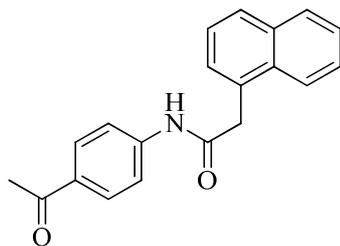
ESI-MS m/z = 306.2 [M+H]⁺, ber.: 305.11

LC Reinheit 97.9% (254 nm), R_t = 10.6 min, Methode Gem6

*Die Substanz war in keinem gängigen, deuterierten Lösungsmittel löslich. Daher wurden zu 1 ml D₂O 50 mg Natriumcarbonat gegeben, die Carbonsäure ging dabei als Salz in Lösung. Diese Lösung wurde NMR-spektroskopisch vermessen. Das Signal von Carbonat ist im ¹³C-NMR-Spektrum bei 168.34 ppm zu erkennen.

N-(4-Acetylphenyl)-2-naphth-1-ylacetamid (78)

Struktur



Laborkürzel AWNE11
Summenformel C₂₀H₁₇NO₂
Molare Masse 303.35

Vorschrift Allgemeine Vorschrift Ac

1 g (7 mmol) *p*-Aminoacetophenon

0.60 g (2.9 mmol) Naphth-1-ylacetylchlorid (71)

Aufarbeitung mit Chloroform statt Diethylether. Die Umkristallisation erfolgt aus Aceton.

Ausbeute 427 mg (1.41 mmol, 49%) gelber Feststoff

¹H-NMR 400.13 MHz, DMSO-*d*₆: δ (ppm) = 2.51 (s, 3 H, CH₃CO), 4.20 (br. s., 2 H, CH₂CO), 7.45 - 7.60 (m, 4 H), 7.71 - 7.78 (m, 2 H), 7.86 (dd, *J*=7.33, 2.02 Hz, 1 H), 7.90 - 7.96 (m, 3 H), 8.07 - 8.15 (m, 1 H), 10.65 (s, 1 H, NH)

¹³C-NMR 100.61 MHz, DMSO-*d*₆: δ (ppm) = 26.38 (CH₃CO), 40.65 (CH₂CO), 118.32 (2 C), 124.10, 125.51, 125.69, 126.13, 127.31, 127.91, 128.42, 129.47 (2 C), 131.69 (quartär), 131.95 (quartär), 132.06 (quartär), 133.34 (quartär), 143.50 (quartär), 169.64 (CONH), 196.45 (CH₃CO)

FT-IR λ⁻¹ (cm⁻¹) = 3311, 1671, 1592, 1514, 1401, 1342, 1304, 1273, 1174, 968, 830, 779

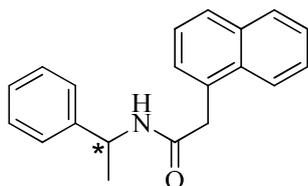
Smp. 202 °C

ESI-MS *m/z* = 629.4 [2M+Na]⁺, 304.2 [M+H]⁺, ber.: 303.13

LC Reinheit 97.2% (215 nm), R_t = 11.1 min, Methode Gem6

2-Naphth-1-yl-N-(1-phenylethyl)acetamid (79)

Struktur



Laborkürzel AWNE14
Summenformel C₂₀H₁₉NO
Molare Masse 289.37

Vorschrift Allgemeine Vorschrift Ac

1 g (8 mmol) 1-Phenylethanamin

0.60 g (2.9 mmol) Naphth-1-ylacetylchlorid (71)

Die Umkristallisation erfolgt aus Methanol.

Ausbeute 678 mg (2.34 mmol, 81%) weißer Feststoff

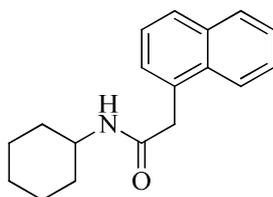
R_f 0.58 (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.26 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H, CH₃CH), 4.05 (s, 2 H, CH₂CO), 5.06 - 5.17 (m, 1 H, CH₃CH), 5.48 (d, *J*=7.07 Hz, 1 H, NH), 6.95 - 7.04 (m, 2 H), 7.14 - 7.23 (m, 3 H), 7.39 - 7.49 (m, 2 H), 7.50 - 7.58 (m, 2 H), 7.84 (d, *J*=8.08 Hz, 1 H), 7.87 - 7.99 (m, 2 H)

¹³ C-NMR	100.61 MHz, CDCl ₃ ; δ (ppm) = 21.59 (<u>CH</u> 3), 42.01 (<u>CH</u> 2), 48.53 (<u>CH</u>), 123.90, 125.62, 125.79 (2 C), 126.21, 126.75, 127.10, 128.31, 128.43 (2 C), 128.54, 128.78, 131.10 (quartär), 132.03 (quartär), 133.97 (quartär), 142.89 (quartär, Pos. 1 Phenyl), 169.99 (<u>CO</u>)
FT-IR	λ ⁻¹ (cm ⁻¹) = 3305, 1645, 1531, 1225, 784, 698
Smp.	124 °C
ESI-MS	m/z = 290.2 [M+H] ⁺ , ber.: 289.15
LC	Reinheit 94.4% (215 nm), R _t = 11.8 min, Methode Gem6

N-Cyclohexyl-2-naphth-1-ylacetamid (80)

Struktur

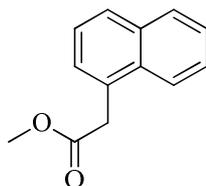


Laborkürzel	AWNE12
Summenformel	C ₁₈ H ₂₁ NO
Molare Masse	267.37

Vorschrift	Allgemeine Vorschrift Ac 1 ml (0.86 g, 8.7 mmol) Cyclohexylamin 0.48 g (2.3 mmol) Naphth-1-ylacetylchlorid (71) Die Umkristallisation erfolgt aus Ethylacetat.
Ausbeute	412 mg (1.54 mmol, 67%) blassgelber Feststoff
¹ H-NMR	400.13 MHz, CDCl ₃ ; δ (ppm) = 0.78 - 0.88 (m, 2 H), 0.92 - 1.06 (m, 1 H), 1.18 - 1.34 (m, 2 H), 1.41 - 1.55 (m, 3 H), 1.65 - 1.77 (m, 2 H), 3.68 - 3.81 (m, 1 H, <u>CH</u> N), 4.01 (s, 2 H, <u>CH</u> ₂ CO), 5.12 (d, J=6.06 Hz, 1 H, <u>NH</u>), 7.37 - 7.43 (m, 1 H, Pos. 2 Naphthyl), 7.43 - 7.49 (m, 1 H, Pos. 3 Naphthyl), 7.49 - 7.58 (m, 2 H, Pos. 6 & 7 Naphthyl), 7.84 (d, J=8.08 Hz, 1 H, Pos. 4 Naphthyl), 7.86 - 7.92 (m, 1 H, Pos. 5 Naphthyl), 7.93 - 8.00 (m, 1 H, Pos. 8 Naphthyl)
¹³ C-NMR	100.61 MHz, CDCl ₃ ; δ (ppm) = 24.57 (Pos. 3 & 5 Cyclohexyl), 25.34 (Pos. 4 Cyclohexyl), 32.67 (Pos. 2 & 6 Cyclohexyl), 42.08 (<u>CH</u> ₂ CO), 48.09 (<u>CH</u> N), 123.87 (Pos. 8 Naphthyl), 125.59 (Pos. 3 Naphthyl), 126.16 (Pos. 6 Naphthyl), 126.67 (Pos. 7 Naphthyl), 128.26 (Pos. 2 Naphthyl), 128.42 (Pos. 4 Naphthyl), 128.73 (Pos. 5 Naphthyl), 131.33 (quartär, Pos. 1 Naphthyl), 132.05 (quartär, Pos. 8a Naphthyl), 133.94 (quartär, Pos.4a Naphthyl), 169.84 (<u>CO</u>)
FT-IR	λ ⁻¹ (cm ⁻¹) = 3297, 2928, 2851, 1640, 1532, 1343, 1247, 1223, 776
Smp.	179 °C (entspricht der Literatur ^[164])
ESI-MS	m/z = 557.3 [2M+Na] ⁺ , 535.3 [2M+H] ⁺ , 268.2 [M+H] ⁺ , ber.: 267.16
LC	Reinheit 97.0% (215 nm), R _t = 12.3 min, Methode Gem6

Methyl-naphth-1-ylacetat (81)

Struktur



Laborkürzel	AWNEM1
Summenformel	C ₁₃ H ₁₂ O ₂
Molare Masse	200.23

Vorschrift In 50 ml Methanol werden 4.3 g (23.1 mmol) Naphthylelessigsäure gelöst und 0.8 ml Schwefelsäure zugegeben. Man erhitzt über 2 Stunden zum Reflux, dann wird nach Abkühlen auf Raumtemperatur mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung bis pH 5 versetzt und die Lösung am Rotationsverdampfer auf etwa 10 ml eingengt. Der Kolbeninhalt wird 3x mit 10 ml Dichlormethan extrahiert und die vereinte organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wird i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Gradient Pentan/Ethylacetat= 20:1 nach 3:1) aufgereinigt.

Ausbeute 4.39 g (21.9 mmol, 95%) farbloses Öl

R_f 0.7 (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1)

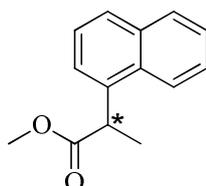
¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 3.70 (s, 3 H, OCH₃), 4.10 (s, 2 H, CH₂), 7.40 - 7.59 (m, 4 H), 7.81 (dd, *J*=7.47, 1.82 Hz, 1 H), 7.85 - 7.91 (m, 1 H), 7.98 - 8.03 (m, 1 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 39.02 (CH₂), 52.11 (OCH₃), 123.74, 125.46, 125.77, 126.38, 127.98, 128.08, 128.72, 130.49 (quartär), 132.09 (quartär), 133.82 (quartär), 172.01 (CO)

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur^[165].

Methyl 2-naphth-1-ylpropanoat (82)

Struktur



Laborkürzel	AWNEM2
Summenformel	C ₁₄ H ₁₄ O ₂
Molare Masse	214.26

Vorschrift Zu 20 ml DMSO werden 4.053 g (20.2 mmol) Naphthylelessigsäure-methylester (**81**), 4.875 g (34.4 mmol) Methyljodid und 1.23 g (22 mmol) KOH Plätzchen zugegeben. Man lässt 10 Tage bei Raumtemperatur rühren, die Plätzchen sind am dritten Tag vollständig in Lösung gegangen. Reaktionskontrolle mittels DC zeigt nahe oberhalb des Eduktsports den während der Reaktionsdauer intensiver werdenden Produktpot. Der Ansatz ist nach 10 Tagen hellgelb und leicht getrübt. Zur Aufarbeitung wird auf 100 ml einer Lösung aus 5.0 g (36 mmol) Natriumdihydrogenphosphat-Hydrat in Wasser gegossen und daraufhin mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung auf pH 7 eingestellt. Man extrahiert 4x mit 40 ml Dichlormethan und 2x mit 40 ml Ethylacetat. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum von Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Rückstand wird säulenchromatographisch aufgereinigt (Beginn Pentan/Ethylacetat = 14:1, Ende Pentan/Ethylacetat = 9:1). Das Produkt eluiert als erstes, man erhält eine reine Fraktion zu 1.327 g (6.19 mmol, 31%) 2-Naphthylpropionsäure-methylester

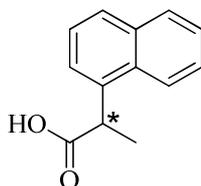
(**82**) und 1.815 g einer mit Edukt verunreinigten Zwischenfraktion (laut Flächenverhältnis im $^1\text{H-NMR}$ 35 mol% Edukt, d. h. zusätzliche erhaltene Ausbeute ca. 30%), bevor überwiegend Edukt eluiert.

Ausbeute 1.327 g (6.19 mmol, 31%) farbloses Öl (weißer Feststoff laut Literatur^[166])
 R_f 0.75 (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1)
 $^1\text{H-NMR}$ 400.13 MHz, CDCl_3 : δ (ppm) = 1.68 (d, $J=7.16$ Hz, 3 H, CH_3CH), 3.67 (s, 3 H, OCH_3), 4.53 (q, $J=7.16$ Hz, 1 H, CH_3CH), 7.45 - 7.59 (m, 4 H), 7.77 - 7.82 (m, 1 H), 7.86 - 7.92 (m, 1 H), 8.10 (d, $J=8.34$ Hz, 1 H)

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum entspricht der Literatur^[166].

2-Naphth-1-ylpropansäure (**83**)

Struktur



Laborkürzel AWNEM3
Summenformel $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_2$
Molare Masse 200.23

Vorschrift In 15 ml THF/Wasser = 2:1 werden 1.0 g (4.7 mmol) Naphthylpropionsäure-methylester (**82**) mit 0.294 g (7 mmol) Lithiumhydroxid-Monohydrat über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Man säuert mit 1 M Salzsäure bis pH 1 an und extrahiert 3x mit 20 ml Dichlormethan. Die organischen Phasen werden vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet. Anschließend wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

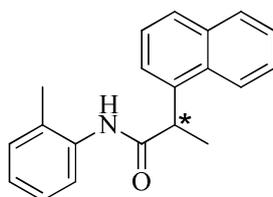
Ausbeute 0.93 g (4.6 mmol; 99%) weißer Feststoff
 R_f 0.2 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1), abhängig von Auftragemenge
 $^1\text{H-NMR}$ 400.13 MHz, $\text{DMSO}-d_6$: δ (ppm) = 1.51 (d, $J=7.15$ Hz, 3 H, CHCH_3), 4.47 (q, $J=7.03$ Hz, 1 H, CHCH_3), 7.39 - 7.62 (m, 4 H), 7.83 (d, $J=8.03$ Hz, 1 H), 7.91 - 7.99 (m, 1 H), 8.13 (d, $J=8.41$ Hz, 1 H), 12.36 (br. s., 1 H, COOH)

FT-IR λ^{-1} (cm^{-1}) = 2984, 1698, 1320, 1228, 918, 775

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur^[166].

N-(2-Methylphenyl)-2-naphth-1-ylpropanamid (**84**)

Struktur



Laborkürzel AWNEM4
Summenformel $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{NO}$
Molare Masse 289.37

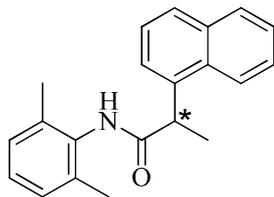
Vorschrift Allgemeine Vorschrift C, Lösungsmittel 2 ml THF
80 mg (0.4 mmol) 2-Naphth-1-ylpropansäure (**83**)
47 mg (0.44 mmol) *o*-Toluidin

Zur Aufarbeitung wird das Filtrat i. Vak. von Lösemittel befreit, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und 0.5 ml Isopropylamin zugegeben, wobei HOBT als Salz ausfällt. Der Niederschlag wird abfiltriert und das Filtrat i. Vak. von Lösemittel befreit. Der erhaltene Rückstand wird säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1) aufgereinigt.

Ausbeute	52 mg (0.18 mmol, 45%) weißer Feststoff
¹ H-NMR	400.13 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 1.54 (s, 3 H, <u>CH</u> ₃), 1.87 (d, <i>J</i> =7.33 Hz, 3 H, <u>CH</u> CH ₃), 4.54 (q, <i>J</i> =7.33 Hz, 1 H, <u>CH</u> CH ₃), 6.78 (br. s., 1 H, <u>NH</u>), 6.93 - 7.02 (m, 2 H), 7.10 - 7.21 (m, 1 H), 7.48 - 7.61 (m, 3 H), 7.63 (d, <i>J</i> =6.82 Hz, 1 H), 7.76 - 7.96 (m, 3 H), 8.14 (d, <i>J</i> =8.08 Hz, 1 H)
¹³ C-NMR	100.61 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 16.66 (<u>C</u> H ₃), 17.52 (CH <u>C</u> H ₃), 44.69 (<u>CH</u> CH ₃), 122.22, 123.28, 124.75, 124.97, 125.58, 126.12, 126.58, 126.89, 128.32 (quartär), 128.51, 129.03, 130.15, 131.62 (quartär), 134.06 (quartär), 135.50 (quartär), 136.44 (quartär), 172.72 (<u>CO</u>)
FT-IR	λ ⁻¹ (cm ⁻¹) = 3221, 2927, 1639, 1531, 1492, 1451, 1342, 1248, 774
Smp.	151 °C
ESI-MS	m/z = 601.4 [2M+Na] ⁺ , 290.2 [M+H] ⁺ , ber.: 289.15
LC	Reinheit 98.8% (300 nm), R _t = 12.6 min, Methode Gem6

***N*-(2,6-Dimethylphenyl)-2-naphth-1-ylpropanamid (85)**

Struktur

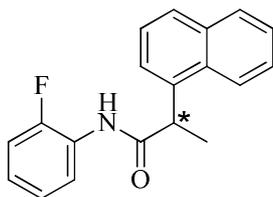


Laborkürzel	AWNEM5
Summenformel	C ₂₁ H ₂₁ NO
Molare Masse	303.40

Vorschrift	Allgemeine Vorschrift C, Lösungsmittel 2 ml THF 80 mg (0.4 mmol) 2-Naphth-1-ylpropansäure (83) 54 µl mg (53 mg, 0.44 mmol) 2,6-Dimethylanilin Die Aufarbeitung erfolgt analog Verbindung 84 . Eine Umkristallisation wurde vor der Säulenchromatographie versucht und erniedrigte die Ausbeute.
Ausbeute	38 mg (0.13 mmol, 31%) weißer Feststoff
R _f	0.53 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)
¹ H-NMR	400.13 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 1.88 (s, 6 H, 2x <u>CH</u> ₃), 1.90 (d, <i>J</i> =7.28 Hz, 3 H, <u>CH</u> CH ₃), 4.58 (q, <i>J</i> =7.15 Hz, 1 H, <u>CH</u> CH ₃), 6.46 (br. s., 1 H, <u>NH</u>), 6.89 - 7.05 (m, 3 H), 7.49 - 7.63 (m, 3 H), 7.67 (d, <i>J</i> =7.03 Hz, 1 H), 7.87 (d, <i>J</i> =8.16 Hz, 1 H), 7.90 - 7.96 (m, 1 H), 8.23 (d, <i>J</i> =8.16 Hz, 1 H)
¹³ C-NMR	100.61 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 17.65 (CH <u>C</u> H ₃), 18.00 (2 C, 2x <u>C</u> H ₃), 44.19 (<u>CH</u> CH ₃), 123.59, 124.51, 125.60, 126.19, 126.84, 127.11, 128.05 (2 C), 128.46, 129.00, 131.89 (quartär), 133.40 (quartär), 134.05 (quartär), 135.16 (quartär, 2 C, 2x <u>C</u> CH ₃), 136.61 (quartär), 172.97 (<u>CO</u>)
FT-IR	λ ⁻¹ (cm ⁻¹) = 3222, 2968, 1637, 1510, 1474, 1369, 1220, 768
Smp.	196 °C
ESI-MS	m/z = 304.2 [M+H] ⁺ , ber.: 303.16
LC	Reinheit > 99% (254 nm), R _t = 12.4 min, Methode Gem6

***N*-(2-Fluorphenyl)-2-naphth-1-ylpropanamid (86)**

Struktur



Laborkürzel

AWNEM6

Summenformel

C₁₉H₁₆FNO

Molare Masse

293.33

Vorschrift Allgemeine Vorschrift C, Lösungsmittel 2 ml THF

80 mg (0.4 mmol) 2-Naphth-1-ylpropansäure (**83**)

50 µl (49 mg, 0.44 mmol) 2-Fluoranilin

Die Aufarbeitung erfolgt analog Verbindung **84**.

Ausbeute 70 mg (0.24 mmol, 60%) weißer Feststoff

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.81 (d, *J*=7.15 Hz, 3 H, CHCH₃), 4.54 (q, *J*=7.15 Hz, 1 H, CHCH₃), 6.90 - 7.01 (m, 2 H), 7.09 (t, *J*=7.40 Hz, 1 H), 7.26 (br. s., 1 H, NH), 7.48 - 7.63 (m, 4 H), 7.86 (d, *J*=8.16 Hz, 1 H), 7.89 - 7.94 (m, 1 H), 8.12 (d, *J*=8.28 Hz, 1 H), 8.29 (t, *J*=7.59 Hz, 1 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 17.86 (CH₃), 44.80 (CH), 114.62 (d, *J*=19.44 Hz, CCF, Pos. 3 Anilin), 121.62, 123.02, 124.24 (d, *J*=7.70 Hz), 124.43 (d, *J*=3.67 Hz), 125.02, 125.72, 126.07, 126.25 (quartär, Pos. 1 Anilin), 126.88, 128.57, 129.16, 131.46 (quartär), 134.17 (quartär), 136.19 (quartär), 172.79 (CO)

Aus HMBC-Spektrum:

δ (ppm) = 152.09 (d, *J*=253.5 Hz, CF)

FT-IR λ⁻¹ (cm⁻¹) = 3287, 2975, 1667, 1599, 1536, 1488, 1452, 1373, 1334, 1259, 1200, 1021, 778, 752

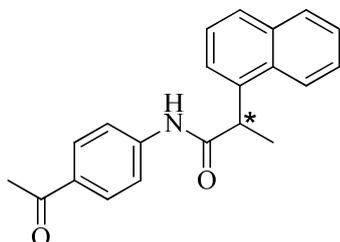
Smp. 116 °C

ESI-MS *m/z* = 294.2 [M+H]⁺, 316.2 [M+Na]⁺, 609.3 [2M+Na]⁺, ber.: 293.12

LC Reinheit 96.0% (254 nm), R_t = 12.6 min, Methode Gem6

***N*-(4-Acetylphenyl)-2-naphth-1-ylpropanamid (87)**

Struktur



Laborkürzel

AWNEM7d

Summenformel

C₂₁H₁₉NO₂

Molare Masse

318.38

Vorschrift Allgemeine Vorschrift C, Lösungsmittel 2 ml THF

80 mg (0.4 mmol) 2-Naphth-1-ylpropansäure (**83**)

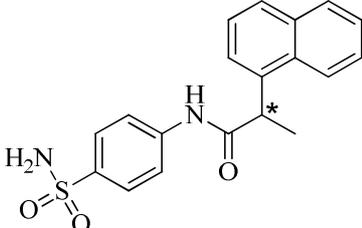
59.5 mg (0.44 mmol) *p*-Aminoacetophenon

Die Aufarbeitung erfolgt analog Verbindung **84**, jedoch wird NMM statt Isopropylamin zum Ausfällen von HOBt eingesetzt.

Ausbeute 42 mg (0.13 mmol, 33%) beiger Feststoff

R _f	0.23 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)
¹ H-NMR	400.13 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 1.79 (d, <i>J</i> =7.15 Hz, 3 H, CHCH ₃), 2.53 (s, 3 H, CH ₃ CO), 4.51 (q, <i>J</i> =7.07 Hz, 1 H, CHCH ₃), 7.13 (br. s., 1 H, NH), 7.36 - 7.48 (m, 2 H), 7.48 - 7.64 (m, 4 H), 7.80 - 7.97 (m, 4 H), 8.09 (d, <i>J</i> =8.16 Hz, 1 H)
¹³ C-NMR	100.61 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 17.86 (CHCH ₃), 26.36 (CH ₃ CO), 44.92 (CHCH ₃), 118.78 (2 C), 122.92, 125.26, 125.78, 126.21, 127.03, 128.70, 129.24, 129.57 (2 C), 131.36 (quartär), 132.84 (quartär), 134.21 (quartär), 136.14 (quartär), 142.07 (quartär), 172.99 (NHCO), 196.78 (CH ₃ CO)
FT-IR	λ ⁻¹ (cm ⁻¹) = 3243, 1677, 1590, 1528, 1405, 1345, 1300, 1253, 1179, 782
Smp.	148 °C
ESI-MS	m/z = 657.4 [2M+Na] ⁺ , 318.2 [M+H] ⁺ , 340.2 [M+Na] ⁺ , ber.: 317.14
LC	Reinheit 96.2% (280 nm), R _t = 12.4 min, Methode Gem6

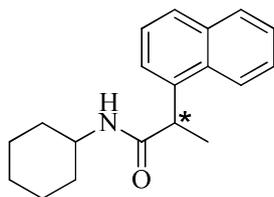
2-Naphth-1-yl-N-(4-sulfamoylphenyl)propanamid (88)

Struktur		Laborkürzel	AWNEM10
		Summenformel	C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₃ S
		Molare Masse	354.42

Vorschrift	Allgemeine Vorschrift C, Lösungsmittel 5 ml THF 80 mg (0.4 mmol) 2-Naphth-1-ylpropansäure (83) 76 mg (0.44 mmol) Sulfanilamid Zur Aufarbeitung wird das Filtrat i. Vak. von Lösemittel befreit und eine Säulenchromatographie durchgeführt (Pentan/Ethylacetat = 2:1 + 1% Ameisensäure). Aufgrund noch vorhandener Verunreinigungen wird der erhaltene Rückstand in 5 ml Methanol gelöst und durch Zugabe von 5 ml Wasser ausgefällt. Man filtriert ab und trocknet den Filtrerrückstand im evakuierten Exsikkator über konz. Schwefelsäure.
Ausbeute	27 mg (76 μmol, 19%) weißer Feststoff
R _f	0.8 (Ethylacetat)
¹ H-NMR	400.13 MHz, Acetone- <i>d</i> ₆ : δ (ppm) = 1.62 (d, <i>J</i> =7.07 Hz, 3 H, CHCH ₃), 4.68 (q, <i>J</i> =6.82 Hz, 1 H, CHCH ₃), 6.43 (br. s., 2 H, SO ₂ NH ₂), 7.42 - 7.64 (m, 4 H), 7.79 (s, 4 H), 7.83 (d, <i>J</i> =8.08 Hz, 1 H), 7.93 - 7.97 (m, 1 H), 8.22 (d, <i>J</i> =8.59 Hz, 1 H), 9.59 (br. s., 1 H, NH)
¹³ C-NMR	100.61 MHz, Acetone- <i>d</i> ₆ : δ (ppm) = 19.19, 44.14, 119.66, 119.75, 124.26, 125.29, 126.63, 126.69, 127.23, 128.03 (2 C), 128.50, 129.89, 132.33, 135.19 (quartär), 139.04 (quartär), 139.41 (quartär), 143.61 (quartär), 173.92 (CO)
FT-IR	λ ⁻¹ (cm ⁻¹) = 3369, 3268, 1665, 1592, 1513, 1400, 1329, 1158, 830, 779
Smp.	206 °C
ESI-MS	m/z = 353.2 [M-H] ⁻ , ber.: 354.10
LC	Reinheit 98.6% (254 nm), R _t = 9.4 min, Methode Gem6

N-Cyclohexyl-2-naphth-1-ylpropanamid (89)

Struktur



Laborkürzel AWNEM9B
 Summenformel C₁₉H₂₃NO
 Molare Masse 281.39

Vorschrift Allgemeine Vorschrift C, Lösungsmittel 2 ml THF
 80 mg (0.4 mmol) 2-Naphth-1-ylpropansäure (**83**)
 50.7 µl (44 mg, 0.44 mmol) Cyclohexylamin
 Die Aufarbeitung erfolgt analog Verbindung **84**.

Ausbeute 53 mg (0.19 mmol, 47%) beiger Feststoff

R_f 0.3 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 0.78 - 0.87 (m, 2 H, Pos. 2 & 6 Cyclohexyl), 1.14 - 1.36 (m, 4 H, Pos. 3 & 5 Cyclohexyl), 1.50 (m, 2 H, Pos. 4 Cyclohexyl), 1.64 - 1.78 (m, 2 H, Pos. 2 & 6 Cyclohexyl), 1.70 (d, *J*=7.15 Hz, 3 H, CHCH₃), 3.64 - 3.82 (m, 1 H, CHN), 4.28 (q, *J*=7.19 Hz, 1 H, CHCH₃), 5.08 (br. s., 1 H, NH), 7.40 - 7.58 (m, 4 H), 7.78 - 7.83 (m, 1 H), 7.86 - 7.92 (m, 1 H), 8.01 - 8.07 (m, 1 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 17.98 (CH₃), 24.63 (2 C, Pos. 3 & 5 Cyclohexyl), 25.39 (Pos. 4 Cyclohexyl), 32.66 (Pos. 2 Cyclohexyl), 32.70 (Pos. 6 Cyclohexyl), 43.90 (CHCH₃), 48.07 (CHN), 123.43, 124.88, 125.62, 125.88, 126.46, 128.05, 128.95, 131.54 (quartär), 134.02 (quartär), 137.30 (quartär), 173.67 (CO)

FT-IR λ⁻¹ (cm⁻¹) = 2925, 1633, 1545, 1448, 1349, 1231, 777, 740

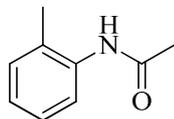
Smp. 151 °C

ESI-MS *m/z* = 282.3 [M+H]⁺, ber.: 281.18

LC Reinheit 94.8% (254 nm), R_t = 13.3 min, Methode Gem6

N-(2-Methylphenyl)acetamid (90)

Struktur



Laborkürzel AWS3_1
 Summenformel C₉H₁₁NO
 Molare Masse 149.19

Vorschrift Allgemeine Vorschrift Aa
 5.0 ml (5.0 g, 47 mmol) *o*-Toluidin
 4.3 ml (4.7 g, 60 mmol) Acetylchlorid

Ausbeute 3.863g (25.9mmol, 65%) weißer Feststoff

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 2.20 (s, 3 H CH₃CO), 2.26 (s, 3 H, CH₃), 7.03 (br. s., NH), 7.09 (t, *J*=7.40 Hz, 1 H, CH Pos. 4 Phenyl), 7.15 - 7.26 (m, 2 H, 2x CH Pos. 3 & 5 Phenyl), 7.75 (d, *J*=7.78 Hz, 1 H, CH Pos. 6 Phenyl)

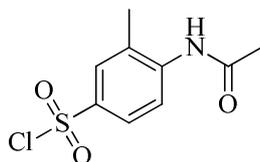
¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃; δ (ppm) = 17.74 (CH₃), 24.25 (CH₃CO), 123.45 (Pos. 6 Phenyl), 125.31 (Pos.

4 Phenyl), 126.73 (Pos. 5 Phenyl), 129.29 (quartär, Pos. 2 Phenyl), 130.45 (Pos. 3 Phenyl), 135.63 (quartär, Pos. 1 Phenyl), 168.28 (CO)

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur^[165].

4-(Acetylamino)-3-methylbenzolsulfonsäurechlorid (91)

Struktur



Laborkürzel	AWS3_2
Summenformel	C ₉ H ₁₀ ClNO ₃ S
Molare Masse	247.70

Vorschrift In einem mittels Eisbad gekühlten Rundkolben mit Stickstoffaufsatz werden unter Argon 3.5 g (23.5 mmol) *N*-(2-Methylphenyl)acetamid (**90**) vorgelegt und unter Rühren 6 ml (10.5 g, 90 mmol) Chlorsulfonsäure langsam zugegeben. Lebhaftige Gasentwicklung! Nach beendeter Zugabe wird unmittelbar auf den Stickstoffaufsatz eine Olive gesetzt, um den entstehenden Chlorwasserstoff in einer Waschflasche mit gesättigter Natriumcarbonatlösung zu binden. Man lässt auf Raumtemperatur auftauen und erwärmt anschließend im Ölbad auf 65 °C über 4 Stunden. Es wird nach Abkühlen auf 40 °C in eine Suspension aus 50 g gestoßenem Eis in 50 ml Diethylether gegossen, welche mittels Rührfisch gerührt wird. Die wässrige Phase wird abgetrennt, die etherische Phase über Natriumsulfat getrocknet und darauf das Lösemittel i. Vak. entfernt.

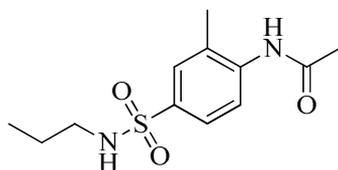
Ausbeute 2.73 g (11.0 mmol, 47%) hellrosa gefärbter, feinkristalliner Feststoff

¹H-NMR 400.13 MHz, DMSO-*d*₆: δ (ppm) = 1.99 - 2.10 (m, 3 H), 2.14 - 2.23 (m, 3 H), 7.26 - 7.69 (m, 3 H), 9.21 - 9.40 (m, 1 H)

Im ¹H-NMR-Spektrum sind die Signale nicht exakt zuweisbar, da die Verbindung vermutlich mit dem Restwasser des DMSO-*d*₆ reagierte (Wasserpeak verschwunden), sodass mehrere zusätzliche Signale der entstandenen Hydrolyseprodukte (Sulfonsäure, evtl. Sulfonsäureanhydrid) mit den ursprünglichen Signalen überlagern.

N-[2-Methyl-4-(propylsulfamoyl)phenyl]acetamid (92)

Struktur



Laborkürzel	AWS3_6
Summenformel	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O ₃ S
Molare Masse	270.35

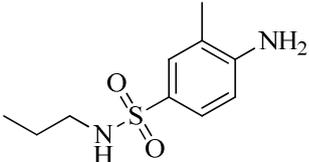
Vorschrift Zunächst wird *n*-Propylamin unter Normaldruck frisch destilliert, man isoliert bei einer Ölbadtemperatur von 60 °C eine bei etwa 50 °C übergehende, klare und ungefärbte Flüssigkeit. In der Vorlage bleiben dabei erhebliche Mengen nicht flüchtiges, gelbes Öl zurück.

In 10 ml abs. THF werden 0.800 g (3.23 mmol) 4-(Acetylamino)-3-methylbenzolsulfonsäurechlorid (**91**) suspendiert und unter Rühren 3 ml *n*-Propylamin zugegeben. Nach 5 Minuten hat sich die Suspension aufgeklärt und leicht gelblich verfärbt. Die Aufarbeitung erfolgt am nächsten Tag, hierzu wird das THF i. Vak. entfernt, zum Rückstand 30 ml 10%iger Citronensäurelösung gegeben

und 3x mit 30 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigte organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. von Lösemittel befreit.

Ausbeute	0.431 g (1.59 mmol, 49%) weißer Feststoff
R _f	0.1 (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1)
¹ H-NMR	400.13 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ : δ (ppm) = 0.78 (t, <i>J</i> =7.34 Hz, 3 H, <u>CH</u> ₃ CH ₂ CH ₂), 1.36 (sxt, <i>J</i> =7.28 Hz, 2 H, CH ₃ <u>CH</u> ₂ CH ₂), 2.10 (s, 3 H, CO <u>CH</u> ₃), 2.28 (s, 3 H, <u>CH</u> ₃ Phenyl), 2.67 (td, <i>J</i> =6.96, 6.15 Hz, 2 H, CH ₃ CH ₂ <u>CH</u> ₂), 7.43 (t, <i>J</i> =5.90 Hz, 1 H, <u>NH</u> SO ₂), 7.55 (dd, <i>J</i> =8.47, 2.20 Hz, 1 H, Pos. 5 Anilin), 7.60 (d, <i>J</i> =1.88 Hz, 1 H, Pos. 3 Anilin), 7.74 (d, <i>J</i> =8.41 Hz, 1 H, Pos. 6 Anilin), 9.43 (s, 1 H, <u>NH</u> CO)
¹³ C-NMR	100.61 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ : δ (ppm) = 11.22 (<u>CH</u> ₃ CH ₂ CH ₂), 18.00 (<u>CH</u> ₃ Phenyl), 22.47 (CH ₃ <u>CH</u> ₂ CH ₂), 23.57 (CO <u>CH</u> ₃), 44.44 (CH ₃ CH ₂ <u>CH</u> ₂), 124.09 (Pos. 6 Anilin), 124.56 (Pos. 5 Anilin), 128.48 (Pos. 3 Anilin), 131.21 (quartär, Pos. 2 Anilin), 136.06 (quartär, Pos. 4 Anilin), 140.16 (quartär, Pos. 1 Anilin), 168.85 (<u>C</u> ONH)

4-Amino-3-methyl-*N*-propylbenzolsulfonamid (93)

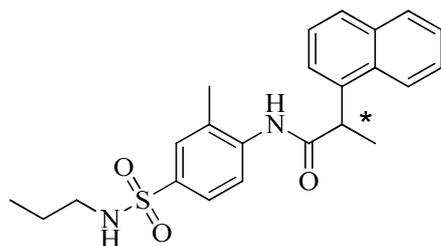
Struktur		Laborkürzel	AWS3_7
		Summenformel	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂ S
		Molare Masse	228.31

Vorschrift Zu 50 ml 15%iger Salzsäure werden 0.431 g (1.59 mmol) *N*-[2-Methyl-4-(propylsulfamoyl)phenyl]acetamid (**92**) gegeben und über 3 Stunden zum Reflux erhitzt. Reaktionskontrolle mittels DC zeigt vollständige Umsetzung an. Die Neutralisation des Ansatzes erfolgt durch portionsweise Zugabe von Natriumhydrogencarbonat, dann wird 3x mit 30 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen trocknet man über Natriumsulfat und entfernt das Lösemittel am Rotationsverdampfer. Der erhaltene Rückstand ist zunächst ein hellbraunes Öl, das nach einigen Tagen bei Raumtemperatur im Kolben unter Argon kristallin erstarrt.

Ausbeute	344.6 mg (1.509 mmol, 96%) hellbrauner Feststoff
R _f	0.33 (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1)
¹ H-NMR	400.13 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 0.88 (t, <i>J</i> =7.40 Hz, 3 H, <u>CH</u> ₃ CH ₂ CH ₂), 1.43 - 1.52 (m, 2 H, CH ₃ <u>CH</u> ₂ CH ₂), 2.19 (s, 3 H, <u>CH</u> ₃ Phenyl), 2.84 - 2.91 (m, 2 H, CH ₃ CH ₂ <u>CH</u> ₂), 4.06 (br. s., 2 H, <u>NH</u> 2), 4.30 (t, <i>J</i> =5.96 Hz, 1 H, <u>NH</u> SO ₂), 6.68 (d, <i>J</i> =8.16 Hz, 1 H, Pos. 5 Benzolsulfonamid), 7.50 - 7.56 (m, 2 H, Pos. 2 & 6 Benzolsulfonamid)
¹³ C-NMR	100.61 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 11.14 (<u>CH</u> ₃ CH ₂ CH ₂), 17.21 (<u>CH</u> ₃ Phenyl), 22.91 (CH ₃ <u>CH</u> ₂ CH ₂), 44.90 (CH ₃ CH ₂ <u>CH</u> ₂), 113.85 (Pos. 5 Benzolsulfonamid), 121.71 (quartär, Pos. 3 Benzolsulfonamid), 126.88 (Pos. 6 Benzolsulfonamid), 128.01 (quartär, Pos. 1 Benzolsulfonamid), 129.60 (Pos. 2 Benzolsulfonamid), 148.71 (quartär, Pos. 4 Benzolsulfonamid)

***N*-(2-Methyl-4-(*N*-propylsulfamoyl)phenyl)-2-(naphth-1-yl)propanamid (94)**

Struktur



Laborkürzel AWS3_8
 Summenformel C₂₃H₂₆N₂O₃S
 Molare Masse 410.53

Vorschrift Zu 100 mg (0.438 mmol) 4-Amino-3-methyl-*N*-propylbenzolsulfonamid (**93**) werden 87.7 mg (0.438 mmol) 2-Naphth-1-ylpropanensäure eingewogen, 5 ml Ethylacetat sowie 700 mg einer 50%igen Lösung (1.1 mmol) PPA zugefügt und unter Rühren 609 µl (4.38 mmol) Triethylamin zugetropft. Nach 5 Tagen wird mit 20 ml Ethylacetat verdünnt und 2x mit 10 ml halbgesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung, dann mit 10 ml 0.1 M Salzsäure und schließlich mit 10 ml gesättigter Natriumchloridlösung ausgeschüttelt. Nach Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat entfernt man das Lösemittel i. Vak. und reinigt den erhaltenen Rückstand mittels SC (169 mg Rohprodukt, Gradient Cyclohexan/Ethylacetat = 9:1 nach 3:1).

Ausbeute 72 mg (0.175 mmol, 40%) weißer Feststoff

R_f 0.63 (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 0.82 (t, *J*=7.40 Hz, 3 H, CH₃CH₂CH₂), 1.35 - 1.48 (m, 2 H, CH₃CH₂CH₂), 1.49 (s, 3 H, CH₃ Phenyl), 1.84 (d, *J*=7.28 Hz, 3 H, CHCH₃), 2.78 (q, *J*=6.99 Hz, 2 H, CH₃CH₂CH₂), 4.56 (q, *J*=7.07 Hz, 1 H, CHCH₃), 4.76 (t, *J*=6.02 Hz, 1 H, CH₂NH₂SO₂), 7.08 (br. s., 1 H, NHCO), 7.38 - 7.66 (m, 6 H), 7.81 - 7.96 (m, 2 H), 8.10 (dd, *J*=14.62, 7.84 Hz, 2 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 10.99 (CH₃CH₂CH₂), 16.48 (CH₃ Phenyl), 17.35 (COCHCH₃), 22.78 (CH₃CH₂CH₂), 44.72 (COCHCH₃), 44.80 (CH₃CH₂CH₂), 120.98 (Pos. 6 Anilin), 122.99, 125.14, 125.64, 125.81, 126.22, 127.03 (Pos. 3 Anilin), 127.66 (quartär, Pos. 2 Anilin), 128.74, 128.77, 129.15, 131.40 (quartär), 134.08 (quartär), 134.76 (quartär), 135.88 (quartär), 139.47 (quartär, Pos. 1 Anilin), 173.00 (CONH)

FT-IR λ⁻¹ (cm⁻¹) = 3273, 2967, 1668, 1579, 1510, 1319, 1255, 1153, 1125, 778

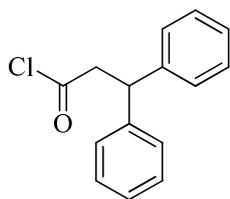
Smp. 143 °C

ESI-MS *m/z* = 409.3 [M-H]⁻, ber.: 410.17

LC Reinheit 97.8% (254 nm), R_t = 12.5 min, Methode Gem6

3,3-Diphenylpropansäurechlorid (95)

Struktur



Laborkürzel AWS4_13

Summenformel C₁₅H₁₃ClO

Molare Masse 244.72

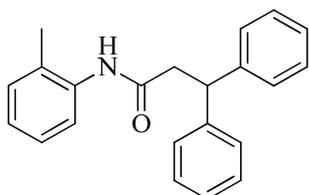
Vorschrift In 50 ml Dichlormethan werden 5.0 g (22.1 mmol) 3,3-Diphenylpropionsäure gelöst und in einen Tropftrichter mit Druckausgleich überführt, der auf einem unter Argon stehenden Dreihalskolben mit Rückflusskühler angebracht wird. Im Dreihalskolben legt man 2.626 g (22.1 mmol) Thionylchlorid vor, gibt einen Tropfen DMF zu und lässt unter Rühren die Eduktlösung eintropfen. Nach beendeter Zugabe heizt man im Ölbad 4 Stunden unter Rückfluss. Dann wird der Rückflusskühler auf dem Tropftrichter angebracht und der Dreihalskolben wird mittels Glasstopfen verschlossen. Unter erhöhter Ölbadtemperatur destilliert man so das Dichlormethan ab und fängt es im Tropftrichter auf.

Man erhält eine in der Hitze weiß-cremige Substanz. Zur besseren Handhabung wird mit exakt 30 ml abs. THF versetzt, wobei das Säurechlorid jedoch nicht vollständig in Lösung geht, sondern eine weiße Suspension bildet. Diese Suspension wird, jeweils frisch aufgeschüttelt, unmittelbar in die Folgeansätze pipettiert.

Berechnete Konzentration der Suspension: 0.74 M 3,3-Diphenylpropansäurechlorid.

N-(2-Methylphenyl)-3,3-diphenylpropanamid (96)

Struktur



Laborkürzel AWS4_14A

Summenformel C₂₂H₂₁NO

Molare Masse 315.41

Vorschrift Allgemeine Vorschrift Ab

3.3 ml (2.44 mmol) einer Suspension von 3,3-Diphenylpropansäurechlorid in THF (0.74 M) (95)

200 µl (200 mg, 1.87 mmol) *o*-Toluidin

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Pentan/Ethylacetat = 2:1) unter Zusatz von 1% Isopropylamin aufgereinigt.

Ausbeute 484 mg (1.53 mmol, 82%) weißer Feststoff

R_f 0.68 (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1)

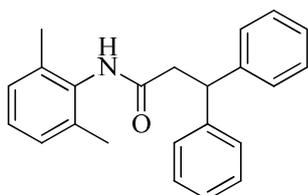
¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.87 (s, 3 H, CH₃), 3.14 (d, J=7.78 Hz, 2 H, CH₂CH), 4.65 (t, J=7.78 Hz, 1 H, CHCH₂), 6.74 (br. s., 1 H, NH), 7.00 - 7.35 (m, 13 H), 7.58 (d, J=7.91 Hz, 1 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 17.25 (CH₃), 44.24 (CH₂), 47.70 (CH), 123.50, 125.30, 126.54, 126.72 (2 C), 127.74 (4 C), 128.74 (4 C), 129.53 (quartär), 130.31, 135.33 (quartär), 143.47 (quartär, 2 C), 169.43 (CO)

FT-IR	λ^{-1} (cm ⁻¹) = 3227, 3026, 1643, 1531, 1490, 1453, 1268, 743, 696
Smp.	155 °C
ESI-MS	m/z = 316.3 [M+H] ⁺ , ber.: 315.16
LC	Reinheit 94.7% (254 nm), R _t = 12.5 min, Methode Gem6

N-(2,6-Dimethylphenyl)-3,3-diphenylpropanamid (97)

Struktur



Laborkürzel	AWS4_15
Summenformel	C ₂₃ H ₂₃ NO
Molare Masse	329.43

Vorschrift Allgemeine Vorschrift Ab

3.3 ml (2.44 mmol) einer Suspension von 3,3-Diphenylpropansäurechlorid in THF (0.74 M) (**95**)

173 µl (169 mg, 1.87 mmol) 2,6-Dimethylanilin

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Pentan/Ethylacetat = 3:1) unter Zusatz von 1% Isopropylamin aufgereinigt.

Ausbeute 325 mg (0.99 mmol, 53%) weißer Feststoff

R_f 0.38 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.90 (s, 6 H, 2x CH₃), 3.16 (d, J=7.91 Hz, 2 H, CH₂CH), 4.68 (t, J=7.97 Hz, 1 H, CHCH₂), 6.55 - 6.76 (m, 1 H, NH), 6.95 - 7.37 (m, 13 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 18.02 (2 C, 2x CH₃), 43.17 (CH₂), 47.54 (CH), 126.64 (2 C), 127.26, 127.82 (4 C), 128.02 (2 C), 128.68 (4 C), 133.62 (quartär), 135.41 (quartär, 2 C), 143.53 (quartär, 2 C), 169.30 (CO)

FT-IR λ^{-1} (cm⁻¹) = 3236, 3031, 1652, 1529, 1473, 1264, 770, 745, 701

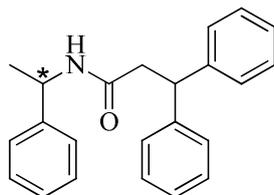
Smp. 188 °C

ESI-MS m/z = 330.3 [M+H]⁺, ber.: 329.18

LC Reinheit 98,0% (254 nm), R_t = 12.9 min, Methode Gem6

3,3-Diphenyl-N-(1-phenylethyl)propanamid (98)

Struktur



Laborkürzel	AWS4_17
Summenformel	C ₂₃ H ₂₃ NO
Molare Masse	329.43

Vorschrift Allgemeine Vorschrift Ab

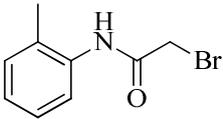
3.3 ml (2.44 mmol) einer Suspension von 3,3-Diphenylpropansäurechlorid in THF (0.74 M) (**95**)

179 µl (170 mg, 1.87 mmol) 1-Phenylethanamin

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Pentan/Ethylacetat = 3:1) unter Zusatz von 1% Isopropylamin aufgereinigt.

Ausbeute	410 mg (1.24 mmol, 67%) weißer Feststoff
R _f	0.31 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)
¹ H-NMR	400.13 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 1.27 (d, <i>J</i> =6.90 Hz, 3 H, <u>CH</u> ₃ CH), 2.91 (d, <i>J</i> =7.91 Hz, 2 H, <u>CH</u> ₂ CH), 4.57 (t, <i>J</i> =7.91 Hz, 1 H, <u>CH</u> CH ₂), 4.91 - 5.11 (m, 1 H, NH <u>CH</u> CH ₃), 5.41 (d, <i>J</i> =7.78 Hz, 1 H, <u>NH</u>), 6.92 - 7.07 (m, 2 H), 7.18 - 7.33 (m, 13 H)
¹³ C-NMR	100.61 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 21.28 (<u>CH</u> ₃), 43.66 (<u>CH</u> ₂), 47.66 (<u>CH</u>), 48.41 (<u>NCH</u> CH ₃), 125.99 (2 C), 126.55, 126.57, 127.13, 127.76 (2 C), 127.78 (2 C), 128.50 (2 C), 128.62 (2 C), 128.63 (2 C), 142.77 (quartär), 143.49 (quartär), 143.67 (quartär), 170.05 (<u>CO</u>)
FT-IR	λ ⁻¹ (cm ⁻¹) = 3263, 3029, 1639, 1554, 1491, 1449, 1375, 750, 699
Smp.	128 °C
ESI-MS	<i>m/z</i> = 330.3 [M+H] ⁺ , 681.5 [2M+Na] ⁺ , ber.: 329.18
LC	Reinheit 95.7% (215 nm), R _t = 13.1 min, Methode Gem6

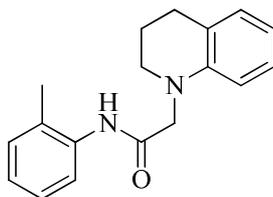
2-Brom-*N*-(2-methylphenyl)acetamid (99)

Struktur		Laborkürzel	AWS4_5
		Summenformel	C ₉ H ₁₀ BrNO
		Molare Masse	228.09
Vorschrift	Allgemeine Vorschrift Aa 1 ml (2.31 g, 11.4 mmol) 2-Bromessigsäurebromid 1 ml (1 g, 9.3 mmol) <i>o</i> -Toluidin		
Ausbeute	1.797 g (7.88 mmol, 85%) blassgelber, voluminöser Feststoff		
R _f	0.57 (Petrolether/Ethylacetat = 3:1)		
¹ H-NMR	400.13 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 2.30 (s, 3 H, <u>CH</u> ₃), 4.06 (s, 2 H, <u>CH</u> ₂ Br), 7.06 - 7.33 (m, 3 H), 7.82 (d, <i>J</i> =8.08 Hz, 1 H), 8.16 (br. s., 1 H, <u>NH</u>)		
¹³ C-NMR	100.61 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 17.51 (<u>CH</u> ₃), 29.73 (<u>CH</u> ₂ Br), 122.52, 125.76, 126.80, 129.27 (quartär), 130.54, 134.83 (quartär), 163.37 (<u>CO</u>)		

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur^[167].

2-(3,4-Dihydrochinolin-1(2H)-yl)-N-(2-methylphenyl)acetamid (100)

Struktur



Laborkürzel AWS4_19

Summenformel C₁₈H₂₀N₂O

Molare Masse 280.36

Vorschrift Es werden 0.3 g (1.3 mmol) 2-Brom-N-(2-methylphenyl)acetamid (**99**) in 1 ml THF gelöst und 0.35 g (2.6 mmol) 1,2,3,4-Tetrahydrochinolin zugegeben. Nach zweistündigen, schwachen Refluxieren wird die überschüssige Base durch Zugabe von 1 ml TFA ausgefällt. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit 5 ml Ethylacetat nachgewaschen und verworfen. Das Filtrat wird mit 10 ml Ethylacetat verdünnt und 2x gegen 10 ml gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. von Lösemittel befreit. Der erhaltene Rückstand wird mittels SC (Cyclohexan/Ethylacetat = 4:1) aufgereinigt.

Ausbeute 190 mg (0.68 mmol, 52%) dunkelroter Feststoff

R_f 0.31 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 2.04 (s, 3 H, CH₃), 2.07 - 2.15 (m, 2 H, NCH₂CH₂CH₂), 2.88 (t, J=6.40 Hz, 2 H, NCH₂CH₂CH₂), 3.40 - 3.46 (m, 2 H, NCH₂CH₂CH₂), 3.95 (s, 2 H, COCH₂), 6.60 (d, J=8.28 Hz, 1 H), 6.76 (td, J=7.34, 1.13 Hz, 1 H), 7.00 - 7.16 (m, 4 H), 7.21 - 7.26 (m, 1 H), 8.04 (dd, J=8.16, 0.88 Hz, 1 H), 8.52 (br. s., 1 H, NH)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 17.22 (CH3), 22.93 (NCH₂CH₂CH₂), 27.66 (NCH₂CH₂CH₂), 51.55 (NCH₂CH₂CH₂), 58.38 (COCH₂), 112.48, 118.76, 121.71, 123.53 (quartär), 124.83, 126.90, 127.47, 127.80 (quartär), 129.51, 130.36, 135.30 (quartär), 144.75 (quartär), 168.18 (CO)

FT-IR λ⁻¹ (cm⁻¹) = 3352, 2925, 1685, 1604, 1583, 1493, 1451, 1327, 1303, 1237, 1193, 1114, 1039, 966, 767, 742

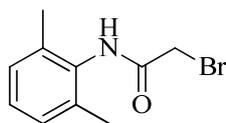
Smp. Zersetzung ab 130 °C

ESI-MS m/z = 281.2 [M+H]⁺, ber.: 280.16

LC Reinheit 99.4% (254 nm), R_t = 13.0 min, Methode Gem6

2-Brom-*N*-(2,6-dimethylphenyl)acetamid (101)

Struktur



Laborkürzel AWS4_6
 Summenformel C₁₀H₁₂BrNO
 Molare Masse 242.11

Vorschrift Allgemeine Vorschrift Aa

1 ml (2.31 g, 11.4 mmol) 2-Bromessigsäurebromid
 1.15 ml (1.13 g, 9.3 mmol) 2,6-Dimethylanilin

Ausbeute 1.81 g (7.5 mmol, 80%) farblose, nadelförmige Kristalle

R_f 0.49 (Petrolether/Ethylacetat = 3:1)

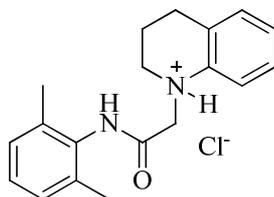
¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 2.22 (s, 6 H, 2x CH₃), 4.03 (s, 2 H, CH₂Br), 7.01 - 7.21 (m, 3 H), 7.83 (br. s., 1 H, NH)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 18.17 (2x CH₃), 28.93 (CH₂Br), 127.73 (Pos. 4 Anilin), 128.24 (2 C, Pos. 3 & 5 Anilin), 132.90 (quartär, Pos. 1 Anilin), 135.31 (quartär, 2 C, Pos. 2 & 6 Anilin), 164.11 (CO)

Das ¹H-NMR-Spektrum entspricht der Literatur^[168].

2-(3,4-Dihydrochinolin-1(2*H*)-yl)-*N*-(2,6-dimethylphenyl)acetamid Hydrochlorid (102)

Struktur



Laborkürzel AWS4_20
 Summenformel C₁₉H₂₃ClN₂O
 Molare Masse 330.85

Vorschrift Die Reaktion wird analog Verbindung **100** durchgeführt.

238 mg (0.98 mmol) 2-Brom-*N*-(2,6-dimethylphenyl)acetamid (**101**)
 262 mg (1.97 mmol) 1,2,3,4-Tetrahydrochinolin

Nach SC wird das Produkt als viskoser Rückstand erhalten. Man löst in Methanol, setzt 1 ml methanolische HCl (4 M) zu und erhält nach Entfernen des Lösemittels i. Vak. das Produkt als sein Tetrahydrochinolinium-Salz.

Ausbeute 121 mg (0.37 mmol, 37%) roter Feststoff

R_f (Base) 0.23 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, DMSO-*d*₆: δ (ppm) = 1.88 - 2.00 (m, 2 H, NCH₂CH₂CH₂), 2.11 (s, 6 H, 2x CH₃), 2.71 (t, *J*=6.27 Hz, 2 H, NCH₂CH₂CH₂), 3.40 - 3.47 (m, 2 H, NCH₂CH₂CH₂), 3.99 - 4.06 (m, 2 H, COCH₂, Rotationsisomerie), 6.50 - 6.57 (m, 1 H), 6.85 - 7.13 (m, 6 H), 9.16 - 9.36 (m, 1 H, NH, Rotationsisomerie)

¹³C-NMR 100.61 MHz, DMSO-*d*₆: δ (ppm) = 18.20 (CH₃), 18.22 (CH₃), 21.22 (NCH₂CH₂CH₂), 21.63 (NCH₂CH₂CH₂, Rotationsisomer), 27.18 (NCH₂CH₂CH₂), 27.41 (NCH₂CH₂CH₂, Rotationsisomer), 50.25 (NCH₂CH₂CH₂), 50.47 (NCH₂CH₂CH₂, Rotationsisomer), 54.58 (COCH₂), 54.95 (COCH₂, Rotationsisomer), 106.75 (quartär), 110.75, 112.47, 116.16, 122.13 (quartär), 122.43 (quartär),

125.05 (quartär), 126.47, 126.51, 126.69, 127.63, 127.64, 127.90, 128.76, 128.98, 130.80, 134.91 (quartär), 134.98 (quartär), 135.35 (quartär), 135.36 (quartär), 144.54 (quartär), 145.20 (quartär), 168.16 (CO), 168.61 (CO, Rotationsisomer)

FT-IR λ^{-1} (cm⁻¹) = 2958, 1682, 1591, 1528, 1471, 1376, 1230, 764, 711

Smp Zersetzung ab 130 °C

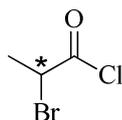
ESI-MS m/z = 295.3 [M+H]⁺, ber.: 294.17

LC Reinheit 91.6% (300 nm), R_t = 12.8 min, Methode Gem6

Das Hydrochlorid **102** zeigt im ¹³C-NMR-Spektrum nahezu vollständig verdoppelten Signalsatz (34 statt 19 Kohlenstoffkerne). Die Protonierung am basischen Stickstoff kann zwar zu einem auf der NMR-Zeitskala beobachtbaren Asymmetriezentrum führen, jedoch nur wenn dadurch Diastereoisomere entstehen. In diesem ansonsten achiralen Molekül kann dieser Effekt nicht Ursache des beobachteten doppelten Signalsatzes sein. Vermutlich führt eine Rotationsisomerie zu den zusätzlichen Signalen, eingeschränkte Drehbarkeit ist im gesamten Acetamid-Spacer wegen der sterisch anspruchsvollen Dimethylphenyl- und Tetrahydrochinolin-Gruppe denkbar.

2-Brompropansäurechlorid (103)

Struktur



Laborkürzel AWS4_22

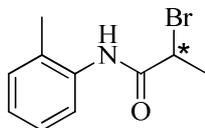
Summenformel C₃H₄BrClO

Molare Masse 171.42

Vorschrift In einen Rundkolben werden unter Argon 5.00 g (32.7 mmol) 2-Brompropionsäure, 2.5 ml (4.1 g, 34 mmol) Thionylchlorid und ein Tropfen DMF gegeben. Es setzt geringfügige Gas- und deutliche Wärmeentwicklung ein. Nach 30 Minuten erhitzt man für 10 Minuten zum Sieden. Die klare, leicht gelbliche Lösung wird ohne Aufarbeitung weiterverwendet und den Folgeansätzen zugegeben.

2-Brom-N-(2-methylphenyl)propanamid (104)

Struktur



Laborkürzel AWS4_23

Summenformel C₁₀H₁₂BrNO

Molare Masse 242.11

Vorschrift Allgemeine Vorschrift Aa

1.0 g (5.8 mmol) 2-Brompropansäurechlorid

0.624 g (5.83 mmol) *o*-Toluidin

Der erhaltene Feststoff wird aus Cyclohexan/Ethanol = 4:1 umkristallisiert.

Ausbeute 768 mg (3.17 mmol, 55%) beiger Feststoff

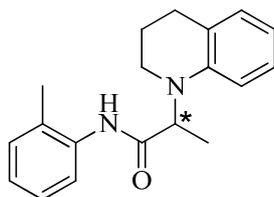
R_f 0.59 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 2.01 (d, $J=7.03$ Hz, 3 H, CHCH₃), 2.32 (s, 3 H, CH₃ Anilin), 4.62 (q, $J=7.03$ Hz, 1 H, CHCH₃), 7.07 - 7.26 (m, 3 H), 7.84 (d, $J=8.03$ Hz, 1 H), 8.07 (br. s., 1 H, NH)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 17.59 (CH₃ Anilin), 23.41 (CHCH₃), 46.16 (CHCH₃), 122.46, 125.64, 126.86, 129.17 (quartär), 130.55, 135.05 (quartär), 167.19 (CO)

2-(3,4-Dihydrochinolin-1(2H)-yl)-N-(2-methylphenyl)propanamid (105)

Struktur



Laborkürzel AWS4_25

Summenformel C₁₉H₂₂N₂O

Molare Masse 294.39

Vorschrift In 1 ml THF werden 0.20 g (0.83 mmol) 2-Brom-N-(2-methylphenyl)propanamid (**104**) gelöst, dann werden 104 µl (110 mg, 0.827 mmol) 1,2,3,4-Tetrahydrochinolin sowie 148 µl (107 mg, 0.828 mmol) Hünig-Base zugegeben. Man erhitzt im Ölbad auf 110 °C über 4 Stunden, das wenige THF wird, ohne in den Ansatz zurückzutropfen, dauerhaft in den Rückflusskühler getrieben. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur erhält man einen lösemittelfreien, schwarzen, viskosen Rückstand. Dieser wird in 10 ml Ethylacetat aufgenommen und 3x mit 5 ml 10%iger Citronensäurelösung gewaschen und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wird i. Vak. entfernt und der erhaltene Rückstand säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat = 4:1) aufgereinigt. Die anfangs beige Substanz hat sich nach einem Jahr (RT, Lichtzutritt) rötlich verfärbt.

Ausbeute 219 mg (0.744 mmol, 89%) beiger Feststoff

R_f 0.57 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.56 (d, *J*=7.15 Hz, 3 H, CHCH₃), 1.99 - 2.16 (m, 2 H, NCH₂CH₂CH₂), 2.06 (s, 3 H, CH₃ Anilin), 2.81 - 2.94 (m, 2 H, NCH₂CH₂CH₂), 3.26 - 3.40 (m, 2 H, NCH₂CH₂CH₂), 4.42 (q, *J*=7.11 Hz, 1 H, CHCH₃), 6.67 - 6.80 (m, 2 H), 6.98 - 7.17 (m, 4 H), 7.18 - 7.26 (m, 1 H), 8.03 (d, *J*=8.03 Hz, 1 H), 8.53 (br. s., 1 H, NH)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 11.97 (CHCH₃), 17.40 (CH₃ Anilin), 22.88 (NCH₂CH₂CH₂), 27.94 (NCH₂CH₂CH₂), 46.17 (NCH₂CH₂CH₂), 60.00 (CHCH₃), 113.14, 118.50, 121.55, 124.54 (quartär), 124.56, 126.86, 127.16, 127.66 (quartär), 129.80, 130.34, 135.71 (quartär), 144.05 (quartär), 170.98 (CO)

FT-IR λ⁻¹ (cm⁻¹) = 3244, 1652, 1587, 1526, 1455, 1370, 1287, 1253, 748

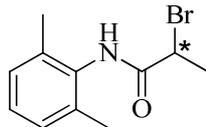
Smp 75 °C

ESI-MS *m/z* = 295.2 [M+H]⁺, ber.: 294.17

LC Reinheit 99.0% (254 nm), R_t = 13.9 min, Methode Gem6

2-Brom-N-(2,6-dimethylphenyl)propanamid (106)

Struktur



Laborkürzel AWS4_24

Summenformel C₁₁H₁₄BrNO

Molare Masse 256.14

Vorschrift Allgemeine Vorschrift Aa

1.02 g (ca. 6.0 mmol) 2-Brompropansäurechlorid

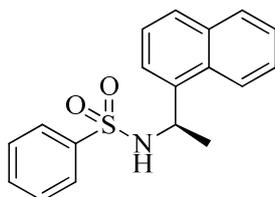
0.720 g (5.95 mmol) 2,6-Dimethylanilin

Der erhaltene Feststoff wird aus Cyclohexan/Ethanol = 4:1 umkristallisiert.

Ausbeute	488 mg (1.91 mmol, 32%) hellgraue, lange Kristallnadeln
R _f	0.44 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)
¹ H-NMR	400.13 MHz, CDCl ₃ ; δ (ppm) = 2.02 (d, <i>J</i> =7.03 Hz, 3 H, CHCH ₃), 2.25 (s, 6 H, 2x CH ₃), 4.62 (q, <i>J</i> =7.11 Hz, 1 H, CHCH ₃), 7.06 - 7.18 (m, 3 H), 7.65 (br. s., 1 H, NH)

N-[(1R)-1-Naphth-1-ylethyl]benzolsulfonamid (107)

Struktur

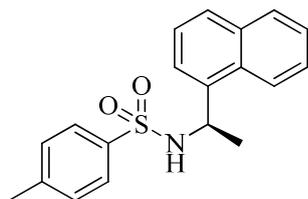


Laborkürzel	AWSA3
Summenformel	C ₁₈ H ₁₇ NO ₂ S
Molare Masse	311.40

Vorschrift	In 5 ml Ethylacetat werden 100 µl (78 mg, 0.77 mmol) Triethylamin und 50 µl (53.4 mg, 0.312 mmol) (1R)-1-Naphth-1-ylethanamin vorgelegt. Unter Rühren pipettiert man 39.8 µL (55.1 mg, 0.312 mmol) Benzolsulfonsäurechlorid hinzu, wobei sich nach 2 Minuten eine Trübung einstellt. Nach 3 Stunden wird zur Aufarbeitung mit weiteren 5 ml Ethylacetat verdünnt, anschließend 4x mit 5 ml 10% Kaliumhydrogensulfatlösung gewaschen und daraufhin die organische Phase mit Druckluft abgeblasen. Der erhaltene Rückstand wird aus Methanol/Wasser/Ameisensäure = 90:9:1 umkristallisiert und anschließend im evakuierten Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet.
Ausbeute	63 mg (0.20 mmol, 65%) beiger Feststoff
R _f	0.32 (Ethylacetat/Cyclohexan = 1:3)
¹ H-NMR	400.13 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ ; δ (ppm) = 1.33 (d, <i>J</i> =6.90 Hz, 3 H, CHCH ₃), 5.13 - 5.25 (m, 1 H, CHCH ₃), 7.32 - 7.55 (m, 7 H), 7.64 - 7.71 (m, 2 H), 7.74 (d, <i>J</i> =8.16 Hz, 1 H), 7.85 - 7.92 (m, 1 H), 8.02 - 8.09 (m, 1 H), 8.40 (d, <i>J</i> =7.91 Hz, 1 H, SO ₂ NH)
¹³ C-NMR	100.61 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ ; δ (ppm) = 22.95 (CHCH ₃), 48.95 (CHCH ₃), 122.66, 123.35, 125.24, 125.47, 126.12, 126.21 (2 C), 127.28, 128.59, 128.78 (2 C), 129.58 (quartär), 131.99 (quartär), 133.17 (quartär), 139.01 (quartär), 141.52 (quartär)
FT-IR	λ ⁻¹ (cm ⁻¹) = 3260, 1427, 1327, 1154, 1092, 1071, 1014, 952, 882, 801, 781, 760, 719, 688
Smp.	138 °C
ESI-MS	m/z = 334.1 [M+Na] ⁺ , ber.: 311.10
LC	Reinheit 99.1% (254 nm), R _t = 11.8 min, Methode Gem6

4-Methyl-N-[(1R)-1-naphth-1-ylethyl]benzolsulfonamid (108)

Struktur



Laborkürzel

AWSA4

Summenformel

C₁₉H₁₉NO₂S

Molare Masse

325.42

Vorschrift

100 µl (78 mg, 0.77 mmol) Triethylamin

50 µl (53.4 mg, 0.312 mmol) (1R)-1-Naphth-1-ylethanamin

59.5 mg (0.312 mmol) p-Toluolsulfonsäurechlorid

Synthese erfolgt analog dem vorherig beschriebenen Benzolsulfonsäurederivat. Zur Umkristallisation wird ein Gemisch aus Methanol/Aceton/Wasser = 4:4:2 verwendet.

Ausbeute

52 mg (0.16 mmol, 51%) hellbraune, kristalline Plättchen

R_f

0.35 (Ethylacetat/Cyclohexan = 1:3)

¹H-NMR

400.13 MHz, DMSO-*d*₆: δ (ppm) = 1.32 (d, *J*=6.90 Hz, 3 H, CHCH₃), 2.32 (s, 3 H, Phenyl-CH₃), 5.14 (qd, *J*=7.15, 6.90 Hz, 1 H, CHCH₃), 7.21 (d, *J*=8.16 Hz, 2 H), 7.38 (t, *J*=7.65 Hz, 1 H), 7.45 - 7.54 (m, 3 H), 7.57 (d, *J*=8.28 Hz, 2 H), 7.76 (d, *J*=8.16 Hz, 1 H), 7.85 - 7.93 (m, 1 H), 8.00 - 8.08 (m, 1 H), 8.29 (d, *J*=7.91 Hz, 1 H, SO₂NH)

¹³C-NMR

100.61 MHz, DMSO-*d*₆: δ (ppm) = 20.86 (Tosyl-CH₃), 22.89 (CHCH₃), 48.93 (CHCH₃), 122.68, 123.39, 125.27, 125.44, 126.09, 126.31 (2 C, Pos. 2 & 6 Benzolsulfonamid), 127.22, 128.57, 129.21 (2 C, Pos. 3 & 5 Benzolsulfonamid), 129.60 (quartär), 133.20 (quartär), 138.66 (quartär), 139.15 (quartär), 142.17 (quartär, Pos. 4 Benzolsulfonamid)

FT-IR

λ⁻¹ (cm⁻¹) = 3289, 1422, 1319, 1153, 1092, 1065, 952, 779, 667

Smp.

141 °C

ESI-MS

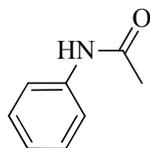
m/z = 324.1 [M-H]⁻, 348.2 [M+Na]⁺, ber.: 325.11

LC

Reinheit 99.3% (254 nm), R_t = 12.8 min, Methode Gem6

Acetanilid (109)

Struktur



Laborkürzel

AWS3_0

Summenformel

C₈H₉NO

Molare Masse

135.16

Vorschrift

Allgemeine Vorschrift Ab

Variation: Lösungsmittel 50 ml Ethylacetat, Trockenmittel Magnesiumsulfat

5.0 ml (5.1 g, 55 mmol) Anilin, frisch destilliert

7.8 ml (8.6 g, 110 mmol) Acetylchlorid

Ausbeute

7.35 g (54.4 mmol, 98.9%) weißer Feststoff

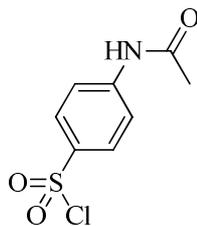
¹H-NMR

400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 2.17 (s, 3 H, CH₃), 7.11 (t, *J*=7.40 Hz, 1 H, Pos. 4 Phenyl), 7.32 (t, *J*=7.84 Hz, 2 H, Pos. 3 & 5 Phenyl), 7.51 (d, *J*=7.78 Hz, 3 H, Pos. 1 & 6 Phenyl, NH)

Das ¹H-NMR-Spektrum entspricht der Literatur^[165].

4-(Acetylamino)benzolsulfonsäurechlorid (**110**)

Struktur



Laborkürzel AWS3_00
Summenformel C₈H₈ClNO₃S
Molare Masse 233.67

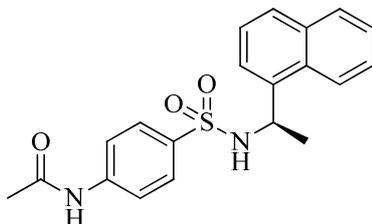
Vorschrift In einem mittels Eisbad gekühlten Kolben werden unter Argon 3.0 g (22 mmol) *N*-Phenylacetamid (**109**) vorgelegt und unter Rühren 6 ml (10.5 g, 90 mmol) Chlorsulfonsäure langsam zugegeben, entweichendes Gas wird in eine Waschflasche mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung geleitet. Nach 30 Minuten lässt man auf Raumtemperatur auftauen und heizt anschließend im Ölbad über 4 Stunden auf 65 °C. Nach Abkühlen auf ca. 40 °C wird in 100ml gestoßenes Eis gegossen, während mittels Glasstab gerührt und gebildete Klumpen zerteilt werden. Die Suspension wird zügig abfiltriert, das Filtrat verworfen und der Filtrerrückstand mit 50 ml Ethylacetat gelöst. Das so erhaltene organische Filtrat wird über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. von Lösemittel befreit.

Ausbeute 3.50 g (14.9 mmol, 68%) beiger Feststoff

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 2.27 (s, 3 H, CH₃), 7.48 (br. s., 1 H, NH), 7.75 - 7.81 (m, 2 H, Pos. 3 & 5 Benzolsulfonsäure), 7.98 - 8.03 (m, 2 H, Pos. 1 & 2 Benzolsulfonsäure)

N-(4-[(*1R*)-1-Naphth-1-ylethyl]sulfamoyl)phenyl)acetamid (**111**)

Struktur



Laborkürzel AWSA1
Summenformel C₂₀H₂₀N₂O₃S
Molare Masse 368.45

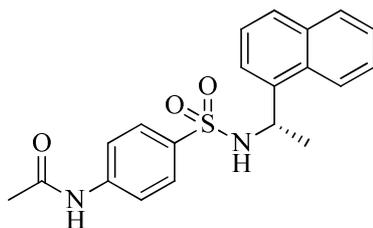
Vorschrift Zu 0.5 ml Dichlormethan werden 50 µl (53.4 mg, 0.312 mmol) (*1R*)-1-Naphth-1-ylethanamin sowie 48 µl (37.4 mg, 0.34 mmol) Triethylamin pipettiert und anschließend unter Rühren eine Lösung von 73.1 mg (0.31 mmol) 4-(Acetylamino)benzolsulfonsäurechlorid (**110**) in 1 ml THF zugetropft. Im Anschluss werden weitere 100 µl Triethylamin zugegeben, an der Eintropfstelle bilden sich dabei weiße Schlieren. Man lässt über Nacht bei RT rühren. Zur Aufarbeitung wird mit 10 ml Diethylether versetzt und die organische Phase 3x mit 2 ml 10%iger Citronensäurelösung extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. von Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird säulenchromatographisch aufgereinigt (Ethylacetat/Petrolether = 2:1). Man erhält einen weißen Feststoff, der nach Umkristallisation aus Methanol/Wasser und anschließender Trocknung im evakuierten Exsikkator über Schwefelsäure feinkristallin anfällt.

Ausbeute 66 mg (0.18 mmol, 57%) farblose Kristalle

R _f	0.16 (Ethylacetat/Cyclohexan = 1:1)
¹ H-NMR	400.13 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ : δ (ppm) = 1.31 (d, <i>J</i> =6.78 Hz, 3 H, CHCH ₃), 2.07 (s, 3 H, CH ₃ CO), 5.15 (qd, <i>J</i> =7.17, 6.96 Hz, 1 H, CHCH ₃), 7.39 (t, <i>J</i> =7.65 Hz, 1 H), 7.47 - 7.55 (m, 3 H), 7.62 (s, 4 H, Pos. 2-3-5-6 Benzolsulfonamid), 7.76 (d, <i>J</i> =8.03 Hz, 1 H), 7.87 - 7.92 (m, 1 H), 8.03 - 8.09 (m, 1 H), 8.24 (d, <i>J</i> =7.91 Hz, 1 H, SO ₂ NH), 10.22 (s, 1 H, CONH)
¹³ C-NMR	100.61 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ : δ (ppm) = 22.89 (CHCH ₃), 24.10 (CH ₃ CO), 48.89 (CHCH ₃), 118.27 (2 C, Pos. 2 & 6 Phenylacetamid), 122.71, 123.36, 125.28, 125.47, 126.12, 127.26, 127.42 (2 C, Pos. 3 & 5 Phenylacetamid), 128.60, 129.60 (quartär), 133.20 (quartär), 135.22 (quartär), 139.24 (quartär), 142.46 (quartär), 168.87 (CO)
FT-IR	λ ⁻¹ (cm ⁻¹) = 3207, 1681, 1587, 1528, 1434, 1399, 1313, 1257, 1146, 1079, 958, 799, 778
Smp.	208 °C
ESI-MS	<i>m/z</i> = 367.1 [M-H] ⁻ , 391.3 [M+Na] ⁺ , ber.: 368.12
LC	Reinheit > 99% (254 nm), R _t = 9.8 min, Methode Gem6

N-(4-[[*(1S)*-1-Naphth-1-ylethyl]sulfamoyl]phenyl)acetamid (**112**)

Struktur



Laborkürzel	AWSA2
Summenformel	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₃ S
Molare Masse	368.45

Vorschrift Die Reaktion erfolgt analog Verbindung **111**
 50 µl (53.4 mg, 0.312 mmol) (*1S*)-1-Naphth-1-ylethanamin
 73.1 mg (0.31 mmol) 4-(Acetylamino)benzolsulfonsäurechlorid (**110**)
 Es wurde versucht die Aufarbeitung zu verbessern. Es wird hierzu der Ansatz mit 5 ml Diethylether versetzt und mit 20%iger Natronlauge extrahiert. Das Sulfonamid hätte sich dabei als Salz in der Wasserphase lösen sollen. Nach Ansäuern der Wasserphase war jedoch kein Sulfonamid mit Diethylether extrahierbar. Daher wird die erste Etherphase wie bei Verbindung **111** aufgearbeitet. Der offensichtliche Ausbeuteverlust könnte durch die Extraktion mit Natronlauge entstanden sein, sodass die wässrige Phase entweder nach Ansäuern aufgrund der verhältnismäßig großen Menge Wasser das Sulfonamid nicht mehr an die Etherphase abgab, oder das Sulfonamid hydrolysierte.

Ausbeute 18 mg (0.049 mmol, 16%) farblose Kristalle

R_f 0.16 (Ethylacetat/Cyclohexan = 1:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, MeOD: δ (ppm) = 1.53 (d, *J*=7.03 Hz, 3 H, CHCH₃), 2.16 (s, 3 H, CH₃CO), 5.31 (q, *J*=6.82 Hz, 1 H, CHCH₃), 7.20 - 7.37 (m, 1 H), 7.39 - 7.58 (m, 7 H), 7.69 (d, *J*=8.28 Hz, 1 H), 7.80 - 7.85 (m, 1 H), 8.01 - 8.05 (m, 1 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, MeOD: δ (ppm) = 23.82 (CHCH₃), 24.11 (CH₃CO), 50.84 (CHCH₃), 120.07 (2 C, Pos. 2 & 6 Phenylacetamid), 123.83, 124.80, 126.43, 126.65, 127.27, 128.84, 128.97 (2 C, Pos. 3 & 5 Phenylacetamid), 129.94, 131.74 (quartär), 135.38 (quartär), 137.15 (quartär), 140.00 (quartär),

143.60 (quartär), 171.96 (CO)

FT-IR λ^{-1} (cm⁻¹) = 3205, 1669, 1588, 1527, 1435, 1314, 1257, 1146, 1080, 958, 799, 778, 727

Smp. 208 °C

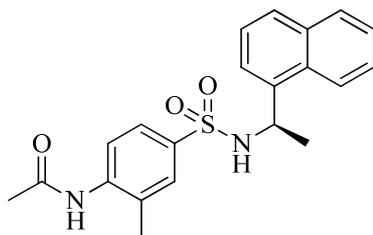
ESI-MS m/z = 367.1 [M-H]⁻, 391.3 [M+Na]⁺, ber.: 368.12

LC Reinheit 98.9% (254 nm), R_t = 9.8 min, Methode Gem6

Die Unterschiede zu Verbindung **111** (NMR-Spektren) resultieren vom unterschiedlichen Lösemittel.

N-(2-Methyl-4-[[**(1R)**-1-naphth-1-ylethyl]sulfonyl]phenyl)acetamid (**113**)

Struktur



Laborkürzel

AWSA7

Summenformel

C₂₁H₂₂N₂O₃S

Molare Masse

382.48

Vorschrift In 5 ml Ethylacetat werden 100 µl (78 mg, 0.77 mmol) Triethylamin und 50 µl (53.4 mg, 0.312 mmol) (1R)-1-Naphth-1-ylethanamin pipettiert. Unter Rühren gibt man 77.3 mg (0.312 mmol) 4-(Acetylamino)-3-methylbenzolsulfonsäurechlorid (**91**) hinzu, das sich im Ethylacetat sofort mit einem Film überzieht und zusammenklumpt. Der Ansatz wird 2,5 Stunden mit Ultraschall behandelt, wonach man eine milchige Suspension erhält. Zur Aufarbeitung verdünnt man mit weiteren 5 ml Ethylacetat und extrahiert 4x mit 5 ml 10%iger Kaliumhydrogensulfatlösung, dann mit 5 ml Wasser. Die organische Phase wird i. Vak. von Lösemittel befreit und der erhaltene Rückstand 2x aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute 36 mg (0.094 mmol, 30%) gelber Feststoff

R_f 0.18 (Ethylacetat/Cyclohexan/Ameisensäure = 1:1:0.01)

¹H-NMR 400.13 MHz, MeOD: δ (ppm) = 1.52 (d, J=6.90 Hz, 3 H, CHCH₃), 1.96 (s, 3 H, CH₃ Pos. 2 Phenylacetamid), 2.16 (s, 3 H, CH₃CO), 5.30 (q, J=6.90 Hz, 1 H, CHCH₃), 7.20 - 7.27 (m, 2 H), 7.36 (dd, J=7.22, 0.82 Hz, 1 H), 7.38 - 7.51 (m, 4 H), 7.64 (d, J=8.28 Hz, 1 H), 7.77 - 7.83 (m, 1 H), 8.01 (d, J=8.28 Hz, 1 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, MeOD: δ (ppm) = 18.02, 23.46, 23.93, 50.81, 123.79, 124.82, 125.52, 126.02, 126.45, 126.65, 127.31, 128.86, 129.98, 130.28, 131.79 (quartär), 132.90 (quartär), 135.30 (quartär), 138.93 (quartär), 139.89 (quartär), 140.80 (quartär), 172.09 (CO)

FT-IR λ^{-1} (cm⁻¹) = 3352, 3250, 2976, 1683, 1579, 1515, 1440, 1308, 1152, 1116, 782

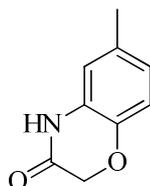
Smp. Zersetzung ab 170 °C

ESI-MS m/z = 381.2 [M-H]⁻, 383.2 [M+H]⁺, 405.3 [M+Na]⁺, ber.: 382.14

LC Reinheit 98.9% (254 nm), R_t = 9.6 min, Methode Gem6

6-Methyl-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-on (114)

Struktur



Laborkürzel AWDS10

Summenformel C₉H₉NO₂

Molare Masse 163.17

Vorschrift In 50 ml Ethylacetat werden 3.0 g (24.4 mmol) 2-Amino-4-methylphenol in der Siedehitze gelöst. Dazu werden nach Abkühlen auf 50 °C 4.4 ml (3.2 g, 25 mmol) DIPEA gegeben und 2.13 ml (4.92 g, 24.4 mmol) Bromoacetyl bromid zugetropft, anschließend wird 6 Stunden refluxiert. Man lässt abkühlen und filtriert die als Hydrobromid auskristallisierte Base ab. Das Filtrat wird i. Vak. von Lösemittel befreit und der erhaltene Rückstand in einem Gemisch aus Aceton/Wasser = 1:1 aufgenommen. Man gibt 2.1 g (25 mmol) Natriumhydrogencarbonat hinzu und refluxiert 4 Stunden. Beim Abkühlen kristallisiert das Produkt aus. Man filtriert ab, wäscht 4x mit 5 ml Wasser nach und trocknet den Filtrückstand im evakuierten Exsikkator über Schwefelsäure.

Ausbeute 3.362 g (20.62 mmol, 85%) hellbrauner, feinkristalliner Feststoff

R_f 0.68 (Ethylacetat)

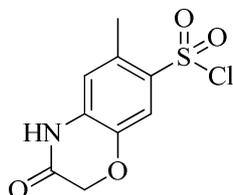
¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 2.29 (s, 3 H, CH₃), 4.60 (s, 2 H, CH₂O), 6.66 (d, *J*=1.13 Hz, 1 H), 6.76 - 6.80 (m, 1 H), 6.86 (d, *J*=8.28 Hz, 1 H), 9.08 (br. s., 1 H, NH)

ESI-MS *m/z* = 164.2 [M+H]⁺, ber.: 163.06

Das ¹H-NMR-Spektrum entspricht der Literatur^[169].

6-Methyl-3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazin-7-sulfonsäurechlorid (115)

Struktur



Laborkürzel AWS3_4

Summenformel C₉H₈ClNO₄S

Molare Masse 261.68

Vorschrift In einem auf -65 °C (Trockeneis/Isopropanol) abgekühlten Rundkolben werden unter Argon 0.80 g (4.9 mmol) 6-Methyl-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-on vorgelegt und 1.6 ml (2.8 g, 24 mmol) Chlorsulfonsäure langsam zugetropft. Man beobachtet leichte Gasentwicklung unter gleichzeitiger Schwarzfärbung des Ansatzes. Nach 30 Minuten wird auf Raumtemperatur aufgetaut und anschließend im Ölbad über 2 Stunden auf 60 °C erhitzt. Daraufhin lässt man bis ca. 40 °C abkühlen und gießt auf 25 g gestoßenes Eis, versetzt mit 50 ml Ethylacetat und rührt 30 Sekunden kräftig mittels Glasstab. Nach Überführen in einen Scheidetrichter werden ohne zu Schütteln die Wasserphase und die bräunliche Zwischenphase abgetrennt. Die schwarze organische Phase trocknet man über Natriumsulfat, filtriert und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum.

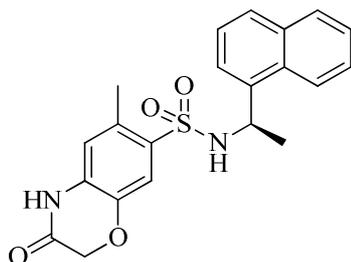
Ausbeute 1.143 g (4.37 mmol, 89%) schwarzer, kristalliner Feststoff

¹H-NMR 400.13 MHz, DMSO-*d*₆: δ (ppm) = 2.40 (s, 3 H, CH₃), 4.50 (s, 2 H, CH₂), 6.64 (s, 1 H), 7.25 (s, 1 H), 10.66 (s, 1 H)

In der NMR-Probe hat das Sulfonsäurechlorid mit dem Restwasser des DMSO-*d*₆ reagiert, da im ¹H-NMR-Spektrum das Restwassersignal fehlt. Daher ist das angegebene Spektrum möglicherweise das der Sulfonsäure.

6-Methyl-N-[(1R)-1-naphth-1-ylethyl]-3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazin-7-sulfonamid (116)

Struktur



Laborkürzel

AWSA5

Summenformel

C₂₁H₂₀N₂O₄S

Molare Masse

396.46

Vorschrift

100 µl (78 mg, 0.77 mmol) Triethylamin

50 µl (53.4 mg, 0.312 mmol) (1R)-1-Naphth-1-ylethanamin

150 mg (0.573 mmol) 6-Methyl-3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazin-7-sulfonsäurechlorid

Synthese erfolgt analog dem vorherig beschriebenen Benzolsulfonsäurederivat **113**, jedoch mussten dem Ansatz 2 ml DMF zugesetzt werden, da sich das schwarze Sulfonsäurechlorid nicht in Ethylacetat löste. Nachdem die organische Phase gewaschen und von Lösemittel befreit wurde (s. oben), wird der erhaltene Rückstand mittels SC aufgereinigt (Petrolether/Ethylacetat = 1:1).

Ausbeute

32 mg (0.081 mmol, 26%) hellbrauner Feststoff

R_f

0.31 (Ethylacetat/Cyclohexan = 1:1)

¹H-NMR

400.13 MHz, DMSO-*d*₆: δ (ppm) = 1.43 (d, *J*=6.90 Hz, 3 H, CHCH₃), 2.34 (s, 3 H, CH₃ Benzolsulfonamid), 4.34 (d, *J*=15.31 Hz, 1 H, OCHH), 4.50 (d, *J*=15.31 Hz, 1 H, OCHH), 5.12 (qd, *J*=7.34, 7.09 Hz, 1 H, CHCH₃), 6.49 (s, 1 H, Pos. 5 Benzoxazin), 7.02 (s, 1 H, Pos. 8 Benzoxazin), 7.36 (t, *J*=7.72 Hz, 1 H), 7.43 - 7.56 (m, 3 H), 7.72 (d, *J*=8.16 Hz, 1 H), 7.80 - 7.88 (m, 1 H), 7.98 - 8.04 (m, 1 H), 8.35 (d, *J*=8.28 Hz, 1 H, SO₂NH), 10.78 (s, 1 H, CONH)

¹³C-NMR

100.61 MHz, DMSO-*d*₆: δ (ppm) = 19.17 (CH₃ Benzoxazin), 23.10 (CHCH₃), 48.61 (CHCH₃), 66.48 (OCH₂), 116.42 (Pos. 8 Benzoxazin), 118.33 (Pos. 5 Benzoxazin), 122.56, 123.43, 125.13, 125.36, 125.97, 127.15, 128.40, 129.59 (quartär), 129.96 (quartär), 130.61 (quartär), 132.76 (quartär), 133.03 (quartär), 138.88 (quartär), 139.86 (quartär), 164.71 (CO)

FT-IR

λ⁻¹ (cm⁻¹) = 3270, 1694, 1597, 1500, 1389, 1290, 1145, 1018, 774

Smp.

Zersetzung ab 210 °C

ESI-MS

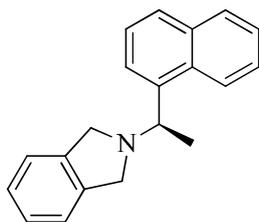
m/z = 395.2 [M-H]⁻, 419.2 [M+Na]⁺ ber.: 396.11

LC

Reinheit 94.4% (300 nm), R_t = 9.9 min, Methode Gem6

2-[(1*R*)-1-Naphth-1-ylethyl]-2,3-dihydro-1*H*-isoindol (117)

Struktur



Laborkürzel AWSU1b
 Summenformel C₂₀H₁₉N
 Molare Masse 273.37

Vorschrift Allgemeine Vorschrift F (Isoindolin-Synthese)

56 µl (60 mg, 0.35 mmol) (1*R*)-1-Naphth-1-ylethanamin

200 µl (145 mg, 1.44 mmol) Triethylamin

93 mg (0.35 mmol) 1,2-Bis(brommethyl)benzol

Die Säulenchromatographie erfolgt mit Fließmittel Petrolether/Ethylacetat = 4:1.

Ausbeute 85 mg (0.31 mmol, 89%) rötliches, viskoses Öl, nach 6 Monaten schwarz, laut LC-UV aber noch nicht merklich zersetzt (Lagerung bei RT und Lichtzutritt)

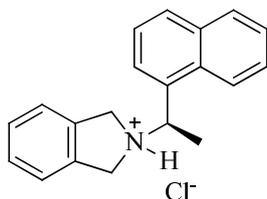
R_f 0.33 (Petrolether/Ethylacetat = 6:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.64 (d, *J*=6.53 Hz, 3 H, CHCH₃), 3.85 - 4.10 (m, 4 H, 2x CH₂), 4.46 (q, *J*=6.53 Hz, 1 H, CHCH₃), 7.13 - 7.22 (m, 4 H, CH Pos. 4-5-6-7 Isoindol), 7.45 - 7.53 (m, 3 H), 7.74 (d, *J*=7.03 Hz, 1 H), 7.79 (d, *J*=8.16 Hz, 1 H), 7.86 - 7.93 (m, 1 H), 8.49 - 8.62 (m, 1 H)

FT-IR λ⁻¹ (cm⁻¹) = 3046, 2971, 2763, 1680, 1595, 1509, 1463, 1369, 1325, 1183, 1137, 861, 801, 776, 741

2-[(1*R*)-1-Naphth-1-ylethyl]-2,3-dihydro-1*H*-isoindol Hydrochlorid (118)

Struktur



Laborkürzel AWSU1
 Summenformel C₂₀H₂₀ClN
 Molare Masse 309.83

Vorschrift 33 mg (0.12 mmol) Isoindolin **117** werden mit 1 ml methanolischer HCl (4 M) versetzt und i. Vak. von Lösemittel befreit.

Ausbeute 37 mg (0.12 mmol, 100%) farblos-kristalliner Feststoff

¹H-NMR 400.13 MHz, DMSO-*d*₆: δ (ppm) = 1.82 (d, *J*=6.53 Hz, 3 H, CHCH₃), 4.20 (ddd, *J*=33.63, 14.31, 7.53 Hz, 2 H, NCH₂ Isoindol), 5.01 (ddd, *J*=60.92, 13.68, 6.21 Hz, 2 H, NCH₂ Isoindol), 5.76 - 5.90 (m, 1 H, CHCH₃), 7.23 (d, *J*=7.40 Hz, 1 H, Pos. 4 bzw. 7 Isoindol), 7.30 (t, *J*=7.40 Hz, 1 H, Pos. 5 bzw. 6 Isoindol), 7.37 (t, *J*=7.40 Hz, 1 H, Pos. 5 bzw. 6 Isoindol), 7.46 (d, *J*=7.65 Hz, 1 H, Pos. 4 bzw. 7 Isoindol), 7.56 - 7.75 (m, 3 H, Pos. 3-6-7 Naphthyl), 8.02 - 8.08 (m, 2 H, Pos. 5 & 8 Naphthyl), 8.33 (d, *J*=7.15 Hz, 1 H, Pos. 2 Naphthyl), 8.39 (d, *J*=8.41 Hz, 1 H, Pos. 4 Naphthyl), 12.43 (br. s., 1 H, NH)

¹³C-NMR 100.61 MHz, DMSO-*d*₆: δ (ppm) = 19.92 (CHCH₃), 57.34 (CH₂N), 57.71 (CH₂N), 59.16 (CHCH₃), 122.52 (Pos. 4 bzw. 7 Isoindol), 122.70 (Pos. 4 Naphthyl), 122.89 (Pos. 4 bzw. 7 Isoindol), 125.50 (Pos. 2 Naphthyl), 125.77, 126.24, 127.09 (Pos. 3 Naphthyl), 128.22 (Pos. 5 bzw. 6 Isoindol),

128.42 (Pos. 5 bzw. 6 Isoindolin), 129.02 (Pos. 5 oder 8 Naphthyl), 129.33 (Pos. 5 oder 8 Naphthyl), 130.37 (quartär, Pos. 4a Naphthyl), 133.51 (quartär, Pos. 8a Naphthyl), 133.96 (quartär, Pos. 1 Naphthyl), 134.28 (quartär, Isoindol), 134.55 (quartär, Isoindol)

FT-IR λ^{-1} (cm⁻¹) = 2979, 2448, 2380, 1599, 1513, 1487, 1416, 1379, 1337, 1253, 1184, 1125, 1079, 1004, 795, 775, 741

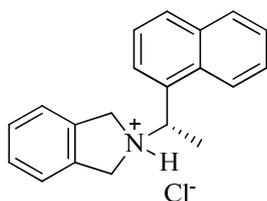
Smp. Zersetzung ab 240 °C

ESI-MS $m/z = 274.2$ [M+H]⁺, ber.: 273.15

LC Reinheit 94.3% (254 nm), R_t = 10.4 min, Methode Gem7

2-[(1S)-1-Naphth-1-ylethyl]-2,3-dihydro-1H-isoindol Hydrochlorid (119)

Struktur



Laborkürzel

AWSU1S

Summenformel

C₂₀H₂₀ClN

Molare Masse

309.83

Vorschrift

Allgemeine Vorschrift F (Isoindolin-Synthese)

115.5 µl (123.2 mg, 0.719 mmol) (1S)-1-Naphth-1-ylethanamin

200 µl (145 mg, 1.44 mmol) Triethylamin

190 mg (0.72 mmol) 1,2-Bis(brommethyl)benzol

Das nach der SC erhaltene rötliche Öl wird mit methanolischer HCl versetzt und i. Vak. von Lösemittel befreit. Man erhält einen bräunlich eingefärbten Feststoff. Nachdem NMR-Spektren und Chromatogramme nur geringfügige Verunreinigung zeigen, scheint die farbgebende Komponente in nur sehr geringer Menge anwesend zu sein.

Ausbeute

203 mg (0.655 mmol, 91%) brauner Feststoff

R_f (Base)

0.66 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1), R_f-Wert stark abhängig von aufgetragener Substanzmenge

¹H-NMR

400.13 MHz, DMSO-*d*₆: δ (ppm) = 1.81 (d, $J=6.65$ Hz, 3 H), 4.12 - 4.33 (m, 2 H), 5.02 (ddd, $J=56.62, 13.77, 6.27$ Hz, 2 H), 5.77 - 5.91 (m, 1 H), 7.19 - 7.27 (m, $J=7.40$ Hz, 1 H), 7.31 (t, $J=7.34$ Hz, 1 H), 7.38 (t, $J=7.53$ Hz, 1 H), 7.44 - 7.49 (m, $J=7.40$ Hz, 1 H), 7.59 - 7.71 (m, 3 H), 8.05 (d, $J=8.16$ Hz, 2 H), 8.20 - 8.29 (m, 1 H), 8.40 (d, $J=8.41$ Hz, 1 H), 12.04 (br. s., 1 H)

¹³C-NMR

100.61 MHz, DMSO-*d*₆: δ (ppm) = 19.92, 57.34, 57.71, 59.16, 122.52, 122.70, 122.89, 125.50, 125.77, 126.24, 127.09, 128.22, 128.42, 129.02, 129.33, 130.37 (quartär), 133.51 (quartär), 133.96 (quartär), 134.28 (quartär), 134.55 (quartär)

FT-IR

λ^{-1} (cm⁻¹) = 2871, 2548, 2459, 2381, 1599, 1513, 1487, 1449, 1414, 1380, 1337, 1253, 1184, 1124, 1079, 1024, 1003, 858, 796, 775, 741

Smp.

Zersetzung ab 236 °C

ESI-MS

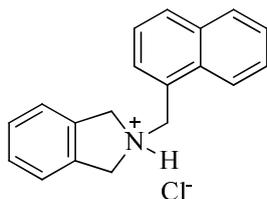
$m/z = 274.2$ [M+H]⁺, ber.: 273.15

LC

Reinheit 98.5% (254 nm), R_t = 10.3 min, Methode Gem7

2-(Naphth-1-ylmethyl)-2,3-dihydro-1H-isoindol Hydrochlorid (120)

Struktur



Laborkürzel

AWSU4

Summenformel

C₁₉H₁₈ClN

Molare Masse

295.81

Vorschrift

Die allgemeine Vorschrift F wird wie folgend beschrieben in abgewandelter Form durchgeführt:

In 5 ml Ethylacetat werden 132 mg (0.500 mmol) 1,2-Bis(brommethyl)benzol und 73 µl (79 mg, 0.50 mmol) 1-Naphthyl-1-ylmethanamin gelöst, 212 mg (2.00 mmol) Natriumcarbonat zugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Reaktionskontrolle mittels DC (Fließmittel Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1) lässt noch deutlich die Edukte erkennen (Amin mit R_f = 0, Startlinie), daher wird für 10 Minuten zum Sieden erhitzt. Zur Aufarbeitung wird mit 15 ml Ethylacetat verdünnt, 2x mit 10% Natriumcarbonatlösung und 1x mit gesättigter Natriumchloridlösung extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. von Lösemittel befreit. Man erhält ein schwach gelbes Öl, das im DC keine Verunreinigung erkennen lässt. Durch Zugabe von 2 ml methanolischer HCl (4 M) wird die Lösung allmählich dunkler, nach Abrotieren des Methanols erhält man das schwarzblau eingefärbte Hydrochlorid des Produkts.

Ausbeute

120 mg (0.406 mmol, 81%) schwarzblauer Feststoff

R_f (Base)

0.59 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)

¹H-NMR

400.13 MHz, DMSO-*d*₆: δ (ppm) = 4.54 - 4.78 (m, 4 H, 2x CH₂ Isoindol), 5.14 (d, *J*=5.52 Hz, 2 H, NCH₂-Naphthyl), 7.26 - 7.45 (m, 4 H, CH Pos. 4-5-6-7 Isoindol), 7.56 - 7.73 (m, 3 H), 7.99 - 8.13 (m, 3 H), 8.43 (d, *J*=8.28 Hz, 1 H), 11.88 (br. s., 1 H, NH)

¹³C-NMR

100.61 MHz, DMSO-*d*₆: δ (ppm) = 53.02 (CH₂-Naphthyl), 57.73 (2 C, 2x CH₂ Isoindol), 122.82 (2 C), 123.84, 125.45, 126.31, 126.97, 127.30 (quartär), 128.31 (2 C), 128.75, 130.11, 130.24, 131.48 (quartär), 133.44 (quartär), 134.37 (quartär, 2 C)

FT-IR

λ⁻¹ (cm⁻¹) = 3400, 3046, 2515, 2364, 2354, 1597, 1513, 1402, 1168, 1026, 777, 748

Smp.

Zersetzung ab 150 °C

ESI-MS

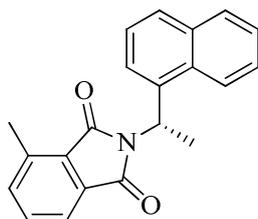
m/z = 260.1 [M+H]⁺, ber.: 259.14

LC

Reinheit 86.9% (254 nm), R_t = 2.6 min, Methode Gem3

4-Methyl-2-[(1S)-1-naphth-1-ylethyl]-1H-isoindol-1,3(2H)-dion (121)

Struktur



Laborkürzel AWSU9

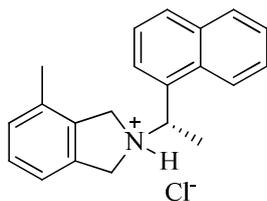
Summenformel $C_{21}H_{17}NO_2$

Molare Masse 315.37

- Vorschrift Die Synthese erfolgt zunächst nach Vorschrift von Oliveira et al.^[132]: (s. auch Kap. 3.9.2)
 In 10 ml Isopropanol werden 114 mg (0.703 mmol) 3-Methylphthalsäureanhydrid und 113 μ l (120 mg, 0.703 mmol) (1S)-1-Naphth-1-ylethanamin gelöst und zum Rückfluss erhitzt. Da nach 4 Stunden im DC keine weitere Substanz detektierbar ist, wird zum Binden von Reaktionswasser eine Spatelspitze Molsieb (gepulvert, Porengröße 0.4 nm) gegeben und über Nacht weiterrefluxiert. Am nächsten Tag wird das Lösungsmittel i. Vak entfernt und das Rohprodukt ¹H-NMR-spektrometrisch untersucht. Das Spektrum zeigt bei 5.06 und 5.23 ppm zwei Septetts, die auf eine Bildung von Isopropylestern mit dem 3-Methylphthalsäureanhydrid hinweisen. Anschließende Untersuchung mit LC-MS bestätigt dies und zeigt neben zwei trennbaren isomeren Monoisopropylestern auch zwei trennbare Monoamide. Die Imid-Synthese nach Vorschrift von Oliveira et al. konnte demnach nicht bestätigt werden. Die weitere Umsetzung geschieht daher wie folgt:
 Das Gemisch wird im Rundkolben in 10 ml Eisessig aufgenommen und mittels Heißluftfön die Essigsäure abgedampft. Dann werden erneut 1 - 2 ml Eisessig zugegeben und der Vorgang 2x wiederholt. Reaktionskontrolle mittels LC-MS zeigt das entstandene Imid und regeneriertes 3-Methylphthalsäureanhydrid an, Nebenreaktionen oder Zersetzung haben demnach nicht stattgefunden. Das Imid wird säulenchromatographisch isoliert (Petrolether/ Ethylacetat = 3:1).
- Ausbeute 60 mg (0.19 mmol, 27%, Ausbeuteverlust durch Siedeverzug), farblose Kristalle
- R_f 0.34 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)
- ¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 2.04 (d, $J=7.15$ Hz, 3 H, CHCH₃), 2.64 (s, 3 H, CH₃), 6.32 (q, $J=7.11$ Hz, 1 H, CHCH₃), 7.39 (d, $J=7.65$ Hz, 1 H), 7.43 - 7.59 (m, 4 H), 7.62 (d, $J=7.28$ Hz, 1 H), 7.78 - 7.91 (m, 2 H), 8.02 (d, $J=7.15$ Hz, 1 H), 8.22 (d, $J=8.66$ Hz, 1 H)
- ESI-MS m/z = 316.2 [M+H]⁺, 338.2 [M+Na]⁺, ber.: 315.13
- LC R_t = 17.9 min, Methode Gem5

4-Methyl-2-[(1S)-1-naphth-1-ylethyl]-2,3-dihydro-1H-isoindol Hydrochlorid (122)

Struktur



Laborkürzel AWSU17

Summenformel C₂₁H₂₂ClN

Molare Masse 323.86

Vorschrift Allgemeine Vorschrift G

60 mg (0.19 mmol) 4-Methyl-2-[(1S)-1-naphth-1-ylethyl]-1H-isoindol-1,3(2H)-dion (**121**)

30 mg (0.79 mmol) Lithiumaluminiumhydrid

Man überführt das nach der SC erhaltene klare Öl mit methanolischer HCl in sein Hydrochlorid.

Ausbeute 18 mg (56 µmol, 29%) beiger Feststoff

R_f (Base) 0.66 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1), abhängig von Auftragemenge, Tailing

¹H-NMR 400.13 MHz, MeOD: δ (ppm) = 1.96 (d, J=6.78 Hz, 3 H, CHCH₃), 2.21 (br. s., 3 H, CH₃), 4.22 - 5.16 (m, 4 H, 2x CH₂), 5.77 (q, J=6.69 Hz, 1 H, CHCH₃), 7.11 (br. s., 1 H), 7.16 (d, J=7.53 Hz, 1 H), 7.26 (t, J=7.53 Hz, 1 H), 7.58 - 7.65 (m, 1 H), 7.65 - 7.74 (m, 2 H), 7.94 - 7.99 (m, 1 H), 7.99 - 8.08 (m, 2 H), 8.29 (d, J=8.66 Hz, 1 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, MeOD: δ (ppm) = 18.78 (CH₃), 20.38 (CHCH₃), 58.48 (CH₂), 59.63 (CH₂), 61.48 (br. s., CHCH₃), 121.26, 123.17, 126.05, 126.97, 127.83, 128.93, 130.54, 130.59, 131.05, 131.48, 132.11 (quartär), 133.73 (quartär), 134.21 (quartär), 134.50 (quartär), 134.67 (quartär), 135.63 (quartär)

FT-IR λ⁻¹ (cm⁻¹) = 3048, 2980, 2457, 2377, 1917, 1599, 1514, 1454, 1415, 1380, 1330, 1251, 1119, 1070, 994, 942, 801, 774

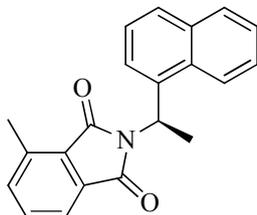
Smp. 247 °C (mit Zersetzung)

ESI-MS m/z = 288.1 [M+H]⁺, ber.: 287.17

LC Reinheit > 99% (280 nm), R_t = 11.5 min, Methode Gem7

4-Methyl-2-[(1R)-1-naphth-1-ylethyl]-1H-isoindol-1,3(2H)-dion (123)

Struktur



Laborkürzel AWSU18

Summenformel C₂₁H₁₇NO₂

Molare Masse 315.37

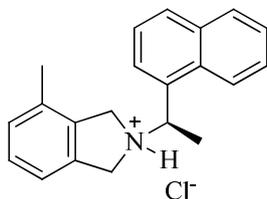
Vorschrift Es werden 130 mg (0.80 mmol) 3-Methylphthalsäureanhydrid und 136 mg (0.794 mmol) (1R)-1-Naphth-1-ylethanamin in einen 50 ml Rundkolben eingewogen und mittels Heißluftfön zusammengeschmolzen, dabei schlagen sich Tröpfchen an der Kolbenwand nieder und die Schmelze verfärbt sich von klar nach blassrot. Nach Erkalten auf Raumtemperatur werden die Tropfen mit 2 ml Essigsäure zurückgespült. Man verkocht die Essigsäure und macht eine erste Reaktionskontrolle mittels LC-MS, die Messung zeigt dabei noch die Masse 332.2 [M-H]⁻ der Amid-Zwischenstufe

mit freier Carboxylgruppe (ber.: 333.14) an. Man wiederholt daher dreimal den Vorgang der Zugabe und des Verkochens von Essigsäure. Die erkaltete blassrote Schmelze wird in 10 ml Ethylacetat aufgenommen und die organische Phase mit 10 ml Wasser, dann 10 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird das Lösemittel i. Vak. entfernt. Das erhaltene Rohprodukt bedarf keiner weiteren Aufreinigung.

Ausbeute	230 mg (0.73 mmol, 92%) glasartig erstarrter, durchsichtiger Feststoff
¹ H-NMR	400.13 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 2.09 (d, <i>J</i> =7.15 Hz, 3 H, CHCH ₃), 2.64 (s, 3 H, CH ₃), 6.38 (q, <i>J</i> =7.07 Hz, 1 H, CHCH ₃), 7.31 (d, <i>J</i> =7.65 Hz, 1 H), 7.40 - 7.53 (m, 2 H), 7.55 - 7.65 (m, 3 H), 7.86 (t, <i>J</i> =8.72 Hz, 2 H), 8.08 (d, <i>J</i> =7.15 Hz, 1 H), 8.30 (d, <i>J</i> =8.53 Hz, 1 H)
ESI-MS	<i>m/z</i> = 316.1 [M+H] ⁺ , 338.1 [M+Na] ⁺ , ber.: 315.13

4-Methyl-2-[(1*R*)-1-naphth-1-ylethyl]-2,3-dihydro-1*H*-isoindol Hydrochlorid (**124**)

Struktur



Laborkürzel	AWSU19
Summenformel	C ₂₁ H ₂₂ ClN
Molare Masse	323.86

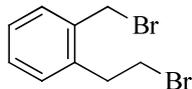
Vorschrift Allgemeine Vorschrift G
 230 mg (0.73 mmol) 4-Methyl-2-[(1*R*)-1-naphth-1-ylethyl]-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-dion (**123**)
 200 mg (5 mmol) Lithiumaluminiumhydrid
 Man überführt das nach der SC erhaltene klare Öl mit methanolischer HCl in sein Hydrochlorid.

Ausbeute	84 mg (0.17 mmol, 23%) beiger Feststoff
R _f (Base)	0.75 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1), abhängig von Auftragemenge, Tailing
¹ H-NMR	400.13 MHz, MeOD: δ (ppm) = 1.94 (d, <i>J</i> =6.65 Hz, 3 H 46%, CHCH ₃), 1.97 (d, <i>J</i> =6.65 Hz, 3 H 54%, CHCH ₃ , Isomer), 2.03 (s, 3 H 46%, CH ₃), 2.39 (s, 3 H 54%, CH ₃ , Isomer), 4.24 - 4.42 (m, 2 H, CH ₂ N), 4.90 - 5.26 (m, 2 H, CH ₂ N), 5.82 (q, <i>J</i> =6.65 Hz, 1 H, CHCH ₃), 6.91 - 7.37 (m, 3 H, Pos. 5-6-7 Isoindol), 7.56 - 7.74 (m, 3 H), 7.96 - 8.10 (m, 3 H), 8.32 (t, <i>J</i> =8.03 Hz, 1 H)
¹³ C-NMR	100.61 MHz, MeOD: δ (ppm) = 18.63 (CH ₃), 18.89 (CH ₃ , Isomer), 20.44 (CHCH ₃), 58.45, 58.74, 59.71, 59.79 (4x CH ₂ N, Isomere), 61.59 (CHCH ₃), 121.28, 123.34, 126.19, 126.97, 127.81, 128.89, 130.45, 130.62, 131.06, 131.49, 132.25 (quartär), 133.76 (quartär), 134.10 (quartär), 134.33 (quartär), 134.44 (quartär), 134.52 (quartär), 134.77 (quartär), 134.99 (quartär), 135.77 (quartär)
FT-IR	λ ⁻¹ (cm ⁻¹) = 3048, 2979, 2457, 2358, 1908, 1600, 1515, 1435, 1381, 1330, 1250, 1111, 1071, 993, 891, 801, 774
Smp.	247 °C mit Zersetzung
ESI-MS	<i>m/z</i> = 288.1 [M+H] ⁺ , ber.: 287.17
LC	Reinheit > 99% (280 nm), R _t = 11.6 min, Methode Gem7

Der Signalsatz in den ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren ist jeweils nahezu verdoppelt: Durch die Protonierung am Stickstoff wird ein auf der NMR-Zeitskala detektierbares Pseudochiralitätszentrum erzeugt, sodass durch das bestehende Asymmetriezentrum ein Diastereomerenpaar gebildet wird. (s. dazu auch Kap. 3.9.2 und die Literatur^[134])

1-(2-Bromomethyl)-2-(bromomethyl)benzol (125)

Struktur



Laborkürzel AWCr1
 Summenformel C₉H₁₀Br₂
 Molare Masse 277.98

Vorschrift In 10 ml 33% HBr/Essigsäure werden 4.20 g (31.3 mmol) Isochroman 3 Stunden unter Rückfluss gekocht. Zur Aufarbeitung wird auf 50 ml Wasser gegossen und 3x mit 50 ml Petrolether extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. von Lösemittel befreit. Es bleiben 8.1 g Rückstand, der säulenchromatographisch mit Cyclohexan als Fließmittel aufgereinigt wird. Man poolt zunächst die sauberen Fraktionen und erhält 860 mg weißen Feststoff. Die laut DC verunreinigten, folgenden Fraktionen werden gepoolt, i. Vak. von Lösemittel befreit und der Rückstand in siedendem Ethanol gelöst. Nach Abkühlen wird ein Feststoffpartikel der sauberen Fraktion als Impfkristall zugegeben. Am nächsten Tag filtriert man den entstandenen Niederschlag ab, trocknet im Vakuum und erhält weitere 4.05 g Produkt.

Ausbeute 4.91 g (17.7 mmol, 57%) weißer Feststoff

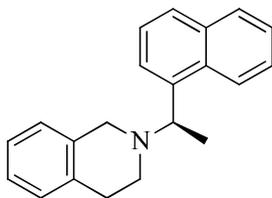
R_f 0.63 (Cyclohexan/Ethylacetat = 6:1), 0.31 (Cyclohexan)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 3.32 (t, *J*=7.72 Hz, 2 H, CH₂CH₂Br), 3.65 (t, *J*=7.72 Hz, 2 H, CH₂CH₂Br), 4.57 (s, 2 H, CH₂Br), 7.20 - 7.41 (m, 4 H)

Das ¹H-NMR-Spektrum entspricht der Literatur^[135].

2-[(1*R*)-1-Naphth-1-ylethyl]-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin (126)

Struktur



Laborkürzel AWCr2
 Summenformel C₂₁H₂₁N
 Molare Masse 287.40

Vorschrift Allgemeine Vorschrift F (Isoindolin-Synthese)

349 mg (1.26 mmol) 1-(2-Bromomethyl)-2-(bromomethyl)benzol (**125**)

201 µl (215 mg, 1.26 mmol) (1*R*)-1-Naphth-1-ylethanamin

500 µl (363 mg, 3.59 mmol) Triethylamin

Säulenchromatographie mit Petrolether/Ethylacetat = 6:1

Ausbeute 217 mg (0.755 mmol, 60%) rötliches Öl, nach 6 Monaten schwarz (Lagerung bei RT, Lichtzutritt).

R_f 0.30 (Cyclohexan/Ethylacetat = 6:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.66 (d, *J*=6.65 Hz, 3 H, CHCH₃), 2.66 - 3.04 (m, 4 H, CH₂CH₂N), 3.73 (d, *J*=14.93 Hz, 1 H, CHHN), 4.05 (d, *J*=14.93 Hz, 1 H, CHHN), 4.37 (q, *J*=6.53 Hz, 1 H, CHCH₃), 6.99 - 7.10 (m, 1 H), 7.09 - 7.22 (m, 3 H), 7.45 - 7.60 (m, 3 H), 7.77 (d, *J*=7.03 Hz, 1 H), 7.83 (d, *J*=8.16 Hz, 1 H), 7.89 - 7.98 (m, 1 H), 8.44 - 8.59 (m, 1 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 19.46 (CHCH₃), 29.28 (CH₂CH₂N), 48.42 (CH2CH₂N), 53.70 (CH₂N), 61.22 (CHCH₃), 123.97, 124.68, 125.34, 125.53 (2 C), 125.60, 126.02, 126.78, 127.43,

128.54, 128.76, 131.56 (quartär), 134.06 (quartär), 134.65 (quartär), 134.99 (quartär), 140.46 (quartär)

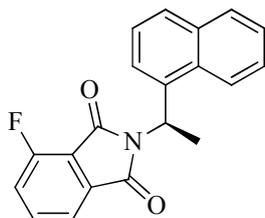
FT-IR λ^{-1} (cm⁻¹) = 2972, 2796, 1672, 1595, 1508, 1453, 1372, 1238, 1130, 1105, 1085, 934, 800, 777, 741

ESI-MS m/z = 288.1 [M+H]⁺, ber.: 287.17

LC Reinheit > 99% (254 nm), R_t = 11.3 min, Methode Gem7

4-Fluor-2-[(1R)-1-naphth-1-ylethyl]-1H-isoindol-1,3(2H)-dion (127)

Struktur



Laborkürzel AWSU25

Summenformel C₂₀H₁₄FNO₂

Molare Masse 319.33

Vorschrift Es werden 331 mg (1.93 mmol) (1R)-1-Naphth-1-ylethanamin in 5 ml Dichlormethan gelöst und 321 mg (1.93 mmol) 3-Fluorphthalsäureanhydrid zugegeben. Das Lösemittel wird langsam mittels Heißluftfön abgedampft, zum erhaltenen Rückstand 5 ml Essigsäure gegeben und wieder abgedampft. Nun werden 5 ml Xylol als hochsiedendes Lösemittel zugegeben (Optimierungsversuch). Man destilliert vom Xylol mittels Destillationsbrücke bei Raumtemperatur ab.

Ausbeute 688 mg (unter Berücks. des Xylolrückstands lt. ¹H-NMR: 1.76 mmol Produkt, 91%) farbloses Öl

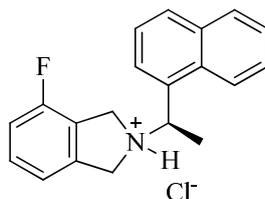
R_f 0.33 (Petrolether/Ethylacetat = 6:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 2.04 (d, J=7.15 Hz, 3 H, CHCH₃), 6.33 (q, J=7.15 Hz, 1 H, CHCH₃), 6.96 - 7.03 (m, 1 H), 7.09 - 7.23 (m, 1 H), 7.32 (t, J=8.47 Hz, 1 H), 7.44 - 7.61 (m, 3 H), 7.81 - 7.89 (m, 2 H), 8.02 (d, J=7.15 Hz, 1 H), 8.20 (d, J=8.53 Hz, 1 H)

Reinheit Das Produkt ist mit *o*-/*m*-Xylol verunreinigt (unvollständige Verflüchtigung über Nacht bei 10 mbar, RT). Im ¹H-NMR-Spektrum werden bei 2.32 und 2.33 ppm zwei Singulets für *o*- und *m*-Xylol mit einer Gesamtfläche der zwei Peaks von 4.01 (resultierend von 6H, 2*CH₃) beobachtet. Dies entspricht (Produktstoffmenge x, Stoffmengenverhältnis x/y = 1/0.667 und Gleichung 319.3 g/mol * x + 106.2 g/mol * y = 688 mg) nach Lösen des linearen Gleichungssystems 1.76 mmol Produkt in 688 mg Substanz mit Lösemittel.

4-Fluor-2-[(1R)-1-naphth-1-ylethyl]-2,3-dihydro-1H-isoindol Hydrochlorid (128)

Struktur



Laborkürzel AWSU26

Summenformel C₂₀H₁₉ClFN

Molare Masse 327.12

Vorschrift Allgemeine Vorschrift G

688 mg (ca 1.76 mmol, s. o.) 4-Fluor-2-[(1R)-1-naphth-1-ylethyl]-1H-isoindol-1,3(2H)-dion (127)

300 mg (7.9 mmol) Lithiumaluminiumhydrid

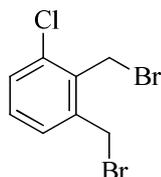
Man erhält 554 mg Rohprodukt, das säulenchromatographisch (Petrolether/Ethylacetat = 6:1) aufgereinigt wird. Das tertiäre Amin eluiert bei der SC als erstes und ist folglich überraschend lipophil. Durch Zugabe von methanolischer HCl überführt man in das Hydrochlorid. Die zunächst farblose Verbindung verfärbt sich innerhalb von 6 Monaten blaugrau (Lagerung: RT, Lichtzutritt).

Ausbeute	46 mg (0.14 mmol, 8%) weißer Feststoff
R _f (Base)	0.66 (Petrolether/Ethylacetat = 6:1), 0.8 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)
¹ H-NMR	400.13 MHz, MeOD: δ (ppm) = 1.96 (d, <i>J</i> =6.78 Hz, 3 H, CHCH ₃), 4.41 (br. s., 2 H, CH ₂ N), 5.02 (d, <i>J</i> =11.80 Hz, 1 H, CHHN), 5.11 - 5.39 (m, 1 H, CHHN), 5.83 (q, <i>J</i> =6.73 Hz, 1 H, CHCH ₃), 6.98 - 7.55 (m, 3 H, Pos. 5-6-7 Isoindol), 7.59 - 7.75 (m, 3 H), 7.91 (d, <i>J</i> =7.40 Hz, 1 H), 8.05 (dd, <i>J</i> =10.67, 8.53 Hz, 2 H), 8.31 (d, <i>J</i> =8.53 Hz, 1 H)
¹³ C-NMR	100.61 MHz, Aceton- <i>d</i> ₆ mit D ₂ O: δ (ppm) = 20.18 (CHCH ₃), 55.65 (CH ₂), 58.91 (CH ₂), 61.10 (CHCH ₃), 115.98 (d, <i>J</i> =19.07 Hz, HCCF, Pos. 5 Isoindol), 119.84 (d, <i>J</i> =3.67 Hz), 122.98, 126.04, 126.11, 126.76 (quartär), 127.27, 128.25, 130.06, 130.77, 131.43 (quartär, Pos. 1 Naphthyl), 132.29, 133.79 (quartär), 134.80 (quartär), 138.16 (quartär)
FT-IR	λ ⁻¹ (cm ⁻¹) = 3049, 2368, 1904, 1714, 1598, 1514, 1482, 1384, 1335, 1252, 1083, 998, 970, 795, 775
Smp.	Zersetzung ab 260 °C
ESI-MS	<i>m/z</i> = 292.1 [M+H] ⁺ , ber.: 291.14
LC	Reinheit > 99% (280 nm), R _t = 11.8 min, Methode Gem7

Das ¹³C-NMR-Spektrum musste aufgrund zu geringer Löslichkeit des Produkts in einem Aceton-*d*₆ / D₂O-Gemisch aufgenommen werden. Aufgrund zu niedriger Signalintensität konnte der direkt an Fluor gebundene aromatische Kohlenstoffkern nicht beobachtet werden.

1,2-Bis(brommethyl)-3-chlorbenzol (129)

Struktur



Laborkürzel	AWSU5
Summenformel	C ₈ H ₇ Br ₂ Cl
Molare Masse	298.40

Vorschrift

Allgemeine Vorschrift E
 4.80 g (34.2 mmol) 1-Chlor-2,3-dimethylbenzol
 12.77 g (71.7 mmol) *N*-Bromsuccinimid
 Reflux erfolgt über 4 Stunden. Säulenchromatographie mit Fließmittel Petrolether.

Ausbeute

9.04 g (30.3 mmol, 89%) rötliches Öl

R_f

0.50 (Cyclohexan)

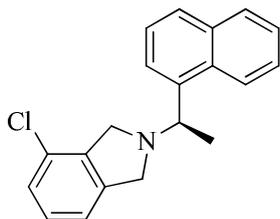
¹H-NMR

400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 4.63 (s, 2 H), 4.82 (s, 2 H), 7.22 - 7.27 (m, 1 H), 7.28 - 7.32 (m, 1 H), 7.39 (dd, *J*=7.65, 1.63 Hz, 1 H)

Das ¹H-NMR-Spektrum entspricht der Literatur^[170].

4-Chlor-2-[(1R)-1-naphth-1-ylethyl]-2,3-dihydro-1H-isoindol (130)

Struktur



Laborkürzel AWSU14
 Summenformel C₂₀H₁₈ClN
 Molare Masse 307.82

Vorschrift Allgemeine Vorschrift F (Isoindolin-Synthese)

310 mg (1.04 mmol) 1,2-Bis(brommethyl)-3-chlorbenzol (**129**)

133 µl (142 mg, 0.83 mmol) (1R)-1-Naphth-1-ylethanamin

500 µl (363 mg, 3.59 mmol) Triethylamin

Es werden 321 mg Rohprodukt der Base als rötliches Öl erhalten und anschließend säulenchromatographisch (Gradient Petrolether/Ethylacetat 9:1 nach 6:1) aufgereinigt. Die Verbindung ist demnach überraschend lipophil und zeigt wenig Retention an Kieselgel.

Ausbeute 189 mg (0.614 mmol, 74%) rötliches Öl

R_f 0.52 (Cyclohexan/Ethylacetat = 6:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.66 (d, J=6.65 Hz, 3 H, CHCH₃), 3.89 - 4.26 (m, 4 H, 2x CH₂), 4.49 (q, J=6.06 Hz, 1 H, CHCH₃), 7.04 (d, J=7.03 Hz, 1 H), 7.09 - 7.21 (m, 2 H), 7.44 - 7.59 (m, 3 H), 7.74 (d, J=7.03 Hz, 1 H), 7.81 (d, J=8.16 Hz, 1 H), 7.86 - 7.96 (m, 1 H), 8.52 (d, J=6.40 Hz, 1 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 22.33 (CHCH₃), 57.17 (CH₂), 58.71 (CH₂), 62.07 (br. s., CHCH₃), 120.53, 123.65 (br. s.), 124.94, 125.39, 125.72, 125.76, 126.78, 127.55, 128.32, 128.71 (quartär), 128.91, 131.03 (quartär), 134.11 (quartär), 138.61 (br. s., quartär), 140.47 (br. s., quartär), 142.24 (br. s., quartär)

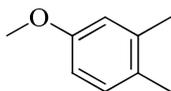
FT-IR λ⁻¹ (cm⁻¹) = 3048, 2972, 2770, 1688, 1580, 1509, 1453, 1356, 1320, 1240, 1171, 1146, 1073, 905, 860, 800, 772, 695

ESI-MS m/z = 308.1 [M+H]⁺, ber.: 307.11

LC Reinheit 97.8% (280 nm), R_t = 13.2 min, Methode Gem7

4-Methoxy-1,2-dimethylbenzol (131)

Struktur



Laborkürzel AWSU11
 Summenformel C₉H₁₂O
 Molare Masse 136.19

Vorschrift Unter Argon werden in 10 ml DMF (p.a., gelagert über Molsieb) 416 mg (60%ig, 10.4 mmol) pulverige Natriumhydridsuspension vorgelegt und unter Rühren eine Lösung von 856 mg (7.01 mmol) 3,4-Dimethylphenol in 2 ml DMF langsam zugetropft. Die Wasserstoffentwicklung ist aufgrund Schaumbildung gut zu beobachten. Sobald die Reaktion beendet ist, werden 561 µl (1.278 g, 9.0 mmol) Methyljodid zupipettiert und über Nacht bei Raumtemperatur weitergerührt.

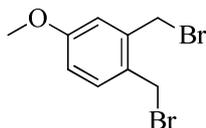
Zur Aufarbeitung gießt man in 50 ml Wasser und extrahiert 2x mit 30 ml Ethylacetat. Um DMF-Reste zu entfernen, wird die vereinigte organische Phase anschließend 3x mit 30 ml Wasser und 1x mit 30 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Man trocknet über Natriumsulfat und entfernt das Lösemittel am Rotationsverdampfer. Die Umsetzung erfolgte quantitativ, eine weitere Aufreinigung ist nicht nötig.

Ausbeute 950 mg (6.98 mmol, 99%) farbloses Öl mit angenehm aromatischem Geruch
R_f 0.76 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)
¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 2.21 (s, 3 H, CH₃), 2.26 (s, 3 H, CH₃), 3.79 (s, 3 H, OCH₃), 6.66 (dd, *J*=8.22, 2.70 Hz, 1 H, Pos. 6 Methoxybenzol), 6.73 (d, *J*=2.63 Hz, 1 H, Pos. 2 Methoxybenzol), 7.05 (d, *J*=8.16 Hz, 1 H, Pos. 5 Methoxybenzol)

Das ¹H-NMR-Spektrum entspricht der Literatur^[165].

1,2-Bis(brommethyl)-4-methoxybenzol (132)

Struktur



Laborkürzel AWSU12
Summenformel C₉H₁₀Br₂O
Molare Masse 293.98

Vorschrift Allgemeine Vorschrift E

950 mg (6.98 mmol) 1-Methoxy-3,4-dimethylbenzol (**131**)

2.487 g (13.97 mmol) *N*-Bromsuccinimid

Reflux erfolgt über 3 Stunden. Nach Ausschütteln werden 2.09 g Rückstand erhalten, die nach der ersten SC (Gradient Petrolether nach Petrolether/Ethylacetat = 6:1) zu 1.49 g Rohprodukt und nach der zweiten SC zu 0.80 g Produkt aufgereinigt wurden. Da jeweils nur die laut DC saubersten Fraktionen gepoolt wurden, ist der Ausbeuteverlust maßgeblich vom großzügigen Verwerfen verunreinigter Produktfraktionen bestimmt.

Ausbeute 0.80 g (2.7 mmol, 39%) rotes, viskoses Öl

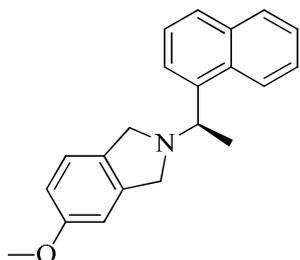
R_f 0.58 (Cyclohexan/Ethylacetat = 6:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 3.83 (s, 3 H, OCH₃), 4.63 (s, 2 H, CH₂Br), 4.67 (s, 2 H, CH₂Br), 6.84 (dd, *J*=8.47, 2.70 Hz, 1 H, Pos. 6 Methoxybenzol), 6.91 (d, *J*=2.64 Hz, 1 H, Pos. 2 Methoxybenzol), 7.30 (d, *J*=8.41 Hz, 1 H, Pos. 5 Methoxybenzol)

Das ¹H-NMR-Spektrum entspricht der Literatur^[171].

5-Methoxy-2-[(1R)-1-naphth-1-ylethyl]-2,3-dihydro-1H-isoindol (133)

Struktur



Laborkürzel AWSU15
 Summenformel C₂₁H₂₁NO
 Molare Masse 303.40

Vorschrift In 25 ml Acetonitril werden 343 mg (1.17 mmol) 1,2-Bis(brommethyl)-4-methoxybenzol (**132**) gelöst und 187 µl (200 mg, 1.17 mmol) (1R)-1-Naphth-1-ylethanamin zupipettiert. Zum Ansatz werden 1.0 g (7.2 mmol) Kaliumcarbonat gegeben, dann über vier Stunden zum Reflux erhitzt, der Ansatz verfärbt sich dabei schwarz. Danach wird das Acetonitril i. Vak. entfernt, der Rückstand in 20 ml Ethylacetat aufgenommen und 3x mit 10%iger Natriumcarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. von Lösemittel befreit. Es werden 340 mg Rohprodukt erhalten, die säulenchromatographisch (Petrolether/Ethylacetat = 5:1) aufgereinigt werden.

Ausbeute 118 mg (0.389 mmol, 33%) dunkelrotes, viskoses Öl

R_f 0.56 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1), 0.82 (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.65 (d, *J*=6.53 Hz, 3 H, CHCH₃), 3.78 (s, 3 H, OCH₃), 3.83 - 4.09 (m, 4 H, 2x CH₂), 4.47 (q, *J*=5.94 Hz, 1 H, CHCH₃), 6.70 - 6.79 (m, 2 H), 7.07 (d, *J*=8.16 Hz, 1 H), 7.45 - 7.57 (m, 3 H), 7.72 - 7.84 (m, 2 H), 7.86 - 7.95 (m, 1 H), 8.53 (d, *J*=4.39 Hz, 1 H)

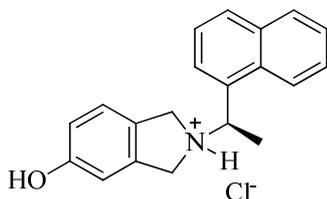
FT-IR λ⁻¹ (cm⁻¹) = 2924, 2853, 1681, 1615, 1595, 1493, 1454, 1355, 1262, 1204, 1134, 1104, 1028, 801, 777, 739

ESI-MS *m/z* = 304.1 [M+H]⁺, ber.: 303.16

LC Reinheit 99.1% (280 nm), R_t = 11.2 min, Methode Gem7

2-[(1R)-1-Naphth-1-ylethyl]-2,3-dihydro-1H-isoindol-5-ol Hydrochlorid (134)

Struktur



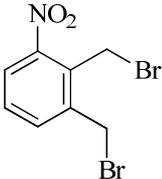
Laborkürzel AWSU16
 Summenformel C₂₀H₂₀ClNO
 Molare Masse 325.83

Vorschrift In 20 ml 33% HBr/Essigsäure werden 65 mg (0.21 mmol) 5-Methoxy-2-[(1R)-1-naphth-1-ylethyl]-2,3-dihydro-1H-isoindol (**133**) über 24 Stunden zum Reflux erhitzt. Zur Aufarbeitung wird die Essigsäure bei Normaldruck bis auf ca. 1 ml abdestilliert, diese Lösung neutralisiert man mit halbgesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung, extrahiert mit 50 ml Ethylacetat und wäscht die organische Phase 2x mit 10 gesättigter Natriumchloridlösung. Man trocknet über Natriumsulfat und entfernt das Lösemittel i. Vak, der erhaltene Rückstand wird säulenchromatographisch (Petrolether/Ethylacetat = 2:1) aufgereinigt. Es werden 36 mg (0.12 mmol) der Phenolbase als

gelbliches Öl erhalten, man überführt mit methanolischer HCl in ihr Hydrochlorid.

Ausbeute	41 mg (0.12 mmol, 57%) farblose, durchsichtige Kristalle
R _f (Base)	0.32 (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1)
¹ H-NMR	400.13 MHz, MeOD: δ (ppm) = 1.91 (d, <i>J</i> =6.78 Hz, 3 H, CHCH ₃), 4.20 - 4.78 (m, 4 H, 2x CH ₂), 5.72 (q, <i>J</i> =6.11 Hz, 1 H, CHCH ₃), 6.74 (br. s., 1 H, Pos. 4 Isoindol), 6.78 (dd, <i>J</i> =8.28, 1.88 Hz, 1 H, Pos. 6 Isoindol), 7.02 - 7.21 (m, 1 H, Pos. 7 Isoindol), 7.58 - 7.73 (m, 3 H), 7.84 (d, <i>J</i> =7.15 Hz, 1 H), 8.03 (t, <i>J</i> =7.65 Hz, 2 H), 8.30 (d, <i>J</i> =8.53 Hz, 1 H)
¹³ C-NMR	100.61 MHz, MeOD: δ (ppm) = 20.29 (CH ₃), 59.14 (CH ₂), 59.41 (CH ₂), 110.71, 117.43, 123.26 (2 C), 124.99, 126.92, 127.85, 128.89 (2 C), 130.66, 131.53, 132.27 (quartär), 135.84 (quartär), 160.02 (quartär, C-OH)
	Aufgrund zu niedriger Signalintensität wurden nicht alle Kohlenstoff-Kerne beobachtet.
FT-IR	λ ⁻¹ (cm ⁻¹) = 2981, 2574, 1619, 1500, 1458, 1288, 778
Smp.	Färbt sich ab 180 °C dunkelgelb, Zersetzung ab 240 °C
ESI-MS	m/z = 290.1 [M+H] ⁺ , ber.: 289.15
LC	Reinheit 96.8% (280 nm), R _t = 10.0 min, Methode Gem7

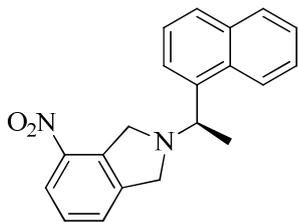
1,2-Bis(brommethyl)-3-nitrobenzol (135)

Struktur		Laborkürzel	AWSU7
		Summenformel	C ₈ H ₇ Br ₂ NO ₂
		Molare Masse	308.95

Vorschrift	Allgemeine Vorschrift E 3.10 g (20.5 mmol) 1,2-Dimethyl-3-nitrobenzol 7.48 g (42.0 mmol) <i>N</i> -Bromsuccinimid Reflux über 4 Stunden. Es werden zunächst 6.9 g Rohprodukt erhalten, aus dem nach zweimaliger Säulenchromatographie (Petrolether/Ethylacetat = 9:1) lediglich 400 mg Reinstoff isoliert werden konnten. Dies entspricht einer Ausbeute von 6%, die tatsächliche Ausbeute bei der Reaktion ist allerdings höher, das Problem besteht in der Aufreinigung: In den meisten Fraktionen koeluierten ebenso bromierte Nebenprodukte.
Ausbeute	400 mg Produkt aus sauberster Fraktion (1.29 mmol, 6%) als beiges Öl, im Kühlschrank kristallin.
R _f	0.44 (Petrolether/Ethylacetat = 6:1)
¹ H-NMR	400.13 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 4.70 (s, 2 H), 4.87 (s, 2 H), 7.48 (t, <i>J</i> =7.97 Hz, 1 H), 7.65 (dd, <i>J</i> =7.72, 1.32 Hz, 1 H), 7.89 (dd, <i>J</i> =8.16, 1.25 Hz, 1 H)
	Das ¹ H-NMR-Spektrum entspricht der Literatur ^[172] .

2-[(1*R*)-1-Naphth-1-ylethyl]-4-nitro-2,3-dihydro-1*H*-isoindol (136)

Struktur



Laborkürzel

AWSU21

Summenformel

C₂₀H₁₈N₂O₂

Molare Masse

318.37

Vorschrift Abgewandelte Vorschrift F, Optimierungsversuch ohne Triethylamin, Kaliumcarbonat als Base

457 mg (1.48 mmol) 1,2-Bis(brommethyl)-3-nitrobenzol (**135**)

253 mg (1.48 mmol) (1*R*)-1-Naphth-1-ylethanamin

1.0 g (7.2 mmol) Kaliumcarbonat

Die Reaktion erfordert zur vollständigen Umsetzung 12 Stunden Reaktionszeit (Reaktionskontrolle mittels DC). Es wird säulenchromatographisch (Petrolether/Ethylacetat = 6:1) aufgereinigt, das Produkt eluiert dabei laut DC als vierte Substanz.

Ausbeute 301 mg (0.945 mmol, 64%) rotes Öl

R_f 0.32 (Petrolether/Ethylacetat = 6:1), 0.62 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)

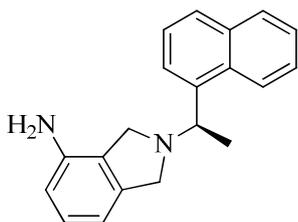
¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.68 (br. s., 3 H, CHCH₃), 4.01 (br. s., 2 H, CH₂), 4.40 (d, *J*=16.44 Hz, 1 H, CHH), 4.47 - 4.58 (m, 1 H, CHCH₃), 4.63 (d, *J*=15.94 Hz, 1 H, CHH), 7.33 - 7.59 (m, 5 H), 7.66 - 7.75 (m, 1 H), 7.81 (d, *J*=8.66 Hz, 1 H), 7.88 - 7.95 (m, 1 H), 8.05 (d, *J*=7.91 Hz, 1 H), 8.50 (br. s., 1 H)

ESI-MS *m/z* = 319.1 [M+H]⁺, ber.: 318.14

LC Reinheit > 99% (280 nm), R_t = 12.4 min, Methode Gem7

2-[(1*R*)-1-Naphth-1-ylethyl]-2,3-dihydro-1*H*-isoindol-4-amin (137)

Struktur



Laborkürzel

AWSU22

Summenformel

C₂₀H₂₀N₂

Molare Masse

288.39

Vorschrift Allgemeine Vorschrift H

301 mg (0.945 mmol) 2-[(1*R*)-1-Naphth-1-ylethyl]-4-nitro-2,3-dihydro-1*H*-isoindol (**136**)

700 mg (3.1 mmol) Zinn(II)-chlorid-Dihydrat

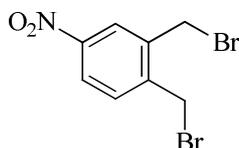
Ausbeute 124 mg (0.43 mmol, 45%) bräunlicher Feststoff

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.67 (d, *J*=6.53 Hz, 3 H, CHCH₃), 3.52 (br. s., 2 H, NH₂), 3.86 (s, 2 H, CH₂ Pos. 3 Isoindol), 3.96 (d, *J*=12.80 Hz, 1 H, CHH Pos. 1 Isoindol), 4.13 (d, *J*=13.18 Hz, 1 H, CHH Pos. 1 Isoindol), 4.50 (q, *J*=6.53 Hz, 1 H, CHCH₃), 6.52 (dd, *J*=7.84, 0.56 Hz, 1 H, Pos. 5 Isoindol), 6.64 (d, *J*=7.28 Hz, 1 H, Pos. 7 Isoindol), 7.04 (t, *J*=7.65 Hz, 1 H, Pos. 6 Isoindol), 7.43 - 7.59 (m, 3 H), 7.72 - 7.85 (m, 2 H), 7.86 - 7.95 (m, 1 H), 8.56 (d, *J*=5.52 Hz, 1 H)

¹³ C-NMR	100.61 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 22.41 (CH ₂ CH ₃), 55.48 (CH ₂ Pos. 3 Isoindol), 58.54 (CH ₂ Pos. 1 Isoindol), 62.33 (br. s., CHCH ₃), 112.57 (Pos. 7 Isoindol), 113.24 (Pos. 5 Isoindol), 123.76, 124.80 (quartär), 125.07, 125.36, 125.70, 125.73, 127.45, 128.07 (Pos. 6 Isoindol), 128.84, 131.04 (quartär), 134.04 (quartär), 140.70 (quartär), 140.89 (quartär), 141.15 (quartär)
FT-IR	λ ⁻¹ (cm ⁻¹) = 3347, 2972, 1623, 1509, 1483, 1397, 1326, 1205, 802, 776
Smp.	Zersetzung ab 103 °C
ESI-MS	m/z = 289.1 [M+H] ⁺ , ber.: 288.16
LC	Reinheit 97.9% (280 nm), R _t = 9.8 min, Methode Gem7

1,2-Bis(brommethyl)-4-nitrobenzol (138)

Struktur



Laborkürzel

AWSU8

Summenformel

C₈H₇Br₂NO₂

Molare Masse

308.95

Vorschrift

Allgemeine Vorschrift E

1.54 g (10.2 mmol) 1,2-Dimethyl-4-nitrobenzol

3.63 g (20.4 mmol) *N*-Bromsuccinimid

Die Zugabe von *N*-Bromsuccinimid erfolgt aufgeteilt auf zwei Portionen, wovon die zweite nach einer Stunde Reflux zugegeben wird. Nach 4 Stunden wird das Sieden unter Reflux beendet, da dann im DC kein Edukt mehr beobachtet wird. Die Umkristallisation aus Ethanol ist nicht gelungen, das Produktgemisch ölte bei jedem Versuch in der Kälte aus. Zur Aufreinigung wird die Säulenchromatographie (Gradient von Petrolether nach Petrolether/Ethylacetat = 6:1) 3x durchgeführt, die verwendete Fraktion ergab schließlich 375 mg Produktgemisch (Reinheit geschätzt auf 57mol% laut ¹H-NMR-Spektrum), die anderen Fraktionen waren dabei noch stärker mit über- und unterbromierten Nebenprodukten verunreinigt.

Ausbeute

375 mg Produktgemisch (unter Berücksichtigung der Reinheit laut ¹H-NMR: 0.87 mmol, 8%) hellgelbe Kristalle

R_f

0.64 (Petrolether/Ethylacetat = 6:1)

¹H-NMR

400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 4.67 (s, 2 H), 4.68 (s, 2 H), 7.57 (d, *J*=8.41 Hz, 1 H), 8.15 - 8.19 (m, 1 H), 8.26 (d, *J*=2.38 Hz, 1 H)

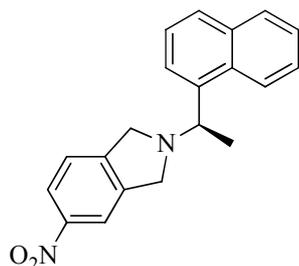
Reinheit

57mol% bezogen auf Peakflächenverhältnis im ¹H-NMR-Spektrum zwischen 4.68 ppm (Produkt, 2H, Fläche 2.00) und 2.54-2.57 ppm (zwei monobromierte Nebenprodukte, 2x 3H, Fläche 1.17 und 1.12, ergibt (2/2)/(1+(1.17/3)+(1.12/3)) = 0.57mol%), entsprechend 0.87 mmol Produkt in 375 mg Produktgemisch.

Das ¹H-NMR-Spektrum entspricht der Literatur^[173].

2-[(1R)-1-Naphth-1-ylethyl]-5-nitro-2,3-dihydro-1H-isoindol (139)

Struktur



Laborkürzel AWSU23
 Summenformel C₂₀H₁₈N₂O₂
 Molare Masse 318.37

Vorschrift Abgewandelte Vorschrift F, Optimierungsversuch ohne Triethylamin, Kaliumcarbonat als Base
 375 mg (unsauber, entsprechend 0.87 mmol) 1,2-Bis(brommethyl)-4-nitrobenzol (**138**)
 208 mg (1.21 mmol) (1R)-1-Naphth-1-ylethanamin
 1.0 g (7.2 mmol) Kaliumcarbonat
 Die Reaktion erfordert zur vollständigen Umsetzung 12 Stunden Reaktionszeit (Reaktionskontrolle mittels DC). Es wird säulenchromatographisch (Petrolether/Ethylacetat = 6:1) aufgereinigt, das Produkt eluiert dabei laut DC als dritte Substanz.

Ausbeute 100 mg (0.31 mmol, 36%) gelbes, viskoses Öl

R_f 0.40 (Petrolether/Ethylacetat = 6:1), 0.68 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)

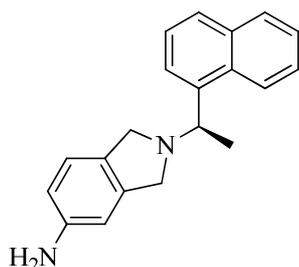
¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.67 (br. s., 3 H, CHCH₃), 3.93 - 4.17 (m, 4 H, 2x CH₂), 4.49 (br. s., 1 H, CHCH₃), 7.29 (d, J=8.53 Hz, 1 H), 7.46 - 7.57 (m, 3 H), 7.65 - 7.77 (m, 1 H), 7.82 (d, J=7.91 Hz, 1 H), 7.86 - 7.97 (m, 1 H), 8.02 (br. s., 1 H), 8.10 (d, J=8.16 Hz, 1 H), 8.49 (br. s., 1 H)

ESI-MS m/z = 319.1 [M+H]⁺, ber.: 318.14

LC Reinheit > 99% (280 nm), R_t = 12.1 min, Methode Gem7

2-[(1R)-1-Naphth-1-ylethyl]-2,3-dihydro-1H-isoindol-5-amin (140)

Struktur



Laborkürzel AWSU24
 Summenformel C₂₀H₂₀N₂
 Molare Masse 288.39

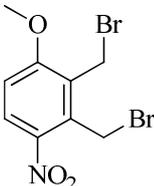
Vorschrift Allgemeine Vorschrift H
 97.7 mg (0.307 mmol) 2-[(1R)-1-Naphth-1-ylethyl]-5-nitro-2,3-dihydro-1H-isoindol (**139**)
 300 mg (1.3 mmol) Zinn(II)-chlorid-Dihydrat

Ausbeute 76 mg (0.26 mmol, 86%) hellbrauner Feststoff

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.64 (d, J=6.53 Hz, 3 H, CHCH₃), 3.58 (br. s., 2 H, NH₂), 3.78 - 4.04 (m, 4 H, 2x CH₂), 4.38 - 4.53 (m, 1 H, CHCH₃), 6.51 (br. s., 1 H, Pos. 4 Isoindol), 6.53 (dd, J=7.91, 2.13 Hz, 1 H, Pos. 6 Isoindol), 6.95 (d, J=7.91 Hz, 1 H, Pos. 7 Isoindol), 7.45 - 7.55 (m, 3 H), 7.71 - 7.84 (m, 2 H), 7.86 - 7.94 (m, 1 H), 8.53 (d, J=4.52 Hz, 1 H)

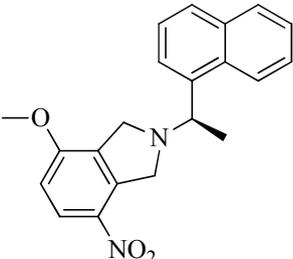
¹³ C-NMR	100.61 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 22.45 (CH ₂ CH ₃), 57.64 (CH ₂ Pos. 1 Isoindol), 58.24 (CH ₂ Pos. 3 Isoindol), 62.27 (CHCH ₃), 109.17 (Pos. 4 Isoindol), 113.79 (Pos. 6 Isoindol), 122.85 (Pos. 7 Isoindol), 123.72, 125.05, 125.31, 125.67, 125.70, 127.39, 128.84, 130.07 (quartär, Pos. 7a Isoindol), 131.05 (quartär), 134.03 (quartär), 140.74 (quartär, Pos. 1 Naphthyl), 141.28 (quartär, Pos. 3a Isoindol), 145.41 (quartär, CNH ₂ Pos. 5 Isoindol)
FT-IR	λ ⁻¹ (cm ⁻¹) = 3340, 2970, 1618, 1497, 1451, 1356, 1211, 1139, 802, 777
Smp.	Zersetzung ab 84 °C
ESI-MS	m/z = 289.2 [M+H] ⁺ , ber.: 288.16
LC	Reinheit 88.5% (280 nm), R _t = 4.5 min, Methode Gem7

2,3-Bis(brommethyl)-1-methoxy-4-nitrobenzol (**141**)

Struktur		Laborkürzel	AWSU27
		Summenformel	C ₉ H ₉ Br ₂ NO ₃
		Molare Masse	338.98

Vorschrift	Allgemeine Vorschrift E 3.00 g (16.6 mmol) 1-Methoxy-2,3-dimethyl-4-nitrobenzol 5.9 g (33.15 mmol) <i>N</i> -Bromsuccinimid Reflux erfolgt über 24 Stunden. Es werden 5.551 g rötliches Öl als Rohprodukt erhalten. Nach Umkristallisation aus Petrolether/Ethylacetat = 2:1 fallen 1.339 g Produkt als hellgelbe Kristalle an. Die Mutterlauge wird i. Vak. von Lösemittel befreit und der Rückstand aus Ethylacetat umkristallisiert, wodurch weitere 601 mg Produkt erhalten werden konnten.
Ausbeute	1.94 g (5.72 mmol, 34%) hellgelbe Kristalle
¹ H-NMR	400.13 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 4.03 (s, 3 H, OCH ₃), 4.76 (s, 2 H, CH ₂ Br), 4.94 (s, 2 H, CH ₂ Br), 6.97 (d, <i>J</i> =9.29 Hz, 1 H, Pos. 6 Methoxybenzol), 8.10 (d, <i>J</i> =9.16 Hz, 1 H, Pos. 5 Methoxybenzol)

4-Methoxy-2-[(1*R*)-1-naphth-1-ylethyl]-7-nitro-2,3-dihydro-1*H*-isoindol (**142**)

Struktur		Laborkürzel	AWSU28
		Summenformel	C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₃
		Molare Masse	348.40

Vorschrift	Abgewandelte Vorschrift F, Optimierungsversuch ohne Triethylamin, Kaliumcarbonat als Base 578 mg (1.71 mmol) 2,3-Bis(brommethyl)-1-methoxy-4-nitrobenzol (141) 292 mg (1.71 mmol) (1 <i>R</i>)-1-Naphth-1-ylethanamin
------------	---

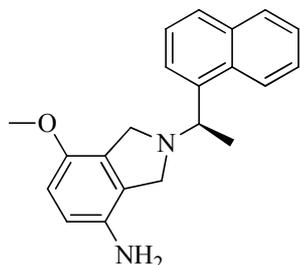
2.5 g (18 mmol) Kaliumcarbonat

Die vollständige Umsetzung (laut DC bis kein Edukt mehr vorhanden) erfordert 30 stündiges Erhitzen unter Reflux. Nach Entfernen des Toluols am Rotationsverdampfer wird in Dichlormethan aufgenommen und wie in Allgemeiner Vorschrift F beschrieben weiter verfahren. Der erhaltene Rückstand wird säulenchromatographisch (Petrolether/Ethylacetat = 4:1) aufgereinigt.

Ausbeute	326 mg (0.935 mmol, 55%) rotes Öl
R _f	0.51 (Cyclohexan/Petrolether = 3:1)
¹ H-NMR	400.13 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 1.67 (d, <i>J</i> =6.53 Hz, 3 H, CHCH ₃), 3.87 (s, 3 H, OCH ₃), 3.89 - 4.04 (m, 2 H, CH ₂), 4.42 (d, <i>J</i> =16.06 Hz, 1 H, CHH), 4.48 - 4.57 (m, 1 H, CHCH ₃), 4.62 (d, <i>J</i> =16.19 Hz, 1 H, CHH), 6.79 (d, <i>J</i> =9.03 Hz, 1 H, Pos. 5 Isoindol), 7.43 - 7.56 (m, 3 H), 7.70 (d, <i>J</i> =6.90 Hz, 1 H), 7.80 (d, <i>J</i> =8.28 Hz, 1 H), 7.86 - 7.96 (m, 1 H), 8.13 (d, <i>J</i> =9.03 Hz, 1 H, Pos. 6 Isoindol), 8.50 (d, <i>J</i> =5.52 Hz, 1 H)
FT-IR	λ ⁻¹ (cm ⁻¹) = 2971, 1591, 1510, 1484, 1335, 1273, 1067, 802, 777
ESI-MS	m/z = 349.1 [M+H] ⁺ , ber.: 348.15
LC	Reinheit > 99% (280 nm), R _t = 13.3 min, Methode Gem7

7-Methoxy-2-[(1*R*)-1-naphth-1-ylethyl]-2,3-dihydro-1*H*-isoindol-4-amin (143)

Struktur

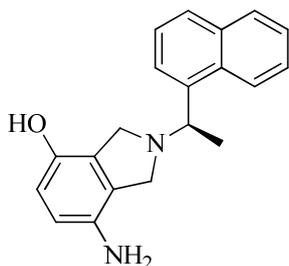


Laborkürzel	AWSU29
Summenformel	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O
Molare Masse	318.41

Vorschrift	Abgewandelte Vorschrift H, Optimierungsversuch in Ethanol mit geringer Salzsäurekonzentration 182 mg (0.522 mmol) 4-Methoxy-2-[(1 <i>R</i>)-1-naphth-1-ylethyl]-7-nitro-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -isoindol (142) 400 mg (1.8 mmol) Zinn(II)-chlorid-Dihydrat 20 ml Ethanol als Lösemittel, unter Zusatz von 3 ml konz. Salzsäure Reflux erfolgt über 4 Stunden. Die Aufreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie (Petrolether/Ethylacetat/Triethylamin = 1:1:0.05)
Ausbeute	120.3 mg (0.3778 mmol, 72%) dunkelbraunes Öl
R _f	0.23 (Petrolether/Ethylacetat/Triethylamin = 1:1:0.05)
¹ H-NMR	400.13 MHz, CDCl ₃ : δ (ppm) = 1.67 (br. s., 3 H, CHCH ₃), 2.94 (br. s., 2 H, NH ₂), 3.73 (s, 3 H, OCH ₃), 3.77 - 4.23 (m, 4 H, 2x CH ₂), 4.53 (br. s., 1 H, CHCH ₃), 6.51 (d, <i>J</i> =8.41 Hz, 1 H), 6.59 (d, <i>J</i> =8.41 Hz, 1 H), 7.45 - 7.55 (m, 3 H), 7.66 - 7.93 (m, 3 H), 8.51 (br. s., 1 H)
ESI-MS	m/z = 319.2 [M+H] ⁺ , ber.: 318.17
LC	Reinheit 98.5% (254 nm), R _t = 9.8 min, Methode Gem7

7-Amino-2-[(1R)-1-naphth-1-ylethyl]-2,3-dihydro-1H-isoindol-4-ol (144)

Struktur



Laborkürzel AWSU30

Summenformel C₂₀H₂₀N₂O

Molare Masse 304.39

Vorschrift In 30 ml 48%iger Bromwasserstoffsäure werden 110 mg (0.345 mmol) 7-Methoxy-2-[(1R)-1-naphth-1-ylethyl]-2,3-dihydro-1H-isoindol-4-amin (**143**) über 2 Stunden zum Sieden erhitzt, dabei ist eine Farbänderung von anfangs hellrosa nach grau beobachtbar. Beim Abkühlen auf Raumtemperatur fällt das Hydrobromid gallertig aus, man stellt daher über 3 Stunden ins Eisfach (-30 °C), filtriert den Niederschlag über ein Faltenfilter ab, wäscht den Rückstand 3x mit kaltem Wasser und verwirft das Filtrat. Der Filtrückstand wird durch abwechselnde Zugabe von 5%iger Natriumcarbonatlösung und Methanol durch den Filter gespült. Dieses Filtrat wird mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat neutralisiert (pH = 7) und anschließend 2x mit 50 ml Ethylacetat extrahiert. Nach Vereinigung der organischen Phasen wird über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. von Lösemittel befreit. Anschließend ist eine Nach Trocknung bei 10 mbar über 4 Tage nötig, um Ethylacetatreste aus der anfangs öligen Substanz zu entfernen.

Ausbeute 89 mg (0.29 mmol, 84%) beiger Feststoff, nach 6 Monaten dunkelrot (Lagerung: RT, Lichtzutritt).

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.64 (d, *J*=6.65 Hz, 3 H, CHCH₃), 3.80 - 3.99 (m, 3 H), 4.07 - 4.19 (m, 1 H), 4.44 (br. s., 3 H, NH₂ & OH), 4.55 (q, *J*=6.36 Hz, 1 H, CHCH₃), 6.33 (d, *J*=8.28 Hz, 1 H), 6.42 (d, *J*=8.28 Hz, 1 H), 7.42 - 7.54 (m, 3 H), 7.72 - 7.82 (m, 2 H), 7.84 - 7.92 (m, 1 H), 8.45 (d, *J*=4.77 Hz, 1 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 22.11 (CHCH₃), 55.65 (CH₂), 55.99 (CH₂), 61.75 (br. s., CHCH₃), 115.34, 115.42, 123.49, 125.06, 125.42, 125.73, 125.88, 126.65 (quartär), 126.76 (quartär), 127.65, 128.90, 131.01 (quartär), 133.86 (quartär), 134.02 (quartär), 139.88 (quartär), 143.89 (quartär)

FT-IR λ⁻¹ (cm⁻¹) = 3048, 2976, 1596, 1497, 1372, 1287, 1240, 1141, 1014, 954, 908, 860, 801, 777, 729

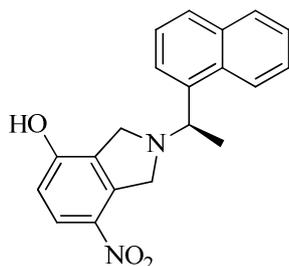
Smp. Zersetzung ab 127 °C

ESI-MS m/z = 305.2 [M+H]⁺, ber.: 304.16

LC Reinheit gesamt > 99% (280 nm), R_t = 10.0 min, Methode 5% B

2-[(1R)-1-Naphth-1-ylethyl]-7-nitro-2,3-dihydro-1H-isoindol-4-ol (145)

Struktur



Laborkürzel

AWSU31

Summenformel

C₂₀H₁₈N₂O₃

Molare Masse

334.37

Vorschrift Zu 30 ml 48%iger Bromwasserstoffsäure werden 291 mg (0.84 mmol) 4-Methoxy-2-[(1R)-1-naphth-1-ylethyl]-7-nitro-2,3-dihydro-1H-isoindol (**143**) gegeben und zum Reflux erhitzt. Da sich das Edukt auch im Sieden nicht unter Salzbildung löst, werden 20 ml Essigsäure als Kosolvens zugegeben. Man refluxiert 2 Tage, bis laut Loop-MS vollständige Umsetzung erfolgt ist. Zur Aufarbeitung wird unter Atmosphärendruck bis auf etwa 1 ml Lösung abdestilliert, anschließend mit halbgesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung bis pH = 6 neutralisiert und die Nitrophenolbase mit 30 ml Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird mit 5 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und i. Vak. von Lösemittel befreit. Der erhaltene rote Rückstand wird säulenchromatographisch (Petrolether/Ethylacetat = 3:1) aufgereinigt.

Ausbeute 54 mg (0.16 mmol, 19%) roter Feststoff

R_f 0.16 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.75 (d, *J*=6.65 Hz, 3 H, CHCH₃), 4.05 - 4.27 (m, 2 H, CH₂), 4.61 (d, *J*=16.06 Hz, 1 H, CHH), 4.84 (d, *J*=16.06 Hz, 1 H, CHH), 4.88 - 5.01 (m, 1 H, CHCH₃), 6.46 (d, *J*=8.91 Hz, 1 H, Pos. 5 Isoindol), 7.39 - 7.61 (m, 3 H), 7.75 (d, *J*=9.03 Hz, 1 H, Pos. 6 Isoindol), 7.78 - 7.93 (m, 3 H), 8.19 (d, *J*=7.03 Hz, 1 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 20.86 (CHCH₃), 55.23 (CH₂), 59.66 (CH₂), 61.08 (br. s., CH), 115.62, 122.23, 125.01, 125.34 (quartär), 125.68, 125.96, 126.43, 126.77, 129.00, 129.31, 130.71 (quartär), 134.01 (quartär), 135.08 (quarter), 135.79 (br. s., quartär), 136.00 (br. s., quartär), 159.63 (quartär, COH Pos. 4 Isoindol)

FT-IR λ⁻¹ (cm⁻¹) = 1480, 1294, 1024, 906, 800, 776, 756, 725

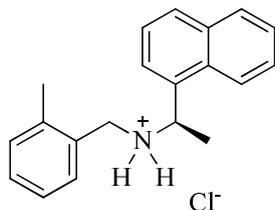
Smp. 122 °C

ESI-MS *m/z* = 335.0 [M+H]⁺, ber.: 334.13

LC Reinheit 97.6% (300 nm), R_t = 1.7 min, Methode Gem6

(1R)-N-(2-Methylbenzyl)-1-naphth-1-ylethanamin Hydrochlorid (146)

Struktur



Laborkürzel

AWAm5

Summenformel

C₂₀H₂₂ClN

Molare Masse

311.85

Vorschrift

Abgewandelte Vorschrift F, Optimierungsversuch ohne Triethylamin, Kaliumcarbonat als Base
 84 µl (115.4 mg, 0.624 mmol) 1-(Brommethyl)-2-methylbenzol
 100 µl (96 mg, 0.56 mmol) (1R)-1-Naphth-1-ylethanamin
 0.5 g (3.6 mmol) Kaliumcarbonat
 Reflux erfolgt über 12 Stunden. Der erhaltene Rückstand wird säulenchromatographisch (Petrol-
 ether/Ethylacetat = 5:1) aufgereinigt. Man überführt mit methanolischer HCl ins Hydrochlorid der
 Base.

Ausbeute

132 mg (0.423 mmol, 76%) weißer Feststoff

R_f (Base)

0.5 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1), stark abhängig von Auftragemenge

¹H-NMR

400.13 MHz, MeOD: δ (ppm) = 1.87 (d, *J*=6.78 Hz, 3 H, CHCH₃), 2.09 (s, 3 H, CH₃), 3.99 (d, *J*=13.43 Hz, 1 H, CHHN), 4.25 (d, *J*=13.30 Hz, 1 H, CHHN), 5.51 (q, *J*=6.78 Hz, 1 H, CHCH₃), 7.19 - 7.34 (m, 3 H), 7.40 (dd, *J*=7.40, 1.38 Hz, 1 H), 7.58 - 7.69 (m, 3 H), 7.84 (dd, *J*=7.22, 0.82 Hz, 1 H), 7.99 - 8.06 (m, 2 H), 8.15 (d, *J*=8.53 Hz, 1 H)

¹³C-NMR

100.61 MHz, MeOD: δ (ppm) = 19.15 (CH₃), 20.38 (CHCH₃), 48.17 (CH₂N), 54.45 (CHCH₃), 123.13, 125.31, 126.79, 127.82, 127.98, 128.78, 130.59, 130.89 (quartär), 131.06, 131.40, 131.81, 132.34, 132.53 (quartär), 134.15 (quartär), 135.73 (quartär), 139.04 (quartär)

FT-IR

λ⁻¹ (cm⁻¹) = 2702, 2048, 1445, 1253, 1150, 1095, 805, 784, 765, 743

Smp.

279 °C (mit Zersetzung)

ESI-MS

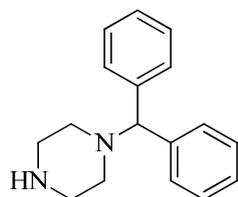
m/z = 276.2 [M+H]⁺, ber.: 275.17

LC

Reinheit > 99% (280 nm), R_t = 12.7 min, Methode Gem7

1-Benzhydrylpiperazin (147)

Struktur



Laborkürzel

AWTo2

Summenformel

C₁₇H₂₀N₂

Molare Masse

252.35

Vorschrift

Unter Stickstoff werden in 15 ml Toluol 1.394 g (16.19 mmol) Piperazin bei 80 °C gelöst. Langsam wird eine Lösung von 1.0 g (4.05 mmol) Diphenylbrommethan in 5 ml Toluol unter Rühren zugegeben. Nach 15 Minuten bildet sich eine weiße Suspension, es wird noch weitere 2 Stunden bei 80 °C gerührt. Zur Aufarbeitung lässt man auf Raumtemperatur abkühlen, verdünnt mit 10 ml Diethylether und extrahiert 4x mit 10 ml Wasser. Die organische Phase wird über Natriumsulfat

getrocknet und i. Vak von Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Rückstand (1.1 g) wird in 10 ml Ethylacetat suspendiert, dann filtriert man vom ungelösten Feststoff ab (dialkyliertes Piperazin). Das Filtrat wird i. Vak von Lösungsmittel befreit und das Produkt unter Stickstoff aufbewahrt.

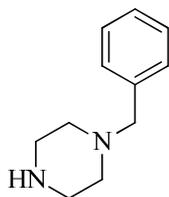
Ausbeute 667 mg (2.64 mmol, 65%) farbloses, viskoses Öl

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 2.36 (br. s., 4 H), 2.89 (t, *J*=4.89 Hz, 4 H), 4.22 (s, 1 H, CH-Diphenyl), 7.14 - 7.22 (m, 2 H), 7.23 - 7.32 (m, 4 H), 7.38 - 7.48 (m, 4 H)

Das ¹H-NMR-Spektrum entspricht der Literatur^[174].

1-Benzylpiperazin (148)

Struktur



Laborkürzel AWTo5

Summenformel C₁₁H₁₆N₂

Molare Masse 176.26

Vorschrift In 40 ml Toluol werden 8.6 g (100 mmol) Piperazin bei 80 °C gelöst (Stickstoffatmosphäre). Unter Rühren wird eine Lösung von 4.254 g (25 mmol) Benzylbromid in 4 ml Toluol zugetropft, es bildet sich sofort weißer Niederschlag, man lässt noch weitere 30 Minuten bei 80 °C rühren. Zur Aufarbeitung wird die organische Phase 5x mit 10 ml Wasser gewaschen, sodass kein Piperazin mehr im DC erkennbar ist (Kaliumpermanganat-Tauchbad). Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhält 3.84 g öligen Rückstand, der laut MS deutlich mit *N,N'*-Dibenzylpiperazin verunreinigt ist. Daher wird eine Kugelrohrdestillation durchgeführt, bei 155 °C (ca. 10-20 mbar) geht das *N*-Benzylpiperazin über und friert in der mit Trockeneis gekühlten Kugel weiß aus.

Ausbeute 3.017 g (17.1 mmol, 69%) farbloses Öl

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.62 (br. s., 1 H, NH), 2.40 (br. s., 4 H), 2.86 (t, *J*=4.89 Hz, 4 H), 3.48 (s, 2 H, CH₂-Phenyl), 7.19 - 7.36 (m, 5 H)

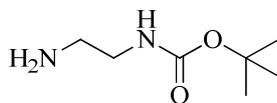
¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 45.98 (2 C), 54.40 (2 C), 63.56 (CH₂-Phenyl), 126.82, 128.01 (2 C), 129.04 (2 C), 137.95 (quartär)

ESI-MS *m/z* = 177.1 [M+H]⁺, ber.: 176.13

Die NMR-Spektren entsprechen der Literatur^[175].

tert-Butyl (2-aminoethyl)carbamat (149)

Struktur



Laborkürzel AWTo6

Summenformel C₇H₁₆N₂O₂

Molare Masse 160.21

Vorschrift Zu 30 ml THF werden 6.7 ml (6.0 g, 100 mmol) Ethylendiamin gegeben und unter Rühren bei 0 °C eine Lösung von 7.4 g (33 mmol) Boc-Anhydrid in 30 ml THF über 30 Minuten zugetropft. Die

Reaktion wird eine weitere Stunde bei 0 °C gerührt, dann lässt man über Nacht auftauen. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und die erhaltene ölig-weiße Suspension mittels Hochvakuum zu einem weißen Feststoff getrocknet. Die Aufreinigung geschieht durch Kugelrohrdestillation, der Feststoff schmilzt bei etwa 120 °C und ab 160 °C (ca. 5 mbar) geht ein klare Flüssigkeit über.

Ausbeute 3.0 g (18.7 mmol, 56%) farbloses, viskoses Öl mit süßlichem Geruch

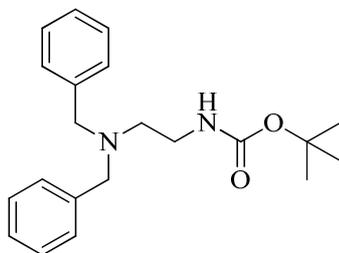
¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.45 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.46 (br. s., 2 H, NH₂), 2.79 (t, *J*=5.87 Hz, 2 H, CH₂NH₂), 3.17 (q, *J*=5.61 Hz, 2 H, CH₂CH₂NH₂), 5.19 (br. s., 1 H, NHCO)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 28.27 (3x CH₃), 41.73 (CH₂), 43.27 (CH₂), 78.97 (quartär, C(CH₃)₃), 156.14 (CO)

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur^[176].

tert-Butyl (2-(dibenzylamino)ethyl)carbamat (150)

Struktur



Laborkürzel AWT09
 Summenformel C₂₁H₂₈N₂O₂
 Molare Masse 340.46

Vorschrift In 3 ml THF werden 0.505 g (3.15 mmol) *N*-Boc-ethylendiamin (**149**) gelöst und 0.75 g (7.43 mmol) Triethylamin zugegeben (Stickstoffatmosphäre!). Unter Rühren werden 1.07 g (6.3 mmol) Benzylbromid hinzugegeben, nach 5 Minuten fällt ein feinkristalliner weißer Niederschlag aus. Nach weiteren 10 Minuten ist der Ansatz vollständig erstarrt, Reaktionskontrolle mit Loop-MS zeigt noch Edukt an, es werden daher 10 ml THF zugegeben und für 1 Stunde zum Rückfluss erhitzt, laut Loop-MS erfolgte vollständige Umsetzung. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt, der Rückstand mit 10 ml Ethylacetat versetzt und 3x mit 10 ml 10%iger Ammoniumchloridlösung und daraufhin mit 10 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel i. Vak. entfernt.

Ausbeute 1.2 g (3.5 mmol, 90%) farbloses, viskoses Öl

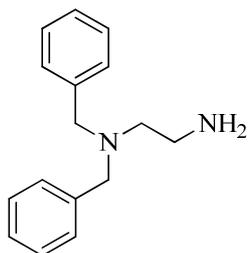
¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.42 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.53 (t, *J*=5.87 Hz, 2 H, CH₂), 3.19 (q, 2 H, CH₂), 3.57 (s, 4 H, N(CH₂-Phenyl)₂), 4.75 (br. s., 1 H, NHCO), 7.18 - 7.37 (m, 10 H)

¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 28.37 (3x CH₃), 37.98 (CH₂), 52.74 (CH₂), 58.27 (2x CH₂-Phenyl), 78.84 (quartär, C(CH₃)₃), 126.98 (2 C), 128.24 (4 C), 128.81 (4 C), 139.09 (quartär, 2 C), 155.90 (CO)

ESI-MS *m/z* = 341.2 [M+H]⁺, ber.: 340.22

N,N'-Dibenzylethan-1,2-diamin (151)

Struktur



Laborkürzel AWTo12
 Summenformel C₁₅H₁₈N₂
 Molare Masse 240.34

Vorschrift In 5 ml *n*-Propanol werden 1.0 g (2.94 mmol) *tert*-Butyl (2-(dibenzylamino)ethyl)carbamat (**150**) gelöst und 2 ml methanolische HCl (4 M) zugegeben, dann auf 60 °C erhitzt. Nach 30 Minuten wird auf Raumtemperatur abgekühlt und das gebildete Salz durch Zugabe von 50 ml Ethylacetat ausgefällt. Man dekantiert vom Lösungsmittel ab, gibt 50 ml Ethylacetat zu und setzt die Base durch Zugabe von 5 ml 10%iger Kalilauge unter Rühren frei. Die organische Phase wird mit 10 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. von Lösungsmittel befreit.

Ausbeute 604 mg (2.67 mmol, 91%) weißer, kristalliner Feststoff

¹H-NMR 400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 2.65 (t, *J*=5.87 Hz, 2 H, CH₂), 2.77 (t, *J*=6.06 Hz, 2 H, CH₂), 3.59 (s, 4 H, N(CH₂-Phenyl)₂), 4.57 (br. s., 2 H, NH₂), 7.18 - 7.38 (m, 10 H)

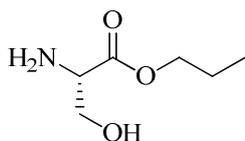
¹³C-NMR 100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 38.45 (CH₂NH₂), 53.73 (CH₂CH₂NH₂), 58.54 (2 C, N(CH₂-Phenyl)₂), 127.14 (2 C), 128.37 (4 C), 128.93 (4 C), 138.71 (quartär, 2 C)

ESI-MS *m/z* = 241.1 [M+H]⁺, ber.: 240.16

Das ¹H-NMR-Spektrum entspricht dem der Literatur^[177].

L-Serinpropylester (152)

Struktur



Laborkürzel AWTo7
 Summenformel C₆H₁₃NO₃
 Molare Masse 147.17

Vorschrift Es werden 45 g (428 mmol) L-Serin in 700 ml *n*-Propanol suspendiert und über einen Tropftrichter 120 ml (196 g, 1.65 mol) Thionylchlorid unter Rühren vorsichtig zugetropft. Es entwickelt sich eine lebhafte Gasentwicklung, wobei das Thionylchlorid so langsam zutropfen ist, dass das *n*-Propanol schwach siedet. Nach vollständiger Zugabe wird auf dem Ölbad für weitere 5 Stunden die Temperatur auf 65 °C gehalten, die Lösung ist am Ende der Reaktion klar. Reaktionskontrolle mittels Loop-MS zeigt mit [M+H]⁺= 148.1 nur die Produktmasse, es liegt kein Edukt mehr vor. Der Ansatz wird am Rotationsverdampfer von Lösungsmittel befreit, man erhält das L-Serinpropylester Hydrochlorid als weiß-kristallinen Feststoff. Um Reste von *n*-Propanol zu entfernen, wird der Feststoff in 100 ml Wasser bei 70 °C gelöst und das Lösemittel erneut i. Vak. entfernt. Nun liegt die Verbindung als wasserhaltiges Öl vor, das mit 50 ml konz. Ammoniaklösung versetzt und 4x mit je 50 ml Dichlormethan extrahiert wird. Die vereinigte organische Phase wird mit 20 ml

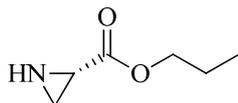
gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. von Lösungsmittel befreit. Die Substanz wird sofort weiterverarbeitet, da sie laut Aussage von Mitgliedern des AK Yudin instabil ist (Esterspaltung).

Ausbeute 52.88 g (359 mmol, 84%) gelblich-viskoses Öl

ESI-MS $m/z = 148.1 [M+H]^+$, ber.: 147.01

(S)-Propyl aziridin-2-carboxylat (153)

Struktur



Laborkürzel AWTo8

Summenformel $C_6H_{11}NO_2$

Molare Masse 129.16

Vorschrift Der gesamte Ansatz von Verbindung **152** (52.88 g, 0.36 mol L-Serinpropylester) wird in 500 ml Dichlormethan gelöst (1 Liter Rundkolben) und auf 0 °C abgekühlt. Es werden 113 g (0.43 mol) Triphenylphosphin über einen Pulvertrichter zugegeben. Dann spült man den Kolben mit Stickstoff und tropft über 30 Minuten mittels Spritze 84.8 ml (87.3 g, 0.43 mol) Diisopropyl-azodicarboxylat durch ein Septum zu (Stickstoffzufuhr und Druckausgleich!). Der zunächst hellrosa gefärbte Ansatz wird über Nacht bei Raumtemperatur hellbraun und bis zum zweiten Tag dunkelbraun. Zur Aufarbeitung wird der Ansatz bis auf die Hälfte i. Vak. eingeengt, dann 300 ml Diethylether zugegeben und das ausgefallene Triphenylphosphinoxid abfiltriert. Das Filtrat wird über Nacht im Eisfach (-20 °C) aufbewahrt und am nächsten Tag weiteres, auskristallisiertes Triphenylphosphinoxid abfiltriert. Dieses etherische Filtrat wird i. Vak. von Lösungsmittel befreit. Man erhält 97.3 g braunen, viskosen Rückstand, aus welchem das Aziridin mittels Kugelrohr-destillation isoliert wird (Hauptlauf etwa 10 mbar, 50-100 °C).

Ausbeute 18.32 g (0.14 mol, 39%) farbloses, dünnflüssiges Öl mit markantem Geruch

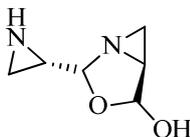
1H -NMR 400.13 MHz, $CDCl_3$: δ (ppm) = 0.97 (t, $J=7.40$ Hz, 3 H, CH_3), 1.35 (br. s., 1 H, NH), 1.70 (sxt, $J=7.40, 7.09$ Hz, 2 H, CH_2CH_3), 1.87 (dd, $J=5.46, 1.44$ Hz, 1 H, Azi- CHH), 2.01 (dd, $J=3.01, 1.51$ Hz, 1 H, Azi- CHH), 2.54 (dd, $J=5.40, 3.01$ Hz, 1 H, Azi- $CH-COOPropyl$), 4.05 - 4.21 (m, 2 H, OCH_2)

ESI-MS $m/z = 130.1 [M+H]^+$, ber.: 129.08

Das 1H -NMR-Spektrum entspricht der Literatur^[139].

Dimer von (S)-Aziridin-2-carboxaldehyd (154)

Struktur



Laborkürzel AWTo8

Summenformel $C_6H_{10}N_2O_2$

Molare Masse 142.16

Vorschrift In einem flamm-getrocknetem Kolben werden unter Stickstoff 3 g (23.3 mmol) (S)-Propyl aziridin-2-carboxylat (**153**) in 30 ml abs. Toluol (entnommen aus Grubbs-dry-solvent-system, Toronto)

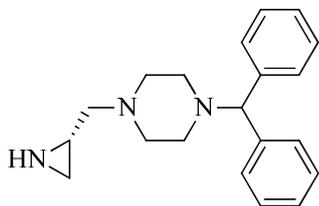
gelöst. Man kühlt im Trockeneis/Aceton-Kältebad auf $-73\text{ }^{\circ}\text{C}$ und tropft 20 ml (1.5 M, 30 mmol) DIBAL-H Lösung (Toluol) unter Rühren so langsam zu, dass die Temperatur nicht über $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ steigt (Zeitdauer 2 Stunden). Die Reaktion kann sehr gut am Temperaturanstieg kontrolliert werden, bis 16 ml DIBAL-H führte jeder Tropfen zu einem Anstieg um $2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nach weiteren 5 Stunden bei $-72\text{ }^{\circ}\text{C}$ quencht man vorsichtig mit 3 ml Methanol und lässt auf Raumtemperatur auftauen. Da nach 3 Stunden noch kein Aluminiumsalz ausgefallen ist, wird 1 ml einer Lösung von 2 g KH_2PO_4 und 3 g K_3PO_4 in 20 ml Wasser zugegeben, um Aluminium als Phosphat zu fällen. Man filtriert ab und wäscht den Rückstand gründlich mit 100 ml Methanol. Das Filtrat wird i. Vak. von Lösemittel befreit und das erhaltene viskose Öl säulenchromatographisch (Ethylacetat/Acetonitril/Methanol/Wasser = 70 / 5 / 2.5 / 2.5) aufgereinigt. Die Substanz ist im Eisfach aufzubewahren und baldmöglichst umzusetzen.

Ausbeute	0.71 g (5 mmol, 43%) wachsartige, farblose Substanz
R_f	0.15 (Ethylacetat/Acetonitril/Methanol/Wasser = 70 / 5 / 2.5 / 2.5)
$^1\text{H-NMR}$	400.13 MHz, CDCl_3 : δ (ppm) = 1.26 (d, $J=3.51$ Hz, 1 H), 1.63 - 1.74 (m, 2 H), 1.77 (d, $J=5.26$ Hz, 1 H), 1.87 (d, $J=6.63$ Hz, 1 H), 2.42 - 2.50 (m, 1 H), 2.63 (dd, $J=5.36, 3.41$ Hz, 1 H), 4.93 (br. s., 1 H), 5.28 (br. s., 1 H)

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum entspricht der Literatur^[139].

(S)-1-(Aziridin-2-ylmethyl)-4-benzhydrylpiperazin (155)

Struktur



Laborkürzel	AWTo3
Summenformel	$\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_3$
Molare Masse	307.43

Vorschrift

Allgemeine Vorschrift J
 308 mg (2.17 mmol) Dimer von (S)-Aziridin-2-carboxaldehyd (**154**)
 547 mg (2.17 mmol) 1-Benzhydrylpiperazin (**147**)
 150 mg (2.39 mmol) Natriumcyanoborhydrid
 633 mg (4.64 mmol) Zinkchlorid
 Elutionsmittel der Säulenchromatographie: Gradient von Dichlormethan/Methanol = 8:1 zu 4:1

Ausbeute

117 mg (0.38 mmol, 18%) farbloses, viskoses Öl

R_f

0.24 (Dichlormethan/Methanol = 9:1)

$^1\text{H-NMR}$

400.13 MHz, CDCl_3 : δ (ppm) = 1.37 (d, $J=3.51$ Hz, 1 H, Azi- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\underline{\text{H}}$), 1.79 (d, $J=5.77$ Hz, 1 H, Azi- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\underline{\text{H}}$), 2.06 - 2.19 (m, $J=5.77, 5.65, 5.65, 3.64$ Hz, 1 H, Azi- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 2.29 - 2.82 (m, 11 H, Piperazin (8H), Piperazin- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$ -Azi (2H) und $\underline{\text{N}}\underline{\text{H}}$), 4.25 (s, 1 H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ -Diphenyl) 7.14 - 7.21 (m, 2 H), 7.24 - 7.30 (m, 4 H), 7.37 - 7.45 (m, 4 H)

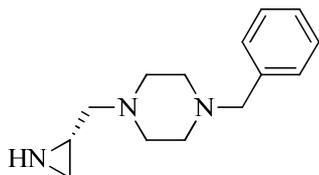
$^{13}\text{C-NMR}$

100.61 MHz, CDCl_3 : δ (ppm) = 23.89 (Azi- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 27.75 (Azi- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 51.75 (2 C, Piperazin- $\underline{\text{N}}(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2)_2$), 53.86 (2 C, Piperazin- $\underline{\text{N}}(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2)_2$), 62.85 (Piperazin- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$ -Azi), 76.20 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ -Diphenyl), 126.90 (2 C), 127.93 (2 C), 127.95 (2 C), 128.45 (4 C), 142.72 (quartär), 142.73 (quartär)

FT-IR	λ^{-1} (cm ⁻¹) = 3059, 3025, 2933, 2807, 1598, 1491, 1450, 1332, 1303, 1136, 1076, 1006, 909, 849, 729, 704
ESI-MS	m/z = 308.2 [M+H] ⁺ , ber.: 307.20
LC	Reinheit 87.0% (254 nm), R _t = 1.0 min, Methode 5Bshort

(S)-1-(Aziridin-2-ylmethyl)-4-benzylpiperazin (156)

Struktur



Laborkürzel	AWTo18
Summenformel	C ₁₄ H ₂₁ N ₃
Molare Masse	231.34

Vorschrift

Allgemeine Vorschrift J
200 mg (1.41 mmol) Dimer von (S)-Aziridin-2-carboxaldehyd (**154**)
248 mg (1.41 mmol) 1-Benzylpiperazin (**148**)
98 mg (1.55 mmol) Natriumcyanoborhydrid
411 mg (3.02 mmol) Zinkchlorid
Elutionsmittel der Säulenchromatographie: Gradient von Dichlormethan/Methanol = 8:1 zu 4:1

Ausbeute

56 mg (0.24 mmol, 17%) farbloses Öl

R_f

0.14 (Dichlormethan/Methanol = 9:1)

¹H-NMR

400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.39 (br. s., 1 H, Azi-CHH), 1.81 (br. s., 1 H, Azi-CHH), 2.13 (br. s., 1 H, Azi-CH-CH₂), 2.27 - 2.43 (m, 2 H, Piperazin-CH₂-Azi), 2.42 - 2.73 (m, 8 H, Piperazin), 3.51 (br. s., 2 H, Phenyl-CH₂), 7.20 - 7.34 (m, 5 H, Phenyl)

¹³C-NMR

100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 23.94 (Azi-CH₂), 27.84 (br. s., Azi-CH), 52.85 (2 C, Piperazin-N(CH₂)₂), 53.50 (2 C, Piperazin-N(CH₂)₂), 62.50 (br. s., Piperazin-CH₂-(Azi)), 62.96 (Phenyl-CH₂-Piperazin), 126.94, 128.11 (2 C), 129.10 (2 C), 137.96 (quartär)

FT-IR

λ^{-1} (cm⁻¹) = 3266, 2937, 2810, 1495, 1455, 1332, 1296, 1134, 1007, 930, 824, 740, 697

ESI-MS

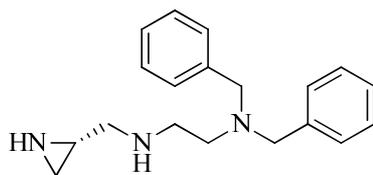
m/z = 232.2 [M+H]⁺, ber.: 231.17

LC

Reinheit > 99% (254 nm), R_t = 0.7 min, Methode 5Bshort

(S)-N¹-(Aziridin-2-ylmethyl)-N²,N²-dibenzylethan-1,2-diamin (157)

Struktur



Laborkürzel

AWTo19_F7

Summenformel

C₁₉H₂₅N₃

Molare Masse

295.42

Vorschrift

Allgemeine Vorschrift J

200 mg (1.41 mmol) Dimer von (S)-Aziridin-2-carboxaldehyd (**154**)

339 mg (1.41 mmol) N¹,N¹-Dibenzylethan-1,2-diamin (**151**)

98 mg (1.55 mmol) Natriumcyanoborhydrid

411 mg (3.02 mmol) Zinkchlorid

Elutionsmittel der Säulenchromatographie: Gradient von Dichlormethan/Methanol = 8:1 zu 4:1.

Die Isolierung als Reinprodukt ist aufgrund der schlechten Trennleistung an Kieselgel nicht gelungen.

Ausbeute

110 mg (0.37 mmol, 26%) blassgelbes Öl

R_f

0.18 (Dichlormethan/Methanol = 8:1)

¹H-NMR

400.13 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 1.74 - 1.88 (m, 1H, Azi-CHH), 2.01 - 2.16 (m, 1 H, Azi-CHH), 2.40 - 2.59 (m, Azi-CH-CH₂, Ethylendiamin-CH₂), 2.63 (br. s., 1 H, Azi-CH-CH₂), 2.74 - 3.01 (m, Ethylendiamin-CH₂), 3.45 - 3.77 (m, 4 H, 2x Phenyl-CH₂), 7.17 - 7.41 (m, 10 H)

¹³C-NMR

100.61 MHz, CDCl₃: δ (ppm) = 23.12 (Azi-CH₂), 30.66 (Azi-CH), 49.93 (CH₂ Ethylendiamin), 52.17 (CH₂ Ethylendiamin), 53.26 (Azi-CH-CH₂-Ethylendiamin), 58.72 (Phenyl-CH₂), 58.91 (Phenyl-CH₂), 126.84, 126.88, 128.14 (4 C), 128.62 (2 C), 128.72 (2 C), 139.49 (quartär), 139.54 (quartär)

FT-IR

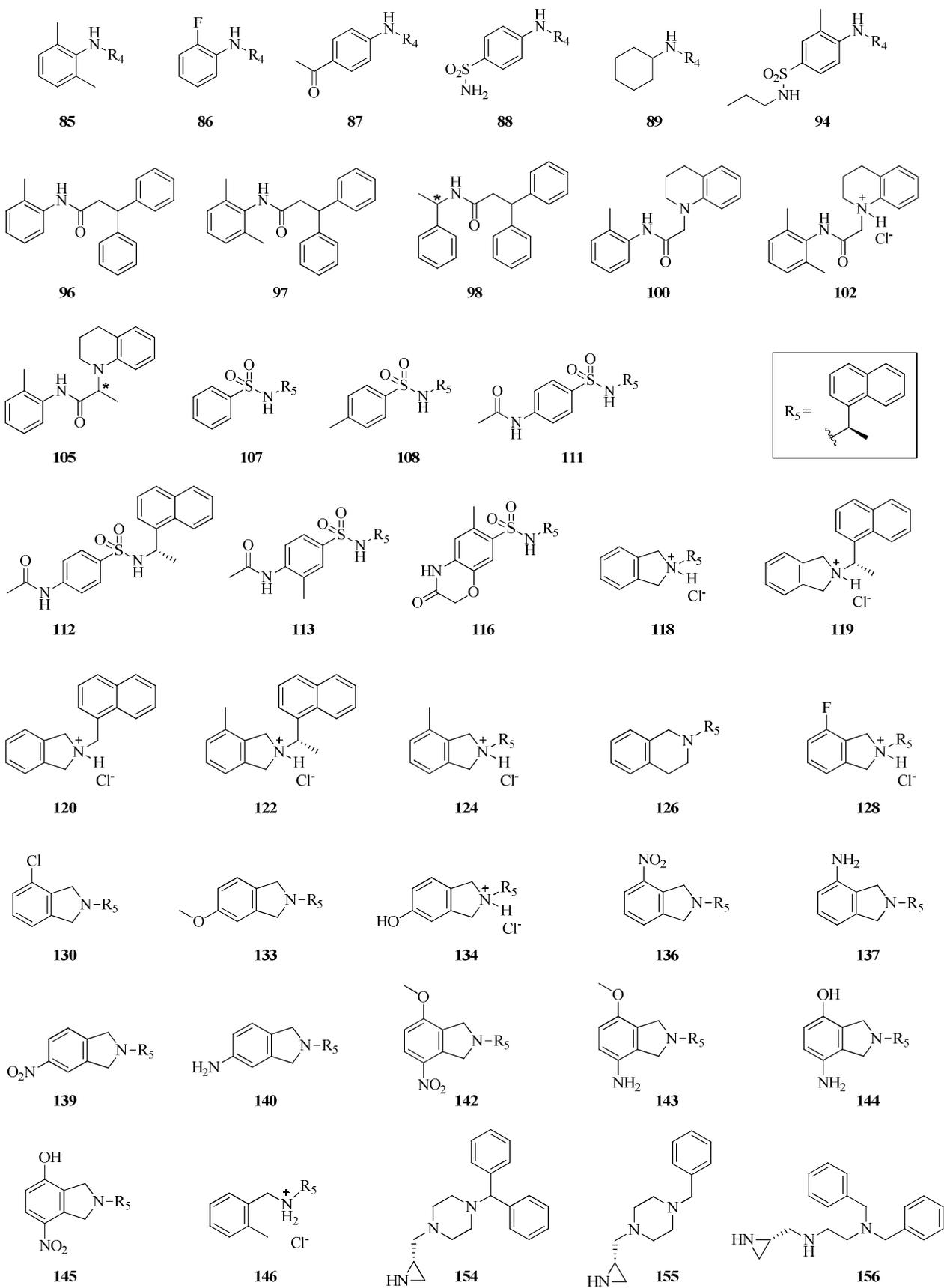
λ⁻¹ (cm⁻¹) = 3026, 2806, 1601, 1494, 1451, 1365, 1237, 1112, 1070, 1027, 971, 906, 849, 814, 734, 697

ESI-MS

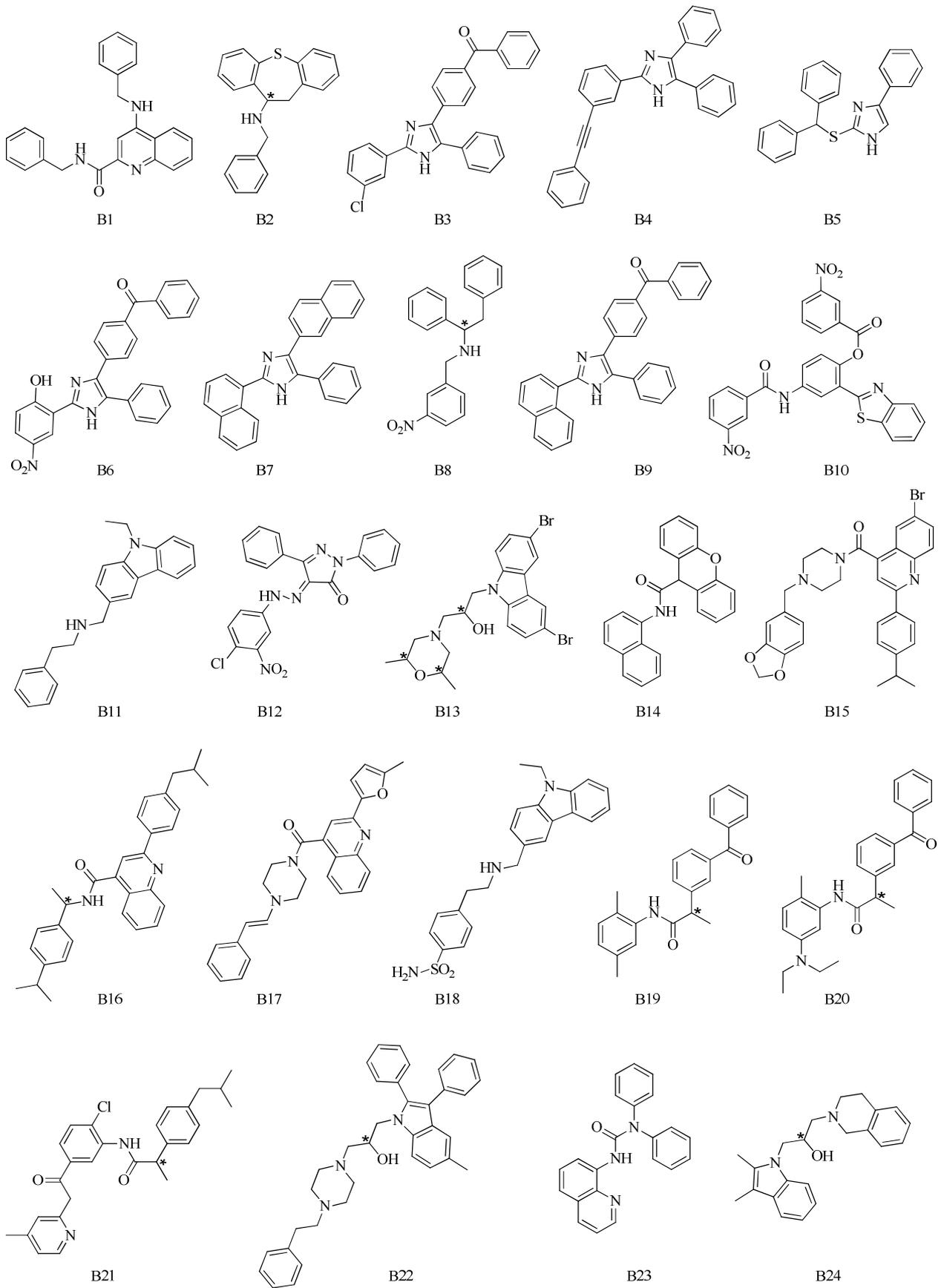
m/z = 296.3 [M+H]⁺, ber.: 295.20

Reinheit

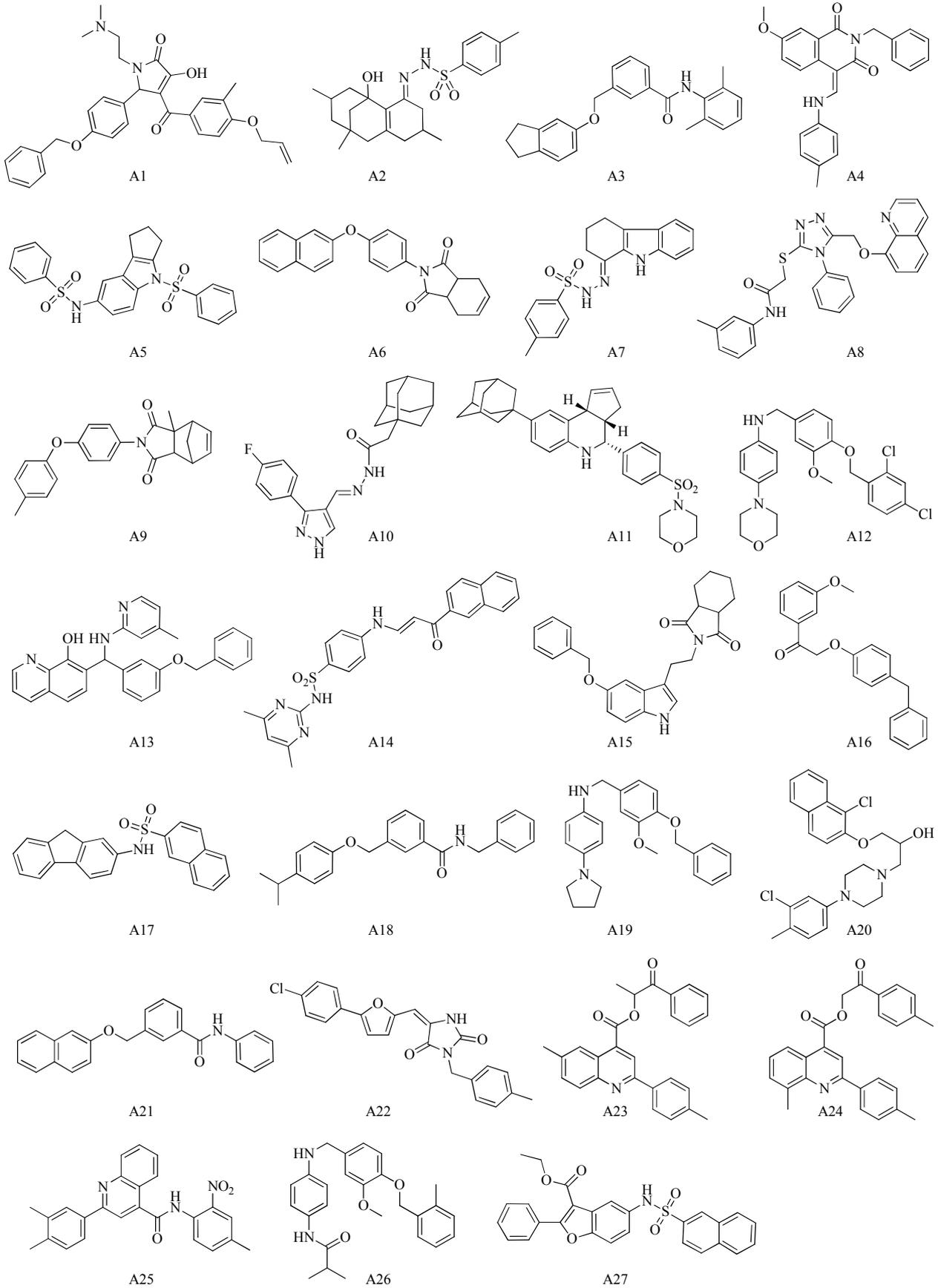
Keine Auftrennung (LC) mit Methode 5Bshort bei UV-detektierbaren Konzentrationen. Bei geringerer Injektion erfolgt eine Auftrennung in 4 Peaks, Integration des +TIC führt zu 51% der Produktmasse 296.3, wobei in den anderen Peaks Verunreinigungen mit den Massen 349.3, 320.3 und 297.3 enthalten sind. Auf Basis des +TIC würde damit eine Reinheit von ca. 50-55% abgeschätzt, vorausgesetzt die Substanzen besitzen gleiche Massenempfindlichkeit.



Kommerziell erworbene Substanzen, getestet auf Inhibition der SARS-CoV-Papain-like-Protease



Kommerziell erworbene Substanzen, getestet auf Inhibition des HIV-1 Vif-vermittelten A3G-Abbaus



Literaturverzeichnis

- ¹ Lichtenthaler, F. W.
Hundert Jahre Schluessel-Schloss-Prinzip: Was fuehrte Emil Fischer zu dieser Analogie?
Angewandte Chemie, **1994**, 106, 2456-2467
- ² Robert Koch-Institut
Schweres Akutes Respiratorisches Syndrom (SARS), Stand: 17.04.2003
<http://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/S/SARS/SARS-Corona.html>
Datum des letzten Webseitenzugriffs: Januar 2013
- ³ Skowronski, D.; Astell, C.; Brunham, R.; Low, D.; Petric, M.; Roper, R.; Talbot, P.; Tam, T. & Babiuk, L.
Severe acute respiratory syndrome (SARS): a year in review
Annu. Rev. Med., **2005**, 56, 357-381
Kuhn, J.; Radoshitzky, S.; LI, W. & Wong, S.
The SARS Coronavirus receptor ACE2 therapy
New Concepts of Antiviral Therapy, **2006**, 397
- ⁴ Balboni, A.; Battilani, M. & Prosperi, S.
The SARS-like coronaviruses: the role of bats and evolutionary relationships with SARS coronavirus
New Microbiol, **2012**, 35, 1-16
- ⁵ Perlman, S. & Zhao, J.
Human Coronavirus EMC Is Not the Same as Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus
mBio, **2013**, 4
- ⁶ Harcourt, B.; Jukneliene, D.; Kanjanahaluethai, A.; Bechill, J.; Severson, K.; Smith, C.; Rota, P. & Baker, S.
Identification of severe acute respiratory syndrome coronavirus replicase products and characterization of papain-like protease activity
Journal of Virology, **2004**, 78, 13600-13612
- ⁷ McBride, R. & Fielding, B.
The Role of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)-Coronavirus Accessory Proteins in Virus Pathogenesis
Viruses, **2012**, 4, 2902-2923
- ⁸ Satija, N. & Lal, S.
The molecular biology of SARS coronavirus
Annals of the New York Academy of Sciences, **2007**, 1102, 26-38
- ⁹ Stertz, S.; Reichelt, M.; Spiegel, M.; Kuri, T.; Martinez-Sobrido, L.; Garcia-Sastre, A.; Weber, F. & Kochs, G.
The intracellular sites of early replication and budding of SARS-coronavirus
Virology, **2007**, 361, 304-315
- ¹⁰ Kwong, A.; Rao, B. & Jeang, K.
Viral and cellular RNA helicases as antiviral targets
Nature Reviews Drug Discovery, **2005**, 4, 845-853
- ¹¹ Geller, C.; Varbanov, M. & Duval, R.
Human Coronaviruses: Insights into Environmental Resistance and Its Influence on the Development of New Antiseptic Strategies
Viruses, **2012**, 4, 3044-3068
- ¹² Stockman, L.; Bellamy, R. & Garner, P.
SARS: systematic review of treatment effects
PLoS Medicine, **2006**, 3, e343, 1525-1531

- ¹³ Pogrebnyak, N.; Golovkin, M.; Andrianov, V.; Spitsin, S.; Smirnov, Y.; Egolf, R. & Koprowski, H.
Severe acute respiratory syndrome (SARS) S protein production in plants: development of recombinant vaccine
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **2005**, 102, 9062-9067
- ¹⁴ Shim, B.; Stadler, K.; Nguyen, H.; Yun, C.; Kim, D.; Chang, J.; Czerkinsky, C. & Song, M.
Sublingual immunization with recombinant adenovirus encoding SARS-CoV spike protein induces systemic and mucosal immunity without redirection of the virus to the brain
Virology Journal, **2012**, 9, 215
- ¹⁵ Tanner, J.; Zheng, B.; Zhou, J.; Watt, R.; Jiang, J.; Wong, K.; Lin, Y.; Lu, L.; He, M.; Kung, H. & others
The adamantane-derived bananins are potent inhibitors of the helicase activities and replication of SARS coronavirus
Chemistry & Biology, **2005**, 12, 303-311
Wang, Z.; Huang, J.; Wong, K.; Wang, P.; Zhang, H.; Tanner, J.; Spiga, O.; Bernini, A.; Zheng, B. & Niccolai, N.
On the mechanisms of bananin activity against severe acute respiratory syndrome coronavirus
FEBS Journal, **2011**, 278, 383-389
Keum, Y. & Jeong, Y.
Development of Chemical Inhibitors of the SARS Coronavirus: Viral Helicase as a Potential Target
Biochemical Pharmacology, **2012**, 84, 1351-1358
- ¹⁶ Yang, H.; Xie, W.; Xue, X.; Yang, K.; Ma, J.; Liang, W.; Zhao, Q.; Zhou, Z.; Pei, D.; Ziebuhr, J. & others
Design of wide-spectrum inhibitors targeting coronavirus main proteases
PLoS Biology, **2005**, 3, e324
Xue, X.; Yu, H.; Yang, H.; Xue, F.; Wu, Z.; Shen, W.; Li, J.; Zhou, Z.; Ding, Y.; Zhao, Q. & others
Structures of two coronavirus main proteases: implications for substrate binding and antiviral drug design
Journal of Virology, **2008**, 82, 2515-2527
- ¹⁷ Chou, C.; Chien, C.; Han, Y.; Prebanda, M.; Hsieh, H.; Turk, B.; Chang, G. & Chen, X.
Thiopurine analogues inhibit papain-like protease of severe acute respiratory syndrome coronavirus
Biochemical Pharmacology, **2008**, 75, 1601-1609
- ¹⁸ Ratia, K.; Pegan, S.; Takayama, J.; Sleeman, K.; Coughlin, M.; Baliji, S.; Chaudhuri, R.; Fu, W.; Prabhakar, B.; Johnson, M. & others
A noncovalent class of papain-like protease/deubiquitinase inhibitors blocks SARS virus replication
Proceedings of the National Academy of Sciences, **2008**, 105, 16119-16124
- ¹⁹ Ghosh, A.; Takayama, J.; Aubin, Y.; Ratia, K.; Chaudhuri, R.; Baez, Y.; Sleeman, K.; Coughlin, M.; Nichols, D.; Mulhearn, D. & others
Structure-Based Design, Synthesis, and Biological Evaluation of a Series of Novel and Reversible Inhibitors for the Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus Papain-like Protease
Journal of Medicinal Chemistry, **2009**, 52, 5228-5240
- ²⁰ Ghosh, A.; Takayama, J.; Rao, K.; Ratia, K.; Chaudhuri, R.; Mulhearn, D.; Lee, H.; Nichols, D.; Baliji, S.; Baker, S. & others
Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Papain-like Novel Protease Inhibitors: Design, Synthesis, Protein- Ligand X-ray Structure and Biological Evaluation
Journal of Medicinal Chemistry, **2010**, 53, 4968-4979
- ²¹ Park, J.; Jae, J.; Hoon, K.; Min, K.; Park, S.; Kim, D.; Hun, P.; Song, L. & Bae, R.
Diarylheptanoids from *Alnus japonica* Inhibit Papain-Like Protease of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus.
Biological & Pharmaceutical Bulletin, **2012**, 35, 2036-2042
- ²² Han, YS; Chang, G.; Juo, C.; Lee, H.; Yeh, S.; Hsu, J. & Chen, X.
Papain-like protease 2 (PLP2) from severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV): expression, purification, characterization, and inhibition
Biochemistry, **2005**, 44, 10349-10359

- ²³ Rawlings, N.; Tolle, D. & Barrett, A.
MEROPS: the peptidase database
Nucleic Acids Research, **2004**, 32, D160-D164
- ²⁴ Daviet, L. & Colland, F.
Targeting ubiquitin specific proteases for drug discovery
Biochimie, **2008**, 90, 270-283
- ²⁵ Barretto, N.; Jukneliene, D.; Ratia, K.; Chen, Z.; Mesecar, A. & Baker, S.
The papain-like protease of severe acute respiratory syndrome coronavirus has deubiquitinating activity
Journal of Virology, **2005**, 79, 15189-15198
- ²⁶ Polgar, L.
The catalytic triad of serine peptidases
Cellular and Molecular Life Sciences, **2005**, 62, 2161-2172
- ²⁷ Schechter, I. & Berger, A.
On the size of the active site in proteases. I. Papain.
Biochemical and Biophysical Research Communications, **1967**, 27, 157-162
- ²⁸ Lindner, H.; Fotouhi-Ardakani, N.; Lytvyn, V.; Lachance, P.; Sulea, T. & Ménard, R.
The papain-like protease from the severe acute respiratory syndrome coronavirus is a deubiquitinating enzyme
Journal of Virology, **2005**, 79, 15199-15208
- ²⁹ Lindner, H.
Deubiquitination in virus infection
Virology, **2007**, 362, 245-256
- ³⁰ Alvarez, E.; DeDiego, M.; Nieto-Torres, J.; Jimenez-Guardeno, J.; Marcos-Villar, L. & Enjuanes, L.
The envelope protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus interacts with the non-structural protein 3 and is ubiquitinated
Virology, **2010**, 402, 281-291
- ³¹ Frieman, M.; Ratia, K.; Johnston, R.; Mesecar, A. & Baric, R.
Severe acute respiratory syndrome coronavirus papain-like protease ubiquitin-like domain and catalytic domain regulate antagonism of IRF3 and NF- κ B signaling
Journal of Virology, **2009**, 83, 6689-6705
- ³² Sun, L.; Xing, Y.; Chen, X.; Zheng, Y.; Yang, Y.; Nichols, D.; Clementz, M.; Banach, B.; Li, K.; Baker, S. & others
Coronavirus Papain-like Proteases Negatively Regulate Antiviral Innate Immune Response through Disruption of STING-Mediated Signaling
PloS One, **2012**, 7, e30802
- ³³ Crowe, S. M.; Carlin, J. B.; Stewart, K. I.; Lucas, C. R. & Hoy, J. F.
Predictive value of CD4 lymphocyte numbers for the development of opportunistic infections and malignancies in HIV-infected persons
Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, **1991**, 4, 770-776
- ³⁴ Robert Koch-Institut
Epidemiologisches Bulletin Nr.47, Stand 26.11.2012
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2012/Ausgaben/47_12.pdf?__blob=publicationFile
Datum des letzten Webseitenzugriffs: Januar 2013
- ³⁵ U.S. Global Health Policy
The Global HIV/AIDS Epidemic, Stand Dez. 2012
<http://www.kff.org/hiv/aids/upload/3030-17.pdf>
Datum des letzten Webseitenzugriffs: Januar 2013

UNAIDS - Joint United Nations Programme on HIV/AIDS

Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2012, Stand 2012

http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/20121120_UNAIDS_Global_Report_2012_en.pdf

Datum des letzten Webseitenzugriffs: Januar 2013

- ³⁶ Zhu, P.; Liu, J.; Bess, J.; Chertova, E.; Lifson, J. D.; Grisé, H.; Ofek, G. A.; Taylor, K. A. & Roux, K. H.
Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes
Nature, **2006**, 441, 847-852
- ³⁷ Checkley, M. A.; Lutge, B. G. & Freed, E. O.
HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation
Journal of Molecular Biology, **2011**, 410, 582-608
- ³⁸ Vicenzi, E. & Poli, G.
Novel factors interfering with human immunodeficiency virus-type 1 replication in vivo and in vitro
Tissue Antigens, **2013**, 81, 61-71
- ³⁹ van Harmelen, J.; Wood, R.; Lambrick, M.; Rybicki, E. P.; Williamson, A.-L. & Williamson, C.
An association between HIV-1 subtypes and mode of transmission in Cape Town, South Africa
Aids, **1997**, 11, 81-87
- Jaffar, S.; Grant, A. D.; Whitworth, J.; Smith, P. G. & Whittle, H.
The natural history of HIV-1 and HIV-2 infections in adults in Africa: a literature review
Bulletin of the World Health Organization, **2004**, 82, 462-469
- ⁴⁰ Peterlin, B.; Trono, D. & others
Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication
Nature Reviews Immunology, **2003**, 3, 97-107
- Frankel, A. & Young, J.
HIV-1: fifteen proteins and an RNA
Annual Review of Biochemistry, **1998**, 67, 1-25
- ⁴¹ Bebenek, K.; Abbotts, J.; Roberts, J.; Wilson, S. & Kunkel, T.
Specificity and mechanism of error-prone replication by human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase.
Journal of Biological Chemistry, **1989**, 264, 16948-16956
- ⁴² Valtierra, H.
Stability of viral pathogens in the laboratory environment
Applied Biosafety, **2008**, 13, 21
- ⁴³ Abdala, N.; Crowe, M.; Tolstov, Y. & Heimer, R.
Survival of human immunodeficiency virus type 1 after rinsing injection syringes with different cleaning solutions
Substance use & misuse, **2004**, 39, 581-600
- ⁴⁴ Girard, M. P.; Osmanov, S. K. & Kieny, M. P.
A review of vaccine research and development: the human immunodeficiency virus (HIV)
Vaccine, **2006**, 24, 4062-4081
- ⁴⁵ De Clercq, E.
Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV
International Journal of Antimicrobial Agents, **2009**, 33, 307-320
- ⁴⁶ Gazzard, B.
British HIV Association guidelines for the treatment of HIV-1-infected adults with antiretroviral therapy 2008
HIV Medicine, **2008**, 9, 563-608

- ⁴⁷ Vigerust, D. & Shepherd, V.
Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions
Trends in Microbiology, **2007**, 15, 211-218
- ⁴⁸ Yu, X.; Yu, Y.; Liu, B.; Luo, K.; Kong, W.; Mao, P. & Yu, X.
Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex
Science, **2003**, 302, 1056-1060
Mangeat, B.; Turelli, P.; Caron, G.; Friedli, M.; Perrin, L. & Trono, D.
Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts
Nature, **2003**, 424, 99-103
Goff, S.
Retrovirus restriction factors
Molecular Cell, **2004**, 16, 849-859
- ⁴⁹ Reingewertz, T.H.; E Shalev, D. & Friedler, A.
Structural disorder in the HIV-1 Vif protein and interaction-dependent gain of structure
Protein and Peptide Letters, **2010**, 17, 988-998
- ⁵⁰ Bergeron, J.; Huthoff, H.; Veselkov, D.; Beavil, R.; Simpson, P.; Matthews, S.; Malim, M. & Sanderson, M.
The SOCS-box of HIV-1 Vif interacts with ElonginBC by induced-folding to recruit its Cul5-containing ubiquitin ligase complex
PLoS Pathogens, **2010**, 6, e1000925
- ⁵¹ Stanley, B.; Ehrlich, E.; Short, L.; Yu, Y.; Xiao, Z.; Yu, X. & Xiong, Y.
Structural insight into the human immunodeficiency virus Vif SOCS box and its role in human E3 ubiquitin ligase assembly
Journal of Virology, **2008**, 82, 8656-8663
- ⁵² Nathans, R.; Cao, H.; Sharova, N.; Ali, A.; Sharkey, M.; Stranska, R.; Stevenson, M. & Rana, T.
Small-molecule inhibition of HIV-1 Vif
Nature Biotechnology, **2008**, 26, 1187-1192
Ali, A.; Wang, J.; Nathans, R.; Cao, H.; Sharova, N.; Stevenson, M. & Rana, T.
Synthesis and Structure-Activity Relationship Studies of HIV-1 Virion Infectivity Factor (Vif) Inhibitors that Block Viral Replication
ChemMedChem, **2012**, 7, 1217-1229
- ⁵³ Cen, S.; Peng, Z.; Li, X.; Li, Z.; Ma, J.; Wang, Y.; Fan, B.; You, X.; Wang, Y.; Liu, F. & others
Small molecular compounds inhibit HIV-1 replication through specifically stabilizing APOBEC3G
Journal of Biological Chemistry, **2010**, 285, 16546-16552
- ⁵⁴ Zuo, T.; Liu, D.; Lv, W.; Wang, X.; Wang, J.; Lv, M.; Huang, W.; Wu, J.; Zhang, H.; Jin, H. & others
Small-Molecule Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication by Targeting the Interaction between Vif and ElonginC
Journal of Virology, **2012**, 86, 5497-5507
- ⁵⁵ Monajemi, M.; Woodworth, C.; Benkaroun, J.; Grant, M. & Larijani, M.
Emerging complexities of APOBEC3G action on immunity and viral fitness during HIV infection and treatment
Retrovirology, **2012**, 9, 35
- ⁵⁶ Akhtar, L. & Benveniste, E.
Viral exploitation of host SOCS protein functions
Journal of Virology, **2011**, 85, 1912-1921
- ⁵⁷ Porkka, K.; Saramäki, O.; Tanner, M. & Visakorpi, T.
Amplification and overexpression of Elongin C gene discovered in prostate cancer by cDNA microarrays
Laboratory Investigation, **2002**, 82, 629-638

- ⁵⁸ Li, X.; Liang, D.; Lin, X.; Robertson, E. & Lan, K.
Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded latency-associated nuclear antigen reduces interleukin-8 expression in endothelial cells and impairs neutrophil chemotaxis by degrading nuclear p65
Journal of Virology, **2011**, 85, 8606-8615
- Cai, Q.; Knight, J.; Verma, S.; Zald, P. & Robertson, E.
EC5S ubiquitin complex is recruited by KSHV latent antigen LANA for degradation of the VHL and p53 tumor suppressors
PLoS Pathogens, **2006**, 2, e116
- ⁵⁹ Mandriota, S.; Turner, K.; Davies, D.; Murray, P.; Morgan, N.; Sowter, H.; Wykoff, C.; Maher, E.; Harris, A.; Ratcliffe, P. & others
HIF activation identifies early lesions in VHL kidneys: evidence for site-specific tumor suppressor function in the nephron
Cancer Cell, **2002**, 1, 459-468
- Bader, H. & Hsu, T.
Systemic VHL gene functions and the VHL disease
FEBS Letters, **2012**, 586, 1562-1569
- ⁶⁰ Russell, R. & Ohh, M.
NEDD8 acts as a 'molecular switch' defining the functional selectivity of VHL
EMBO Reports, **2008**, 9, 486-491
- ⁶¹ Haley, S.
The next big thing in drug development may be the ubiquitin pathway
Pharmaceutical Approvals Monthly, **2010**, 15, 3
- ⁶² Nishio, M.
The CH/ π hydrogen bond in chemistry. Conformation, supramolecules, optical resolution and interactions involving carbohydrates
Physical Chemistry Chemical Physics, **2011**, 13, 13873-13900
- ⁶³ Suezawa, H.; Hashimoto, T.; Tsuchinaga, K.; Yoshida, T.; Yuzuri, T.; Sakakibara, K.; Hirota, M. & Nishio, M.
Electronic substituent effect on intramolecular CH/ π interaction as evidenced by NOE experiments
Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2, **2000**, 1243-1249
- ⁶⁴ Molecular Operating Environment (MOE); Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2012.
Es fanden die MOE-Versionen 2009.10 und 2010.10 Anwendung.
- ⁶⁵ Wang, Y.; Saebo, S. & Pittman, C.
The structure of aniline by ab initio studies
Journal of Molecular Structure: THEOCHEM, **1993**, 281, 91-98
- ⁶⁶ Szatylowicz, H.
Structural aspects of the intermolecular hydrogen bond strength: H-bonded complexes of aniline, phenol and pyridine derivatives
Journal of Physical Organic Chemistry, **2008**, 21, 897-914
- ⁶⁷ Klebe, G.
Wirkstoffdesign: Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen
Spektrum Akademischer Verlag, **2009**
- ⁶⁸ Hendlich, M.; Bergner, A.; Günther, J. & Klebe, G.
Relibase: Design and Development of a Database for Comprehensive Analysis of Protein-Ligand Interactions
Journal of Molecular Biology, **2003**, 326, 607 - 620

- ⁶⁹ Gilli, G. & Gilli, P.
Towards an unified hydrogen-bond theory
Journal of Molecular Structure, **2000**, 552, 1-15
- ⁷⁰ Reynisson, J. & McDonald, E.
Tuning of hydrogen bond strength using substituents on phenol and aniline: A possible ligand design strategy
Journal of Computer-Aided Molecular Design, **2004**, 18, 421-431
- ⁷¹ Goodford, P. J.
A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules
Journal of Medicinal Chemistry, **1985**, 28, 849-857
- ⁷² Ratia, K.; Saikatendu, K.; Santarsiero, B.; Barretto, N.; Baker, S.; Stevens, R. & Mesecar, A.
Severe acute respiratory syndrome coronavirus papain-like protease: structure of a viral deubiquitinating enzyme
Proceedings of the National Academy of Sciences, **2006**, 103, 5717-5722
- ⁷³ Chaudhuri, R.; Tang, S.; Zhao, G.; Lu, H.; Case, D. & Johnson, M.
Comparison of SARS and NL63 Papain-Like Protease Binding Sites and Binding Site Dynamics: Inhibitor Design Implications
Journal of Molecular Biology, **2011**, 414, 272-288
- ⁷⁴ Jones, G.; Willett, P. & Glen, R.
Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation
Journal of Molecular Biology, **1995**, 245, 43-53
- ⁷⁵ Verdonk, M.; Cole, J.; Hartshorn, M.; Murray, C. & Taylor, R.
Improved protein-ligand docking using GOLD
Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, **2003**, 52, 609-623
Es fanden die GOLD-Versionen 4.0, 4.1 und 5.0 Anwendung.
- ⁷⁶ Jones, G.; Willett, P.; Glen, R.; Leach, A.; Taylor, R. & others
Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking
Journal of Molecular Biology, **1997**, 267, 727-748
- ⁷⁷ Cambridge Crystallographic Data Centre
GOLD Help, Stand 2010
http://www.ccdc.cam.ac.uk/support/documentation/gold/5_0/gold/gold.1.77.html
Datum des letzten Webseitenzugriffs: Januar 2013
- ⁷⁸ Korb, O.; Stützle, T. & Exner, T.
Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS
Journal of Chemical Information and Modeling, **2009**, 49, 84-96
- ⁷⁹ Cambridge Crystallographic Data Centre
GOLD Help, Stand 2010
http://www.ccdc.cam.ac.uk/support/documentation/gold/5_0/gold/gold.1.96.html
Datum des letzten Webseitenzugriffs: Januar 2013
- ⁸⁰ Mooij, W. & Verdonk, M.
General and targeted statistical potentials for protein-ligand interactions
Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, **2005**, 61, 272-287
- ⁸¹ Neudert, G. & Klebe, G.
fconv: format conversion, manipulation and feature computation of molecular data
Bioinformatics, **2011**, 27, 1021-1022

- ⁸² Brameld, K.; Kuhn, B.; Reuter, D. & Stahl, M.
Small molecule conformational preferences derived from crystal structure data. A medicinal chemistry focused analysis
Journal of Chemical Information and Modeling, **2008**, 48, 1-24
- ⁸³ Rios, M. & Rodriguez, J.
Semiempirical study of compounds with O-H/O intramolecular hydrogen bond
Journal of Computational Chemistry, **2004**, 13, 860-866
- ⁸⁴ Seifert, M. H.
Targeted scoring functions for virtual screening
Drug Discovery Today, **2009**, 14, 562-569
- ⁸⁵ Proctor, E. A.; Yin, S.; Tropsha, A. & Dokholyan, N. V.
Discrete Molecular Dynamics Distinguishes Nativelike Binding Poses from Decoys in Difficult Targets
Biophysical Journal, **2012**, 102, 144-151
- ⁸⁶ Homeyer, N. & Gohlke, H.
Free Energy Calculations by the Molecular Mechanics Poisson- Boltzmann Surface Area Method
Molecular Informatics, **2012**, 31, 114-122
- ⁸⁷ Rastelli, G.; Rio, A. D.; Degliesposti, G. & Sgobba, M.
Fast and accurate predictions of binding free energies using MM-PBSA and MM-GBSA
Journal of Computational Chemistry, **2010**, 31, 797-810
- ⁸⁸ OpenEye Scientific Software
Softwarepaket OMEGA von Openeye: OEChem, Version 1.7.4, OpenEye Scientific Software, Inc., Santa Fe, NM, USA, <http://www.eyesopen.com>
Hawkins, P.; Skillman, A.; Warren, G.; Ellingson, B. & Stahl, M.
Conformer generation with OMEGA: algorithm and validation using high quality structures from the Protein Databank and Cambridge Structural Database
Journal of Chemical Information and Modeling, **2010**, 50, 572-584
- ⁸⁹ Bender, A. & Glen, R.
A discussion of measures of enrichment in virtual screening: comparing the information content of descriptors with increasing levels of sophistication
Journal of Chemical Information and Modeling, **2005**, 45, 1369-1375
- ⁹⁰ Chen, Z.; Li, H.; Zhang, Q.; Bao, X.; Yu, K.; Luo, X.; Zhu, W. & Jiang, H.
Pharmacophore-based virtual screening versus docking-based virtual screening: a benchmark comparison against eight targets
Acta Pharmacologica Sinica, **2009**, 30, 1694-1708
- ⁹¹ ZINC Database
Download der Datenbanken im Jahr 2009 von: <http://zinc.docking.org>
Irwin, J.; Sterling, T.; Mysinger, M.; Bolstad, E. & Coleman, R.
ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology
Journal of Chemical Information and Modeling, **2012**, 52, 1757-1768
- ⁹² Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W. & Feeney, P. J.
Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings
Advanced Drug Delivery Reviews, **1997**, 23, 3 - 25
- ⁹³ Reynolds, C. H.; Bembenek, S. D. & Tounge, B. A.
The role of molecular size in ligand efficiency
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, **2007**, 17, 4258-4261

- ⁹⁴ Helten, H.; Schirmeister, T. & Engels, B.
Theoretical studies about the influence of different ring substituents on the nucleophilic ring opening of three-membered heterocycles and possible implications for the mechanisms of cysteine protease inhibitors
The Journal of Organic Chemistry, **2005**, 70, 233-237
- ⁹⁵ Vicik, R.; Helten, H.; Schirmeister, T. & Engels, B.
Rational Design of Aziridine-Containing Cysteine Protease Inhibitors with Improved Potency: Studies on Inhibition Mechanism
ChemMedChem, **2006**, 1, 1021-1028
- ⁹⁶ Drag, M.; Mikolajczyk, J.; Bekes, M.; Reyes-Turcu, F.; Ellman, J.; Wilkinson, K. & Salvesen, G.
Positional-scanning fluorogenic substrate libraries reveal unexpected specificity determinants of deubiquitinating enzymes (DUBs)
The Biochemical Journal, **2008**, 415, 367
- ⁹⁷ Hu, M.; Li, P.; Li, M.; Li, W.; Yao, T.; Wu, J.; Gu, W.; Cohen, R. & Shi, Y.
Crystal structure of a UBP-family deubiquitinating enzyme in isolation and in complex with ubiquitin aldehyde
Cell, **2002**, 111, 1041-1054
- ⁹⁸ Hu, M.; Li, P.; Song, L.; Jeffrey, P.; Chernova, T.; Wilkinson, K.; Cohen, R. & Shi, Y.
Structure and mechanisms of the proteasome-associated deubiquitinating enzyme USP14
The EMBO Journal, **2005**, 24, 3747-3756
- ⁹⁹ Fridman, N.; Kaftory, M.; Eichen, Y. & Speiser, S.
Crystal structures and solution spectroscopy of lophine derivatives
Journal of Molecular Structure, **2009**, 917, 101-109
Balalaie, S.; Arabanian, A. & Hashtroudi, M. S.
Zeolite HY and silica gel as new and efficient heterogenous catalysts for the synthesis of triarylimidazoles under microwave irradiation
Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly, **2000**, 131, 945-948
- ¹⁰⁰ Sengar, R.; Miller, J. & Basu, P.
Design, syntheses, and characterization of dioxo-molybdenum (VI) complexes with thiolate ligands: effects of intraligand NHS hydrogen bonding
Dalton Trans., **2008**, 2569-2577
- ¹⁰¹ Lamoureux, G. & Whitesides, G.
Synthesis of dithiols as reducing agents for disulfides in neutral aqueous solution and comparison of reduction potentials
The Journal Of Organic Chemistry, **1993**, 58, 633-641
- ¹⁰² Steiner, T.
S-HS hydrogen-bond chain in thiosalicylic acid
Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications, **2000**, 56, 876-877
- ¹⁰³ Schaefer, T.; McKinnon, D.; Sebastian, R. & Krawchuk, B.
On the existence of intramolecular hydrogen bonds in methyl o-mercaptobenzoate and 2-methoxymethylbenzenethiol
Canadian Journal of Chemistry, **1981**, 59, 566-571
- ¹⁰⁴ Cavagna, F.; Grewer, T.; Jaenicke, O. & Zeininger, H.
Reaktionsgeschwindigkeit der Chlorsulfonierung von Acetanilid (N-Phenylacetamid) mit überberschüssiger Chlorsulfonsäure
Chemie Ingenieur Technik, **1978**, 50, 51-51
- ¹⁰⁵ Crimmin, M.; Colby, D.; Ellman, J. & Bergman, R.
Synthesis and coordination chemistry of tri-substituted benzamidrazones
Dalton Trans., **2010**, 40, 514-522

- ¹⁰⁶ Blinco, J.; Hodgson, J.; Morrow, B.; Walker, J.; Will, G.; Coote, M.; Bottle, S. & others
Experimental and theoretical studies of the redox potentials of cyclic nitroxides.
The Journal of Organic Chemistry, **2008**, 73, 6763
- ¹⁰⁷ Lehr, M.
Indol-2-alkansäuren und ihre Derivate als Hemmstoffe der Phospholipase A2
Deutsches Patentamt, **1995**, Offenlegungsschrift DE 4338770 A1
<http://depatisnet.dpma.de/DepatisNet/depatisnet?action=pdf&docid=DE000004338770A1>
Datum des letzten Webseitenzugriffs: Januar 2013
- ¹⁰⁸ Brown, E. & Moudachirou, M.
Agents de dédoublement. 2. Synthèse d'aryluréthanes de l'acide (S)-lactique et leur utilisation dans le dédoublement de bases racémiques
Tetrahedron, **1994**, 50, 10309-10320
- ¹⁰⁹ Pirkle, W. & Simmons, K.
Improved chiral derivatizing agents for the chromatographic resolution of racemic primary amines
The Journal of Organic Chemistry, **1983**, 48, 2520-2527
- ¹¹⁰ Adkins, H. & Billica, H.
The preparation of Raney nickel catalysts and their use under conditions comparable with those for platinum and palladium catalysts
Journal of the American Chemical Society, **1948**, 70, 695-698
- ¹¹¹ Borch, R.; Bernstein, M. & Durst, H.
Cyanohydrinborate anion as a selective reducing agent
Journal of the American Chemical Society, **1971**, 93, 2897-2904
- ¹¹² Xie, Y.; Zhang, Y.; Zheng, W.; Fu, C. & Song, H.
Synthesis and enantiomer separation of 5-(10-undecentylamido)-acenaphthene
Tetrahedron: Asymmetry, **2009**, 20, 175-178
- ¹¹³ Schubert, W. & Latourette, H.
The Aromatic Elimination Reaction. II. The Mechanism of the Acid-catalyzed Deacylation of Aromatic Ketones
Journal of the American Chemical Society, **1952**, 74, 1829-1834
- ¹¹⁴ Van Allan, J.; Giannini, D. & Whitesides, T.
Dibenzoxanthene derivatives and related products from beta-naphthol and aldehydes or acetals
The Journal of Organic Chemistry, **1982**, 47, 820-823
- ¹¹⁵ Busch, M. & Knoll, R.
Über Phenol-Alkylierung; Einführung von Diphenylmethyl
Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series), **1927**, 60, 2243-2257
- ¹¹⁶ Hart, H. & Simons, J.
The Kinetics and mechanism of the uncatalyzed alkylation of phenol
Journal of the American Chemical Society, **1949**, 71, 345-352
- ¹¹⁷ Nocker, M.; Handschuh, S.; Tautermann, C. & Liedl, K.
Theoretical Prediction of Hydrogen Bond Strength for use in Molecular Modeling
Journal of Chemical Information and Modeling, **2009**, 49, 2067-2076
- ¹¹⁸ Kato, K.; Gong, Y.; Saito, T. & Yokogawa, Y.
Enzymatic resolution of 2,2,2-trifluoro-1-arylethylamine derivatives by *Pseudomonas fluorescens* lipase in organic solvents
Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, **2004**, 30, 61-68

- ¹¹⁹ Fuglseth, E.; Thvedt, T.; Moll, M. & Hoff, B.
Electrophilic and nucleophilic side chain fluorination of para-substituted acetophenones
Tetrahedron, **2008**, 64, 7318-7323
- ¹²⁰ Fuglseth, E.; Otterholt, E.; Høgmoen, H.; Sundby, E.; Charnock, C. & Hoff, B.
Chiral derivatives of Butenafine and Terbinafine: synthesis and antifungal activity
Tetrahedron, **2009**, 65, 9807-9813
- ¹²¹ Crank, G. & Khan, H.
Formation of Thioamide Derivatives from Reactions of Isothiocyanates with Oxazol-2-amines
Australian Journal of Chemistry, **1985**, 38, 447-458
- ¹²² Pravst, I.; Zupan, M. & Stavber, S.
Directed regioselectivity of bromination of ketones with NBS: solvent-free conditions versus water
Tetrahedron Letters, **2006**, 47, 4707-4710
- ¹²³ Adhikari, M. & Samant, S.
Sonochemical bromination of acetophenones using p-toluenesulfonic acid - N-bromosuccinimide
Ultrasonics Sonochemistry, **2002**, 9, 107-111
- ¹²⁴ Surya-Prakash-Rao, H. & Siva, P.
Facile Reduction of Azides with Sodium Borohydride/Copper (II) Sulphate System
Synthetic Communications, **1994**, 24, 549-555
- ¹²⁵ Corbel, B.; Michaud, F.; Meijer, L.; Simon, G.; Couthon-Gourves, H.; Haelters, J. & Kervarec, N.
Towards the syntheses of N-H and N-alkylated derivatives of meridianins
Journal of Heterocyclic Chemistry, **2009**, 44, 793-801
- ¹²⁶ Watanabe; Kobayashi; Nishiura; Takahashi; Usui; Kamiyama; Mochizuki; Noritake; Yokoyama & Murakami
Synthetic studies on indoles and related compounds. XXVI. The debenzoylation of protected indole nitrogen with aluminum chloride.(2)
Chemical & Pharmaceutical Bulletin, **1991**, 39, 1152-1156
- ¹²⁷ Olsen, J. & Kang, S.
Conformational analysis and electronic structure of acetanilide
Theoretical Chemistry Accounts: Theory, Computation, and Modeling (Theoretica Chimica Acta), **1970**, 17, 329-333
- ¹²⁸ Wantoch Rekowski, M.; Pyriochou, A.; Papapetropoulos, N.; Stößel, A.; Papapetropoulos, A. & Giannis, A.
Synthesis and biological evaluation of oxadiazole derivatives as inhibitors of soluble guanylyl cyclase
Bioorganic & Medicinal Chemistry, **2010**, 18, 1288-1296
- ¹²⁹ Hehre, W.; Radom, L. & Pople, J.
Molecular orbital theory of the electronic structure of organic compounds. XII. Conformations, stabilities, and charge distributions in monosubstituted benzenes
Journal of the American Chemical Society, **1972**, 94, 1496-1504
- ¹³⁰ Mugnoli, A.; Sancassan, F.; Novi, M. & Petrillo, G.
Structure of methyl 4-methoxy-2,6-dimethylbenzoate
Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications, **1988**, 44, 2149-2151
- ¹³¹ Hou, D.; Hsieh, Y. & Hsieh, Y.
New formation of 4,5,6,7-tetrahydroisindoles
Tetrahedron Letters, **2005**, 46, 5927-5929
- ¹³² De Oliveira, K.; Costa, P.; Santin, J.; Mazzambani, L.; Bürger, C.; Mora, C.; Nunes, R. & de Souza, M.
Synthesis and antidepressant-like activity evaluation of sulphonamides and sulphonyl-hydrazones
Bioorganic & Medicinal Chemistry, **2011**, 19, 4295-4306

- ¹³³ Orzeszko, A.; Kaminska, B.; Orzeszko, G. & Starosciak, B.
Synthesis and antimicrobial activity of new adamantane derivatives II
Il Farmaco, **2000**, *55*, 619-623
- ¹³⁴ Richards, S. A. & Hollerton, J. C.
Essential practical NMR for Organic Chemistry
1. Auflage, Wiley, Chichester (UK), **2010**, 98-100
- ¹³⁵ Salman, M. & Ray, S.
Studies in antifertility agents: Part XXXVI – Syntheses of N-(substituted benzylidene)aminophthalimides, -dihydroisoindoles and -1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines
Indian Journal of Chemistry, Section B: Org. Chem. Incl. Med. Chem. B, **1981**, *20*, 477-479
Szymanska, E.; Frydenvang, K.; Contreras-Sanz, A.; Pickering, D. S.; Frola, E.; Serafimoska, Z.; Nielsen, B.; Kastrup, J. S. & Johansen, T. N.
A new phenylalanine derivative acts as an antagonist at the AMPA receptor GluA2 and introduces partial domain closure: Synthesis, resolution, pharmacology, and crystal structure
Journal of Medicinal Chemistry, **2011**, *54*, 7289-7298
- ¹³⁶ Hunter, C.
Quantifying intermolecular interactions: guidelines for the molecular recognition toolbox
Angewandte Chemie International Edition, **2004**, *43*, 5310-5324
- ¹³⁷ Saari, W.; Schwering, J.; Lyle, P.; Smith, S. & Engelhardt, E.
Cyclization-activated prodrugs. Basic carbamates of 4-hydroxyanisole
Journal of Medicinal Chemistry, **1990**, *33*, 97-101
- ¹³⁸ Hili, R. & Yudin, A.
Readily available unprotected amino aldehydes
Journal of the American Chemical Society, **2006**, *128*, 14772-14773
- ¹³⁹ Assem, N.; Natarajan, A. & Yudin, A.
Chemoselective peptidomimetic ligation using thioacid peptides and aziridine templates
Journal of the American Chemical Society, **2010**, *132*, 10986-10987
- ¹⁴⁰ Burlingham, B. & Widlanski, T.
An intuitive look at the relationship of K_i and IC_{50} : A more general use for the Dixon plot
Journal of Chemical Education, **2003**, *80*, 214
Cer, R.; Mudunuri, U.; Stephens, R. & Lebeda, F.
 IC_{50} -to- K_i : a web-based tool for converting IC_{50} to K_i values for inhibitors of enzyme activity and ligand binding
Nucleic Acids Research, **2009**, *37*, W441-W445
- ¹⁴¹ GraFit, Erithacus Software Ltd., P.O. Box 274, Horley, Surrey, RH6 9YJ, UK <http://www.erithacus.com/grafit/>
- ¹⁴² Prinz, H. & Schönichen, A.
Transient binding patches: a plausible concept for drug binding
Journal of Chemical Biology, **2008**, *1*, 95-104
- ¹⁴³ Ludewig, S.; Kossner, M.; Schiller, M.; Baumann, K. & Schirmeister, T.
Enzyme kinetics and hit validation in fluorimetric protease assays
Current Topics in Medicinal Chemistry, **2010**, *10*, 368-382
- ¹⁴⁴ Luckner, S.; Liu, N.; am Ende, C.; Tonge, P.; Kisker, C.
A slow, tight binding inhibitor of InhA, the enoyl-acyl carrier protein reductase from *Mycobacterium tuberculosis*
Journal of Biological Chemistry, **2010**, *285*, 14330-14337

- ¹⁴⁵ Tirado-Rives, J. & Jorgensen, W.
Contribution of conformer focusing to the uncertainty in predicting free energies for protein-ligand binding
Journal of Medicinal Chemistry, **2006**, 49, 5880-5884
- ¹⁴⁶ Marcsisin, S. & Engen, J.
Molecular insight into the conformational dynamics of the Elongin BC complex and its interaction with HIV-1 Vif
Journal of Molecular Biology, **2010**, 402, 892-904
- ¹⁴⁷ Babon, J.; Sabo, J.; Soetopo, A.; Yao, S.; Bailey, M.; Zhang, J.; Nicola, N. & Norton, R.
The SOCS box domain of SOCS3: structure and interaction with the elonginBC-cullin5 ubiquitin ligase
Journal of Molecular Biology, **2008**, 381, 928-940
- ¹⁴⁸ Sotriffer, C.; Sanschagrín, P.; Matter, H. & Klebe, G.
SFCscore: scoring functions for affinity prediction of protein-ligand complexes
Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, **2008**, 73, 395-419
- ¹⁴⁹ Sperandio, O.; Reynès, C. H.; Camproux, A.-C. & Villoutreix, B. O.
Rationalizing the chemical space of protein-protein interaction inhibitors
Drug Discovery Today, **2010**, 15, 220-229
- ¹⁵⁰ Wells, J. A. & McClendon, C. L.
Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces
Nature, **2007**, 450, 1001-1009
- ¹⁵¹ Zhong, S.; Macias, A. T. & MacKerell, A. D.
Computational identification of inhibitors of protein-protein interactions
Current Topics in Medicinal Chemistry, **2007**, 7, 63-82
- ¹⁵² Morelli, X.; Bourgeois, R. & Roche, P.
Chemical and structural lessons from recent successes in protein-protein interaction inhibition (2P2I)
Current Opinion in Chemical Biology, **2011**, 15, 475-481
- ¹⁵³ Yamasaki, T. & Ohama, T.
Involvement of Elongin C in the spread of repressive histone modifications
The Plant Journal, **2011**, 65, 51-61
- ¹⁵⁴ Chong, J. M. & Mar, E. K.
Enantioselective reduction of aryl trifluoromethyl ketones with BINAL-H. A preparation of 2, 2, 2-trifluoro-1-(9-anthryl) ethanol
The Journal of Organic Chemistry, **1991**, 56, 893-896
- ¹⁵⁵ Schenck, H. A.; Lenkowski, P. W.; Choudhury-Mukherjee, I.; Ko, S.-H.; Stables, J. P.; Patel, M. K. & Brown, M.
Design, synthesis and evaluation of novel hydroxyamides as orally available anticonvulsants
Bioorganic & Medicinal Chemistry, **2004**, 12, 979-993
- ¹⁵⁶ Slungard, S. V.; Krakeli, T.-A.; Thvedt, T. H. K.; Fuglseth, E.; Sundby, E. & Hoff, B. H.
Investigation into the enantioselection mechanism of ruthenium-arene-diamine transfer hydrogenation catalysts using fluorinated substrates
Tetrahedron, **2011**, 67, 5642-5650
- ¹⁵⁷ Zhao, Y.; Zhu, J.; Ni, C. & Hu, J.
Magnesium Metal-Mediated Reductive Trifluoromethylation of Aldehydes with Phenyl Trifluoromethyl Sulfone
Synthesis, **2010**, 2010, 1899-1904
- ¹⁵⁸ Macharla, A. K.; Chozhiyath Nappunni, R.; Marri, M. R.; Peraka, S. & Nama, N.
Oxidative bromination of ketones using ammonium bromide and oxone
Tetrahedron Letters, **2012**, 53, 191-195

- ¹⁵⁹ Sheng, J.; Li, X.; Tang, M.; Gao, B. & Huang, G.
An efficient method for the alpha-acetoxylation of ketones
Synthesis, **2007**, 2007, 1165-1168
- ¹⁶⁰ Pan, X.; Jia, L.; Liu, X.; Ma, H.; Yang, W. & Schwarz, J. B.
A general asymmetric synthesis of phenylglycinols
Tetrahedron: Asymmetry, **2011**, 22, 329-337
- ¹⁶¹ Ottoni, O.; Cruz, R. & Alves, R.
Efficient and simple methods for the introduction of the sulfonyl, acyl and alkyl protecting groups on the nitrogen of indole and its derivatives
Tetrahedron, **1998**, 54, 13915-13928
- ¹⁶² Pindur, U.; Otto, C.; Molinier, M. & Massa, W.
Diels-Alder Reactions of (1H-Indol-3-yl)-enacetamides and-endiacetamides: A Selective Access to Acetylamino-Functionalized [b] Annelated Indoles and Carbazoles
Helvetica Chimica Acta, **1991**, 74, 727-738
- ¹⁶³ Zheng, Y.; Wang, P.; Chen, H. & Pan, Q.
Antitumor compounds. III. Synthesis of derivatives of analogs of sulfanilamide
Zhongshan Daxue Xuebao, Ziran Kexueban, **1989**, 28, 124-127
- ¹⁶⁴ Chiriac, C. I.
Synthesis of amides by a new direct condensation reaction
Revue Roumaine de Chimie, **1985**, 30, 799-802
- ¹⁶⁵ Spektrendatenbank SDBSWeb
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
<http://sdbs.riodb.aist.go.jp>
Datum des letzten Webseitenzugriffs: Januar 2013
- ¹⁶⁶ Hayashi, K.-i.; Tan, X.; Zheng, N.; Hatate, T.; Kimura, Y.; Kepinski, S. & Nozaki, H.
Small-molecule agonists and antagonists of F-box protein--substrate interactions in auxin perception and signaling
Proceedings of the National Academy of Sciences, **2008**, 105, 5632-5637
- ¹⁶⁷ Romines, K. R.; Freeman, G. A.; Schaller, L. T.; Cowan, J. R.; Gonzales, S. S.; Tidwell, J. H.; Andrews, C. W.; Stammers, D. K.; Hazen, R. J.; Ferris, R. G. & others
Structure-activity relationship studies of novel benzophenones leading to the discovery of a potent, next generation HIV nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor
Journal of Medicinal Chemistry, **2006**, 49, 727-739
- ¹⁶⁸ Shannon, S. K.; Peacock, M. J.; Kates, S. A. & Barany, G.
Solid-Phase Synthesis of Lidocaine and Procainamide Analogues Using Backbone Amide Linker (BAL) Anchoring
Journal of Combinatorial Chemistry, **2003**, 5, 860-868
- ¹⁶⁹ Ramesh, C.; Raju, B. R.; Kavala, V.; Kuo, C.-W. & Yao, C.-F.
A simple and facile route for the synthesis of 2H-1,4-benzoxazin-3-(4H)-ones via reductive cyclization of 2-(2-nitrophenoxy)acetonitrile adducts in the presence of Fe/acetic acid
Tetrahedron, **2011**, 67, 1187-1192
- ¹⁷⁰ Maieranu, C.; Schmitt, Cé.; Schifano-Faux, N.; Le Nouën, D.; Defoin, A. & Tarnus, Cé.
A novel amino-benzosuberone derivative is a picomolar inhibitor of mammalian aminopeptidase N/CD13
Bioorganic & Medicinal Chemistry, **2011**, 19, 5716-5733

- ¹⁷¹ Zoń, J.; Miziak, P.; Amrhein, N. & Gancarz, R.
Inhibitors of Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL): Synthesis and Biological Evaluation of 5-Substituted 2-Aminoindane-2-phosphonic Acids
Chemistry & Biodiversity, **2005**, 2, 1187-1194
- ¹⁷² Wang, G.; Yang, X.; Sun, Y.; Bao, H. & Li, X.
Aniline-Based Disulfide/Aniline Copolymers as a High Energy-Storage Material
Macromolecular Chemistry and Physics, **2009**, 210, 2118-2124
- ¹⁷³ Bell, I. M.; Gallicchio, S. N.; Wood, M. R.; Quigley, A. G.; Stump, C. A.; Zartman, C. B.; Fay, J. F.; Li, C.-C.; Lynch, J. J.; Moore, E. L. & others
Discovery of MK-3207: a highly potent, orally bioavailable CGRP receptor antagonist
ACS Medicinal Chemistry Letters, **2010**, 1, 24-29
Hay, M. P.; Hicks, K. O.; Pchalek, K.; Lee, H. H.; Blaser, A.; Pruijn, F. B.; Anderson, R. F.; Shinde, S. S.; Wilson, W. R. & Denny, W. A.
Tricyclic [1,2,4]Triazine 1,4-dioxides as hypoxia selective cytotoxins
Journal of Medicinal Chemistry, **2008**, 51, 6853-6865
- ¹⁷⁴ Lee, J.; Kang, S.-U.; Lim, J.-O.; Choi, H.-K.; Jin, M.-k.; Toth, A.; Pearce, L. V.; Tran, R.; Wang, Y.; Szabo, T. & others
N-[4-(Methylsulfonylamino)benzyl]thiourea analogues as vanilloid receptor antagonists: analysis of structure-activity relationships for the 'C-Region'
Bioorganic & Medicinal Chemistry, **2004**, 12, 371-385
- ¹⁷⁵ Putt, K. S.; Chen, G. W.; Pearson, J. M.; Sandhorst, J. S.; Hoagland, M. S.; Kwon, J.-T.; Hwang, S.-K.; Jin, H.; Churchwell, M. I.; Cho, M.-H. & others
Small-molecule activation of procaspase-3 to caspase-3 as a personalized anticancer strategy
Nature Chemical Biology, **2006**, 2, 543-550
- ¹⁷⁶ Holland, J. P.; Fisher, V.; Hickin, J. A. & Peach, J. M.
Pyrene-Functionalised Copper Complexes as Potential Dual-Modality Imaging Agents
European Journal of Inorganic Chemistry, **2010**, 2010, 48-58
- ¹⁷⁷ Andrews, S.; Burgess, S. J.; Skaalrud, D.; Kelly, J. X. & Peyton, D. H.
Reversal agent and linker variants of reversed chloroquines: activities against *Plasmodium falciparum*
Journal of Medicinal Chemistry, **2009**, 53, 916-919