

„Synthese, Charakterisierung und Testung von  
Phenylacrylsäure-Derivaten, Benzothiazolen und  
Diarylthioethern als potentielle Inhibitoren der  
Dengue-Virus Typ 2 NS2B-NS3 Protease“

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
im Promotionsfach Pharmazie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Steven Holloway

geb. in Hannover

Mainz, 2014

# Inhaltsverzeichnis

Seite

<b>I</b>	<b>ALLGEMEINER TEIL .....</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Dengue-Fieber .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Verschiedene Serotypen, Replikation und Enzymausstattung des Dengue-Flavivirus .....	3
1.1.2	Charakterisierung der Dengue-Virus Typ 2 NS2B-NS3 Protease (DEN-2 NS2B-NS3pro) .....	8
<b>1.2</b>	<b>Vorkommen, Bedeutung, Aufbau, Struktur und katalytische Aktivität von Serin-Proteasen .....</b>	<b>16</b>
<b>1.3</b>	<b>Dengue-Virus Typ 2 NS2B-NS3 Protease (DEN-2 NS2B-NS3pro) als Target für Inhibitoren .....</b>	<b>28</b>
1.3.1	Enzym-Assays zur Testung von Dengue-Virus Typ 2 NS2B-NS3 Protease-Inhibitoren (DEN-2 NS2B-NS3pro-Inhibitoren) .....	28
1.3.2	Inhibitoren der Dengue-Virus Typ 2 NS2B-NS3 Protease (DEN-2 NS2B-NS3pro) .....	31
<b>1.4</b>	<b>Hintergrund und Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>51</b>
<b>2</b>	<b>SYNTHESEN .....</b>	<b>57</b>
<b>2.1</b>	<b>Synthese Aminosäure-verknüpfter Phenylacrylsäureamide: verwendete Kupplungsreaktionen zur Ausbildung von Amid- und Peptid-Bindungen .....</b>	<b>57</b>
2.1.1	Kupplung mittels <i>n</i> -Propylphosphonsäureanhydrid (PPA) .....	57
2.1.2	Kupplung durch Aktivierung zum Säurechlorid .....	61
2.1.3	Kupplung mittels <i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyluronium-Hexafluorophosphat (HBTU) und <i>O</i> -(6-Chlorobenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyluronium-Hexafluorophosphat (HCTU) .....	62
2.1.4	Abspaltung der Benzylester-Schutzgruppe .....	66
2.1.5	Abspaltung der <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl- (Boc-) und 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl- (Pbf-) Schutzgruppe .....	68
<b>2.2</b>	<b>Synthesestufen zur Darstellung von 4-Amidinophenylacrylsäure-ethylester .....</b>	<b>70</b>
2.2.1	Knoevenagel-Kondensation zur Darstellung von Carbonsäuren aus Aldehyden .....	70
2.2.2	Veresterung durch Aktivierung zum Säurechlorid .....	70
2.2.3	Synthese von Iminoethern aus Nitrilen .....	71
2.2.4	Synthese von Amidinen aus Iminoethern .....	72
<b>2.3</b>	<b>Synthese der Benzothiazole und Diarylthioether .....</b>	<b>73</b>
2.3.1	Synthese der Benzothiazol-Bausteine .....	73
2.3.2	Synthese der Diarylthioether .....	76
2.3.3	Abspaltung von Methoxy-Gruppen .....	79

<b>3</b>	<b>BIOCHEMISCHE UND BIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN .....</b>	<b>82</b>
<b>3.1</b>	<b>Enzym-Assays .....</b>	<b>82</b>
3.1.1	Enzymkinetik .....	82
3.1.2	Durchführung fluorimetrischer Enzym-Assays mit der Dengue- Virus Typ 2 NS2B-NS3 Protease (DEN-2 NS2B-NS3pro) .....	87
3.1.3	Ergebnisse der Enzym-Assays mit der Dengue-Virus Typ 2 NS2B-NS3 Protease (DEN-2 NS2B-NS3pro) .....	89
3.1.4	Durchführung fluorimetrischer Enzym-Assays mit anderen Serin-Proteasen .....	94
3.1.5	Ergebnisse der Enzym-Assays mit anderen Serin-Proteasen .....	96
<b>3.2</b>	<b>Infektionsbiologische Testungen .....</b>	<b>99</b>
3.2.1	Antivirale Aktivität gegen Dengue-Flaviviren .....	99
3.2.2	Anti-trypanosomale und Anti-leishmaniale Aktivität, Cytotoxizität an Makrophagen .....	100
<b>4</b>	<b>DISKUSSION DER ERGEBNISSE UND STRUKTUR-WIRKUNGS- BEZIEHUNGEN .....</b>	<b>104</b>
<b>4.1</b>	<b>Hemmung der Dengue-Virus Typ 2 NS2B-NS3 Protease (DEN-2 NS2B-NS3pro) in enzymatischen Assays .....</b>	<b>104</b>
4.1.1	Phenylacrylsäureamide .....	104
4.1.2	Benzothiazole und Diarylthioether .....	117
4.1.3	Zusammenfassung .....	135
<b>4.2</b>	<b>Hemmung anderer Serin-Proteasen in enzymatischen Assays .....</b>	<b>138</b>
4.2.1	Phenylacrylsäureamide .....	138
4.2.2	Benzothiazole und Diarylthioether .....	140
4.2.3	Zusammenfassung .....	142
<b>4.3</b>	<b>Antivirale Aktivität und Cytotoxizität .....</b>	<b>144</b>
<b>4.4</b>	<b>Testungen an <i>Leishmania major</i> und <i>Trypanosoma brucei brucei</i> .....</b>	<b>146</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY .....</b>	<b>149</b>
<b>5.1</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>149</b>
<b>5.2</b>	<b>Summary .....</b>	<b>153</b>
<b>II</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL .....</b>	<b>157</b>
<b>6</b>	<b>ALLGEMEINE ANGABEN .....</b>	<b>157</b>
<b>6.1</b>	<b>Verwendete Messgeräte, analytische und chromatographische Methoden .....</b>	<b>157</b>
6.1.1	Schmelzpunkte .....	157
6.1.2	Spezifische Drehwerte .....	157
6.1.3	Dünnschichtchromatographie (DC) .....	158
6.1.4	Säulenchromatographie (SC) .....	158
6.1.5	Infrarot-Spektroskopie (IR) .....	158
6.1.6	Kernresonanz-Spektroskopie ( <sup>1</sup> H- und <sup>13</sup> C-NMR) .....	158
6.1.7	Massenspektrometrie (MS) und Hochleistungs- Flüssigchromatographie (HPLC) .....	159
<b>6.2</b>	<b>Enzym-Assays .....</b>	<b>161</b>

---

<b>6.3</b>	<b>Enzyme, Substrate und Reagenzien</b> .....	<b>164</b>
<b>6.4</b>	<b>Arbeitsmethoden</b> .....	<b>164</b>
<b>6.5</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>165</b>
<b>7</b>	<b>ALLGEMEINE SYNTHETISCHE METHODEN</b> .....	<b>168</b>
<b>7.1</b>	<b>Amid- und Peptidkupplungen</b> .....	<b>168</b>
7.1.1	Methode A1: Kupplung mit <i>n</i> -Propylphosphonsäureanhydrid (PPA) .....	168
7.1.2	Methode A2: Kupplung mit Thionylchlorid.....	168
7.1.3	Methode A3: Kupplung mit <i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyluronium-Hexafluorophosphat (HBTU) bzw. <i>O</i> -(6-Chlorobenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyluronium-Hexafluorophosphat (HCTU).....	169
7.1.4	Methode A4: Kupplung mit <i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyluronium-Hexafluorophosphat (HBTU) bei Dicarbonsäuren.....	169
<b>7.2</b>	<b>Schutzgruppen</b> .....	<b>170</b>
7.2.1	Methode B1: Benzylester-Hydrolyse mit Lithiumhydroxid.....	170
7.2.2	Methode B2: Abspaltung der <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl- (Boc-) bzw. 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl- (Pbf-) Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure (TFA) .....	170
7.2.3	Methode B3: Abspaltung aromatischer Methoxy-Gruppen mit Bortribromid .....	171
<b>7.3</b>	<b>Darstellung aromatischer Amidine aus den entsprechenden Nitrilen</b> .....	<b>171</b>
7.3.1	Methode C1: Synthese von 4-Cyanozimtsäure mittels Knoevenagel-Kondensation .....	171
7.3.2	Methode C2: Veresterung von 4-Cyanozimtsäure mit Ethanol über Thionylchlorid .....	171
7.3.3	Methode C3: Synthese von Iminoethern (Imidoestern) aus Nitrilen (Pinner-Reaktion).....	172
7.3.4	Methode C4: Überführung von Iminoethern (Imidoestern) in Amidine .....	172
<b>7.4</b>	<b>Synthese methoxylierter 2-Aminobenzothiazole aus den entsprechenden Anilin-Derivaten</b> .....	<b>172</b>
7.4.1	Methode D: .....	172
<b>7.5</b>	<b>Synthese von Diarylthioethern durch nucleophile aromatische Substitution (S<sub>N</sub>Ar)</b> .....	<b>173</b>
7.5.1	Methode E1: .....	173
7.5.2	Methode E2: .....	173
<b>8</b>	<b>SYNTHETISIERTE VERBINDUNGEN</b> .....	<b>174</b>
<b>8.1</b>	<b>Phenylacrylsäureamide</b> .....	<b>174</b>
8.1.1	( <i>R,E</i> )-Benzyl-2-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)propanoat (SH01).....	174
8.1.2	( <i>R,E</i> )-Benzyl-2-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)-3-methylbutanoat (SH02) .....	175

---

8.1.3	( <i>R,E</i> )-Benzyl-2-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)-4-methylpentanoat (SH03) .....	177
8.1.4	(2 <i>S,3R</i> )-Benzyl-2-(( <i>E</i> )-3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)-3-methylpentanoat (SH04) ....	178
8.1.5	( <i>S,E</i> )-Benzyl-2-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)-3-methylbutanoat (SH05) .....	180
8.1.6	( <i>S,E</i> )-Benzyl-2-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)-3-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)propanoat (SH06) .....	182
8.1.7	( <i>S,E</i> )-Benzyl-2-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)propanoat (SH07).....	183
8.1.8	( <i>E</i> )-Benzyl-2-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)acetat (SH08) .....	185
8.1.9	( <i>E</i> )-2-(3-(4-(Dimethylamino)phenyl)acrylamido)essigsäure (SH08a) .....	186
8.1.10	( <i>S,E</i> )-Methyl-2-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)propanoat (SH10).....	187
8.1.11	( <i>S,E</i> )-Methyl-2-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)-3-methylbutanoat (SH11) .....	189
8.1.12	( <i>S,E</i> )-Methyl-2-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)-4-methylpentanoat (SH12) .....	190
8.1.13	( <i>R,E</i> )-Methyl-2-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)-3-phenylpropanoat (SH13) .....	192
8.1.14	( <i>S,E</i> )-Dimethyl-2-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)succinat (SH14) .....	193
8.1.15	( <i>S,E</i> )-Dimethyl-2-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)pentandioat (SH15).....	195
8.1.16	( <i>S</i> )-Benzyl-2-(4-(dimethylamino)benzamido)-3-methylbutanoat (SH23) .....	196
8.1.17	( <i>S</i> )-Benzyl-2-(3-(2,3-dichlorphenyl)propanamido)-3-methylbutanoat (SH24) .....	198
8.1.18	( <i>S</i> )-Benzyl-2-(3-(2-fluorphenyl)propanamido)-3-methylbutanoat (SH25) .....	199
8.1.19	( <i>S,E</i> )-Benzyl-2-(3-(2,4-difluorphenyl)acrylamido)-3-methylbutanoat (SH26) .....	201
8.1.20	( <i>S,E</i> )-Benzyl-2-(3-(2,5-difluorphenyl)acrylamido)-3-methylbutanoat (SH27) .....	202
8.1.21	( <i>S,E</i> )-Benzyl-2-(4-(4-chlorphenyl)-4-oxobut-2-enamido)-3-methylbutanoat (SH28) .....	204
8.1.22	( <i>S,E</i> )-Benzyl-2-(4-(4-methoxyphenyl)-4-oxobut-2-enamido)-3-methylbutanoat (SH29) .....	205
8.1.23	( <i>E</i> )-3-(4-(Dimethylamino)phenyl)acrylamid (SH30).....	207
8.1.24	( <i>S,E</i> )-Benzyl-2-(3-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)acrylamido)-3-methylbutanoat (SH32) .....	208
8.1.25	( <i>S,E</i> )-Benzyl-3-methyl-2-(3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)acrylamido)butanoat (SH33) .....	210
8.1.26	( <i>S,E</i> )-Benzyl-3-methyl-2-(2-methyl-3-phenylacrylamido)butanoat (SH34) .....	211

8.1.27	( <i>E</i> )-3-(4-(( <i>E</i> )-3-((( <i>S</i> )-1-(Benzyloxy)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)amino)-3-oxoprop-1-en-1-yl)phenyl)acrylsäure (SH35A) .....	213
8.1.28	SH35B (kein IUPAC-Name möglich).....	214
8.1.29	( <i>S</i> )-Methyl-2-(( <i>E</i> )-3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)-3-(1-(( <i>E</i> )-3-(4-(dimethylamino)phenyl)acryloyl)-1 <i>H</i> -imidazol-4-yl)propanoat (SH36).....	216
8.1.30	( <i>S,E</i> )-Methyl-6-(( <i>tert</i> -butoxycarbonyl)amino)-2-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)hexanoat (SH37) .....	217
8.1.31	( <i>S,E</i> )-5-(3-(4-(Dimethylamino)phenyl)acrylamido)-6-methoxy-6-oxohexan-1-aminium-2,2,2-trifluoracetat (SH37a) .....	218
8.1.32	( <i>S,E</i> )-Methyl 2-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)-5-(3-((2,2,4,6,7-pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)sulfonyl)guanidino)pentanoat (SH38).....	220
8.1.33	( <i>S,E</i> )-Amino((4-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)-5-methoxy-5-oxopentyl)amino)methaniminium-2,2,2-trifluoracetat (SH38a).....	221
8.1.34	( <i>E</i> )-3-(4-Cyanophenyl)acrylsäure (SH42).....	222
8.1.35	( <i>E</i> )-Ethyl-3-(4-cyanophenyl)acrylat (SH43) .....	223
8.1.36	( <i>E</i> )-Ethyl-3-(4-(ethoxy(imino)methyl)phenyl)acrylat-Hydrochlorid (SH44).....	224
8.1.37	( <i>E</i> )-Amino(4-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)phenyl)methaniminiumchlorid (SH45) .....	225
<b>8.2</b>	<b>Benzothiazole und Diarylthioether .....</b>	<b>227</b>
8.2.1	2-Iod- <i>N</i> -(4-methoxybenzo[ <i>d</i> ]thiazol-2-yl)benzamid (SH50).....	227
8.2.2	2-Iod- <i>N</i> -(6-methoxybenzo[ <i>d</i> ]thiazol-2-yl)benzamid (SH51).....	228
8.2.3	5,6-Dimethoxybenzo[ <i>d</i> ]thiazol-2-amin (SH53) .....	229
8.2.4	<i>N</i> -(5,6-Dimethoxybenzo[ <i>d</i> ]thiazol-2-yl)-2-iodbenzamid (SH56) ....	230
8.2.5	<i>N</i> -(5,6-Dimethoxybenzo[ <i>d</i> ]thiazol-2-yl)-3-iodbenzamid (SH58) ....	231
8.2.6	<i>N</i> -(5,6-Dimethoxybenzo[ <i>d</i> ]thiazol-2-yl)-4-iodbenzamid (SH59) ....	232
8.2.7	<i>N</i> -(5,6-Dimethoxybenzo[ <i>d</i> ]thiazol-2-yl)-2-((4-(trifluormethyl)phenyl)thio)benzamid (SH60).....	234
8.2.8	<i>N</i> -(4-Methoxybenzo[ <i>d</i> ]thiazol-2-yl)-2-((4-(trifluormethyl)phenyl)thio)benzamid (SH61).....	235
8.2.9	<i>N</i> -(6-Methoxybenzo[ <i>d</i> ]thiazol-2-yl)-2-((4-(trifluormethyl)phenyl)thio)benzamid (SH62).....	236
8.2.10	<i>N</i> -(5,6-Dihydroxybenzo[ <i>d</i> ]thiazol-2-yl)-2-((4-(trifluormethyl)phenyl)thio)benzamid (SH65).....	237
8.2.11	<i>N</i> -(4-Hydroxybenzo[ <i>d</i> ]thiazol-2-yl)-2-((4-(trifluormethyl)phenyl)thio)benzamid (SH66).....	238
8.2.12	<i>N</i> -(6-Hydroxybenzo[ <i>d</i> ]thiazol-2-yl)-2-((4-(trifluoromethyl)phenyl)thio)benzamid (SH67).....	240
8.2.13	Methyl-2-amino-5-methoxybenzo[ <i>d</i> ]thiazol-6-carboxylat (SH69) .....	241
8.2.14	5,6,7-Trimethoxybenzo[ <i>d</i> ]thiazol-2-amin (SH73) .....	242
8.2.15	2-Iod- <i>N</i> -(5,6,7-trimethoxybenzo[ <i>d</i> ]thiazol-2-yl)benzamid (SH74) .....	243
8.2.16	4-((4-(Trifluormethyl)phenyl)thio)benzoesäure (SH77) .....	245

---

8.2.17	Methyl-5-methoxy-2-(4-((4-(trifluormethyl)phenyl)thio)benzamido)benzo[ <i>d</i> ]thiazol-6-carboxylat (SH79) .....	246
<b>8.3</b>	<b>Übersicht der synthetisierten und getesteten Verbindungen .....</b>	<b>248</b>
8.3.1	Phenylacrylsäureamide: Amide der 4-Dimethylaminozimtsäure .....	248
8.3.2	Andere Phenylacrylsäureamide und verschiedene Carbonsäureamide des <i>L</i> -Valinbenzylesters .....	250
8.3.3	Andere Phenylacrylsäure-Derivate .....	252
8.3.4	Methoxy-substituierte Benzothiazol- und Thioether-Bausteine .....	252
8.3.5	Methoxy- und Hydroxy-substituierte Benzothiazole mit Diarylthioether-Funktion.....	253
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>254</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>259</b>
<b>11</b>	<b>ANHÄNGE .....</b>	<b>260</b>
11.1	Anhang 1: Enzymkinetische Grafiken .....	260
11.2	Anhang 2: Tagungen und Poster-Präsentationen .....	269
11.3	Anhang 3: Publikationen .....	270
<b>12</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>271</b>

# I ALLGEMEINER TEIL

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Dengue-Fieber

Bei Dengue-Fieber handelt es sich um eine wichtige virale Infektionskrankheit des Menschen <sup>[35]</sup>, welche durch Stechmücken der Gattungen *Aedes aegypti* und *Aedes albopictus* übertragen wird <sup>[37]</sup>. Die ersten Fallberichte einer in Nordamerika, Afrika und Asien aufgetretenen Erkrankung, bei der es sich vermutlich um Dengue-Fieber handelte, stammen aus den Jahren 1779/80 <sup>[32]</sup>. Die erste bekannte Epidemie an Hämorrhagischem Dengue-Fieber (DHF) fand 1953/54 in Südostasien (Philippinen, Indien, Sri Lanka, Malediven, Pakistan, China und Pazifik-Inseln) statt. In den 1970er Jahren breitete sich das Hämorrhagische Dengue-Fieber weiterhin in Südostasien, in den 1980er und 1990er Jahren auch in Mittel- und Südamerika aus <sup>[32,92]</sup> und wurde in Südostasien zum Hauptgrund für Krankenhaus-Aufenthalte und Todesfälle bei Kindern <sup>[32]</sup>. Seit dem Beginn des 21. Jahrhunderts leben mehr als 2.5 Milliarden Menschen und damit mehr als 50% der Weltbevölkerung in Risikogebieten des Dengue-Fiebers <sup>[32,33,92]</sup>. Während der letzten Jahre traten auch in Europa zunehmend Fälle auf: Im Jahr 2010 infizierten sich in der südfranzösischen Stadt Nizza sowie in Kroatien vereinzelt Menschen mit Dengue-Fieber <sup>[6]</sup>; am 10. Oktober 2012 wurden auf der portugiesischen Insel Madeira 18 Erkrankungsfälle sowie 191 weitere mögliche Fälle berichtet <sup>[108]</sup>. In Süddeutschland wurden von April 2012 an zahlreiche eingeschleppte *Aedes*-Mücken gefangen sowie deren Gelege entdeckt; im Jahr 2013 wurden 641 importierte, d.h. von Reisenden eingeschleppte Dengue-Infektionen in Deutschland gemeldet <sup>[48]</sup>.

Von dem Erreger des Dengue-Fiebers, einem *Flavivirus*, existieren vier unterschiedliche Serotypen (DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4). Im Fall einer Infektion mit einem dieser Virus-Serotypen entwickelt der erkrankte Mensch zwar eine lebenslange Immunität gegen den jeweiligen Serotyp, mit dem er infiziert wurde, nicht jedoch gegen die anderen drei Serotypen. Anhand der Symptome und deren Schweregrad lässt sich die Erkrankung in



drei verschiedene Verlaufsformen unterteilen: Klassisches Dengue-Fieber (DF), Hämorrhagisches Dengue-Fieber (DHF) und Dengue-Schock-Syndrom (DSS) <sup>[32,92]</sup>.

Das **klassische Dengue-Fieber (DF)** betrifft vorwiegend ältere Kinder und Erwachsene und äußert sich durch unspezifische Symptome wie Fieber, Kopf- und Gelenkschmerzen, evtl. sogar den ganzen Körper betreffende Schmerzen, allgemeine Schwäche, Übelkeit, Erbrechen und Hautausschlag. Zusätzlich können erhöhte Leberwerte sowie Neutropenie auftreten; Todesfälle durch klassisches Dengue-Fieber sind selten. Die Inkubationszeit beträgt durchschnittlich 3 bis 14 Tage (häufig 4 bis 7 Tage), die akute Fieber- und Schmerzphase häufig 5 bis 7 Tage (möglicherweise auch 2 bis 10 Tage), die akute symptomatische Phase 3 bis 7 Tage <sup>[32,92]</sup>. Pro Jahr treten etwa 50-100 Millionen Fälle an klassischem Dengue-Fieber auf <sup>[33,92]</sup>.

Die nächste, schwerwiegendere Verlaufsform stellt das **Hämorrhagische Dengue-Fieber (DHF)** dar, charakterisiert durch Symptome wie Blutungen der Haut und des Gastrointestinal-Traktes, Hämaturie, Hypoalbuminämie bzw. Hypoproteinämie, Blutgerinnungsstörungen (z.B. Thrombozytopenie) sowie eine erhöhte Permeabilität der Blutgefäße bis hin zu leckenden Blutgefäßen. Betroffen sind überwiegend Kinder älter als 15 Jahre <sup>[32,92,96]</sup>.

Aus dem Hämorrhagischen Dengue-Fieber kann schließlich die schwerste, lebensbedrohliche Verlaufsform, das **Dengue-Schock-Syndrom (DSS)** resultieren. Dabei kommt es zu einem Blutdruckabfall, Schock durch Blutverlust bis hin zum Kreislaufversagen; der Patient verstirbt innerhalb von 8 bis 24 Stunden <sup>[32,92]</sup>. Erfährt ein bereits an klassischem Dengue-Fieber erkrankter Patient zu einem späteren Zeitpunkt eine Sekundärinfektion, besteht für diesen ein erhöhtes Risiko, an einer der schwereren Formen, d.h. DHF oder DSS, zu erkranken <sup>[32]</sup>.

Die bisher mögliche Therapie erkrankter Patienten beschränkt sich auf die Behandlung der Symptome. Zur Senkung des Fiebers sowie zur Bekämpfung der Schmerzen bei klassischem Dengue-Fieber eignet sich die Gabe des Antipyretikums bzw. Analgetikums Paracetamol; Acetylsalicylsäure bewirkt eine Hemmung der Aggregation von Thrombozyten und ist aufgrund der bei DHF vorhandenen Blutgerinnungsstörungen kontra-

indiziert<sup>[92]</sup>. DHF und DSS erfordern zusätzlich eine Zufuhr von Flüssigkeit und Elektrolyten<sup>[32,92]</sup> sowie eine intensive Überwachung der Patienten unter ständiger Kontrolle der Laborparameter (z.B. Hämatokrit, Hämostase, Urinabgabe etc.)<sup>[92]</sup>.

Die innerhalb der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts bis zum Beginn des 21. Jahrhunderts angestiegene Inzidenz des Dengue-Fiebers ist auf das zunehmende Bevölkerungswachstum, die damit verbundene Ansiedlung und Entstehung von Städten in tropischen Ländern, mangelnde Schädlingsbekämpfung, Flugverkehr sowie auf mangelnde Infrastruktur im öffentlichen Gesundheitswesen zurückzuführen<sup>[32,92]</sup>. Als Präventionsmaßnahmen kommen die Verwendung von Insektensprays und das Tragen langer, den ganzen Körper bedeckender Kleidung in Frage, sowie eine Beseitigung von Quellen, die den Stechmücken Lebensraum und Vermehrungsmöglichkeiten bieten, z.B. Behältnisse mit stehendem Wasser oder liegen gelassene Fahrzeugreifen<sup>[92]</sup>.

Als weitere, zum Schutz der Menschheit sehr wichtige Präventionsmaßnahme, befindet sich seit mehreren Jahrzehnten die Entwicklung eines Impfstoffes gegen Dengue-Viren in Arbeit, welche aber aufgrund der komplexen Pathologie der Erkrankung, der Existenz vier verschiedener Virus-Serotypen sowie unzureichender Investitionen in die Entwicklung der Impfstoffe erschwert wird. Ein optimaler Impfstoff sollte eine robuste Immunantwort auf alle vier Dengue-Virus-Serotypen sowohl bei bereits immunisierten als auch bei nicht-immunisierten Menschen bewirken, möglichst keine erheblichen Nebenwirkungen hervorrufen, eine lebenslange Immunität gegen alle vier Virus-Serotypen gewährleisten und, nicht zuletzt, auch kostengünstig sein<sup>[35]</sup>.

#### 1.1.1 Verschiedene Serotypen, Replikation und Enzymausstattung des Dengue-Flavivirus

Dengue-Viren gehören neben Gelbfieber-Viren, West-Nil-Viren (WNV) und Viren der Japanischen Encephalitis in die Familie der *Flaviviridae*<sup>[9]</sup> und verfügen über eine positiv polarisierte, aus 10723 Nucleotiden bestehenden Einzelstrang-RNA<sup>[39]</sup>, deren offener Leserahmen (ORF = „Open Reading Frame“) eine Verschlüsselung für den viralen Polyprotein-Vorläufer in folgender Reihenfolge enthält: 5'-C-prM(M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'. Am 5'-Ende des Genoms befindet sich die Codierung

für die strukturellen Proteine C (= Capsid), prM (pr = precursor = Vorläufer, M = Membran) und E (= envelope = Umschlag), während die Nucleotide (Codons) für die nicht-strukturellen Proteine den übrigen Strang einnehmen. Die sieben nicht-strukturellen Proteine lassen sich in drei große (NS1, NS3 und NS5) und vier kleine, hydrophobe Proteine (NS2A, NS2B, NS4A und NS4B) einteilen <sup>[13]</sup>. Unter den Dengue-Viren existieren vier verschiedene Serotypen (DEN1, DEN2, DEN3 und DEN4), welche mithilfe einer reversen Transkription der RNA in DNA und anschließender Polymerase-Kettenreaktion (PCR) schnell identifiziert werden können <sup>[72]</sup>.

Flaviviren besitzen einen aus sieben wesentlichen Schritten bestehenden Lebenszyklus (**Abbildung 1-1**). Im ersten Schritt binden die Virionen an die auf der Zelloberfläche befindlichen Rezeptoren und werden durch Endocytose in die Wirtszelle eingeschleust (**A**). Aufgrund des im Endosom vorliegenden, niedrigen pH-Wertes vermitteln virale Glycoproteine eine Fusion viraler und zellulärer Membranen und ermöglichen damit eine Zerlegung des Virions, wodurch eine Einschleusung der RNA in das Cytoplasma stattfindet (**B**). Die virale RNA codiert für ein Polyprotein, welches von viralen und zellulären Proteasen weiter verarbeitet wird (**C**); die dabei entstehenden nicht-strukturellen Proteine bewirken eine Replikation des RNA-Genoms (**D**). An der Membran des Endoplasmatischen Reticulums (ER) kommt es zunächst zu einer Ansammlung von Viren, anschließend zu einer Einhüllung des Capsid-Proteins und viraler RNA durch die ER-Membran und Glycoproteine, womit unreife Virus-Partikel gebildet werden (**E**), deren Transport über einen sekretorischen Pfad erfolgt. Bei dem niedrigen pH-Wert des trans-Golgi-Apparates findet eine Spaltung des viralen Vorläufer-Membran-Proteins (prM) durch TGN-Furin statt, was eine Reifung der Viren bewirkt (**F**). Im letzten Schritt verlassen schließlich die reifen Viren die Wirtszelle (**G**) <sup>[83]</sup>.

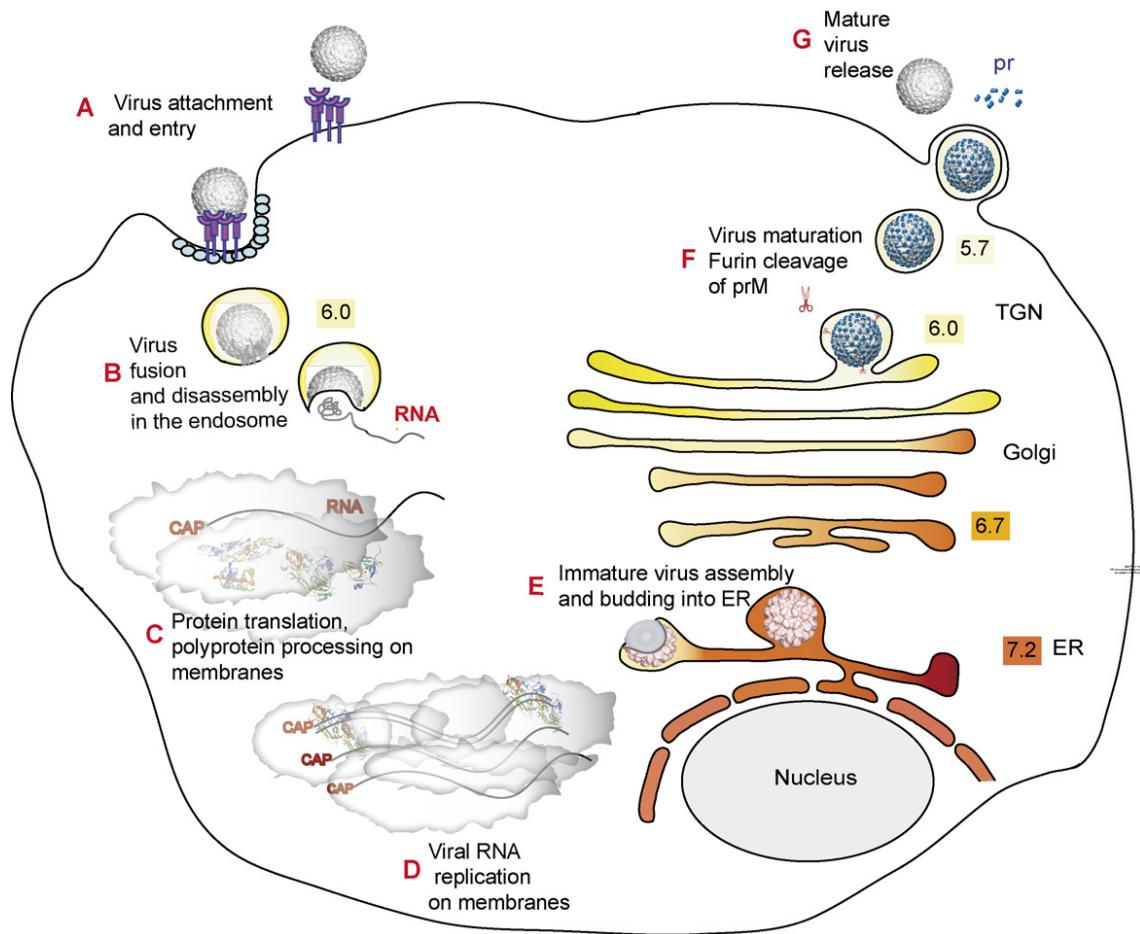


Abbildung 1-1: Lebenszyklus der Flaviviren (Die farbig unterlegten Zahlen geben den pH-Wert der jeweiligen Zellkompartimente an.) Copyright eingeholt.<sup>[84]</sup>

Von besonderer Bedeutung sind die beiden nicht-strukturellen Proteine NS2B und NS3, da sie die beiden Komponenten einer viralen, Trypsin-ähnlichen Serin-Protease sind, deren aktives Zentrum durch die katalytische Triade His51, Asp75 und Ser135 gebildet wird. Diese katalytische Triade befindet sich auf der N-terminalen Domäne (180 Aminosäuren) von NS3<sup>[5]</sup>, während NS2B einen für die enzymatische Aktivität der Protease notwendigen Cofaktor darstellt<sup>[23,53,116]</sup>. Innerhalb der Aminosäure-Sequenzen der nicht-strukturellen Proteine befinden sich vier Haupt-Spaltstellen, an denen die Protease jeweils eine Peptid-Bindung hydrolysiert:

---

<b>NS2A-NS2B</b>	<b>(DEN2)</b>	Arg-Thr-Ser-Lys- <u>Lys-Arg</u> ↓ <u>Ser</u> -Trp-Pro-Leu-Asn-Glu
	<b>(DEN4)</b>	Lys-Gly-Ala-Ser- <u>Arg-Arg</u> ↓ <u>Ser</u> -Trp-Pro-Leu-Asn-Glu
<b>NS2B-NS3</b>	<b>(DEN2)</b>	Glu-Val-Lys-Lys- <u>Gln-Arg</u> ↓ <u>Ala</u> -Gly-Val-Leu-Trp-Asp
	<b>(DEN4)</b>	Gln-Val-Lys-Thr- <u>Gln-Arg</u> ↓ <u>Ser</u> -Gly-Ala-Leu-Trp-Asp
<b>NS3-NS4A</b>	<b>(DEN2)</b>	Phe-Ala-Ala-Gly- <u>Arg-Lys</u> ↓ <u>Ser</u> -Leu-Thr-Leu-Asn-Leu
	<b>(DEN4)</b>	Phe-Ala-Ser-Gly- <u>Arg-Lys</u> ↓ <u>Ser</u> -Ile-Thr-Leu-Asp-Ile
<b>NS4B-NS5</b>	<b>(DEN2)</b>	Thr-Thr-Ser-Thr- <u>Arg-Arg</u> ↓ <u>Gly</u> -Thr-Gly-Asn-Ile-Gly
	<b>(DEN4)</b>	Ala-Gln-Thr-Pro- <u>Arg-Arg</u> ↓ <u>Gly</u> -Thr-Gly-Thr-Thr-Gly

Die Spaltstellen treten bevorzugt hinter zwei benachbarten, basischen Aminosäuren (Lys-Arg, Arg-Arg oder Arg-Lys), gelegentlich auch hinter einem Gln-Arg-Paar (NS2B-NS3-Spaltstelle), sowie in Nachbarschaft zu kurzkettingen Aminosäuren wie Glycin, Serin oder Alanin auf. Die Funktion der Dengue-Virus-Protease besteht in einer post-translationalen, proteolytischen Weiterverarbeitung des viralen Polyprotein-Vorläufers und sie ist damit essentiell für die Virus-Replikation <sup>[23,117]</sup>.

Das Polyprotein kann sowohl an den bisher beschriebenen Stellen durch die flavivirale NS2B-NS3-Protease als auch an vier weiteren Stellen durch Signal-Peptidasen im Endoplasmatischen Reticulum (ER) der Wirtszelle gespalten werden: Von den vier Spaltstellen für die Signal-Peptidase befindet sich die erste zwischen dem Capsid-Protein (C) und dem Vorläufer-Membran-Protein (prM), die zweite zwischen prM und dem „Envelope“-Protein (E), die dritte zwischen E und dem nicht-strukturellen Protein NS1, die vierte zwischen den beiden nicht-strukturellen Proteinen NS4A und NS4B. Während die Signal-Peptidase ihre Funktion im Lumen des ER ausübt, findet die Verarbeitung der übrigen nicht-strukturellen Proteine (NS2A-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A, NS4B-NS5) durch die virale Protease im Cytoplasma der Wirtszelle statt <sup>[13]</sup>. Eine farbige Übersicht der verschiedenen Spaltstellen präsentiert die **Abbildung 1-2 (A)** <sup>[20]</sup>.

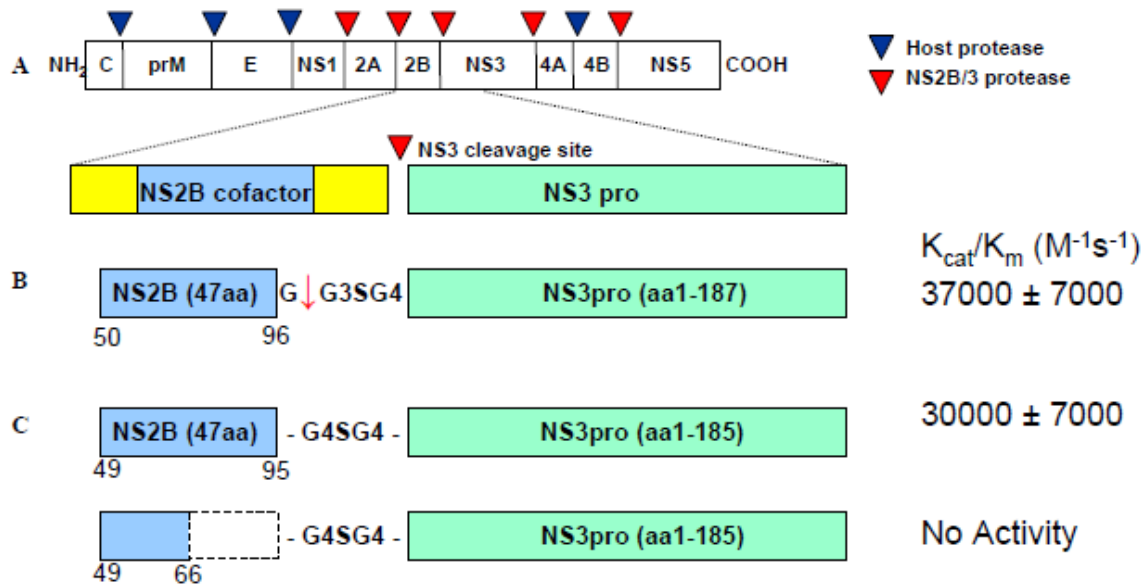


Abbildung 1-2: Organisation des Virus-Genoms der WNV- und Dengue-Virus-Polyproteine sowie Konstrukte zur Strukturaufklärung <sup>[20]</sup>. (A) Schema des Flavivirus-Genoms (B) WNV NS2B-NS3 Protease-Konstrukt mit Glycin-Linker (C) Dengue-Virus NS2B-NS3 Protease-Konstrukte mit Glycin-Linker

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Structural and Molecular Biology (Erbel P, Schiering N, D'Arcy A, Renatus M, Kroemer M, Lim SP, Yin Z, Keller TH, Vasudevan SG, Hommel U: Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus, Nature Structural & Molecular Biology, 13, 4, 372-373) Copyright © 2006

Das nicht-strukturelle Protein NS3 besteht insgesamt aus 618, der NS2B-Cofaktor aus 130 Aminosäuren; letzterer wird zu beiden Seiten seiner aus 47 Aminosäuren bestehenden, hydrophilen Zentralregion (in der **Abbildung 1-2 (A)** blau markiert) von jeweils einer hydrophoben Region (gelb) flankiert, was einen Zusammenschluss mit Zellmembranen fördert. Von den flaviviralen Proteasen DEN-2 NS2B-NS3pro und WNV NS2B-NS3pro existieren spezielle, rekombinante Konstrukte, bei denen die NS3-Domäne auf die N-terminalen 185 bzw. 187 Aminosäuren verkürzt und über „Glycin-Linker“ (Nonapeptid Gly<sub>4</sub>-Ser-Gly<sub>4</sub>) mit dem NS2B-Cofaktor verknüpft ist (**Abbildung 1-2 (B) und (C)**) <sup>[20]</sup>. Die Verwendung solcher Konstrukte der DEN-2 NS2B-NS3pro in Enzym-Assays hat gezeigt, dass der Glycin-Linker die katalytische Aktivität der Protease um das vierfache gegenüber dem Protease-Konstrukt ohne Glycin-Linker erhöht und eine Auto-Proteolyse zwischen dem NS2B-Cofaktor und der NS3pro-Domäne ausbleibt; in Abwesenheit des NS2B-Cofaktors ist die NS3-Protease inaktiv <sup>[53]</sup>. Der Aufbau und die Funktionen des NS2B-Cofaktors und

der NS3-Domäne sowie deren Interaktionen werden in den folgenden Kapiteln (**1.1.2 und 1.2**) genauer beschrieben.

Neben der Serin-Protease ist das NS3-Protein des Typ 2-Dengue-Virus noch mit zwei weiteren Enzymen, einer Nucleosid-Triphosphatase (NTPase) und einer intrinsischen RNA-Helicase ausgestattet, deren funktionelle Domänen innerhalb der Aminosäuren 160 bis 180 der NS3-Domäne liegen. Eine wichtige Rolle für die Aktivität der NTPase spielt dabei die Anhäufung der vier basischen Aminosäuren <sup>184</sup>Arg-Lys-Arg-Lys. Damit besitzt das Dengue-Virus-Polyprotein insgesamt drei für die Virus-Replikation bedeutende Enzyme <sup>[54]</sup>.

#### 1.1.2 Charakterisierung der Dengue-Virus Typ 2 NS2B-NS3 Protease (DEN-2 NS2B-NS3pro)

Die NS3-Domäne der Dengue-Virus Typ 2 NS2B-NS3 Protease (DEN-2 NS2B-NS3pro) besitzt eine dem Chymotrypsin ähnliche Faltung und besteht aus zwei  $\beta$ -Fässern, die sich aus jeweils sechs  $\beta$ -Strängen (A1, B1, C1, D1, E1a/E1b und F1 bzw. A2, B2a/B2b, C2, D2, E2a/E2b und F2) zusammensetzen und damit die wesentlichen Elemente der Sekundärstruktur des Proteins beinhalten; des Weiteren beteiligt sich auch der NS2B-Cofaktor mit zwei  $\beta$ -Strängen und einer  $\alpha$ -Helix an der Sekundärstruktur. In einem Spalt zwischen den beiden  $\beta$ -Fässern der NS3-Domäne befindet sich das aktive Zentrum mit der katalytischen Triade (His51, Asp75 und Ser135) (siehe **Abbildung 1-3** links) <sup>[20]</sup>. Die hohe Übereinstimmung der Aminosäure-Sequenzen (50-56 %) von DEN-2 NS2B-NS3pro und der West Nile Virus NS2B-NS3 Protease (WNV NS2B-NS3pro) <sup>[2, 20]</sup> verleiht diesen beiden flaviviralen Serin-Proteasen eine hohe Homologie <sup>[2]</sup> und ermöglicht damit einen interessanten Vergleich der Enzyme hinsichtlich ihrer Eigenschaften bei der Erkennung von Substraten und dem Mechanismus der Aktivierung der Protease <sup>[20]</sup>. An den Kristallstrukturen der DEN-2 NS2B-NS3pro und der WNV NS2B-NS3pro (**Abbildung 1-3**) ist zu erkennen, dass der NS2B-Cofaktor der WNV NS2B-NS3pro im Gegensatz zu dem der DEN-2 NS2B-NS3pro über fünf  $\beta$ -Stränge ( $\beta$ 1- $\beta$ 5) verfügt <sup>[20]</sup> und eine große Schlinge um die NS3pro-Domäne bilden kann <sup>[2, 20]</sup> (siehe **Abbildung 1-3** rechts); wiederum trägt der Cofaktor der DEN-2 NS2B-NS3pro mit seinem  $\beta$ 1-Strang, bestehend aus den

Aminosäuren 51-57 (NS2B), zum Aufbau des N-terminalen  $\beta$ -Fasses der NS3pro-Domäne bei (siehe **Abbildung 1-3 links**)<sup>[20]</sup>.

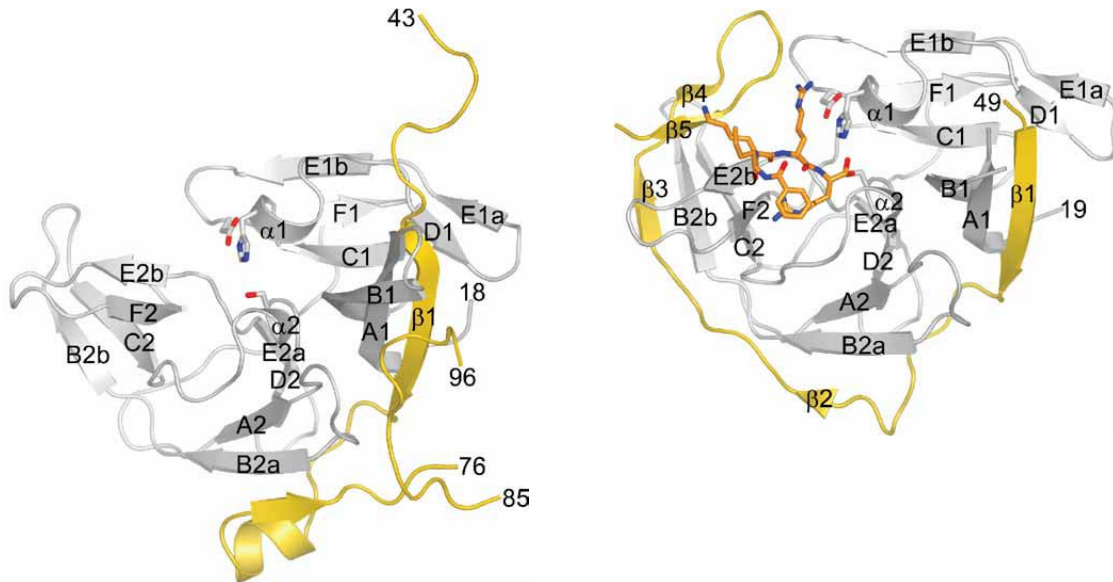


Abbildung 1-3: 3D-Strukturen der flaviviraler NS2B-NS3-Proteasen in Ab- und Anwesenheit eines Inhibitors (grau: NS3pro, gelb: NS2B)<sup>[20]</sup> **Links:** Dengue-Virus Typ 2 NS2B-NS3pro ohne Inhibitor (PDB-Code: 2FOM) **Rechts:** WNV NS2B-NS3pro als Komplex mit dem Inhibitor Bz-Nle-Lys-Arg-Arg-H (orange)<sup>[114,115]</sup> (PDB-Code: 2FP7)

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Structural and Molecular Biology (Erbel P, Schiering N, D'Arcy A, Rénatus M, Kroemer M, Lim SP, Yin Z, Keller TH, Vasudevan SG, Hommel U: Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus, Nature Structural & Molecular Biology, 13, 4, 372-373) Copyright © 2006

Für die allgemeine Bezeichnung der einzelnen Bindetaschen von Proteasen und ihrer peptidischen Substrate findet die Nomenklatur nach *Schechter* und *Berger* Anwendung<sup>[94]</sup>, bei welcher die Spaltstelle im Substrat als Ursprung dient und die einzelnen Aminosäure-Bausteine der Substrate links der Spaltstelle („non-prime site“) mit P1, P2, P3, P4... bzw. rechts der Spaltstelle („prime site“) mit P1', P2', P3', P4'... benannt werden. Die zu den Substrat-Aminosäuren gehörenden Bindetaschen des Enzyms erhalten die entsprechende Bezeichnung S1, S2, S3, S4 bzw. S1', S2', S3', S4'. Demnach ergibt sich für den in **Abbildung 1-4** als Vorlage dienenden, Substrat-basierten Peptid-Aldehyd-Inhibitor Bz-Nle-Lys-Arg-Arg-H<sup>[114,115]</sup> die Nomenklatur P1 und P2 für Arginin, P3 für Lysin und P4 für Norleucin.



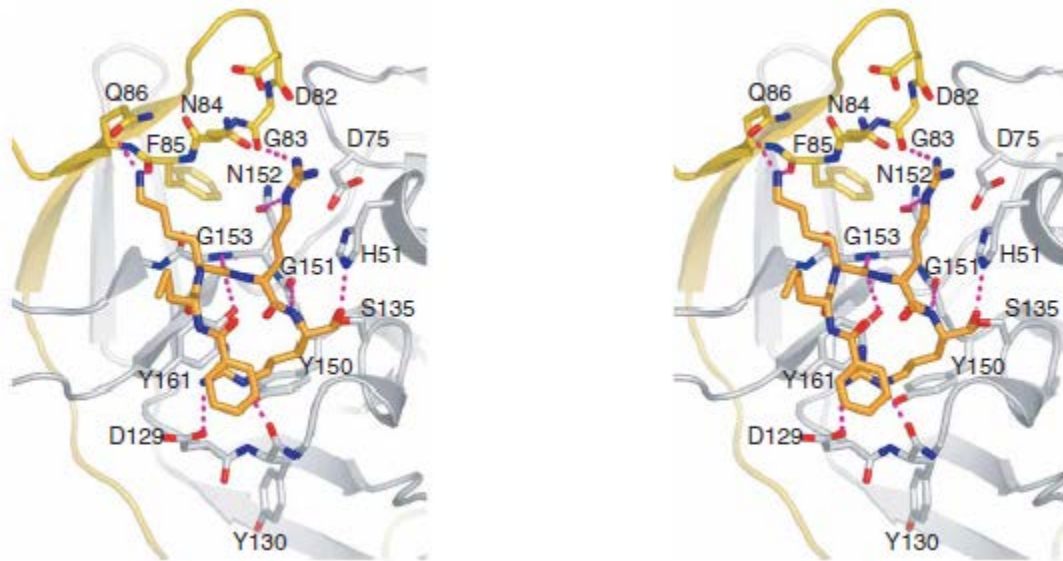


Abbildung 1-4: Stereo-Ansicht der Substrat-Bindungsstelle der WNV NS2B-NS3pro (Farbgebung wie in Abbildung 1-2) mit potentiellen Wasserstoff-Brückenbindungen als gepunktete Linien. Copyright eingeholt.<sup>[20]</sup>

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Structural and Molecular Biology (Erbel P, Schiering N, D'Arcy A, Renatus M, Kroemer M, Lim SP, Yin Z, Keller TH, Vasudevan SG, Hommel U: Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus, Nature Structural & Molecular Biology, 13, 4, 372-373) Copyright © 2006

Die Substrat-Bindungsstelle flaviviraler NS2B-NS3-Proteasen, wie in **Abbildung 1-4** am Beispiel der WNV NS2B-NS3pro gezeigt, enthält zahlreiche Aminosäuren der NS3-Domäne, die ebenso in den Sequenzen aller vier Dengue-Virus-Proteasen (DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4) vertreten sind: His51, Asp75, Asp129, Ser135, Tyr150, Gly151, Asn152, Gly153 und Tyr161; anstelle von Tyr130 enthalten die Dengue-Virus-Proteasen Phe130<sup>[14]</sup>. Mithilfe Computer-gestützter Methoden, z.B. molekulardynamischer Simulation, Erstellung von Homologie-Modellen und Konformationsanalysen der Bindungsmodi für Liganden gelang eine Zuordnung einzelner bestimmter Aminosäuren zu den jeweiligen Bindetaschen (S1-S4) der Dengue-Virus-Protease<sup>[3]</sup>:

- **S1:** Asp129, Phe130, Lys131, Pro132, Gly133, Thr134, Ser135, Tyr150, Tyr161 (NS3; alle erwartet und detektiert<sup>[3]</sup>; Lys131 nur bei DEN-1, DEN-3 und DEN-4<sup>[14]</sup>)

- **S2:** Asp80, Asp81, Gly82, Thr83 (NS2B); Val72, Lys73, Lys74, Asp75 (NS3; alle erwartet, aber nur Asp80 (NS2B) und Asp75 (NS3) detektiert <sup>[3]</sup>; Asp80 und Thr83 (NS2B) nur bei DEN-1 und DEN-3; Lys73 und Lys74 nur bei DEN-1, DEN-2 und DEN-3 <sup>[14]</sup>)
- **S3:** Met84, Lys85, Ile86 (NS2B; alle erwartet, aber nur Met84 detektiert <sup>[3]</sup>; Met84 nur bei DEN-1, DEN-2 und DEN-3; Lys85 nur bei DEN-1 <sup>[14]</sup>)
- **S4:** Val154, Val155 (NS3; alle erwartet und detektiert <sup>[3]</sup>)
- Weitere, für die Bindung von Liganden wichtige Aminosäuren: Gln35, Val36, Trp50, His51, Gly151, Asn152, Gly153 (NS3 <sup>[3]</sup>; Val36 nur bei DEN-1, DEN-3 und DEN-4 <sup>[14]</sup>)

Die Relevanz bestimmter Aminosäuren für die Bindung von Substraten und deren Einfluss auf die katalytische Aktivität der DEN-2 NS2B-NS3pro konnte neben Computergestützten, eher prädiktiven Methoden auch experimentell aufgeklärt werden: Mithilfe klonierter NS2B-NS3-cDNA-Fragmente erstellte man Mutanten des Enzym-Wildtyps und tauschte einzelne Aminosäuren, die entweder in vorausgegangenen Studien als verantwortliche Komponenten der Substrat-Bindung identifiziert wurden (z.B. Asp129, Phe130, Tyr150, Asn152, Gly153) <sup>[5]</sup> oder generell in flaviviralen bzw. sonstigen Serin-Proteasen häufig vorkommen, durch andere Aminosäuren aus <sup>[105]</sup>. Von diesen Mutationen führten zwölf (**Thr134Asp, Ser135Ala, Ser135Cys, Gly148Ala, Leu149Ala, Leu149Arg, Tyr150Ala, Tyr150Val, Tyr150His, Gly151Ala, Gly153Ala, Gly153Val**) zu einem vollständigen oder fast vollständigen Verlust der Protease-Aktivität; neun weitere Mutationen (**Asp129Lys, Asp129Arg, Asp129Leu, Phe130Ala, Phe130Leu, Gly133Ala, Gly136Ala, Asn152Ala, Asn152Gln**) bewirkten eine signifikante Reduktion der Aktivität. Ebenfalls, jedoch geringfügiger, zeigten 14 weitere Mutanten (**Val126Ala, Asp129Glu, Asp129Ser, Asp129Ala, Phe130Tyr, Thr134Ala, Ile139Leu, Ile139Ala, Ile140Ala, Gly144Pro, Leu149Ile, Tyr150Phe, Val154Ala, Val155Ala**) eine gegenüber der Wildtyp-Protease erniedrigte Enzym-Aktivität, während letztere bei den verbleibenden elf Mutanten (**Ser131Pro, Ser131Cys, Ile140Leu, Asp141Glu, Asp141Ala, Lys142Ala, Lys142Asn, Lys143Ala, Lys143Asn, Gly144Ala, Arg184Ala**) unverändert blieb. Aus den Ergebnissen

dieser Mutationsanalyse geht hervor, dass die größte Flexibilität des Austausches der Aminosäure Asp129 zuzuordnen ist, was für eine eher untergeordnete Rolle dieser Aminosäure bei der Bindung von Substraten spricht; im Gegensatz dazu sind (neben dem katalytischen Ser135) die Aminosäuren Gly133, Gly136, Gly148, Leu149 und Gly153 an der 3D-Struktur der Protease sowie an der Formung Bindetasche für das Substrat maßgeblich beteiligt <sup>[105]</sup>.

Eine wichtige, in vielfältiger Weise untersuchte Eigenschaft der DEN-2 NS2B-NS3pro ist deren Substrat-Spezifität, welche unter Anderem eine Grundlage für die Entwicklung potentieller Inhibitoren als Arzneistoffe zur Therapie flaviviraler Infektionskrankheiten darstellt <sup>[53,56,79]</sup>. Häufig wurden chromogene bzw. fluorogene Peptid-Substrate mit Aminosäure-Sequenzen P6-P1 <sup>[53]</sup> bzw. P6-P4' <sup>[79]</sup> analog zu den „non-prime site“- und „prime site“-Sequenzen <sup>[94]</sup> der nicht-strukturellen Proteine (NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4B/NS5), d.h. links bzw. links und rechts der natürlichen Spaltstellen der NS3-Protease, synthetisiert und hinsichtlich ihrer kinetischen Eigenschaften, z.B.  $K_M$ -Werte und katalytischer Umsetzungsraten ( $k_{cat}$  bzw.  $k_{cat}/K_M$ -Quotient) charakterisiert. <sup>[53,79]</sup>

Vier Peptid-Analoga der Sequenzen Ac-**Arg-Thr-Ser-Lys-Lys-Arg**-pNA (NS2A/NS2B), Ac-**Glu-Val-Lys-Lys-Gln-Arg**-pNA (NS2B/NS3), Ac-**Phe-Ala-Ala-Gly-Arg-Lys**-pNA (NS3/NS4A) und Ac-**Thr-Thr-Ser-Thr-Arg-Arg**-pNA (NS4B/NS5) zeigten hinsichtlich ihrer  $k_{cat}$ -Werte einerseits eine Umsetzungsgeschwindigkeit in der Reihenfolge NS4B/NS5 > NS2B/NS3 >> NS2A/NS2B ~ NS3/NS4A; andererseits nahmen die  $K_M$ -Werte in der Reihenfolge NS2B/NS3 >> NS4B/NS5 >> NS2A/NS2B ~ NS3/NS4A ab. Zur Beurteilung der gesamten Effizienz dieser Substrate wurden  $k_{cat}/K_M$ -Quotienten in der Reihenfolge NS4B/NS5 > NS3/NS4A > NS2A/NS2B > NS2B/NS3 berechnet, aus welcher eine deutliche Präferenz der DEN-2 NS2B-NS3pro für zwei benachbarte basische Aminosäuren an den Positionen P1 und P2 ihrer Substrate zu schließen war <sup>[53]</sup>.

Um auch die Spezifitäten für die Positionen P3 und P4 sowie die Sequenzen P1'-P4' rechts der Spaltstellen festlegen zu können, führte die Forschungsgruppe Li *et al.* eine ähnliche Studie mit einer Substanzbibliothek aus Tetra- und Octapeptid-Substraten an den Proteasen aller vier Dengue-Virus-Serotypen (DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4) durch <sup>[56]</sup> und erweiterte damit die von Leung *et al.* ermittelten Ergebnisse:

Die Substrat-Spezifität der Dengue-Virus-Proteasen setzt sich aus den Präferenzen für basische Aminosäuren (Arg/Lys) an Position P1, für Arg > Thr > Gln/Asn/Lys an Position P2, für Lys > Arg > Asn an Position P3 und für Nle > Leu > Lys > Xaa (aa = amino acid) an Position P4 peptidischer Substrate zusammen, während an den Positionen P1' und P3' Aminosäuren mit kleinen bzw. polaren Seitenketten (Gly, Ala, Ser) bevorzugt werden (**Abbildung 1-5**)<sup>[56]</sup>.

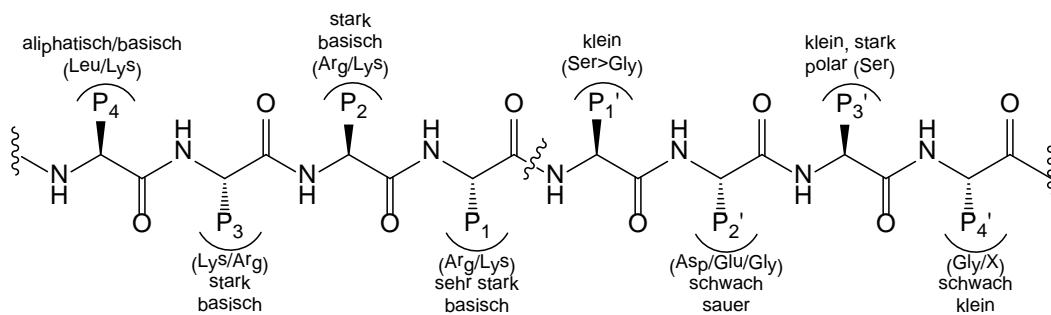


Abbildung 1-5: Zusammenfassende Übersicht der Substrat-Spezifitäten der Dengue-Virus-Proteasen<sup>[56]</sup>

Zur Analyse des Bindungsmodus peptidischer Substrate mit den bisher genannten bevorzugten Aminosäuren wurde von Li *et al.* zusätzlich ein Molecular Docking-Experiment mit dem Octapeptid Nle-Lys-Arg-Arg-Ser-Gly-Ser-Gly durchgeführt; als Target diente die Kristallstruktur des Komplexes der Dengue-Virus-NS3-Protease mit dem so genannten *Bowman-Birk-Inhibitor* (PDB-Code: 1DF9), wobei die Aminosäuren 44-51 dieses Inhibitors entsprechend der Sequenz des Octapeptids (P4-P4') mutiert und manuell mithilfe des Molecular Modeling-Computerprogrammes *Maestro* in die Bindetaschen der Dengue-Virus-NS3-Protease platziert wurden (**Abbildung 1-6**)<sup>[56]</sup>.

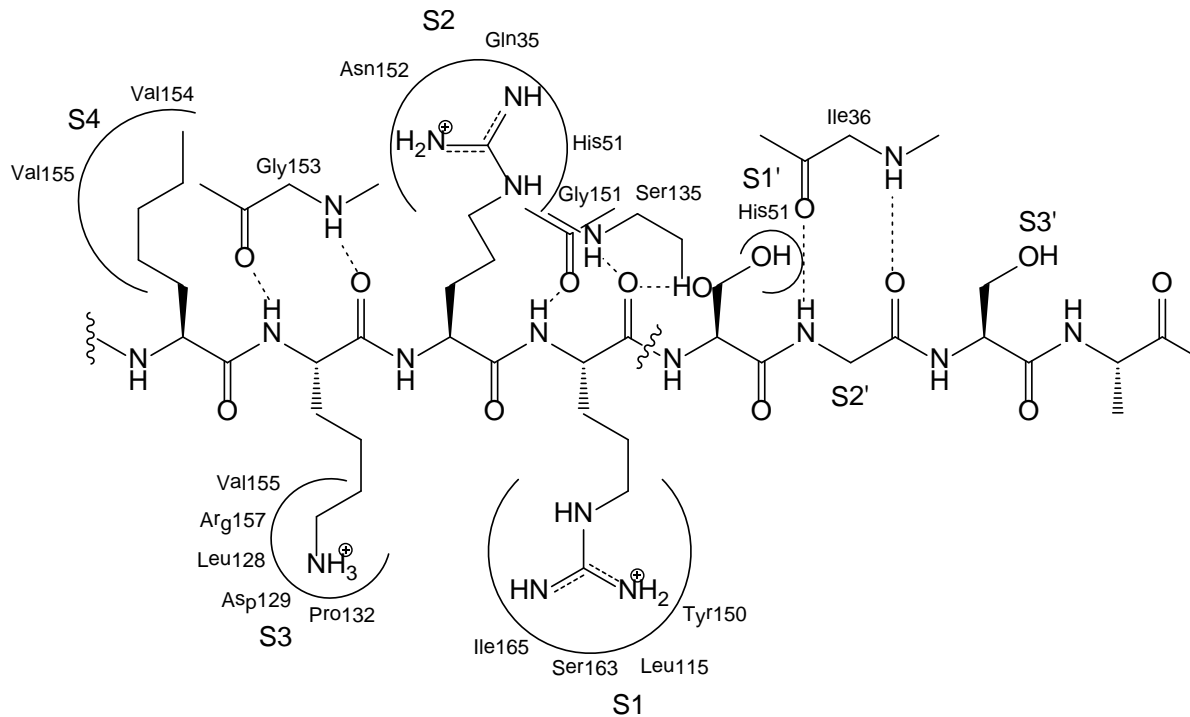


Abbildung 1-6: Theoretischer Bindungsmodus des Octapeptid-Substrates Nle-Lys-Arg-Arg-Ser-Gly-Ser-Gly mit Wechselwirkungen der einzelnen Aminosäure-Seitenketten mit den Bindetaschen der NS3-Protease <sup>[56]</sup>

Interessante, vertiefende Ergebnisse hinsichtlich der Substrat-Spezifität der DEN-2 NS2B-NS3pro lieferte eine von der Forschungsgruppe Niyomrattanakit *et al.* durchgeführte Studie über die Charakterisierung einer breitgefächerten, kombinatorischen Substanzbibliothek fluorogener Peptid-Substrate, basierend auf den Sequenzen P6-P4 und darüber hinaus P1'-P4' der nicht-strukturellen Proteine NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4B/NS5 sowie auch auf den Sequenzen nahe der Spaltstelle innerhalb des Dengue-Virus-Capsid-Proteins: Hierbei erwiesen sich die beiden Peptide Abz-**Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Leu-Thr-Leu**-nY-NH<sub>2</sub> ( $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 10870 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) und Abz-**Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Ala-Gly**-nY-NH<sub>2</sub> ( $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 11087 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) bezüglich ihrer Hydrolyserate als hoch effizient. Die Sequenz **Arg-Arg-Arg-Arg** entspricht den Aminosäuren P4-P1, die Sequenz **Ser-Ala-Gly** den Aminosäuren P1'-P3' des Capsid-Proteins; die Sequenz **Ser-Leu-Thr-Leu** repräsentiert hingegen die Aminosäuren P1'-P4' im Bereich der Spaltstelle NS3/NS4A. Die Ergebnisse dieser Studie verdeutlichten erneut die optimale Kombination basischer Aminosäuren im Bereich P4-P1 mit kleinen, polaren Aminosäuren im Bereich P1'-P3' <sup>[79]</sup>.

---

Hinsichtlich ihres aktiven Zentrums lassen sich für Chymotrypsin-ähnliche, flavivirale Serin-Proteasen drei Gemeinsamkeiten festhalten <sup>[2]</sup>:

- Eine klassische katalytische Triade, bestehend aus den Aminosäuren His51, Asp75 und Ser135 (bei Dengue-Virus-Proteasen und WNV NS2B-NS3pro);
- ein so genanntes „Oxyanion-Loch“, welches die im Übergangszustand am Carbonyl-O-Atom des zu spaltenden Peptids entstehende negative Ladung stabilisiert;
- die zur Sekundärstruktur gehörenden  $\beta$ -Stränge E2 und B1, welche die Bindung des Substrates sowie dessen Positionierung im aktiven Zentrum begünstigen.

Im Grundzustand der aktiven Protease bildet die Hydroxy-Gruppe des katalytischen Serins (Ser135) eine Wasserstoff-Brückenbindung mit dem Imidazol-Ring des katalytischen Histidins (His51), dieser wiederum eine H-Brücke mit der Carboxy-Gruppe des katalytischen Aspartats (Asp75) <sup>[2]</sup>; analog zu der in Trypsin vorkommenden Aminosäure Asp189 auf dem Grund der Bindetasche ist bei flaviviralen Serin-Proteasen die Aminosäure Asp129 zur Ausbildung einer Salzbrücke mit den positiv geladenen Seitenketten basischer Aminosäuren an Position P1 peptidischer Substrate befähigt <sup>[2,20]</sup>. Der genaue Katalyse-Mechanismus von Serin-Proteasen wird im folgenden Kapitel **(1.2)** ausführlich erklärt.

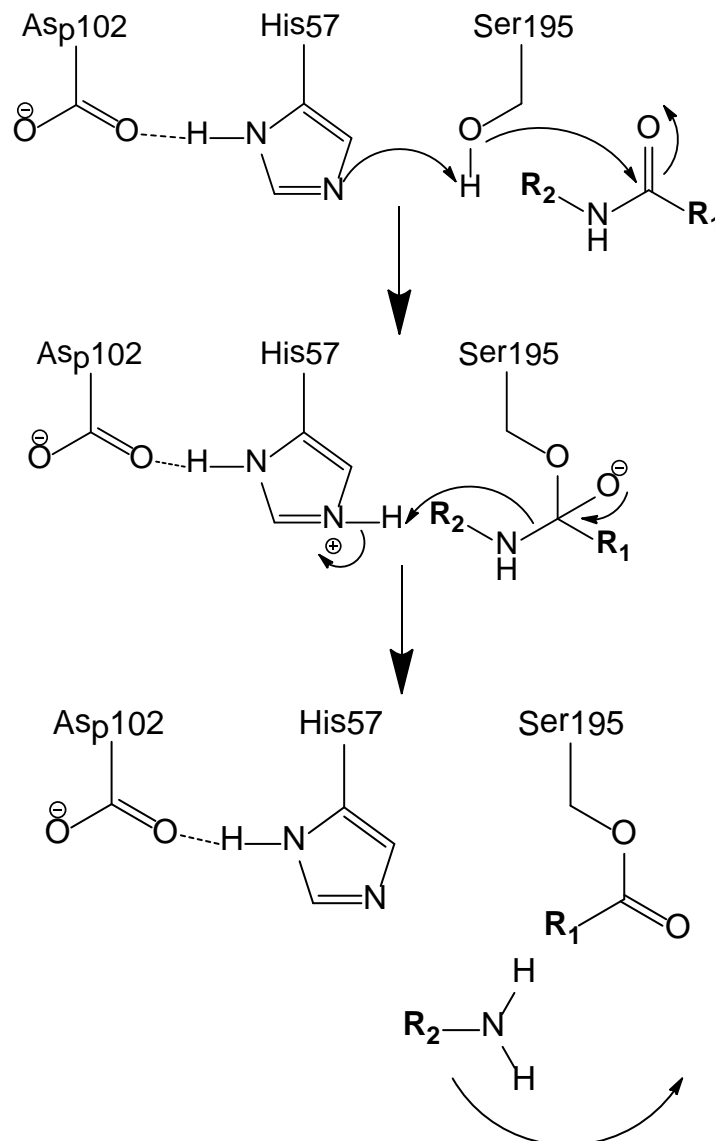
## 1.2 Vorkommen, Bedeutung, Aufbau, Struktur und katalytische Aktivität von Serin-Proteasen

Serin-Proteasen kommen in großer Vielfalt im menschlichen Organismus vor und erfüllen dabei hinsichtlich ihrer gemeinsamen Funktion, Peptid-Bindungen in Proteinen bzw. Peptiden hydrolytisch zu spalten, unterschiedliche Aufgaben in den einzelnen Bereichen des Organismus. Zu den körpereigenen Serin-Proteasen gehören beispielsweise Prohormon-Convertasen, die pankreatischen Verdauungsenzyme Trypsin, Chymotrypsin und Elastase sowie die an der Blutgerinnung bzw. Thrombolysen beteiligten Enzyme Thrombin und Plasmin<sup>[58]</sup>. Von den hier genannten Serin-Proteasen sollen in diesem Kapitel Trypsin und Chymotrypsin näher erläutert werden, da die Dengue-Virus-Protease mit den Enzymen der Trypsin-Familie verwandt ist<sup>[5]</sup>, eine dem Chymotrypsin ähnliche Faltung aufweist<sup>[20]</sup> und die beiden pankreatischen Enzyme sehr ähnliche Tertiärstrukturen besitzen<sup>[60]</sup>.

Trypsin und Chymotrypsin dienen der Verdauung von Proteinen, die mit der Nahrung aufgenommen werden. Sie müssen zunächst aus ihren inaktiven Formen, den so genannten Proenzymen Trypsinogen und Chymotrypsinogen, in ihre aktive Form überführt werden. Nach der Synthese von Trypsinogen und Chymotrypsinogen in den exokrinen Pankreas-Zellen findet im Duodenum eine Aktivierung statt, indem die in den Zellen der intestinalen Mucosa gebildete Enteropeptidase das Trypsinogen durch Abspaltung eines N-terminalen Hexapeptids zu Trypsin umsetzt. Chymotrypsin entsteht durch Abspaltung zweier Dipeptide des Chymotrypsinogens, wobei diese Reaktion durch Trypsin oder bereits vorhandenes Chymotrypsin katalysiert wird; letzteres ist somit zur Autokatalyse befähigt<sup>[58]</sup>.

Der allgemeine Mechanismus der Katalyse bei Serin-Proteasen ist in den folgenden **Schema 1-1** bis **Schema 1-3** am Beispiel des Chymotrypsins dargestellt<sup>[58]</sup>. Sowohl Chymotrypsin als auch Trypsin besitzen in ihrem aktiven Zentrum eine katalytische Triade, bestehend aus den drei Aminosäuren Histidin-57 (His57), Aspartat-102 (Asp102) und Serin-195 (Ser195)<sup>[7,60,86,98]</sup>. Die Seitenkette von Ser195 ist über eine Wasserstoff-Brückenbindung mit dem Imidazol-Ring von His57 verbunden, dessen NH-Gruppe wiederum durch eine H-Brücke mit der Carboxylat-Gruppe von Asp102 verknüpft ist, was eine Polarisierung der Hydroxy-Gruppe von Ser195 zur Folge hat<sup>[58]</sup>. Die hydrolytische Spaltung des Protein- oder Peptid-Substrates erfolgt in zwei wesentlichen Schritten:

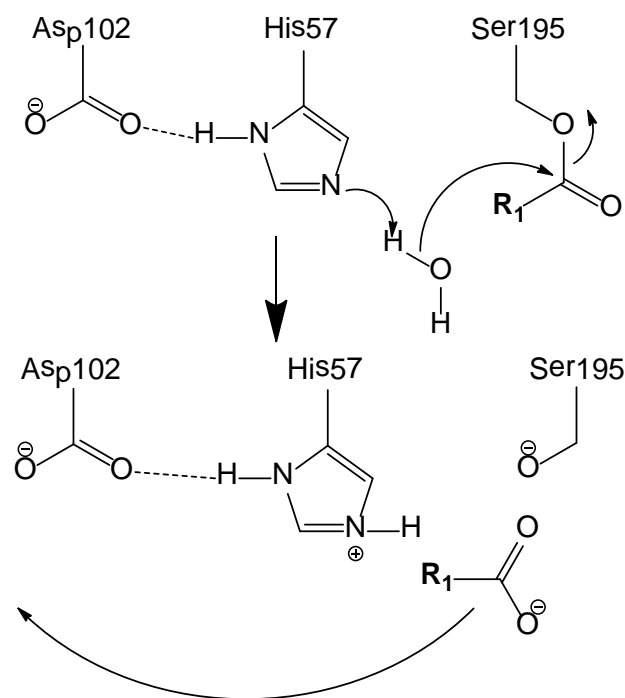
Im ersten Reaktionsschritt (**Schema 1-1**) fungiert His57 als allgemeine Base und akzeptiert das Proton der Hydroxy-Gruppe von Ser195, wodurch der deprotonierte, stark nucleophile Seryl-Rest das Carbonyl-C-Atom der zu spaltenden Peptid-Bindung angreift. Es entsteht zunächst ein Intermediat, in dem das Carbonyl-C-Atom tetraedrisch koordiniert ist. Aus diesem tetraedrischen Intermediat wird das freie Amin  $R_2-NH_2$  als erstes Reaktionsprodukt freigesetzt, wodurch ein kovalentes Acyl-Enzym ( $R_1-CO-O-Ser195$ ) zurückbleibt <sup>[58,85]</sup>.



Schema 1-1: Erster Reaktionsschritt des Katalyse-Mechanismus von Serin-Proteasen am Beispiel von Chymotrypsin <sup>[58]</sup>

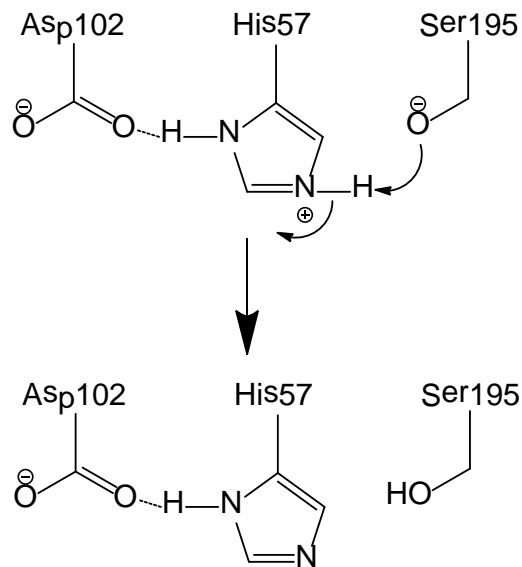


Im zweiten Reaktionsschritt erfolgt die hydrolytische Abspaltung des zweiten Produktes, welches als Ester kovalent an Ser195 gebunden ist (**Schema 1-2**). Dabei kommt es zur Bindung eines Wasser-Moleküls als zweites Substrat im aktiven Zentrum und zur Übertragung des Acyl-Restes ( $R_1\text{-CO}$ ) auf dieses Wasser-Molekül, wodurch das zweite Produkt ( $R_1\text{-COOH}$ ) freigesetzt wird <sup>[58,85]</sup>.



Schema 1-2: Zweiter Reaktionsschritt des Katalyse-Mechanismus von Serin-Proteasen am Beispiel von Chymotrypsin <sup>[58]</sup>

Das im zweiten Reaktionsschritt protonierte His57 fungiert letztendlich als allgemeine Säure, indem es ein Proton auf den anionischen Seryl-Rest überträgt und damit das aktive Zentrum wieder herstellt (**Schema 1-3**) <sup>[58]</sup>.



Schema 1-3: Wiederherstellung des katalytischen Zentrums von Serin-Proteasen am Beispiel von Chymotrypsin <sup>[58]</sup>

Trypsin und Chymotrypsin gehören in die Familie der Serin-Proteasen mit Chymotrypsin-ähnlicher Faltstruktur und bestehen aus zwei  $\beta$ -Fässern, welche das aktive Zentrum mit der katalytischen Triade (His57, Asp102 und Ser195) an der Verbindungsstelle der beiden Domänen einschließen. Die links in **Abbildung 1-7** dargestellte 3D-Struktur des Trypsins zeigt sowohl die beiden  $\beta$ -Fässer als auch acht Schleifen („Loops“), welche die Oberfläche des Proteins bilden: Schleife A (Aminosäuren 34-41), Schleife B (Aminosäuren 56-64), Schleife C (Aminosäuren 97-103), Schleife D (Aminosäuren 143-149), Schleife E (Aminosäuren 74-80), Schleife 1 (Aminosäuren 185-188), Schleife 2 (Aminosäuren 217-225) und Schleife 3 (Aminosäuren 169-174). Bei dem in dieser Struktur gebundenen Peptid-Substrat  $\text{NH}_2\text{-Pro-Cys-Lys-Ala-Arg-COOH}$  sind dessen Aminosäuren Pro, Lys und Arg mit den Positionen P3, P1 und P3' gekennzeichnet <sup>[86]</sup>.

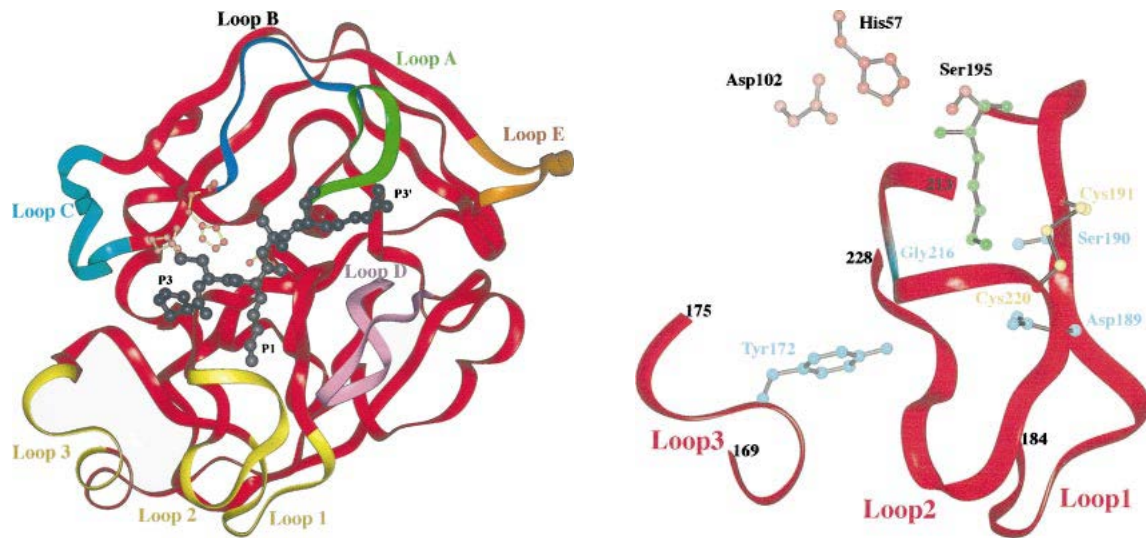


Abbildung 1-7: Struktur des Trypsins mit zwei  $\beta$ -Fässern, acht oberflächenbildende Schleifen („Loops“) und dem gebundenen Peptid-Substrat  $\text{NH}_2\text{-Pro-Cys-Lys-Ala-Arg-COOH}$  (links) sowie die S1-Bindetasche des Trypsins mit einer in grüner Farbe gekennzeichneten, gebundenen Lysin-Seitenkette (rechts). Copyright eingeholt.<sup>[87]</sup>

Die S1-Bindetaschen des Trypsins und des Chymotrypsins sind hinsichtlich ihrer Primär- (Aminosäure-Sequenz) und Tertiärstrukturen (Peptid-Rückgrat) praktisch identisch<sup>[60]</sup>, unterscheiden sich jedoch maßgeblich dadurch, dass Chymotrypsin anstelle der in Trypsin vorkommenden Aminosäure Asp189 die Aminosäure Ser189 besitzt, wodurch der S1-Bindetasche des Chymotrypsins eine negative Ladung fehlt<sup>[60,86]</sup>. Da sich die Aminosäure 189 bei beiden Enzymen jeweils auf dem Grund der S1-Bindetasche befindet<sup>[60,86]</sup>, bestimmt sie dadurch die chemischen Eigenschaften dieser Bindetasche<sup>[60]</sup>.

Die rechts in **Abbildung 1-7** dargestellte 3D-Struktur zeigt die S1-Bindetasche des Trypsins und beinhaltet die in roter Farbe gekennzeichneten Aminosäuren der katalytischen Triade (His57, Asp 102 und Ser195), die in blauer Farbe gekennzeichneten „Schlüssel-Aminosäuren“ (Tyr172, Asp189, Ser190 und Gly216) sowie eine in grüner Farbe gekennzeichnete Lysin-Seitenkette; bei den roten Bändern handelt es sich um Strukturelemente, die für die Substrat-Spezifität entscheidend sind und aus den Aminosäuren 169-175, 184-195 und 213-228 bestehen. Drei  $\beta$ -Stränge, verbunden durch die Schleifen 1 und 2 sowie durch die Disulfid-Brücke Cys191-Cys220, bilden die Wände der S1-Bindetasche; an einer dieser Wände befinden sich die Aminosäuren Gly216 und Gly226, während die Aminosäuren 190 und 228 in den Boden der Bindetasche hineinragen und damit als Modulatoren

der Substrat-Spezifität fungieren. Sowohl bei Trypsin als auch bei Chymotrypsin ermöglichen die Glycin-Reste Substraten mit großen Seitenketten den Zugang zum Boden der S1-Bindetasche <sup>[86]</sup>.

Die Ähnlichkeit der Serin-Proteasen Trypsin und Chymotrypsin hinsichtlich ihrer Tertiärstruktur kann durch eine Überlagerung der Strukturen dieser beiden Enzyme dargestellt werden (**Abbildung 1-8 A**). Laut Aminosäure-Sequenz (**Abbildung 1-8 B**) wird bei Chymotrypsin die S1-Bindetasche durch die Aminosäuren 189-195, 214-220 und 225-228 gebildet, während die nahe gelegenen Schleifen („Loops“) L1 und L2 die Aminosäuren 185-188 und 221-224 enthalten. Ein computer-gestütztes Clustering-Experiment zeigte, dass sich diese beiden Schleifen bei Trypsin und Chymotrypsin hinsichtlich ihrer dynamischen Eigenschaften unterscheiden und deren Beweglichkeit stark mit der Beweglichkeit bestimmter Aminosäuren in den Bindetaschen korreliert, was folglich für die Aktivität und Substrat-Spezifität der beiden Enzyme von Bedeutung ist: Der Austausch von L1 und L2 des Trypsins durch die des Chymotrypsins führte zu einer Veränderung der Beweglichkeit, Aktivität und Substrat-Spezifität des Hybrid-Trypsins in Richtung Chymotrypsin <sup>[60]</sup>.

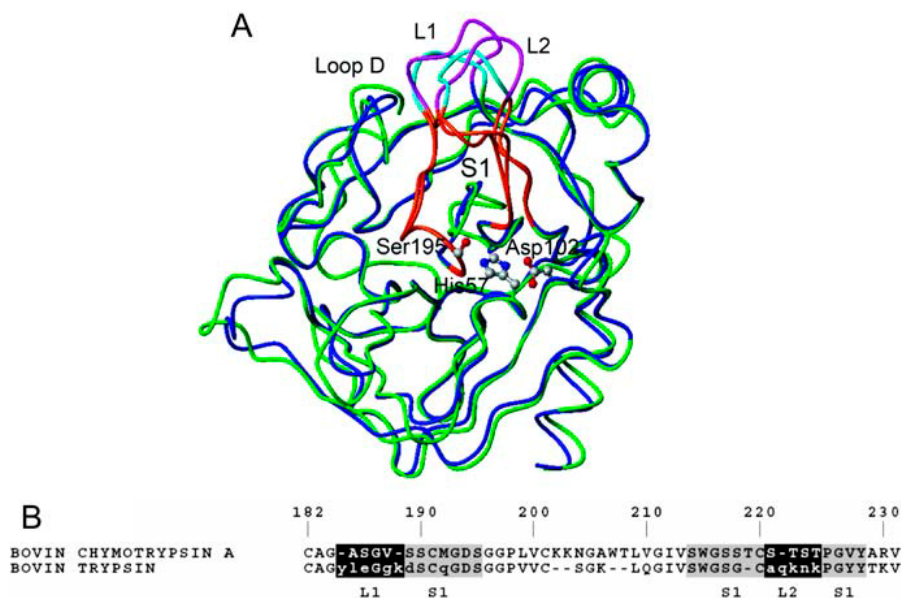


Abbildung 1-8: Überlagerte Strukturen von Trypsin (grün) und Chymotrypsin (blau) – (A) Tertiärstruktur – (B) Aminosäure-Sequenz von Trypsin und Chymotrypsin im Bereich der Schleifen („Loops“) L1 und L2 (schwarz unterlegt) und der S1-Bindetasche (grau unterlegt). Copyright eingeholt. <sup>[61]</sup>

Chymotrypsin besitzt in der Nähe des katalytischen Serins (Ser195) eine tiefe Tasche, die ausreichend groß ist, dass sich Moleküle mit aromatischen Resten, z.B. Indol, einlagern können. Besetzt ein solches Molekül diese Tasche, so wird es zwischen den Peptid-Bindungen Ser190-Cys191 und Cys191-Met192 auf der einen Seite und der Peptid-Bindung Trp215-Gly216 auf der anderen Seite eingeschlossen. An hydrophoben Wechselwirkungen sind die Aminosäuren Ser190, Val213, Trp215 und Tyr228 sowie die Disulfid-Brücke Cys191-220 beteiligt <sup>[7,98]</sup>. Den genauen Aufbau der S1-Bindungstasche des Chymotrypsins präsentiert die **Abbildung 1-9**, aus welcher hervorgeht, dass sie sich im Wesentlichen aus den Aminosäuren Ser189, Ser214, Trp215, Gly216 und Gly226 zusammensetzt, wobei Ser189, Gly216 und Gly226 für die Tiefe und Hydrophobizität der Bindetasche ausschlaggebend sind. Bei der Bindung eines Peptid-Substrates kommen Wechselwirkungen von dessen Aminosäuren an Positionen P1-P3 mit den Aminosäuren Ser214, Trp215 und Gly216 der S1-Bindetasche des Chymotrypsins zustande <sup>[60]</sup>.

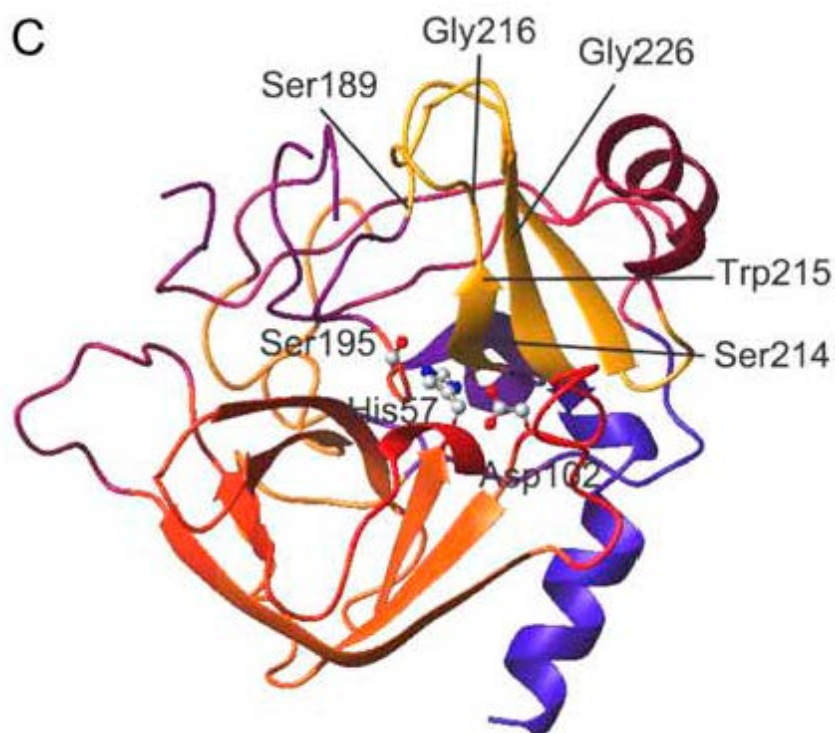


Abbildung 1-9: 3D-Struktur des Chymotrypsins mit verschiedenfarbig dargestellten Clustern (Schleifen L1 und L2 in violetter Farbe). Copyright eingeholt. <sup>[61]</sup>

Wenngleich sich Trypsin und Chymotrypsin bezüglich ihrer katalytischen Mechanismen sowie ihrer Struktur ähneln <sup>[60]</sup>, unterscheiden sich diese beiden Enzyme jedoch in ihrer Substrat-Spezifität: Trypsin spaltet bevorzugt Peptid-Bindungen in direkter Nachbarschaft von Aminosäuren mit basischen Seitenketten (Arginin, Lysin), wobei die Carboxy-Gruppe der Aminosäure Asp189 eine Salzbrücke mit der Guanidin-Funktion der Arginin-Seitenkette bilden kann; Chymotrypsin hingegen bevorzugt Substrate mit aromatischen Seitenketten (z.B. Tryptophan) <sup>[98]</sup>. Obwohl durch Asp189 die Spezifität des Trypsins für Arginin- und Lysin-haltige Substrate wesentlich bestimmt wird, bewirkt dessen Austausch durch andere Aminosäuren (z.B. Serin oder Lysin) keine Veränderung der Substratspezifität <sup>[22,31,86]</sup>. Eine Präferenz für Peptid-Substrate mit basischen Aminosäure-Seitenketten, insbesondere für ein zusätzliches Arginin an Position P4, wurde im Übrigen auch bei den humanen Serin-Proteasen Furin und Prohormon-Convertase PC1 beobachtet <sup>[41]</sup>.

Neben den bisher beschriebenen, im menschlichen Organismus vorkommenden Serin-Proteasen Trypsin und Chymotrypsin sei noch die als therapeutisches Target bedeutsame Hepatitis C Virus NS3 Protease (HCV NS3pro-NS4A) zu erwähnen, bei der es sich ebenfalls um eine Serin-Protease, jedoch mit einigen wesentlichen Unterschieden zu den *Flavivirus*-Proteasen DEN-2 NS3B-NS3pro und WNV NS2B-NS3pro, handelt <sup>[2]</sup>.

Mit der von Kim *et al.* beschriebenen Röntgen-Kristallstruktur einer verkürzten HCV NS3 Protease-Domäne (tNS3) als Komplex mit einem synthetischen Peptid, welches die essentielle NS3-bindende Region des NS4A-Cofaktors darstellte, konnte für die HCV NS3 Protease-Domäne eine dem Chymotrypsin ähnliche Faltung gezeigt werden. Die C-terminale Domäne besteht zum Einen aus dem für zahlreiche Enzyme der Chymotrypsin-Familie charakteristischen, sechs-strängigen  $\beta$ -Fass, zum Anderen aus einer  $\alpha$ -Helix, während die N-terminale Domäne über acht  $\beta$ -Stränge verfügt, von denen einer dem NS4A-Cofaktor angehört. Von den drei Aminosäuren der katalytischen Triade (in dieser Kristallstruktur als His1083, Asp1107 und Ser1165 definiert) befinden sich die ersten beiden innerhalb der N-terminalen, das katalytische Serin auf der C-terminalen Domäne; damit liegt das aktive Zentrum des HCV tNS3-NS4A-Komplexes in einem Spalt zwischen beiden Domänen (**Abbildung 1-10**) <sup>[44]</sup>.

Außer der Chymotrypsin-ähnlichen Faltung weist die HCV NS3 Serin-Protease drei weitere wichtige Merkmale auf: Erstens bildet die für die Aktivierung der Protease verantwortliche Region des NS4A-Cofaktors einen  $\beta$ -Strang, welcher mit dem  $\beta$ -Faltblatt der N-terminalen Domäne im Kern des Enzyms interkaliert; dieser  $\beta$ -Strang ist in der **Abbildung 1-10** als Magenta-farbener Pfeil dargestellt. Zweitens existiert eine Bindungsstelle für ein Metall-Kation, hier Zink ( $\text{Zn}^{2+}$ , in der **Abbildung 1-10** als blauer Punkt dargestellt), welches eine tetraedrische Koordination mit drei Cystein-Resten (Cys1123, Cys1125 und Cys 1171) eingeht. Drittens fehlen der HCV NS3 Protease die für andere Enzyme der Chymotrypsin-Familie typischen Schleifen „Loops“, welche bei der Form der Substrat-Bindetaschen eine entscheidende Rolle spielen <sup>[44]</sup>.

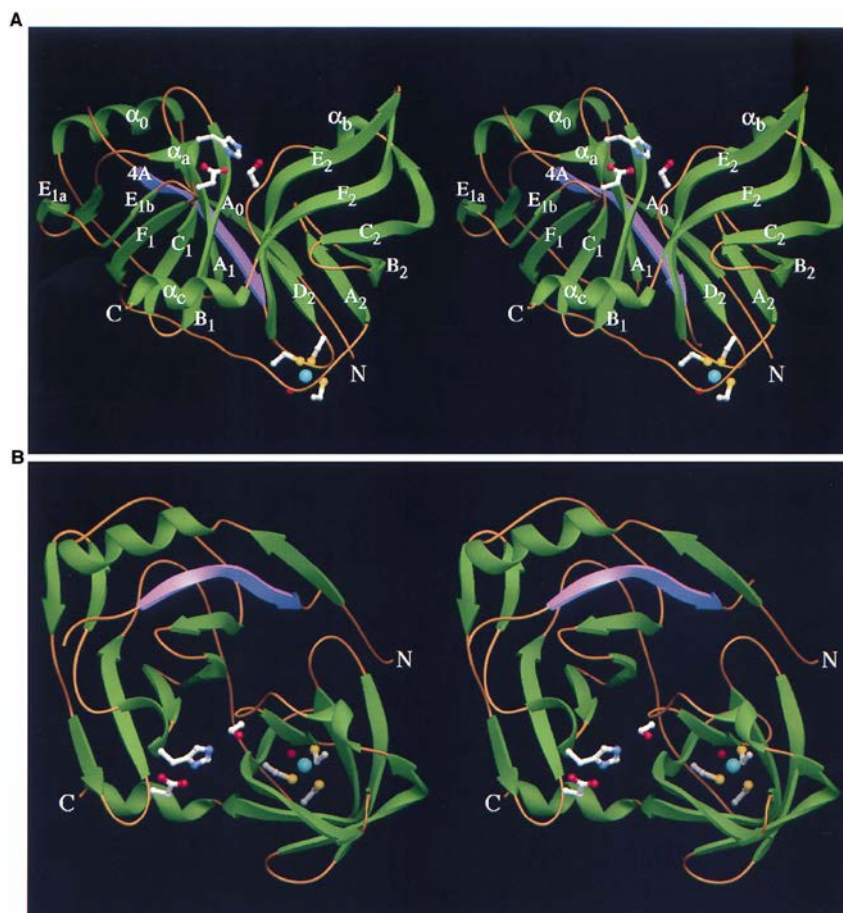


Abbildung 1-10: Kristallstruktur der Hepatitis C Virus NS3 Protease (HCV NS3pro-NS4A) mit einer Ansicht des aktiven Zentrums, N-terminaler Domäne links und C-terminaler Domäne rechts (A) sowie einer Ansicht von oberhalb des aktiven Zentrums entlang der Achse des C-terminalen  $\beta$ -Fasses (B). Copyright eingeholt <sup>[45]</sup>

Hinsichtlich Struktur und Funktion der HCV NS3 Protease besteht zwar eine Verwandtschaft mit der *Flavivirus*-Protease WNV NS2B-NS3pro, welche jedoch aufgrund der nur 17%igen Übereinstimmung der Aminosäure-Sequenzen dieser beiden Enzyme als entfernt einzustufen ist <sup>[2]</sup>. Im Gegensatz zu der WNV NS2B-NS3pro fungiert bei der HCV NS3 Protease das NS4A-Polypeptid als Cofaktor <sup>[2]</sup>, welcher aus 54 Aminosäuren besteht und sich in drei Bereiche einteilen lässt: Das N-terminale Drittel ist reich an hydrophoben Aminosäuren; der zentrale Bereich enthält sowohl hydrophobe als auch hydrophile Aminosäuren (z.T. mit geladenen Seitenketten); der C-terminale Bereich besitzt aufgrund von sieben Aminosäuren mit sauren Seitenketten eine hohe negative Ladung <sup>[57]</sup>. Demnach fehlt der HCV NS3 Protease der bei *Flavivirus*-Proteasen vorhandene, C-terminale hydrophobe Bereich des NS2B-Cofaktors <sup>[2]</sup>.

Generell bestehen zwischen *Flavivirus*-Proteasen und HCV NS3pro-NS4A zwei grundsätzliche Unterschiede: Erstens verfügt letztere über einen längeren C-Terminus, zweitens weisen *Flavivirus*-Proteasen zusätzlich eine aus acht Aminosäuren aufgebaute, eingeschobene Schleife („Loop“) auf. Darüber hinaus findet bei *Flavivirus*-Proteasen die Reorganisation der Sekundär- und Tertiärstrukturen innerhalb des N-terminalen  $\beta$ -Fasses statt, indem der NS2B-Cofaktor aufgrund seiner Länge mit dem C-terminalen Lappen des Proteins interkaliert, was bei HCV NS3pro-NS4A nicht der Fall ist. Letztere besitzt einen in Chymotrypsin-ähnlicher  $\beta$ -Fass-Konformation vorliegenden, C-terminalen Lappen, welcher in seiner Struktur nicht durch den NS4A-Cofaktor beeinflusst wird <sup>[2]</sup>.

Zur Therapie chronischer Hepatitis-C-Infektionen werden heutzutage zwei im Handel befindliche, peptidomimetische Arzneistoffe mit Ketoamid-Funktion eingesetzt, deren Wirksamkeit als HCV NS3pro-NS4A-Inhibitoren im nanomolaren Konzentrationsbereich liegt: **Boceprevir** ( $K_i = 14$  nM) <sup>[38,106]</sup> und **Telaprevir** ( $K_i = 7$  nM) <sup>[49]</sup> (Strukturen siehe **Abbildung 1-11**).

Der Wirkmechanismus dieser Inhibitoren der HCV NS3pro-NS4A beruht auf einem nucleophilen Angriff des  $\gamma$ -O-Atoms von Ser139 auf das C-Atom der Keto-Gruppe unter Bildung eines Oxyanions, welches über eine Wasserstoff-Brückenbindung mit His57 verbunden ist. Des Weiteren fungiert das O-Atom der P1-Amid-Funktion als H-Brücken-Akzeptor gegenüber den NH-Gruppen von Ser139 und Gly137, wodurch letztendlich das



„Oxyanion-Loch“ entsteht <sup>[89,106]</sup>. Ketoamide als Inhibitoren der DEN-2 NS2B-NS3pro werden später noch im **Kapitel 1.3.2** beschrieben.

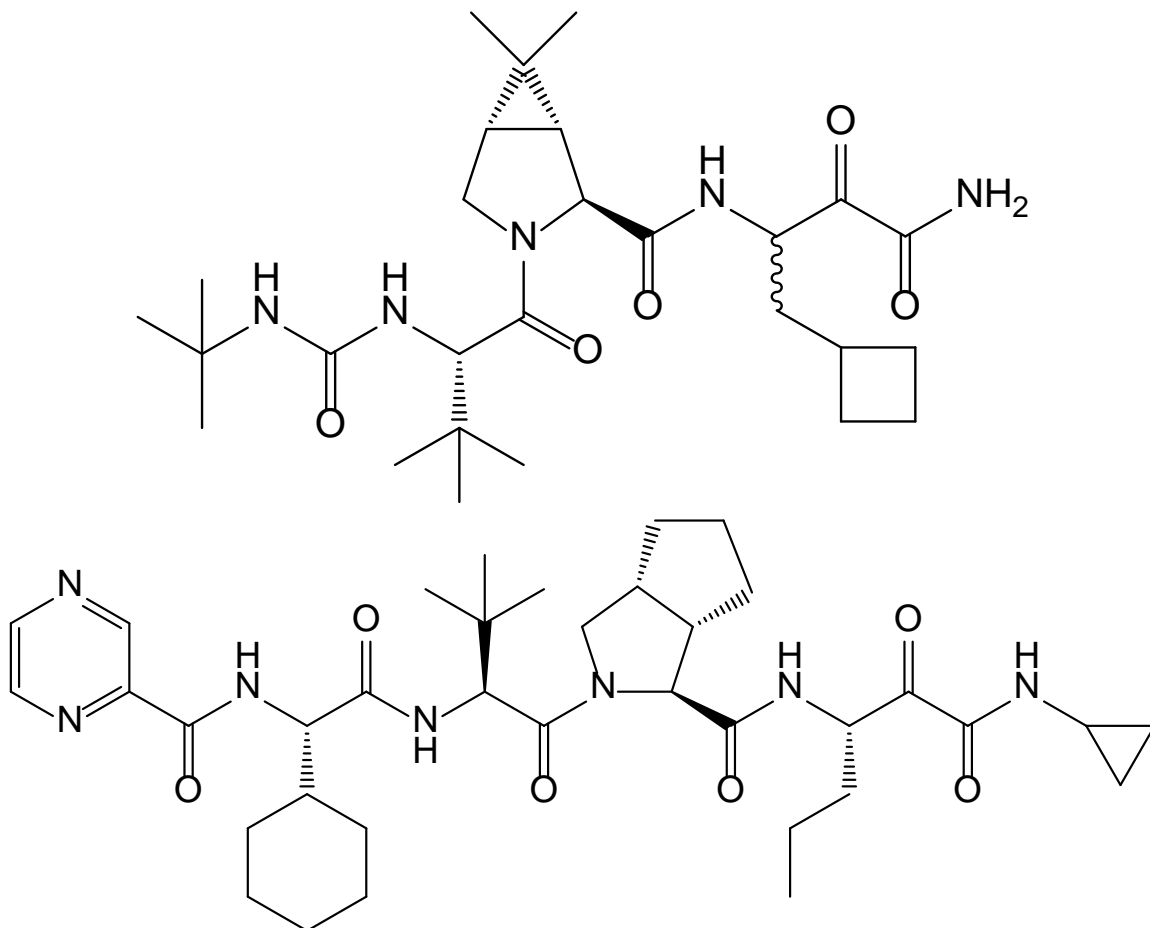


Abbildung 1-11: Strukturen der zur Therapie chronischer Hepatitis-C-Infektionen eingesetzten HCV NS3pro-NS4A-Inhibitoren **Boceprevir** (oben) <sup>[38,106]</sup> und **Telaprevir** (unten) <sup>[49]</sup>

Neben der bisher beschriebenen kompetitiven Hemmung, bei welcher ein Inhibitor direkt an das aktive Zentrum eines Enzyms bindet und dieses durch Interaktion mit den Aminosäuren der katalytischen Triade hemmt, können Serin-Proteasen auch nach verschiedenen nicht-kompetitiven Mechanismen außerhalb des aktiven Zentrums gehemmt werden.

Die Hepatitis C Virus NS3 Protease (HCV NS3pro-NS4A) besitzt zwei natürliche Co-faktoren: Das nicht-strukturelle Protein NS4A und das Zink-Kation ( $Zn^{2+}$ ), welche bereits zu einem früheren Zeitpunkt in diesem Kapitel beschrieben wurden <sup>[44]</sup>. Bei Abwesenheit des Zink-Ions ist die HCV NS3pro nicht in der Lage, sich in ihre proteolytisch aktive

Konformation zu falten; es entsteht lediglich eine partiell gefaltete, inaktive Konformation, welche mithilfe allosterischer Inhibitoren stabilisiert und „gefangen“ werden kann. Demzufolge können Wechselwirkungen des Enzyms weder mit dem Substrat noch mit dem NS4A-Cofaktor stattfinden, wodurch der Lebenszyklus des Hepatitis-C-Virus blockiert wird. Dieser neue Mechanismus einer nicht-kompetitiven Hemmung der HCV NS3pro wurde von der Forschungsgruppe Abian *et al.* experimentell beschrieben und stellt eine weitere Strategie für die Entwicklung neuer Wirkstoffe zur Therapie der Hepatitis C dar<sup>[1]</sup>.

Über die nicht-kompetitive Hemmung von Trypsin veröffentlichte die Forschungsgruppe Migliolo *et al.* eine sowohl experimentell als auch von Docking-Rechnungen unterstützte Studie mit dem Inhibitor ApTKI (*Adenanthera pavonina* Kunitz trypsin inhibitor), einem aus den Samen der Pflanze *Adenanthera pavonina* L. isolierten Protein<sup>[69]</sup>. Der mögliche nicht-kompetitive Bindungsmodus des Trypsin-ApTKI-Komplexes ist in der **Abbildung 1-12** dargestellt.

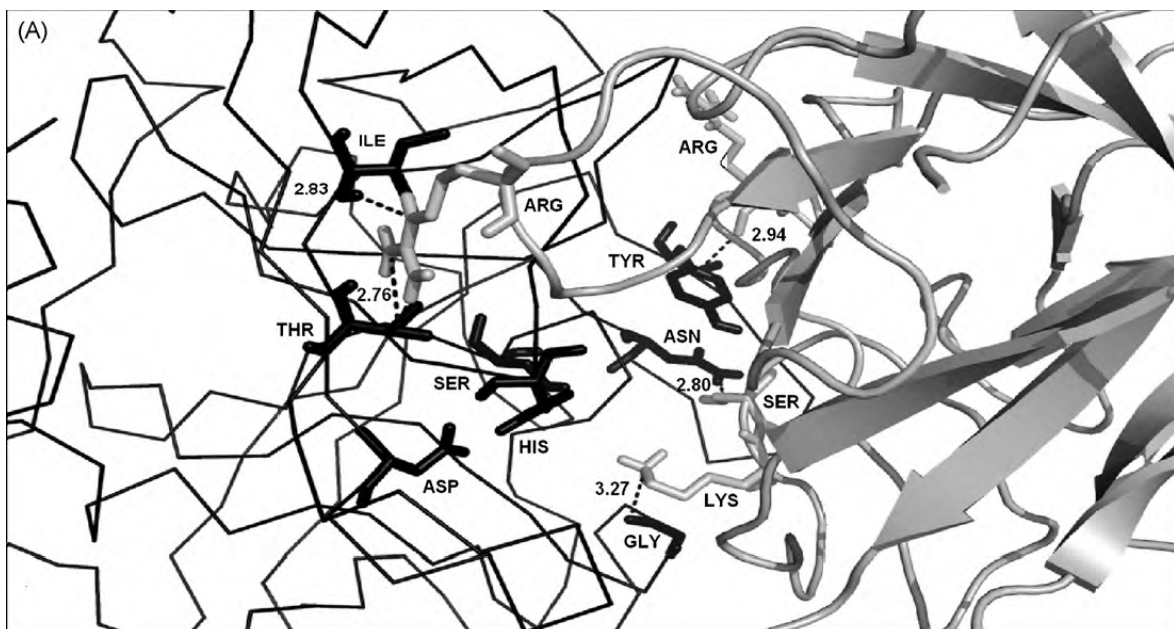


Abbildung 1-12: Möglicher nicht-kompetitiver Bindungsmodus des Inhibitors ApTKI (*Adenanthera pavonina* Kunitz trypsin inhibitor) mit Trypsin. Copyright eingeholt.<sup>[70]</sup>

Laut Docking-Rechnung verhindert der nicht-kompetitive Inhibitor ApTKI den Zugang des Substrates zum Enzym durch fünf mögliche Wechselwirkungen mit der meist bevor-

zugten Region des Trypsins: Die positiv geladene Seitenkette von Arg64 des Inhibitors bildet zwei Wasserstoff-Brückenbindungen, davon eine mit dem Carbonyl-O-Atom von Ile88 (2.83 Å) und eine mit der OH-Gruppe in der Seitenkette von Thr90 (2.76 Å) des Trypsins. Eine weitere H-Brücke (2.94 Å) bildet Arg88 des Inhibitors mit Tyr151 des Trypsins. Bei der H-Brücke (2.80 Å) zwischen Ser107 des Inhibitors mit Asn143 des Trypsins fungiert das Serin als Protonenakzeptor, das Asparagin als Protonendonor. Ähnlich verhält sich die H-Brücke zwischen Lys108 des Inhibitors und Gly219 des Trypsins, wobei das protonierte Amin in der Seitenkette des Lysins den Protonendonor und das Carbonyl-O-Atom des Glycins den Protonenakzeptor darstellt <sup>[69]</sup>.

Die Dengue-Virus-Protease verfügt ebenfalls über eine Bindungsstelle für nicht-kompetitive Inhibitoren <sup>[82]</sup>, welche noch in späteren Kapiteln näher beschrieben wird und als Grundlage für weitere Docking-Rechnungen diene. Die nicht-kompetitive Bindungsstelle der Dengue-Virus-Protease ist jedoch nicht mit der von Migliolo *et al.* beschriebenen nicht-kompetitiven Bindungsstelle des Trypsins vergleichbar, da erstens nicht dieselben Inhibitoren verwendet wurden und zweitens jeweils ganz andere Aminosäuren an den Wechselwirkungen beteiligt sind <sup>[69,82]</sup>.

### 1.3 Dengue-Virus Typ 2 NS2B-NS3 Protease (DEN-2 NS2B-NS3pro) als Target für Inhibitoren

#### 1.3.1 Enzym-Assays zur Testung von Dengue-Virus Typ 2 NS2B-NS3 Protease-Inhibitoren (DEN-2 NS2B-NS3pro-Inhibitoren)

Enzym-Assays stellen experimentelle Verfahren dar, welche dazu dienen, die Ergebnisse chemischer, durch Enzyme katalysierte Reaktionen sichtbar zu machen und finden eine sehr wichtige Anwendung im Bereich der Entwicklung von Arzneistoffen. Unabhängig von ihrem definierten Verwendungszweck sollten Enzym-Assays grundsätzlich folgende Kriterien erfüllen: Eine möglichst einfache Durchführung, eine hohe Robustheit sowie ein geringfügiges Auftreten falsch positiver bzw. falsch negativer Ergebnisse.

Generell können bei der Durchführung von Enzym-Assays zwei verschiedene Messprinzipien unterschieden werden: Einerseits die Verwendung markierter Substrate (z.B. mit fluorogenen oder chromogenen funktionellen Gruppen, Isotopenmarkierung oder FRET-Substrate), andererseits die Detektion der Produkte der enzymatischen Reaktion natürlicher Substrate mithilfe der instrumentellen Analytik, z.B. Gas- und Flüssigchromatographie (HPLC), NMR- oder Massenspektrometrie.

Enzym-Assays mit markierten Substraten besitzen den wesentlichen Vorteil, dass eine direkte Verbindung zwischen der Aktivität des Enzyms und dem Messsignal besteht und ein geringes Risiko für Artefakte, speziell bei Assays zur Testung von Enzym-Inhibitoren besteht. Wiederum ergibt sich hierbei der Nachteil, dass z.B. bei fluorogenen und chromogenen Substraten das durch das Enzym abgespaltene Fluorophor bzw. Chromophor (z.B. Aminocumarin) häufig erheblich reaktiver sein kann als das im natürlichen Substrat vorkommende aliphatische Amin, was u.a. eine Instabilität der markierten Substrate gegenüber an sich katalytisch inaktiven Verunreinigungen bedingt<sup>[30]</sup>.

FRET-Substrate sind Peptide, an deren N-terminalen Ende sich eine Fluoreszenz-Donor-Gruppe (z.B. *ortho*-Aminobenzoesäure = Abz), am C-terminalen Ende eine so genannte Quenching-Akzeptor-Gruppe (z.B. Nitro-Aromaten) befindet. Die durch das proteolytische Enzym zu spaltende Peptid-Bindung befindet sich innerhalb der Aminosäure-Sequenz des Substrates zwischen der Donor- und der Quencher-Gruppe<sup>[11,12]</sup>. Bei der Spaltung einer Peptid-Bindung in einem FRET-Substrat werden Donor- und Quencher-Gruppe unter Erzeugung einer Fluoreszenz voneinander getrennt<sup>[11,12]</sup>, welche kontinuierlich messbar ist und eine quantitative Messung der Enzym-Aktivität ermöglicht<sup>[12]</sup>. Dieses Prinzip beruht auf einem Energie-Transfer von der Fluoreszenz-Donor-Gruppe auf die Quenching-Akzeptor-Gruppe, wobei das Emissionsspektrum der Donor-Gruppe (zumindest teilweise) mit dem Absorptionsspektrum der Akzeptor-Gruppe überlappen muss<sup>[11,12,24]</sup>. Enzym-Assays mit FRET-Substraten besitzen den Vorteil, dass sie schnell und einfach durchführbar sind und sich durch eine hohe Empfindlichkeit auszeichnen<sup>[12]</sup>.

Zur Testung der in der vorliegenden Arbeit synthetisierten Verbindungen wurden fluorimetrische Enzym-Assays unter Verwendung fluorogener Peptid-Substrate durchgeführt, welche als Fluorophor 7-Amino-4-methylcumarin (AMC) enthalten. Bei dem Substrat für

die DEN-2 NS2B-NS3pro handelt es sich um Boc-Gly-Arg-Arg-AMC, ein häufig verwendetes fluorogenes Tripeptid-Derivat <sup>[15,28,43,56,103,104,116]</sup>. Da sich AMC-markierte Substrate ebenfalls bei der Durchführung von Enzym-Assays mit den verwandten Serin-Proteasen  $\alpha$ -Chymotrypsin und Trypsin bewährt haben <sup>[118,119]</sup>, wurden für den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Selektivitätstest die im Handel befindlichen Dipeptid-Derivate Suc-Leu-Tyr-AMC für Chymotrypsin und Z-Phe-Arg-AMC für Trypsin als Substrate verwendet. Eine genaue Beschreibung der Enzym-Assays beinhalten die **Kapitel 3.1.2** und **3.1.4**.

AMC-markierte fluorogene Peptid-Substrate besitzen jedoch den Nachteil, dass ihre sehr kurzen Aminosäure-Sequenzen nicht über die P1'-Position, d.h. über das C-terminale Ende direkt neben der Spaltstelle für das Enzym hinausgehen und damit – im Gegensatz zu natürlichen Polyprotein-Substraten – keine Rückschlüsse auf Substrat-Spezifität im Bereich der Aminosäure-Reste P1'-P4' gezogen werden können. Darüber hinaus besitzt die Dengue-Virus-Protease eine schwache Affinität gegenüber solchen Substraten. Die Forschungsgruppe Niyomrattanakit *et al.* verwendete für Enzym-Assays mit der DEN-2 NS2B-NS3pro synthetische Peptid-Substrate längerer Aminosäure-Sequenz (P4-P3') mit einer N-terminalen *o*-Aminobenzoyl-Gruppe (Abz) und einem C-terminalen 3-Nitrotyrosin(nY)-Amid-Rest <sup>[79]</sup>; bei diesen Substraten wirkt die Nitro-Gruppe als „Quencher“. Damit handelt es sich um so genannte FRET-Substrate <sup>[30]</sup>. Als Beispiel sei aus dieser Substratklasse der vielfach verwendete Vertreter Abz-Nle-Lys-Arg-Arg-Ser-3-(NO<sub>2</sub>)Tyr genannt <sup>[77,78,99,100]</sup>. Anstelle des 3-Nitrotyrosins kann auch eine C-terminale *p*-Nitroanilid-Funktion als „Quencher“ fungieren <sup>[53]</sup>.

Eine Möglichkeit, genau zu bestimmen, ob es sich bei zu testenden Substanzen um spezifische oder nicht-spezifische Inhibitoren der DEN-2 NS2B-NS3pro handelt, bietet ein weiterer Fluoreszenz-Quenching-Assay, bei welchem eine Validierung mithilfe einer Tryptophan-Alanin-Mutante der Dengue-Virus-Protease stattfindet. Bei dieser Mutante sind die einzelnen fünf Aminosäuren Trp5, Trp50, Trp69, Trp83 und Trp89, von denen sich keine direkt im katalytischen Zentrum des Enzyms befindet, jeweils durch Alanin ausgetauscht. Bei diesem Assay wird die Bindung der Inhibitoren zum Enzym aufgrund eines Fluorescence Resonance Energy Transfers (FRET) zwischen den Inhibitoren und in deren Nach-

barschaft befindlichen Tryptophan-Resten des Protease-Wildtyps detektiert, unter der Annahme, dass sich die Inhibitoren hierbei hauptsächlich als Akzeptoren der Tryptophan-Fluoreszenz verhalten und damit eine Änderung der intrinsischen Fluoreszenz der Protease bewirken <sup>[8]</sup>.

### 1.3.2 Inhibitoren der Dengue-Virus Typ 2 NS2B-NS3 Protease (DEN-2 NS2B-NS3pro)

Inhibitoren der Dengue-Virus Typ 2 NS2B-NS3 Protease (DEN-2 NS2B-NS3pro) lassen sich anhand ihrer Strukturen in drei wesentliche Hauptklassen einteilen: Peptidische und peptidomimetische Inhibitoren <sup>[15,25,53,95,102,114,115]</sup> orientieren sich bezüglich ihrer Aminosäure-Sequenz im Wesentlichen an den Substraten der DEN-2 NS2B-NS3pro, während es sich bei den nicht-peptidischen Inhibitoren <sup>[28,77,100,103,104,113]</sup> um kleine Moleküle („small molecules“) handelt, welche einerseits entweder kommerziell erworben oder durch organisch-chemische Synthesen hergestellt und anschließend in Enzym-Assays getestet wurden, andererseits durch Computer-gestützte Methoden (Molecular Docking, Molecular Modeling) bezüglich ihrer Bindung am Enzym genauer analysiert und im Hinblick auf ihre Struktur-Wirkungs-Beziehungen entsprechend weiterentwickelt und optimiert wurden. Unter den nicht-peptidischen Inhibitoren der DEN-2 NS2B-NS3pro existieren auch einige pflanzliche Naturstoffe <sup>[16,26,27,42,43,82]</sup>. In die dritte Hauptklasse gehören Substanzen, die sowohl peptidische als auch nicht-peptidische Strukturmerkmale, also eine Kombination der ersten beiden Hauptklassen darstellen <sup>[78]</sup>. Dieses Kapitel soll eine zusammenfassende Übersicht bereits existierender Inhibitoren der DEN-2 NS2B-NS3pro, deren Ergebnisse bisher veröffentlicht wurden, geben.

Die erste Hauptklasse beinhaltet vorwiegend auf natürlichen Substraten der DEN-2 NS2B-NS3pro basierende Peptid-Inhibitoren, welche zusätzlich als elektrophile, reaktive Gruppe („Warhead“) beispielsweise eine Aldehyd-Funktion am C-terminalen Ende <sup>[53,95,114,115]</sup> oder eine  $\alpha$ -Ketoamid-Funktion inmitten der Aminosäure-Sequenz <sup>[53]</sup> besitzen, die eine kovalente Bindung mit der Hydroxy-Gruppe des katalytischen Serins (Ser135) der DEN-2 NS2B-NS3pro eingehen kann. Die Forschungsgruppe Yin *et al.* führte eine Synthese und Testung zweier Serien solcher Peptid-Inhibitoren durch, von denen innerhalb der ersten Serie das Peptid Bz-Nle-Lys-Arg-Arg-CF<sub>3</sub> mit C-terminaler Triflourmethylketon-Funktion

( $K_i = 0.85 \mu\text{M}$ ), das entsprechende Peptid Bz-Nle-Lys-Arg-Arg-B(OH)<sub>2</sub> mit entständigiger Boronsäure-Gruppe ( $K_i = 0.043 \mu\text{M} = 43 \text{ nM}$ ) sowie das entsprechende Peptid Bz-Nle-Lys-Arg-Arg-H mit C-terminaler Aldehyd-Funktion ( $K_i = 5.8 \mu\text{M}$ ) potente Inhibitoren der DEN-2 NS2B-NS3pro darstellten <sup>[114]</sup>. Bei Bz-Nle-Lys-Arg-Arg-H handelt es sich um einen reversiblen, kompetitiven Inhibitor <sup>[114]</sup>, welcher als Leitstruktur für weitere Peptid-Aldehyd-Inhibitoren der zweiten Serie (**Tabelle 1-1**) <sup>[115]</sup> verwendet wurde.

Tabelle 1-1: Peptidische Inhibitoren der DEN-2 NS2B-NS3pro mit C-terminaler Aldehyd-Funktion

Peptid	Formel (Bz-P4-P3-P2-P1-H)	$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]	Literatur
1	<b>Bz-Nle-Lys-Arg-Arg-H</b>	<b>5.8</b>	[114,115]
2	Bz-Nle-Lys-Arg- <b>Ala</b> -H	193.0	[115]
3	Bz-Nle-Lys- <b>Ala</b> -Arg-H	>500	[115]
4	Bz-Nle- <b>Ala</b> -Arg-Arg-H	22.1	[115]
5	Bz- <b>Ala</b> -Lys-Arg-Arg-H	5.3	[115]
6	Bz-Nle-Lys-Arg- <b>Phe</b> -H	15.9	[115]
7	Bz-Nle-Lys- <b>Phe</b> -Arg-H	40.7	[115]
8	Bz-Nle- <b>Phe</b> -Arg-Arg-H	15.8	[115]
9	Bz- <b>Phe</b> -Lys-Arg-Arg-H	6.8	[115]
10	Bz-Nle-Lys-Arg- <b>Lys</b> -H	20.5	[115]
11	Bz-Nle-Lys- <b>Lys</b> -Arg-H	41.3	[115]
12	Bz-Nle-Lys- <b>Pro</b> -Arg-H	109.0	[115]
13	Bz-Nle- <b>Pro</b> -Arg-Arg-H	61.4	[115]
14	Bz-Nle-Lys- <b>N-Me</b> -Arg-Arg-H	47.4	[115]
15	Bz-Nle- <b>N-Me</b> -Lys-Arg-Arg-H	113.3	[115]

Tabelle 1-1 wird auf der nächsten Seite fortgesetzt

Tabelle 1-1: Peptidische Inhibitoren der DEN-2 NS2B-NS3pro mit C-terminaler Aldehyd-Funktion (Fortsetzung)

Peptid	Formel (Bz-P4-P3-P2-P1-H)	$K_i$ [ $\mu$ M]	Literatur
16	Bz- <i>N</i> -Me-Nle-Lys-Arg-Arg-H	43.7	[115]
17	Bz-Nle-Lys-Arg- <i>D</i> -Arg-H	51.0	[115]
18	Bz-Nle-Lys- <i>D</i> -Arg-Arg-H	115.0	[115]
19	Bz-Nle- <i>D</i> -Lys-Arg-Arg-H	28.6	[115]
20	Bz- <i>D</i> -Nle-Lys-Arg-Arg-H	9.4	[115]
21	Bz-Lys-Arg-Arg-H	1.5	[115]
22	Bz-Arg-Arg-H	12.0	[115]
23	Bz-Nle-Lys-Arg-( <i>p</i> -guanidiny)Phe-H	2.8	[115]
24	Bz-Nle-Lys-Arg-Phg-H	33.0	[115]
25	Bz-Nle-Lys-Arg-homoPhe-H	>500	[115]
26	Bz-Nle-Lys-Arg-( <i>p</i> -Cl)Phe-H	38.0	[115]
27	Bz-Nle-Lys-Arg-( <i>p</i> -CN)Phe-H	18.6	[115]
28	Bz-Nle-Lys-Arg-( <i>p</i> -Me)Phe-H	6.0	[115]
29	Bz-Nle-Lys-Arg-( <i>p</i> -Ph)Phe-H	11.6	[115]
30	Bz-Nle-Lys-Arg-Trp-H	7.5	[115]

Innerhalb der zweiten Serie wurden einzelne Aminosäure-Reste des Tetrapeptid-Inhibitors Bz-Nle-Lys-Arg-Arg-H (**Peptid 1**) durch Alanin (**Peptide 2-5**), Phenylalanin (**Peptide 6-9**), Lysin (**Peptide 10+11**), Prolin (**Peptide 12+13**) Phenylglycin (**Peptid 24**), homo-Phenylalanin (**Peptid 25**), andere para-substituierte Phenylalanin-Derivate (**Peptide 23, 26-29**) sowie durch Tryptophan (**Peptid 30**) ausgetauscht. Ferner wurden *N*-methylierte Aminosäuren eingesetzt (**Peptide 14-16**), die Stereochemie einzelner Aminosäuren von *L* nach *D* verändert (**Peptide 17-20**) sowie bei zwei Verbindungen die Sequenz verkürzt (**Peptide 21+22**). Die in der **Tabelle 1-1** aufgeführten, experimentell bestimmten  $K_i$ -Werte



zeigten, dass ein Austausch des an Position P2 befindlichen Arginins zu einer größeren Abnahme der Hemmwirkung im Vergleich zum **Peptid 1** führt als ein Austausch des an Position P1 befindlichen Arginins, während die Substitution der Aminosäuren an Position P3 (Lysin) und P4 (Norleucin) die Hemmwirkung deutlich weniger beeinflusst. Die Tatsache, dass die Peptid-Inhibitoren **6**, **29** und **30**, bei denen das an Position P4 befindliche Norleucin durch aromatische Aminosäuren wie Phenylalanin, *p*-Phenyl-phenylalanin oder Tryptophan ersetzt wurde, nach wie vor eine inhibitorische Wirkung im niedrigen mikromolaren Konzentrationsbereich zeigten, führten zu der Annahme, dass die aromatischen Seitenketten der an P1 befindlichen Aminosäuren vermutlich  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit Tyr150 in der S1-Bindetasche der Protease eingehen könnten, während die sonst bei dem **Peptid 1** vorhandenen Wasserstoff-Brückenbindungen, die das P1-Arginin mit Tyr150 und Ser163 eingehen würde, verloren gehen. Diese möglichen Bindungsmodi wurden anhand von Molecular Modeling-Experimenten mit den **Peptiden 1 und 6** durchgeführt <sup>[115]</sup>.

Unter Beibehaltung der C-terminalen Aldehyd-Funktion synthetisierte und testete die Forschungsgruppe Schüller *et al.* eine Auswahl an Tripeptid-Inhibitoren, welche neben den an Positionen P3-P1 befindlichen basischen Aminosäuren (Arginin oder Lysin) jeweils unterschiedliche N-terminale Acyl-Reste anstelle einer Aminosäure an Position P4 sowie Modifikationen der Seitenkette von P2-Lysin enthalten. Die **Tabelle 1-2** präsentiert neben den IC<sub>50</sub>-Werten dieser Tripeptid-Inhibitoren auch den des zuvor beschriebenen Tetrapeptid-Aldehyd-Inhibitors Benzoyl-Nle-Lys-Arg-Arg-H <sup>[114,115]</sup>, welcher in dieser Studie nachsynthetisiert wurde und folglich als Referenz-Inhibitor dienen sollte <sup>[95]</sup>.

Tabelle 1-2: Basische Tripeptid-Inhibitoren der DEN-2 NS2B-NS3pro mit C-terminaler Aldehyd-Funktion

Peptid	Formel	IC <sub>50</sub> [μM]	Literatur
1	<b>Benzoyl-Nle-Lys-Arg-Arg-H</b>	<b>9.5 ± 0.21</b>	[95,114,115]
2	Phenylacetyl-Lys- <b>Arg</b> -Arg-H	6.7 ± 1.1	[95]
3	Phenylacetyl-Lys- <i>Lys</i> -Arg-H	167 ± 47	[95]
4	4-Aminobenzoyl-Lys- <b>Arg</b> -Arg-H	201 ± 33	[95]
5	4-Aminobenzoyl-Lys- <i>Lys</i> -Arg-H	>300	[95]
6	Acetyl-Lys- <b>Arg</b> -Arg-H	201 ± 33	[95]
7	Acetyl-Lys- <i>Lys</i> -Arg-H	115 ± 23	[95]
8	Propionyl-Lys- <b>Arg</b> -Arg-H	218 ± 18	[95]
9	Propionyl-Lys- <i>Lys</i> -Arg-H	>300	[95]
10	4-Phenylphenylacetyl-Lys- <b>Arg</b> -Arg-H	23.4 ± 1.4	[95]
11	4-Phenylphenylacetyl-Lys- <i>Lys</i> -Arg-H	12.2 ± 0.38	[95]
12	4-Aminophenylacetyl-Lys- <b>Arg</b> -Arg-H	11.2 ± 0.28	[95]
13	2-Naphthoyl-Lys- <b>Arg</b> -Arg-H	26.7 ± 0.11	[95]
14	Cinnamoyl-Lys- <b>Arg</b> -Arg-H	15.8 ± 4.5	[95]
15	Phenylpropionyl-Lys- <b>Arg</b> -Arg-H	>300	[95]
16	<b>Benzoyl-Lys-<i>Lys</i>-Arg-H</b>	127 ± 2.1	[95]
17	Cyclopropionyl-Lys- <i>Lys</i> -Arg-H	172 ± 10	[95]
18	Trifluoroacetyl-Lys- <i>Lys</i> -Arg-H	274 ± 27	[95]
19	<b>Benzoyl-Lys-Lys(acetyl)-Arg-H</b>	>300	[95]
20	<b>Benzoyl-Lys-Lys(benzoyl)-Arg-H</b>	>300	[95]
21	<b>Benzoyl-Lys-Lys(<i>p</i>-anisoyl)-Arg-H</b>	>300	[95]
22	<b>Benzoyl-Lys-Lys(benzyl)-Arg-H</b>	>300	[95]

Innerhalb dieser Serie peptidischer Aldehyd-Inhibitoren stellt Phenylacetyl-Lys-Arg-Arg-H (**Peptid 2**) den potentesten Inhibitor der DEN-2 NS2B-NS3pro dar und bewirkt eine 25-fach stärkere Hemmung der Protease im Vergleich zu Phenylacetyl-Lys-Lys-Arg-Arg-H (**Peptid 3**); da sich diese beiden Peptide lediglich durch die an Position P3 befindliche Aminosäure (Arginin bzw. Lysin) unterscheiden, kann auch anhand dieser Ergebnisse die hohe Präferenz der DEN-2 NS2B-NS3pro für das P2-Arginin beobachtet werden. Für das **Peptid 2** wurde mithilfe eines Molecular Docking-Experimentes ein möglicher Bindungsmodus an der Bindungsstelle für das Substrat (S1-, S2- und S3-Bindetasche) analysiert, aus dem hervorgeht, dass trotz des Fehlens der P4-Aminosäure in dem Inhibitor eine gute räumliche Anordnung der N-terminalen Phenylacetyl-Gruppe mit Ausbildung von  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen dieser und Tyr161 möglich ist <sup>[95]</sup>.

Abschließend seien als Vertreter der ersten Hauptklasse noch die von den Forschungsgruppen Leung *et al.* und Chanprapaph *et al.* synthetisierten und getesteten Peptid-Inhibitoren erwähnt, von denen einige als strukturelle Besonderheit die Aminosäure-Sequenzen P6-P1 bzw. P1'-P5' analog zu den Sequenzen im Bereich der vier natürlichen Spaltstellen (NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4B/NS5) innerhalb des Dengue-Virus-Typ 2-Polyproteins <sup>[15,53]</sup> sowie eine  $\alpha$ -Ketoamid-Funktion <sup>[53]</sup> aufweisen. Die experimentell ermittelten  $K_i$ -Werte dieser Peptid-Inhibitoren sind in der **Tabelle 1-3** zusammengefasst.

Welcher dieser Peptid-Inhibitoren welche natürlichen Sequenz des Dengue-Virus-Typ 2-Polyproteins nachahmen soll, wird anhand der durch Li *et al.* und Niyomrattanakit *et al.* veröffentlichten Studien zur Substratspezifität der Dengue-Virus-Protease in der **Tabelle 1-3** entsprechend gekennzeichnet und zugeordnet <sup>[56,79]</sup>. Die vier Hexapeptide (**Peptide 5-8**), welche die Sequenzen P6-P1 im Bereich der natürlichen Spaltstellen enthalten, erwiesen sich als kompetitive Inhibitoren der DEN-2 NS2B-NS3pro, von denen Ac-Arg-Thr-Ser-Lys-Lys-Arg-CONH<sub>2</sub> (**Peptid 7**) den niedrigsten  $K_i$ -Wert besitzt und damit den potentesten Inhibitor innerhalb der von Chanprapaph *et al.* untersuchten Serie darstellt. Von den **Peptiden 9-13** mit kürzeren Sequenzen bewirkt das Tripeptid Ac-Lys-Lys-Arg-CONH<sub>2</sub> (**Peptid 11**) die stärkste Hemmung der Protease, welche sich bei Austausch des an Position P3 befindlichen Lysins durch Glycin (**Peptid 12**) oder bei Entfernung des P3-Lysins (**Peptid 13**) deutlich verschlechtert. Folglich konnte anhand dieser Studie einerseits

die Präferenz der DEN-2 NS2B-NS3pro für basische Aminosäuren an den Position P1 und P2, andererseits aber auch die Bedeutung der Aminosäuren an den Positionen P3 und P4 belegt werden. Die den natürlichen Sequenzen P1'-P5' entsprechenden **Peptide 14-17** zeigten wiederum keine Aktivität im Enzym-Assay<sup>[15]</sup>.

Tabelle 1-3: Andere peptidische und peptidomimetische Inhibitoren der DEN-2 NS2B-NS3pro

Peptid	Formel	$K_i$ [ $\mu$ M]	Literatur
1	Ac-Phe-Ala-Ala-Gly-Arg-Arg- $\alpha$ keto-Ser-Leu-CONH <sub>2</sub>	47 $\pm$ 3	[53]
2	Ac-Thr-Thr-Ser-Thr-Arg-Arg- $\alpha$ keto-Ser-Leu-CONH <sub>2</sub>	220 $\pm$ 55	[53]
3	Ac-Thr-Thr-Ser-Thr-Arg-Arg- $\alpha$ keto-Gly-Thr-Gly-Asn-CONH <sub>2</sub>	368 $\pm$ 47	[53]
4	Ac-Phe-Ala-Ala-Gly-Arg-Arg-CHO	16 $\pm$ 3	[53]
5	Ac-Phe-Ala-Ala-Gly-Arg-Lys-CONH <sub>2</sub> (NS3/NS4A, P6-P1)	25.87	[15]
6	Ac-Glu-Val-Lys-Lys-Gln-Arg-CONH <sub>2</sub> (NS2B/NS3, P6-P1)	66.68	[15]
7	Ac-Arg-Thr-Ser-Lys-Lys-Arg-CONH <sub>2</sub> (NS2A/NS2B, P6-P1)	12.14	[15]
8	Ac-Thr-Thr-Ser-Thr-Arg-Arg-CONH <sub>2</sub> (NS4B/NS5, P6-P1)	45.96	[15]
9	Ac-Ala-Gly-Arg-Arg-CONH <sub>2</sub>	>1000	[15]
10	Ac-Ser-Lys-Lys-Arg-CONH <sub>2</sub>	187.60	[15]
11	Ac-Lys-Lys-Arg-CONH <sub>2</sub>	22.31	[15]
12	Ac-Gly-Lys-Arg-CONH <sub>2</sub>	152.30	[15]
13	Ac-Lys-Arg-CONH <sub>2</sub>	121.53	[15]
14	Ac-Ala-Gly-Val-Leu-Trp-CONH <sub>2</sub> (NS2B/NS3, P1'-P5')	>1000	[15]
15	Ac-Gly-Thr-Gly-Asn-Ile-CONH <sub>2</sub> (NS4B/NS5, P1'-P5')	>1000	[15]
16	Ac-Ser-Leu-Thr-Leu-Asn-CONH <sub>2</sub> (NS3/NS4A, P1'-P5')	>1000	[15]
17	Ac-Ser-Trp-Pro-Leu-Asn-CONH <sub>2</sub> (NS2A/NS2B, P1'-P5')	>1000	[15]

Die peptidischen Inhibitoren mit  $\alpha$ -Ketoamid-Partialstruktur basieren zum Ersten auf der Sequenz P6-P2' von NS3/NS4A (**Peptid 1**), zum Zweiten auf der Sequenz P6-P2' von NS4B/NS5 (**Peptid 2**), zum Dritten auf der Sequenz P6-P4' von NS4B/NS5 (**Peptid 3**). Analog zum **Peptid 1** wurde zusätzlich ein auf der Sequenz P6-P1 von NS3/NS4A basierender Aldehyd-Inhibitor (**Peptid 4**) synthetisiert und getestet. Aus dieser Serie hemmen die NS3/NS4A-analogen **Peptide 1 und 4** die DEN-2 NS2B-NS3pro am stärksten <sup>[53]</sup>.

Aus einer Betrachtung sämtlicher Hemmdaten der hier aufgeführten Vertreter der ersten Hauptklasse geht hervor, dass neben dem Tetrapeptid-Aldehyd-Inhibitor Bz-Nle-Lys-Arg-Arg-H ( $K_i = 5.8 \mu\text{M}$ ) dessen an Position P4 durch Alanin substituiertes Derivat Bz-Ala-Lys-Arg-Arg-H ( $K_i = 5.3 \mu\text{M}$ ) und das um die P4-Aminosäure verkürzte Derivat Bz-Lys-Arg-Arg-H ( $K_i = 1.5 \mu\text{M}$ ) <sup>[115]</sup> die potentesten peptidischen Inhibitoren der DEN-2 NS2B-NS3pro darstellen. Die Tatsache, dass sich deren  $K_i$ -Werte im niedrigen mikromolaren Bereich befinden und die Inhibitoren dadurch immer noch relativ schwache Aktivitäten besitzen, machte die Zielsetzung, im nanomolaren Bereich aktive Wirkstoffe zu finden, für die Forschungsgruppen zu einer Herausforderung. Darüber hinaus bedingen die positiv geladenen Seitenketten basischer Aminosäuren die schlechte Membrangängigkeit peptidischer Inhibitoren <sup>[9]</sup>. Es existiert eine von *Freceer* und *Miertus* veröffentlichte Studie über die Entwicklung, struktur-basierte Fokussierung und computer-basiertes Screening einer kombinatorischen Substanzbibliothek peptidomimetischer Inhibitoren der Dengue-Virus-NS2B-NS3-Protease auf der Basis des Tetrapeptid-Aldehyds Bz-Nle-Lys-Arg-Arg-H, welche als Grundlage für die zukünftige Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen Dengue-Viren dienen sollte. Durch den Austausch bestimmter Aminosäuren durch eine große Auswahl unnatürlicher Aminosäuren entstand eine virtuelle Datenbank an Inhibitoren, von denen für 16 ausgewählte Treffer prädiktive  $K_i$ -Werte im Bereich zwischen  $0.1 \mu\text{M}$  und  $2.0 \mu\text{M}$  berechnet wurden. Bezüglich der Präferenzen der vier Bindetaschen der Dengue-Virus-NS2B-NS3-Protease für bestimmte Aminosäuren wurde bei der Erstellung der kombinatorischen Substanzbibliothek folgende Substitutionsstrategie verfolgt:

- **S1 → Präferenz für Arginin sowie für Aminosäuren mit basischen und aromatischen Seitenketten (P1):** Arginin, Lysin, Ornithin, Citrullin, Histidin, homo-Histidin, (4-Amino)-phenylalanin, (4-Imino)-phenylalanin, (4-Guanidino)-phenylalanin, (4-N-

Acetylamino)-phenylalanin, Tryptophan, (3,4-Methylenedioxy)-phenylalanin, (4-Phenyl)-phenylalanin,  $\beta$ -(2-Naphtyl)-alanin, Tyrosin, (4-Hydroxymethyl)-phenylalanin, (3,4-Dimethoxy)-phenylalanin, Phenylalanin, (4-Methyl)-phenylalanin, (4-Isopropyl)-phenylalanin,  $\beta$ -(4-Pyridyl)-alanin

- **S2 → Präferenz für Arginin (P2):** Arginin, Lysin, Histidin, homo-Histidin, (4-Amino)-phenylalanin, (3-Amino)-phenylalanin, (4-Imino)-phenylalanin, (3-Imino)-phenylalanin, (4-Guanidino)-phenylalanin, (3-Guanidino)-phenylalanin
- **S3 → Präferenz für Aminosäuren mit basischen und polaren Seitenketten (P3):** Arginin, Lysin, Histidin, homo-Histidin, (4-Amino)-phenylalanin, (3-Amino)-phenylalanin, (4-Imino)-phenylalanin, (3-Imino)-phenylalanin, (4-Guanidino)-phenylalanin, (3-Guanidino)-phenylalanin), Citrullin
- **S4 → unspezifisch bzw. Präferenz für Aminosäuren mit längeren, hydrophoben Seitenketten (P4):** Norleucin, Norvalin, Valin,  $\alpha$ -Aminobutansäure

Bei den unterstrichenen Aminosäuren handelt es sich um diejenigen, die letztendlich in der allgemeinen Sequenz Bz-P4-P3-P2-P1-H vorkamen. Der kleinste prädiktive  $K_i$ -Wert von 0.1  $\mu$ M wurde für den Inhibitor mit folgender Kombination an Aminosäuren gefunden: Norleucin (P4), Histidin (P3), (3-Guanidino)-phenylalanin (P2) und (4-Guanidino)-phenylalanin (P1) <sup>[25]</sup>.

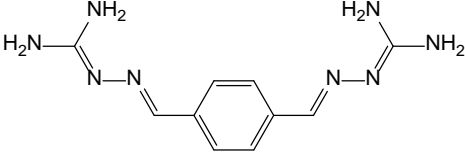
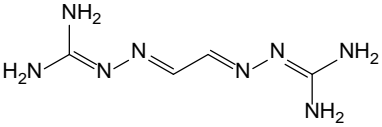
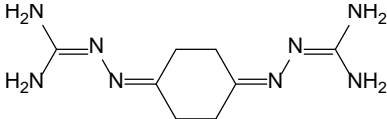
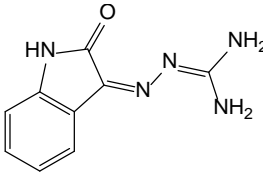
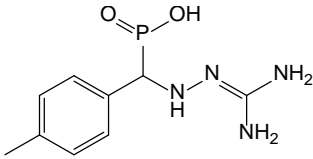
Eine von *Tambunan* und *Alamudi* veröffentlichte Docking-Studie befasste sich mit der Entwicklung sieben verschiedener Cyclopentapeptid-Inhibitoren der DEN-2 NS2B-NS3pro (Cys-Lys-Arg-Arg-Cys, Cys-Gly-Arg-Arg-Cys, Cys-Arg-Gly-Arg-Cys, Cys-Arg-Thr-Arg-Cys, Cys-Thr-Arg-Arg-Cys, Cys-Lys-Arg-Lys-Cys, Cys-Arg-Arg-Lys-Cys), deren endständige Cystein-Seitenketten über Disulfid-Brücken den Ringschluss bilden. Dabei stellte sich Cys-Lys-Arg-Lys-Cys mit einem prädiktiven  $K_i$ -Wert von 0.707  $\mu$ M als bester Inhibitor dieser Serie heraus, für den zum Einen Wechselwirkungen mit der katalytischen Triade (His51, Asp75, Ser135), zum Anderen mit Tyr150 beobachtet wurden <sup>[102]</sup>.

Neben den bisher beschriebenen peptidischen bzw. peptidomimetischen Inhibitoren der DEN-2 NS2B-NS3pro rückten innerhalb der letzten Jahre auch zunehmend nicht-peptidische, kleine Moleküle als potentielle Wirkstoffe in das Interesse der Forschung, welche die zweite wesentliche Hauptklasse an Inhibitoren der Dengue-Virus-Protease bilden und sich strukturell nicht von deren Substraten ableiten. Exemplarisch werden hier Guanidine <sup>[28]</sup>, Pflanzeninhaltsstoffe aus *Boesenbergia Rotunda* (L.) <sup>[43]</sup>, Anthracen-Derivate <sup>[103,104]</sup>, Arylcianoacrylamide <sup>[77]</sup>,  $\alpha$ -Ketoamide <sup>[100]</sup> und andere Einzelsubstanzen wie z.B. BP2109 <sup>[113]</sup> im Folgenden aufgeführt.

Guanidin-Inhibitoren weisen strukturelle Ähnlichkeiten mit der in bevorzugten Substraten der DEN-2 NS2B-NS3pro vorkommenden, basischen Aminosäure Arginin auf und gaben in der Forschungsgruppe Ganesh *et al.* einen Anhaltspunkt für die Entwicklung potenterer, vor allem selektiverer Inhibitoren für *Flavivirus*-Proteasen. In dieser Studie wurden verschiedene Derivate dieser Strukturklasse in enzymatischen Assays getestet, von denen fünf Vertreter mit inhibitorischen Eigenschaften gegenüber der DEN-2 NS2B-NS3pro identifiziert werden konnten (**Tabelle 1-4**).

Die Guanidin-Derivate **1**, **4** und **5** bewirken eine stärkere Hemmung der DEN-2 NS2B-NS3pro als die Verbindungen **2** und **3**. Ein Molecular Modeling-Experiment zeigte das Auftreten zweier möglicher Konformationen des Guanidin-Inhibitors **1** aufgrund der Rotation der terminalen Guanidin-Reste um die Bindungsachse zum Phenyl-Ring einerseits sowie aufgrund der Eigenrotation der Guanidin-Reste andererseits; darüber hinaus könnten das Amid-O-Atom im Indolin-Ring der Verbindung **4** sowie der Phosphonsäure-Rest der Verbindung **5** jeweils eine Wasserstoff-Brückenbindung mit Ser135 im aktiven Zentrum der DEN-2 NS2B-NS3pro ausbilden. Ein Selektivitätstest auf  $\alpha$ -Chymotrypsin und Trypsin ergab eine schwache Hemmung des  $\alpha$ -Chymotrypsins durch die Verbindung **2** ( $K_i = 1346 \pm 57 \mu\text{M}$ ) sowie eine schwache Hemmung des Trypsins durch die Verbindungen **1** ( $K_i = 87 \pm 13 \mu\text{M}$ ) und **2** ( $K_i = 155 \pm 20 \mu\text{M}$ ), während die Verbindung **3** von allen fünf Guanidin-Derivaten einen stärkeren Trypsin-Inhibitor ( $K_i = 51 \pm 5 \mu\text{M}$ ) darstellt. Eine wiederum stärkere Trypsin-Hemmung bewirken die Verbindungen **4** ( $K_i = 4.0 \pm 0.4 \mu\text{M}$ ) und **5** ( $K_i = 3.2 \pm 0.5 \mu\text{M}$ ) Diese Ergebnisse verdeutlichen demnach eine Selektivität dieser Verbindungen gegenüber Trypsin-ähnlichen Serin-Proteasen <sup>[28]</sup>.

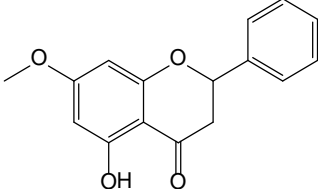
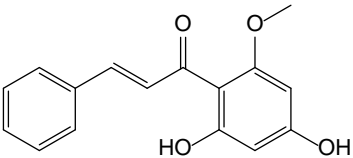
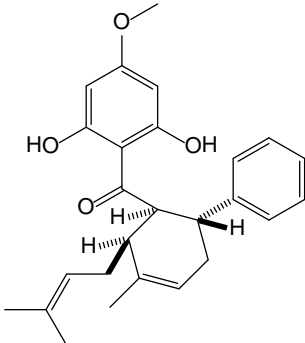
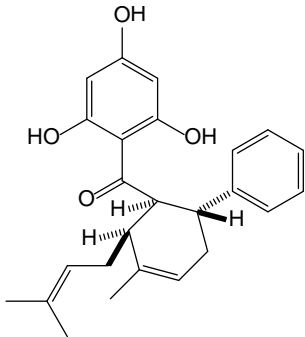
Tabelle 1-4: Nicht-peptidische Inhibitoren der DEN-2 NS2B-NS3pro mit terminalen Guanidin-Funktionen

Nummer	Struktur	$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]	Literatur
1		$44 \pm 5$	[28]
2		$423 \pm 50$	[28]
3		$1783 \pm 113$	[28]
4		$23 \pm 2$	[28]
5		$14 \pm 2$	[28]

Inhibitorisch wirksame Pflanzeninhaltsstoffe aus *Boesenbergia rotunda* (L.) umfassen zum Einen Cyclohexenyl-Chalcon-Derivate (4-Hydroxypanduratin A, Panduratin A), zum Anderen Flavonoide (Pinostrobin, Pinocembrin, Alpinetin und Cardamonin), welche hinsichtlich ihrer Hemmeigenschaften und Mechanismen in der Forschungsgruppe Kiat *et al.* an der DEN-2 NS2B-NS3pro getestet und charakterisiert wurden; die wesentlichen Ergebnisse hierzu veranschaulicht die **Tabelle 1-5**.



Tabelle 1-5: Pflanzliche, nicht-peptidische Inhibitoren der DEN-2 NS2B-NS3pro aus *Boesenbergia Rotunda*

Name und Struktur	$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]	Inhibitionstyp	Literatur
Pinostrobin 	$345 \pm 70$	nicht-kompetitiv	[43]
Cardamonin 	$377 \pm 77$	nicht-kompetitiv	[43]
Panduratin A 	$25 \pm 8$	Kompetitiv	[43]
Hydroxypanduratin A 	$21 \pm 6$	Kompetitiv	[43]

Die Bindungsmodi und Wechselwirkungen von 4-HydroxyPanduratin A und Panduratin A mit der DEN-2 NS2B-NS3pro wurden in diversen Molecular Docking-Studien analysiert und als Grundlage für die Entwicklung neuer potentieller Inhibitoren auf der Basis dieser pflanzlichen Wirkstoffe durch Derivatisierung und Fragmentierung genutzt <sup>[26,27,42,82]</sup>. Zudem wurde auch eine Synthese von Panduratin A und seinem Regioisomer Isopanduratin A mittels Diels-Alder-Cycloaddition veröffentlicht <sup>[16]</sup>.

Für die Enzym-Ligand-Wechselwirkung der kompetitiven Inhibitoren 4-HydroxyPanduratin A und Panduratin A im aktiven Zentrum wurden anhand eines Molecular Docking-Experimentes die Aminosäuren Tyr150, Asn152, Gly153, Ser135 und Gly151 der DEN-2 NS2B-NS3pro als essentiell postuliert, wobei die letzten beiden speziell aufgrund ihrer Bildung von Wasserstoff-Brückenbindungen mit den Inhibitoren von Bedeutung sind. Darüber hinaus sind Van-der-Waals-Interaktionen durch Ser131, Pro132, Tyr150 und Asn152 sowie hydrophobe Wechselwirkungen durch Val52, Leu128, Pro132 und Val155 gewährleistet <sup>[42]</sup>. Weitere Molecular Docking-Studien umfassten zum Einen die Berechnung von Komplexierungsenergien für unterschiedlich substituierte Derivate von 4-HydroxyPanduratin A und Panduratin A <sup>[26]</sup>, zum Anderen die Entwicklung neuer, kompetitiver Inhibitoren der DEN-2 NS2B-NS3pro auf der Basis einzelner Molekülfragmente dieser beiden Verbindungen <sup>[27]</sup>. Auch der nicht-kompetitive Bindungsmodus der übrigen Inhaltsstoffe der Pflanze *Boesenbergia Rotunda* (L.), d.h. Pinostrobin, Pinocembrin, Alpinetin und Cardamonin wurden mithilfe von Molecular Docking-Rechnungen an allosterischer Bindungsstelle der DEN-2 NS2B-NS3pro genauer beschrieben <sup>[82]</sup>.

Anthracen-Derivate repräsentieren hinsichtlich der Inhibition Trypsin-ähnlicher Serin-Proteasen eine interessante Strukturklasse aufgrund der Tatsache, dass einige Vertreter die DEN-2 NS2B-NS3pro nach einem anderen Mechanismus hemmen als das Trypsin. Nachdem die Verbindung **ARPD0006** in einer Struktur-basierten Entdeckungstudie als Inhibitor der DEN-2 NS2B-NS3pro identifiziert wurde <sup>[103]</sup>, diente sie als Leitstruktur für eine weiterführende Studie zur Charakterisierung des inhibitorischen Verhaltens unterschiedlich substituierter Anthracen-Derivate und ihrer Struktur-Wirkungs-Beziehungen <sup>[104]</sup>. Die

**Tabelle 1-6** präsentiert eine Auswahl dieser Verbindungen mit ihren Hemmkonstanten und Inhibitionstypen gegenüber der DEN-2 NS2B-NS3pro und Trypsin.

Tabelle 1-6: Anthracen-Derivate als nicht-peptidische Inhibitoren von DEN-2 NS2B-NS3pro und Trypsin <sup>[103,104]</sup>

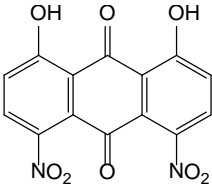
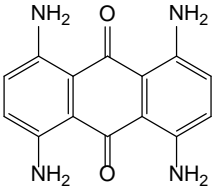
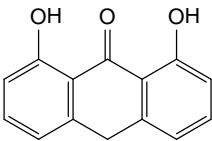
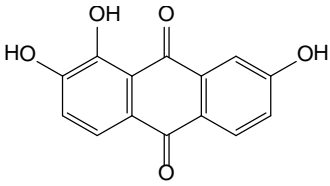
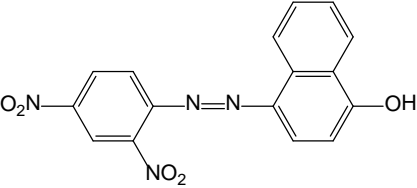
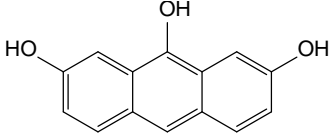
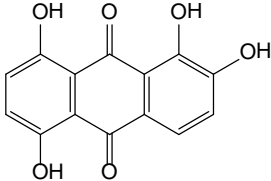
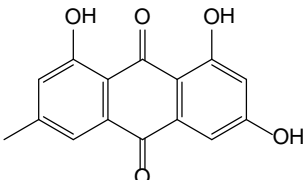
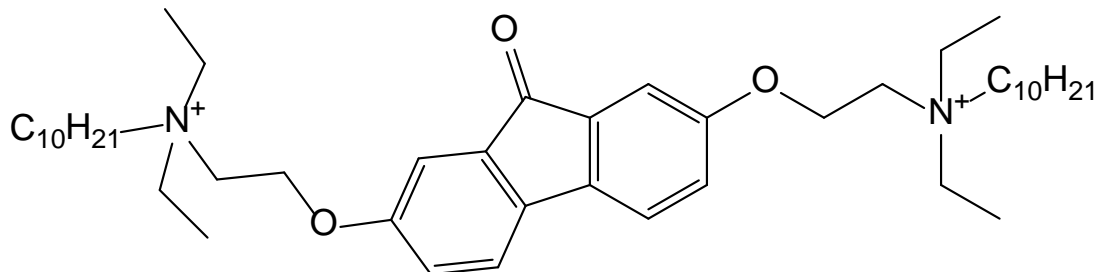
Bezeichnung und Struktur	DEN-2 $K_{i1}$ [ $\mu$ M] $K_{i2}$ [ $\mu$ M]	DEN-2 Inhibitionstyp	Trypsin $K_{i1}$ [ $\mu$ M] $K_{i2}$ [ $\mu$ M]	Trypsin Inhibitionstyp
ARDP0006 	432 ± 46 -	kompetitiv	- 13 ± 0.1	unkompetitiv
6A42 	158 ± 32 43 ± 3	gemischt	60 ± 13 167 ± 20	gemischt
6A45 	47 ± 15 77 ± 35	gemischt	0.6 ± 0.07 -	kompetitiv
6A47 	215 ± 119 20 ± 2	gemischt	4 ± 0.7 25 ± 3	gemischt
6A49 	15 ± 3 10 ± 1	gemischt	- -	keine Hemmung

Tabelle 1-6 wird auf der nächsten Seite fortgesetzt

Tabelle 1-6: Anthracen-Derivate als nicht-peptidische Inhibitoren von DEN-2 NS2B-NS3pro und Trypsin <sup>[103,104]</sup> (Fortsetzung)

6A60		$7 \pm 5$ $3 \pm 1$	gemischt	- -	keine Hemmung
6A61		$72 \pm 15$ $10 \pm 2$	gemischt	-	keine Hemmung
6A62		$508 \pm 47$ -	kompetitiv	- $5 \pm 0.4$	unkompetitiv

Abbildung 1-13: **BP2109** als nicht-peptidischer Inhibitor der DEN-2 NS2B-NS3pro <sup>[113]</sup>

Aus diesen Ergebnissen wird ersichtlich, dass nur die drei Anthracen-Derivate **6A49**, **6A60** und **6A61** eine selektive Hemmung der DEN-2 NS2B-NS3pro bewirken. Mithilfe eines Molecular Modeling-Experimentes konnten signifikante Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen den Hydroxy- und Nitro-Gruppen der Inhibitoren und der katalytischen Triade (His51, Asp75, Ser135) sowie den in der P1-Bindetasche befindlichen Aminosäuren Gly151, Gly153 und Tyr150 vorhergesagt werden <sup>[104]</sup>.

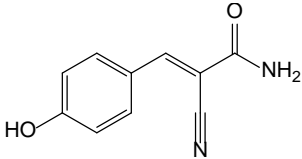
Wiederum eine Besonderheit unter den nicht-peptidischen Inhibitoren der DEN-2 NS2B-NS3pro stellt die Verbindung **BP2109** (**Abbildung 1-13**) dar, welche zum Einen eine

Hemmung der Protease mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $15.43 \pm 2.12 \mu\text{M}$ , zum Anderen eine Hemmung der Virus-Replikation sowie der viralen RNA-Synthese bei allen vier Dengue-Virus-Serotypen bewirkt. Darüber hinaus zeigte dieser Inhibitor keine cytotoxischen Effekte. Mithilfe einer Sequenzanalyse isolierter, gegenüber **BP2109** resistenter Dengue-Viren konnten innerhalb des zentralen, hydrophilen Bereichs des NS2B-Cofaktors des NS2B-NS3-Protease-Komplexes zwei Mutationen, Arg55Lys und Glu80Lys, detektiert werden; diese wurden daraufhin sowohl in das DEN-2 NS2B-NS3-Protease-Konstrukt als auch in das Dengue-Virus-Replikon eingebaut, was zu einer starken Resistenz gegenüber **BP2109** führte. Diese Ergebnisse wiesen auf einen neuartigen Wirkungsmechanismus hin, bei dem sich **BP2109** nicht wie ein „klassischer“ Enzym-Inhibitor mit Bindung im aktiven Zentrum der Protease verhält, sondern mit den Wechselwirkungen zwischen dem NS2B-Cofaktor und der NS3-Domäne interkaliert <sup>[113]</sup>.

Die Forschungsgruppe von Prof. Dr. Christian Klein, Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie der Universität Heidelberg, führte Synthesen und Testungen von Arylcianoacrylamiden <sup>[77]</sup>,  $\alpha$ -Ketoamiden <sup>[100]</sup> und Thiazolidinon-Peptid-Hybriden <sup>[78]</sup> als Inhibitoren der Dengue-Virus-Protease durch, wobei es sich bei letzteren um Vertreter der dritten Hauptklasse, d.h. Inhibitoren mit sowohl peptidischen als auch nicht-peptidischen Partialstrukturen handelt.

Arylcianoacrylamide besitzen eine an das  $\alpha$ -C-Atom der Acrylamid-Partialstruktur gebundene, elektrophile Nitril-Funktion als Pharmakophor, welche mit der Hydroxy-Gruppe des katalytischen Serins unter Bildung eines Imidat-Adduktes kovalent reagieren könnte <sup>[55]</sup>. Diese Serie an Verbindungen umfasste zum Einen Variationen der aromatischen Reste links, zum Anderen unterschiedliche Substitutionen der Amid-Funktion rechts der Nitril-Funktion. (*E*)-2-Cyano-3-(4-hydroxyphenyl)acrylamid stellt den stärksten kompetitiven Inhibitor der Dengue-Virus-Protease innerhalb der Arylcianoacrylamide dar (**Tabelle 1-7**) <sup>[77]</sup>.

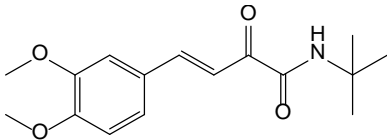
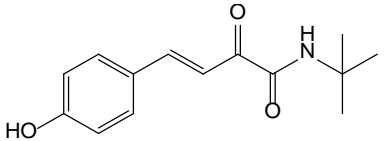
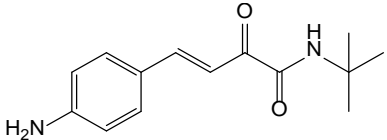
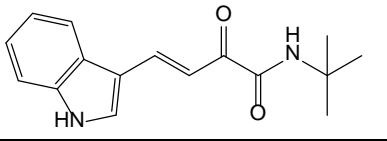
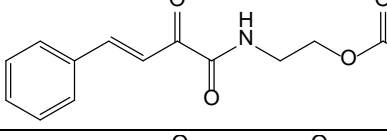
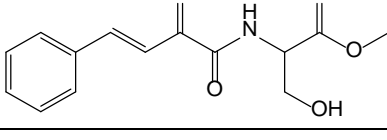
Tabelle 1-7: Arylcianoacrylamide als nicht-peptidische Inhibitoren der DEN-2 NS2B-NS2pro

(E)-2-Cyano-3-(4-hydroxyphenyl)acrylamid	% Hemmung [50 $\mu$ M]	$K_i$ [ $\mu$ M]	Literatur
	51.7 $\pm$ 1.0	35.7	[77]

Eine weiteres, elektrophiles Pharmakophor, welches mit der Hydroxy-Gruppe des katalytischen Serins kovalent unter Bildung eines Hemiketals als tetraedrisches Intermediat reagieren kann, ist das  $\alpha$ -Ketoamid <sup>[62]</sup>. Die auf der Basis dieses Strukturelementes synthetisierten und getesteten Inhibitoren der Dengue-Virus-Protease enthalten neben einer gemeinsamen, dem  $\alpha$ -Ketoamid benachbarten C=C-Doppelbindung unterschiedliche, an diese olefinische Partialstruktur gebundene aromatische Reste (**Tabelle 1-8**) <sup>[100]</sup>.

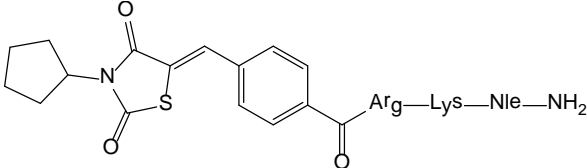
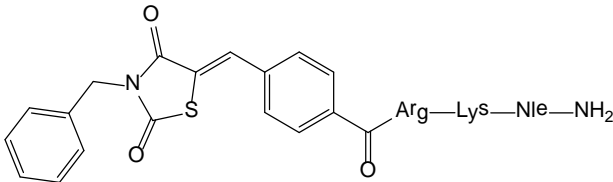
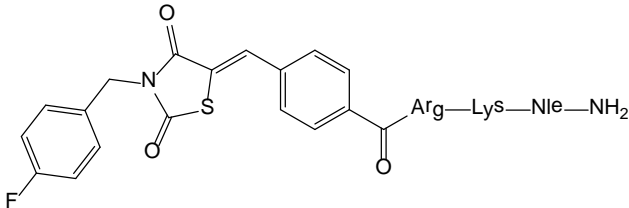
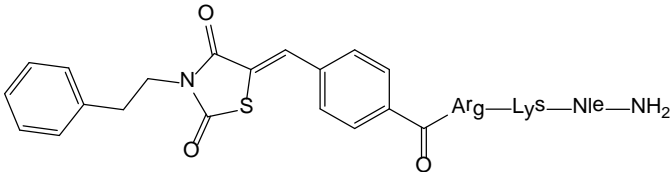
Bei diesen sechs Verbindungen handelt es sich um Vertreter mit schwacher inhibitorischer Aktivität gegenüber der Dengue-Protease, wobei keine dieser  $\alpha$ -Ketoamide eine stärkere Hemmung als ca. 40% [50  $\mu$ M] besitzt (Verbindung **21**). Die Hemmwirkung wurde hier speziell bei denjenigen Verbindungen beobachtet, die einen aromatischen Rest mit H-Brücken-Donoren (Verbindungen **20**, **21** und **32**) oder Elektronen-Donoren (Verbindung **18**) besaßen oder die in den Substraten der Dengue-Virus-Protease bevorzugten P1'-Aminosäure-Reste Glycin (Verbindung **46**) oder Serin (Verbindung **51**) vortäuschen bzw. nachahmen sollten. Ein Molecular Modeling-Experiment mit kovalenter Bindung der Hydroxy-Gruppe des katalytischen Serins an das  $\alpha$ -Ketoamid zeigte am Beispiel der Verbindung **32**, dass die aromatischen Reste (z.B. Indol) in die S1-Bindetasche hineinragen und deren hydrophile Substituenten (hier: NH des Indols) Wechselwirkungen mit den Seitenketten von Tyr150 und Asp129 eingehen könnten. Der nucleophile Angriff der Serin-Hydroxy-Gruppe auf das  $\alpha$ -Ketoamid verläuft vermutlich im Sinne einer 1,2-Addition <sup>[100]</sup>.

Tabelle 1-8:  $\alpha$ -Ketoamide als nicht-peptidische Inhibitoren der DEN-2 NS2B-NS3pro

Nummer	Struktur	% Hemmung [50 $\mu$ M]	Literatur
18		36.1 $\pm$ 6.8	[100]
20		37.6 $\pm$ 2.4	[100]
21		40.6 $\pm$ 0.9	[100]
32		39.1 $\pm$ 0.7	[100]
46		35.8 $\pm$ 6.1	[100]
51		35.1 $\pm$ 3.0	[100]

Thiazolidinon-Peptid-Hybride bestehen aus Tripeptiden der Sequenz Arg-Lys-Nle, welche am N-terminalen Ende jeweils einen 5-Aryliden-thiazolidinon-Heterozyklus, am C-terminalen Ende jeweils eine unsubstituierte Amid-Funktion besitzen. Innerhalb dieser Inhibitor-Serie konnte mit hydrophoben Substituenten (z.B. Cyclopentyl-, Benzyl-, 4-Fluorbenzyl- und Phenylethyl-Resten, siehe **Tabelle 1-9**) die stärkste Hemmung der DEN-2 NS2B-NS3pro ( $K_i$ -Werte zwischen 1.5  $\mu$ M und 1.8  $\mu$ M) erreicht werden<sup>[78]</sup>.

Tabelle 1-9: Thiazolidinon-Peptid-Hybride als Inhibitoren der DEN-2 NS2B-NS3pro<sup>[78]</sup>

Nummer und Struktur	% Hemmung [50 $\mu$ M]	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]	K <sub>i1</sub> [ $\mu$ M] K <sub>i2</sub> [ $\mu$ M]
9b 	98.2 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.3 7.9 $\pm$ 2.6
21b 	98.6 $\pm$ 0.6	2.9 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 1.0 >10
24b 	99.4 $\pm$ 0.9	2.9 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.8 5.2 $\pm$ 2.3
26b 	96.8 $\pm$ 1.8	3.5 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.4 >10

Bei den Verbindungen **21b** und **26b** handelte es sich um kompetitive Inhibitoren, bei den Verbindungen **9b** und **24b** um Inhibitoren mit gemischtem Hemm-Mechanismus. Zur Ableitung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurde ein Molecular Modeling-Experiment mit dem potentesten Inhibitor 9b an der Kristallstruktur der DEN-3 NS2B-NS3pro (PDB-Code: **3u1i**) durchgeführt: Die Seitenkette des Lysins belegte die S1-Bindetasche, die Seitenkette des Arginins die S2-Bindetasche, so dass diese beiden



basischen Aminosäuren Wasserstoff- oder Salzbrücken mit den Aminosäuren Asp129 und Asp75 der DEN-3 NS2B-NS3pro eingehen könnten. Die Seitenkette des Norleucins bildet hydrophobe Wechselwirkungen mit zwei Valin-Seitenketten der NS3-Domäne nahe der S1'-Bindetasche, während sich der N-terminale 5-Aryliden-thiazolidinon-Rest in der Nähe der S3-Bindetasche, bestehend Aminosäure-Seitenketten der NS3-Domäne und des NS2B-Cofaktors, befindet. Der Aryliden-Rest stellt einen rigiden „Linker“ für den Heterozyklus und den hydrophoben Cyclopentyl-Ring dar, welche als Gesamtheit einen großen hydrophoben Rest für Interaktionen mit zwei Valin-Seitenketten (NS3) sowie mit Methionin und Isoleucin (NS2B) bilden. Hierdurch kann folglich die Präferenz für hydrophobe Substituenten an Position 3 des Heterozyklus beschrieben werden. Analog zu den Thiazolidinon-Peptid-Hybriden wurden innerhalb dieser Inhibitor-Serie auch entsprechende Derivate mit Rhodanin-Heterozyklen, d.h. bei denen das O-Atom der Carbonyl-Gruppe an Position 3 des Heterozyklus durch ein S-Atom ausgetauscht ist, synthetisiert; die Rhodanin-Derivate zeigten bei der Testung an Dengue-Virus-infizierten Zellen eine erhöhte antivirale Aktivität im Vergleich zu den Thiazolidinon-Derivaten<sup>[78]</sup>.

Betrachtet man die Hemmdaten der hier aufgeführten Vertreter der zweiten (nicht-peptidische Inhibitoren) und dritten Hauptklasse (partiell peptidische Inhibitoren), so stellt sich das Anthracen-Derivat **6A60** ( $K_{i1} = 7 \pm 5 \mu\text{M}$ ;  $K_{i2} = 3 \pm 5 \mu\text{M}$ ; gemischter Hemmtyp)<sup>[103,104]</sup> als der potenteste, gegenüber Trypsin selektiver Inhibitor der DEN-2 NS2B-NS3pro heraus. Als nächste Serie folgen die Thiazolidinon-Peptid-Hybride, deren  $K_i$ -Werte im Bereich zwischen  $1.5 \mu\text{M}$  und  $1.8 \mu\text{M}$  liegen und von denen einige die DEN-2 NS2B-NS3pro kompetitiv hemmen<sup>[78]</sup>. Dennoch befinden sich die Hemmwerte wie bei den Verbindungen der ersten Hauptklasse (peptidische Inhibitoren) ebenfalls noch im mikromolaren Konzentrationsbereich. Mit Ausnahme des aufgrund seines Wirkmechanismus interessanten Inhibitors **BP2109**, für den lediglich der  $\text{IC}_{50}$ -Wert angegeben ist<sup>[113]</sup>, werden für die anderen Inhibitoren erfreulicherweise  $K_i$ -Werte angegeben, welche in dieser Hinsicht einen besseren Vergleich der Substanzklassen untereinander ermöglichen.

Insgesamt erschweren drei wesentliche Gründe die Entwicklung wirksamer, kompetitiver Inhibitoren der DEN-2 NS2B-NS3pro: Erstens verfügen flavivirale Proteasen über ein flaches, hydrophiles aktives Zentrum, was die Bindung spezifischer Substanzen mit hoher

Affinität unwahrscheinlich macht. Zweitens besitzt deren aktives Zentrum ausreichende Ähnlichkeit mit dem der eigenen Serin-Proteasen des Wirtes, so dass die Inhibitoren im Organismus des Wirtes vermutlich toxisch wirken könnten. Drittens findet im aktiven Zentrum eine bevorzugte Bindung von Substanzen mit positiver Ladung statt, welche deren Bioverfügbarkeit herabsetzen würde<sup>[9]</sup>.

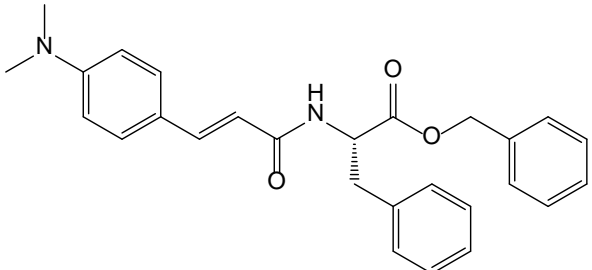
Die Tatsache, dass einerseits bisher keine nicht-peptidischen Inhibitoren existieren, welche in der Lage sind, die Dengue-Virus-Protease im niedrigen mikromolaren Bereich zu hemmen und es sich andererseits bei den meisten Inhibitoren, bei denen dies doch der Fall ist, um Peptide mit Aldehyd-Funktion handelt, die kovalente Bindungen eingehen, stellt in der vorliegenden Arbeit eine besondere Herausforderung dar.

## 1.4 Hintergrund und Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, neue Inhibitoren der Dengue-Virus Typ 2 NS2B-NS3 Protease (DEN-2 NS2B-NS3pro) zu entwickeln. Dazu gehörten die Synthesen und Testungen in Enzym-Assays, die Analyse von Struktur-Wirkungs-Beziehungen sowie die Optimierung von sich ergebenden Leitstrukturen. Testungen an Dengue-Viren erfolgten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Jochen Bodem, Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg.

Die im ersten Teilprojekt der vorliegenden Arbeit synthetisierte, Substanzklasse umfasst Amide verschiedener Phenylacrylsäure-Derivate auf der Basis von **TP38** als Ausgangssubstanz. Dieser Michael-Akzeptor wurde ursprünglich als Inhibitor verschiedener Cystein-Proteasen synthetisiert<sup>[88]</sup> und zeigte bei der Testung an der DEN-2 NS2B-NS3pro schwache Hemmung (siehe **Tabelle 1-10**).

Tabelle 1-10: Ausgangssubstanz für die Synthese der Phenylacrylsäureamide

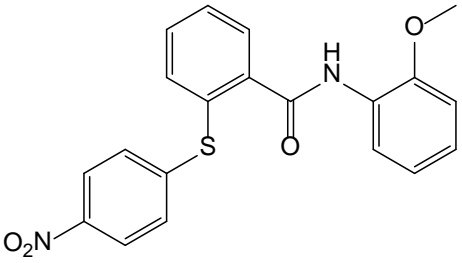
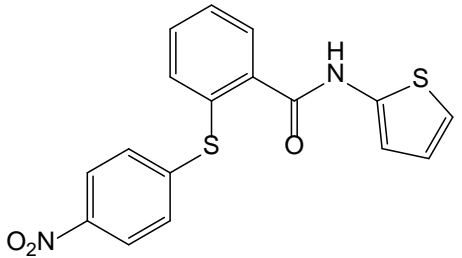
TP 38	Hemmung der DEN-2 NS2B-NS3pro
	54 % [50 $\mu$ M]

Die Substanzklasse der Phenylacrylsäureamide teilt sich wie folgt in zwei Untergruppen: In der ersten Untergruppe wurde 4-Dimethylaminozimtsäure, d.h. unter Beibehaltung der linken Seite des Moleküls **TP38**, mit Estern verschiedener Aminosäuren verknüpft, um den Einfluss der Seitenkette, der Konfiguration, des C-terminalen Esters sowie der Substitution des Amid-Stickstoff-Atoms auf die Hemmung der DEN-2 NS2B-NS3pro zu untersuchen. In der zweiten Untergruppe wurden anstelle der 4-Dimethylaminozimtsäure andere aromatische Carbonsäuren eingesetzt, d.h. die linke Seite des Moleküls **TP38** variiert. Da innerhalb der Phenylacrylsäureamide keine Verbindung eine größere Hemmung der DEN-2 NS2B NS3pro als ca. 50-60% [50  $\mu$ M] zeigte und es sich bei den schwachen Inhibitoren um nicht-kompetitive Inhibitoren handelt (siehe **Kapitel 3.1.3** und **4.1.1**), deren genauer Wirkungsmechanismus nicht aufgeklärt werden konnte, wurde dieses erste Teilprojekt nach Synthese und Testung von 32 Derivaten beendet.

Das zweite Teilprojekt befasst sich mit der Synthese nicht-peptidischer Diarylthioether auf der Basis der Ausgangssubstanzen **RN18** <sup>[76]</sup> und **FM47** <sup>[64]</sup>, welche ursprünglich als Inhibitoren der HIV-1 Apobec3G-Vif-Interaktion synthetisiert wurden <sup>[64,76]</sup> und, ebenfalls wie **TP38**, eine schwache Hemmung der DEN-2 NS2B-NS3pro zeigten (siehe **Tabelle 1-11**). Ein Screening der Verbindung **FM47** bei einer niedrigeren Konzentration von 20  $\mu$ M ergab eine Hemmung der DEN-2 NS2B-NS3pro von 31 %, welche als Ausgangspunkt dieses Teilprojektes diente, das Substitutionsmuster der Diarylthioether mit dem Ziel einer Optimierung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu verändern und die möglichen Bindungsmodi an der Protease mithilfe von Docking-Rechnungen vorherzusagen. Ferner

sollte in den Enzym-Assays der Inhibitionstyp der Verbindungen (d.h. kompetitive, nicht-kompetitive Hemmung etc.) genauer charakterisiert werden.

Tabelle 1-11: Ausgangssubstanzen für die Synthese der Diarylthioether

Verbindung	Hemmung der DEN-2 NS2B-NS3pro
 RN18	36 % [50 $\mu$ M]
 FM47	31 % [50 $\mu$ M]

Die Derivatisierung der Diarylthioether umfasste zum Einen die Variation der Substituenten des Phenyl-Rings, welcher bei **RN18** und **FM47** jeweils eine Nitro-Gruppe in *para*-Stellung zum Schwefel-Atom der Thioether-Funktion enthielt; anstelle dieser Nitro-Gruppe sollten beispielsweise Trifluormethyl-Substituenten, Carbonsäure-Gruppen, primäre Amine (durch Reduktion der Nitro-Gruppe) oder auch Wasserstoff-Atome (d.h. keine Substitution am Phenyl-Ring) eingeführt werden. Zum Anderen sollte das Stickstoff-Atom der Benzamid-Funktion unterschiedlich substituierte Reste, z.B. aromatische, heterocyclische (insbesondere Thiazole und Benzothiazole) oder einfache aliphatische Reste erhalten. Darüber hinaus waren eine Variation der Position des Benzamids zum Thioether (d.h. *ortho*, *meta* oder *para*) sowie ein Austausch des Schwefel-Atoms durch Kohlenstoff- oder Sauerstoff-Atome geplant (siehe **Abbildung 1-14**).

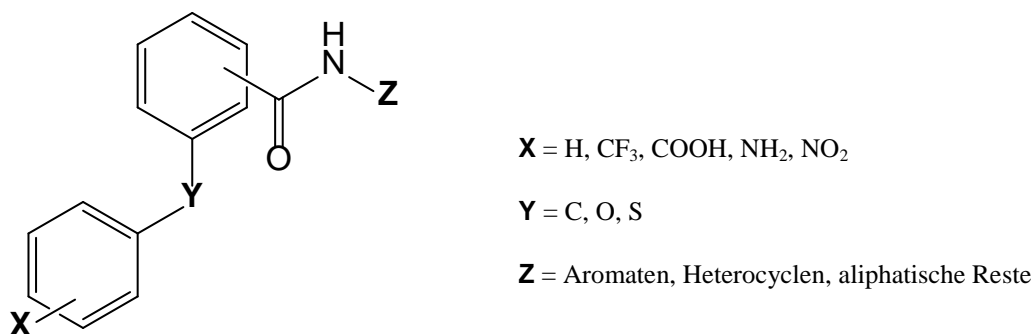


Abbildung 1-14: Allgemeines Substitutionsmuster der auf RN18 und FM47 basierenden Zielverbindungen

In der vorliegenden Arbeit beschränkt sich das zweite Teilprojekt auf die Synthese und Testung von Diarylthioethern mit Trifluormethyl-Resten in *para*-Stellung zum Thioether und Benzothiazolen am Stickstoff-Atom des Benzamids, welche mit Hydroxy- und Carboxy-Gruppen unterschiedlich substituiert sind (siehe **Abbildung 1-15**). Als Grundlage für die Synthese-Planung dieser Verbindungen dienten entsprechende Molecular Docking-Experimente mit dem Computer-Programm *LeadIT*<sup>®</sup> (siehe **Kapitel 4.1.2**).

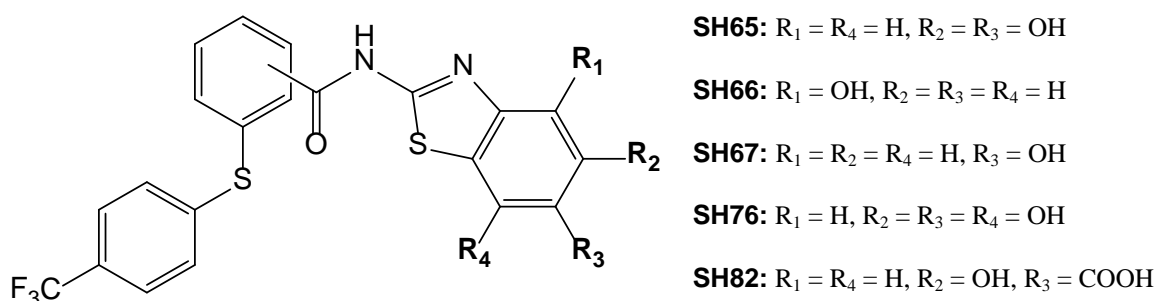


Abbildung 1-15: Substitutionsmuster der in der vorliegenden Arbeit geplanten Diarylthioether.  
Bei **SH82** befindet sich die Benzamid-Funktion in *para*-Stellung, bei allen anderen Verbindungen jeweils in *ortho*-Stellung zum S-Atom der Diarylthioether-Funktion.

Bei den Enzym-Assays erfolgte die Testung nicht nur mit den Zielverbindungen, d.h. den synthetischen Endprodukten, sondern in den meisten Fällen auch mit den synthetischen Zwischenprodukten (Vorstufen), um die Relevanz und den Einfluss der einzelnen Bausteine auf die Hemmung der Protease zu untersuchen.

Außerdem sollten die synthetisierten Verbindungen zum Vergleich auch an der Dengue-Virus Typ 3 NS2B-NS3 Protease (DEN-3 NS2B-NS3pro) sowie an anderen Serin-Proteasen wie  $\alpha$ -Chymotrypsin und Trypsin getestet werden, um die Selektivität und Enzym-Spezifität der Inhibitoren genauer zu charakterisieren. Des Weiteren erfolgten infektionsbiologische Testungen an mit Dengue-Viren infizierten Vero-Zellen, *Trypanosoma brucei brucei*, *Leishmania major* sowie eine Bestimmung der Cytotoxizität an Makrophagen.

---

## 2 SYNTHESEN

Dieser Teil der vorliegenden Arbeit umfasst die Darstellung von Phenylacrylsäure-Derivaten, Benzothiazolen und Diarylthioethern. Bei der ersten Substanzklasse (**Kapitel 2.1**) handelt es sich überwiegend um Amide, welche durch einstufige Kupplungsreaktionen verschiedener aromatischer Carbonsäuren mit C-terminalen Estern verschiedener Aminosäuren (ggf. mit anschließender Abspaltung bestimmter Schutzgruppen) synthetisiert wurden; eine Ausnahme bildete hier die vierstufige Synthese von 4-Amidino-phenylacrylsäure-ethylester (**Kapitel 2.2**). Die Benzothiazole dienten primär als Edukte für die mehrstufigen Synthesen der Diarylthioether (**Kapitel 2.3**); auch hier wurden häufig Amid-Funktionen dargestellt. Die Vor- und Nachteile der jeweils verwendeten Reagenzien sowie deren Auswirkung auf die Ausbeuten der einzelnen Syntheseschritte sollen in diesem Kapitel detailliert beschrieben werden.

### 2.1 Synthese Aminosäure-verknüpfter Phenylacrylsäureamide: verwendete Kupplungsreaktionen zur Ausbildung von Amid- und Peptid-Bindungen

#### 2.1.1 Kupplung mittels *n*-Propylphosphonsäureanhydrid (PPA)

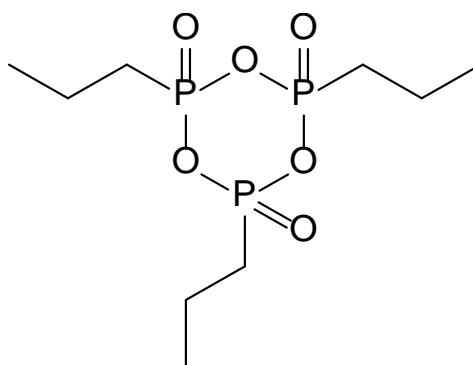
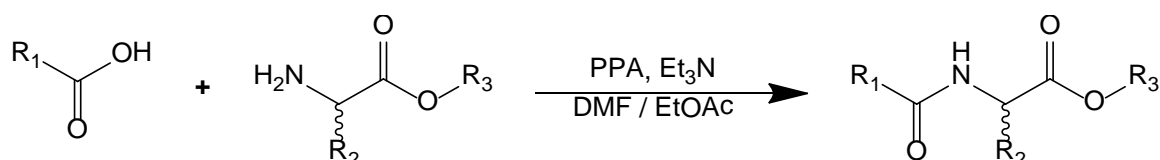


Abbildung 2-1: Struktur von *n*-Propylphosphonsäureanhydrid (PPA)

Bei *n*-Propylphosphonsäureanhydrid (PPA) handelt es sich um ein cyclisches Anhydrid aus drei Teilen *n*-Propylphosphonsäure (siehe **Abbildung 2-1**), welches als Kupplungsreagenz zur Ausbildung von Amid- und Peptidbindungen (siehe **Schema 2-1**) verwendet wird. Es



ist als gebrauchsfertige Lösung (50 wt%) in Dichlormethan, Ethylacetat oder Dimethylformamid (DMF) erhältlich und erfordert die Anwesenheit eines tertiärenamins als Hilfsbase, z.B. Diisopropylethylamin (DIPEA), N-Methylmorpholin (NMM) oder Triethylamin<sup>[111]</sup>.

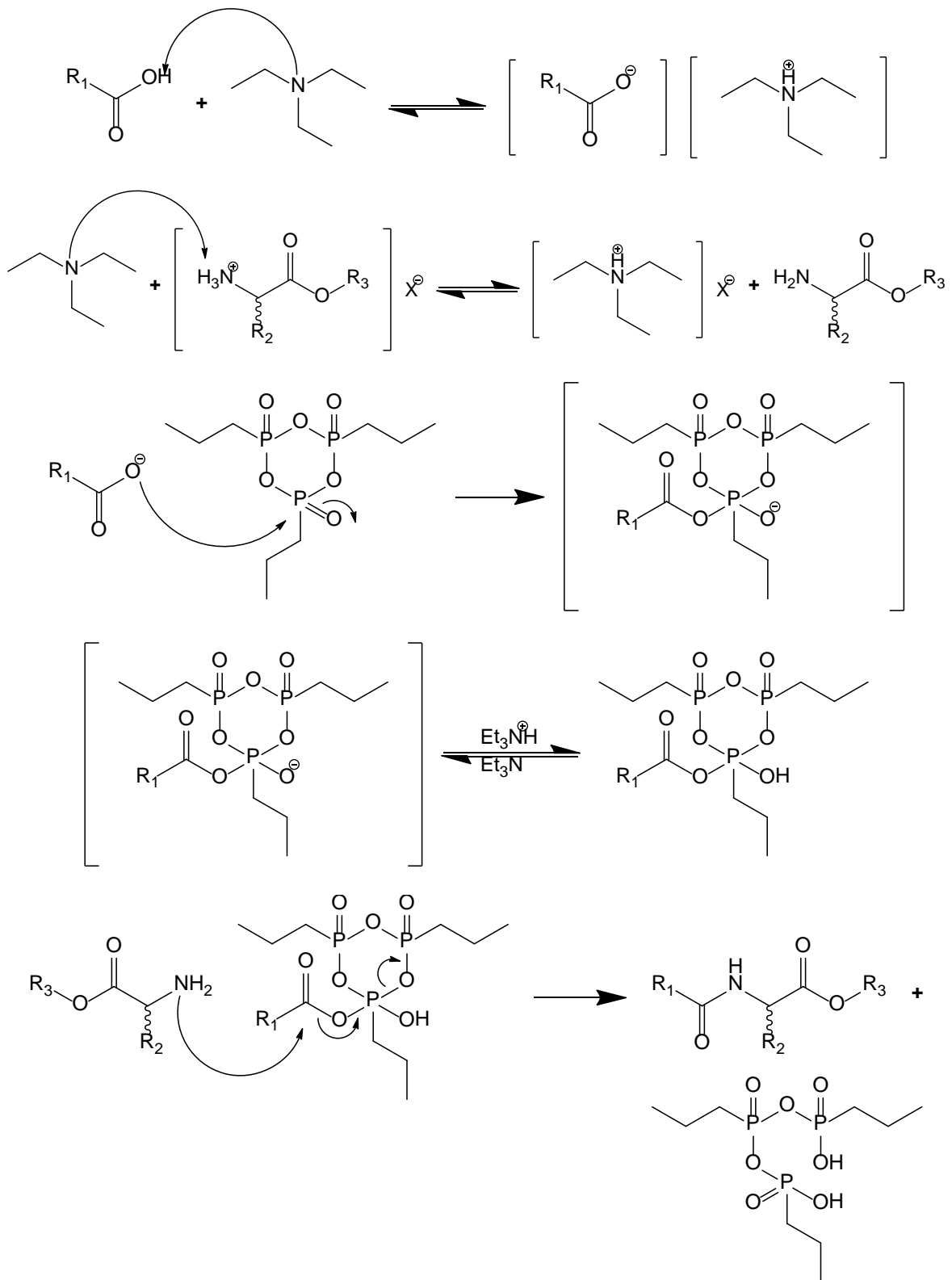


Schema 2-1: Allgemeine Kupplungsreaktion bei Verwendung von PPA

Der Mechanismus der Kupplungsreaktion mit PPA ist im **Schema 2-2** wie folgt beschrieben: Die Carbonsäure-Komponente wird durch ein Äquivalent der Hilfsbase Triethylamin deprotoniert, wodurch deren Nucleophilie durch das entstehende Carboxylat erhöht wird. Wird als Amin-Komponente das Hydrochlorid oder Tosylat einer Aminosäure verwendet, ist folglich ein zweites Äquivalent Triethylamin erforderlich, um ebenfalls die Ammonium-Gruppe zu deprotonieren. Durch den nucleophilen Angriff des Carboxylats auf PPA entsteht zunächst ein Intermediat, anschließend ein gemischtes Anhydrid, welches letztendlich mit der Amin-Komponente unter Ausbildung der Amid- bzw. Peptid-Bindung reagiert.

Als Kupplungsreagenz besitzt PPA den wesentlichen Vorteil einer geringen Tendenz zur Racemisierung der Aminosäuren bei der Peptid-Synthese sowie einer hohen Wasserlöslichkeit der bei der Reaktion anfallenden Nebenprodukte (z.B. Salze von Aminosäuren, *n*-Propylphosphonsäure und Triethylamin), welche die anschließende Aufarbeitung der Produkte entscheidend erleichtern. Ferner ist ein schonender Ablauf der Reaktion bei Raumtemperatur (anfangs unter Eiskühlung), d.h. ohne Erhitzen gewährleistet.

Durch die Verwendung der PPA-Lösung in DMF konnte zudem die Löslichkeit der 4-Dimethylaminozimtsäure, welche sich erfahrungsgemäß in anderen, häufiger verwendeten organischen Lösungsmitteln wie Dichlormethan und Ethylacetat relativ schlecht löst, verbessert werden<sup>[111]</sup>. Eine Übersicht der durch Kupplung mit PPA synthetisierten Amide der 4-Dimethylaminozimtsäure mit den jeweiligen Ausbeuten zeigt die **Tabelle 2-1**.



Schema 2-2: Mechanismus der Kupplungsreaktion bei Verwendung von PPA

Tabelle 2-1: Übersicht der durch Kupplung mit PPA synthetisierten Phenylacrylsäureamide

Verbindung	Phenylacrylsäure-Baustein	Aminosäure-Baustein	Ausbeute [%]
SH01	4-Dimethylaminozimtsäure	<i>D</i> -Alaninbenzylester	40
SH02	4-Dimethylaminozimtsäure	<i>D</i> -Valinbenzylester	24
SH03	4-Dimethylaminozimtsäure	<i>D</i> -Leucinbenzylester	52
SH04	4-Dimethylaminozimtsäure	<i>L</i> -Isoleucinbenzylester	51
SH05	4-Dimethylaminozimtsäure	<i>L</i> -Valinbenzylester	62
SH06	4-Dimethylaminozimtsäure	<i>L</i> -Tryptophanbenzylester	54
SH07	4-Dimethylaminozimtsäure	<i>L</i> -Alaninbenzylester	39
SH08	4-Dimethylaminozimtsäure	Glycinbenzylester	29
SH10	4-Dimethylaminozimtsäure	<i>L</i> -Alaninmethylester	4
SH11	4-Dimethylaminozimtsäure	<i>L</i> -Valinmethylester	26
SH12	4-Dimethylaminozimtsäure	<i>L</i> -Leucinmethylester	46
SH13	4-Dimethylaminozimtsäure	<i>D</i> -Phenylalaninmethylester	44
SH14	4-Dimethylaminozimtsäure	<i>L</i> -Asparaginsäuredimethylester	25
SH15	4-Dimethylaminozimtsäure	<i>L</i> -Glutaminsäuredimethylester	13
SH23	4-Dimethylaminobenzoessäure	<i>L</i> -Valinbenzylester	16
SH24	3-(2,3-Dichlorphenyl)-propansäure	<i>L</i> -Valinbenzylester	64
SH25	3-(2-Fluorphenyl)-propansäure	<i>L</i> -Valinbenzylester	66
SH26	<i>trans</i> -2,4-Difluorzimtsäure	<i>L</i> -Valinbenzylester	52
SH27	<i>trans</i> -2,5-Difluorzimtsäure	<i>L</i> -Valinbenzylester	56
SH28	<i>trans</i> -3-(4-Chlorbenzoyl)-acrylsäure	<i>L</i> -Valinbenzylester	23
SH29	<i>trans</i> -3-(4-Methoxybenzoyl)-acrylsäure	<i>L</i> -Valinbenzylester	62

Während bei den einstufigen Synthesen der Phenylacrylsäureamide, welche nach Aufreinigung durch Säulenchromatographie ohne weitere Umsetzung direkt zur Testung in Enzym-Assays verwendet wurden, eine hohe Ausbeute nicht von vorrangiger Bedeutung war, mussten andere Amid-Zwischenstufen, welche in weiteren Synthese-Schritten umgesetzt werden sollten, in höheren Ausbeuten gewonnen werden. Hierzu wurden anstelle von PPA die im **Kapitel 2.1.3** genauer beschriebenen Kupplungsreagenzien *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-Tetramethyluronium-Hexafluorophosphat (HBTU) und *O*-(6-Chlorobenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-Tetramethyluronium-Hexafluorophosphat (HCTU) verwendet.

### 2.1.2 Kupplung durch Aktivierung zum Säurechlorid

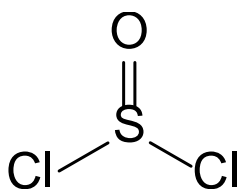
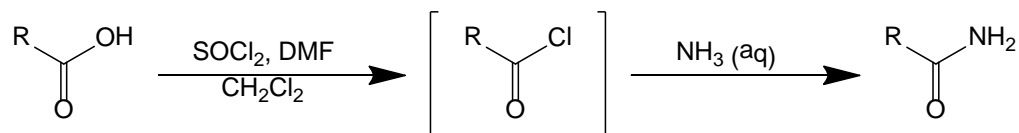
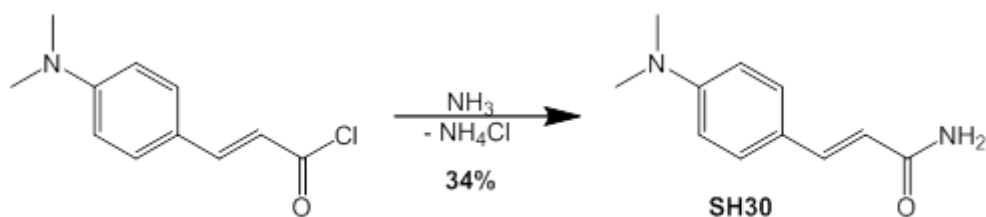


Abbildung 2-2: Struktur von Thionylchlorid

Eine weitere, mögliche Kupplungsreaktion zur Synthese von Amiden bietet die Umsetzung von Carbonsäuren mit Thionylchlorid (siehe **Abbildung 2-2**) zu den entsprechenden Säurechloriden, welche als reaktive Zwischenstufen *in situ* mit Ammoniak (siehe **Schema 2-3**) oder Aminen zu den entsprechenden Amiden weiter umgesetzt werden. Säurechloride besitzen eine höhere Reaktivität als Säureanhydride wie PPA (siehe **Kapitel 2.1.1**) und zersetzen sich schnell durch Luftfeuchtigkeit; aus diesem Grund empfiehlt es sich, Säurechloride vor ihrer weiteren Umsetzung nicht aus dem Lösungsmittel zu isolieren <sup>[51,71]</sup>.



Schema 2-3: Allgemeine Kupplungsreaktion bei Verwendung von Thionylchlorid



Schema 2-4: Reaktion von Ammoniak mit Carbonsäurechloriden am Beispiel der Synthese von **SH30**

Die Vorteile dieser Methode bestehen zum einen in der schnellen und einfachen Herstellung von Carbonsäurechloriden, zum anderen in der Entstehung gasförmiger Nebenprodukte (Chlorwasserstoff und Schwefeldioxid) und der damit verbundenen Aufarbeitung. Ein wesentlicher Nachteil ist jedoch die Tendenz von Aminosäuren zur Racemisierung, wodurch die Methode für die Peptid-Synthese ungeeignet ist. Ein weiterer Nachteil ist die hohe Acidität des entstehenden Chlorwasserstoffs, welche die Zugabe einer Hilfsbase (z.B. Pyridin) erforderlich macht; die Kupplungsreaktion mit Säurechloriden stellt demnach keine sehr schonende Methode dar <sup>[71]</sup>. Ferner ist bei der Synthese von Säurechloriden die Verwendung trockener Lösungsmittel zu beachten. Von den Phenylacrylsäureamiden wurde deswegen nur **SH30** (unsubstituiertes Amid der 4-Dimethylaminozimtsäure) als einzige Verbindung nach der Kupplungsmethode mit Thionylchlorid synthetisiert. Dabei wurde das in Dichlormethan gelöste Säurechlorid zu einem Überschuss wässriger Ammoniak-Lösung (26%) unter Eiskühlung getropft, um gleichzeitig den entstehenden Chlorwasserstoff zu neutralisieren (siehe **Schema 2-4**). Die Ausbeute betrug nach der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie 34%.

### 2.1.3 Kupplung mittels *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-Tetramethyluronium-Hexafluorophosphat (HBTU) und *O*-(6-Chlorobenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-Tetramethyluronium-Hexafluorophosphat (HCTU)

Eine dritte, zur Synthese von Amidn durchgeführte Methode erfolgte unter Verwendung von Uronium-Salzen als Kupplungsreagenzien: *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-Tetramethyluronium-Hexafluorophosphat (HBTU) und *O*-(6-Chlorobenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-Tetramethyluronium-Hexafluorophosphat (HCTU) (siehe **Abbildung 2-3**).

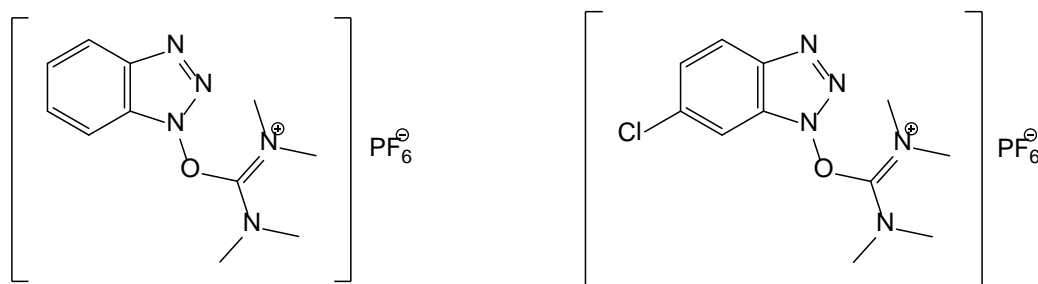
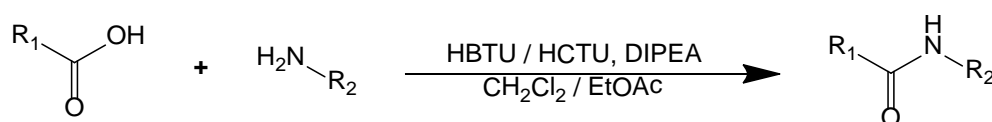


Abbildung 2-3: Strukturen der Kupplungsreagenzien HBTU (links) und HCTU (rechts)

Analog zu der in **Kapitel 2.1.1** beschriebenen Kupplungsmethode mit PPA handelt es sich hierbei ebenfalls um eine in der Peptid-Synthese gängige Methode, welche ebenfalls die Anwesenheit eines tertiären Amins als Hilfsbase erfordert. In der vorliegenden Arbeit wurde Diisopropylethylamin (DIPEA) als Hilfsbase verwendet (siehe **Schema 2-5**)<sup>[36,71]</sup>.

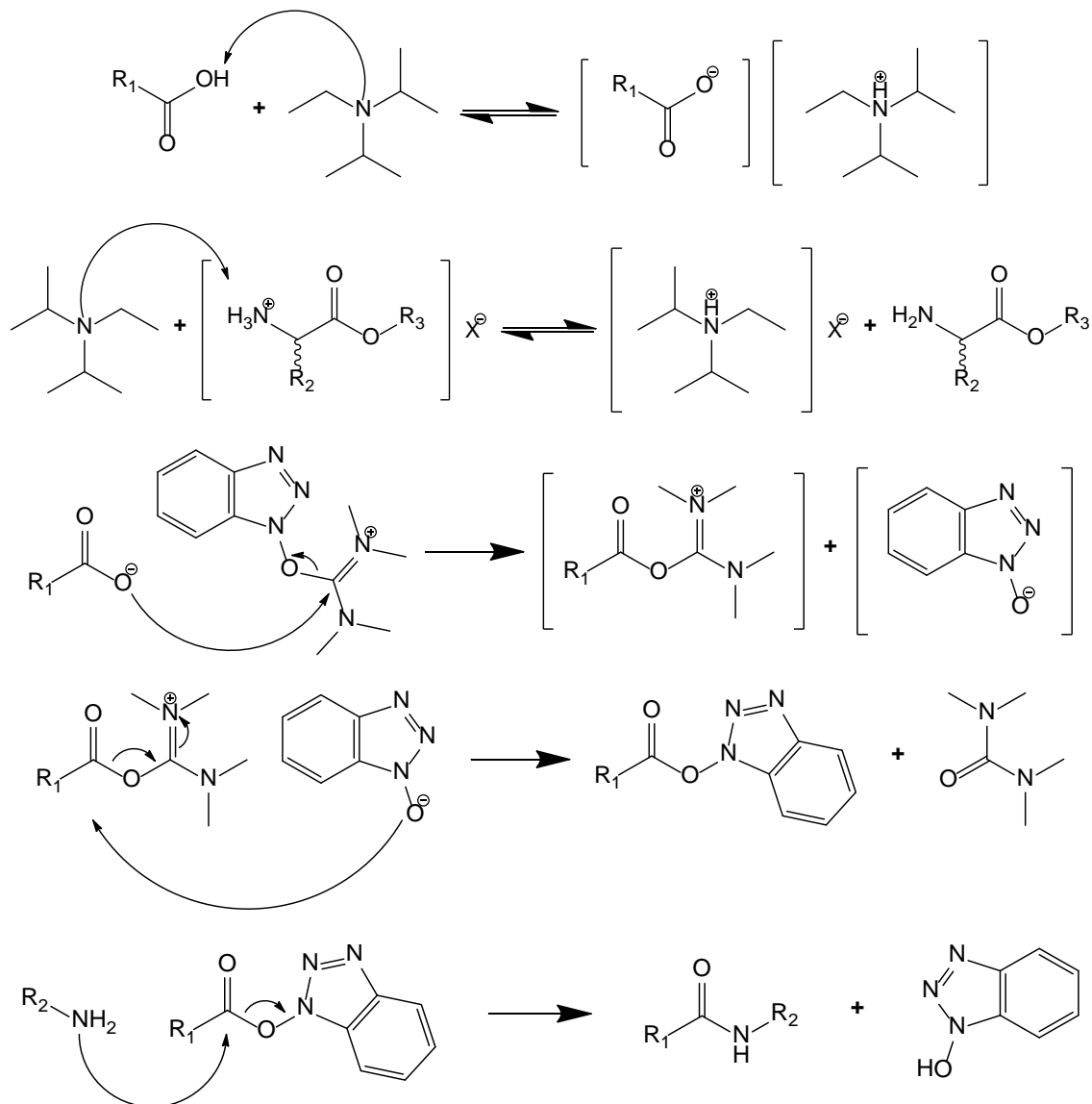


Schema 2-5: Allgemeine Kupplungsreaktion bei Verwendung von HBTU bzw. HCTU

Der Mechanismus dieser Kupplungsreaktion ist im **Schema 2-6** am Beispiel von HBTU wie folgt beschrieben: Die Carbonsäure-Komponente wird durch ein Äquivalent der Hilfsbase Diisopropylethylamin deprotoniert. Wird als Amin-Komponente das Hydrochlorid oder Tosylat einer Aminosäure verwendet, ist ein zweites Äquivalent Triethylamin erforderlich. Das Carboxylat greift HBTU am elektrophilen C-Atom der Harnstoff-Partialstruktur nucleophil an, wodurch 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) in deprotonierter Form abgespalten wird; dieses reagiert wiederum mit dem entstandenen Acyluronium-Kation unter Bildung eines Aktivesters. Als Nebenprodukt fällt der wasserlösliche Tetramethylharnstoff an. Im letzten Schritt greift das Amin den aus Carbonsäure und HOBt gebildeten Aktivester unter Ausbildung der Amid- bzw. Peptid-Bindung nucleophil an, wodurch HOBt als Abgangsgruppe abgespalten wird<sup>[71]</sup>.

Wie das in **Kapitel 2.1.1** beschriebene Kupplungsreagenz PPA besitzen Uronium-Salze wie HBTU und HCTU ebenfalls den Vorteil einer geringen Tendenz der Aminosäuren zur

Racemisierung bei der Peptid-Synthese und einer hohen Wasserlöslichkeit der entstehenden Nebenprodukte (Tetramethylharnstoff, 1-Hydroxybenzotriazol) bei der Aufarbeitung. Die Kupplungsreaktion mit Uronium-Salzen wird anfangs unter Eiskühlung angesetzt und anschließend bei Raumtemperatur gerührt, wodurch sie ebenfalls eine sehr schonende Methode darstellt. Ein weiterer, großer Vorteil gegenüber der Kupplungsmethode mit PPA besteht darin, dass Uronium-Salze die Amide bzw. Peptide häufig in höheren Ausbeuten liefern <sup>[36,71]</sup>. Die **Tabelle 2-2** zeigt eine Übersicht der mithilfe von HBTU und HCTU synthetisierten Phenylacrylsäureamide mit den jeweiligen Ausbeuten.



Schema 2-6: Mechanismus der Kupplungsreaktion bei Verwendung von HBTU

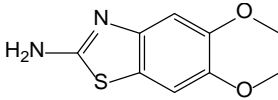
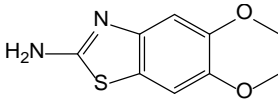
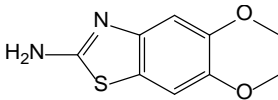
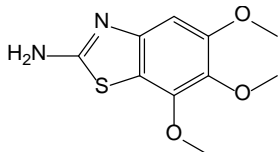
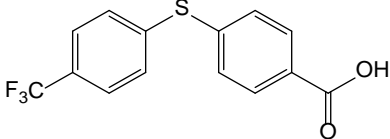
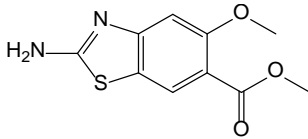
Tabelle 2-2: Übersicht der durch Kupplung mit HBTU bzw. HCTU synthetisierten Phenylacrylsäureamide

Verbindung	Phenylacrylsäure-Baustein	Aminosäure-Baustein	Kupplungsreagenz	Ausbeute [%]
SH32	<i>trans</i> -3-Indolacrylsäure	<i>L</i> -Valinbenzylester	HCTU	45
SH33	3,4,5-Trimethoxyzimtsäure	<i>L</i> -Valinbenzylester	HCTU	93
SH34	$\alpha$ -Methylzimtsäure	<i>L</i> -Valinbenzylester	HCTU	87
SH35A	1,4-Phenylendiacrylsäure	<i>L</i> -Valinbenzylester	HBTU	2
SH35B	1,4-Phenylendiacrylsäure	<i>L</i> -Valinbenzylester	HBTU	68
SH36	4-Dimethylaminozimtsäure	<i>L</i> -Histidinmethylester	HBTU	0.8
SH37	4-Dimethylaminozimtsäure	<i>L</i> -Lysin(Boc)-methylester	HBTU	58
SH38	4-Dimethylaminozimtsäure	<i>L</i> -Arginin(Pbf)-methylester	HBTU	44

Das Kupplungsreagenz HBTU wurde ebenfalls zur Synthese der Amid-Bausteine für die Benzothiazol-Derivate bzw. Diarylthioether verwendet (siehe **Tabelle 2-3**), damit diese Bausteine für weitere, mehrstufige Synthesen in möglichst hohen Ausbeuten erhalten werden konnten. Die Synthese des Bausteins **SH50** wurde zunächst mithilfe von PPA versucht, führte jedoch aufgrund der relativ schlechten Nucleophilie der aromatischen Aminfunktion des 2-Aminobenzothiazol-Bausteins nicht zum gewünschten Produkt. Folglich eignet sich HBTU erfahrungsgemäß sowohl für Kupplungsreaktionen mit aliphatischen als auch mit aromatischen Aminen, während eine Kupplungsreaktion mit PPA nur bei aliphatischen Aminen, d.h. besseren Nucleophilen zufriedenstellend abläuft.



Tabelle 2-3: Übersicht anderer durch Kupplung mit HBTU synthetisierter Carbonsäureamide

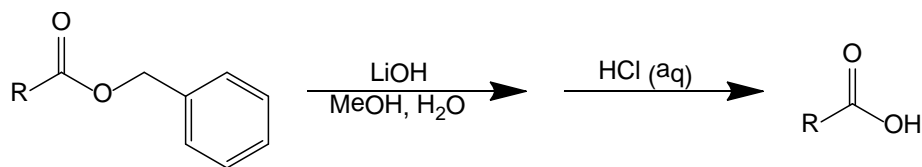
Verbindung	Carbonsäure-Baustein	Amin-Baustein	Ausbeute [%]
SH50	2-Iodbenzoesäure	2-Amino-4-methoxy-1,3-benzothiazol	91
SH51	2-Iodbenzoesäure	2-Amino-6-methoxy-1,3-benzothiazol	65
SH56	2-Iodbenzoesäure	 SH53	89
SH58	3-Iodbenzoesäure	 SH53	75
SH59	4-Iodbenzoesäure	 SH53	75
SH74	2-Iodbenzoesäure	 SH73	14
SH79	 SH77	 SH69	46

Kupplungsreaktionen mit HBTU und HCTU können sowohl in Dichlormethan als auch in Ethylacetat durchgeführt werden. Bei der Aufarbeitung erwies sich jedoch Ethylacetat als das effektivere Lösungsmittel, da in diesem Fall der Tetramethylharnstoff bei der wässrigen Extraktion (untere Phase) besser entfernt werden konnte.

#### 2.1.4 Abspaltung der Benzylester-Schutzgruppe

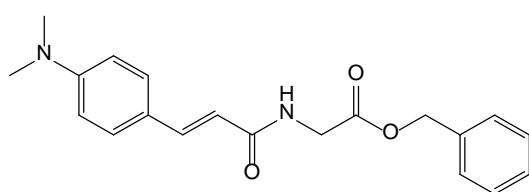
Benzylester werden üblicherweise durch katalytische Hydrierung oder durch Verseifung mit Alkalihydroxiden und anschließendes Ansäuern (siehe **Schema 2-7**) entschützt, um eine freie Carbonsäure-Funktion zu erhalten <sup>[40]</sup>. Da die Entschützung C-terminaler Benzylester in diesem Fall bei Phenylacrylsäureamiden benötigt wurde, musste die zweite

Methode verwendet werden, um eine unerwünschte Hydrierung der C=C-Doppelbindung des Phenylacrylsäure-Rests zu vermeiden.

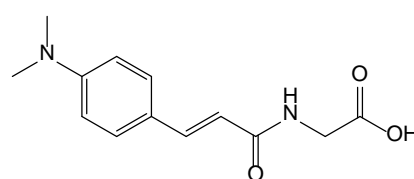


Schema 2-7: Alkalische Hydrolyse (Verseifung) von Benzylestern mit Lithiumhydroxid

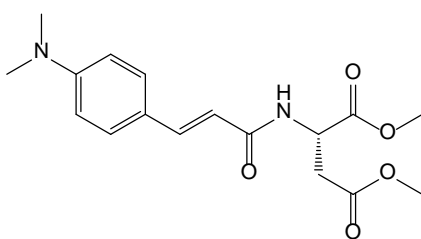
Diese Methode wurde (mit Lithiumhydroxid im Überschuss) zur Entschützung der C-terminalen Benzylester der Phenylacrylsäureamide **SH05** und **SH08** sowie zur Verseifung beider Methylester der Phenylacrylsäureamide **SH14** und **SH15** verwendet, führte aber nur im Fall von **SH08** zum gewünschten Reaktionsprodukt **SH08a**, welches nach Aufreinigung durch Säulenchromatographie mit einer hohen Ausbeute von 90% gewonnen werden konnte. Bei der Verseifung der Verbindungen **SH14** und **SH15** bestand das Problem vermutlich darin, dass auch nach dem Ansäuern die Produkte aufgrund ihrer beiden Carboxy-Gruppen eine sehr hohe Wasserlöslichkeit besaßen und sich deshalb nicht mit einem organischen Lösungsmittel extrahieren ließen. Da die freie Säure **SH08a** im Enzym-Assay keine bessere Hemmung zeigte, wurde auf erneute Versuche, **SH14** und **SH15** alkalisch zu hydrolysieren, verzichtet.



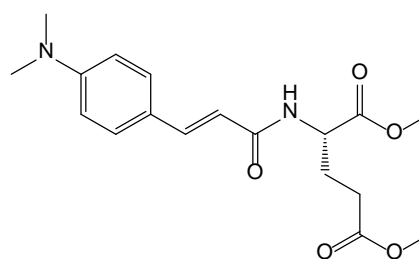
**SH08**



**SH08a**



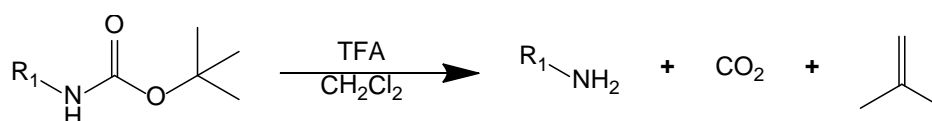
**SH14**



**SH15**

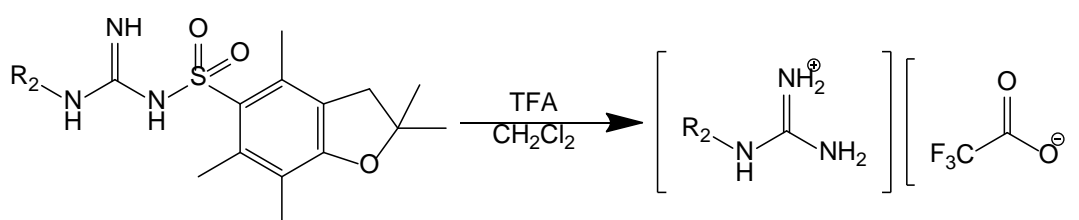
### 2.1.5 Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonyl- (Boc-) und 2,2,4,6,7-Pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl- (Pbf-) Schutzgruppe

In der Peptid-Synthese werden Amino-Gruppen von Aminosäuren häufig mit einer *tert*-Butyloxycarbonyl-(Boc-)Gruppe geschützt; diese lässt sich mithilfe von Trifluoressigsäure (*trifluoroacetic acid* = TFA) in Dichlormethan schnell und einfach entfernen <sup>[40]</sup> und besitzt zudem den Vorteil, dass die entstehenden Nebenprodukte Kohlenstoffdioxid und Isobuten (siehe **Schema 2-8**) <sup>[107]</sup> gasförmig sind.



Schema 2-8: Reaktion der Boc-Entschützung primärer Amine mit Trifluoressigsäure (TFA)

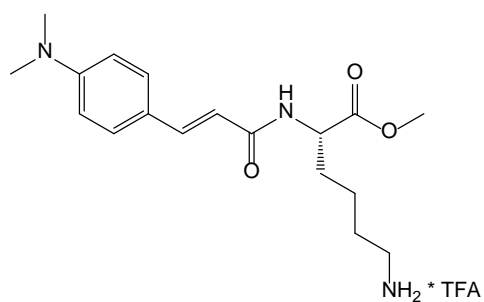
Eine weitere Schutzgruppe, die auf die gleiche Weise mit TFA abgespalten werden kann, stellt die 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl-(Pbf-)Gruppe (siehe **Schema 2-9**) dar. Sie wird insbesondere zur Schützung der stark basischen Guanidin-Funktion in der Seitenkette der Aminosäure Arginin eingesetzt <sup>[40]</sup> und bildet nach der Hydrolyse durch TFA eine Sulfonsäure als Nebenprodukt, die sich in Diethylether löst und damit durch Ausfällen und Waschen des entstandenen Salzes mit Diethylether leicht entfernen lässt <sup>[112]</sup>.



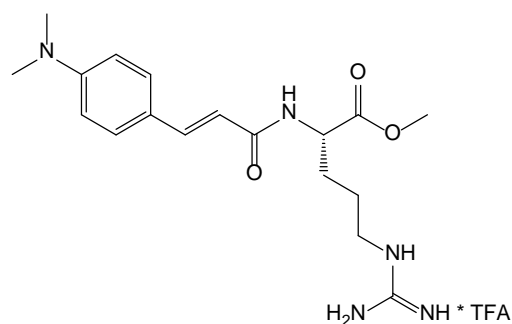
Schema 2-9: Reaktion der Pbf-Entschützung von Guanidinen mit Trifluoressigsäure (TFA)

Diese Methode der Entschützung mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan wurde bei zwei Phenylacrylsäureamiden verwendet: **SH37** (Boc-geschützte Lysin-Seitenkette) und **SH38** (Pbf-geschützte Arginin-Seitenkette). Das Salz **SH37a** entstand mit einer Ausbeute von nahezu 100%, besaß aber den großen Nachteil, dass es aufgrund seiner stark hygroskopischen Eigenschaften an der Luft schnell zerfloss. Das Salz **SH38a** entstand ebenfalls mit

100% Ausbeute, besaß aber deutlich geringere hygroskopische Eigenschaften. Die Enzym-Assays mit **SH37a** und **SH38a** wurden direkt nach der Synthese durchgeführt, da diese beiden Substanzen laut  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren nur im frisch hergestellten Zustand rein waren und eine spätere Reinheitsbestimmung mittels analytischer HPLC Hinweise auf eine Zersetzung dieser beiden Verbindungen lieferte.



SH73a

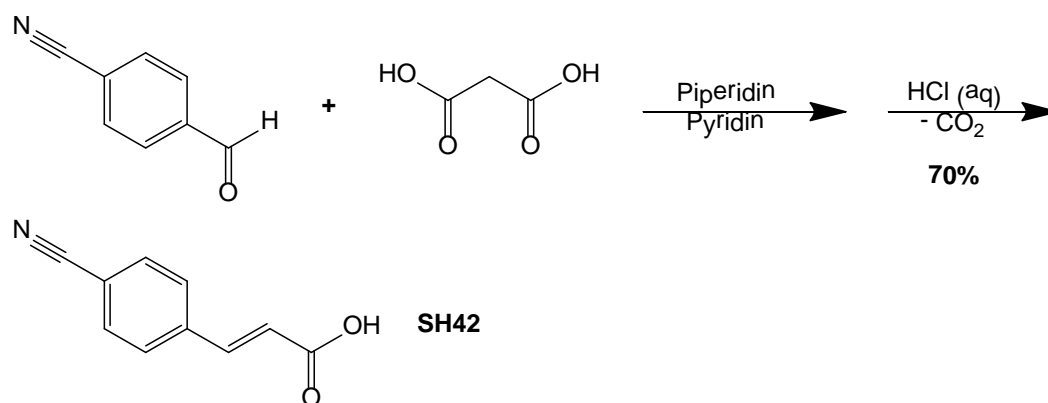


SH38a

## 2.2 Synthesestufen zur Darstellung von 4-Amidinophenylacrylsäure-ethylester

### 2.2.1 Knoevenagel-Kondensation zur Darstellung von Carbonsäuren aus Aldehyden

Bei der Knoevenagel-Kondensation handelt es sich um eine Reaktion von Malonsäure bzw. ihrer Ester mit Aldehyden in Gegenwart schwacher Basen wie Piperidin (siehe **Schema 2-10**). Malonsäure bzw. ihre Ester fungieren dabei aufgrund der CH-Acidität ihres  $\alpha$ -H-Atoms als Methylen-Komponente <sup>[51]</sup>.



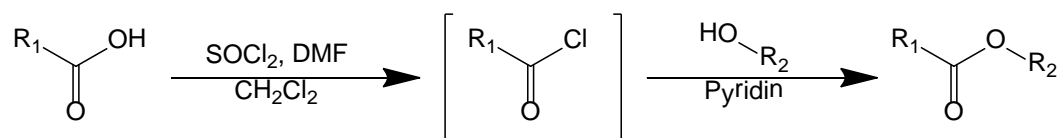
Schema 2-10: Knoevenagel-Kondensation von 4-Cyanobenzaldehyd mit Malonsäure am Beispiel der Synthese von **SH42**

Die Knoevenagel-Kondensation wurde in diesem Fall zur Synthese von 4-Cyanophenylacrylsäure (4-Cyanozimtsäure) aus 4-Cyanobenzaldehyd und Malonsäure in Anwesenheit von Piperidin als Hilfsbase und Pyridin als Lösungsmittel verwendet <sup>[52]</sup>. Nach Erhitzen, Abkühlen und Ansäuern der Lösung entstand die 4-Cyanophenylacrylsäure (**SH43**) mit einer Ausbeute von 70% und konnte ohne Aufreinigung im nächsten Syntheseschritt umgesetzt werden.

### 2.2.2 Veresterung durch Aktivierung zum Säurechlorid

Neben der klassischen, säurekatalysierten Veresterung von Carbonsäuren mit Alkoholen besteht die Möglichkeit, Ester über Carbonsäurechloride zu synthetisieren. Dabei wird die Carbonsäure mit Thionylchlorid zunächst in das entsprechende Säurechlorid überführt und

anschließend mit einem Alkohol in Anwesenheit einer Hilfsbase wie Pyridin (siehe **Schema 2-11**) umgesetzt <sup>[51]</sup>.

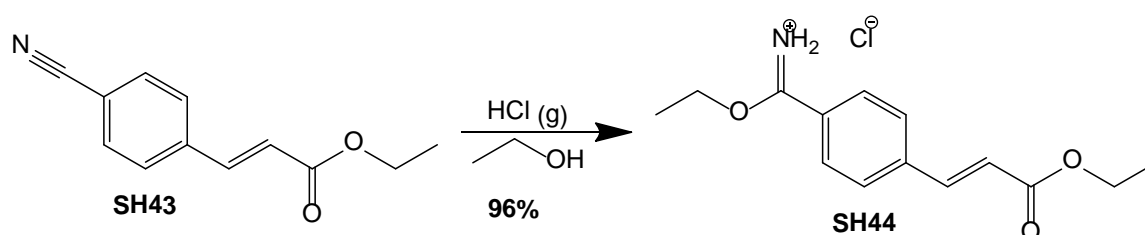


Schema 2-11: Darstellung von Estern durch Umsetzung von Carbonsäurechloriden mit Alkoholen

Diese Methode wurde zur Synthese von 4-Cyanozimtsäure-ethylester (**SH43**) gewählt <sup>[59]</sup>, um eine Hydrolyse der Nitril-Funktion durch Schwefelsäure und Wasser bei der klassischen Veresterung zu vermeiden. Zum Abfangen der Protonen des freigesetzten Chlorwasserstoffs wurde dem Ethanol Pyridin als Hilfsbase zugesetzt. Die Verbindung **SH43** wurde in einer hohen Ausbeute von jeweils 80 bis nahezu 100% erhalten.

### 2.2.3 Synthese von Iminoethern aus Nitrilen

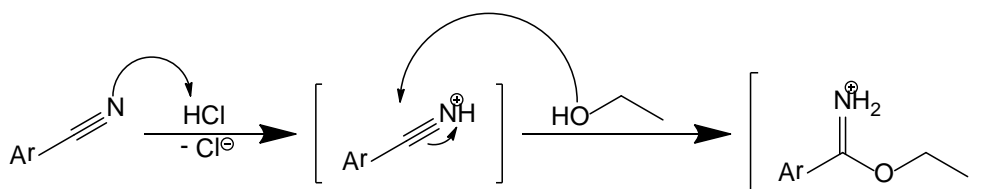
Iminoether (auch Imidoester genannt) lassen sich aus ihren entsprechenden Nitrilen durch Einleiten von trockenem Chlorwasserstoff-Gas in eine alkoholische Lösung des Nitrils darstellen (siehe **Schema 2-12**) <sup>[51,59]</sup>. Diese Synthese muss unter wasserfreien Bedingungen durchgeführt werden, damit keine Hydrolyse des Nitrils zum Amid bzw. zur Carbonsäure stattfinden kann.



Schema 2-12: Darstellung des Iminoethers **SH44** aus der Nitril-Funktion von 4-Cyanozimtsäure (**SH43**)

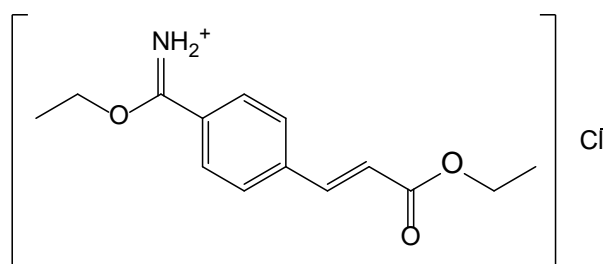
Der Mechanismus der Reaktion eines Nitrils zum Iminoether ist im **Schema 2-13** kurz beschrieben: Im ersten Schritt wird das Nitril am N-Atom durch Chlorwasserstoff protoniert, im zweiten Schritt erfolgt ein nucleophiler Angriff des Alkohols auf das C-Atom des

Nitrils unter Bildung des Iminoethers, welcher aufgrund der salzsauren Bedingungen als Hydrochlorid-Salz vorliegt.



Schema 2-13: Reaktionsmechanismus der Darstellung eines Iminoethers aus Nitrilen

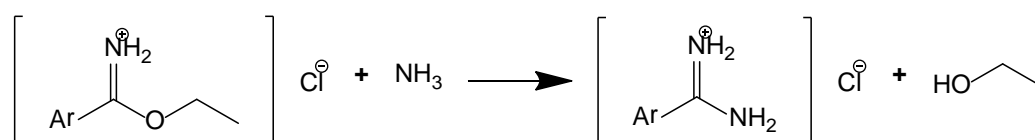
Diese Methode wurde zur Synthese der Verbindung **SH44** verwendet, welche mit einer hohen Ausbeute von 96% entstand und als Zwischenprodukt für die Umsetzung mit Ammoniak zum entsprechenden Amidin (Pinner-Reaktion, siehe **Kapitel 2.2.4**) diene.



SH44

#### 2.2.4 Synthese von Amidinen aus Iminoethern

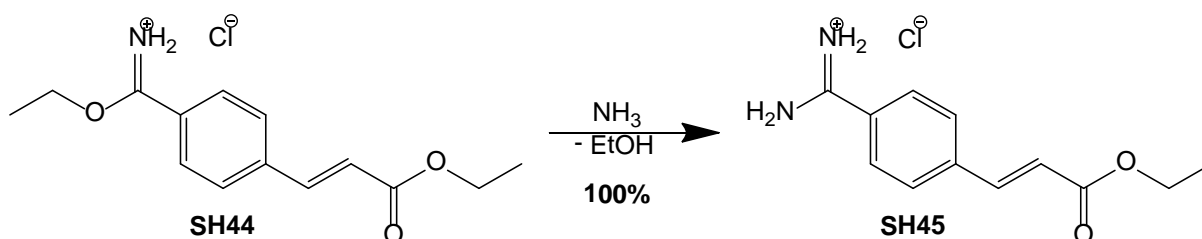
Amidine werden durch Umsetzung der im **Kapitel 2.2.3** beschriebenen Iminoether (Imidoester) mit Aminen oder Ammoniak (siehe **Schema 2-14**) synthetisiert; es handelt sich hierbei um die so genannte Pinner-Reaktion <sup>[51]</sup>.



Schema 2-14: Darstellung von Amidinen durch Reaktion von Iminoethern mit Ammoniak

Diese Methode wurde zur Synthese der Verbindung **SH45** verwendet, indem der Iminoether **SH44** mit ethanolischer Ammoniak-Lösung zum entsprechenden Amidin reagierte

(siehe **Schema 2-15**)<sup>[59]</sup>. Bei dieser Reaktion findet ein nucleophiler Angriff am C-Atom des Iminoethers durch Ammoniak statt (Ammonolyse), womit folglich Ethanol abgespalten wird. Durch die starke Basizität der Amidin-Funktion bleibt diese auch in Anwesenheit von Ammoniak protoniert (Amidin-Hydrochlorid).



Schema 2-15: Darstellung von 4-Amidinophenylacrylsäure-ethylester-Hydrochlorid (**SH45**)

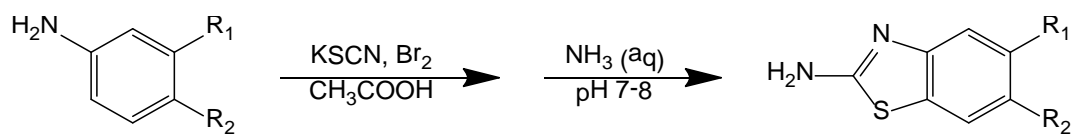
Die Verbindung **SH45** entstand in zwei Synthese-Ansätzen mit einer hohen Ausbeute von jeweils nahezu 100%. Es handelt sich hierbei um den letzten, in der vorliegenden Arbeit synthetisierten Vertreter der Phenylacrylsäure-Derivate. Die ursprünglich geplante Hydrolyse des Ethylesters sowie die anschließende Kupplung mit *L*-Valinbenzylester wurde nicht mehr durchgeführt, da die bis dahin erhaltenen Struktur-Wirkungs-Beziehungen zeigten, dass die Substanzklasse nicht vielversprechend ist.

## 2.3 Synthese der Benzothiazole und Diarylthioether

### 2.3.1 Synthese der Benzothiazol-Bausteine

Substituierte Derivate des 2-Aminobenzothiazols lassen sich aus den entsprechend substituierten Anilin-Derivaten mit einem Überschuss an Kaliumthiocyanat und einer katalytischen Menge an elementarem Brom in konzentrierter Essigsäure (Eisessig) als Lösungsmittel darstellen (siehe **Schema 2-16**)<sup>[34]</sup>; die Reaktionsprodukte fallen nach Neutralisation mit konzentrierter wässriger Ammoniak-Lösung als kristalline Feststoffe aus<sup>[101]</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode verwendet, um speziell substituierte Derivate des 2-Aminobenzothiazols zu synthetisieren, wenn diese käuflich nicht zu erwerben waren.

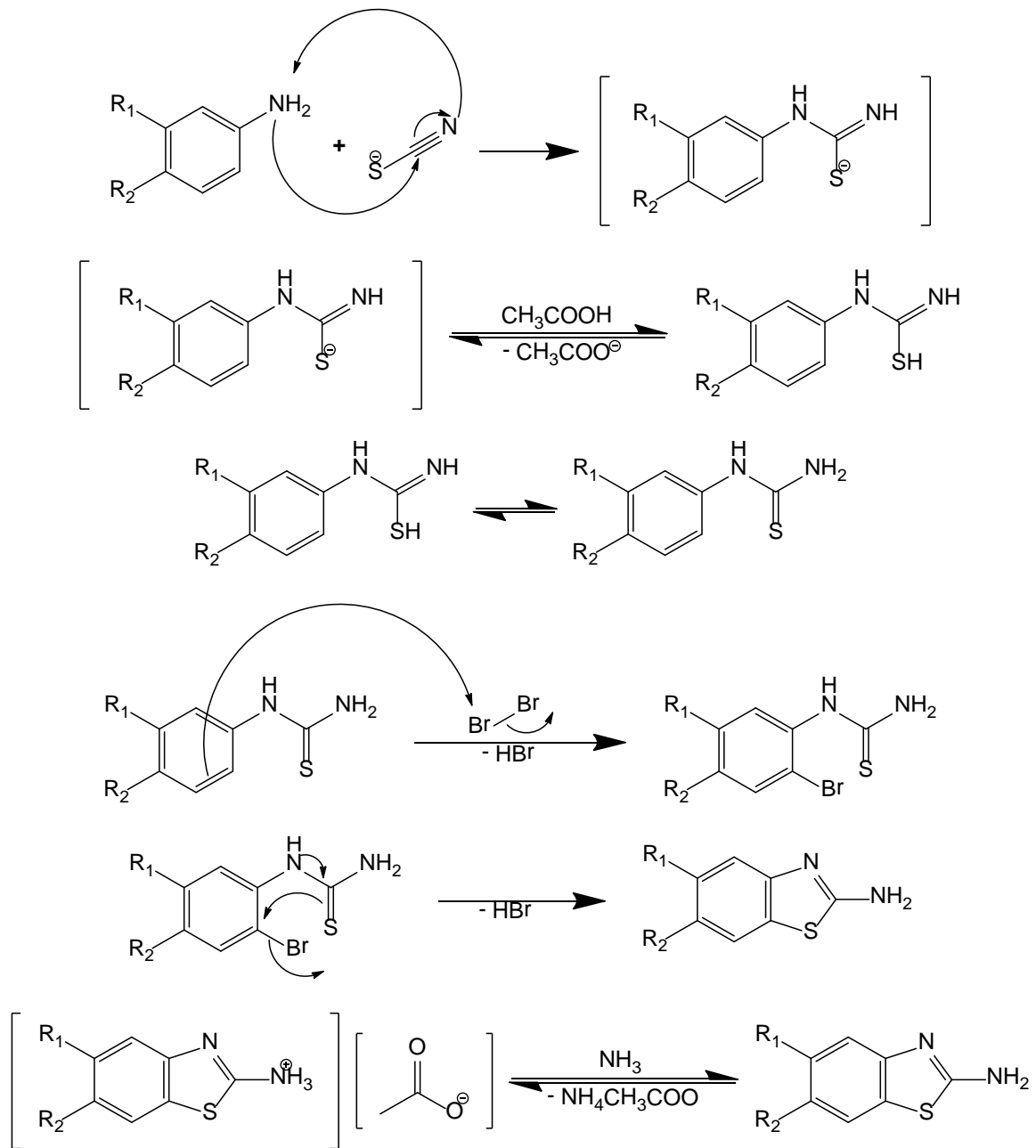




Schema 2-16: Darstellung von 2-Aminobenzothiazolen aus entsprechenden Anilin-Derivaten

Bei Anilin-Derivaten, die nur in *para*-Stellung bzw. in *meta*- und in *para*-Stellung zur primären aromatischen Amino-Gruppe einen Substituenten enthalten, läuft die Reaktion in der Regel ohne Probleme bei Raumtemperatur ab; in manchen Fällen ist jedoch Erhitzen erforderlich. Ein möglicher Reaktionsmechanismus (analog <sup>[4]</sup>) ist im **Schema 2-17** wie folgt beschrieben: Das elektrophile C-Atom des Thiocyanat-Anions wird von dem primären aromatischen Amin nucleophil angegriffen, wodurch es zur Bildung eines Thioharnstoff-Derivates als Zwischenprodukt kommt. Im nächsten Schritt findet in *ortho*-Stellung zum Thioharnstoff eine elektrophile aromatische Substitution durch das elementare Brom unter Abspaltung von Bromwasserstoff statt. Das 2-Aminobenzothiazol-Derivat entsteht im letzten Schritt, indem das S-Atom des Thioharnstoffs im Sinne einer nucleophilen aromatischen Substitution den Ring schließt, wobei Bromid als Abgangsgruppe fungiert. Da das Reaktionsprodukt im sauren Milieu als Salz mit protonierter Amino-Funktion vorliegt, muss es durch Neutralisation mit Ammoniak in das freie Amin überführt werden, damit eine Isolierung möglich ist.

Mithilfe dieser Methode wurden die 2-Aminobenzothiazol-Bausteine **SH53**, **SH69** und **SH73** synthetisiert; eine Übersicht der verwendeten Edukte und Ausbeuten zeigt die **Tabelle 2-4**. Die Methode bietet in präparativer Hinsicht den großen Vorteil, dass die 2-Aminobenzothiazole nach Neutralisation bzw. Alkalisieren als kristalline Feststoffe in der Lösung ausfallen und sich folglich durch Abfiltrieren und Waschen mit Wasser einfach isolieren lassen.



Schema 2-17: Reaktionsmechanismus der Darstellung von 2-Aminobenzothiazolen

Tabelle 2-4: Übersicht der synthetisierten Benzothiazol-Bausteine

Verbindung	Edukt	Ausbeute [%]
SH53	3,4-Dimethoxyanilin	>80
SH69	Methyl-4-amino-2-methoxybenzoat	28
SH73	3,4,5-Trimethoxyanilin	5

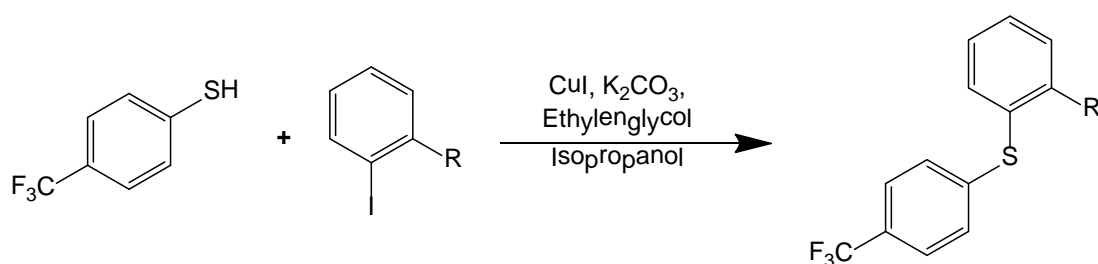
Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigte bei **SH53** eine ausreichend hohe Reinheit, wodurch dieses nicht durch Säulenchromatographie aufgereinigt werden musste. Diese war jedoch bei den Verbindungen **SH69** und **SH73** nach deren Synthese erforderlich, welche letztendlich in deutlich kleineren Ausbeuten entstanden. Im Fall von **SH69** entstanden nach Reaktion bei Raumtemperatur zwei Reaktionsprodukte: Zum einen das gewünschte Benzothiazol-Derivat, zum anderen ein so genanntes Organo-Thiocyanat (siehe **Abbildung 2-4**)<sup>[21]</sup>, welches sich jedoch durch nachträgliches Erhitzen in das Benzothiazol-Derivat überführen ließ.



Abbildung 2-4: Struktur eines Organo-Thiocyanats

### 2.3.2 Synthese der Diarylthioether

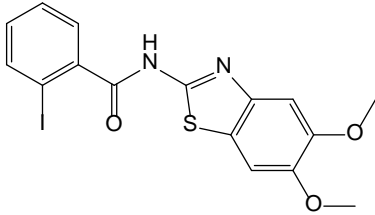
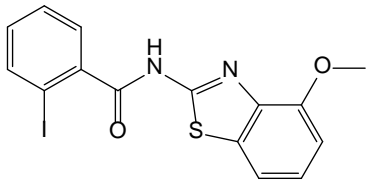
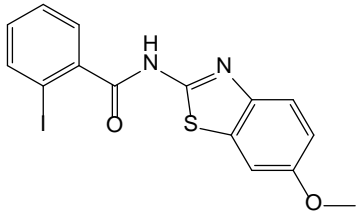
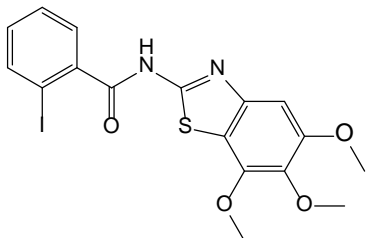
Diarylthioether entstehen bei der Reaktion von Arylhalogeniden mit Arylthiolen in Anwesenheit katalytischer Mengen von Kupfer(I)-iodid sowie einer Base, z.B. Kaliumcarbonat (siehe **Schema 2-18**). Das zugesetzte Ethylenglycol dient als Ligand zur Komplexbildung mit Kupfer(I)-Ionen<sup>[50,97]</sup>.



Schema 2-18: Kupfer(I)-katalysierte Synthese von Diarylthioethern aus Aryliodiden und -thiolen

Bei dem Mechanismus dieser Reaktion handelt es sich um eine nucleophile aromatische Substitution ( $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ )<sup>[50]</sup>. Die **Tabelle 2-5** zeigt eine Übersicht der Diarylthioether, die mithilfe der durch Kupfer(I)-iodid katalysierten  $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ -Reaktion synthetisiert wurden, sowie deren Ausbeuten.

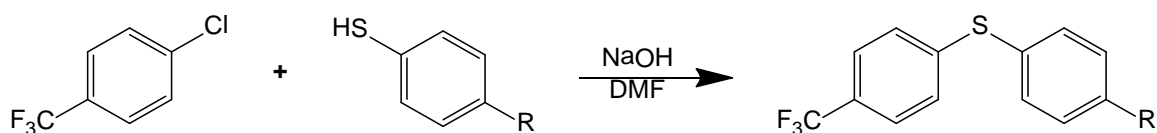
Tabelle 2-5: Übersicht der durch Mikrowellen-Synthese erhaltenen Diarylthioether

Verbindung	Thiol-Baustein	Aryliodid-Baustein	Ausbeute [%]
SH60	<i>p</i> -Trifluormethylthiophenol	 SH56	94
SH61	<i>p</i> -Trifluormethylthiophenol	 SH50	69
SH62	<i>p</i> -Trifluormethylthiophenol	 SH51	61
SH75	<i>p</i> -Trifluormethylthiophenol	 SH74	Produkt wurde nicht rein erhalten

Die Verbindungen **SH60**, **SH61** und **SH62** entstanden in relativ hohen Ausbeuten, darunter insbesondere **SH60**. Als Aryliodid-Bausteine dienten drei verschiedene Amide der 2-Iodbenzoesäure, welche nach der im **Kapitel 2.1.3** beschriebenen Kupplungsmethode mit HBTU synthetisiert wurden. Die Durchführung der Thioether-Synthesen in der Mikrowelle ergab folgende Vorteile: Kurze Reaktionszeiten, hohe Ausbeuten an Produkt sowie fast keine Nebenprodukte. In der Reaktionsmischung verbleibende Kupfersalze, Ethylenglycol und Isopropanol ließen sich bei der Aufarbeitung problemlos in die wässrige Phase

abtrennen; lediglich der in allen drei Fällen verwendete, sehr lipophile Thio-Baustein *p*-Trifluormethylthiophenol konnte erst durch Aufreinigung der Rohprodukte mittels Säulenchromatographie entfernt werden. Mithilfe dieser Methode wurde auch eine Thioether-Synthese mit den Verbindungen **SH58** und **SH59**, d.h. Amiden der 3- und 4-Iodbenzoesäure, versucht, welche jedoch nicht zum gewünschten Produkt führte. Die Verbindung **SH74** wurde mit *p*-Trifluormethylthiophenol umgesetzt, um anschließend die drei Methoxy-Gruppen in 5-, 6- und 7-Position am Benzothiazol-Rest des erhaltenen Thioethers mit Bortribromid abzuspalten und damit die entsprechende Verbindung mit drei Hydroxy-Gruppen zu synthetisieren; der Thioether mit dem 5,6,7-Trihydroxybenzothiazol-Rest konnte jedoch trotz Säulenchromatographie nicht in reiner Form gewonnen werden und führte bei der späteren Etherspaltung mit Bortribromid nicht zu der gewünschten, dreifach hydroxylierten Verbindung.

Eine alternative, zur Synthese von Diarylthioethern geeignete Methode stellt das Erhitzen von Arylchloriden und -thiolen in Anwesenheit einer starken Base, z.B. Natriumhydroxid, und Dimethylformamid als Lösungsmittel dar (siehe **Schema 2-19**)<sup>[10]</sup>.

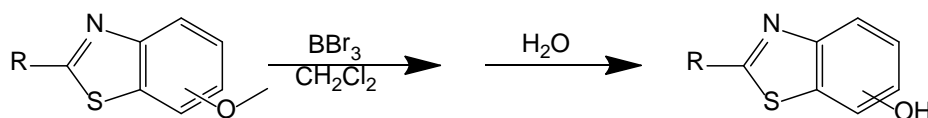


Schema 2-19: Diarylthioether-Synthese aus Arylchloriden und -thiolen in Anwesenheit einer starken Base

Nach dieser Methode wurde lediglich die Verbindung **SH77** aus den Edukten 1-Chlor-4-trifluormethylbenzol und 4-Mercaptobenzoessäure synthetisiert, da eine zuvor versuchte Synthese mithilfe der Kupfer(I)-katalysierten Reaktion in der Mikrowelle nicht zum gewünschten Produkt führte. Ein großer Nachteil dieser alternativen Methode besteht zum einen in der Notwendigkeit einer langen Reaktionszeit, zum anderen darin, dass **SH77** mit einer nur sehr geringen Ausbeute von 7% erhalten wurde. Wiederum einen Vorteil stellte das Ausfällen der schwer löslichen Carbonsäure durch Ansäuern dar, wodurch diese einfach abfiltriert und das Dimethylformamid durch mehrmaliges Waschen mit Wasser entfernt werden konnte.

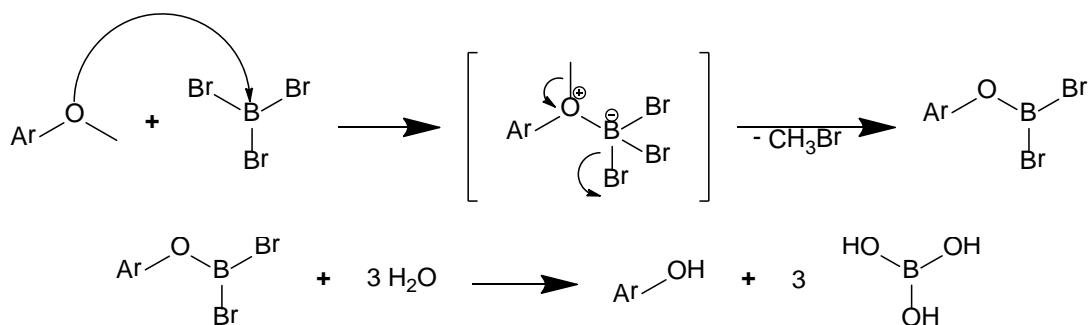
## 2.3.3 Abspaltung von Methoxy-Gruppen

Aromatisch gebundene Methoxy-Gruppen (Aryl-Methylether) lassen sich mithilfe der Lewis-Säure Bortribromid spalten und durch anschließende Hydrolyse in phenolische Hydroxy-Gruppen überführen (siehe **Schema 2-20**). Die Reaktion wird bei sehr niedrigen Temperaturen ( $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) gestartet und nach und nach langsam auf Raumtemperatur erwärmt <sup>[67,90]</sup>. Die Hydrolyse durch Zugabe von Wasser kann erfolgen, sobald nach Kontrolle mittels Dünnschichtchromatographie ein vollständiger Umsatz des Eduktes stattgefunden hat.



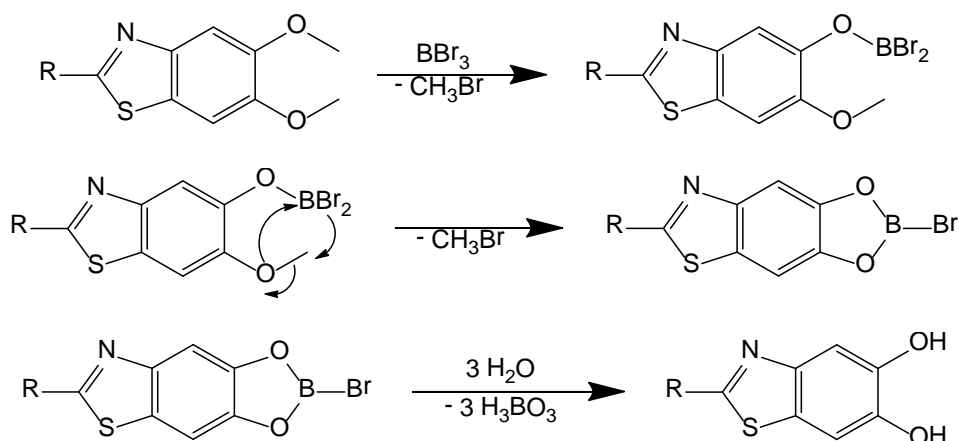
Schema 2-20: Abspaltung aromatischer Methoxy-Gruppen durch Bortribromid und anschließende Hydrolyse

Ein möglicher Reaktionsmechanismus dieser Etherspaltung ist im **Schema 2-21** wie folgt beschrieben: Die elektrophile Lewis-Säure Bortribromid wird von einem freien Elektronenpaar am O-Atom des Aryl-Methylethers nucleophil angegriffen, wodurch es zur Bildung eines zwitterionischen Komplexes als Intermediat kommt. Aus diesem entsteht nach Abspaltung von Methylbromid ein ungeladenes Zwischenprodukt, welches durch drei Äquivalente Wasser zum gewünschten Hydroxy-Aromaten hydrolysiert wird. Als Nebenprodukt entsteht wasserlösliche Borsäure <sup>[67]</sup>.



Schema 2-21: Reaktionsmechanismus der Abspaltung aromatischer Methoxy-Gruppen durch Bortribromid

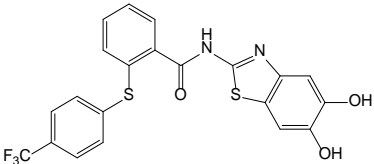
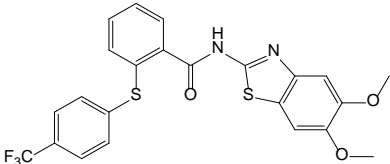
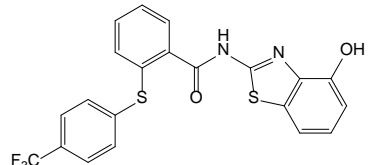
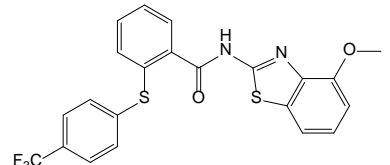
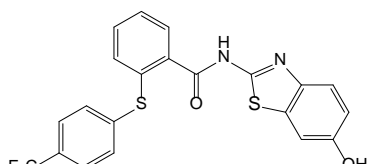
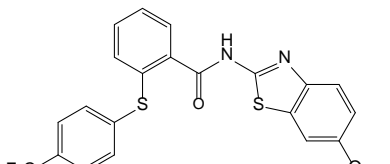
Der Mechanismus einer Abspaltung zweier *ortho*-ständiger Methoxy-Gruppen bei so genannten Catechol-Dimethylethern verläuft vermutlich stufenweise über ein cyclisches Zwischenprodukt, welches nach Hydrolyse mit Wasser das entsprechende Catechol mit *ortho*-ständigen Hydroxy-Gruppen bildet (siehe **Schema 2-22**)<sup>[67]</sup>. Ein Beispiel für diese Reaktion stellte die Umsetzung der Verbindung **SH60** zu **SH65** dar.



Schema 2-22: Etherspaltung bei Benzothiazolen mit zwei benachbarten Methoxygruppen (vgl. **SH60**)

Diese Methode der Etherspaltung mit einem Überschuss an Bortribromid wurde zur Synthese der aromatischen Hydroxy-Verbindungen **SH65**, **SH66** und **SH67** aus den entsprechenden Aryl-Methylethern **SH60**, **SH61** und **SH62** verwendet. Eine Übersicht der nach Säulenchromatographie erhaltenen Ausbeuten stellt die **Tabelle 2-6** dar.

Tabelle 2-6: Übersicht der durch Etherspaltung mit Bortribromid erhaltenen Hydroxybenzothiazole

Verbindung	Edukt	Ausbeute [%]
 SH65	 SH60	46
 SH66	 SH61	30
 SH67	 SH62	66

Der Vorteil dieser Methode besteht zum einen in der Wasserlöslichkeit der als Nebenprodukt entstehenden Borsäure, zum anderen in der Löslichkeit der entstandenen Hydroxy-Aromaten in polaren organischen Lösungsmitteln wie Dichlormethan und Ethylacetat, was die Aufarbeitung der Rohprodukte erleichtert. Als Nachteil erwies sich die Erfahrung, dass die Reaktion nur in Anwesenheit eines exzessiven Überschusses an Bortribromid erfolgreich ablaufen kann; beispielsweise führte im Fall von **SH60** erst eine wiederholte Zugabe an Bortribromid zum gewünschten Reaktionsprodukt **SH65**, welches trotz seiner Catechol-Partialstruktur (benachbarte Hydroxy-Gruppen am Benzothiazol-Rest) laut wiederholter  $^1\text{H-NMR}$ -Messungen dauerhaft stabil ist. Wie bei Säurechloriden sollte als Lösungsmittel trockenes Dichlormethan verwendet werden.

Insgesamt wurden in der vorliegenden Arbeit Phenylacrylsäureamide, Benzothiazole und Diarylthioether synthetisiert und anschließend, wie im folgenden Kapitel beschrieben, mithilfe biochemischer und biologischer Untersuchungsmethoden getestet.



### 3 BIOCHEMISCHE UND BIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

#### 3.1 Enzym-Assays

##### 3.1.1 Enzymkinetik

Literatur: <sup>[58]</sup>

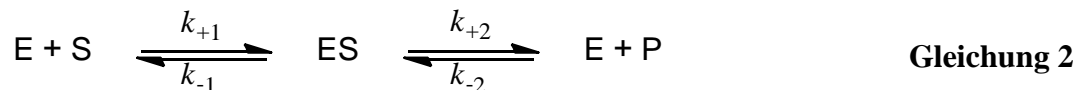
Enzyme fungieren als Katalysatoren, indem sie die Aktivierungsenergie der in lebenden Organismen stattfindenden chemischen Reaktionen herabsetzen und letztere damit beschleunigen, ohne dabei die Lage des Reaktionsgleichgewichtes zu beeinflussen. Unter den in lebenden Organismen herrschenden Reaktionsbedingungen (z.B. Stoffkonzentration, Temperatur, pH-Wert, Druck) können bestimmte Reaktionen nur in Gegenwart solcher Katalysatoren mit hinreichender Geschwindigkeit ablaufen, wodurch Enzyme eine entscheidende Rolle spielen. Im Gegensatz zu den „klassischen“, beispielsweise in der Chemie verwendeten Katalysatoren handelt es sich bei Enzymen um so genannte „Biokatalysatoren“ mit der besonderen Fähigkeit, ein bestimmtes Substrat selektiv zu erkennen und dieses von strukturell ähnlichen Substraten zu unterscheiden (Substratspezifität) sowie nur einen von mehreren thermodynamisch möglichen Reaktionstypen für dieses Substrat auszuwählen (Reaktionsspezifität). Diese spezifische Wechselwirkung eines Enzyms mit seinem Substrat findet im aktiven (oder katalytischen) Zentrum des Enzyms statt. Die katalytische Wirkung von Enzymen wird auch als Enzymaktivität bezeichnet.

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist von den Konzentrationen sämtlicher Reaktionspartner, d.h. sowohl von der Enzym- als auch von der Substratkonzentration abhängig und definiert sich laut **Gleichung 1** als Veränderung der Substrat- oder Produktkonzentration pro Zeiteinheit:

$$v = + \frac{d[P]}{dt} = - \frac{d[S]}{dt}$$

**Gleichung 1**

In einer ersten, reversiblen Teilreaktion bildet das Enzym (E) mit dem Substrat (S) den Enzym-Substrat-Komplex (ES), aus welchem in einer zweiten Teilreaktion das Produkt (P) entsteht und gleichzeitig das unveränderte Enzym freigesetzt wird. Die **Gleichung 2** veranschaulicht eine solche enzymkatalysierte Reaktion im Allgemeinen:



Beträgt die Konzentration des Reaktionsproduktes  $[P] \sim 0$  und/oder  $k_{-2} \ll k_{+2}$ , so kann die Möglichkeit einer Rückreaktion von E und P zu ES vernachlässigt werden. Demnach sagt die **Gleichung 3** aus, dass im Fließgleichgewicht (*steady state*) die Reaktionsgeschwindigkeit der Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes proportional ist:

$$v = k_{+2} \times [ES] \quad \text{Gleichung 3}$$

Bei  $k_{+2}$  handelt es sich um eine Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung, welche auch als katalytische Konstante bezeichnet wird und die maximale Anzahl an Substratmolekülen, die pro Enzymmolekül pro Sekunde in das Produkt umgewandelt werden, angibt. In der initialen Reaktionsphase, auch als „*pre-steady state*“ bezeichnet, findet zunächst ein rascher Aufbau des Enzym-Substrat-Komplexes statt, dessen Konzentration (und die des freien Enzyms E) bei ausreichender Verfügbarkeit des Substrates für einen längeren Zeitabschnitt nahezu unverändert bleibt, da sich die Geschwindigkeiten der Bildung und des Zerfalls von ES in einem Gleichgewicht befinden, für welches gilt:

$$\frac{d[ES]}{dt} = (k_{+1} \times [E] \times [S] - (k_{-1} + k_{+2}) \times [ES]) = 0 \quad \text{Gleichung 4}$$

In der **Gleichung 4** bezeichnet  $[S]$  die Konzentration des freien Substrates,  $[E]$  die Konzentration des freien Enzyms. Unter der Annahme, dass  $[S]$  im Messzeitraum größer ist als die Totalkonzentration des Enzyms  $[E_T]$ , ergeben sich unter Berücksichtigung der Summe in **Gleichung 5** die **Gleichung 6** und **Gleichung 7**, von denen die **Gleichung 6** die quasi-stationäre Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes darstellt:

$$[E_T] = [E] + [ES] \quad \text{Gleichung 5}$$

$$[ES] = \frac{[E] \times [S]}{K_M} = \frac{[E_T] \times [S]}{(K_M + [S])} \quad \text{Gleichung 6}$$

$$K_M = \frac{(k_{+2} + k_{-1})}{k_{+1}} \quad \text{Gleichung 7}$$

Unter Einbeziehung der in **Gleichung 8** beschriebenen Maximalgeschwindigkeit, welche der insgesamt eingesetzten Enzymkonzentration  $[E_T]$  proportional ist, ergibt sich aus den **Gleichung 3**, **Gleichung 6** und **Gleichung 7** die als Michaelis-Menten-Gleichung **Gleichung 9** bezeichnete Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration:

$$V_{MAX} = k_{+2} \times [E_T] \quad \text{Gleichung 8}$$

$$V = V_{MAX} \times \frac{[S]}{(K_M + [S])} \quad \text{Gleichung 9}$$

Die so genannte Michaelis-Konstante  $K_M$  trägt die Maßeinheit einer Konzentration (z.B.  $\mu\text{M}$  im Falle der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Substrate) und stellt eine kinetische Konstante dar. Da bei  $[S] = K_M$  der Quotient in **Gleichung 9** den Wert  $\frac{1}{2}$  beträgt, gibt die Michaelis-Konstante diejenige Substratkonzentration an, bei der eine halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird.

Wenn  $k_{+2}$  sehr viel kleiner als  $k_{-1}$  ist, entspricht  $K_M$  näherungsweise der Dissoziationskonstanten des Enzym-Substrat-Komplexes und stellt damit ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat dar: Ein Enzym mit hoher Affinität zum Substrat besitzt folglich einen niedrigen  $K_M$ -Wert und umgekehrt. Mithilfe der Michaelis-Menten-Gleichung kann näherungsweise das kinetische Verhalten zahlreicher Enzyme charakterisiert werden.

Die anhand der Michaelis-Menten-Gleichung erstellten Kurven zeigen einen hyperbolen Verlauf (vgl. Abbildungen im **Anhang**). Eine Erhöhung der Substratkonzentration  $[S]$  bewirkt eine asymptotische Annäherung der Reaktionsgeschwindigkeit  $V$  an den Maximalwert  $V_{MAX}$ . Im Gegensatz zu diesem hängt der numerische Wert von  $K_M$  nicht von der eingesetzten Enzymkonzentration  $[E_T]$  ab.

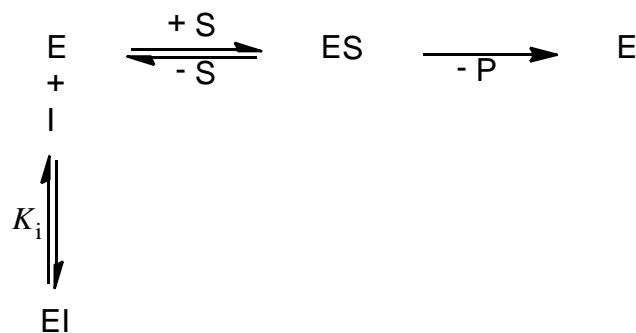
**Enzymhemmung.** Enzym-Inhibitoren verändern die katalytische Aktivität von Enzymen, indem sie diese reversibel oder irreversibel hemmen.

Eine reversible Hemmung ist durch eine Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes charakterisiert und kann durch die Entfernung des Inhibitors aufgehoben werden. Das Gleichgewicht zwischen dem Enzym und dem Inhibitor stellt sich schnell ein.

Eine irreversible Hemmung kommt dadurch zustande, dass der Inhibitor sehr fest im aktiven Zentrum des Enzyms gebunden wird oder er das Enzym dauerhaft verändert.

Neben diesen beiden Hemmtypen unterscheidet man zusätzlich zwischen kompetitiver, nicht-kompetitiver und unkompetitiver Enzymhemmung.

**Kompetitive Enzymhemmung.** Ähnelt die chemische Struktur des Inhibitors (I) der des Substrates (S) und reagiert dieser reversibel mit dem Enzym zum Enzym-Inhibitor-Komplex (EI), so liegt eine kompetitive Hemmung vor (siehe **Schema 3-1**). Die gleichzeitige Anwesenheit von Substrat und Inhibitor hat eine Konkurrenz dieser beiden Komponenten um die gleiche Bindungsstelle am Enzym, dem aktiven Zentrum, zur Folge. Eine Erhöhung der Substratkonzentration bei gleich bleibender Inhibitorkonzentration bewirkt eine Zunahme der Wahrscheinlichkeit, dass sich ES anstelle von EI bildet, und damit folglich eine Aufhebung der kompetitiven Hemmung.



Schema 3-1: Reaktionsschema der kompetitiven Enzymhemmung

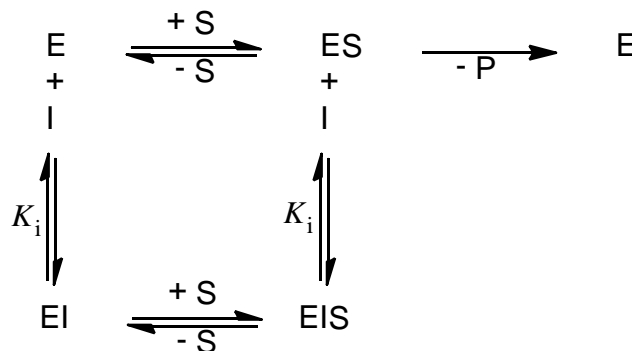
Die Wirkung eines kompetitiven Inhibitors besteht formal in einer scheinbaren Erhöhung des  $K_M$ -Wertes für das Substrat (vgl. **Gleichung 10**):

$$K_M^{app} = K_M \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \quad \text{Gleichung 10}$$

Die Dissoziationskonstante  $K_i$  des Enzym-Inhibitor-Komplexes trägt die Maßeinheit einer Konzentration; je kleiner der numerische Wert für  $K_i$  ist, desto potenter ist der Inhibitor für das betreffende Enzym.

Reversible kompetitive Inhibitoren vergrößern folglich den  $K_M$ -Wert, ohne die Maximalaktivität bzw. die Maximalgeschwindigkeit zu beeinflussen.

**Nicht-kompetitive Enzymhemmung.** Unterscheiden sich der Inhibitor und das Substrat in ihrer Struktur, so kommt es bei der Wechselwirkung mit dem Enzym zu keiner Konkurrenz zwischen den beiden Komponenten. Bei der nicht-kompetitiven Hemmung interagieren sie folglich mit verschiedenen Bindungsstellen des Enzyms (außerhalb des aktiven Zentrums), d.h. es kann sowohl ein Enzym-Inhibitor-Komplex (EI) als auch ein Enzym-Inhibitor-Substrat-Komplex (EIS) gebildet werden (siehe **Schema 3-2**).



Schema 3-2: Reaktionsschema der nicht-kompetitiven Enzymhemmung

Eine nicht-kompetitive Hemmung führt formal zu einer Verringerung der wirksamen Enzymmenge; darüber hinaus kann sie im Gegensatz zur kompetitiven Hemmung durch eine Erhöhung der Substratkonzentration nicht kompensiert werden. Laut **Gleichung 11** reduzieren reversible nicht-kompetitive Inhibitoren die Maximalgeschwindigkeit  $V_{MAX}$  eines Enzyms, ohne dabei den  $K_M$ -Wert zu verändern:

$$V_{MAX}^{app} = \frac{V_{MAX}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad \text{Gleichung 11}$$

Auch hier bezeichnet  $K_i$  die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes.

**Unkompetitive Enzymhemmung.** Reagiert der Inhibitor ausschließlich mit dem Enzym-Substrat-Komplex (ES), nicht aber mit dem freien Enzym (E), so spricht man von einer unkompetitiven Hemmung. Reversible unkompetitive Inhibitoren erniedrigen sowohl  $V_{MAX}$  als auch den  $K_M$ -Wert eines Enzyms; letzteres bedeutet folglich eine Zunahme der apparenten Substrataffinität. Eine steigende Substratkonzentration verstärkt die Wirkung des Inhibitors.

### 3.1.2 Durchführung fluorimetrischer Enzym-Assays mit der Dengue-Virus Typ 2 NS2B-NS3 Protease (DEN-2 NS2B-NS3pro)

Die zur Ermittlung der prozentualen Hemmung der DEN-2 NS2B-NS3pro durchgeführten Enzym-Assays erfolgten nach dem so genannten kontinuierlichen Assay-Verfahren unter Verwendung eines Fluoreszenz-Spektrometers mit Leseinheit für 96-Well-Mikrotiterplatten bei einer Temperatur von 25 °C. Die verwendete Pufferlösung musste dabei auf einen bestimmten pH-Wert eingestellt werden, bei dem das Enzym sein Aktivitätsmaximum aufweist. Das Screening wurde stets in voneinander unabhängigen Doppelbestimmungen durchgeführt.

Bei dem Dengue-Protease-Assay wurde das in **Abbildung 3-1** dargestellte Tripeptid-Substrat Boc-Gly-Arg-Arg-7-amino-4-methylcumarin verwendet, welches an seinem C-terminalen Ende mit 7-Amino-4-methylcumarin (AMC) über eine Amid-Bindung verknüpft ist. In dem Enzym-Assay spaltet die DEN-2 NS2B-NS3pro diese Amid-Bindung hydrolytisch unter Freisetzung von AMC, was eine Zunahme der Fluoreszenz pro Zeiteinheit zur Folge hat. Über diese lässt sich demnach die Protease-Aktivität bestimmen; eine Hemmung des Enzyms äußert sich wiederum durch eine entsprechende Abnahme der Fluoreszenz. Für AMC beträgt die Anregungswellenlänge 380 nm, die Detektionswellenlänge 460 nm.

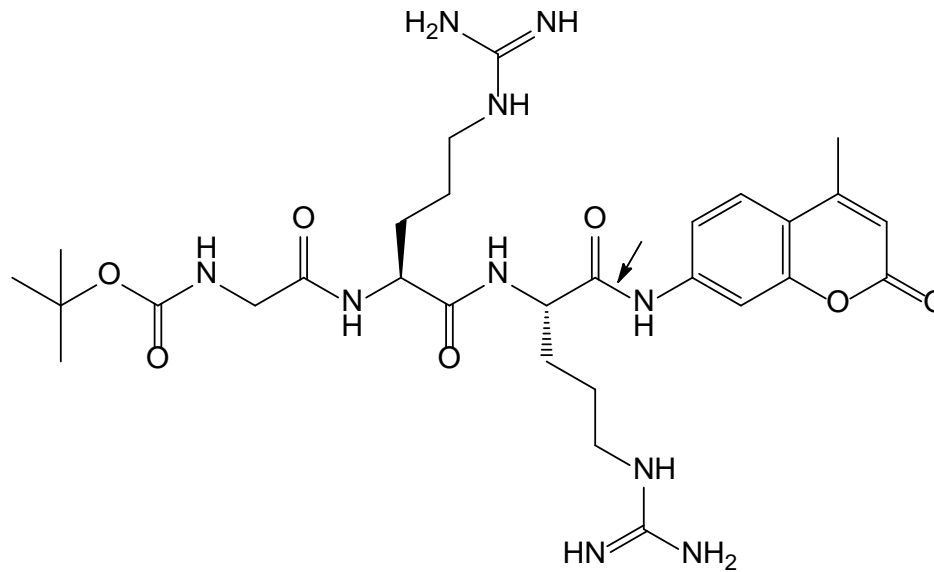


Abbildung 3-1: Struktur des Tripeptid-Substrates Boc-Gly-Arg-Arg-7-amino-4-methylcoumarin und dessen Spaltstelle für die Dengue-Virus Typ 2 NS2B-NS3 Protease (DEN-2 NS2B-NS3pro)

Zur Durchführung des Screenings wurde eine bestimmte Reihenfolge beim Pipettieren eingehalten: Das Enzym wurde in Pufferlösung vorgelegt und mit dem in DMSO gelösten Inhibitor versetzt; anschließend erfolgte die Zugabe des (ebenfalls in DMSO gelösten) Fluoreszenz-markierten Substrates. Die genauen Bedingungen des Dengue-Protease-Assays sind in der **Tabelle 3-1** zusammengefasst.

Tabelle 3-1: Bedingungen des verwendeten fluorimetrischen Enzym-Assays mit der Dengue-Virus Typ 2 NS2B-NS3 Protease (DEN-2 NS2B-NS3pro)

Enzym	Dengue-Virus Typ 2 NS2B-NS3 Protease (DEN-2 NS2B-NS3pro)
Puffer	50 mM Tris-Puffer pH 9.0 mit 10% Ethylenglycol und 0.0016% Brij <sup>®</sup> -35
Substrat	Boc-Gly-Arg-Arg-7-amino-4-methylcoumarin · HCl ( $M_r = 644.73$ ), $K_M = 194 \mu\text{M}$
Endkonzentrationen	Inhibitor: [I] = 50 $\mu\text{M}$ ; Substrat: [S] = 100 $\mu\text{M}$ (soweit nicht anders angegeben)
Wellenlängen und Temperatur	$\lambda$ (Anregung) = 380 nm; $\lambda$ (Detektion) = 460 nm; Temperatur: 25 °C

### 3.1.3 Ergebnisse der Enzym-Assays mit der Dengue-Virus Typ 2 NS2B-NS3 Protease (DEN-2 NS2B-NS3pro)

Zur Untersuchung, ob die in der vorliegenden Arbeit synthetisierten Verbindungen eine Hemmung der DEN-2 NS2B-NS3pro bewirken und um ggf. einen Anhaltspunkt für die Inhibitionsstärke der jeweiligen Substanzen zu erhalten, wurde zunächst ein Screening bei festgelegten Inhibitorkonzentrationen (meist 50  $\mu$ M) durchgeführt und damit die prozentuale Hemmung im Vergleich zu einer Negativ-Kontrolle mit DMSO ermittelt. Um falsch positive Ergebnisse durch eventuelle Eigenfluoreszenz oder durch Quenching der AMC-Fluoreszenz durch die Testsubstanzen zu vermeiden, wurde ggf. eine Korrekturmessung mit AMC und dem Inhibitor in Puffer und DMSO, jedoch ohne Enzym und Substrat (siehe **Tabelle 6-2, Kapitel 6.2**) durchgeführt. Eine Übersicht der Ergebnisse (als Mittelwerte zweier Messungen mit einer Abweichung <8 %, in einigen Fällen <16%) ist in der **Tabelle 3-2** dargestellt. Bei den Verbindungen **SH01** bis **SH45** handelt es sich um Phenylacrylsäure-Derivate, bei **SH53** bis **SH79** um Benzothiazole und Diarylthioether.

Tabelle 3-2: Screening-Ergebnisse an der Dengue-Virus Typ 2 NS2B-NS3 Protease (DEN-2 NS2B-NS3pro)

Verbindung	% Hemmung [50 $\mu$ M]	Verbindung	% Hemmung [50 $\mu$ M]	Verbindung	% Hemmung [50 $\mu$ M]
SH01	47	SH23	11	SH38a	29
SH02	49	SH24	20	SH45	2
SH03	54	SH25	18	SH53	5
SH04	47	SH26	23	SH56	2
SH05	52	SH27	13	SH58	25
SH06	44	SH28	19	SH59	34
SH07	50	SH29	21	SH60	11
SH08	43	SH30	53	<b>SH65</b>	<b>90</b>
SH08a	47	SH32	30	SH66	33
SH10	30	SH33	4	SH67	14
SH11	38	SH34	11	SH69	0
SH12	54	SH35A	21	SH73	18
SH13	45	<b>SH35B</b>	<b>61</b>	SH74	30
SH14	51	SH36	3	SH77	6
SH15	35	SH37a	4	SH79	24



Von einigen Phenylacrylsäureamiden, die eine Hemmung der DEN-2 NS2B-NS3pro von mindestens 50 % bei 50  $\mu\text{M}$  zeigten, wurden zusätzlich Verdünnungsreihen gemessen und anhand dieser mithilfe des Enzymkinetik-Computerprogrammes *GraFit*<sup>®</sup> die jeweiligen  $\text{IC}_{50}$ -Werte über die folgende 2-Parameter-Gleichung (**Gleichung 12**) berechnet:

$$y = \frac{100\%}{1 + \left(\frac{[I]}{\text{IC}_{50}}\right)^s} \quad \text{Gleichung 12}$$

In dieser Gleichung bezeichnet  $y$  die Substrat-Hydrolyserate des Enzyms, gemessen als Änderung der Fluoreszenz-Einheiten pro Zeiteinheit [dF/min],  $[I]$  die Inhibitorkonzentration [ $\mu\text{M}$ ] und  $s$  den *slope factor*.

Die aus den Verdünnungsreihen ermittelten  $\text{IC}_{50}$ -Werte der Phenylacrylsäureamide **SH05**, **SH06**, **SH07**, **SH08**, **SH12**, **SH13**, **SH30** und **SH35B** (bei Substratkonzentrationen von 20, 50, 100 und 200  $\mu\text{M}$ ) sind in der **Tabelle 3-3** (siehe weiter unten) als Mittelwerte unabhängiger Messreihen zusammengefasst. Mithilfe von *GraFit*<sup>®</sup> wurden Grafiken der Steigungen und Enzym-Restaktivitäten zu jeder Verdünnungsreihe dieser Substanzen erstellt, hier jedoch nur an einem Beispiel (**SH05**) bei einer Konzentration dargestellt (siehe **Abbildung 3-2**).

Bei den in der **Tabelle 3-3** dargestellten Ergebnissen fällt auf, dass sich die  $\text{IC}_{50}$ -Werte der in Verdünnungsreihen gemessenen Phenylacrylsäureamide **SH05** bis **SH35B** alle im Bereich von ~40-80  $\mu\text{M}$  befinden und die jeweilige Erhöhung der Substratkonzentration keine signifikante Veränderung der Werte bewirkt, was für eine nicht-kompetitive Hemmung spricht <sup>[17]</sup>. Auch alle mit *GraFit*<sup>®</sup> zur Enzym-Restaktivität erstellten Diagramme besaßen einen vergleichbaren Kurvenverlauf.

Steigungen bei [S] = 100  $\mu$ M

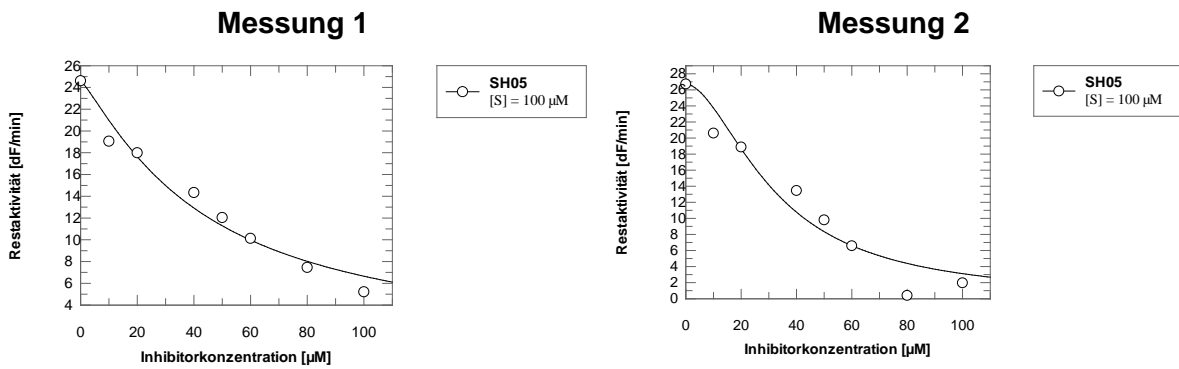
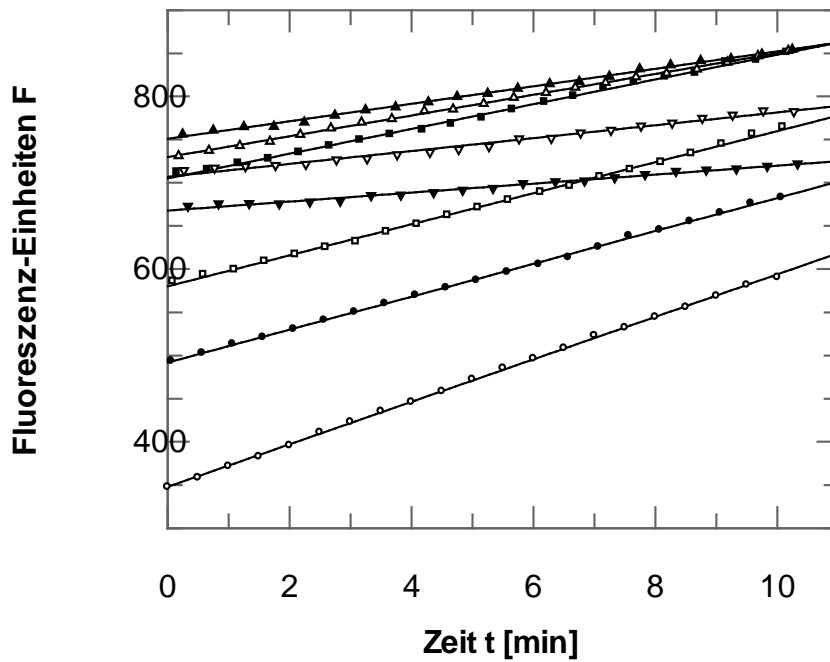


Abbildung 3-2: Graphische Darstellung der Steigungen und Enzym-Restaktivitäten bei der mit **SH05** gemessenen Verdünnungsreihe mit Substratkonzentrationen [S] = 100  $\mu$ M und Inhibitorkonzentrationen [I] = 0 / 10 / 20 / 40 / 50 / 60 / 80 / 100  $\mu$ M

Tabelle 3-3: Ergebnisse der gemessenen Verdünnungsreihen mit einigen ausgewählten Phenylacrylsäureamiden an der Dengue-Virus Typ 2 NS2B-NS3 Protease (DEN-2 NS2B-NS3pro)

Verbindung	IC <sub>50</sub> [S] = 20 µM	IC <sub>50</sub> [S] = 50 µM	IC <sub>50</sub> [S] = 100 µM	IC <sub>50</sub> [S] = 200 µM
SH05	73.9 ± 7.48 µM	71.1 ± 4.53 µM	37.8 ± 8.06 µM	70.2 ± 2.68 µM
SH06	65.5 ± 16.7 µM	67.0 ± 2.40 µM	48.0 ± 4.54 µM	45.4 ± 0.87 µM
SH07	78.7 ± 8.94 µM	53.5 ± 7.19 µM	52.1 ± 0.61 µM	54.0 ± 13.3 µM
SH08	63.3 ± 0.66 µM	64.0 ± 7.20 µM	58.7 ± 1.63 µM	54.1 ± 4.89 µM
SH12	79.1 ± 2.37 µM	81.3 ± 7.22 µM	48.8 ± 6.46 µM	51.3 ± 2.74 µM
SH13	57.9 ± 4.70 µM	58.4 ± 19.1 µM	60.8 ± 3.27 µM	53.9 ± 1.07 µM
SH30	66.9 ± 3.11 µM	56.6 ± 0.05 µM	50.3 ± 1.22 µM	63.3 ± 0.75 µM
SH35B	-	-	56.6 ± 1.18 µM	41.8 ± 3.86 µM

Für die Verbindung **SH65**, welche von allen in der vorliegenden Arbeit synthetisierten Substanzen die stärkste Inhibition der DEN-2 NS2B-NS3pro (90 % bei 50 µM) bewirkte, wurden anhand der gemessenen Verdünnungsreihen Grafiken der Steigungen und Enzym-Restaktivitäten sowie Michaelis-Menten-Diagramme erstellt und die jeweiligen IC<sub>50</sub>- und *K<sub>M</sub>*-Werte (siehe **Tabelle 3-4**, weiter unten) berechnet. Die **Abbildung 3-3** zeigt zunächst eine bei [S] = 100 µM gemessene Verdünnungsreihe von **SH65**.

Steigungen bei [S] = 100  $\mu$ M

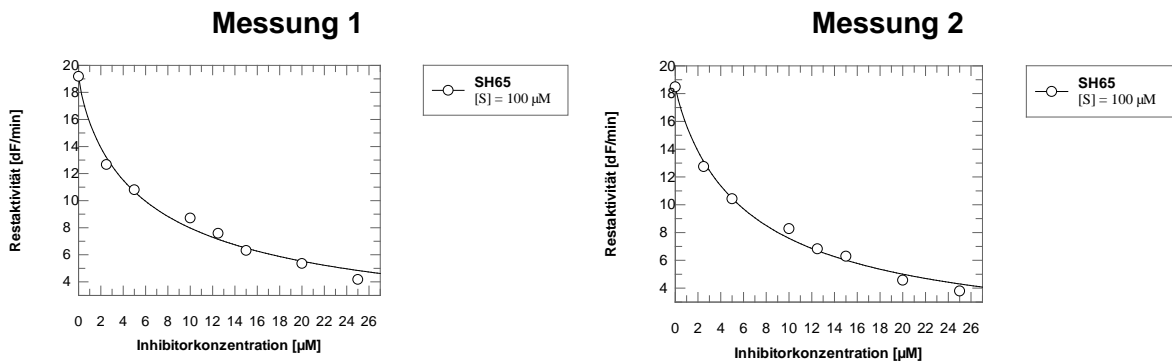
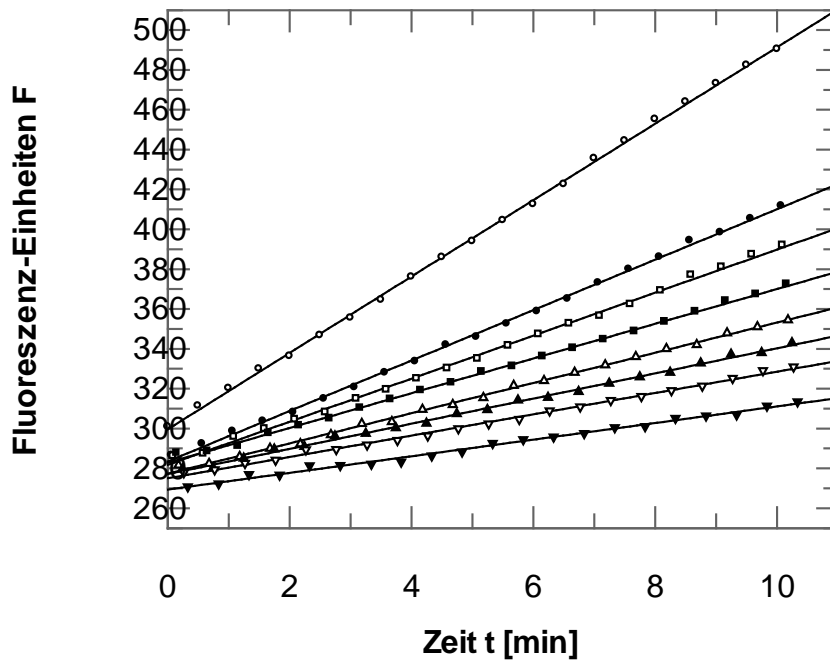


Abbildung 3-3: Graphische Darstellung der Steigungen und Enzym-Restaktivitäten bei der mit **SH65** gemessenen Verdünnungsreihe mit einer Substratkonzentration von [S] = 100  $\mu$ M und InhibitorKonzentrationen [I] = 0 / 2.5 / 5 / 10 / 12.5 / 15 / 20 / 25  $\mu$ M

Zur genaueren Charakterisierung der Enzymhemmung wurden von **SH65** weitere Verdünnungsreihen mit jeweils steigenden Substratkonzentrationen gemessen; die dazugehörigen Diagramme (Steigungen, Enzym-Restaktivitäten, Michaelis-Menten-Kurven) sind in dem **Anhang 11.1** dargestellt.

Die in der **Tabelle 3-4** dargestellten Ergebnisse zeigen, dass es sich bei **SH65**, dem aktivsten Benzothiazol-Derivat mit Diarylthioether-Funktion, um einen nicht-kompetitiven Inhibitor der DEN-2 NS2B-NS3pro handelt, da sich alle  $IC_{50}$ -Werte, die bei fünf verschiedenen Substratkonzentrationen ermittelt wurden, in einem gleichen Konzentrationsbereich von  $\sim 17 \mu\text{M}$  befinden <sup>[17]</sup>. Außerdem wird die nicht-kompetitive Hemmung durch die  $K_M$ - und  $V_{\max}$ -Werte bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen untermauert (sinkende  $V_{\max}$ -Werte bei steigender Inhibitorkonzentration;  $K_M$ -Wert gleichbleibend).

Tabelle 3-4: Ergebnisse der gemessenen Verdünnungsreihen mit der Verbindung **SH65** an der Dengue-Virus Typ 2 NS2B-NS3 Protease (DEN-2 NS2B-NS3pro)

Verbindung	$K_M$ [I] = 1 $\mu\text{M}$	$K_M$ [I] = 5 $\mu\text{M}$	$K_M$ [I] = 10 $\mu\text{M}$	$K_M$ [I] = 20 $\mu\text{M}$
SH65	$219 \pm 34.6 \mu\text{M}$	$136 \pm 49.7 \mu\text{M}$	$119 \pm 43.2 \mu\text{M}$	$206 \pm 13.0 \mu\text{M}$
$V_{\max}$ [I] = 1 $\mu\text{M}$	$V_{\max}$ [I] = 5 $\mu\text{M}$	$V_{\max}$ [I] = 10 $\mu\text{M}$	$V_{\max}$ [I] = 20 $\mu\text{M}$	$V_{\max}$ [I] = 50 $\mu\text{M}$
$47.9 \pm 1.33 \text{ min}^{-1}$	$24.9 \pm 4.85 \text{ min}^{-1}$	$25.4 \pm 0.21 \text{ min}^{-1}$	$28.3 \pm 0.28 \text{ min}^{-1}$	$8.66 \pm 0.72 \text{ min}^{-1}$
$IC_{50}$ [S] = 50 $\mu\text{M}$	$IC_{50}$ [S] = 100 $\mu\text{M}$	$IC_{50}$ [S] = 150 $\mu\text{M}$	$IC_{50}$ [S] = 200 $\mu\text{M}$	$IC_{50}$ [S] = 250 $\mu\text{M}$
$17.1 \pm 4.50 \mu\text{M}$	$17.3 \pm 0.10 \mu\text{M}$	$17.7 \pm 1.83 \mu\text{M}$	$17.6 \pm 1.15 \mu\text{M}$	$15.9 \pm 4.45 \mu\text{M}$

#### 3.1.4 Durchführung fluorimetrischer Enzym-Assays mit anderen Serin-Proteasen

Die Testung bestimmter Verbindungen an anderen Serin-Proteasen wie  $\alpha$ -Chymotrypsin und Trypsin erfolgte ebenfalls nach einem kontinuierlichen fluorimetrischen Enzym-Assay, d.h. in der Durchführung entsprechend dem Dengue-Protease-Assay, nur unter Verwendung anderer Fluoreszenz-markierter Substrate und Pufferlösungen.

Bei dem Enzym-Assay mit  $\alpha$ -Chymotrypsin wurde das in der **Abbildung 3-4** dargestellte Fluoreszenz-markierte Dipeptid-Substrat Suc-Leu-Tyr-7-amino-4-methylcumarin verwendet.

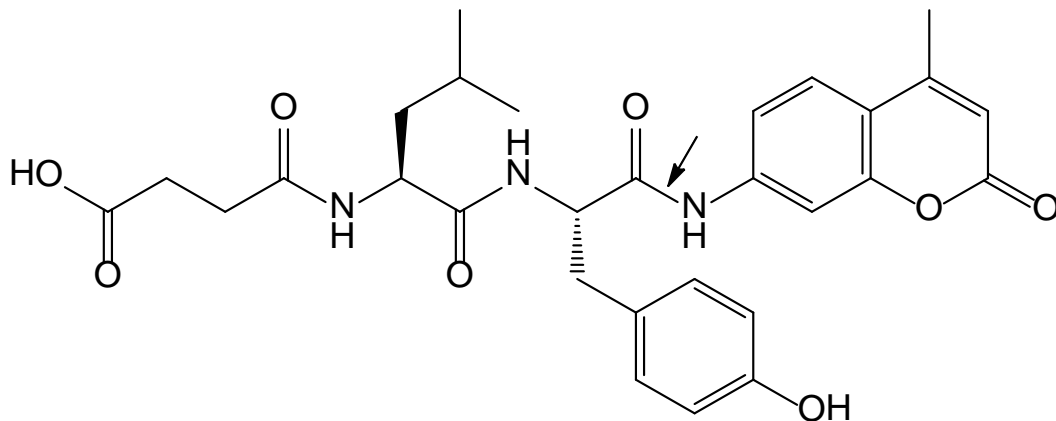


Abbildung 3-4: Struktur des Dipeptid-Substrates Suc-Leu-Tyr-7-amino-4-methylcumarin und dessen Spaltstelle für  $\alpha$ -Chymotrypsin

Die genauen Bedingungen des  $\alpha$ -Chymotrypsin-Assays sind in der **Tabelle 3-5** zusammengefasst.

Tabelle 3-5: Bedingungen des verwendeten fluorimetrischen Enzym-Assays mit  $\alpha$ -Chymotrypsin

Enzym	$\alpha$ -Chymotrypsin
Puffer	50 mM Tris-Puffer pH 8,0, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA
Substrat	Suc-Leu-Tyr-7-amino-4-methylcumarin ( $M_r = 551,6$ )
Endkonzentrationen	Inhibitor: [I] = 50 $\mu$ M; Substrat: [S] = 75 $\mu$ M (soweit nicht anders angegeben)
Wellenlängen und Temperatur	$\lambda$ (Anregung) = 380 nm; $\lambda$ (Detektion) = 460 nm; Temperatur: 25 °C

Bei dem Enzym-Assay mit Trypsin wurde das in der **Abbildung 3-5** dargestellte Fluoreszenz-markierte Dipeptid-Substrat Z-Phe-Arg-7-amino-methylcumarin verwendet.

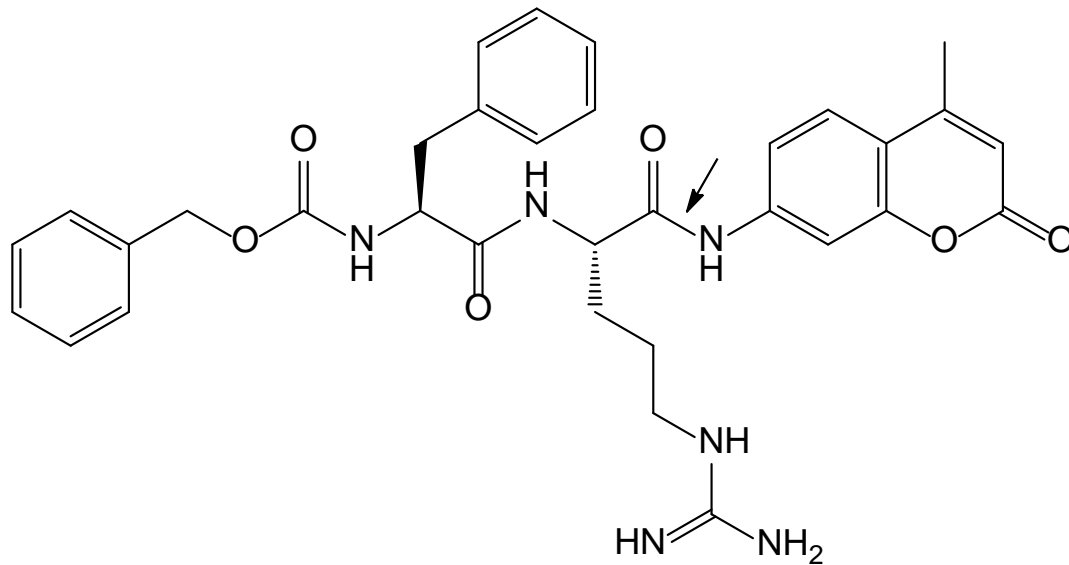


Abbildung 3-5: Struktur des Dipeptid-Substrates Z-Phe-Arg-7-amino-4-methylcoumarin und dessen Spaltstelle für Trypsin

Die genauen Bedingungen des Trypsin-Assays sind in der **Tabelle 3-6** zusammengefasst.

Tabelle 3-6: Bedingungen des verwendeten fluorimetrischen Enzym-Assays mit Trypsin

Enzym	Trypsin
Puffer	50 mM Tris-Puffer pH 8.0, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA
Substrat	Z-Phe-Arg-7-amino-4-methylcoumarin · HCl (Mr = 612.6)
Endkonzentrationen	Inhibitor: [I] = 50 $\mu$ M; Substrat: [S] = 40 $\mu$ M (soweit nicht anders angegeben)
Wellenlängen und Temperatur	$\lambda$ (Anregung) = 380 nm; $\lambda$ (Detektion) = 460 nm; Temperatur: 25 °C

### 3.1.5 Ergebnisse der Enzym-Assays mit anderen Serin-Proteasen

Aus der Substanzklasse der Phenylacrylsäureamide wurde nur eine kleinere Auswahl an Verbindungen an  $\alpha$ -Chymotrypsin und Trypsin getestet, darunter einige Amide der 4-Dimethylaminozimtsäure, welche zuvor eine schwache Hemmung der DEN-2 NS2B-NS3pro zeigten, sowie einige andere Vertreter, die als Strukturelement ein Michael-System enthielten. Aus der Substanzklasse der Benzothiazole und Diarylthioether wurden hingegen sämtliche Verbindungen an diesen Serin-Proteasen getestet. Die Ergebnisse des  $\alpha$ -

Chymotrypsin-Assays sind in der **Tabelle 3-7**, die Ergebnisse des Trypsin-Assays in der **Tabelle 3-8** als Übersicht dargestellt.

Tabelle 3-7: Screening-Ergebnisse einiger ausgewählter Substanzen an  $\alpha$ -Chymotrypsin

Verbindung	Konz. [ $\mu$ M]	% Hemmung	Verbindung	Konz. [ $\mu$ M]	% Hemmung
SH05	50	46	SH53	50	0
SH06	50	20	SH56	50	0
SH07	50	35	SH58	50	1
SH08	50	32	SH59	50	1
SH12	50	34	SH60	50	0
SH13	50	42	SH65	50	21
SH30	50	40	SH66	50	3
<b>SH32</b>	<b>50</b>	<b>99</b>	SH67	50	26
SH33	50	12	SH69	20	7
SH34	50	44	SH73	50	8
<b>SH35A</b>	<b>50</b>	<b>73</b>	SH74	50	34
<b>SH35B</b>	<b>50</b>	<b>96</b>	SH77	20	7
			SH79	50	8

Tabelle 3-8: Screening-Ergebnisse einiger ausgewählter Substanzen an Trypsin

Verbindung	Konz. [ $\mu$ M]	% Hemmung	Verbindung	Konz. [ $\mu$ M]	% Hemmung
SH05	50	21	SH53	40	0
SH06	50	43	SH56	50	0
SH07	50	23	SH58	40	12
SH08	50	23	SH59	40	25
SH12	50	25	SH60	50	11
SH13	50	32	<b>SH65</b>	<b>50</b>	<b>96</b>
SH30	50	37	<b>SH66</b>	<b>50</b>	<b>90</b>
SH32	50	45	<b>SH67</b>	<b>50</b>	<b>97</b>
SH33	50	0	SH69	40	9
SH34	50	28	SH73	40	24
SH35A	50	28	SH74	40	28
<b>SH35B</b>	<b>50</b>	<b>74</b>	SH77	40	6
			SH79	50	24



Von einigen Phenylacrylsäureamiden und Diarylthioethern, die eine nahezu vollständige Hemmung des  $\alpha$ -Chymotrypsins (96-99 %) bzw. eine starke bis nahezu vollständige Hemmung des Trypsins (74-97 %) bei 50  $\mu\text{M}$  zeigten, wurden ebenfalls zusätzlich Verdünnungsreihen gemessen und – analog der Vorgehensweise bei den Verdünnungsreihen mit der DEN-2 NS2B-NS3pro – mithilfe des Enzymkinetik-Computerprogrammes *GraFit*<sup>®</sup> die jeweiligen  $\text{IC}_{50}$ -Werte über die 2-Parameter-Gleichung (**Gleichung 12**) berechnet.

Tabelle 3-9: Ergebnisse der gemessenen Verdünnungsreihen mit einigen ausgewählten Phenylacrylsäureamiden und Diarylthioethern an  $\alpha$ -Chymotrypsin und Trypsin

$\alpha$ -Chymotrypsin				
Verbindung	$\text{IC}_{50} [\text{S}] = 50 \mu\text{M}$	$\text{IC}_{50} [\text{S}] = 75 \mu\text{M}$	$\text{IC}_{50} [\text{S}] = 100 \mu\text{M}$	$\text{IC}_{50} [\text{S}] = 150 \mu\text{M}$
SH32	$22.8 \pm 3.29 \mu\text{M}$	$21.2 \pm 1.93 \mu\text{M}$	$21.9 \pm 3.34 \mu\text{M}$	$35.5 \pm 0.36 \mu\text{M}$
SH35B	$11.2 \pm 1.69 \mu\text{M}$	$11.4 \pm 0.16 \mu\text{M}$	$15.7 \pm 1.43 \mu\text{M}$	-
Trypsin				
Verbindung	$\text{IC}_{50} [\text{S}] = 25 \mu\text{M}$	$\text{IC}_{50} [\text{S}] = 40 \mu\text{M}$	$\text{IC}_{50} [\text{S}] = 75 \mu\text{M}$	$\text{IC}_{50} [\text{S}] = 100 \mu\text{M}$
SH35B	$38.7 \pm 2.50 \mu\text{M}$	-	$25.3 \pm 8.51 \mu\text{M}$	$26.2 \pm 5.71 \mu\text{M}$
SH65	$5.17 \pm 0.01 \mu\text{M}$	$3.61 \pm 0.32 \mu\text{M}$	$3.51 \pm 0.04 \mu\text{M}$	$6.27 \pm 0.68 \mu\text{M}$
SH66	$18.0 \pm 0.68 \mu\text{M}$	$13.7 \pm 1.28 \mu\text{M}$	$10.5 \pm 3.15 \mu\text{M}$	$9.42 \pm 3.57 \mu\text{M}$
SH67	$13.9 \pm 0.06 \mu\text{M}$	$9.00 \pm 1.85 \mu\text{M}$	$12.2 \pm 1.40 \mu\text{M}$	$15.5 \pm 2.83 \mu\text{M}$

Die in der **Tabelle 3-9** dargestellten Ergebnisse der Verdünnungsreihen zeigen, dass die  $\text{IC}_{50}$ -Werte auch bei den Inhibitoren von  $\alpha$ -Chymotrypsin und Trypsin, unabhängig von der Substratkonzentration, jeweils in einem Konzentrationsbereich bleiben; demzufolge findet auch bei den endogenen Serin-Proteasen eine nicht-kompetitive Hemmung sowohl durch Phenylacrylsäureamide als auch durch Diarylthioether statt <sup>[17]</sup>. Alle mit *GraFit*<sup>®</sup> zur Enzym-Restaktivität erstellten Diagramme besaßen einen vergleichbaren Kurvenverlauf.

## 3.2 Infektionsbiologische Testungen

### 3.2.1 Antivirale Aktivität gegen Dengue-Flaviviren

Neben dem Screening der synthetisierten Substanzen in Enzym-Assays wurden weiterhin die antivirale Aktivität potentieller Inhibitoren der DEN-2 NS2B-NS3pro mithilfe Virus-infizierter Vero-Zellen sowie auf Cytotoxizität gegenüber diesen Zellen getestet; letztere beruht auf dem Prinzip des so genannten MTS-Tetrazolium-Assays<sup>[66,73]</sup>.

Diese Testungen auf Cytotoxizität und antivirale Aktivität wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Jochen Bodem (Institut für Virologie und Immunbiologie, Universität Würzburg) wie folgt durchgeführt:

Vero-Zellen wurden zunächst vier Tage lang mit der zu testenden Substanz in den Konzentrationen 30, 10, 3 und 1  $\mu\text{M}$  inkubiert, anschließend mit MTS-Lösung versetzt und die Absorption bei 490 nm gemessen.

Im Anschluss wurden Vero-Zellen mit der zu testenden Substanz (in gerade nicht mehr toxischer Konzentration) versetzt und mit einer Multiplicity of Infection (MOI) = 0.5 mit Typ-2-Dengue-Viren (DEN2) infiziert, vier Tage lang inkubiert und der Virus-Titer bestimmt.

Beide Tests wurden jeweils in Dreifach-Bestimmungen (mit DMSO als Kontrolle) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der **Tabelle 3-10** zusammengefasst.

Bei einem Wiederholungstest zeigten die Verbindungen **SH24** und **SH29** keine Inhibition am Virus (Logarithmus-Stufe = 0), was vermutlich auf deren bereits toxische Wirkung beim ersten Test zurückzuführen ist.

Tabelle 3-10: Ergebnisse der Testung ausgewählter Verbindungen auf Aktivität gegen Dengue-Viren

Verbindung	Konz. [ $\mu\text{M}$ ]	Virus-Inhibition (log-Stufen)	Verbindung	Konz. [ $\mu\text{M}$ ]	Virus-Inhibition (log-Stufen)
SH06	30	0	<b>SH29</b>	<b>1</b>	<b>4</b>
SH07	30	0	SH30	1	0
SH08	30	0	<b>SH53</b>	<b>10</b>	<b>1</b>
SH08a	30	0	<b>SH56</b>	<b>10</b>	<b>1</b>
SH12	30	0	SH58	30	0
SH13	30	0	SH59	10	0
SH23	30	0	<b>SH60</b>	<b>30</b>	<b>3</b>
SH24	30	1	SH65	3	0
SH25	30	0	SH69	30	0
SH26	30	0	SH73	10	0
SH27	30	0	SH74	3	0
SH28	1	Bei 1 $\mu\text{M}$ noch toxisch!	SH77	30	0

Eine Testung der Verbindungen **SH60** und **SH65** auf Hemmung der DEN-2 NS2B-NS3pro in Vero-Zellen ergab für **SH60** einen  $\text{EC}_{50}$ -Wert (mittlere effektive Konzentration bzw. mittlere effektive Dosis) von  $2.5 \pm 0.1 \mu\text{M}$  und einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert (mittlere inhibitorische Konzentration) von  $9.3 \pm 2.5 \mu\text{M}$ ; bei **SH65** lag sowohl der  $\text{EC}_{50}$ - als auch der  $\text{IC}_{50}$ -Wert jeweils über  $3 \mu\text{M}$ .

### 3.2.2 Anti-trypanosomale und Anti-leishmaniale Aktivität, Cytotoxizität an Makrophagen

Die Afrikanische Schlafkrankheit kommt in 36 afrikanischen Ländern unterhalb der Sahara vor und wird über Stiche durch die *Tsetse*-Fliege der Gattung *Glossina* auf Menschen oder Tiere übertragen. Bei den Erregern handelt es sich um *Trypanosomen*, welche der parasitären Gruppe der *Protozoen* zugeordnet werden. Anhand zweier verschiedener Parasiten lässt sich die Schlafkrankheit entsprechend in zwei verschiedene Formen unterteilen:

*Trypanosoma brucei gambiense* (>98% der berichteten Fälle) tritt in 24 west- und zentralafrikanischen Ländern auf und verursacht eine chronische Infektion, deren Symptome sich

erst Monate oder Jahre nach der Infektion bemerkbar machen können. Beim Eintreten der Symptome befindet sich der Infizierte häufig in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung, in welchem bereits das Zentralnervensystem in Mitleidenschaft gezogen ist.

*Trypanosoma brucei rhodesiense* (<2% der berichteten Fälle) betrifft 13 Länder im östlichen und südlichen Teil des afrikanischen Kontinentes und führt zu einer akuten Infektion. Diese Krankheitsform verläuft sehr schnell und befällt ebenfalls das Zentralnervensystem; die ersten Anzeichen treten bereits nach einigen Wochen bzw. Monaten auf.

Neben diesen zwei Hauptformen existieren noch zwei weitere Varianten der Schlafkrankheit: Zum Einen die in 21 lateinamerikanischen Ländern vorkommende, so genannte „Amerikanische Schlafkrankheit“, zum Anderen die Tier-Schlafkrankheit.

Der Krankheitsverlauf gliedert sich in zwei Phasen: In der ersten, so genannten „hämolympatischen“ Phase vermehren sich die Trypanosomen in subkutanen Geweben, im Blut und in der Lymphe; es kommt zu Fieberschüben, Kopf- und Gelenkschmerzen und Juckreiz. Bei der Therapie dieser ersten Krankheitsphase finden die Arzneistoffe Pentamidin und Suramin Anwendung.

In der zweiten, so genannten „neurologischen“ Phase überschreiten die Parasiten die Blut-Hirn-Schranke und befallen damit das Zentralnervensystem, was nunmehr eindeutige Symptome zur Folge hat: Psychologische Veränderungen in der Verhaltensweise, Verwirrtheit, sensorische Störungen, Koordinationsprobleme und Störungen des Schlafrhythmus. Für die Therapie dieser schweren Krankheitsphase eignen sich die Arzneistoffe Melarsoprol und Eflornithin, letzteres ggf. auch in Kombination mit Nifurtimox.

Unbehandelt führt die Afrikanische Schlafkrankheit zum Tod <sup>[109]</sup>.

Leishmaniose kommt weltweit in Ländern mit einer sehr armen Bevölkerung vor und wird über Stiche durch Sandfliegen, welche mit dem Protozoen-Erreger *Leishmania* infiziert sind, auf den Menschen übertragen. Die Entstehung und Ausbreitung dieser Erkrankung wird zusätzlich durch Mangelernährung, Bevölkerungswanderung, schlechte Behausung, Immunschwäche, Armut und bestimmte Umweltfaktoren (z.B. Abholzen von Wäldern, Bau von Dämmen und Städten) begünstigt. Pro Jahr wird die Anzahl neuer Fälle auf 1.3

Mio., davon 20.000-30.000 Todesfälle, geschätzt. Man unterscheidet drei Verlaufsformen der Leishmaniose:

*Viszerale Leishmaniose* äußert sich durch Fieberschübe, Gewichtsverlust, Vergrößerung von Milz und Leber sowie Anämie und führt unbehandelt zum Tod. Geschätzt wird eine Anzahl von 200.000 bis 400.000 neuer Krankheitsfälle pro Jahr, von denen mehr als 90% in Bangladesch, Brasilien, Äthiopien, Indien, Südsudan und Sudan auftreten.

*Kutane Leishmaniose* ist die häufigste aller Verlaufsformen (0.7-1.3 Mio. neue Fälle pro Jahr) und führt zur Bildung von Hautgeschwüren mit bleibenden Narben. Etwa 95% der Fälle kutaner Leishmaniose treten in den amerikanischen Kontinenten, im Mittelmeerraum, dem Mittleren Osten und Zentralasien auf. Mehr als zwei Drittel aller neuen Fälle betreffen die Länder Afghanistan, Algerien, Brasilien, Kolumbien, den Iran und Syrien.

*Mukokutane Leishmaniose* führt zu einer teilweisen oder vollständigen Zerstörung der Schleimhäute im Mund-, Nasen- und Rachenbereich; nahezu 90% der Fälle mukokutaner Leishmaniose kommen in Bolivien, Brasilien und Peru vor<sup>[110]</sup>.

Nach den SOPs (Standard Operating Procedures) des Sonderforschungsbereiches 630 („*Erkennung, Gewinnung und funktionale Analyse von Wirkstoffen gegen Infektionskrankheiten*“) wurde im Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg eine Auswahl an Phenylacrylsäureamiden auf Anti-Trypanosomale und Anti-Leishmaniale Aktivität sowie auf Cytotoxizität an der Maus-Makrophagen-Zelllinie J774.1 (Ergebnisse siehe **Tabelle 3-9**) getestet. Die Testung an Trypanosomen und Leishmanien wurde nach dem Prinzip des *Alamar Blue*<sup>®</sup>-Assays<sup>[91]</sup> durchgeführt.

Tabelle 3-11: Anti-trypanosomale und Anti-leishmaniale Aktivität einiger ausgewählter Phenylacrylsäureamide sowie deren Cytotoxizität an Makrophagen

<b>Verbindung</b>	<b><i>Trypanosoma brucei brucei</i> TC221 EC<sub>50</sub> [µM] (48 h)</b>	<b><i>Trypanosoma brucei brucei</i> TC221 EC<sub>50</sub> [µM] (72 h)</b>	<b><i>Leishmania major</i> EC<sub>50</sub> [µM]</b>	<b>Makrophagen J774.1 EC<sub>50</sub> [µM]</b>
SH06	1.00 ± 0.04	2.75 ± 0.62	>100	48.8
SH07	1.63 ± 0.30	3.44 ± 0.17	>100	45.3
SH08	34.15 ± 1.09	>40	>100	>100
SH08a	>40	>40	>100	>100
SH13	>40	>40	>100	>100
SH23	9.04 ± 1.07	17.65 ± 1.25	>100	>100
SH24	16.02 ± 0.74	18.16 ± 0.26	>100	>100
SH25	3.60 ± 0.23	8.25 ± 3.21	>100	>100
SH26	6.03 ± 0.40	14.94 ± 0.59	>100	>100
SH27	2.93 ± 0.52	3.89 ± 0.03	>100	>100
SH29	0.55 ± 0.06	0.72 ± 0.00	2.21	1.9
SH30	>40	>40	>100	>100

## 4 DISKUSSION DER ERGEBNISSE UND STRUKTUR- WIRKUNGS-BEZIEHUNGEN

Die in diesem Kapitel diskutierten Ergebnisse und Struktur-Wirkungs-Beziehungen basieren auf der in Enzym-Assays ermittelten Hemmung der synthetisierten Verbindungen. An der DEN-2 NS2B-NS3pro (**Kapitel 4.1**) wurden Verbindungen sämtlicher Substanzklassen getestet, einige Vertreter der Diarylthioether auch an der DEN-3 NS2B-NS3pro. Mit einigen ausgewählten Verbindungen erfolgte ferner ein Selektivitätstest auf andere Serin-Proteasen wie  $\alpha$ -Chymotrypsin und Trypsin (**Kapitel 4.2**). Eine Selektion aromatischer Carbonsäureamide aus der Substanzklasse der Phenylacrylsäure-Derivate – sowohl mit als auch ohne C=C-Doppelbindung – wurden zusätzlich auf Anti-Leishmaniale und Anti-Trypanosomale Aktivität sowie auf Cytotoxizität an Makrophagen getestet (**Kapitel 4.3 und 4.4**). Mit einigen Benzothiazolen und Diarylthioethern erfolgte eine direkte Testung an Dengue-Viren sowie an Makrophagen (**Kapitel 4.3**).

### 4.1 Hemmung der Dengue-Virus Typ 2 NS2B-NS3 Protease (DEN-2 NS2B-NS3pro) in enzymatischen Assays

#### 4.1.1 Phenylacrylsäureamide

**Verknüpfung von 4-Dimethylaminozimtsäure mit C-terminalen Estern verschiedener Aminosäuren.** In der ersten Untergruppe der Phenylacrylsäureamide, welche das erste Teilprojekt der vorliegenden Arbeit darstellen, wurde 4-Dimethylaminozimtsäure, d.h. unter Beibehaltung der linken Seite des Moleküls **TP38**, mit C-terminalen Estern verschiedener Aminosäuren verknüpft. Bei der Variation der rechten Molekülseite kamen Benzyl- und Methylester verschiedener Aminosäuren mit aliphatischen, aromatischen, polaren und basischen Seitenketten zum Einsatz.

**Variation der Aminosäure-Seitenkette unter Beibehaltung des C-terminalen Benzylesters.** Die Verbindungen **SH03**, **SH04**, **SH06** und **SH08** entstanden durch Verknüpfung von 4-Dimethylaminozimtsäure mit den Benzylestern der Aminosäuren *D*-Leucin, *L*-Isoleucin, *L*-Tryptophan und Glycin, wodurch folglich der Einfluss aliphatischer und aromatischer Seitenketten auf die Hemmeigenschaften dieser Substanzen verglichen

werden sollte. Die aliphatischen Aminosäure-Reste der Substanzen **SH03** und **SH04** unterscheiden sich zusätzlich in der Konfiguration ihres chiralen C-Atoms (**SH03** *R*, **SH04** *S*), während bei **SH08** die Seitenkette und damit die Chiralität völlig fehlen. Betrachtet man die Hemmwerte der vier Substanzen (siehe **Tabelle 4-1**), fällt auf, dass diese sich praktisch nicht unterscheiden, was einen ersten Hinweis darauf gibt, dass die Hemmeigenschaften der Amide von 4-Dimethylaminozimtsäure weder von der Aminosäure-Seitenkette noch von der Stereochemie, d.h. der Konfiguration des chiralen C-Atoms abhängen.

Tabelle 4-1: Einfluss der Aminosäure-Seitenkette unter Beibehaltung des C-terminalen Benzylesters

R	Hemmung [50 $\mu$ M]	R	Hemmung [50 $\mu$ M]
 SH03	54 %	 SH06	44 %
 SH04	47 %	H SH08	43 %

**Variation der Aminosäure-Konfiguration unter Beibehaltung des C-terminalen Benzylesters.** Um den Einfluss der Konfiguration des chiralen C-Atoms auf die Hemmeigenschaften genauer vergleichen zu können, wurden hier die Benzylester der Aminosäuren *D*-Alanin, *L*-Alanin, *D*-Valin und *L*-Valin mit 4-Dimethylaminozimtsäure verknüpft, wodurch jeweils die Enantiomerenpaare **SH01/SH07** (*R/S*) und **SH02/SH05** (*R/S*) entstanden. Die Tatsache, dass sich alle Hemmwerte dieser vier Verbindungen ebenfalls sehr stark ähneln (siehe **Tabelle 4-2**), bestätigt nahezu, dass die Hemmeigenschaften der



Amide von 4-Dimethylaminozimtsäure weder von der Seitenkette noch von der Konfiguration des chiralen C-Atoms abhängen. Die Substanz **SH05** wird als „bester“ Inhibitor innerhalb der ersten Untergruppe der Zimtsäureamide als Ausgangssubstanz für die zweite Untergruppe gewählt, in welcher die 4-Dimethylaminozimtsäure (unter Beibehaltung des *L*-Valinbenzylesters) durch andere aromatische Carbonsäuren ausgetauscht wird.

Tabelle 4-2: Einfluss der Aminosäure-Konfiguration unter Beibehaltung des C-terminalen Benzylesters

R	Hemmung [50 µM]	R	Hemmung [50 µM]
 SH01	47 %	 SH07	50 %
 SH02	49 %	 SH05	52 %

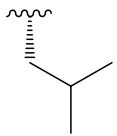
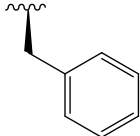
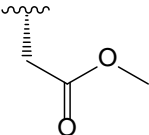
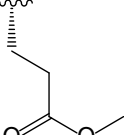
**Austausch des C-terminalen Esters unter Beibehaltung der *S*-konfigurierten Aminosäure-Seitenkette.** Die Verbindungen **SH07/SH10** bzw. **SH05/SH11** unterscheiden sich jeweils durch ihre C-terminalen Ester-Gruppen, während die aliphatischen Seitenketten der Aminosäuren unverändert bleiben. An den Hemmwerten dieser vier Substanzen (siehe **Tabelle 4-3**) fällt auf, dass die Methylester **SH10** und **SH11** eine etwas schwächere Aktivität besitzen als die Benzylester **SH07** und **SH05**. Diese Eigenschaft könnte auf stärkere lipophile bzw. aromatische  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen des Benzylesters zurückgeführt werden.

Tabelle 4-3: Einfluss des C-terminalen Esters unter Beibehaltung der *S*-konfigurierten Aminosäure-Seitenkette

R	Hemmung [50 $\mu$ M]	R	Hemmung [50 $\mu$ M]
 SH07	50 %	 SH10	30 %
 SH05	52 %	 SH11	38 %

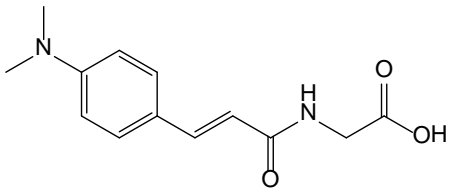
**Variation der Aminosäure-Seitenkette unter Beibehaltung des C-terminalen Methyl-esters.** Die Verbindungen **SH12**, **SH13**, **SH14** und **SH15** unterscheiden sich jeweils durch ihre Seitenketten (*L*-Leucin  $\rightarrow$  aliphatisch, *D*-Phenylalanin  $\rightarrow$  aromatisch, *L*-Asparaginsäuremethylester bzw. *L*-Glutaminsäuremethylester  $\rightarrow$  aliphatisch mit polarer Estergruppe), während die C-terminalen Methyl-ester unverändert bleiben. Unter den Hemm-werten dieser vier Substanzen fällt lediglich eine etwas schwächere Aktivität von **SH15** auf, insgesamt unterscheiden sich aber auch hier die Werte kaum (siehe **Tabelle 4-4**). Hiermit liegt nun die Vermutung immer näher, dass innerhalb der ersten Untergruppe, d.h. unter den Amid- der 4-Dimethylaminozimtsäure, lediglich die linke Seite der Moleküle (4-Dimethylaminozimtsäure) für die Hemmeigenschaften verantwortlich ist, die rechte Seite hingegen die Hemmung praktisch nicht beeinflusst.

Tabelle 4-4: Einfluss der Aminosäure-Seitenkette unter Beibehaltung des C-terminalen Methylesters

R	Hemmung [50 $\mu$ M]	R	Hemmung [50 $\mu$ M]
 SH12	54 %	 SH13	45 %
 SH14	51 %	 SH15	35 %

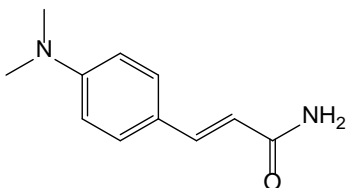
**Einführung einer Carboxyl-Gruppe durch alkalische Hydrolyse des Benzylesters von SH08.** Die Verbindung **SH08a** (a = „acid“) entstand durch Entfernung der C-terminalen Benzyl-Schutzgruppe durch alkalische Hydrolyse mit Lithiumhydroxid und anschließendes Ansäuern der Substanz **SH08**. Die Einführung einer Säure-Gruppe erhöht hier die Polarität sowie die Wasserlöslichkeit von **SH08a**. Im Vergleich zu den Hemmeigenschaften von **SH08** (43 % bei 50  $\mu$ M, siehe **Tabelle 4-1**) führt sie jedoch auch im Fall von **SH08a** nicht zu einer erhöhten Aktivität (siehe **Tabelle 4-5**).

Tabelle 4-5: Einfluss der Säure-Gruppe nach Entfernung des C-terminalen Benzylesters von SH08

SH08a	Hemmung [50 $\mu$ M]
	47 %

**Austausch des Aminosäure-Esters durch eine unsubstituierte Amid-Gruppe.** Die Verbindung **SH30** entstand durch Überführung der 4-Dimethylaminozimtsäure in ein Säurechlorid und dessen anschließende Umsetzung *in situ* mit konzentrierter wässriger Ammoniak-Lösung, d.h. hier wird vollständig auf die Substitution des Amid-Stickstoff-Atoms verzichtet, um die bereits vermutete Unabhängigkeit der Hemmeigenschaften von der Substitution der rechten Molekülseite endgültig bestätigen zu können. Betrachtet man den für **SH30** ermittelten Hemmwert, ist dies hier tatsächlich der Fall (siehe **Tabelle 4-6**).

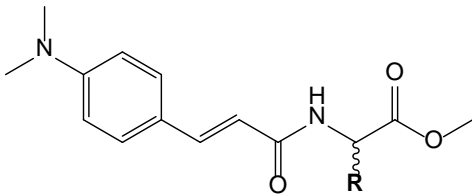
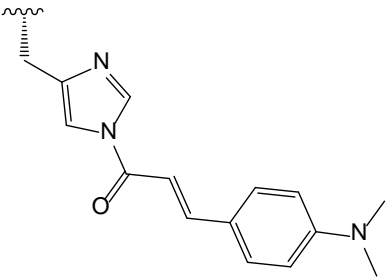
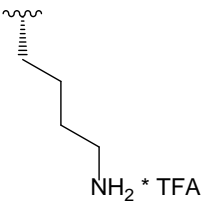
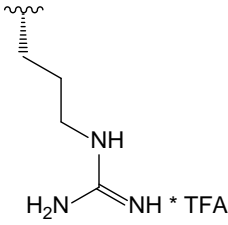
Tabelle 4-6: Einfluss der unsubstituierten Amid-Gruppe anstelle eines Aminosäure-Esters

SH30	Hemmung [50 $\mu$ M]
	53 %

**Verknüpfung von 4-Dimethylaminozimtsäure mit Methylestern basischer Aminosäuren.** Zum Abschluss der ersten Untergruppe der Phenylacrylsäureamide wurde 4-Dimethylaminozimtsäure mit den Methylestern basischer Aminosäuren (*L*-Histidin, *L*-Lysin, *L*-Arginin) verknüpft, um eventuell eine Adressierung der S1- oder S2-Bindetasche der DEN-2 NS2B-NS3pro zu erreichen. **SH37** besaß zunächst eine Boc-Schutzgruppe, **SH38** eine Pbf-Schutzgruppe in der Seitenkette, welche im nächsten Syntheseschritt mit Trifluoressigsäure abgespalten wurden. Die Verbindung **SH36B** entsteht durch zweifache Acylierung durch 4-Dimethylaminozimtsäure, d.h. einmal an der  $\alpha$ -Aminogruppe (wie

gewünscht) sowie an der NH-Gruppe des Imidazol-Rings in der Seitenkette. **SH36B** und **SH37a** zeigen keinerlei Hemmeigenschaften. Bei **SH38a** wird *L*-Arginin gewählt, da diese Aminosäure in dem beim fluorimetrischen Enzym-Assay verwendeten Substrat (Boc-Gly-Arg-Arg-AMC) zweifach vorkommt. **SH38a** soll damit sowohl die 4-Dimethylaminozimtsäure als Partialstruktur enthalten sowie durch sein Arginin dem Substrat ähneln, zeigt aber ebenfalls nur eine schwache Hemmung (siehe **Tabelle 4-7**).

Tabelle 4-7: Einfluss der Methylester von Aminosäuren mit basischer Seitenkette

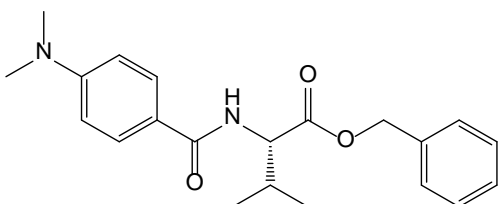
			
<b>R</b>	<b>Hemmung [50 µM]</b>		
 <p style="text-align: center;">SH36</p>	3 %		
<b>R</b>	<b>Hemmung [50 µM]</b>	<b>R</b>	<b>Hemmung [50 µM]</b>
 <p style="text-align: center;">SH37a</p>	4 %	 <p style="text-align: center;">SH38a</p>	29 %

**Verknüpfung anderer aromatischer Carbonsäuren mit *L*-Valinbenzylester.** Bei der Synthese der zweiten Untergruppe der Phenylacrylsäureamide wurden anstelle der 4-Dimethylaminozimtsäure andere aromatische Carbonsäuren unter Beibehaltung der rechten Molekülseite von **SH05** (*L*-Valinbenzylester) verwendet. Bei der Variation der linken

Molekülseite kamen hier überwiegend Carbonsäuren mit C=C-Doppelbindungen (Phenylacrylsäure-Derivate) zum Einsatz.

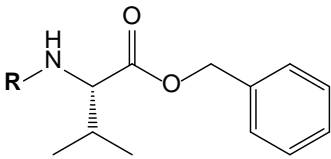
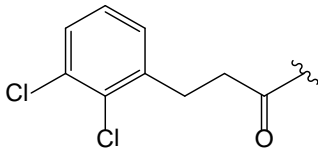
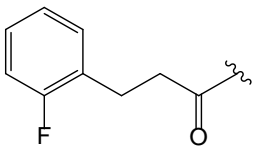
**Beibehaltung der 4-Dimethylaminophenyl-Funktion (ohne olefinische C=C-Partialstruktur).** Bei der Synthese der Verbindung **SH23** wurde 4-Dimethylaminobenzoessäure anstelle der in der ersten Untergruppe verwendeten 4-Dimethylaminobenzoessäure mit *L*-Valinbenzylester verknüpft, wodurch die C=C-Doppelbindung zwischen dem Phenyl-Ring und der Carbonyl-Gruppe der Amid-Funktion fehlt. **SH23** zeigt keine Aktivität am Enzym (siehe **Tabelle 4-8**), was auf eine Relevanz der olefinischen Partialstruktur bei 4-Dimethylaminosäure hindeutet. Die 4-Dimethylaminophenyl-Funktion ist demnach allein nicht ausreichend.

Tabelle 4-8: Einfluss des Fehlens der olefinischen Partialstruktur

SH23	Hemmung [50 $\mu$ M]
	11 %

**Verknüpfung halogener Phenylpropansäure-Derivate mit *L*-Valinbenzylester.** Die Verbindungen **SH24** und **SH25** entstanden durch Verknüpfung halogener Phenylpropansäuren mit *L*-Valinbenzylester, wodurch zwar zwei C-Atome zwischen dem Phenyl-Ring und der Carbonyl-Gruppe der Amid-Funktion vorhanden sind, jedoch ohne Doppelbindung. Durch die Halogene erhöht sich unter anderem die Lipophilie der Substanzen. Die sehr schwache Aktivität am Enzym (siehe **Tabelle 4-9**) untermauert die Vermutung, dass die C=C-Doppelbindung für die Hemmung relevant ist.

Tabelle 4-9: Einfluss halogener Phenylpropansäure-Reste ohne olefinische Partialstruktur

			
R	Hemmung [50 µM]	R	Hemmung [50 µM]
 SH24	20 %	 SH25	18 %

**Variation der Substituenten am aromatischen Rest der Phenylacrylsäure-Partialstruktur.** Bei der Synthese von **SH26**, **SH27** und **SH33** wurden Derivate der Phenylacrylsäure verwendet, die am aromatischen Rest andere lipophile Substituenten als die 4-Dimethylaminozimtsäure (z.B. Fluor-Atome, Methoxy-Gruppen) aufweisen. Die Tatsache, dass diese drei Verbindungen keine signifikante Hemmung des Enzyms zeigen (siehe **Tabelle 4-10**), lässt vermuten, dass auch die C=C-Doppelbindung allein für die Hemmeigenschaften nicht ausreicht und demnach zusammen mit der 4-Dimethylaminophenyl-Funktion vorliegen muss (vgl. erste Untergruppe der Phenylacrylsäureamide).

Tabelle 4-10: Einfluss verschiedener Substituenten am aromatischen Rest der Phenylacrylsäure-Partialstruktur

R		Hemmung [50 $\mu$ M]	R		Hemmung [50 $\mu$ M]
 SH26		23 %	 SH27		13 %
R		Hemmung [50 $\mu$ M]			
 SH33		4 %			

**Einführung einer Methyl-Gruppe am olefinischen  $\alpha$ -C-Atom der Phenylacrylsäure-Partialstruktur.** Die Einführung einer Methyl-Gruppe in  $\alpha$ -Position zur Carbonyl-Gruppe der Phenylacrylsäure und die damit verbundene Erhöhung der Lipophilie bei **SH34** bewirkt ebenfalls keine Hemmung des Enzyms (siehe **Tabelle 4-11**).

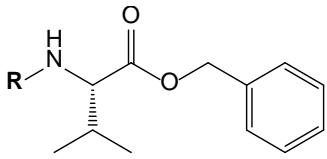
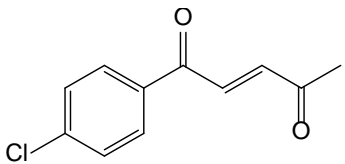
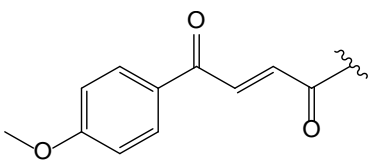
Tabelle 4-11: Einfluss einer Methyl-Gruppe am olefinischen  $\alpha$ -C-Atom der Phenylacrylsäure-Partialstruktur

SH34	Hemmung [50 $\mu$ M]
	11 %



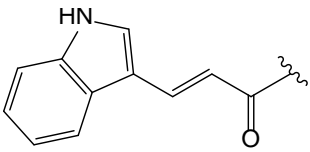
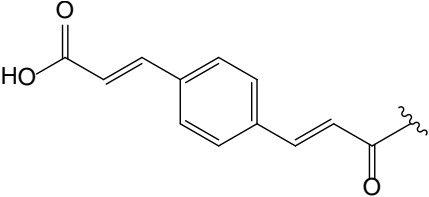
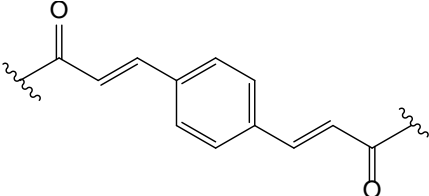
**Einführung einer  $\gamma$ -Carbonyl-Gruppe an der olefinischen Partialstruktur.** Die Verbindungen **SH28** und **SH29** weisen eine Fumarsäure-Partialstruktur auf, d.h. die C=C-Doppelbindung ist direkt von zwei elektronenziehenden Carbonyl-Gruppen umgeben. Im Enzym-Assay bewirkt diese strukturelle Erweiterung jedoch keine Verbesserung der Hemmwirkung (siehe **Tabelle 4-12**).

Tabelle 4-12: Einfluss einer  $\gamma$ -Carbonyl-Gruppe an der olefinischen Partialstruktur

			
R	Hemmung [50 $\mu$ M]	R	Hemmung [50 $\mu$ M]
 SH28	19 %	 SH29	21 %

**Variation des aromatischen Rests an der Acrylsäure-Partialstruktur.** Die Verbindungen **SH32**, **SH35A** und **SH35B** weisen alle das für Phenylacrylsäure-Derivate charakteristische Michael-System auf, jedoch größere aromatische Reste anstelle der 4-Dimethylaminophenyl-Partialstruktur. **SH35A** entsteht als Nebenprodukt bei der Synthese von **SH35B**; beide Verbindungen verfügen über zwei Michael-Systeme. Während **SH32** und **SH35A** keine oder nur sehr schwache Hemmeigenschaften besitzen, entspricht der Hemmwert von **SH35B** nahezu dem von **SH05**, einem der „besten“ Inhibitoren der ersten Untergruppe (siehe **Tabelle 4-13**). **SH35B** stellt damit den „besten“ Inhibitor der zweiten Untergruppe dar, was vermutlich auf verstärkte lipophile bzw. aromatische  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen durch die zwei *L*-Valinbenzylester-Reste zurückzuführen ist.

Tabelle 4-13: Einfluss verschiedener aromatischer Reste an der Acrylsäure-Partialstruktur

R	Hemmung [50 $\mu$ M]
 <p data-bbox="480 790 544 819">SH32</p>	30 %
 <p data-bbox="472 1070 552 1099">SH35A</p>	21 %
 <p data-bbox="472 1350 552 1379">SH35B</p>	61 %

Vergleicht man die prozentualen Hemmwerte sämtlicher Phenylacrylsäureamide beider Untergruppen, fällt auf, dass nur die Verbindungen der ersten Untergruppe, d.h. die Amide der 4-Dimethylaminozimtsäure (mit Ausnahme der Verbindungen **SH36**, **SH37a** und **SH38a** mit basischen Seitenketten) überhaupt schwache Hemmeigenschaften bei der Testung an der DEN-2 NS2B-NS3pro besitzen (siehe **Tabelle 4-14**). Dabei spielt offensichtlich nur die linke Molekülseite, d.h. der 4-Dimethylaminozimtsäure-Rest, eine Rolle, während die rechte Molekülseite alles in allem irrelevant scheint. Fehlt entweder die 4-Dimethylaminophenyl-Gruppe oder die C=C-Doppelbindung, so verschlechtern sich auch deutlich die Hemmeigenschaften, wie es bei den Verbindungen der zweiten Untergruppe der Fall ist. In der zweiten Untergruppe zeigt lediglich eine Verbindung (**SH35B**) eine

schwache Hemmung des Enzyms, welche den für die erste Untergruppe bestimmten Werten ähnelt (siehe **Tabelle 4-15**).

Tabelle 4-14: Hemmwerte der Amide der 4-Dimethylaminozimtsäure

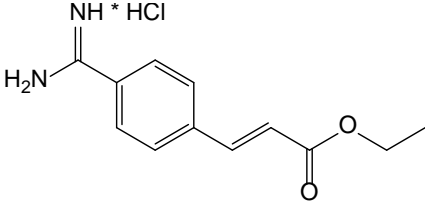
Verbindung	% Hemmung [50 µM]	Verbindung	% Hemmung [50 µM]
TP38	54	SH10	30
SH01	47	SH11	38
SH02	49	SH12	54
SH03	54	SH13	45
SH04	47	SH14	51
SH05	52	SH15	35
SH06	44	SH30	53
SH07	50	SH36	3
SH08	43	SH37a	4
SH08a	47	SH38a	29

Tabelle 4-15: Hemmwerte anderer Carbonsäureamide des *L*-Valinbenzylesters

Verbindung	% Hemmung [50 µM]	Verbindung	% Hemmung [50 µM]
SH23	11	SH29	21
SH24	20	SH32	30
SH25	18	SH33	4
SH26	23	SH34	11
SH27	13	SH35A	21
SH28	19	<b>SH35B</b>	<b>61</b>

**4-Amidinozimtsäureethylester-Hydrochlorid.** Als letzter Vertreter der Phenylacrylsäure-Derivate wurde die Substanz SH45 synthetisiert, welche anstelle der praktisch nicht basischen N,N'-Dimethylamino-Funktion am Aromaten in *para*-Stellung zum Michael-System eine basische Amidin-Funktion enthält. Letztere weist eine strukturelle Ähnlichkeit mit den ebenfalls basischen Guanidin-Funktionen der beiden Arginin-Seitenketten des im Enzym-Assay verwendeten Substrates (Boc-Gly-Arg-Arg-AMC) auf, bewirkt aber im Falle der Substanz SH45 keine Enzymhemmung (siehe **Tabelle 4-16**).

Tabelle 4-16: Einfluss einer basischen Amidin-Funktion in *para*-Stellung zum Michael-System

SH45	Hemmung [50 $\mu$ M]
	2 %

Bei den Phenylacrylsäure-Derivaten stellt sich die Frage, ob die schwache Hemmung der DEN-2 NS2B-NS3pro entweder generell von der C=C-Doppelbindung, welche ein relativ starres Molekülgerüst bewirkt, ausgeht oder auf der Reaktion eines Nucleophils mit der C=C-Doppelbindung, welche durch die benachbarte Carbonyl-Gruppe aktiviert ist, beruht. Da erstens die inhibitorisch schwach wirksamen Vertreter dieser Substanzklasse die DEN-2 NS2B-NS3pro nicht-kompetitiv hemmen, zweitens deren Bindungsstelle am Enzym nicht festgestellt und drittens die schwache Hemmung durch weitere Derivatisierungen nicht verbessert werden konnte, wurde dieser Fragestellung in der vorliegenden Arbeit nicht weiter nachgegangen und damit dieses Teilprojekt nicht weiter verfolgt.

#### 4.1.2 Benzothiazole und Diarylthioether

**Hydroxy- und carboxy-substituierte Benzothiazole mit Diarylthioether-Funktion und *p*-Trifluormethyl-phenyl-Rest.** Ausgehend von den bereits in **Kapitel 1.4** genannten Verbindungen **RN18** und **FM47** bestand das Ziel des zweiten Teilprojektes der vorliegenden Arbeit darin, nicht-peptidische Inhibitoren der DEN-2 NS2B-NS3pro zu synthetisieren, deren Grundgerüst ein Benzamid mit hydroxy- und carboxy-substituierten 2-Aminobenzothiazolen als Amin-Komponente darstellt; in *ortho*- bzw. *para*-Stellung zur Carbonyl-Gruppe des Benzamids soll sich jeweils ein *p*-Trifluormethyl-phenyl-thioether befinden. Das Substitutionsmuster der 2-Aminobenzothiazol-Bausteine wurde nach zwei wesentlichen Kriterien gewählt: Zum Einen anhand der Möglichkeiten, ob und welche der methoxy-geschützten 2-Aminobenzothiazole als Vorstufen dieser Bausteine entweder kommerziell zu erwerben oder durch eigene Synthese darstellbar sind, zum Anderen durch zwei Molecular Docking-Experimente mit der Zielverbindung **SH65** an der DEN-3 NS2B-

NS3pro unter Verwendung des Computer-Programmes *LeadIT*<sup>®</sup> (Version 2.1.3). Aufgrund der Datenlage war zuerst nicht eindeutig, ob **SH65** die Protease kompetitiv oder nicht-kompetitiv hemmt, so dass Bindemodi sowohl im aktiven Zentrum (erster Bindemodus) als auch außerhalb (zweiter Bindemodus) berechnet wurden. Als Target diente in beiden Fällen die Röntgen-Kristallstruktur der DEN-3 NS2B-NS3pro (PDB-Code: **3UII**), welche laut Literatur die aktive Konformation der Dengue-Virus-Protease darstellt <sup>[46,80]</sup>. Eine durch die Forschungsgruppe Chandramouli *et al.* veröffentlichte Aminosäure-Sequenz der NS2B-NS3-Proteasen aller vier Virus-Serotypen (DEN-1-DEN-4) veranschaulicht, dass nahezu sämtliche, in dem ersten Bindemodus an der Bindung des Inhibitors **SH65** beteiligten Aminosäuren (Trp50, His51, Gly133, Thr134, Ser135, Tyr150, Gly153 und Tyr161) in den Proteasen aller vier Serotypen enthalten sind; eine Ausnahme bildet Thr83 (nur DEN-1 und DEN-3). Letzteres befindet sich innerhalb der Sequenz des NS2B-Cofaktors, während alle übrigen hier genannten Aminosäuren der NS3-Domäne angehören. Zu beachten ist, dass sowohl der NS2B-Cofaktor als auch die NS3-Domäne an Position 82 die Aminosäure Glycin besitzt <sup>[14]</sup>.

Die mithilfe des ersten Docking-Experimentes vorhergesagten Wechselwirkungen sollen jedoch an dieser Stelle nicht weiter diskutiert werden, da bei **SH65** laut Ergebnisse der Enzym-Assays kein kompetitiver Bindungsmodus an der Dengue-Virus-Protease stattfinden kann.

Mithilfe eines zweiten, von Hongmei Wu (Arbeitskreis Prof. Dr. Tanja Schirmeister, Institut für Pharmazie und Biochemie, Universität Mainz) durchgeführten Docking-Experimentes ein anderer möglicher Bindungsmodus für den Inhibitor **SH65** vorgeschlagen. Als Grundlage für dieses Experiment diente eine im Jahr 2008 veröffentlichte Docking-Studie, in welcher ein allosterischer Bindungsmodus mit Struktur-Wirkungs-Beziehungen für sechs verschiedene Pflanzeninhaltsstoffe aus *Boesenbergia rotunda* (L.) an der DEN-2 NS2B-NS3pro, vor allem das im **Kapitel 1.3.2** bereits aufgeführte Pinostrobin, analysiert wurde <sup>[82]</sup>. Letzteres hatte sich experimentell bereits als nicht-kompetitiver Inhibitor erwiesen <sup>[43]</sup>.

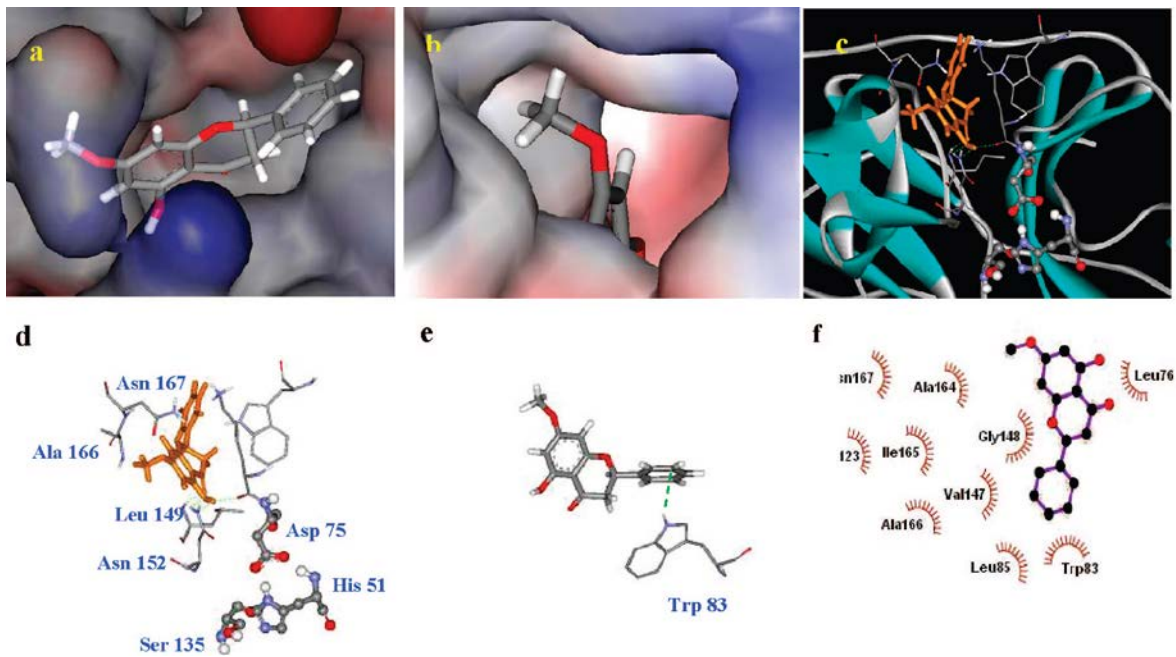


Abbildung 4-1: Bindungsmodus von Pinostrobin <sup>[82]</sup> (a) Oberflächendarstellung von Pinostrobin an der Bindungsstelle (b) Betrachtung des Pinostrobins an der Bindungsstelle aus einem anderen Winkel (c) Darstellung des Pinostrobins (orange) an der Bindungsstelle der DEN-2-Protease (d) Vereinfachte Darstellung des Pinostrobins und dessen Wechselwirkungen mit den Aminosäuren der Umgebung (e) Nicht-klassische H-Brückenbindung zwischen Trp83 und dem Phenylring B des Pinostrobins (f) Schematische 2D-Darstellung der Aminosäure-Reste an der Bindungsstelle, die hydrophobe Wechselwirkungen mit Pinostrobin eingehen. Copyright eingeholt.

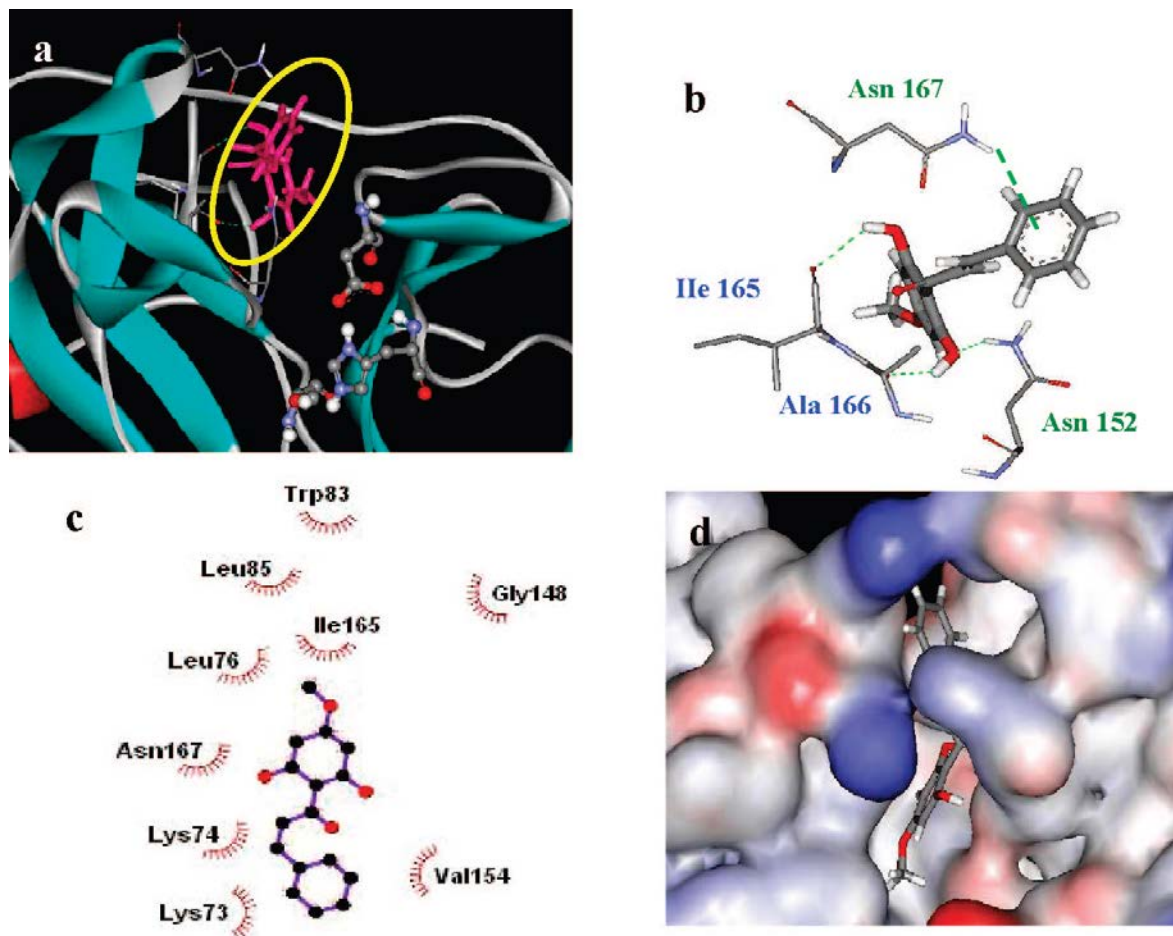


Abbildung 4-2: Bindungsmodus von Pinostrobin <sup>[82]</sup> (a) Darstellung des Pinostrobin-Chalcons (rosa) an der Bindungsstelle der DEN-2-Protease (b) Vereinfachte Darstellung des Pinostrobin-Chalcons und dessen Wechselwirkungen mit den Aminosäuren der Umgebung (c) Schematische 2D-Darstellung der Aminosäuren der Bindungsstelle, die hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Pinostrobin-Chalcon eingehen (d) Oberflächendarstellung des Pinostrobin-Chalcons an der Bindungsstelle (Nicht-Ligand-Rest an hydrophobem Kontakt beteiligt). Copyright eingeholt.

Laut Docking-Studie (**Abbildung 4-1** und **Abbildung 4-2**) wird eine Wasserstoff-Brückenbindung zwischen seiner phenolischen Hydroxy-Gruppe und der Carbonyl-Gruppe von Lys74 der DEN-2 NS2B-NS3pro gebildet, mit der Annahme, dass diese vermutlich eine Änderung der Konformation im Bereich der katalytischen Triade bzw. auf die direkt benachbarte Aminosäure Asp75 bewirkt haben könnte, welche wiederum eine Unterbrechung des Elektronentransfer-Prozesses, welcher für die Bindung des Substrates im aktiven Zentrum erforderlich wäre, zur Folge hätte. Die phenolische Hydroxy-Gruppe könnte damit ein wichtiges Pharmakophor darstellen <sup>[82]</sup>.

Das zweite Docking-Experiment (**Abbildung 4-3**, **Abbildung 4-4**, **Abbildung 4-5**) wurde ebenfalls mithilfe des Computer-Programmes *LeadIT*<sup>®</sup>, jedoch mit der neueren Version 2.1.6, durchgeführt. Als Target diente auch hier die Röntgen-Kristallstruktur der DEN-3 NS2B-NS3pro (PDB-Code: **3u1i**).

Das zweite Docking-Experiment für **SH65** schlägt fünf mögliche Wasserstoff-Brückenbindungen vor: Den kürzesten Abstand von 1.44 Å besitzt die H-Brücke zwischen der  $\gamma$ -Amid-Funktion in der Seitenkette von Asn152 und der Hydroxy-Gruppe am C-Atom 5 des Benzothiazols; die CONH<sub>2</sub>-Gruppe fungiert dabei als H-Brücken-Donor. Die Carbonyl-O-Atome von Lys73 und Lys74 interagieren als H-Brücken-Akzeptoren jeweils mit einer der beiden Hydroxy-Gruppen am Benzothiazol, wobei der Abstand Lys73 → C6-OH = 1.82 Å und Lys74 → C5-OH = 2.24 Å beträgt; letztere H-Brückenbindung besitzt damit von allen fünf den größten Abstand. Zwei weitere H-Brücken bildet Gln167, einerseits mit seiner  $\alpha$ -NH-Gruppe als H-Brücken-Donor und dem N-Atom 3 des Benzothiazols (1.85 Å), andererseits mit seinem C1-Carbonyl-O-Atom als H-Brücken-Akzeptor und der NH-Gruppe des Benzamids von **SH65** (2.03 Å). Ein Fehlen der OH-Gruppe am C-Atom 5 des Benzothiazols (vgl. Substanz **SH67**) hätte einen Verlust der H-Brücke zu den Aminosäuren Asn152 und Lys74, ein Fehlen der OH-Gruppe am C-Atom 6 des Benzothiazols einen Verlust der H-Brücke zu Lys73 zur Folge.

Zusätzlich zu den bisher beschriebenen Wasserstoff-Brückenbindungen werden in dem zweiten Docking-Experiment sechs mögliche hydrophobe Wechselwirkungen vorhergesagt, die der Inhibitor **SH65** mit Methyl-Gruppen in den Seitenketten aliphatischer Aminosäuren eingehen könnte. Von diesen Interaktionen gehen drei von dem Benzothiazol-Rest, die anderen drei von dem *p*-Trifluormethyl-phenyl-Rest aus. Die Abstände der hydrophoben Wechselwirkungen betragen: Benzothiazol → Ala166 = 2.09 Å < *p*-Trifluormethyl-phenyl → Thr120 = 3.88 Å < *p*-Trifluormethyl-phenyl → Ile123 = 3.97 Å < Benzothiazol → Ile123 = 4.67 Å < *p*-Trifluormethyl-phenyl → Thr118 = 5.03 Å < Benzothiazol → Val78 = 5.36 Å. Die **Abbildungen 4-5** und **4-6** zeigen den postulierten Bindemodus und die aufgeführten Interaktionen.



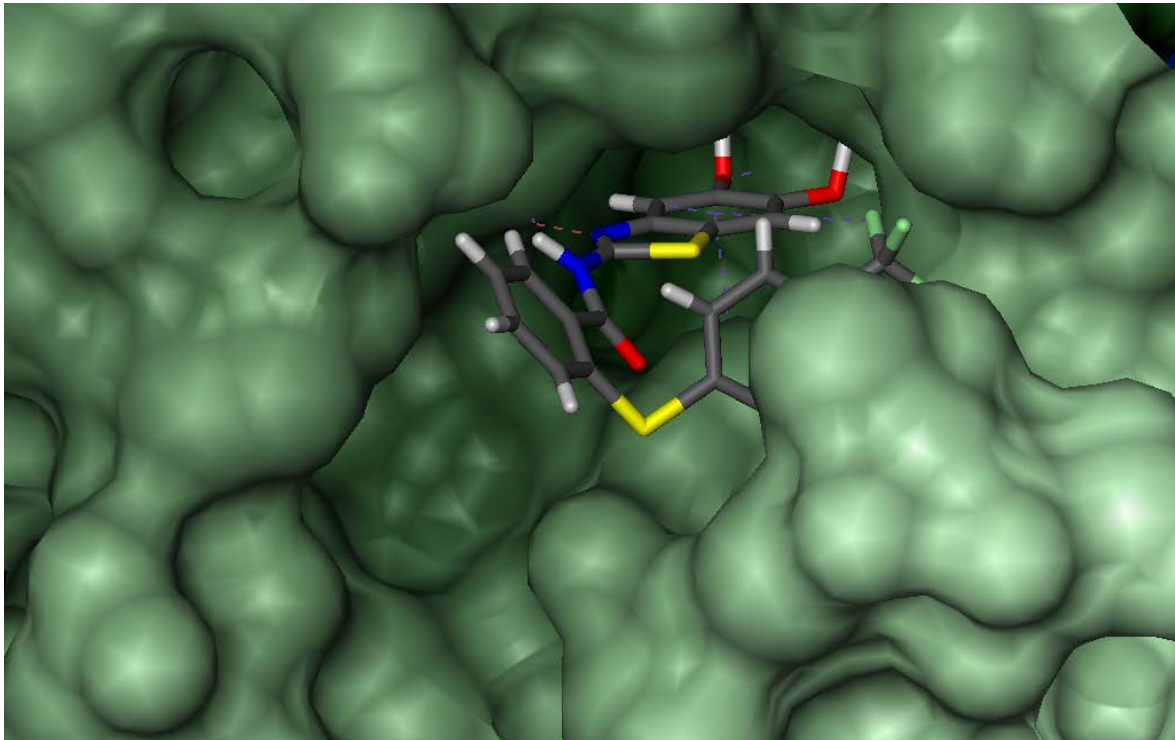


Abbildung 4-3: Der Inhibitor **SH65** im nicht-kompetitiven Bindungsmodus an der DEN-3 NS2B-NS3pro (3U1I)

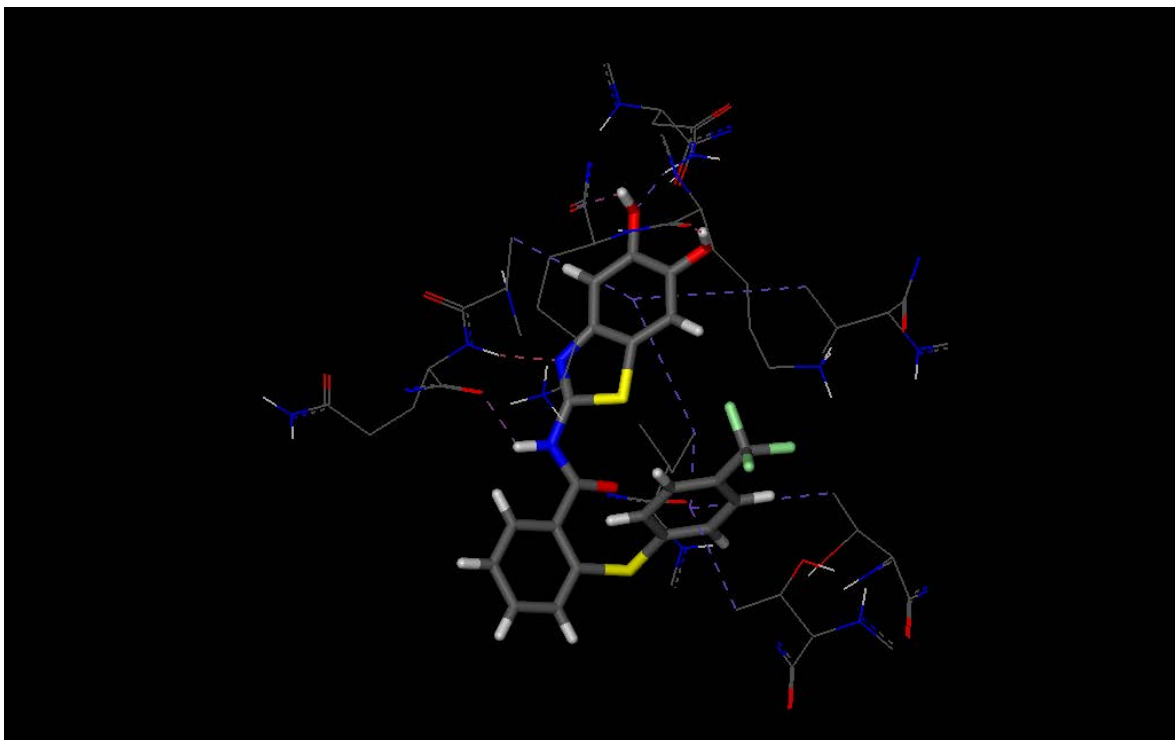


Abbildung 4-4: Wechselwirkungen des Inhibitors **SH65** mit den Aminosäuren der DEN-3 NS2B-NS3pro (3U1I) im nicht-kompetitiven Bindungsmodus (dreidimensionale Darstellung)

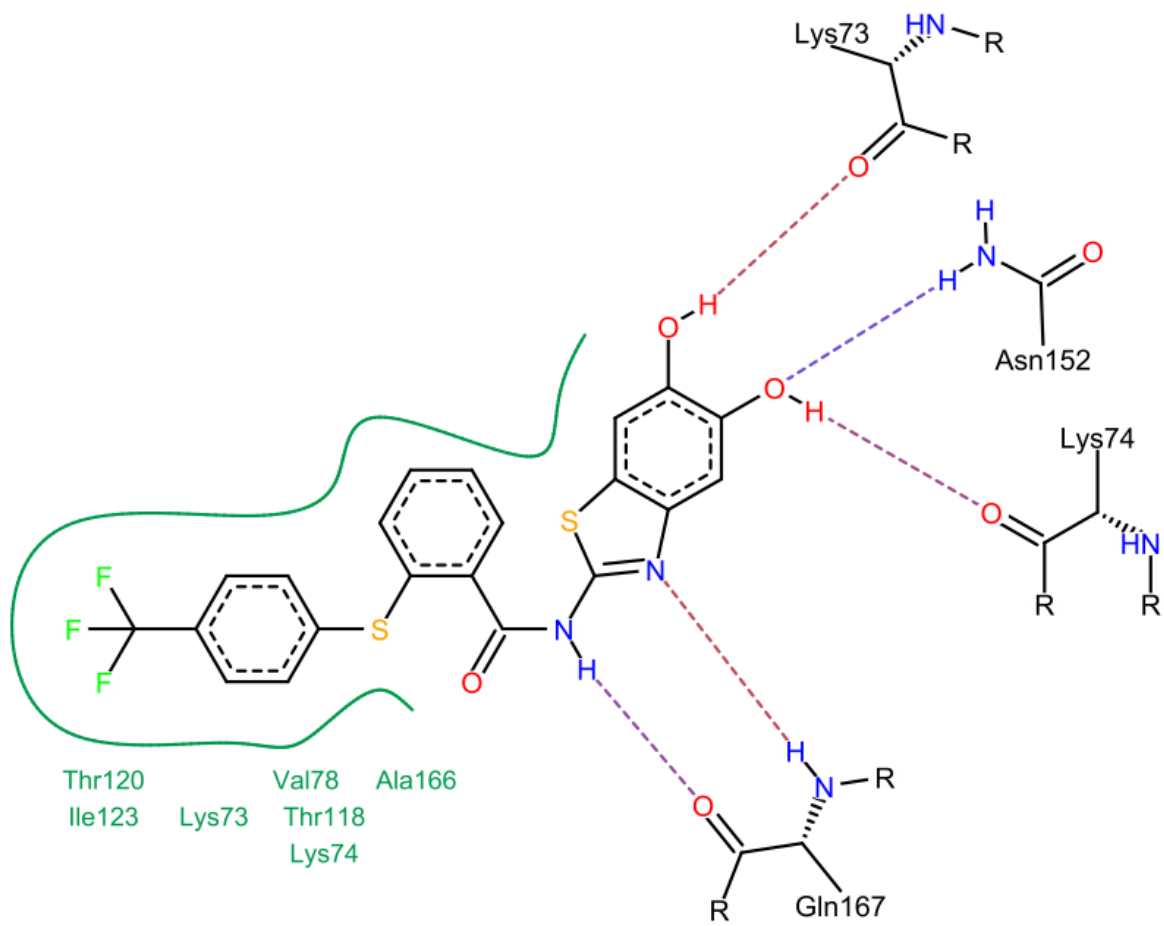
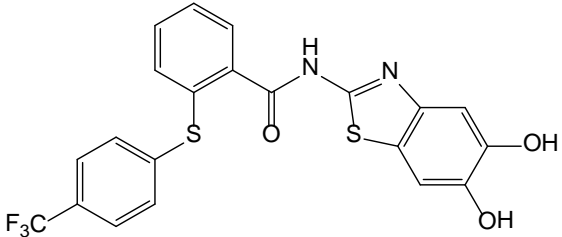
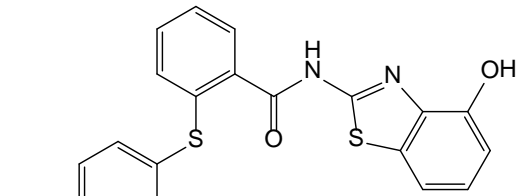
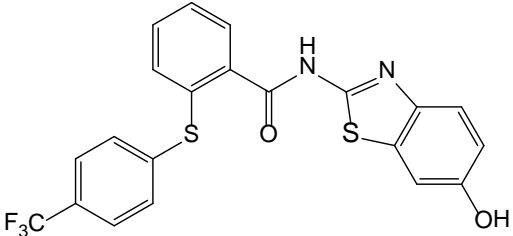


Abbildung 4-5: Wechselwirkungen des Inhibitors **SH65** mit den Aminosäuren der DEN-3 NS2B-NS3pro (3U1I) im nicht-kompetitiven Bindungsmodus (zweidimensionale Darstellung)

Die im Folgenden aufgeführten Struktur-Wirkungs-Beziehungen sowie deren Vergleich basieren auf den mithilfe von Enzym-Assays experimentell ermittelten Hemmwirkungen der Substanzen auf die DEN-2 NS2B-NS3pro und in einigen Fällen auch auf die DEN-3 NS2B-NS3pro. Die Diarylthioether mit Hydroxy-substituierten 2-Aminobenzothiazol-Resten wurden bei zwei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (50 und 100  $\mu\text{M}$ ) an der DEN-2 NS2B-NS3pro getestet (Ergebnisse siehe **Tabelle 4-17**).

Tabelle 4-17: Hemmeigenschaften hydroxy-substituierter Benzothiazole mit Diarylthioether-Funktion in *ortho*-Stellung zum Benzamid

Verbindung	Hemmung [50 $\mu\text{M}$ ]	Hemmung [100 $\mu\text{M}$ ]
 <p>SH65</p>	90 %	96 %
 <p>SH66</p>	33 %	68 %
 <p>SH67</p>	14 %	31 %

Von diesen drei Verbindungen besaß **SH65** die stärkste inhibitorische Wirkung. **SH66** zeigte eine deutlich schlechtere und **SH67** eine wiederum schlechtere Hemmung. Da sich diese drei Verbindungen lediglich anhand des Substitutionsmusters ihrer Hydroxy-Gruppen am 2-Aminobenzothiazol-Rest unterscheiden, kann man davon ausgehen, dass dieses für die inhibitorische Wirkung der Substanzen maßgeblich ist. Bei **SH67** fehlt – als einziger Unterschied zu **SH65** – die am C-Atom 5 des Benzothiazols befindliche Hydroxy-Gruppe; die Tatsache, dass letztere Substanz eine fast vollständige und erstere Substanz praktisch keine Hemmung der Protease bewirkte, bestätigt, dass die Anwesenheit beider benachbarter Hydroxy-Gruppen an C-5 und C-6 des Benzothiazols eine Voraussetzung für die Wirksamkeit von **SH65** als Inhibitor und damit eine wichtige Struktur-Wirkungs-Beziehung darstellt.

Aus den Ergebnissen der für **SH65** bei Inhibitorkonzentrationen von 0 bis 50  $\mu\text{M}$  und Substratkonzentrationen von 50 bis 250  $\mu\text{M}$  gemessenen Verdünnungsreihe wurden nahezu gleich bleibende  $\text{IC}_{50}$ -Werte ( $\sim 17 \mu\text{M}$ ) berechnet, was für eine nicht-kompetitive Hemmung der DEN-2 NS2B-NS3pro durch **SH65** spricht. (Eine wiederholte Bestimmung ergab sogar einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $3.6 \pm 0.11 \mu\text{M}$ !) In Kooperation mit der Universität Marburg wurde **SH65** auch an der DEN-3 NS2B-NS3pro *in vitro* getestet und zeigte an diesem Enzym ebenfalls eine nahezu vollständige Hemmung von  $>99\%$  bei 100  $\mu\text{M}$  sowie einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $9.1 \pm 1.02 \mu\text{M}$ . Bei **SH66** und **SH67** wurden aufgrund keiner oder nur geringer Enzym-Hemmung keine Verdünnungsreihen gemessen.

**Methoxy-substituierte Benzothiazole mit und ohne Diarylthioether-Funktion bzw. p-Trifluormethyl-phenyl-Rest sowie mit und ohne o/m/p-Iod-Benzamid-Funktion.** Um den Einfluss einzelner Strukturelemente der Verbindung **SH65** auf die Hemmung der DEN-2 NS2B-NS3pro zu untersuchen und damit deren Relevanz für die inhibitorische Wirkung genauer aufzuklären, wurden neben **SH65** ebenfalls die synthetischen Vorstufen in Enzym-Assays getestet:

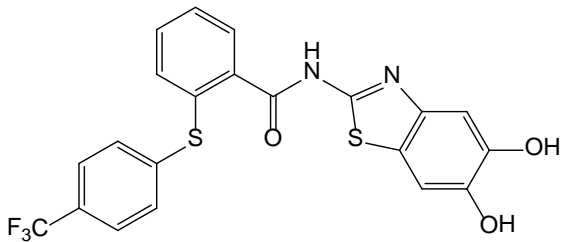
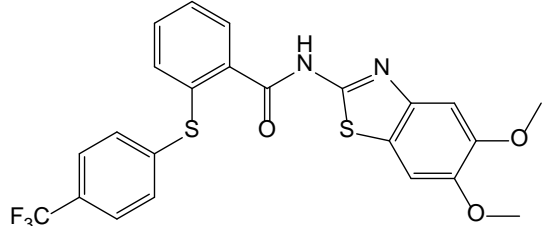
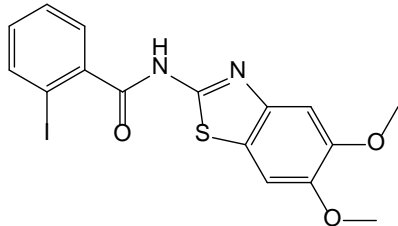
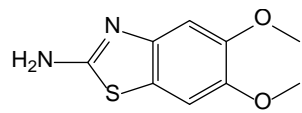
Die Verbindung **SH60** stellt die direkte Vorstufe von **SH65** dar und unterscheidet sich lediglich dadurch, dass sie an C-5 und C-6 des 2-Aminobenzothiazol-Rests jeweils eine

Methoxy- anstelle einer Hydroxy-Gruppe besitzt. Der Verbindung **SH56**, der Vorstufe von **SH60**, fehlen der *p*-Trifluormethyl-phenyl-Rest und die Thioether-Funktion; bei **SH53**, der gemeinsamen Amin-Komponente von **SH65**, **SH60** und **SH56**, handelt es sich um ein an C-5 und C-6 Methoxy-substituiertes 2-Aminobenzothiazol mit freier Amino-Gruppe, d.h. ohne Benzamid-Funktion, Thioether oder *p*-Trifluormethyl-phenyl-Rest (**Tabelle 4-18**).

Bei der Betrachtung der in **Tabelle 4-18** verglichenen Screening-Ergebnisse fällt auf, dass außer der Verbindung **SH65** keine ihrer Vorstufen eine Hemmung der DEN-2 NS2B-NS3pro bei 50  $\mu$ M bewirkte. Als Struktur-Wirkungs-Beziehung kann damit angenommen werden, dass die für inhibitorische Wirkung von **SH65** eine gleichzeitige Anwesenheit dreier Strukturelemente erforderlich ist:

- **Zwei benachbarte Hydroxy-Gruppen** an C-5 und C-6 des 2-Aminobenzothiazol-Rests;
- Eine **Benzamid-Funktion**, welche sich zwischen dem 2-Aminobenzothiazol-Rest und der Diarylthioether-Funktion befindet;
- Ein ***p*-Trifluormethyl-phenyl-thioether** in *ortho*-Stellung zur Carbonyl-Gruppe der Benzamid-Funktion.

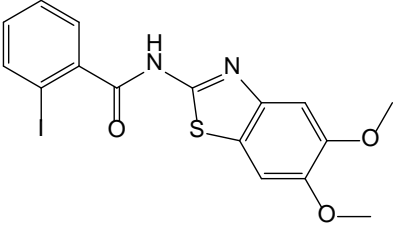
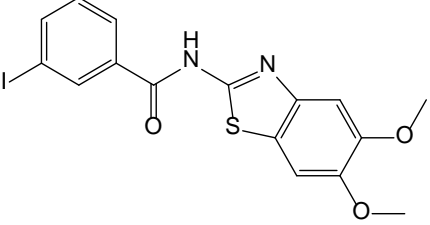
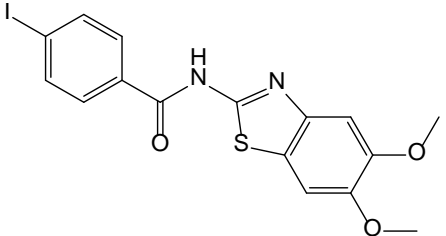
Tabelle 4-18: Hemmeigenschaften von SH65 und dessen Synthese-Vorstufen im Vergleich

Verbindung	Hemmung [50 $\mu$ M]
 SH65	90 %
 SH60	11 %
 SH56	2 %
 SH53	5 %

Die Tatsache, dass ein Austausch der bei **SH65** vorkommenden Hydroxy-Gruppen durch die bei **SH60** vorkommenden Methoxy-Gruppen praktisch zu einem vollständigen Verlust der Hemmwirkung führte, ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Hydroxy-Gruppen bei der Ausbildung von Wasserstoff-Brückenbindungen sowohl als starke H-Donoren als auch als starke H-Akzeptoren fungieren können, während Methoxy-Gruppen allenfalls als schwache H-Brücken-Akzeptoren wirken. Darüber hinaus erhöhen Hydroxy-Gruppen, im Gegensatz zu Methoxy-Gruppen, die Hydrophilie der Substanz.

**Methoxy-substituierte Benzothiazole mit und ohne *o/m/p*-Iod-Benzamid-Funktion und ohne Diarylthioether-Funktion bzw. *p*-Trifluormethyl-phenyl-Rest.** Nachdem der Inhibitor **SH65** hinsichtlich der Hemmung von DEN-2 NS2B-NS3pro und DEN-3 NS2B-NS3pro die bisher überzeugendsten Ergebnisse lieferte, entstand der Plan, Derivate von **SH65** zu synthetisieren, bei denen sich der *p*-Trifluormethyl-phenyl-thioether einmal in *meta*- und einmal in *para*-Stellung zur Carbonyl-Gruppe der Benzamid-Funktion befinden sollte, um den Einfluss der Position dieses Strukturelementes am Phenyl-Ring des Benzamids auf die Enzym-Hemmung zu untersuchen. Da jedoch die Synthesen der *meta*- und *para*-ständigen Thioether nicht zum gewünschten Produkt führten, wurden letztendlich nur die Vorstufen mit 3- bzw. 4-Iodbenzamid-Funktion bei 50  $\mu$ M auf ihre Hemmeigenschaften getestet. Einen Vergleich der Ergebnisse stellt die **Tabelle 4-19** dar.

Tabelle 4-19: Hemmeigenschaften verschiedener methoxy-substituierter Benzothiazole im Vergleich

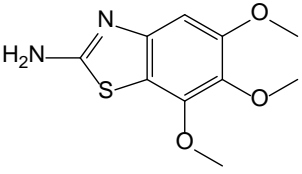
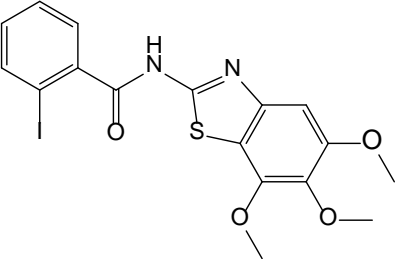
Verbindung	Hemmung [50 $\mu$ M]
 <p>SH56</p>	2 %
 <p>SH58</p>	25 %
 <p>SH59</p>	34 %

Wenngleich keines dieser drei Iodbenzamide mit 5,6-dimethoxy-substituiertem 2-Aminobenzothiazol als Amin-Komponente eine signifikante Hemmung der DEN-2 NS2B-NS3pro zeigte, verdeutlichen deren Screening-Ergebnisse einen schwachen Anstieg der Hemmung im Zusammenhang mit der Position des aromatisch gebundenen Iod-Atoms am Phenyl-Ring des Benzamids: **SH59** zeigte mit 34 % [50  $\mu$ M] eine stärkere Hemmung als **SH58**, letzteres mit 25 % [50  $\mu$ M] eine wiederum stärkere Hemmung als die praktisch völlig inaktive Verbindung **SH56**. Daraus folgt für den Hemmwirkung des aromatisch gebundenen Iod-Atoms: *para* > *meta* > *ortho*. Je weiter sich dieses von der Carbonyl-Gruppe des Benzamids entfernt befindet, desto größer und lipophiler wird das Molekül. Somit könnte diese Korrelation vermutlich auch für die geplanten Derivate mit *p*-Trifluormethyl-phenyl-thioether in *meta*- oder *para*-Stellung zum Benzamid gelten, wenn diese in Analogie zu **SH65** ein 5,6-dihydroxy-substituiertes 2-Aminobenzothiazol als Amin-Komponente des Benzamids besäßen.

Ebenfalls geplant war die Synthese eines Derivates von **SH65**, welches an C-7 des 2-Aminobenzothiazols über eine dritte Hydroxy-Gruppe verfügen sollte. Da aber auch diese Synthese nicht zum gewünschten Produkt führte, wurden lediglich die ersten beiden Bausteine **SH73** und **SH74** (siehe **Tabelle 4-20**) an der DEN-2 NS2B-NS3pro bei 50  $\mu$ M getestet.

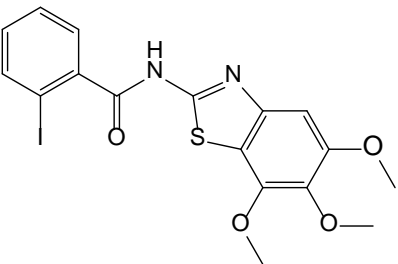
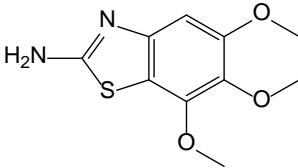
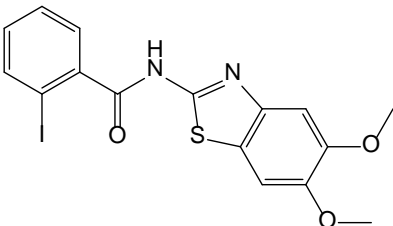
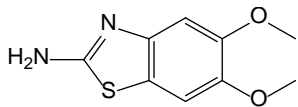


Tabelle 4-20: Hemmeigenschaften verschiedener methoxy-substituierter Benzothiazole (Fortsetzung)

Verbindung	Hemmung [50 $\mu$ M]
 SH73	18 %
 SH74	30 %

Weder **SH73** (2-Amino-5,6,7-trimethoxy-benzothiazol) noch das damit verknüpfte 2-Iodbenzamid **SH74** zeigten eine signifikante Hemmung. Vergleicht man jedoch die Substanzpaare **SH73/SH53** und **SH74/SH56**, welche sich lediglich um eine weitere Methoxy-Gruppe an C-7 des 2-Aminobenzothiazols unterscheiden, so ist ein geringfügig höherer Hemmwert für das jeweilige Derivat mit drei Methoxy-Gruppen zu beobachten (siehe **Tabelle 4-21**). Eine zusätzliche Methoxy-Gruppe erhöht einerseits die Lipophilie einer Substanz, kann sich aber auch als schwacher H-Akzeptor an der Ausbildung von Wasserstoff-Brückenbindungen beteiligen.

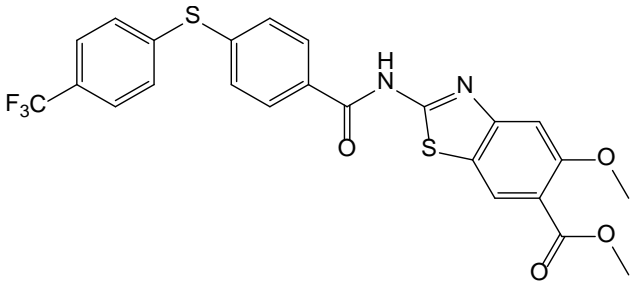
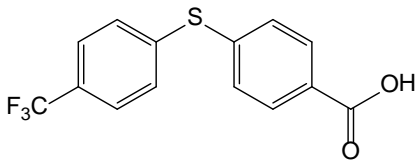
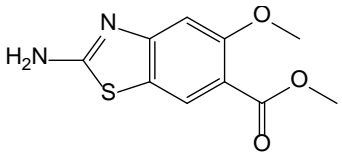
Tabelle 4-21: Hemmeigenschaften strukturell ähnlicher Benzothiazole im Vergleich

Verbindung	Hemmung [50 $\mu$ M]
 SH74	30 %
 SH73	18 %
 SH56	2 %
 SH53	5 %

**Methoxy- und Methylester-substituierte Benzothiazole mit und ohne Diarylthioether-Funktion bzw. *p*-Trifluormethyl-phenyl-Rest sowie mit und ohne Benzamid-Funktion.** Neben den bisher beschriebenen Verbindungen, die eine Benzamid-Partialstruktur mit *p*-Trifluormethyl-phenyl-thioether in *ortho*-Stellung zur Carbonyl-Gruppe besitzen, entstand der Plan, ein Derivat (**SH82**) der Verbindung **SH65** zu synthetisieren, bei dem sich der *p*-Trifluormethyl-phenyl-thioether in *para*-Stellung zum Benzamid befindet und an dessen 2-Aminobenzothiazol-Rest die Hydroxy-Gruppe am C-Atom 6 durch eine freie Carboxy-Gruppe ausgetauscht ist. Da mit der (insgesamt fünfstufigen) Synthese von **SH82**

lediglich die dritte Stufe **SH79** erreicht werden konnte, wurde diese sowie deren beiden Vorstufen **SH69** und **SH77** im Enzym-Assay an der DEN-2 NS2B-NS3pro getestet; die Ergebnisse hierzu befinden sich in der **Tabelle 4-22**.

Tabelle 4-22: Hemmeigenschaften von **SH79** mit Diarylthioether-Funktion in *para*-Stellung zum Benzamid und dessen Synthese-Vorstufen im Vergleich

Verbindung	Hemmung [50 $\mu$ M]
 <p style="text-align: center;">SH79</p>	24 %
 <p style="text-align: center;">SH77</p>	6 %
 <p style="text-align: center;">SH69</p>	0 %

**SH79** zeigte mit 24 % [50  $\mu$ M] keine signifikante Hemmung, **SH69** und **SH77** erwiesen sich als vollständig inaktiv. Als Struktur-Wirkungs-Beziehung geht hervor, dass ein 2-Aminobenzothiazol-Baustein (**SH69**) allein für die inhibitorische Aktivität nicht ausreicht, was auch bei den strukturell ähnlichen Bausteinen **SH53** und **SH73** der Fall war. Ebenso bewirkt ein *p*-Trifluormethyl-phenyl-thioether, der bei **SH77** mit Benzoesäure in *para*-Position zur freien Carboxy-Gruppe verknüpft ist, allein keine Hemmung des Enzyms. Es müssen folglich, wie bei **SH65**, alle drei Strukturelemente (*p*-Trifluormethyl-phenyl-thioether, Benzamid und substituiertes 2-Aminobenzothiazol) gleichzeitig vorhanden sein, um zumindest in die Richtung einer zu erzielenden Hemmwirkung zu gehen.

Im Rahmen des zweiten, von Hongmei Wu durchgeführten Docking-Experimentes wurde ein überlappender, nicht-kompetitiver Bindemodus für **SH65** und zwei von Hongmei Wu synthetisierte Verbindungen, **HWu62** und **HWu180**, postuliert (siehe **Abbildung 4-6**); als Target diente hierbei ebenfalls die Röntgen-Kristallstruktur der DEN-3 NS2B-NS3pro (PDB-Code: **3u1i**).

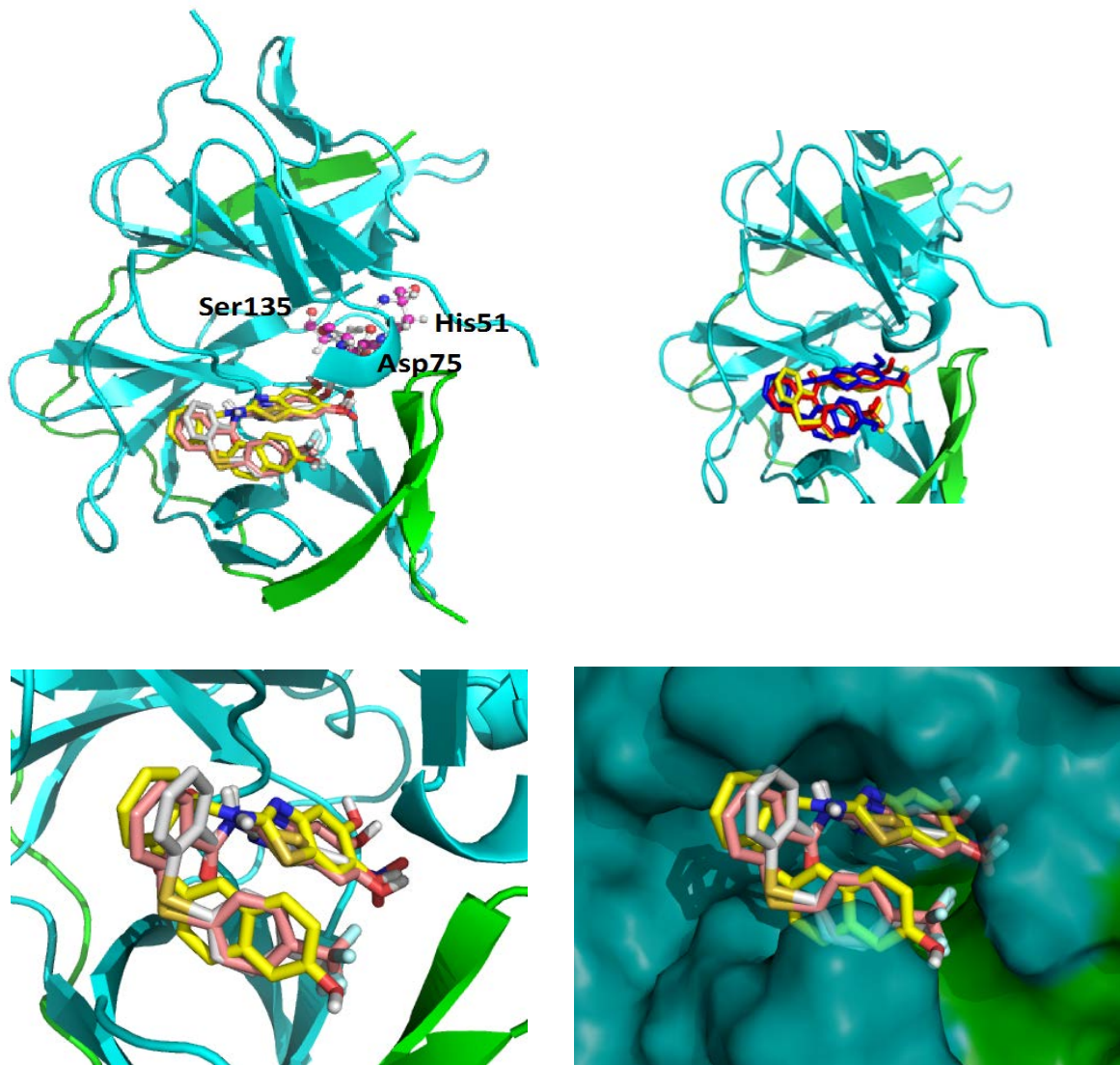
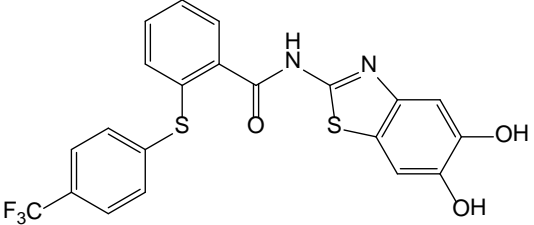
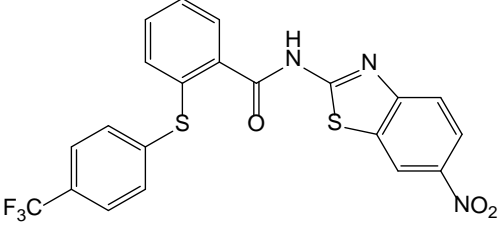
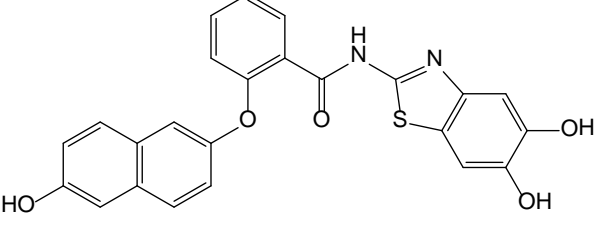


Abbildung 4-6: Überlappender allosterischer Bindemodus von **SH65**, **HWu62** und **HWu180** an der DEN-3 NS2B-NS3pro. **Oben:** rot (SH65), gelb (HWu62), blau (HWu180) **Unten:** rosa (SH65), weiß (HWu62), gelb (HWu180)

Die Verbindung **HWu62** unterscheidet sich von **SH65** dadurch, dass sich am C-Atom 5 des Benzothiazols keine OH-Gruppe und anstelle der am C-Atom 6 des Benzothiazols befindlichen OH-Gruppe eine Nitro-Gruppe, welche, analog einer OH-Gruppe, als H-Brücken-Akzeptor fungieren kann. **HWu180** verfügt, wie **SH65**, über einen jeweils an C-5 und C-6 hydroxy-substituierten Benzothiazol-Baustein, jedoch anstelle der *p*-Trifluormethyl-phenyl-thioether-Funktion über einen Hydroxynaphthylether in *ortho*-Stellung zum Benzamid. Von diesen drei Inhibitoren besitzt **HWu180** den kleinsten IC<sub>50</sub>-Wert, sowohl an der DEN-2 NS2B-NS3pro als auch an der DEN-3 NS2B-NS3pro (siehe **Tabelle 4-23**), womit **HWu180** den potentesten Dengue-Protease-Inhibitor darstellt; **SH65** weist den zweitgrößten IC<sub>50</sub>-Wert an beiden Dengue-Proteasen auf und ist damit immer noch ein stärkerer Inhibitor als **HWu62**. Da **SH65** und **HWu180** als gemeinsames Strukturelement über einen an C-5 und C-6 hydroxy-substituierten Benzothiazol-Baustein verfügen und damit mindestens zwei Hydroxy-Gruppen enthalten, wäre die Synthese weiterer Derivate mit einem variablen Substitutionsmuster aromatischer Hydroxy-Gruppen ein sinnvoller und vielversprechender Ausblick für die Entwicklung neuer Dengue-Protease-Inhibitoren.

Tabelle 4-23: Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte von SH65, HWu62 und HWu180

Verbindung	IC <sub>50</sub> [μM] DEN-2 NS2B- NS3pro	IC <sub>50</sub> [μM] DEN-3 NS2B- NS3pro
 SH65	17.3 ± 0.10	9.06 ± 1.02
 HWu62	22 ± 1	21 ± 4
 HWu180	4.2 ± 0.44	0.99 ± 0.1

#### 4.1.3 Zusammenfassung

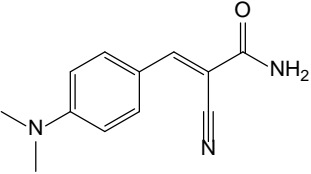
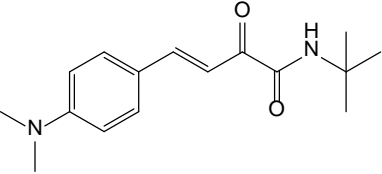
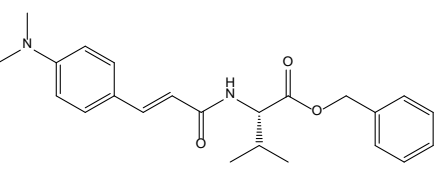
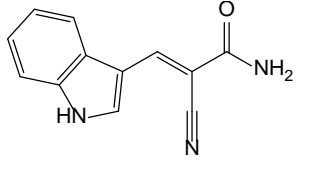
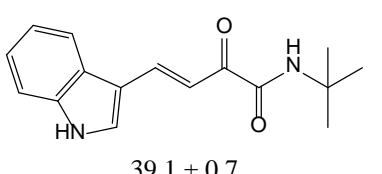
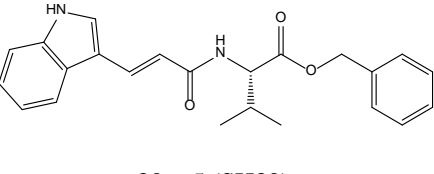
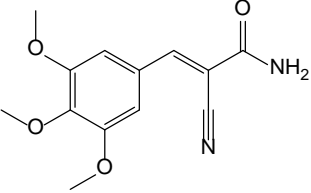
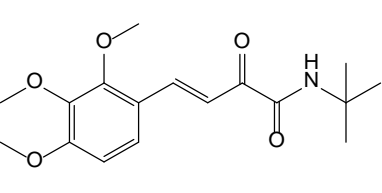
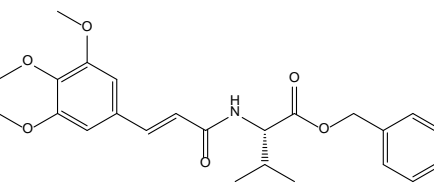
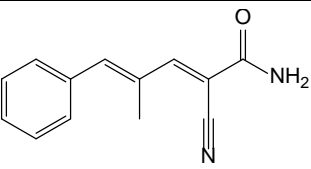
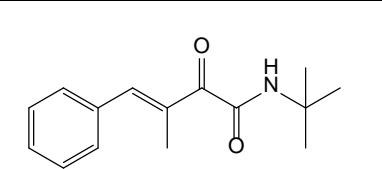
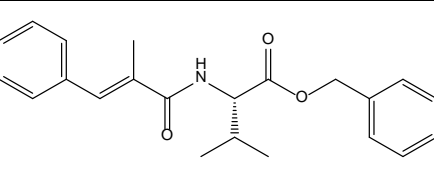
Ein Vergleich der Ergebnisse der an der DEN-2 NS2B-NS3pro getesteten Phenylacrylsäureamide mit denen der Benzothiazole und Diarylthioether zeigt, dass nur mit letzteren das eigentliche Ziel der vorliegenden Arbeit, wirksame Inhibitoren der DEN-2 NS2B-NS3pro zu entwickeln, mit Erfolg erreicht werden konnte.

Innerhalb der ersten Substanzklasse, den Phenylacrylsäureamiden, zeigte keine der Verbindungen eine höhere inhibitorische Aktivität am Enzym als 61 % bei einer Konzentration von 50 μM. Diese Hemmung wurde für die Verbindung **SH35B** aus der zweiten Untergruppe der Phenylacrylsäureamide ermittelt, welche sich aus 1,4-Phenylendiacylsäure und

*L*-Valinbenzylester (2x) als Bausteine zusammensetzt. Von den Amiden der 4-Dimethylaminozimtsäure, welche die erste Untergruppe der Phenylacrylsäureamide bilden und sich strukturell von der Ausgangsverbindung **TP38** ableiten, zeigten sämtliche Vertreter eine Hemmung von maximal 54 % bei 50  $\mu$ M, sofern die 4-Dimethylaminozimtsäure mit Benzyl- und Methylestern aliphatischer oder aromatischer Aminosäuren (**SH01-SH15**) verknüpft oder mit Ammoniak in ein unsubstituiertes Amid (**SH30**) überführt wurde. Der Austausch durch Aminosäuren mit basischen Seitenketten (**SH36, SH37a, SH38a**) führte zu einem Verlust dieser schwachen Hemmwirkung, ebenso der Austausch von 4-Dimethylaminozimtsäure durch andere aromatische Carbonsäuren unter Beibehaltung des *L*-Valinbenzylesters als Amin-Komponente. Als Struktur-Wirkungs-Beziehung ergibt sich für die Phenylacrylsäureamide das Vorhandensein eines für die schwache inhibitorische Aktivität erforderlichen 4-Dimethylaminophenylacrylamid-Partialstruktur (erste Untergruppe) oder einer 1,4-Phenylendiacylamid-Partialstruktur mit zwei C=C-Doppelbindungen (zweite Untergruppe).

Die in der vorliegenden Arbeit synthetisierten Phenylacrylsäureamide weisen sowohl ähnliche als auch gemeinsame Strukturelemente mit den in der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Christian Klein (Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie, Universität Heidelberg) synthetisierten Arylcianoacrylamide <sup>[77]</sup> und  $\alpha$ -Ketoamide <sup>[100]</sup> auf: Erstere besitzen eine C=C-Doppelbindung, welche sich zwischen einer Amid-Funktion und unterschiedlich substituierten aromatischen Resten befindet, von denen einige auch auf der linken Molekülseite der  $\alpha$ -Ketoamide und Phenylacrylsäureamide vorkommen. Ein wesentlicher Unterschied besteht jedoch zum Einen darin, dass die Phenylacrylsäureamide auf der rechten Molekülseite über andere Reste verfügen als die Arylcianoacrylamide und  $\alpha$ -Ketoamide, zum Anderen darin, dass bei den Phenylacrylsäureamiden eine elektrophile, reaktive Gruppe (Nitril bzw. Diketon) fehlt. Eine vergleichende Übersicht strukturell ähnlicher Arylcianoacrylamide,  $\alpha$ -Ketoamide und Phenylacrylsäureamide stellt die **Tabelle 4-24** dar.

Tabelle 4-24: Vergleich der Hemmung der DEN-2 NS2B-NS3pro durch strukturell ähnliche Arylcianoacrylamide<sup>[77]</sup>,  $\alpha$ -Ketoamide<sup>[100]</sup> und Phenylacrylsäureamide

Arylcianoacrylamide % Hemmung [50 $\mu$ M]	$\alpha$ -Ketoamide % Hemmung [50 $\mu$ M]	Phenylacrylsäureamide % Hemmung [50 $\mu$ M]
 35.1 $\pm$ 2.4	 13.8 $\pm$ 1.2	 52 $\pm$ 14 (SH05)
 23.7 $\pm$ 0.6	 39.1 $\pm$ 0.7	 30 $\pm$ 5 (SH32)
 15.6 $\pm$ 2.6	 27.8 $\pm$ 0.4	 4 $\pm$ 4 (SH33)
 30.2 $\pm$ 1.1	 25.6 $\pm$ 3.4	 11 $\pm$ 3 (SH34)

Vergleicht man die Hemmwerte einiger Arylcianoacrylamide und  $\alpha$ -Ketoamide mit denjenigen ihrer strukturell ähnlichen Phenylacrylsäureamide, fällt auf, dass letztere nur bei vorhandenem 4-Dimethylaminophenylacryl- (**SH05**) bzw. Indol-3-yl-acryl-Rest (**SH32**) eine vergleichbare bzw. leicht erhöhte Hemmung der DEN-2 NS2B-NS3pro gegenüber den Arylcianoacrylamiden und  $\alpha$ -Ketoamiden besitzen. **SH33** und **SH34** bewirken keine Hemmung im Vergleich zu ihren strukturellen „Pendants“ mit elektrophiler Nitril- oder Diketon-Funktion, was vermutlich auf das Fehlen dieser reaktiven Gruppen bei den Phenylacrylsäureamiden zurückzuführen ist. An dieser Stelle muss jedoch erwähnt werden,



dass bei den Enzym-Assays für die Testung der Arylcianoacrylamide und  $\alpha$ -Ketoamide ein Substrat mit höherer Affinität (Abz-Nle-Lys-Arg-Arg-3-(NO<sub>2</sub>)-Tyr,  $K_M = 104 \mu\text{M}$ )<sup>[77]</sup> verwendet wurde als bei dem Assay für die Testung der Phenylacrylsäureamide (Boc-Gly-Arg-Arg-AMC,  $K_M = 194 \mu\text{M}$ ).

Die zweite Substanzklasse (Benzothiazole und Diarylthioether) lieferte die Verbindung **SH65** als einzigen potenten Inhibitor der DEN-2 NS2B-NS3pro mit einer nahezu vollständigen Enzym-Hemmung von 90 % bei 50  $\mu\text{M}$  und 96 % bei 100  $\mu\text{M}$ , wenngleich es sich hierbei um eine nicht-kompetitive Hemmung (d.h. keine Unterschiede in den  $K_M$ -Werten bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen bzw. in den  $\text{IC}_{50}$ -Werten bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen) handelt. Diese gute Hemmung ging verloren, wenn auf eines der für die Struktur-Wirkungs-Beziehungen relevanten Strukturelemente von **SH65** (*p*-Trifluormethyl-phenyl-thioether, Benzamid, Hydroxy-Gruppe an C-5 des 2-Aminobenzothiazols) entweder verzichtet oder die als starke H-Brücken-Donoren und H-Brücken-Akzeptoren fungierenden Hydroxy-Gruppen durch Methoxy-Gruppen ersetzt wurden. **SH65** bewirkte ebenfalls eine praktisch vollständige Hemmung (> 99 % bei 100  $\mu\text{M}$ ;  $\text{IC}_{50} = 9.1 \pm 1.02 \mu\text{M}$ ) der DEN-3 NS2B-NS3pro (Substrat: Ph-Ac-Lys-Arg-Arg-AMC).

## 4.2 Hemmung anderer Serin-Proteasen in enzymatischen Assays

### 4.2.1 Phenylacrylsäureamide

Die Auswahl der an  $\alpha$ -Chymotrypsin und Trypsin getesteten Phenylacrylsäure-Derivate umfasste zum Einen diverse Amide der 4-Dimethylaminozimtsäure (**SH05-SH08**, **SH12**, **SH13**, **SH30**), zum Anderen Amide verschiedener aromatischer Carbonsäuren mit Michael-System (**SH32-SH34**, **SH35A**, **SH35B**). Das Ziel dieser Testungen bestand darin, die Selektivität und Spezifität für verschiedene Serin-Proteasen zu untersuchen und die Ergebnisse gegebenenfalls in einen Zusammenhang mit den an der DEN-2 NS2B-NS3pro ermittelten Hemmwerten zu bringen. Einen Vergleich der Hemmung durch die getesteten Phenylacrylsäureamide nach Screening an der DEN-2 NS2B-NS3pro,  $\alpha$ -Chymotrypsin und Trypsin stellt die **Tabelle 4-25** als Übersicht dar.

Tabelle 4-25: Vergleich der Hemmwerte einiger ausgewählter Phenylacrylsäureamide nach Screening an der Dengue-Virus Typ 2 NS2B-NS3 Protease (DEN-2),  $\alpha$ -Chymotrypsin (Chy) und Trypsin (Try)

Substanz	Konz. [ $\mu$ M]	% DEN-2	Konz. [ $\mu$ M]	% Chy	Konz. [ $\mu$ M]	% Try
SH05	50	52	50	46	50	21
SH06	50	44	50	20	50	43
SH07	50	50	50	35	50	23
SH08	50	43	50	32	50	23
SH12	50	54	50	34	50	25
SH13	50	45	50	42	50	32
SH30	50	53	50	40	50	37
<b>SH32</b>	50	30	50	<b>99</b>	50	45
SH33	50	4	50	12	50	0
SH34	50	11	50	44	50	28
<b>SH35A</b>	50	21	50	<b>73</b>	50	28
<b>SH35B</b>	50	<b>61</b>	50	<b>96</b>	50	<b>74</b>

Alle in der **Tabelle 4-25** aufgeführten Verbindungen wurden bei einer Konzentration von 50  $\mu$ M getestet. Auffällig ist die Hemmung des  $\alpha$ -Chymotrypsins durch die Verbindungen **SH32** (99 %), **SH35A** (73 %) und **SH35B** (96 %) sowie die Hemmung des Trypsins durch **SH35B** (74 %). Mit einer Hemmung von 61 % stellt **SH35B** einen der „besten“ Inhibitoren der DEN-2 NS2B-NS3pro aus der Substanzklasse der Phenylacrylsäure-Derivate da, besitzt aber offensichtlich eine schlechte Selektivität für Serin-Proteasen. **SH32** verfügt über einen mit dem Michael-System verknüpften Indol-Rest, **SH35A** und **SH35B** jeweils über zwei in *para*-Stellung zueinander verknüpfte Michael-Systeme an einem Phenyl-Ring; alle drei dieser Verbindungen enthalten als Amin-Komponente jeweils den C-terminalen Benzylester der Aminosäure *L*-Valin (bei **SH35B** zweifach vorhanden) und damit einen weiteren aromatischen Rest. Demnach könnte die Hemmwirkung von **SH32**, **SH35A** und **SH35B** auf  $\alpha$ -Chymotrypsin mit dessen Präferenz für Peptid-Spaltungen hinter aromatischen Aminosäuren <sup>[98]</sup> in einen Zusammenhang gebracht werden. Alle übrigen Phenylacrylsäureamide, welche an der DEN-2 NS2B-NS3pro keine oder nur schwache Hemmwirkung von bis zu 54 % bei 50  $\mu$ M zeigten, bewirkten bei  $\alpha$ -Chymotrypsin und Trypsin ebenfalls keine oder nur schwache Enzym-Hemmung von bis zu 46 % (bei  $\alpha$ -Chymotrypsin) bzw. 45 % (bei Trypsin). Die DEN-2 NS2B-NS3pro wurde von

diesen Verbindungen mit 43-54 % etwas stärker gehemmt als  $\alpha$ -Chymotrypsin, dieses mit 20-46 % wiederum etwas stärker gehemmt als Trypsin mit 21-43 %.

#### 4.2.2 Benzothiazole und Diarylthioether

Aus der Substanzklasse der Benzothiazole und Diarylthioether wurden sämtliche Vertreter an  $\alpha$ -Chymotrypsin und Trypsin getestet, um deren Selektivität und Spezifität für Serin-Proteasen genauer aufzuklären und mit den an der DEN-2 NS2B-NS3pro ermittelten Hemmwerten zu vergleichen. Eine solche vergleichende Übersicht stellt die **Tabelle 4-26** dar.

An der DEN-2 NS2B-NS3pro wurden alle Verbindungen bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  getestet, an  $\alpha$ -Chymotrypsin einige bei 20  $\mu\text{M}$  (**SH69** und **SH77**) und an Trypsin viele bei 40  $\mu\text{M}$ . Dadurch ist in einigen Fällen kein direkter Vergleich möglich, jedoch kann hier ein genereller Trend, ob Hemmung oder keine Hemmung vorliegt, gezeigt werden.

Von den Benzothiazolen zeigten lediglich **SH58** (25 %), **SH59** (34 %) und **SH74** (30 %) bei 50  $\mu\text{M}$  eine schwache Hemmung der DEN-2 NS2B-NS3pro; dazu hemmte **SH74**  $\alpha$ -Chymotrypsin um 34 % bei 50  $\mu\text{M}$  sowie Trypsin um 28 % bei 40  $\mu\text{M}$ . Bei Trypsin bewirkten **SH59** mit 25 % und **SH73** mit 24 % eine vergleichbar schwache Hemmung bei 40  $\mu\text{M}$ . **SH73** stellt die synthetische Vorstufe und **SH74** dar und besitzt mit diesem drei Methoxy-Gruppen an den Positionen 5, 6 und 7 des Benzothiazol-Restes als gemeinsames Strukturelement. Die übrigen Benzothiazole waren an allen Serin-Proteasen völlig inaktiv.

Tabelle 4-26: Vergleich der Hemmwerte von Benzothiazolen und Diarylthioethern nach Screening an der Dengue-Virus Typ 2 NS2B-NS3 Protease (DEN-2),  $\alpha$ -Chymotrypsin (Chy) und Trypsin (Try)

Benzothiazole						
Substanz	Konz. [ $\mu$ M]	% DEN-2	Konz. [ $\mu$ M]	% Chy	Konz. [ $\mu$ M]	% Try
SH53	50	5	50	0	40	0
SH56	50	2	50	0	50	0
SH58	50	25	50	1	40	12
SH59	50	34	50	1	40	25
SH69	50	0	20	7	40	9
SH73	50	18	50	8	40	24
SH74	50	30	50	34	40	28
Diarylthioether						
Substanz	Konz. [ $\mu$ M]	% DEN-2	Konz. [ $\mu$ M]	% Chy	Konz. [ $\mu$ M]	% Try
SH60	50	11	50	0	50	11
<b>SH65</b>	50	<b>90</b>	50	21	50	<b>96</b>
<b>SH66</b>	50	33	50	3	50	<b>90</b>
<b>SH67</b>	50	14	50	26	50	<b>97</b>
SH77	50	6	20	7	40	6
SH79	50	24	50	8	50	24

Die Verbindungen **SH56**, **SH58** und **SH59** verfügen jeweils gemeinsam über eine Benzamid-Funktion, dessen Amin-Komponente ein 2-Aminobenzothiazol mit zwei Methoxy-Gruppen an den C-Atomen 5 und 6 darstellt, sowie über ein aromatisch gebundenes, lipophiles Iod-Atom, welches sich entweder in *ortho*- (**SH56**), *meta*- (**SH58**) oder *para*-Stellung (**SH59**) zur Benzamid-Funktion befindet. Vergleicht man die Hemmwerte dieser drei Verbindungen, so kann eine Zunahme der Hemmung der DEN-2 NS2B NS3pro von 2 % über 25 % bis 34 % bei 50  $\mu$ M sowie eine Zunahme der Trypsin-Hemmung von 0 % über 12 % bis 25 % mit der veränderten Stellung des Iod-Atoms zur Benzamid-Funktion in einen Zusammenhang gebracht werden; damit wäre **SH59** der „stärkste“ Inhibitor der DEN-2 NS2B-NS3pro innerhalb der Benzothiazole. Die Verbindung **SH74**, welche an  $\alpha$ -Chymotrypsin und Trypsin eine vergleichbar schwache Aktivität zeigte, besitzt – wie die an allen Serin-Proteasen inaktive Verbindung **SH56** – ein aromatisch gebundenes Iod-Atom in *ortho*-Stellung zum Benzamid, jedoch zusätzlich eine dritte Methoxy-Gruppe am C-Atom 7 des Benzothiazol-Restes, welche insgesamt die Lipophilie der Substanz erhöht.

Dieser einzige strukturelle Unterschied liegt auch bei den Verbindungen **SH53** (2-Amino-**5,6-dimethoxy**-benzothiazol) und **SH73** (2-Amino-**5,6,7-trimethoxy**-benzothiazol) vor; erstere zeigte an keiner der drei Serin-Proteasen eine Aktivität, während letztere 24 % Hemmung des Trypsins bei 40  $\mu\text{M}$  bewirkte.

Von den Diarylthioethern führten die Verbindungen **SH65**, **SH66** und **SH67** zu einer nahezu vollständigen Hemmung des Trypsins (90-97 % bei 50  $\mu\text{M}$ ); diese Verbindungen besitzen jeweils eine Benzamid-Funktion mit unterschiedlich Hydroxy-substituierten 2-Aminobenzothiazolen als Amin-Komponenten sowie einen lipophilen *p*-Trifluormethylphenyl-thioether-Rest in *ortho*-Stellung zum Benzamid. **SH65** zeigte eine vergleichbar starke Hemmung der DEN-2 NS2B-NS3pro von 90 % bei 50  $\mu\text{M}$  im Gegensatz zu **SH66** und **SH67**. Die Verbindung **SH79** verfügt, ebenfalls wie diese drei Substanzen, über einen *p*-Trifluormethylphenyl-thioether-Rest, welcher sich hier allerdings in *para*-Stellung zum Benzamid befindet; der 2-Aminobenzothiazol-Rest ist am C-Atom 5 mit einer Methoxy-Gruppe, am C-Atom 6 mit einer Methylester-Funktion substituiert. **SH79** zeigte jedoch im Vergleich zu **SH65-SH67** nur eine sehr schwache Hemmung sowohl der DEN-2 NS2B-NS3pro als auch des Trypsins (jeweils 24 % bei 50  $\mu\text{M}$ ). An  $\alpha$ -Chymotrypsin erwiesen sich nahezu alle Diarylthioether-Substanzen als inaktiv.

#### 4.2.3 Zusammenfassung

Vergleicht man die Ergebnisse der an  $\alpha$ -Chymotrypsin und Trypsin getesteten Phenylacrylsäureamide mit denen der Benzothiazole und Diarylthioether, fällt auf, dass einige Vertreter beider Substanzklassen bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  eine nahezu vollständige Hemmung dieser Enzyme bewirkten.

Unter den Phenylacrylsäureamiden war dies beispielsweise bei **SH32** und **SH35B** der Fall (96-99 % Hemmung von  $\alpha$ -Chymotrypsin bei 50  $\mu\text{M}$ ), ebenso wurde eine relativ starke Hemmung von  $\alpha$ -Chymotrypsin durch **SH35A** (73 % bei 50  $\mu\text{M}$ ) im Vergleich zu DEN-2 NS2B-NS3pro und Trypsin beobachtet. DEN-2 NS2B-NS3pro und Trypsin wurden durch **SH35B** in etwa ähnlich stark gehemmt (61-74 % bei 50  $\mu\text{M}$ ). Wie bereits erwähnt, verfügen diese genannten Verbindungen über mehrere sperrige Aromaten in Kombination mit einem oder zwei Michael-Systemen, was für eine hohe Selektivität und Spezifität des  $\alpha$ -

Chymotrypsins für Peptid-Substrate mit aromatischen Aminosäure-Seitenketten spricht <sup>[98]</sup>. Die Verbindung **SH06**, welche durch Verknüpfung von 4-Dimethylaminozimtsäure mit *L*-Tryptophan-Benzylester synthetisiert wurde und damit ebenfalls über sperrige Aromaten, u.a. in der Aminosäure-Seitenkette, verfügt, bewirkte hingegen praktisch keine Hemmung des  $\alpha$ -Chymotrypsins.

Innerhalb der Benzothiazole und Diarylthioether führten die drei Diarylthioether-Verbindungen **SH65**, **SH66** und **SH67** zu einer vollständigen Hemmung (90-97 %) des Trypsins bei 50  $\mu$ M. Diese Verbindungen besitzen drei gemeinsame Strukturelemente, welche für deren Wirkung als Trypsin-Inhibitoren relevant scheinen: Eine Benzamid-Funktion, einen *p*-Trifluormethyl-phenyl-thioether-Rest in *ortho*-Stellung zum Benzamid sowie einen 2-Aminobenzothiazol-Rest als Amin-Komponente des Benzamids, der jeweils an unterschiedlichen Positionen mit Hydroxy-Gruppen substituiert ist. Die durch **SH65** erzeugte, vergleichbar starke Hemmung der DEN-2 NS2B-NS3pro bei 50  $\mu$ M ist vermutlich auf die strukturelle Ähnlichkeit dieser viralen Protease mit Trypsin zurückzuführen.

Die Amide der 4-Dimethylaminozimtsäure bewirkten weder eine selektive Hemmung der DEN-2 NS2B-NS3pro noch des  $\alpha$ -Chymotrypsins noch des Trypsins; von den anderen Phenylacrylsäureamiden hemmten **SH32** ( $IC_{50}$  ~21-36  $\mu$ M) und **SH35A** selektiv  $\alpha$ -Chymotrypsin, im Falle von **SH32** nicht-kompetitiv. **SH35B** war aufgrund einer starken Hemmung von  $\alpha$ -Chymotrypsin ( $IC_{50}$  ~11-16  $\mu$ M) und Trypsin ( $IC_{50}$  ~25-39  $\mu$ M) sowie einer etwas schwächeren Hemmung der DEN-2 NS2B-NS3pro ( $IC_{50}$  ~42-57  $\mu$ M) nicht selektiv und ebenfalls nicht-kompetitiv. Während  $\alpha$ -Chymotrypsin durch **SH32** und **SH35A** und Trypsin durch **SH35B** ( $IC_{50}$  ~25-39  $\mu$ M) am stärksten gehemmt wurden, erreichte leider kein Vertreter der Phenylacrylsäureamide eine selektive und effektive Inhibition der DEN-2 NS2B-NS3pro.

Die Benzothiazole **SH58** und **SH59** zeigten eine schwache Selektivität für die DEN-2 NS2B-NS3pro und Trypsin, während alle anderen Benzothiazole weder selektiv noch inhibitorisch wirksam waren. Der Diarylthioether **SH65** hemmte die DEN-2 NS2B-NS3pro ( $IC_{50}$  ~16-17  $\mu$ M) und leider auch Trypsin ( $IC_{50}$  ~4-6  $\mu$ M) nicht-kompetitiv, **SH66** und **SH67** nur Trypsin ( $IC_{50}$  ~9-16  $\mu$ M bzw. ~9-18  $\mu$ M), ebenfalls nicht-kompetitiv; **SH79** zeigte eine schwache Selektivität für die DEN-2 NS2B-NS3pro und Trypsin. Trypsin

wurde durch **SH65**, **SH66** und **SH67** ungefähr gleich stark gehemmt. Mit **SH65**, dem in der vorliegenden Arbeit potentesten Inhibitor der DEN-2 NS2B-NS3pro, konnte leider keine Selektivität ausschließlich für die DEN-2 NS2B-NS3pro erreicht werden; hingegen handelt es sich bei **SH66** und **SH67** um selektive, nicht-kompetitive Trypsin-Inhibitoren. **SH67** unterscheidet sich von **SH65** lediglich durch die am C-Atom 5 des Benzothiazol-Bausteins fehlende OH-Gruppe und besitzt – wie **SH66** – nur eine OH-Gruppe, welche sich jedoch bei **SH66** am C-Atom 4 des Benzothiazols befindet. Da **SH65**, **SH66** und **SH67** sonst über ein gemeinsames Molekül-Grundgerüst verfügen, erscheint das Substitutionsmuster der Benzothiazol-Partialstruktur mit Hydroxy-Gruppen ausschlaggebend für die selektive Hemmung Trypsin-ähnlicher Serin-Proteasen.

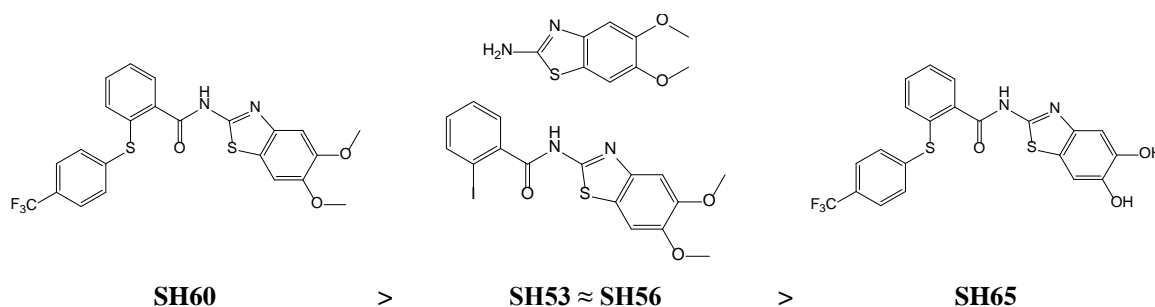
Die in der vorliegenden Arbeit vorhandenen Ergebnisse ergeben im Hinblick auf deren Fortsetzung einen aus drei wesentlichen Schritten bestehenden Ausblick:

- Entwicklung neuer, möglichst kompetitiver Inhibitoren der DEN-2 NS2B-NS3pro, welche idealerweise bereits im nanomolaren Bereich wirksam und möglichst wenig toxisch sein sollten;
- Verbesserung der Selektivität der neuen Inhibitoren für Dengue-Virus-Proteasen, d.h. weitestgehend ohne Hemmung endogener Serin-Proteasen wie  $\alpha$ -Chymotrypsin und Trypsin;
- Genauere Charakterisierung möglicher nicht-kompetitiver Bindungsstellen an Trypsin, unterstützt durch Molecular Docking-Experimente.

### 4.3 Antivirale Aktivität und Cytotoxizität

Im Hinblick auf antivirale Aktivität und Cytotoxizität wurde neben einer Auswahl verschiedener Phenylacrylsäureamide ein Großteil der synthetisierten Benzothiazole und Diarylthioether getestet. Interessant ist dabei die Tatsache, dass die Verbindung **SH65**, welche bei den Enzym-Assays eine nahezu vollständige Hemmung sowohl der DEN-2 NS2B-NS3pro als auch der DEN-3 NS2B-NS3pro bei einer Inhibitorkonzentration von 50-100  $\mu$ M bewirkte, keine antivirale Aktivität in Dengue-Virus-infizierten Zellen besitzt.

Diese wurde jedoch bei den drei Synthese-Vorstufen von **SH65**, d.h. bei **SH53**, **SH56** und **SH60** beobachtet, welche wiederum keine Protease-Hemmung im Enzym-Assay zeigten. Eine absteigende Reihenfolge der antiviralen Aktivitäten von **SH53**, **SH56**, **SH60** und **SH65** ist in dem **Schema 4-1** dargestellt:



Schema 4-1: Antivirale Aktivität spezieller Benzothiazole und Diarylthioether

Interessanterweise ergab die Testung auf Protease-Hemmung in Vero-Zellen für **SH60** einen  $EC_{50}$ -Wert von  $2.5 \pm 0.1 \mu\text{M}$  und einen  $IC_{50}$ -Wert von  $9.3 \pm 2.5 \mu\text{M}$ , während **SH65** keine Hemmung der Protease in Zellen bewirkte ( $EC_{50}$  bzw.  $IC_{50} > 3 \mu\text{M}$ ). Als Wirkungsmechanismus wird eine enzymatische Umsetzung des methoxy-substituierten Diarylthioethers **SH60** zu dem Dengue-Virus-Protease-Inhibitor **SH65**, etwa durch eine Abspaltung der beiden Methoxy-Gruppen durch O-Desmethylasen in den Virus-infizierten Zellen, angenommen; die beiden methoxy-substituierten Benzothiazol-Derivate **SH53** und **SH56** werden demnach vermutlich in ihre entsprechenden hydroxy-substituierten Derivate umgewandelt, um dann als aktive Inhibitoren in Dengue-Virus-infizierten Zellen wirken zu können. Eine genauere Untersuchung dieses Wirkungsmechanismus, d.h. die Beantwortung der Frage, ob hier tatsächlich ein solches „Prodrug“-Prinzip, d.h. die enzymatische oder nicht-enzymatische Umwandlung einer biologisch weitgehend inaktiven Substanz in ihre aktive Form <sup>[75]</sup>, vorliegt, wäre damit ein weiterer Ausblick für die Fortsetzung der vorliegenden Arbeit.



#### 4.4 Testungen an *Leishmania major* und *Trypanosoma brucei brucei*

Von den an *Leishmania major* getesteten Phenylacrylsäureamiden erwies sich nur die Verbindung **SH29** als wirksam, jedoch mit einem sehr geringen  $IC_{50}$ -Wert von 2.21  $\mu$ M (vgl. **Tabelle 3-11** in **Kapitel 3.2.2**) und einer damit starken Toxizität für Leishmanien. Diese Toxizität zeigte **SH29** ebenfalls gegenüber Makrophagen ( $IC_{50} = 1.9 \mu$ M).

Bei der Testung an *Trypanosoma brucei brucei* erwiesen sich mehrere Phenylacrylsäureamide, die als gemeinsames Strukturelement einen auf der rechten Seite des Moleküls befindlichen C-terminalen Aminosäure-Benzylester besaßen, sich jedoch hinsichtlich ihrer aromatischen Carbonsäure-Reste auf der linken Seite des Moleküls teilweise unterschieden, als toxisch. Auch hier war diese Wirkung wieder bei der Verbindung **SH29** am stärksten ausgeprägt ( $IC_{50} = 0.55 \pm 0.06$  (48 h) bzw. 0.72  $\mu$ M (72 h), vgl. **Tabelle 3-11**, **Kapitel 3.2.2**), was vermutlich auf die Fumarsäure-Partialstruktur von **SH29** als strukturelle Besonderheit innerhalb der Phenylacrylsäureamide zurückzuführen ist.

Die zweitstärkste Toxizität gegenüber Trypanosomen zeigten die beiden Amide der 4-Dimethylaminozimtsäure, **SH06** und **SH07**, welche wiederum gegen Leishmanien unwirksam und für Makrophagen relativ gering toxisch waren. Die Verbindung **SH23**, ein Amid der 4-Dimethylaminobenzoesäure, welchem im Vergleich zu **SH06** und **SH07** das Michael-System fehlte, besaß einen höheren  $IC_{50}$ -Wert von  $9.04 \pm 1.07$  (48 h) und damit eine geringere, jedoch erwähnenswerte Toxizität für Trypanosomen.

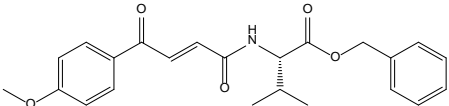
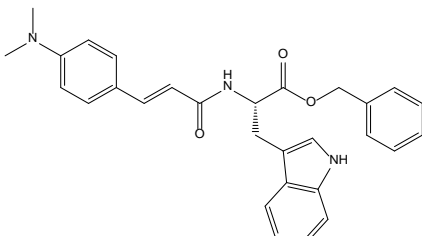
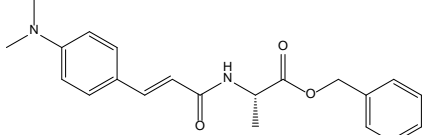
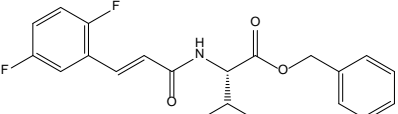
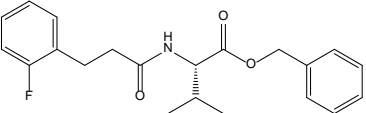
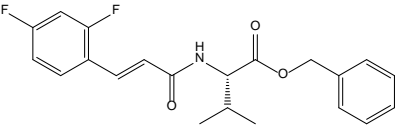
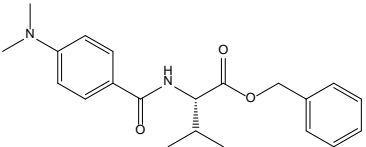
Die drittstärkste Toxizität gegenüber Trypanosomen trat schließlich bei den Verbindungen **SH25**, **SH26** und **SH27** auf, welche als ähnliches Strukturelement unterschiedlich substituierte Fluor-Phenyl-Reste besaßen; bei der Testung an Leishmanien und Makrophagen erwiesen sich diese als unwirksam bzw. nicht toxisch.

Die Toxizitäten der an *Trypanosoma brucei brucei* getesteten Substanzen, die auf der rechten Seite des Moleküls den L-Valinbenzylester als gemeinsames Strukturelement besitzen, sind in der

---

**Tabelle 4-27** in absteigender Reihenfolge unter Einbeziehung der Strukturen zusammenfassend dargestellt; hierbei fällt auf, dass erstens eine Fumarsäure-Partialstruktur (**SH29**), zweitens ein Indol-Rest in der Aminosäure-Seitenkette (**SH06**) und drittens eine Phenylacrylsäure-Partialstruktur (**SH07**, **SH27**, **SH26**) offensichtlich die Toxizität bedingen, welche beim Fehlen der dem Amid benachbarten C=C-Doppelbindung erkennbar sinkt.

Tabelle 4-27: Toxizitäten der an *Trypanosoma brucei brucei* getesteten Substanzen

Verbindung	<i>Trypanosoma brucei brucei</i> TC221 EC <sub>50</sub> [μM] (48 h)	<i>Trypanosoma brucei brucei</i> TC221 EC <sub>50</sub> [μM] (72 h)
 SH29	0.55 ± 0.06	0.72 ± 0.00
 SH06	1.00 ± 0.04	2.75 ± 0.62
 SH07	1.63 ± 0.30	3.44 ± 0.17
 SH27	2.93 ± 0.52	3.89 ± 0.03
 SH25	3.60 ± 0.23	8.25 ± 3.21
 SH26	6.03 ± 0.40	14.94 ± 0.59
 SH23	9.04 ± 1.07	17.65 ± 1.2

## 5 ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY

### 5.1 Zusammenfassung

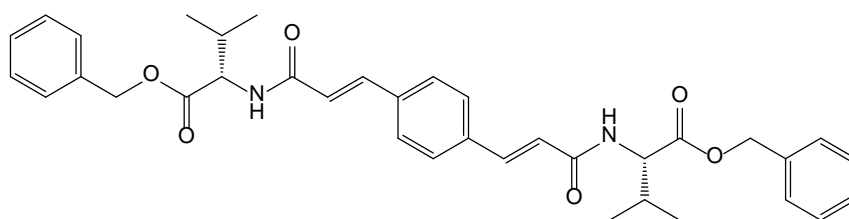
Dengue-Fieber ist eine durch Stechmücken der Gattungen *Aedes aegypti* und *Aedes albopictus* übertragene, virale Infektionskrankheit des Menschen, welche eine zunehmende Bedrohung für die Weltbevölkerung darstellt; das Infektionsrisiko betrifft vorwiegend Menschen, die in tropischen und subtropischen Gebieten der Erde (Asien, Afrika, Amerika) leben <sup>[35,37]</sup>. Bei dem Erreger handelt es sich um ein Flavivirus, bestehend aus einer positiv polarisierten Einzelstrang-RNA <sup>[13,54]</sup>, welches in vier verschiedenen Serotypen existiert <sup>[72]</sup>. Eine Infektion mit Dengue-Viren zeigt sich durch drei mögliche Krankheitsbilder: Klassisches Dengue-Fieber (DF), hämorrhagisches Dengue Fieber (DHF) oder Dengue-Schock-Syndrom (DSS) <sup>[32,92]</sup>. Das Dengue-Virus-Genom codiert eine Serin-Protease mit einer klassischen katalytischen Triade, bestehend aus den Aminosäuren His51, Asp75 und Ser135 <sup>[5,68]</sup>. Die Funktion der Dengue-Virus-Protease besteht in einer post-translationalen, proteolytischen Weiterverarbeitung des viralen Polyprotein-Vorläufers, womit sie essentiell für die Virus-Replikation ist <sup>[23,117]</sup> und damit einen wichtigen therapeutischen Ansatz für die Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen Dengue-Fieber darstellt <sup>[114]</sup>.

Basierend auf dem Screening einer umfangreichen Substanzbibliothek im Arbeitskreis Prof. Dr. Tanja Schirmeister, Pharmazeutische und Medizinische Chemie (2000-2011 Universität Würzburg, seit 2011 Universität Mainz), d.h. einer Testung bereits vorhandener synthetisierter Verbindungen an einer Auswahl verschiedener Proteasen, bestanden die Ziele der vorliegenden Arbeit darin, neue potentielle Inhibitoren der Dengue-Virus Typ 2 NS2B-NS3 Protease (DEN-2 NS2B-NS3pro) zu synthetisieren, deren Hemmwirkung sowie den Inhibitionstyp mithilfe fluorimetrischer Enzym-Assays zu bestimmen, Struktur-Wirkungs-Beziehungen (u.a. mithilfe von Molecular Docking-Rechnungen) zu analysieren und die erhaltenen Leitstrukturen zu optimieren. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Substanzklassen und damit zwei verschiedene Teilprojekte behandelt: Phenylacrylsäureamide im ersten Teilprojekt, Benzothiazole und Diarylthioether zusammen im zweiten Teilprojekt.

Im ersten Teilprojekt wurden Phenylacrylsäureamide zweier Untergruppen synthetisiert und getestet: Die erste Untergruppe umfasste Amide der 4-Dimethylaminozimtsäure, bei denen diese als Carbonsäure-Komponente beibehalten und jeweils mit verschiedenen Aminosäure-Derivaten als Amin-Komponente verknüpft wurden. In der zweiten Untergruppe entstanden Amide verschiedener aromatischer Carbonsäure-Komponenten unter Beibehaltung des *L*-Valinbenzylesters als Amin-Komponente. Hierbei sollte einerseits der Einfluss der Variation der rechten Seite des Moleküls (Amin-Komponente) und andererseits der linken Seite des Moleküls (Carbonsäure-Komponente) auf die Hemmung der DEN-2 NS2B-NS3pro untersucht werden.

Ein Großteil der Amide der 4-Dimethylaminozimtsäure zeigte eine schwache Hemmung der DEN-2 NS2B-NS3pro von ca. 50 % bei einer Inhibitorkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  sowie eine nicht-kompetitive Hemmung, welche durch die Variation der Amin-Komponente praktisch kaum verändert werden konnte. In der zweiten Untergruppe verschlechterte sich die Hemmung durch Variation der Carbonsäure-Komponente erheblich, nicht jedoch bei der Verbindung **SH35B**, welche durch Verknüpfung von 1,4-Phenylendiacylsäure mit zwei Äquivalenten *L*-Valinbenzylester entstand. Die Hemmeigenschaften dieser Verbindung sind in der **Tabelle 5-1** zusammengefasst.

Tabelle 5-1: Hemmeigenschaften des Phenylacrylsäureamids **SH35B**



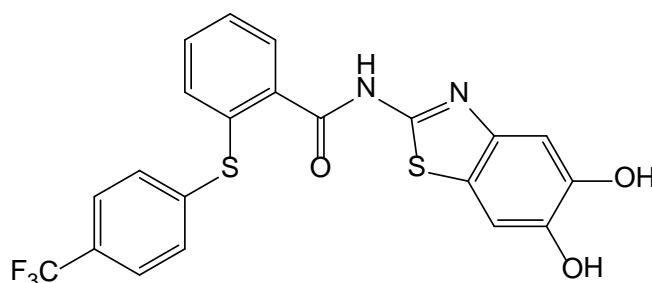
DEN-2 NS2B-NS3pro		$\alpha$ -Chymotrypsin		Trypsin	
Hemmung % [50 $\mu\text{M}$ ]	$\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ] [S] = 100 $\mu\text{M}$	Hemmung % [50 $\mu\text{M}$ ]	$\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ] [S] = 100 $\mu\text{M}$	Hemmung % [50 $\mu\text{M}$ ]	$\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ] [S] = 100 $\mu\text{M}$
61	$56.6 \pm 1.18$	96	$15.7 \pm 1.43$	74	$26.2 \pm 5.71$

Die Verbindung **SH35B** erwies sich innerhalb der Phenylacrylsäureamide als der „beste“ Inhibitor der DEN-2 NS2B-NS3pro, bewirkte aber eine wesentlich stärkere Hemmung der endogenen Serin-Proteasen  $\alpha$ -Chymotrypsin und Trypsin, womit **SH35B** als unselektiver

Inhibitor eingestuft werden muss. An allen drei getesteten Enzymen fand eine nicht-kompetitive Hemmung statt. Da innerhalb der Phenylacrylsäureamide keine einzige Verbindung eine bessere Hemmung der DEN-2 NS2B-NS3pro oder eine Selektivität gegenüber diesem Zielenzym bewirkte, wurde das erste Teilprojekt nach der Synthese und Testung von insgesamt 32 Derivaten vorzeitig beendet.

Das zweite Teilprojekt befasste sich mit der Synthese und Testung von Diarylthioethern mit hydroxy-substituierten Benzothiazol-Bausteinen sowie der Testung einiger methoxy-substituierter Synthese-Vorstufen der Endverbindungen, um die Relevanz und den Einfluss der einzelnen Bausteine auf die Hemmung der DEN-2 NS2B-NS3pro zu untersuchen. Der in der vorliegenden Arbeit synthetisierte, potenteste Inhibitor der DEN-2 NS2B-NS3pro und der DEN-3 NS2B-NS3pro **SH65** (Hemmeigenschaften siehe **Tabelle 5-2**) entstand aufgrund der Vorhersage zweier möglicher Bindungsmodi (kompetitiv und nicht-kompetitiv) mithilfe von Molecular Docking-Experimenten an der Röntgen-Kristallstruktur der DEN-3 NS2B-NS3pro (PDB-Code: **3U1I**) unter Verwendung des Computer-Programmes *LeadIT*<sup>®</sup>. Nach experimenteller Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen erwies sich **SH65** als nicht-kompetitiver Inhibitor der DEN-2 NS2B-NS3pro, wodurch das zweite Docking-Experiment möglicherweise dessen tatsächlichen Bindungsmodus repräsentiert. Eine charakterisierende Beschreibung der nicht-kompetitiven Bindungsstelle an der DEN-3 NS2B-NS3pro findet sich bereits in der Literatur<sup>[82]</sup>.

Tabelle 5-2: Hemmeigenschaften des Benzothiazols/Diarylthioethers **SH65**



DEN-2 NS2B-NS3pro		DEN-3 NS2B-NS3pro		Trypsin	
Hemmung % [50 µM]	IC <sub>50</sub> [µM]	Hemmung % [100 µM]	IC <sub>50</sub> [µM]	Hemmung % [50 µM]	IC <sub>50</sub> [µM]
90	3.6 ± 0.11	>99	9.1 ± 1.02	96	6.27 ± 0.68

Trypsin wurde von **SH65** vergleichbar stark gehemmt wie die beiden getesteten Dengue-Virus-Proteasen (siehe **Tabelle 5-2**), nicht jedoch  $\alpha$ -Chymotrypsin (nur 21 % Hemmung bei 50  $\mu$ M), wodurch diesem Inhibitor zumindest eine relative Selektivität gegenüber Serin-Proteasen zugeschrieben werden kann. Ein Fehlen der Hydroxy-Gruppe am C-Atom 5 des Benzothiazol-Bausteins führte zu einer Verschlechterung der Hemmung der DEN-2 NS2B-NS3pro, wiederum aber zu einer starken, selektiven, nicht-kompetitiven Hemmung des Trypsins; ein vergleichbares Ergebnis lieferte ein gleichzeitiges Fehlen der Benzothiazol-C6-OH-Gruppe in Kombination mit einer Versetzung der Benzothiazol-C5-OH-Gruppe an das C-Atom 4 des Benzothiazols. **SH65** zeigte lediglich eine Protease-Hemmung in den Enzym-Assays, jedoch keine antivirale Aktivität bei der Testung an Dengue-Virus-infizierten Zellen, was aber wiederum bei der synthetischen Vorstufe von **SH65**, welche anstelle der beiden OH-Gruppen über Methoxy-Gruppen verfügt, der Fall war.

Diarylthioether mit mehrfach hydroxy-substituiertem Benzothiazol-Baustein stellen hiermit eine neue, vielversprechende Wirkstoffgruppe zur Hemmung sowohl der Dengue-Virus Typ 2- als auch der Dengue-Virus Typ 3 NS2B-NS3 Protease dar, bei deren Weiterentwicklung und Derivatisierung drei wesentliche, wichtige Ziele verfolgt werden sollten: Zum Ersten eine kompetitive Hemmung der Dengue-Virus-Proteasen im möglichst nanomolaren Konzentrationsbereich, zum Zweiten eine gleichzeitige Selektivität und Spezifität gegenüber den Dengue-Virus-Proteasen ohne gleichzeitige Hemmung endogener Serin-Proteasen ( $\alpha$ -Chymotrypsin, Trypsin u.a.) und zum Dritten eine möglichst geringe Toxizität der Substanzen. Darüber hinaus wäre eine genaue Aufklärung und Charakterisierung der nicht-kompetitiven Bindungsstelle der bisher synthetisierten Verbindungen an Trypsin sowie deren Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu der nicht-kompetitiven Bindungsstelle der Dengue-Virus-Protease sinnvoll.

## 5.2 Summary

Dengue, a mosquito-borne viral infection of humans, transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes, has become a continuing global threat, since 2.5 billion people living in tropical and subtropical regions of the world (predominantly in Asia, Africa and the Americas) are at risk of infection <sup>[35,37]</sup>. The infection is caused by a flavivirus with a single positive-stranded RNA genome <sup>[13,54]</sup> and four distinct serotypes <sup>[72]</sup>. The dengue virus infection can result in classic dengue fever (DF), dengue hemorrhagic fever (DHF) or dengue shock syndrome (DSS) <sup>[32,92]</sup>. The dengue virus genome encodes a serine protease with a classical catalytic triad (His51, Asp75 and Ser135) <sup>[5,68]</sup>, which is responsible for the post-translational proteolytic processing of the polyprotein precursor and essential for the viral replication <sup>[23,117]</sup>, making it an important and attractive therapeutic target <sup>[114]</sup>.

The work presented in this thesis is based on the in-house screening of a wide-ranging library of compounds which were synthesised in the research group of Prof Dr Tanja Schirmeister, Pharmaceutical and Medicinal Chemistry (University of Würzburg 2000-2011, University of Mainz since 2011) and tested on a variety of proteases, with the aim of designing new potential inhibitors of the dengue virus type 2 NS2B-NS3 protease (DEN-2 NS2B-NS3pro). The type of inhibition mechanism was characterised in fluorometric enzyme assays and possible structure-activity-relationships (SAR) were analysed using molecular docking calculations, making the optimisation of the resulting lead structures an important process for the entire duration of the research work. The compounds synthesised in this thesis were divided into two major substance classes: phenylacrylic acid amides during the first project, benzothiazoles and diarylthioethers altogether within the second project.

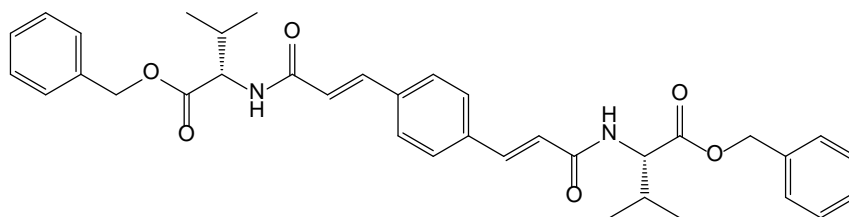
The first project included synthesis and screening of phenylacrylic acid amides, divided into two subgroups: Firstly, various amides of 4-dimethylaminocinnamic acid, retaining the carboxylic acid moiety and coupled with several amino acid derivatives as amine moieties, secondly, amides of other aromatic carboxylic acid moieties in which *L*-valine benzyl ester remained the amine moiety. The aim of this first project was to investigate the



influence of the “left side” (carboxylic acid moiety) and the “right side” (amine moiety) of the molecule on the inhibition on the DEN-2 NS2B-NS3 protease.

A majority of the 4-dimethylaminocinnamic acid amides (first subgroup) showed weak inhibition of the DEN-2 NS2B-NS3 protease of approximately 50 % at an inhibitor concentration of 50  $\mu\text{M}$ . The type of inhibition was non-competitive and almost not influenced by the variation of the amine or amino acid moiety. Within the second subgroup of the phenylacrylic acid amides the DEN-2 NS2B-NS3pro inhibition decreased due to the variation of the carboxylic acid moiety, except for compound **SH35B**, which was synthesised by a coupling reaction of 1,4-phenylene-diacrylic acid and two equivalents of *L*-valine benzyl ester (see **Table 5-1** for inhibitory properties).

Table 5-1: Inhibitory properties of the phenyl acrylic acid amide **SH35B**

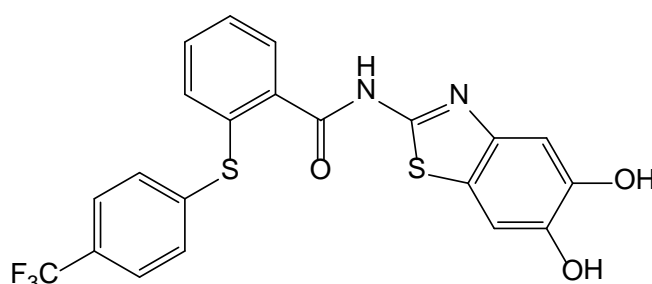


DEN-2 NS2B-NS3pro		$\alpha$ -Chymotrypsin		Trypsin	
Inhibition % [50 $\mu\text{M}$ ]	$\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ] [S] = 100 $\mu\text{M}$	Inhibition % [50 $\mu\text{M}$ ]	$\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ] [S] = 100 $\mu\text{M}$	Inhibition % [50 $\mu\text{M}$ ]	$\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ] [S] = 100 $\mu\text{M}$
61	$56.6 \pm 1.18$	96	$15.7 \pm 1.43$	74	$26.2 \pm 5.71$

Of all synthesised phenylacrylic acid amides, compound **SH35B** turned out to be the “strongest” inhibitor of the DEN-2 NS2B-NS3pro, but also inhibited  $\alpha$ -chymotrypsin and trypsin even stronger, making **SH35B** an unselective and non-specific inhibitor. The type of inhibition was non-competitive for all three serine proteases tested. All in all, none of the phenylacrylic acid amides showed an improved inhibition of the DEN-2 NS2B-NS3pro and no significant selectivity and specificity for this enzyme compared with other serine proteases such as  $\alpha$ -chymotrypsin and trypsin. For this reason, the first project was prematurely abandoned after synthesis and screening of 32 phenylacrylic acid derivatives.

Diaryl thioethers with hydroxy-substituted benzothiazole moieties were synthesised and screened including some of their synthetic intermediates to analyse the influence of the distinct moieties on the inhibition of the DEN-2 NS2B-NS3 protease and their relevance for the inhibition. The most potent inhibitor of this second project, **SH65** (see **Table 5-2** for inhibitory properties), was designed with the help of two possible binding modes (one competitive, one non-competitive) in the x-ray crystal structure of the DEN-3 NS2B-NS3 protease (PDB code: **3UII**), using the molecular docking computer programme *LeadIT*<sup>®</sup>. Experimental obtainment of  $IC_{50}$  values at various substrate concentrations showed that **SH65** is a non-competitive inhibitor of the DEN-2 NS2B-NS3 protease, making the second docking poseview more plausible for the true binding mode of this inhibitor. The binding site of the DEN-3 NS2B-NS3 protease was previously described and characterised by Othman *et al.* <sup>[82]</sup>.

Table 5-2: Inhibitory properties of the benzothiazole/diaryl thioether **SH65**



DEN-2 NS2B-NS3pro		DEN-3 NS2B-NS3pro		Trypsin	
Inhibition % [50 $\mu$ M]	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	Inhibition % [100 $\mu$ M]	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	Inhibition % [50 $\mu$ M]	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]
90	$3.6 \pm 0.11$	>99	$9.06 \pm 1.02$	96	$6.27 \pm 0.68$

DEN-2 NS2B-NS3 protease, DEN-3 NS2B-NS3 protease and trypsin were inhibited by **SH65** in a comparable percentage (see **Table 5-2**) whereas  $\alpha$ -chymotrypsin was hardly affected by this inhibitor (21 % inhibition at 50  $\mu$ M), awarding **SH65** a relative selectivity towards serine proteases. A structurally similar compound missing the hydroxy group attached to the C5 atom of the benzothiazole moiety decreased the inhibition of the DEN-2 NS2B-NS3 protease but achieved a strong selective, non-competitive inhibition of trypsin. The same effect occurred if, simultaneously, the hydroxy group attached to the

benzothiazole C6 atom was missing and the C5 hydroxy group was shifted to C4 of the benzothiazole moiety. **SH65** showed a high inhibitory activity towards both DEN-2 and DEN-3 NS2B-NS3 proteases but no antiviral activity in cells infected with dengue virus. However, antiviral activity was discovered for the synthetic intermediate of **SH65** in which the two hydroxyl groups are replaced by two methoxy groups.

Diaryl thioethers containing hydroxy-substituted benzothiazol moieties could represent a promising new class of dengue virus protease inhibitors if the following three aims are pursued within the context of further research work based on the results of this thesis: Firstly, the inhibition mechanism should be competitive in the nanomolar range; secondly, selectivity and specificity towards the dengue virus protease should be achieved without inhibition of other, endogenous serine proteases such as  $\alpha$ -chymotrypsin and trypsin; thirdly, new future compounds should exhibit low toxicity. Furthermore, the detailed investigation of a non-competitive binding site in trypsin for the existing compounds of this project would also be of interest.

---

## II EXPERIMENTELLER TEIL

### 6 ALLGEMEINE ANGABEN

#### 6.1 Verwendete Messgeräte, analytische und chromatographische Methoden

##### 6.1.1 Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte der Verbindungen **SH01** bis **SH30** wurden mithilfe eines Schmelzpunkt-Messgerätes vom Typ *melting point SMP3* der Firma *Stuart* (Standort: Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg) gemessen; die Schmelzpunkte aller übrigen Substanzen wurden mithilfe eines Schmelzpunkt-Messgerätes vom Typ *melting point SMP10*, ebenfalls von Firma *Stuart* (Standort: Institut für Pharmazie und Biochemie, Universität Mainz) gemessen. Die Messungen erfolgten mit offener Kapillare; die am Schmelzpunkt abgelesene Temperatur ist in Grad Celsius (°C) angegeben.

##### 6.1.2 Spezifische Drehwerte

Die spezifischen Drehwerte der Verbindungen **SH01** bis **SH07**, **SH10** bis **SH15** und **SH23** bis **SH29** wurden mithilfe eines Polarimeters vom Typ *241* der Firma *Perkin Elmer* (Standort: Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg), die spezifischen Drehwerte der Verbindungen **SH32**, **SH33**, **SH34**, **SH35B** und **SH38a** wurden mithilfe eines Polarimeters der Firma *A. Krüss Optronic GmbH* (Standort: Institut für Pharmazie und Biochemie, Universität Mainz) ermittelt. Als Lichtquelle diente die D-Linie des Natrium-Lichtes ( $\text{Na}_D$ ,  $\lambda = 589 \text{ nm}$ ). Die bei 20 °C gemessenen, spezifischen Drehwerte  $[\alpha]_D^{20}$  sind in Grad (°), die Konzentration der vermessenen Lösung in  $\frac{\text{g}}{100\text{ml}}$  angegeben. Zur Berechnung wurde folgende Formel verwendet <sup>[93]</sup>:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{100 \times \alpha}{c \times l}$$

Bei  $\alpha$  handelt es sich um den gemessenen Drehwinkel in Grad ( $^{\circ}$ );  $c$  ist die Konzentration (in  $\frac{g}{100ml}$ ) und  $l$  die Länge bzw. Schichtdicke der Küvette (in dm) <sup>[93]</sup>.

#### 6.1.3 Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur Durchführung der Dünnschichtchromatographie wurden DC-Fertigfolien vom Typ *ALUGRAM<sup>®</sup> Xtra SIL G/UV<sub>254</sub>* der Firma *Macherey-Nagel* verwendet. Diese enthalten Kieselgel 60 (Schichtdicke: 0.20 mm) mit Fluoreszenz-Indikator (Detektionswellenlänge: 254 nm). Die Zusammensetzung der verwendeten Fließmittel-Gemische ist in Volumenteilen angegeben; die  $R_f$ -Werte berechnen sich als Quotienten der Laufstrecke der Substanz und der Laufstrecke der Fließmittelfront. Nach Entwicklung wurden die DC-Platten ggf. mit Ninhydrin-Reagenz (Nachweis für Amine, Aminosäuren und Peptide) besprüht.

#### 6.1.4 Säulenchromatographie (SC)

Zur Aufreinigung der synthetisierten Verbindungen mittels Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (Korndurchmesser: 0.06-0.2 mm) der Firma *Carl Roth GmbH* verwendet. Der Durchmesser und die Länge der verwendeten Säulen variierten je nach Menge des Rohproduktes. Die Säulen wurden stets nass befüllt; die Zusammensetzung der verwendeten Elutionsmittel-Gemische ist in Volumenteilen angegeben.

#### 6.1.5 Infrarot-Spektroskopie (IR)

Die Infrarot-Spektren der Substanzen **SH01** bis **SH30** wurden an einem *FT-IR-6100*-Spektrometer der Firma *Jasco* mit Diamant-ATR-Einheit (Standort: Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg), die Spektren aller anderen Verbindungen an einem Infrarot-Spektrometer vom Typ *Avatar 330* der Firma *ThermoNicolet* mit ATR-Einheit (Standort: Institut für Pharmazie und Biochemie, Universität Mainz) aufgenommen. Die Wellenzahlen  $\tilde{\nu}$  sind in [ $cm^{-1}$ ] angegeben.

#### 6.1.6 Kernresonanz-Spektroskopie ( $^1H$ - und $^{13}C$ -NMR)

Die Kernresonanz-Spektren der synthetisierten Verbindungen wurden an insgesamt drei verschiedenen Kernresonanz-Spektrometern aufgenommen:

- **SH01 bis SH30:** Bruker AVANCE 400 MHz, 300 K (Standort: Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg)
- **SH32 bis SH59:** Bruker Spektrometer AC-300, 300 MHz (Standort: Institut für Pharmazie und Biochemie, Universität Mainz)
- **SH60 bis SH79:** Bruker Fourier 300, 300 MHz (Standort: Institut für Pharmazie und Biochemie, Universität Mainz)

Die chemische Verschiebung  $\delta$  ist in *parts per million* [ppm], die Kopplungskonstanten  $J$  in *Hertz* [Hz] angegeben. Als Referenz dienten die Signale der in den verwendeten deuterierten Lösungsmitteln enthaltenen Restprotonen:

- Chloroform-*d* (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 7.26$  ppm (<sup>1</sup>H-NMR) / 77.16 ppm (<sup>13</sup>C-NMR)
- Dimethylsulfoxid-*d*<sub>6</sub> (DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 2.50$  ppm (<sup>1</sup>H-NMR) / 39.52 ppm (<sup>13</sup>C-NMR)
- Methanol-*d*<sub>4</sub> (CD<sub>3</sub>OD):  $\delta = 3.31$  ppm (<sup>1</sup>H-NMR) / 49.00 ppm (<sup>13</sup>C-NMR)

Die Multiplizität der Signale ist wie folgt angegeben: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplet, q = Quartett, p = Pentett, dd = Dublett vom Dublett, dt = Dublett vom Triplet, dq = Dublett vom Quartett, td = Triplet vom Dublett, tq = Triplet vom Quartett, qd = Quartett vom Dublett, qt = Quartett vom Triplet, m = Multiplet. Die Zuordnung der <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-Signale erfolgte, falls erforderlich, unter Zuhilfenahme zweidimensionaler <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-Korrelationsspektren (COSY), <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-Korrelationsspektren (HMBC, HMQC, HSQC) und DEPT-135-Spektren.

#### 6.1.7 Massenspektrometrie (MS) und Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

Die Massenspektren der Verbindungen **SH01 bis SH08**, **SH10 bis SH15** und **SH30** wurden an einem Massenspektrometer vom Typ *Agilent 1100 LC/MSD-Trap*, ausgestattet mit einer Ionenfalle (MSD-Trap), einem UV-Detektor und einem Hochleistungs-Flüssigchromatographie-System (HPLC) der Firma *Agilent*, aufgenommen (Standort: Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg). Sämtliche Messungen erfolgten im positiven Modus. Die Reinheit der Verbindungen wurde über den Flächeninhalt aller im Chromatogramm auftretenden Peaks ermittelt und ist in Prozent [%] angegeben. Die Retentionszeiten  $R_t$  sind in Minuten [min] angegeben.

- Elutionsmittel A: Millipore®-Wasser mit 0.1 % Ameisensäure
- Elutionsmittel B: Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure

Tabelle 6-1: Verwendete HPLC-MS-Methoden zur Bestimmung der Molaren Masse und Reinheit der Substanzen **SH01** bis **SH08**, **SH10** bis **SH15** und **SH30** (Amide der 4-Dimethylaminozimtsäure)

Methoden	HPLC-MS-1		HPLC-MS-2		HPLC-MS-3		HPLC-MS-4	
Säule	Phenomenex® Gemini 5µ C18 110 150 x 2.00 mm		Phenomenex® Gemini 5µ C18 110 150 x 2.00 mm		Phenomenex® Gemini 5µ C18 110 150 x 2.00 mm		Phenomenex® Jupiter 4µ Proteo 90A 150 x 4.60 mm	
Fluss	t [min]	[ml/min]	t [min]	[ml/min]	t [min]	[ml/min]	t [min]	[ml/min]
	5.0	0.40	5.0	0.40	0.0	0.30	0.0	1.00
	8.0	0.40	7.0	0.40	7.0	0.30	15.0	1.00
	8.1	0.60	8.0	0.60	10.0	0.30	18.0	1.00
	9.5	0.60	10.4	0.60	10.2	0.45	18.1	1.00
	9.6	0.60	10.5	0.40	12.4	0.45	19.0	1.00
	11.0	0.40	11.0	0.40	12.5	0.30	19.1	1.00
						22.5	1.00	
<b>P<sub>max</sub></b> <b>[bar]</b>	250		250		250			
Gradient	t [min]	B [%]	t [min]	B [%]	t [min]	B [%]	t [min]	B [%]
	0.0	60	0.0	60	0.0	30	0.0	30
	5.0	100	5.0	95	7.0	100	15.0	100
	8.0	100	7.0	95	10.0	100	18.0	100
	8.1	30	8.0	60	10.2	10	18.1	10
	9.5	30	10.4	60	12.4	30	19.0	10
	9.6	60	10.5	60	12.5	30	19.1	30
11.0	60	11.0	60			22.5	30	

Die Massenspektren aller anderen Verbindungen wurden entweder als ESI-Spektren an einem *Micromass LCT* Spektrometer der Firma *Micromass* oder als FD-Spektren an einem *MAT 95* Massenspektrometer der Firma *Finnigan* (Standort: Institut für Organische Chemie, Universität Mainz) aufgenommen.

Die Reinheitsbestimmung dieser Substanzen erfolgte an einer analytischen HPLC-Anlage der Firma *Waters* (Standort: Institut für Pharmazie und Biochemie, Universität Mainz), bestehend aus einer Pumpe vom Typ *Waters 600 Controller*, einem Autosampler vom Typ *Waters 717 plus* sowie einem *Photo Diode Array 996* Detektor. Die Chromatogramme wurden mithilfe der Software *Waters Empower* ausgewertet; die Reinheit der Verbindungs-

en wurde über den Flächeninhalt sämtlicher im Chromatogramm auftretenden Peaks berechnet und ist in Prozent [%] angegeben.

- **Methode HPLC-1:** Acetonitril/Millipore®-Wasser [70:30]
- **Methode HPLC-2:** Linearer Gradient von Acetonitril/Millipore®-Wasser [5:95] zu Acetonitril/Millipore®-Wasser [95:5] über 20 Minuten.
- **Säule:** Orbit 250 x 4.6 mm; 100 C18 5µM (Fa. *MZ Analysetechnik*)
- **Proben:** 10 µl einer ca. 2 mM Stammlösung der jeweiligen Verbindung (in DMSO) in 200 µl Acetonitril/Millipore®-Wasser [1:1]
- **Injektionsvolumen:** 20 µl
- **Fluss:** 1 ml/min

## 6.2 Enzym-Assays

Die Enzym-Assays mit der Dengue Virus Typ 2 NS2B-NS3 Protease (DEN-2 NS2B-NS3pro) wurden an zwei verschiedenen Fluoreszenz-Spektrometern mit Leseinheit für Mikrotiterplatten (*microplate reader*) durchgeführt:

- *Cary Eclipse* Fluorimeter, Firma *Varian* (Standort: Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg) → alle Verbindungen
- *TECAN Infinite F200 Pro* (Standort: Institut für Pharmazie und Biochemie, Universität Mainz) → nur Verbindungen **SH65**, **SH66** und **SH67**

Es wurden weiße 96-Well-Mikrotiterplatten der Firma *Nunc* verwendet. Das Screening erfolgte zunächst bei einer Inhibitorkonzentration von 50 µM (alle Verbindungen) bzw. auch bei 100 µM (Verbindungen **SH65**, **SH66** und **SH 67**). Die Verdünnungsreihen wurden in der Regel bei Inhibitorkonzentrationen von 0, 10, 20, 40, 50, 60, 80, 100 µM und Substratkonzentrationen von 20, 50, 100, 200 µM gemessen. (Eine Ausnahme bildeten die Verdünnungsreihen der Verbindung **SH65** mit Inhibitorkonzentrationen von 0, 2.5, 5, 10, 12.5, 15, 20, 25 µM bzw. 0, 1, 5, 10, 20, 50 µM und Substratkonzentrationen von 50, 100, 150, 200, 250 µM bzw. 30, 75, 120, 150, 225 µM.) Alle Versuche wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Bedingungen des DEN-2 NS2B-NS3pro Assays sind in **Tabelle 6-2** zusammengefasst.



Tabelle 6-2: Bedingungen des verwendeten fluorimetrischen Enzym-Assays mit DEN-2 NS2B-NS3pro

Enzym	Dengue-Virus Typ 2 NS2B-NS3 Protease (DEN-2 NS2B-NS3pro)
Puffer	50 mM Tris-Puffer pH 9.0 mit 10% Ethylenglycol und 0.0016% Brij <sup>®</sup> -35
Substrat	Boc-Gly-Arg-Arg-7-amino-4-methylcumarin · HCl ( $M_r = 644.73$ ), $K_M = 194 \mu\text{M}$
Endkonzentrationen	Inhibitor: $[I] = 50 \mu\text{M}$ ; Substrat: $[S] = 100 \mu\text{M}$ (soweit nicht anders angegeben)
Wellenlängen und Temperatur	$\lambda$ (Anregung) = 380 nm; $\lambda$ (Detektion) = 460 nm; Temperatur: 25 °C
Pipettier-Schema Screening (200 $\mu\text{l}$ )	180 $\mu\text{l}$ Puffer + 5 $\mu\text{l}$ Enzym-Lösung + 10 $\mu\text{l}$ DMSO bzw. 10 $\mu\text{l}$ Inhibitor-Lösung (1 mM Stammlösung) + 5 $\mu\text{l}$ Substrat-Lösung (4 mM Stammlösung)
Pipettier-Schema Korrekturmessung (200 $\mu\text{l}$ )	185 $\mu\text{l}$ Puffer + 10 $\mu\text{l}$ DMSO bzw. 10 $\mu\text{l}$ Inhibitor-Lösung (1mM Stammlösung) + 5 $\mu\text{l}$ AMC-Lösung (40 $\mu\text{M}$ )
Pipettier-Schema Verdünnungsreihe (200 $\mu\text{l}$ )	185 $\mu\text{l}$ Puffer + 5 $\mu\text{l}$ Enzym-Lösung + 5 $\mu\text{l}$ DMSO bzw. 5 $\mu\text{l}$ Inhibitor-Lösung (4 mM Stammlösung) + 5 $\mu\text{l}$ Substrat-Lösung (4 mM Stammlösung)

Die Enzym-Assays mit  $\alpha$ -Chymotrypsin wurden an einem *Cary Eclipse* Fluorimeter der Firma *Varian* (Standort: Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg) durchgeführt. Es wurden weiße 96-Well-Mikrotiterplatten der Firma *Nunc* verwendet. Das Screening erfolgte in der Regel bei einer Inhibitorkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  und einer Substratkonzentration von 75  $\mu\text{M}$ . Die Verdünnungsreihen der Verbindung **SH32** wurden bei Inhibitorkonzentrationen von 0, 5, 10, 20, 25, 30, 40, 50  $\mu\text{M}$  und Substratkonzentrationen von 50, 75, 100, 150  $\mu\text{M}$ , die der Verbindung **SH35B** bei Inhibitorkonzentrationen 0, 2.5, 5, 10, 12.5, 15, 20, 25  $\mu\text{M}$  und Substratkonzentrationen von 50, 75, 100  $\mu\text{M}$  gemessen. Alle Versuche wurden in unabhängigen Doppelbestimmung durchgeführt. Die Bedingungen des Chymotrypsin-Assays sind in **Tabelle 6-3** zusammengefasst.

Tabelle 6-3: Bedingungen des verwendeten fluorimetrischen Enzym-Assays mit  $\alpha$ -Chymotrypsin

Enzym	$\alpha$ -Chymotrypsin
Puffer	50 mM Tris-Puffer pH 8.0, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA
Substrat	Suc-Leu-Tyr-7-amino-4-methylcumarin ( $M_r = 551.6$ )
Endkonzentrationen	Inhibitor: [I] = 50 $\mu$ M; Substrat: [S] = 75 $\mu$ M (soweit nicht anders angegeben)
Wellenlängen und Temperatur	$\lambda$ (Anregung) = 380 nm; $\lambda$ (Detektion) = 460 nm; Temperatur: 25 °C
Pipettier-Schema Screening (200 $\mu$ l)	170 $\mu$ l Puffer + 5 $\mu$ l Enzym-Lösung (1 mg/ml Puffer $\rightarrow$ Verdünnung ca. 1:3) + 20 $\mu$ l DMSO bzw. 20 $\mu$ l Inhibitor-Lösung (0.5 mM Stammlösung)

Die Enzym-Assays mit Trypsin wurden an einem *Cary Eclipse* Fluorimeter der Firma *Varian* (Standort: Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg) durchgeführt. Es wurden weiße 96-Well-Mikrotiterplatten der Firma *Nunc* verwendet. Das Screening erfolgte in der Regel bei einer Inhibitorkonzentration von 50  $\mu$ M und einer Substratkonzentration von 40  $\mu$ M. Die Verdünnungsreihen der Verbindung **SH35B** wurden bei Inhibitorkonzentrationen von 0, 5, 10, 20, 25, 30, 40, 50  $\mu$ M und Substratkonzentrationen von 25, 75, 100  $\mu$ M, die der Verbindung **SH65** bei Inhibitorkonzentrationen von 0, 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10  $\mu$ M und Substratkonzentrationen von 25, 40, 75, 100  $\mu$ M, die der Verbindung **SH66** bei Inhibitorkonzentrationen von 0, 5, 10, 20, 25, 30, 40, 50  $\mu$ M und Substratkonzentrationen von 25, 40, 75, 100  $\mu$ M und die der Verbindung **SH67** bei Inhibitorkonzentrationen von 0, 2.5, 5, 10, 12.5, 15, 20, 25  $\mu$ M gemessen. Alle Versuche wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Bedingungen des Trypsin-Assays sind in **Tabelle 6-4** zusammengefasst.

Tabelle 6-4: Bedingungen des verwendeten fluorimetrischen Enzym-Assays mit Trypsin

Enzym	Trypsin
Puffer	50 mM Tris-Puffer pH 8.0, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA
Substrat	Z-Phe-Arg-7-amino-4-methylcumarin $\cdot$ HCl ( $M_r = 612.6$ )
Endkonzentrationen	Inhibitor: [I] = 50 $\mu$ M; Substrat: [S] = 40 $\mu$ M (soweit nicht anders angegeben)
Wellenlängen und Temperatur	$\lambda$ (Anregung) = 380 nm; $\lambda$ (Detektion) = 460 nm; Temperatur: 25 °C
Pipettier-Schema Screening (200 $\mu$ l)	170 $\mu$ l Puffer + 5 $\mu$ l Enzym-Lösung (1 mg/ml Puffer, ggf. Verdünnung) + 20 $\mu$ l DMSO bzw. 20 $\mu$ l Inhibitor-Lösung (0.5 mM Stammlösung)

### 6.3 Enzyme, Substrate und Reagenzien

Tabelle 6-5: Übersicht über die verwendeten Enzyme, Substrate und Reagenzien

<b>Enzyme</b>		
Dengue Virus Typ 2 NS2B-NS3 Protease (DEN-2 NS2B-NS3pro)		Dr. Jochen Bodem, Institut für Virologie und Immunbiologie, Universität Würzburg
Dengue Virus Typ 3 NS3B-NS3 Protease (DEN-3 NS2B-NS3pro)		Prof. Dr. Wibke Diederich, Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Marburg
$\alpha$ -Chymotrypsin		Fluka
Trypsin		Merck
<b>Substrate</b>		
Boc-Gly-Arg-Arg-AMC · HCl	(für DEN-2 Protease-Assay)	Bachem
Z-Gly-Arg-Arg-AMC	(für DEN-2/3 Protease-Assay)	
PhAc-Lys-Arg-Arg-AMC	(für DEN-2/3 Protease-Assay)	
Suc-Leu-Tyr-AMC	(für $\alpha$ -Chymotrypsin-Assay)	Bachem
Z-Phe-Arg-AMC · HCl	(für Trypsin-Assay)	Bachem
<b>Chemikalien</b>		
Edukte, Synthese-Bausteine, Kupplungsreagenzien, Lösungsmittel		Acros, Alfa Aesar, Allessa Chemie, Sigma Aldrich
Aminosäuren (und Derivate)		Bachem
<b>Sprühreagenzien für Dünnschichtchromatographie</b>		
Ehrlichs Reagenz		1 g 4-(Dimethylamino)benzaldehyd, 75 ml Methanol, 25 ml konzentrierte Salzsäure Detektion durch Erhitzen auf ca. 130 °C
Ninhydrin-Reagenz		0.3 g Ninhydrin, 100ml Butanol oder Isopropanol, 3 ml Eisessig Detektion durch Erhitzen auf ca. 130 °C

### 6.4 Arbeitsmethoden

Die Lösungsmittel wurden vor der Anwendung durch Destillation gereinigt. Das zur Darstellung von Carbonsäurechloriden verwendete Dichlormethan wurde über Calciumhydrid (CaH<sub>2</sub>) oder Phosphorpentoxid (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) getrocknet, das zur Synthese von Thioethern verwendete Isopropanol über Molekularsieb gelagert. Eine Verwendung von Argon oder Stickstoff als Schutzgas war bei keiner der durchgeführten Synthesen erforderlich.

---

## 6.5 Abkürzungsverzeichnis

---

Abz	<i>o</i> -Aminobenzoyl
Ac	Acetyl
AMC	7-amino-4-methylcumarin
Ala (A)	Alanin
Ar	Aromat, Aryl
Arg (R)	Arginin
Asn (N)	Asparagin
Asp (D)	Asparaginsäure, Aspartat
ATR	Attenuated Total Reflection
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl (Schutzgruppe)
Bz	Benzoyl (Schutzgruppe)
Chy	$\alpha$ -Chymotrypsin
COSY	Correlated Spectroscopy
Cys (C)	Cystein
DC	Dünnschichtchromatographie
DEN-2 NS2B-NS3pro	Dengue-Virus Typ 2 NS2B-NS3 Protease
DEN-3 NS2B-NS3pro	Dengue-Virus Typ 3 NS2B-NS3 Protease
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer
DF	Dengue Fever (klassisches Dengue-Fieber)
DHF	Dengue Hemorrhagic Fever (Hämorrhagisches Dengue-Fieber)
DMF	N,N'-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)
DSS	Dengue Shock Syndrome
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ESI	Electrospray ionization
Et <sub>3</sub> N	Triethylamin
EtOAc	Ethylacetat
FD	Field Desorption
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer

---

FT	Fourier Transformation
Gln (Q)	Glutamin
Glu (E)	Glutaminsäure, Glutamat
Gly (G)	Glycin
HBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyluronium-Hexafluorophosphat
HCTU	<i>O</i> -(6-Chlorobenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyluronium-Hexafluorophosphat
HCV NS3pro-NS4A	Hepatitis C Virus NS3 Protease (mit NS4A-Cofaktor)
His (H)	Histidin
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Ile (I)	Isoleucin
IR	Infrarot
LC	Liquid Chromatography (Flüssigchromatographie)
Leu (L)	Leucin
Lys (K)	Lysin
<i>m</i>	<i>meta</i> (Substitution an Aromaten)
Me	Methyl
Met (M)	Methionin
MOI	Multiplicity Of Infection
MS	Massenspektrometrie
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernresonanz-Spektroskopie)
nY	3-Nitrotyrosin (bzw. 3-Nitrotyrosyl-)
<i>o</i>	<i>ortho</i> (Substitution an Aromaten)
ORF	Open Reading Frame
<i>p</i>	<i>para</i> (Substitution an Aromaten)
Pbf	2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl

---

---

	(Schutzgruppe)
PCR	Polymerase Chain Reaction (PCR)
PDB	Protein Data Bank
Ph	Phenyl
Phe (F)	Phenylalanin
Phg	Phenylglycin
<i>p</i> NA	<i>para</i> -Nitroanilid
PPA	<i>n</i> -Propylphosphonsäureanhydrid
Pro (P)	Prolin
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonucleinsäure)
SC	Säulenchromatographie
Ser (S)	Serin
SOP	Standard Operating Procedure
Suc	Succinyl (Schutzgruppe)
TGN	trans Golgi network
TFA	Trifluoroacetic Acid (Trifluoressigsäure)
Thr (T)	Threonin
Trp (W)	Tryptophan
Try	Trypsin
Tyr (Y)	Tyrosin
UV	Ultraviolett
Val (V)	Valin
WNV	West Nile Virus
WNV NS2B-NS3pro	West Nile Virus NS2B-NS3 Protease
Z	Benzyloxycarbonyl (Schutzgruppe)

---

## 7 ALLGEMEINE SYNTHETISCHE METHODEN

Die in diesem Kapitel beschriebenen synthetischen Methoden orientieren sich im Wesentlichen an den jeweils zitierten, veröffentlichten Synthese-Vorschriften, wurden jedoch in erforderlichen Fällen hinsichtlich der Durchführung und Aufarbeitung der Reaktionsprodukte geringfügig abgewandelt bzw. weiterentwickelt und damit den jeweiligen Eigenschaften der eingesetzten Edukte angepasst.

### 7.1 Amid- und Peptidkupplungen

Literatur: <sup>[36,71]</sup>

#### 7.1.1 Methode A1: Kupplung mit *n*-Propylphosphonsäureanhydrid (PPA)

1.00 Äquivalent der Carbonsäure und 1.00 Äquivalent des Aminosäureester-Hydrochlorids/-Tosylats werden in Dimethylformamid oder Ethylacetat gelöst und im Eisbad bei 0 °C mit 1.00 Äquivalent PPA (50 wt% in Dimethylformamid oder Ethylacetat) und 2.00 Äquivalenten Triethylamin versetzt. Der Ansatz wird über 24 Stunden gerührt und danach in Ethylacetat gegeben. Anschließend wird die organische Phase nacheinander mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung, Kaliumhydrogensulfat-Lösung (1M) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung (4x) gewaschen. Schließlich wird die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt <sup>[111]</sup>.

#### 7.1.2 Methode A2: Kupplung mit Thionylchlorid

Die Carbonsäure wird in Dichlormethan gelöst bzw. suspendiert, im Eisbad bei 0 °C mit Thionylchlorid (Überschuss) versetzt, anschließend langsam auf Raumtemperatur erwärmt und im Ölbad langsam auf 50-55 °C bis zum Reflux des Lösungsmittels erhitzt. Nach 3.5 Stunden Reaktionszeit (DC-Kontrolle!) wird das erhaltene, in Dichlormethan gelöste Säurechlorid über einen Zeitraum von ca. 45 Minuten langsam zu einer konzentrierten wässrigen Ammoniak-Lösung im Eisbad bei 0 °C getropft. Die organische Phase wird 3-4x mit Wasser gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt <sup>[29,63]</sup>.

7.1.3 Methode A3: Kupplung mit O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-Tetramethyluronium-Hexafluorophosphat (HBTU) bzw. O-(6-Chlorobenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-Tetramethyluronium-Hexafluorophosphat (HCTU)

1.00 Äquivalent der Carbonsäure wird in Dichlormethan oder Ethylacetat gelöst bzw. suspendiert und die Lösung bzw. Suspension im Eisbad auf 0 °C abgekühlt. 1.00 Äquivalent HBTU bzw. HCTU und 2.00 Äquivalente Diisopropylethylamin werden zugegeben und das Reaktionsgemisch 30-60 Minuten lang im Eisbad gerührt. Anschließend wird 1.00 Äquivalent des Aminosäureester-Hydrochlorids/-Tosylats bzw. des Amins zugegeben und die Reaktionsmischung über mehrere Tage gerührt. Die organische Phase wird nacheinander 3x mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung, Wasser, 3x mit Citronensäure-Lösung (10%) oder Kaliumhydrogensulfat-Lösung (1M), erneut mit Wasser und 3x mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt <sup>[47]</sup>.

7.1.4 Methode A4: Kupplung mit O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-Tetramethyluronium-Hexafluorophosphat (HBTU) bei Dicarbonsäuren

1.00 Äquivalent der Dicarbonsäure wird in Dichlormethan gelöst bzw. suspendiert und die Lösung bzw. die Suspension im Eisbad auf 0 °C abgekühlt. 2.00 Äquivalente HBTU und 4.00 Äquivalente Diisopropylethylamin werden zugegeben und das Reaktionsgemisch 60 Minuten lang im Eisbad gerührt. Anschließend werden 2.00 Äquivalente des Aminosäureester-Tosylats zugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt analog Methode A3 <sup>[47]</sup>.



## 7.2 Schutzgruppen

Literatur: <sup>[40]</sup>

### 7.2.1 Methode B1: Benzylester-Hydrolyse mit Lithiumhydroxid

Der Benzylester wird in Methanol gelöst, mit einem Überschuss an wässriger Lithiumhydroxid-Lösung (0.1M) versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wird in Wasser gegeben und 3x mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und mit Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wird mit 1 ml (2.0 mmol) Salzsäure (2M) versetzt, gerührt und mit Ethylacetat extrahiert. Diese organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Wasserphase wird mit 0.1M Lithiumhydroxid-Lösung auf pH 3-5 eingestellt, bis ein Feststoff ausfällt. Diese Lösung wird mit Dichlormethan und 3x mit Ethylacetat extrahiert. Diese organischen Phasen werden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt <sup>[18,65]</sup>.

### 7.2.2 Methode B2: Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonyl- (Boc-) bzw. 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl- (Pbf-) Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure (TFA)

Das Boc- bzw. Pbf-geschützte Aminosäure-Derivat wird in trockenem Dichlormethan gelöst, in einem Eisbad auf 0 °C abgekühlt und mit Trifluoressigsäure im Überschuss versetzt. Die Reaktionsmischung wird zunächst im Eisbad, anschließend bei Raumtemperatur gerührt und der Reaktionsverlauf mittels DC-Kontrolle verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion wird die Reaktionsmischung mehrmals mit Dichlormethan versetzt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, bis der Rückstand keine Trifluoressigsäure mehr enthält. Anschließend wird der Rückstand mit Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet <sup>[112]</sup>.

### 7.2.3 Methode B3: Abspaltung aromatischer Methoxy-Gruppen mit Bortribromid

Der Arylmethylether wird in trockenem Dichlormethan gelöst und bei ca.  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Ethanol in flüssigem Stickstoff) mit einem Überschuss an Bortribromid-Lösung (1M in Dichlormethan) versetzt. Der Ansatz wird mindestens 24 Stunden lang gerührt und schließlich bei Raumtemperatur mit Wasser versetzt, bis das Produkt ausfällt. Die wässrige Phase wird, je nach Löslichkeit des Produktes, mit Ethylacetat und/oder Dichlormethan extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt <sup>[67,90]</sup>.

## 7.3 Darstellung aromatischer Amidine aus den entsprechenden Nitrilen

### 7.3.1 Methode C1: Synthese von 4-Cyanozimtsäure mittels Knoevenagel-Kondensation

1.00 Äquivalent 4-Cyanobenzaldehyd und 2.00 Äquivalente Malonsäure werden in Pyridin gelöst, mit 0.2 Äquivalenten Piperidin versetzt und 4.5 Stunden lang unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen der Reaktionsmischung auf Raumtemperatur werden 50 ml halbkonzentrierte Salzsäure (5M) zugegeben, der dabei ausfallende weiße Feststoff abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet <sup>[52]</sup>.

### 7.3.2 Methode C2: Veresterung von 4-Cyanozimtsäure mit Ethanol über Thionylchlorid

Die durch Methode C1 erhaltene 4-Cyanozimtsäure wird in trockenem Dichlormethan suspendiert, im Eisbad auf  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  abgekühlt und mit Thionylchlorid (Überschuss) sowie wenigen Tropfen DMF (als Katalysator) versetzt. Die Reaktionsmischung wird 15 Minuten lang im Eisbad und 15 Minuten lang bei Raumtemperatur gerührt, anschließend langsam erwärmt und 2.5 Stunden lang unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen der Reaktionsmischung auf Raumtemperatur bzw. auf  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Eisbad wird ein Gemisch aus trockenem Ethanol (Überschuss) und Pyridin tropfenweise zugegeben, die Reaktionsmischung über Nacht gerührt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der erhaltene Feststoff (4-Cyanozimtsäureethylester) im Vakuum getrocknet <sup>[29,63]</sup>.

### 7.3.3 Methode C3: Synthese von Iminoethern (Imidoestern) aus Nitrilen (Pinner-Reaktion)

Der durch Methode C2 erhaltene 4-Cyanozimtsäureethylester wird in trockenem Ethanol gelöst und unter Kühlung in einem Aceton-Trockeneis-Bad wird mindestens 5 Minuten lang Chlorwasserstoffgas in die Lösung eingeleitet. Die Reaktionsmischung wird über Nacht gerührt und überschüssiges Chlorwasserstoff-Gas durch halbstündiges Einleiten von Argon in die Lösung entfernt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der erhaltene Feststoff (Iminoether-Hydrochlorid) mit Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet <sup>[59]</sup>.

### 7.3.4 Methode C4: Überführung von Iminoethern (Imidoestern) in Amidine

Das durch Methode C3 erhaltene Iminoether-Hydrochlorid wird in trockenem Ethanol gelöst, mit ethanolischer Ammoniak-Lösung (2M) versetzt und mindestens 2 Tage lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der erhaltene Feststoff (Amidin-Hydrochlorid) im Vakuum getrocknet <sup>[59]</sup>.

## 7.4 Synthese methoxylierter 2-Aminobenzothiazole aus den entsprechenden Anilin-Derivaten

### 7.4.1 Methode D:

1.00 Äquivalent des methoxylierten Anilins und 4.00 Äquivalente Kaliumthiocyanat werden in Eisessig gelöst und tropfenweise mit 1.00 Äquivalent Brom (in Eisessig) tropfenweise versetzt. Bei Wärmeentwicklung wird die Reaktionsmischung ggf. im Eisbad gekühlt und mindestens 10 Stunden lang (über Nacht) gerührt. Nach Ende der Reaktion wird das Gemisch filtriert, der Filtrückstand mit Wasser gewaschen und das Filtrat mit konzentrierter Ammoniak-Lösung neutralisiert. Der ausfallende Feststoff wird abfiltriert und im Vakuum getrocknet <sup>[34,101]</sup>.

## 7.5 Synthese von Diarylthioethern durch nucleophile aromatische Substitution ( $S_NAr$ )

### 7.5.1 Methode E1:

1.00 Äquivalent des Aryliodids, 1.00 Äquivalent des Arylthiols und 2.00 Äquivalente Kaliumcarbonat werden in Isopropanol gelöst bzw. suspendiert und nach Zusatz von 0.10 Äquivalenten Kupfer(I)-iodid und 2.00 Äquivalenten Ethylenglycol 2-3 Stunden lang (DC-Kontrolle!) in der Mikrowelle (*CEM<sup>®</sup> Discover*, 100-150 Watt, geschlossenes Gefäß) auf 80 °C erhitzt. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung versetzt und 3x mit Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt <sup>[50,97]</sup>.

### 7.5.2 Methode E2:

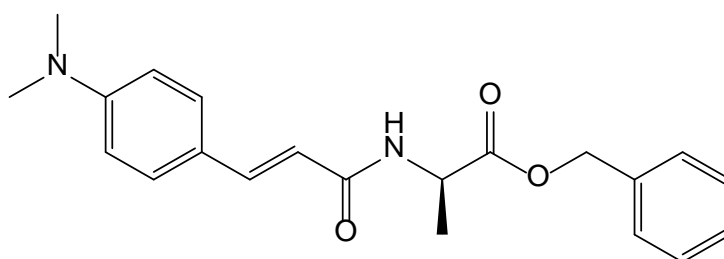
Das Chlorbenzol-Derivat, Mercaptobenzoessäure und Natriumhydroxid werden in DMF gelöst und 6-8 Stunden lang unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wird die abgekühlte Reaktionsmischung mit Salzsäure (3M) auf pH = 2 eingestellt, der ausfallende Feststoff abfiltriert, mehrfach mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet <sup>[10]</sup>.

## 8 SYNTHETISIERTE VERBINDUNGEN

### 8.1 Phenylacrylsäureamide

#### 8.1.1 (R,E)-Benzyl-2-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)propanoat (SH01)

Struktur:



Molare Masse: 352.43

Summenformel: C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Methode: A1

Ansatz: 301 mg (0.857 mmol) D-Alaninbenzylester-*p*-Tosylat, 164 mg (0.857 mmol) 4-Dimethylaminozimtsäure, 0.50 ml (0.857 mmol) PPA (50 wt% in Ethylacetat), 0.24 ml (1.714 mmol) Triethylamin, 10 ml Dimethylformamid.

Aufreinigung: Säulenchromatographie (n-Pentan/Ethylacetat = [3:1]-[1:2])

R<sub>f</sub>-Wert: 0.45 (Petrolether/Ethylacetat = [1:1])

Ausbeute: 121.1 mg (0.344 mmol, 40%), schwach gelblicher Feststoff

FT-IR:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3324.68, 1749.12, 1646.91, 1595.81, 1522.52, 1452.14, 1351.86, 1227.47, 1149.37.

<sup>1</sup>H-NMR: (400.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.48 (d, 3 H, *J* = 7.1 Hz, Ala-CH<sub>3</sub>), 3.01 (s, 6 H, Ph-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.80 (p, 1 H, *J* = 7.2 Hz, N-CH-COO), 5.16-5.24 (m, 2 H, COO-CH<sub>2</sub>-Ph), 6.09 (d, 1 H, *J* = 7.2 Hz, NH),

6.23 (d, 1 H,  $J = 15.5$  Hz, Ph-CH=CH-CONH), 6.70 (d, 2 H,  $J = 8.2$  Hz, Ph-CH), 7.31-7.38 (m, 5 H, Ph-CH), 7.41 (d, 2 H,  $J = 8.8$  Hz, Ph-CH), 7.57 (d, 1 H,  $J = 15.5$  Hz, Ph-CH=CH-CONH).

$^{13}\text{C-NMR}$ : (100.62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 18.87 (Ala-CH<sub>3</sub>), 40.28 (Ph-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 48.34 (N-CH-COO), 67.23 (COO-CH<sub>2</sub>-Ph), 112.01 (Ph-CH), 114.94 (Ph-CH=CH-CONH), 122.68 (Ph-Cq-CH=CH-CONH), 128.24, 128.52, 128.74, 129.54 (Ph-CH), 135.43 (Ph-Cq-CH<sub>2</sub>-OOC), 142.11 (Ph-CH=CH-CONH), 151.57 (Ph-CN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 166.33 (Ph-CH=CH-CONH), 173.39 (COO-CH<sub>2</sub>-Ph).

$[\alpha]_D^{20}$ :  $-65.7^\circ$  (1.065,  $\text{CHCl}_3$ )

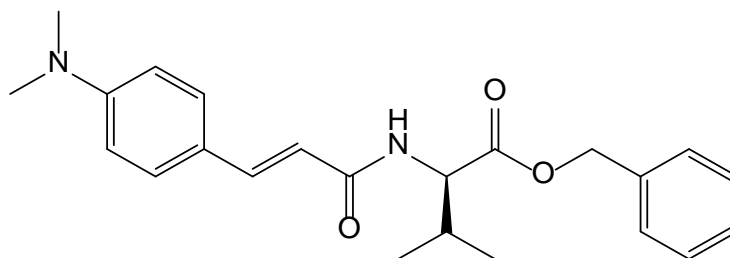
Schmelzpunkt: 150-151 °C

LOOP-ESI-MS:  $[\text{M}+\text{H}]^+$  353.3

HPLC:  $R_t = 2.4$ -2.6 min, Reinheit >99% (Methode: HPLC-MS-1)

8.1.2 (R,E)-Benzyl-2-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)-3-methylbutanoat (SH02)

Struktur:



Molare Masse: 380.48

Summenformel:  $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_3$

Methode: A1

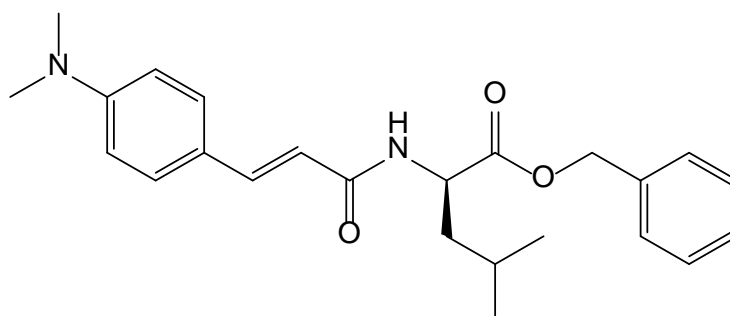
- Ansatz:* 325 mg (0.856 mmol) *D*-Valinbenzylester-*p*-Tosylat, 164 mg (0.857 mmol) 4-Dimethylaminozimtsäure, 0.50 ml (0.857 mmol) PPA (50 wt% in Dimethylformamid), 0.24 ml (1.714 mmol) Triethylamin, 10 ml Dimethylformamid.
- Aufreinigung:* Säulenchromatographie (*n*-Pentan/Ethylacetat = [9:1]-[3:1])
- R<sub>f</sub>-Wert:* 0.19 (Petrolether/Ethylacetat = [3:1])
- Ausbeute:* 77.9 mg (0.205 mmol, 24%), gelber bis orangefarbener Feststoff
- FT-IR:*  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3300.57, 3035.41, 2958.27, 2921.63, 2867.63, 1741.41, 1642.09, 1603.52, 1587.13, 1524.45, 1466.6, 1455.03, 1351.86, 1257.36, 1224.58, 1203.36, 1167.69, 1136.83.
- <sup>1</sup>H-NMR:* (400.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 0.91 (d, 3 H, *J* = 6.9 Hz, Val-CH<sub>3</sub>), 0.96 (d, 3 H, *J* = 6.9 Hz, Val-CH<sub>3</sub>), 2.23 (dq, 1 H, *J* = 11.6, 6.9 Hz, Val-CH), 3.01 (s, 6 H, Ph-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.79 (dd, 1 H, *J* = 8.9, 4.8 Hz, N-CH-COO), 5.16 (d, 1 H, *J* = 12.2 Hz, COO-CH<sub>2</sub>-Ph), 5.21 (d, 1 H, *J* = 12.2 Hz, COO-CH<sub>2</sub>-Ph), 5.98 (d, 1 H, *J* = 8.6 Hz, NH), 6.25 (d, 1 H, *J* = 15.5 Hz, Ph-CH=CH-CONH), 6.67 (d, 2 H, *J* = 8.9 Hz, Ph-CH), 7.32-7.38 (m, 5 H, Ph-CH), 7.41 (d, 2 H, *J* = 8.8 Hz, Ph-CH), 7.57 (d, 1 H, *J* = 15.5 Hz, Ph-CH=CH-CONH).
- <sup>13</sup>C-NMR:* (100.62 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 17.91, 19.14 (Val-CH<sub>3</sub>), 31.81 (Val-CH), 40.30 (Ph-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 57.17 (N-CH-COO), 67.15 (COO-CH<sub>2</sub>-Ph), 112.02 (Ph-CH), 115.03 (Ph-CH=CH-CONH), 122.71 (Ph-C<sub>q</sub>-CH=CH-CONH), 128.50, 128.56, 128.73, 129.55 (Ph-CH), 135.52 (Ph-C<sub>q</sub>-CH<sub>2</sub>-OOC), 142.23 (Ph-CH=CH-CONH), 151.59 (Ph-C-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 166.76 (Ph-CH=CH-CONH), 172.42 (COO-CH<sub>2</sub>-Ph).
- [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>:* -77.2° (1.052, CHCl<sub>3</sub>)
- Schmelzpunkt:* 108-110 °C

*LOOP-ESI-MS:* [M+H]<sup>+</sup> 380.4

*HPLC:* R<sub>t</sub> = 3.8-4.2 min, Reinheit >99% (Methode: HPLC-MS-2)

8.1.3 (R,E)-Benzyl-2-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)-4-methylpentanoat (SH03)

*Struktur:*



*Molare Masse:* 394.51

*Summenformel:* C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

*Methode:* A1

*Ansatz:* 337 mg (0.856 mmol) D-Leucinbenzylester-*p*-Tosylat, 164 mg (0.857 mmol) 4-Dimethylaminozimtsäure, 0.50 ml (0.857 mmol) PPA (50 wt% in Dimethylformamid), 0.24 ml (1.714 mmol) Triethylamin, 10 ml Dimethylformamid.

*Aufreinigung:* Säulenchromatographie (Petrolether/Ethylacetat = [4:1]-[2:1])

*R<sub>f</sub>-Wert:* 0.21 (Petrolether/Ethylacetat = [3:1])

*Ausbeute:* 176.1 mg (0.447 mmol, 52%), hochviskoses, gelbes Öl

*FT-IR:*  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3600.45, 3263.93, 3034.44, 2950.55, 2868.59, 1743.33, 1644.98, 1594.84, 1524.45, 1444.42, 1349.93, 1231.33, 1163.83.



$^1\text{H-NMR}$ : (400.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 0.94 (dd, 6 H,  $J = 9.7, 6.2$  Hz, Leu- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$ ), 1.59-1.76 (m, 3 H, Leu- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$ - $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ ), 3.01 (s, 6 H, Ph-N( $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$ ) $_2$ ), 4.85 (td, 1 H,  $J = 8.7, 5.0$  Hz, N- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ -COO), 5.18 (s, 2 H, COO- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$ -Ph), 5.89 (d, 1 H,  $J = 8.4$  Hz, N $\underline{\text{H}}$ ), 6.22 (d, 1 H,  $J = 15.5$  Hz, Ph-CH= $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ -CONH), 6.66 (d, 2 H,  $J = 8.9$  Hz, Ph- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ ), 7.30-7.38 (m, 5 H, Ph- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ ), 7.39 (d, 2 H,  $J = 8.8$  Hz, Ph- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ ), 7.57 (d, 1 H,  $J = 15.5$  Hz, Ph- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ =CH-CONH).

$^{13}\text{C-NMR}$ : (100.62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 22.17, 22.98 (Leu- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$ ), 25.03 (Leu- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ ), 40.29 (Ph-N( $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$ ) $_2$ ), 42.13 (Leu- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$ ), 51.01 (N- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ -COO), 67.15 (COO- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$ -Ph), 112.01 (Ph- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ ), 114.88 (Ph-CH= $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ -CONH), 122.70 (Ph- $\underline{\text{C}}\underline{\text{q}}$ -CH=CH-CONH), 128.34, 128.48, 128.71, 129.54 (Ph- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ ), 135.58 (Ph- $\underline{\text{C}}\underline{\text{q}}$ -CH $_2$ -OOC), 142.25 (Ph- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ =CH-CONH), 151.58 (Ph- $\underline{\text{C}}$ -N( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 166.59 (Ph-CH=CH- $\underline{\text{C}}\underline{\text{O}}\underline{\text{N}}\underline{\text{H}}$ ), 173.42 ( $\underline{\text{C}}\underline{\text{O}}\underline{\text{O}}$ -CH $_2$ -Ph).

$[\alpha]_D^{20}$ :  $-51.5^\circ$  (1.035,  $\text{CHCl}_3$ )

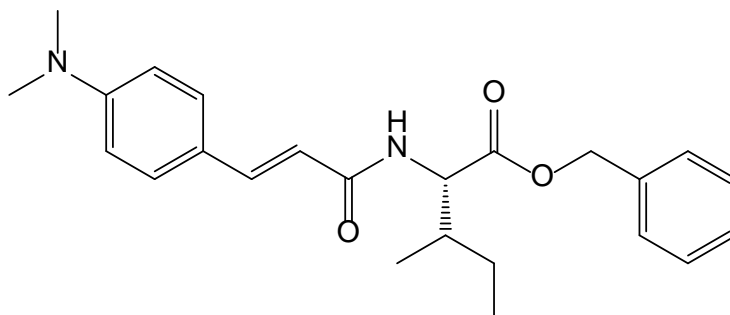
Schmelzpunkt:  $85^\circ\text{C}$

ESI-MS:  $[\text{M}+\text{H}]^+$  395.19, 396.22,  $[2\text{M}+\text{H}]^+$  789.42, 790.43

HPLC:  $R_t = 28.4$  min, Reinheit: 72% (Methode: HPLC-2)

8.1.4 (2S,3R)-Benzyl-2-((E)-3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)-3-methylpentanoat (SH04)

Struktur:



---

<i>Molare Masse:</i>	394.51
<i>Summenformel:</i>	C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
<i>Methode:</i>	A1
<i>Ansatz:</i>	337 mg (0.856 mmol) <i>L</i> -Isoleucinbenzylester- <i>p</i> -Tosylat, 164 mg (0.857 mmol) 4-Dimethylaminozimtsäure, 0.50 ml (0.857 mmol) PPA (50 wt% in Dimethylformamid), 0.24 ml (1.714 mmol) Triethylamin, 10 ml Dimethylformamid.
<i>Aufreinigung:</i>	Säulenchromatographie ( <i>n</i> -Pentan/Ethylacetat = [9:1]-[3:1])
<i>R<sub>f</sub>-Wert:</i>	0.21 (Petrolether/Ethylacetat = [3:1])
<i>Ausbeute:</i>	172.6 mg (0.438 mmol, 51%), hochviskoses, gelbes Öl
<i>FT-IR:</i>	$\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3313.11, 3056.62, 3034.44, 2965.98, 2950.55, 2923.56, 2869.56, 1742.37, 1638.23, 1602.56, 1518.67, 1455.03, 1354.75, 1317.14, 1267.97, 1230.36, 1181.91, 1144.55.
<i><sup>1</sup>H-NMR:</i>	(400.13 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ (ppm) = 0.88-0.94 (m, 6 H, Ile- <u>CH</u> <sub>3</sub> ), 1.19 (ddt, <i>J</i> = 16.3, 14.4, 7.3 Hz, 1 H, Ile- <u>CH</u> <sub>2</sub> ), 1.39-1.50 (m, 1 H, Ile- <u>CH</u> <sub>2</sub> ), 1.90-2.01 (m, 1 H, Ile- <u>CH</u> ), 3.01 (s, 6 H, Ph-N( <u>CH</u> <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 4.82 (dd, 1 H, <i>J</i> = 8.7, 4.9 Hz, N- <u>CH</u> -COO), 5.16 (d, 1 H, <i>J</i> = 12.2 Hz, COO- <u>CH</u> <sub>2</sub> -Ph), 5.22 (d, 1 H, <i>J</i> = 12.2 Hz, COO- <u>CH</u> <sub>2</sub> -Ph), 6.01 (d, 1 H, <i>J</i> = 8.7 Hz, N <u>H</u> ), 6.24 (d, 1 H, <i>J</i> = 15.5 Hz, Ph-CH= <u>CH</u> -CONH), 6.67 (d, 2 H, <i>J</i> = 8.8 Hz, Ph- <u>CH</u> ), 7.32-7.38 (m, 5 H, Ph- <u>CH</u> ), 7.40 (d, 2 H, <i>J</i> = 8.8 Hz, Ph- <u>CH</u> ), 7.57 (d, 1 H, <i>J</i> = 15.5 Hz, Ph- <u>CH</u> =CH-CONH).
<i><sup>13</sup>C-NMR:</i>	(100.62 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ (ppm) = 11.73 (Ile- $\gamma$ - <u>C</u> H <sub>3</sub> ), 15.63 (Ile- $\beta$ - <u>C</u> H <sub>3</sub> ), 25.34 (Ile- <u>C</u> H <sub>2</sub> ), 38.52 (Ile- <u>C</u> H), 40.31 (Ph-N( <u>C</u> H <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 56.59 (N- <u>C</u> H-COO), 67.11 (COO- <u>C</u> H <sub>2</sub> -Ph), 112.03 (Ph- <u>C</u> H), 115.06 (Ph-CH= <u>C</u> H-CONH), 122.74 (Ph- <u>C</u> <sub>q</sub> -CH=CH-CONH), 128.50,

128.54, 128.72, 129.54, 131.40 (Ph-CH), 135.53 (Ph-C<sub>q</sub>-CH<sub>2</sub>-OOC),  
142.18 (Ph-CH=CH-CONH), 151.57 (Ph-C-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 166.58 (Ph-  
CH=CH-CONH), 172.38 (COO-CH<sub>2</sub>-Ph).

$[\alpha]_D^{20}$ : +67.3° (1.027, CHCl<sub>3</sub>)

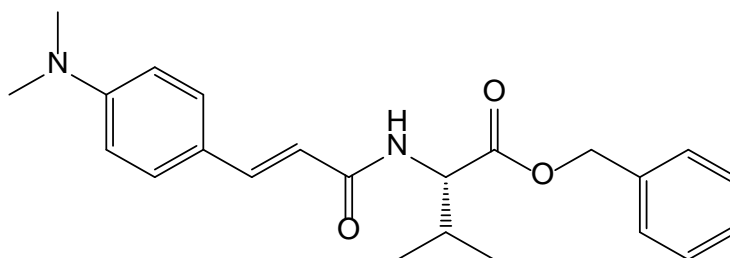
*Schmelzpunkt*: 88 °C

*LOOP-ESI-MS*: [M+H]<sup>+</sup> 394.5

*HPLC*: R<sub>t</sub> = 4.6-4.9 min, Reinheit >99% (Methode: HPLC-MS-2)

8.1.5 (S,E)-Benzyl-2-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)-3-methylbutanoat  
(SH05)

*Struktur*:



*Molare Masse*: 380.48

*Summenformel*: C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

*Methode*: A1

*Ansatz*: 209 mg (0.858 mmol) L-Valinbenzylester-Hydrochlorid, 164 mg (0.857 mmol) 4-Dimethylaminozimtsäure, 0.50 ml (0.857 mmol) PPA (50 wt% in Dimethylformamid), 0.24 ml (1.714 mmol) Triethylamin, 10 ml Dimethylformamid.

*Aufreinigung*: Säulenchromatographie (n-Pentan/Ethylacetat = [9:1]-[3:1])

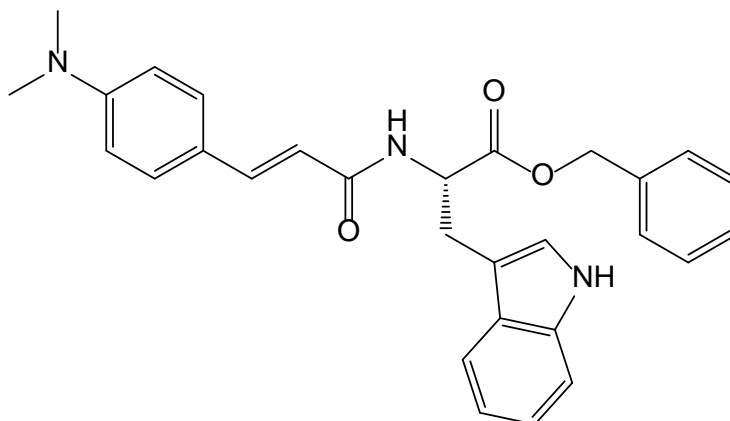
*R<sub>f</sub>-Wert*: 0.28 (n-Pentan/Ethylacetat = [3:1])

---

<i>Ausbeute:</i>	202.7 mg (0.533 mmol, 62%), gelber bis orangefarbener Feststoff
<i>FT-IR:</i>	$\tilde{\nu}$ [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3303.46, 3035.41, 2953.45, 2866.67, 1741.41, 1641.13, 1602.56, 1523.49, 1465.63, 1350.89, 1258.32, 1224.58, 1203.36, 1170.58, 1136.83.
<i><sup>1</sup>H-NMR:</i>	(400.13 MHz, $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$ (ppm) = 0.91 (d, 3 H, $J = 6.9$ Hz, Val- <u>CH</u> <sub>3</sub> ), 0.96 (d, 3 H, $J = 6.9$ Hz, Val- <u>CH</u> <sub>3</sub> ), 2.18-2.28 (m, 1 H, Val- <u>CH</u> ), 3.01 (s, 6 H, Ph-N( <u>CH</u> <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 4.79 (dd, 1 H, $J = 8.8, 4.8$ Hz, N- <u>CH</u> -COO), 5.17 (d, 1 H, $J = 12.2$ Hz, COO- <u>CH</u> <sub>2</sub> -Ph), 5.21 (d, 1 H, $J = 12.2$ Hz, COO- <u>CH</u> <sub>2</sub> -Ph), 5.99 (d, 1 H, $J = 8.8$ Hz, <u>NH</u> ), 6.26 (d, 1 H, $J = 15.5$ Hz, Ph-CH= <u>CH</u> -CONH), 6.70 (d, 2 H, $J = 8.2$ Hz, Ph- <u>CH</u> ), 7.32-7.38 (m, 5 H, Ph- <u>CH</u> ), 7.41 (d, 2 H, $J = 8.8$ Hz, Ph- <u>CH</u> ), 7.57 (d, 1 H, $J = 15.5$ Hz, Ph- <u>CH</u> =CH-CONH).
<i><sup>13</sup>C-NMR:</i>	(100.62 MHz, $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$ (ppm) = 17.91, 19.14 (Val- <u>CH</u> <sub>3</sub> ), 31.80 (Val- <u>CH</u> ), 40.32 (Ph-N( <u>CH</u> <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 57.16 (N- <u>CH</u> -COO), 67.14 (COO- <u>CH</u> <sub>2</sub> -Ph), 112.04 (Ph- <u>CH</u> ), 115.06 (Ph-CH= <u>CH</u> -CONH), 122.74 (Ph- <u>C</u> <sub>q</sub> -CH=CH-CONH), 128.49, 128.54, 128.72, 129.54 (Ph- <u>CH</u> ), 135.52 (Ph- <u>C</u> <sub>q</sub> -CH <sub>2</sub> -OOC), 142.20 (Ph- <u>CH</u> =CH-CONH), 151.55 (Ph- <u>C</u> -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 166.73 (Ph-CH=CH- <u>C</u> ONH), 172.40 ( <u>C</u> OO-CH <sub>2</sub> -Ph).
<i><math>[\alpha]_D^{20}</math>:</i>	+85.3° (1.058, $\text{CHCl}_3$ )
<i>Schmelzpunkt:</i>	109-111 °C
<i>LOOP-ESI-MS:</i>	$[\text{M}+\text{H}]^+$ 381.4
<i>HPLC:</i>	$R_t = 10.9$ -11.3 min, Reinheit >99% (Methode: HPLC-MS-4)

8.1.6 (S,E)-Benzyl-2-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)-3-(1H-indol-3-yl)propanoat (SH06)

Struktur:



Molare Masse: 467.56

Summenformel: C<sub>29</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

Methode: A1

Ansatz: 252 mg (0.856 mmol) *L*-Tryptophanbenzylester-Hydrochlorid, 164 mg (0.857 mmol) 4-Dimethylaminozimtsäure (0.587 mmol), 0.50 ml (0.857 mmol) PPA (50 wt% in Ethylacetat), 0.24 ml (1.714 mmol) Triethylamin, 20 ml Dimethylformamid.

Aufreinigung: Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = [199:1]-[19:1])

R<sub>f</sub>-Wert: 0.08 (Dichlormethan)

Ausbeute: 216.9 mg (0.464 mmol, 54%), gelber Feststoff

FT-IR:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3380.6, 3256.22, 2922.59, 1725.98, 1655.59, 1593.88, 1522.52, 1432.85, 1352.82, 1237.11, 1168.65.

<sup>1</sup>H-NMR: (400.13 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 2.94 (s, 6 H, Ph-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.18 (ddd, 2 H, *J* = 22.8, 14.6, 7.2 Hz, Trp-CH<sub>2</sub>), 4.71 (dd, 1 H, *J* = 14.1, 7.8 Hz, N-CH-COO), 5.03 (d, 1 H, *J* = 12.6 Hz, COO-CH<sub>2</sub>-Ph), 5.09

(d, 1 H,  $J = 12.6$  Hz, COO-CH<sub>2</sub>-Ph), 6.45 (d, 1 H,  $J = 15.7$  Hz, Ph-CH=CH-CONH), 6.71 (d, 2 H,  $J = 8.9$  Hz, Ar-CH), 6.96-7.02 (m, 1 H, Ar-CH), 7.05-7.11 (m, 1 H, Ar-CH), 7.16 (d, 1 H,  $J = 2.2$  Hz, Ar-CH), 7.18-7.22 (m, 2 H, Ar-CH), 7.28-7.32 (m, 4 H, Ar-CH), 7.34 (d, 1 H,  $J = 4.1$  Hz, Ph-CH=CH-CONH), 7.38 (d, 2 H,  $J = 8.8$  Hz, Ar-CH), 7.52 (d, 1 H, 7.9 Hz, Ar-CH), 8.37 (d, 1H,  $J = 7.5$  Hz, CONH), 10.87 (d, 1 H,  $J = 1.2$  Hz, Indol-NH).

<sup>13</sup>C-NMR: (100.62 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 27.34 (Trp-CH<sub>2</sub>), 39.71 (Ph-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 53.41 (N-CH-COO), 65.91 (COO-CH<sub>2</sub>-Ph), 109.46 (Ar-C<sub>q</sub>), 111.49 (Ar-CH), 111.99 (Ar-CH), 115.83 (Ph-CH=CH-CONH), 118.06 (Ar-CH), 118.49 (Ar-CH), 121.04 (Ar-CH), 122.19 (Ph-C<sub>q</sub>-CH=CH-CONH), 123.74 (Ar-CH), 127.09 (Ar-C<sub>q</sub>), 127.69, 127.96, 128.36, 128.99 (Ar-CH), 135.87 (Ph-C<sub>q</sub>-CH<sub>2</sub>-OOC), 136.89 (Ar-C<sub>q</sub>), 140.01 (Ph-CH=CH-CONH), 151.22 (Ph-C-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 165.89 (Ph-CH=CH-CONH), 172.17 (COO-CH<sub>2</sub>-Ph).

$[\alpha]_D^{20}$ : +105.6° (0.517, CHCl<sub>3</sub>)

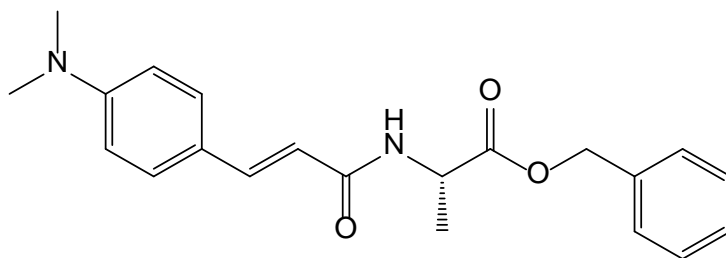
Schmelzpunkt: 214-216 °C

LOOP-ESI-MS: [M+H]<sup>+</sup> 468.3, 468.4

HPLC: 4.2-4.5 min, Reinheit >99% (Methode: HPLC-MS-1)

8.1.7 (S,E)-Benzyl-2-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)propanoat (SH07)

Struktur:



- Molare Masse:* 352.43
- Summenformel:* C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>
- Methode:* A1
- Ansatz:* 301 mg (0.857 mmol) *L*-Alaninbenzylester-*p*-Tosylat, 164 mg (0.857 mmol) 4-Dimethylaminozimtsäure, 0.50 ml (0.857 mmol) PPA (50 wt% in Ethylacetat), 0.24 ml (1.714 mmol) Triethylamin, 20 ml Dimethylformamid, 25 ml Ethylacetat.
- Aufreinigung:* Säulenchromatographie (*n*-Pentan/Ethylacetat = [3:1]-[1:2])
- R<sub>f</sub>-Wert:* 0.71 (*n*-Pentan/Ethylacetat = [2.5:1])
- Ausbeute:* 118.7 mg (0.337 mmol, 39%), schwach gelblicher Feststoff
- FT-IR:*  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3334.32, 1749.12, 1647.88, 1595.81, 1522.52, 1452.14, 1352.82, 1228.43, 1150.33.
- <sup>1</sup>H-NMR:* (400.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.48 (d, 3 H, *J* = 7.1 Hz, Ala-CH<sub>3</sub>), 3.01 (s, 6 H, Ph-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.80 (p, 1 H, *J* = 7.2 Hz, N-CH-COO), 5.16-5.24 (m, 2 H, COO-CH<sub>2</sub>-Ph), 6.09 (d, 1 H, *J* = 7.3 Hz, NH), 6.23 (d, 1 H, *J* = 15.5 Hz, Ph-CH=CH-CONH), 6.72 (d, 2 H, *J* = 7.7 Hz, Ph-CH), 7.31-7.38 (m, 5 H, Ph-CH), 7.40 (d, 2 H, *J* = 8.8 Hz, Ph-CH), 7.57 (d, 1 H, *J* = 15.5 Hz, Ph-CH=CH-CONH).
- <sup>13</sup>C-NMR:* (100.62 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 18.85 (Ala-CH<sub>3</sub>), 40.33 (Ph-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 48.34 (N-CH-COO), 67.22 (COO-CH<sub>2</sub>-Ph), 112.08 (Ph-CH), 115.02 (Ph-CH=CH-CONH), 122.79 (Ph-C<sub>q</sub>-CH=CH-

CONH), 128.23, 128.51, 128.73, 129.52 (Ph-CH), 135.54 (Ph-C<sub>q</sub>-CH<sub>2</sub>-OOC), 142.06 (Ph-CH=CH-CONH), 151.48 (Ph-C-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 166.31 (Ph-CH=CH-CONH), 173.38 (COO-CH<sub>2</sub>-Ph).

$[\alpha]_D^{20}$ : +66.7° (1.019, CHCl<sub>3</sub>)

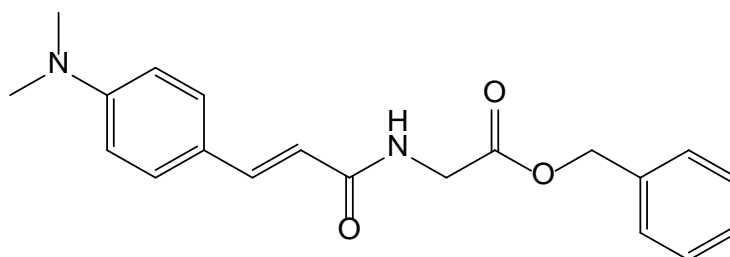
Schmelzpunkt: 150-151 °C

LOOP-ESI-MS: [M+H]<sup>+</sup> 353.3

HPLC: R<sub>t</sub> = 2.9-3.3 min, Reinheit >99% (Methode: HPLC-MS-1)

#### 8.1.8 (E)-Benzyl-2-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)acetat (SH08)

Struktur:



Molare Masse: 338.40

Summenformel: C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Methode: A1

Ansatz: 578 mg (1.713 mmol) Glycinbenzylester-*p*-Tosylat, 328 mg (1.714 mmol) 4-Dimethylaminozimtsäure, 1.00 ml (1.714 mmol) PPA (50 wt% in Ethylacetat), 0.48 ml (3.43 mmol) Triethylamin, 20 ml Dimethylformamid.

Aufreinigung: Säulenchromatographie (*n*-Pentan/Ethylacetat = [3:1]-[1:2])

R<sub>f</sub>-Wert: 0.40 (*n*-Pentan/Ethylacetat = [2:1])

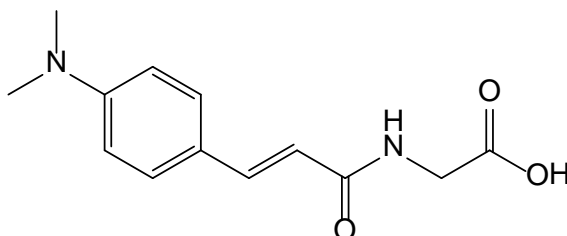
Ausbeute: 169.4 mg (0.501 mmol, 29%), gelblicher Feststoff



- FT-IR:*  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3270.68, 2936.09, 1757.8, 1657.52, 1644.02, 1600.63, 1551.45, 1525.42, 1405.85, 1390.42, 1356.68, 1254.47, 1233.25, 1166.72.
- <sup>1</sup>H-NMR:* (400.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.01 (s, 6 H,  $\text{Ph-N}(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_2$ ), 4.23 (d, 2 H,  $J = 5.2$  Hz,  $\text{N-}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{-COO}$ ), 5.22 (s, 2 H,  $\text{COO-}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{-Ph}$ ), 6.01 (s, 1 H,  $\underline{\text{N}}\underline{\text{H}}$ ), 6.25 (d, 1 H,  $J = 15.5$  Hz,  $\text{Ph-CH=}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{-CONH}$ ), 6.71 (d, 2 H,  $J = 8.1$  Hz,  $\text{Ph-}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ ), 7.33-7.39 (m, 5 H,  $\text{Ph-}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ ), 7.41 (d, 2 H,  $J = 8.8$  Hz,  $\text{Ph-}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ ), 7.58 (d, 1 H,  $J = 15.5$  Hz,  $\text{Ph-}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{-CH-CONH}$ ).
- <sup>13</sup>C-NMR:* (100.62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 40.33 ( $\text{Ph-N}(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_2$ ), 41.74 ( $\text{N-}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{-COO}$ ), 67.30 ( $\text{COO-}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{-Ph}$ ), 112.08 ( $\text{Ph-}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ ), 114.68 ( $\text{Ph-CH=}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{-CONH}$ ), 122.71 ( $\text{Ph-}\underline{\text{C}}\underline{\text{q}}\text{-CH=CH-CONH}$ ), 128.48, 128.62, 128.76, 129.57 ( $\text{Ph-}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ ), 135.35 ( $\text{Ph-}\underline{\text{C}}\underline{\text{q}}\text{-CH}_2\text{-OOC}$ ), 142.29 ( $\text{Ph-}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{-CH=CH-CONH}$ ), 151.54 ( $\text{Ph-}\underline{\text{C}}\text{-N}(\text{CH}_3)_2$ ), 166.95 ( $\text{Ph-CH=CH-}\underline{\text{C}}\underline{\text{O}}\underline{\text{N}}\underline{\text{H}}$ ), 170.34 ( $\underline{\text{C}}\underline{\text{O}}\underline{\text{O}}\text{-CH}_2\text{-Ph}$ ).
- Schmelzpunkt:* 149-150 °C
- LOOP-ESI-MS:*  $[\text{M}+\text{H}]^+$  339.3, 339.2
- HPLC:*  $R_t = 2.5\text{-}2.8$  min, Reinheit >99% (Methode: HPLC-MS-1)

### 8.1.9 (E)-2-(3-(4-(Dimethylamino)phenyl)acrylamido)essigsäure (SH08a)

*Struktur:*

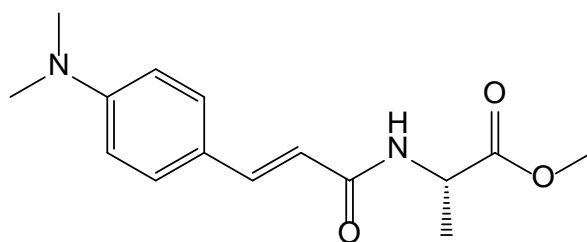


*Molare Masse:* 248.28

*Summenformel:*  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$

---

<i>Methode:</i>	B1
<i>Ansatz:</i>	100.2 mg (0.296 mmol) <b>SH08</b> , 3.5 ml (0.35 mmol) wässrige Lithiumhydroxid-Lösung (0.1 M), 15 ml Methanol.
<i>Aufreinigung:</i>	Säulenchromatographie ( <i>n</i> -Pentan/Ethylacetat = [1:1]-[0:1], anschließend Dichlormethan/Methanol = [9:1]-[1:2])
<i>Ausbeute:</i>	66.1 mg (0.257 mmol, 90%), orangefarbener bis roter Feststoff
<i>FT-IR:</i>	$\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3400.85, 3297.68, 2920.66, 1644.98, 1574.59, 1525.42, 1443.46, 1408.75, 1355.71, 1305.57, 1243.33, 1184.08.
<i><sup>1</sup>H-NMR:</i>	(400.13 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ): $\delta$ (ppm) = 2.91 (s, 6 H, Ph-N( <u>CH</u> <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 3.67 (d, 2 H, <i>J</i> = 4.5 Hz, N- <u>CH</u> <sub>2</sub> -COOH), 6.59 (d, 1 H, <i>J</i> = 15.7 Hz, Ph-CH= <u>CH</u> -CONH), 6.67 (d, 2 H, <i>J</i> = 8.9 Hz, Ph- <u>CH</u> ), 7.29 (d, 1 H, <i>J</i> = 15.6 Hz, Ph- <u>CH</u> =CH-CONH), 7.38 (d, 2 H, <i>J</i> = 8.8 Hz, Ph- <u>CH</u> ), 7.74 (s, 1 H, <u>NH</u> ).
<i><sup>13</sup>C-NMR:</i>	(100.62 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ): $\delta$ (ppm) = 39.72 (Ph-N( <u>C</u> H <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 43.85 (N- <u>CH</u> <sub>2</sub> -COO), 112.00 (Ph- <u>CH</u> ), 117.31 (Ph-CH= <u>CH</u> -CONH), 122.63 (Ph- <u>C</u> <sub>q</sub> -CH=CH-CONH), 128.89 (Ph- <u>CH</u> ), 138.81 (Ph- <u>CH</u> =CH-CONH), 151.00 (Ph- <u>C</u> -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 165.40 (Ph-CH=CH- <u>C</u> ONH), 173.78 ( <u>C</u> OOH).
<i>ESI-MS:</i>	[M+Na] <sup>+</sup> 271.10, [2M+Na] <sup>+</sup> 519.23
<i>Reinheit:</i>	>90% ( <sup>1</sup> H-NMR)
8.1.10	( <i>S,E</i> )-Methyl-2-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)propanoat (SH10)
<i>Struktur:</i>	



- Molare Masse:* 276.33
- Summenformel:* C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>
- Methode:* A1
- Ansatz:* 239.2 mg (1.713 mmol) *L*-Alaninmethylester-Hydrochlorid, 328 mg (1.714 mmol) 4-Dimethylaminozimtsäure, 1.00 ml (1.714 mmol) PPA (50 wt% in Ethylacetat), 0.48 ml (3.43 mmol) Triethylamin, 20 ml Dimethylformamid.
- Aufreinigung:* Säulenchromatographie (*n*-Pentan/Ethylacetat = [3:1]-[1:2])
- R<sub>f</sub>-Wert:* 0.30 (*n*-Pentan/Ethylacetat = [2:1])
- Ausbeute:* 20.1 mg (0.073 mmol, 4%), gelber Feststoff
- FT-IR:*  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3271.64, 3066.26, 2937.06, 1736.58, 1644.02, 1602.56, 1540.85, 1439.6, 1347.03, 1205.29, 1107.9.
- <sup>1</sup>H-NMR:* (400.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.47 (d, 3 H, *J* = 7.1 Hz, Ala-CH<sub>3</sub>), 3.01 (s, 6 H, Ph-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.77 (s, 3 H, COO-CH<sub>3</sub>), 4.75 (p, 1 H, *J* = 7.2 Hz, N-CH-COO), 6.09 (d, 1 H, *J* = 7.2 Hz, NH), 6.24 (d, 1 H, *J* = 15.5 Hz, Ph-CH=CH-CONH), 6.73 (d, 2 H, *J* = 6.3 Hz, Ph-CH), 7.41 (d, 2 H, *J* = 8.8 Hz, Ph-CH), 7.57 (d, 1 H, *J* = 15.5 Hz, Ph-CH=CH-CONH).
- <sup>13</sup>C-NMR:* (100.62 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 18.94 (Ala-CH<sub>3</sub>), 40.67 (Ph-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 48.26 (N-CH-COO), 52.62 (COO-CH<sub>3</sub>), 112.56 (Ph-CH), 115.44 (Ph-CH=CH-CONH), 129.56 (Ph-CH), 141.99 (Ph-CH=CH-

CONH), 151.20 (Ph-C-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 166.18 (Ph-CH=CH-CONH),  
173.99 (COO-CH<sub>3</sub>).

$[\alpha]_D^{20}$ : +44.3° (0.733, CHCl<sub>3</sub>)

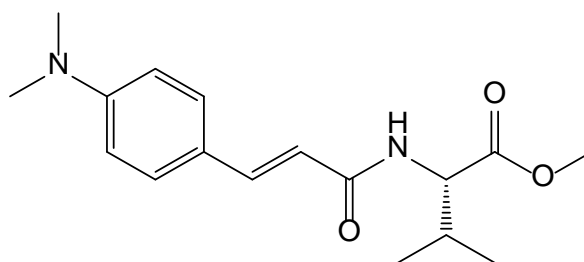
*Schmelzpunkt*: 129-131 °C

*LOOP-ESI-MS*: [M+H]<sup>+</sup> 277.2

*HPLC*: R<sub>t</sub> = 1.5-1.8 min, Reinheit >99% (Methode: HPLC-MS-1)

8.1.11 (S,E)-Methyl-2-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)-3-methylbutanoat  
(SH11)

*Struktur*:



*Molare Masse*: 304.38

*Summenformel*: C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

*Methode*: A1

*Ansatz*: 143.5 mg (0.856 mmol) *L*-Valinmethylester-Hydrochlorid, 164 mg (0.857 mmol) 4-Dimethylaminozimtsäure, 0.50 ml (0.857 mmol) PPA (50 wt% in Ethylacetat), 0.24 ml (1.714 mmol) Triethylamin, 10 ml Dimethylformamid.

*Aufreinigung*: Säulenchromatographie (*n*-Pentan/Ethylacetat = [2:1]-[1:2])

*R<sub>f</sub>-Wert*: 0.57 (*n*-Pentan/Ethylacetat = [2:1])

*Ausbeute*: 67.7 mg (0.223 mmol, 26%), farbloser bis gelblicher Feststoff

*FT-IR:*  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3304.43, 2966.95, 1741.41, 1646.91, 1595.81, 1523.49, 1431.89, 1357.64, 1254.47, 1223.61, 1186.01, 1167.69, 1146.47.

*$^1\text{H-NMR}$ :* (400.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 0.97 (dd, 6 H,  $J = 12.3, 6.9$  Hz, Val- $\text{CH}_3$ ), 2.22 (tt, 1 H,  $J = 8.6, 3.5$  Hz, Val- $\text{CH}$ ), 3.02 (s, 6 H, Ph- $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 3.76 (s, 3 H,  $\text{COO-CH}_3$ ), 4.73 (dd, 1 H,  $J = 8.8, 5.0$  Hz, N- $\text{CH-COO}$ ), 5.99 (d, 1 H,  $J = 8.4$  Hz, N $\text{H}$ ), 6.28 (d, 1 H,  $J = 15.5$  Hz, Ph- $\text{CH=CH-CONH}$ ), 6.77 (s, 2 H, Ph- $\text{CH}$ ), 7.43 (d, 2 H,  $J = 8.8$  Hz, Ph- $\text{CH}$ ), 7.57 (d, 1 H,  $J = 15.5$  Hz, Ph- $\text{CH=CH-CONH}$ ).

*$^{13}\text{C-NMR}$ :* (100.62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 18.06, 19.10 (Val- $\text{CH}_3$ ), 31.71 (Val- $\text{CH}$ ), 40.35 (Ph- $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 52.22 ( $\text{COO-CH}_3$ ), 57.19 (N- $\text{CH-COO}$ ), 112.10 (Ph- $\text{CH}$ ), 115.11 (Ph- $\text{CH=CH-CONH}$ ), 122.82 (Ph- $\text{C}_q\text{-CH=CH-CONH}$ ), 129.53 (Ph- $\text{CH}$ ), 142.16 (Ph- $\text{CH=CH-CONH}$ ), 151.47 (Ph- $\text{C-N}(\text{CH}_3)_2$ ), 166.69 (Ph- $\text{CH=CH-CONH}$ ), 172.99 ( $\text{COO-CH}_3$ ).

$[\alpha]_D^{20}$ : +69.1° (1.013,  $\text{CHCl}_3$ )

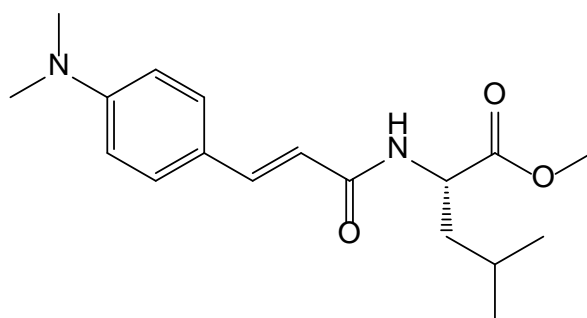
*Schmelzpunkt:* 124-125 °C

*LOOP-ESI-MS:*  $[\text{M}+\text{H}]^+$  305.2

*HPLC:*  $R_t = 2.1\text{-}2.6$  min, Reinheit >99% (Methode: HPLC-MS-1)

8.1.12 (S,E)-Methyl-2-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)-4-methylpentanoat (SH12)

*Struktur:*



---

<i>Molare Masse:</i>	318.41
<i>Summenformel:</i>	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
<i>Methode:</i>	A1
<i>Ansatz:</i>	155.7 mg (0.857 mmol) <i>L</i> -Leucinmethylester-Hydrochlorid, 164 mg (0.857 mmol) 4-Dimethylaminozimtsäure, 0.50 ml (0.857 mmol) PPA (50 wt% in Ethylacetat), 0.24 ml (1.714 mmol) Triethylamin, 10 ml Dimethylformamid.
<i>Aufreinigung:</i>	Säulenchromatographie ( <i>n</i> -Pentan/Ethylacetat = [2:1]-[1:1])
<i>R<sub>f</sub>-Wert:</i>	0.61 ( <i>n</i> -Pentan/Ethylacetat = [2:1])
<i>Ausbeute:</i>	125.4 mg (0.394 mmol, 46%), gelber Feststoff
<i>FT-IR:</i>	$\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3286.11, 2953.45, 1741.41, 1645.95, 1594.84, 1523.49, 1433.82, 1350.89, 1165.76.
<i><sup>1</sup>H-NMR:</i>	(400.13 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ (ppm) = 0.97 (dd, 6 H, <i>J</i> = 8.7, 6.2 Hz, Leu- <u>CH</u> <sub>3</sub> ), 1.61 (dd, 1 H, <i>J</i> = 12.9, 5.2 Hz, Leu- <u>CH</u> ), 1.66-1.74 (m, 2 H, Leu- <u>CH</u> <sub>2</sub> ), 3.02 (s, 6 H, Ph-N( <u>CH</u> <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 3.75 (s, 3 H, COO- <u>CH</u> <sub>3</sub> ), 4.80 (td, 1 H, <i>J</i> = 8.7, 4.9 Hz, N- <u>CH</u> -COO), 5.88 (d, 1 H, <i>J</i> = 8.5 Hz, <u>NH</u> ), 6.24 (d, 1 H, <i>J</i> = 15.5 Hz, Ph-CH= <u>CH</u> -CONH), 6.74 (d, 2 H, <i>J</i> = 3.6 Hz, Ph- <u>CH</u> ), 7.41 (d, 2 H, <i>J</i> = 8.8 Hz, Ph- <u>CH</u> ), 7.57 (d, 1 H, <i>J</i> = 15.5 Hz, Ph- <u>CH</u> =CH-CONH).
<i><sup>13</sup>C-NMR:</i>	(100.62 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ (ppm) = 22.16, 22.98 (Leu- <u>CH</u> <sub>3</sub> ), 25.02 (Leu- <u>CH</u> ), 40.36 (Ph-N( <u>CH</u> <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 42.14 (Leu- <u>CH</u> <sub>2</sub> ), 50.87 (N- <u>CH</u> -COO), 52.38 (COO- <u>CH</u> <sub>3</sub> ), 112.11 (Ph- <u>CH</u> ), 114.97 (Ph-CH= <u>CH</u> -CONH), 122.85 (Ph- <u>C</u> <sub>q</sub> -CH=CH-CONH), 129.54 (Ph- <u>CH</u> ), 142.21 (Ph- <u>CH</u> =CH-CONH), 151.48 (Ph- <u>C</u> -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 166.57 (Ph-CH=CH- <u>CONH</u> ), 174.05 ( <u>COO</u> -CH <sub>3</sub> ).
<i>[<math>\alpha</math>]<sub>D</sub><sup>20</sup>:</i>	+39.6° (1.010, CHCl <sub>3</sub> )

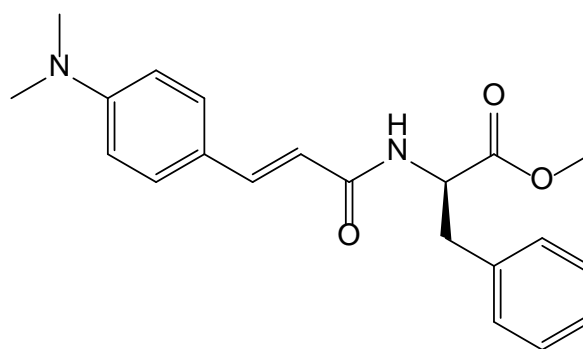
*Schmelzpunkt:* 121-122 °C

*LOOP-ESI-MS:*  $[M+H]^+$  319.3, 319.2

*HPLC:*  $R_t = 2.6-3.0$  min, Reinheit >99% (Methode: HPLC-MS-1)

8.1.13 (R,E)-Methyl-2-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)-3-phenylpropanoat (SH13)

*Struktur:*



*Molare Masse:* 352.34

*Summenformel:*  $C_{21}H_{24}N_2O_3$

*Methode:* A1

*Ansatz:* 184.9 mg (0.857 mmol) *D*-Phenylalaninmethylester-Hydrochlorid, 164 mg (0.857 mmol) 4-Dimethylaminozimtsäure, 0.50 ml (0.857 mmol) PPA (50 wt% in Ethylacetat), 0.24 ml (1.714 mmol) Triethylamin, 10 ml Dimethylformamid.

*Aufreinigung:* Säulenchromatographie (*n*-Pentan/Ethylacetat = [2:1]-[1:3])

*R<sub>f</sub>-Wert:* 0.59 (*n*-Pentan/Ethylacetat = [2:1])

*Ausbeute:* 132.6 mg (0.377 mmol, 44%), gelber Feststoff

*FT-IR:*  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3314.07, 2953.45, 1744.3, 1644.98, 1594.84, 1523.49, 1442.49, 1360.53, 1236.15, 1187.94, 1164.79.

$^1\text{H-NMR}$ : (400.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.00 (s, 6 H,  $\text{Ph-N}(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_3$ ), 3.13-3.26 (m, 2 H,  $\text{Phe-CH}_2$ ), 3.74 (s, 3 H,  $\text{COO-CH}_3$ ), 5.04 (dt, 1 H,  $J = 7.7, 5.6$  Hz,  $\text{N-CH-COO}$ ), 6.00 (d, 1 H,  $J = 7.7$  Hz,  $\text{NH}$ ), 6.19 (d, 1 H,  $J = 15.5$  Hz,  $\text{Ph-CH=CH-CONH}$ ), 6.67 (d, 2 H,  $J = 8.6$  Hz,  $\text{Ph-CH}$ ), 7.10-7.14 (m, 2 H,  $\text{Ph-CH}$ ), 7.21-7.26 (m, 1 H,  $\text{Ph-CH}$ ), 7.27-7.31 (m, 2 H,  $\text{Ph-CH}$ ), 7.39 (d, 2 H,  $J = 8.8$  Hz,  $\text{Ph-CH}$ ), 7.57 (d, 1 H,  $J = 15.5$  Hz,  $\text{Ph-CH=CH-CONH}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$ : (100.62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 38.14 ( $\text{Phe-CH}_2$ ), 40.37 ( $\text{Ph-N}(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_2$ ), 52.41 ( $\text{COO-CH}_3$ ), 53.37 ( $\text{N-CH-COO}$ ), 112.13 ( $\text{Ph-CH}$ ), 114.87 ( $\text{Ph-CH=CH-CONH}$ ), 122.78 ( $\text{Ph-C}_q\text{-CH=CH-CONH}$ ), 127.18, 128.67, 129.35, 129.50, 129.58 ( $\text{Ph-CH}$ ), 136.16 ( $\text{Phe-C}_q$ ), 142.25 ( $\text{Ph-CH=CH-CONH}$ ), 151.51 ( $\text{Ph-C-N}(\text{CH}_3)_2$ ), 166.30 ( $\text{Ph-CH=CH-CONH}$ ), 172.37 ( $\text{COO-CH}_3$ ).

$[\alpha]_D^{20}$ :  $-165.9^\circ$  (1.017,  $\text{CHCl}_3$ )

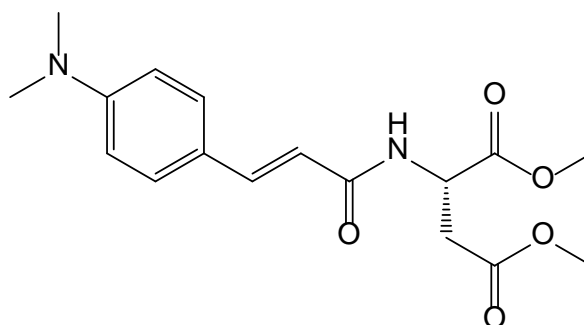
Schmelzpunkt:  $172\text{-}174^\circ\text{C}$

LOOP-ESI-MS:  $[\text{M}+\text{H}]^+$  353.2

HPLC:  $R_t = 2.7\text{-}3.1$  min, Reinheit  $>99\%$  (Methode: HPLC-MS-1)

8.1.14 (S,E)-Dimethyl-2-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)succinat (SH14)

Struktur:



Molare Masse: 334.37



<i>Summenformel:</i>	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
<i>Methode:</i>	A1
<i>Ansatz:</i>	169.3 mg (0.857 mmol) <i>L</i> -Asparaginsäuremethylester-Hydrochlorid, 164 mg (0.857 mmol) 4-Dimethylaminozimtsäure, 0.50 ml (0.857 mmol) PPA (50 wt% in Ethylacetat), 0.24 ml (1.714 mmol) Triethylamin, 10 ml Dimethylformamid.
<i>Aufreinigung:</i>	Säulenchromatographie ( <i>n</i> -Pentan/Ethylacetat = [3:1]-[1:2])
<i>R<sub>f</sub>-Wert:</i>	0.25 ( <i>n</i> -Pentan/Ethylacetat = [2:1])
<i>Ausbeute:</i>	70.4 mg (0.211 mmol, 25%), schwach gelblicher Feststoff
<i>FT-IR:</i>	$\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3292.86, 2953.45, 1748.16, 1730.8, 1640.16, 1603.52, 1533.13, 1432.85, 1353.78, 1297.86, 1229.4, 1197.58, 1159.01, 1106.94.
<i><sup>1</sup>H-NMR:</i>	(400.13 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ (ppm) = 2.94 (dd, 1 H, <i>J</i> = 17.3, 4.5 Hz, Asp- <u>CH</u> <sub>2</sub> ), 3.02 (s, 6 H, Ph-N( <u>CH</u> <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 3.10 (dd, 1 H, <i>J</i> = 17.3, 4.3 Hz, Asp- <u>CH</u> <sub>2</sub> ), 3.70 (s, 3 H, COO- <u>CH</u> <sub>3</sub> ), 3.78 (s, 3 H, COO- <u>CH</u> <sub>3</sub> ), 4.98-5.04 (m, 1 H, N- <u>CH</u> -COO), 6.25 (d, 1 H, <i>J</i> = 15.5 Hz, Ph-CH= <u>CH</u> -CONH), 6.53 (d, 1 H, <i>J</i> = 7.9 Hz, N <u>H</u> ), 6.74 (d, 2 H, <i>J</i> = 6.9 Hz, Ph- <u>CH</u> ), 7.42 (d, 2 H, <i>J</i> = 8.8 Hz, Ph- <u>CH</u> ), 7.58 (d, 1 H, <i>J</i> = 15.5 Hz, Ph- <u>CH</u> =CH-CONH).
<i><sup>13</sup>C-NMR:</i>	(100.62 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ (ppm) = 36.42 (Asp- <u>CH</u> <sub>2</sub> ), 40.33 (Ph-N( <u>CH</u> <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 48.67 (N- <u>CH</u> -COO), 52.09, 52.89 (COO- <u>CH</u> <sub>3</sub> ), 112.08 (Ph- <u>CH</u> ), 114.73 (Ph-CH= <u>CH</u> -CONH), 122.66 (Ph- <u>C</u> <sub>q</sub> -CH=CH-CONH), 129.59 (Ph- <u>CH</u> ), 142.42 (Ph- <u>CH</u> =CH-CONH), 151.54 (Ph- <u>C</u> -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 166.44 (Ph-CH=CH- <u>C</u> ONH), 171.60, 171.86 ( <u>COO</u> -CH <sub>3</sub> ).
<i>[<math>\alpha</math>]<sub>D</sub><sup>20</sup>:</i>	+41.7° (1.028, CHCl <sub>3</sub> )

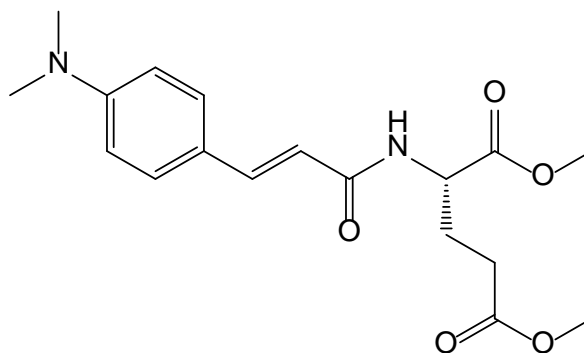
*Schmelzpunkt:* 136-137 °C

*LOOP-ESI-MS:* [M+H]<sup>+</sup> 335.2

*HPLC:* R<sub>t</sub> = 1.7-1.9 min, Reinheit >99% (Methode: HPLC-MS-1)

8.1.15 (S,E)-Dimethyl-2-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)pentandioat  
(SH15)

*Struktur:*



*Molare Masse:* 348.39

*Summenformel:* C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

*Methode:* A1

*Ansatz:* 181.4 mg (0.857 mmol) *L*-Glutaminsäuremethyldiester-Hydrochlorid, 164 mg (0.857 mmol) 4-Dimethylaminozimtsäure, 0.50 ml (0.857 mmol) PPA (50 wt% in Ethylacetat), 0.24 ml (1.714 mmol) Triethylamin, 10 ml Dimethylformamid.

*Aufreinigung:* Säulenchromatographie (*n*-Pentan/Ethylacetat = [3:1]-[1:1])

*R<sub>f</sub>-Wert:* 0.22 (*n*-Pentan/Ethylacetat = [2:1])

*Ausbeute:* 39.7 mg (0.114 mmol, 13%), schwach gelblicher Feststoff

*FT-IR:*  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3267.79, 2953.45, 1733.69, 1644.02, 1606.41, 1539.88, 1432.85, 1349.93, 1269.9, 1236.15, 1166.72.

<sup>1</sup>H-NMR: (400.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 2.06 (td, 1 H, *J* = 14.5, 8.0 Hz, Glu- $\beta$ -CH<sub>2</sub>), 2.27 (dt, 1 H, *J* = 12.6, 7.3 Hz, Glu- $\beta$ -CH<sub>2</sub>), 2.35-2.53 (m, 2 H, Glu- $\gamma$ -CH<sub>2</sub>), 3.00 (s, 6 H, Ph-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.66 (s, 3 H, COO-CH<sub>3</sub>), 3.76 (s, 3 H, COO-CH<sub>3</sub>), 4.78 (dd, 1 H, *J* = 12.9, 7.9 Hz, N-CH-COO), 6.23 (d, 1 H, *J* = 15.5 Hz, Ph-CH=CH-CONH), 6.28 (d, 1 H, *J* = 7.7 Hz, NH), 6.66 (d, 2 H, *J* = 8.7 Hz, Ph-CH), 7.39 (d, 2 H, *J* = 8.8 Hz, Ph-CH), 7.55 (d, 1 H, *J* = 15.5 Hz, Ph-CH=CH-CONH).

<sup>13</sup>C-NMR: (100.62 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 27.76 (Glu- $\beta$ -CH<sub>2</sub>), 30.27 (Glu- $\gamma$ -CH<sub>2</sub>), 40.32 (Ph-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 51.93, 52.63 (COO-CH<sub>3</sub>), 112.06 (Ph-CH), 114.73 (Ph-CH=CH-CONH), 122.67 (Ph-CH=CH-CONH), 129.57 (Ph-CH), 142.35 (Ph-CH=CH-CONH), 151.55 (Ph-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 166.69 (Ph-CH=CH-CONH), 172.76, 173.56 (COO-CH<sub>3</sub>).

$[\alpha]_D^{20}$ : +17.5° (0.401, CHCl<sub>3</sub>)

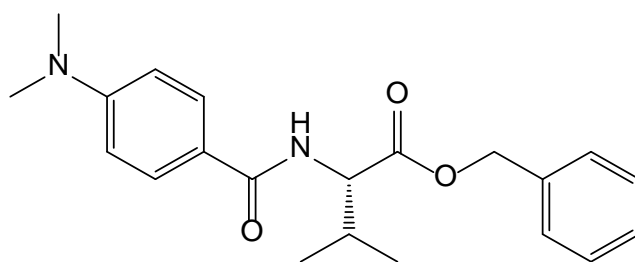
*Schmelzpunkt:* 144 °C

*LOOP-ESI-MS:* [M+H]<sup>+</sup> 349.2, 349.3

*HPLC:* R<sub>t</sub> = 1.7-2.0 min, Reinheit >99% (Methode: HPLC-MS-1)

8.1.16 (S)-Benzyl-2-(4-(dimethylamino)benzamido)-3-methylbutanoat (SH23)

*Struktur:*



---

<i>Molare Masse:</i>	354.44
<i>Summenformel:</i>	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
<i>Methode:</i>	A1
<i>Ansatz:</i>	418.1 mg (1.715 mmol) <i>L</i> -Valinbenzylester-Hydrochlorid, 283.2 mg (1.714 mmol) 4-Dimethylaminobenzoesäure, 1.00 ml (1.714 mmol) PPA (50 wt% in Dimethylformamid), 0.48 ml (3.43 mmol) Triethylamin, 20 ml Dimethylformamid.
<i>Aufreinigung:</i>	Säulenchromatographie ( <i>n</i> -Pentan/Ethylacetat = [4:1]-[2:1])
<i>R<sub>f</sub>-Wert:</i>	0.36 ( <i>n</i> -Pentan/Ethylacetat = [3:1])
<i>Ausbeute:</i>	95 mg (0.268 mmol, 16%), farbloser Feststoff
<i>FT-IR:</i>	$\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3330.46, 2986.23, 2972.73, 2952.48, 2938.98, 2865.7, 1741.41, 1626.66, 1613.16, 1556.27, 1532.17, 1497.45, 1459.85, 1388.5, 1366.32, 1351.86, 1324.86, 1304.61, 1240.97, 1200.47, 1179.26, 1149.37, 1137.8.
<i><sup>1</sup>H-NMR:</i>	(400.13 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ (ppm) = 0.96 (dd, 6 H, <i>J</i> = 16.8, 6.9 Hz, Val- <u>CH</u> <sub>3</sub> ), 2.21-2.34 (m, 1 H, Val- <u>CH</u> ), 3.02 (s, 6 H, Ph-N( <u>CH</u> <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 4.84 (dd, 1 H, <i>J</i> = 8.6, 4.8 Hz, N- <u>CH</u> -COO), 5.17 (d, 1 H, <i>J</i> = 12.2 Hz, COO- <u>CH</u> <sub>2</sub> -Ph), 5.23 (d, 1 H, <i>J</i> = 12.2 Hz, COO- <u>CH</u> <sub>2</sub> -Ph), 6.49 (d, 1 H, <i>J</i> = 8.6 Hz, N <u>H</u> ), 6.65-6.71 (m, 2 H, Ph- <u>CH</u> ), 7.30-7.39 (m, 5 H, Ph- <u>CH</u> ), 7.69-7.74 (m, 2 H, Ph- <u>CH</u> ).
<i><sup>13</sup>C-NMR:</i>	(100.62 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ (ppm) = 17.98, 19.17 (Val- <u>C</u> H <sub>3</sub> ), 31.91 (Val- <u>C</u> H), 40.25 (Ph-N( <u>C</u> H <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 57.30 (N- <u>C</u> H-COO), 67.12 (COO- <u>C</u> H <sub>2</sub> -Ph), 111.21 (Ph- <u>C</u> H), 121.03 (Ph- <u>C</u> <sub>q</sub> -CONH), 128.48, 128.53, 128.70, 128.72 (Ph- <u>C</u> H), 135.57 (Ph- <u>C</u> <sub>q</sub> -CH <sub>2</sub> -OOC), 152.75 (Ph- <u>C</u> -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 167.29 (Ph- <u>C</u> ONH), 172.58 ( <u>C</u> OO-CH <sub>2</sub> -Ph).
<i>[<math>\alpha</math>]<sub>D</sub><sup>20</sup>:</i>	+40.9° (1.053, CHCl <sub>3</sub> )

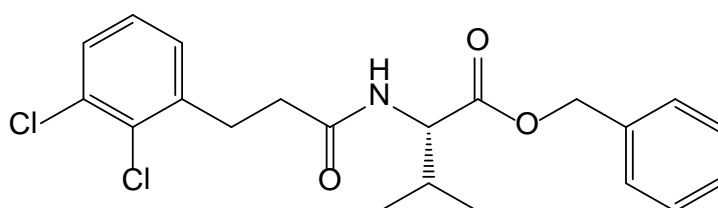
*Schmelzpunkt:* 116-118 °C

*FD-MS:* [M] 354.3, [2M] 708.5

*HPLC:*  $R_t = 26.9$  min, Reinheit: 73% (Methode: HPLC-2)

8.1.17 (S)-Benzyl-2-(3-(2,3-dichlorphenyl)propanamido)-3-methylbutanoat (SH24)

*Struktur:*



*Molare Masse:* 408.32

*Summenformel:*  $C_{21}H_{23}Cl_2NO_3$

*Methode:* A1

*Ansatz:* 417.4 mg (1.713 mmol) *L*-Valinbenzylester-Hydrochlorid, 375.1 mg (1.712 mmol) 3-(2,3-Dichlorphenyl)-propansäure, 1.00 ml (1.714 mmol) PPA (50 wt% in Dimethylformamid), 0.48 ml (3.43 mmol) Triethylamin, 20 ml Dimethylformamid.

*Aufreinigung:* Säulenchromatographie (*n*-Pentan/Ethylacetat = [4:1]-[2:1])

*R<sub>f</sub>-Wert:* 0.58 (*n*-Pentan/Ethylacetat = [3:1])

*Ausbeute:* 449 mg (1.103 mmol, 64%), farbloser Feststoff

*FT-IR:*  $\tilde{\nu}$  [ $cm^{-1}$ ] = 3293.82, 3070.12, 3038.3, 2962.13, 2937.06, 1723.09, 1640.16, 1543.74, 1454.06, 1421.28, 1388.5, 1333.53, 1311.36, 1272.79, 1199.51, 1137.8.

*<sup>1</sup>H-NMR:* (400.13 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 0.82 (dd, 6 H,  $J = 15.0, 6.9$  Hz, Val-CH<sub>3</sub>), 2.06-2.19 (m, 1 H, Val-CH), 2.52-2.60 (m, 2 H, Ph-CH<sub>2</sub>-

$\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{-CONH}$ ), 3.12 (t, 2 H,  $J = 7.6$  Hz,  $\text{Ph-}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$ ), 4.60 (dd, 1 H,  $J = 8.8, 4.8$  Hz,  $\text{N-}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{-COO}$ ), 5.13 (d, 1 H,  $J = 12.2$  Hz,  $\text{COO-}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{-Ph}$ ), 5.18 (d, 1 H,  $J = 12.2$  Hz,  $\text{COO-}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{-Ph}$ ), 5.92 (d, 1 H,  $J = 8.6$  Hz,  $\text{NH}$ ), 7.09 (t, 1 H,  $J = 7.8$  Hz,  $\text{Ph-}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ ), 7.17 (dd, 1 H,  $J = 7.7, 1.6$  Hz,  $\text{Ph-}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ ), 7.31 (d, 1 H,  $J = 1.6$  Hz,  $\text{Ph-}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ ), 7.32-7.40 (m, 5 H,  $\text{Ph-}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$ : (100.62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 17.79, 18.97 ( $\text{Val-}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$ ), 30.48 ( $\text{Ph-}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$ ), 31.43 ( $\text{Val-}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ ), 35.98 ( $\text{Ph-CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{-CONH}$ ), 57.12 ( $\text{N-}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{-COO}$ ), 67.21 ( $\text{COO-}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{-Ph}$ ), 127.39, 128.49, 128.62, 128.74, 128.78, 128.99 ( $\text{Ph-}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ ), 132.22 ( $\text{Ph-}^2\underline{\text{C}}\text{-Cl}$ ), 133.33 ( $\text{Ph-}^3\underline{\text{C}}\text{-Cl}$ ), 135.38 ( $\text{Ph-}\underline{\text{C}}_q\text{-CH}_2\text{-OOC}$ ), 140.77 ( $\text{Ph-}\underline{\text{C}}_q\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$ ), 171.48 ( $\text{Ph-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\underline{\text{O}}\text{NH}$ ), 172.01 ( $\underline{\text{C}}\underline{\text{O}}\text{O-CH}_2\text{-Ph}$ ).

$[\alpha]_D^{20}$ :  $-8.9^\circ$  (1.113,  $\text{CHCl}_3$ )

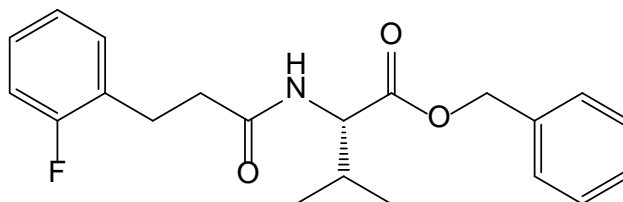
Schmelzpunkt:  $105\text{-}107^\circ\text{C}$

FD-MS:  $[\text{M}] 408.3$ ,  $[\text{2M}] 815.3$

Reinheit:  $>90\%$  ( $^1\text{H-NMR}$ )

8.1.18 (S)-Benzyl-2-(3-(2-fluorphenyl)propanamido)-3-methylbutanoat (SH25)

Struktur:



Molare Masse: 357.42

Summenformel:  $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{FNO}_3$

Methode: A1

---

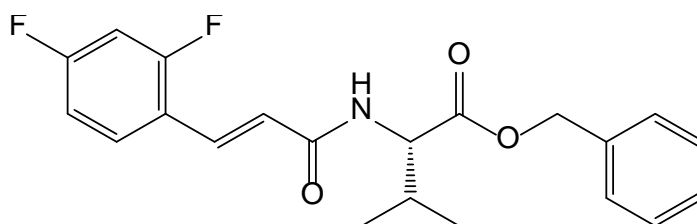
<i>Ansatz:</i>	417.4 mg (1.713 mmol) <i>L</i> -Valinbenzylester-Hydrochlorid, 288.6 mg (1.716 mmol) 3-(2-Fluorphenyl)-propansäure, 1.00 ml (1.714 mmol) PPA (50 wt% in Dimethylformamid), 0.48 ml (3.43 mmol) Triethylamin, 20 ml Dimethylformamid.
<i>Aufreinigung:</i>	Säulenchromatographie ( <i>n</i> -Pentan/Ethylacetat = [4:1]-[3:1])
<i>R<sub>f</sub>-Wert:</i>	0.60 ( <i>n</i> -Pentan/Ethylacetat = [3:1])
<i>Ausbeute:</i>	400.8 mg (1.123 mmol, 66%), farbloser Feststoff
<i>FT-IR:</i>	$\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3295.75, 3063.37, 3037.34, 2968.87, 2938.02, 2881.13, 1722.12, 1642.09, 1584.24, 1541.81, 1491.67, 1455.03, 1417.42, 1385.6, 1332.57, 1310.39, 1277.61, 1264.11, 1227.47, 1198.54, 1161.9, 1137.8, 1100.19.
<i><sup>1</sup>H-NMR:</i>	(400.13 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ (ppm) = 0.81 (dd, 6 H, <i>J</i> = 14.6, 6.9 Hz, Val- <u>CH</u> <sub>3</sub> ), 2.05-2.18 (m, 1 H, Val- <u>CH</u> ), 2.55 (dd, 2 H, <i>J</i> = 11.1, 4.9 Hz, Ph-CH <sub>2</sub> - <u>CH</u> <sub>2</sub> -CONH), 3.00 (t, 2 H, <i>J</i> = 7.7 Hz, Ph- <u>CH</u> <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CONH), 4.61 (dd, 1 H, <i>J</i> = 8.8, 4.8 Hz, N- <u>CH</u> -COO), 5.12 (d, 1 H, <i>J</i> = 12.2 Hz, COO- <u>CH</u> <sub>2</sub> -Ph), 5.18 (d, 1 H, <i>J</i> = 12.2 Hz, COO- <u>CH</u> <sub>2</sub> -Ph), 5.92 (d, 1 H, <i>J</i> = 8.6 Hz, N <u>H</u> ), 6.96-7.07 (m, 2 H, Ph- <u>CH</u> ), 7.14-7.24 (m, 2 H, Ph- <u>CH</u> ), 7.30-7.41 (m, 5 H, Ph- <u>CH</u> ).
<i><sup>13</sup>C-NMR:</i>	(100.62 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ (ppm) = 17.73, 18.94 (Val- <u>C</u> H <sub>3</sub> ), 25.36, 25.38 (Ph- <u>C</u> H <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CONH), 31.44 (Val- <u>C</u> H), 36.76, 36.77 (Ph-CH <sub>2</sub> - <u>C</u> H <sub>2</sub> -CONH), 57.06 (N- <u>C</u> H-COO), 67.16 (COO- <u>C</u> H <sub>2</sub> -Ph), 115.29, 115.51, 124.21, 124.25 (Ph- <u>C</u> H), 127.48, 127.63 (Ph- <u>C</u> <sub>q</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CONH), 128.15, 128.23, 128.48, 128.59, 128.73, 130.95, 131.00 (Ph- <u>C</u> H), 135.42 (Ph- <u>C</u> <sub>q</sub> -CH <sub>2</sub> -OOC), 160.06, 162.49 (Ph- <u>C</u> -F), 171.81 (Ph-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> - <u>C</u> ONH), 172.06 ( <u>C</u> OO-CH <sub>2</sub> -Ph).
<i>[<math>\alpha</math>]<sub>D</sub><sup>20</sup>:</i>	-1.5° (1.064, CHCl <sub>3</sub> )
<i>Schmelzpunkt:</i>	57-58 °C

*FD-MS:* [M] 357.3

*HPLC:*  $R_t = 27.1$  min, Reinheit: 84% (Methode: HPLC-2)

8.1.19 (S,E)-Benzyl-2-(3-(2,4-difluorphenyl)acrylamido)-3-methylbutanoat (SH26)

*Struktur:*



*Molare Masse:* 373.39

*Summenformel:*  $C_{21}H_{21}F_2NO_3$

*Methode:* A1

*Ansatz:* 417.9 mg (1.715 mmol) *L*-Valinbenzylester-Hydrochlorid, 315.6 mg (1.714 mmol) *trans*-2,4-Difluorzimtsäure, 1.00 ml (1.714 mmol) PPA (50 wt% in Dimethylformamid), 0.48 ml (3.43 mmol) Triethylamin, 20 ml Dimethylformamid.

*Aufreinigung:* Säulenchromatographie (*n*-Pentan/Ethylacetat = [4:1]-[3:1])

*R<sub>f</sub>-Wert:* 0.65 (*n*-Pentan/Ethylacetat = [3:1])

*Ausbeute:* 330 mg (0.885 mmol, 52%), farbloser Feststoff

*FT-IR:*  $\tilde{\nu}$  [ $cm^{-1}$ ] = 3282.25, 3057.58, 2981.41, 2949.59, 2905.24, 2868.59, 1717.3, 1654.62, 1624.73, 1590.02, 1536.99, 1499.38, 1465.63, 1429.96, 1390.42, 1352.82, 1310.39, 1289.18, 1271.82, 1216.86, 1202.4, 1186.97, 1139.72.

*<sup>1</sup>H-NMR:* (400.13 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 0.91 (d, 3 H,  $J = 6.9$  Hz, Val-CH<sub>3</sub>), 0.96 (d, 3 H,  $J = 6.9$  Hz, Val-CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.18-2.35 (m, 1 H, Val-CH),



4.79 (dd, 1 H,  $J = 8.8, 4.8$  Hz, N-CH-COO), 5.17 (d, 1 H,  $J = 12.2$  Hz, COO-CH<sub>2</sub>-Ph), 5.22 (d, 1 H,  $J = 12.2$  Hz, COO-CH<sub>2</sub>-Ph), 6.28 (d, 1 H,  $J = 8.8$  Hz, NH), 6.55 (d, 1 H,  $J = 15.8$  Hz, Ph-CH=CH-CONH), 6.79-6.94 (m, 2 H, Ph-CH), 7.30-7.42 (m, 5 H, Ph-CH), 7.46 (td, 1 H,  $J = 8.5, 6.5$  Hz, Ph-CH), 7.65 (d, 1 H,  $J = 15.8$  Hz, Ph-CH=CH-CONH).

<sup>13</sup>C-NMR: (100.62 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 17.87, 19.12 (Val-CH<sub>3</sub>), 31.71 (Val-CH), 57.35 (N-CH-COO), 67.30 (COO-CH<sub>2</sub>-Ph), 104.45, 104.71, 104.96, 111.90, 111.93, 112.11, 112.15 (Ph-CH), 119.29, 119.33, 119.41, 119.44 (Ph-C<sub>q</sub>-CH=CH-CONH), 122.71 122.73, 122.78, 122.81 (Ph-CH=CH-CONH), 128.52, 128.62, 128.74, 130.76, 130.81, 130.86, 130.91 (Ph-CH), 133.94 (Ph-CH=CH-CONH), 135.38 (Ph-C<sub>q</sub>-CH<sub>2</sub>-OOC), 160.40, 160.52, 162.30, 162.42, 162.94, 163.06, 164.81, 164.93 (Ph-<sup>2</sup>C-F, Ph-<sup>4</sup>C-F), 165.63 (Ph-CH=CH-CONH), 172.22 (COO-CH<sub>2</sub>-Ph).

$[\alpha]_D^{20}$ : +37.3° (1.191, CHCl<sub>3</sub>)

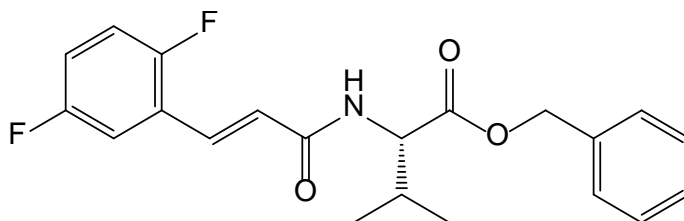
Schmelzpunkt: 67-68 °C

FD-MS: [M] 373.3, [2M] 746.4

HPLC: R<sub>t</sub> = 27.6 min, Reinheit: 99% (Methode: HPLC-2)

8.1.20 (S,E)-Benzyl-2-(3-(2,5-difluorphenyl)acrylamido)-3-methylbutanoat (SH27)

Struktur:



Molare Masse: 373.39

---

<i>Summenformel:</i>	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> F <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>
<i>Methode:</i>	A1
<i>Ansatz:</i>	417.2 mg (1.712 mmol) <i>L</i> -Valinbenzylester-Hydrochlorid, 315.8 mg (1.715 mmol) <i>trans</i> -2,5-Difluorzimtsäure, 1.00 ml (1.714 mmol) PPA (50 wt% in Dimethylformamid), 0.48 ml (3.43 mmol) Triethylamin, 20 ml Dimethylformamid.
<i>Aufreinigung:</i>	Säulenchromatographie ( <i>n</i> -Pentan/Ethylacetat = [4:1]-[3:1])
<i>R<sub>f</sub>-Wert:</i>	0.79 ( <i>n</i> -Pentan/Ethylacetat = [3:1])
<i>Ausbeute:</i>	356 mg (0.954 mmol, 56%), farbloser Feststoff
<i>FT-IR:</i>	$\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3316.96, 3061.44, 2978.52, 2961.16, 2940.91, 2875.34, 1735.62, 1654.62, 1617.02, 1588.09, 1545.67, 1493.6, 1470.46, 1455.03, 1428.03, 1395.25, 1382.71, 1354.75, 1321, 1267.97, 1245.79, 1213.97, 1185.04, 1143.58.
<i><sup>1</sup>H-NMR:</i>	(400.13 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ (ppm) = 0.91 (d, 3 H, <i>J</i> = 6.9 Hz, Val- <u>CH</u> <sub>3</sub> ), 0.96 (d, 3 H, <i>J</i> = 6.9 Hz, Val- <u>CH</u> <sub>3</sub> ), 2.18-2.32 (m, 1 H, Val- <u>CH</u> ), 4.79 (dd, 1 H, <i>J</i> = 8.8, 4.8 Hz, N- <u>CH</u> -COO), 5.17 (d, 1 H, <i>J</i> = 12.2 Hz, COO- <u>CH</u> <sub>2</sub> -Ph), 5.22 (d, 1 H, <i>J</i> = 12.2 Hz, COO- <u>CH</u> <sub>2</sub> -Ph), 6.34 (d, 1 H, <i>J</i> = 8.7 Hz, N <u>H</u> ), 6.59 (d, 1 H, <i>J</i> = 15.8 Hz, Ph-CH= <u>CH</u> -CONH), 6.96-7.08 (m, 2 H, Ph- <u>CH</u> ), 7.17 (ddd, 1 H, <i>J</i> = 8.7, 5.7, 2.9 Hz, Ph- <u>CH</u> ), 7.29-7.43 (m, 5 H, Ph- <u>CH</u> ), 7.66 (d, 1 H, <i>J</i> = 15.8 Hz, Ph- <u>CH</u> =CH-CONH).
<i><sup>13</sup>C-NMR:</i>	(100.62 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ (ppm) = 17.86, 19.10 (Val- <u>CH</u> <sub>3</sub> ), 31.67 (Val- <u>CH</u> ), 57.40 (N- <u>CH</u> -COO), 67.31 (COO- <u>CH</u> <sub>2</sub> -Ph), 115.09, 115.13, 115.33, 115.37, 117.19, 117.28, 117.42, 117.44, 117.50, 117.53, 117.66, 117.75 (Ph- <u>CH</u> ), 124.03, 124.11, 124.17, 124.24, 124.31 (Ph-CH= <u>CH</u> -CONH), 128.51, 128.61, 128.73 (Ph- <u>CH</u> ), 133.66 (Ph- <u>CH</u> =CH-CONH), 135.35 (Ph- <u>C</u> <sub>q</sub> -CH <sub>2</sub> -OOC), 156.17,

156.19, 157.52, 157.54, 158.65, 158.67, 159.93, 159.96 (Ph-<sup>2</sup>C-F, Ph-<sup>5</sup>C-F), 165.32 (Ph-CH=CH-CONH), 172.15 (COO-CH<sub>2</sub>-Ph).

$[\alpha]_D^{20}$ : +34.9° (1.078, CHCl<sub>3</sub>)

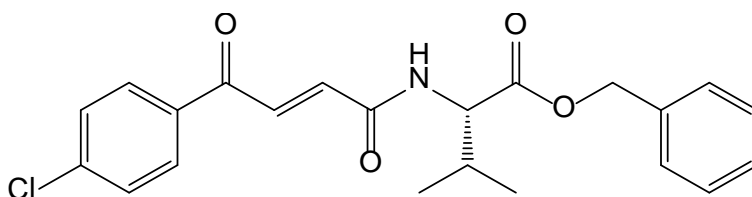
*Schmelzpunkt*: 114-115 °C

*FD-MS*: [M] 373.4, [2M] 746.5

*HPLC*: R<sub>t</sub> = 27.6 min, Reinheit: 99% (Methode: HPLC-2)

8.1.21 (S,E)-Benzyl-2-(4-(4-chlorphenyl)-4-oxobut-2-enamido)-3-methylbutanoat (SH28)

*Struktur*:



*Molare Masse*: 399.87

*Summenformel*: C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>ClNO<sub>4</sub>

*Methode*: A1

*Ansatz*: 650.6 mg (1.714 mmol) *L*-Valinbenzylester-*p*-Tosylat, 361.6 mg (1.717 mmol) *trans*-3-(4-Chlorbenzoyl)-acrylsäure, 1.00 ml (1.714 mmol) PPA (50 wt% in Dimethylformamid), 0.48 ml (3.43 mmol) Triethylamin, 20 ml Dimethylformamid.

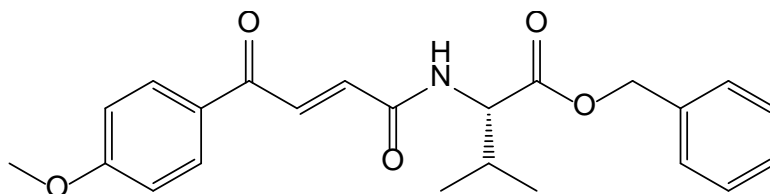
*Aufreinigung*: Säulenchromatographie (*n*-Pentan/Ethylacetat = [8:1]-[4:1])

*R<sub>f</sub>-Wert*: 0.21 (*n*-Pentan/Ethylacetat = [8:1])

*Ausbeute*: 159 mg (0.398 mmol, 23%), gelber Feststoff

- FT-IR:*  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3300.57, 3066.26, 2962.13, 2936.09, 2873.42, 1736.58, 1725.01, 1676.8, 1639.2, 1587.13, 1535.06, 1467.56, 1455.03, 1390.42, 1332.57, 1315.21, 1288.22, 1271.82, 1191.79, 1146.47.
- <sup>1</sup>H-NMR:* (400.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 0.90 (d, 3 H, *J* = 6.9 Hz, Val-CH<sub>3</sub>), 0.96 (d, 3 H, *J* = 6.9 Hz, Val-CH<sub>3</sub>), 2.19-2.33 (m, 1 H, Val-CH), 4.78 (dd, 1 H, *J* = 8.8, 4.8 Hz, N-CH-COO) 5.17 (d, 1 H, *J* = 12.2 Hz, COO-CH<sub>2</sub>-Ph), 5.23 (d, 1 H, *J* = 12.2 Hz, COO-CH<sub>2</sub>-Ph), 6.82 (d, 1 H, *J* = 8.8 Hz, NH), 7.15 (d, 1 H, *J* = 15.0 Hz, Ph-CO-CH=CH-CONH), 7.29-7.41 (m, 5 H, Ph-CH), 7.42-7.50 (m, 2 H, Ph-CH), 7.92 (d, 1 H, *J* = 15.0 Hz, Ph-CO-CH=CH-CONH), 7.95-7.99 (m, 2 H, Ph-CH).
- <sup>13</sup>C-NMR:* (100.62 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 17.83, 19.11 (Val-CH<sub>3</sub>), 31.71 (Val-CH), 57.65 (N-CH-COO), 67.45 (COO-CH<sub>2</sub>-Ph), 128.55, 128.69, 128.77, 129.33, 130.39 (Ph-CH), 133.38 (Ph-CO-CH=CH-CONH), 135.26 (Ph-C<sub>q</sub>-CH<sub>2</sub>-OOC), 135.44 (Ph-CO-CH=CH-CONH), 140.52 (Ph-C<sub>q</sub>-CO, Ph-C-Cl), 163.96 (Ph-CO-CH=CH-CONH), 171.70 (COO-CH<sub>2</sub>-Ph), 188.61 (Ph-CO-CH=CH-CONH).
- [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>:* -4.1° (2.530, CHCl<sub>3</sub>)
- Schmelzpunkt:* 111-112 °C
- FD-MS:* [M] 399.4, [2M] 801.4
- HPLC:* R<sub>t</sub> = 28.6 min, Reinheit: 91% (Methode: HPLC-2)
- 8.1.22 (S,E)-Benzyl-2-(4-(4-methoxyphenyl)-4-oxobut-2-enamido)-3-methylbutanoat (SH29)

*Struktur:*



- Molare Masse:* 395.45
- Summenformel:* C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>5</sub>
- Methode:* A1
- Ansatz:* 650.9 mg (1.715 mmol) *L*-Valinbenzylester-*p*-Tosylat, 353.3 mg (1.713 mmol) *trans*-3-(4-Methoxybenzoyl)-acrylsäure, 1.00 ml (1.714 mmol) PPA (50 wt% in Dimethylformamid), 0.48 ml (3.43 mmol) Triethylamin, 20 ml Dimethylformamid.
- Aufreinigung:* Säulenchromatographie (*n*-Pentan/Ethylacetat = [3:1]-[2:1])
- R<sub>f</sub>-Wert:* 0.22 (*n*-Pentan/Ethylacetat = [3:1])
- Ausbeute:* 422.7 mg (1.069 mmol, 62%), gelber Feststoff
- FT-IR:*  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3269.72, 3067.23, 3038.3, 3008.41, 2975.62, 2956.34, 2872.45, 2841.6, 1733.69, 1675.84, 1631.48, 1594.84, 1571.7, 1542.77, 1509.99, 1455.03, 1421.28, 1377.89, 1351.86, 1317.14, 1294.97, 1261.22, 1246.75, 1212.04, 1183.11, 1140.69, 1109.83.
- <sup>1</sup>H-NMR:* (400.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 0.93 (dd, 6 H, *J* = 21.4, 6.9 Hz, Val-CH<sub>3</sub>), 2.19-2.33 (m, 1 H, Val-CH), 3.87 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.77 (dd, 1 H, *J* = 8.8, 4.9 Hz, N-CH-COO), 5.17 (d, 1 H, *J* = 12.2 Hz, COO-CH<sub>2</sub>-Ph), 5.23 (d, 1 H, *J* = 12.2 Hz, COO-CH<sub>2</sub>-Ph), 6.79 (d, 1 H, *J* = 8.8 Hz, NH), 6.92-6.98 (m, 2 H, Ph-CH), 7.13 (d, 1 H, *J* = 15.0 Hz, Ph-CO-CH=CH-CONH), 7.29-7.41 (m, 5 H, Ph-CH), 7.97 (d, 1 H, *J* = 15.0 Hz, Ph-CO-CH=CH-CONH), 8.00-8.06 (m, 2 H, Ph-CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ : (100.62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 17.86, 19.11 (Val- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 31.68 (Val- $\underline{\text{C}}\text{H}$ ), 55.67 ( $\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 57.63 ( $\text{N}-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{COO}$ ), 67.36 ( $\text{COO}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{Ph}$ ), 114.19, 128.53, 128.63, 128.75 ( $\text{Ph}-\underline{\text{C}}\text{H}$ ), 130.06 ( $\text{Ph}-\underline{\text{C}}_{\text{q}}-\text{CO}$ ), 131.48 ( $\text{Ph}-\underline{\text{C}}\text{H}$ ), 134.01 ( $\text{Ph}-\text{CO}-\underline{\text{C}}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CONH}$ ), 134.32 ( $\text{Ph}-\text{CO}-\underline{\text{C}}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CONH}$ ), 135.33 ( $\text{Ph}-\underline{\text{C}}_{\text{q}}-\text{CH}_2-\text{OOC}$ ), 164.33, 164.35 ( $\text{Ph}-\underline{\text{C}}-\text{OCH}_3$ ,  $\text{Ph}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{ONH}$ ), 171.71 ( $\underline{\text{C}}\text{OO}-\text{CH}_2-\text{Ph}$ ), 188.05 ( $\text{Ph}-\underline{\text{C}}\text{O}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CONH}$ ).

$[\alpha]_D^{20}$ :  $-1.5^\circ$  (1.109,  $\text{CHCl}_3$ )

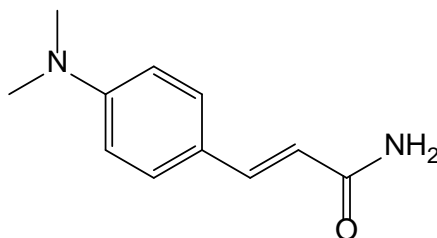
*Schmelzpunkt*: 114-115 °C

*FD-MS*:  $[\text{M}]$  395.4,  $[\text{2M}]$  790.5

*HPLC*:  $R_t = 27.1$  min, Reinheit: 77% (Methode: HPLC-2)

8.1.23 (E)-3-(4-(Dimethylamino)phenyl)acrylamid (SH30)

*Struktur*:



*Molare Masse*: 190.24

*Summenformel*:  $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$

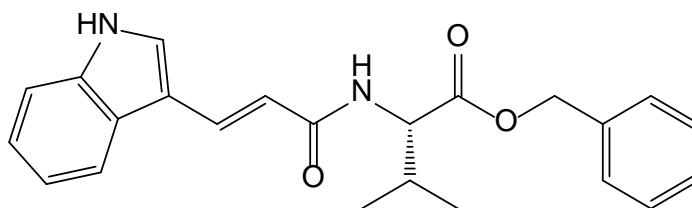
*Methode*: A2

*Ansatz*: 510 mg (2.667 mmol) 4-Dimethylaminozimtsäure, 0.25 ml (3.446 mmol) Thionylchlorid, 20 ml Dichlormethan, 50 ml konz. wässrige Ammoniak-Lösung (26%).

- Aufreinigung:* Säulenchromatographie (Dichlormethan/Ethylacetat = [0:1]-[1:1], anschließend Ethylacetat/Methanol = [1:1]-[0:1])
- R<sub>f</sub>-Wert:* 0.16 (Dichlormethan/Ethylacetat = [1:1])
- Ausbeute:* 173 mg (0.911 mmol, 34%), orangefarbener bis roter Feststoff
- FT-IR:*  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3317.93, 3156.9, 1645.95, 1607.38, 1576.52, 1524.45, 1434.78, 1414.53, 1401.03, 1361.5, 1325.82, 1295.93, 1256.4, 1231.33, 1170.58, 1129.12.
- <sup>1</sup>H-NMR:* (400.13 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 2.94 (s, 6 H, Ph-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 6.34 (d, 1 H, *J* = 15.7 Hz, Ph-CH=CH-CONH<sub>2</sub>), 6.70 (d, 2 H, *J* = 8.8 Hz, Ph-CH), 6.87 (s, 1 H, CONH<sub>2</sub>), 7.31 (d, 1 H, *J* = 15.8 Hz, Ph-CH=CH-CONH<sub>2</sub>), 7.34 (dd, 4 H, *J* = 24.7, 12.3 Hz, Ph-CH=CH-CONH<sub>2</sub>, CONH<sub>2</sub>, Ph-CH), 7.37 (d, 2 H, *J* = 8.8 Hz, Ph-CH).
- <sup>13</sup>C-NMR:* (100.62 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 39.75 (Ph-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 111.96 (Ph-CH), 116.70 (Ph-CH=CH-CONH<sub>2</sub>), 122.31 (Ph-C<sub>q</sub>-CH=CH-CONH<sub>2</sub>), 128.85 (Ph-CH), 139.69 (Ph-CH=CH-CONH<sub>2</sub>), 151.08 (Ph-C-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 167.46 (Ph-CH=CH-CONH<sub>2</sub>).
- Schmelzpunkt:* 198 °C (Zersetzung)
- LOOP-ESI-MS:* [M+H]<sup>+</sup> 191.2
- HPLC:* R<sub>t</sub> = 2.9 min, Reinheit >99% (Methode: HPLC-MS-3)

8.1.24 (S,E)-Benzyl-2-(3-(1*H*-indol-3-yl)acrylamido)-3-methylbutanoat (SH32)

*Struktur:*



---

<i>Molare Masse:</i>	376.45
<i>Summenformel:</i>	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
<i>Methode:</i>	A3
<i>Ansatz:</i>	200.7 mg (1.072 mmol) <i>trans</i> -3-Indolacrylsäure, 405.6 mg (1.069 mmol) <i>L</i> -Valinbenzylester-Hydrochlorid, 450.2 mg (1.088 mmol) HCTU, 0.35 ml (2.118 mmol) Diisopropylethylamin, 45 ml Dichlormethan.
<i>Aufreinigung:</i>	Säulenchromatographie (Petrolether/Ethylacetat = [4:1]-[1:4])
<i>R<sub>f</sub>-Wert:</i>	0.26 (Petrolether/Ethylacetat = [1:1])
<i>Ausbeute:</i>	179 mg (0.476 mmol, 45%), bernsteinfarbener Feststoff
<i>FT-IR:</i>	$\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3260.39, 3064.25, 2970.26, 2929.40, 2868.10, 1732.12, 1646.31, 1597.28, 1515.55, 1446.08, 1356.19, 1303.06, 1278.55, 1241.77, 1188.65, 1147.79, 1111.01.
<i><sup>1</sup>H-NMR:</i>	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ (ppm) = 0.96 (dd, 6 H, <i>J</i> = 16.0, 6.8 Hz, Val-C <u>H</u> <sub>3</sub> ), 2.26 (dq, 1 H, <i>J</i> = 13.2, 6.6 Hz, Val-C <u>H</u> ), 4.83 (dd, 1 H, <i>J</i> = 8.7, 4.8 Hz, N-C <u>H</u> -COO), 5.12-5.27 (m, 2 H, COO-C <u>H</u> <sub>2</sub> -Ph), 6.11 (d, 1 H, <i>J</i> = 8.8 Hz, CON <u>H</u> ), 6.47 (d, 1 H, <i>J</i> = 15.6 Hz, Indol-CH=C <u>H</u> -CONH), 7.24 (d, 1 H, <i>J</i> = 4.0 Hz, Ar-C <u>H</u> ), 7.27-7.46 (m, 8 H, Ar-C <u>H</u> ), 7.81-7.96 (m, 2 H, Indol-C <u>H</u> =CH-CONH, Ar-C <u>H</u> ), 8.85 (s, 1 H, Indol-N <u>H</u> ).
<i><sup>13</sup>C-NMR:</i>	(75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ (ppm) = 17.95, 19.20 (Val-C <u>H</u> <sub>3</sub> ), 31.81 (Val-C <u>H</u> ), 57.27 (N-C <u>H</u> -COO), 67.22 (COO-C <u>H</u> <sub>2</sub> -Ph), 111.99, 113.48 (Ar-C <u>C</u> ), 115.37 (Indol-CH=C <u>H</u> -CONH), 120.46, 121.29, 123.17, 125.47, 128.41, 128.53, 128.59, 128.67, 128.75 (Ar-C <u>C</u> ), 135.62 (Ph-C <u>C</u> <sub>q</sub> -CH <sub>2</sub> -OOC), 137.24 (Indol-C <u>H</u> =CH-CONH), 167.27 (C <u>C</u> ONH), 172.48 (C <u>C</u> OO-CH <sub>2</sub> -Ph).



$[\alpha]_D^{20}$ : +51.0° (1.353, CHCl<sub>3</sub>)

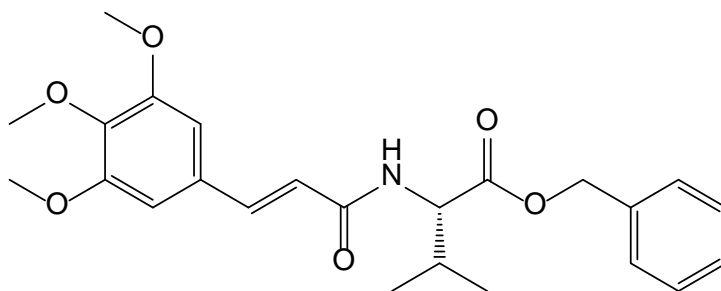
*Schmelzpunkt*: 71-75 °C

*FD-MS*: [M] 376.3, [2M] 751.2

*HPLC*: R<sub>t</sub> = 25.9 min, Reinheit: 93% (Methode: HPLC-2)

8.1.25 (S,E)-Benzyl-3-methyl-2-(3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)acrylamido)butanoat (SH33)

*Struktur*:



*Molare Masse*: 427.49

*Summenformel*: C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>6</sub>

*Methode*: A3

*Ansatz*: 510.3 mg (2.142 mmol) 3,4,5-Trimethoxyzimtsäure, 812.0 mg (2.140 mmol) *L*-Valinbenzylester-Hydrochlorid, 890.4 mg (2.152 mmol) HCTU, 0.7 ml (4.236 mmol) Diisopropylethylamin, 70 ml Dichlormethan.

*Aufreinigung*: Säulenchromatographie (Petrolether/Ethylacetat = [4:1]-[1:1])

*R<sub>f</sub>-Wert*: 0.23 (Petrolether/Ethylacetat = [2:1])

*Ausbeute*: 852 mg (1.995 mmol, 93%), farbloser Feststoff

*FT-IR:*  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3284.90, 2970.26, 2835.41, 1744.38, 1723.95, 1654.48, 1613.62, 1576.84, 1531.90, 1499.21, 1450.17, 1417.48, 1392.96, 1335.75, 1315.32, 1237.68, 1184.56, 1147.79, 1119.18.

*<sup>1</sup>H-NMR:* (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 0.93 (dd, 6 H,  $J = 17.5, 6.9$  Hz, Val-CH<sub>3</sub>), 2.17-2.34 (m, 1 H, Val-CH), 3.88 (d, 9 H,  $J = 3.0$  Hz, OCH<sub>3</sub>), 4.79 (dd, 1 H,  $J = 8.9, 4.7$  Hz, N-CH-COO), 5.13-5.26 (m, 2 H, COO-CH<sub>2</sub>-Ph), 6.18 (d, 1 H,  $J = 8.8$  Hz, NH), 6.39 (d, 1 H,  $J = 15.5$  Hz, Ph-CH=CH-CONH), 6.73 (s, 2 H, Ph-CH), 7.36 (s, 5 H, Ph-CH), 7.54 (d, 1 H,  $J = 15.5$  Hz, Ph-CH=CH-CONH).

*<sup>13</sup>C-NMR:* (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 17.85, 19.14 (Val-CH<sub>3</sub>), 31.77 (Val-CH), 56.26 (OCH<sub>3</sub>), 57.23 (N-CH-COO), 61.09 (OCH<sub>3</sub>), 67.30 (COO-CH<sub>2</sub>-Ph), 105.10 (Ph-CH), 119.71 (Ph-CH=CH-CONH), 128.54, 128.65, 128.76 (Ph-CH), 130.38 (Ph-C<sub>q</sub>-CH=CH-CONH), 135.37 (Ph-C<sub>q</sub>-CH<sub>2</sub>-OOC), 139.79 (Ph-C-OCH<sub>3</sub>), 141.83 (Ph-CH=CH-CONH), 153.52 (Ph-C-OCH<sub>3</sub>), 165.76 (Ph-CH=CH-CONH), 172.26 (COO-CH<sub>2</sub>-Ph).

$[\alpha]_D^{20}$ : +54.2° (1.433,  $\text{CHCl}_3$ )

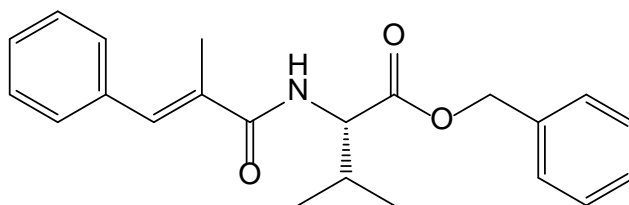
*Schmelzpunkt:* 100-101 °C

*FD-MS:* [M] 427.1, [2M] 853.0

*HPLC:*  $R_t = 26.4$  min, Reinheit: 94% (Methode: HPLC-2)

8.1.26 (S,E)-Benzyl-3-methyl-2-(2-methyl-3-phenylacrylamido)butanoat (SH34)

*Struktur:*



<i>Molare Masse:</i>	351.44
<i>Summenformel:</i>	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>3</sub>
<i>Methode:</i>	A3
<i>Ansatz:</i>	347.7 mg (2.144 mmol) α-Methylzimtsäure, 812.0 mg (2.140 mmol) L-Valinbenzylester-Hydrochlorid, 890.9 mg (2.154 mmol) HCTU, 0.7 ml (4.236 mmol) Diisopropylethylamin, 70 ml Dichlormethan.
<i>Aufreinigung:</i>	Säulenchromatographie (Petrolether/Ethylacetat = [8:1])
<i>R<sub>f</sub>-Wert:</i>	0.63 (Petrolether/Ethylacetat = [3:1])
<i>Ausbeute:</i>	652 mg (1.858 mmol, 87%), farbloser Feststoff
<i>FT-IR:</i>	$\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3317.59, 3027.47, 2970.26, 2908.97, 2876.28, 1732.12, 1634.05, 1617.71, 1519.64, 1491.03, 1442.00, 1392.96, 1368.44, 1331.67, 1249.94, 1151.87.
<i><sup>1</sup>H-NMR:</i>	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): δ (ppm) = 0.96 (dd, 6 H, <i>J</i> = 15.7, 6.9 Hz, Val- <u>CH</u> <sub>3</sub> ), 2.14 (d, 3 H, <i>J</i> = 1.3 Hz, Ph-CH=C( <u>CH</u> <sub>3</sub> )-CONH), 2.19-2.36 (m, 1 H, Val- <u>CH</u> ), 4.76 (dd, 1 H, <i>J</i> = 8.6, 4.7 Hz, N- <u>CH</u> -COO), 5.17 (d, 1 H, <i>J</i> = 12.2 Hz, COO- <u>CH</u> <sub>2</sub> -Ph), 5.25 (d, 1 H, <i>J</i> = 12.2 Hz, COO- <u>CH</u> <sub>2</sub> -Ph), 6.40 (d, 1 H, <i>J</i> = 8.5 Hz, N <u>H</u> ), 7.27-7.42 (m, 11 H, Ph-CH=C(CH <sub>3</sub> )-CONH, Ph- <u>CH</u> ).
<i><sup>13</sup>C-NMR:</i>	(75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): δ (ppm) = 14.38 (Ph-CH=C( <u>C</u> CH <sub>3</sub> )-CONH), 17.94, 19.17 (Val- <u>C</u> CH <sub>3</sub> ), 31.70 (Val- <u>CH</u> ), 57.41 (N- <u>CH</u> -COO), 67.25 (COO- <u>C</u> CH <sub>2</sub> -Ph), 128.02, 128.46, 128.51, 128.61 (Ph- <u>CH</u> ), 128.74 (Ph-CH= <u>C</u> (CH <sub>3</sub> )-CONH), 129.47, 131.89, 134.49 (Ph- <u>CH</u> ), 135.41 (Ph- <u>C</u> <sub>q</sub> -CH <sub>2</sub> -OOC), 136.06 (Ph- <u>CH</u> =C(CH <sub>3</sub> )-CONH), 169.52 (Ph-CH=C(CH <sub>3</sub> )- <u>C</u> ONH), 172.26 ( <u>C</u> OO-CH <sub>2</sub> -Ph).
<i>[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>:</i>	+23.8° (1.520, CHCl <sub>3</sub> )

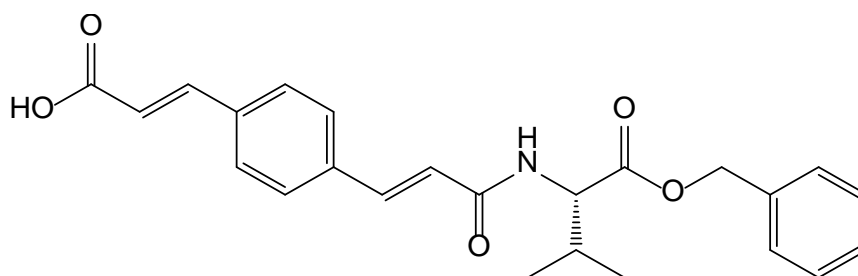
*Schmelzpunkt:* 59-60 °C

*FD-MS:* [M] 352.3, [2M] 702.5

*HPLC:*  $R_t = 28.0-28.5$  min, Reinheit >99% (Methode: HPLC-2)

8.1.27 (E)-3-(4-((E)-3-(((S)-1-(Benzyloxy)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)amino)-3-oxoprop-1-en-1-yl)phenyl)acrylsäure (SH35A)

*Struktur:* Nebenprodukt der Synthese von SH35B



*Molare Masse:* 407.46

*Summenformel:* C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>5</sub>

*Methode:* A4

*Ansatz:* 467.1 mg (2.141 mmol) 1,4-Phenylendiacrylsäure, 1624.9 mg (4.282 mmol) *L*-Valinbenzylester-Hydrochlorid, 1625.0 mg (4.285 mmol) HBTU, 1.4 ml (8.471 mmol) Diisopropylethylamin, 70 ml Dichlormethan.

*Aufreinigung:* Säulenchromatographie (Petrolether/Ethylacetat = [2:1]-[1:2])

*R<sub>f</sub>-Wert:* 0.38 (Petrolether/Ethylacetat = [2:1])

*Ausbeute:* 20 mg (0.049 mmol, 2%), gelblicher Feststoff

*FT-IR:*  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3297.16, 3060.16, 3031.55, 2974.35, 1723.95, 1695.35, 1654.48, 1613.62, 1564.59, 1527.81, 1499.21, 1454.26, 1388.88, 1343.93, 1249.94, 1200.91, 1164.13, 1127.36

$^1\text{H-NMR}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 0.94 (dd, 6 H,  $J = 17.1, 6.9$  Hz, Val- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 2.26 (pd, 1 H,  $J = 6.9, 4.9$  Hz, Val- $\underline{\text{C}}\text{H}$ ), 4.79 (dd, 1 H,  $J = 8.8, 4.7$  Hz, N- $\underline{\text{C}}\text{H}$ -COO), 5.14-5.27 (m, 2 H, COO- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -Ph), 6.33 (d, 1 H,  $J = 8.7$  Hz, N $\underline{\text{H}}$ ), 6.60 (d, 1 H,  $J = 15.6$  Hz, Ph-CH= $\underline{\text{C}}\text{H}$ -CO), 7.30-7.44 (m, 5 H, Ph- $\underline{\text{C}}\text{H}$ ), 7.66 (dd, 3 H,  $J = 11.9, 8.1$  Hz, Ph- $\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}$ -CO, Ph- $\underline{\text{C}}\text{H}$ ), 7.88 (d, 2 H,  $J = 8.3$  Hz, Ph- $\underline{\text{C}}\text{H}$ ), 10.01 (s, 1 H, COO $\underline{\text{H}}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$ : (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 17.85, 19.14 (Val- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 31.72 (Val- $\underline{\text{C}}\text{H}$ ), 57.39 (N- $\underline{\text{C}}\text{H}$ -COO), 67.38 (COO- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -Ph), 123.47 (Ph-CH= $\underline{\text{C}}\text{H}$ -CONH), 128.45, 128.55, 128.68, 128.77, 130.29 (Ph- $\underline{\text{C}}\text{H}$ ), 135.30 (Ph- $\underline{\text{C}}_q$ -CH $_2$ -OOC), 136.97 (Ph- $\underline{\text{C}}_q$ -CH=CH-CO), 140.31 (Ph- $\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}$ -CO), 140.62 (Ph-CH= $\underline{\text{C}}\text{H}$ -COOH), 165.15 (Ph-CH=CH- $\underline{\text{C}}\text{O}$ NH), 172.12 ( $\underline{\text{C}}\text{O}$ O-CH $_2$ -Ph), 191.64 ( $\underline{\text{C}}\text{O}$ OH).

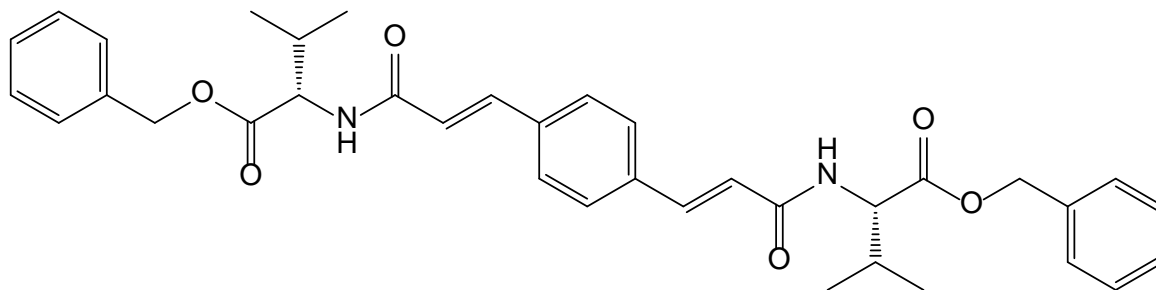
$[\alpha]_D^{20}$ : keine Bestimmung möglich, da zu wenig Substanz!

Schmelzpunkt: 132-134 °C

Reinheit: >90% ( $^1\text{H-NMR}$ )

8.1.28 SH35B (kein IUPAC-Name möglich)

Struktur:



Molare Masse: 596.71

Summenformel:  $\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_6$

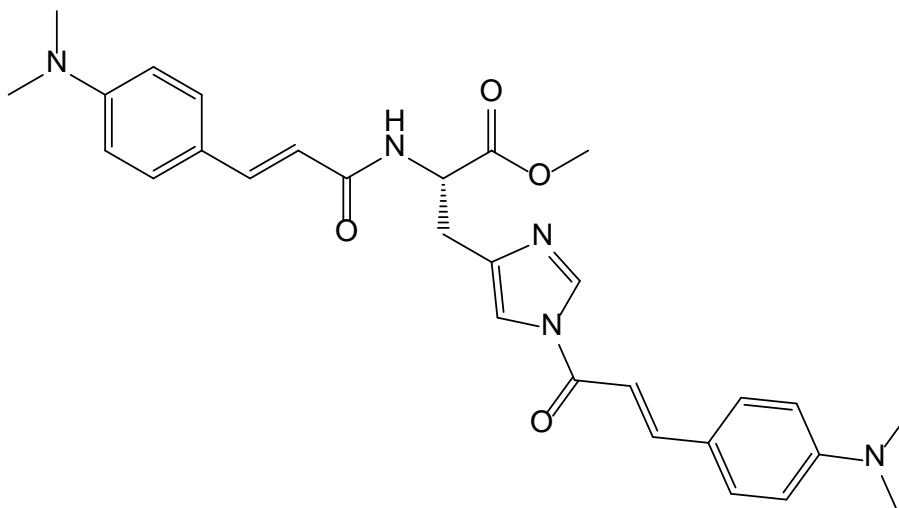
---

<i>Methode:</i>	A4
<i>Ansatz:</i>	467.1 mg (2.141 mmol) 1,4-Phenylendiacylsäure, 1624.9 mg (4.282 mmol) <i>L</i> -Valinbenzylester-Hydrochlorid, 1625.0 mg (4.285 mmol) HBTU, 1.4 ml (8.471 mmol) Diisopropylethylamin, 70 ml Dichlormethan.
<i>Aufreinigung:</i>	Säulenchromatographie (Petrolether/Ethylacetat = [2:1]-[1:2])
<i>R<sub>f</sub>-Wert:</i>	0.17 (Petrolether/Ethylacetat = 2:1)
<i>Ausbeute:</i>	875 mg (1.466 mmol, 68%), gelblicher Feststoff
<i>FT-IR:</i>	$\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3313.51, 3284.90, 3060.16, 3031.55, 2958.00, 2868.10, 1736.21, 1650.40, 1617.71, 1531.90, 1450.17, 1376.62, 1343.93, 1254.03, 1213.17, 1176.39, 1135.63.
<i><sup>1</sup>H-NMR:</i>	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ (ppm) = 0.93 (dd, 12 H, <i>J</i> = 16.6, 6.8 Hz, Val- <u>CH</u> <sub>3</sub> ), 2.15-2.34 (m, 2 H, Val- <u>CH</u> ), 4.80 (dd, 2 H, <i>J</i> = 8.7, 4.8 Hz, N- <u>CH</u> -COO), 5.10-5.28 (m, 4 H, COO- <u>CH</u> <sub>2</sub> -Ph), 6.34 (d, 2 H, <i>J</i> = 8.8 Hz, N <u>H</u> ), 6.51 (d, 2 H, <i>J</i> = 15.6 Hz, Ph-CH= <u>CH</u> -CONH), 7.36 (d, 10 H, <i>J</i> = 1.4 Hz, Ph- <u>CH</u> ), 7.46 (d, 4 H, <i>J</i> = 1.6 Hz, Ph- <u>CH</u> ), 7.61 (d, 2 H, <i>J</i> = 15.6 Hz, Ph- <u>CH</u> =CH-CONH).
<i><sup>13</sup>C-NMR:</i>	(75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ (ppm) = 17.89, 19.14 (Val- <u>CH</u> <sub>3</sub> ), 31.71 (Val- <u>CH</u> ), 57.33 (N- <u>CH</u> -COO), 67.29 (COO- <u>CH</u> <sub>2</sub> -Ph), 121.15 (Ph-CH= <u>CH</u> -CONH), 128.40, 128.51, 128.62, 128.74 (Ph- <u>CH</u> ), 135.35 (Ph- <u>C</u> <sub>q</sub> -CH <sub>2</sub> -OOC), 136.14 (Ph- <u>C</u> <sub>q</sub> -CH=CH-CONH), 140.91 (Ph- <u>CH</u> =CH-CONH), 165.67 (Ph-CH=CH- <u>C</u> ONH), 172.24 ( <u>C</u> OO-CH <sub>2</sub> -Ph).
<i>[<math>\alpha</math>]<sub>D</sub><sup>20</sup>:</i>	+95.3° (1.587, CHCl <sub>3</sub> )
<i>Schmelzpunkt:</i>	152-154 °C
<i>FD-MS:</i>	[M] 595.7, [2M] 1189.9

*HPLC:*  $R_t = 28.6$  min, Reinheit: 99% (Methode: HPLC-2)

8.1.29 (S)-Methyl-2-((E)-3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)-3-(1-((E)-3-(4-(dimethylamino)phenyl)acryloyl)-1*H*-imidazol-4-yl)propanoat (SH36)

*Struktur:*



*Molare Masse:* 515.60

*Summenformel:* C<sub>29</sub>H<sub>33</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>

*Methode:* A3

*Ansatz:* 382.6 mg (2.001 mmol) 4-Dimethylaminozimtsäure, 485.0 mg (2.003 mmol) *L*-Histidinmethylester-Dihydrochlorid, 890.1 mg (2.152 mmol) HCTU, 1.05 ml (6.353 mmol) Diisopropylethylamin, 70 ml Dichlormethan.

*Aufreinigung:* Säulenchromatographie (Dichlormethan/Ethylacetat = [2:1]-[0:1], anschließend Ethylacetat/Methanol = [39:1]-[19:1])

*Ausbeute:* 8 mg (0.016 mmol, 0.8%), gelber Feststoff

*<sup>1</sup>H-NMR:* (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 2.99 (s, 6 H, Ph-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.07 (s, 6 H, Ph-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.10-3.27 (m, 2 H, His-CH<sub>2</sub>), 3.74 (s, 3 H, COO-

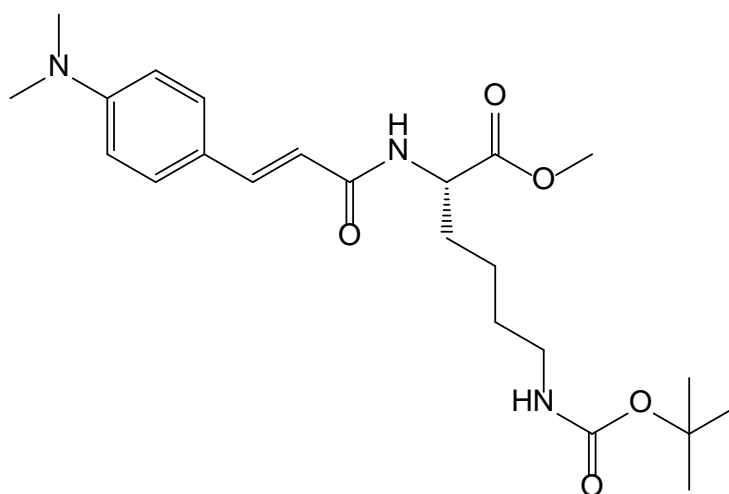
$\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$ ), 5.03 (dt, 1 H,  $J = 7.8, 5.1$  Hz, N- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ -COO), 6.30 (d, 1 H,  $J = 15.6$  Hz, Ph-CH= $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ -CONH), 6.66 (t, 4 H,  $J = 8.4$  Hz, Ph- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ ), 6.73 (d, 1 H,  $J = 15.2$  Hz, His-N-CO- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ =CH-Ph), 7.00 (d, 1 H,  $J = 7.8$  Hz, N $\underline{\text{H}}$ ), 7.32-7.47 (m, 3 H, Ph-CH, His- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ ), 7.52 (d, 2 H,  $J = 8.9$  Hz, Ph- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ ), 7.58 (d, 1 H,  $J = 15.6$  Hz, Ph- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ =CH-CONH), 7.99 (d, 1 H,  $J = 15.1$  Hz, His-N-CO-CH= $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ -Ph), 8.25 (d, 1 H,  $J = 0.8$  Hz, His- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$ : (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 30.06 (His- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$ ), 40.16, 40.26 (Ph-N( $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$ ) $_2$ ), 52.21 (O $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$ ), 52.53 (N- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ -COO), 107.96 (His- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ ), 111.14, 111.79, 111.93 (Ph- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ ), 114.13, 115.18 (Ph-CH= $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ -CO), 121.44, 122.77 (Ph- $\underline{\text{C}}\underline{\text{q}}$ -CH=CH-CO), 129.52, 130.08, 131.11, 133.70 (Ph- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ ), 136.17 (Ph- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ =CH-CO), 139.29 (Ph- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ ), 141.97 (Ph- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ =CH-CO), 150.75 (His- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ ), 151.44, 152.80 (Ph- $\underline{\text{C}}$ -N( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 162.25 (His-N- $\underline{\text{C}}\underline{\text{O}}$ -CH=CH-Ph), 166.63 ( $\underline{\text{C}}\underline{\text{O}}\text{NH}$ ), 172.17 ( $\underline{\text{C}}\underline{\text{O}}$ -O $\text{CH}_3$ ).

$[\alpha]_D^{20}$ : keine Bestimmung möglich, da zu wenig Substanz!

8.1.30 (S,E)-Methyl-6-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)hexanoat (SH37)

Struktur:

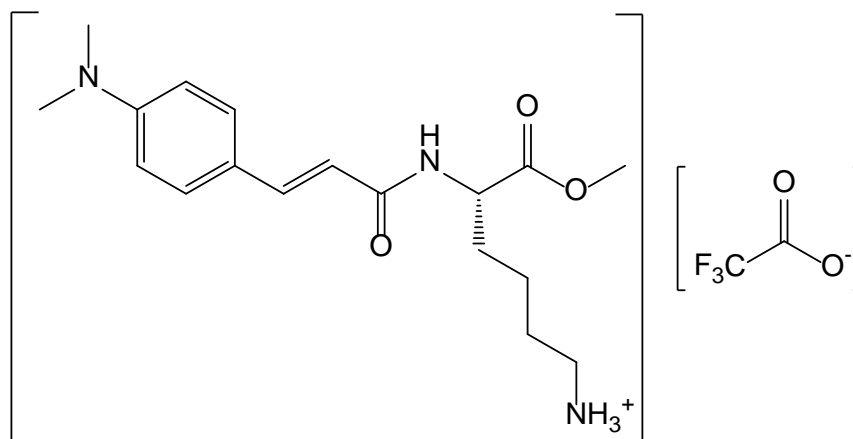




---

<i>Molare Masse:</i>	433.54
<i>Summenformel:</i>	C <sub>23</sub> H <sub>35</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>
<i>Methode:</i>	A3
<i>Ansatz:</i>	191.4 mg (1.001 mmol) 4-Dimethylaminozimtsäure, 298.2 mg (1.005 mmol) <i>L</i> -Lysin(Boc)-methylester-Hydrochlorid, 381.8 mg (1.007 mmol) HBTU, 0.35 ml (2.118 mmol) Diisopropylethylamin, 50 ml Ethylacetat.
<i>Aufreinigung:</i>	Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = [39:1]-[19:1])
<i>R<sub>f</sub>-Wert:</i>	0.32 (Dichlormethan/Methanol = [19:1])
<i>Ausbeute:</i>	250 mg (0.577 mmol, 58%), hochviskoses, gelbes Öl
<i><sup>1</sup>H-NMR:</i>	(300 MHz, CD <sub>3</sub> OD): δ (ppm) = 1.42 (s, 13 H, COO-C( <u>CH</u> <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> , Lys- <u>CH</u> <sub>2</sub> - <u>CH</u> <sub>2</sub> ), 1.49 (d, 2 H, <i>J</i> = 5.6 Hz, Lys- <u>CH</u> <sub>2</sub> ), 1.61-1.99 (m, 1 H, Lys- <u>CH</u> <sub>2</sub> ), 3.00 (s, 6 H, Ph-N( <u>CH</u> <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 3.04 (t, 2 H, <i>J</i> = 6.6 Hz, Lys- <u>CH</u> <sub>2</sub> ), 3.73 (s, 3 H, COO- <u>CH</u> <sub>3</sub> ), 4.50 (dd, 1 H, <i>J</i> = 8.7, 5.1 Hz, N- <u>CH</u> -COO), 6.44 (d, 1 H, <i>J</i> = 15.6 Hz, Ph-CH= <u>CH</u> -CONH), 6.72 (d, 2 H, <i>J</i> = 8.8 Hz, Ph- <u>CH</u> ), 7.42 (d, 2 H, <i>J</i> = 9.1 Hz, Ph- <u>CH</u> ), 7.47-7.55 (m, 1 H, Ph- <u>CH</u> =CH-CONH).
8.1.31	( <i>S,E</i> )-5-(3-(4-(Dimethylamino)phenyl)acrylamido)-6-methoxy-6-oxohexan-1-aminium-2,2,2-trifluoracetat (SH37a)

*Struktur:*



*Molare Masse:* 447.45

*Summenformel:*  $C_{20}H_{28}F_3N_3O_5$

*Methode:* B2

*Ansatz:* 230 mg (0.531 mmol) **SH37**, 1 ml (13.059 mmol) Trifluoressigsäure, 9 ml Dichlormethan (trocken).

*Aufreinigung:* Waschen mit Diethylether

*Ausbeute:* 280 mg (0.626 mmol, 100%), sehr hygroskopischer, roter Feststoff

*FT-IR:*  $\tilde{\nu}$  [ $cm^{-1}$ ] = 3256.30, 3051.99, 2958.00, 1736.21, 1666.74, 1527.81, 1429.74, 1352.10, 1172.30, 1123.27.

*$^1H$ -NMR:* (300 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  (ppm) = 1.27-2.01 (m, 6 H, Lys- $\underline{CH}_2$ ), 2.93 (t, 2 H,  $J = 7.6$  Hz, Lys- $\underline{CH}_2$ ), 3.09 (s, 6 H, Ph-N( $\underline{CH}_3$ ) $_2$ ), 3.74 (s, 3 H, COO-O $\underline{CH}_3$ ), 4.56 (dd, 1 H,  $J = 9.0, 5.1$  Hz, N- $\underline{CH}$ -COO), 6.53 (d, 1 H,  $J = 15.7$  Hz, Ph-CH= $\underline{CH}$ -CONH), 7.00 (d, 2 H,  $J = 8.7$  Hz, Ph-CH), 7.50-7.57 (m, 3 H, Ph- $\underline{CH}$ =CH-CONH, Ph- $\underline{CH}$ ).

*$^{13}C$ -NMR:* keine Bestimmung möglich, da schnelle Zersetzung!

*$[\alpha]_D^{20}$ :* keine Bestimmung möglich, da schnelle Zersetzung!

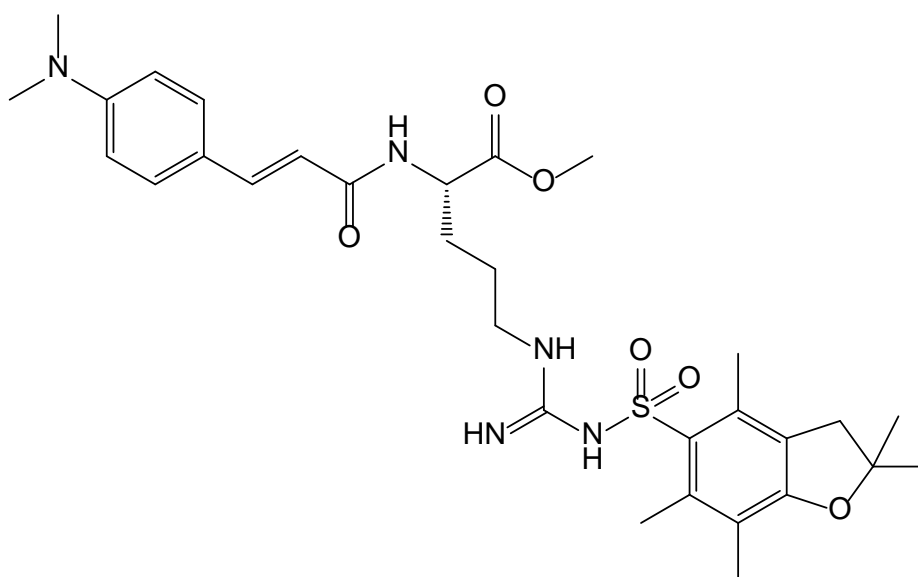
*Schmelzpunkt:* keine Bestimmung möglich, da sehr hygroskopisch!

*FD-MS:* [R-NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> 333.5, [2R-NH<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> 666.5

*HPLC:* keine Reinheitsbestimmung möglich, da schnelle Zersetzung!

8.1.32 (S,E)-Methyl 2-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)-5-(3-((2,2,4,6,7-pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)sulfonyl)guanidino)pentanoat (SH38)

*Struktur:*



*Molare Masse:* 613.77

*Summenformel:* C<sub>31</sub>H<sub>43</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>S

*Methode:* A3

*Ansatz:* 191.7 mg (1.002 mmol) 4-Dimethylaminozimtsäure, 477.1 mg (1.000 mmol) *L*-Arginin(Pbf)-methylester-Hydrochlorid, 383.9 mg (1.012 mmol) HBTU, 0.35 ml (2.118 mmol) Diisopropylethylamin, 50 ml Ethylacetat.

*Aufreinigung:* Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = [39:1]-[19:1])

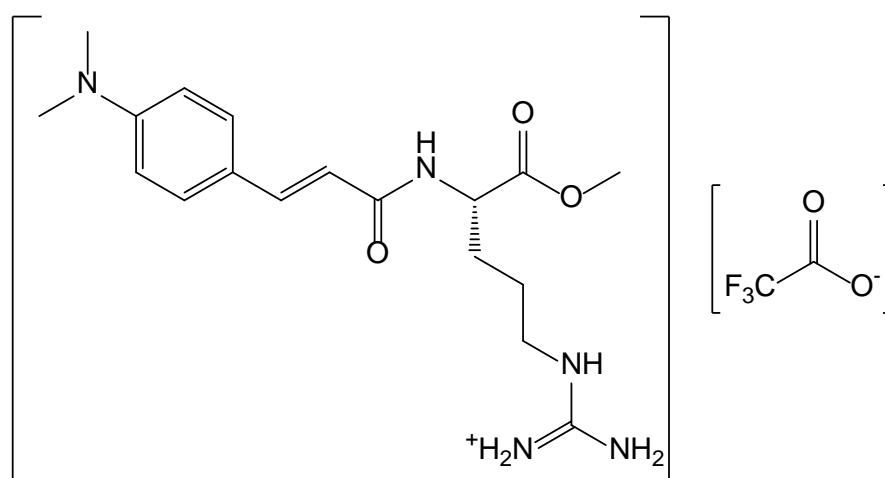
*R<sub>f</sub>-Wert:* 0.27 (Dichlormethan/Methanol = [19:1])

*Ausbeute:* 270 mg (0.440 mmol, 44 %), hochviskoses, gelbes Öl

$^1\text{H-NMR}$ : (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) = 1.43 (s, 6 H, Pbf-C( $\underline{\text{H}}_3$ ) $_2$ ), 1.49-1.95 (m, 2 H, Arg-C( $\underline{\text{H}}_2$ )), 2.06 (s, 3 H, Pbf-C( $\underline{\text{H}}_3$ )), 2.50 (s, 3 H, Pbf-C( $\underline{\text{H}}_3$ )), 2.56 (s, 3 H, Pbf-C( $\underline{\text{H}}_3$ )), 2.96 (s, 2 H, Pbf-C( $\underline{\text{H}}_2$ )), 3.00 (s, 6 H, Ph-N( $\underline{\text{H}}_3$ ) $_2$ ), 3.17 (qdd, 2 H,  $J = 4.2, 2.4, 1.3$  Hz, Arg-C( $\underline{\text{H}}_2$ )), 3.70 (s, 3 H, COO- $\underline{\text{H}}_3$ ), 4.45-4.53 (m, 1 H, N-C( $\underline{\text{H}}$ )-COO), 6.43 (d, 1 H,  $J = 15.6$  Hz, Ph-CH=C( $\underline{\text{H}}$ )-CONH), 6.73 (d, 2 H,  $J = 8.7$  Hz, Ph-C( $\underline{\text{H}}$ )), 7.42 (d, 2 H,  $J = 8.6$  Hz, Ph-C( $\underline{\text{H}}$ )), 7.50 (d, 1 H,  $J = 9.2$  Hz, Ph-C( $\underline{\text{H}}$ )-CH-CONH).

8.1.33 (S,E)-Amino((4-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)-5-methoxy-5-oxopentyl)amino)methaniminium-2,2,2-trifluoracetat (SH38a)

*Struktur:*



*Molare Masse:* 475.46

*Summenformel:*  $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_5$

*Methode:* B2

*Ansatz:* 250 mg (0.407 mmol) **SH38**, 4.5 ml (58.766 mmol) Trifluoressigsäure, 9 ml Dichlormethan (trocken).

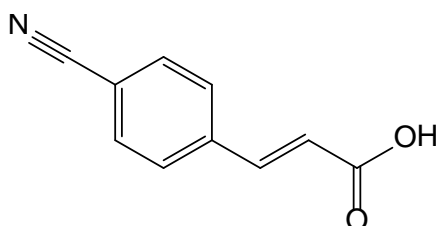
*Aufreinigung:* Waschen mit Diethylether

---

<i>Ausbeute:</i>	230 mg (0.484 mmol, 100 %), gelber Feststoff
<i>FT-IR:</i>	$\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3346.20, 3272.64, 3182.72, 2953.92, 2467.65, 1736.21, 1658.57, 1621.79, 1540.07, 1454.26, 1433.83, 1352.10, 1172.30, 1127.36.
<i><sup>1</sup>H-NMR:</i>	(300 MHz, CD <sub>3</sub> OD): $\delta$ (ppm) = 1.57-1.76 (m, 2 H, Arg-CH <sub>2</sub> ), 1.76-1.88 (m, 1 H, Arg-CH <sub>2</sub> ), 1.95 (qd, 1 H, <i>J</i> = 10.8, 4.8 Hz, Arg-CH <sub>2</sub> ), 3.15 (s, 6 H, Ph-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 3.24 (td, 3 H, <i>J</i> = 9.7, 5.4 Hz, Arg-CH <sub>2</sub> , NH), 3.74 (s, 3 H, COO-CH <sub>3</sub> ), 4.54 (dd, 1 H, <i>J</i> = 8.9, 4.8 Hz, N-CH-COO), 6.69 (d, 1 H, <i>J</i> = 15.7 Hz, Ph-CH=CH-CONH), 7.23 (d, 2 H, <i>J</i> = 8.5 Hz, Ph-CH), 7.51 (d, 1 H, <i>J</i> = 15.7 Hz, Ph-CH=CH-CONH), 7.62 (d, 2 H, <i>J</i> = 8.6 Hz, Ph-CH).
<i><sup>13</sup>C-NMR:</i>	(75 MHz, CD <sub>3</sub> OD): $\delta$ (ppm) = 26.27, 29.81, 41.33 (Arg-CH <sub>2</sub> ), 41.83 (Ph-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 52.81 (COO-CH <sub>3</sub> ), 53.35 (N-CH-COO), 114.49 (Ph-CH), 116.59 (Ph-CH=CH-CONH), 125.91 (Ph-C <sub>q</sub> -CH=CH-CONH), 130.55 (Ph-CH), 142.88 (Ph-CH=CH-CONH), 152.01 (Ph-C-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 158.59 (C=NH <sub>2</sub> <sup>+</sup> ), 169.49 (Ph-CH=CH-CONH), 173.91 (COO-CH <sub>3</sub> ).
<i>[\alpha]<sub>D</sub><sup>20</sup>:</i>	-19.7° (1.053, CH <sub>3</sub> OH)
<i>Schmelzpunkt:</i>	280-285 °C (Zersetzung)
<i>FD-MS:</i>	[R <sub>2</sub> C=NH <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> 362.5
<i>HPLC:</i>	keine Reinheitsbestimmung möglich, da schnelle Zersetzung!

8.1.34 (E)-3-(4-Cyanophenyl)acrylsäure (SH42)

*Struktur:*



*Molare Masse:* 173.17

*Summenformel:* C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>

*Methode:* C1

*Ansatz:* 3.938 g (30 mmol) 4-Cyanobenzaldehyd, 6.244 g (60 mmol) Malonsäure, 600 ml (6.06 mmol) Piperidin, 60 ml Pyridin.

*Aufreinigung:* Das Rohprodukt wurde ohne Aufreinigung weiter umgesetzt.

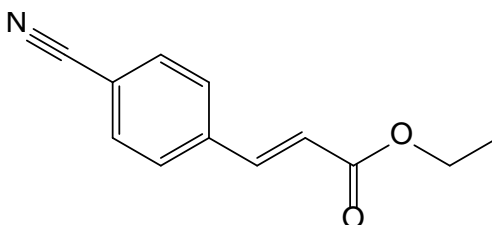
*Ausbeute:* 3.65 g (21.078 mmol, 70 %), farbloser Feststoff

*<sup>1</sup>H-NMR:* (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 6.71 (d, 1 H, *J* = 16.1 Hz, Ph-CH=CH-COOH), 7.63 (d, 1 H, *J* = 16.0 Hz, Ph-CH=CH-COOH), 7.89 (d, 4 H, *J* = 2.2 Hz, Ph-CH), 12.14 (s, 1 H, COOH).

Die <sup>1</sup>H-NMR-Daten entsprechen der Literatur <sup>[81]</sup>.

### 8.1.35 (E)-Ethyl-3-(4-cyanophenyl)acrylat (SH43)

*Struktur:*



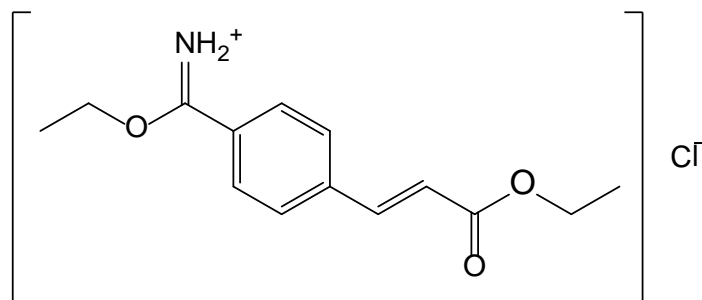
*Molare Masse:* 201.22

*Summenformel:* C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>

- Methode:* C2
- Ansatz 1:* 600 mg (3.465 mmol) 4-Cyanozimtsäure (**SH42**), 0.55 ml (7.540 mmol) Thionylchlorid, 5 Tropfen DMF, Dichlormethan (trocken), 30 ml Ethanol (trocken), 30 ml Pyridin.
- Ansatz 2:* 2 g (11.549 mmol) 4-Cyanozimtsäure (SH42), 1.7 ml (23.306 mmol) Thionylchlorid, 10 Tropfen DMF, Dichlormethan (trocken), 50 ml Ethanol (trocken), 4 ml (50 mmol) Pyridin.
- Ansatz 3:* 900 mg (5.197 mmol) 4-Cyanozimtsäure (**SH42**), 0.8 ml (10.967 mmol) Thionylchlorid, 10 Tropfen DMF, Dichlormethan (trocken), 40 ml Ethanol (trocken), 1.8 ml (22 mmol) Pyridin.
- Aufreinigung:* Das Rohprodukt wurde ohne Aufreinigung weiter umgesetzt.
- Ausbeute 1:* 560 mg (2.783 mmol, 80%), schwach gelblicher Feststoff
- Ausbeute 2:* 2.28 g (11.331 mmol, 98%), schwach gelblicher Feststoff
- Ausbeute 3:* 1.088 g (5.407 mmol, 100%), schwach gelblicher Feststoff
- <sup>1</sup>H-NMR:* (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 1.33 (t, 3 H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 4.27 (q, 2 H, *J* = 7.1 MHz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 6.51 (d, 1 H, *J* = 16.0 Hz, Ph-CH=CH-COO), 7.57-7.72 (m, 5 H, Ph-CH, Ph-CH=CH-COO).
- Die <sup>1</sup>H-NMR-Daten entsprechen der Literatur<sup>[74]</sup>.

8.1.36 (E)-Ethyl-3-(4-(ethoxy(imino)methyl)phenyl)acrylat-Hydrochlorid (SH44)

*Struktur:*



*Molare Masse:* 283.75

*Summenformel:* C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>ClNO<sub>3</sub>

*Methode:* C3

*Ansatz:* 1.02 g (5.069 mmol) 4-Cyanozimtsäureethylester (**SH43**), 40 ml Ethanol (trocken), Chlorwasserstoff-Gas.

*Aufreinigung:* Das Rohprodukt wurde ohne Aufreinigung weiter umgesetzt.

*Ausbeute:* 1.386 g (4.885 mmol, 96%), farbloser Feststoff

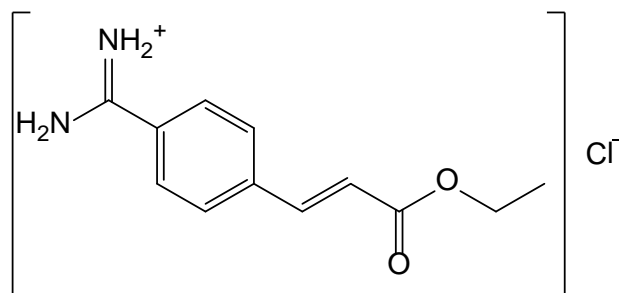
*FT-IR:*  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2986.61, 2806.81, 1715.78, 1638.14, 1507.38, 1446.08, 1384.79, 1360.27, 1303.06, 1213.17, 1168.22, 1123.27.

*<sup>1</sup>H-NMR:* (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.27 (td, 3 H, *J* = 7.0, 3.7 Hz, COO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.42-1.52 (m, 3 H, <sup>+</sup>H<sub>2</sub>N=C-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 4.22 (dt, 2 H, *J* = 7.0, 5.2 Hz, COO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 4.53-4.64 (m, 2 H, <sup>+</sup>H<sub>2</sub>N=C-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 6.88 (d, 1 H, *J* = 16.1 Hz, Ph-CH=CH-COO), 7.74 (d, 1 H, *J* = 16.2 Hz, Ph-CH=CH-COO), 7.95-8.03 (m, 2 H, Ph-CH), 8.09 (td, 2 H, *J* = 8.6, 3.5 Hz, Ph-CH).

8.1.37 (E)-Amino(4-(3-ethoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)phenyl)methaniminiumchlorid (SH45)

*Struktur:*





- Molare Masse:* 254.71
- Summenformel:* C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Methode:* C4
- Ansatz 1:* 600 mg (2.115 mmol) **SH44**, 1.1 ml (2.200 mmol) ethanolische Ammoniak-Lösung (2M), 20 ml Ethanol (trocken).
- Ansatz 2:* 602 mg (2.122 mmol) SH44, 1.5 ml (3.000 mmol) ethanolische Ammoniak-Lösung (2M), 20 ml Ethanol (trocken).
- Aufreinigung:* Umkristallisation (Diethylether/Ethanol = [1:1])
- Ausbeute 1:* 560 mg (2.199 mmol, 100%), farbloser Feststoff
- Ausbeute 2:* 580 mg (2.277 mmol, 100%), farbloser Feststoff
- FT-IR:*  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3333.94, 3109.19, 3031.55, 2806.81, 1679.00, 1634.05, 1605.45, 1576.84, 1535.98, 1495.12, 1433.83, 1401.14, 1364.36, 1311.24, 1254.03, 1209.08, 1188.65.
- <sup>1</sup>H-NMR:* (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1.22-1.32 (m, 3 H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 4.16-4.26 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 6.86 (d, 1 H, *J* = 16.1 Hz, Ph-CH=CH-COO), 7.73 (d, 1 H, *J* = 16.1 Hz, Ph-CH=CH-COO), 7.82-7.92 (m, 2 H, Ph-CH), 7.94-8.04 (m, 2 H, Ph-CH), 9.25 (s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 9.46 (s, 2 H, NH<sub>2</sub>).
- <sup>13</sup>C-NMR:* (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 13.98 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 60.13 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 121.17 (Ph-CH=CH-COO), 128.40, 128.46 (Ph-CH), 128.57, 138.86

(Ph-C<sub>q</sub>), 142.32 (Ph-CH=CH-COO), 164.77 (Amidin-C), 165.66 (COO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).

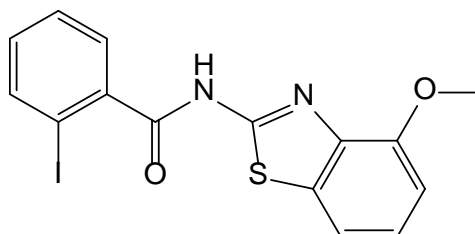
*Schmelzpunkt:* >300 °C

*FD-MS:* [R<sub>2</sub>C=NH<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 219.6

## 8.2 Benzothiazole und Diarylthioether

### 8.2.1 2-Iod-N-(4-methoxybenzo[d]thiazol-2-yl)benzamid (SH50)

*Struktur:*



*Molare Masse:* 410.23

*Summenformel:* C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>IN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S

*Methode:* A3

*Ansatz:* 396.4 mg (1.598 mmol) 2-Iodbenzoesäure, 288.0 mg (1.598 mmol) 2-Amino-4-methoxy-1,3-benzothiazol, 606.5 mg (1.599 mmol) HBTU, 0.53 ml (3.207 mmol) Diisopropylethylamin, 50 ml Ethylacetat.

*Aufreinigung:* Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = [1:0]-[39:1])

*R<sub>f</sub>-Wert:* 0.72 (Dichlormethan/Methanol = [39:1])

*Ausbeute:* 596 mg (1.454 mmol, 91%), schwach gelblicher Feststoff

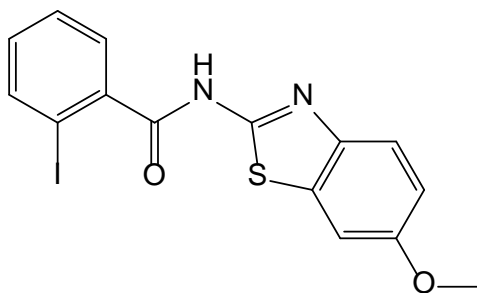
*<sup>1</sup>H-NMR:* (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 3.89 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 6.80 (d, 1 H, *J* = 7.9 Hz, Ar-CH), 7.12 (td, 1 H, *J* = 7.8, 1.6 Hz, Ar-CH), 7.27-7.35 (m,

2 H, Ar-CH), 7.46 (ddd, 2 H,  $J = 14.0, 7.8, 1.0$  Hz, Ar-CH), 7.89 (d, 1 H,  $J = 7.9$  Hz, Ar-CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ : (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 56.00 (O $\text{CH}_3$ ), 92.72 (Ph-C-I), 107.02, 113.57, 125.47, 128.45, 129.16, 132.70 (Ar-CH), 133.25, 137.40, 138.61 (Ar-C<sub>q</sub>), 140.92 (Ar-CH), 152.00 (Ar-C- $\text{OCH}_3$ ), 157.52 (S- $\text{C}=\text{N}$ ), 166.67 (CCONH).

### 8.2.2 2-Iod-N-(6-methoxybenzo[d]thiazol-2-yl)benzamid (SH51)

Struktur:



Molare Masse: 410.23

Summenformel:  $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{IN}_2\text{O}_2\text{S}$

Methode: A3

Ansatz: 396.8 mg (1.600 mmol) 2-Iodbenzoesäure, 294.1 mg (1.632 mmol) 2-Amino-6-methoxy-1,3-benzothiazol, 607.1 mg (1.601 mmol) HBTU, 0.53 ml (3.207 mmol) Diisopropylethylamin, 50 ml Ethylacetat.

Aufreinigung: Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = [1:0]-[39:1])

$R_f$ -Wert: 0.72 (Dichlormethan/Methanol = [39:1])

Ausbeute: 426 mg (1.039 mmol, 65%), farbloser Feststoff

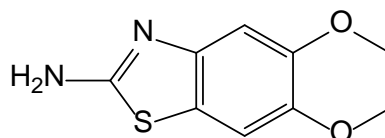
$^1\text{H-NMR}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.86 (s, 3 H, O $\text{CH}_3$ ), 6.65-6.76 (m, 2 H, Ar-CH), 7.07 (td, 1 H,  $J = 7.8, 1.5$  Hz, Ar-CH), 7.31 (td, 1 H,  $J = 7.6,$

0.9 Hz, Ar-CH), 7.52 (ddd, 1 H,  $J = 6.2, 5.7, 2.6$  Hz, Ar-CH), 7.77 (d, 1 H,  $J = 8.0$  Hz, Ar-CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ : (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 55.95 (OCH<sub>3</sub>), 92.83 (Ph-C-I), 103.97, 115.49, 120.76, 128.46, 129.35, 132.45 (Ar-CH), 132.90, 139.55 (Ar-C<sub>q</sub>), 140.56 (Ar-CH), 141.67 (Ar-C<sub>q</sub>), 156.90 (Ar-C-OCH<sub>3</sub>), 157.85 (S-C=N), 167.45 (CONH).

### 8.2.3 5,6-Dimethoxybenzo[*d*]thiazol-2-amin (SH53)

Struktur:



Molare Masse: 210.25

Summenformel:  $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$

Methode: D

Ansatz: 4.600 g (30 mmol) 3,4-Dimethoxyanilin, 11.7 g (120 mmol) Kaliumthiocyanat, 1.5 ml (29.276 mmol) Brom, 60 ml Eisessig.

Aufreinigung: Das Rohprodukt wurde ohne Aufreinigung weiter umgesetzt.

$R_f$ -Wert: 0.10 (Dichlormethan/Methanol = [39:1])

Ausbeute: rotvioletter Feststoff

FT-IR:  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3366.63, 3309.42, 3088.76, 2994.78, 2962.09, 2933.48, 2761.86, 2157.98, 1650.40, 1601.36, 1535.98, 1470.60, 1433.83, 1401.14, 1352.10, 1307.15, 1196.82, 1164.13.

$^1\text{H-NMR}$ : (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.74 (d, 6 H,  $J = 7.5$  Hz, OCH<sub>3</sub>), 6.97 (s, 1 H, Ar-CH), 7.20 (s, 1 H, NH<sub>2</sub>), 7.28 (s, 1 H, Ar-CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ : (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 55.68, 56.20 ( $\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 102.35, 104.83 ( $\text{Ar}\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}$ ), 121.30, 144.63 ( $\text{Ar}\text{-}\underline{\text{C}}_q$ ), 146.64, 148.19 ( $\text{Ar}\text{-}\underline{\text{C}}\text{-OCH}_3$ ), 165.81 ( $\text{S}\text{-}\underline{\text{C}}\text{=N}$ ).

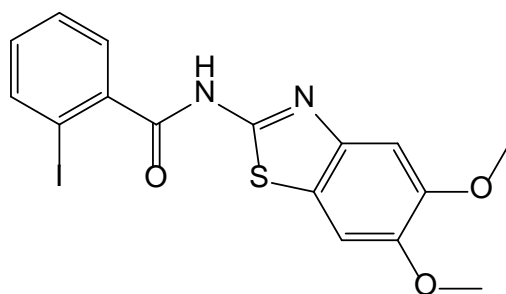
*Schmelzpunkt*: 227 °C

*FD-MS*: [M] 210.6

*HPLC*:  $R_t$  = 18.3 min, Reinheit 89% (Methode: HPLC-2)

#### 8.2.4 *N*-(5,6-Dimethoxybenzo[*d*]thiazol-2-yl)-2-iodbenzamid (SH56)

*Struktur*:



*Molare Masse*: 440.26

*Summenformel*:  $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{IN}_2\text{O}_3\text{S}$

*Methode*: A3

*Ansatz*: 498.5 mg (2.010 mmol) 2-Iodbenzoesäure, 423.5 mg (2.014 mmol) **SH53**, 764.9 mg (2.017 mmol) HBTU, 0.7 ml (4.236 mmol) Diisopropylethylamin, 50 ml Ethylacetat.

*Aufreinigung*: Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = [1:0]-[39:1])

*R<sub>f</sub>-Wert*: 0.46 (Dichlormethan/Methanol = [39:1])

*Ausbeute*: 786 mg (1.785 mmol, 89%), hellbrauner Feststoff

*FT-IR:*  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3145.97, 3076.50, 2929.40, 2904.88, 2827.24, 2157.09, 1670.83, 1548.24, 1482.86, 1466.52, 1429.74, 1409.31, 1282.63, 1221.34, 1200.91, 1155.96, 1127.36.

*<sup>1</sup>H-NMR:* (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.77 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.96 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.56 (s, 1 H, Benzothiazol- $\text{CH}$ ), 7.04 (td, 1 H,  $J = 7.7, 1.6$  Hz, Ar- $\text{CH}$ ), 7.18-7.25 (m, 2 H, Ar- $\text{CH}$ ), 7.48 (dd, 1 H,  $J = 7.6, 1.5$  Hz, Ar- $\text{CH}$ ), 7.77 (d, 1 H,  $J = 7.9$  Hz, Ar- $\text{CH}$ ).

*<sup>13</sup>C-NMR:* (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 55.74, 55.97 ( $\text{OCH}_3$ ), 93.75 (Ph- $\text{C}-\text{I}$ ), 103.62 (Benzothiazol- $^{4/7}\text{CH}$ ), 123.04 (Ar- $\text{C}_q$ ), 128.08, 128.65, 131.79, 139.17 (Ar- $\text{CH}$ ), 140.53, 142.55 (Ar- $\text{C}_q$ ), 147.14, 148.98 (Ar- $\text{C}-\text{OCH}_3$ ), 156.18 (S- $\text{C}=\text{N}$ ), 167.61 ( $\text{CONH}$ ).

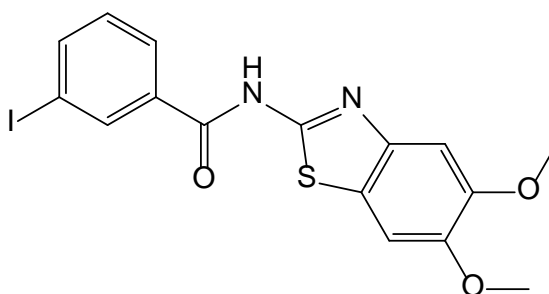
*Schmelzpunkt:* 184-185 °C

*ESI-MS:*  $[\text{M}+\text{H}]^+$  440.96,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  462.96,  $[\text{M}+\text{K}]^+$ , 478.95,  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$  902.94

*HPLC:*  $R_t = 24.5$  min, Reinheit: 84% (Methode: HPLC-2)

### 8.2.5 *N*-(5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-3-iodbenzamid (SH58)

*Struktur:*



*Molare Masse:* 440.26

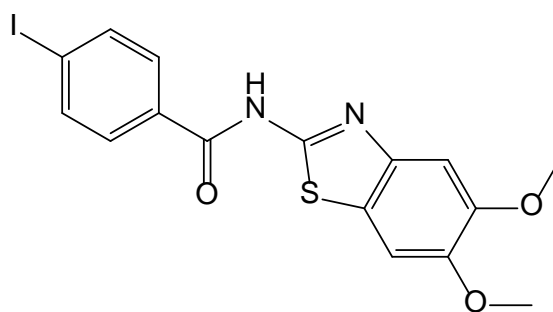
*Summenformel:*  $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{IN}_2\text{O}_3\text{S}$

*Methode:* A3

- Ansatz:* 497.6 mg (2.006 mmol) 3-Iodbenzoesäure, 425.0 mg (2.021 mmol) **SH53**, 762.6 mg (2.011 mmol) HBTU, 0.7 ml (4.236 mmol) Diisopropylethylamin, 50 ml Ethylacetat.
- Aufreinigung:* Säulenchromatographie (Petrolether/Ethylacetat = [3:1]-[1:2])
- R<sub>f</sub>-Wert:* 0.30 (Petrolether/Ethylacetat = [3:1])
- Ausbeute:* 660 mg (1.499 mmol, 75 %), schwach gelblicher Feststoff
- FT-IR:*  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3187.62, 3073.56, 2995.90, 2944.94, 2830.88, 2636.73, 2527.52, 2360.07, 1698.04, 1664.07, 1552.47, 1477.26, 1433.59, 1397.19, 1312.28, 1280.74, 1237.06, 1224.93, 1203.10, 1159.43, 1142.44.
- <sup>1</sup>H-NMR:* (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 3.84 (d, 6 H, *J* = 5.6 Hz, OCH<sub>3</sub>), 7.31 (s, 1 H, Benzothiazol-CH), 7.36 (t, 1 H, *J* = 7.9 Hz, Ar-CH), 7.54-7.62 (m, 2 H, Ar-CH), 7.66 (dt, 2 H, *J* = 7.3, 3.7 Hz, Ar-CH), 8.01 (d, 1 H, *J* = 7.8 Hz, Ar-CH), 8.10 (d, 1 H, *J* = 7.8 Hz, Ar-CH), 8.48 (s, 1 H, Ar-CH), 12.98 (s, 1 H, CONH).
- <sup>13</sup>C-NMR:* (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 55.78, 55.98 (OCH<sub>3</sub>), 94.84 (Ph-C-I), 103.22, 103.70 (Benzothiazol-<sup>47</sup>CH), 122.93, 127.68 (Ar-C<sub>q</sub>), 128.38, 130.73, 130.81, 132.85 (Ar-CH), 134.22, 136.64, 141.10 (Ar-C<sub>q</sub>), 147.19, 149.03, (Ar-C-OCH<sub>3</sub>), 168.72 (CONH).
- Schmelzpunkt:* 178-179 °C
- ESI-MS:* [M+H]<sup>+</sup> 440.98
- HPLC:* R<sub>t</sub> = 26.9 min, Reinheit: 78% (Methode: HPLC-2)

## 8.2.6 N-(5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-4-iodbenzamid (SH59)

*Struktur:*



- Molare Masse:* 440.26
- Summenformel:* C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>I<sub>N</sub><sub>2</sub>O<sub>3</sub>S
- Methode:* A3
- Ansatz:* 498.4 mg (2.010 mmol) 4-Iodbenzoesäure, 423.2 mg (2.013 mmol) **SH53**, 767.7 mg (2.024 mmol) HBTU, 0.7 ml (4.236 mmol) Diisopropylethylamin, 50 ml Ethylacetat.
- Aufreinigung:* Säulenchromatographie (Petrolether/Ethylacetat = [3:1]-[1:2])
- R<sub>f</sub>-Wert:* 0.33 (Petrolether/Ethylacetat = [3:1])
- Ausbeute:* 660 mg (1.499 mmol, 75 %), gelblicher Feststoff
- FT-IR:*  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2933.96, 2359.68, 1741.06, 1671.02, 1584.65, 1549.63, 1478.65, 1287.23, 1245.21, 1217.20, 1200.86, 1158.84.
- <sup>1</sup>H-NMR:* (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 3.83 (d, 6 H, *J* = 4.9 Hz, OCH<sub>3</sub>), 7.31 (s, 1 H, Benzothiazol-CH), 7.59 (s, 1 H, Benzothiazol-CH), 7.88 (d, 2 H, *J* = 7.9 Hz, Ph-CH), 7.95 (d, 2 H, *J* = 7.8 Hz, Ph-CH).
- <sup>13</sup>C-NMR:* (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 55.76, 55.96 (OCH<sub>3</sub>), 100.94 (Ph-C-D), 103.23, 103.71 (Benzothiazol-<sup>4/7</sup>CH), 122.94, 128.36 (Ar-C<sub>q</sub>), 130.06 (Ar-CH), 130.76, 131.61, 132.83 (Ar-C<sub>q</sub>), 137.50 (Ar-CH), 147.16, 149.00 (Ar-C-OCH<sub>3</sub>), 168.66 (CONH).
- Schmelzpunkt:* 207 °C

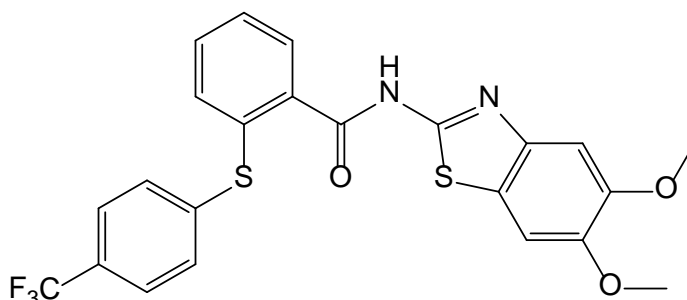


*ESI-MS:*  $[M+H]^+$  441.00

*HPLC:*  $R_t = 27.0$  min, Reinheit: 81% (Methode: HPLC-2)

8.2.7 *N*-(5,6-Dimethoxybenzo[*d*]thiazol-2-yl)-2-((4-(trifluormethyl)phenyl)thio)benzamid (SH60)

*Struktur:*



*Molare Masse:* 490.52

*Summenformel:*  $C_{23}H_{17}F_3N_2O_3S_2$

*Methode:* E1

*Ansatz:* 440.1 mg (1.000 mmol) **SH56**, 0.14 ml (1.022 mmol) *p*-Trifluormethylthiophenol, 19.6 mg (0.103 mmol) Kupfer(I)-iodid, 276.8 mg (2.002 mmol) Kaliumcarbonat, 0.12 ml (2.152 mmol) Ethylenglycol, 10 ml Isopropanol.

*Aufreinigung:* Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = [1:0]-[39:1])

*R<sub>f</sub>-Wert:* 0.69 (Dichlormethan/Methanol = [39:1])

*Ausbeute:* 460 mg (0.938 mmol, 94%), bernsteinfarbener Feststoff

*FT-IR:*  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3072.42, 2945.74, 2904.88, 2827.24, 1728.04, 1662.66, 1597.28, 1544.15, 1482.86, 1433.83, 1397.05, 1364.36, 1319.41, 1282.63, 1217.25, 1155.96, 1119.18.

<sup>1</sup>H-NMR: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 3.75 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.95 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 6.83 (s, 1 H, Benzothiazol-CH), 7.21 (dt, 2 H, J = 7.6, 3.0 Hz, Ar-CH), 7.34 (qd, 4 H, J = 7.5, 1.3 Hz, Ar-CH), 7.47 (d, 2 H, J = 8.5 Hz, Ar-CH), 7.85 (dd, 1 H, J = 7.6, 1.5 Hz, Ar-CH).

<sup>13</sup>C-NMR: (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 56.09, 56.49 (OCH<sub>3</sub>), 102.65, 102.88 (Benzothiazol-<sup>47</sup>CH), 123.51 (Ar-C<sub>q</sub>), 126.31, 126.36, 128.02, 129.90, 131.35, 132.43, 133.00 (Ph-CH), 134.52, 134.72, 139.56, 141.80 (Ar-C<sub>q</sub>), 147.80, 149.36 (Ar-C-OCH<sub>3</sub>), 158.15 (S-C=N), 165.46 (CONH).

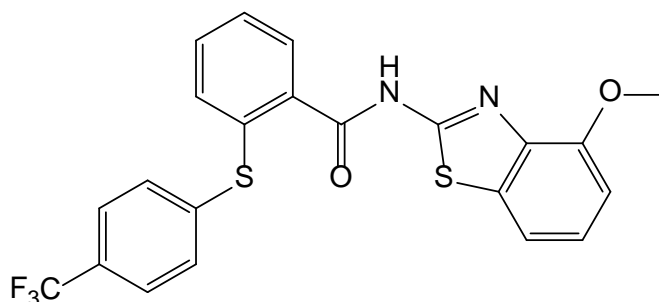
Schmelzpunkt: 194 °C

ESI-MS: [M+H]<sup>+</sup> 491.11, [M+Na]<sup>+</sup> 513.11, [M+K]<sup>+</sup> 529.09, [2M+Na]<sup>+</sup> 1003.24

HPLC: R<sub>t</sub> = 27.8 min, Reinheit: 96% (Methode: HPLC-1)

8.2.8 N-(4-Methoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-2-((4-(trifluormethyl)phenyl)thio)benzamid (SH61)

Struktur:



Molare Masse: 460.49

Summenformel: C<sub>22</sub>H<sub>15</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>

Methode: E1

Ansatz: 410.5 mg (1.001 mmol) **SH50**, 0.14 ml (1.022 mmol) *p*-Trifluormethylthiophenol, 21.3 mg (0.112 mmol) Kupfer(I)-iodid, 276.8

(2.002 mmol) Kaliumcarbonat, 0.12 ml (2.152 mmol) Ethylenglycol, 10 ml Isopropanol.

*Aufreinigung:* Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol [1:0]-[39:1])

*R<sub>f</sub>-Wert:* 0.44 (Dichlormethan)

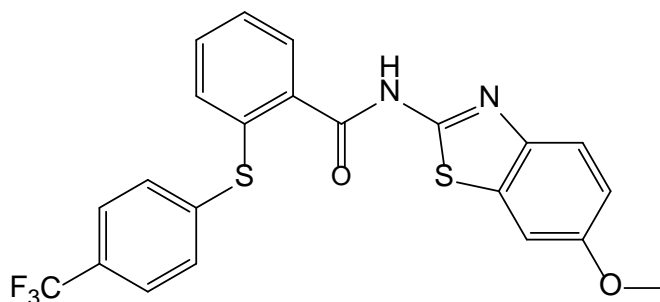
*Ausbeute:* 320 mg (0.695 mmol, 69%), gelblicher Feststoff

*<sup>1</sup>H-NMR:* (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 3.92 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 6.84 (d, 1 H, *J* = 8.0 Hz, Ar-CH), 7.24 (d, 1 H, *J* = 1.8 Hz, Ar-CH), 7.31 (dd, 2 H, *J* = 12.5, 7.7 Hz, Ar-CH), 7.41 (q, 4 H, *J* = 5.7 Hz, Ar-CH), 7.51 (d, 2 H, *J* = 8.4 Hz, Ar-CH), 7.80 (d, 1 H, *J* = 7.2 Hz, Ar-CH).

*<sup>13</sup>C-NMR:* (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 55.86 (OCH<sub>3</sub>), 106.85 (Ar-CH), 113.57 (Ar-C<sub>q</sub>), 125.22, 126.39, 126.43, 127.82 (Ar-CH), 129.77 (Ar-C<sub>q</sub>), 131.69, 132.57, 132.76 (Ar-CH), 133.51, 133.77, 135.25, 137.99, 139.49 (Ar-C<sub>q</sub>), 152.04 (Ar-C-OCH<sub>3</sub>), 157.39 (S-C=N), 165.35 (CONH).

8.2.9 *N*-(6-Methoxybenzo[*d*]thiazol-2-yl)-2-((4-(trifluormethyl)phenyl)thio)benzamid (SH62)

*Struktur:*



*Molare Masse:* 460.49

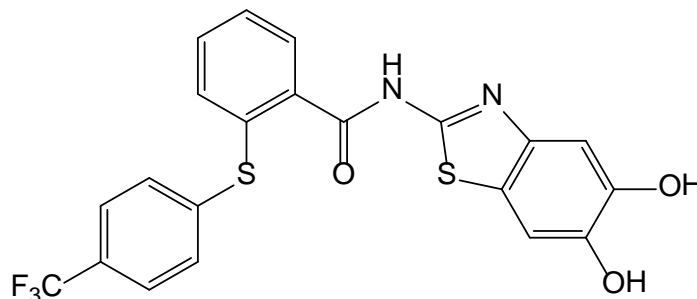
*Summenformel:* C<sub>22</sub>H<sub>15</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>

*Methode:* E1

- Ansatz:* 368.0 mg (0.897 mmol) **SH51**, 0.13 ml (0.948 mmol) *p*-Trifluormethylthiophenol, 20.3 mg (0.107 mmol) Kupfer(I)-iodid, 248.8 mg (1.800 mmol) Kaliumcarbonat, 0.1 ml (1.793 mmol) Ethylenglycol, 10 ml Isopropanol.
- Aufreinigung:* Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = [1:0]-[39:1])
- R<sub>f</sub>-Wert:* 0.56 (Dichlormethan)
- Ausbeute:* 250 mg (0.543 mmol, 61%), gelblicher Feststoff
- <sup>1</sup>H-NMR:* (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 3.86 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 6.76 (dd, 1 H, *J* = 8.9, 2.5 Hz, Ar-CH), 6.87 (d, 1 H, *J* = 8.9 Hz, Ar-CH), 7.18 (dd, 1 H, *J* = 7.7, 1.0 Hz, Ar-CH), 7.27-7.39 (m, 4 H, Ar-CH), 7.46 (d, 2 H, *J* = 8.4 Hz, Ar-CH), 7.82 (dd, 1 H, *J* = 7.5, 1.5 Hz, Ar-CH).
- <sup>13</sup>C-NMR:* (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 55.91 (OCH<sub>3</sub>), 103.95, 115.43, 120.84, 126.28, 126.33, 127.96, 129.74, 131.50, 132.37, 132.85, 132.96 (Ar-CH, Ar-C<sub>q</sub>), 134.88, 134.92, 139.67, 141.74 (Ar-C<sub>q</sub>), 156.91 (Ar-C-OCH<sub>3</sub>), 157.82 (S-C=N), 166.06 (CONH).

8.2.10 *N*-(5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazol-2-yl)-2-((4-trifluormethyl)phenyl)thio)benzamid (**SH65**)

*Struktur:*



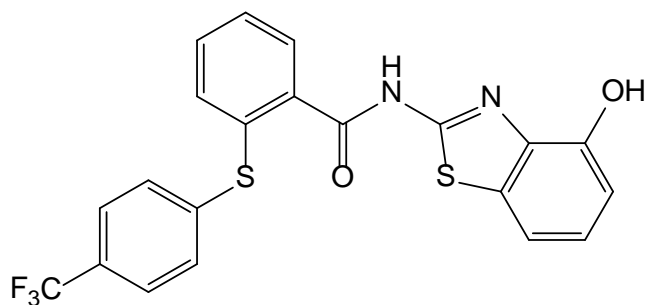
*Molare Masse:* 462.46

*Summenformel:* C<sub>21</sub>H<sub>13</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub>

---

<i>Methode:</i>	B3
<i>Ansatz:</i>	396 mg (0.807 mmol) <b>SH60</b> , 2.8 ml (2.800 mmol) Bortribromid-Lösung (1M in Dichlormethan), 10 ml Dichlormethan (trocken).
<i>Aufreinigung:</i>	Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = [19:1])
<i>R<sub>f</sub>-Wert:</i>	0.26 (Dichlormethan/Methanol = [19:1])
<i>Ausbeute:</i>	170 mg (0.368 mmol, 46%), gelber Feststoff
<i>FT-IR:</i>	$\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3297.16, 3207.26, 3195.01, 3047.90, 2974.35, 2929.40, 2161.18, 1977.30, 1736.21, 1670.83, 1546.82, 1470.60, 1433.83, 1397.05, 1360.27, 1327.58, 1303.06, 1282.63, 1221.34, 1209.08, 1172.30, 1143.70, 1111.01.
<i><sup>1</sup>H-NMR:</i>	(300 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ): $\delta$ (ppm) = 7.11 (s, 1 H, Benzothiazol- <b>CH</b> ), 7.23 (s, 1 H, Benzothiazol- <b>CH</b> ), 7.36-7.49 (m, 3 H, Ph- <b>CH</b> ), 7.54 (dd, 2 H, <i>J</i> = 12.0, 6.7 Hz, Ph- <b>CH</b> ), 7.68 (d, 2 H, <i>J</i> = 8.2 Hz, F <sub>3</sub> C-Ph- <b>CH</b> ), 7.77 (d, 1 H, <i>J</i> = 7.8 Hz, Ph- <b>CH</b> ), 9.19 (d, 2 H, <i>J</i> = 4.1 Hz, <b>OH</b> ), 12.63 (s, 1 H, CON <b>H</b> ).
<i><sup>13</sup>C-NMR:</i>	(75 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ): $\delta$ (ppm) = 106.38 (Benzothiazol- <sup>4/7</sup> <b>CH</b> ), 122.33, 125.93 (Ar- <b>C<sub>q</sub></b> ), 126.18 (dd, <i>J</i> = 7.5, 3.8 Hz, F <sub>3</sub> C-Ph- <b>CH</b> ), 127.08, 127.51 (Ar- <b>C<sub>q</sub></b> ), 128.30, 129.01, 130.30, 131.80, 133.28 (Ph- <b>CH</b> ), 137.40, 141.52 (Ar- <b>C<sub>q</sub></b> ), 144.11, 145.69 (Ar- <b>C-OH</b> ).
<i>Schmelzpunkt:</i>	223-224 °C (Zersetzung)
<i>FD-MS:</i>	[M] 463.0
<i>HPLC:</i>	R <sub>t</sub> = 7.9 min, Reinheit: 97% (Methode: HPLC-1)
8.2.11	<i>N</i> -(4-Hydroxybenzo[ <i>d</i> ]thiazol-2-yl)-2-((4-(trifluormethyl)phenyl)thio)benzamid (SH66)

*Struktur:*



- Molare Masse:* 446.47
- Summenformel:* C<sub>21</sub>H<sub>13</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>
- Methode:* B3
- Ansatz:* 310 mg (0.673 mmol) **SH61**, 2.4 ml (2.400 mmol) Bortribromid-Lösung (1M in Dichlormethan), 25 ml Dichlormethan (trocken).
- Aufreinigung:* Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = [1:0]-[39:1])
- R<sub>f</sub>-Wert:* 0.27 (Dichlormethan/Methanol = [39:1])
- Ausbeute:* 90 mg (0.202 mmol, 30%), schwach gelblicher Feststoff
- FT-IR:*  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3329.85, 3043.81, 2157.09, 1977.30, 1952.78, 1928.26, 1662.66, 1605.45, 1556.41, 1474.69, 1446.08, 1433.83, 1309.50, 1266.29, 1221.34, 1164.13, 1147.79, 1106.92.
- <sup>1</sup>H-NMR:* (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 6.85 (d, 1 H, *J* = 7.9 Hz, Benzothiazol-<sup>5/7</sup>CH), 7.13 (t, 1 H, *J* = 7.9 Hz, Benzothiazol-<sup>6</sup>CH), 7.35-7.48 (m, 4 H, Ar-CH), 7.49-7.60 (m, 2 H, Ar-CH), 7.68 (d, 2 H, *J* = 8.4 Hz, F<sub>3</sub>C-Ph-CH), 7.80 (d, 1 H, *J* = 7.2 Hz, Ar-CH), 9.86 (s, 1 H, OH), 12.92 (s, 1 H, CONH).
- <sup>13</sup>C-NMR:* (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 111.38, 111.84 (Benzothiazol-<sup>5/7</sup>CH), 122.30 (Ar-C<sub>q</sub>), 124.84 (Benzothiazol-<sup>6</sup>CH), 125.91 (Ar-C<sub>q</sub>), 126.19 (q, *J* = 3.8 Hz, F<sub>3</sub>C-Ph-CH), 127.12, 127.54 (Ar-C<sub>q</sub>), 128.28 (Ar-CH), 129.11, 129.51 (Ar-CH, Ar-C<sub>q</sub>), 130.33, 131.95, 132.14, 133.25

(Ar-CH), 136.99, 137.84, 141.43 (Ar-C<sub>q</sub>), 150.12 (Ar-C-OH), 155.44 (S-C=N), 166.44 (CONH).

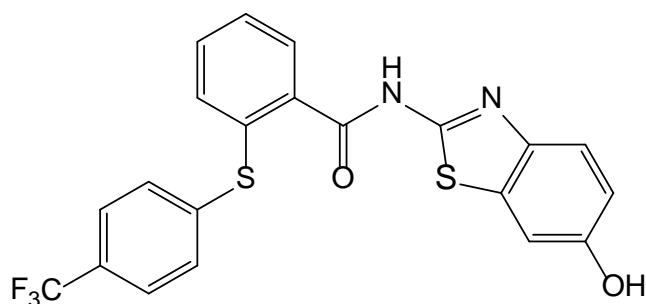
*Schmelzpunkt:* 273 °C (Zersetzung)

*FD-MS:* [M] 445.9

*HPLC:* R<sub>t</sub> = 27.6 min, Reinheit: 92% (Methode: HPLC-2)

8.2.12 *N*-(6-Hydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-2-((4-(trifluoromethyl)phenyl)thio)benzamid (SH67)

*Struktur:*



*Molare Masse:* 446.47

*Summenformel:* C<sub>21</sub>H<sub>13</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>

*Methode:* B3

*Ansatz:* 250 mg (0.543 mmol) **SH62**, 2.0 ml (2.000 mmol) Bortribromid-Lösung (1M in Dichlormethan), 50 ml Dichlormethan (trocken).

*Aufreinigung:* Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = [39:1]-[19:1])

*R<sub>f</sub>-Wert:* 0.20 (Dichlormethan/Methanol = [39:1])

*Ausbeute:* 160 mg (0.358 mmol, 66%), schwach gelblicher Feststoff

*FT-IR:*  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3166.40, 3084.68, 2974.35, 2831.33, 2778.21, 2684.22, 2598.41, 2549.38, 1666.74, 1646.31, 1617.71, 1601.36, 1564.59,

1535.98, 1474.69, 1421.57, 1397.05, 1352.10, 1323.50, 1278.55, 1200.91, 1160.05, 1123.27, 1102.84.

<sup>1</sup>H-NMR: (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 6.90 (dd, 1 H, *J* = 8.7, 2.4 Hz, Benzothiazol-<sup>4/5</sup>CH), 7.30 (d, 1 H, *J* = 2.4 Hz, Benzothiazol-<sup>7</sup>CH), 7.32-7.48 (m, 3 H, Ar-CH), 7.49-7.63 (m, 3 H, Ar-CH), 7.68 (d, 2 H, *J* = 8.3 Hz, F<sub>3</sub>C-Ph-CH), 7.78 (d, 1 H, *J* = 7.2 Hz, Ar-CH), 9.58 (s, 1 H, OH), 12.70 (s, 1 H, CONH).

<sup>13</sup>C-NMR: (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 106.51 (Benzothiazol-<sup>7</sup>CH), 115.43 (Benzothiazol-<sup>4/5</sup>CH), 121.21, 122.31, 125.91 (Ar-C<sub>q</sub>), 126.17 (dd, *J* = 7.3, 3.5 Hz, F<sub>3</sub>C-Ph-CH), 127.08, 127.50 (Ar-C<sub>q</sub>), 128.33, 129.03, 130.26, 131.87 (Ar-CH), 132.79, 133.32, 137.29, 141.47 (Ar-C<sub>q</sub>), 154.39 (Ar-C-OH), 166.34 (CONH).

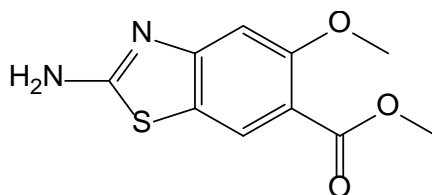
Schmelzpunkt: 183 °C

FD-MS: [M] 446.0, [2M] 892.9

Reinheit: >90% (<sup>1</sup>H-NMR)

### 8.2.13 Methyl-2-amino-5-methoxybenzo[*d*]thiazol-6-carboxylat (SH69)

Struktur:



Molare Masse: 238.26

Summenformel: C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S

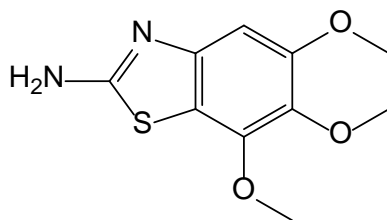
Methode: D



<i>Ansatz:</i>	1.812 g (10.001 mmol) Methyl-4-amino-2-methoxybenzoat, 3.89 g (40.103 mmol) Kaliumthiocyanat, 0.55 ml (10.734 mmol) Brom, 60 ml Eisessig.
<i>Aufreinigung:</i>	Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = [1:0]-[19:1])
<i>R<sub>f</sub>-Wert:</i>	0.20 (Dichlormethan/Methanol = [39:1])
<i>Ausbeute:</i>	657 mg (2.757 mmol, 28%), farbloser bis gelblicher Feststoff
<i>FT-IR:</i>	$\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3293.08, 3080.59, 3002.95, 2953.92, 2872.19, 2813.33, 2757.78, 1699.43, 1654.48, 1601.36, 1552.33, 1523.33, 1523.72, 1462.43, 1429.74, 1405.22, 1331.67, 1213.17, 1172.30.
<i><sup>1</sup>H-NMR:</i>	(300 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ): $\delta$ (ppm) = 3.74 (s, 3 H, COO- <u>CH</u> <sub>3</sub> ), 3.80 (s, 3 H, O <u>CH</u> <sub>3</sub> ), 7.02 (s, 1 H, Ar- <u>CH</u> ), 7.86 (s, 2 H, <u>NH</u> <sub>2</sub> ), 8.00 (s, 1 H, Ar- <u>CH</u> ).
<i><sup>13</sup>C-NMR:</i>	(75 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ): $\delta$ (ppm) = 51.59 (COO- <u>CH</u> <sub>3</sub> ), 55.91 (O <u>CH</u> <sub>3</sub> ), 101.46 (Ar- <u>CH</u> ), 112.55, 122.03 (Ar- <u>C</u> <sub>q</sub> ), 123.74 (Ar- <u>CH</u> ), 157.82, 158.37 (Ar- <u>C</u> <sub>q</sub> ), 165.68 ( <u>COO</u> -CH <sub>3</sub> ), 170.51 (S- <u>C</u> =N).
<i>Schmelzpunkt:</i>	243-244 °C
<i>ESI-MS:</i>	[M+H] <sup>+</sup> 239.04, [M+Na] <sup>+</sup> 261.02, [2M+H] <sup>+</sup> 477.09, [2M+Na] <sup>+</sup> 499.07
<i>HPLC:</i>	R <sub>t</sub> = 18.6 min, Reinheit: 99% (Methode: HPLC-2)

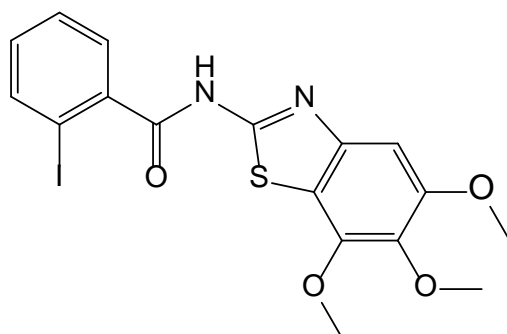
#### 8.2.14 5,6,7-Trimethoxybenzo[d]thiazol-2-amin (SH73)

*Struktur:*



---

<i>Molare Masse:</i>	240.28
<i>Summenformel:</i>	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S
<i>Methode:</i>	D
<i>Ansatz:</i>	1.838 (10.032 mmol) 3,4,5-Trimethoxyanilin, 3.89 g (40.103 mmol) Kaliumthiocyanat, 0.55 ml (10.734 mmol) Brom, 60 ml Eisessig.
<i>Aufreinigung:</i>	Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = [1:0]-[39:1])
<i>R<sub>f</sub>-Wert:</i>	0.09 (Dichlormethan/Methanol = [39:1])
<i>Ausbeute:</i>	120 mg (0.499 mmol, 5%), gelber Feststoff
<i>FT-IR:</i>	$\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3401.50, 3285.33, 3101.23, 3004.79, 2993.83, 2976.30, 2939.04, 1636.20, 1601.14, 1566.07, 1535.38, 1467.44, 1447.72, 1423.61, 1410.46, 1375.39, 1320.60, 1226.35, 1202.24, 1175.94, 1105.81.
<i><sup>1</sup>H-NMR:</i>	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ (ppm) = 3.86 (s, 3 H, OCH <sub>3</sub> ), 3.88 (s, 3 H, OCH <sub>3</sub> ), 4.01 (s, 3 H, OCH <sub>3</sub> ), 6.87 (s, 1 H, Ar-CH).
<i><sup>13</sup>C-NMR:</i>	(75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ (ppm) = 56.47, 60.72, 61.59 (OCH <sub>3</sub> ), 97.35 (Ar-CH), 137.76, 144.60, 147.00 (Ar-C <sub>q</sub> ), 153.99 (Ar-C <sub>q</sub> , S-C=N).
<i>Schmelzpunkt:</i>	190-191 °C
<i>FD-MS:</i>	[M] 240.2
<i>HPLC:</i>	R <sub>t</sub> = 19.5 min, Reinheit: 84% (Methode: HPLC-2)
8.2.15	2-Iod-N-(5,6,7-trimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)benzamid (SH74)
<i>Struktur:</i>	



- Molare Masse:* 470.28
- Summenformel:* C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>IN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S
- Methode:* A3
- Ansatz:* 1.000 g (4.032 mmol) 2-Iodbenzoesäure, 970 mg (4.037 mmol) **SH73**, 1.531 g (4.037 mmol) HBTU, 1.4 ml (8.471 mmol) Diisopropylethylamin, 100 ml Ethylacetat.
- Aufreinigung:* Säulenchromatographie (Petrolether/Ethylacetat = [4:1]-[3:1])
- R<sub>f</sub>-Wert:* 0.25 (Petrolether/Ethylacetat = [2:1])
- Ausbeute:* 270 mg (0.574 mmol, 14%), weißer Feststoff
- FT-IR:*  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3142.75, 3053.84, 2933.01, 2825.86, 1679.11, 1542.33, 1469.69, 1462.84, 1414.89, 1291.58, 1229.93, 1195.68, 1102.05.
- <sup>1</sup>H-NMR:* (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 3.72 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.88 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.10 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 6.27 (s, 1 H, Benzothiazol-CH), 7.00 (t, 1 H, *J* = 7.6 Hz, Ph-CH), 7.17 (t, 1 H, *J* = 7.5 Hz, Ph-CH), 7.42 (d, 1 H, *J* = 7.6 Hz, Ph-CH), 7.72 (d, 1 H, *J* = 7.9 Hz, Ph-CH).
- <sup>13</sup>C-NMR:* (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 56.28, 60.80, 61.58 (OCH<sub>3</sub>), 92.85 (Ph-C-I), 98.01 (Benzothiazol-CH), 116.30 (Ar-C<sub>q</sub>), 128.21, 129.16, 132.29 (Ph-CH), 138.65, 139.03 (Ar-C<sub>q</sub>), 140.41 (Ph-CH), 143.60, 146.92, 153.78 (Ar-C-OCH<sub>3</sub>), 160.23 (S-C=N), 167.23 (CONH).

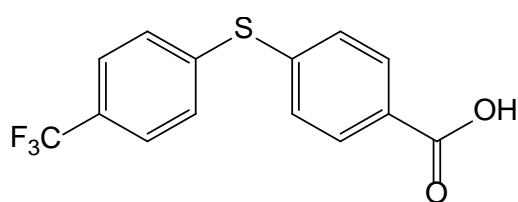
*Schmelzpunkt:* 95 °C

*ESI-MS:* [M+H]<sup>+</sup> 470.98, [M+Na]<sup>+</sup> 492.96, [2M+Na]<sup>+</sup> 962.94

*HPLC:* R<sub>t</sub> = 25.9 min, Reinheit: 87% (Methode: HPLC-2)

8.2.16 4-((4-(Trifluormethyl)phenyl)thio)benzoesäure (SH77)

*Struktur:*



*Molare Masse:* 298.28

*Summenformel:* C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>F<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S

*Methode:* E2

*Ansatz:* 6.46 g (35.88 mmol) 1-Chlor-4-trifluormethylbenzol, 4.00 g (25.94 mmol) 4-Mercaptobenzoesäure, 2.46 g (61.5 mmol) Natriumhydroxid, 50 ml Dimethylformamid.

*Aufreinigung:* Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = [1:0]-[19:1])

*R<sub>f</sub>-Wert:* 0.44 (Dichlormethan/Methanol = [39:1])

*Ausbeute:* 515 mg (1.727 mmol, 7 %), farbloser Feststoff

*FT-IR:*  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3080.59, 2982.52, 2876.28, 2831.33, 2667.88, 2537.12, 1695.35, 1579.00, 1593.19, 1556.41, 1491.03, 1421.57, 1331.67, 1282.63, 1180.48, 1143.70, 1131.44, 1106.92.

*<sup>1</sup>H-NMR:* (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 7.48 (d, 2 H, *J* = 8.3 Hz, S-C=CH), 7.54 (d, 2 H, *J* = 8.3 Hz, S-C=CH), 7.75 (d, 2 H, *J* = 8.3 Hz, F<sub>3</sub>C-

C=CH), 7.95 (d, 2 H,  $J = 8.3$  Hz, CH=C-COOH), 13.12 (s, 1 H, COOH).

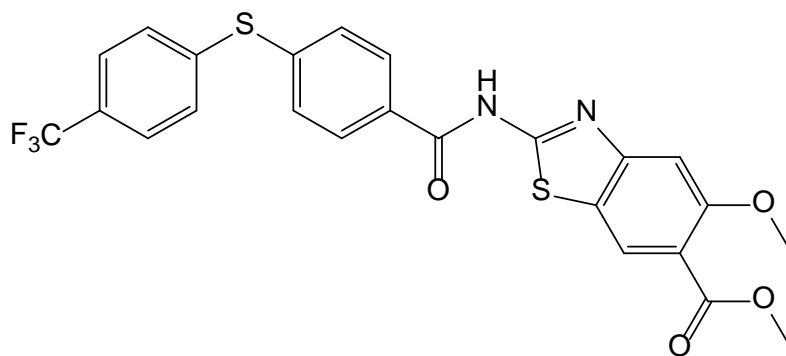
$^{13}\text{C-NMR}$ : (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 122.25, 125.86 (CF<sub>3</sub>), 126.45 (q,  $J = 3.7$  Hz, F<sub>3</sub>C-C=CH), 127.63, 128.06 (CF<sub>3</sub>), 130.40 (Ar-Cq), 130.57 (CH=C-COOH), 130.76, 130.81 (S-C=CH), 138.83 (S-CCH), 139.83 (d,  $J = 1.3$  Hz, S-CCH), 166.82 (COOH).

*Schmelzpunkt*: 168-170 °C

*HPLC*:  $R_t = 27.0$  min, Reinheit: 97% (Methode: HPLC-2)

8.2.17 Methyl-5-methoxy-2-(4-((4-(trifluormethyl)phenyl)thio)benzamido)benzo[d]thiazol-6-carboxylat (SH79)

*Struktur*:



*Molare Masse*: 518.53

*Summenformel*: C<sub>24</sub>H<sub>17</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>

*Methode*: A3

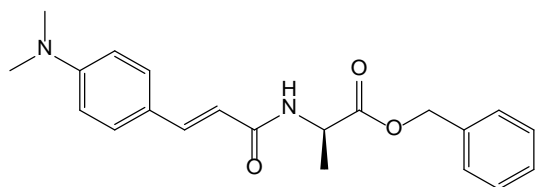
*Ansatz*: 298 mg (0.999 mmol) **SH77**, 239 mg (1.003 mmol) **SH69**, 382 mg (1.007 mmol) HBTU, 0.4 ml (2.421 mmol) Diisopropylethylamin, 50 ml Ethylacetat.

---

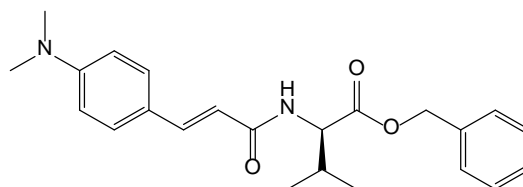
<i>Aufreinigung:</i>	Säulenchromatographie (Dichlormethan/Ethylacetat = [99:1]-[9:1])
<i>R<sub>f</sub>-Wert:</i>	0.43 (Dichlormethan/Ethylacetat = [9:1])
<i>Ausbeute:</i>	239 mg (0.461 mmol, 46 %), farbloser bis schwach gelber Feststoff
<i>FT-IR:</i>	$\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3317.59, 3092.85, 3039.73, 3015.21, 2945.74, 1662.66, 1593.19, 1531.90, 1495.12, 1462.43, 1433.83, 1397.05, 1286.72, 1266.29, 1200.91, 1164.13, 1102.84.
<i><sup>1</sup>H-NMR:</i>	(300 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ): $\delta$ (ppm) = 3.81 (s, 3 H, COO- <u>CH</u> <sub>3</sub> ), 3.90 (s, 3 H, O <u>CH</u> <sub>3</sub> ), 7.41 (s, 1 H, Benzothiazol- <sup>4</sup> <u>CH</u> ), 7.56 (dd, 4 H, <i>J</i> = 12.9, 8.3 Hz, S-C= <u>CH</u> ), 7.78 (d, 2 H, <i>J</i> = 8.2 Hz, F <sub>3</sub> C-C= <u>CH</u> ), 8.15 (d, 2 H, <i>J</i> = 8.3 Hz, <u>CH</u> =C-CONH), 8.34 (s, 1 H, Benzothiazol- <sup>7</sup> <u>CH</u> ), 13.09 (s, 1 H, CON <u>H</u> ).
<i><sup>13</sup>C-NMR:</i>	(75 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ): $\delta$ (ppm) = 51.97 (COO- <u>CH</u> <sub>3</sub> ), 56.13 (O <u>CH</u> <sub>3</sub> ), 116.99 (Ar- <u>C</u> <sub>q</sub> ), 124.68 (Benzothiazol- <sup>7</sup> <u>CH</u> ), 126.56 (dd, <i>J</i> = 7.5, 3.7 Hz, F <sub>3</sub> C-C= <u>CH</u> ), 127.81, 128.23 ( <u>CF</u> <sub>3</sub> ), 129.74 ( <u>CH</u> =C-CONH), 130.52, 131.16 (S-C= <u>CH</u> ), 139.46 (S- <u>C</u> =CH), 157.81 (Ar- <u>C</u> <sub>q</sub> ), 165.82 ( <u>COO</u> -CH <sub>3</sub> ).
<i>Schmelzpunkt:</i>	225-227 °C
<i>ESI-MS:</i>	[M+Na] <sup>+</sup> 541.29, [2M+Na] <sup>+</sup> 1059.13
<i>HPLC:</i>	R <sub>t</sub> = 30.5 min, Reinheit: 76% (Methode: HPLC-2)

### 8.3 Übersicht der synthetisierten und getesteten Verbindungen

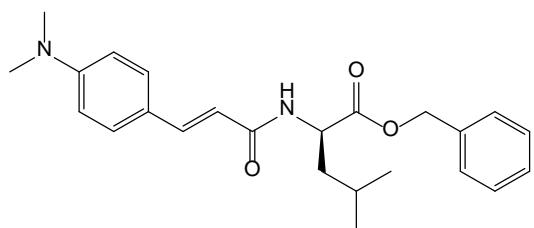
#### 8.3.1 Phenylacrylsäureamide: Amide der 4-Dimethylaminozimtsäure



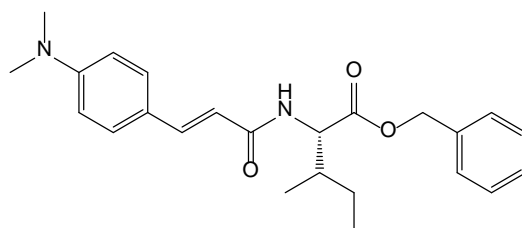
SH01



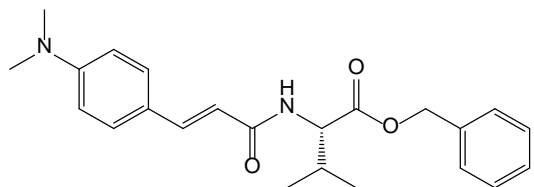
SH02



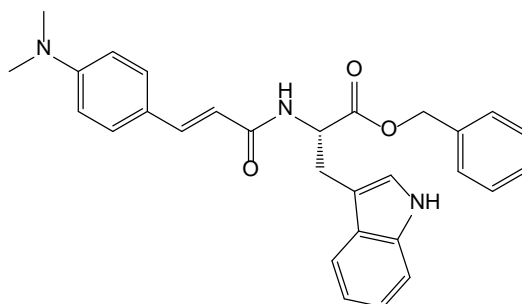
SH03



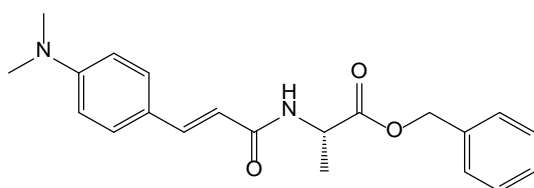
SH04



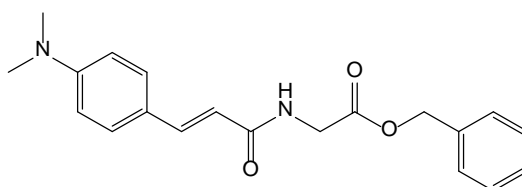
SH05



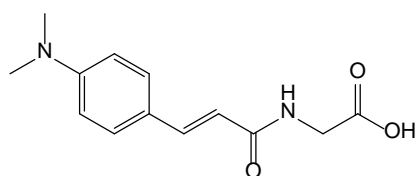
SH06



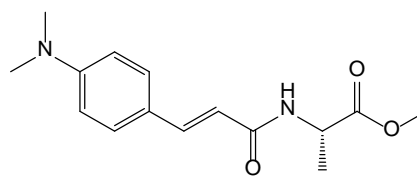
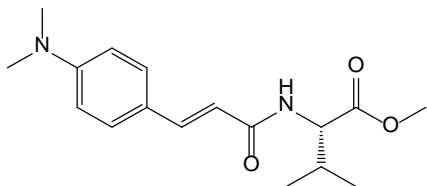
SH07



SH08

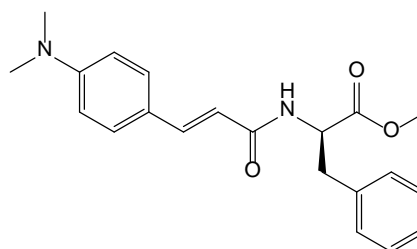
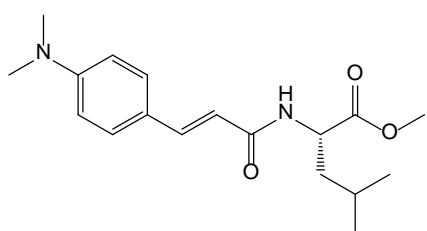


SH08a



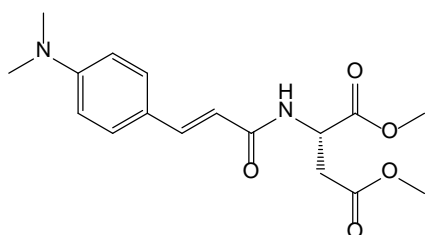
SH10

SH11

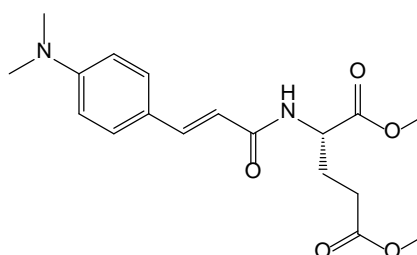


SH13

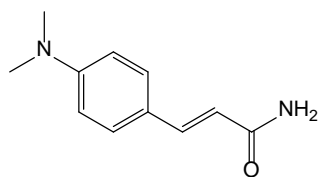
SH12



SH14

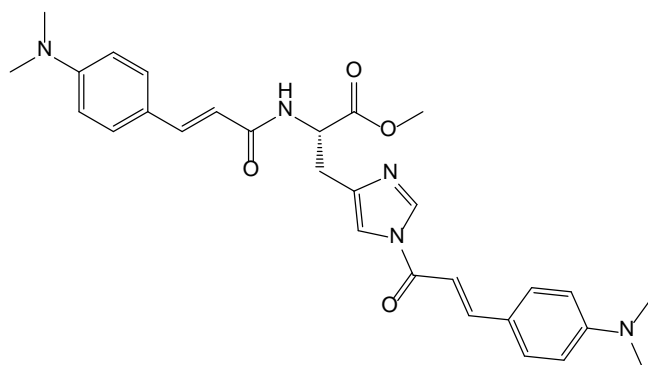


SH15

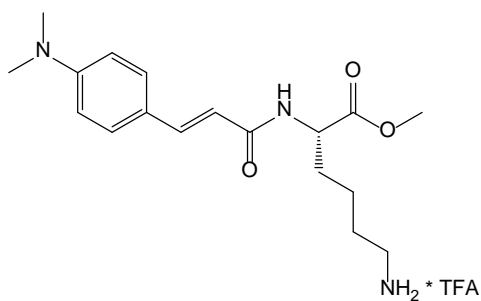


SH30

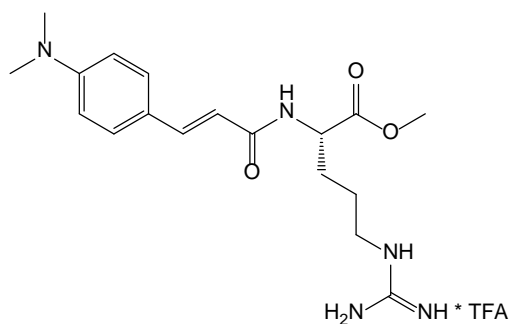




SH36

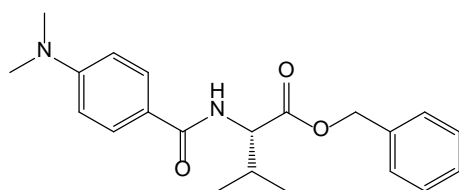


SH37a

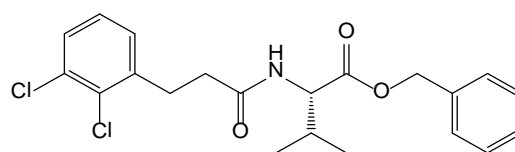


SH38a

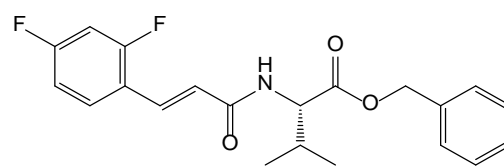
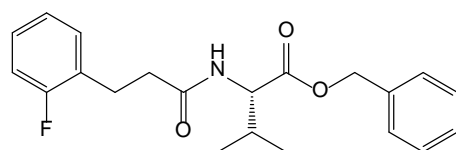
### 8.3.2 Andere Phenylacrylsäureamide und verschiedene Carbonsäureamide des L-Valinbenzylesters



SH23

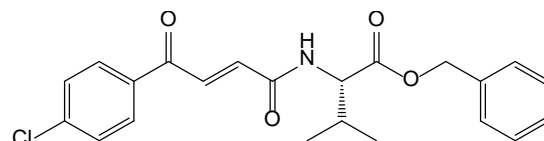
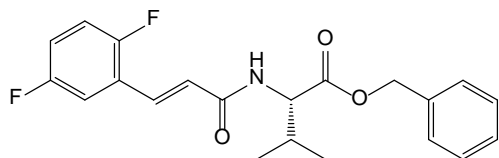


SH24



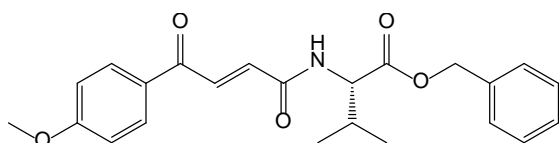
SH26

SH25

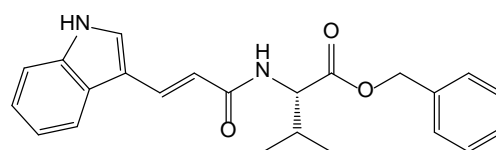


SH28

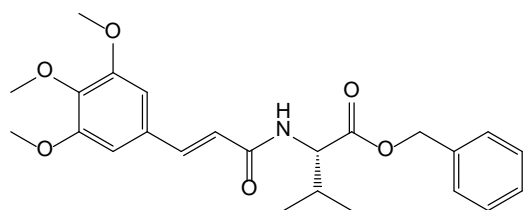
SH27



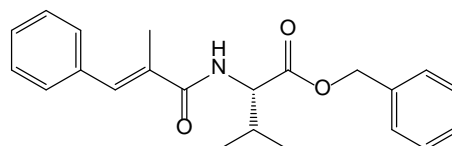
SH29



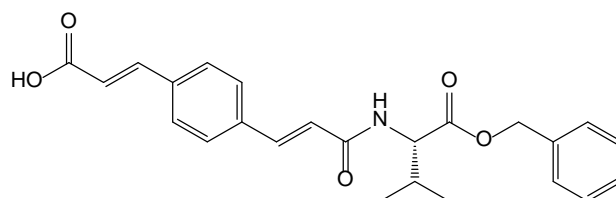
SH32



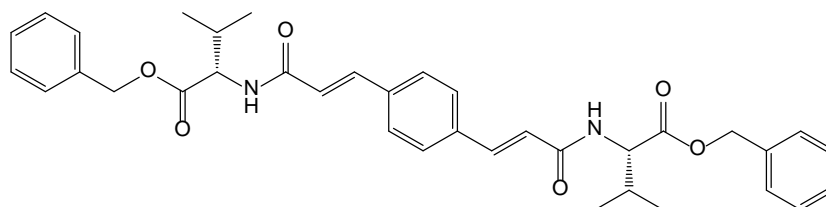
SH33



SH34

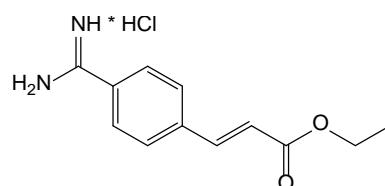


SH35A



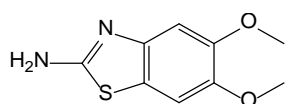
SH35B

## 8.3.3 Andere Phenylacrylsäure-Derivate

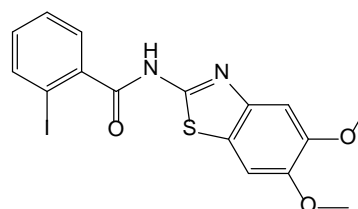


SH45

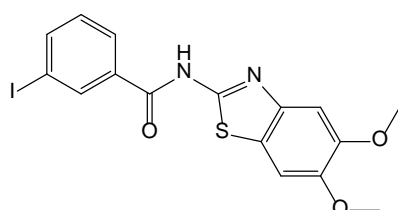
## 8.3.4 Methoxy-substituierte Benzothiazol- und Thioether-Bausteine



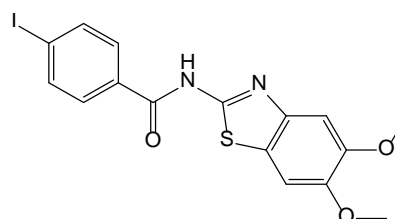
SH53



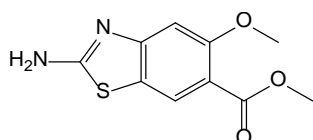
SH56



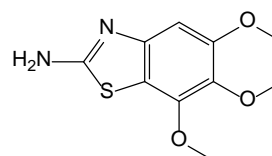
SH58



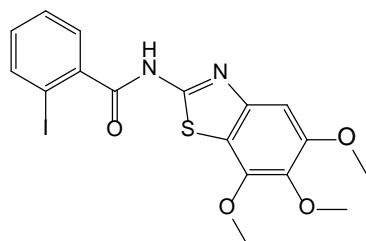
SH59



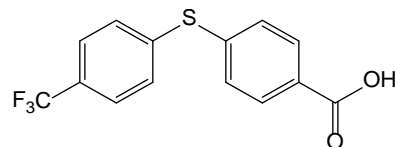
SH69



SH73

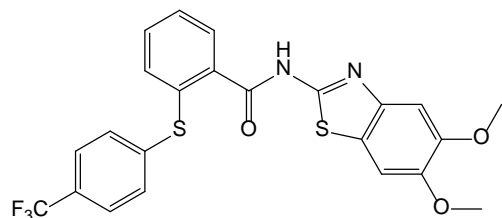


SH74

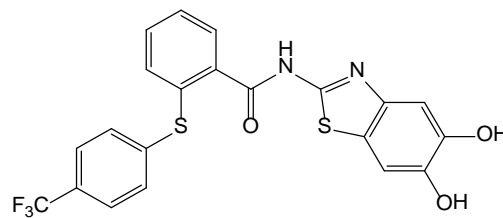


SH77

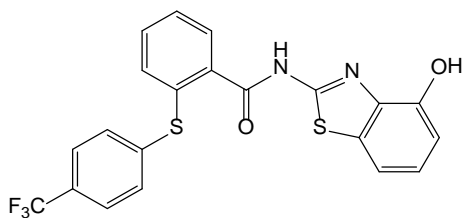
## 8.3.5 Methoxy- und Hydroxy-substituierte Benzothiazole mit Diarylthioether-Funktion



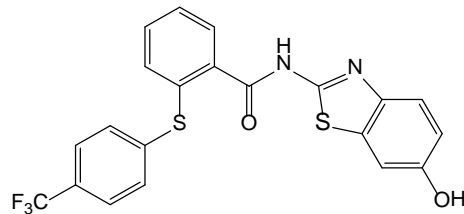
SH60



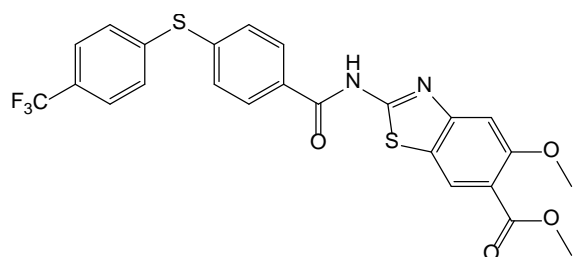
SH65



SH66



SH67



SH79

## 9 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abian O *et al.*: *PLOS ONE* **2013**, 8(7): e69773
2. Aleshin AE *et al.*: *Protein Science* **2007**, 16: 795-806
3. Almeida H *et al.*: *PLOS ONE* **2013**, 8(8): e72402
4. Bachhav, HM: *Development and Application of New Methodologies for Synthesis of Bioactive Molecules* **2012**, chapter 4: 216-255
  - <http://shodhganga.inflibnet.ac.in/handle/10603/9231>
5. Bazan JF, Fletterick RJ: *Virology* **1989**, 171: 637-639
6. Berliner Zeitung
  - <http://www.berliner-zeitung.de/wissen/asiatische-moskitos-in-suedfrankreich-und-kroatien-tigermuecke-bringt-dengue-fieber-nach-europa,10808894,23443110.html> (19.06.2013)
7. Blow DM: *Acc Chem Res* **1976**, 9(4): 145-152
8. Bodenreider C *et al.*: *Anal Biochem* **2009**, 395: 195-204
9. Brecher M, Zhang J, Li H: *Virol Sin* **2013**, 28(6): 326-336
10. Campbell JR: *J Org Chem* **1964**, 29(7): 1830-1833
11. Carmel A, Yaron A: *Eur J Biochem* **1978**, 87: 265-273
12. Carmona AK, Juliano MA, Juliano J: *Ann Braz Acad Sci* **2009**, 81(3): 381-392
13. Chambers TJ *et al.*: *Annu Rev Microbiol* **1990**, 44: 649-688
14. Chandramouli S *et al.*: *J Virol* **2010**, 84(6): 3059-3067
15. Chanprapaph S *et al.*: *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, 330: 1237-1246
16. Chee CF *et al.*: *Tetrahedron Lett* **2010**, 51: 495-498
17. Cheng YC, Prusoff WH: *Biochem Pharmacol* **1973**, 22: 3099-3108
18. Dayal B *et al.*: *Steroids* **1990**, 55: 233-237
19. Eilingsfeld H, Seefelder M, Weidinger H: *Angew Chem* **1960**, 72(22): 836-845
20. Erbel P *et al.*: *Nat Struct Mol Biol* **2006**, 13(4): 372-373
21. Erian AW, Sherif SM: *Tetrahedron* **1999**, 55: 7957-8024
22. Evinin LB, Vásquez JR, Craik CS: *Proc Natl Acad Sci USA* **1990**, 87: 6659-6663
23. Falgout B *et al.*: *J Virol* **1991**, 65(5): 2467-2475
24. Förster T: *Ann Phys* **1948**, 2(6): 55-75
25. Freceer V, Miertus S: *J Comput Aided Mol Des* **2010**, 24: 195-212
26. Frimayanti N *et al.*: *Int J Mol Sci* **2011**, 12: 1089-1100
27. Frimayanti N *et al.*: *In Silico Biol* **2011/2012**, 11: 29-37
28. Ganesh VK *et al.*: *Bioorg Med Chem* **2005**, 13: 257-264
29. Ghosh K *et al.*: *J Phys Chem B* **2010**, 114: 321-329

30. Goddard JP, Reymond JL: *Trends in Biotechnology* **2004**, 22(7): 363-370
31. Graf L *et al.*: *Biochemistry* **1987**, 26: 2616-2623
32. Gubler DJ: *Clin Microbiol Rev* **1998**, 11(3): 480-496
33. Gubler DJ: *Trends in Microbiology* **2002**, 10(2): 100-103
34. Gupta A, Rawat S: *J Curr Pharm Res* **2010**, 3(1): 13-23
35. Guzman MG *et al.*: *Nat Rev Microbiol* **2010**, 8: S7-S16
36. Han SY, Kim YA: *Tetrahedron* **2004**, 60: 2447-2467
37. Halstead SB: *Lancet* **2007**, 370: 1644-1652
38. Hazuda DJ *et al.*: *Ann NY Acad Sci* **2013**, 1291: 69-76
39. Irie K *et al.*: *Gene* **1989**, 75: 197-211
40. Isidro-Llobet A, Álvarez M, Albericio F: *Chem Rev* **2009**, 109: 2455-2504
41. Jean F *et al.*: *J Biol Chem* **1995**, 270(33): 19225-19231
42. Kee LY *et al.*: *AsPac J Mol Biol Biotechnol* **2007**, 15(2): 53-59
43. Kiat TS *et al.*: *Bioorg Med Chem Lett* **2006**, 16: 3337-3340
44. Kim JL *et al.*: *Cell* **1996**, 87: 343-355
45. Reprinted from Cell, 87, Kim JL, Morgenstern KA, Lin C, Fox T, Dwyer MD, Landro JA, Chambers SP, Markland W, Lepre CA, O'Malley ET, Harbeson SL, Rice CM, Murcko MA, Caron PR, Thomson JA, Crystal Structure of the Hepatitis C Virus NS3 Protease Domain Complexed with a Synthetic NS4A Cofactor Peptide, 343-355, 1996, Copyright © 1996 by Cell Press, with permission from Elsevier.
46. Kim YM *et al.*: *J Biol Chem* **2013**, 288(18): 12891-12900
47. Kirin SI, Wissenbach D, Metzler-Nolte N: *New J Chem* **2005**, 29: 1168-1173
48. Kölner Stadt-Anzeiger
  - <http://www.ksta.de/tiernachrichten/dengue-fieber-asiatische-tigermuecke-in-deutschland-,16153386,24633118.html> (15.10.2013)
49. Kwong AD *et al.*: *Nature Biotechnology* **2011**, 29(11): 993-1003
50. Kwong FY, Buchwald SL: *Org Lett* **2002**, 4(20): 3517-3520
51. Latscha HP, Kazmeier U, Klein HA: *Chemie für Pharmazeuten*, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York **2002**, 5. Auflage
52. Legoabe L *et al.*: *Europ J Med Chem* **2011**, 46: 5162-5174
53. Leung D *et al.*: *J Biol Chem* **2001**, 276(49): 45762-45771
54. Li H *et al.*: *J Virol* **1999**, 73(4): 3108-3116
55. Li J, Wilk E, Wilk S: *Arch Biochem Biophys* **1995**, 323(1): 148-154
56. Li J *et al.*: *J Biol Chem* **2005**, 280(31): 28766-28774
57. Lin C, Thomson JA, Rice CM: *J Virol* **1995**, 69(7): 4373-4380
58. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC: *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer Medizin Verlag Heidelberg **2007**, 8. Auflage

59. Loeffler LJ, Mar EC: *J Med Chem* **1975**, 18(3): 287-292
60. Ma W, Tang C, Lai L: *Biophys J* **2005**, 89: 1183-1193
61. Reprinted from Biophysical Journal, 89, Ma W, Tang C, Lai L, Specificity of Trypsin and Chymotrypsin: Loop-Motion-Controlled Dynamic Correlation as a Determinant, 1183-1193, 2005, Copyright © 2005 by the Biophysical Society, with permission from Elsevier.
62. Maryanoff BE *et al.*: *Proc Natl Acad Sci USA* **1993**, 90: 8048-8052
63. Mathew R *et al.*: *Chem Biol Drug Des* **2010**, 76: 34-42
64. Matz F: *Synthese und Testung von RN18-Derivaten auf Apobec3G-Vif-Interaktionshemmung und Verknüpfung von D-Biotin mit Xanthurensäure*, Würzburg **2010**
65. Maclaren JA: *Austral J Chem* **1958**, 11(3): 360-365
66. Malich G, Markovic B, Winder C: *Toxicology* **1997**, 124: 179-192
67. McOmie JFW, Watts ML, West DE: *Tetrahedron* **1968**, 24: 2289-2292
68. Melino S, Paci M: *FEBS J* **2007**, 274: 2986-3002
69. Migliolo L *et al.*: *J Mol Graph Model* **2010**, 29: 148-156
70. Reprinted from Journal of Molecular Graphics and Modelling, 29, Migliolo L, Oliveira AS, Santos EA, Franco OL, Sales MP, Structural and mechanistic insights into a novel non-competitive Kunitz trypsin inhibitor from *Adenantha pavonina* L. seeds with double activity toward serine and cysteine-proteases, 148-156, 2010, Copyright © 2010 by Elsevier, with permission from Elsevier.
71. Montalbetti CAGN, Falque V: *Tetrahedron* **2005**, 61: 10827-10852
72. Morita K, Tanaka M, Igarashi A: *J Clin Microbiol* **1991**, 29(10): 2107-2110
73. Mosmann T: *J Immunol Meth* **1983**, 65: 55-63
74. Mu B *et al.*: *Tetrahedron* **2007**, 63: 11475-11488
75. Mutschler E *et al.*: *Mutschler Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart **2001**, 8. Auflage
76. Nathans, R *et al.*: *Nature Biotechnology* **2008**, 26(10): 166-177
77. Nitsche C, Steuer C, Klein CD: *Bioorg Med Chem* **2011**, 19: 7318-7337
78. Nitsche C *et al.*: *J Med Chem* **2013**, 56: 8389-8403
79. Niyomrattanakit, P *et al.*: *Biochem J* **2006**, 397: 203-211
80. Noble CG *et al.*: *J Virol* **2012**, 86(1): 438-446
81. Nudelman A *et al.*: *Arch Pharm (Weinheim)* **1994**, 327: 619-625
82. Othman R *et al.*: *J Chem Inf Model* **2008**, 48(8): 1582-1591
83. Perera R, Khaliq M, Kuhn RJ: *Antivir Res* **2008**, 80: 11-22
84. Reprinted from Antiviral Research, 80, Perera R, Khaliq M, Kuhn RJ, Closing the door on flaviviruses: Entry as a target for antiviral drug design, 11-22, 2008, Copyright © 2008 by Elsevier, with permission from Elsevier.
85. Perona JJ, Craik CS: *Protein Science* **1995**, 4: 337-360
86. Perona JJ, Craik CS: *J Biol Chem* **1997**, 272(48): 29987-29990

87. This research was originally published in The Journal of Biological Chemistry. Perona JJ, Craik CS. Evolutionary Divergence of Substrate Specificity within the Chymotrypsin-like Serine Protease fold. *J Biol Chem.* 1997; 272: 29987-29990. © The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.
88. Pfeuffer T: *Synthese und Testung von Aza-Peptiden als Cystein- und Aspartat-Protease Inhibitoren sowie Kristallisation und Elektronendichtebestimmung von Aziridin-, Epoxid- und Michael-Akzeptor substituierten Bausteinen*, Würzburg **2009**
  - <http://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/files/3895/PfeufferDiss.pdf>
89. Prongay AJ *et al.*: *J Med Chem* **2007**, 50: 2310-2318
90. Punna S, Meunier S, Finn MG: *Org Lett* **2004**, 6(16): 2777-2779
91. Räs B *et al.*: *Acta Tropica* **1997**, 68: 139-147
92. Rigau-Pérez JG *et al.*: *Lancet* **1998**, 352: 971-977
93. Rücker G, Neugebauer M, Willems GG: *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart **2001**, 3. Auflage
94. Schechter I, Berger A: *Biochem Biophys Res Com* **1967**, 27(2): 157-162
95. Schüller A, *et al.*: *Antivir Res* **2011**, 92: 96-101
96. Sinniah M, Igarashi A: *Rev Med Virol* **1995**, 5: 193-203
97. Sperotto E *et al.*: *J Org Chem* **2008**, 73: 5625-5628
98. Steitz TA, Henderson R, Blow DM: *J Mol Biol* **1969**, 46: 337-348
99. Steuer C *et al.*: *J Biomol Screening* **2009**, 14(9): 1102-1108
100. Steuer C *et al.*: *Bioorg Med Chem* **2011**, 19: 4067-4074
101. Stuckwisch CG: *J Amer Chem Soc* **1949**, 71: 3417-3417
102. Tambunan USF, Alamudi S: *Bioinformation* **2010**, 5(6): 250-254
103. Tomlinson SM, *Antiviral Research* **2009**, 28: 110-114
104. Tomlinson SM, Watowich SJ: *Antiviral Research* **2011**, 89: 127-135
105. Valle RPC, Falgout B: *J Virol* **1998**, 72(1): 624-632
106. Venkatraman S: *Trends in Pharmacological Sciences* **2012**, 33(5): 289-294
107. Volhardt KPC, Schore NE: *Organische Chemie*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim **2000**, 3. Auflage
108. [http://www.who.int/csr/don/2012\\_10\\_17/en](http://www.who.int/csr/don/2012_10_17/en)
109. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en> (Update: 06/2013)
110. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en> (Update: 01/2014)
111. Wissmann H, Kleiner HJ: *Angew Chem Int Ed Engl* **1980**, 19(2): 133-134
112. Yajima S *et al.*: *Bioorg Med Chem* **2006**, 14: 2799-2809
113. Yang CC *et al.*: *Antimicrob Agents Chemother* **2011**, 55(1): 229-238
114. Yin, Z *et al.*: *Bioorg Med Chem* **2006**, 16: 36-39
115. Yin, Z *et al.*: *Bioorg Med Chem* **2006**, 16: 40-43



116. Yusof R *et al.*: *J Biol Chem* **2000**, 275(14), 9963-9969
117. Zhang L, Mohan PM, Padmanabhan R: *J Virol* **1992**, 66(12): 7549-7554
118. Zimmerman M, Yurewicz E, Patel G: *Anal Biochem* **1976**, 70: 258-262
119. Zimmerman M *et al.*: *Anal Biochem* **1977**, 78: 45-51

# 11 ANHÄNGE

## 11.1 Anhang 1: Enzymkinetische Grafiken

Abbildung 3-6 und Abbildung 3-7 beziehen sich auf Abschnitt 3.1.3 und stellen die Ergebnisse der Testung der Verbindungen bei weiteren Substratkonzentrationen dar.

### Steigungen bei $[S] = 50 \mu\text{M}$

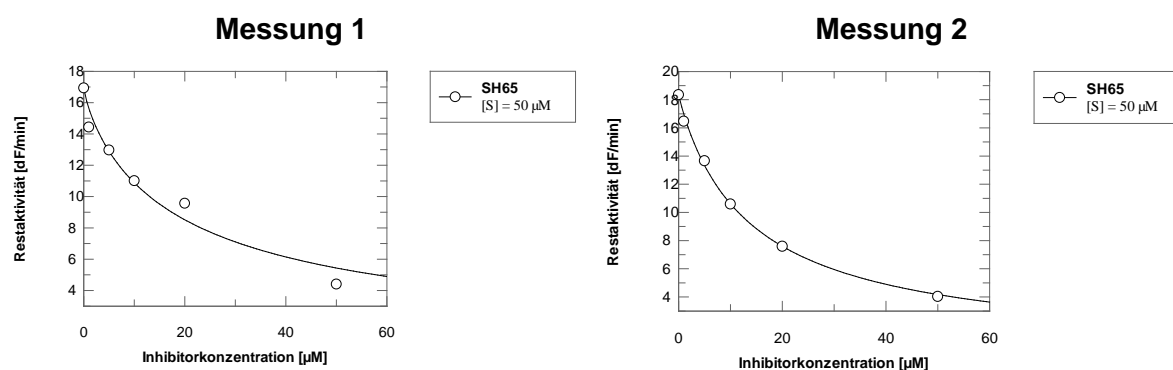
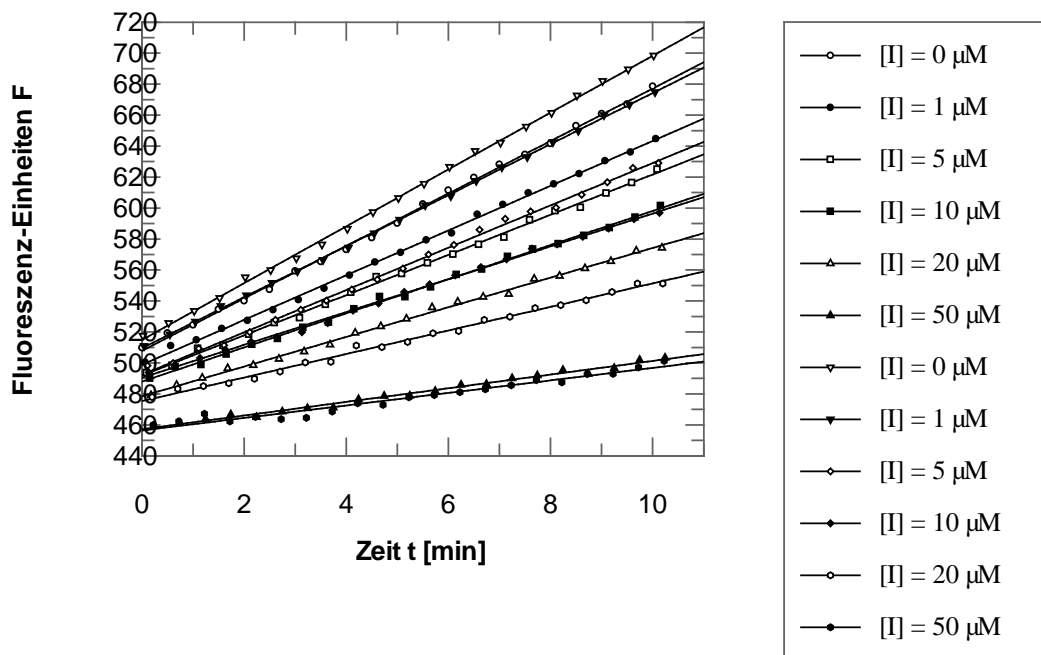
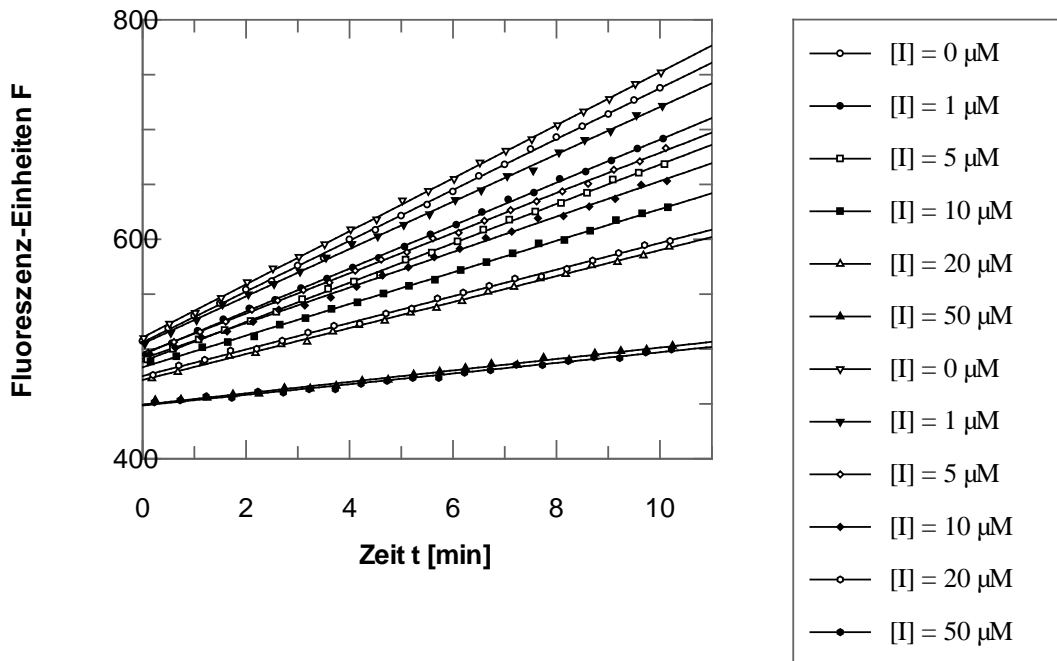


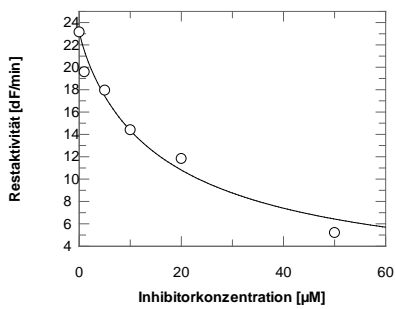
Abbildung 3-6: Graphische Darstellung der Steigungen und Enzym-Restaktivitäten bei der mit **SH65** gemessenen Verdünnungsreihe mit Substratkonzentrationen  $[S] = 50 / 100 / 150 / 200 / 250 \mu\text{M}$  und Inhibitorkonzentrationen  $[I] = 0 / 1 / 5 / 10 / 20 / 50 \mu\text{M}$

Abbildung 3-6 wird auf der nächsten Seite fortgesetzt

Steigungen bei [S] = 100 µM



Messung 1



Messung 2

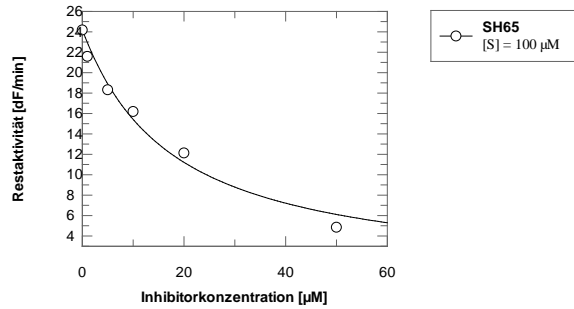
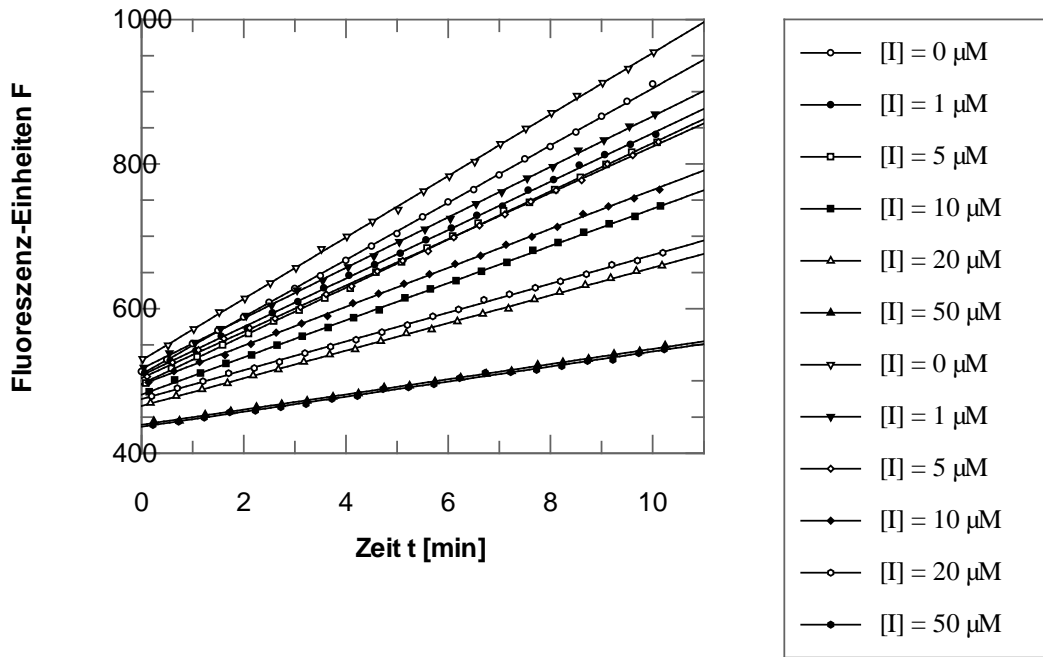


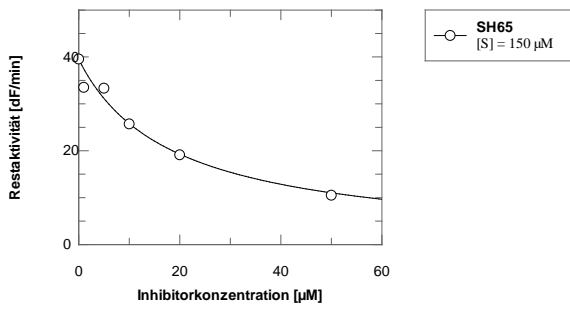
Abbildung 3-6: Graphische Darstellung der Steigungen und Enzym-Restaktivitäten bei der mit **SH65** gemessenen Verdünnungsreihe mit Substratkonzentrationen [S] = 50 / 100 / 150 / 200 / 250 µM und Inhibitorkonzentrationen [I] = 0 / 1 / 5 / 10 / 20 / 50 µM (Fortsetzung)

Abbildung 3-6 wird auf der nächsten Seite fortgesetzt

**Steigungen bei [S] = 150  $\mu$ M**



**Messung 1**



**Messung 2**

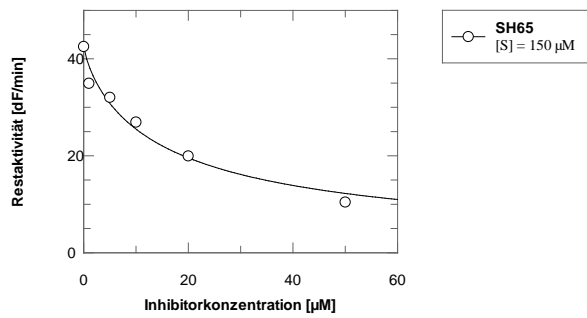
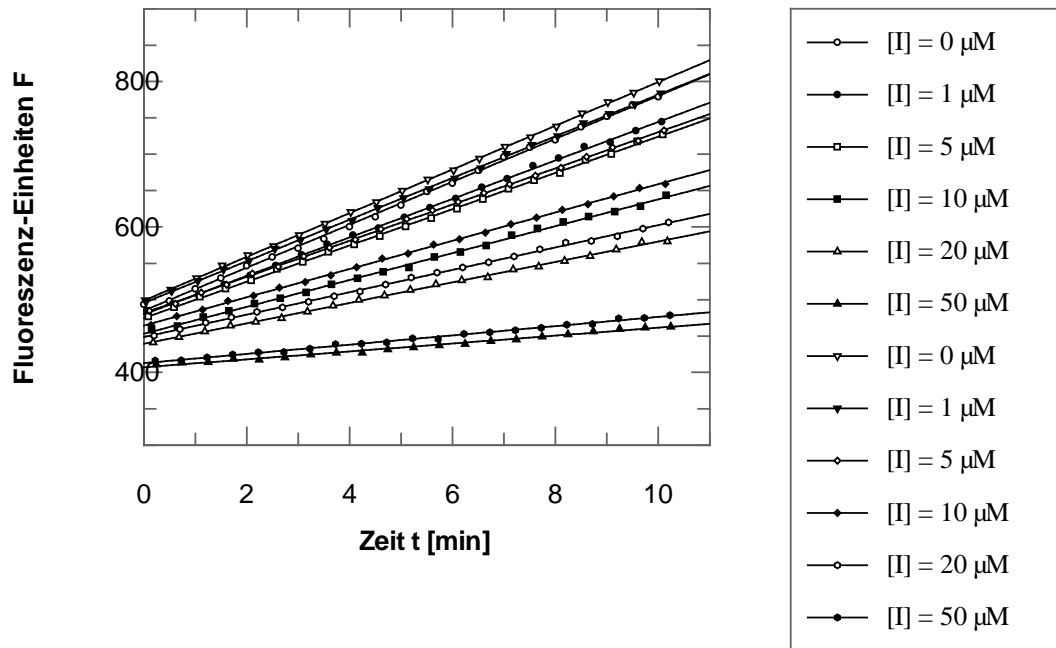


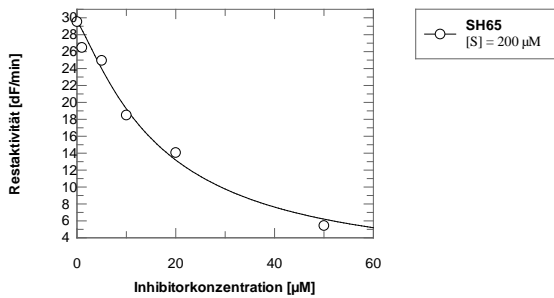
Abbildung 3-6: Graphische Darstellung der Steigungen und Enzym-Restaktivitäten bei der mit **SH65** gemessenen Verdünnungsreihe mit Substratkonzentrationen [S] = 50 / 100 / 150 / 200 / 250  $\mu$ M und Inhibitorkonzentrationen [I] = 0 / 1 / 5 / 10 / 20 / 50  $\mu$ M (Fortsetzung)

Abbildung 3-6 wird auf der nächsten Seite fortgesetzt

Steigungen bei [S] = 200  $\mu$ M



Messung 1



Messung 2

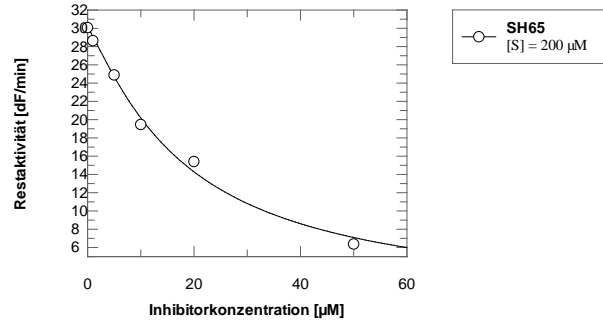


Abbildung 3-6: Graphische Darstellung der Steigungen und Enzym-Restaktivitäten bei der mit **SH65** gemessenen Verdünnungsreihe mit Substratkonzentrationen [S] = 50 / 100 / 150 / 200 / 250  $\mu$ M und Inhibitor-Konzentrationen [I] = 0 / 1 / 5 / 10 / 20 / 50  $\mu$ M (Fortsetzung)

Abbildung 3-6 wird auf der nächsten Seite fortgesetzt

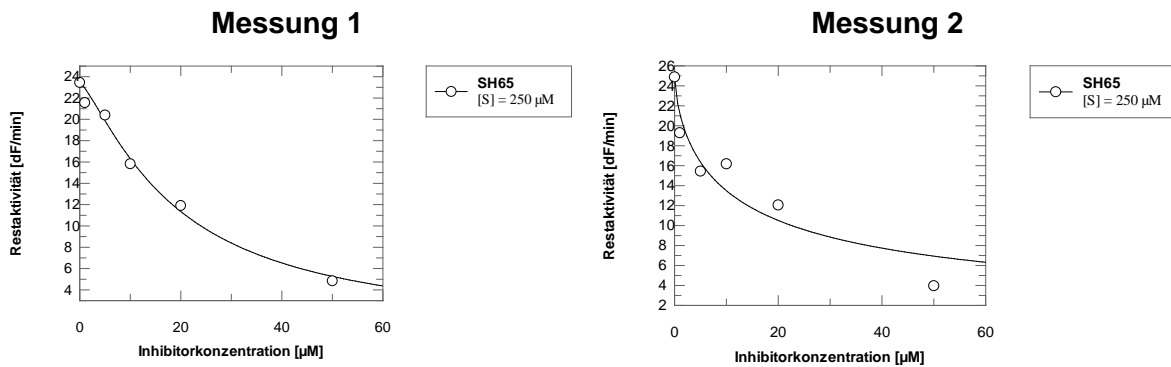
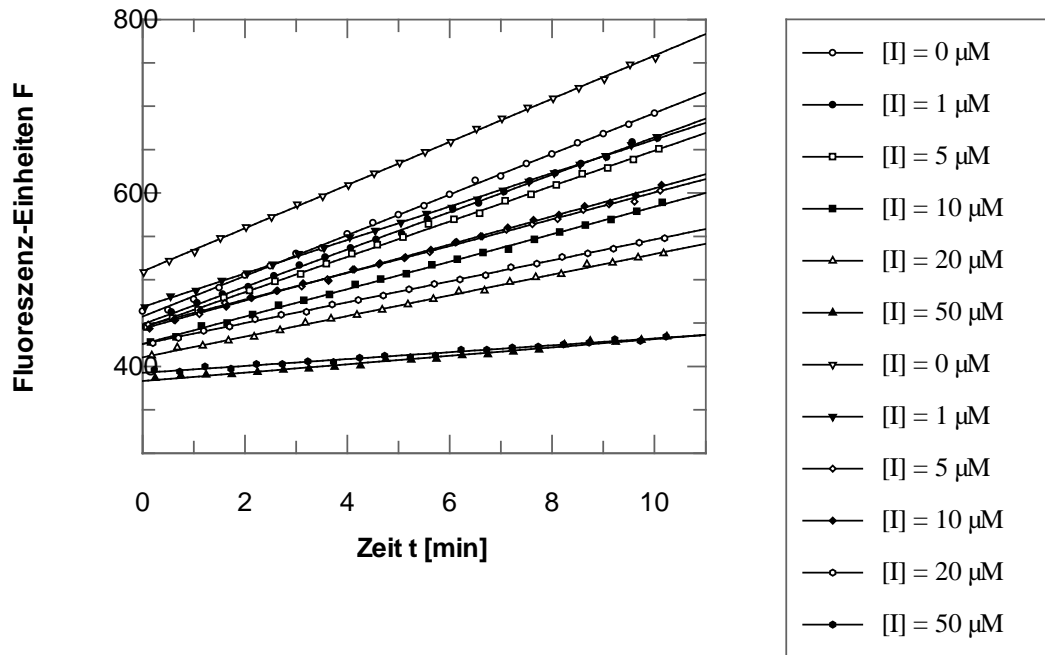
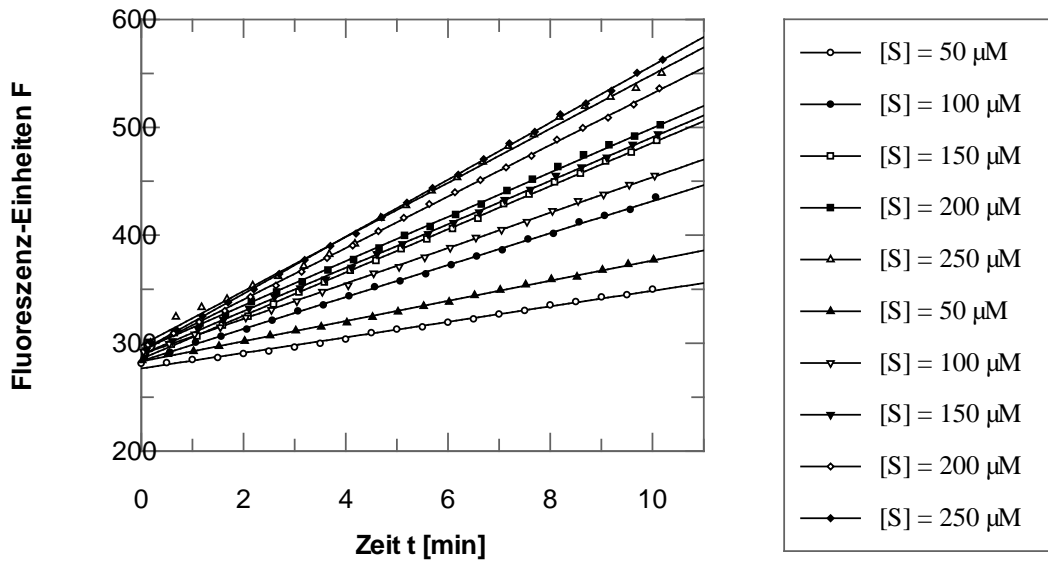
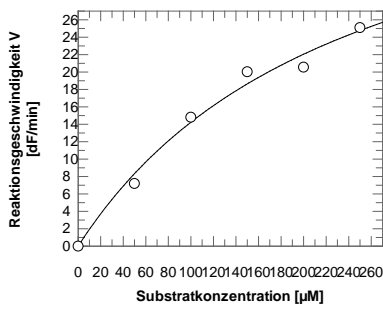
Steigungen bei  $[S] = 250 \mu\text{M}$ 

Abbildung 3-6: Graphische Darstellung der Steigungen und Enzym-Restaktivitäten bei der mit **SH65** gemessenen Verdünnungsreihe mit Substratkonzentrationen  $[S] = 50 / 100 / 150 / 200 / 250 \mu\text{M}$  und Inhibitorkonzentrationen  $[I] = 0 / 1 / 5 / 10 / 20 / 50 \mu\text{M}$  (Fortsetzung)

Steigungen bei  $[I] = 1 \mu\text{M}$



Messung 1



Messung 2

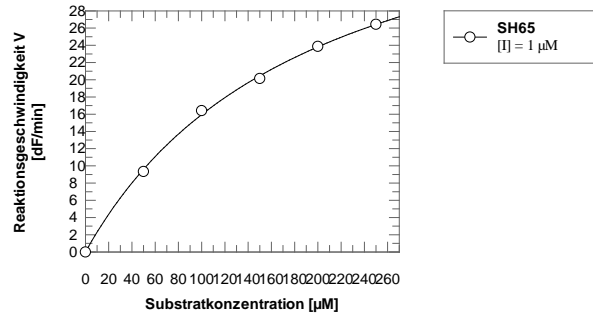


Abbildung 3-7: Graphische Darstellung der Steigungen und Michaelis-Menten-Diagramme bei der mit **SH65** gemessenen Verdünnungsreihe mit Inhibitorkonzentrationen  $[I] = 1 / 5 / 10 / 20 \mu\text{M}$  und Substratkonzentrationen  $[S] = 50 / 100 / 150 / 200 / 250 \mu\text{M}$  bzw.  $[S] = 30 / 75 / 120 / 150 / 225 \mu\text{M}$

Abbildung 3-7 wird auf der nächsten Seite fortgesetzt

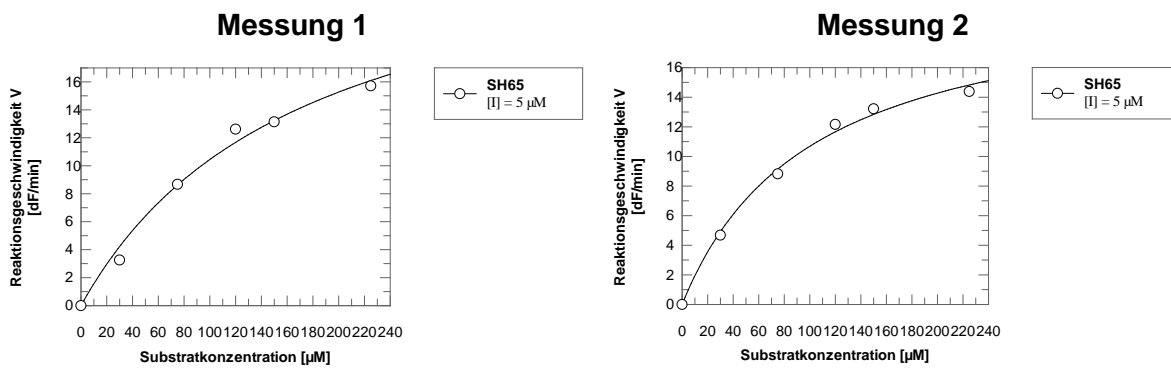
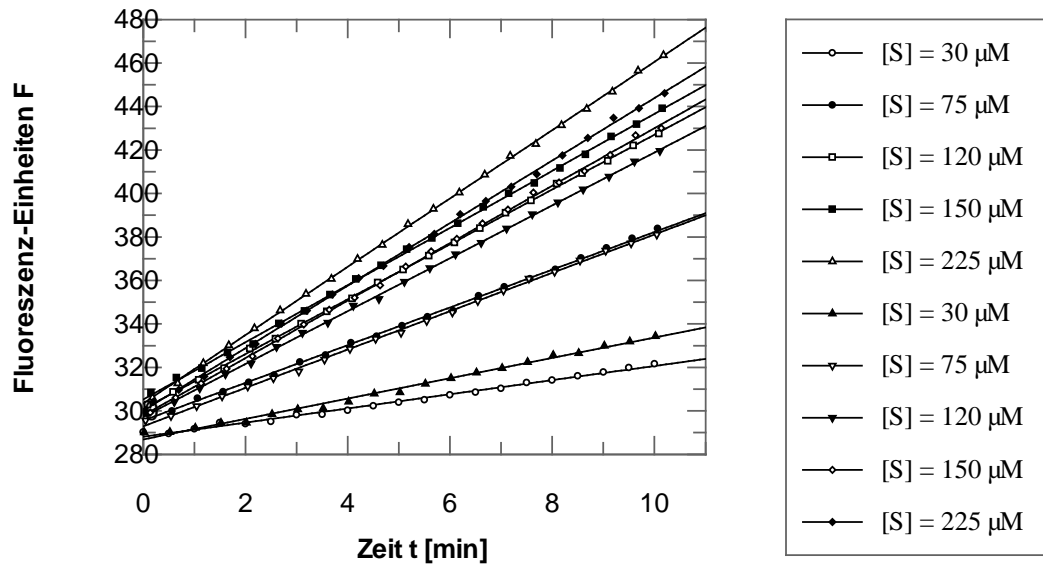
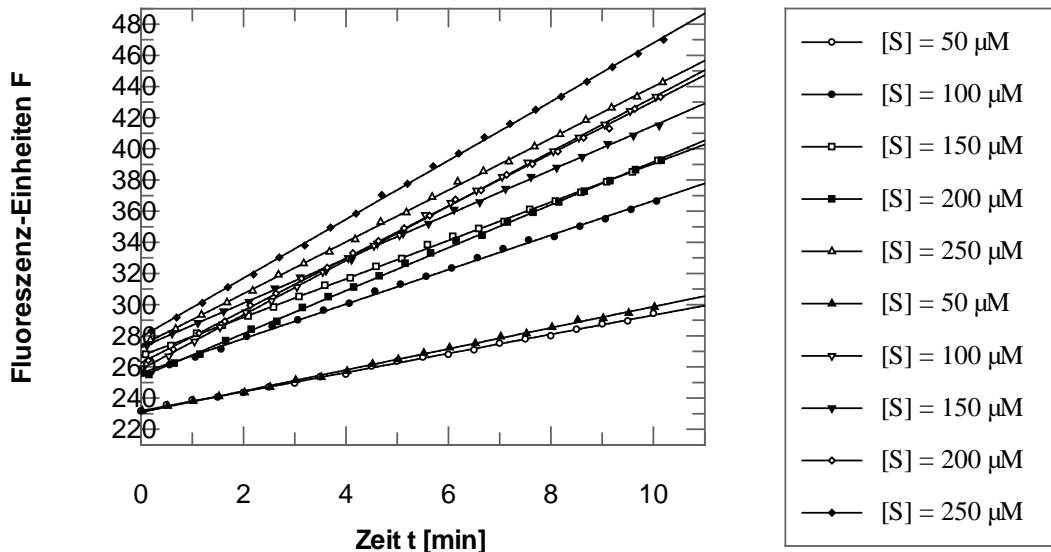
Steigungen bei  $[I] = 5 \mu\text{M}$ 

Abbildung 3-7: Graphische Darstellung der Steigungen und Michaelis-Menten-Diagramme bei der mit **SH65** gemessenen Verdünnungsreihe mit InhibitorKonzentrationen  $[I] = 1 / 5 / 10 / 20 \mu\text{M}$  und Substratkonzentrationen  $[S] = 50 / 100 / 150 / 200 / 250 \mu\text{M}$  bzw.  $[S] = 30 / 75 / 120 / 150 / 225 \mu\text{M}$  (Fortsetzung)

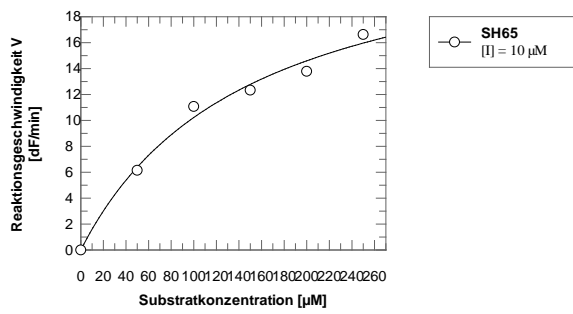
Abbildung 3-7 wird auf der nächsten Seite fortgesetzt



Steigungen bei  $[I] = 10 \mu\text{M}$



Messung 1



Messung 2

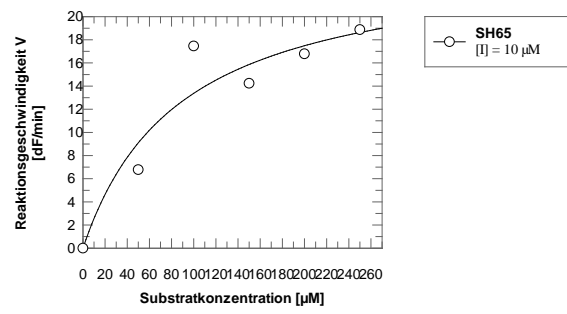


Abbildung 3-7: Graphische Darstellung der Steigungen und Michaelis-Menten-Diagramme bei der mit **SH65** gemessenen Verdünnungsreihe mit InhibitorKonzentrationen  $[I] = 1 / 5 / 10 / 20 \mu\text{M}$  und Substratkonzentrationen  $[S] = 50 / 100 / 150 / 200 / 250 \mu\text{M}$  bzw.  $[S] = 30 / 75 / 120 / 150 / 225 \mu\text{M}$  (Fortsetzung)

Abbildung 3-7 wird auf der nächsten Seite fortgesetzt

Steigungen bei [I] = 20  $\mu\text{M}$

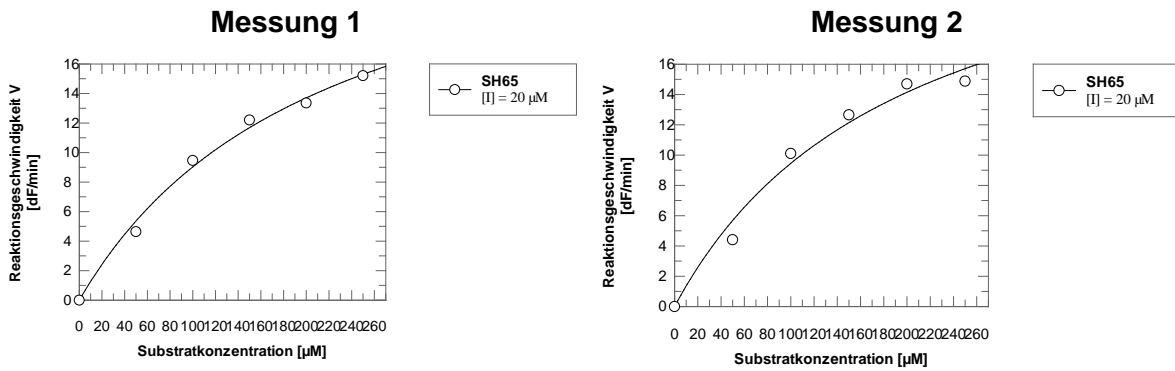
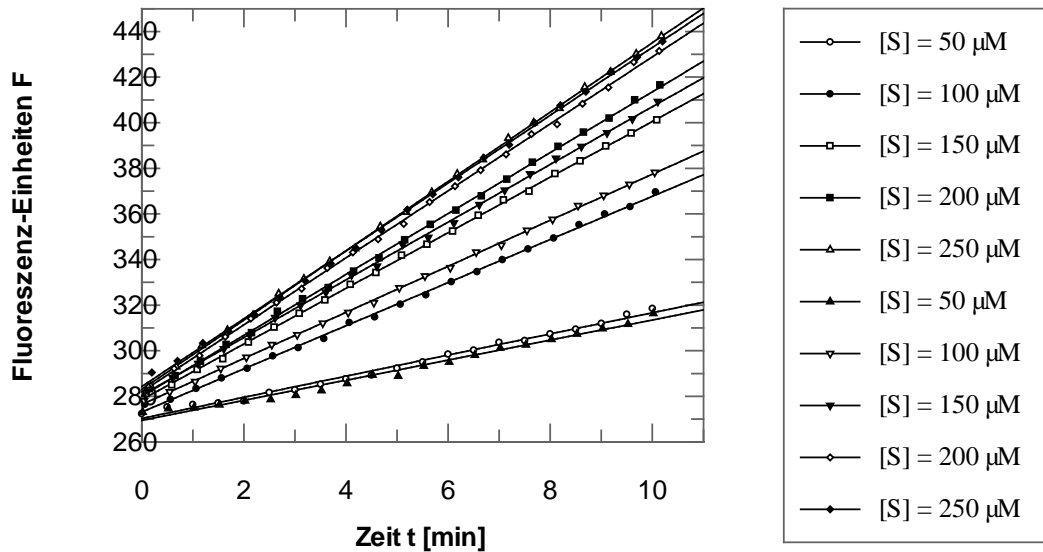


Abbildung 3-7: Graphische Darstellung der Steigungen und Michaelis-Menten-Diagramme bei der mit **SH65** gemessenen Verdünnungsreihe mit Inhibitorkonzentrationen [I] = 1 / 5 / 10 / 20  $\mu\text{M}$  und Substratkonzentrationen [S] = 50 / 100 / 150 / 200 / 250  $\mu\text{M}$  bzw. [S] = 30 / 75 / 120 / 150 / 225  $\mu\text{M}$  (Fortsetzung)

## 11.2 Anhang 2: Tagungen und Poster-Präsentationen

- **6. Joint Ph.D. Students Meeting** in Ellwangen, 22.-24.11.2010: **“New Trends in Infectious Disease Research”** (Sonderforschungsbereich 766: “The Bacterial Cell Envelope: Structure, Function and Infection Interface”, Universität Tübingen; Sonderforschungsbereich 630: “Recognition, Preparation and Functional Analysis of Agents against Infectious Diseases”, Universität Würzburg; Sonderforschungsbereich 544: “Control of Tropical Infectious Diseases”, Universität Heidelberg)
- **DPhG-Jahrestagung 2012** in Greifswald, 10.-13.10.2012: **“Moleküle, Targets und Tabletten – Translationale Forschung für Arzneimittel der Zukunft”** (Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft e.V.)

Holloway S, Wu H, Bodem J, Snitko M, Welker A, Sotriffer C, Klein C, Schirmeister T: *Synthesis, characterization and screening of Dengue Virus Type 2 NS2B-NS3 protease inhibitors* (Abstract und Poster-Präsentation)

- **7. Joint Ph.D. Student Meeting** in Freudenstadt/Lauterbad: **“New drugs and targets to fight against infectious diseases“** (Sonderforschungsbereich 766: “The Bacterial Cell Envelope: Structure, Function and Infection Interface”, Universität Tübingen; Sonderforschungsbereich 630: “Recognition, Preparation and Functional Analysis of Agents against Infectious Diseases”, Universität Würzburg)

Holloway S, Wu H, Bodem J, Snitko M, Welker A, Sotriffer C, Klein C, Schirmeister T: *Synthesis, characterization and screening of Dengue Virus Type 2 NS2B-NS3 protease inhibitors* (Abstract und Poster-Präsentation mit Kurzvortrag)

- **DPhG-Jahrestagung 2013** in Freiburg/Breisgau, 08.-11.10.2013: **“Drug Discovery inspired by Nature“** (Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft e.V.)

Holloway S, Wu H, Weidner T, Bodem J, Snitko M, Ehlert F, Kanitz M, Diederich W, Schirmeister T: *Synthesis, characterization and screening of Dengue Virus Type 2 NS2B-NS3 protease inhibitors* (Abstract und Poster-Präsentation)

- **International Symposium 2013** in Würzburg, 20.-22.11.2013: “**Novel Agents against Infectious Diseases – An Interdisciplinary Approach**“ (Sonderforschungsbereich 630: “Recognition, Preparation and Functional Analysis of Agents against Infectious Diseases”)

⇒ **Poster Award** for the Scientific Contribution:

Holloway S, Wu H, Bodem J, Snitko M, Welker A, Sotriffer C, Klein C, Schirmeister T: *Synthesis, characterization and screening of Dengue Virus Type 2 NS2B-NS3 protease inhibitors*

### 11.3 Anhang 3: Publikationen

- Nitsche C, Holloway S, Schirmeister T, Klein CD: Biochemistry and Medicinal Chemistry of the Dengue Virus Protease. *Chem. Rev.* (akzeptiert)
- Wu H, Bock S, Snitko M, Berger T, Weidner T, Holloway S, Kanitz M, Diederich WE, Steuber H, Walter C, Engels B, Schirmeister T, Bodem J: Novel and potent Dengue virus NS2B-NS3 protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* (derzeit in Revision)