

Entwicklung neuer nicht-kompetitiver Inhibitoren flaviviraler NS2B/NS3-Proteasen



Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
im Promotionsfach Chemie

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

Benedikt Millies
geb. in Wiesbaden

Mainz, 2019

Eingereicht beim Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften am:

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums:

D77 (Dissertation Mainz)

Erklärung der Urheberschaft

Hiermit versichere ich, Benedikt Millies, dass ich die als Dissertation vorgelegte Arbeit mit dem Titel „Entwicklung neuer nicht-kompetitiver Inhibitoren flaviviraler NS2B/NS3-Proteasen“ selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel (Literatur, Apparaturen, Material) in der Arbeit angegeben habe. Ich habe die als Dissertation vorgelegte Arbeit nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder wissenschaftliche Prüfung eingereicht und habe weder die Arbeit noch Teile davon bei einer anderen Fakultät bzw. einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

Mainz, 16.12.2019

Ort, Datum

.....

Benedikt Millies

Danksagung

Entwicklung neuer nicht-kompetitiver Inhibitoren flaviviraler NS2B/NS3-Proteasen

Das Dengue- und Zika-Virus und die damit zusammenhängenden Krankheitsbilder beeinflussen das Leben von vielen Menschen in tropischen und subtropischen Gebieten, jedoch gibt es bis heute keine spezifischen Therapiemöglichkeiten. Zur Entwicklung neuer Medikamente stellen die NS2B/NS3-Proteasen beider Viren attraktive Targets dar, da sie essenzielle Aufgaben bei der Replikation der Viren erfüllen. Neben kompetitiven Inhibitoren wurden in vorausgegangenen Studien nicht-kompetitive Inhibitoren entdeckt. Für einen von diesen wurde durch die kovalente Modifikation von Punktmutanten der Dengue-Virus Protease die vermutete Bindestelle bestätigt, was die Grundlage für strukturbasiertes Design von Inhibitoren durch die Anwendung computergestützter Methoden ist.

Ausgehend von einer Leitstruktur wurden zudem neue Inhibitoren mit einer höheren Hydrophilie entwickelt und sukzessive optimiert. Dabei wurden für die Inhibition wichtige Bestandteile der alten Struktur beibehalten und ein Diarylether gegen einen Arylsulfonylprolin-Baustein ausgetauscht. Diese neuen Strukturen zeigten in enzymatischen Assays Inhibition der Zika-Virus Protease bis in den submikromolaren Bereich hinein, jedoch wurde bei der Testung auf antivirale Aktivität in Zell-basierten Assays nur eine geringe Aktivität festgestellt. Dagegen inhibierten die Verbindungen, welche über Methoxygruppen anstelle der freien Catecholgruppe verfügen, die Virusreplikation in höherem Ausmaß, jedoch nicht die Protease in enzymatischen Assays. Dies konnte durch Metabolismusstudien erklärt werden, in welchen eine Spaltung der Methoxygruppen zu Hydroxygruppen beobachtet wurde, welche für die Inhibition der Protease wichtig sind. Zudem konnte eine weitere metabolische Modifikation durch Hydroxylierung anhand einer Synthese des Metaboliten nachgewiesen werden.

Ein Austausch des Prolins des Inhibitors gegen andere cyclische und offenkettige, proteinogene und nicht-proteinogene Aminosäuren wurde vorgenommen und deren Struktur-Wirkungsbeziehungen untersucht. Durch die Synthese eines Hybridinhibitors mit Strukturelementen eines kompetitiven und eines nicht-kompetitiven Inhibitors konnten die für die Bindung an die allosterische Tasche wichtigen Strukturelemente identifiziert werden.

Development of New Non-Competitive Inhibitors of Flaviviral NS2B/NS3 Proteases

Dengue and Zika virus infections and related diseases affect the life of many people in the tropical and subtropical regions, but to date no specific treatment options exist. The NS2B/NS3 proteases of both viruses are attractive targets for the development of new drugs, as they perform essential tasks during the replication of the viruses. In addition to competitive inhibitors, non-competitive inhibitors have been developed in previous studies. For one of these, the binding site was confirmed by covalent modification of single point mutants of the Dengue virus protease which provides the basis for structure-based design of inhibitors using computer-aided methods.

Starting from a lead structure, new inhibitors with a higher hydrophilicity were developed and optimized in further steps. Structures that were important for the inhibition were maintained and a diarylether moiety was exchanged for an arylsulfonyl proline fragment. These new structures showed inhibition of the Zika virus protease in the submicromolar range in enzymatic assays, but only weak antiviral activity in cell-based assays was observed. In contrast, compounds with methoxy groups instead of hydroxyl groups, which do not display inhibition of the protease in enzymatic assays, showed higher antiviral activity. This was explained by metabolism studies in which the cleavage of methoxy groups to hydroxyl groups was observed, which are an important structural feature for the inhibition of the isolated enzyme. In addition, another metabolic modification, namely hydroxylation of a methyl group, was verified by synthesis of the metabolite.

The exchange of proline to other cyclic and open, proteinogenic and non-proteinogenic amino acids was conducted and the structure-activity relationships were investigated. Important structural elements for binding to the allosteric pocket were identified by synthesis of a hybrid inhibitor with structural elements of both, a competitive and a non-competitive inhibitor.

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Flavivirale Krankheiten	1
1.1.1	Dengue-Virus	1
1.1.2	Zika-Virus	4
1.2	Flaviviren	6
1.3	NS2B/NS3-Protease	8
1.3.1	Katalytische Aktivität	8
1.3.2	Struktur	10
1.4	Inhibitoren	13
1.4.1	Kompetitive Inhibitoren	13
1.4.2	Nicht-kompetitive Inhibitoren	15
1.5	Enzyminhibition	23
1.5.1	NS2B/NS3-Protease Assays	23
1.5.2	Enzymkinetik	25
2	Zielsetzung	31
3	Hauptteil	33
3.1	Identifizierung der Bindestelle von 25	33
3.1.1	Zielsetzung	33
3.1.2	Synthese	35
3.1.3	Einfluss der modifizierten Cysteine auf 25	37
3.2	Prolinderivate	47
3.2.1	Design neuer Prolin-basierter Inhibitoren	47
3.2.2	Synthese	47
3.2.3	Untersuchung der Stabilität von (<i>R</i>)- 48	53
3.2.4	Testung der synthetisierten Prolin-basierten Inhibitoren	56
3.2.5	Testung auf antivirale Aktivität	63
3.2.6	Berechnung der lipophilen Ligandeneffizienz	66

3.3	Metabolismusstudien.....	71
3.3.1	Optimierung der Assaybedingungen.....	71
3.3.2	Metabolismusstudien von (<i>R</i>)- und (<i>S</i>)- 52	72
3.3.3	Synthese des Metaboliten 64	74
3.3.4	Zellpermeabilitätsstudien.....	78
3.4	Hybridinhibitor.....	81
3.4.1	Design des Inhibitors.....	81
3.4.2	Synthese.....	81
3.4.3	Testung.....	85
3.5	Aminosäurenaustausch.....	87
3.5.1	Design der Inhibitoren.....	87
3.5.2	Synthese.....	88
3.5.3	Testung.....	100
3.6	Cyclische Inhibitoren.....	107
3.6.1	Design der Inhibitoren.....	107
3.6.2	Synthese.....	108
3.6.3	Testung.....	117
3.7	Scaffold Hopping.....	119
3.7.1	Design des Inhibitors.....	119
3.7.2	Synthese.....	119
3.7.3	Testung.....	121
3.8	Fragment basierter Ansatz zur Optimierung der Catechol-Struktur.....	123
3.8.1	Design der Inhibitoren.....	123
3.8.2	Synthese.....	124
3.8.3	Testung.....	129
3.8.4	Synthese und Testung von (<i>R</i>)- und (<i>S</i>)- 190	131
4	Zusammenfassung und Ausblick.....	133
5	Experimentalteil.....	139

5.1	Material und Methoden	139
5.1.1	Chemikalien	139
5.1.2	Chromatographische Methoden	139
5.1.3	Schmelzpunktbestimmung	140
5.1.4	Polarimetrie	140
5.1.5	Kernresonanzspektroskopie	141
5.1.6	Infrarotspektroskopie	141
5.1.7	HPLC ESI-MS.....	142
5.2	Fluorimetrische Assays	142
5.2.1	ZIKV und DENV2 NS2B/NS3-Protease	143
5.2.2	Cathepsin B und Cathepsin L.....	143
5.2.3	Cruzain und Rhodesain	143
5.3	Kovalentes Docking	143
5.4	Metabolismusstudien mit Rattenlebermikrosomen.....	144
5.5	Zellpermeabilitätsstudien	144
5.6	Allgemeine Synthesemethoden.....	146
5.6.1	Methoden zur Darstellung von Carbonsäureamiden aus Carbonsäuren	146
5.6.2	Methoden zur Darstellung von Sulfonamiden	146
5.6.3	Methoden zur Einführung von Schutzgruppen	147
5.6.4	Methoden zur Entfernung von Schutzgruppen.....	147
5.7	Maleimide.....	149
5.8	Synthese verschiedener Prolinderivate.....	154
5.8.1	Grundstrukturen	154
5.8.2	Amide	158
5.8.3	Sulfonamide	160
5.9	Metabolismusstudien.....	167
5.10	Hybridinhibitor.....	172
5.11	Aminosäureaustausch.....	179

5.11.1	Alanin	179
5.11.2	Isoleucin	183
5.11.3	Phenylalanin	186
5.11.4	Tyrosin	189
5.11.5	Asparaginsäure	195
5.11.6	Asparaginderivate.....	200
5.11.7	<i>tert</i> -Leucin	206
5.11.8	β -Alanin.....	209
5.11.9	Piperidin-3-carbonsäure	215
5.11.10	Piperidin-4-carbonsäure	219
5.11.11	2-Azabicyclo[2.2.1] heptan-3-carbonsäure	223
5.11.12	Cyclohexyl	230
5.12	Synthese cyclischer Inhibitoren	232
5.12.1	6-Ring	232
5.12.2	7-Ring	241
5.12.3	Benzodiazepin	247
5.13	Scaffold Hopping	252
5.13.1	Benzimidazol.....	252
5.14	Fragmente.....	257
5.14.1	Catechol.....	257
5.14.2	Imidazol.....	261
5.14.3	Triazol	265
5.14.4	2-Hydroxypyridin.....	266
5.14.5	2-Oxobenzimidazol	268
6	Abkürzungsverzeichnis.....	271
7	Abbildungsverzeichnis.....	273
8	Quellenverzeichnis.....	279
9	Anhang.....	291

9.1	Berechnete lipophile Ligandeneffizienzen (LLE-Werte).....	291
9.2	Übersicht der getesteten Verbindungen	292

1 Einleitung

1.1 Flavivirale Krankheiten

Die Gattung der Flaviviren umfasst 89 Virusspezies, unter ihnen als bekannte Vertreter das Gelbfieber-Virus (YFV), das West-Nil-Virus (WNV), das Japanische-Enzephalitis-Virus (JEV), das Dengue-Virus (DENV) und das Zika-Virus (ZIKV).^[1] Die meisten der Viren nutzen Arthropoden, oftmals Zecken und Stechmücken, als Vektoren für die Übertragung auf Vögel und Säugetiere.

Die durch die Viren hervorgerufenen Krankheitsbilder beinhalten schwere Verläufe mit potentiell tödlichem Ausgang.^[2] Durch die zunehmende Ausbreitung der Vektoren und damit auch der Viren sind sie eine Gefahr für die Gesundheit von Menschen in vielen Ländern.^[3] Die DENV-Infektion wird von der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*, WHO) als vernachlässigte tropische Krankheit eingeordnet.

1.1.1 Dengue-Virus

Das DENV wird aufgrund von Variationen der Oberflächenproteine in verschiedene Serotypen unterteilt, welche unterschiedliche humane Antikörper binden.^[4] Im Menschen wurden bisher vier Serotypen beobachtet (DENV1-4), welche zwar eine Identität im Genom von 65% teilen, jedoch unterschiedliche Wahrscheinlichkeiten für schwere Krankheitsverläufe aufweisen.^[4] Als am gefährlichsten wird DENV2 angesehen, gefolgt von DENV1 und DENV3.^[5] 2007 wurde ein fünfter Serotyp im Menschen in Malaysia gefunden, bei welchem bisher jedoch keine Ausbreitung beobachtet werden konnte.^[6] Die Bindung von humanen Antikörpern gegen einen Serotypen an die Viruspartikel eines anderen sorgen dafür, dass diese nicht neutralisiert, jedoch in Zellen besser aufgenommen werden können und somit einen stärkeren Verlauf von Erkrankungen begünstigen. Dieser Effekt wird als „Antikörper-abhängige Verstärkung“ (*antibody dependent enhancement*, ADE) bezeichnet.^[7]

1.1.1.1 Verbreitung

Überträger für DENV sind die Stechmücken der Arten *Aedes aegypti* und *Aedes albopictus*, weshalb die Verbreitung des Virus mit der Verbreitung der Stechmücken verbunden ist. Die ersten Beobachtungen, die DENV zugerechnet werden könnten, stammen aus den Jahren 1779

und 1780 aus Asien, Afrika und Nordamerika, während die erste Epidemie 1953 in Manila auf den Philippinen auftrat.^[8] Eine Schwierigkeit bei der Nennung von Infektionszahlen sind die verschiedenen Arten der Krankheitsverläufe, welche zu einem Teil unspezifisch oder asymptomatisch sind und so die Identifizierung der Krankheit erschweren. Zudem ist in Ländern mit hohen Fallzahlen die Dokumentation der Fälle meist unvollständig.^[9] Jedoch gab es bereits im Jahr 1988 Schätzungen von 80 – 100 Millionen Infektionen weltweit. Neuere Schätzungen gehen von ca. 390 Millionen Infektionen weltweit aus, wobei die Zahl der symptomatischen Krankheitsverläufe auf 50 bis 100 Millionen geschätzt wird.^[3,10]

Am stärksten betroffen sind die tropischen und subtropischen Regionen der Erde (**Abbildung 1**).

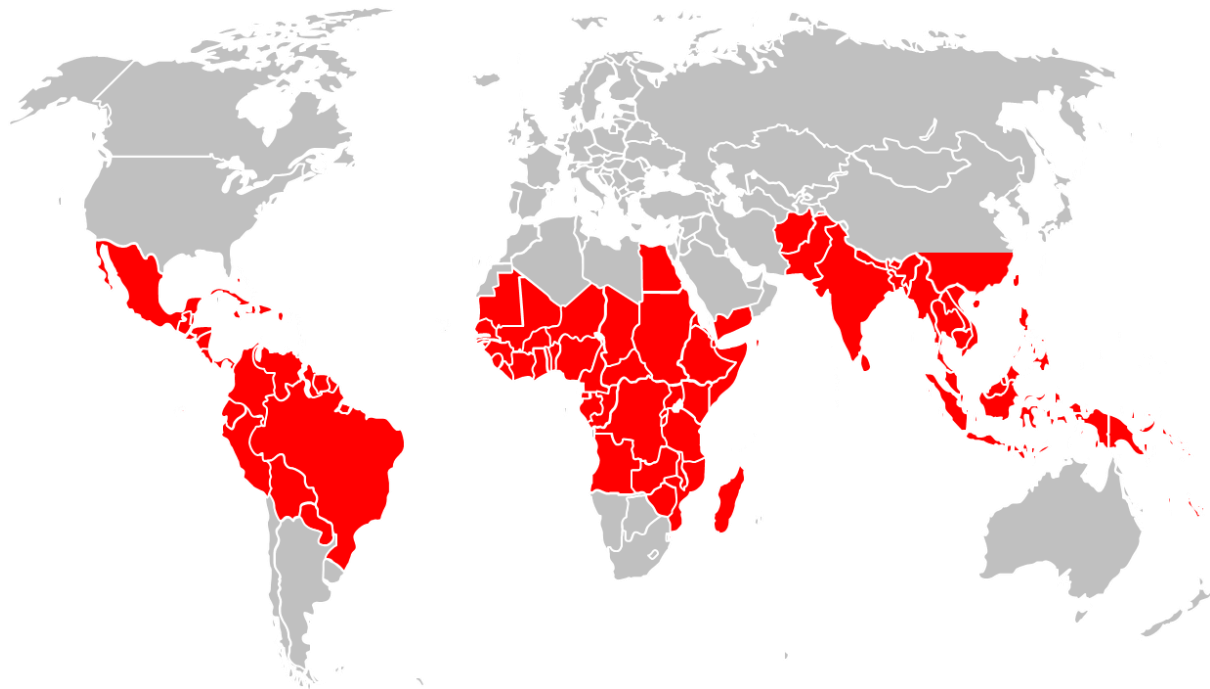


Abbildung 1: Verbreitung des DENV. Länder und Regionen, welche rot eingefärbt sind, weisen Vorkommen des Virus auf. Grafik erstellt auf Grundlage der Daten von BHATT et al.^[3]

70% der Infektionen entfallen auf Asien, davon 34% auf Indien. Auf dem amerikanischen Kontinent treten 14% der Infektionen auf, davon die Hälfte in Brasilien und Mexiko, die gleiche Zahl wurde für Afrika erhalten. An dieser Stelle wird allerdings eine starke Fehlerbehaftung angenommen, da in Afrika eine hohe Zahl von Krankheiten mit ähnlichen Symptomen auftritt und zudem die Dokumentationsrichtlinien weniger ausgebaut ist.^[3,11]

Der Anstieg der Fallzahlen und die Ausbreitung in der näheren Vergangenheit und Gegenwart werden mit der fortschreitenden Urbanisierung und Globalisierung in Verbindung gebracht. Dadurch entstehen neue Lebensräume für die Stechmücken und ihre Ausbreitung wird

2

begünstigt. Neue Ausbreitungsräume wurden von den tropischen und subtropischen Regionen nach Norden und Süden vorhergesagt.^[8,12] In Südeuropa wurden 2010 erste autochthone Fälle gemeldet.^[13] In Deutschland erfolgte bisher lediglich die Meldung von Fällen rückkehrender Reisender, jedoch wurden erste Populationen an *Aedes albopictus* in Süddeutschland beobachtet, die hier überwintert haben.^[14,15] Modelle für die Vorhersage der Ausbreitung der *Aedes aegypti* und *Aedes albopictus* sagen eine weiter voranschreitende Ausbreitung in den nächsten Dekaden vorher.^[16] Eine Eindämmung der Ausbreitung der Mücken kann unter anderem durch Pestizide, Bakterien oder auch modifizierte Stechmücken erfolgen. Diese Maßnahmen müssen jedoch dauerhaft unterhalten werden, da ansonsten wieder ein Anstieg der Population folgt.^[17]

1.1.1.2 Krankheitsbilder und Therapie

Bei DENV-infizierten Personen wird zwischen verschiedenen Krankheitsverläufen unterschieden: Dem Denguefieber (DF), dem hämorrhagischen Denguefieber (DHF) und dem Dengue-Schock-Syndrom (DSS).^[18] Im Falle des DF weisen Patienten nach einer Inkubationszeit von 3 – 14 Tagen oftmals zusätzlich zu grippalen Symptomen nur unspezifische Symptome, wie Muskel- und Gelenkschmerzen oder Ausschläge auf, es gibt jedoch auch Fälle, in denen wochenlange Phasen von Schwäche und Depression folgen. Das DF hält zwischen drei und sieben Tage an, gegen Ende kann jedoch ein schwerer Krankheitsverlauf, das DHF, folgen. Dabei erhöht sich die Permeabilität der Wände von Blutgefäßen für Thrombozyten und Blutplasma, wodurch es zu inneren Blutungen und Kreislaufversagen kommen kann. Wenn dieser Zustand anhält, kann es durch den Blutverlust zu einem Schockzustand, dem DSS, kommen. Neben diesen Krankheitsverläufen sind auch andere Symptome wie neurologische Schäden oder das Guillain-Barré-Syndrom möglich.^[2,19]

Es existiert noch keine spezifische Therapie, für alle Krankheitsphasen gibt es lediglich Ansätze, die Symptome zu mildern und den Körper zu unterstützen. So wird in Fällen von DHF der Körper möglichst schnell intravenös versorgt.^[20]

Für die Entwicklung von Impfstoffen stellt die ADE eine Herausforderung dar, da tetravalente Impfstoffe benötigt werden. Für DENV existiert seit 2015 eine Impfung, CYD-TDV (Dengvaxia®, Sanofi-Pasteur), welche jedoch unterschiedlich gut vor den verschiedenen Serotypen schützt.^[21] Bei seronegativen Patienten wurde zudem eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für schwere Krankheitsverläufe beobachtet.^[22] Eine Zulassung ist in

manchen Ländern nur für seropositive Patienten gegeben, die Entdeckung des fünften Serotypen erschwert die Entwicklung einer Impfung jedoch zusätzlich.^[6]

1.1.2 Zika-Virus

1.1.2.1 Verbreitung

Die erste Erkrankung mit ZIKV wurde im Jahr 1954 in Nigeria dokumentiert.^[23] Obwohl die Krankheit bekannt war, trat die erste große Epidemie erst 2007 in Yap Island und Mikronesien auf, wobei ein großer Anteil der Bevölkerung infiziert wurde, gefolgt von Französisch-Polynesien und anderen Inseln im Südpazifik.^[24] 2015 kam es zu einer Epidemie in Südamerika, vor allem in Brasilien, wobei Schätzungen dort zwischen 0.4 und 1.3 Mio. Infektionen vermuten.^[25] In Folge dieser Ausbreitung wurde auch von Fällen im südlichen Bereich der USA berichtet, die sich für das Jahr 2016 auf 40.000 beziffern lassen.^[26] In Deutschland sind bisher nur Fälle von Reisekrankheiten bekannt.^[14] Neben der Übertragung durch Stechmücken der Arten *Aedes aegypti* und *Aedes albopictus* wurde für ZIKV auch eine Übertragung auf sexuellem Wege, perinatal und durch Stillen beobachtet.^[27] Zudem wurde ZIKV in der Samenflüssigkeit eines Mannes auch noch Monate nach der Infektion nachgewiesen.^[28] Die Übertragung ohne Vektoren allein reicht jedoch nicht für eine endemische Ausbreitung, wodurch sich eine Verbreitung ergibt, die der von DENV ähnlich ist (**Abbildung 2**). Die Schwierigkeit bei der genauen Einschätzung von Fallzahlen durch unspezifische oder asymptomatische Krankheitsbilder besteht jedoch ebenso.

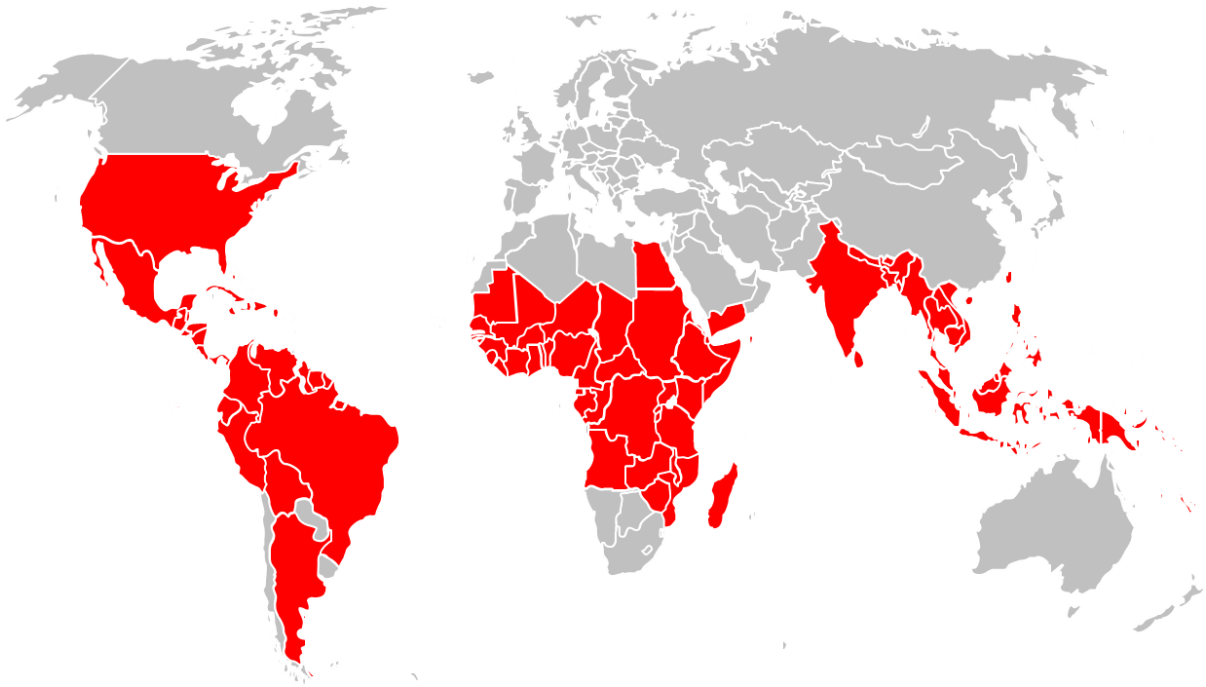


Abbildung 2: Verbreitung des ZIKV. Länder und Regionen, welche rot eingefärbt sind, weisen Vorkommen des Virus auf. Grafik erstellt auf Grundlage der Daten von COLLINS *et al.*^[29]

1.1.2.2 Krankheitsbilder und Therapie

Die Symptome einer Infektion mit ZIKV ähneln der mit DENV, nach einer Infektionszeit von drei bis zwölf Tagen kann es zu Fieber, Hautausschlag, Kopf-, Muskel- und Gelenkschmerzen kommen, welche nach sieben Tagen wieder abklingen. Allerdings verlaufen viele Infektionen auch asymptomatisch.^[24,30] ZIKV steht zudem im Verdacht, das Guillain-Barré Syndrom auszulösen.^[31] In Folge der Epidemie in Brasilien im Jahre 2015 wurde ein Anstieg an Neugeborenen mit Mikrozephalie beobachtet, woraufhin man untersuchte, ob ZIKV dies auslösen kann.^[32] In vielen Fällen gab es eine vorhergehende ZIKV-Infektion der Mutter und das Virus wurde im Gehirn von betroffenen Föten nachgewiesen.^[33] Als mögliche Ursache für das Auftreten dieser Fälle bei der Epidemie in Brasilien konnte eine S139N-Punktmutation im viralen Polyprotein ermittelt werden.^[34] Andere Experimente erbrachten Hinweise auf eine Verstärkung von ZIKV-Infektionen durch DENV-Antikörper mit einem vermehrten Auftreten von Mikrozephalie-Fällen in Verbindung, jedoch gibt es auch Untersuchungen, welche einen durch ZIKV-Antikörper vermittelten Mechanismus nahe legen.^[35]

Aktuell gibt es keine spezifische Therapie oder Impfung gegen ZIKV-Infektionen.

1.2 Flaviviren

Flaviviren bestehen aus einem Capsid, welches von einer Lipidmembran umgeben ist. Das Capsid, das aus Capsid (*C*)-Proteinen besteht, enthält das Genom in Form einer positiven, einzelsträngigen RNA von ca. 11.000 Basen. Die Lipidmembran selbst ist bedeckt von jeweils 180 Kopien des Envelope (*E*)-Proteins und des Membranproteins, die entweder in der gereiften (*M*)-Form oder der Vorläufer-Form (*precursor*, *prM*) vorliegen. Das Virus wird zuerst im endoplasmatischen Retikulum (ER) in einer ungeriffen Form zusammengesetzt, welche später im trans-Golgi-Netzwerk in die gereifte Form umgewandelt wird, wobei eine Prozessierung vom *prM* (ca. 165 Aminosäure) zu *M* (ca. 75 Aminosäuren) erfolgt. Dabei ändert sich die äußere Struktur von 60 trimeren Einheiten aus Heterodimeren von *E* und *prM* zu 90 Dimeren von *E*- und *M*-Heterodimeren (**Abbildung 3**).^[36]

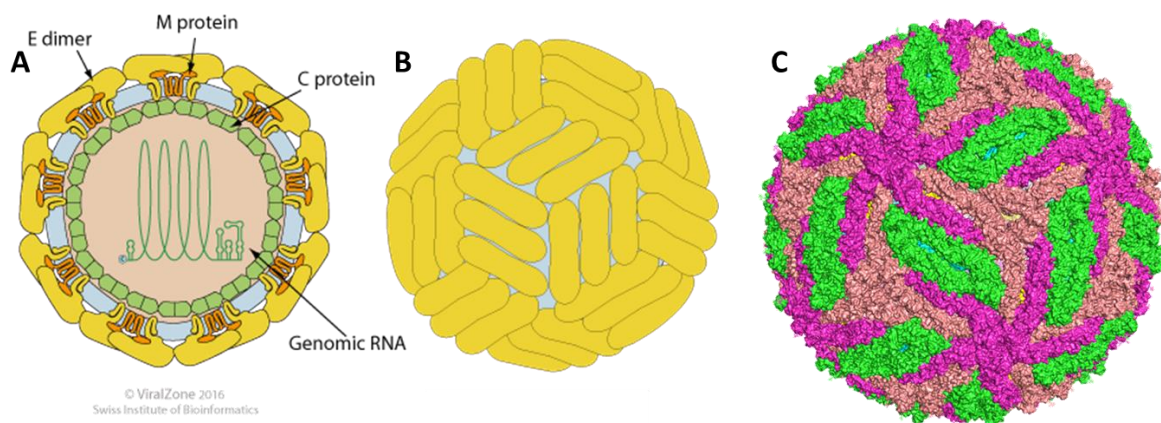


Abbildung 3: Struktur und Aufbau von Flaviviren. **A:** Schematischer Querschnitt des Virus, zu sehen sind Envelope (*E*) und Membran (*M*)-Protein, welche mit der Lipidmembran (blau) das Capsid, bestehend aus Capsid (*C*)-Proteinen umhüllen. Im Inneren befindet sich die positive, einzelsträngige RNA, die das Genom enthält. **B:** Schematische Außenansicht des Virus mit den *E*-Proteinen in gelb und der Lipidmembran darunter in blau. Grafik übernommen von ViralZone.^[37] **C:** Struktur von ZIKV; gemessen per Kryoelektronenmikroskopie, zu sehen ist die Symmetrie der *E*-Proteine in grün, lila und rosa. PDB-Code 6CO8, Grafik erstellt mit PyMOL.^[36,38]

Im Körper binden die Viruspartikel an Rezeptoren und andere Moleküle an der Zelloberfläche und gelangen durch Endozytose in die Zellen hinein. Nachdem sie in das Endosom und darauf folgend in das Lysosom gelangt sind, kommt es durch den niedrigen pH-Wert zu einer Konformationsänderung des *E*-Proteins, wodurch die virale Membran mit der Wirtsmembran verschmilzt und die virale RNA in das Cytoplasma gelangt.^[39] Anschließend wird sie in ein Polyprotein translatiert, welches neben den bereits erwähnten Proteinen auch nicht-strukturelle Teile enthält, die als NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4 und NS5 bezeichnet werden. Anschließend

wird es von Wirtsproteasen, unter anderem von Furin und der Signalase, und der viralen NS2B/NS3-Protease prozessiert (**Abbildung 4**).

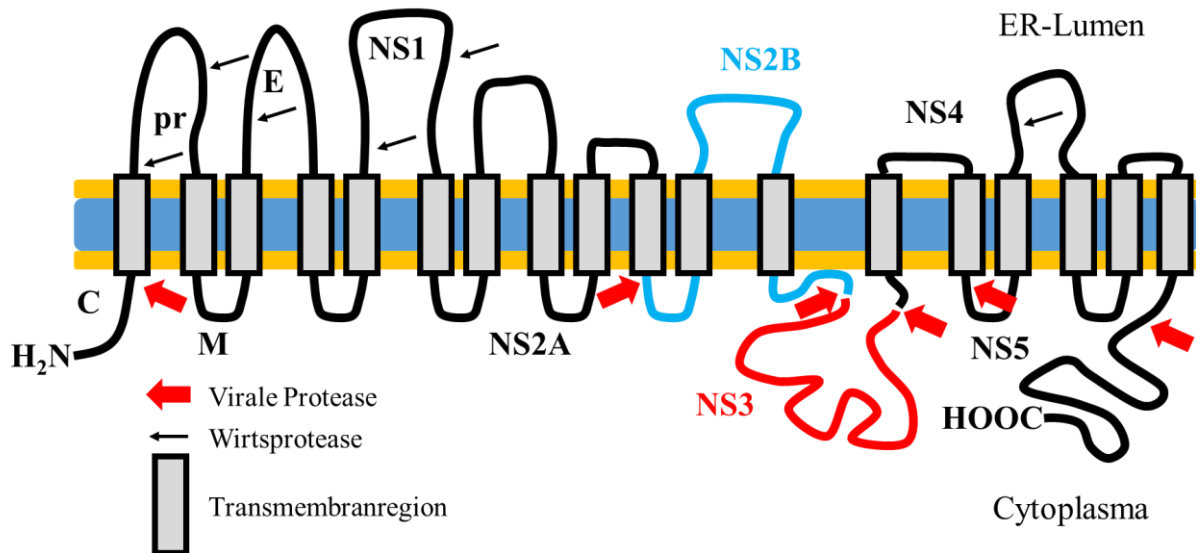


Abbildung 4: Schematische Darstellung des von der viralen RNA translatierten Polyproteins in der ER-Membran. Die Membran ist in blau und gelb dargestellt, das Peptid in schwarz, NS2B in blau und NS3 in rot. Schwarze Pfeile markieren die Schnittstellen der Wirtsproteasen, rote die der viralen NS2B/NS3-Protease. Grafik erstellt in Anlehnung an NITSCHKE *et al.*^[40]

Die RNA des Virus wird anschließend durch die NS5-RNA-Polymerase repliziert, woraufhin aus der ER-Membran, welche die strukturellen Proteine des Virus trägt, neue Viruspartikel gebildet werden. Diese werden nach Prozessierung und Reifung im trans-Golgi-Netzwerk durch sekretorische Wege aus der Zelle freigegeben.^[41]

Bei diesem Prozess übernehmen die nichtstrukturellen Proteine des Virus verschiedene Aufgaben. NS1 hat eine Bedeutung in der frühen Phase der Replikation der RNA. Da es von manchen Zellen in die Blutbahn abgegeben wird, ist es ebenfalls relevant für die Detektion und Identifizierung des Virus, wobei Immunoassays zum Einsatz kommen.^[42] NS2A gehört zum Replikationskomplex und dient zur Unterstützung der Zusammensetzung neuer Viruspartikel.^[43] NS2B bildet den Cofaktor zu der Protease-Domäne von NS3, welche das virale Polyprotein an verschiedenen Schnittstellen schneidet. Zu diesen gehören unter anderem die Schnittstelle zwischen NS2A und NS2B und NS2B und NS3. Die letztere wird bei DENV in einer intramolekularen Reaktion (*cis*) gespalten, bei ZIKV wurde dieser Mechanismus *in vitro* ebenfalls gezeigt.^[44,45] Neben der Protease enthält NS3 außerdem eine Helicase- und eine Triphosphatasedomäne und ist unabhängig von seinen enzymatischen Funktionen auch an der

Zusammensetzung der neuen Viruspartikel beteiligt.^{[46][47]} NS4A und NS4B dienen ebenfalls als Gerüst für die Zusammensetzung neuer Viren, wobei NS4A für die Anordnung der Membran von Bedeutung ist und NS4B in Kontakt mit der doppelsträngigen RNA kommt.^[48,49] NS5 weist eine Methyltransferase-Domäne auf, welche für Modifikationen an der viralen RNA sorgt.^[50] Zudem ist die RNA-abhängige RNA-Polymerase von NS5 für die Replikation der viralen RNA zuständig, wobei aus dem positiven Einzelstrang zwischenzeitlich ein negativer gebildet wird, welcher als Vorlage für die Replikation dient.^[51]

Zur Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen DENV und ZIKV können Inhibitoren auf verschiedenen Stufen wirken, vom Eintritt des Virus in die Zelle bis zur Prozessierung des Polyproteins und der Replikation der viralen RNA.^[52] Wird das Polyprotein nicht gespalten, kann es zu keiner Replikation der Viren kommen. Da die Wirtsproteasen auch noch andere Funktionen ausüben, deren Hemmung zu Nebenwirkungen führen könnten, stellt die virale NS2B/NS3-Protease das vielversprechendere Target dar.

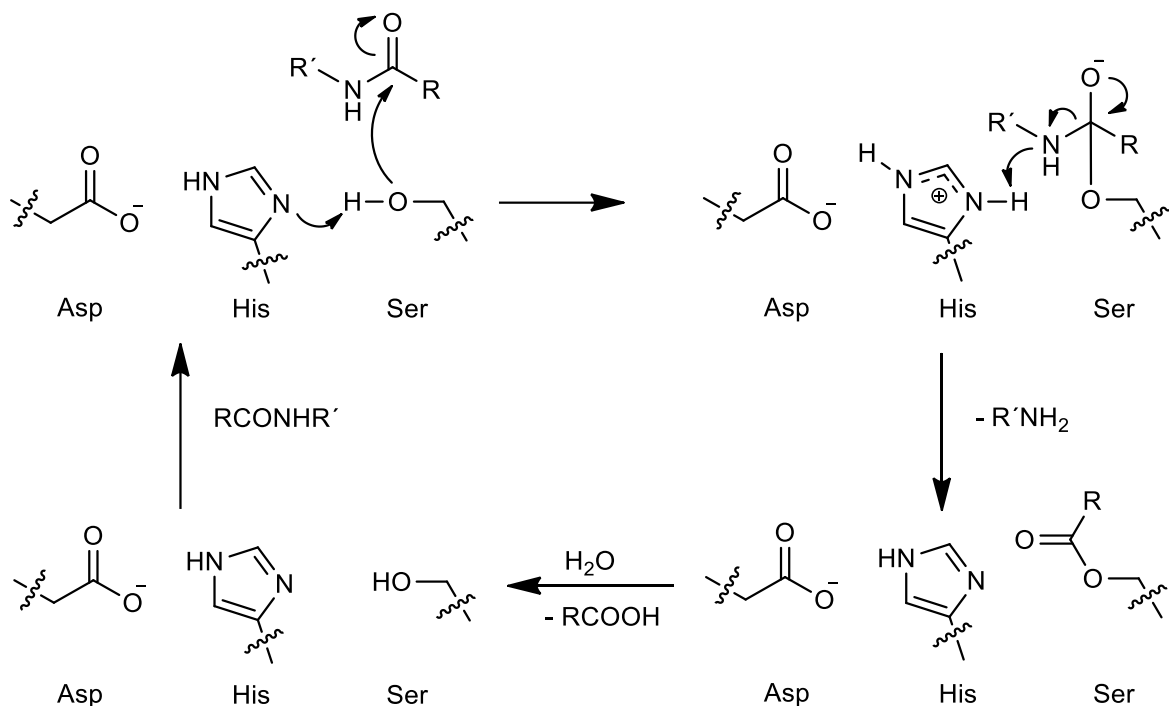
1.3 NS2B/NS3-Protease

1.3.1 Katalytische Aktivität

Die virale NS2B/NS3-Protease besteht aus der Protease-Domäne des NS3-Proteins und NS2B als Cofaktor, welcher wichtig für eine vollständige Aktivität der Protease und für die Löslichkeit des Komplexes ist. Die Protease-Domäne von NS3 ist den Serin-Proteasen zuzurechnen und beinhaltet eine katalytische Triade aus Serin S135, Histidin H51 und Aspartat D75.^a Anhand der Zusammensetzung der katalytischen Triade und der evolutionären Verwandtschaft werden Proteasen in der MEROPS-Datenbank hierarchisch in Familien und Clans eingeteilt.^[55] Die DENV-Protease wird dabei in den Clan PA eingeordnet, der sich durch eine Ähnlichkeit zu Trypsin und einer katalytischen Triade aus Serin (Ser), Histidin (His) und Aspartat (Asp) auszeichnet. Die untergeordnete Familie ist S7, die Flavivirus-Proteasen. In dieser ist neben der DENV-Protease S07.001 auch die ZIKV-Protease unter S07.003 zu finden. Zur Spaltung von Substraten werden diese vom Serin nucleophil am Carbonylkohlenstoff der Amidgruppe angegriffen. Die katalytische Triade dient dabei dem Zweck, die Nucleophilie des

^a Im Folgenden wir für alle Reste der DENV NS2B/NS3-Protease die Nummerierung der Aminosäuren anhand der Kristallstruktur 2FOM für DENV übernommen.^[53] Diese Nummerierung wird auch verwendet, wenn beide Proteasen betroffen sind, bei expliziter Beschreibung der ZIKV-Protease alleine wird die Nummerierung anhand der Kristallstruktur 5LC0 verwendet.^[54]

aliphatischen Alkohols des Serins zu erhöhen. Dabei wird das Proton des Serins durch das freie Elektronenpaar des Imidazolrings des Histidins angegriffen, es entsteht ein Imidazoliumkation. Die positive Ladung wird durch die negative Ladung des Aspartats stabilisiert. Durch den Angriff des Serin-Alkohols an der Amidbindung des Substrats entsteht ein tetraedrisches Intermediat, bei welchem die negative Ladung am Carbonylsauerstoff lokalisiert ist und durch die Proteinumgebung (*oxyanion hole*) stabilisiert wird.^[56] Aus diesem entsteht das freie Amin und die am Serin acylierte Protease. Zum Schluss wird der Ester hydrolysiert, sodass auch die andere Hälfte des Substrates aus der Bindetasche heraus diffundieren kann (**Mechanismus 1**).



Mechanismus 1: Katalytische Triade der DENV- und ZIKV-Protease mit den Resten Asparaginsäure (Asp), Histidin (His) und Serin (Ser).

Die Substratspezifität der Protease vor (P_n) und nach (P_n') der Spaltungsstelle variiert zwischen den verschiedenen DENV-Serotypen leicht, jedoch wird in der P_1 -Tasche Arginin (Arg) deutlich bevorzugt, lediglich in manchen Substraten ist noch das ebenfalls kationisch vorliegende Lysin (Lys) zu finden. In der P_2 -Position sind ebenfalls die beiden kationischen Reste Arginin und Lysin bevorzugt, während P_3 wenig spezifisch ist. Dort wurden in natürlichen Substraten unter anderem Glycin (Gly), Alanin (Ala) und Lysin beobachtet. In der P_1' -Position werden kleine neutrale Reste wie Glycin oder Serin bevorzugt.^[57] Die Substratspezifität der ZIKV-Protease ist der von DENV sehr ähnlich, jedoch ist eine im Vergleich erhöhte katalytische Aktivität von ZIKV gegenüber DENV festzustellen. Zudem wird von der DENV-Protease in P_2 Arginin gegenüber Lysin leicht bevorzugt, wobei bei ZIKV

Lysin favorisiert wird. Als Grund dafür wird ein Unterschied in der Position 83 des Cofaktors NS2B genannt. Während bei der DENV-Protease dort Serin oder Threonin gefunden werden kann, ist in der ZIKV-Protease ein negativ geladenes Aspartat vorhanden.^[54,58] Zudem wurde eine veränderte Aktivität der ZIKV-Protease gegenüber zellulären Substraten gefunden und durch Experimente mit Hybriden zwischen beiden Proteasen die Hypothese aufgestellt, dass auch andere Regionen von NS2B an der Substraterkennung beteiligt sind.^[58]

1.3.2 Struktur

In beiden Proteasen ist die Faltung von NS3 ähnlich zu Chymotrypsin, wobei NS2B in verschiedenen Konformationen beobachtet wurde, welche als geschlossen oder geöffnet bezeichnet werden (**Tabelle 1**).

Tabelle 1: Übersicht über verschiedene ausgewählte Kristallstrukturen der DENV- und ZIKV-NS2B/NS3-Protease.

Virus	PDB-Code	Konstrukt^a	Ligand^b	Konformation
DENV3	3U1I ^[59]	NS2B-Gly-NS3	Bz-nKRR-H	geschlossen
DENV2	2FOM ^[53]	NS2B-Gly-NS3	-	offen
DENV2	6MO0 ^[60]	NS2B-Gly-NS3	1 (vgl. 1.4.2)	offen
ZIKV	5LC0 ^[54]	NS2B-Gly-NS3	Bz-(4-H ₂ N- CH ₂)F—R-B(OH) ₂	geschlossen
ZIKV	5GPI ^[61]	NS2B, NS3	KKGE	geschlossen
ZIKV	5GXJ ^[62]	NS2B-Gly-NS3	-	offen

a) Der Gly₄-Ser-Gly₄-Linker ist mit Gly abgekürzt. b) Aminosäuren sind mit Einbuchstabencodes angegeben, n = Norleucin.

In der geschlossenen Konformation ist NS2B komplett an NS3 gebunden und bildet einen β -Hairpin aus, welcher in die Bindetasche der P₂-Aminosäure hineinragt, und geht mit seinem Peptidrückgrat Interaktionen mit dem gebundenen Inhibitor ein.^[54,59] In der offenen Konformation hingegen gibt es weniger Interaktion von NS2B mit NS3, wobei NS2B auch nicht vollständig in den Kristallstrukturen aufgelöst ist, was auf einen flexibleren Zustand hindeutet (**Abbildung 5**).^[53,60]

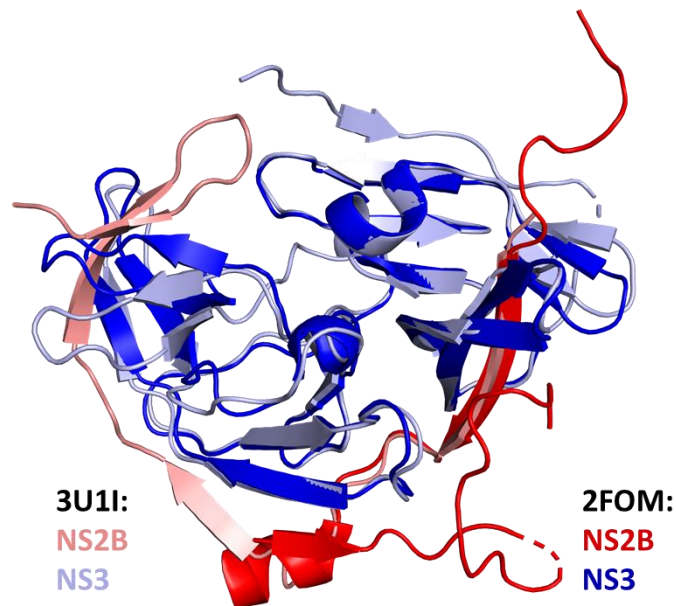


Abbildung 5: Vergleich der offenen (2FOM^[53]) und geschlossenen (3U1I^[59]) Konformation der DENV NS2B/NS3-Protease. Grafik erstellt mit PyMOL.^[38]

Die aktive Konformation ist die geschlossene, welche bei Bindung von Substraten und kompetitiven Inhibitoren eingenommen wird, während ohne oder mit nicht-kompetitiven Inhibitoren die offene Konformation in Kristallstrukturen beobachtet wurde.^{b[63]} Durch NMR-Studien konnte gezeigt werden, dass die Protease in Lösung in beiden Konformationen vorliegt und durch einen kompetitiven, positiv geladenen Inhibitor die geschlossene Konformation induziert wird.^[64–66] Zwischen der DENV- und der ZIKV NS2B/NS3-Protease wurde in den Studien der Unterschied gesehen, dass der C-Terminus der Protease von ZIKV im Vergleich zu DENV deutlich weniger geordnet ist.^[66] Des Weiteren wurde ein Unterschied zwischen Konstrukten ohne eine kovalente Verbindung zwischen NS2B und NS3 und Konstrukten mit einem Gly₄SerGly₄-Linker nachgewiesen.^[65] Der Einfluss dieses Linkers auf unterschiedliche Konformationen wurde durch Experimente, bei denen Konformationen mittels Disulfidbrücken eingefroren wurden, ebenfalls postuliert.^[63] In diesen wurden drei verschiedene Konstrukte der DENV-NS2B/NS3-Protease mit Cysteinpaaren durch Punktmutationen erstellt, so dass diese Cysteine entweder in der offenen (I73C*, P106C), geschlossenen (S75C*/K117C) oder beiden (A125C/V162C) Konformationen eine Disulfidbrücke ausbilden konnten. Diese Konstrukte wurden jeweils mit und ohne einen Linker zwischen NS2B und NS3 erstellt. Im Falle des Paares, welches in der geschlossenen Konformation eine Disulfidbrücke ausbilden kann, waren

^b Für eine Diskussion der Kristallstrukturen mit einem nicht-kompetitiven Inhibitor (PDB-ID 6MO0, 6MO1, 6MO2) siehe 1.4.2, Seite 21.

bei der Protease mit Linker nur ein Viertel der Moleküle in eine Disulfidbrücke involviert, während im Falle der Protease ohne Linker fast alle Moleküle durch Disulfidbrücken verbunden waren. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass in Lösung die Protease ohne einen Linker zum größten Teil in der geschlossenen Konformation vorliegt. Die geschlossene Konformation ist jedoch auch nicht als eine fixe Konformation zu betrachten, sondern weist selbst mit einem kompetitiven Inhibitor noch verschiedene Konformationen auf.^[67]

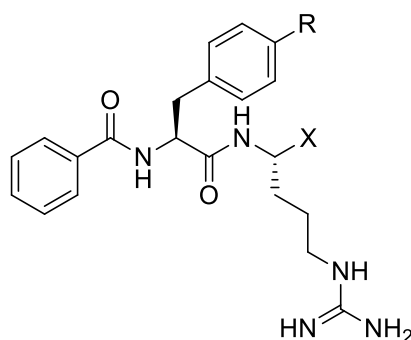
Während die native DENV2 NS2B/NS3-Protease keine Cystein-Reste besitzt, was sie für Untersuchungen mit Cystein-Punktmutanten, welche selektiv inseriert werden können, geeignet macht, weist die ZIKV NS2B/NS3-Protease zwei Cystein-Reste auf: C1080 und C1143. Wenn diese durch intermolekulare Disulfidbrücken verbunden sind, ist der $\frac{k_{cat}}{K_M}$ -Wert höher im Vergleich zu den durch Zugabe von Reduktionsmitteln erhaltenen Monomeren. Ein Austausch der Cysteine gegen Serin ergab $\frac{k_{cat}}{K_M}$ -Werte ähnlich dem durch Disulfidbrücken gebildeten Dimer.^[54]

1.4 Inhibitoren

1.4.1 Kompetitive Inhibitoren

Zur Entwicklung kompetitiver Inhibitoren ist es eine gängige Strategie, Substrate nachzuahmen, um so durch eine stärkere Bindung von Inhibitoren in die aktive Tasche die Bindung der Substrate zu verhindern. Eine Möglichkeit, die Verweildauer der Inhibitoren am aktiven Zentrum zusätzlich zu erhöhen, besteht in der Einführung von Gruppen, welche mit dem aktiven Zentrum eine kovalente Reaktion eingehen können. Im Falle der DENV- und ZIKV-Protease werden kationische Reste im Substrat bevorzugt. Durch den Einsatz von Arginin, Lysin und Biomimetika dieser Reste konnten nanomolare Inhibitoren entwickelt werden.^[68]

Tabelle 2: Kompetitive Inhibitoren der ZIKV- und DENV-Protease basierend auf der bevorzugten Substratstruktur mit und ohne reaktive Kopfgruppe.^[68]



Inhibitor	R	X	DENV2		ZIKV	
			IC ₅₀ [μ M]	K _i [μ M]	IC ₅₀ [μ M]	K _i [μ M]
2	CH ₂ -NH ₂	CONH ₂	>50	-	-	-
3	CH ₂ -NH ₂	B(OH) ₂	0.066	0.051	0.25	0.04
4	guanidinyll	CONH ₂	87	29	-	-
5	guanidinyll	B(OH) ₂	0.036	0.027	2.1	-

Die Verwendung von kationischen Inhibitoren führt jedoch zu einer höheren Polarität der Moleküle, verbunden mit einer geringeren Membrangängigkeit und höheren EC₅₀-Werten (**3** DENV2 EC₅₀ = 30 μ M).

Ein weiteres Problem bei diesen Ansätzen ist die mangelnde Selektivität gegenüber anderen Proteasen (*off-targets*) wie Thrombin oder Trypsin, welche jedoch durch das Einführen weiterer

Modifikationen in das peptidische Rückgrat zu **6** und **7** angegangen werden können (**Abbildung 6**).^[69]

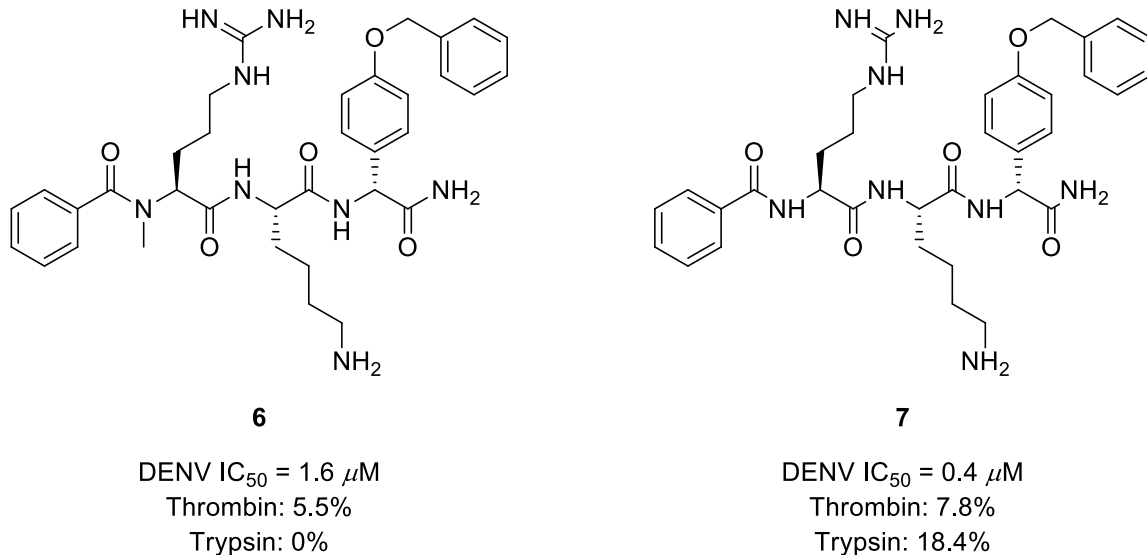


Abbildung 6: Modifikation des Peptidrückgrates von peptidischen kompetitiven Inhibitoren der DENV NS2B/NS3-Protease. Prozentuale Inhibition wurde gemessen bei einer Inhibitor-Konzentration von 25 (Thrombin) bzw. 50 (Trypsin) μM.^[69]

Im Bereich der nicht-peptidischen kompetitiven Inhibitoren gab es ebenfalls den Ansatz, die bevorzugten basischen Substrate zu nutzen, was zur Entdeckung von **8** (DENV IC₅₀ = 14.4 μM^[70], bzw. 7.7 μM^[71]) geführt hat. **8** geht eine kovalente Bindung mit dem aktiven S135 des Enzyms ein, weist jedoch eine geringe Stabilität in verschiedenen Puffersystemen auf, wodurch die Schwankungen in den IC₅₀-Werten erklärt werden können.^[71,70] Ein anderer Ansatz ging von einem Hochdurchsatzscreening (*high throughput screening*, HTS) aus, in Folge dessen **9** als kompetitiver Inhibitor der ZIKV NS2B/NS3-Protease mit einem IC₅₀-Wert von 4.1 μM und einem K_D von 9.0 μM (Oberflächenresonanzspektroskopie, *surface plasmon resonance*, SPR) gefunden wurde (**Abbildung 7**).^[72]

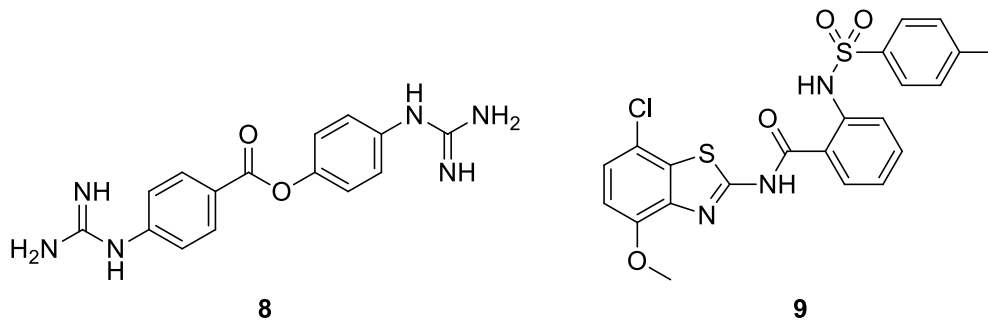


Abbildung 7: Die kompetitiven, nicht-peptidischen Inhibitoren **8** und **9**.^[71,72]

1.4.2 Nicht-kompetitive Inhibitoren

Inhibitoren, welche nicht-kompetitives Verhalten gegenüber der NS2B/NS3-Protease zeigten, wurden in den Extrakten des chinesischen Ingwers, *Boesenbergia rotunda*, gefunden, woraus unter anderem das Flavonoid Pinostrobin extrahiert werden konnte.^[73,74] Bei weiteren Untersuchungen mittels Docking-Studien wurden Vorschläge für mögliche allosterische Taschen an der Protease gemacht. Auch bei anderen Flavonoiden, wie dem Agathisflavon **10**, Pinostrobin **11** oder Myricetin **12** wurde nicht-kompetitives Inhibitionsverhalten gefunden (**Abbildung 8**).^[66,75]

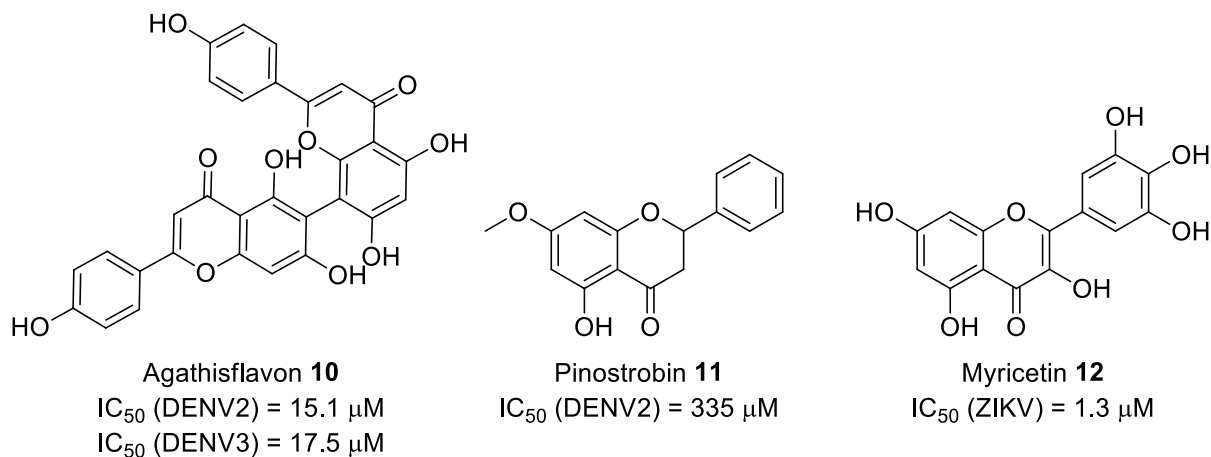


Abbildung 8. Flavonoide als nicht-kompetitive Inhibitoren der DENV NS2B/NS3-Protease. Links Pinostrobin, rechts Agathisflavon.^[74,73,75]

Zur Aufklärung der möglichen Bindetasche wurden Cystein-Mutanten in die DENV2 NS2B/NS3-Protease eingeführt, welche über keine nativen Cysteine verfügt. Mithilfe von sogenannten chemischen Sonden (*chemical probes*), die reaktiv gegenüber Cystein-Thiolen,

wie beispielsweise Ellmanns Reagenz **13**, sind, wurden die Cysteine dann modifiziert und die Aktivität der Protease gemessen (**Abbildung 9**).

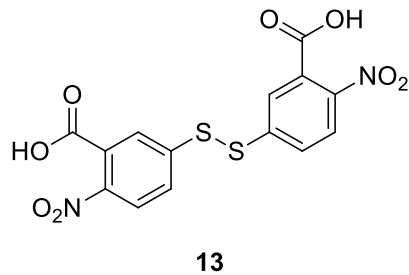


Abbildung 9: Ellmanns Reagenz **13**.

Für die Mutante A125C wurde dabei eine Inhibition der Proteaseaktivität festgestellt, was auf eine potentielle allosterische Tasche hindeutet. Durch den Vergleich von Kristallstrukturen mit (4M9T) und ohne (4M9F) Ellmanns Reagenz als Sonde ließ sich eine Konformationsänderung des Bereiches um T120 feststellen, welcher von der Lage mehr der offenen Kristallstruktur 2FOM ähnelt (**Abbildung 10A**).^[53] Zudem ist in der geschlossenen Konformation (3U1I) an dieser Stelle ein Teil von NS2B lokalisiert, wodurch als Hypothese für den Inhibitionsmechanismus eine Stabilisierung der offenen Konformation genannt wurde (**Abbildung 10B**).^[59,76]

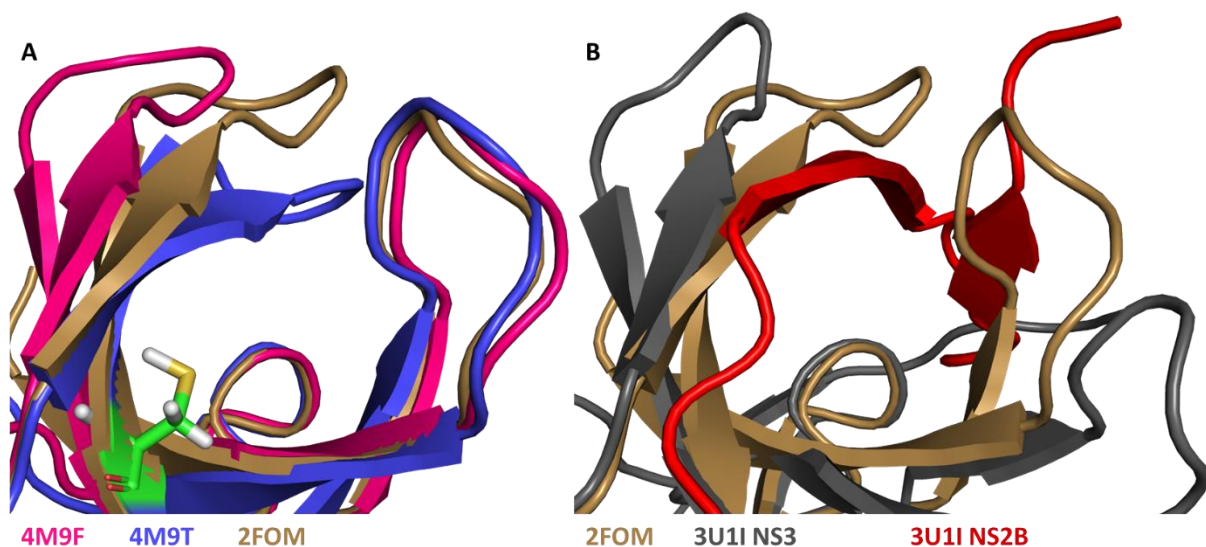


Abbildung 10: Die Umgebung von Position 125 in Kristallstrukturen der DENV NS2B/NS3-Protease mit der Schleife um T120 links oben. **A:** Vergleich der Kristallstrukturen der offenen Konformation (2FOM), der Cystein-Mutanten mit (4M9T) und ohne (4M9F) Ellmanns Reagenz. Kristallstruktur 4M9F in pink, 4M9T in blau und 2FOM in braun. C125 von 4M9T dargestellt als Striche, Farben nach Elementen. **B:** Vergleich der Kristallstrukturen der offenen (2FOM) und geschlossenen (3U1I) Konformation. 2FOM in braun, NS3 von 3U1I in schwarz und NS2B von 3U1I in rot. Grafiken erstellt mit PymOL.^[38,53,59,76]

Die A125C-Mutante ist zugänglich für Ellmanns Reagenz sowohl in Konstrukten mit und ohne Linker zwischen NS2B und NS3 und auch für ZIKV wurden die gleichen Ergebnisse beobachtet.^[58,63]

Um der Frage nach der Konformation der Protease unter dem Einfluss von nicht-kompetitiven Inhibitoren nachzugehen, wurde ein Konstrukt der Protease mit einer geteilten Luciferase erstellt. Durch das Einnehmen der geschlossenen Konformation durch die Protease wurden beide Fragmente der Luciferase in ausreichende räumliche Nähe gebracht, um ein Substrat umzusetzen, wodurch eine experimentell bestimmbare Lumineszenz entstand. Im Falle der offenen Konformation wurde jedoch keine Aktivität der Luciferase gesehen, womit ein Assay zur Messung der Konformation geschaffen wurde. Die Protease mit der A125C-Mutante zeigte zwar keine eindeutigen Ergebnisse unter dem Einfluss von Ellmanns Reagenz, jedoch konnte durch eine A125W-Mutante eine Verminderung des Luciferase-Signals gesehen werden, was als Einnahme der offenen Konformation bei Bindung eines Inhibitors in die nicht-kompetitive Tasche gedeutet wurde. Der nicht-kompetitive Inhibitor **14** ($IC_{50} = 1.8 \mu M$) wurde durch ein virtuelles Screening, gefolgt von einem *in vitro*-Screening identifiziert und auch im Luciferase-Assay konnte eine Inhibition der Luciferase-Aktivität beobachtet werden. Als Inhibitionsmechanismus stellte man die Hypothese des Verhinderns des notwendigen konformellen Wechsels zu der geschlossenen Konformation auf.^[77] In zellbasierten Untersuchungen wurde die Inhibition von DENV2 ($EC_{50} = 0.81 \mu M$), ZIKV ($EC_{50} = 1.0 \mu M$), WNV ($EC_{50} = 1.27 \mu M$) und YFV ($EC_{50} = 0.28 \mu M$) festgestellt (**Abbildung 11**).

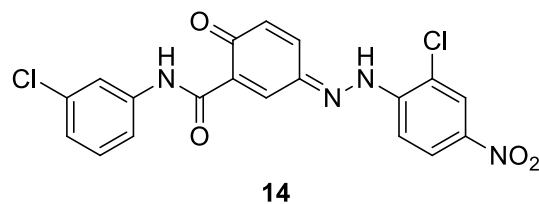


Abbildung 11: Der nicht-kompetitive Inhibitor der DENV2 NS2B/NS3-Protease **14** (DENV2 $IC_{50} = 1.8 \mu M$).^[77]

Der Bindemodus von **14** wurde durch Dockingstudien untersucht, wobei eine Bindung unter anderem an N152 postuliert wurde. Durch Untersuchungen mit Punktmutanten des Enzyms konnte diese Hypothese unterstützt werden.

Durch ein Screening von bereits existierenden Wirkstoffen wurden Temporofin **15** (ZIKV $IC_{50} = 1.1 \mu M$), Niclosamid **16** (ZIKV $IC_{50} = 12.3 \mu M$) und Nitazoxanid **17** (ZIKV $IC_{50} = 15.9 \mu M$) als nicht-kompetitiver Inhibitoren der ZIKV NS2B/NS3-Protease identifiziert. Neben der Inhibition von DENV2, WNV und YFV in zellbasierten antiviralen Assays war auch für diese

Inhibitoren eine Schwächung der Bindung zwischen NS2B und NS3 mit Hilfe eines Luciferase-basierten Assays, sowie eines *pull down*-Assays zu beobachten. Per SPR sowie einem thermalen Shift-Assay (*protein thermal shift assay*, PTSA) wurde eine Bindung alleine an NS3, welches als Konstrukt mit dem Maltose-Bindungsprotein (MBP) löslich ist, mit Bindungskonstanten im niedrigen mikromolaren Bereich beobachtet.^[78] Eine Inhibition der Bindung von NS2B an NS3 durch die Hemmstoffe wurde als Bindehypothese aufgestellt, die bereits zuvor schon postuliert und durch Mutationsstudien untersucht worden war. In diesen Fällen konnte durch die Mutanten Q27A und H60S eine verringerte Bindung des Inhibitors **18** festgestellt, jedoch nicht der Frage nach einer Änderung der gesamten Struktur und Konformation von NS2B und NS3 nachgegangen werden (**Abbildung 12**).^[79]

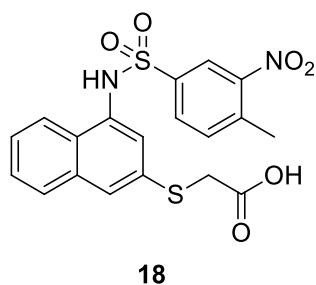


Abbildung 12: Der nicht-kompetitive Inhibitor der DENV NS2B/NS3-Protease **18**.

Ein Docking wurde für die Verbindungen **15** – **17** an den geschlossenen Kristallstrukturen von DENV3 (3U1I) und ZIKV (5LC0) durchgeführt, wobei NS2B aus den Strukturen entfernt worden war.^[78] Die Möglichkeit der Bindung in die offene Konformation, in welcher weniger Wechselwirkungen zwischen NS2B und NS3 vorhanden sind, und potentielle Änderungen der Struktur von NS3 ohne NS2B, welches ohne spezielle Konstrukte nicht löslich ist, wurden dabei nicht diskutiert (**Abbildung 13**).^[53]

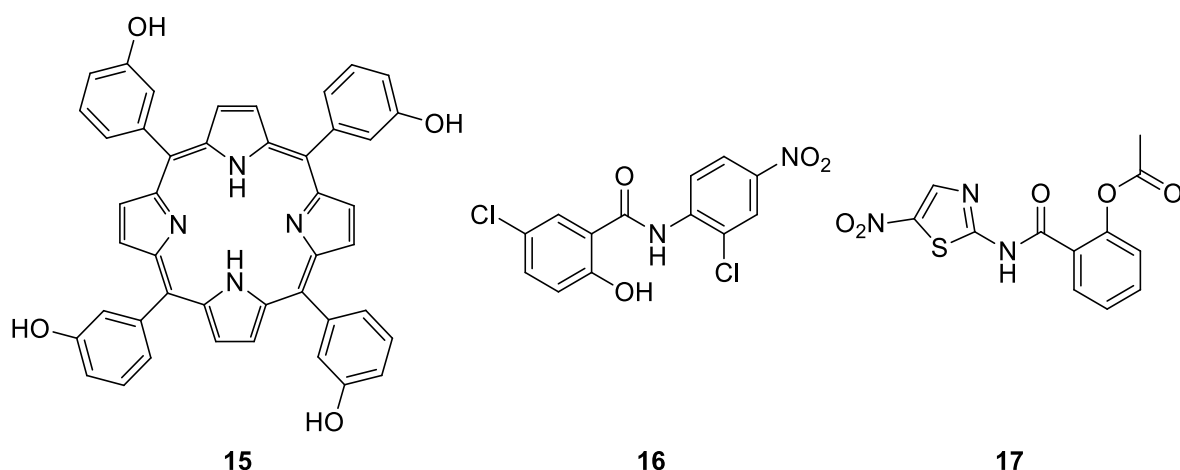


Abbildung 13: Existierende Wirkstoffe als nicht-kompetitive Inhibitoren der ZIKV NS2B/NS3-Protease: Temporofin **15** (ZIKV $IC_{50} = 1.1 \mu M$), Niclosamid **16** (ZIKV $IC_{50} = 12.3 \mu M$) und Nitazoxanid **17** (ZIKV $IC_{50} = 15.9 \mu M$).^[78]

Die Bedeutung von N152 für das Gleichgewicht der offenen und geschlossenen Konformation wurde sowohl ausgehend von Homologie-Modellen mit darauffolgenden Simulationen der molekularen Dynamik (*molecular dynamic simulations*, MD) an der DENV NS2B/NS3-Protease, als auch ausgehend von Kristallstrukturen der ZIKV NS2B/NS3-Protease postuliert.^[80] Die Region der Aminosäuren 152 bis 167 wird danach als molekularer Schalter zwischen der offenen und der geschlossenen Konformation bezeichnet, wobei eine Punktmutation an dieser Stelle zu Alanin, N152A, zu einem weitgehenden Verlust der katalytischen Aktivität der Protease führt.^[62,77] Ausgehend davon wurde eine Bindetasche um N152 herum mittels computergestützten Methoden definiert, welche die Aminosäuren D71, K73, K74, W83, L85, G87, G88, W89, E91, T118, T120, V147, L149, N152, V155, A164, I165 und N167 beinhaltet und in direkter Nähe zu A125 liegt (**Abbildung 14A**). Als mögliche Mechanismen für die Inhibition wurde zum einen die Hemmung der korrekten Ausbildung der katalytischen Triade in der aktiven Tasche, die genau auf der anderen Seite des Proteins liegt (**Abbildung 14B**), und zum anderen die Störung der Ausbildung der geschlossenen Konformation genannt.^[81]

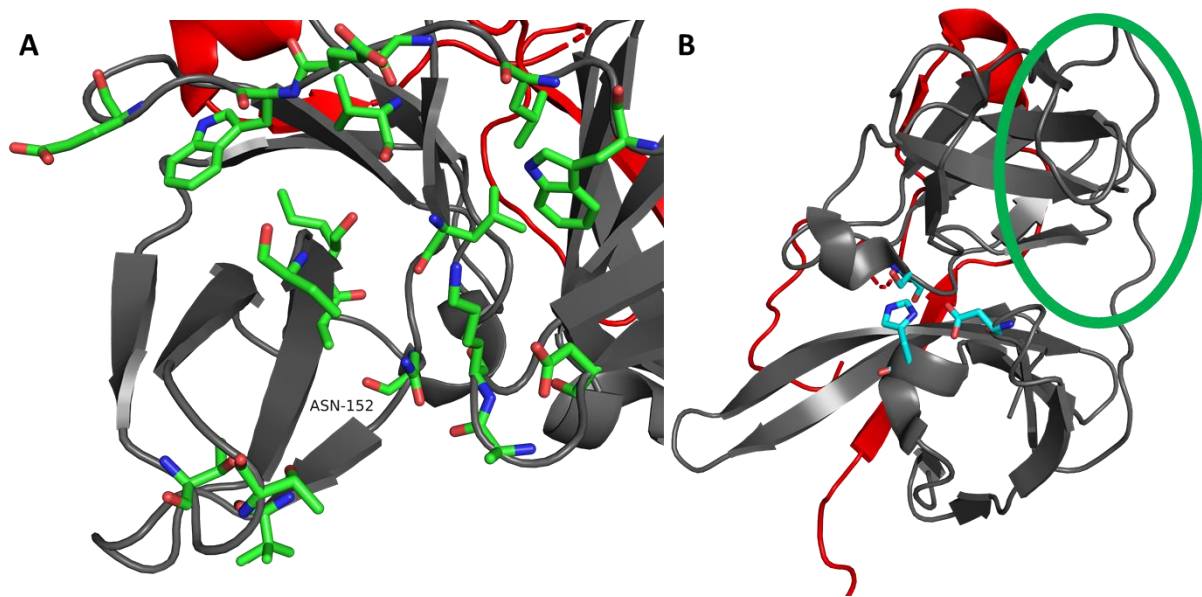


Abbildung 14: Postulierte allosterische Tasche der DENV2 NS2B/NS3-Protease um N152. **A:** Aminosäuren der postulierten allosterischen Tasche. **B:** Ansicht der Lage der allosterischen Tasche (grünes Oval), relativ zum aktiven Zentrum, dargestellt als Striche. NS2B ist als Cartoon in rot dargestellt, NS3 in schwarz, Aminosäuren in Stabform mit Farbcodierung nach Elementen: Kohlenstoff: grün (allosterische Tasche), hellblau (katalytische Triade), Sauerstoff: rot, Stickstoff: blau. Grafik erstellt mit PyMOL, Kristallstruktur 2FOM.^[38,53,81]

Im Rahmen eines Screenings bekannter Verbindungen an der ZIKV, DENV2, DENV3 und WNV NS2B/NS3-Proteasen wurden Inhibitoren mit einer Pyrazin-Struktur gefunden und ausgehend von diesen die Inhibitoren **1**, **19** und **20** entwickelt, welche IC_{50} -Werte im submikromolaren Bereich aufweisen (**Abbildung 15A**). Die Inhibitoren wurden zudem auch auf Wirkung in zellbasierten Assays untersucht (**1** ZIKV $EC_{50} = 300 - 600 \mu M$) und die Überlebenszeit von mit ZIKV infizierten Mäusen wurde durch Gabe von 30 mg/kg von 10 auf 15 Tage verlängert.^[60] Alle drei Inhibitoren wurden zusammen mit DENV2 NS2B/NS3-Protease kristallisiert (**19** 6MO2, **20** 6MO1, **1** 6MO0) und sowohl die Position der schon vorher postulierten allosterischen Tasche, als auch die Bindung in die offene Konformation scheinbar experimentell bestätigt. Die Struktur der Protease ähnelt laut der Publikation sehr stark 2FOM, als Inhibitionsmechanismus wird hier ebenfalls die These aufgestellt, dass die offene Konformation durch Bindung des Inhibitors stabilisiert wird. Der zuvor bei der ZIKV NS2B/NS3-Protease als molekularer Schalter postulierte Bereich zwischen den Aminosäuren 152 – 164 konnte in allen drei Kristallstrukturen nicht aufgelöst werden, was ebenfalls die Theorie stützt, dass diese Region für die Bindung und Funktionsweise von nicht-kompetitiven Inhibitoren von zentraler Bedeutung ist (**Abbildung 15B**). Zudem sind auch andere Funde, wie die schwächere Bindung von NS2B an NS3 oder die reduzierte Aktivität im Luciferase-Assay,

über die Theorie der Stabilisierung der offenen Konformation durch nicht-kompetitive Inhibitoren erklärbar.

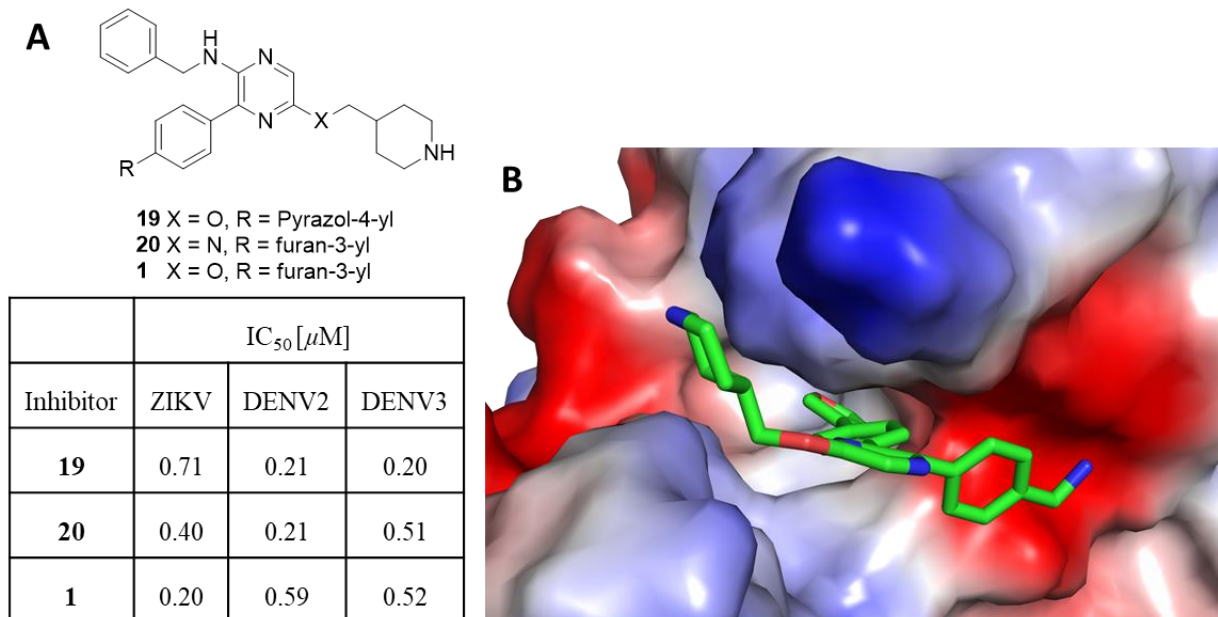


Abbildung 15: Nicht-kompetitive Inhibitoren der DENV und ZIKV NS2B/NS3-Protease. **A)** Strukturen und zugehörige IC₅₀-Werte. **B)** Postulierte Lage des Inhibitors **1** in der allosterischen Tasche der DENV2 NS2B/NS3-Protease. Der Inhibitor ist in Stabform dargestellt, mit Farbkodierung nach Elementen: Kohlenstoff: grün (allosterische Tasche), Sauerstoff: rot, Stickstoff: blau. Das Enzym ist mit seiner Oberfläche dargestellt mit Farbkodierung entsprechend der Ladung: blau: positive Ladung, rot: negative Ladung. Abbildung erstellt mit PyMOL, PDB-Code 6MO0.^[38,60]

Die Kristallstrukturen mit **19**, **20** und **1** (PDB-ID: 6MO0, 6MO1, 6MO2) wurden in der wissenschaftlichen Gemeinschaft sehr intensiv diskutiert, da die Elektronendichte nicht eindeutig dem Liganden zugeordnet werden kann, sondern auch auf andere Teile des Proteins, vor allem den C-Terminus, zurückführbar ist.^[82] Der nicht aufgelöste Bereich um die Aminosäuren 153 – 158 kann zudem teilweise anderen Elektronendichten zugeordnet werden, welche in diesem Fall den Resten 165 – 170 zugerechnet wurden. Dies deutet auf mögliche Fehler in der Auswertung der Kristallstrukturanalyse hin.^[83]

Eine weitere Theorie der Hemmung der Protease durch Bindung von Inhibitoren in dieser allosterischen Tasche beruht auf der Aminosäure N152, welche auch als Teil der aktiven Tasche Interaktionen mit kompetitiven Inhibitoren ausbilden kann.^[84] Nach dieser Hypothese führt die Bindung von nicht-kompetitiven Inhibitoren an N152 zu einer Konformationsänderung, so dass die hydrolytische Spaltung durch die katalytische Triade nicht erfolgt.

In einem anderen Ansatz wurde mithilfe von enzymatischen Methoden (*RaPID Display*) eine Bibliothek von 5×10^{13} Makrocyclen erstellt und die Bindung dieser Moleküle an die ZIKV NS2B/NS3-Protease untersucht.^[85] Die Makrocyclen waren aus Aminosäuren mit peptidischen und nicht-peptidischen Resten aufgebaut, wobei der Ringschluss über eine Sulfidbrücke zwischen dem C-terminalen Cystein und dem N-terminalen Chloracetyltyrosin zu Stande kam (**Tabelle 3**). Jene sechs Verbindungen mit der höchsten Affinität wurden anschließend synthetisiert und die Bindung nochmals per SPR bestätigt. In einem funktionalen Assay wurde anschließend bei allen Verbindungen bis auf **21** eine Inhibition der Protease beobachtet, bei letzterer erfolgte zwar eine Bindung an die Protease ($K_D = 5$ nM), jedoch nicht an einer Stelle, welche einen Einfluss auf die Aktivität besitzt (**Tabelle 3**). Enzymatische Untersuchungen der anderen Makrocyclen zeigten eine nicht-kompetitive Hemmung der Protease, die synergistisch zu kompetitiven Inhibitoren wirkt, jedoch zeigte bis auf **22** (DENV2 $IC_{50} = 1.7 \mu M$) keine Verbindung eine Hemmung der DENV NS2B/NS3-Protease.

Tabelle 3: Makrocyclische Binder an die ZIKV NS2B/NS3-Protease.^[85]

Inhibitor	Struktur ^a	IC ₅₀ [μM]	K _D [nM]
23	- <u>S</u> -Ac-YWKI ^{Me} Y _{Me} NTLVNIC-NH ₂	1.32	20
22	- <u>S</u> -Ac-Y ^{Me} Y _{Me} K ^{Me} FK ^{Me} S ^{Me} Y _{Me} K ^{Me} Y _{Me} ^{Me} Y _{Me} K ^{Me} C-NH ₂	0.62	9
21	- <u>S</u> -Ac-YTLPFHN ^{Me} GTFFC-NH ₂	>100	5

^a S: Schwefelatom des C; ^{Me}Y_{Me}: *N*-Methyl-4-*O*-Methyl-Tyrosin; ^{Me}F: *N*-Methylphenylalanin; ^{Me}S: *N*-Methylphenylserin.

Im Rahmen des Screenings einer *in-house*-Bibliothek wurde **24** als Inhibitor der DENV NS2B/NS3-Protease identifiziert (DENV2 $IC_{50} = 98 \mu M$). Eine nachfolgende Optimierung wurde hauptsächlich im Bereich des Thiophens durchgeführt, wobei **25** als nicht-kompetitiver Inhibitor mit einer Hemmkonstante im niedrigen mikromolaren Bereich gefunden wurde (DENV2 $IC_{50} = 4.2 \mu M$). Für diesen wurde eine antivirale Aktivität in zellbasierten Assays festgestellt (DENV2 $EC_{50} = 0.8 \mu M$). In späteren Messungen konnte zudem eine Inhibition der ZIKV NS2B/NS3-Protease beobachtet werden (DENV2 $IC_{50} = 1.4 \mu M$). Im Laufe der Optimierung wurden verschiedene Substitutionen am Benzothiazol eingeführt, wobei **26** mit der 6-Nitrobenzo[*d*]thiazol-Struktur ebenfalls eine gute Inhibition aufwies (DENV2 $IC_{50} = 22 \mu M$). Aus der Synthese erhaltene Vorstufen mit einer 5,6-Dimethoxybenzo[*d*]thiazol-Struktur wiesen keine Inhibition in enzymatischen Assays auf, wodurch die Bindung des 5,6-Dihydroxy-Motivs an das Enzym als besonders wichtig erachtet wurde. In Dockingstudien,

welche zu diesem Zeitpunkt allerdings mit der geschlossenen Struktur von DENV3 (3U1I) durchgeführt wurden, wurde eine Bindung der beiden orthoständigen Hydroxygruppen an N152 vorhergesagt (**Abbildung 16**).^[86]

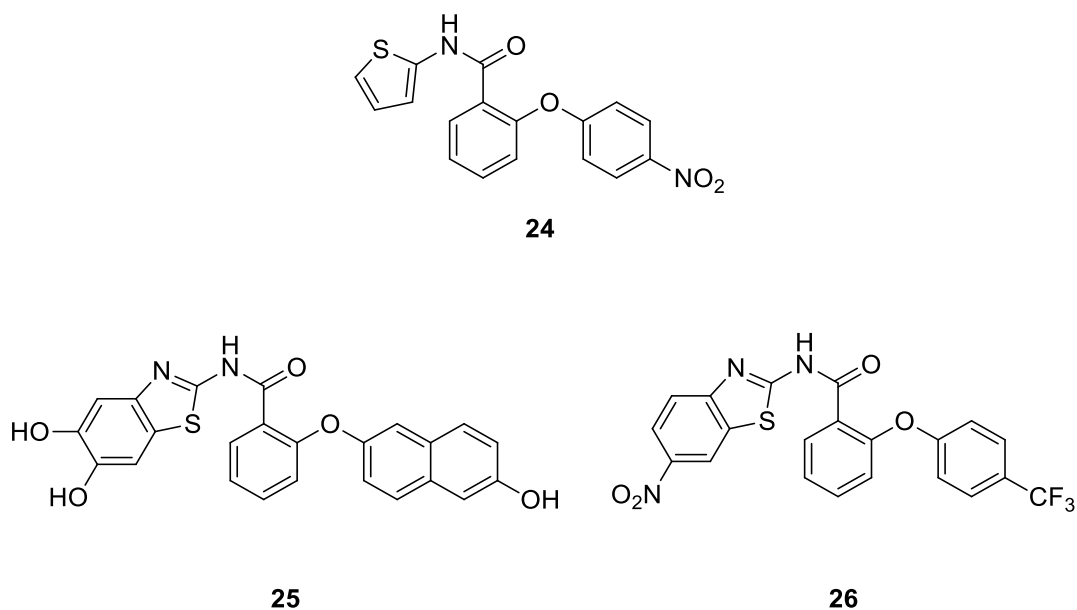


Abbildung 16: Nicht-kompetitive Inhibitoren der DENV NS2B/NS3-Protease.^[86]

1.5 Enzyminhibition

1.5.1 NS2B/NS3-Protease Assays

Zur Bestimmung der Inhibition eines Enzyms durch einen Inhibitor können enzymatische Assays durchgeführt werden, die auf der Funktion des Enzyms basieren. Im Falle von Proteasen eignen sich in vielen Fällen fluorimetrische Assays, bei denen ein Substrat durch die Protease gespalten wird, wobei ein Fluorophor freigesetzt wird, dessen Konzentrationsänderung gemessen werden kann. Im Fall der DENV- und ZIKV-Protease werden Arginin und Lysin als Reste in der P₁- und P₂-Position bevorzugt (vgl. Abschnitt 1.3.1), als Fluorophore wurden sowohl 4-Nitrophenol, als auch 7-Amino-4-methylcumarin **27** (AMC) eingesetzt, welche mit dem Substrat über eine Ester- oder Amidbindung in der P₁'-Position verbunden werden. Letzteres kann bei einer Wellenlänge von 380 nm angeregt werden und emittiert bei 460 nm. Um die Affinität zu der Protease zu erhöhen, werden Tri-, Tetra-, oder auch längere Oligopeptide eingesetzt, wie beispielsweise Boc-GRR-AMC **28** (DENV2: $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 4052 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ZIKV: $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 162 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (**Abbildung 17**).^[87]

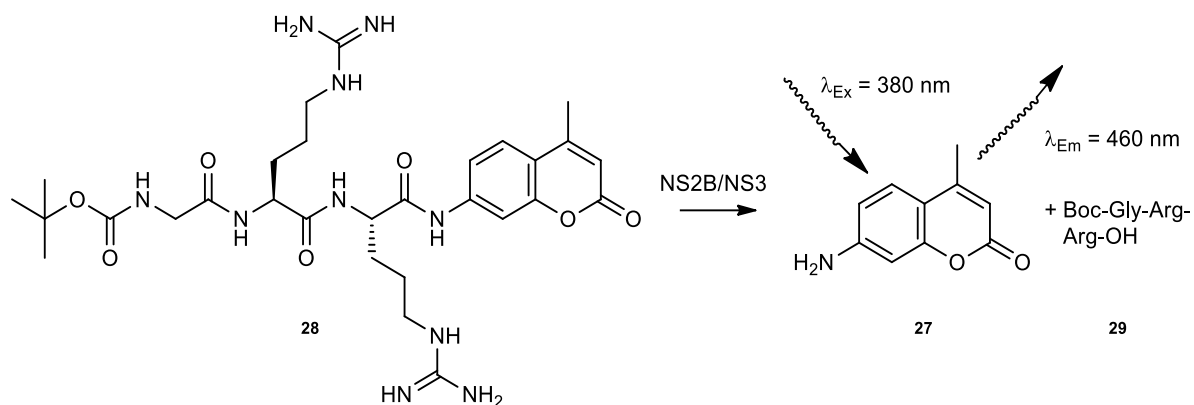


Abbildung 17: Boc-GRR-AMC als Substrat der NS2B/NS3-Protease, bestehend aus der Substratsequenz GRR und dem Fluorophor AMC.

Andere Substrate beruhen nicht auf einem Fluorophor, sondern stattdessen auf intern fluoreszenzlöschenden Systemen, wie Anthranilamid und 3-Nitrotyrosin, welche an beiden Enden des Substrates positioniert werden. Durch die Spaltung des Substrates diffundieren die beiden Enden voneinander weg, die Löschung der Fluoreszenz bleibt aus und das emittierende Licht von Anthranilamid kann gemessen werden. Diese Methodik bietet den Vorteil längerer Substrate, wodurch man eine höhere Affinität erhält, beispielsweise mit ABZ-VKKRAAW-(3-NO₂)Y-NH₂ **30** ($k_{cat}/K_M = 1.26 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) an der ZIKV-*NS2B/NS3*-Protease (**Abbildung 18**).^[88]

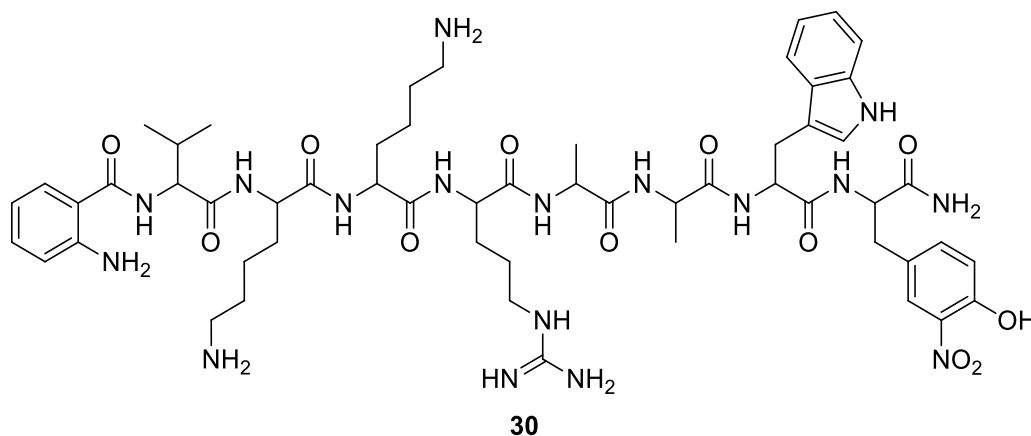


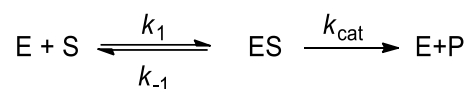
Abbildung 18: ABZ-VKKRAAW-(3-NO₂)Y-NH₂ als intern fluoreszenzlöschendes Substrat der ZIKV *NS2B/NS3*-Protease.

Um eine möglichst hohe Enzymaktivität zu erreichen, müssen zudem die Bedingungen des Assays optimiert werden. Im Fall der *NS2B/NS3*-Protease, welche nach der Expression über *NS2B* in der ER-Membran verankert ist und bei der die ersten Spaltungen intramolekular ablaufen, wirkt sich eine lipophilere Umgebung positiv auf die Aktivität auf. Diese kann mit verschiedenen Additiven erreicht werden, oftmals werden Glykol, Glycerol oder

Propylenglykol verwendet, aber auch Detergenzien sind möglich. Die Enzyme bevorzugen zudem eine basische Umgebung, für Assays werden daher pH-Werte von 8 – 9.5 verwendet.^[87]

1.5.2 Enzymkinetik

Durch Messung von Parametern der Enzymkinetik unter verschiedenen Bedingungen können kompetitive, nicht-kompetitive, kovalente und andere Bindemodi von Inhibitoren an Enzymen bestimmt werden. Zugrunde liegt die Umsetzung eines Substrates durch ein Enzym (**Reaktionsgleichung 1**).



Reaktionsgleichung 1: Reaktion eines Enzyms mit einem Substrat. E: Enzym, ES: Enzym-Substrat Komplex, P: Produkt, k_n = Geschwindigkeitskonstanten.

Die Gleichung beschreibt die zwei Schritte der Reaktion, zuerst die reversible Anlagerung des Substrates an das Enzym, anschließend die Reaktion des Substrates. Die Rückreaktion des Produktes zum Substrat und die Dissoziation von Produkt und Enzym sind dabei vernachlässigbar, da der Beginn einer Reaktion beschrieben wird, bei der $[P] \sim 0$ ist. Unter der Voraussetzung, dass es einen Gleichgewichtszustand der Sättigung des Enzyms mit Substrat gibt, wurde von Michaelis und Menten eine mathematische Beschreibung der Reaktion aufgestellt.

$$v = \frac{v_{max} [S]}{K_M + [S]} \quad (1)$$

v ist die Reaktionsgeschwindigkeit, v_{max} die maximale Geschwindigkeit der Reaktion, $[S]$ die Substratkonzentration und die Michaeliskonstante K_M diejenige Substratkonzentration, bei der eine halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird. Somit kann K_M als Beschreibung für die Affinität des Enzyms zum Substrat dienen und ist folgendermaßen definiert:^[89]

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1} \quad (2)$$

Wenn keine Reaktion stattfindet, kann die Dissoziationskonstante K_D zur Beschreibung als Maß für die Affinität eines Liganden zum Enzym verwendet werden. Bei Inhibitoren wird auch der K_i -Wert als Maß für die Hemmstärke angegeben (vgl. Gleichung (5)).

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

Graphisch ergibt die Michaelis-Menten-Kinetik bei der Auftragung von $[S]$ gegen v eine Hyperbel (**Abbildung 19A**), für verschiedene Bestimmungen und Auswertungen bieten sich auch lineare Graphen an, erhalten durch verschiedene Möglichkeiten der Linearisierung. Der Lineweaver-Burk-Plot nutzt eine doppelt reziproke Auftragung von v^{-1} gegen $[S]^{-1}$, wodurch der Y-Achsenabschnitt $1/v_{max}$ und der X-Achsenabschnitt $-1/K_M$ entspricht (**Abbildung 19B**).^[90]

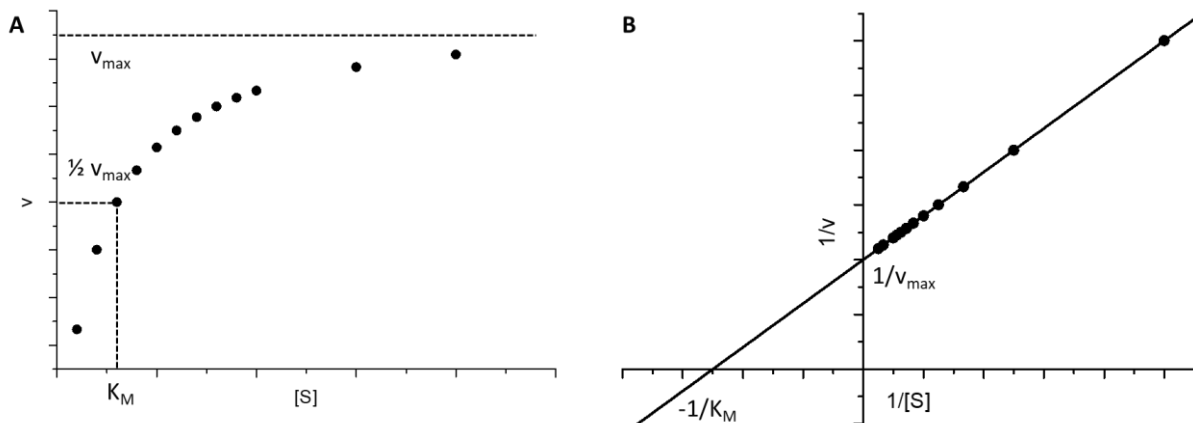


Abbildung 19: Möglichkeiten der Auftragung zur Bestimmung von enzymkinetischen Konstanten. **A:** Auftragung von $[S]$ gegen v ergibt eine Hyperbel, deren Asymptote v_{max} darstellt, wobei K_M an der halbmaximalen Geschwindigkeit abgelesen werden kann. **B:** Auftragung von $1/[S]$ gegen $1/v$ nach Lineweaver-Burk, durch die lineare Regression sind $1/v_{max}$ und $-1/K_M$ an den Achsenabschnitten abzulesen.

Zur Bestimmung der Enzymhemmung durch potenzielle Inhibitoren in Assays wird im linearen Bereich der Michaelis-Menten-Kinetik gearbeitet. Bindet ein Inhibitor an ein Enzym, wird dessen Aktivität herabgesetzt, was zu einer geringeren Umsatzgeschwindigkeit führt. Zur experimentellen Bestimmung kann somit der Messwert, beispielsweise die Fluoreszenz, gegen die Zeit aufgetragen werden, wobei die Steigung die Geschwindigkeit der Reaktion angibt. Die prozentuale Inhibition wird aus dem Verhältnis der Steigungen m mit und ohne Inhibitor berechnet.

$$Inhibition = 1 - Restaktivität = 1 - \frac{m_{Inhibitor}}{m_{Kontrolle}} \quad (4)$$

Zur Berechnung des IC_{50} -Wertes als die Konzentration an Inhibitor, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft, wird die Steigung bei verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors gemessen und die erhaltene Dosis-Wirkungskurve mit einer nichtlinearen Regression ausgewertet (**Abbildung 20**).

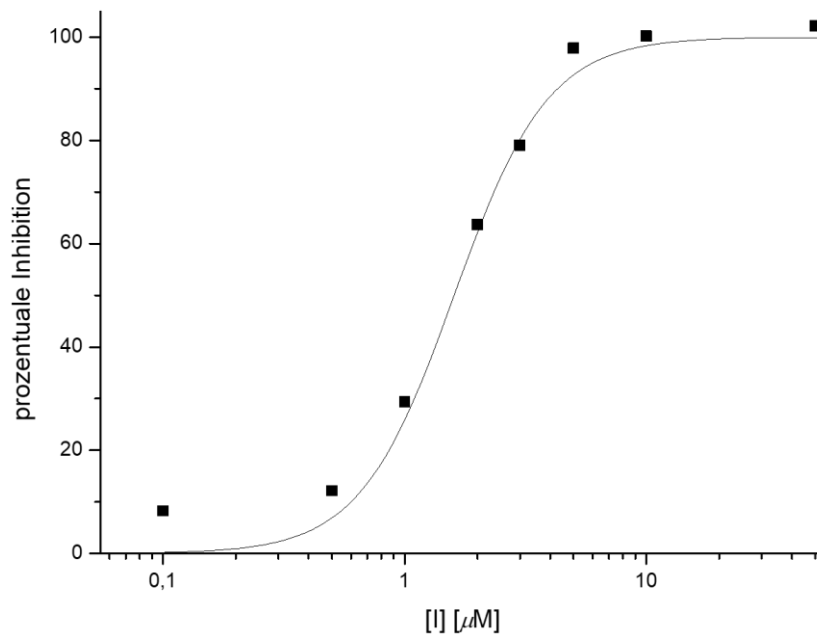


Abbildung 20: IC₅₀-Kurve von **25**, erhalten durch die Messung der Enzymaktivität bei verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors.

Im Falle von kompetitiven Inhibitoren kann durch das Messen von IC₅₀-Werten bei verschiedenen Substratkonzentrationen die Dissoziationskonstante K_i mithilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung bestimmt werden:^[91]

$$IC_{50} = \left(1 + \frac{[S]}{K_M} \right) * K_i \quad (5)$$

Im Fall von nicht-kompetitiver Inhibition ist dies nicht möglich aufgrund der verschiedenen möglichen Hemmmechanismen. Bei kompetitiven Inhibitoren können Substrat und Inhibitor nicht gleichzeitig an das Enzym binden, während bei nicht-kompetitiven Inhibitoren eine Bindung des Inhibitors an das Enzym mit und ohne Substrat erfolgen kann (**Abbildung 21**). Dadurch steht eine reine Bindung an das Enzym nicht in direktem Zusammenhang zu der Inhibition, hier spielt auch der Hemmmechanismus eine Rolle. Die Dissoziationskonstante muss in diesen Fällen durch andere, meist biophysikalische Methoden bestimmt werden.

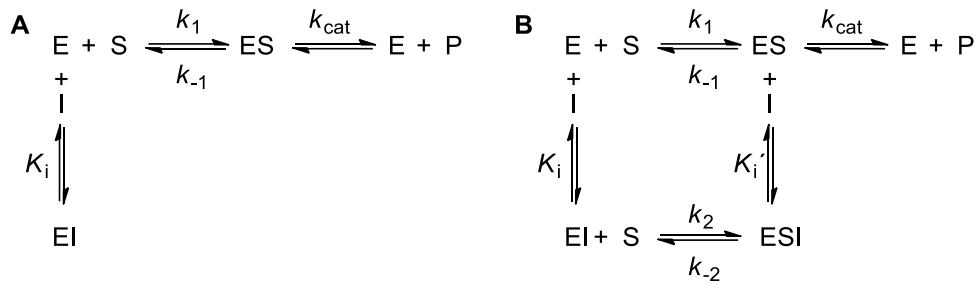


Abbildung 21: Vergleich zwischen kompetitiver (A) und nicht-kompetitiver Inhibition (B). E: Enzym, ES: Enzym-Substrat Komplex, P: Produkt, EI: Enzym-Inhibitor Komplex; ESI: Enzym-Inhibitor-Substrat Komplex, k_n = Geschwindigkeitskonstanten.

Bei kompetitiver Inhibition wird durch den anwesenden Inhibitor, welcher eine Bindung des Substrats an das Enzym erschwert, die benötigte Substratkonzentration für eine bestimmte Umsatzgeschwindigkeit, und damit der K_M -Wert erhöht. Bei ausreichendem Überschuss an Substrat wird der Inhibitor jedoch ebenfalls an der Bindung gehindert, wodurch sich v_{max} nicht verändert. Bei einer nicht-kompetitiven Inhibition dagegen bleibt K_M gleich, die Bindung des Substrates wird nicht beeinflusst. Jedoch wird v_{max} verringert, da der Inhibitor nicht durch einen Substratüberschuss an der Bindung gehindert wird. Somit kann zur Unterscheidung zwischen kompetitiven und nicht-kompetitiven Inhibitoren eine IC_{50} -Bestimmung bei verschiedenen Substratkonzentrationen durchgeführt und graphisch ausgewertet werden (**Abbildung 22**).^[92]

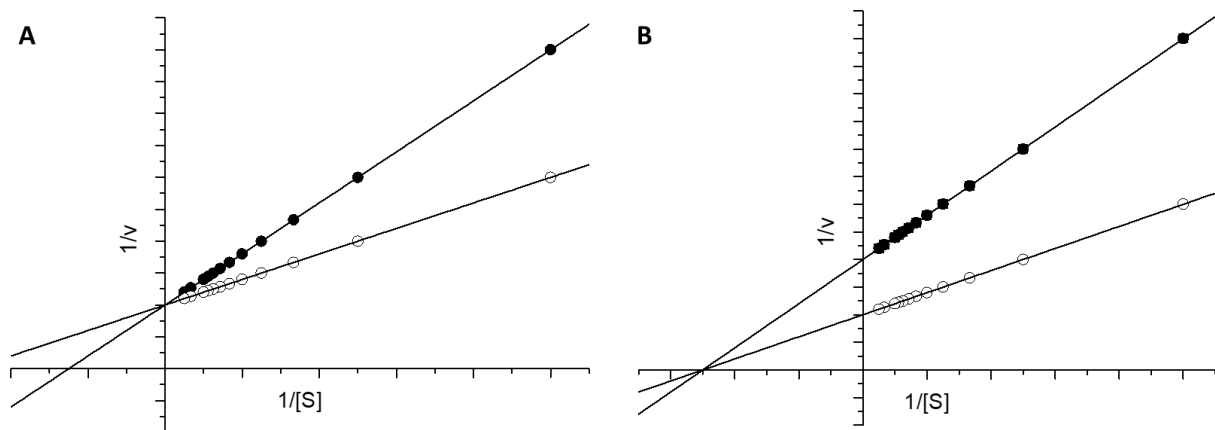


Abbildung 22: Bestimmung von kompetitiver (A), beziehungsweise nicht-kompetitiver (B) Inhibition mittels Auftragung der Geschwindigkeit nach Lineweaver-Burk in Abhängigkeit von der Substratkonzentration mit (●) und ohne Inhibitor (○). Bei kompetitiver Inhibition schneiden sich beide Graphen am Y-Achsenabschnitt, da sich die maximale Geschwindigkeit nicht verändert, während im Fall von nicht-kompetitiver Inhibition der K_M -Wert und damit der X-Achsenabschnitt gleichbleibt.^[90]

Neben diesen Varianten gibt es noch die Möglichkeit der unkompetitiven und der gemischten Hemmung. Zwischen diesen kann durch die Auftragung der Konzentration der Inhibitoren

gegen das Verhältnis von Substratkonzentration und Umsatzgeschwindigkeit unterschieden werden (Cornish-Bowden-Plot).^[93] Bei einer kompetitiven Hemmung werden dabei parallele Geraden erhalten werden, bei unkompetitiver Hemmung erfolgt ein Schnittpunkt der Geraden im zweiten Quadranten (**Abbildung 23**). Im Falle einer nicht-kompetitiven Hemmung ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei einer Auftragung nach Lineweaver-Burk mit Schnittpunkt der Geraden auf der X-Achse.

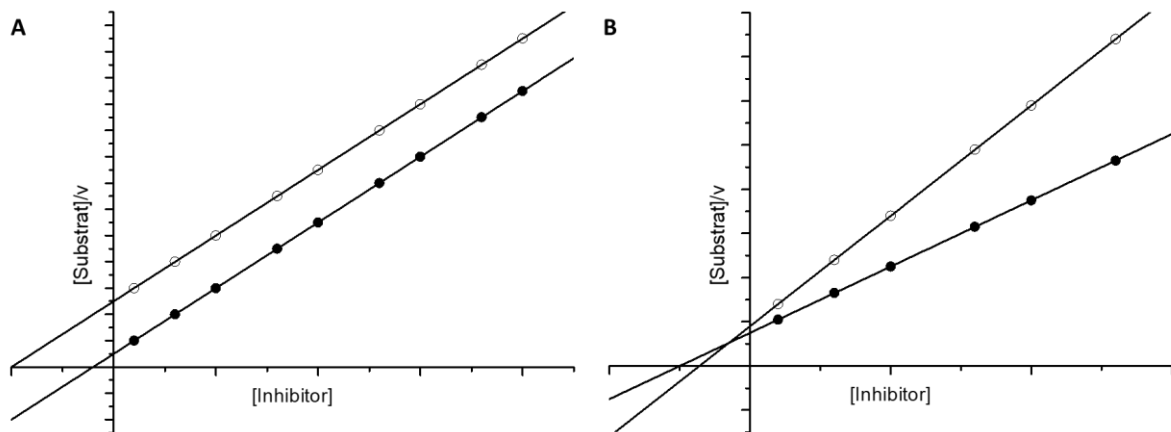


Abbildung 23: Cornish-Bowden-Plot zur Unterscheidung verschiedener Hemmungsarten. **A:** kompetitive Hemmung; **B:** unkompetitive Hemmung.

2 Zielsetzung

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde von WU *et al.* **25** als nicht-kompetitiver Inhibitor der DENV NS2B/NS3-Protease und von [REDACTED] als Inhibitor der ZIKV-Protease identifiziert. Ausgehend davon sollte die Bindestelle des Inhibitors durch Punktmutanten der DENV-Protease und deren Modifikation bestimmt werden, um eine Grundlage für Dockingstudien zur weiteren Optimierung von Inhibitoren und für eine Aufklärung des Inhibitionsmechanismus von nicht-kompetitiven Inhibitoren flaviviraler Proteasen zu erhalten.

Des Weiteren sollte der Inhibitor selbst optimiert werden und gezielte Untersuchungen der Struktur-Wirkungsbeziehungen (*structure-activity relationship*, SAR) an sowohl der DENV2 als auch der ZIKV NS2B/NS3-Protease erfolgen. In vorausgegangenen Experimenten stellte die hohe Lipophilie von **25** ein Problem dar, welche mit einer geringen Löslichkeit einher geht. Daher sollte im Rahmen der Optimierung auch die Hydrophilie der Strukturen weiter verbessert werden, wobei die Catecholstruktur des 5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazols beibehalten werden sollte.

Das Benzo[*d*]thiazol selbst sollte durch einen Austausch gegen andere heterocyclische Verbindungen hinsichtlich weiterer Optimierungsmöglichkeiten untersucht werden. Um zu analysieren, durch welche Gruppen die Catechol-Struktur ersetzt werden kann, wurde ein Fragment-basierter Ansatz gewählt (**Abbildung 24**).

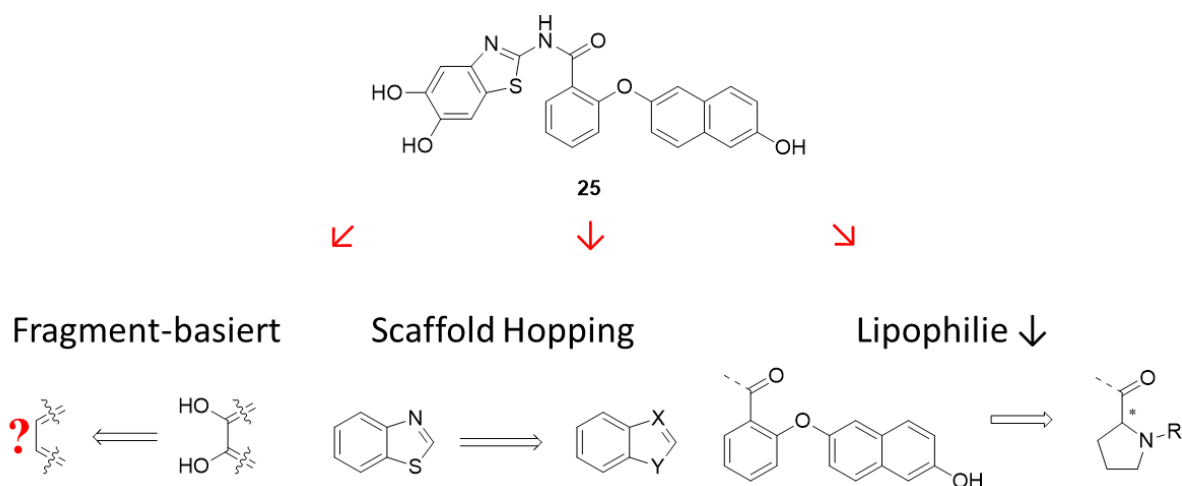


Abbildung 24: Übersicht der Ziele zur Modifikation der Leitstruktur **25**.

3 Hauptteil

3.1 Identifizierung der Bindestelle von 25

3.1.1 Zielsetzung

Die Bindestelle eines Moleküls experimentell zu bestimmen ist essentiell für die weitere Entwicklung von Inhibitoren, da anhand von Analysen der Bindetasche und prospektivem Docking ein rationales Vorgehen möglich wird. **25** wurde bereits per Docking in die beschriebene allosterische Tasche der NS2B/NS3-Protease untersucht.^[86] Um die postulierte Bindestelle experimentell zu verifizieren, sollten, basierend auf diesen Docking-Ergebnissen, Punktmutationen in diese Tasche eingeführt werden, die eine Bindung von **25** durch sterische Hemmung erschweren sollten. Um die nötige Sterik zu erreichen, sollten Cystein-Mutanten eingeführt werden, welche nachfolgend über die Addition an Maleimide modifiziert werden können. Die DENV2-Protease eignet sich für dieses Experiment besonders, da sie nativ nicht über Cystein-Reste verfügt, im Gegensatz zur ZIKV-Protease, deren Sequenz zwei Cystein-Reste beinhaltet: C1080 und C1143. Bei Mutation dieser Aminosäuren zu Serin-Resten kommt es zu einer Änderung der katalytischen Aktivität, wobei eine Änderung in der Struktur oder Konformation nicht ausgeschlossen werden kann (vgl. 1.3.2). Zudem wurde bei der ZIKV-Protease eine Spaltung von NS2B durch eine intramolekulare Reaktion nachgewiesen.^[45] Die DENV2-Protease bot somit den besseren Ansatz, um die Experimente zur Bestimmung der Bindestelle durchzuführen.

Die Wahl der Aminosäuren basierte auf dem vorhergesagten Bindemodus von **25**. In diesem wurde eine Bindung zu T120 postuliert, daher sollte dieser Rest und jeweils auch die danebengelegenen Threonin-Reste T118 und T122 per Punktmutation durch einen Cystein-Rest ausgetauscht werden.^[86] Zudem wurden zwei weitere Aminosäuren, welche tiefer in der Tasche liegen, gewählt, damit diese eventuell eine größere sterische Hemmung bewirken: A164 und A166 (**Abbildung 25**).

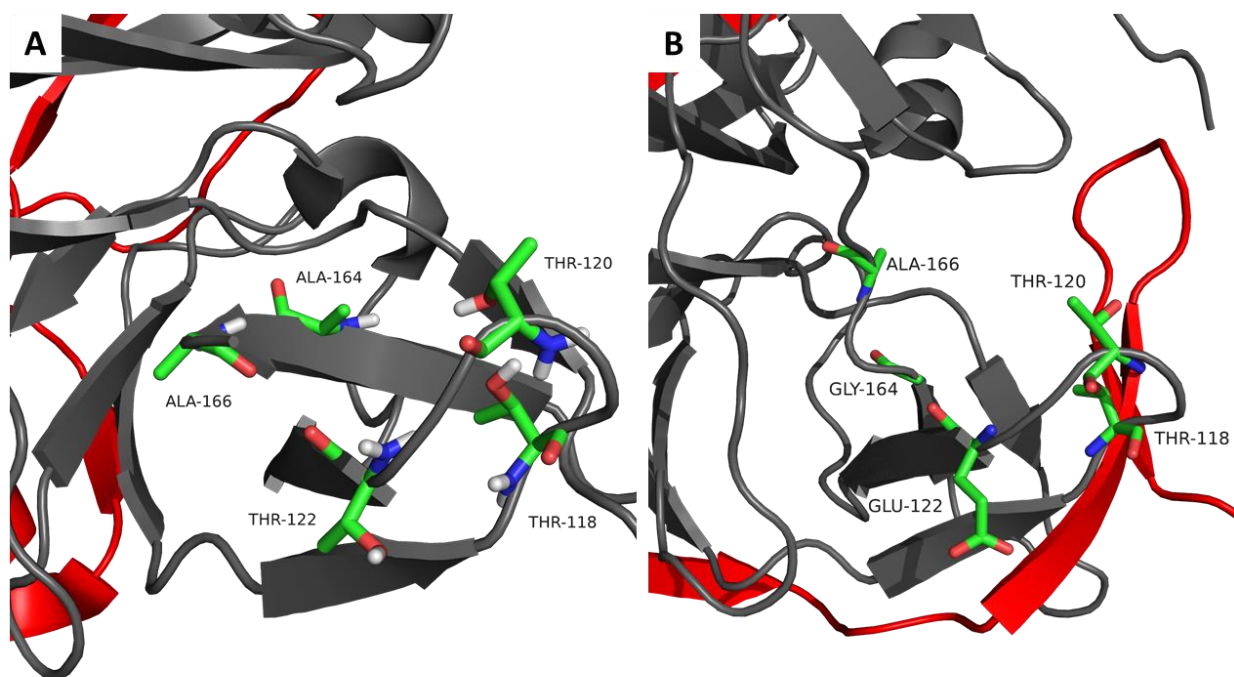


Abbildung 25: Die Lage der mutierten Aminosäuren in der allosterischen Tasche der DENV NS2B/NS3-Protease. **A)** Offene Konformation von DENV2, PDB-Code 2FOM.^[53] **B)** Geschlossene Konformation von DENV3, PDB-Code 3UII.^[59] Das Enzym ist als Cartoon dargestellt, NS2B in rot und NS3 in schwarz. Die Aminosäuren sind in Stabform dargestellt, mit Farbkodierung nach Elementen: Kohlenstoff: grün, Sauerstoff: rot, Stickstoff: blau, Wasserstoff: weiß. Die Abbildung wurde erstellt mit PyMOL.^[38]

Als ersten Test, ob ein Maleimid die Tasche blockieren kann, sollte die als wichtig für die Inhibition bekannte Benzothiazol-Struktur mit einem Maleimid verknüpft werden. Da Maleimide unter den drastischen Bedingungen, die für die Entschützung von Methoxygruppen benötigt werden, ein Problem darstellen können, wurde eine Verbindung basierend auf 6-Nitrobenzothiazol **31** gewählt. **32** als Vorstufe von **31** wurde ebenfalls in die Experimente mit einbezogen. Für die Experimente zur sterischen Blockade der Bindetasche für Inhibitor **25** sollten anschließend das kommerziell erhältliche *N*-Ethyl- **33** und *N*-Benzylmaleimid **34** verwendet werden (**Abbildung 26**).

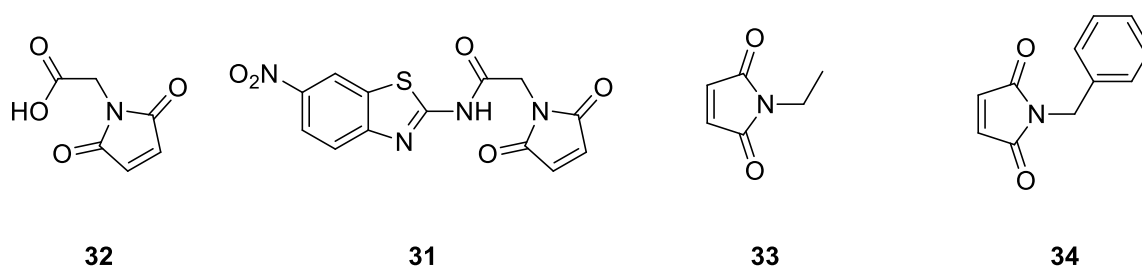


Abbildung 26: Maleimide für die Modifikation von Cystein-Mutanten der DENV2 NS2B/NS3-Protease.

3.1.2 Synthese

Der erste Ansatz zur Synthese von **31** basierte darauf, *N*-Maleimidglycin **32** herzustellen und dieses dann mit 6-Nitrobenzo[*d*]thiazol **35** zu verknüpfen (**Abbildung 27**).

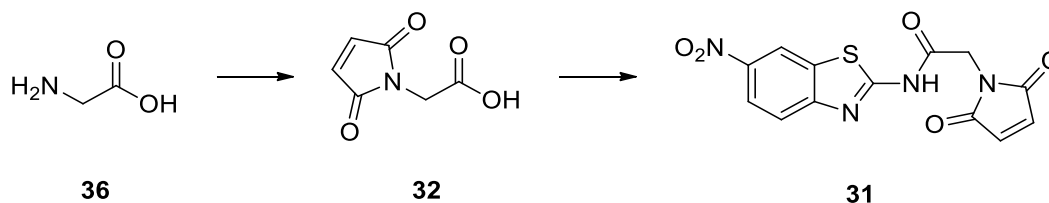
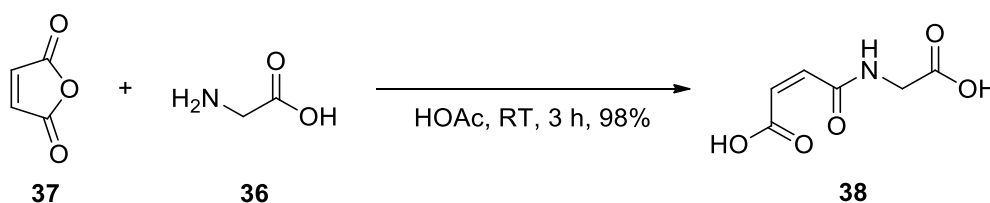


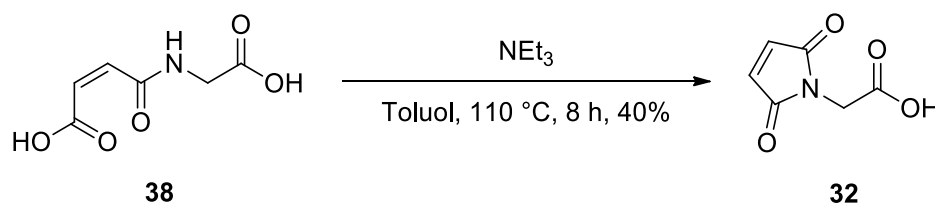
Abbildung 27: Syntheseplan zur Darstellung von **31** über *N*-Maleimidglycin **32**.

32 wurde in zwei Stufen nach einer Vorschrift von BAUMHOVER *et al.* dargestellt.^[94] Im ersten Schritt wurde dazu in einer ringöffnenden Reaktion Glycin **36** an Maleinsäureanhydrid **37** zu **38** durch Rühren in Essigsäure addiert, wobei eine Ausbeute von 98% erzielt wurde (**Reaktionsgleichung 2**).^[94]



Reaktionsgleichung 2: Synthese von **38** durch Addition von **36** an **37**.

Im zweiten Schritt wurde durch Refluxieren von **38** in Toluol an einem Wasserabscheider der Ringschluss zu **32** vollzogen (**Reaktionsgleichung 3**).^[94]



Reaktionsgleichung 3: Darstellung von **32** durch Erhitzen von **38** in Toluol mit einem Wasserabscheider.

Die Kupplung von **32** mit 6-Nitrobenzo[*d*]thiazol **35** durch (2-(1*H*-Benzo[*d*]triazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat) (TBTU) führte jedoch nicht zu dem gewünschten Produkt. Eine mögliche Erklärung liegt in der reaktiven Doppelbindung der Maleimidgruppe, welche Reaktionen mit den anderen Reagenzien eingehen könnte. Daher wurde im Folgenden die Synthese umgekehrt aufgebaut: Zuerst sollte die Amidbindung von Glycin, welches an der Aminogruppe durch eine *tert*-Butoxycarbonyl-Gruppe (Boc) geschützt

ist, mit **35** ausgebildet werden, wodurch **39** erhalten wird. Anschließend sollte die Aminogruppe zu **40** freigesetzt und das Maleimid eingeführt werden, um **31** zu erhalten (**Abbildung 28**).

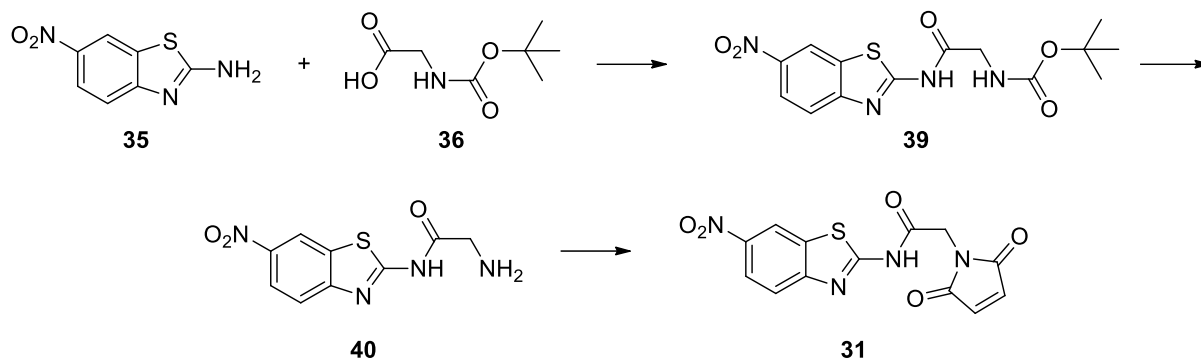
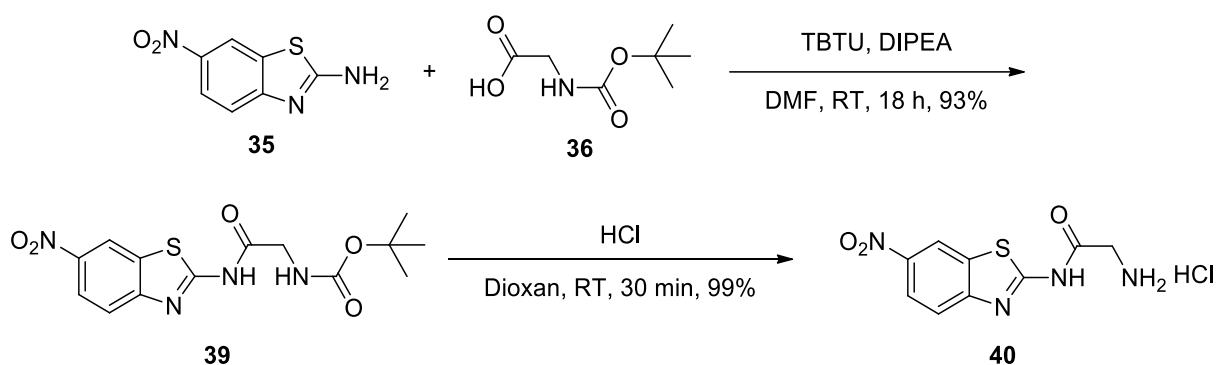


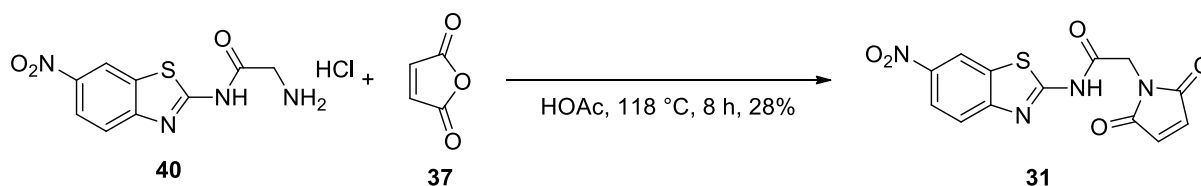
Abbildung 28: Alternative Syntheseroute zu **31**, sodass das Maleimid erst im letzten Schritt gebildet wird.

Die Kupplung von **35** und **36** wurde mittels TBTU durchgeführt und die Boc-Gruppe anschließend mit 4 M HCl in Dioxan abgespalten, wodurch das Hydrochlorid von **40** erhalten wurde (**Reaktionsgleichung 4**).



Reaktionsgleichung 4: Darstellung von **40** in zwei Schritten aus **35** und **37**.

Die Ausbildung des Maleimids, welche zuvor mit Glycin in zwei Schritten vollzogen worden war, wurde anschließend in einem Schritt durchgeführt. Das Hydrochlorid **40** wurde zusammen mit Maleinsäureanhydrid **37** in Eisessig für acht Stunden zum Sieden erhitzt und so **31** erhalten (**Reaktionsgleichung 5**).



Reaktionsgleichung 5: Ausbildung des Maleimids **31** durch die Reaktion des Hydrochlorids **40** mit Maleinsäureanhydrid **37**.

Die Ausbeute lag in diesem Fall lediglich bei 28%. Die Synthese des *N*-Maleimidglycins **32** wurde in zwei Schritten durchgeführt, im ersten Schritt wurde dabei eine sehr hohe Ausbeute erzielt, im zweiten lediglich eine von 40%. Um die Ausbeute zu erhöhen, könnte zum einen die Reaktion näher an den ersten Schritt angepasst werden, indem vor dem Erhitzen die beiden Edukte ebenfalls erst für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt werden. Zum anderen wurde der zweite Schritt zwar bei ähnlichen Temperaturen, jedoch mit unterschiedlichen Lösemitteln und im Fall von **31** auch ohne Wasserabscheider durchgeführt, was eine Ursache für die geringere Ausbeute darstellen kann.

3.1.3 Einfluss der modifizierten Cysteine auf 25

Die Punktmutanten der DENV2 NS2B/NS3-Protease T118C, T120C, T122C, A164C und A166C wurden von [REDACTED] kloniert, exprimiert und aufgereinigt. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst mit den synthetisierten Maleimiden **32** und **31** getestet, ob eine Bindung der Benzothiazol-Struktur an diesen Bereich des Enzyms zu einer verringerten Aktivität führt. Bei Vergleich der Aktivität des Enzyms mit und ohne Maleimide waren zuvor Inkubationszeiten der Enzyme mit **31** von 10 und 60 Minuten untersucht worden. Dabei konnten keine Unterschiede beobachtet werden, weshalb alle nachfolgenden Experimente mit einer Inkubationszeit von 10 Minuten durchgeführt wurden (**Abbildung 29**).

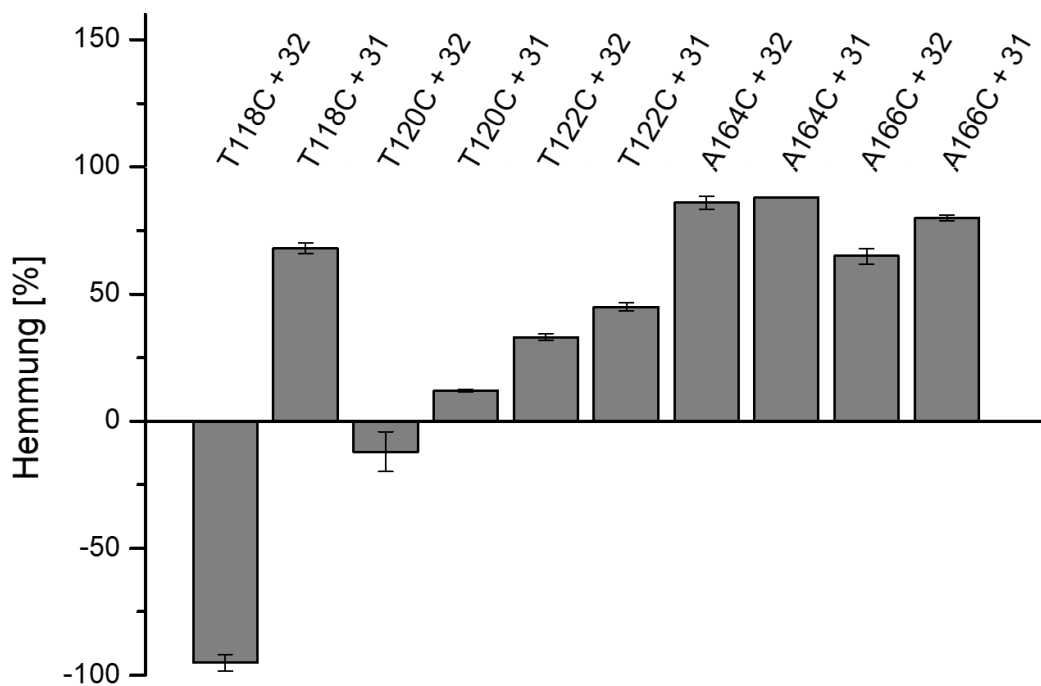


Abbildung 29: Prozentuale Hemmung von verschiedenen Cysteinmutanten der DENV2 NS2B/NS3-Protease durch **32** und **31**. Die Beschriftungen der Balken geben die Kombination aus Mutante und Maleimid an. Die Konzentration der Maleimide betrug $20 \mu\text{M}$, die Enzyme wurden mit den Maleimiden für zehn Minuten inkubiert. Aufgetragen ist die Hemmung, berechnet als Verhältnis der Aktivität mit Maleimid und DMSO als Kontrolle. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen, welche jeweils als doppelte Bestimmung durchgeführt wurden.

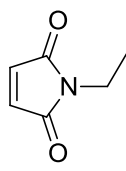
Bei den Threonin-Resten wurde im Fall von T118C eine Hemmung durch **31**, jedoch eine Steigerung der Enzymaktivität um 95% durch **32** beobachtet. Die Aktivität von T120C wurde durch beide Maleimide nur wenig beeinflusst, wohingegen T122C durch beide gehemmt wurde. Die Hemmung der Protease durch **31** wurde bei allen Threonin-Mutanten beobachtet, am deutlichsten jedoch bei T118C, welche durch **32** eine Aktivierung erfährt. Die Aktivierung kann dadurch erfolgen, dass das Einbringen der negativ geladenen Carboxylgruppe an dieser Stelle nicht dazu führt, dass eine Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung der offenen, inaktiven Form stattfindet, sondern stattdessen die geschlossene Form stabilisiert wird. Eine mögliche Erklärung der Unterschiede der Threonin-Mutanten liegt in deren Position: durch andere Abstände der Cystein-Resten zu der Bindestelle des Benzothiazols kann eine Inhibition entsprechend erfolgen oder nicht.

Im Falle der beiden Mutanten A164C und A166C, welche tiefer in der Tasche liegen, wurde jeweils durch die Maleimide eine Inhibition von über 60% beobachtet. Im Falle von A164C und A166C, welche tiefer in der Tasche liegen, kann eine Inhibition auch durch das Einbringen

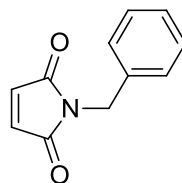
der Maleimide selbst erfolgen. Möglich wäre sowohl eine Veränderung der Struktur an dieser Stelle, aber auch eine Bindung, die zu einer Inhibition führt.

Durch die Hemmung der Mutanten durch **31** wurde gezeigt, dass eine Hemmung der enzymatischen Aktivität durch das Einbringen der 6-Nitrobenzo[*d*]thiazol-Struktur an dieser Stelle des Enzyms erfolgen kann. Da in den Konstrukten jedoch nur jeweils ein Cystein vorhanden ist, wurde in diesem Versuch die Modifikation gezielt an dieser Stelle eingebracht. Somit erlaubt es noch keine Aussage darüber, ob **25** auch an diese Stelle bindet. Um dies zu überprüfen wurde im Folgenden untersucht, ob eine sterische Modifikation der Cysteine durch **33** und **34** zu einer verminderten Bindung von **25** führt. Dazu wurde im ersten Schritt untersucht, ob die Enzyme bereits durch die Maleimide selbst gehemmt werden.

Zu diesem Zweck wurde die Enzymaktivität der Mutanten mit den Maleimiden im Vergleich zu DMSO gemessen (**Abbildung 30**).



33



34

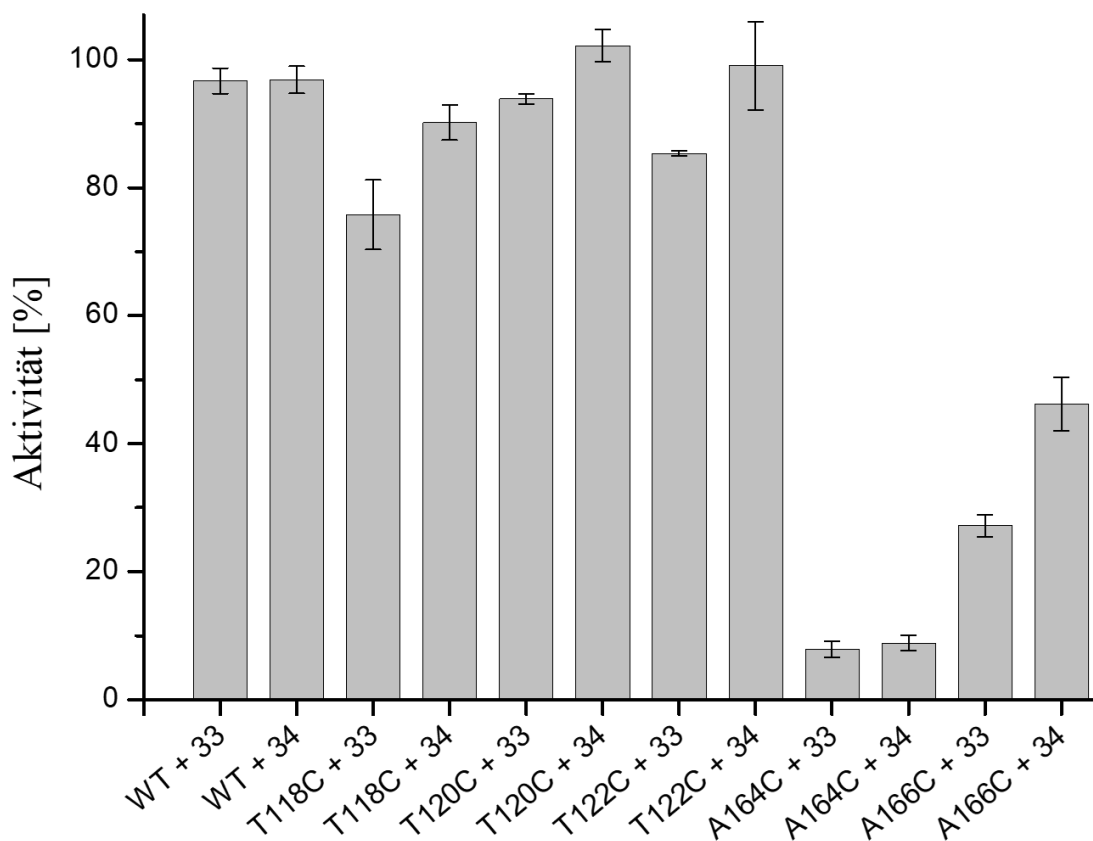


Abbildung 30: Aktivität der DENV2 NS2B/NS3-Protease und verschiedener Cystein-Mutanten unter dem Einfluss von Maleimiden bei 20 μ M. Die Enzyme wurden mit den Maleimiden für zehn Minuten inkubiert und anschließend die Enzymaktivität gemessen. Die prozentualen Aktivitäten stellen das Verhältnis zu der Kontrolle mit DMSO dar. Als Fehler sind die Standardabweichung aus drei unterschiedlichen Messungen aufgetragen, welche jeweils als Doppelbestimmung durchgeführt wurden.

Zur Kontrolle wurde ebenfalls der Wildtyp (WT) mit den Maleimiden vermessen, um eine Interaktion, die nicht auf eine Bindung an die Cysteine zurückzuführen ist, auszuschließen. Mit beiden Maleimiden wurde keine Hemmung der Enzymaktivität des WT beobachtet, bei den Threonin-Mutanten wurde bei einigen Kombinationen lediglich eine leichte Inhibition festgestellt, nur bei **33** und der Mutante T118C kam es zu einer Aktivitätshemmung um mehr als 20%. Im Fall von A164C wurde die Aktivität durch die Maleimide fast vollständig inhibiert, bei A166C kam es ebenfalls zu einer deutlichen Hemmung.

Um Erklärungen für den Einfluss der kovalenten Bindung der Maleimide an die verschiedenen Cystein-Mutanten zu finden, wurden die Bindepasen durch ein kovalentes Docking untersucht. Dafür wurden zunächst ausgehend von der offenen Konformation der Protease (PDB-ID: 2FOM^[53]) die Mutationen T118C, T120C, T122C, A164C und A166C mit Hilfe der Software *Molecular Operating Environment* (MOE)^[95] eingeführt, um anschließend das kovalente Docking mit den Maleimiden an den verschiedenen Mutanten durchzuführen. Dabei wurde als kovalenter Teil des Dockings eine 1,4-Addition des Thiols an eine α,β -ungesättigte Carbonylverbindung vorgegeben.

Während **32** eine Aktivierung der Cystein-Mutante T118C zeigte, war bei **31** eine Hemmung zu beobachten (**Abbildung 29**). In den vorhergesagten Bindepasen beider Moleküle wurden deutliche Unterschiede beobachtet (**Abbildung 31**).

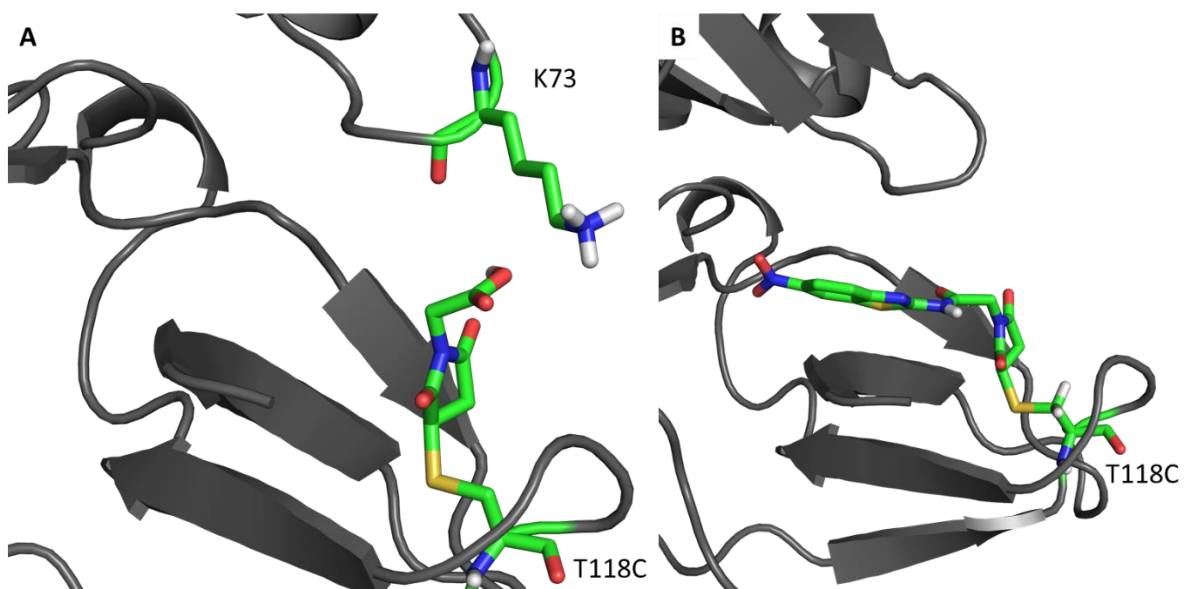


Abbildung 31: Vorhergesagte Bindepasen des kovalenten Docking von **32** (A) und **31** (B) an der Cystein-Mutante T118C. Das Enzym ist als Cartoon in schwarz dargestellt. Die Maleimide und ausgewählte Aminosäuren sind in Stabform dargestellt, mit Farbkodierung nach Elementen: Kohlenstoff: grün, Sauerstoff: rot, Stickstoff: blau, Wasserstoff: weiß, Schwefel: gelb. Die Abbildung wurde erstellt mit PyMOL.^[38]

32 bleibt dabei am Rand der Bindetasche, die Carboxylgruppe zeigt in Richtung K73. Auf der anderen Seite ragt das Benzo[*d*]thiazol von **31** tief in die Bindetasche hinein, was zu einer Inhibition führen kann. Für **32** kann vermutet werden, dass Interaktionen mit den Resten anderer Aminosäuren, wie K73, zu einer Konformationsänderung und damit einer Aktivierung der Protease führen können. Zudem wurde in verschiedenen Kristallstrukturen eine Flexibilität des Bereiches um T120 beobachtet (vgl. 1.4.2, **Abbildung 10**), was ebenfalls für diese Hypothese spricht.

Durch **33** und **34** wurden nur die Cystein-Mutanten A164C und A166C stark inhibiert, auch in diesem Fall wurden in den Dockingstudien deutliche Unterschiede in der Positionierung sichtbar (**Abbildung 32**).

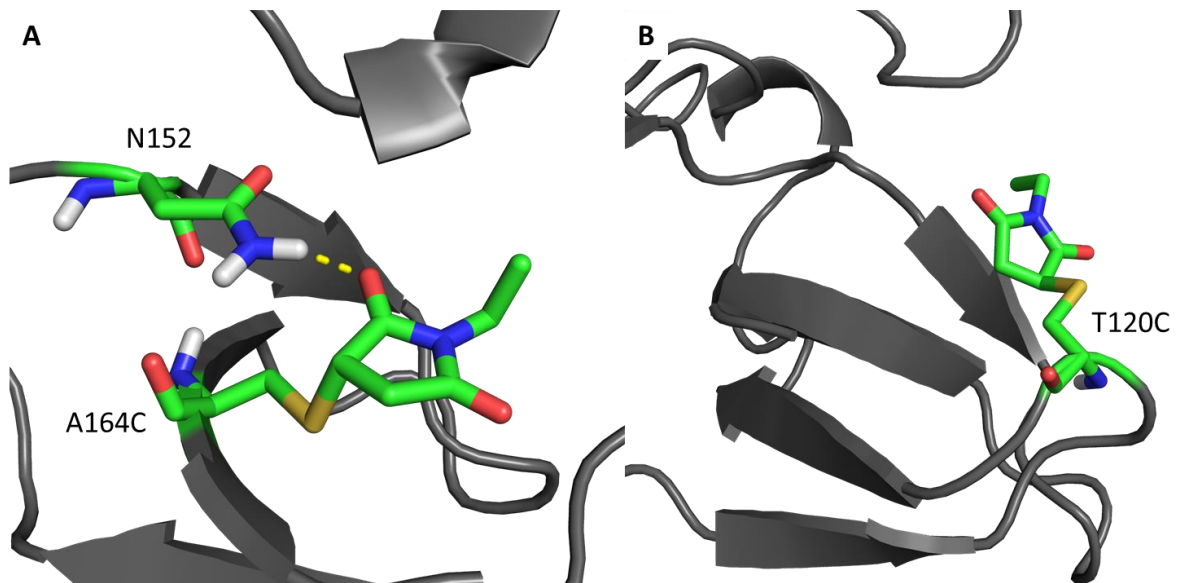


Abbildung 32: Vorhergesagte Bindeposen des kovalenten Docking von **33** an den Cystein-Mutanten A164C (A) und T120C (B). Das Enzym ist als Cartoon in schwarz dargestellt. Die Maleimide und ausgewählte Aminosäuren sind in Stabform dargestellt, mit Farbkodierung nach Elementen: Kohlenstoff: grün, Sauerstoff: rot, Stickstoff: blau, Wasserstoff: weiß, Schwefel: gelb. Die Abbildung wurde erstellt mit PyMOL.^[38]

In der vorhergesagten Bindepose geht **33** bei Bindung an die Cystein-Mutante A164C eine Wasserstoffbrückenbindung mit N152 ein. Eine Inhibition der Protease durch Bindung an N152 ist Bestandteil von Hypothesen zum Wirkmechanismus allosterischer Inhibitoren und würde auch in diesem Fall die Hemmung der Cystein-Mutanten A164C und A166C erklären, da diese in der Nähe von N152 lokalisiert sind (vgl. 1.4.2). An der Cystein-Mutante T120C dagegen ist **33** am Rand der Tasche platziert, wodurch es diese zwar verkleinert, aber nicht selbst zu einer Inhibition führt.

Der vorher aufgestellten Hypothese, dass durch die tiefere Lage der Alanin-Reste in der Tasche bereits die Bindung der Maleimide zu dem inhibierenden Effekt führt, stand gegenüber, dass auch eine Änderung der Struktur des Enzyms erfolgen kann. Um dies zu überprüfen wurde von [REDACTED] die Struktur der Enzyme mittels Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie untersucht, wobei keine Änderung in der Zusammensetzung der Proteinsekundärstrukturen im Vergleich der Cystein-Mutanten A164C und A166C mit und ohne **33** und **34** beobachtet wurde. Entsprechend führt eine Bindung der Maleimide an dieser

Stelle zu einer Hemmung, was ein Hinweis auf die Adressierbarkeit der allosterischen Tasche durch kleine Moleküle ist.

Um die Bindung von **25** an die Bindetaschen mit den modifizierten Cysteinen zu untersuchen, wurden IC_{50} -Werte mit allen Kombinationen aus Cystein-Mutante und **33** oder **34** bestimmt, welche bei der Überprüfung der Aktivität eine Hemmung von weniger als 20% aufwiesen. Zum Vergleich wurden die Bestimmungen ebenfalls mit dem Wildtyp in Kombination mit den Maleimiden, sowie den Cystein-Mutanten ohne Maleimide durchgeführt (**Abbildung 33**).

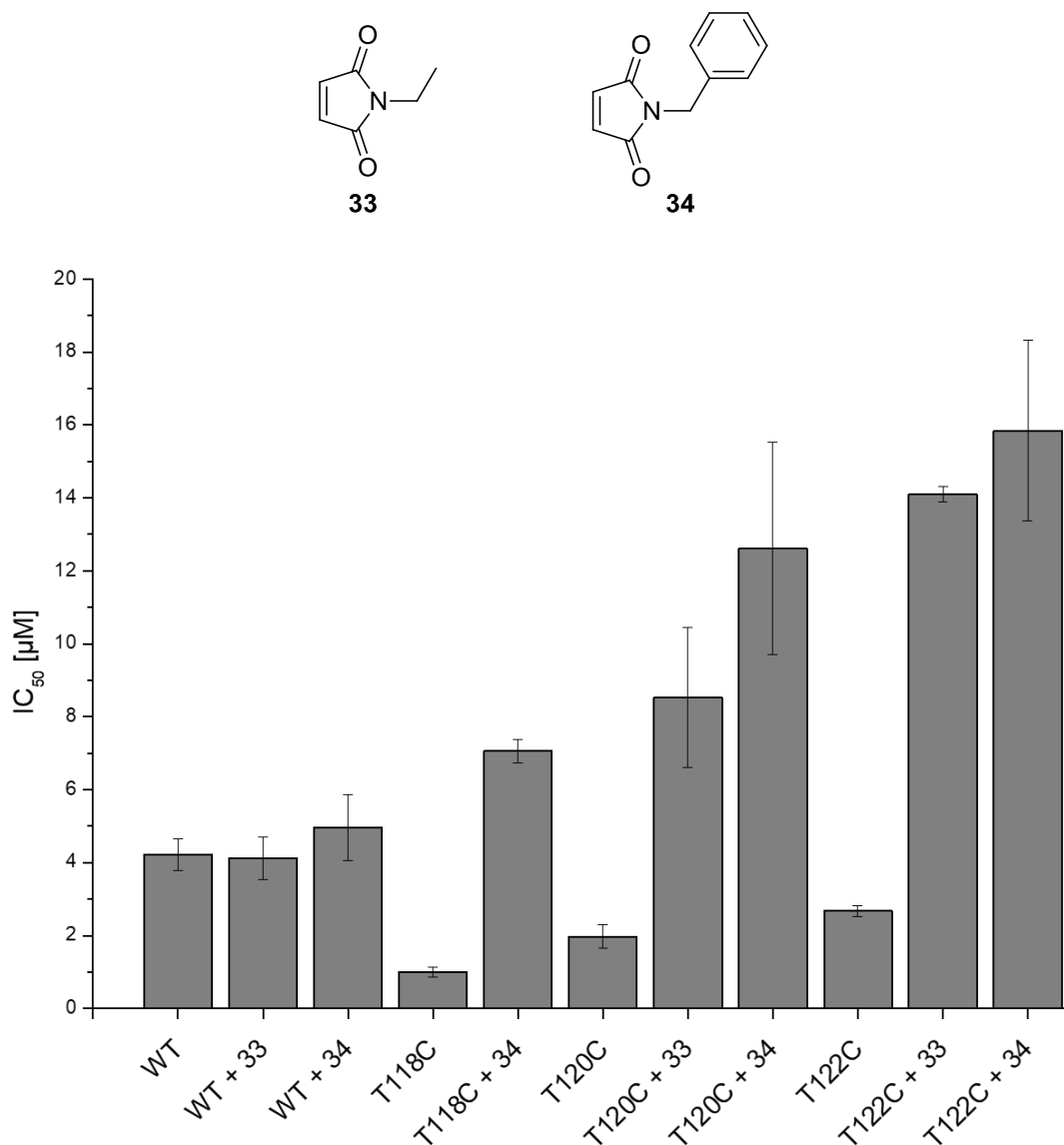


Abbildung 33: IC_{50} -Werte von **25** am Wildtyp und den verschiedenen Cystein-Mutanten, mit und ohne **33** und **34**. Die Enzyme wurden vor der Messung zehn Minuten lang mit den Maleimiden ($20 \mu M$) inkubiert. Als Fehler sind die Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen, welche jeweils als Doppelbestimmung durchgeführt wurden, aufgetragen.

Der IC_{50} von **25** am Wildtyp der DENV2 NS2B/NS3-Protease wurde durch die Maleimide nicht beeinflusst, was darauf schließen lässt, dass keine Interaktion von **25** mit überschüssigem Maleimid stattfindet. An den Cystein-Mutanten selbst wies **25** niedrigere IC_{50} -Werte im Vergleich zum Wildtyp auf. Eine mögliche Erklärung dafür ist die veränderte allosterische Tasche, im Gegensatz zu Threonin besitzt Cystein eine Methylengruppe weniger, aber dafür ein Thiol anstelle der Hydroxygruppe, womit andere Wechselwirkungen ausgebildet werden können, was sich in einer Änderung im IC_{50} widerspiegeln kann. Bei den Werten mit den Maleimiden wurden schließlich deutlich höhere Werte sichtbar, bis zu einem Faktor von sieben (T118C). Dies zeigt, dass die Modifikation der allosterischen Tasche durch die Maleimide **25** daran hindert, in diese Tasche zu binden. Die Maleimide führen dabei durch ihre Größe zu einer sterischen Hinderung. Im Vergleich liegen die Mittelwerte der IC_{50} -Werte an T120C und T122C mit **34** höher als mit **33**. Während **33** eine Ethylgruppe aufweist, bringt **34** eine deutlich größere und somit sterisch anspruchsvollere Benzylgruppe in die Tasche. Dies stellt eine mögliche Erklärung für den höheren Mittelwert der IC_{50} -Werte von **25** an den beiden Mutanten dar. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant hinsichtlich der Fehlerbereiche der Messungen der beiden Maleimide, die sich überlappen.

In Dockingstudien, welche zur Bindung von **25** an diese Tasche durchgeführt wurden, ließ sich eine Interaktion mit T120 vorhersagen. In den Experimenten wurde eine Erhöhung der IC_{50} -Werte beobachtet, jedoch nur um Faktoren im einstelligen Bereich. Wenn die Interaktion mit T120 einen großen Beitrag zu der Bindung liefert, kann argumentiert werden, dass eine größere Änderung sichtbar sein müsste. Jedoch wurde nur eines der drei nebeneinander liegenden Threonine verändert, wodurch eine alternative Interaktion mit einer der zwei anderen Hydroxylgruppen immer noch möglich ist. Zudem basierten diese Dockingstudien auf der geschlossenen Konformation, neuere Experimente postulierten dagegen eine Bindung von nicht-kompetitiven Inhibitoren an die offene Konformation.^[60,77]

25 wurde von XXXXXXXXXX ebenfalls an der ZIKV NS2B/NS3-Protease getestet, wobei ein IC_{50} von $1.41 \pm 0.16 \mu\text{M}$ erhalten wurde. Durch Bestimmung des IC_{50} -Wertes bei verschiedenen Substratkonzentrationen konnte zudem auch im Fall von ZIKV eine nicht-kompetitive Hemmung bestätigt werden, aufgrund der großen Ähnlichkeit der beiden Enzyme und der gleichen Hemmeigenschaften von **25** wurde daher die gleiche Bindestelle angenommen (**Abbildung 34**).

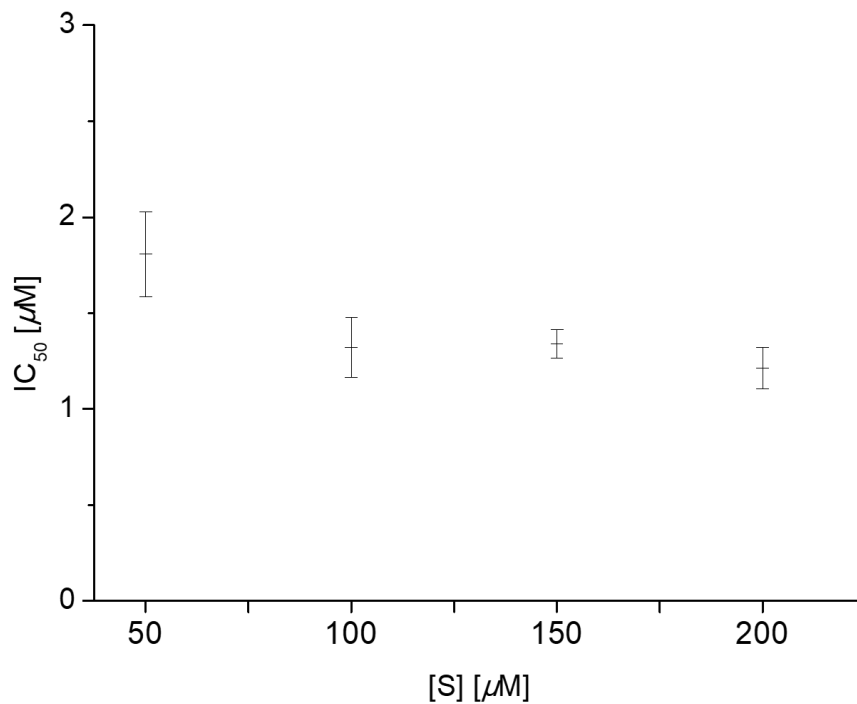


Abbildung 34: IC₅₀-Werte von **25** an der ZIKV-Protease, bestimmt bei verschiedenen Substratkonzentrationen. Die Werte stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Doppelbestimmungen dar, als Fehlerbalken sind die Standardabweichungen verwendet.

Mit diesen Experimenten konnte somit zum einen gezeigt werden, dass eine Bindung von kleinen Molekülen in diese Tasche zu einer Inhibition führt und dass die 6-Nitrobenzo[*d*]thiazol-Struktur ebenfalls inhibierend an dieser Stelle wirkt. Für **25** konnte zudem eine verringerte Hemmung nach der Modifikation der Cysteine mit Maleimiden gezeigt werden, was für eine Bindung von **25** an diese Stelle spricht. Dieses Ergebnis stellt eine verbesserte Grundlage für die weitere Entwicklung von Inhibitoren durch strukturbasiertes Design mit Hilfe von prospektive Dockingstudien dar.

3.2 Prolinderivate

3.2.1 Design neuer Prolin-basierter Inhibitoren

Als wesentliches Strukturmerkmal von bisherigen nicht-kompetitiven Inhibitoren der DENV- und ZIKV NS2B/NS3-Proteasen wurde die 5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazol-Struktur identifiziert,^[86] die bei dem Design von neuen Inhibitoren beibehalten werden sollte. Den Rest des Inhibitors stellten Diaryl(thio)ether dar, welche über eine Amidbindung mit dem Heterocyclus verknüpft worden waren. Die Diarylether wurden über ein Ullmann-Kondensation aufgebaut, die in vielen Fällen zu geringen Ausbeuten und Problemen mit manchen reaktiven Gruppen führte. Zudem zeigten diese Verbindungen eine geringe Löslichkeit in wässrigen Medien, womit Probleme bei biophysikalischen Experimenten, die zur Aufklärung des Bindemodus und der Dynamik der Konformationen der Protease bei Bindung von nicht-kompetitiven Inhibitoren von Bedeutung sind, wie zum Beispiel der Kristallisation, auftraten.

Aus diesen Gründen sollte der Diaryl(thio)ether ersetzt werden, wobei die räumliche Geometrie der Strukturen beibehalten werden sollte. Zudem wurden Syntheserouten angestrebt, welche Möglichkeiten zur einfachen Derivatisierung für die Erstellung von Struktur-Wirkungsbeziehungen bietet. Die *ortho*-substituierte Benzoesäure von **25** sollte dafür durch Prolin ersetzt werden, das eine ähnliche Geometrie aufweist und zudem weitere Möglichkeiten für Derivatisierungen anbietet. Zudem sollten ausgehend von Prolin die Strukturen anstelle der Thioether durch (Sulfon)amide weiter aufgebaut werden (**Abbildung 35**).

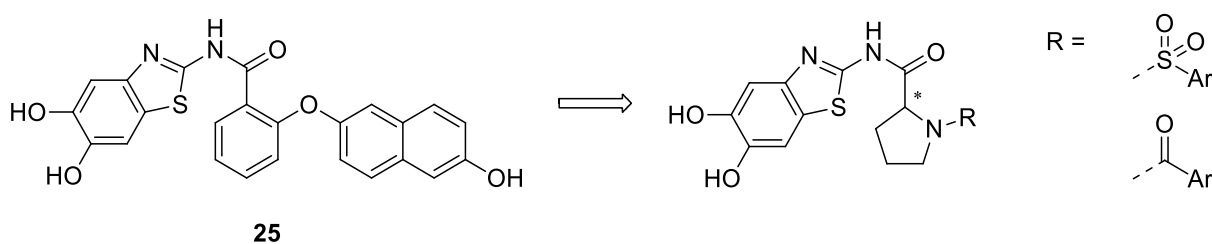


Abbildung 35: Design der auf Prolin basierenden Inhibitoren.

3.2.2 Synthese

Um die Derivate, bei welchen das Prolin mit einem Amid versehen wurde, stereoselektiv aufzubauen, sollte zuerst das 5,6-Dimethoxybenzo[*d*]thiazol **41** mit *N*-Boc geschütztem (*R*)- oder (*S*)-Prolin zu **42** verbunden, anschließend die Boc-Gruppe zu **43** abgespalten und das

Benzamid **44** ausgebildet werden. Zuletzt musste die Catecholgruppe von **45** durch Spaltung der Methoxygruppen freigesetzt werden (**Abbildung 36**).

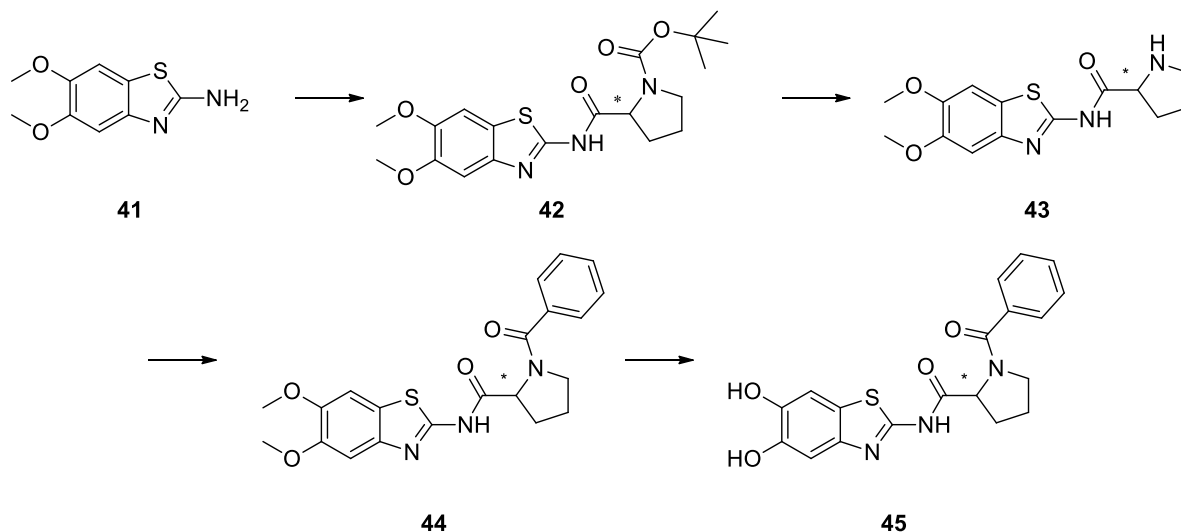
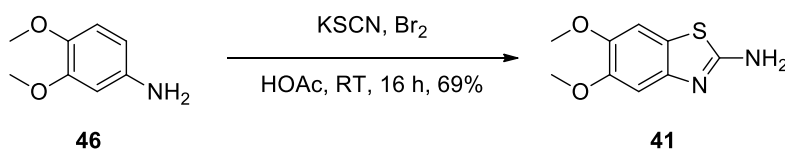


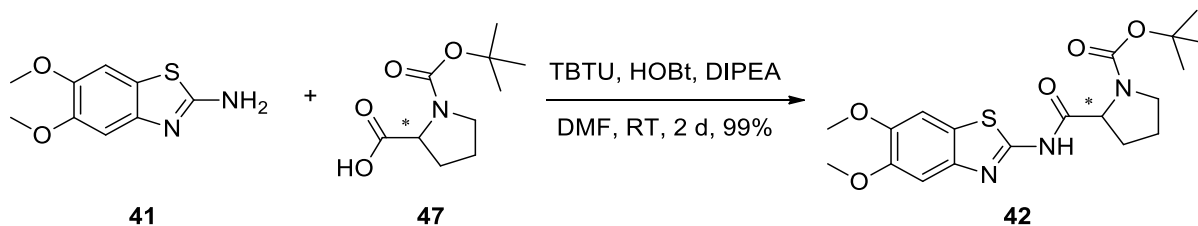
Abbildung 36: Synthesepfad zum Aufbau von **45** ausgehend von der Kupplung des Benzothiazols **41** mit *N*-Boc Prolin aus.

In der ersten Stufe wurde **41** aus 3,4-Dimethoxyanilin durch Umsetzung mit Dirhodan hergestellt, das *in situ* aus Kaliumthiocyanat und Brom gewonnen wurde (**Reaktionsgleichung 6**).



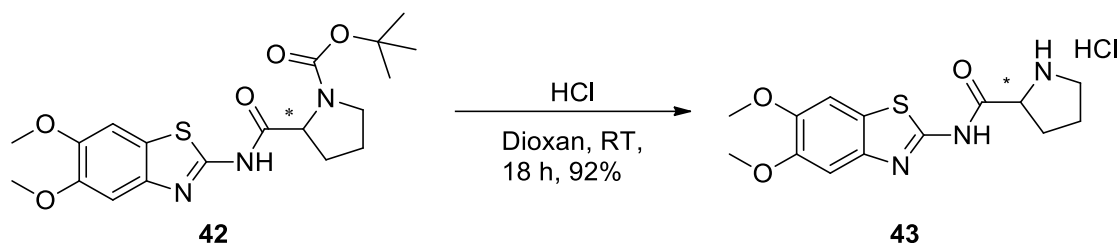
Reaktionsgleichung 6: Synthese von **41** aus **46** durch Kaliumthiocyanat und Brom.

Anschließend wurde die Kupplung mit Prolin durchgeführt, über den Einsatz von kommerziell erhältlichem (*R*)- oder (*S*)-*N*-Boc-Prolin konnte das Stereozentrum in die Struktur eingeführt werden. Um eine Racemisierung zu unterdrücken, wurde ein zusätzliches Äquivalent HOBt zur schnelleren Ausbildung des Aktivesters eingesetzt (**Reaktionsgleichung 7**).^[96]



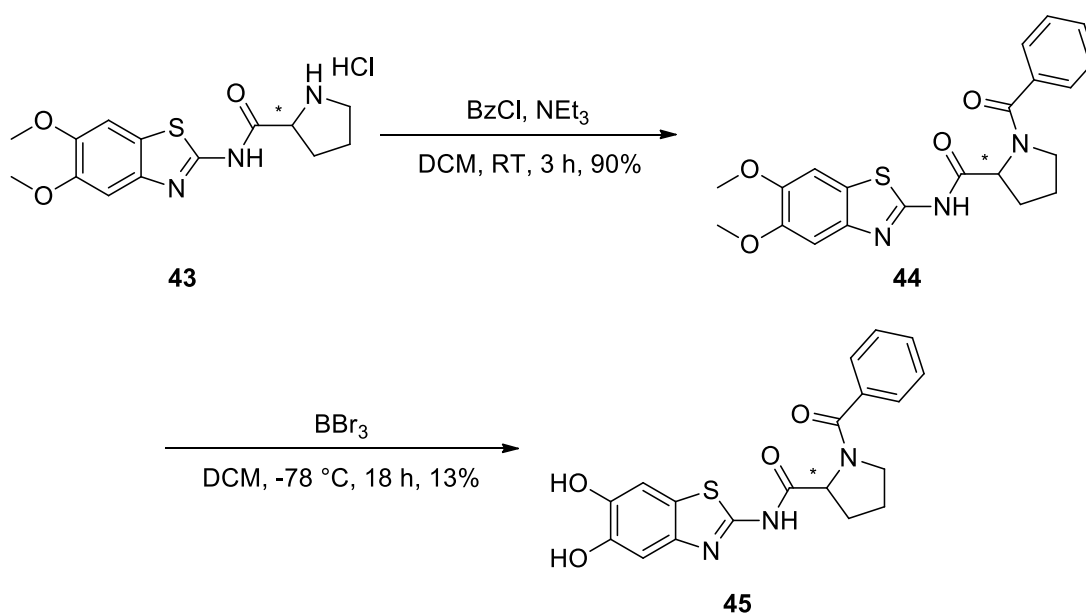
Reaktionsgleichung 7: Synthese von **42** durch eine TBTU-vermittelte Amidkupplung von **41** und **47**.

Anschließend wurde die Boc-Gruppe selektiv mit HCl abgespalten, wobei das Hydrochlorid von **43** erhalten wurde (**Reaktionsgleichung 8**).



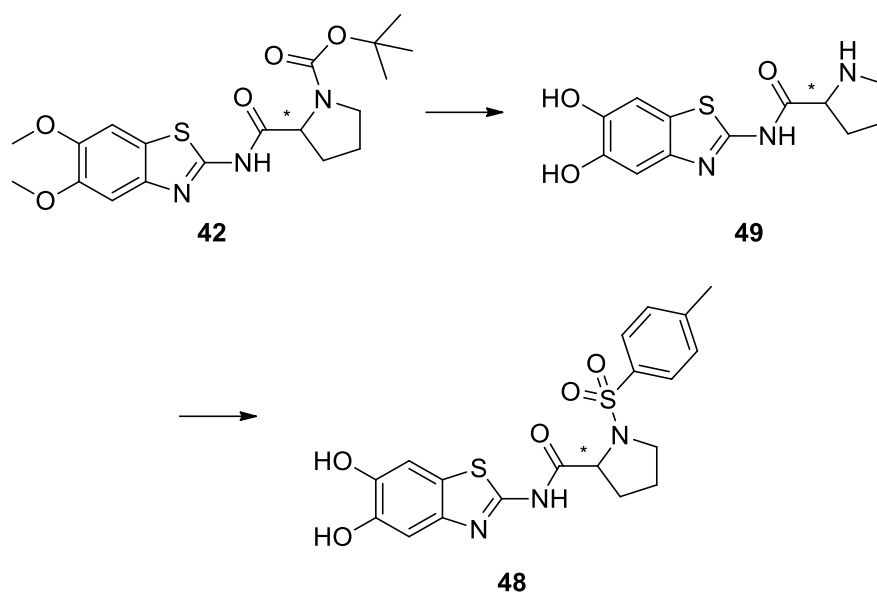
Reaktionsgleichung 8: Entschützung von **42** zu **43**.

Das nun freie sekundäre Amin von **43** wurde anschließend mit Benzoylchlorid zu dem Benzamid **44** umgesetzt und durch Entschützung der Hydroxygruppen mit BBr_3 wurde **45** erhalten (**Reaktionsgleichung 9**).



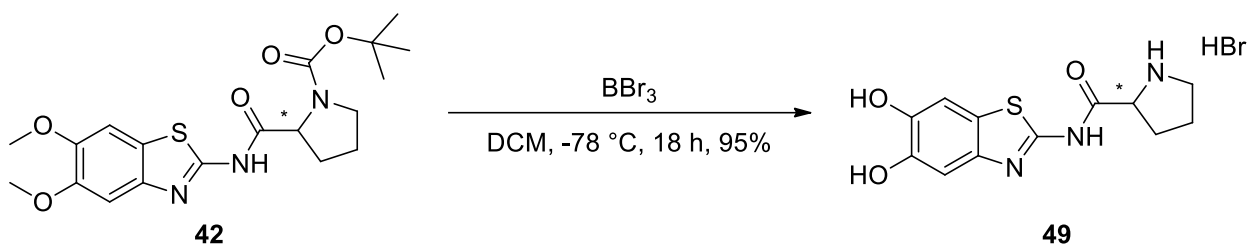
Reaktionsgleichung 9: Ausbildung des Benzamides **44** aus **43** durch Benzoylchlorid mit anschließender Entschützung zu **45**.

Im Falle der Sulfonamide wurde ein anderer Ansatz gewählt, da Sulfonylchloride eine Selektivität für Amine gegenüber Phenolen aufweisen. Letztere müssen für eine Reaktion durch stärkere Basen deprotoniert werden, um in Anwesenheit einesamins mit einem Sulfonylchlorid zu reagieren.^[97] So sollte **42** zunächst vollständig entschützt werden, um dann durch Reaktion mit einem Sulfonylchlorid das Zielmolekül zu erhalten (**Reaktionsgleichung 10**).



Reaktionsgleichung 10: Syntheschema zur Darstellung der Sulfonamide **48** aus dem vollständig entschlützten **49**.

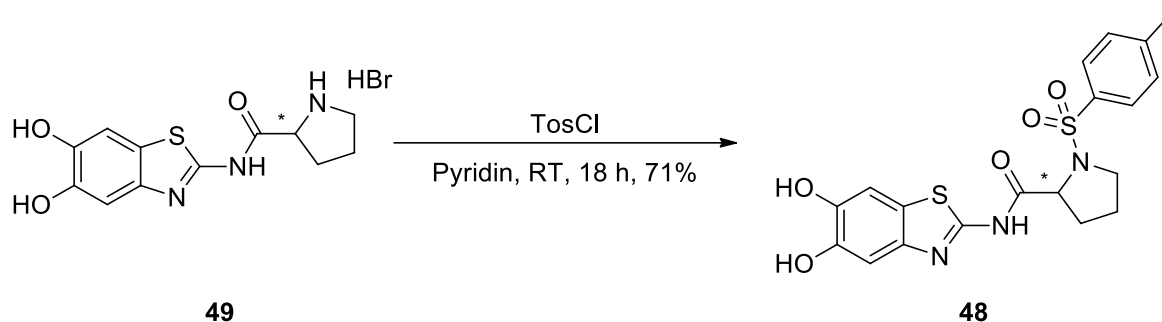
Im ersten Schritt wurden sowohl die Methoxygruppen als auch die Boc-Gruppe von **42** durch BBr_3 entschlützt, wobei das Hydrobromid von **49** erhalten werden konnte (**Reaktionsgleichung 11**).



Reaktionsgleichung 11: Entschlützung von **42** zu dem Hydrobromid von **49**.

Im Folgenden sollte **49** mit Tosylchlorid umgesetzt werden. Zu Beginn wurden Acetonitril als Lösemittel und Pyridin als Base gewählt. Dabei löste sich das Edukt **49** erst langsam während der Reaktion. Nach der Aufreinigung per Säulenchromatographie wurde eine Verunreinigung des Produkts entdeckt. Per Flüssigchromatographie mit angeschlossener Massenspektrometrie (LC-MS) konnte darauf geschlossen werden, dass eine zweifache Tosylierung von **49** erfolgt war, die zweite vermutlich an den Hydroxygruppen. Um der Entstehung des zweifach tosylierten Produktes entgegen zu wirken, wurde im nächsten Versuch Triethylamin als Base eingesetzt, wodurch das Hydrobromid von **49** schneller in Lösung ging, und anschließend das Tosylchlorid zugegeben. Durch Untersuchung der Reaktionslösung per LC-MS wurde jedoch

eine erhöhte Bildung des zweifach tosylierten Produktes festgestellt. Als Ursache dafür wurde die Basizität von Triethylamin ($pK_s = 11.01$) angenommen, welche höher liegt, als die von Pyridin ($pK_s = 5.25$), sodass es neben der erhöhten Löslichkeit des Hydrobromids auch zu einer Deprotonierung der Catecholgruppen kommen kann.^[98] Dadurch wird deren Nucleophilie erhöht und die Reaktion mit dem Sulfonylchlorid wird wahrscheinlicher. Schließlich wurde Pyridin als Lösemittel *und* als Base gewählt, in welchem sich das Hydrobromid direkt löste und weniger Nebenreaktionen auftraten (**Reaktionsgleichung 12**).

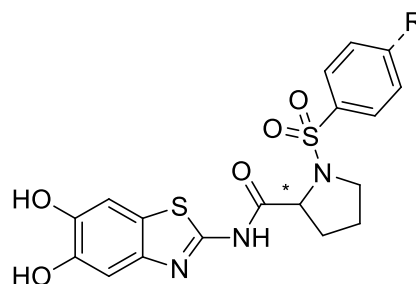


Reaktionsgleichung 12: Synthese des Tosylamids **48** mit Pyridin als Base und Lösemittel.

Neben dem Tosylrest wurden Derivate mit Nosyl- und 4-Fluorphenylsulfonylresten synthetisiert (**Tabelle 4**).

Tabelle 4: Übersicht über die synthetisierten Prolin-basierten Inhibitoren mit Sulfonamidstruktur.

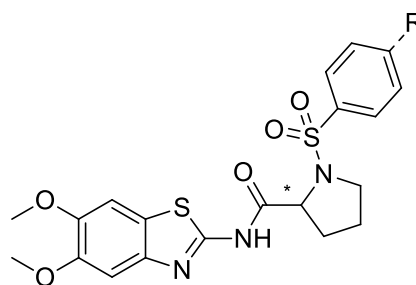
Molekül-Nr.	R	Stereochemie
<i>(R)</i> - 48	CH ₃	<i>R</i>
<i>(S)</i> - 48	CH ₃	<i>S</i>
<i>(R)</i> - 50	NO ₂	<i>R</i>
<i>(S)</i> - 50	NO ₂	<i>S</i>
<i>(R)</i> - 51	F	<i>R</i>



Die Ausbeuten der Synthesen lagen in der letzten Stufe zwischen 41 – 71%, als Grund dafür können die Hydroxygruppen genannt werden, welche ebenfalls eine Reaktion mit dem Tosylchlorid eingehen können. Unterstützt wird diese These dadurch, dass bei der Synthese der Derivate mit Methoxygruppen durch eine analoge Reaktion mit **43** als Edukt Ausbeuten über 80% erzielt wurden (**Tabelle 5**).

Tabelle 5: Übersicht über die synthetisierten Prolin-basierten Sulfonamide mit Methoxygruppen.

Molekül-Nr.	R	Stereochemie
(<i>R</i>)-52	CH ₃	<i>R</i>
(<i>S</i>)-52	CH ₃	<i>S</i>
(<i>R</i>)-53	NO ₂	<i>R</i>
(<i>S</i>)-53	NO ₂	<i>S</i>



Aufgrund von Abweichungen in den spezifischen Drehwerten von einigen Enantiomeren, wie (*R*)-53 ($[\alpha]_{589}^{25} = + 178$) und (*S*)-53 ($[\alpha]_{589}^{25} = - 158$) wurden exemplarisch die Enantiomerenverhältnisse (*enantiomeric ratio*, *er*) von (*R*)- und (*S*)-48 und (*R*)- und (*S*)-53 per HPLC mit einer chiralen Phase bestimmt (**Abbildung 37**).

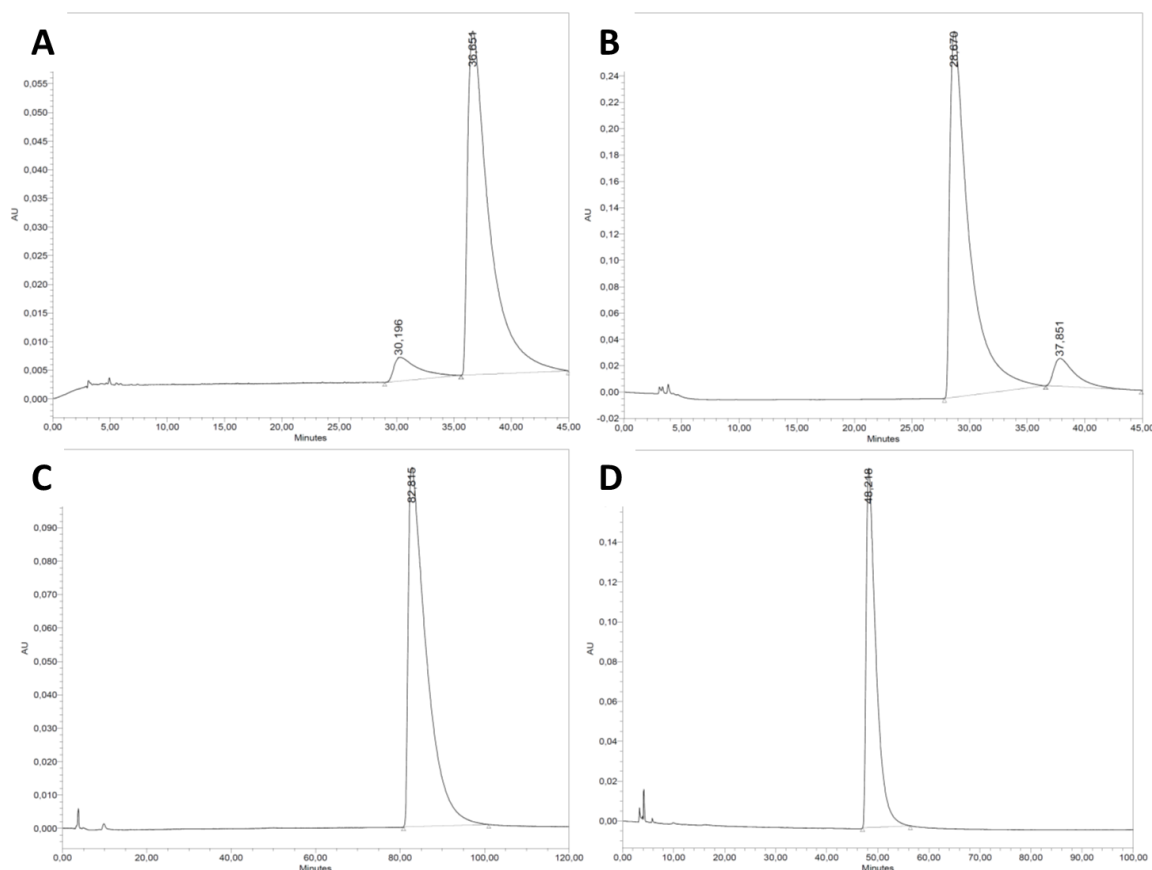


Abbildung 37: Trennung der Enantiomere (*R*)- und (*S*)-48 und (*R*)- und (*S*)-53 auf einer chiralen Phase. Die Detektion erfolgte bei 254 nm.

Während bei (*R*)- und (*S*)-**53** das jeweils andere Enantiomer in den Chromatogrammen nicht sichtbar war und somit ein *er* bei beiden Verbindungen von 100:0 bestimmt wurde, wurde bei (*R*)- und (*S*)-**48** jeweils 7% des anderen Enantiomers detektiert, wodurch ein *er* von 93:7 erhalten wurde. Die partielle Racemisierung der Verbindungen erfolgt danach eher in dem Schritt der Entschützung mit BBr₃ und nicht bei der Kupplung des Benzothiazols mit Boc-Prolin. Daher sind die Unterschiede in den spezifischen Drehwerten auf Fehler in der Bestimmung von derselben zurück zu führen, da beide Enantiomerenpaare die jeweils gleichen *er* aufwiesen. Auch das erneute Bestimmen der spezifischen Drehung von (*R*)- und (*S*)-**53** ergab keine Änderung der Werte, was auf einen Fehler des Gerätes selbst hindeutet.

3.2.2.1 Zusammenfassung der Synthese der Prolin-basierten Inhibitoren

Es wurden Synthesewege entwickelt, um sowohl die Inhibitoren mit einer Amid-, als auch die mit einer Sulfonamidstruktur am Stickstoff des Prolins synthetisch aufzubauen. Im Falle der Sulfonamide bietet sich zudem die Möglichkeit an, verschiedene Reste und Substitutionsmuster als Sulfonamide zu synthetisieren, da die Derivatisierung erst auf der letzten Stufe geschieht. Auf diese Art wurde eine Reihe von Molekülen von [REDACTED] im Rahmen ihrer Masterarbeit synthetisiert und getestet.^[99]

3.2.3 Untersuchung der Stabilität von (*R*)-**48**

Aufgrund der geringen Beständigkeit von Catecholen gegenüber oxidativen Bedingungen wurde beispielhaft die Stabilität von (*R*)-**48** untersucht.^[100] Dazu wurde (*R*)-**48** in Methanol (0.1 g/mL) gelöst und in verschiedenen Ansätzen mit 1 μ L der folgenden Reagenzien versetzt: Triethylamin, Pyridin, konz. HCl, 30% H₂O₂, gesättigte Na₂S₂O₃-Lösung. Anschließend wurden alle Lösungen zu Beginn und nach 3 h, 6 h und 24 h per LC-MS vermessen (**Abbildung 38**).

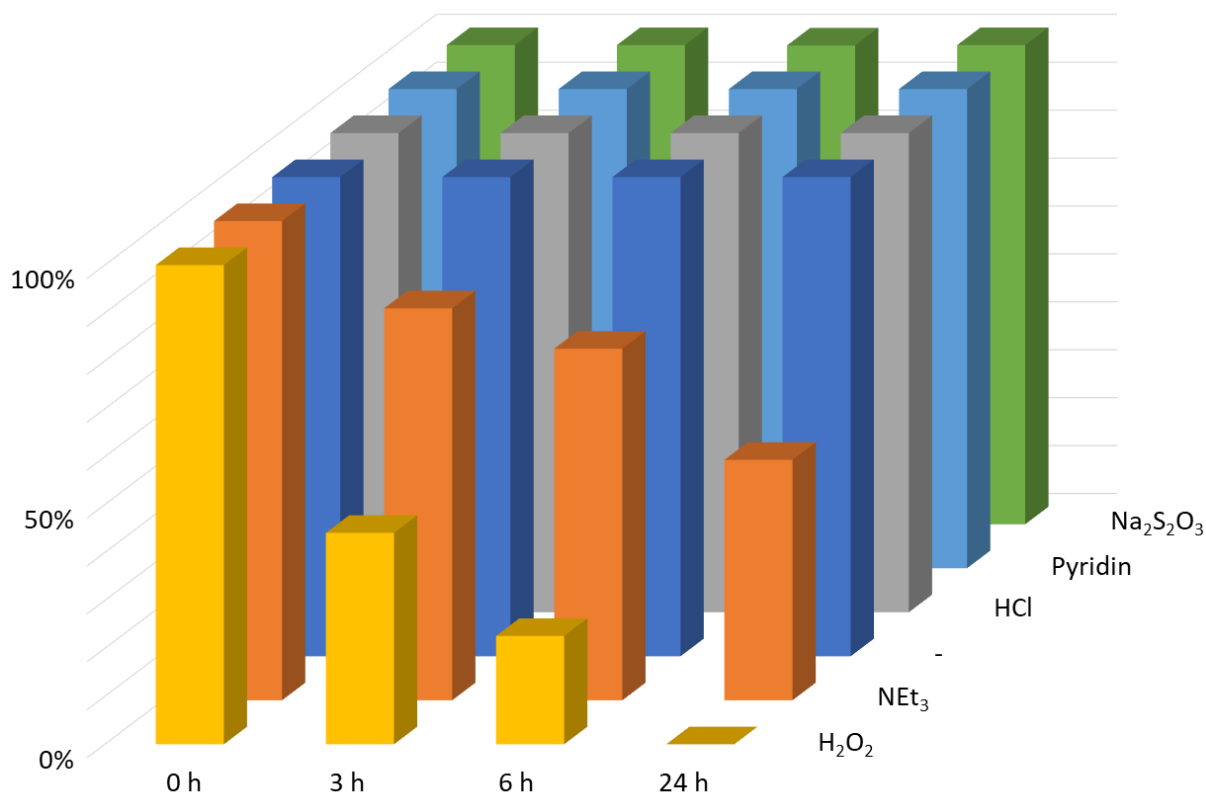


Abbildung 38: Untersuchung der Stabilität von (*R*)-**48** unter verschiedenen Bedingungen. (*R*)-**48** wurde in Methanol ohne oder mit den angegebenen Zusätzen gelöst und per LC-MS bei 254 nm vermessen. Aufgetragen wurden die Flächen der Signale von (*R*)-**48** im Verhältnis zu der Fläche bei 0 h.

Das Signal von (*R*)-**48** zeigte keine Abnahme in reinem Methanol, in Anwesenheit von Pyridin, HCl und Na₂S₂O₃. Bei Triethylamin wurde eine Abnahme auf 50% des ursprünglichen Signals nach 24 h beobachtet, unter dem Einfluss von H₂O₂ erfolgte eine komplette Zersetzung in dem gleichen Zeitraum. Bei beiden Experimenten wurde kein definiertes Zersetzungsprodukt gefunden, sondern eine Vielzahl verschiedener Signale.

Die Instabilität von (*R*)-**48** gegenüber H₂O₂ steht im Einklang mit der Anfälligkeit von Catecholen gegenüber Oxidation. Triethylamin als Base könnte das Catechol deprotonieren, wodurch sich die Elektronendichte im aromatischen System erhöhen und die Oxidationsanfälligkeit steigen kann. Pyridin dagegen ist eine schwächere Base, wodurch die Stabilität in diesem Fall zu erklären ist. Zusammengefasst ist (*R*)-**48** somit stabil gegenüber sauren, schwach basischen und reduktiven Bedingungen und instabil gegenüber starken basischen und oxidativen Bedingungen.

Da der in den Enzymassays verwendete Puffer ebenfalls basisch ist (pH = 9), wurde (*R*)-**48** bei einer Konzentration von 1.5 mM in dem Puffer mit 7.5% DMSO über verschiedene Zeiträume inkubiert und per LC-MS vermessen (**Abbildung 39**).

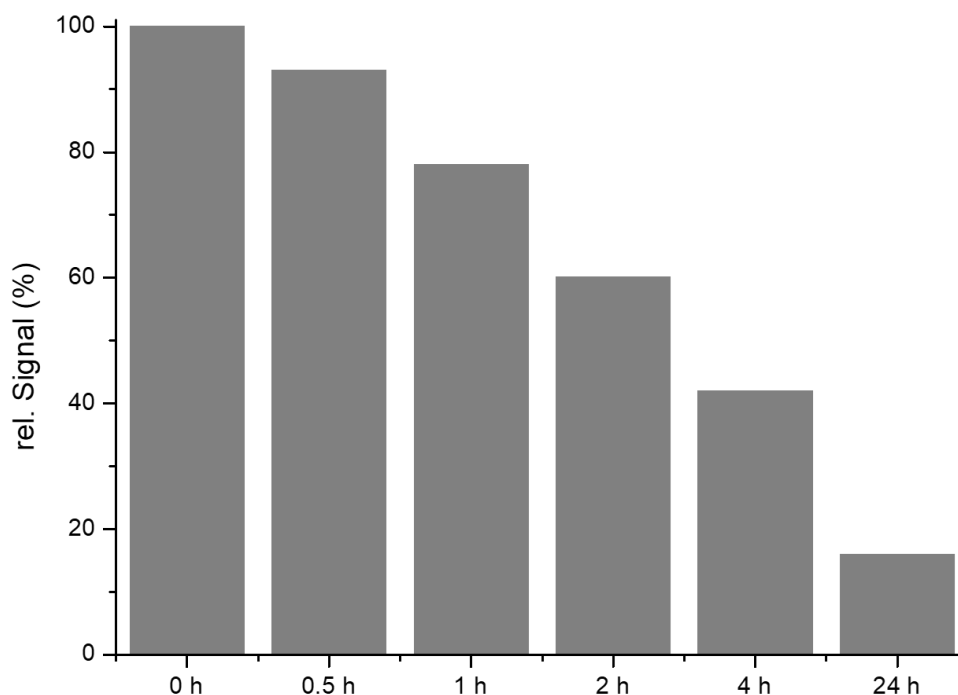


Abbildung 39: Stabilität von (*R*)-**48** in dem Puffer des Assays. Aufgetragen sind die Signale der LC-MS bei 254 nm (*R*)-**48** relativ zu dem Zeitpunkt 0 h.

Analog zu den Untersuchungen mit Triethylamin zeigt sich auch im Assay-Puffer eine Instabilität der Verbindung. Nach 24 h wurden nur noch 12% des Ursprungssignals detektiert. In dem für die Enzymassays relevanten Zeitraum von maximal 30 Minuten wurde jedoch nur eine geringe Abnahme (93%) beobachtet.

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Instabilität auf die Hemmung der ZIKV-Protease hat, wurde (*R*)-**48** im Assay an der isolierten Protease bei einer Konzentration von 20 μM eingesetzt, wobei der Inhibitor im Puffer vorher für 24 h inkubiert wurde (**Tabelle 6**).

Tabelle 6: Inhibition der ZIKV-Protease durch (*R*)-**48** (20 μM), nachdem der Inhibitor für 24 h in dem Assay-Puffer inkubiert wurde. Als Kontrolle wurde der Inhibitor parallel ohne Inkubation getestet.

Inkubationsdauer	Hemmung
0 h	100%
24 h	82%

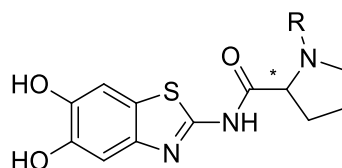
Nachdem (*R*)-**48** für 24 h in dem Assay-Puffer inkubiert worden war, wurde eine Inhibition von 82% erhalten. (*R*)-**48**, welches als Kontrolle nicht inkubiert wurde, wies dagegen eine Hemmung von 100% auf. Die Untersuchung der Stabilität im Puffer ergab nach 24 h noch einen Restanteil von 12% (*R*)-**48**. Umgerechnet auf den Assay-Ansatz, in welchem eine ursprüngliche

Konzentration von 20 μM eingesetzt wurde, entspricht dies 2.4 μM , was wenig oberhalb des IC_{50} -Wertes von (*R*)-**48** (1.32 μM , vgl. 3.2.4, **Tabelle 7**) liegt. Es ist daher möglich, dass einige der Zersetzungsprodukte ebenfalls die Protease inhibieren. Bei den Messungen der Stabilitäten wurde kein einheitliches Zersetzungsprodukt beobachtet, sondern ein Gemisch von mindestens 17 Verbindungen. Aufgrund der Catecholstruktur kann vermutet werden, dass auch (Semi-)Chinone entstehen, welche ebenfalls eine inhibitorische Wirkung zeigen könnten.

3.2.4 Testung der synthetisierten Prolin-basierten Inhibitoren

Zu Beginn sollte der Frage, ob es einen signifikanten Unterschied in der Inhibition zwischen den Verbindungen mit Amid- oder Sulfonamidsubstitution am Stickstoff des Prolins gibt, nachgegangen werden, indem die Verbindungen (*R*)-**45**, (*S*)-**45**, (*R*)-**48** und (*S*)-**48** in enzymatischen Assays getestet wurden (**Tabelle 7**).

Tabelle 7: Ergebnisse der Testung von (*R*)-**45**, (*S*)-**45**, (*R*)-**48** und (*S*)-**48** an der ZIKV- und DENV2 NS2B/NS3-Protease in enzymatischen Assays.



Molekül-Nr.	R	Stereochemie	ZIKV ^a	DENV2 ^a
			IC_{50} [μM]/%	IC_{50} [μM]/%
(<i>R</i>)- 45		<i>R</i>	0.94 ± 0.22	33%
(<i>S</i>)- 45		<i>S</i>	1.55 ± 0.18	38%
(<i>R</i>)- 48		<i>R</i>	1.32 ± 0.10	19.7 ± 1.5
(<i>S</i>)- 48		<i>S</i>	2.32 ± 0.19	25.2 ± 3.0

^aAngegeben ist die prozentuale Inhibition bei einer Konzentration des Inhibitors von 20 μM oder der IC_{50} -Wert. Die Mittelwerte und Fehler stammen aus jeweils drei unterschiedlichen Messungen, jeweils als Doppelbestimmung durchgeführt.

Die IC_{50} -Werte an der ZIKV NS2B/NS3-Protease liegen bei allen Molekülen im niedrigen mikromolaren Bereich, jedoch existieren keine großen Unterschiede zwischen den Amiden und Sulfonamiden und auch die Stereochemie scheint an dieser Stelle keinen großen Einfluss zu haben. Im Vergleich dazu liegen die an der DENV2 NS2B/NS3-Protease gemessenen Werte um eine Größenordnung höher. Während (*R*)- und (*S*)-**48** IC_{50} -Werte um die $20 \mu\text{M}$ aufweisen, liegt die Hemmung von (*R*)- und (*S*)-**45** bei $20 \mu\text{M}$ nur bei 33% bzw. 38%. Somit können beide Strukturen, sowohl Amide, als auch Sulfonamide, als Ausgangspunkte für das weitere Design von Inhibitoren verwendet werden. Um die Bindung von **48** an die Protease durch eine weitere Methode zu bestätigen, wurden beide Enantiomere von [REDACTED] mittels *Microscale Thermophoresis* (MST) untersucht, wobei K_D -Werte von $0.49 \mu\text{M}$ ((*R*)-**48**) bzw. $0.24 \mu\text{M}$ ((*S*)-**48**) erhalten wurden. Diese liegen somit etwas unter den IC_{50} -Werten von $1.32 \mu\text{M}$ ((*R*)-**48**), bzw. $2.32 \mu\text{M}$ ((*S*)-**48**) und geben einen Hinweis darauf, dass die reine Bindung an die Protease nicht im gleichen Ausmaß zu Hemmung der Protease führt.

Für (*R*)-**48** wurden zudem die IC_{50} -Werte bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt, wobei diese keine signifikanten Unterschiede zeigten, was auf eine nicht-kompetitive Hemmung hindeutet (**Abbildung 40**).

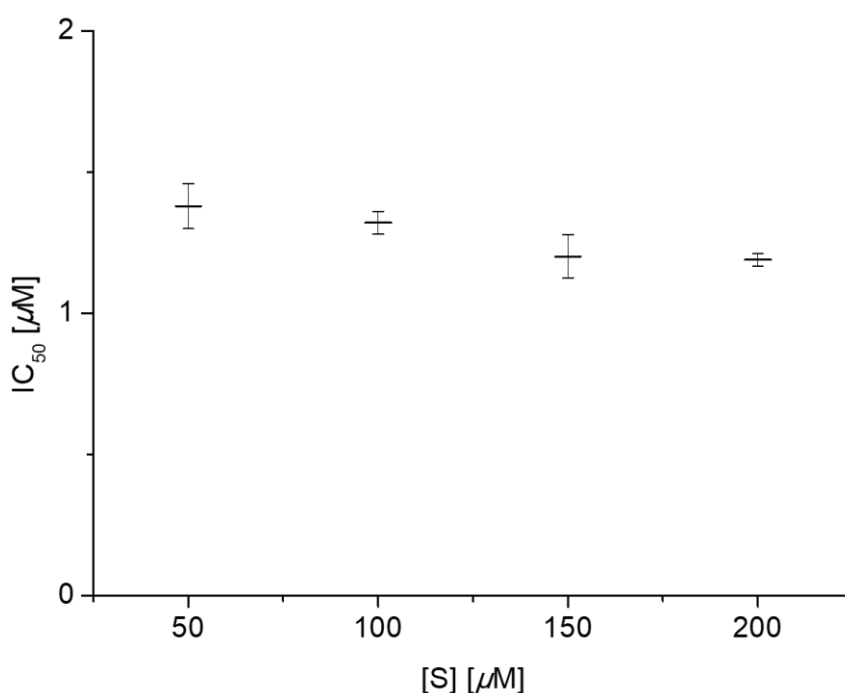
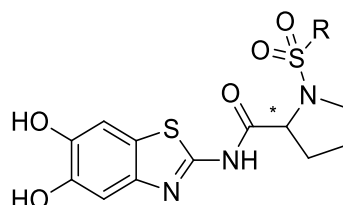


Abbildung 40: IC_{50} -Werte von (*R*)-**48**, bestimmt bei verschiedenen Substratkonzentrationen. Die Werte stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Doppelbestimmungen dar.

Im Folgenden wurde durch die einfache Möglichkeit der Derivatisierung auf der letzten Synthesestufe eine Reihe von verschiedenen Sulfonamiden untersucht (**Tabelle 8**).

Tabelle 8: Ergebnisse der Testung verschiedener Inhibitoren mit Sulfonamidstruktur an der ZIKV und DENV2 NS2B/NS3-Protease.



Molekül-Nr.	R	Stereochemie	ZIKV ^a IC ₅₀ [μM]/%	DENV2 ^a IC ₅₀ [μM]/%
(<i>R</i>)-54 ^b		<i>R</i>	1.86 ± 0.49	21%
(<i>S</i>)-54 ^b		<i>S</i>	1.43 ± 0.29	27%
(<i>R</i>)-51		<i>R</i>	1.03 ± 0.17	17%
(<i>R</i>)-55 ^b		<i>R</i>	1.40 ± 0.25	34%
(<i>S</i>)-55 ^b		<i>S</i>	0.93 ± 0.06	39%
(<i>R</i>)-56 ^b		<i>R</i>	0.86 ± 0.15	28%
(<i>S</i>)-56 ^b		<i>S</i>	1.32 ± 0.21	36%
(<i>R</i>)-50		<i>R</i>	0.32 ± 0.05	10.00 ± 0.98
(<i>S</i>)-50		<i>S</i>	0.93 ± 0.04	8.58 ± 1.37
(<i>R</i>)-57 ^b		<i>R</i>	1.11 ± 0.23	33%
(<i>S</i>)-57 ^b		<i>S</i>	0.78 ± 0.52	25%
(<i>R</i>)-58 ^b		<i>R</i>	2.47 ± 0.29	10.9 ± 2.3
(<i>S</i>)-58 ^b		<i>S</i>	3.17 ± 1.58	13.5 ± 1.6
(<i>R</i>)-59 ^b		<i>R</i>	1.35 ± 0.28	18%
(<i>S</i>)-59 ^b		<i>S</i>	2.95 ± 0.45	29%

^aAngegeben ist die prozentuale Inhibition bei einer Konzentration des Inhibitors von 20 μM oder der IC_{50} -Wert. Die Mittelwerte und Fehler stammen aus jeweils drei unterschiedlichen Messungen, jeweils als Doppelbestimmung durchgeführt. ^bInhibitor wurde synthetisiert und getestet von [REDACTED].^[99]

Die Testung der Inhibitoren mit Methoxygruppen **52** und **53** ergab keine Hemmung bei 20 μM an beiden Proteasen, was zeigt, dass die Hydroxygruppen wie erwartet das maßgebliche Element für die Inhibition sind. Es zeigen sich sehr geringe Unterschiede zwischen den Enantiomeren der Inhibitoren, beispielsweise bei **50**. Es ist jedoch kein klarer Trend hinsichtlich einer Konfiguration zu erkennen.

Die IC_{50} -Werte der Inhibitoren an der ZIKV NS2B/NS3-Protease liegen fast alle im niedrigen mikromolaren Bereich, jedoch sind einige Unterschiede zwischen den verschiedenen Aromaten erkennbar. Von den Substituenten in der *para*-Stellung hebt sich **50** mit einer Nitrogruppe deutlich ab. Diese weist eine höhere Polarität auf und es werden Werte im submikromolaren Bereich (ZIKV: *R*: 0.32 μM , *S*: 0.93 μM) erreicht. Im Gegensatz dazu liegen die Werte von **58** (ZIKV: *R*: 2.47 μM , *S*: 3.17 μM), welches eine Biphenylgerüst aufweist, höher. Die Änderung der Nitrogruppe von der *para*- in die *meta*-Position führt zu einem etwas höheren Wert für das *R*-Enantiomer von **57** (ZIKV: *para*: 0.32 μM , *meta*: 1.11 μM).

Wie auch die Grundstruktur **48** weisen alle Inhibitoren eine Selektivität gegenüber der ZIKV-Protease im Vergleich zur DENV2-Protease auf, in den meisten Fällen liegen die beiden Werte circa eine Größenordnung auseinander. Die einzige Ausnahme hiervon bilden die Biphenylderivate **58** (ZIKV: *R*: 2.47 μM , *S*: 3.17 μM ; DENV2: *R*: 10.9 μM , *S*: 13.5 μM), bei denen die Werte für DENV2 nur um circa den Faktor 4 höher liegen im Vergleich zu ZIKV.

Um den Bindemodus vorherzusagen wurden Dockingstudien von [REDACTED] durchgeführt. Die Kristallstruktur der offenen Konformation der ZIKV NS2B/NS3-Protease (PDB-ID 5GXJ) zeigt einen großen Unterschied in der Struktur der allosterischen Tasche im Vergleich zu DENV2 (PDB-ID 2FOM, 6MO0).^[53,62] Die offene Konformation der ZIKV-Protease liegt als Dimer im Kristallgitter vor, wobei die Reste 1088 – 1092 direkt in Richtung N1152 zeigen, was die Struktur der allosterischen Tasche beeinflussen kann. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie der beiden Proteasen und der hohen Ähnlichkeit der geschlossenen Konformationen mit kompetitivem Inhibitor (C_{α} RMSD = 0.61 PDB-ID ZIKV: 5LC0, DENV: 3U1I) wurde eine zu DENV ähnliche Struktur der ZIKV-Protease postuliert.^[54,59] Daher werden

unter den Ergebnissen des Dockings die Posen, die mit der offenen Konformation von DENV2 (PDB-ID 2FOM) erhalten wurden, diskutiert. Die kürzlich postulierten Strukturen mit allosterischen Inhibitoren (PDB-ID 6MO0, 6MO1, 6MO2) stehen, wie bereits beschrieben (vgl. 1.4.2), unter intensiver wissenschaftlicher Diskussion und wurden daher nicht verwendet.^[60]

In der Dockingstudie wurde eine sehr stabile Positionierung der 5,6-Dihydroxybenz[*d*]thiazol-Einheit beobachtet, was im Einklang mit deren Bedeutung für die experimentell ermittelte Hemmung steht. An der Positionierung der beiden Enantiomere (*R*)- und (*S*)-**48** wurde deutlich, warum das Stereozentrum keinen großen Einfluss auf die Inhibition hat. Die Positionierung des Benzo[*d*]thiazols von beiden Enantiomeren war ähnlich, Unterschiede wurden bei dem Prolin-Rest deutlich, von welchem aus der Tosylrest durch das Stereozentrum entgegengesetzt positioniert wurde. In diesem Bereich wurden keine spezifischen Interaktionen vorhergesagt (**Abbildung 41A**). Die Hypothese, dass für die Hemmung eine Bindung der Inhibitoren an N152 wichtig ist, da so die offene Konformation stabilisiert wird, ist ebenfalls im Einklang mit der Dockingstudie. Für (*R*)-**48** wurde eine Wasserstoffbrückenbindung zu der Amidgruppe der Seitenkette von N152 vorhergesagt (**Abbildung 41B**), was ebenfalls eine Erklärung für die im Vergleich zu den IC₅₀-Werten niedrigeren K_D-Werte sein könnte: Eine Hemmung der Protease tritt nur dann ein, wenn der Inhibitor richtig in der allosterischen Tasche positioniert ist und durch eine Interaktion mit N152 die offene Konformation stabilisiert.

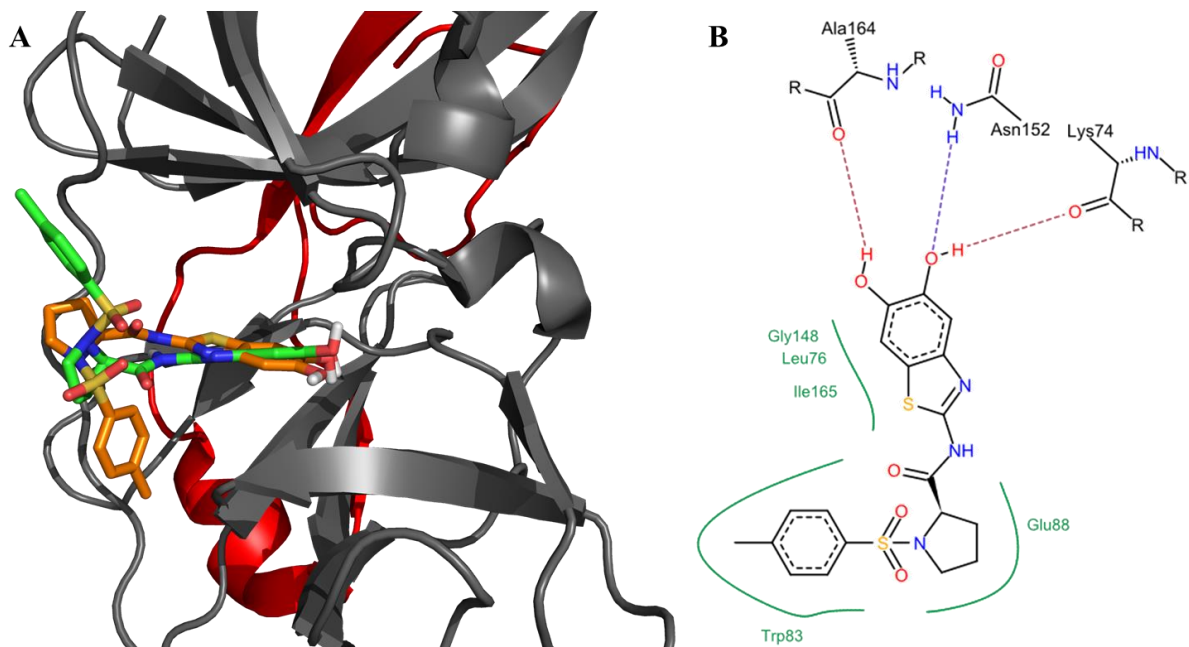


Abbildung 41: Docking der Inhibitoren mit Sulfonamid-Struktur. **A)** Positionierung von (*R*)- und (*S*)-**48** in der allosterischen Tasche der DENV2 NS2B/NS3-Protease (PDB ID 2FOM).^[53] Das Docking wurde durchgeführt von [REDACTED]. Das Enzym ist als Cartoon dargestellt, NS2B in rot und NS3 in schwarz. Die

Inhibitoren sind in Stabform dargestellt, mit Farbkodierung nach Elementen: Kohlenstoff: grün ((*R*)-**48**), orange ((*S*)-**48**), Sauerstoff: rot, Stickstoff: blau, Wasserstoff: weiß, Schwefel: gelb. Die Abbildung wurde erstellt mit PyMOL.^[38] **B**) Schematische Darstellung der Interaktionen von (*R*)-**48** mit der allosterischen Tasche. Hydrophobe Wechselwirkungen sind als grüne Linien mit den interagierenden Aminosäuren in grün dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen sind durch Striche zu dem jeweiligen Strukturelement der Aminosäure dargestellt.

Eine mögliche Erklärung für die Selektivität der Inhibitoren für die ZIKV-Protease gegenüber der DENV2-Protease liegt in den Unterschieden der Sequenzen im Bereich der allosterischen Tasche. Es gibt fünf Aminosäuren, welche sich an dieser Stelle unterscheiden: E86/D1086, E88/A1088 V147/I1147, A166/T1166, K74/Q1074 und mit denen Interaktionen im Docking vorhergesagt wurden (**Abbildung 42**).

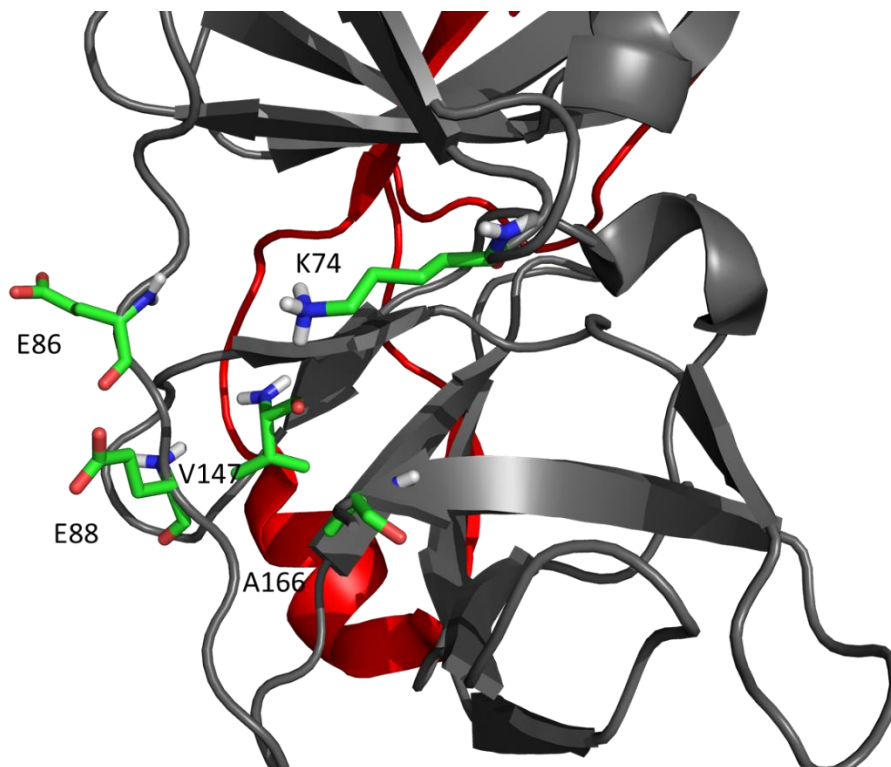


Abbildung 42: Aminosäuren im Bereich der allosterischen Tasche der DENV2-Protease, welche sich von der ZIKV-Protease unterscheiden. Das Enzym (PDB ID 2FOM) ist als Cartoon dargestellt, NS2B in rot und NS3 in schwarz.^[53] Die Aminosäuren sind in Stabform dargestellt, mit Farbkodierung nach Elementen: Kohlenstoff: grün Sauerstoff: rot, Stickstoff: blau, Wasserstoff: weiß. Die Abbildung wurde erstellt mit PyMOL.^[38]

So wurden für (*R*)-**48** in Dockingstudien an der offenen Konformation der DENV-Protease (PDB-ID 2FOM) hydrophobe Wechselwirkungen mit E88 (**Abbildung 41B**) und für (*S*)-**48** mit A166 vorhergesagt. Im Vergleich zu Glutamat setzt Alanin die Polarität der Bindetasche herab. Das kann die hydrophobe Wechselwirkung von (*R*)-**48** mit E88/A1088 begünstigen und bietet

eine mögliche Erklärung für die Selektivität der Inhibitoren für die ZIKV- gegenüber der DENV2-Protease. Bei beiden Enantiomeren wurde außerdem eine Wasserstoffbrückenbindung des Catechols mit K74 gesehen, was ebenfalls einen Einfluss haben kann. Dieser ist jedoch nicht als hoch anzunehmen, da die Interaktion nicht mit der Seitenkette, sondern mit dem Rückgrat ausgebildet wird (**Abbildung 41B**).

(*R*)-**48**, (*S*)-**48**, (*R*)-**50** oder (*S*)-**50** als ausgewählte Verbindungen wurden in Enzymassays auch an anderen Proteasen untersucht (**Tabelle 9**).

Tabelle 9: Ergebnisse der Testung ausgewählter Verbindungen an verschiedenen Proteasen.^a

Verbindung	Cathepsin B	Cathepsin L	Cruzain	Rhodesain
(<i>R</i>)- 48	1%	1%	0%	2%
(<i>S</i>)- 48	1%	1%	0%	11%
(<i>R</i>)- 50	3%	5%	3%	3%
(<i>S</i>)- 50	2%	3%	5%	15%

^aAngegeben ist die prozentuale Inhibition bei einer Konzentration des Inhibitors von 20 μ M.

Bei der Testung an Cathepsin B, Cathepsin L und Cruzain wurde bei 20 μ M keine signifikante Inhibition beobachtet. Bei Rhodesain wurde durch (*S*)-**48** und (*S*)-**50** eine geringe Inhibition gemessen. Insgesamt zeigen die Inhibitoren somit eine gute Selektivität für die flaviviralen Proteasen gegenüber den anderen getesteten Proteasen.

3.2.5 *Testung auf antivirale Aktivität*

Nach der Testung der Substanzen in Enzymassays wurden einige ausgewählte Verbindungen auch in zellbasierten Assays von [REDACTED] ([REDACTED]) auf ihre antiviralen Eigenschaften an DENV und ZIKV und von [REDACTED] ([REDACTED]) auf die antiviralen Eigenschaften an ZIKV untersucht. Dafür wurden (*R*)- und (*S*)-**48** als neue Leitstrukturen, (*R*)- und (*S*)-**52** als Methoxyderivate von (*R*)- und (*S*)-**48** und (*R*)- und (*S*)-**50** als Inhibitoren mit den niedrigsten IC₅₀-Werten ausgewählt. Diese Verbindungen wurden zunächst auf cytotoxische Eigenschaften in einem MTS-Assay untersucht, wobei (*R*)-**48** und (*R*)-**50** einen Effekt bei Konzentrationen $\geq 30 \mu\text{M}$ zeigten und in nachfolgenden Untersuchungen in Konzentrationen von $3 \mu\text{M}$ eingesetzt wurden. Alle anderen Inhibitoren wurden mit $10 \mu\text{M}$ getestet. Die Verbindungen wurden ebenfalls an A549-Zellen untersucht, wobei keine Effekte bei Konzentrationen von $5 \mu\text{M}$ beobachtet wurden. Zur Bestimmung der antiviralen Aktivität an ZIKV in Vero-Zellen wurde neben den synthetisierten Verbindungen auch **25** ($\text{EC}_{50} \text{ DENV2} = 0.8 \pm 0.2 \mu\text{M}^{[86]}$) und dessen geschützte Vorstufe **60** eingesetzt (**Abbildung 43**).

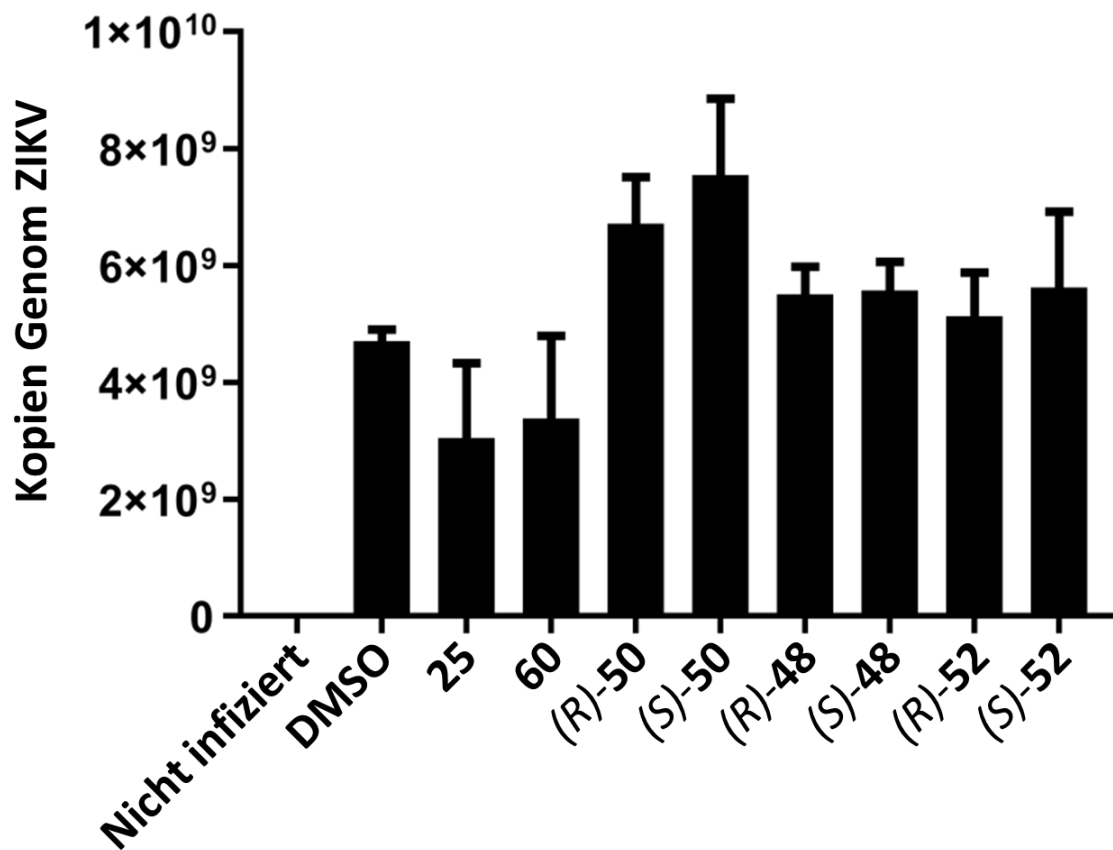
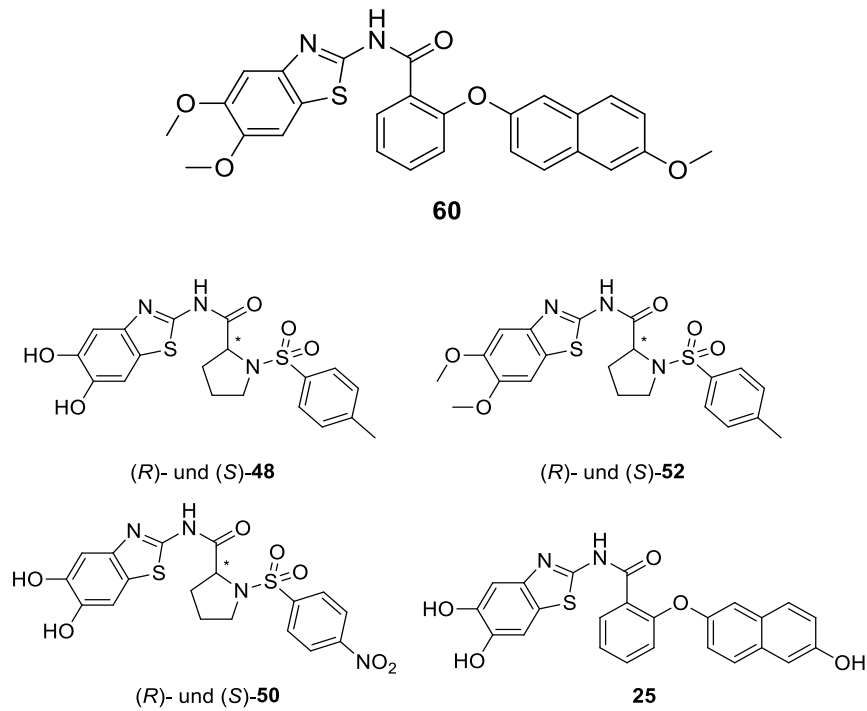


Abbildung 43: Viruslast von ZIKV in Vero-Zellen unter dem Einfluss verschiedener Inhibitoren. Die Zellen wurden 1 h mit den Inhibitoren inkubiert und anschließend infiziert. (R)-48 und (R)-50 wurden mit einer Konzentration von 3 μ M eingesetzt, alle anderen mit einer Konzentration von 10 μ M. Nach 3 Tagen wurden Proben entnommen und die Menge an viraler RNA durch qPCR bestimmt. Reines DMSO diente als Kontrolle.

Im Vergleich zu der Kontrolle mit DMSO konnte bei **25** und **60** eine verringerte Viruslast beobachtet werden, welche bei Betrachtung der Fehlerbalken jedoch nicht signifikant war. Alle anderen Verbindungen zeigten keine erniedrigte Viruslast. Die Testung wurde zudem auch in A549-Zellen durchgeführt, wobei dort ebenfalls keine antivirale Aktivität beobachtet wurde.

Die antivirale Aktivität an DENV2 wurde in Vero-Zellen durch Bestimmung der viralen RNA durch quantitative Polymerase-Kettenreaktion (*quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) bestimmt. Dabei wurde die Menge an viraler RNA im extrazellulären Raum mit Inhibitor und mit reinem DMSO als Kontrolle verglichen (**Abbildung 44**).

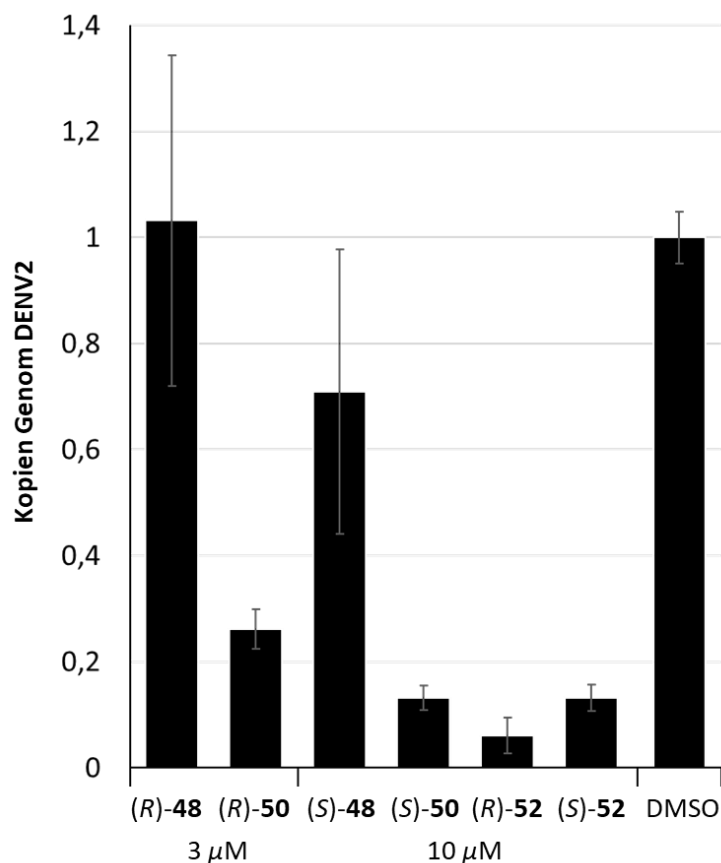
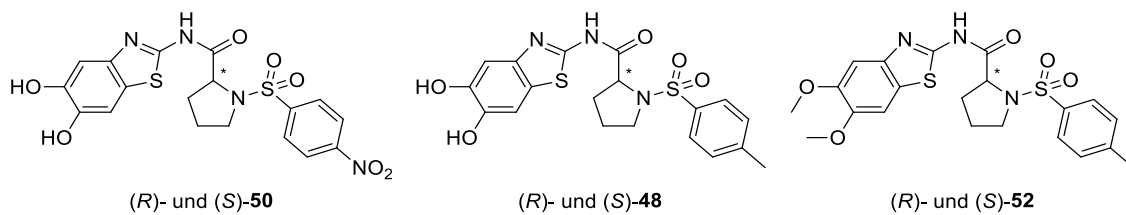


Abbildung 44: Relative Viruslast von mit DENV2 infizierten Vero-Zellen unter dem Einfluss verschiedener Inhibitoren mit DMSO als Kontrolle. Die Zellen wurden 1 h mit den Inhibitoren inkubiert und anschließend infiziert. Die eingesetzten Konzentrationen sind unter den jeweiligen Verbindungen angegeben. Nach 3 Tagen wurden Proben entnommen und die Menge an viraler RNA durch qPCR bestimmt.

(*R*)-**48** zeigte bei 3 μM keine Aktivität, (*S*)-**48** bei 10 μM eine geringe. Im Vergleich dazu reduzierten (*R*)- und (*S*)-**50** die Viruslast in größerem Maße, was zu den niedrigeren IC_{50} -Werten im enzymatischen Assay passt. (*R*)- und (*S*)-**52** wiesen die größte Reduktion der viralen RNA auf, obwohl im Enzymassay keine Inhibition der Protease beobachtet werden konnte. Eine mögliche Erklärung dafür ist die erhöhte Lipophilie von (*R*)- und (*S*)-**52**. Dadurch kann die Zellmembranen besser passiert werden und anschließend können die Hydroxygruppen durch eine metabolische Spaltung der Methoxygruppen freigesetzt werden. Diese Hypothese sollte im Folgenden durch Metabolismusstudien untersucht werden (vgl. 3.3).

Im Vergleich zu der antiviralen Aktivität an DENV2 stehen die Ergebnisse an ZIKV im Kontrast zu der Testung im Enzymassay, in welchem niedrigere IC_{50} -Werte für ZIKV im Vergleich zu DENV2 bestimmt wurden. Da die gleichen Zelllinien in den Assays verwendet wurden, sind die Unterschiede auf die Viren selbst zurückzuführen. Im Vergleich zu DENV2 verursacht ZIKV an Vero-Zellen in einem größeren Ausmaß cytopathische Effekte, was für eine größere Auswirkung des Virus auf die sonstigen Bestandteile der Zelle spricht.^[101] Beide Viren bilden zudem Replikationsfabriken (RF), welche aus Membranelementen des endoplasmatischen Retikulums bestehen und die RNA sowie NS3 enthalten.^[48,102] In diesen werden neue Viruspartikel gebildet und so vor der Abwehr der Zelle geschützt. Im Unterschied zu DENV werden bei ZIKV die RF zusätzlich von Intermediärfilamenten umgeben.^[102] Es kann daher sein, dass eine Inhibition der in der RF lokalisierten NS2B/NS3-Protease durch die Hemmstoffe in ZIKV im Vergleich zu DENV2 eher verhindert wird und dadurch die Inhibitoren keine antivirale Wirkung aufweisen. In zukünftigen Experimenten könnte daher der Einfluss der Viren auf die Zellen und eine Veränderung von Eigenschaften, wie Aufnahme und Metabolismus, untersucht werden. Zudem wäre die Lokalisierung der Inhibitoren in den Zellen interessant, um zu untersuchen, ob die Inhibitoren in die RF gelangen.

3.2.6 Berechnung der lipophilen Ligandeneffizienz

Das Ziel der Entwicklung dieser Reihe von Inhibitoren lag nicht nur darin, neue Inhibitoren mit besseren IC_{50} -Werten zu finden, sondern auch deren Lipophilie zu verringern. Als Maß dafür dient der $\log P$ -Wert, der Logarithmus des Verteilungskoeffizienten zwischen *n*-Octanol und Wasser. In Verbindung damit steht für die Bewertung von Liganden und Leitstrukturen die lipophile Effizienz von Liganden (*lipophilic ligand efficiency*, LLE), welche die Affinität oder Hemmstärke eines Liganden in Verbindung mit dessen Lipophilie bringt:^[103]

$$LLE = pIC_{50} - \log P \quad (6)$$

Die LLE dient somit der Korrektur von Werten für Affinität oder Hemmung, um Liganden mit vermehrt hydrophoben und somit weniger spezifischen Wechselwirkungen weniger zu gewichten.

Für die Berechnung des Wertes wird zunächst der $\log P$ benötigt. In diesem Fall wurde er in Form des SlogPs berechnet, welcher durch den Beitrag der einzelnen Atome der Moleküle summiert wird.^[104] Zur Validierung dieser Berechnung wurden die erhaltenen SlogP-Werte gegen die Retentionszeiten von Umkehrphasen-Hochdruckflüssigchromatographie (*reversed phase high performance liquid chromatography*, RP HPLC) Messungen aufgetragen (**Abbildung 45**).

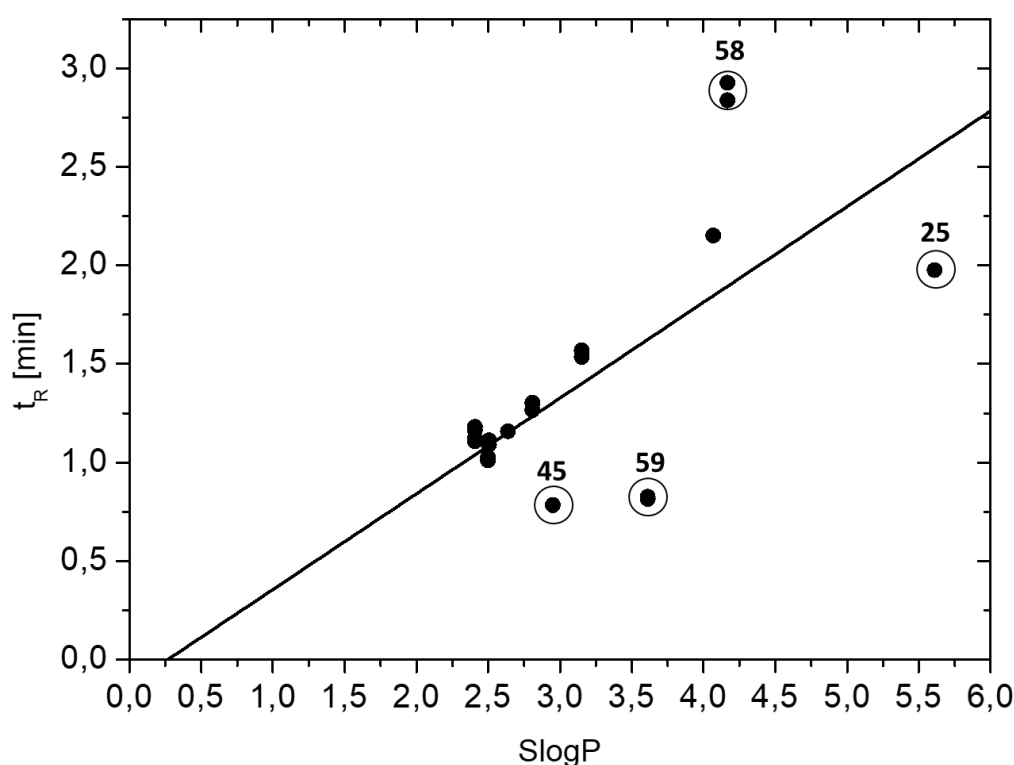


Abbildung 45: Auftragung der Retentionszeiten der Prolin-basierten Inhibitoren und **25** gegen den berechneten SlogP zu dessen Validierung. Alle Retentionszeiten wurden auf einer RP-Säule mit einem Fließmittel von 55% Wasser, 45% Acetonitril und einer Beimischung von 0.01% Ameisensäure gemessen. Die eingezeichnete Gerade stellt die lineare Regression der aufgetragenen Daten dar.

Da auf einer RP-Säule, wie der für dieses Experiment verwendete C₁₈-Säule, hauptsächlich lipophile Wechselwirkungen auftreten, erlaubt diese eine Abschätzung der Lipophilie von Substanzen, welche sich strukturell ähneln. Letzteres ist nötig, damit das Ergebnis nicht durch andere Faktoren, wie zum Beispiel der Größe der Moleküle beeinflusst wird. Durch die lineare

Regression wird sichtbar, dass die berechneten SlogP-Werte in proportionalem Zusammenhang zur Lipophilie der Verbindungen stehen. Im Vergleich zu dem berechneten SlogP weisen Verbindungen, welche keine Sulfonamide sind, wie **57** oder (*R*)- und (*S*)-**45**, oder Sulfonamide mit anderen Sulfonylgruppen, wie das Acetamidonaphthalen von (*R*)- und (*S*)-**59**, niedrigere Retentionszeiten auf. Eine höhere Retentionszeit wird dagegen für (*R*)- und (*S*)-**58** auf, dessen Biphenylgerüste sehr lipophil sind, gefunden.

Anschließend wurde der SlogP gegen den pIC₅₀ (ZIKV) aufgetragen, um eine Visualisierung der LLE zu ermöglichen (**Abbildung 46**).

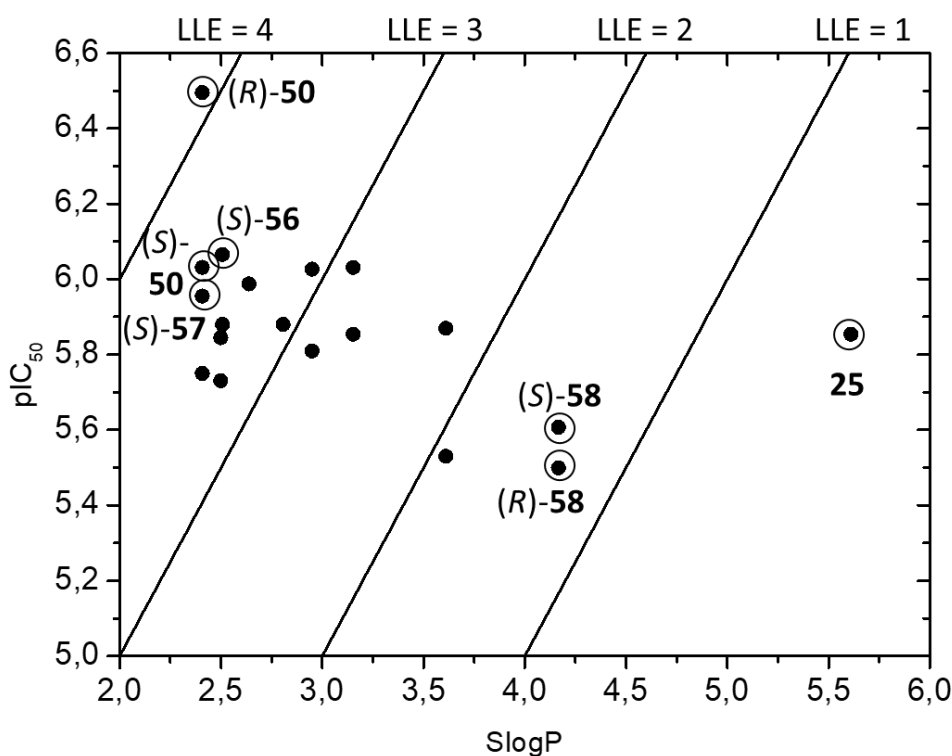


Abbildung 46: Visuelle Darstellung der LLE durch Auftragung des pIC₅₀ gegen den SlogP. Die eingezeichneten Linien stellen die Grenzen der LLE dar.

Durch die Auftragung ist zu sehen, dass durch die neuen Inhibitoren deutlich höhere LLEs erreicht wurden. Während **25** einen LLE von unter eins aufweist (0.24), liegen die meisten LLE-Werte der neuen Hemmstoffe über drei, wobei (*R*)-**50** sogar einen Wert über vier zeigt (4.09). Im Gegensatz dazu weisen (*R*)- und (*S*)-**58** durch die großen, lipophilen Biphenylgruppen und die höheren IC₅₀-Werte lediglich einen LLE über eins auf (*R*: 1.33, *S*: 1.44).

Der LLE als Maß zur Bewertung von Inhibitoren wurde anhand einer Analyse von verschiedenen Wirkstoffen und ihrer Lipophilie aufgestellt, da die Betrachtung von Wirkstärken (z.B. IC₅₀, K_i, EC₅₀) alleine nicht ausreichend ist für die Entwicklung von

Wirkstoffen.^[105] Dabei wurden für Arzneistoffe LLEs zwischen 5 und 7 bestimmt, ausgehend von einem durchschnittlichen clogP von 2.5 und einer Wirkstärke von 1 ~ 10 nM. Ein anzustrebender Wert des LLE ist abhängig von verschiedenen Faktoren: in diesem Fall wurden oral verfügbare Wirkstoffe betrachtet. Zudem ist der Wert abhängig von der Klasse des zu inhibierenden Enzyms: bei Hormonrezeptoren liegt der durchschnittliche clogP-Wert höher als bei Proteaseinhibitoren. Die durchschnittliche Lipophilie sinkt zudem, wenn Wirkstoffe in den klinischen Phasen I – III betrachtet werden, aber auch in präklinischen Studien wurde ein bevorzugter clogP von <3 bei Wirkstoffen mit geringer Toxizität beobachtet.^[103,106] Beides geht mit höheren LLE-Werten einher, wobei bei der Entwicklung von Leitstrukturen, welche statistisch LLE-Werte von 3 – 4 aufweisen, zu einem Wirkstoff allgemein eine Erhöhung des LLEs beobachtet wurde.^[107,108] In diesen Zusammenhang lassen sich die hier erhaltenen Werte gut einordnen, ausgehend von **25** (LLE: 0.24) konnte dieser auf Werte >3 und für (*R*)-**50** >4 gesteigert werden.

Der LLE als Mittel zur Beurteilung von verschiedenen Inhibitoren eignet sich für diese Phase der Entwicklung, welche hauptsächlich noch auf Testungen am Target basiert: Substanzen aus verschiedenen Stufen der Entwicklung, wie Leitstrukturen oder Strukturen aus klinischen Studien, zeigen unterschiedliche LLE-Werte.^[108] Zu beachten ist, dass dieser Wert die Größe von Molekülen nicht einbezieht und somit die Bewertung von kleinen Molekülen und der Vergleich von solchen mit großen Unterschieden im Molekulargewicht anhand des LLEs weniger hilfreich ist.^[109] In der untersuchten Serie an Inhibitoren gab es jedoch keine große Änderungen im Molekulargewicht, wodurch der LLE in diesem Fall als Mittel zur Beurteilung verwendet werden kann.

3.3 Metabolismusstudien

3.3.1 Optimierung der Assaybedingungen

Um die Hypothese der metabolischen Spaltung der Methoxygruppen in den Zelltests zu überprüfen, sollten (*R*)- und (*S*)-**52** in Metabolismusstudien mit Rattenlebermikrosomen untersucht werden. Dabei wurden die Substanzen mit Rattenlebermikrosomen inkubiert, wobei die in den Mikrosomen enthaltenen Enzyme, unter anderem Cytochrom P450 (CYP) Enzyme, die Substanz umsetzen. Diese Enzyme sind ebenso in den für die Bestimmung der antiviralen Aktivität verwendeten Zelllinien, A549 und Vero, vorhanden.^[110] Für den Assay wurde neben den Mikrosomen, welche kommerziell erworben wurden, auch ein regenerierendes System aus NADP, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und Glucose-6-Phosphat verwendet, um NADPH zu erzeugen, welches das katalytische Zentrum der Enzyme regenerieren kann. Die Auswertung des Assays erfolgte durch Probennahme nach 0, 15, 30, 45 und 60 Minuten und anschließende Analyse per LC-MS/MS.

Zunächst wurde eine Optimierung des Assays vorgenommen. In einem ersten Versuch wurde als Puffer Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) verwendet, das jedoch durch das enthaltene primäre Amin ein intensives Signal in der ESI-MS von $m/z = 122.1$ zeigte. Hierdurch verschlechterte sich das Signal-Rausch-Verhältnis und somit wurde die Detektion niedriger Konzentrationen erschwert. Durch einen Wechsel zu einem auf Phosphat basierenden Puffersystem wurde ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis erreicht.

Ohne weitere Veränderungen war jedoch nur eine teilweise Metabolisierung der Substanzen zu sehen. Der nächste Faktor zur Optimierung war das Lösemittel von (*R*)- und (*S*)-**52**. Zu Beginn wurde DMSO verwendet, welches jedoch zur Hemmung einiger CYP-Enzymen führt.^[111] Da viele gängige Lösemittel zur Hemmung oder zu anderen Interaktionen mit CYP-Enzymen führen, wurde Acetonitril gewählt und die Konzentration des organischen Lösemittel von den vorher verwendeten 1% auf 0.2% reduziert.^[112] Zu Beginn wurden (*R*)- und (*S*)-**52** in einer Konzentration von $190 \mu\text{M}$ eingesetzt, bei einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ wurde relativ betrachtet ein erhöhter Umsatz beobachtet. Da bei einer mehrfachen Metabolisierung die Wahrscheinlichkeit der Moleküle, mit den Enzymen zu reagieren, eine große Rolle spielt, ist prinzipiell eine geringe Konzentration der Substanz anzustreben, da nur bei einer Konzentration $[S] < K_m$ die Reaktionsrate proportional zur Konzentration ist.^[113] Die Wahl der Konzentration war jedoch auch von der Analysenmethode abhängig. Bei diesen Konzentrationen war eine quantitative Auswertung nicht mehr möglich, da die Signale des UV-Detektors zu gering

ausfielen und die Intensitäten im Chromatogramm der LC-MS von der Ionisierbarkeit der Substanzen abhängen. Bei einer Konzentration von 1 μM waren die UV-Signale der ESI-MS jedoch auch zu schwach. Somit wurde eine Konzentration von 10 μM gewählt.

3.3.2 *Metabolismusstudien von (R)- und (S)-52*

In den Ionenchromatogrammen wurde eine Abnahme der Intensität der Ausgangsmoleküle (*R*)- oder (*S*)-**52** im Verlauf von einer Stunde gesehen. Stattdessen wurde die Masse $m/z = 448.2$ detektiert, welche um 14 niedriger liegt als die Masse von (*R*)- oder (*S*)-**52** ($m/z = 462.3$). Dies spricht für eine einfache Demethylierung, wobei jedoch keine Aussage getroffen werden kann, welche der beiden Methoxygruppen abgespalten wird. Die Masse des doppelt demethylierten Produktes (*R*)- und (*S*)-**48** trat ebenfalls auf mit $m/z = 434.1$, jedoch mit geringerer Intensität. Die größte Intensität im Ionenchromatogramm wurde bei einer geringeren Retentionszeit gesehen mit $m/z = 478.2$, wobei auch die Massen $m/z = 464.2$ und 450.2 sichtbar waren. Zwischen beiden Enantiomeren konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Zur Aufklärung der Struktur wurde die Masse $m/z = 478.2$ fragmentiert und das Fragmentierungsmuster mit denen von (*R*)- und (*S*)-**52** und (*R*)- und (*S*)-**48** verglichen. Als erste Theorie wurde durch den Unterschied von 16, welcher zur Masse von Sauerstoff passt, eine Hydroxylierung postuliert. Diese geht mit einer geringeren Retentionszeit einher, was auf eine höhere Polarität hinweist. Im Fragmentierungsmuster von **48** wurde der Masse $m/z = 278.0$ das Fragment der Spaltung an der Sulfonamidbindung **61** zugeordnet. Passend dazu mit einer um 28 höheren Masse wurde bei **52** $m/z = 306.2$ (**62**) beobachtet. Dieses trat auch bei der Fragmentierung von $m/z = 478.2$ auf, wodurch die metabolische Reaktion dem Bereich des Tosylrestes zugeordnet werden konnte. Bei **48** und **52** wurde das Fragment **63** mit $m/z = 224.1$ beobachtet, während bei der Fragmentierung von $m/z = 478.2$ eine um 16 höhere Masse von $m/z = 240.1$ erschien. Ein zusätzliches Fragment, das nur bei der Fragmentierung von $m/z = 478.2$ auftrat, wies eine Masse $m/z = 460.2$ auf. Diese lag um 18 niedriger als die Masse der Ausgangssubstanz, was auf eine Dehydratisierung hinwies, die nur bei aliphatischen Hydroxygruppen eintreten kann. Da es im Bereich des Tosylrestes nur die Methylgruppe als aliphatisches Element gibt, wurde daher dem Signal $m/z = 478.2$ die Struktur **64** zugeordnet, deren Fragmente **65** und **66** ebenfalls zu den beobachteten Fragmenten passen (**Abbildung 47**). Zudem ist die metabolische Hydroxylierung von Tosylresten an der Methylgruppe auch in der Literatur bekannt.^[114]

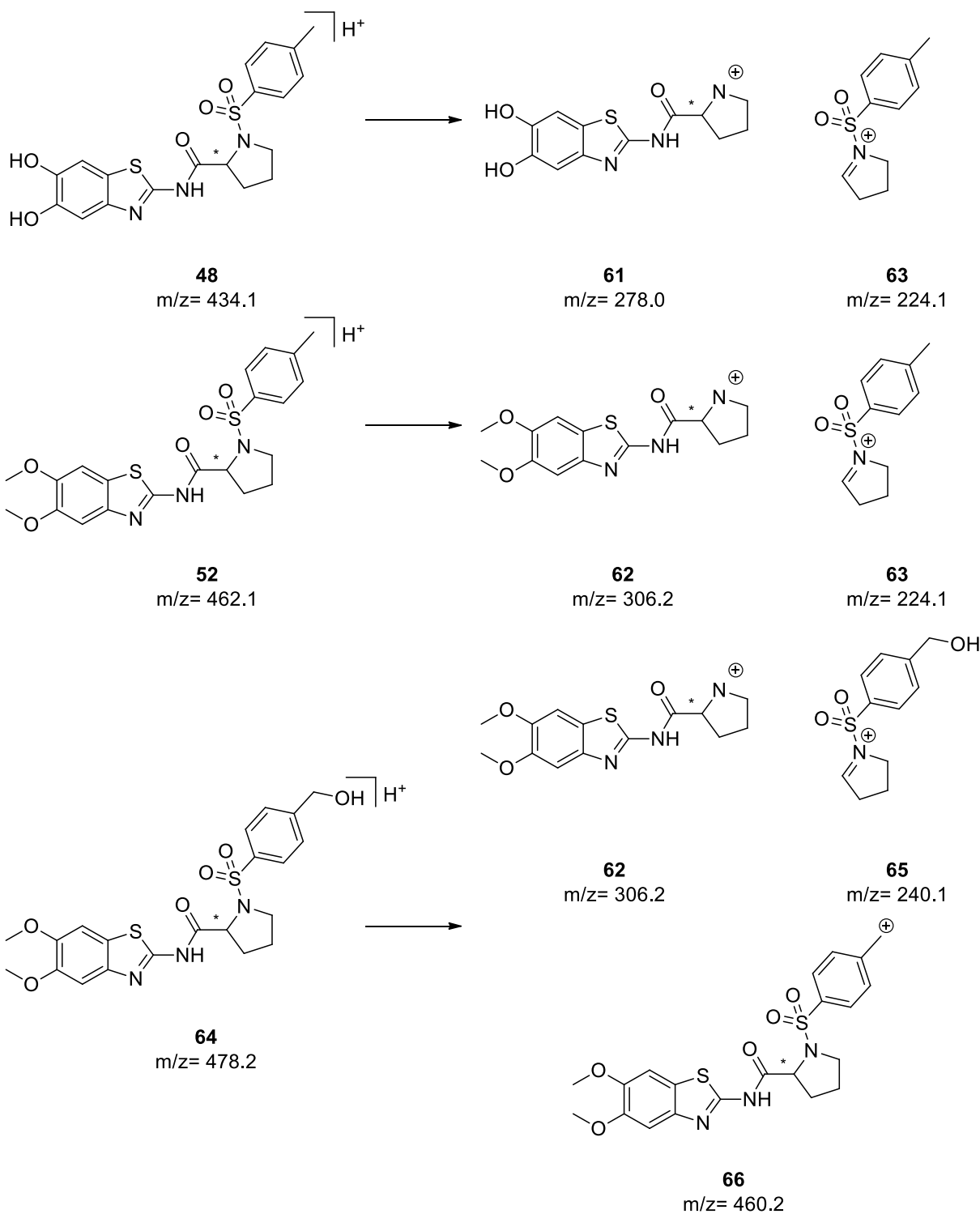


Abbildung 47: Fragmentierung von **48**, **52** und $m/z = 478.2$ zur Aufklärung der Struktur von **64** durch den Vergleich der verschiedenen Fragmentierungsmuster.

Um die Entstehung von **64** zu belegen, wurde dieses im Anschluss synthetisiert, um die Retentionszeit und das Fragmentierungsmuster zu vergleichen.

3.3.3 Synthese des Metaboliten 64

Da beide Enantiomere (*R*)- und (*S*)-**52** die gleichen Metabolisierungsmuster aufwiesen, wurde lediglich ein Enantiomer des postulierten Metaboliten, (*S*)-**64**, synthetisiert, um dessen Struktur zu beweisen. Als erster Ansatz zur Synthese von (*S*)-**64** sollte die Methylgruppe von Tosylchlorid **67** zur Carbonsäure **68** oxidiert werden, um anschließend nach der Kupplung zu (*S*)-**69** wieder reduziert zu werden und (*S*)-**64** zu erhalten (**Abbildung 48**).

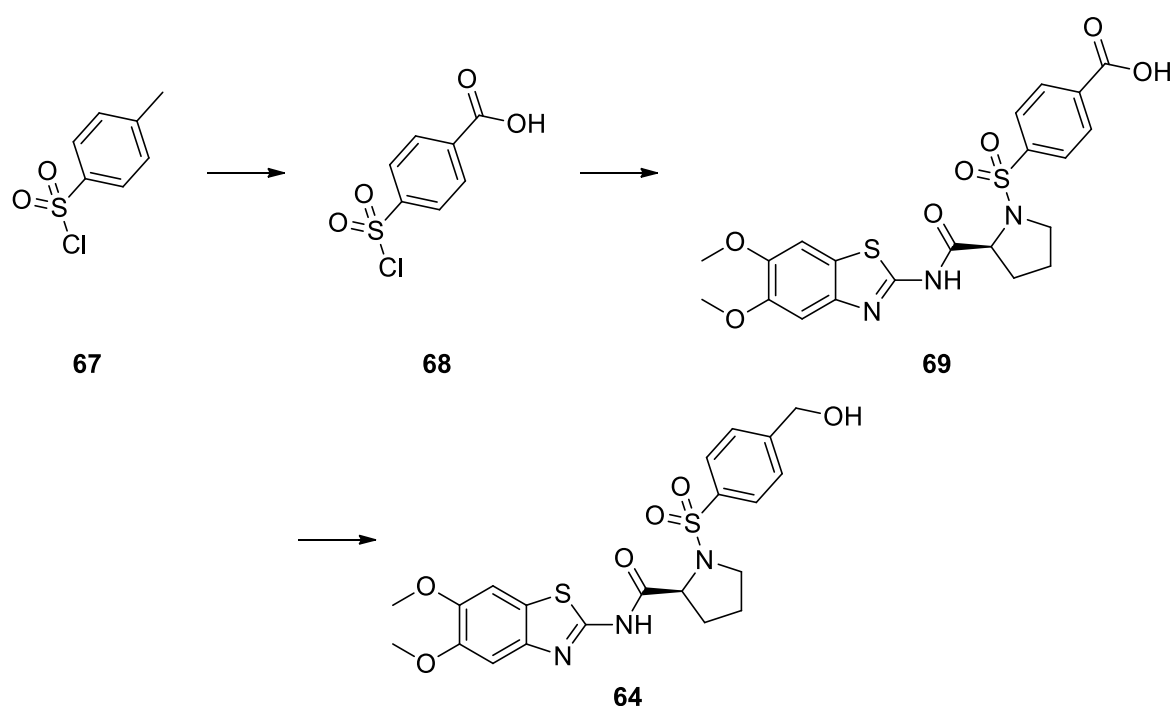
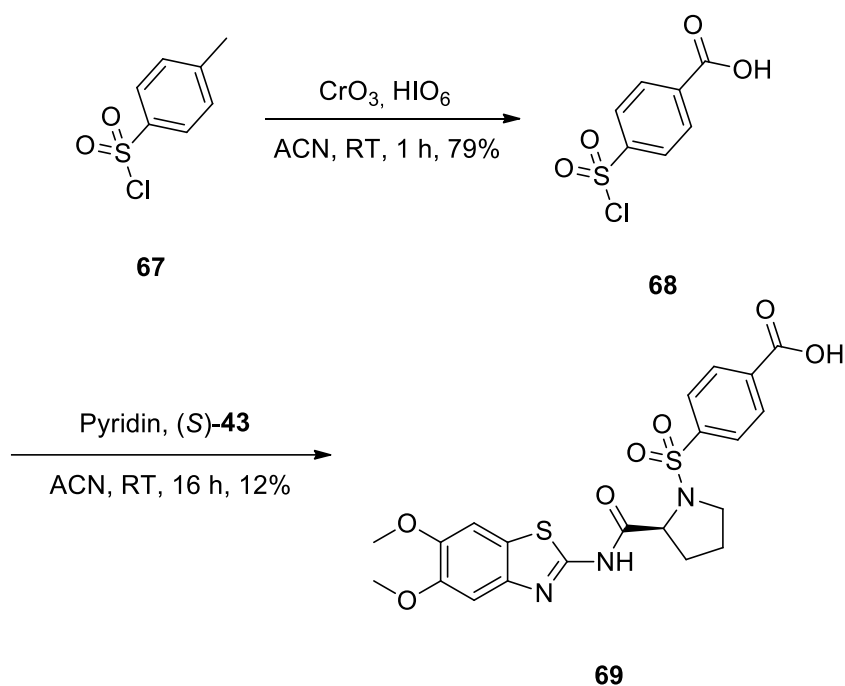


Abbildung 48: Synthesepfad von (*S*)-**64** durch Reduktion der Carbonsäure von (*S*)-**69**.

In den ersten Schritten wurde **67** zu **68** oxidiert, angelehnt an eine Vorschrift von YAMAZAKI.^[115] Dabei wurde die Methylgruppe durch CrO_3 oxidiert, welches jedoch nur in katalytischen Mengen vorlag und durch stöchiometrische Mengen an Periodsäure regeneriert wurde.^[116] Anschließend wurde **68** mit (*S*)-**43** zu (*S*)-**69** umgesetzt (**Reaktionsgleichung 13**).



Reaktionsgleichung 13: Synthese von (*S*)-**69** aus **68** und (*S*)-**43**.

Die Ausbeute im zweiten Schritt liegt deutlich unter der, die in den anderen Fällen der Reaktion von **43** mit Sulfonylchloriden erhalten wurde (vgl. Kapitel 3.2.2), die Carbonsäure von **68** scheint in diesen Fällen ein Problem zu sein.

Im Folgenden sollte die Carbonsäure zu (*S*)-**64** reduziert werden, wobei Versuche mit BH_3 , NaBH_4 und auch LiAlH_4 als stärkeres Reduktionsmittel unternommen wurden. Jedoch konnte in keinem Fall bei der Reaktionskontrolle per Dünnschichtchromatographie ein Umsatz festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung dafür sind die beiden *ortho*-ständigen Methoxygruppen, welche ebenfalls an die Reduktionsmittel koordinieren können. Jedoch wurde auch nach weiterer Zugabe der Reduktionsmittel kein Umsatz festgestellt.

Anschließend wurde eine andere Syntheseroute geplant, bei der die Hydroxygruppe durch eine nucleophile Substitution des Halogenalkans (*S*)-**70** eingeführt werden sollte (**Abbildung 49**).

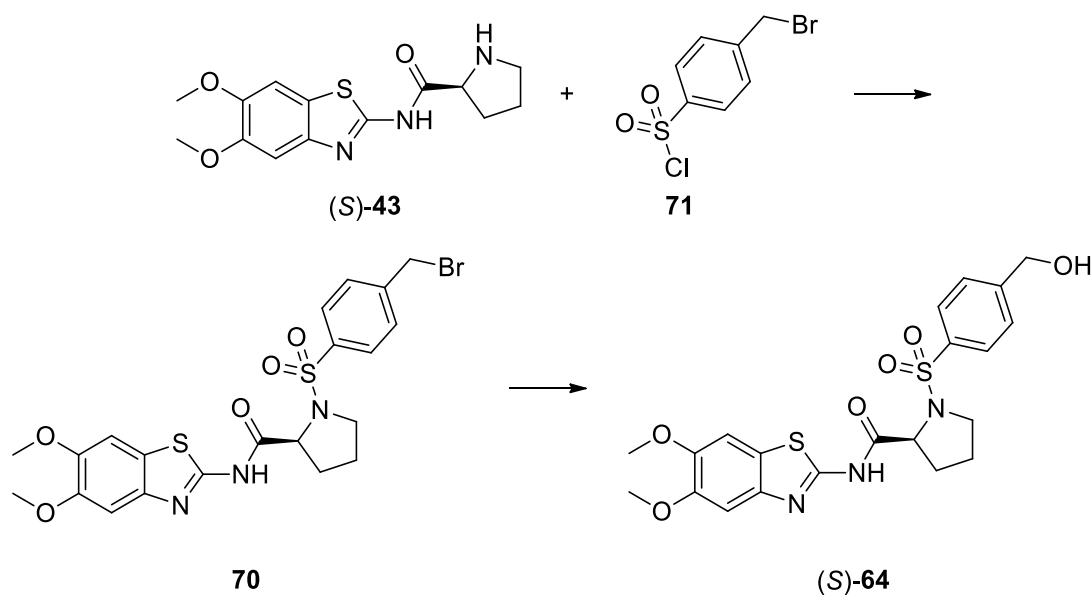
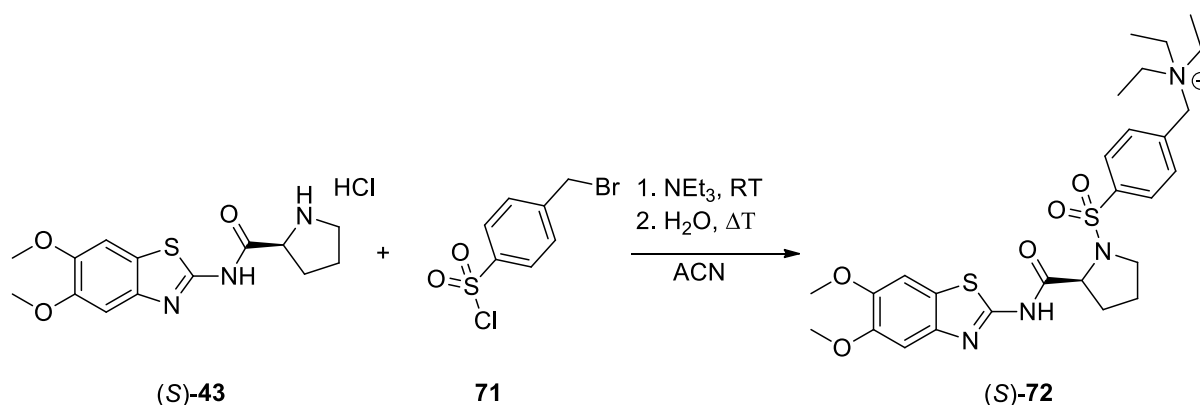


Abbildung 49: Synthese von (S)-64 über das Halogenalkan (S)-70.

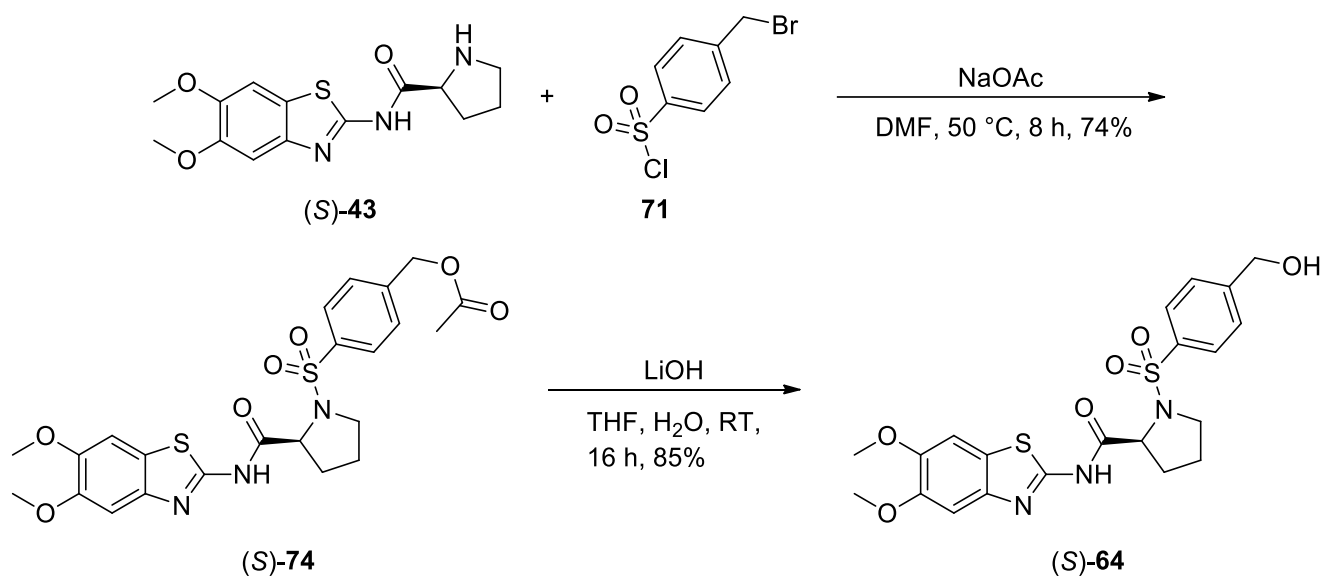
Da von dem Halogenalkan (S)-70 erwartet wurde, dass es empfindlich gegenüber Hydrolyse ist, sollten beide Schritte in einer Reaktion stattfinden. Zuerst wurden beiden Edukte in Acetonitril mit Triethylamin als Base zusammengegeben, um anschließend nach Zugabe von Wasser erhitzt zu werden. Dabei wurde durch die Reaktionskontrolle per LC-MS ein Umsatz zu einem sehr polaren Produkt beobachtet, welches in der Totzeit des Chromatogramms eluierte und eine Masse von $m/z = 561.3$ aufwies. Beides passt zu einer Substitution des Bromatoms durch Triethylamin zu einem quartären, positiv geladenen und damit sehr polaren Amin (S)-72 (Reaktionsgleichung 14).



Reaktionsgleichung 14: Entstehung von (S)-72 durch Triethylamin.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde anschließend K_2CO_3 als Base eingesetzt, wobei bei der Reaktionskontrolle nur ein geringer Umsatz beobachtet wurde. Da durch die Edukte unpolare Lösemittel, in diesem Fall Tetrahydrofuran, eingesetzt werden mussten, wurde nachfolgend ein

Ansatz mit Dichlormethan und Wasser als Lösemittel, KOH als Nucleophil und Base und Tetrabutylammoniumbromid als Phasentransferkatalysator unternommen. Jedoch wurden bei Reaktionskontrollen per LC-MS die deutlich höhere Masse $m/z = 919.4$ detektiert. Diese konnte trotz Fragmentierung nicht aufgeklärt werden, möglicherweise handelt es sich um ein Kondensationsprodukt von zwei Molekülen. Ein Problem schien auch die Möglichkeit von Wasser zu sein, zweimal hintereinander als Nucleophil eine Substitutionsreaktion einzugehen. In dem nächsten Ansatz wurde daher Wasser als Nucleophil durch Acetat ersetzt, welches ebenfalls als Base dient. Dieser Ansatz war erfolgreich und der Ester (*S*)-**74** konnte isoliert werden, um anschließend durch Hydrolyse mit Lithiumhydroxid (*S*)-**64** zu erhalten (**Reaktionsgleichung 15**).



Reaktionsgleichung 15: Synthese von (*S*)-**64** mit NaOAc als Nucleophil und (*S*)-**74** Zwischenstufe.

Im Anschluss an die Synthese wurde (*S*)-**64** per LC-MS/MS untersucht, wobei die gleiche Retentionszeit und Fragmentierung wie in den Proben aus den Metabolismusstudien gefunden wurden. Dadurch konnte die Metabolisierung von (*S*)-**52** durch Hydroxylierung an der Methylgruppe des Tosylrestes zu (*S*)-**64** bestätigt werden.

Die anfangs aufgestellte Hypothese, dass eine Metabolisierung von **52** zur Bildung der für die Inhibition im Enzymassay wichtigen Hydroxygruppen führen kann, wurde somit durch diese Experimente belegt. Die Methoxy-Verbindungen sind damit besser Zellpermeable Prodrugs der Catechole. Zusätzlich wurde in der Hydroxylierung der Tosylgruppe zu **64** eine weitere Metabolisierungsreaktion beobachtet. Da die Massen $m/z = 464.2$ und 450.2 mit geringeren Retentionszeiten im Vergleich zu **64** ebenfalls gefunden wurden, können beide Reaktionen auch nacheinander ablaufen (**Abbildung 50**).

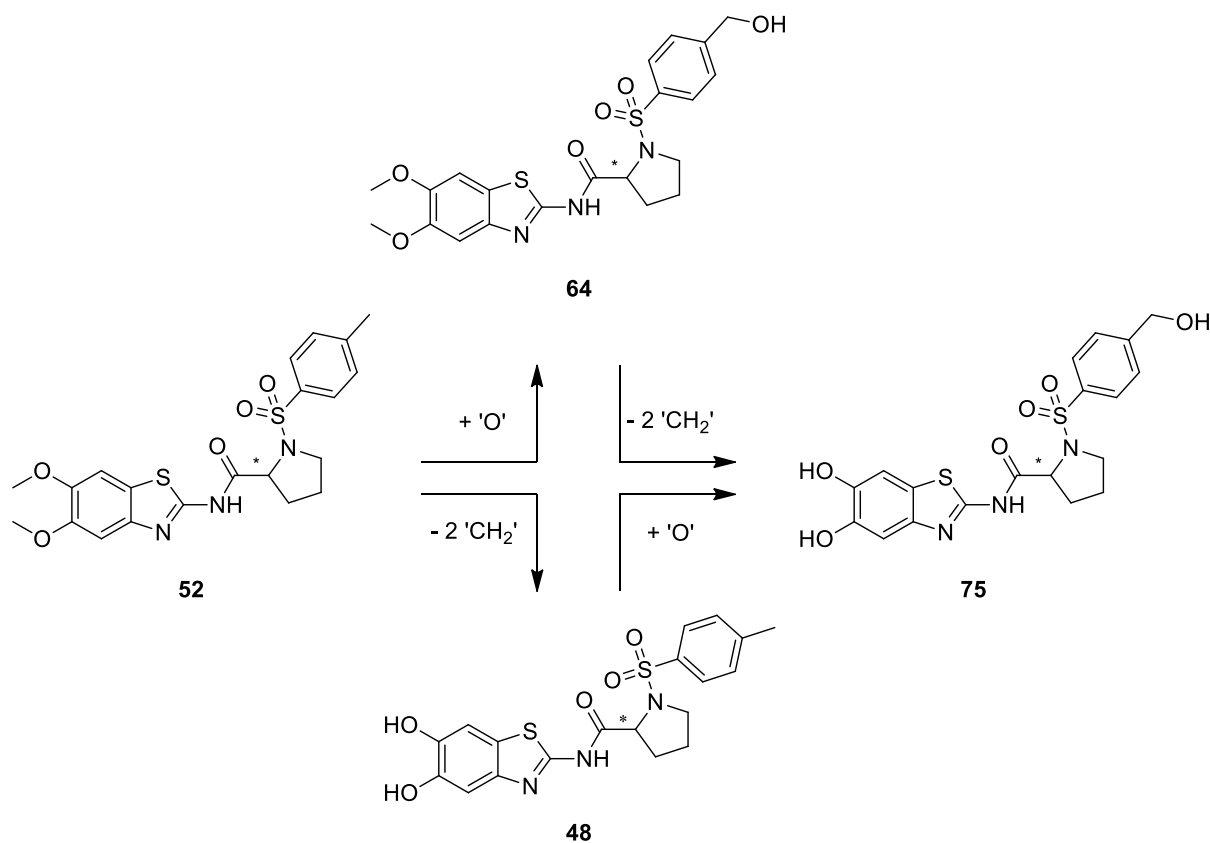


Abbildung 50: Metabolisierung von (*R*)- und (*S*)-**52** durch Demethylierung der Methoxygruppen und Hydroxylierung der Tosylgruppe.

Eine Synthese von (*R*)- oder (*S*)-**75** analog zu (*S*)-**64** schien nicht aussichtsreich, da andere Nucleophile bei dem ersten Schritt ein Problem darstellten. Zudem ist nicht zu erwarten, dass die Catecholstruktur unter den basischen Bedingungen der Hydrolyse des Esters im zweiten Schritt stabil ist (vgl. 3.2.3). Für die Affinität zu den Proteasen hat die Hydroxylierung der Tosylgruppe zu **75** vermutlich keine negativen Auswirkungen. Bei der Testung von verschiedenen Sulfonamiden wurde eine hohe Toleranz für verschiedene Reste beobachtet, speziell in der *para*-Stellung zum Sulfonamid. Zudem wiesen polare Reste an dieser Stelle eine bessere Hemmung der Protease auf (vgl. 3.2.4).

3.3.4 Zellpermeabilitätsstudien

Zur weiteren Überprüfung der Prodrug-Theorie wurden Zellpermeabilitätsstudien mit (*R*)-**48** und (*R*)-**52** durchgeführt. Dazu wurde von XXXXXXXXXX (XXXXXXXXXX) eine 10 μ M Lösung der Substanzen auf eine Schicht aus Caco-2-Zellen gegeben und die Lösung darüber (Donor) und darunter (Akzeptor) nach 3 h per LC-MS analysiert.

In der Akzeptor-Lösung konnte (R)-48 nicht nachgewiesen werden und (R)-52 in einer geringeren Konzentration als in der Donor-Lösung. Hier entsprach das Verhältnis der Donor- und Akzeptor-Signale der Zellschicht zu einem Großteil (91%) dem der Kontrolle (Abbildung 51).

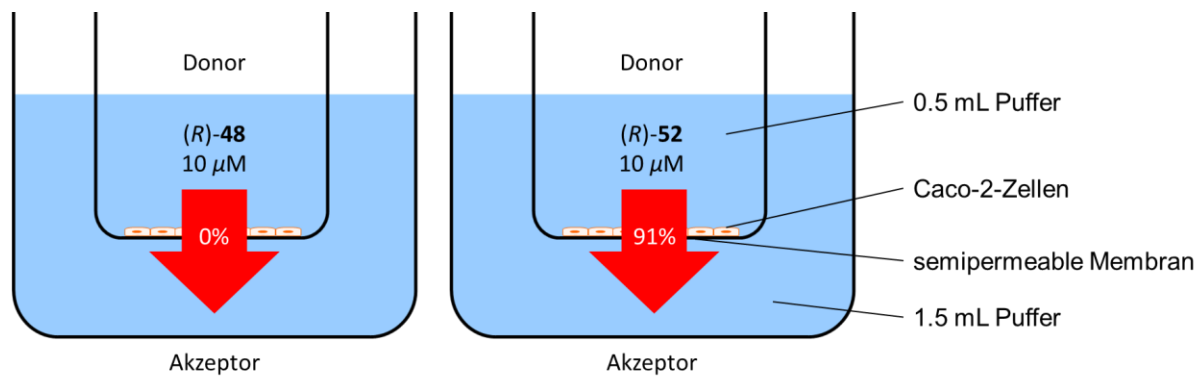


Abbildung 51: Bestimmung der Zellpermeabilität von (R)-48 und (R)-52. Angegeben ist das Verhältnis der Signalfächen (LC-MS) von Donor- und Akzeptor-Lösung in Bezug auf die Kontrollversuche ohne Caco-2-Zellen.

Bei der Kontrolle wurde ebenfalls ein geringeres Signal in den Akzeptor-Lösungen gemessen, was auf eine niedrige Permeabilität der semipermeablen Membran für die Substanzen hinweist. Die Konzentration von (R)-52 in der Donor-Lösung ist zudem höher im Vergleich zu den anderen Versuchen mit Zellen, was darauf hindeuten kann, dass ein Teil der Substanz auch in den Zellen verblieben ist. Insgesamt konnte aus diesem Experiment der Schluss gezogen werden, dass (R)-52 eine bessere Zellpermeabilität aufweist im Vergleich zu (R)-48.

3.4 Hybridinhibitor

3.4.1 Design des Inhibitors

Nachdem von LEE *et al.* der kompetitive Inhibitor **9** veröffentlicht wurde, kam durch den Vergleich der Struktur mit (*R*)- und (*S*)-**48** die Frage auf, welche Strukturelemente der Inhibitoren wichtig für eine Bindung in das aktive Zentrum oder die allosterische Tasche sind.^[72] Sowohl (*R*)- und (*S*)-**48**, als auch **9** beinhalten eine Tosylgruppe, welche über eine Aminosäure mit einem Benzo[*d*]thiazol-2-amin verbunden ist. Während (*R*)- und (*S*)-**48** jedoch ein 5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazol und Prolin als Aminosäure aufweist, verfügt **9** über eine 7-Chlor-4-methoxybenzo[*d*]thiazol-Struktur sowie Anthranilsäure als mittleren Baustein. Daher sollte der Hybridinhibitor **76** synthetisiert und in Enzymassays getestet werden, welcher sowohl die beiden Hydroxygruppen am Benzo[*d*]thiazol trägt, die bereits als wichtig für die Hemmung identifiziert wurden, als auch die Anthranilsäure von **9** (**Abbildung 52**).

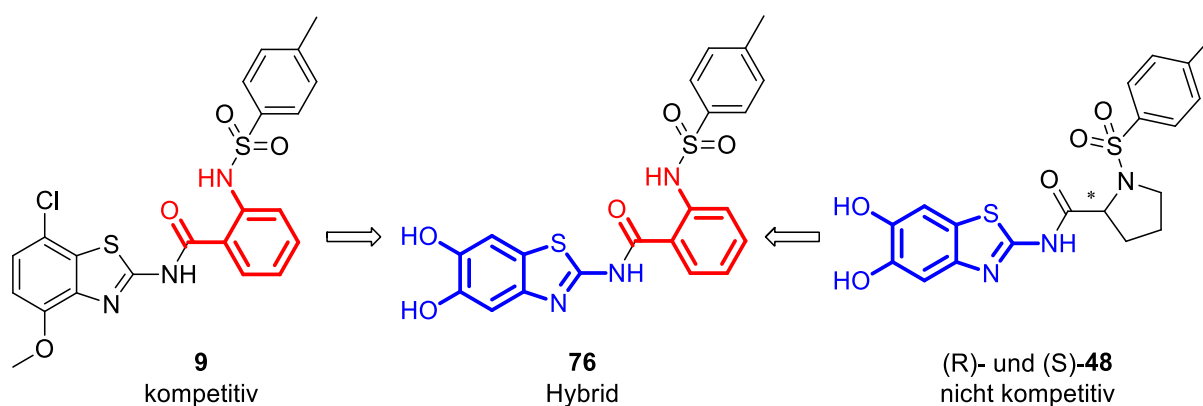


Abbildung 52: Design von **76** als Hybrid aus den Strukturen von (*R*)- und (*S*)-**48** und **9**.

3.4.2 Synthese

Die erste Strategie zur Synthese von **76** beruhte darauf, zuerst durch Kondensation von **41** und **77** **78** herzustellen, wobei die Nitrogruppe eine Schutzgruppe darstellte, welche im nächsten Schritt zu der Aminogruppe von **79** reduziert werden sollte. Darauffolgend sollte das Sulfonamid **80** hergestellt werden, das schlussendlich zu der Zielstruktur **76** entschützt werden sollte (**Abbildung 53**).

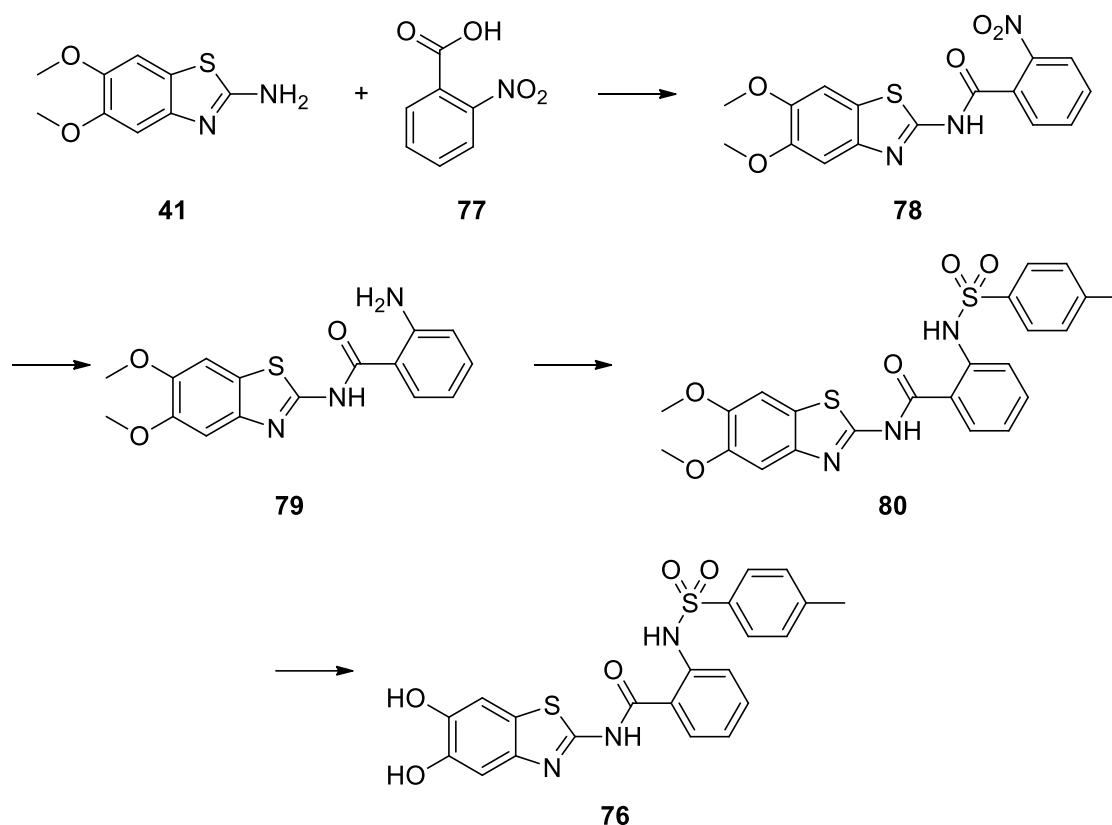
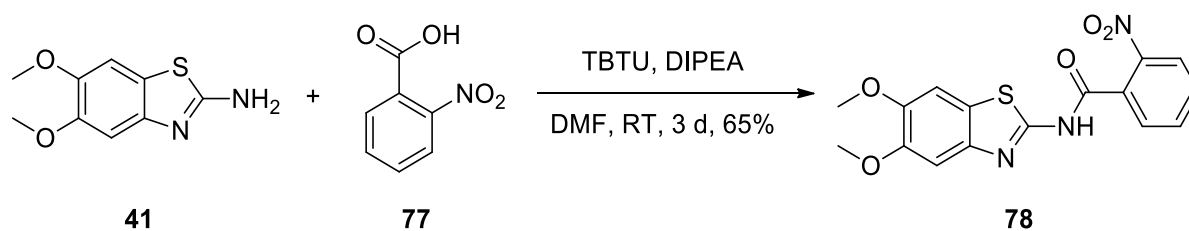


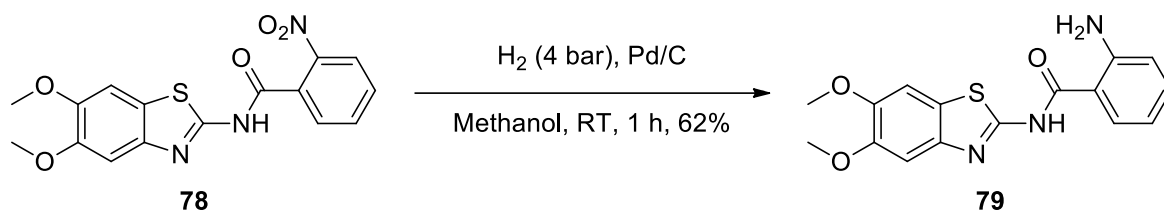
Abbildung 53: Syntheschema zur Darstellung von **76** über eine Nitrogruppe als Schutzgruppe der Aminofunktion von **79**.

Im ersten Schritt wurde durch TBTU als Kupplungsreagenz **78** mit einer Ausbeute von 65% der Theorie erhalten (**Reaktionsgleichung 16**).



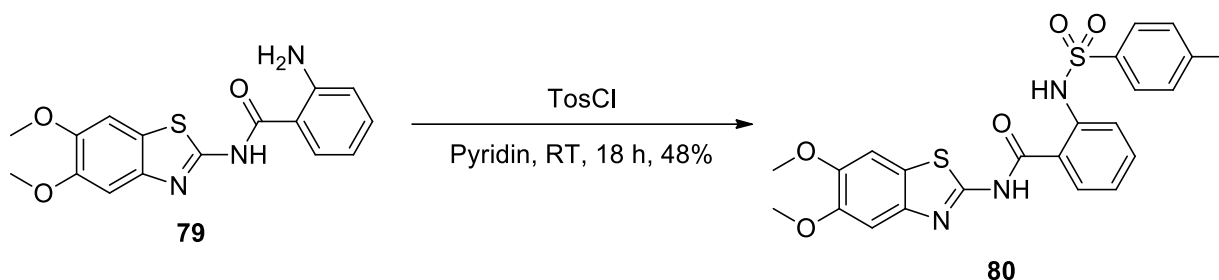
Reaktionsgleichung 16: Synthese von **78** durch TBTU vermittelte Kupplung von **41** und **77**.

Im nächsten Schritt erfolgte die Reduktion der Nitrogruppe zur Aminogruppe durch Wasserstoff mit Palladium als Katalysator. In einem ersten Ansatz mit Atmosphärendruck wurde jedoch nur ein unvollständiger Umsatz beobachtet. Bei der Verwendung von 4 bar H₂ in einem Autoklav konnte dagegen per Dünnschichtchromatographie ein vollständiger Umsatz nachgewiesen werden (**Reaktionsgleichung 17**).



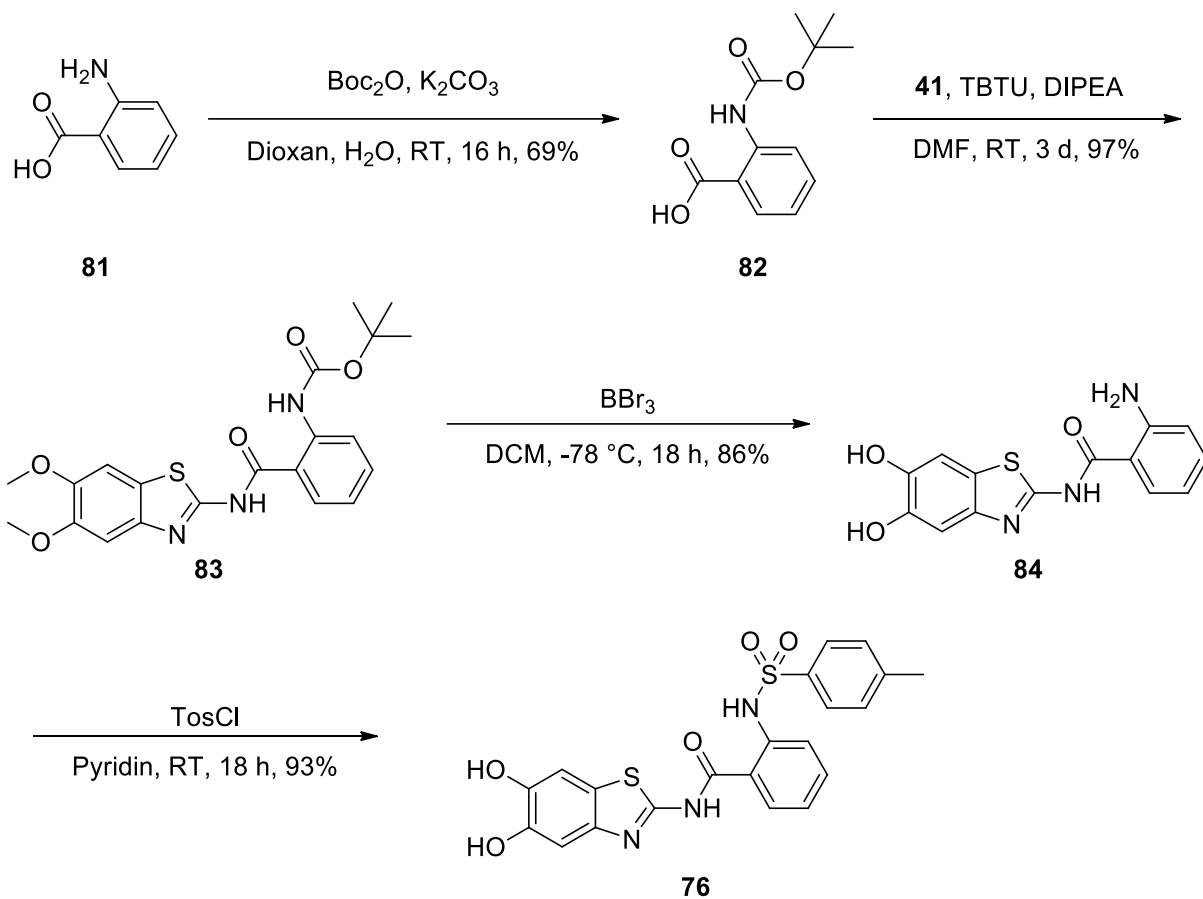
Reaktionsgleichung 17: Darstellung von **79** durch Reduktion der Nitrogruppe von **78**.

Anschließend wurde dann durch Reaktion mit Tosylchlorid die Sulfonamidgruppe ausgebildet (**Reaktionsgleichung 18**). Im Vergleich zu den Reaktionen mit anderen Aminen ohne freie Hydroxyverbindungen wurde hier jedoch eine geringere Ausbeute erzielt (vgl. 3.2.2). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass es sich in diesem Fall nicht um ein aliphatisches Amin handelt, sondern um ein aromatisches, welches durch die Carbonylgruppe in *ortho*-Position desaktiviert und damit weniger nucleophil ist (**Reaktionsgleichung 18**).



Reaktionsgleichung 18: Synthese von **80** durch Reaktion des Amins von **79** mit Tosylchlorid.

Nachfolgend wurde versucht, die Entschützung der Methoxygruppen von **80** mittels BBr_3 durchzuführen, wobei jedoch kein Produkt isoliert werden konnte, da die Sulfonamidgruppe unter diesen Bedingungen nicht stabil war. Die Strategie der Synthese wurde umgestellt und sie wurde analog der Synthese der Derivate mit Prolin durchgeführt. Anstelle der Aminosäuren wurde Anthranilsäure **81** verwendet, welche an der Aminogruppe mit einer Boc-Gruppe zu **82** versehen wurde. Anschließend wurde dieses mit **41** zu dem Amid **83** umgesetzt. Durch Entschützung mit BBr_3 wurde dann **84** erhalten, welches mit Tosylchlorid zu der Zielstruktur **76** umgesetzt wurde (**Reaktionsgleichung 19**).



Reaktionsgleichung 19: Darstellung von **76** ausgehend von Anthranilsäure **81**.

3.4.3 Testung

Bei der Testung im Enzymassay zeigte **76** sowohl eine Hemmung der ZIKV ($IC_{50} = 6.43 \pm 2.76 \mu M$), als auch der DENV2 NS2B/NS3-Protease ($IC_{50} = 15.3 \pm 2.3 \mu M$). Der IC_{50} -Wert wurde zudem bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt und in einem CORNISH-BOWDEN Plot aufgetragen, um das Inhibitionsverhalten zu untersuchen (**Abbildung 54**).^[93]

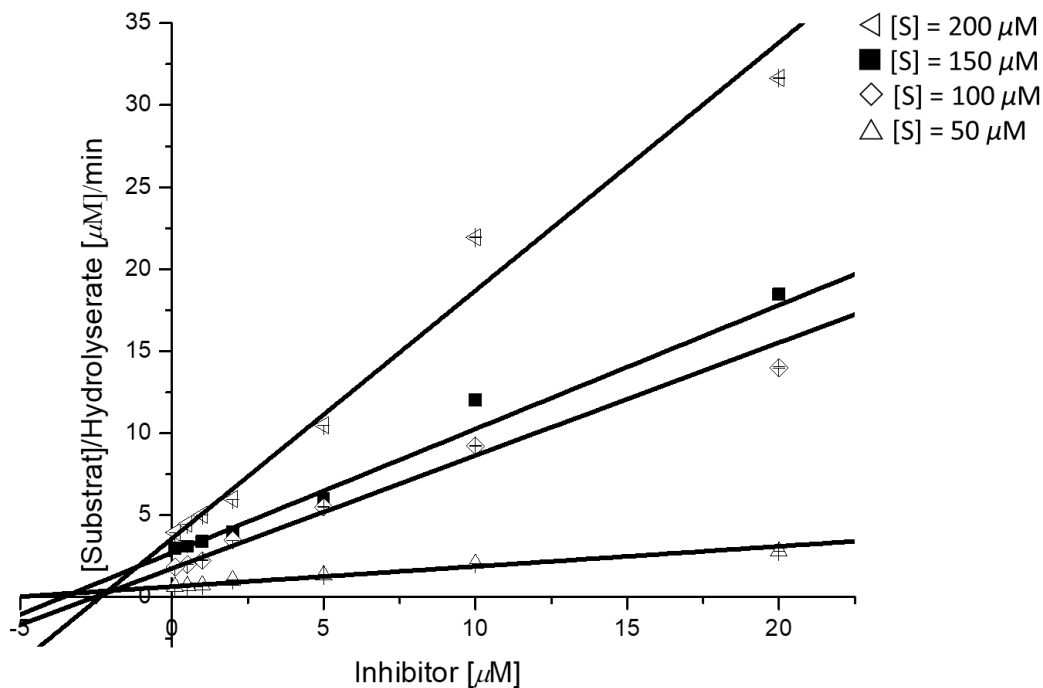


Abbildung 54: Cornish-Bowden-Plot der Hemmung der ZIKV-Protease durch **76**.^[93] Aufgetragen wurde die Konzentration des Inhibitors gegen den Quotienten aus Substratkonzentration und der Hydrolyserate. Die Werte sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Doppelbestimmungen.

In der Auftragung wurden aus den einzelnen Messungen bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen durch lineare Regression Geraden gebildet, welche sich in der Nähe der X-Achse schneiden, was auf ein nicht-kompetitives Verhalten hindeutet.

Für die Bindung in die allosterische Tasche ist somit die 5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazol-Struktur ausschlaggebend, da der Austausch der Substitution von **9** an dieser Position allein für die Änderung des Bindeverhaltens gesorgt hat. Zudem zeigt **76** im Vergleich zu den anderen Prolin-basierten Inhibitoren einen geringfügig höheren IC_{50} -Wert an der ZIKV NS2B/NS3-Protease, wodurch die Selektivität zu der DENV-Protease weniger stark ausgeprägt ist.

3.5 Aminosäureaustausch

3.5.1 Design der Inhibitoren

Der Austausch der verschiedenen Arylsulfonyle zeigte einen Einfluss auf die Hemmung der Protease, weiterhin sollte der Einfluss der Aminosäure Prolin untersucht werden. Als Leitstruktur wurden (*R*)- und (*S*)-**48** verwendet, das Benzo[*d*]thiazol und die Tosylgruppe sollten dabei erhalten werden. Zum einen sollte eine Erweiterung des Ringes stattfinden, um den Einfluss größerer, sterisch anspruchsvollerer Aminosäuren zu untersuchen. Unter anderem sollte dabei auch das Substitutionsmuster verändert werden. Zum anderen sollte untersucht werden, inwieweit der Austausch zu nicht cyclischen Aminosäuren, sowohl proteinogenen als auch nicht-proteinogenen, einen Einfluss auf die Hemmung der Protease hat.

Als erste Inhibitoren wurden durch [REDACTED] im Rahmen der Bachelorarbeit drei Derivate basierend auf Glycin **85** und den beiden Enantiomeren der Pipecolinsäure (*R*)- und (*S*)-**86** synthetisiert und getestet (**Abbildung 55**).^[117]

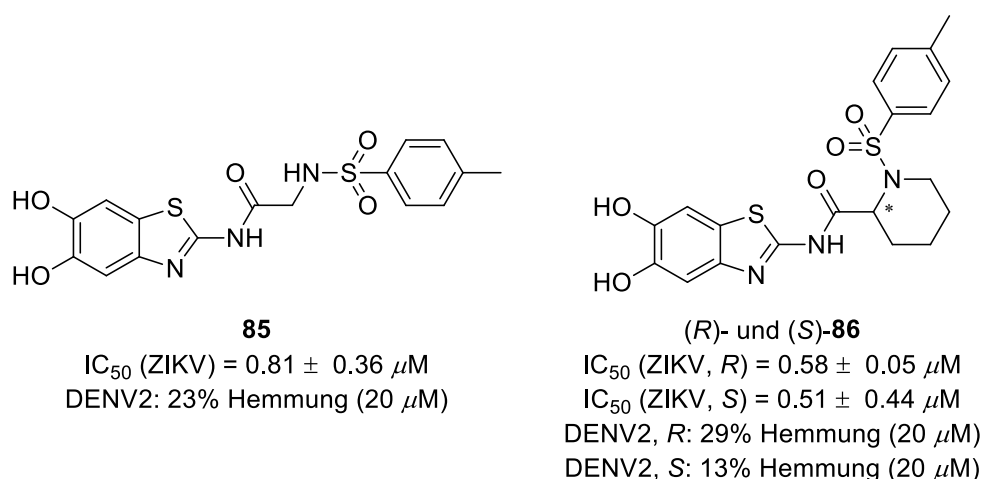


Abbildung 55: Von [REDACTED] synthetisierte und im Enzymassay getestete Inhibitoren basierend auf Glycin **85** und (*R*)- und (*S*)-Pipecolinsäure (*R*)- und (*S*)-**86**.^[117]

Da diese Inhibitoren eine Hemmung im submikromolaren Bereich erzielten, sollten nachfolgend weitere Derivate untersucht und getestet werden. Bei den cyclischen Aminosäuren sollte das Substitutionsmuster am Ring abgeändert werden und eine Überbrückung des Ringes erfolgen, um sowohl den Einfluss des Sterik als auch der Geometrie zu untersuchen. Zudem sollte durch ein Derivat mit einem Cyclohexylrest anstelle der Aminosäure der prinzipielle Einfluss der Sulfonamid-Struktur auf die Inhibition evaluiert werden (**Abbildung 56**).

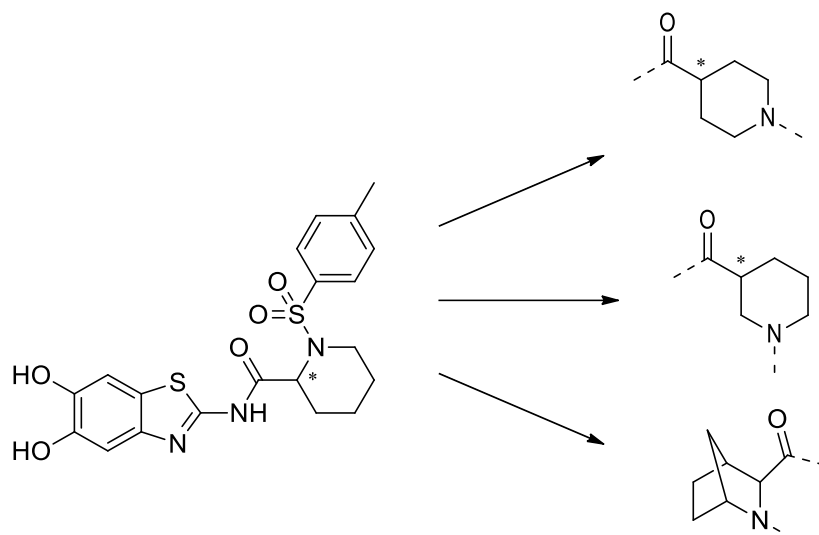


Abbildung 56: Variation von cyclischen nicht-proteinogenen Aminosäuren ausgehend von **86**.

Bei den offenkettigen Aminosäuren sollte eine Reihe mit proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren untersucht werden, um den Einfluss von sterischen Effekten und Unterschieden in der Polarität und dem Abstand des Sulfonamides zu dem Benzothiazol zu evaluieren.

3.5.2 Synthese

Da sich die Syntheseroute, welche zur Synthese der Prolin-basierten Inhibitoren verwendet wurde, bereits bei verschiedenen Strukturen bewährt hatte, sollte diese auch bei der Synthese von Inhibitoren mit verschiedenen Aminosäuren eingesetzt werden (**Abbildung 57**).

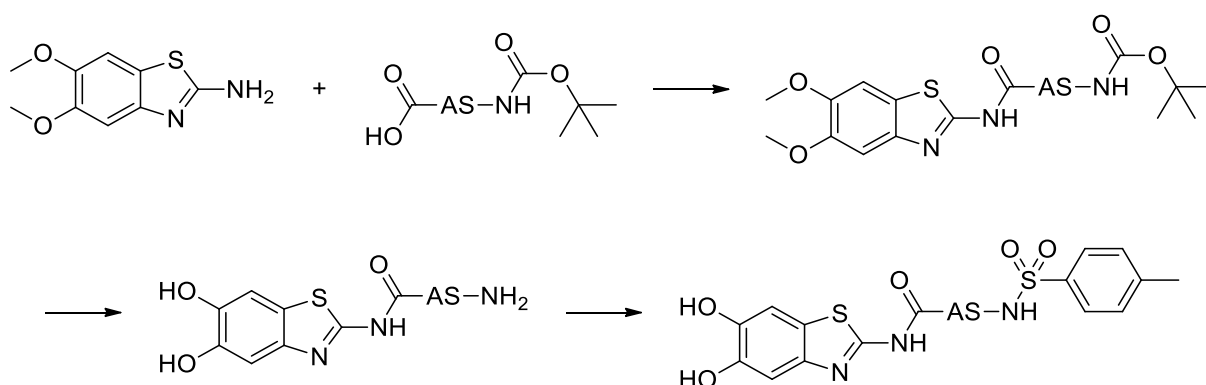
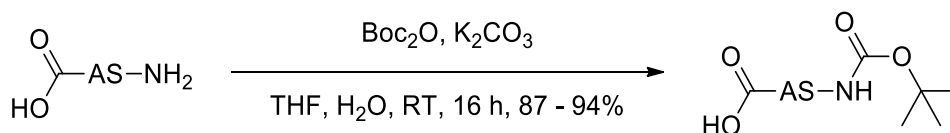


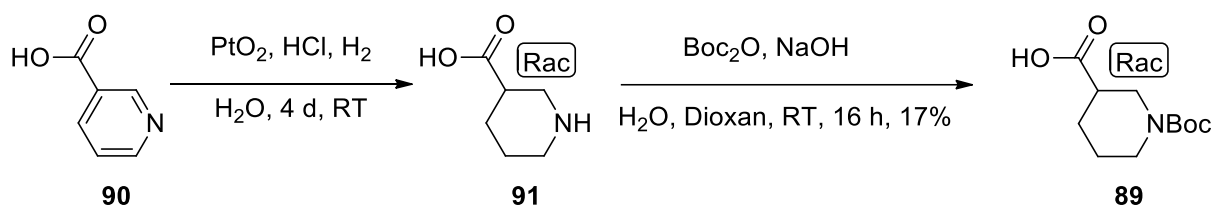
Abbildung 57: Syntheschema zur Synthese der Inhibitoren mit verschiedenen Aminosäuren (CO-AS-NH).

Einige der Boc-geschützten Aminosäuren konnten kommerziell erworben werden, andere mussten erst durch Boc-Anhydrid Boc_2O mit Kaliumcarbonat als Base geschützt werden (**Reaktionsgleichung 20**).



Reaktionsgleichung 20: Schützung der Aminogruppe durch Boc-Anhydrid.

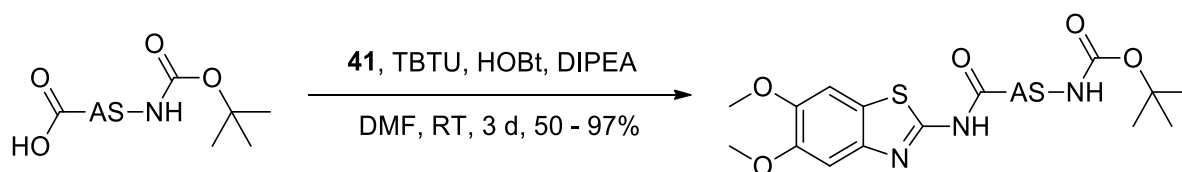
Auf diese Weise konnten β -Alanin und Piperidin-4-carbonsäure zu **87** (87%) und **88** (94%) umgesetzt werden. Im Falle der Boc-geschützten Piperidin-3-carbonsäure *rac*-**89** wurde diese erst aus Nicotinsäure **90** durch eine Reduktion mit Platinoxid als Katalysator zu **91** und direkt anschließender Schützung gewonnen (**Reaktionsgleichung 21**).



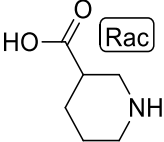
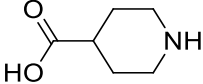
Reaktionsgleichung 21: Synthese von *rac*-**89** durch Reduktion und anschließender Schützung von Nicotinsäure **90**.

Das Produkt wurde als Racemat erhalten. Tyrosin und Aspartat wurden zum Schutz der funktionellen Gruppen in den Seitenketten mit einer weiteren Benzylgruppe versehen eingesetzt. Die Kupplung der Aminosäuren mit **41** erfolgte mittels TBTU und dem Zusatz HOBt zur Unterdrückung von Racemisierung (**Tabelle 10**).

Tabelle 10: Übersicht der Kupplung der Boc-geschützten Aminosäuren mit **41**.



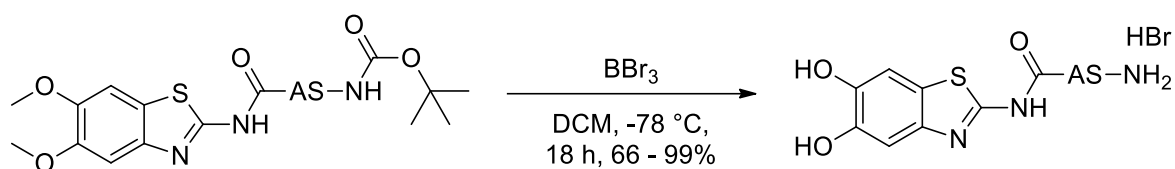
Nr.	Aminosäure ^a	Ausbeute
(<i>R</i>)- oder (<i>S</i>)- 92	(<i>R</i>)- oder (<i>S</i>)-Ala	77%
93	Ile	74%
94	Phe	72%
95	Tyr(OBn)	97%
96	Asp(OBn)	95%
97	<i>tert</i> -Leu	82%
98	β -Ala	78%

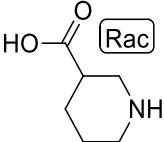
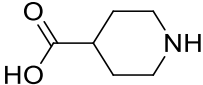
<i>rac</i> - 99		84%
100		50%

^aFalls nicht anders angegeben, wurde die (*S*)-konfigurierten Aminosäuren eingesetzt.

Da die Reaktion in allen Fällen sehr gut funktionierte, wurde im Folgenden mittels BBr_3 entschützt, wobei sowohl die Methoxygruppen am Benzo[*d*]thiazol, als auch die Boc-Gruppen und die Benzylgruppen der Seitenketten gespalten wurden (**Tabelle 11**).

Tabelle 11: Übersicht der Entschützung mittels BBr_3 .

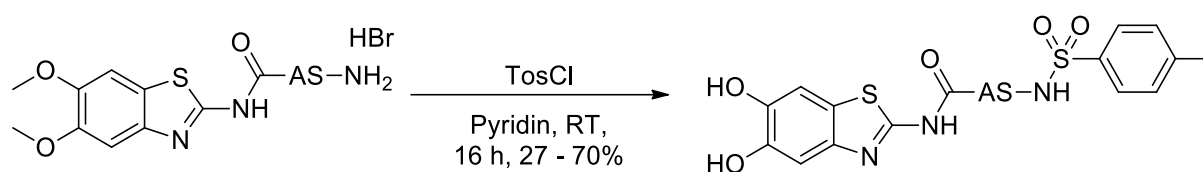


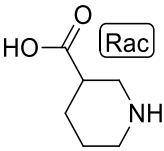
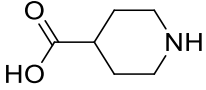
Nr.	Aminosäure ^a	Ausbeute
(<i>R</i>)- oder (<i>S</i>)- 101	(<i>R</i>)- oder (<i>S</i>)-Ala	93%
102	Ile	99%
103	Phe	86%
104	Tyr	95%
105	<i>tert</i> -Leu	66%
106	β -Ala	93%
<i>rac</i> - 107		99%
108		74%

^aFalls nicht anders angegeben, wurde die (*S*)-konfigurierten Aminosäuren eingesetzt.

Auch dieser Schritt war für alle eingesetzten Strukturen erfolgreich, wodurch im Anschluss die Umsetzung der Amine mit Tosylchlorid erfolgte (**Tabelle 12**).

Tabelle 12: Übersicht der Ausbildung der Sulfonamide mit Tosylchlorid in Pyridin.



Nr.	Aminosäure ^a	Ausbeute
(<i>R</i>)- oder (<i>S</i>)- 109	(<i>R</i>)- oder (<i>S</i>)-Ala	70%
110	Ile	39%
111	Phe	35%
112	<i>tert</i> -Leu	34%
<i>rac</i> - 113		27%
114		43%

^aFalls nicht anders angegeben, wurde die (*S*)-konfigurierten Aminosäuren eingesetzt.

Im Fall von β -Alanin und Tyrosin konnten auf dieser Stufe keine Produkte isoliert werden. Tyrosin weist im Vergleich zu den anderen Aminosäuren eine weitere aromatische Hydroxygruppe auf. Nach den Erkenntnissen zu Beginn der Synthese der verschiedenen Sulfonamide reagiert das Tosylchlorid ebenfalls mit aromatischen Hydroxygruppen, wodurch auch die geringeren Ausbeuten im Vergleich zu den Methoxyderivaten zu erklären sind. Durch die weitere Alkoholfunktion des Tyrosins kann es so zu mehr Nebenreaktionen kommen, was die Ausbeute verringert. Im Fall von Aspartat wurde nach den Erfahrungen mit Tyrosin direkt eine andere Syntheseroute angewandt.

Für die Inhibitoren, welche β -Alanin, Tyrosin und Aspartat enthalten, wurde daher die Zielstruktur mit Benzamidgruppen anstelle von Tosyl gewählt, da zwischen den beiden kein Unterschied bezüglich der Inhibition beobachtet werden konnte (vgl. 3.2.4). Die Synthese wurde analog zu den Prolin-basierten Inhibitoren durchgeführt, indem die Boc-Gruppe selektiv entschützt, anschließend das Benzamid ausgebildet und zuletzt die Hydroxygruppen freigesetzt wurden (**Abbildung 58**).

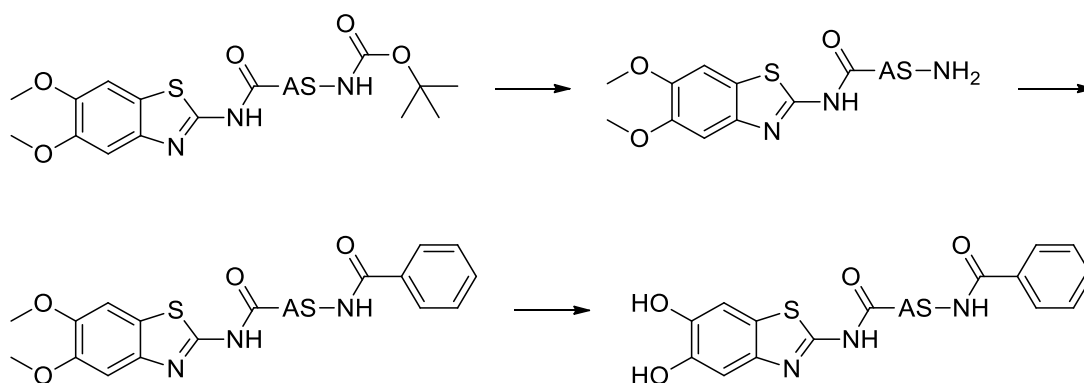
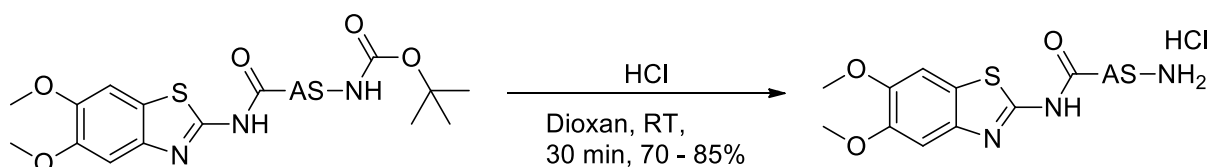


Abbildung 58: Syntheschema zu den Aminosäuren-basierten Inhibitoren mit Amidgruppe.

Ausgehend von den Derivaten nach der Amidkupplung wurde durch HCl selektiv die Boc-Gruppe abgespalten, wobei die Hydrochloride der Amine erhalten werden konnten (**Tabelle 13**).

Tabelle 13: Übersicht über die selektiven Entschützungen der Boc-Gruppe durch HCl.



Nr.	Aminosäure ^a	Ausbeute
115	β -Ala	70%
116	Tyr(OBn)	87%
117	Asp(OBn)	70%

^aFalls nicht anders angegeben, wurde die (*S*)-konfigurierten Aminosäuren eingesetzt.

Anschließend wurden durch Benzoylchlorid die Amine zu den Benzamiden umgewandelt (**Tabelle 14**).

Tabelle 14: Übersicht über die Ausbildung der Benzamide durch Benzoylchlorid.

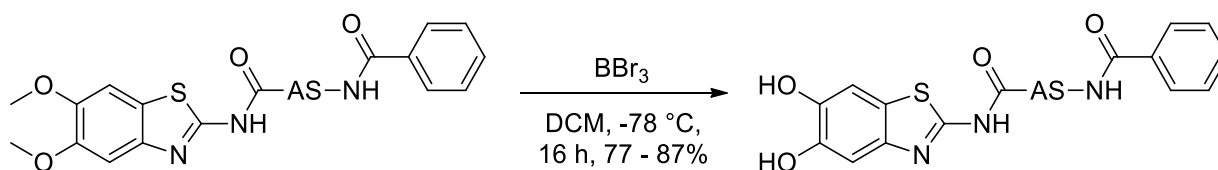


Nr.	Aminosäure ^a	Ausbeute
118	β -Ala	40%
119	Tyr(OBn)	76%
120	Asp(OBn)	71%

^aFalls nicht anders angegeben, wurde die (*S*)-konfigurierten Aminosäuren eingesetzt.

Zuletzt wurden die Methoxygruppen durch BBr_3 abgespalten, wobei auch die Benzylgruppen der Seitenketten entschützt wurden (**Tabelle 15**).

Tabelle 15: Übersicht über die Entschützung der Benzamide durch BBr_3 .

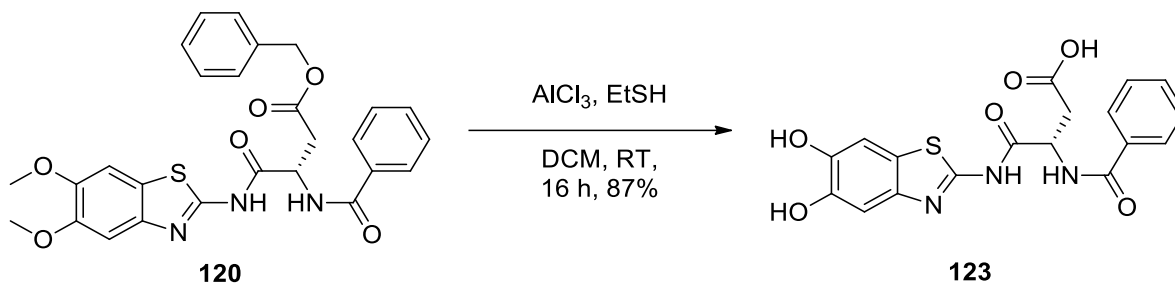


Nr.	Aminosäure ^a	Ausbeute
121	β -Ala	87%
122	Tyr	77%

^aFalls nicht anders angegeben, wurde die (*S*)-konfigurierten Aminosäuren eingesetzt.

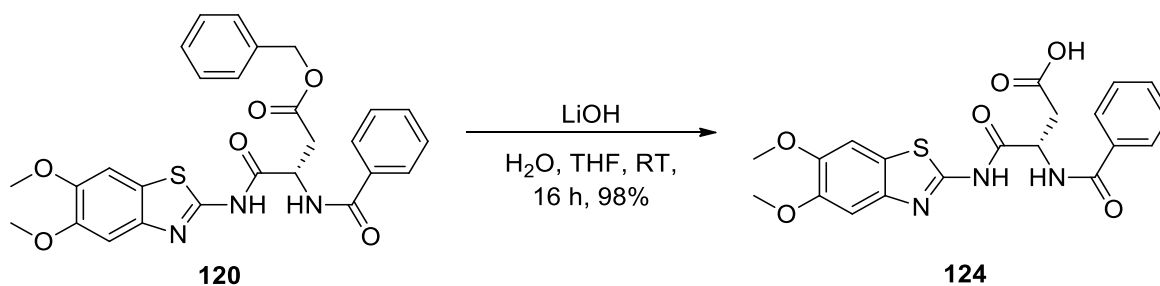
Im Fall der Entschützung von dem auf Aspartat basierenden **120** durch BBr_3 konnte kein Produkt isoliert werden. Eine Analyse der Reaktionsmischung per LC-MS ergab die Entstehung eines Produktes mit der Masse $m/z = 384.2$, welche um 18 niedriger als die der Zielstruktur **123** ($m/z = 402.2$) liegt. Dies legt eine ablaufende Kondensationsreaktion nahe, bei der Wasser abgespalten wird. Für die Entschützung mussten daher mildere Bedingungen gewählt werden. Ein Ansatz beruhte auf der Verwendung von MgI_2 in der ionischen Flüssigkeit 1-Butyl-3-methylimidazolium Tetrafluoroborat (BMIM) BF_4 . Jedoch wurde bei dieser Methode auch nach langen Reaktionszeiten und zusätzlichen Äquivalenten an MgI_2 lediglich die Abspaltung der Benzylgruppe in der Seitenkette des Aspartats beobachtet.

Als weitere Methode wurde die Entschützung von **120** mit AlCl_3 und Ethanthiol vorgenommen. Bei dieser Methode koordiniert das Aluminiumchlorid an den Sauerstoff der Methoxygruppe und das Ethanthiol dient als Nucleophil, um den Methylkohlenstoff anzugreifen.^[118] Diese Methode zeigte in der Reaktionskontrolle einen vollständigen Umsatz ohne Nebenreaktionen, es konnte eine Ausbeute von 87% der Theorie erzielt werden (**Reaktionsgleichung 22**).



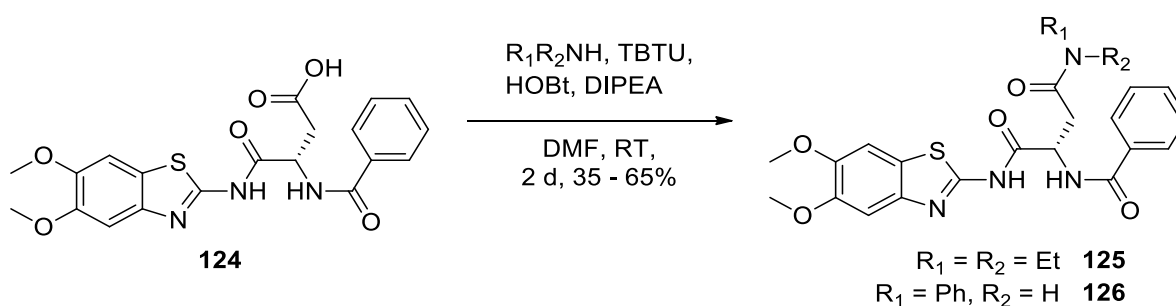
Reaktionsgleichung 22: Entschützung von **120** durch $\text{AlCl}_3/\text{EtSH}$.

Zur Darstellung von Derivaten basierend auf Asparagin wurde der Benzylester von **120** durch LiOH gespalten, um die freie Carbonsäure zu erhalten (**Reaktionsgleichung 23**).



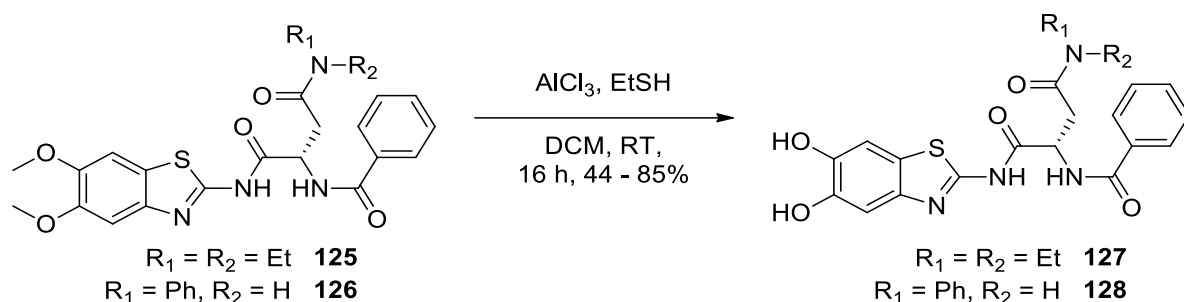
Reaktionsgleichung 23: Spaltung des Esters **120** zur Carbonsäure **124**.

Anschließend wurde aus der Carbonsäure durch Anilin und Diethylamin die entsprechenden Amide **125** und **126** hergestellt (**Reaktionsgleichung 24**).



Reaktionsgleichung 24: Darstellung der Amide **125** und **126**.

Anschließend wurden die Methoxygruppen durch AlCl_3 abgespalten und so die Asparaginderivate **127** und **128** erhalten (**Reaktionsgleichung 25**).



Reaktionsgleichung 25: Entschützung der Asparaginderivate **127** und **128**.

2-Azanobornan-1-carbonsäure sollte als weitere cyclische, nicht-proteinogene Aminosäure verwendet werden, um einen Inhibitor darzustellen, der im Vergleich zu (*R*)- und (*S*)-**86** ein starres Ringsystem aufweist, das sterisch anspruchsvoller ist. Da das Grundgerüst erst synthetisiert werden musste, sollte auch in diesem Fall das Zielmolekül **129** über eine Benzamidgruppe verfügen, um einen kürzeren Syntheseweg zu erreichen. Ausgehend von **130** sollte daher zuerst die Benzamidgruppe zu **131** eingeführt werden, anschließend eine Entschützung zu **132** erfolgen, um **133** zu erhalten, welches dann zur Zielstruktur **129** entschützt werden kann (**Abbildung 59**).

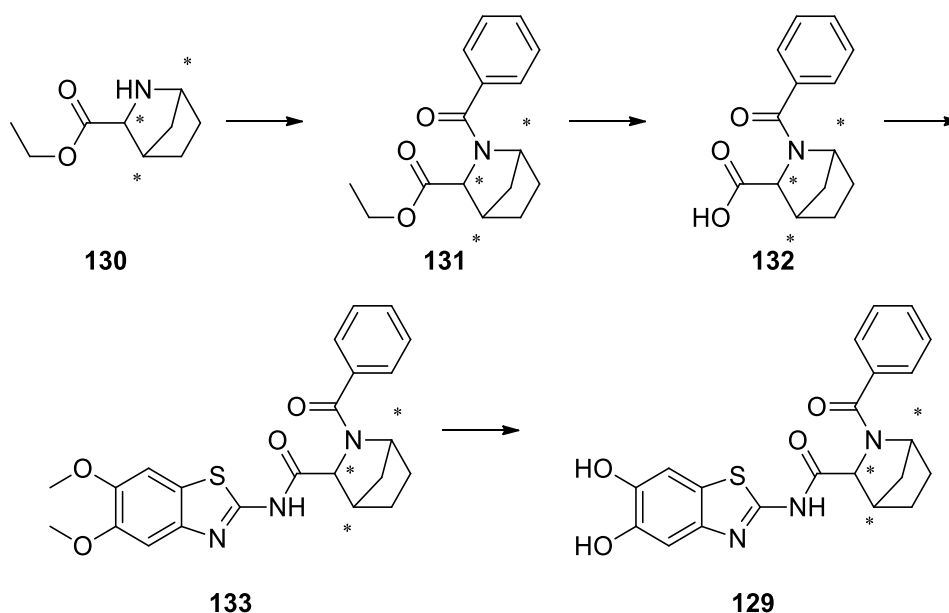


Abbildung 59: Syntheschema für die Darstellung von **129** mit einer 2-Azanobornan-1-carbonsäure als nicht-proteinogene Aminosäure.

Das Azanobornangerüst selbst sollte durch eine stereoselektive Diels-Alder-Reaktion von Cyclopentadien mit einem chiralen Imin aufgebaut werden. Das Imin **134** wird dabei *in situ* aus einem Glyoxalsäureester **135** und *R*- oder *S*-Phenylethylamin (*R*)- oder (*S*)-**136** gebildet. Die reaktive Spezies, die als Dienophil agiert, ist dabei die protonierte Form von **134**, die durch

Zugabe von Trifluoressigsäure (TFA) erhalten wird. Dabei kann es jedoch zur Ausbildung des kovalenten Adduktes **137** kommen, welche durch Zugabe von BF_3 zur Komplexierung des Trifluoracetats unterdrückt wird (**Abbildung 60**).^[119]

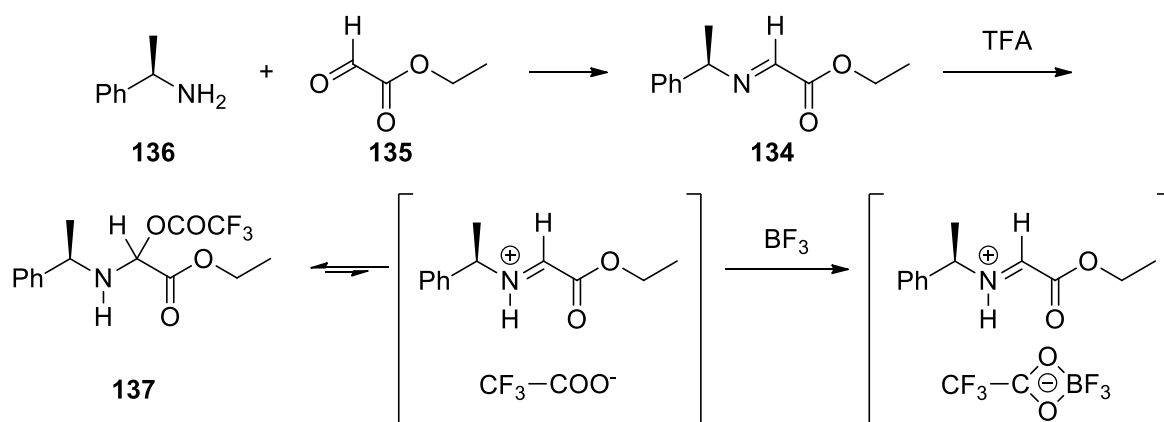


Abbildung 60: *In situ* Generierung des Imins **134** und Ausbildung des aktiven Dienophils.^[119]

Bei der Reaktion von **134** mit Cyclopentadien zu **138** können vier verschiedene endo/exo-beziehungswise Regio-Isomere entstehen (**Abbildung 61**).

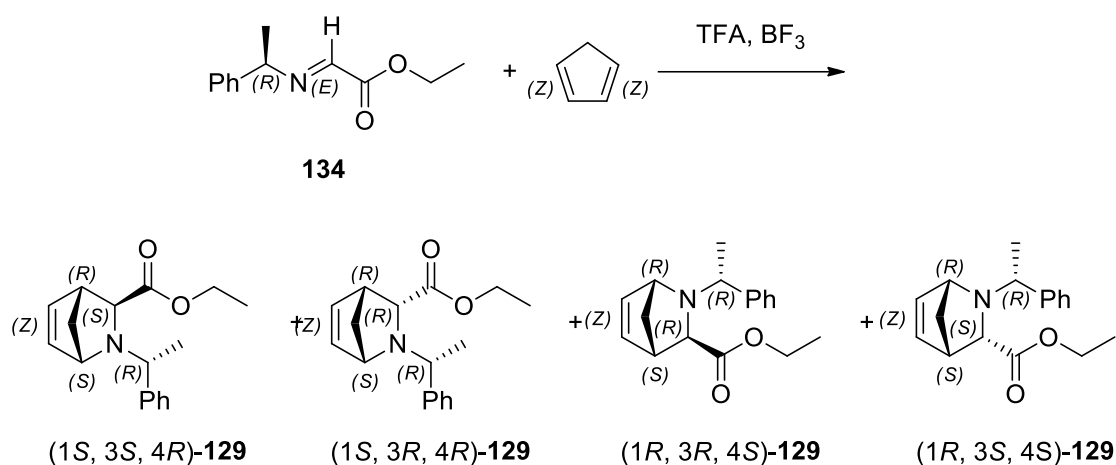


Abbildung 61: Entstehung vier verschiedener Isomere von **138** durch Diels-Alder-Reaktion von **134** mit Cyclopentadien.

Die Selektivität der Reaktion zugunsten des Exo-Produktes konnte mit Hilfe der Reaktionstemperatur kontrolliert werden. Durch eine Reaktionsführung bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ konnte eine Bevorzugung der beiden Exo-Produkte (1*S*, 3*S*, 4*R*)- und (1*R*, 3*R*, 4*S*)-**138** erreicht werden. Der Einsatz von (*R*)-**136** als Amin erzeugte eine Selektivität zugunsten von (1*R*, 3*S*, 4*S*)-**138**. Das Imin **134** liegt bei der Reaktion planar vor, aus der Ebene ragen nur die Methylgruppe und das Wasserstoffatom des chiralen Zentrums heraus. Zur Diels-Alder-Reaktion nähert sich das Cyclopentadien dem Imin von zwei Seiten: *Re* und *Si*. Durch die Methylgruppe ist eine Seite

sterisch ungünstiger und die Anlagerung von Cyclopentadien auf der *Si*-Seite bevorzugt, wodurch (1*S*, 3*S*, 4*R*)-**138** als favorisiertes Produkt entsteht (**Abbildung 62**).^[119] Wenn stattdessen (*S*)-**136** eingesetzt wird, wird als Hauptprodukt das Enantiomer (1*R*, 3*R*, 4*S*)-**138** erhalten.

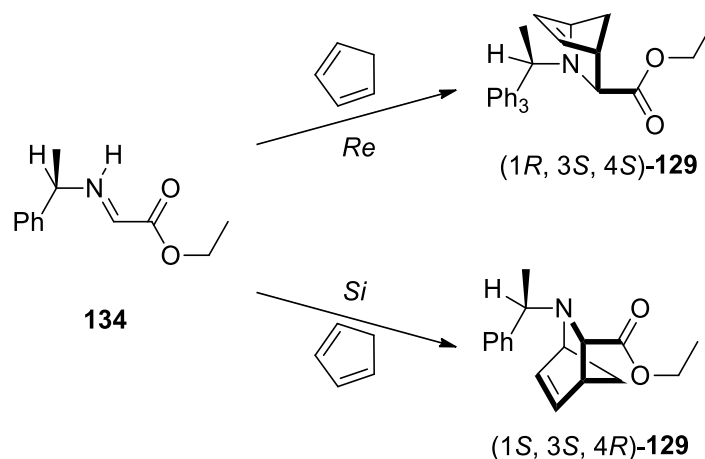
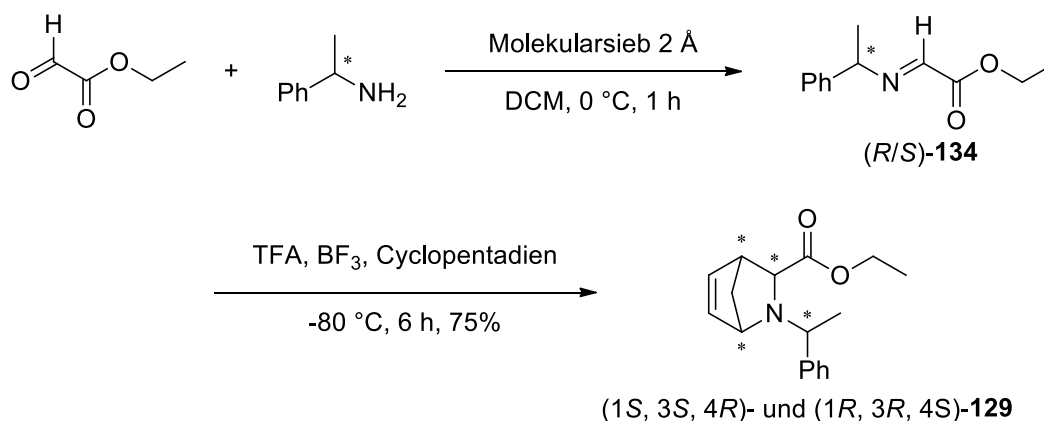


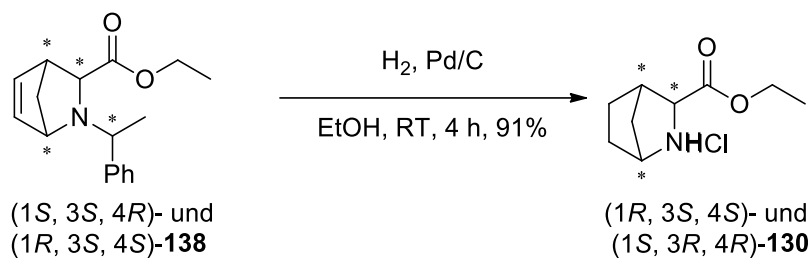
Abbildung 62: Beeinflussung der Stereoselektivität der Diels-Alder-Reaktion durch das chirale Zentrum von **134**.

Die trotzdem zu einem sehr geringen Anteil entstandenen diastereomeren Nebenprodukte wurden durch eine chromatographische Aufreinigung abgetrennt. Auf diese Weise konnten nach einer Vorschrift von TARAROV *et al.* (1*S*, 3*S*, 4*R*)- und (1*R*, 3*R*, 4*S*)-**138** mit einer Ausbeute von 75% erhalten werden (**Reaktionsgleichung 26**).^[120]



Reaktionsgleichung 26: Darstellung von (1*S*, 3*S*, 4*R*)- und (1*R*, 3*R*, 4*S*)-**138** durch eine stereoselektive Diels-Alder-Reaktion.

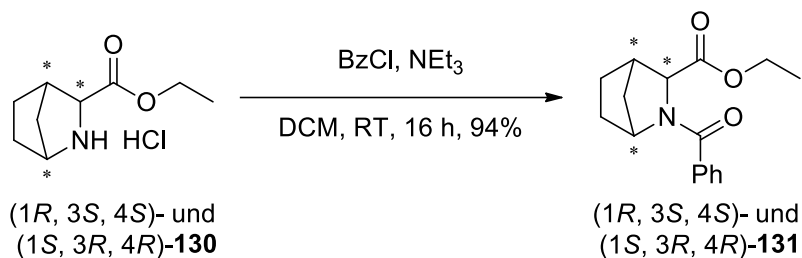
Um schließlich zu den angestrebten Aminosäuren (1*R*, 3*S*, 4*S*)- und (1*S*, 3*R*, 4*R*)-**130** zu gelangen, wurden nach einer Vorschrift von TARAROV *et al.* sowohl die Doppelbindung als auch der Phenylethylrest an der Aminogruppe durch eine Hydrierung mit Palladium als Katalysator entfernt, wobei das Hydrochlorid erhalten wurde (**Reaktionsgleichung 27**).^[120]



Reaktionsgleichung 27: Synthese von (1*R*, 3*S*, 4*S*)- und (1*S*, 3*R*, 4*R*)-**138** durch Hydrierung von (1*R*, 3*S*, 4*S*)- oder (1*S*, 3*R*, 4*R*)-**138**.

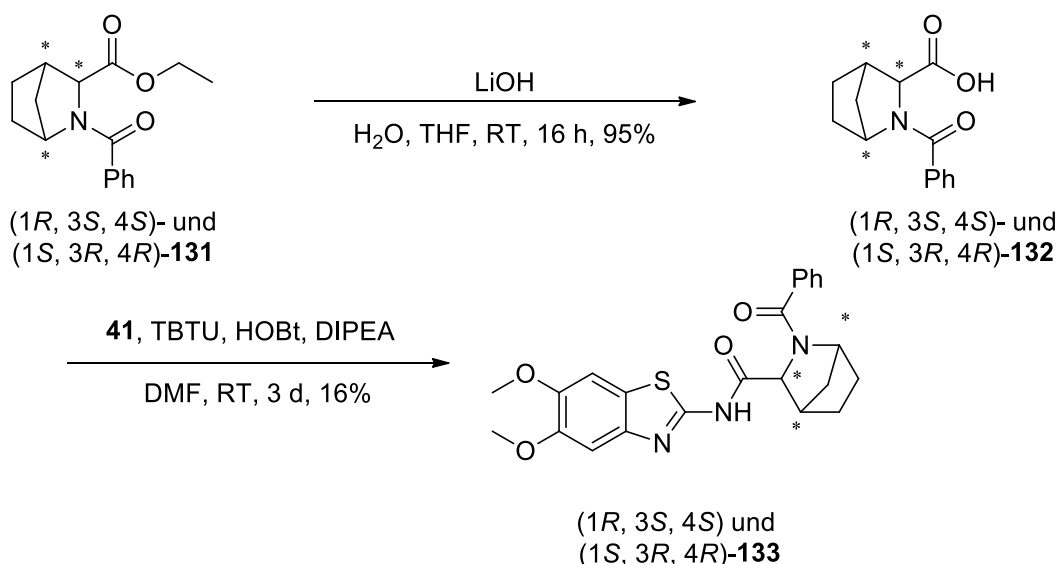
Auf dieser Stufe konnte der Erfolg der stereoselektiven Synthese bestätigt werden durch Vergleich der optischen Drehung von (1*R*, 3*S*, 4*S*)- und (1*S*, 3*R*, 4*R*)-**130** mit Werten aus der Literatur, welche übereinstimmen.^[120]

Anschließend konnte nach obigem Syntheschema weiter vorgegangen werden, indem die Benzamid (1*R*, 3*S*, 4*S*)- und (1*S*, 3*R*, 4*R*)-**131** durch Reaktion mit Benzoylchlorid ausgebildet wurden (**Reaktionsgleichung 28**).



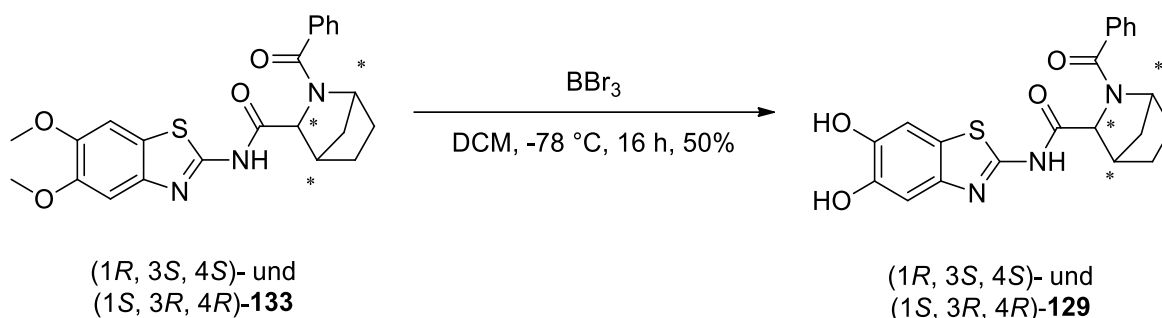
Reaktionsgleichung 28: Synthese der Benzamide (1*R*, 3*S*, 4*S*)- und (1*S*, 3*R*, 4*R*)-**131**.

Der Ester wurde durch Lithiumhydroxid gespalten, um die freien Säuren (1*R*, 3*S*, 4*S*)- und (1*S*, 3*R*, 4*R*)-**132** zu erhalten, welche mit **41** zu den Amiden (1*R*, 3*S*, 4*S*)- und (1*S*, 3*R*, 4*R*)-**133** umgesetzt wurden (**Reaktionsgleichung 29**).



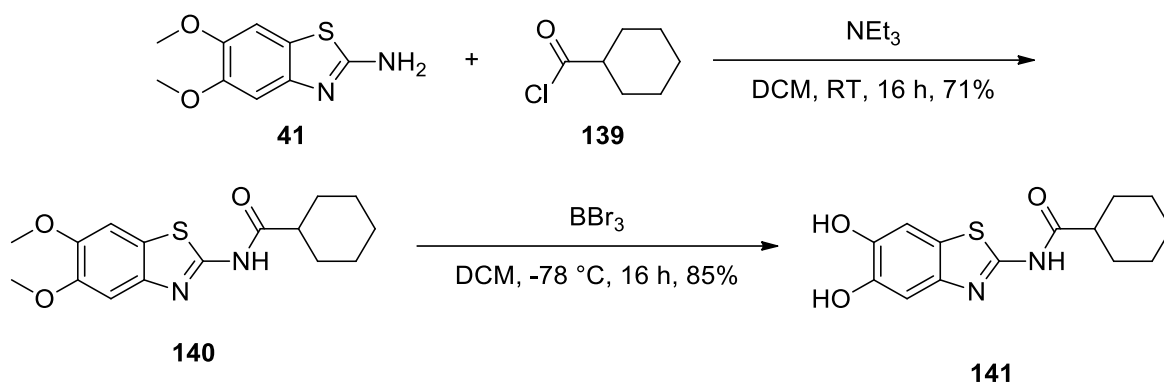
Reaktionsgleichung 29: Entschützung der Carbonsäurefunktionen von (1*R*, 3*S*, 4*S*)- und (1*S*, 3*R*, 4*R*)-**132**, gefolgt von der Kupplung mit **41** zu (1*R*, 3*S*, 4*S*)- und (1*S*, 3*R*, 4*R*)-**133**.

Im letzten Schritt wurden die Methoxygruppen von (1*R*, 3*S*, 4*S*)- und (1*S*, 3*R*, 4*R*)-**133** entschützt, um die beiden Enantiomere (1*R*, 3*S*, 4*S*)- und (1*S*, 3*R*, 4*R*)-**129** mit den freien Hydroxygruppen zu erhalten (**Reaktionsgleichung 30**).



Reaktionsgleichung 30: Entschützung von (1*R*, 3*S*, 4*S*)- oder (1*S*, 3*R*, 4*R*)-**133** zum Erhalt der Zielstrukturen (1*R*, 3*S*, 4*S*)- und (1*S*, 3*R*, 4*R*)-**129**.

Das Derivat, das an der Stelle der Aminosäuren einen Cyclohexylrest trägt, zur Untersuchung, welchen Einfluss die (Sulfon)amid-Struktur ausübt, wurde in zwei Schritten dargestellt. Im ersten wurde **41** mit Cyclohexancarbonsäurechlorid **139** zu **140** umgesetzt, um im zweiten Schritt durch BBr₃ entschützt zu werden (**Reaktionsgleichung 31**).



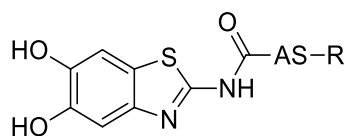
Reaktionsgleichung 31: Synthese des Cyclohexanderivates **141** mit **140** als Zwischenstufe.

3.5.3 Testung

Die synthetisierten Verbindungen wurden an der DENV2 und ZIKV NS2B/NS3-Protease in einem enzymatischen Assay getestet. Nach Ermittlung der prozentualen Hemmung bei einer Konzentration von $20\ \mu\text{M}$ wurden anschließend für Inhibitoren, welche eine Hemmung von mehr als 50% zeigten, die IC_{50} -Werte bestimmt.

Bei den cyclischen Inhibitoren zeigten dabei die Inhibitoren mit Piperidin-Gerüst und mit Carbonsäureamid in der 3- (*rac*-**113**) und 4-Position (**114**) an der ZIKV-Protease Werte im niedrigen mikromolaren Bereich, während die verbrückten Derivate ((1*R*, 3*S*, 4*S*)- und (1*S*, 3*R*, 4*R*)-**129**) nur knapp unter 50% Inhibition bei $20\ \mu\text{M}$ zeigten. In einem ähnlichen Bereich lag auch der Inhibitor ohne Sulfonamid-Struktur (**141**), wobei bei allen Substanzen eine geringere Inhibition der DENV2-Protease beobachtet wurde (**Tabelle 16**).

Tabelle 16: Ergebnisse der Testung verschiedener Inhibitoren mit cyclischen, nicht-proteinogenen Aminosäuren



Molekül-Nr.	-(CO)-AS-	Stereochemie	R	ZIKV ^a IC ₅₀ [μM]/%	DENV2 ^a IC ₅₀ [μM]/%
(<i>R</i>)- 86^b		<i>R</i>	Tos	0.58 ± 0.05	29%
(<i>S</i>)- 86^b		<i>S</i>		0.51 ± 0.44	13%
<i>rac</i> - 113		<i>rac</i>	Tos	4.55 ± 0.92	34%
114		<i>R</i>	Tos	5.95 ± 0.65	41%
(1 <i>R</i> , 3 <i>S</i> , 4 <i>S</i>)- 129		1 <i>R</i> , 3 <i>S</i> , 4 <i>S</i>	Bz	36%	27%
(1 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>R</i>)- 129		1 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>R</i>	Bz	44%	28%
141		-	-	36%	20%

^aAngegeben ist die prozentuale Inhibition bei einer Konzentration des Inhibitors von 20 μM oder der IC₅₀-Wert. Die Mittelwerte und Standardfehler stammen aus jeweils drei unterschiedlichen Messungen, jeweils als Doppelbestimmung durchgeführt. ^bSynthese und Testung wurden von [REDACTED] durchgeführt.^[117]

Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass die relative Position des Carbonsäureamids zum Stickstoffatom des Piperidins wichtig für die Inhibition ist, wobei die 2-Position in beiden Enantiomeren bevorzugt wird. Im Vergleich wiesen *rac*-**113** und **114** IC₅₀-Werte auf, welche um ca. den Faktor 10 höher lagen. In dem von [REDACTED] durchgeführten Docking-Studien zeigten (*R*)- und (*S*)-**86** ähnlich zu (*R*)- und (*S*)-**48** eine stabile Positionierung der 5,6-

Dihydroxybenzo[*d*]thiazol-Einheit, wobei die Tosylreste durch die Unterschiede im Stereozentrum in verschiedene Richtungen weisen (**Abbildung 63A**). Dagegen zeigt bei **114** der Tosylrest durch die andere Substitution des Piperidinringes weiter von der Tasche weg, wodurch die geringere Inhibition der Protease zu erklären ist (**Abbildung 63B**).

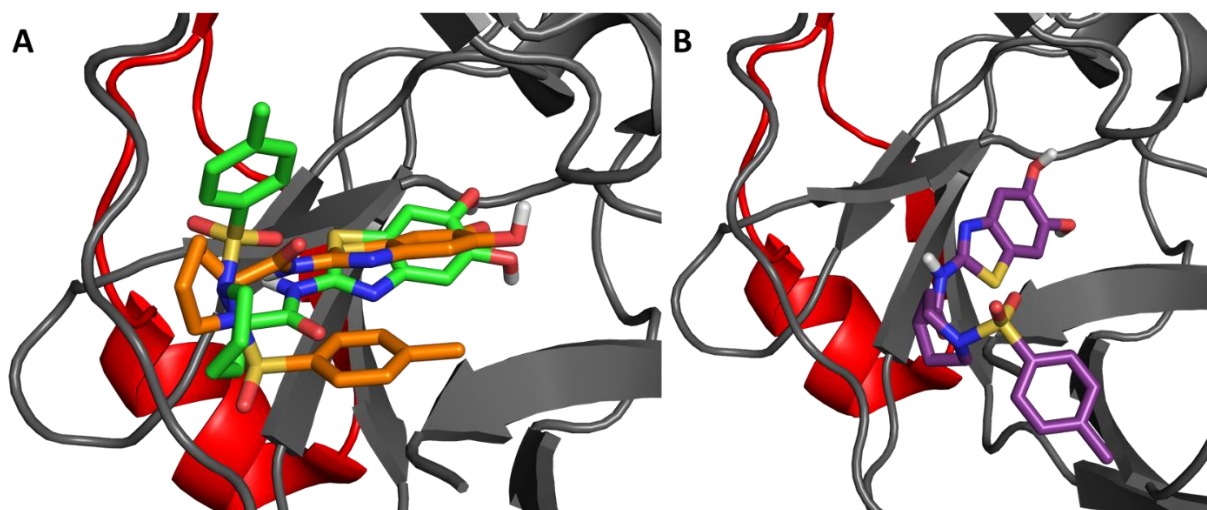


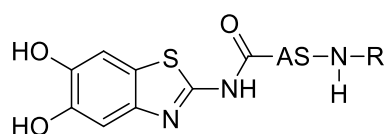
Abbildung 63: Per Docking vorhergesagte Bindeposen von (*R*)- und (*S*)-**86** (**A**) und **114** (**B**) in der allosterischen Tasche der DENV2 NS2B/NS3-Protease (PDB ID: 2FOM^[53]). Das Docking wurde durchgeführt von [REDACTED]. Das Enzym ist als Cartoon dargestellt, NS2B in rot und NS3 in schwarz. Die Inhibitoren sind in Stabform dargestellt, mit Farbkodierung nach Elementen: Kohlenstoff: grün ((*R*)-**86**), orange ((*S*)-**86**), violett (**114**), Sauerstoff: rot, Stickstoff: blau, Wasserstoff: weiß, Schwefel: gelb. Die Grafik wurde erstellt mit PyMOL.^[38]

Im Fall von (1*R*, 3*S*, 4*S*)- und (1*S*, 3*R*, 4*R*)-**129** bewirkt das 2-Azanorboman-Gerüst im Vergleich zum Piperidin der anderen Derivate zum einen eine weniger flexible Struktur, was einen entropischen Vorteil bringen kann, zum anderen einen kleineren Winkel und einen größeren sterischen Anspruch. Während ausgehend von Dockingstudien von (*R*)- und (*S*)-**86** der Winkel zwischen dem Carbonsäureamid und dem Sulfonamid vermutlich weniger ein Problem darstellt, kann das größere, unpolare und starre Gerüst zu der verringerten Hemmung geführt haben.

Das Derivat ohne Sulfonamid **141** zeigt schließlich, dass die Anwesenheit des Sulfonamids ein wichtiger Faktor für die Inhibition ist. Der Austausch des Tosylrestes gegen verschiedene andere aromatische Reste hatte einen weniger großen Einfluss, jedoch ist es für die Inhibition wichtig, dass die Sulfonamidgruppe vorhanden ist, was auf eine Wasserstoffbrückenbindung im Bereich des Sulfonamides oder eine hydrophobe Interaktion im Bereich des Aromaten hindeutet. Letztere wurde auch im Docking von (*R*)- und (*S*)-**86** beobachtet.

Betrachtet man die Derivate mit verschiedenen acyclischen Aminosäuren, wies das auf Alanin basierende (*S*)-**109** eine schwächere Inhibition im Vergleich zu (*R*)-**109** auf, letzteres besitzt einen IC₅₀-Wert im niedrigen mikromolaren Bereich. Die meisten Verbindungen besaßen Werte in diesem Bereich, mit Ausnahme der auf Aspartat und β -Alanin basierenden **123** und **121**, die eine geringere Inhibition zeigten (**Tabelle 17**).

Tabelle 17: Ergebnisse der Testung verschiedener Inhibitoren mit acyclischen Inhibitoren.



Molekül-Nr.	Aminosäure CO-AS-NH	Stereochemie	R	ZIKV ^a IC ₅₀ [μ M]/%	DENV2 ^a IC ₅₀ [μ M]/%
85^b	Gly	-	Tos	0.81 \pm 0.36	23%
(<i>S</i>)- 109	Ala	<i>S</i>	Tos	26%	14%
(<i>R</i>)- 109		<i>R</i>		6.48 \pm 0.79	39%
110	Ile	<i>S</i>	Tos	5.35 \pm 0.33	33%
111	Phe	<i>S</i>	Tos	3.66 \pm 0.49	33%
122	Tyr	<i>S</i>	Bz	4.59 \pm 8.30	23%
123	Asp	<i>S</i>	Bz	45%	32%
127	Asn(NEt ₂)	<i>S</i>	Bz	13%	16%
128	Asn(NHPh)	<i>S</i>	Bz	5.48 \pm 0.35	9.95 \pm 0.34
112	<i>tert</i> -Leu	<i>S</i>	Tos	5.74 \pm 0.79	44%
121	β -Ala	-	Bz	38%	23%

^aAngegeben ist die prozentuale Inhibition bei einer Konzentration des Inhibitors von 20 μ M oder der IC₅₀-Wert. Die Mittelwerte und Standardfehler stammen aus jeweils drei unterschiedlichen Messungen, jeweils als Doppelbestimmung durchgeführt. ^bSynthese und Testung wurden durchgeführt von [REDACTED].^[117]

Die vergleichbare Hemmung durch (*R*)-**109**, **110**, **111** und **112** lässt sich dadurch erklären, dass alle Moleküle aus Aminosäuren mit unpolaren Seitenketten aufgebaut sind (Alanin, Isoleucin, Phenylalanin, *tert*-Leucin) und somit ähnliche Eigenschaften aufweisen. Der auf Tyrosin basierende Inhibitor **122** verfügt im Vergleich zu dem auf Phenylalanin basierenden **111** über eine weitere Hydroxygruppe und, bedingt durch den synthetischen Aufbau des Moleküls, über eine Benzoylgruppe anstelle des Tosyls. Letzteres hatte jedoch bisher keinen Einfluss auf die Inhibition (vgl. 3.2.4), jedoch ist im Fall der Sulfonamide der offenkettigen Aminosäuren eine zusätzliche saure Gruppe vorhanden. Diese Veränderung hat jedoch keinen großen Einfluss auf die inhibitorische Aktivität, wie der Vergleich zwischen **122** und **111** zeigt. Auch die Hydroxygruppe hat hier zu keinem signifikanten Unterschied in der Inhibition geführt. Im Vergleich dazu weist das auf Aspartat basierende Derivat **123** eine deutlich schwächere Inhibition auf, was durch die negative Ladung verursacht werden kann, welche offenbar keine günstigen Wechselwirkungen in der allosterischen Tasche ausbilden kann. Das Asparaginderivat **127**, welches über zwei Ethylgruppen am Amid verfügt, zeigte eine noch schwächere Inhibition bei 20 μM . Dagegen wies **128**, welches über einen Phenylrest am Asparagin verfügt, einen IC_{50} -Wert im niedrigen mikromolaren Bereich an der ZIKV-Protease auf und ist auch gegenüber der DENV2-Protease aktiver als andere Derivate. Unpolare Reste in diesem Bereich des Moleküls sind somit günstiger für die Inhibition, verglichen mit polaren oder sogar geladenen Resten.

Ebenfalls zu einer signifikanten Verringerung der Inhibition führte der Austausch von Glycin in **85** zu β -Alanin in **121**, wobei auch in diesem Fall aus synthetischen Gründen der Austausch von Tosyl zu Benzoyl erfolgte. Während bei **85** die vorhergesagte Pose auch in diesem Fall die typische Positionierung des 5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazols beinhaltet, ist das Tosyl im Falle von **85** an der Außenseite der Tasche positioniert (**Abbildung 64**).

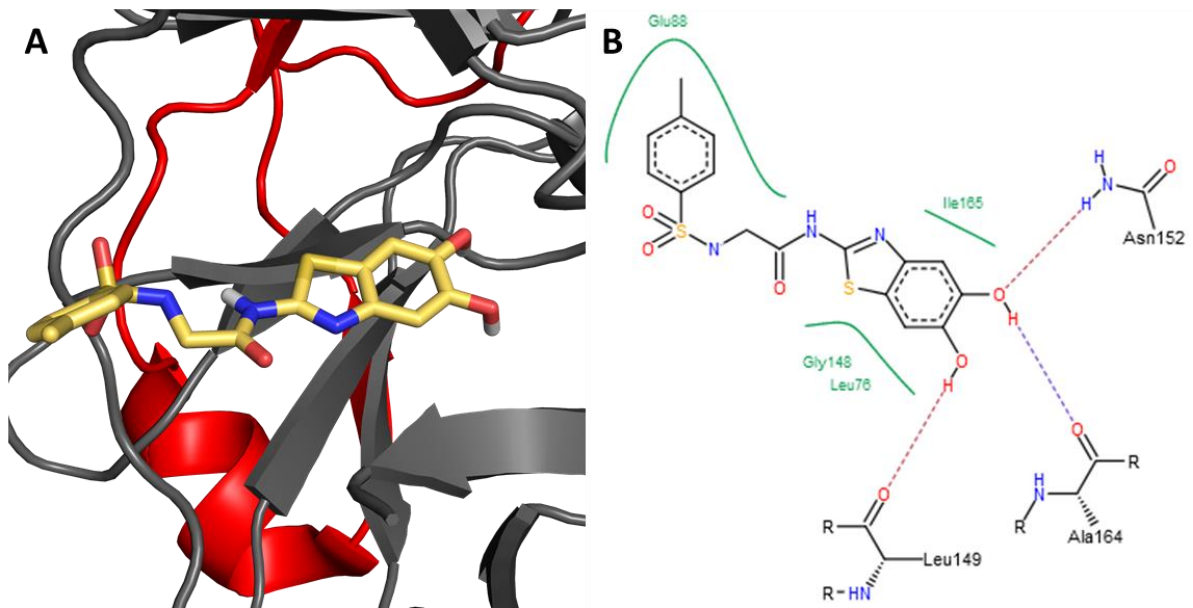


Abbildung 64: Per Docking vorhergesagte Bindepose (A) und schematische Darstellung der Interaktionen (B) von **85** in der allosterischen Tasche der DENV2 NS2B/NS3-Protease (PDB ID: 2FOM^[53]). Das Docking wurde durchgeführt von [REDACTED]. Das Enzym ist als Cartoon dargestellt, NS2B in rot und NS3 in schwarz. Der Inhibitor ist in Stabform dargestellt, mit Farbkodierung nach Elementen: Kohlenstoff: ocker, Sauerstoff: rot, Stickstoff: blau, Schwefel gelb, Wasserstoff: weiß. Die Grafik wurde erstellt mit PyMOL.^[38]

Ähnlich den verschiedenen Piperidincarbonsäurederivaten kann auch in diesem Fall der um eine Methylengruppe verlängerte Abstand von Tosylamid zu dem Benzo[*d*]thiazol zu einer weniger günstigen Wechselwirkung führen. Somit bleibt das auf Glycin basierende Derivat **85** im Fall der offenkettigen Aminosäuren der Inhibitor mit dem niedrigsten IC₅₀-Wert (IC₅₀ (ZIKV) = 0.81 ± 0.36 μM).

3.6 Cyclische Inhibitoren

3.6.1 Design der Inhibitoren

Durch die offene Struktur der allosterischen Tasche der DENV und ZIKV NS2B/NS3-Protease (vgl. 1.3.2) wurden Diketopiperazin-Strukturen, welche eine größere Zahl an Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können, als mögliche neue Inhibitorstrukturen in Betracht gezogen. Um die bisher als wichtig betrachtete Catecholgruppe beizubehalten, sollten diese Strukturen auf Dopa basierend aufgebaut werden. Ein Docking dieser Strukturen wurde von [REDACTED] im Rahmen seines Forschungsmoduls durchgeführt und zwei Strukturen konnten von [REDACTED] im Rahmen seiner Masterarbeit synthetisiert und in Enzymassays untersucht werden (**Abbildung 65**).^[121,122]

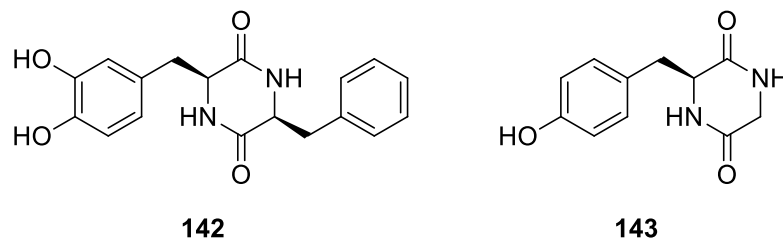


Abbildung 65: Diketopiperazine als neue Strukturen und potentielle Inhibitoren der DENV und ZIKV NS2B/NS3-Protease.^[121]

Beide Verbindungen zeigten jedoch bei einer Konzentration von 20 μ M keine Inhibition der Proteasen. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Catecholgruppen allein für die Bindung nicht ausreichen. Daher sollten Inhibitoren synthetisiert werden, welche auch die 5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazol-Struktur beinhalten. Zuerst sollte **144** als Grundstruktur synthetisiert und getestet werden. Um der Größe der allosterischen Tasche Rechnung zu tragen, wurde außerdem **145** angestrebt, das mit einer Diketodiazebin-Struktur einen im Vergleich zu **144** größeren Ring aufweist (**Abbildung 66**).

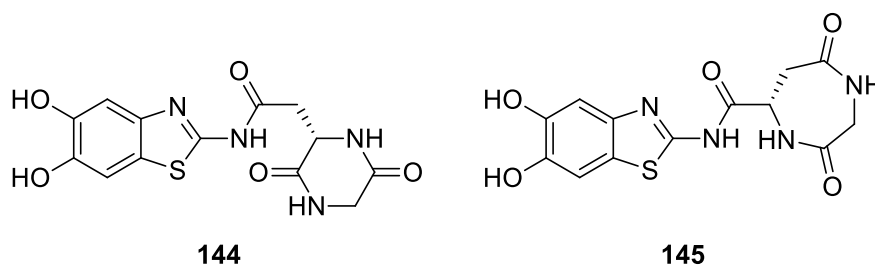


Abbildung 66: Potentielle Inhibitoren basierend auf Diketopiperazin **144** und Diketodiazebin **145**.

Daneben sollte das auf einer Benzo[*e*][1,4]diazepin-Struktur basierende **146** synthetisiert und untersucht werden. Dieses weist ebenfalls die Catecholgruppe auf, das Benzo[*d*]thiazol wird jedoch durch Benzo[*e*][1,4]diazepin ersetzt, welches etwas größer ist, jedoch ebenfalls die Möglichkeit für Wasserstoffbrückenbindungen bietet (**Abbildung 67**). **146** sollte hierbei ebenfalls als Grundstruktur fungieren, welche in weiteren Schritten durch den Einsatz anderer Aminosäuren anstelle des in der Struktur enthaltenen Glycins in verschiedene Richtungen modifiziert werden kann.

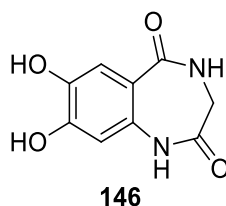
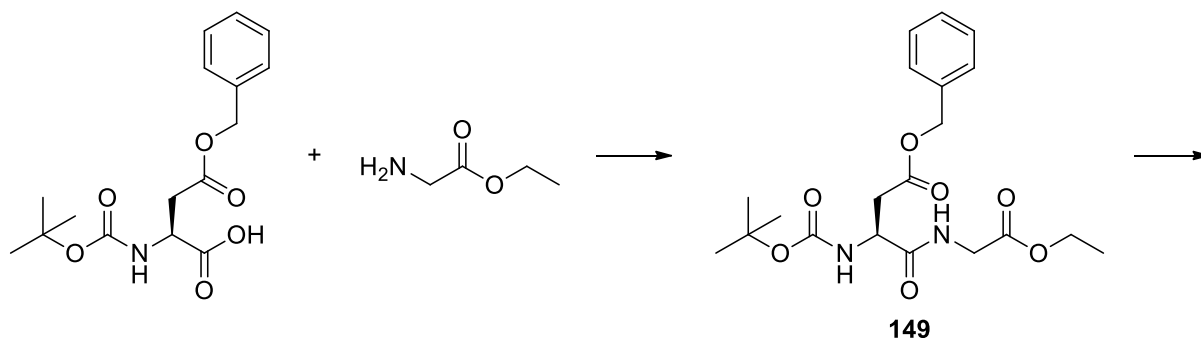


Abbildung 67: **146** als Zielstruktur, um die Möglichkeit von Benzo[*e*][1,4]diazepinen als neue Grundstruktur für Inhibitoren zu untersuchen.

3.6.2 Synthese

Die Grundidee des Syntheseweges zu **144** bestand darin, das Dipeptid **147** zu erhalten, welches in der Seitenkette von Aspartat mit dem Amin von 5,6-Dimethoxybenzo[*d*]thiazol verbunden ist. Von **147** ausgehend sollte dann durch Entschützungen und Ringschluss **148** aufgebaut werden, das dann zu **144** entschützt werden sollte.

Zum Aufbau von **147** sollte von einem Dipeptid **149** aus Aspartat und Glycin ausgegangen und nach Entschützung der Aspartat-Seitenkette zu **150** mit **41** zu **147** gekuppelt werden (**Abbildung 68**).



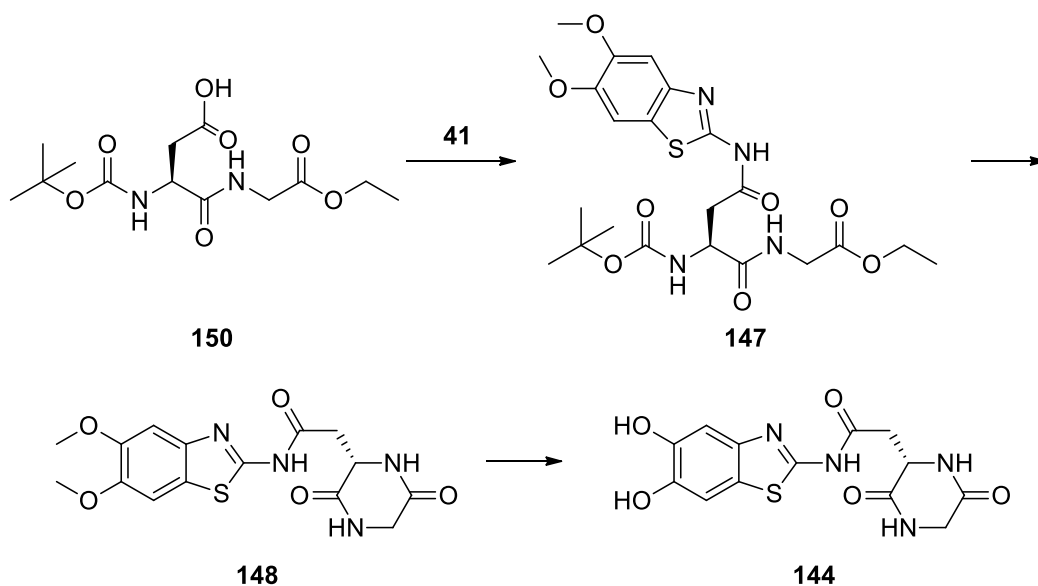
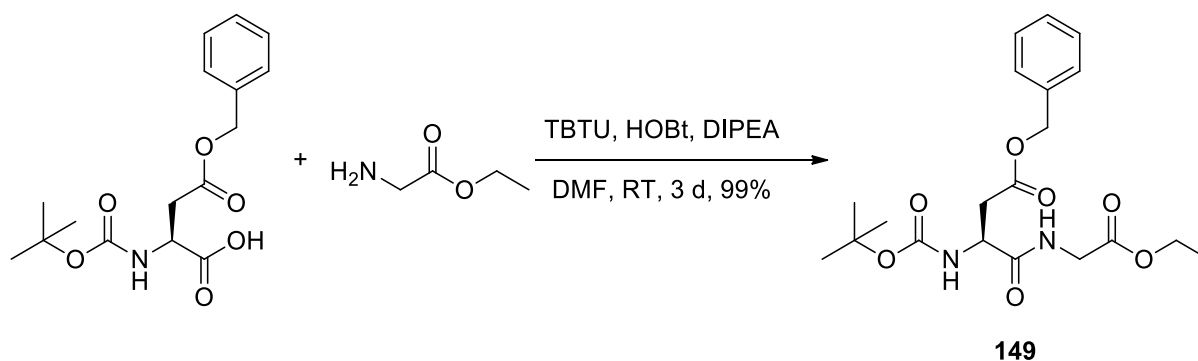


Abbildung 68: Syntheschema zum Aufbau von **144** über das Dipeptid **149**.

Im ersten Schritt wurde daher das Dipeptid **149** aus Boc-Asp(OBn)-OH und Glycinethylester Hydrochlorid durch Kupplung mit TBTU dargestellt (**Reaktionsgleichung 32**).



Reaktionsgleichung 32: Synthese von **149** aus geschütztem Aspartat und Glycin.

Anschließend sollte der Benzylester entschützt werden, damit die freie Carbonsäure im nächsten Schritt zum Amid **147** umgewandelt werden kann. Durch Hydrierung mit Palladium als Katalysator konnte diese Stufe nicht realisiert werden. Eine Vermutung bestand darin, dass durch den Glycin-Rest Nebenreaktionen stattfinden.

Daher sollte in der folgenden Syntheseroute die Amidbildung zwischen der Carbonsäure in der Seitenkette des Aspartats und **41** vor der Amidbildung zwischen Aspartat und Glycin durchgeführt werden. Dazu musste zuerst das zweifach geschützte Aspartat **151** mit freier Seitenkette erhalten werden, ausgehend von Boc-Asp(OBn)-OH, welches zum Methylester **154** umgewandelt werden kann, gefolgt von der Abspaltung der Benzylgruppe zu **151**. Dieses sollte

dann mit **41** zu **152** verknüpft werden, woraus nach Abspaltung der Boc-Gruppe zu **153** und Kupplung mit Boc-Glycin der Methylester **155** erhalten werden sollte (**Abbildung 69**).

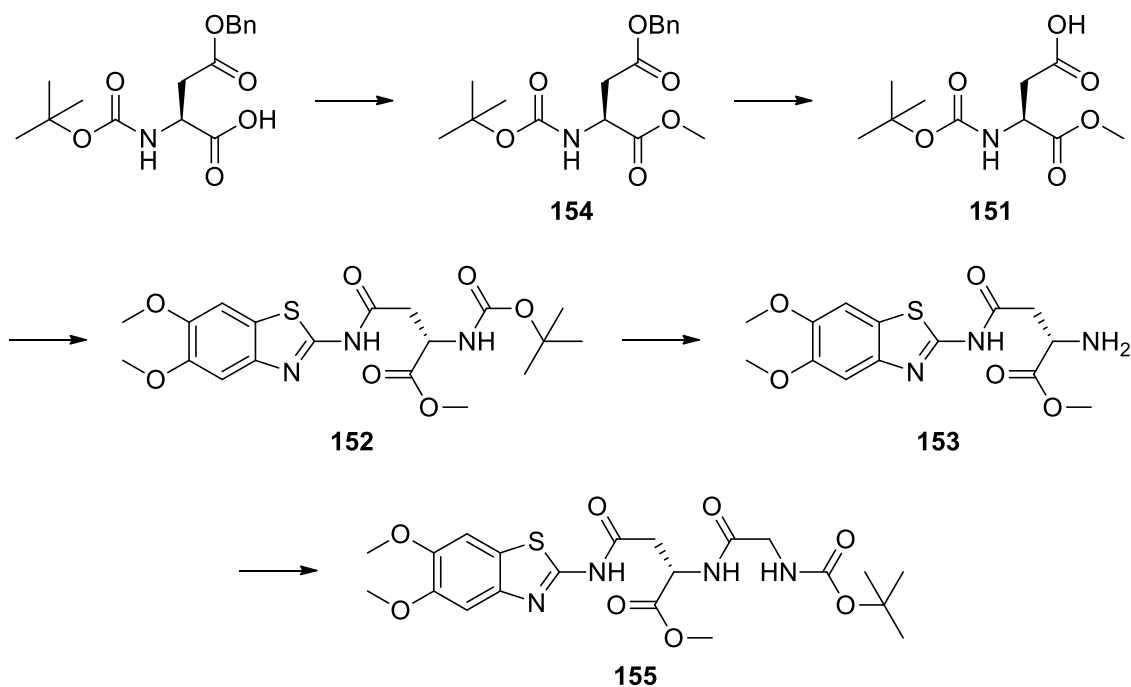
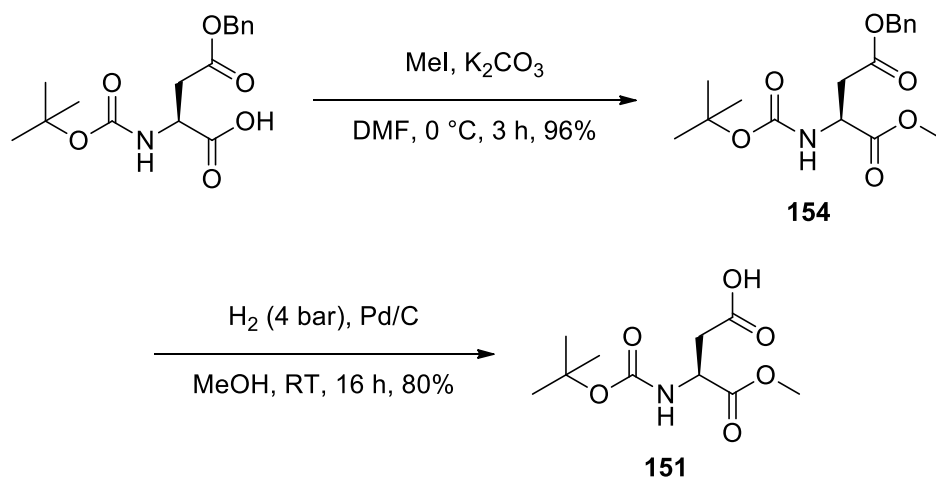
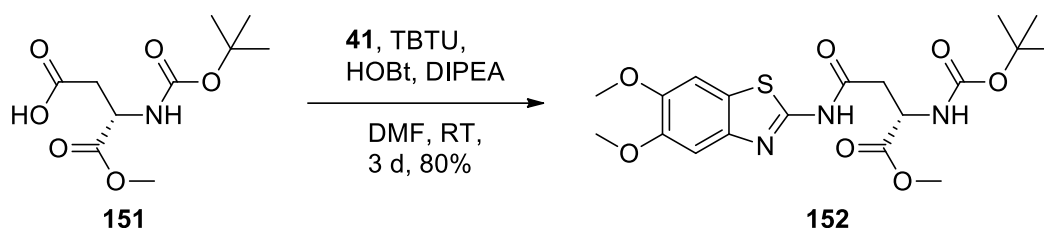


Abbildung 69: Syntheschema zur Darstellung von **155** über die Amidbildung zwischen Aspartat und Benzothiazol **41**, vor dem Anknüpfen des Glycins.

In der ersten Stufe wurde nach einer Vorschrift von JIANG *et al.*^[123] durch Methyliodid und K₂CO₃ als Base die Carbonsäuregruppe von Boc-Asp(OBn)-OH zum Methylester **154** durch eine nucleophile Substitution umgesetzt und anschließend die Benzylgruppe durch Wasserstoff und Palladium auf Aktivkohle als Katalysator entfernt (**Reaktionsgleichung 33**).

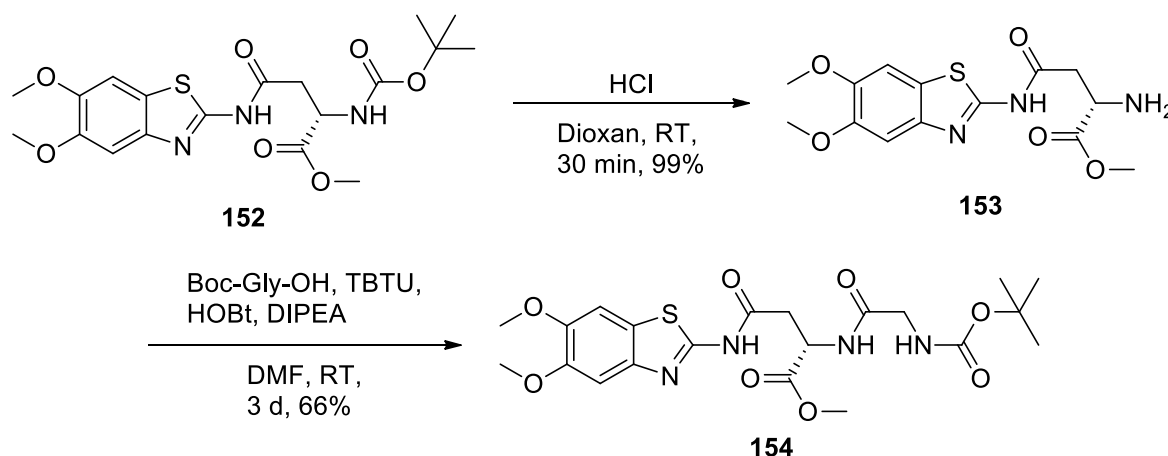


Im Folgenden konnte dann **151** durch TBTU mit **41** verbunden werden, womit **152** erhalten wurde.



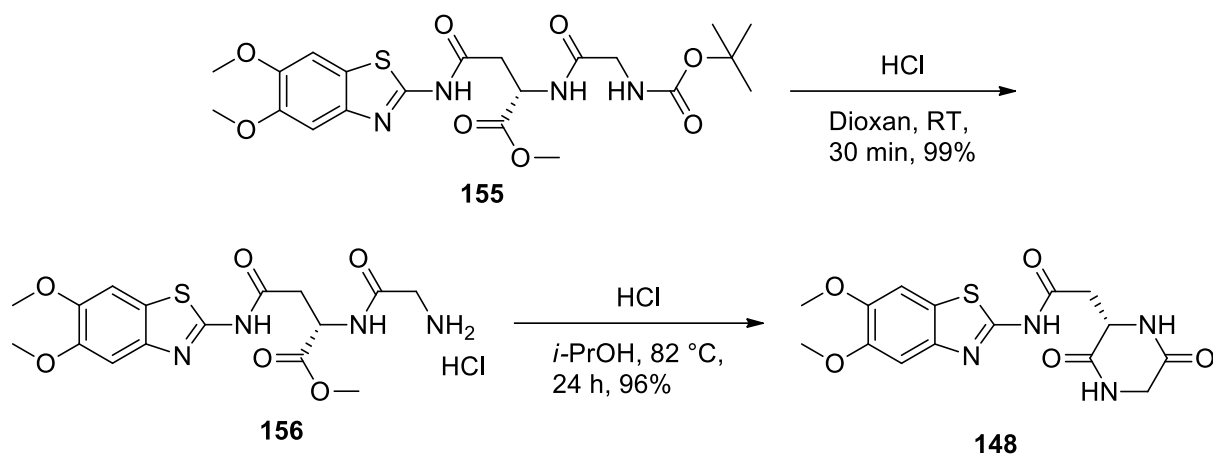
Reaktionsgleichung 34: Darstellung von **153**.

Nachdem die Verbindung der Benzo[*d*]thiazol-Struktur mit dem Aspartat erfolgreich war, wurde anschließend die Boc-Gruppe zu **153** entfernt, um das Hydrochlorid **155** zu erhalten, und das Glycin über eine weitere TBTU-Kupplung angefügt.



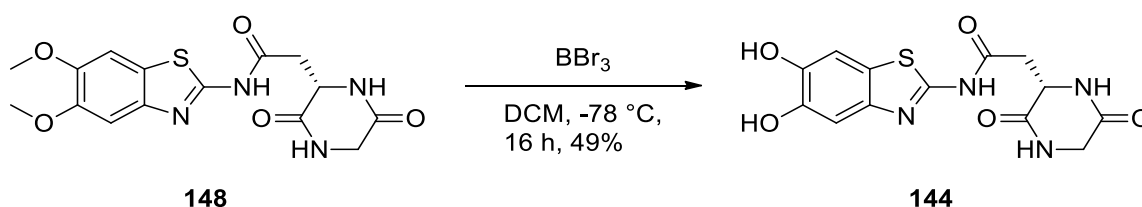
Reaktionsgleichung 35: Darstellung von **155** aus dem Hydrochlorid **153**.

In Verbindung **155** waren alle Bestandteile des Zielmoleküls **144** enthalten, als nächstes sollte dann der Ringschluss durch thermische Bildung des Amides aus dem bestehenden Methyl ester erfolgen, welche nach BALDWIN in diesem Fall begünstigt ist (6-exo-trig).^[124] Daher wurde nachfolgend die Boc-Gruppe von **155** entfernt, um das Hydrochlorid **156** zu erhalten, das anschließend durch Erhitzen mit HCl in Isopropanol cyclisiert werden konnte (**Reaktionsgleichung 36**).



Reaktionsgleichung 36: Entschützung von **155** zu **156** mit anschließender Cyclisierung zu **148**.

Im letzten Schritt wurden die Methoxygruppen durch BBr_3 entfernt, wodurch die Zielstruktur **144** erhalten werden konnte (**Reaktionsgleichung 37**).



Reaktionsgleichung 37: Darstellung von **144** durch Entschützung von **148**.

Zur Darstellung des Siebenringes **145** wurde zunächst der gleiche Ansatz der Ringbildung durch Umsetzung des Esters **157** zum Amid **158** gewählt. Um **157** zu erhalten, sollte **117** mit Glycin zu **159** verbunden werden, welches anschließend durch Abspalten der Boc-Gruppe zu **157** umgewandelt werden sollte (**Abbildung 70**).

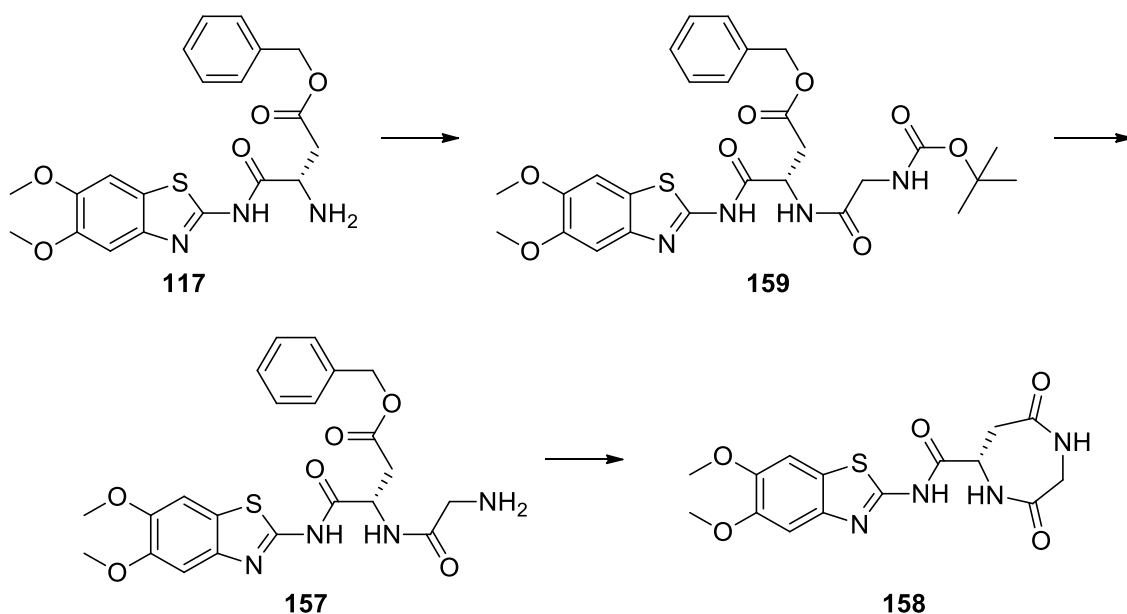
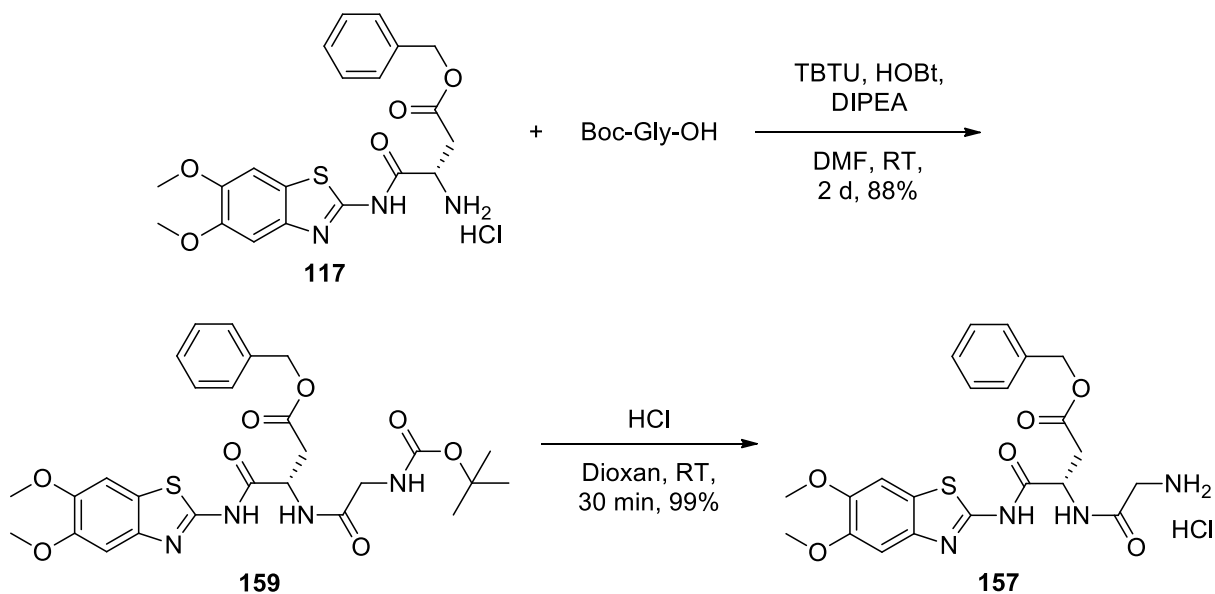


Abbildung 70: Syntheschema zur Darstellung von **158** über eine thermische Amidbildung aus **157**.

Ausgehend von **117** wurde durch Kupplung mit TBTU und Boc-Gly-OH **159** synthetisiert, das anschließend zu **157** entschützt wurde (**Reaktionsgleichung 38**).



Reaktionsgleichung 38: Synthese von **157** ausgehend von **117**.

Bei dem anschließenden Versuch des Ringschlusses durch Erhitzen in Acetonitril wurde ein Feststoff erhalten, welcher im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum jedoch keine Signale für die Protonen des Benzo[*d*]thiazols oder für die Methoxygruppen zeigte, stattdessen waren Signale der Methylengruppe des Benzylrings und auch dessen aromatische Protonen zu sehen. Analyse des Feststoffes per LC-MS ergab eine Masse $m/z = 295.1$, welche dem 6-Ring **160** (berechnet: $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 295.1$) zugeordnet werden konnte. Die Ausbildung des 6-Ringes **160** durch Spaltung

eines Amides war in diesem Fall bevorzugt gegenüber der Ausbildung eines 7-Ringes durch Spaltung eines Esters (**Abbildung 71**).

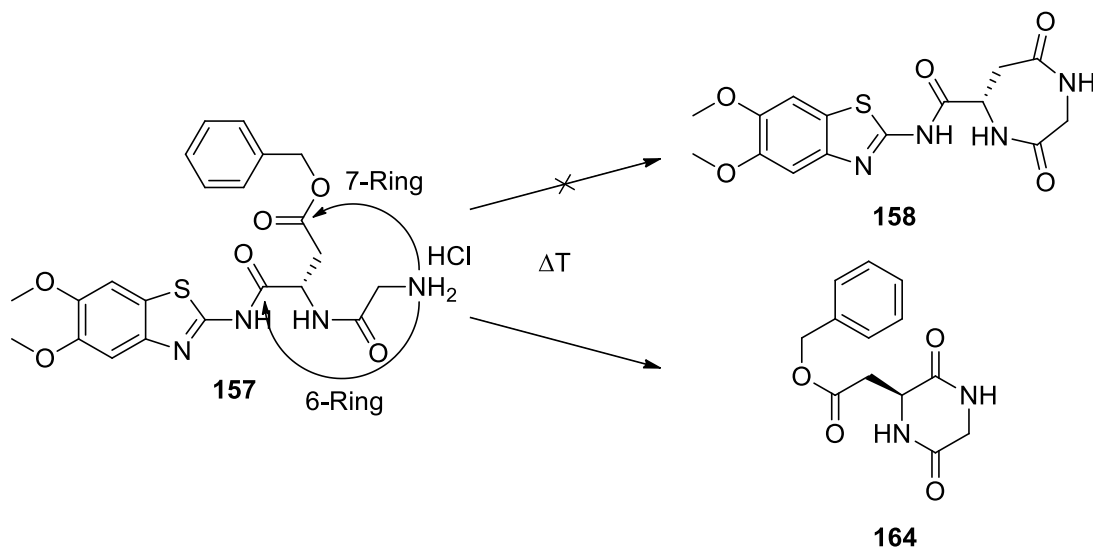


Abbildung 71: Bildung des 6-Ringes **160** anstelle des 7-Ringes **158** durch Erhitzen von **157**.

Der Ringschluss, um **158** zu erhalten, musste daher mit schonenderen Mitteln erfolgen, es sollten Kupplungsreagenzien verwendet werden. Dafür sollten sowohl die Boc- als auch die Benzylgruppe von **159** entfernt werden, um **161** mit freiem Amin und Carbonsäure zu erhalten, welche anschließend zu **158** verknüpft werden sollen (**Abbildung 72**).

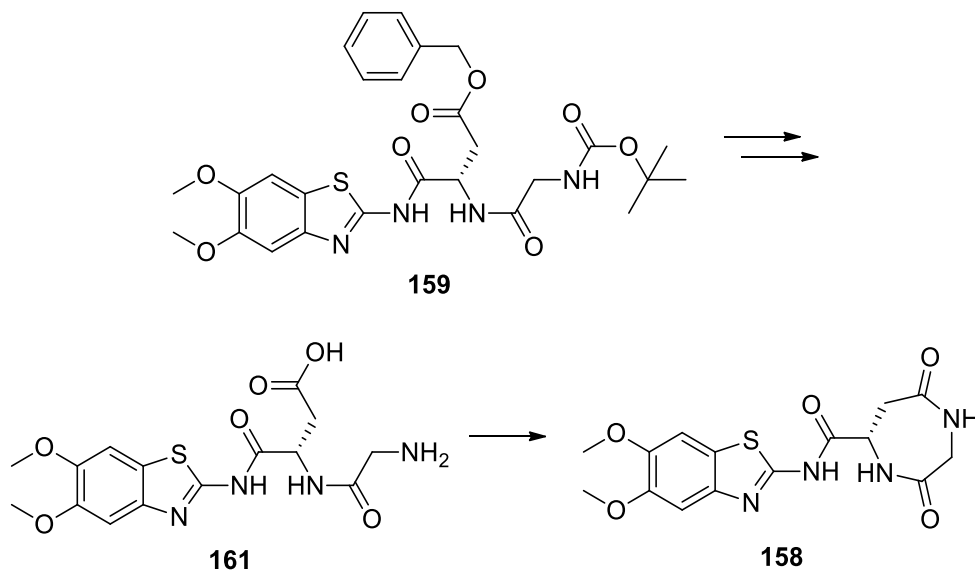
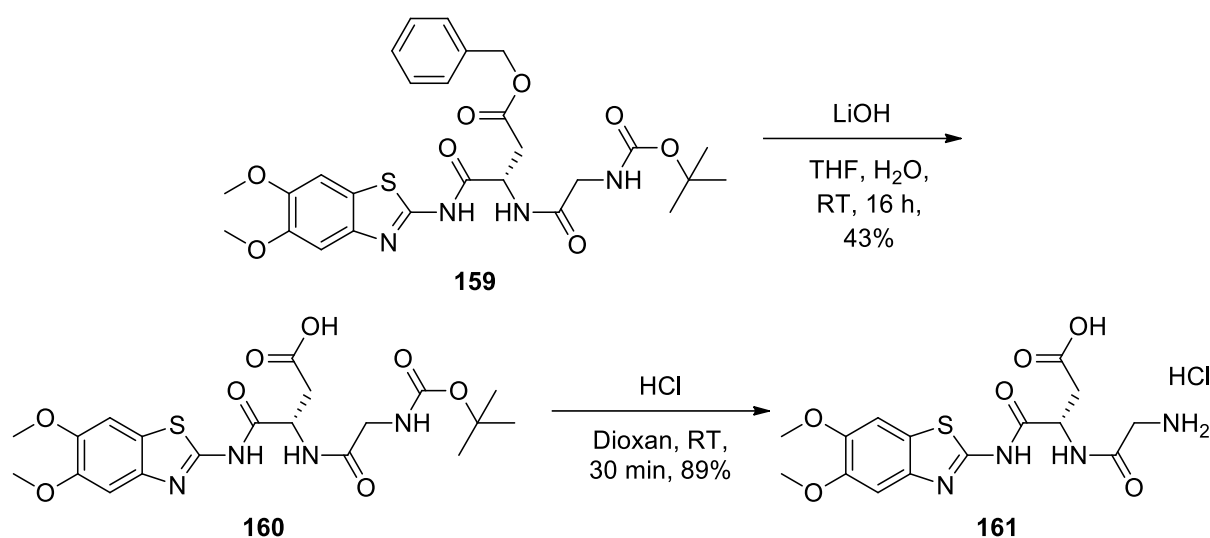


Abbildung 72: Syntheschema zur Synthese von **158** über einen Ringschluss durch Kupplungsreagenzien ausgehend von **161**.

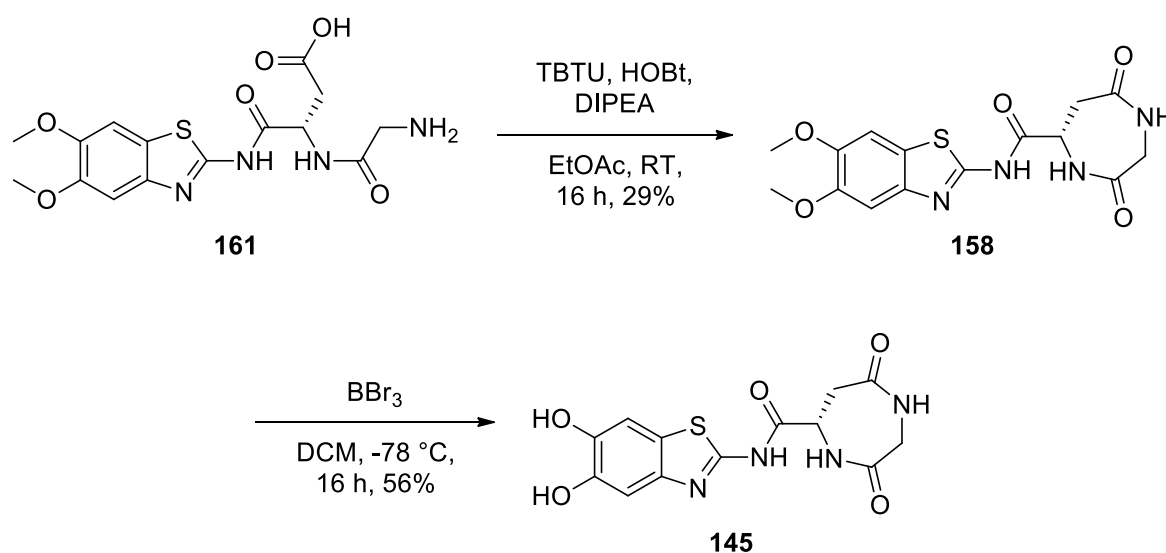
Um eine einfachere Aufreinigung der Produkte zu ermöglichen, wurde nicht von **157** ausgegangen, da bei der Spaltung des Benzylesters durch LiOH auch Wasser anwesend ist, in

welchem das amphotere **161** gut löslich ist. Daher wurde ausgehend von **159** zuerst der Benzylester durch Lithiumhydroxid hydrolysiert und anschließend die Boc-Gruppe durch HCl entfernt, wobei **161** aus dem organischen Lösemittel der Reaktion durch Filtration als Hydrochlorid erhalten werden konnte (**Reaktionsgleichung 39**).



Reaktionsgleichung 39: Darstellung von **161** aus **159** durch zweifache Entschützung.

Anschließend konnte der Ringschluss zu **158** durch TBTU durchgeführt werden, das durch Entschützung mit BBr_3 in die Zielstruktur **145** umgewandelt werden konnte (**Reaktionsgleichung 40**).



Reaktionsgleichung 40: Ringschluss von **161** durch TBTU zu **158**, gefolgt von der Entschützung zu **145**.

Zur Synthese von **146** waren schon Ansätze über ein *N*-Carboxy-Anhydrid und über einen thermischen Ringschluss unternommen worden, welche jedoch nicht erfolgreich waren.^[121] Daher sollte der zentrale Schritt der Synthese von **146** nach BIHEL *et al.* erfolgen, wobei ein thermischer Ringschluss von **162** zu **163** erfolgt.^[125] **162** sollte ausgehend von 2-Amino-5,6-dimethoxybenzoesäure **164** durch Schutzgruppen- und Amidbindungschemie aufgebaut werden (**Abbildung 73**).

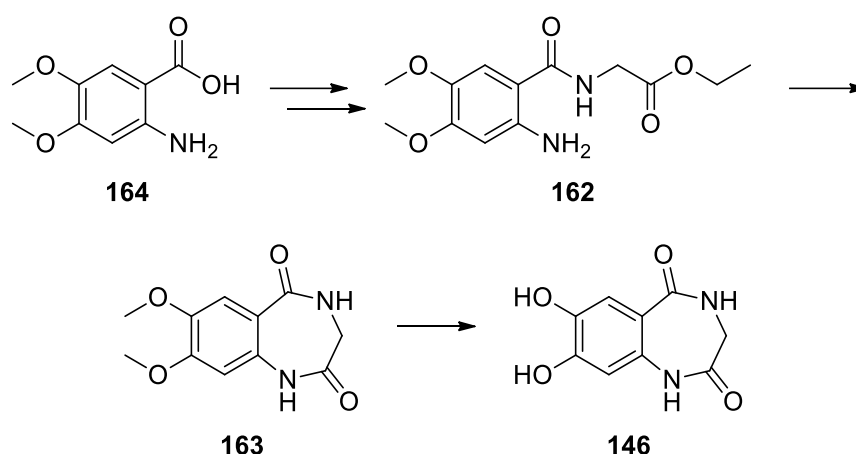
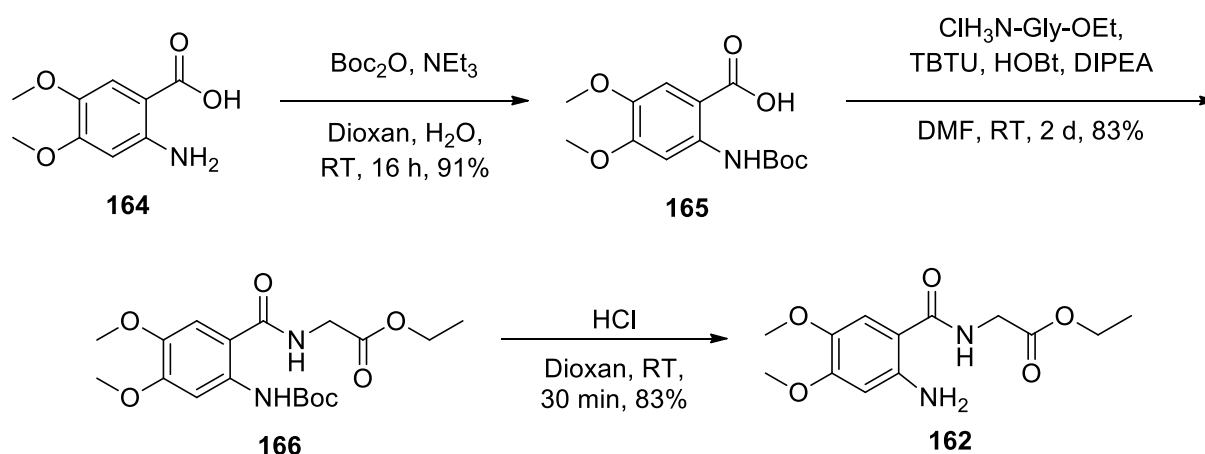


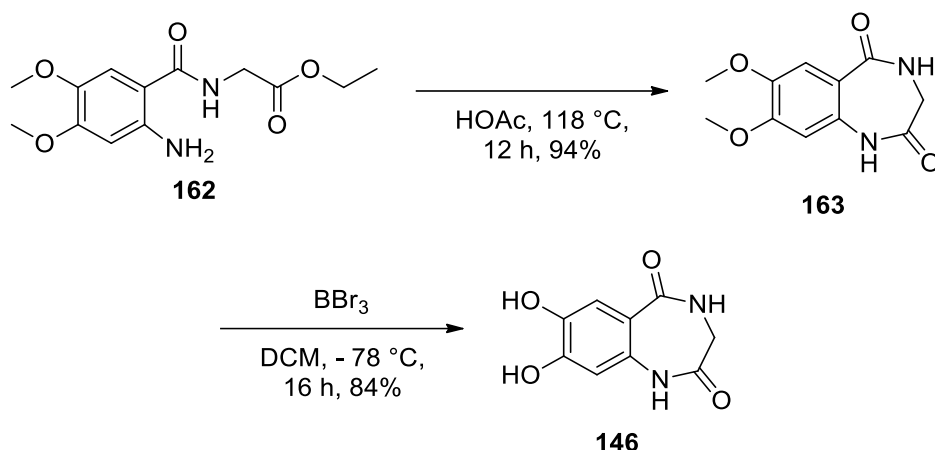
Abbildung 73: Aufbau von **146** über den Ringschluss von **162** zu **163**.

Zu diesem Zweck wurde **164** zuerst nach einer Vorschrift von ASANO *et al.*^[126] mit einer Boc-Gruppe an der Aminogruppe zu **165** versehen, gefolgt von der Kupplung mit Glycinethylester durch TBTU. Anschließend wurde die Boc-Gruppe von **166** wieder entfernt, und so **162** erhalten (**Reaktionsgleichung 41**).



Reaktionsgleichung 41: Darstellung von **162** ausgehend von **166**.

Danach konnte der Ringschluss nach einer Vorschrift von BIHEL *et al.* durch Erhitzen von **162** in Eisessig erfolgen. Im Anschluss wurde **163** entschützt, um die Zielstruktur **146** zu erhalten (**Reaktionsgleichung 42**).^[125]



Reaktionsgleichung 42: Ringschluss von **162** zu **163**, gefolgt von der Entschützung zu **146**.

3.6.3 Testung

Die synthetisierten Verbindungen **144**, **145** und **146** wurden im Folgenden im enzymatischen Assay auf Hemmung der DENV und ZIKV NS2B/NS3-Protease untersucht, wobei zunächst die Inhibitoren bei einer Konzentration von 20 μM untersucht wurden (**Tabelle 18**).

Tabelle 18: Übersicht der Ergebnisse der Testungen der synthetisierten cyclischen Verbindungen an der DENV2 und ZIKV NS2B/NS3-Protease.

Molekül-Nr.	Struktur	ZIKV ^a %	DENV2 ^a %
144		7%	24%
145		20%	21%
146		11%	1%

^aAngabe ist die prozentuale Inhibition bei einer Konzentration des Inhibitors von 20 μM . Die Mittelwerte stammen aus jeweils drei unterschiedlichen Messungen, jeweils als Doppelbestimmung durchgeführt.

144 und **145** zeigten eine Inhibition von etwas über 20% an DENV2, an ZIKV zeigte **144** eine Inhibition von 7%, während **145** eine von 20% aufwies. Die Inhibitoren wurden nicht weiter untersucht, da sie im Vergleich zu den Prolin-basierten Inhibitoren schlechtere Hemmstoffe sind. Während bei diesen der an das Benzo[*d*]thiazol angehängte Ring lediglich *eine* (Sulfon)amid-Struktur aufweist, liegen hier *zwei* Amidbindungen eingebettet vor. Dies lässt darauf schließen, dass in diesem Bereich der Bindetasche nur wenig hydrophile Strukturen toleriert werden. Im Vergleich mit dem Cyclohexylderivat **141** wird eine ähnliche Hemmung an DENV2 beobachtet, jedoch weist **141** an ZIKV eine höhere Hemmung auf, was ebenfalls die These stützt, dass dessen Bindetasche hydrophobe Elemente besser bindet. Jedoch gibt es im Fall von **144** ebenfalls eine weitere Methylengruppe zwischen Benzo[*d*]thiazol und Ring und der Ring von **145** ist größer, wodurch sich ebenfalls ein Einfluss ergeben kann.

146 wies eine Hemmung von 11% an der ZIKV-Protease und 1% an der DENV2-Protease auf. Da **146** ein sehr kleines Molekül im Vergleich zu den anderen ist, wurde es ebenfalls bei einer Konzentration von 100 μM im Assay an beiden Proteasen getestet, wobei Werte von 12% (ZIKV), beziehungsweise 16% (DENV2) erhalten wurden. Somit konnte auch **146** nicht für die weitere Entwicklung von Inhibitoren in Betracht gezogen werden. Im Vergleich zu der 5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazol-Struktur ist das Benzo[*e*][1,4]diazepin **146** größer, zudem sind die enthaltenen Amide zur Seite gerichtet. Dagegen weisen die Inhibitoren, welche auf Prolin oder anderen Aminosäuren basieren, eine Amidbindung auf der dem Catechol gegenüberliegenden Seite des Moleküls auf, die für die Affinität an den Inhibitor eine Bedeutung zu haben scheint.

3.7 Scaffold Hopping

3.7.1 Design des Inhibitors

Der Einfluss des Benzo[*d*]thiazols auf die Hemmung der Proteasen ist in vorangegangenen Arbeiten bereits gut untersucht worden, in Dockingstudien wurde eine Benzimidazol-Struktur ebenfalls gut bewertet, die jedoch synthetisch nicht zugänglich war.^[127] Im Rahmen der Synthese von verschiedenen Sulfonamiden wurde von [REDACTED] im Rahmen ihrer Masterarbeit ebenfalls (*S*)-**167**, welche anstelle der 5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazol-Struktur eine Nitrogruppe aufweist, synthetisiert und getestet.^[99] Basierend darauf sollte (*S*)-**168** dargestellt werden, das ein Benzimidazol anstelle der Benzo[*d*]thiazol Struktur enthält (**Abbildung 74**).

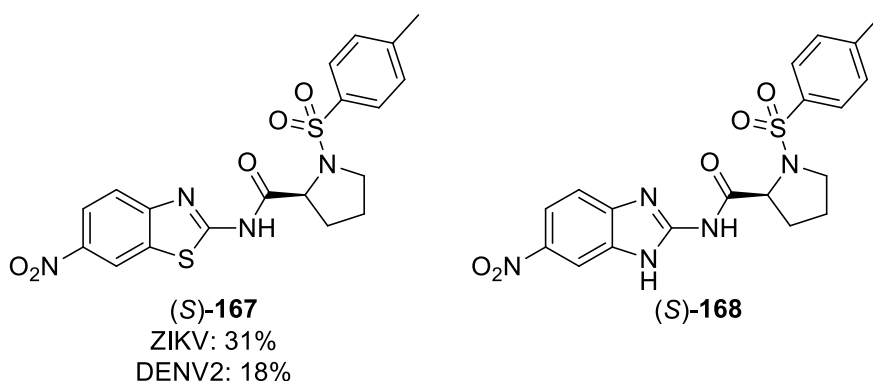
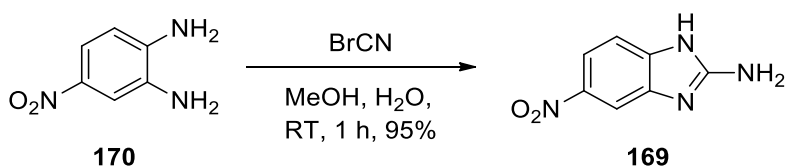


Abbildung 74: (*S*)-**167** bestehend aus einer 6-Nitrobenzo[*d*]thiazol-Struktur und die Zielstruktur (*S*)-**168** mit einer 5-Nitrobenzimidazol-Struktur.^[99]

3.7.2 Synthese

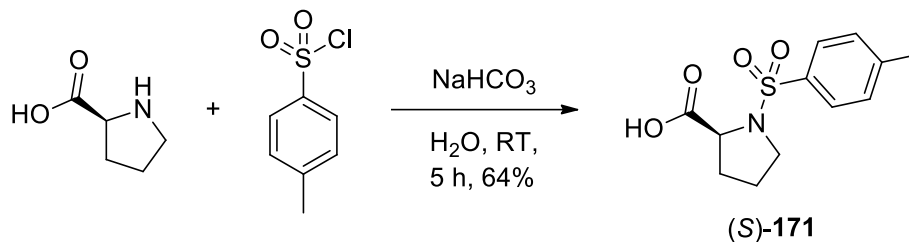
Der Grundkörper **169** wurde nach einer Vorschrift von FREI *et al.* ausgehend von **170** durch Umsetzung mit Bromcyan hergestellt (**Reaktionsgleichung 43**).



Reaktionsgleichung 43: Darstellung von 2-Amino-5-nitrobenzimidazol **169**.

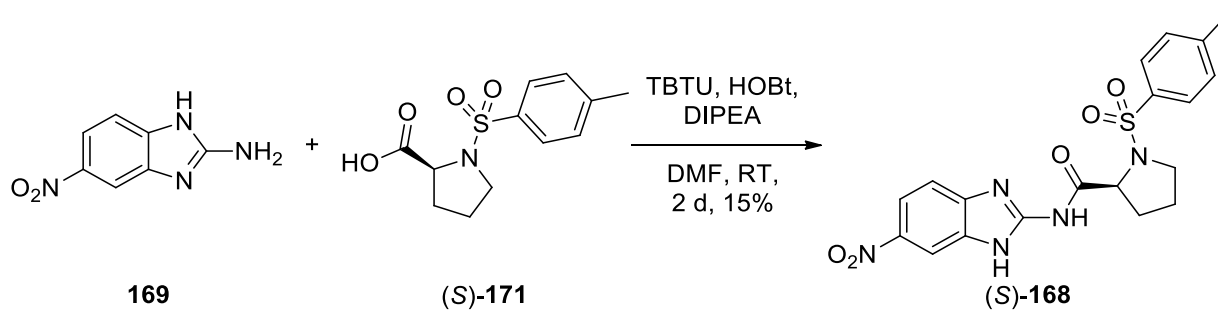
Da die Imidazol-Struktur von **169** ebenfalls eine Reaktion mit Tosylchlorid eingehen kann und in diesem Fall keine Spaltung von Methoxygruppen nötig war, wurde im Gegensatz zu den

Prolin-basierten Inhibitoren erst Prolin mit Tosylchlorid zu (*S*)-**171** nach einer Vorschrift von UGWU *et al.* verknüpft (**Reaktionsgleichung 44**).^[128]



Reaktionsgleichung 44: Synthese von Tosylprolin (*S*)-**171**.

Im letzten Schritt wurden **169** und (*S*)-**171** durch TBTU zu (*S*)-**168** verbunden (**Reaktionsgleichung 45**).



Reaktionsgleichung 45: Darstellung von (*S*)-**168** aus (*S*)-**171** und **169**.

3.7.3 Testung

Mit (*S*)-**168** wurde an der DENV2 und ZIKV NS2B/NS3-Protease ein IC_{50} -Wert von $12.0 \pm 1.1 \mu\text{M}$ (ZIKV) bzw. eine Inhibition von 29% ($20 \mu\text{M}$, DENV2) erhalten. Im Vergleich zu (*S*)-**167** ($20 \mu\text{M}$, ZIKV: 31%, DENV: 18%) war die Hemmung durch die Benzimidazol-Struktur damit höher als die der Benzo[*d*]thiazol-Struktur. Die durch Docking vorhergesagten Posen beider Inhibitoren stimmen weitgehend überein (**Abbildung 75A**).

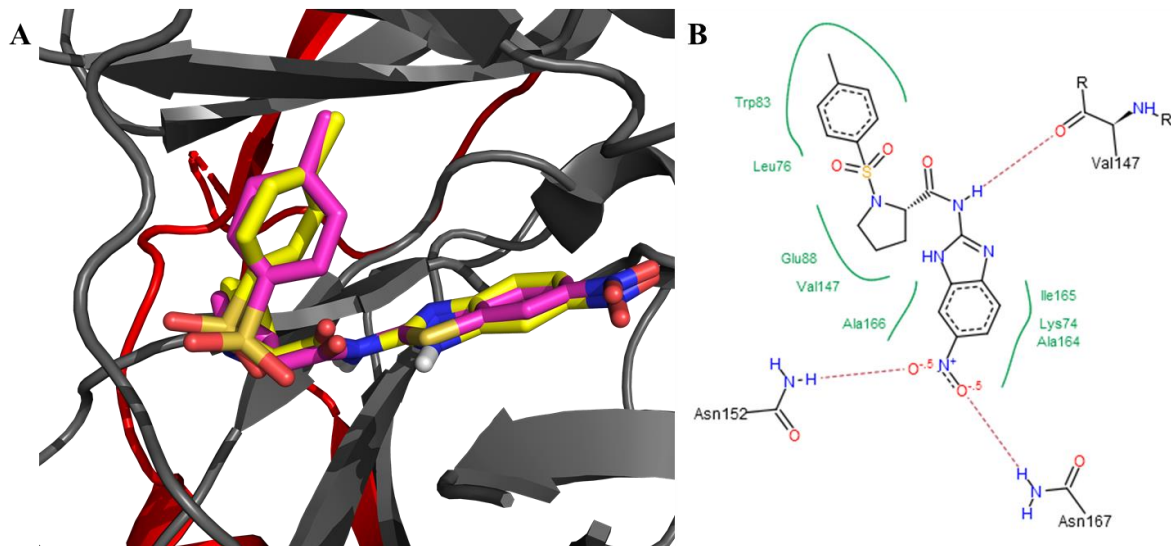


Abbildung 75: Docking von (*S*)-**168** und (*S*)-**167**. **A)** Positionierung von (*S*)-**168** und (*S*)-**167** in der allosterischen Tasche der DENV2 NS2B/NS3-Protease (PDB ID 2FOM).^[53] Das Docking wurde durchgeführt von [REDACTED]. Das Enzym ist als Cartoon dargestellt, NS2B in rot und NS3 in schwarz. Die Inhibitoren sind in Stabform dargestellt mit Farbkodierung nach Elementen: Kohlenstoff: gelb ((*S*)-**168**), rosa ((*S*)-**167**), Sauerstoff: rot, Stickstoff: blau, Wasserstoff: weiß, Schwefel: gelb. Die Abbildung wurde erstellt mit PyMOL.^[38] **B)** Schematische Darstellung der Interaktionen von (*S*)-**168** mit der allosterischen Tasche. Hydrophobe Wechselwirkungen sind als grüne Linien mit den interagierenden Aminosäuren in grün dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen sind durch Striche zu dem jeweiligen Strukturelement der Aminosäure dargestellt.

Das Imidazol weist im Unterschied zum Thiazol eine zusätzliche Funktion als Wasserstoffbrückenbindungs-Donor auf, diese geht jedoch in dem vorhergesagten Bindemodus keine Interaktion ein. Bei beiden Inhibitoren wird auch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen V147 und dem Proton der Amidgruppe vorhergesagt (**Abbildung 75B**). Eine Erklärung für die unterschiedlichen Hemmeigenschaften ist in dem vorhergesagten Bindemodus nicht zu finden. Die berechneten Scores der beiden Verbindungen sagen eine bessere Bindung von (*S*)-**168** ($\Delta G = -29.54 \text{ kJ}$) gegenüber (*S*)-**167** ($\Delta G = -26.50 \text{ kJ}$) voraus, was im Einklang mit der höheren Hemmung der ZIKV-Protease durch (*S*)-**168** steht. In der Aufteilung des Scores ist der größte Unterschied zwischen beiden Molekülen in dem *Match*-Term ($\sim 2 \text{ kJ}$) zu sehen, welcher Wasserstoffbrückenbindungen und ionische

Wechselwirkungen beinhaltet, wobei letztere in diesem Fall nicht vorkommen. Es ist somit möglich, dass die unterschiedlichen elektronischen Eigenschaften der beiden Heterocyclen die Stärke der Wasserstoffbrückenbindungen beeinflussen.

3.8 Fragment basierter Ansatz zur Optimierung der Catechol-Struktur

3.8.1 Design der Inhibitoren

Die Catecholgruppe am Benzo[*d*]thiazol wurde bei dem bisherigen Design von Inhibitoren als wichtiges Element für die Hemmung der Proteasen identifiziert, wobei auch Nitro- und 2-Hydroxycarbonsäuren untersucht worden waren (**Abbildung 76**).^[86]

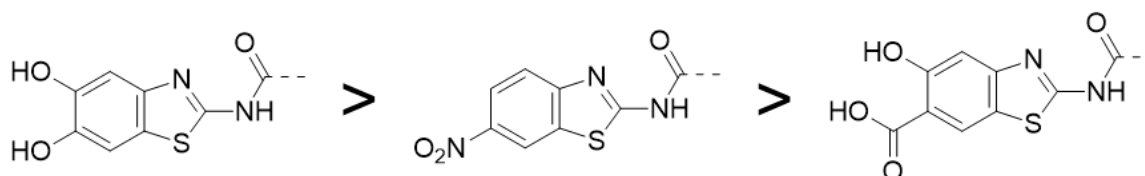


Abbildung 76: Verschiedene Substitutionen am Benzo[*d*]thiazol, welche untersucht worden waren.^[86]

Um dieses für die Inhibition wichtige Element weiter zu optimieren, sollten die Hydroxygruppen gegen verschiedene andere Strukturen ausgetauscht werden. Da die Synthese des Benzo[*d*]thiazols mit verschiedenen Substituenten oder weiteren ankondensierten Ringen und der darauf folgende Aufbau der gesamten Inhibitoren in Analogie an bestehende Strukturen einen höheren synthetischen Aufwand bedeutet hätte, wurde ein Fragment-basierter Ansatz gewählt. Dabei sollte die Struktur der Inhibitoren weitestgehend auf die Hydroxygruppen reduziert werden, sodass in Folge schneller eine Vielzahl verschiedener Strukturen untersucht werden konnte. Als Grundstruktur wurde *N*-Phenylbenzamid gewählt, als Referenzmoleküle sollten **172** und **173** dienen, welche die Catecholgruppe entweder an der Phenylgruppe (**172**) oder am Benzamid (**173**) fragen (**Abbildung 77**).

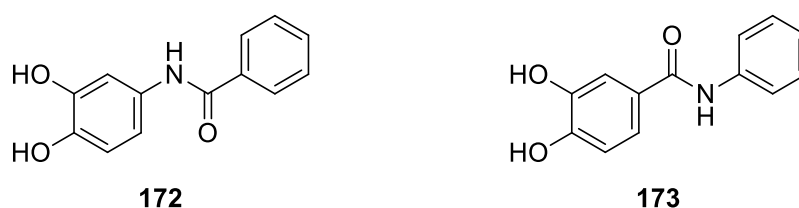


Abbildung 77: **172** und **173** als Referenzmoleküle für den Austausch der Catecholgruppe.

Anschließend sollten anstelle der Catechol-Struktur zuerst verschiedene Bioisostere von Catechol^[129] untersucht werden, um den Ansatz zu validieren und die Grundlage für die Auswahl weiterer Strukturen zu legen, wobei auch computergestützte Methoden zur Anwendung kommen sollten (**Abbildung 78**).

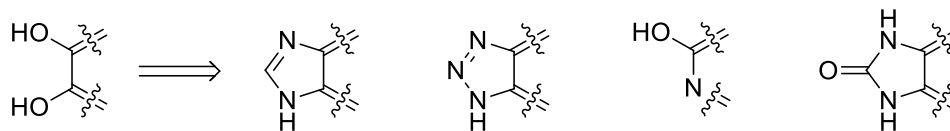
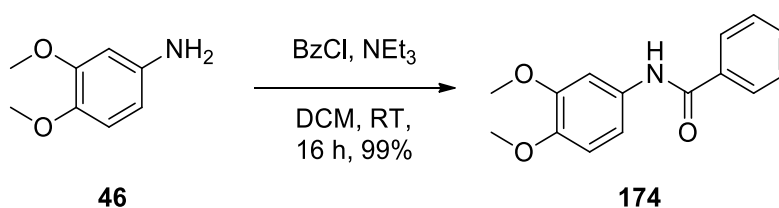


Abbildung 78: Austausch von Catechol gegen verschiedene Bioisostere.

3.8.2 Synthese

Zur Darstellung von **172** wurde zuerst das mit Methoxygruppen geschützte **174** ausgehend von **46** durch Reaktion mit Benzoylchlorid aufgebaut (**Reaktionsgleichung 46**).



Reaktionsgleichung 46: Synthese von **174** durch Benzoylierung von **46**.

Anschließend wurde mit BBr_3 entschützt, in dem zuerst enthaltenen Rohprodukt wurde per LC-MS eine Verunreinigung beobachtet, welche in der Totzeit eluiert, also sehr polar ist, und im Massenspektrum $m/z = 256.1$ und $m/z = 293.3$ als Signale mit der höchsten Intensität aufwies. Diese konnten als die Addukte **175** und **176** identifiziert werden, die Kondensationsprodukte von **172** und einem, bzw. zwei Borsäure-Bausteinen sind (**Abbildung 79**).

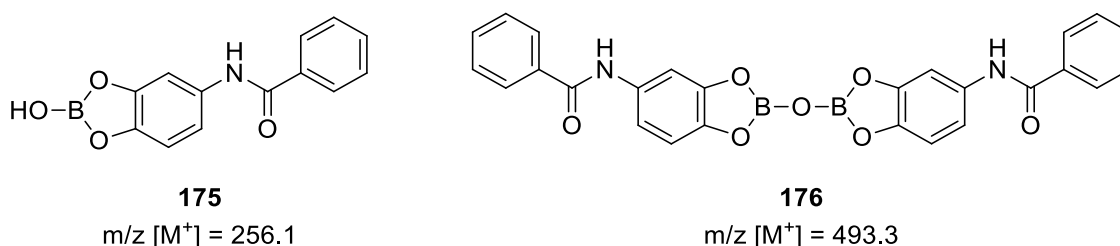


Abbildung 79: Beobachtete Verunreinigung des Rohproduktes von **174**.

Bei der Entschützung von Methoxygruppen durch BBr_3 kommt es im ersten Schritt zu einem Addukt **176** von BBr_3 an die Methoxygruppe, gefolgt von der Substitution an einer Methylgruppe durch Bromid, wodurch Methylbromid frei wird und der entsprechende Borsäureester **177** zurückbleibt. Im Fall von Catecholen kann dies ein zweites Mal geschehen,

wodurch ein Benzo[*d*][1,3,2]dioxaborol **178** entsteht, welches im letzten Schritt durch Wasser gespalten und das Produkt **172** freigesetzt wird (**Abbildung 80**).^[130]

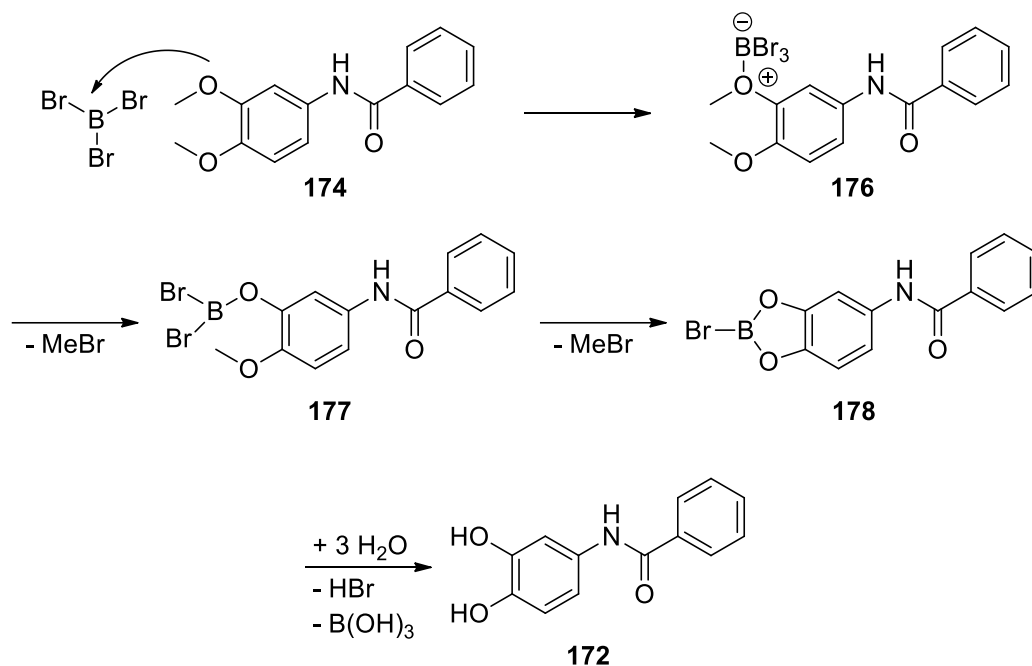
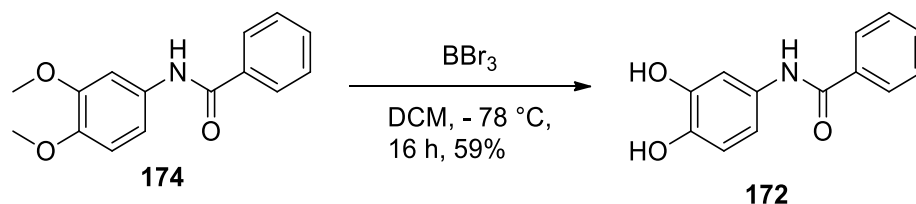


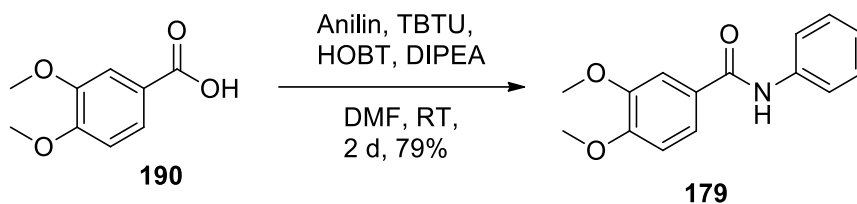
Abbildung 80: Mechanismus der Entschützung von Catecholgruppen durch BBr_3 .^[130]

In diesem Fall wurde die Freisetzung anstelle der Zugabe von Wasser durch Methanol vorgenommen, wobei anstelle der Borsäure der Borsäuretrimethylester entsteht. Borsäureester von Catecholen sind empfindlich gegenüber Hydrolyse, welche in diesem Fall nicht vollständig erfolgte. Daher wurde zunächst eine Spaltung des Esters durch Erhitzen des Rohproduktes in Methanol oder Wasser vorgenommen, was jedoch ohne Erfolg blieb. Die elektronische Struktur des Aromaten scheint im Vergleich zu den 5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazolen in diesem Fall den Borsäureester deutlich zu stabilisieren. Daher wurde eine Aufreinigung per semipräparativer HPLC vorgenommen, um **172** zu erhalten (**Reaktionsgleichung 47**).



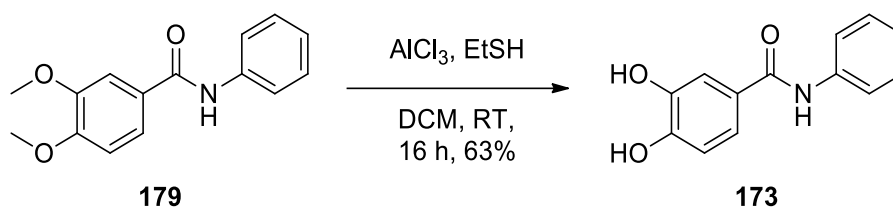
Reaktionsgleichung 47: Darstellung von **172** durch Entschützung von **174**.

Zur Synthese von **173** wurde im ersten Schritt das mit Methoxygruppen geschützte **179** durch eine TBTU-vermittelte Amidbildung zwischen **180** und Anilin dargestellt (**Reaktionsgleichung 48**).



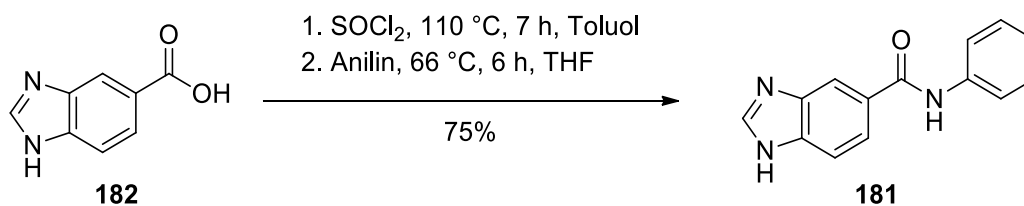
Reaktionsgleichung 48: Darstellung von **179** aus **180** und Anilin durch TBTU.

Anschließend wurde die Entschützung zuerst ebenfalls mit BBr_3 versucht. Der Anteil an den Verunreinigungen mit Borsäurekondensaten war jedoch im Vergleich zu der Synthese von **172** deutlich höher, weswegen eine alternative Entschützungsmethode gewählt wurde, um Ausbeuteverluste entgegen zu wirken. Anstelle von BBr_3 wurden Aluminiumchlorid und Ethanthiol verwendet und so **173** erhalten (**Reaktionsgleichung 49**).



Reaktionsgleichung 49: Entschützung von **179** durch Aluminiumchlorid/Ethanthiol.

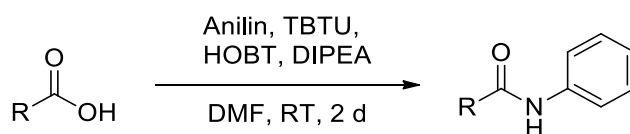
181 konnte nach einer Vorschrift von GONZÁLEZ-VERA *et al.*^[131] ausgehend von der Carbonsäure **182** erhalten werden, indem durch SOCl_2 **182** in das Säurechlorid überführt und anschließend Anilin hinzugegeben wurde (**Reaktionsgleichung 50**).



Reaktionsgleichung 50: Darstellung von **181** ausgehend von **182** durch SOCl_2 und Anilin.

Weitere Strukturen konnten durch TBTU-vermittelte Amidbildungen ausgehend von kommerziell erhältlichen Carbonsäuren dargestellt werden (**Tabelle 19**).

Tabelle 19: Übersicht über die durchgeführten TBTU vermittelten Amid-Kupplungen.



Nr.	R	Ausbeute
183		77%
184		51%
185		76%

Im Fall der 2-Hydroxypyridine **184** und **185** gibt es zwei Tautomere, die auftreten können: die Lactam- und die Lactim-Form (**Abbildung 81**).

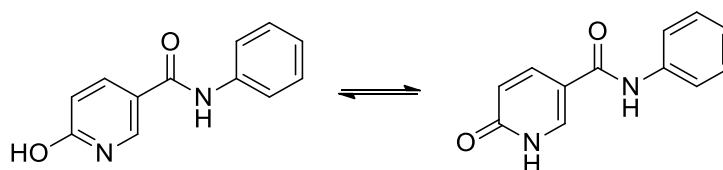


Abbildung 81: Gleichgewicht der beiden Tautomere von **185**: Lactim (links) und Lactam (rechts).

Aufgrund unterschiedlicher Wechselwirkungen ist die Frage der Tautomerie für die Bindung an ein Enzym von Bedeutung. Für **184** gab in diesem Fall das NMR-Spektren einen Aufschluss. Bei den Signalen des Pyridinringes zeigt *H*-1 eine Kopplung zu *H*-2 mit einer Kopplungskonstante von 9.6 Hz. *H*-2 und *H*-3 weisen eine Kopplung mit einer Konstante von 2.7 Hz auf. Eine weitere Aufspaltung von *H*-3 ist nicht zu sehen, im Fall der Lactam-Form wäre eine zusätzliche Kopplung mit dem *N*-H zu erwarten (**Abbildung 82**). Somit liegt **184** in DMSO-*d*₆ als Lactim vor.

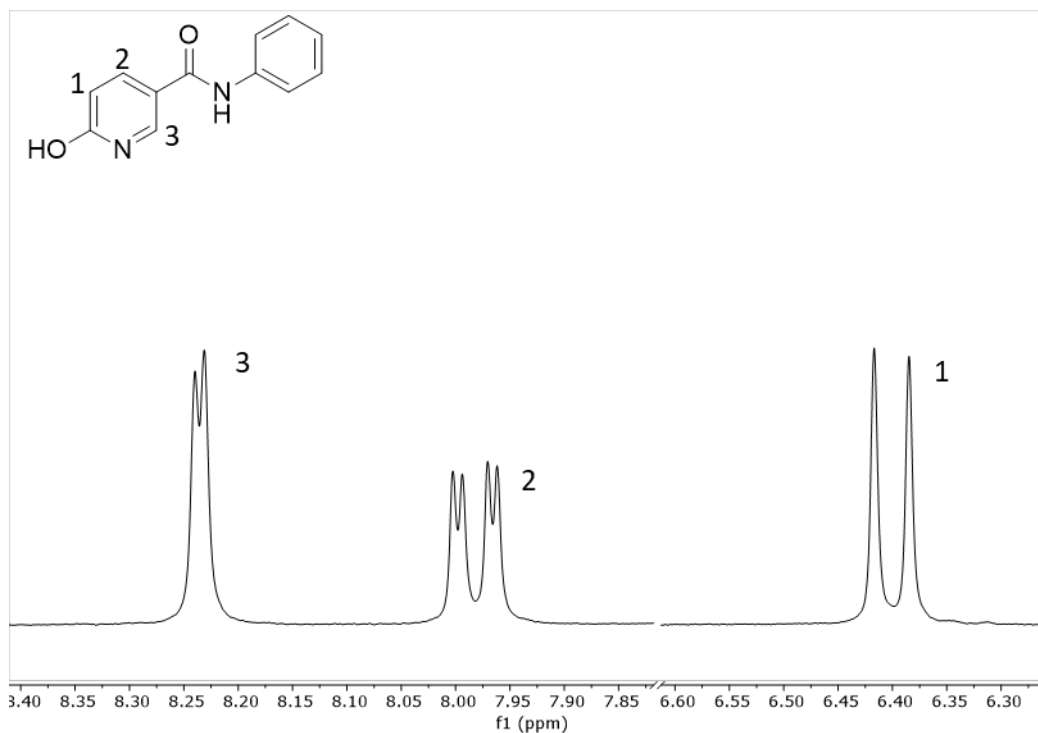
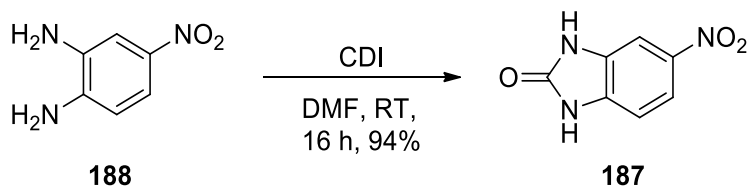


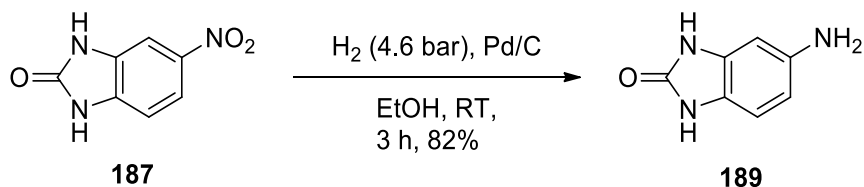
Abbildung 82: Die Signale des Pyridinringes von **184** im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum.

Zur Synthese von **186**, welches ein 2-Oxoimidazol, enthält wurde zuerst **187** ausgehend von dem *ortho*-Diamin **188** durch Carbonyldiimidazol (CDI) hergestellt (**Reaktionsgleichung 51**).



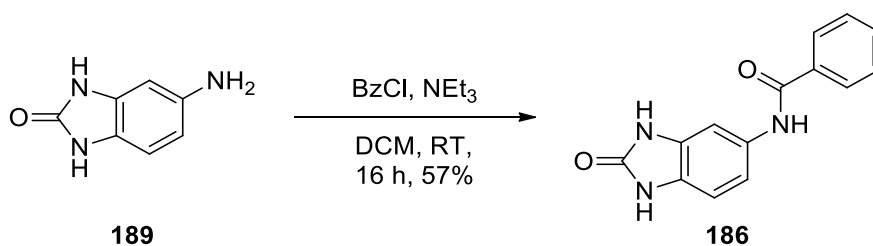
Reaktionsgleichung 51: Darstellung von **187** aus **188** durch CDI.

Anschließend konnte durch Hydrierung der Nitrogruppe von **187** mit Palladium als Katalysator das Amin **189** erhalten werden (**Reaktionsgleichung 52**).



Reaktionsgleichung 52: Reduktion der Nitrogruppe von **187** zu dem Amin **189**.

Um die Zielstruktur **186** zu erhalten wurde zuletzt das Amin **189** mit Benzoylchlorid umgesetzt (**Reaktionsgleichung 53**).



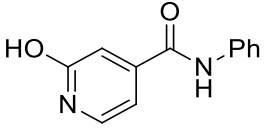
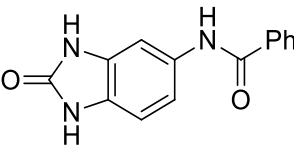
Reaktionsgleichung 53: Ausbildung des Amides **186** durch **189** und Benzoylchlorid.

3.8.3 Testung

Aufgrund der geringen Molekulargewichte (< 255 g/mol) der potentiellen Hemmstoffe, die sich durch den Fragment-basierten Ansatz ergeben, wurden die Testungen bei Konzentrationen von 100 μM vorgenommen (**Tabelle 20**).

Tabelle 20: Übersicht über die Hemmung der ZIKV und DENV2 NS2B/NS3-Protease durch verschiedene Inhibitor-Fragmente.

Molekül-Nr.	Struktur	ZIKV ^a	DENV2 ^a
172		-	-
173		0%	6%
181		81%	19%
183		13%	8%
184		8%	9%

185		10%	6%
186		10%	8%

^aAngegeben ist die prozentuale Inhibition bei einer Konzentration des Inhibitors von 100 μ M. Die Mittelwerte stammen aus jeweils drei unterschiedlichen Messungen, jeweils als Doppelbestimmung durchgeführt.

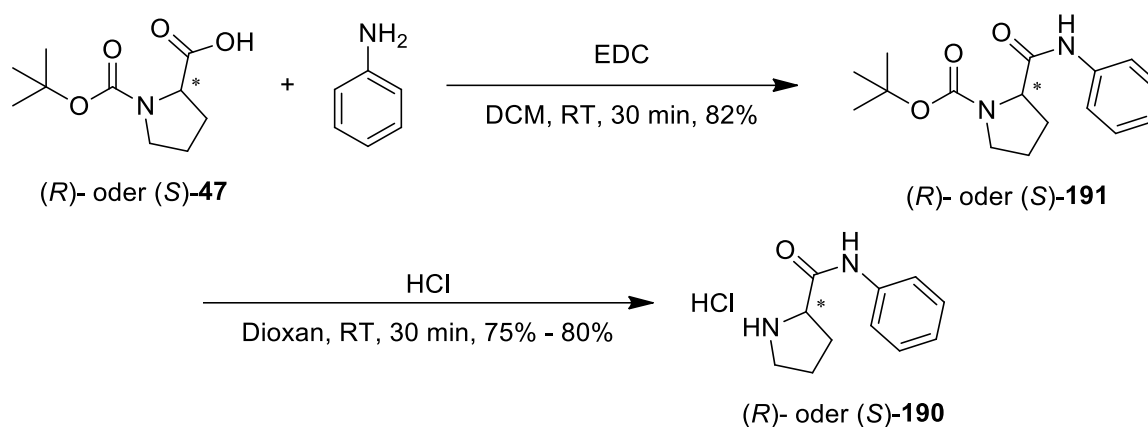
172 zeigte bei der Durchführung des Assays eine erhöhte Steigung im Vergleich zu der Kontrolle mit DMSO. Kontrollmessungen ohne Enzym zeigten, dass die Fluoreszenz von dem Molekül selbst kommen musste. Nach der Messung war eine rote Färbung der Lösung zu erkennen, wodurch die Hypothese aufgestellt wurde, dass **172** in dem verwendeten Puffer (pH = 9) nicht stabil ist. Durch den basischen pH-Wert kann durch teilweise Deprotonierung der Catecholgruppe die Elektronendichte im aromatischen System, welche bereits zuvor durch die dreifache Substitution hoch war, weiter erhöht werden, wodurch eine Oxidation plausibel ist. Somit war **172** als Referenzsubstanz für die Catechole nicht geeignet.

173 zeigte keine Hemmung an der ZIKV und nur eine sehr geringe an der DENV2-Protease, vergleichbar mit den Hemmungen durch **184** und **185**, die beide eine 2-Hydroxypyridinstruktur aufweisen. Die höchste Hemmung wurde mit dem Imidazol **181** beobachtet, welche bei ZIKV sogar bei 81% lag. Wesentlich geringere Hemmung der ZIKV-Protease wurde durch das Triazol **183** erhalten. Eine sehr geringe Hemmung wurde mit 2-Oxoimidazol **186** gemessen.

Für einen Vergleich mit der Catechol-Struktur dienten somit **172** und **173** beide nicht als Bezugspunkt zur Bewertung anderer Strukturen, da **172** im Assay-Puffer eine Fluoreszenz aufwies und **173** keine Inhibition zeigte. Jedoch wurde mit dem Imidazol **181** eine Struktur gefunden, welche als Referenz für computergestützte Methoden und als erster Ansatzpunkt für den Austausch der Catechol-Strukturen dienen kann.

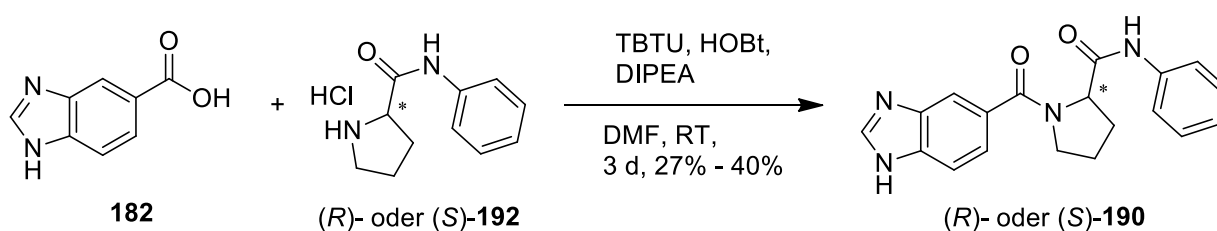
3.8.4 Synthese und Testung von (R)- und (S)-190

Da **181** eine hohe Inhibition an der ZIKV-Protease zeigte, sollten (R)- und (S)-**190** untersucht werden, welches das Benzimidazol-Fragment mit den bisherigen Prolin-basierten Strukturen verbindet. Zur Synthese von (R)- oder (S)-**190** wurde ausgehend von (R)- oder (S)-Boc-Prolin durch Kupplung mit Anilin (R)- oder (S)-**191** hergestellt. Anschließend wurde die Boc-Gruppe durch HCl entfernt, um das Hydrochlorid (R)- oder (S)-**192** zu erhalten (**Reaktionsgleichung 54**).



Reaktionsgleichung 54: Synthese von (R)- und (S)-**192** über (R)- oder (S)-**191**.

Anschließend wurden (R)- oder (S)-**192** mit **182** zu (R)- und (S)-**190** verbunden. Während ein Ansatz analog der Synthese von **181** nicht zum Erfolg führte, war die Ausbildung der Amidbindung mittels TBTU erfolgreich (**Reaktionsgleichung 55**).



Reaktionsgleichung 55: Synthese von (R)- und (S)-**190** aus **182** und (R)- oder (S)-**192**.

(R)- und (S)-**190** wurden anschließend an der DENV- und ZIKV-Protease bei einer Konzentration von 100 μ M auf Inhibition getestet (**Tabelle 21**).

Tabelle 21: Inhibition der DENV- und ZIKV-Protease durch (R)- und (S)-**190** bei einer Konzentration von 100 μ M.

	ZIKV	DENV
(R)- 190	10%	10%
(S)- 190	4%	12%

Keine der beiden Proteasen wurde durch (*R*)- oder (*S*)-**190** inhibiert. Da die Vergrößerung des Moleküls durch Prolin im Vergleich zu **181** zu einer schwächeren Bindung an die Protease führte, wurde die Imidazolstruktur nicht weiter als Ersatz für Catechole in den Inhibitorstrukturen in Betracht gezogen.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der Arbeit war es, neue Inhibitoren der DENV und ZIKV NS2B/NS3-Proteasen zu entwickeln, aufbauend auf vorhergehenden Studien, welche das mit einem Diarylether verknüpfte 5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazol **25** als guten Inhibitor identifizierten. Im ersten Schritt konnte die Bindungsstelle von **25** durch die kovalente Modifikation von Punktmutanten der DENV2 NS2B/NS3-Protease mit Maleimiden identifiziert werden, mit denen eine schwächere Bindung von **25** beobachtet wurde. Für die ZIKV-Protease konnte ein nicht-kompetitives Bindeverhalten bestätigt werden, das zuvor auch schon für die DENV2-Protease beobachtet wurde, sodass für diese die gleiche Bindestelle angenommen werden kann. Diese Ergebnisse sind ein Ausgangspunkt für die strukturbasierte Entwicklung von Inhibitoren, zudem können durch die Identifizierung der Bindestelle computergestützte Methoden zielgerichteter angewandt werden.

Eine Reihe von neuen Inhibitoren wurde durch Austausch des Diarylethers von **25** gegen ein *N*-Tosylprolin erhalten, welche eine Inhibition der ZIKV-Protease mit IC₅₀-Werten im niedrigen mikromolaren Bereich aufweisen. Dabei zeigten Strukturen mit Benzoyl anstelle des Tosyls ähnliche Werte. Die Optimierung des Arylsulfonyl-Restes führte zu den Verbindungen (*R*)- und (*S*)-**50** mit einer Inhibition der ZIKV-Protease im submikromolaren Bereich (ZIKV IC₅₀: *R*: 0.32 μM, *S*: 0.93 μM) (**Abbildung 83**).

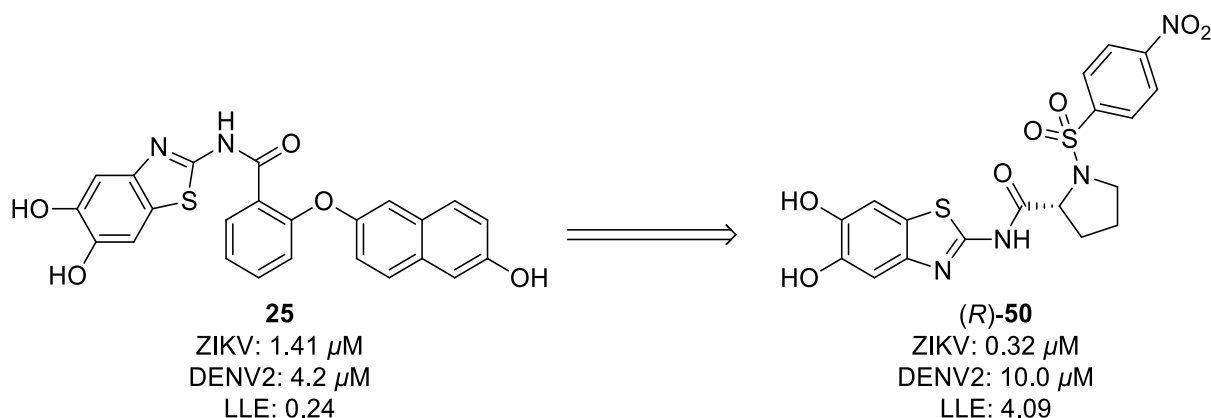


Abbildung 83: Der neue submikromolare Inhibitor der ZIKV NS2B/NS3-Protease (*R*)-**50**.

Die neuen Verbindungen wiesen zudem im Vergleich zu **25** (5.61) deutlich niedrigere SlogP-Werte (2.41 – 4.17) auf. Für die LLE konnten entsprechend höhere Werte erhalten werden, von <1 für **25** auf Werte >3, im Fall von (*R*)-**50** sogar >4.

Für ZIKV wurde durch ausgewählte Sulfonamide keine antivirale Aktivität festgestellt, jedoch zeigten die Verbindungen antivirale Aktivität an DENV2. Da beide Experimente an gleichen Zellen durchgeführt wurden, muss ein Unterschied der Viren selbst ZIKV unempfindlich gegenüber den Inhibitoren machen. Ein möglicher Grund ist die unterschiedliche Struktur der Replikationsfabriken beider Viren, was einen Ansatz für weitere Untersuchungen bietet.

In den Experimenten mit DENV2 wurde beobachtet, dass Derivate mit Methoxygruppen (*R*)- und (*S*)-**52** im Vergleich zu Verbindungen mit der freien Catechol-Struktur (*R*)- und (*S*)-**48** eine bessere antivirale Aktivität zeigten. (*R*)- und (*S*)-**52** sind keine Inhibitoren der isolierten Protease in enzymatischen Assays. In Metabolismusstudien mit Rattenlebermikrosomen konnte jedoch eine Demethylierung der Methoxygruppen und zusätzlich eine Hydroxylierung der Tosylgruppe beobachtet werden. Die Position der Hydroxylierung wurde zusätzlich durch die Synthese des Metaboliten verifiziert. Somit wurde die Hypothese, dass (*R*)- und (*S*)-**52** durch die höhere Lipophilie die Zellmembranen passieren können und anschließend in aktive Inhibitoren mit freier Catechol-Struktur metabolisch umgewandelt wird, bekräftigt (**Abbildung 84**). (*R*)- und (*S*)-**52** stellen somit Prodrugs dar. Zur weiteren Optimierung der Strukturen könnten anstelle der Methoxygruppen auch Acetyl- oder Methylendioxygruppen untersucht werden.

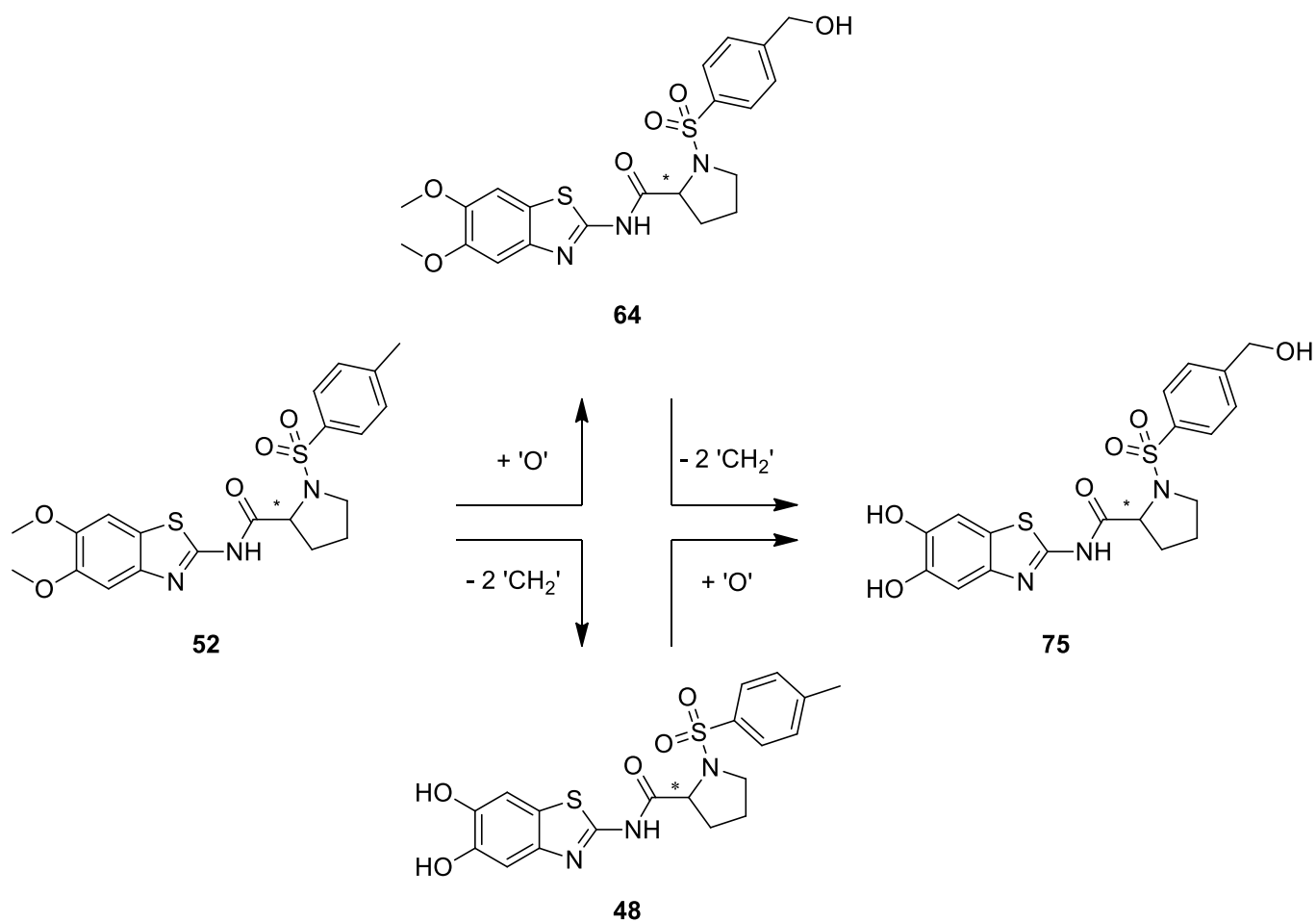


Abbildung 84: Metabolismus von (R)- und (S)-**52** durch Rattenlebermikrosomen. Neben der Demethylierung zu (R)- und (S)-**48** wurde auch eine Hydroxylierung zu **64** und **75** beobachtet.

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zwischen den nicht-kompetitiven Inhibitoren (R)- und (S)-**48** und dem literaturbekannten kompetitiven Inhibitor **9** wurde ein Hybrid aus beiden Strukturen **76** synthetisiert und in enzymatischen Assays untersucht. Das 5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazol erwies sich dabei als wichtiges Element, welches für eine Bindung in die allosterische Tasche verantwortlich ist (**Abbildung 85**).

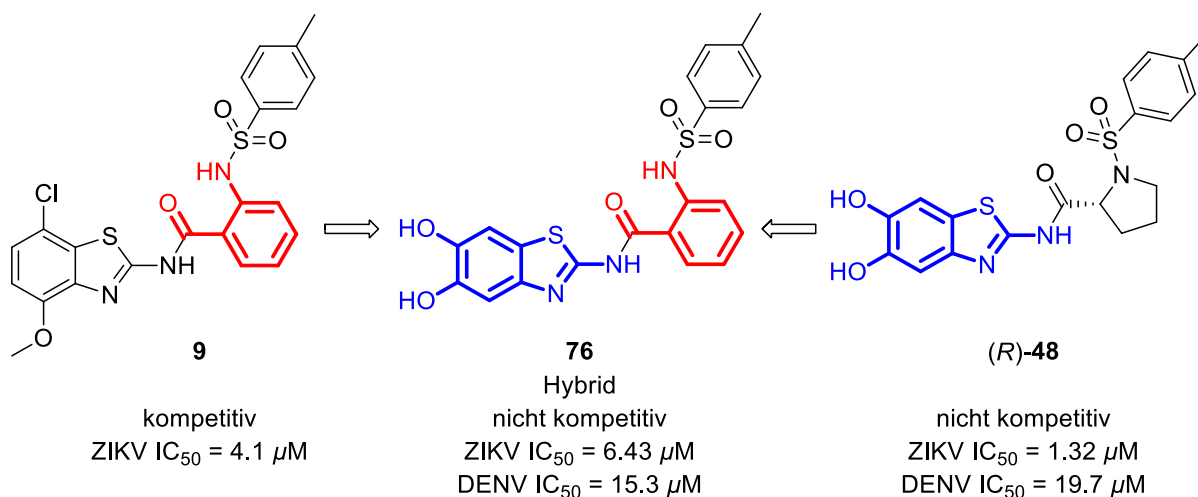


Abbildung 85: 76 als Hybrid aus den Strukturen des kompetitiven Inhibitors 9 und den nicht-kompetitiven (R)- und (S)-48 zeigte eine nicht-kompetitive Hemmung.

Ein Austausch des Pyrrolidinringes von (R)- und (S)-48 gegen verschieden substituierte Piperidine und 2-Azanorbornane ergab die Piperidin-2-carbonsäurederivate (R)- und (S)-86 als Struktur mit den niedrigsten IC₅₀-Werten (ZIKV IC₅₀: R: 0.58 μM, S: 0.51 μM). Beim Austausch gegen verschiedene offenkettige proteinogene und nicht-proteinogene Aminosäuren erwies sich Glycin für die Inhibition am günstigsten (ZIKV IC₅₀: 0.81 μM) (**Abbildung 86**).

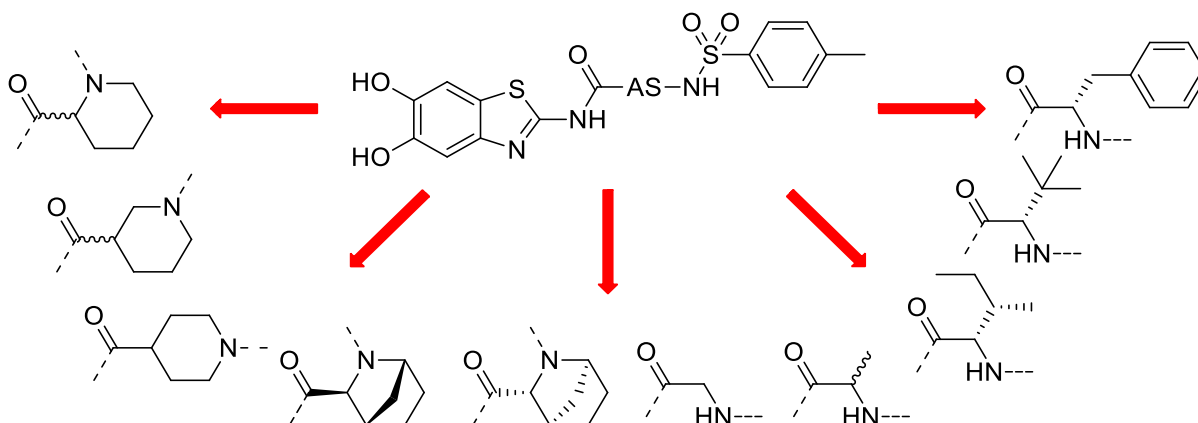


Abbildung 86: Übersicht über den Austausch von Prolin zu proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren.

Weitere Schritte im Design von Inhibitoren an dieser Stelle könnten in dem Einbau weiterer Aminosäuren liegen, welche aus kleineren Ringsystemen, wie Azetidinen, bestehen.

Das Benzo[*d*]thiazol selbst wurde sowohl gegen ein Benzo[*d*]imidazol, als auch gegen ein Benzo[*e*][1,4]diazepin-2,5-dion ausgetauscht. Während letzteres keine verbesserte Inhibition ergab, zeigte das Benzo[*d*]imidazol (S)-168 im Vergleich zu dem Benzo[*d*]thiazol (S)-167 eine

bessere Hemmung und stellt somit einen guten Ausgangspunkt für die weitere Optimierung der Inhibitoren durch das Untersuchen weiterer Heterocyclen dar (**Abbildung 87**).

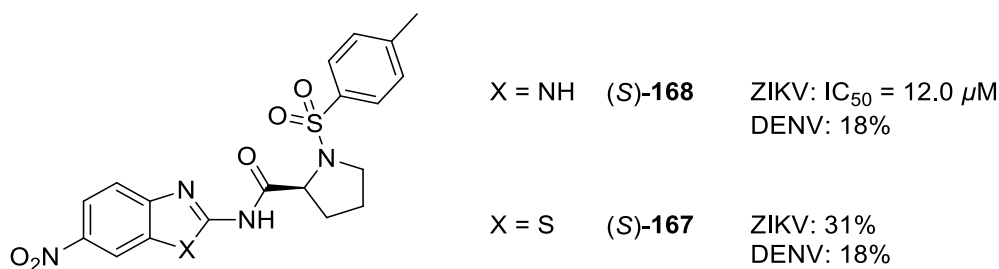


Abbildung 87: Vergleich zwischen dem Benzo[*d*]thiazol (S)-**167** und dem Benzo[*d*]imidazol (S)-**168**. Die prozentualen Werte stellen die Inhibition bei einer Inhibitorkonzentration von 20 μM dar.

Eine weitere Serie von Verbindungen wurde synthetisiert und getestet, um den Bereich der Catecholgruppen zu untersuchen, wobei bioisostere Strukturen verwendet wurden. Das Catechol **173** zeigte keine Inhibition der ZIKV-Protease, jedoch wiesen das Benzotriazol **183** und das Imidazol **181** höhere Hemmungen auf (**Abbildung 88**).

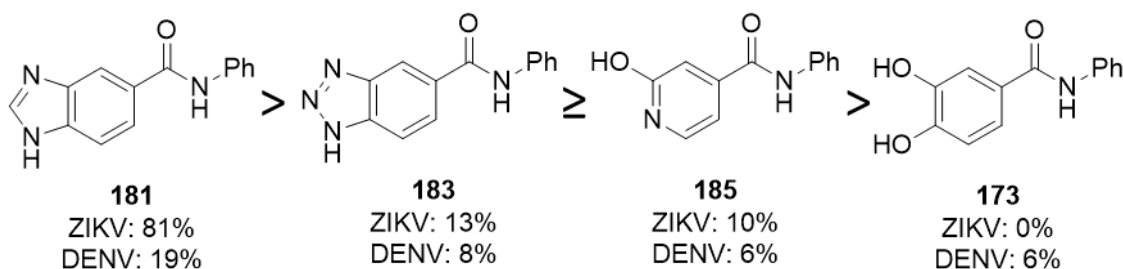


Abbildung 88: Fragment-basierter Ansatz zum Austausch der Catechol-Struktur. Die prozentualen Werte stellen die Inhibition bei einer Inhibitorkonzentration von 100 μM dar.

Die auf dem Benzimidazol basierenden Verbindungen (*R*)- und (*S*)-**190** zeigten dagegen keine Hemmung der ZIKV- und DENV-Protease (**Abbildung 89**). Das Benzimidazol konnte daher nicht als mögliche Alternative zu der Catechol-Struktur bestätigt werden.

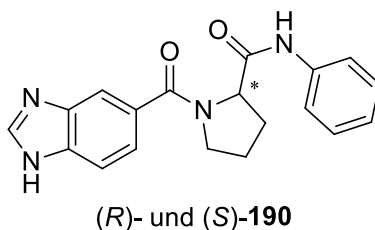


Abbildung 89: Struktur von (*R*)- und (*S*)-**190**

5 Experimentalteil

5.1 Material und Methoden

5.1.1 Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von kommerziellen Herstellern, wie *Acros*, *Alfa Aesar*, *Carbolution*, *Chempur*, *Sigma Aldrich* und *TCI*, erworben und, wenn nicht anders vermerkt, ohne weitere Aufreinigung oder Absolutierung eingesetzt. Ethylacetat, Dichlormethan, Cyclohexan und Aceton wurden vor Verwendung bei vermindertem Druck destilliert.

5.1.2 Chromatographische Methoden

5.1.2.1 Dünnschichtchromatographie

Zur Kontrolle von Reaktionen, Reinheiten, Extraktionen und der säulenchromatographischen Trennungen wurde Dünnschichtchromatographie auf Fertigfolien aus Aluminium des Typs ALGRAM^C XTRA SIL G/UV₂₅₄ der Firma *Macherey-Nagel* durchgeführt. Die Detektion der Substanzen erfolgte durch Fluoreszenzlöschung unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda = 254$ nm, sowie durch Anfärbereagenzien. Das jeweilige Laufmittelgemisch ist als Volumenverhältnis angegeben, im Falle von Zusätzen, wie Trifluoressigsäure oder Triethylamin, wurde jeweils ein Tropfen hinzugegeben.

Das Ninhydrin enthaltende Anfärbereagenz wurde durch Lösen von 0.2 Gew% Ninhydrin in Ethanol hergestellt. Das Anfärbereagenz nach Dragendorff wurde durch Lösen von 0.85 g Bi(NO₃)₃ in 10 mL Eisessig und 40 mL Wasser mit anschließender Zugabe von 8.0 g KI, gelöst in 40 mL Wasser, hergestellt.

5.1.2.2 Säulenchromatographie

Zur Aufreinigung von Substanzen wurde die Säulenchromatographie angewendet, wobei als Füllmaterial *Flash-Säulen Kieselgel 60* (0.04 – 0.063 mm) der Firma *Macherey-Nagel* verwendet wurde. Die Länge und der Durchmesser der Säulen wurde auf das jeweilige Trennproblem angepasst, die Laufmittelzusammensetzungen sind jeweils als

Volumenverhältnis angegeben. Im Falle von Zusatz von Säure (TFA) oder Base (Triethylamin) für saure oder basische Substanzen wurden 0.1% des Zusatzes beigemischt.

5.1.2.3 Semipräparative HPLC

Für Aufreinigungen durch semipräparative HPLC wurde ein *PrepStar*-System der Firma *Varian* verwendet. Es wurde zuerst eine Optimierung der Bedingungen vorgenommen mit einer *Eclipse XDB-C18 5u 4.6x150mm*-Säule der Firma *Agilent* als analytische Säule und anschließend eine Aufreinigung mit Hilfe einer *Zorbax PrepHT XDB-C18 5u 21,2x150mm*-Säule der Firma *Agilent* durchgeführt. Als mobile Phase wurde eine Mischung aus Acetonitril und Wasser verwendet, welche an das jeweilige Trennproblem angepasst wurde, die Detektion erfolgte bei 254 nm.

5.1.2.4 Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse

Enantiomerenverhältnisse (*er*) wurden mit Hilfe einer *Chiralcel IF3 3 µm 4.6 x 250 mm*-Säule bestimmt in einer HPLC *Waters 2695 Separations Module* zusammen mit einem *Column Thermostat Jetstream 2* und einem *Waters 996 Photodiode Array Detector* bei 35 °C. Als mobile Phasen wurden Ethanol und Hexan in den jeweilig angegebenen Volumenverhältnissen verwendet, die Detektion erfolgte bei 254 nm.

5.1.3 Schmelzpunktbestimmung

Die Bestimmung von Schmelzpunkten erfolgte in einseitig offenen Glaskapillaren in einem Schmelzpunktbestimmungsapparat *KSP 1 N* der Firma *Krüss*.

5.1.4 Polarimetrie

Zur Bestimmung von spezifischen Drehwerten α_D^T wurde ein Polarimeter *P3000* der Firma *Krüss* verwendet, gemessen wurde bei Raumtemperatur *T* und der Wellenlänge der Natrium D-Linie ($\lambda = 589 \text{ nm}$). Die verwendeten Lösemittel und Konzentrationen *c* werden jeweils angegeben. Der spezifische Drehwert wurde aus dem gemessenen Drehwinkel α nach folgender Formel berechnet:

$$[\alpha]_D^T = \frac{\alpha}{c * d} \quad (7)$$

d ist die Länge der Küvette von 1 dm. Die erhaltene Einheit $\frac{^{\circ}mL}{g*dm}$ wird bei den einzelnen Werten nicht mit angegeben.

5.1.5 Kernresonanzspektroskopie

Die Messung von NMR-Spektren erfolgte an einem Spektrometer *Fourier 300* der Firma *Bruker*. Die deuterierten Lösemittel wurden von der Firma *Deutero GmbH* bezogen und die Signale der Protonen der nicht vollständig deuterierten Lösemittel relativ zum Standard Trimethylsilan TMS als Referenz verwendet (**Tabelle 22**).^[132]

Tabelle 22: Verschiebung der Restprotonen von Lösemitteln, welche für Kernresonanzspektren verwendet wurden.^[132]

Lösemittel	δ [ppm] ¹ H	δ [ppm] ¹³ C
Chloroform- <i>d</i>	7.260	77.160
DMSO- <i>d</i> ₆	2.500	39.520
Methanol- <i>d</i> ₄	4.870	49.000

Die Signale werden mit ihren Verschiebungen in ppm angegeben, zur Angabe der Multiplizität wurden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett sowie Kombinationen nach dem Schema: dd = Dublett vom Dublett. Zur Auswertung der Spektren wurden DEPT90, COSY, HSQC, HMBC Experimente und Analogien zu Stammverbindungen herangezogen.

5.1.6 Infrarotspektroskopie

Die Infrarotspektren wurden auf einem Spektrometer des Typs *Avatar 330 FT IR-Spektrometer* der Firma *Thermo-Nicolet* aufgenommen. Es wurde eine ATR-Korrektur vorgenommen.

5.1.7 HPLC ESI-MS

Reinheiten und Massen wurden per HPLC mit einer nachgeschalteten ESI-MS bestimmt. Die HPLC-Anlage bestand aus einer *HP Agilent 1100 Series* inklusive einem binären Pumpensystem, Dioden-Array-Detektor und Autosampler. Als Laufmittel dienten Gemische aus Acetonitril und Wasser im angegebenen Verhältnis, wobei jeweils 0.01% Ameisensäure zugemischt wurden. Die Trennung erfolgte auf einer *Agilent Poroshell 29 EC-C₁₈* Säule (150 x 2.10 mm) 4 μ M, die Angabe der Reinheiten basiert auf dem Verhältnis der Signalflächen bei 254 nm. Als Massenspektrometer wurde eine *LC/MSD Ion Trap* der Firma *Agilent* im positiven Modus verwendet.

5.2 Fluorimetrische Assays

Die Messungen wurden in 96-Well Platten von *Greiner Bio-One* mit einem Fluorimeter *F2000* oder einem *Spark 10M* der Firma *Tecan* in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt, wobei jeweils eine Doppelbestimmung erfolgte. Die Substrate und Inhibitoren wurden als Stammlösungen in DMSO eingesetzt.

In jedes Well wurden 180 μ L Puffer, 5 μ L der Enzymlösung, 10 μ L Inhibitor-Lösung in DMSO oder reines DMSO für die Kontrolle und 10 μ L der Substratlösung pipettiert. Für das erste Screening wurden die Inhibitoren in einer Endkonzentration von 20 μ M eingesetzt, für die Bestimmung von IC₅₀-Werten wurden Verdünnungsreihen mit sieben Konzentrationen zwischen 0.01 und 100 μ M durchgeführt. Die Fluoreszenz wurde für zehn Minuten alle 30 Sekunden bei 25 °C bei einer Wellenlänge von 380 nm zur Anregung und 460 nm zur Emission gemessen. Zur Berechnung der IC₅₀-Werte wurde das Programm *GraFit*[®] der Firma *Erithacus Software Limited* verwendet, wobei die folgende Formel genutzt wurde.

$$v = \frac{Y_{max} - Y_{min}}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^S} + Y_{min} \quad (8)$$

Dabei ist Y [$\Delta F/\text{min}$] die Hydrolyserate des Substrates, Y_{max} und Y_{min} sind Maximum und Minimum der Dosis-Wirkungskurve und S ist der Hill-Koeffizienten.^[133]

Zur Bestimmung von nicht-kompetitivem Verhalten wurde der IC₅₀-Wert bei verschiedenen Substratkonzentrationen gemessen.^[92]

5.2.1 ZIKV und DENV2 NS2B/NS3-Protease

Die NS2B/NS3 Proteasen von ZIKV und DENV2 wurden von [REDACTED] und [REDACTED] bereitgestellt, als Substrat wurde Boc-GRR-AMC in einer Endkonzentration von 100 μ M verwendet, welches von der Firma *Bachem* bezogen wurde. Der Puffer für die Assays bestand aus 1 mM CHAPS, 50 mM TRIS und 20% Glycerin bei einem pH-Wert von 9.

5.2.2 Cathepsin B und Cathepsin L

Cathepsin B und Cathepsin L wurden von *Merck Milipore* bezogen, der Puffer der Enzymlösungen bestand aus 50 mM Tris, 2 mM DTT, 5 mM EDTA und 200 mM NaCl bei pH 6.5. Für den Assay Puffer wurde anstelle von 2 mM DTT 0.005% Brij 35 eingesetzt, als Substrat wurde Z-Phe-Arg-AMC in einer Endkonzentration von 100 μ M (Cathepsin B), bzw. 6.25 μ M (Cathepsin L) eingesetzt, welches von der Firma *Bachem* bezogen wurde.

5.2.3 Cruzain und Rhodesain

Cruzain wurde von [REDACTED] ([REDACTED]) zur Verfügung gestellt, Rhodesain wurde von [REDACTED] ([REDACTED]) bereitgestellt, als Substrat wurde Z-Phe-Arg-AMC eingesetzt, welches von der Firma *Bachem* bezogen wurde. Für Cruzain wurde eine Endkonzentration des Substrates von 200 μ M eingesetzt, bei Rhodesain eine von 10 μ M. Der Puffer der Enzymlösung bestand aus 50 mM NaOAc, 5 mM DTT, 5 mM EDTA und 200 mM NaCl bei pH 5.5. Für den Assay Puffer wurde anstelle von 5 mM DTT 0.005% Brij 35 eingesetzt.

5.3 Kovalentes Docking

Für das kovalente Docking von **32**, **31**, **33** und **34** an die Cystein-Mutanten der DENV2 NS2B/NS3-Protease (T118C, T120C, T122C, A164C, A166C) wurden letztere per *MOE 2019.01*^[95] erstellt. Ausgehend von der offenen Konformation der DENV2-Protease (PDB-ID 2FOM^[53]) wurden die Aminosäuren einzeln ausgetauscht und anschließend eine Energieminimierung des Cysteins im Kraftfeld *Amber10*^[134] durchgeführt. Für das kovalente Docking wurde die Konformation der Liganden im Kraftfeld *MMF94x*^[135] hinsichtlich der

Energie minimiert und dann mit MOE mittels der vorgegebenen 1,4-Addition des jeweiligen Cystein-Restes mit einem α,β -ungesättigten Carbonyl das Docking durchgeführt, wobei der Rezeptor als flexibel betrachtet wurde. Zur Bewertung der verschiedenen Posen wurde die Scoring-Funktion $GB/VI^{[136]}$ verwendet und anschließend ein Refinement mit *Affinity dG* durchgeführt.

5.4 Metabolismusstudien mit Rattenlebermikrosomen

Alle benötigten Enzyme und Rattenlebermikrosomen wurden von *Sigma Aldrich* bezogen und vom Hersteller auf die Anwesenheit von Cytochrom P450, Cytochrom B5 und die Aktivität von CYP1A, CYP3A, CYP2C und Cytochrom C Reduktase getestet. Für den Assay wurde ein NADPH-generierendes System aus einem Phosphat-Puffer (750 μL , 100 mM, pH 7.4), MgCl_2 (50 μL , 80 mM), Glucose-6-Phosphat (50 μL , 20 mM), NADP als Natriumsalz (50 μL , 20 mM) und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (50 μL , 100 IU/mL) verwendet. Dieses System wurde für zehn Minuten bei 37 °C inkubiert, anschließend die Mikrosomen (50 μL , 20 mg/mL) hinzugefügt und für weitere zehn Minuten bei 37 °C inkubiert. Für die Kontrollen wurde Phosphatpuffer anstelle der Mikrosomen verwendet. Die Inhibitoren wurden anschließend hinzugegeben (2 μL , 5.21 mM in Acetonitril) und für insgesamt eine Stunde bei 37 °C inkubiert, wobei Aliquote von 50 μL bei 0, 15, 30, 45 und 60 Minuten entnommen wurden. In den Aliquoten wurde durch 100 μL eiskaltes Acetonitril die Reaktion gestoppt und die Proben auf Eis gelagert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand per LC-MS/MS analysiert, wobei als Trennsäule eine *Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈* 150x2.10 mm 4 μm -Säule verwendet wurde und die mobile Phase aus 40% Acetonitril, 60% Wasser und einer Beimischung von 0.01% Ameisensäure bestand. Die Ionenchromatogramme wurden durch das Verwenden von elektronischen Filtern für die gesuchten Ionen erhalten.

5.5 Zellpermeabilitätsstudien

Eine Schicht von Caco-2-Zellen (C2Bbe1) auf einer semipermeablen Membran (Porendurchmesser 0.4 μm , Fläche 1.12 cm^2) wurde durch [REDACTED] ([REDACTED]) auf der Oberseite (Donor) mit 0.5 mL 10 μM (R)-**48** oder (R)-**52** in einem Puffer (DMEM, 10% fetales Kälberserum, 1% nicht-essentielle Aminosäuren, 1%

DMSO) versehen. Unter der Membran (Akzeptor) waren 1.5 mL Puffer vorhanden (**Abbildung 90**).

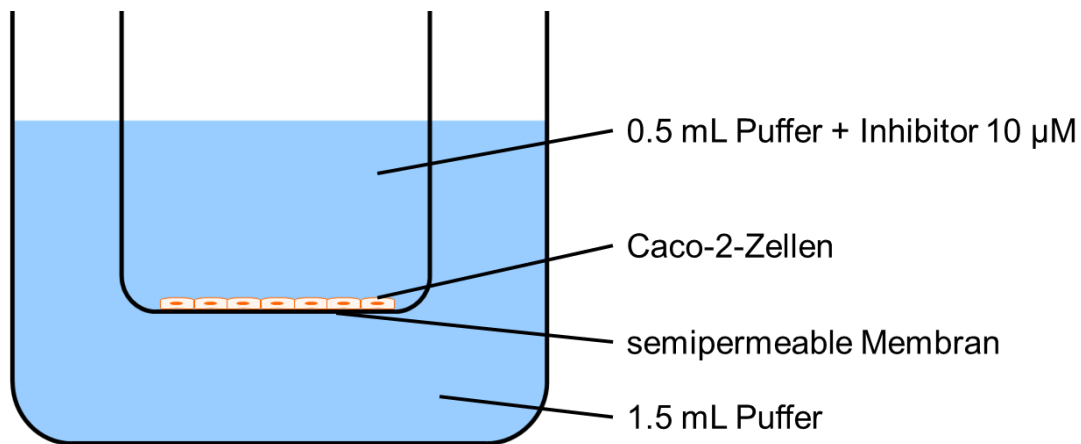


Abbildung 90: Versuchsaufbau zur Bestimmung der Zellpermeabilität.

Beide Lösungen wurden nach 3 h entnommen und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Anschließend wurden den oberen Proben 200 µL und den unteren 600 µL Methanol zugegeben. Die Proben wurden durchmischt und anschließend für 10 Minuten bei 16.1 *rcf* zentrifugiert. Der Überstand wurde per LC-MS analysiert. Für (*R*)-**48** wurde eine mobile Phase von 40% Acetonitril, 60% Wasser mit 0.01% Ameisensäure verwendet. Für (*R*)-**48** wurde eine mobile Phase von 50% Acetonitril, 50% Wasser mit 0.01% Ameisensäure verwendet. Die Ionenchromatogramme wurden durch das Verwenden von elektronischen Filtern für die gesuchten Ionen erhalten. Zur Auswertung wurden die Flächen der Signale von der oberen und unteren Lösung im Verhältnis relativ zu der Kontrolle, welche keine Zellschicht enthielt, herangezogen.

5.6 Allgemeine Synthesemethoden

5.6.1 Methoden zur Darstellung von Carbonsäureamiden aus Carbonsäuren

5.6.1.1 Methode A1: Verwendung von TBTU als Aktivierungsreagenz

Die Carbonsäure (1.0 Äq.) wurde zusammen mit TBTU (1.1 Äq.), HOBt (1.0 Äq.) in einem geeigneten Lösemittel vorgelegt und mit DIPEA (4.0 Äq.) bei Kühlung mit einem Eisbad versehen. Nach einer halben Stunde wurde das Amin (1.0 Äq.) zugegeben und das Eisbad entfernt. Nach der jeweils angegebenen Reaktionsdauer wurden der Lösung Wasser und Ethylacetat zugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase weitere drei Mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden jeweils dreimal mit 2 M HCl, gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung extrahiert, mit MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel bei vermindertem Druck entfernt.

5.6.1.2 Methode A2: Verwendung von Säurechloriden

Das Amin oder dessen Hydrochlorid (1.0 Äq.) wurde in Dichlormethan vorgelegt und Triethylamin (1.1 Äq., im Falle von Hydrochloriden 2.1 Äq.), gefolgt von dem Säurechlorid (1.1 Äq.) unter Kühlung mit einem Eisbad zugegeben. Die Mischung wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt, anschließend das Lösemittel entfernt und der Rückstand per Säulenchromatographie aufgereinigt.

5.6.2 Methoden zur Darstellung von Sulfonamiden

5.6.2.1 Methode B1: Verwendung von Sulfonylchloriden

Das Amin (1.0 Äq.) wurde in Pyridin als Lösemittel vorgelegt und anschließend das Sulfonylchlorid bei Raumtemperatur hinzugefügt. Nach Rühren für 16 h wurde das Lösemittel entfernt und der Rückstand durch Säulenchromatographie weiter aufgereinigt.

5.6.3 Methoden zur Einführung von Schutzgruppen

5.6.3.1 Methode C1: Schützung von Aminogruppen mit Boc₂O

Das Amin (1.0 Äq.), Boc₂O (1.0 Äq.) und K₂CO₃ (2.1 Äq.) wurden vorgelegt und gleiche Mengen an Dioxan und Wasser hinzugegeben. Nach Rühren für 16 h wurde das organische Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit 2 M HCl angesäuert. Extraktion mit Ethylacetat, gefolgt von Trocknung der organischen Phase mit Natriumsulfat und Entfernen des organischen Lösemittels bei vermindertem Druck, ergab die Produkte.

5.6.4 Methoden zur Entfernung von Schutzgruppen

5.6.4.1 Methode D1: Entfernung von Methoxygruppen durch BBr₃

Der Phenoether (1.0 Äq.) wurde in Dichlormethan gelöst und BBr₃ (1 M in Dichlormethan) bei -78 °C langsam zugetropft. Das Kältebad wurde nach einer halben Stunde entfernt und die Reaktion bei Raumtemperatur für 16 h gerührt und anschließend bei 0 °C 20 mL Dichlormethan, gefolgt von 2 mL Methanol zugegeben. Nach 15 Minuten Rühren wurde das Produkt durch Filtration erhalten.

5.6.4.2 Methode D2: Entfernung von Boc-Gruppen durch HCl

Das *tert*-Butoxycarbonylamin (1.0 Äq.) wurde vorgelegt und HCl (4 M in Dioxan) als Lösemittel zugegeben. Nach 30 Minuten Rühren wurde die Kristallisation durch Zugabe von Pentan vervollständigt und das Produkt als Hydrochlorid durch Filtration erhalten.

5.6.4.3 Methode D3: Hydrolyse von Carbonsäureestern durch LiOH

Der Ester (1.0 Äq.) wurde in THF vorgelegt und eine Lösung von LiOH (10.0 Äq.) in Wasser hinzugefügt. Nach Rühren für 16 h wurde das organische Lösemittel durch Destillation unter vermindertem Druck entfernt, die wässrige Phase mit 2 M HCl angesäuert und mit Ethylacetat extrahiert. Nach dem Waschen der organischen Phase mit 2 M HCl und Trocknen mit Na₂SO₄ wurde das Produkt durch Entfernen des Lösemittels unter vermindertem Druck erhalten.

5.6.4.4 Methode D4: Hydrogenolyse von Benzylestern

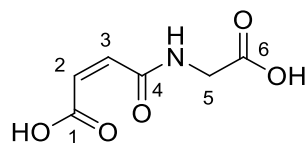
Der Ester (1.0 Äq.) wurde in THF vorgelegt und Palladium auf Aktivkohle (5 Gew%) hinzugegeben. Anschließend wurde unter einem Druck von 4 bar im Autoklaven für 16 h hydriert. Das Produkt wurde durch Filtration und anschließendem Entfernen des organischen Lösemittels bei vermindertem Druck erhalten.

5.6.4.5 Methode D5: Spaltung von Methoxygruppen durch $AlCl_3/EtSH$

Aluminiumchlorid wurde in Ethanthiol (1 mL) gelöst und unter Kühlung mit einem Eis/Wasser-Bad für 15 Minuten gerührt. Anschließend wurde das Edukt, gelöst in Dichlormethan, zugegeben und das Eisbad entfernt. Nach Rühren für 16 h wurde die Reaktion durch Zugabe von konzentrierter HCl (5 mL) gestoppt. Das Rohprodukt wurde durch Filtration erhalten und per Säulenchromatographie aufgereinigt.

5.7 Maleimide

5.7.1 Z-4-((Carboxymethyl)amino)-4-oxobutansäure (38)



Nach einer Vorschrift von Baumhover *et al.*^[94] wurden Glycin (5.0 g, 67 mmol, 1.0 Äq.) und Maleinsäureanhydrid (6.5 g, 67 mmol, 1.0 Äq.) für 3 Stunden in Eisessig bei Raumtemperatur gerührt. Filtration ergab Z-4-((Carboxymethyl)amino)-4-oxobutansäure (11.2 g, 65 mmol, 98% d. Theorie (Lit.: 95%^[94])) als farblosen Feststoff.

R_f: 0.46 (CH/EE 1:1 + TFA)

Smp: 184 – 186 °C (Lit.: 187 – 189 °C^[94])

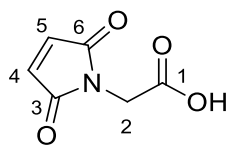
¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 9.19 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, *N*-H), 6.42 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H, *H*-2), 6.29 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H, *H*-3), 3.90 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, *H*-5).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ [ppm] = 171.6 (*C*-6), 167.7 (*C*-1), 166.1 (*C*-4), 127.6 (*C*-3), 125.9 (*C*-2), 41.8 (*C*-5).

IR: ν [cm⁻¹] = 3312, 3053, 2917, 2620, 2537, 1714, 1674, 1610, 1505, 1398, 1307, 1216, 1108, 1073, 995, 915, 863, 802, 689.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[94]

5.7.2 N-Maleimidglycin (32)



Nach einer Vorschrift von Baumhover *et al.*^[94] wurde **38** (5.00 g, 29 mmol, 1.0 Äq.) nach Zugabe von Triethylamin (8.41 mL, 73 mmol, 2.1 Äq.) und Toluol (100 mL) für 8 h am Wasserabscheider zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde filtriert und das organische Lösemittel entfernt. Der Rückstand wurde mit 2 M HCl angesäuert und mit Ethylacetat (3 x 20 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit NaSO₄ getrocknet und das organische Lösemittel entfernt. N-Maleimidglycin (1.81 g, 12 mmol, 40% d. Theorie (Lit.: 36.5%^[94])) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

R_f: 0.62 (CH/EE 2:1 + TFA)

Smp: 103 – 106 °C (Lit.: 99 – 110 °C^[94])

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.12 (s, 2H, *H*-4, *H*-5), 4.14 (s, 2H, *H*-2).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ [ppm] = 170.4 (*C*-3, *C*-6), 169.0 (*C*-1), 135.0 (*C*-4, *C*-5), 38.6 (*C*-2).

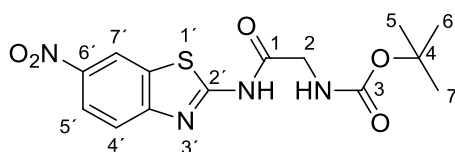
IR: ν [cm⁻¹] = 3094, 2982, 2942, 2727, 1745, 1682, 1574, 1442, 1394, 1312, 1188, 1153, 1047, 923, 837, 795, 694, 674.

ESI-MS: m/z = 155.9 [M+H]⁺ (berechnet: [M] = 155.0)

Reinheit: 99% (H₂O/ACN 55:45)

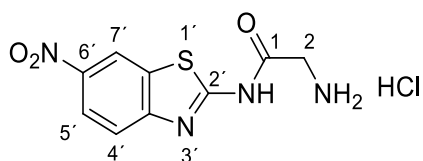
Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[94]

5.7.3 2-((tert-Butoxycarbonyl)amino)-N-(6-nitrobenzo[d]thiazol-2-yl)essigsäureamid (39)



Methode:	A1, Reaktionsdauer: 3 d	
Ansatz:	7-Nitro-2-aminobenzo[d]thiazol	300 mg (1.54 mmol, 1.0 Äq.)
	Boc-Gly-OH	269 mg (1.54 mmol, 1.0 Äq.)
	TBTU	543 mg (1.69 mmol, 1.1 Äq.)
	DIPEA	0.78 mL (4.61 mmol, 3.0 Äq.)
	DMF	10 mL
Ausbeute:	502 mg (1.42 mmol, 93% d. Theorie), farbloser Feststoff	
R _f :	0.41 (CH/EE 1:1)	
Smp:	215 – 219 °C	
¹ H-NMR:	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ [ppm] = 9.02 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H, <i>H</i> -7'), 8.26 (dd, <i>J</i> = 9.0, 2.4 Hz, 1H, <i>H</i> -5'), 7.87 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H, <i>H</i> -4'), 7.24 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 1H, <i>NHCOO</i>), 3.95 (d, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H, <i>H</i> -2), 1.40 (s, 9H, <i>H</i> -5 – <i>H</i> -7).	
¹³ C-NMR:	¹³ C NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ [ppm] = 170.8 (<i>C</i> -1), 163.7 (<i>C</i> -2'), 156.4 (<i>C</i> -3), 153.9 (<i>C</i> -6a'), 143.4 (<i>C</i> -7a'), 132.6 (<i>C</i> -3a'), 122.2 (<i>C</i> -5'), 121.0 (<i>C</i> -4'), 119.5 (<i>C</i> -7'), 78.8 (<i>C</i> -4), 43.8 (<i>C</i> -2), 28.6 (<i>C</i> -5 – <i>C</i> -7).	
IR:	ν [cm ⁻¹] = 3272, 3139, 3103, 2932, 1716, 1678, 1607, 1576, 1555, 1512, 1448, 1434, 1383, 1364, 1338, 1274, 1253, 1184, 1155, 1129, 1051, 1036, 903, 826, 753, 746.	

5.7.4 2-Amino-N-(6-nitrobenzo[d]thiazol-2-yl)acetamid Hydrochlorid (40)



Methode: D2

Ansatz: **39** 400 mg (1.14 mmol, 1.0 Äq.)

HCl (4 M in Dioxan) 9 mL

Ausbeute: 325 mg (1.13 mmol, 99% d. Theorie), gelber Feststoff

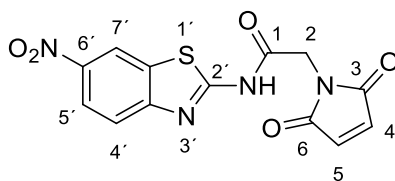
Smp: 255 – 256 °C

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 9.07 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.27 (dd, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 4.09 – 3.92 (m, 2H).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 167.2 (C-1), 162.6 (C-2'), 153.3 (C-6'), 143.3 (C-7a'), 132.2 (C-3a'), 121.9 (C-5'), 121.0 (C-4'), 119.2 (C-7'), 41.0 (C-2).

IR: ν [cm⁻¹] = 3391, 2956, 1703, 1574, 1526, 1495, 1448, 1414, 1393, 1333, 1274, 1245, 1196, 1138, 1112, 1038, 958, 904, 890, 856, 838, 826, 753, 747, 746, 694.

5.7.5 2-Maleimidyl-N-(6-nitrobenzo[d]thiazol-2-yl)acetamid (31)



40 (250 mg, 0.87 mmol, 1.0 Äq.) und Maleinsäureanhydrid (85 mg, 0.87 mmol, 1.0 Äq.) wurden vorgelegt und Eisessig (20 mL) hinzugegeben. Nach Sieden für 8 h wurde durch Filtration 2-Maleimidyl-N-(6-nitrobenzo[d]thiazol-2-yl)acetamid (82 mg, 0.25 mmol, 28% d. Theorie) als farbloser Feststoff erhalten.

R_f: 0.24 (CH/EE 3:1)

Smp: 262 – 265 °C

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 9.07 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, *H*-7'), 8.29 (dd, *J* = 9.0, 2.4 Hz, 1H, *H*-5'), 7.92 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, *H*-4'), 7.18 (s, 2H, *H*-4, *H*-5), 4.50 (s, 2H, *H*-2).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ [ppm] = 170.4 (*C*-3, *C*-6), 167.3 (*C*-1), 163.0 (*C*-2'), 153.3 (*C*-6'), 143.2 (*C*-7a'), 135.1 (*C*-4, *C*-5), 132.2 (*C*-3a'), 121.9 (*C*-5'), 120.8 (*C*-4'), 119.2 (*C*-7'), 40.0 (*C*-2).

IR: ν [cm⁻¹] = 3094, 1714, 1576, 1534, 1446, 1426, 1338, 1281, 1205, 1149, 1045, 833, 752, 696.

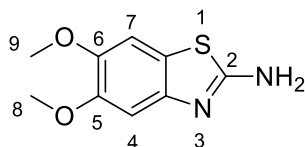
ESI-MS: *m/z* = 333.0 [M+H]⁺ (berechnet: [M] = 332.0)

Reinheit: 95% (H₂O/ACN 55:45)

5.8 Synthese verschiedener Prolinderivate

5.8.1 Grundstrukturen

5.8.1.1 2-Amino-5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol (**41**)



3,4-Dimethoxyanilin (5.00 g, 32.7 mmol, 1.0 Äq.) und KSCN (6.98 g, 71.9 mmol, 2.2 Äq.) wurden in Eisessig (150 mL) suspendiert. Unter Kühlung mit einem Eisbad wurde Brom (1.64 mL, 32.7 mmol, 1.0 Äq.) langsam zugetropft und das Gemisch bei Raumtemperatur für 16 Stunden gerührt und anschließend filtriert. Der Rückstand wurde 20 Minuten in Wasser (100 mL), welches mit konz. HCl (1 mL) angesäuert wurde, refluxiert, anschließend filtriert und das Filtrat mit KOH basisch gestellt. Filtration ergab 2-Amino-5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol (5.98 g, 28.4 mmol, 87% d. Theorie (Literatur: 66%^[137]) als fast farblosen Feststoff.

R_f: 0.15 (CH/EE 1:1)

Smp: 227 °C (Lit: 227 °C^[137])

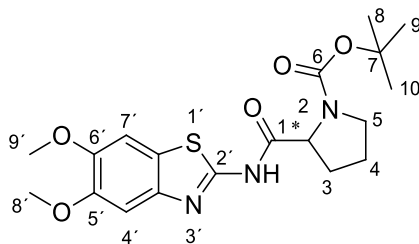
¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.28 (s, 1H, *H*-4), 7.19 (s, 2H, *NH*₂), 6.98 (s, 1H, *H*-7), 3.75 (s, 3H, *H*-8), 3.72 (s, 3H, *H*-9).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 166.3 (*C*-2), 148.7 (*C*-6), 147.2 (*C*-5), 145.1 (*C*-3a), 121.8 (*C*-7a), 105.3 (*C*-7), 102.8 (*C*-4), 56.7 (*C*-9), 56.14 (*C*-8).

IR: ν [cm⁻¹] = 3368, 3305, 3095, 2999, 2963, 2929, 2743, 1651, 1540, 1473, 1443, 1405, 1350, 1311, 1206, 1164, 1053, 981, 873, 774, 704.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[137]

5.8.1.2 (R)- und (S)-1-tert-(Butoxycarbonyl)-N-(5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-pyrrolidin-2-carboxamid ((R)- und (S)-**42**)



Methode: A1, Reaktionsdauer: 3 d

Ansatz: Boc-D- oder L-Prolin 432 mg, 2.01 mmol (1.0 Äq.)

41 422 mg, 2.01 mmol (1.0 Äq.)

TBTU 709 mg, 2.21 mmol (1.1 Äq.)

HOBt 304 mg, 2.01 mmol (1.0 Äq.)

Ausbeute *R*: 808 mg (1.98 mmol, 99% d. Theorie), farbloser Feststoff

Ausbeute *S*: 703 mg (1.72 mmol, 86% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.19 (CH/EE 1:1 + TFA)

Smp *R*: 154 – 156 °C

Smp *S*: 154 – 156 °C

Drehwert *R*: $[\alpha]_{589}^{25} = +100$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, Chloroform)

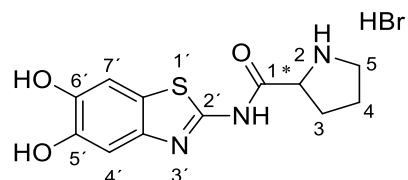
Drehwert *S*: $[\alpha]_{589}^{25} = -86$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, Chloroform)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 7.31 (s, 1H, *H*-4'), 7.22 (s, 1H, *H*-7'), 4.66 – 4.36 (m, 1H, *H*-2), 3.94 (s, 3H, *H*-8'), 3.93 (s, 3H, *H*-9'), 3.66 – 3.29 (m, 2H, *H*-5), 2.60 – 2.35 (m, 1H, *H*-3), 2.08 – 1.86 (m, 3H, *H*-3, *H*-4), 1.60 – 1.30 (m, 9H, *H*-8 – *H*-10).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 171.0 (C-1), 156.7 (C-2'), 153.4 (C-6), 149.3 (C-6'), 147.5 (C-5'), 142.6 (C-3a'), 123.6 (C-7a'), 103.3 (C-4'), 102.7 (C-7'), 81.4 (C-7), 60.0 (C-2), 56.4 (C-8'), 56.1 (C-9'), 47.4 (C-5), 28.4 (C-8 – C-10), 28.2 (C-3) 24.6 (C-4).

IR: ν [cm⁻¹] = 2974, 2935, 1694, 1549, 1487, 1436, 1392, 1366, 1286, 1221, 1199, 1157, 1122, 1088, 1065, 1003, 834, 773.

5.8.1.3 (R)- und (S)-N-(5,6-Dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-pyrrolidin-2-carboxamid Hydrobromid ((R)- und (S)-**49**)



Methode: D1

Ansatz: (R)- oder (S)-**42** 500 mg, 1.23 mmol (1.0 Äq.)

BBr₃ (1 M in DCM) 7.36 mL, 7.36 mmol (6.0 Äq.)

DCM 10 mL

Ausbeute R: 419 mg (1.16 mmol, 95% d. Theorie), beiger Feststoff

Ausbeute S: 428 mg (1.18 mmol, 97% d. Theorie), beiger Feststoff

Smp R: 150 – 152 °C

Smp S: 150 – 152 °C

Drehwert R: $[\alpha]_{589}^{25} = +27$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, Methanol)

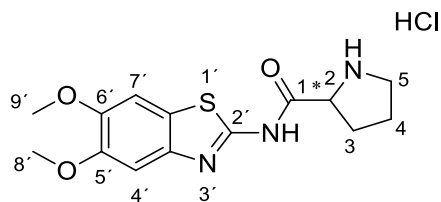
Drehwert S: $[\alpha]_{589}^{25} = -24$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, Methanol)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, Methanol-*d*₄) δ [ppm] = 7.32 (s, 1H, *H*-4'), 7.26 (s, 1H, *H*-7'), 4.84 – 4.63 (m, 1H, *H*-2), 3.60 – 3.39 (m, 2H, *H*-5), 2.78 – 2.51 (m, 1H, *H*-4), 2.37 – 2.05 (m, 3H, *H*-5).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, Methanol-*d*₄) δ [ppm] = 169.3 (*C*-1), 160.4 (*C*-2'), 148.7 (*C*-6'), 147.2 (*C*-3a'), 135.4 (*C*-5'), 120.8 (*C*-7a'), 107.7 (*C*-4'), 104.3 (*C*-7'), 61.8 (*C*-2), 47.7 (*C*-5), 30.7 (*C*-3), 24.9 (*C*-4).

IR: ν [cm⁻¹] = 2973, 2933, 1694, 1550, 1487, 1436, 1393, 1366, 1286, 1222, 1199, 1158, 1122, 1089, 1065, 1003, 835, 773.

5.8.1.4 (R)- und (S)-N-(5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-pyrrolidin-2-carboxamid
Hydrochlorid ((R)- und (S)-**43**)



Methode: D2

Ansatz: (R)- oder (S)-**42** 1.0 Äq.
HCl (4 M in 1,4-Dioxan) 12 mL

Ausbeute R: 341 mg (0.99 mmol, 92% d. Theorie), farbloser Feststoff

Ausbeute S: 131 mg (0.38 mmol, 91% d. Theorie), farbloser Feststoff

Smp R: 96 – 98 °C

Smp S: 96 – 98 °C

Drehwert R: $[\alpha]_{589}^{25} = +43$ ($c = 10 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$, DMSO)

Drehwert S: $[\alpha]_{589}^{25} = -40$ ($c = 10 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$, DMSO)

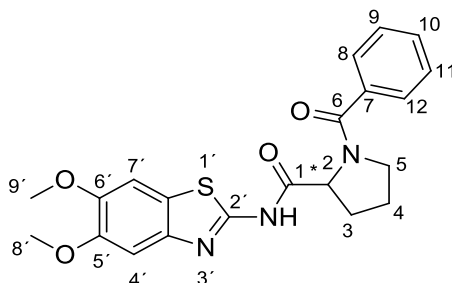
¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.59 (s, 1H, *H*-4'), 7.33 (s, 1H, *H*-7'), 4.62 – 4.47 (m, 1H, *H*-2), 3.82 (s, 3H, *H*-8'), 3.80 (s, 3H, *H*-9'), 3.35 – 3.22 (m, 2H, *H*-5), 2.47 – 2.34 (m, 1H, *H*-3), 2.10 – 1.86 (m, 3H, *H*-3, *H*-4).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ [ppm] = 167.7 (*C*-1), 155.7 (*C*-2'), 149.1 (*C*-5'), 147.3 (*C*-6'), 142.2 (*C*-3a'), 123.0 (*C*-7a'), 103.7 (*C*-4'), 103.6 (*C*-7'), 59.1 (*C*-2), 56.0 (*C*-8'), 55.8 (*C*-9'), 45.7 (*C*-5), 29.5 (*C*-3), 23.6 (*C*-4).

IR: ν [cm⁻¹] = 2929, 1690, 1557, 1490, 1437, 1401, 1367, 1286, 1222, 1201, 1160, 1065.

5.8.2 Amide

5.8.2.1 (R)- und (S)-1-Benzoyl-N-(5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-2-carboxamid ((R)- und (S)-44)



Methode: A2

Ansatz:	(R)- oder (S)-43	1.0 Äq.
	Benzoylchlorid	1.1 Äq.
	Triethylamin	2.1 Äq.
	Dichlormethan	15 mL

Ausbeute R: 114 mg (0.26 mmol, 90% d. Theorie), farbloser Feststoff

Ausbeute S: 230 mg (0.56 mmol, 96% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.28 (CH/EE 2:1)

Smp R: 42 – 44 °C

Smp S: 45 – 47 °C

Drehwert R: $[\alpha]_{589}^{25} = + 61$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, Chloroform)

Drehwert S: $[\alpha]_{589}^{25} = - 55$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, Chloroform)

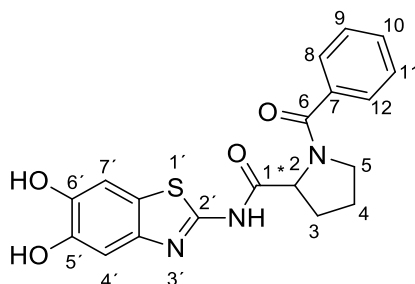
¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.62 – 7.56 (m, 2H, H-8, H-12), 7.54 (s, 1H, H-4'), 7.52 – 7.42 (m, 3H, H-9 – H-11), 7.30 (s, 1H, H-7'), 4.77 – 4.68 (m, 1H, H-2), 3.82 (s, 3H, H-8'), 3.81 (s, 3H, H-9'), 3.71 – 3.58 (m, 1H, H-5), 3.58 – 3.46 (m, 1H, H-5), 2.38 – 2.24 (m, 1H, H-3), 2.04 – 1.82 (m, 3H, H-3, H-4).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 171.1 (C-1), 164.7 (C-6), 156.5 (C-2'), 149.0 (C-5'), 147.0 (C-6'), 142.6 (C-3a'), 136.2 (C-7), 130.3 (C-10), 128.3 (C-9,

C-11), 127.3 (C-8, C-12), 123.0 (C-7a'), 103.7 (C-4'), 103.6 (C-7'), 60.1 (C-2), 56.0 (C-9'), 55.8 (C-8'), 50.0 (C-5), 29.7 (C-3), 25.3 (C-4).

IR: ν [cm⁻¹] = 3681, 3430, 1667, 1572, 1493, 1454, 1441, 1287, 1192, 1135, 1065, 843, 799, 723.

5.8.2.2 (R)- und (S)-1-Benzoyl-N-(5,6-dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-2-carboxamid ((R)- und (S)-45)



Methode: D1

Ansatz: (R) oder (S)-44 1.0 Äq.

BBr₃ (1 M in DCM) 6.0 Äq.

Dichlormethan 10 mL

Ausbeute R: 20 mg (0.05 mmol, 13% d. Theorie), gelber Feststoff

Ausbeute S: 43 mg (0.11 mmol, 60% d. Theorie), gelber Feststoff

R_f: 0.44 (CH/EE 1:1 + TFA)

Smp R: 248 °C

Smp S: 251 °C

Drehwert R: $[\alpha]_{589}^{25} = +103$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, Methanol)

Drehwert S: $[\alpha]_{589}^{25} = -86$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, Methanol)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 7.66 – 7.53 (m, 2H, H-8, H-12), 7.54 – 7.44 (m, 3H, H-9 – H-11), 7.29 (s, 1H, H-4'), 7.17 (s, 1H, H-7'), 4.68 (m, 1H, H-2), 3.81 – 3.50 (m, 2H, H-5), 2.39 – 2.19 (m, 1H, H-4), 2.05 – 1.72 (m, 3H, H-3, H-4).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 170.6 (C-1'), 168.2 (C-6'), 155.2 (C-2'), 145.3 (C-5'), 143.6 (C-3a'), 135.9 (C-6'), 132.3 (C-7), 129.9 (C-10), 128.0 (C-9, C-11), 127.0 (C-8, C-12), 121.6 (C-7a'), 106.3 (C-7'), 105.9 (C-4'), 59.9 (C-2), 49.7 (C-5), 29.4 (C-3), 24.9 (C-4).

IR: ν [cm⁻¹] = 3204, 3234, 2976, 1688, 1598, 1556, 1478, 1448, 1278, 1224, 1159, 854, 699, 658.

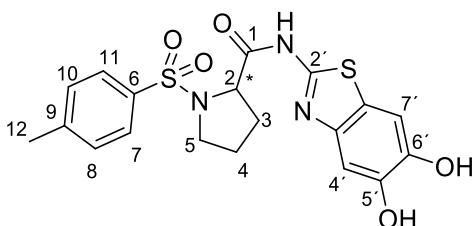
ESI-MS: m/z = 384.1 [M+H]⁺ (berechnet: [M] = 383.1)

Reinheit *R*: 99% (H₂O/ACN 55:45)

Reinheit *S*: 95% (H₂O/ACN 55:45)

5.8.3 Sulfonamide

5.8.3.1 (R)- und (S)-N-(5,6-Dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-1-tosylpyrrolidin-2-carboxamid (*(R)*- und (*S*)-48)



Methode: B1

Ansatz: (*R*)- oder (*S*)-49 1.0 Äq.

TosCl 1.0 Äq.

Pyridin 15 mL

Ausbeute *R*: 86 mg (0.20 mmol, 71% d. Theorie), farbloser Feststoff

Ausbeute *S*: 52 mg (0.12 mmol, 33% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.25 (CH/EE 1:1 + TFA)

Smp *R*: 205 – 209 °C

Smp *S*: 210 °C

Drehwert *R*: $[\alpha]_{589}^{25} = + 113$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, Methanol)

Drehwert *S*: $[\alpha]_{589}^{25} = - 126$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, Methanol)

er R: 97:3 (Hexan/EtOH 70:30)

er S: 97:3 (Hexan/EtOH 70:30)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, Methanol-*d*₄) δ [ppm] = 7.79 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, *H*-7, *H*-11), 7.40 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, *H*-8, *H*-10), 7.21 (s, 1H, *H*-4'), 7.20 (s, 1H, *H*-7'), 4.43 – 4.34 (m, 1H, *H*-2), 3.69 – 3.54 (m, 1H, *H*-5), 3.38 – 3.24 (m, 1H, *H*-5), 2.41 (s, 3H, *H*-12), 2.12 – 1.87 (m, 3H, *H*-3, *H*-4), 1.77 – 1.58 (m, 1H, *H*-4).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, Methanol-*d*₄) δ [ppm] = 172.5 (*C*-1), 158.1 (*C*-2'), 147.4 (*C*-6'), 146.0 (*C*-5'), 145.9 (*C*-9), 141.5 (*C*-3a'), 135.0 (*C*-6), 131.1 (*C*-8, *H*-10), 128.9 (*C*-7, *C*-11), 123.5 (*C*-7a'), 107.0 (*C*-4'), 106.7 (*C*-7'), 63.1 (*C*-1), 50.6 (*C*-5), 25.7 (*C*-4), 21.5 (*C*-12), 20.8 (*C*-3).

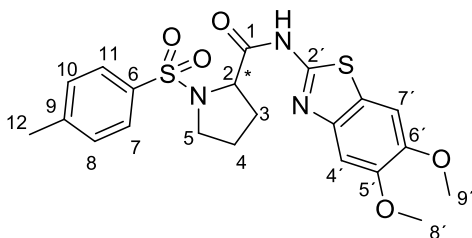
IR: ν [cm⁻¹] = 3435, 2929, 1663, 1599, 1495, 1450, 1343, 1287, 1192, 1140, 1090, 1036, 1009, 722, 662.

ESI-MS: *m/z* = 434.1 [M+H]⁺ (berechnet: [M] = 433.1)

Reinheit *R*: 99% (H₂O/ACN 55:45)

Reinheit *S*: 97% (H₂O/ACN 55:45)

5.8.3.2 (R)- und (S)-N-(5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-1-tosylpyrrolidin-2-carboxamid
((R)- und (S)-52)



Methode: B1

Ansatz: (R) oder (S)-43 1.0 Äq.

TosCl 1.0 Äq.

Pyridin 15 mL

Ausbeute R: 122 mg, 0.26 mmol (91% d. Theorie), farbloser Feststoff

Ausbeute S: 132 mg, 0.30 mmol (80% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.59 (CH/EE 1:1)

Smp R: 171 – 173 °C

Smp S: 172 – 176 °C

Drehwert R: $[\alpha]_{589}^{25} = +152$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, Acetonitril)

Drehwert S: $[\alpha]_{589}^{25} = -144$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, Acetonitril)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 7.82 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, *H*-7, *H*-11), 7.34 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, *H*-8, *H*-10), 7.26 (s, 1H, *H*-4'), 7.23 (s, 1H, *H*-7'), 4.42 – 4.26 (m, 1H, *H*-2), 3.99 (s, 3H, *H*-8'), 3.97 (s, 3H, *H*-9'), 3.86 – 3.67 (m, 1H, *H*-5), 3.40 – 3.18 (m, 1H, *H*-5), 2.42 (s, 3H, *H*-12), 2.20 – 1.93 (m, 3H, *H*-3, *H*-4), 1.84 – 1.56 (m, 1H, *H*-4).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 172.0 (*C*-1), 160.9 (*C*-2'), 151.1 (*C*-5'), 149.2 (*C*-6'), 144.4 (*C*-9), 133.5 (*C*-3a'), 133.3 (*C*-6), 130.1 (*C*-8, *C*-10), 128.0 (*C*-7, *C*-11), 119.5 (*C*-7a'), 103.0 (*C*-4'), 99.6 (*C*-7'), 61.9 (*C*-2), 56.8 (*C*-8'), 56.6 (*C*-9'), 49.6 (*C*-5), 31.5 (*C*-3), 25.1 (*C*-4), 21.7 (*C*-12).

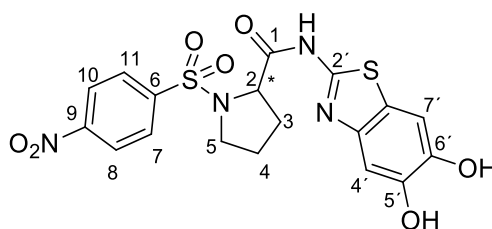
IR: ν [cm⁻¹] = 3461, 3302, 3113, 1688, 1548, 1530, 1489, 1447, 1346, 1287, 1156, 1107, 1088, 1057, 1004, 851, 790, 749, 735, 681.

ESI-MS: $m/z = 462.1$ [M+H]⁺ (berechnet: [M] = 461.1)

Reinheit *R*: 97% (H₂O/ACN 45:55)

Reinheit *S*: >99% (H₂O/ACN 45:55)

5.8.3.3 (R)- und (S)-N-(5,6-Dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-1-nosylpyrrolidin-2-carboxamid
(*(R)*- und (*S*)-50)



Methode: B1

Ansatz: (*R*)- oder (*S*)-**49** 1.0 Äq.

NosCl 1.0 Äq.

Pyridin 15 mL

Ausbeute *R*: 53 mg (0.11 mmol, 41% d. Theorie), farbloser Feststoff

Ausbeute *S*: 122 mg (0.26 mmol, 73% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.28 (CH/EE 1:1 + TFA)

Smp *R*: 222 – 224 °C

Smp *S*: 228 °C

Drehwert *R*: $[\alpha]_{589}^{25} = +230$ (c = 1 $\frac{mg}{ml}$, DMF)

Drehwert *S*: $[\alpha]_{589}^{25} = -210$ (c = 1 $\frac{mg}{ml}$, DMF)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, Methanol-*d*₄) δ [ppm] = 8.38 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, *H*-7, *H*-11), 8.11 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, *H*-8, *H*-10), 7.37 – 7.10 (m, 2H, *H*-4', *H*-7'), 4.65 – 4.34

(m, 1H, *H*-2), 3.80 – 3.57 (m, 1H, *H*-5), 3.53 – 3.34 (m, 1H, *H*-5), 2.28 – 1.94 (m, 3H, *H*-3, *H*-4), 1.91 – 1.60 (m, 1H, *H*-4).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, Methanol-*d*₄) δ [ppm] = 170.6 (*C*-1), 150.4 (*C*-2'), 145.7 (*C*-5'), 144.3 (*C*-3a'), 142.9 (*C*-9), 139.1 (*C*-6'), 136.8 (*C*-6), 128.7 (*C*-8, *C*-10), 124.1 (*C*-7, *C*-11), 122.6 (*C*-7a'), 105.8 (*C*-4'), 105.5 (*C*-7'), 61.6 (*C*-1), 49.1 (*C*-5), 30.9 (*C*-3), 24.4 (*C*-4).

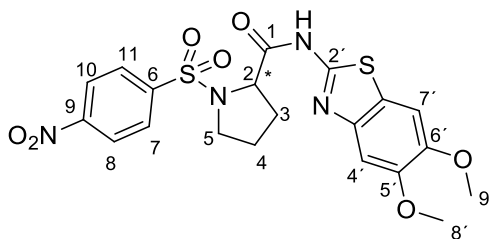
IR: ν [cm⁻¹] = 3461, 3302, 3113, 1688, 1548, 1530, 1489, 1447, 1346, 1287, 1156, 1107, 1088, 1057, 1004, 851, 790, 749, 735, 681.

ESI-MS: m/z = 465.0 [M+H]⁺ (berechnet: [M] = 464.1)

Reinheit *R*: 99% (H₂O/ACN 55:45)

Reinheit *S*: 95% (H₂O/ACN 55:45)

5.8.3.4 (*R*)- und (*S*)-*N*-(5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-*l*-nosylpyrrolidin-2-carboxamid ((*R*)- und (*S*)-**53**)



Methode: B1

Ansatz: (*R*)- oder (*S*)-**43** 100 mg, 0.29 mmol (1.0 Äq.)

NosCl 65 mg, 0.29 mmol (1.0 Äq.)

Pyridin 15 mL

Ausbeute (*R*): 132 mg (0.27 mmol, 92% d. Theorie), farbloser Feststoff

Ausbeute (*S*): 134 mg (0.27 mmol, 94% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.19 (CH/EE 1:1)

Smp *R*: 196 – 199 °C

Smp *S*: 183 – 186 °C

Drehwert *R*: $[\alpha]_{589}^{25} = + 178$ ($c = 5 \frac{mg}{ml}$, Acetonitril)

Drehwert *S*: $[\alpha]_{589}^{25} = - 158$ ($c = 5 \frac{mg}{ml}$, Acetonitril)

ER *R*: 100:0 (Hexan/EtOH 50:50)

ER *S*: 100:0 (Hexan/EtOH 50:50)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.44 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, *H*-7, *H*-11), 8.14 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, *H*-8, *H*-10), 7.57 (s, 1H, *H*-4'), 7.31 (s, 1H, *H*-7'), 4.55 – 4.39 (m, 1H, *H*-2), 3.84 (s, 3H, *H*-8'), 3.81 (s, 3H, *H*-9'), 3.65 – 3.46 (m, 1H, *H*-5), 3.44 – 3.26 (m, 1H, *H*-5), 2.10 – 1.84 (m, 3H, *H*-3, *H*-4), 1.75 – 1.54 (m, 1H, *H*-4).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 170.3 (*C*-1), 158.1 (*C*-2'), 150.1 (*C*-9), 149.0 (*C*-5'), 147.1 (*C*-6'), 142.4 (*C*-6), 142.4 (*C*-3a'), 128.9 (*C*-8, *C*-10), 124.7 (*C*-7, *C*-11), 123.0 (*C*-7a'), 103.7 (*C*-4'), 103.5 (*C*-7'), 60.8 (*C*-2), 56.0 (*C*-8'), 55.8 (*C*-9'), 49.2 (*C*-5), 31.1 (*C*-3), 24.5 (*C*-4).

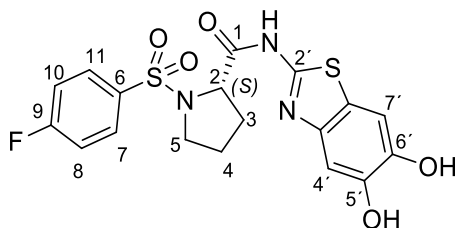
IR: ν [cm⁻¹] = 2923, 2596, 2360, 1716, 1653, 1600, 1563, 1528, 1496, 1471, 1438, 1403, 1345, 1287, 1189, 1161, 1138, 1108, 1090, 1064, 1011, 854, 829, 796, 736, 722, 685.

ESI-MS: $m/z = 493.1$ [M+H]⁺ (berechnet: [M] = 492.1)

Reinheit *R*: 99% (H₂O/ACN 45:55)

Reinheit *S*: 99% (H₂O/ACN 45:55)

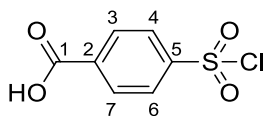
5.8.3.5 (S)-N-(5,6-Dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-1-(4-fluorphenylsulfonyl)pyrrolidin-2-carboxamid ((S)-51)



Methode:	B1	
Ansatz:	(S)-49	100 mg (0.28 mmol, 1.0 Äq.)
	4-Fluorphenylsulfonyl	65 mg (0.33 mmol, 1.2 Äq.)
	Pyridin	10 mL
Ausbeute:	81 mg (0.18 mmol, 67% d. Theorie), farbloser Feststoff	
R _f :	0.13 (CH/EE 1:1 + TFA)	
Smp:	135 – 137 °C	
Drehwert:	[α] ₅₈₉ ²⁵ = – 48 (c = 5 $\frac{mg}{ml}$, Methanol)	
¹ H-NMR:	¹ H NMR (300 MHz, Methanol- <i>d</i> ₄) δ [ppm] = 7.98 (dd, <i>J</i> = 8.7, 5.0 Hz, 2H, <i>H</i> -7, <i>H</i> -11), 7.35 (d, <i>J</i> = 8.7, 8.6 Hz, 2H, <i>H</i> -8, <i>H</i> -10), 7.23 – 7.13 (m, 2H, <i>H</i> -4, <i>H</i> -7), 4.48 – 4.35 (m, 1H, <i>H</i> -2), 3.67 – 3.54 (m, 1H, <i>H</i> -5), 3.41 – 3.24 (m, 1H, <i>H</i> -5), 2.13 – 1.90 (m, 3H, <i>H</i> -3, <i>H</i> -4), 1.82 – 1.65 (m, 1H, <i>H</i> -4).	
¹³ C-NMR:	¹³ C NMR (75 MHz, Methanol- <i>d</i> ₄) δ [ppm] = 172.3 (<i>C</i> -1), 156.0 (<i>C</i> -2'), 147.0 (d, <i>J</i> = 107.7 Hz, <i>C</i> -9), 143.1 (<i>C</i> -3a'), 134.6 (<i>C</i> -6), 131.8 (d, <i>J</i> = 9.5 Hz, <i>C</i> -8, <i>C</i> -10), 122.6 (<i>C</i> -7a'), 117.5 (d, <i>J</i> = 23.1 Hz, <i>C</i> -8, <i>C</i> -11), 107.4 (<i>C</i> -4'), 106.8 (<i>C</i> -7'), 63.0 (<i>C</i> -2), 50.5 (<i>C</i> -5), 32.2 (<i>C</i> -3), 20.1 (<i>C</i> -4).	
IR:	ν [cm ⁻¹] = 3400, 3227, 1668, 1627, 1495, 1465, 1287, 1190, 1139, 1089, 866, 845, 799, 726.	
ESI-MS:	m/z = 438.1 [M+H] ⁺ (berechnet: [M] = 437.1)	
Reinheit:	97% (H ₂ O/ACN 55:45)	

5.9 Metabolismusstudien

5.9.1.1 4-Chlorsulfonylbenzoesäure (68)



Periodsäure (2.99, 13.1 mmol, 2.5 Äq.) und CrO_3 (0.10 g, 1.05 mmol, 0.2 Äq.) wurden in Acetonitril (50 mL) suspendiert und Tosylchlorid (1.00 g, 5.25 mmol, 1.0 Äq.) hinzugegeben. Nach Rühren für 1 h wurde Wasser hinzugegeben und durch Filtration 4-Chlorsulfonylbenzoesäure (0.91 g, 4.12 mmol, 79% d. Theorie) als farbloser Feststoff erhalten.

R_f: 0.39 (CH/EE 3:1)

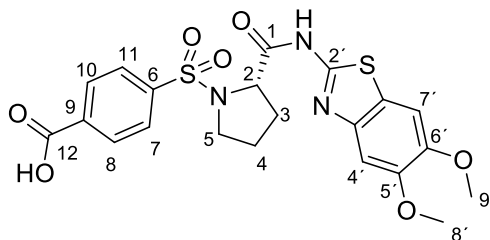
Smp: 230 – 232 °C (Lit.: 235 °C^[138])

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.90 (d, J = 7.7 Hz, 2H, *H*-3, *H*-7), 7.69 (d, J = 7.7 Hz, 2H, *H*-4, *H*-6).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 167.1 (*C*-1), 152.0 (*C*-2), 130.9 (*C*-5), 129.3 (*C*-3, *H*-7), 125.9 (*C*-4, *H*-6).

IR: ν [cm⁻¹] = 1690, 1603, 1584, 1436, 1401, 1392, 1311, 1283, 1112, 1087, 790, 738, 674, 618, 679.

5.9.1.2 (S)-N-(5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-1-(4-carboxyphenylsulfonyl)-pyrrolidin-2-carboxamid ((S)-**69**)



Methode: B1

Ansatz: **68** 200 mg (0.58 mmol, 1.0 Äq.)

(S)-**43** 192 mg (0.87 mmol, 1.5 Äq.)

Pyridin 10 mL

Ausbeute: 34 mg (0.07 mmol, 12% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.28 (CH/EE 2:1 + TFA)

Smp: 103 – 105 °C

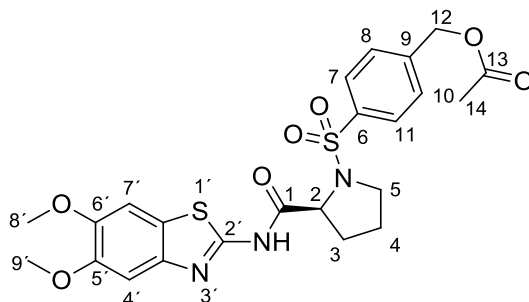
Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = -154$ ($c = 5 \frac{mg}{ml}$, DMSO)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.17 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, *H*-8, *H*-10), 8.00 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, *H*-7, *H*-11), 7.57 (s, 1H, *H*-4'), 7.31 (s, 1H, *H*-7'), 4.56 – 4.38 (m, 1H, *H*-1), 3.84 (s, 3H, *H*-8'), 3.82 (s, 3H, *H*-9'), 3.64 – 3.48 (m, 1H, *H*-5), 3.32 – 3.20 (m, 1H, *H*-5), 2.06 – 1.83 (m, 3H, *H*-3, *H*-4), 1.66 – 1.51 (m, 1H, *H*-4).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 170.5 (*C*-1), 166.2 (*C*-12), 156.1 (*C*-2'), 149.0 (*C*-5'), 147.1 (*C*-6'), 142.5 (*C*-3a'), 140.4 (*C*-9), 134.9 (*C*-6), 130.3 (*C*-8, *C*-10), 127.6 (*C*-7, *C*-11), 123.0 (*C*-7a'), 103.7 (*C*-4'), 103.5 (*C*-7'), 60.8 (*C*-1), 56.0 (*C*-9'), 55.8 (*C*-8'), 49.2 (*C*-5), 31.1 (*C*-3), 24.5 (*C*-4).

IR: ν [cm⁻¹] = 2654, 1693, 1637, 1562, 1472, 1432, 1343, 1273, 1212, 1200, 1140, 1085, 1012, 987, 832, 683.

5.9.1.3 (S)-4-((2-((5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)carbamoyl)pyrrolidine-1-yl)sulfonyl)benzyl Acetat ((S)-74)



(S)-**43** (200 mg, 0.58 mmol, 1.0 Äq.) wurde zusammen mit wasserfreiem Natriumacetat (191 mg, 2.33 mmol, 4.0 Äq.) in DMF (15 mL) gelöst und anschließend 4-Brommethylphenylsulfonylchlorid (157 mg, 0.58 mmol, 1.0 Äq.) hinzugefügt. Nach Rühren bei 50 °C für 8 h wurden Ethylacetat (20 mL) und Wasser (20 mL) hinzugefügt und die wässrige Phase mit Ethylacetat (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 2 M HCl (3 x 20 mL), gesättigter NaHCO₃-Lösung (3 x 20 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (3 x 20 mL) gewaschen. Entfernen des Lösemittels bei vermindertem Druck lieferte 4-((2-((5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)carbamoyl)pyrrolidine-1-yl)sulfonyl)benzyl Acetat (224 mg, 0.43 mmol, 74% d. Theorie) als farblosen Feststoff.

R_f: 0.16 (CH/EE 1:1)

Smp: 165 – 168 °C

Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = -182$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, Chloroform)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 7.87 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, *H*-7, *H*-11), 7.53 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, *H*-8, *H*-10), 7.31 (s, 1H, *H*-4'), 7.22 (s, 1H, *H*-7'), 5.17 (s, 2H, *H*-12), 4.38 – 4.26 (m, 1H, *H*-2), 3.95 – 3.92 (s, 6H, *H*-8', *H*-9'), 3.70 – 3.54 (m, 1H, *H*-5), 3.30 – 3.16 (m, 1H, *H*-6), 2.39 – 2.25 (m, 1H, *H*-3), 2.13 (s, 3H, *H*-14), 1.95 – 1.64 (m, 3H, *H*-14).

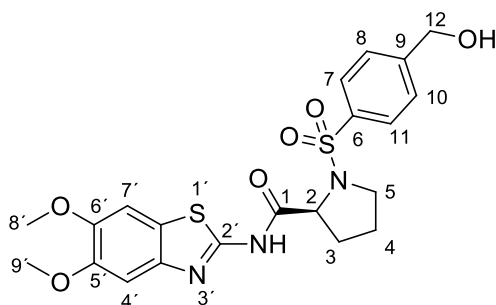
¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 170.6 (C-13), 169.4 (C-1), 155.8 (C-2'), 149.5 (C-OCH₃), 147.8 (OCH₃), 142.6 (C-3a'), 142.4 (C-6), 135.2 (C-9), 128.6 (C-8, C-10), 128.3 (C-7, C-11), 123.8 (C-7a'), 103.6 (C-4'), 102.7 (C-7'), 64.9 (C-12), 62.4 (C-2), 56.5 (OCH₃), 56.2 (OCH₃), 50.1 (C-5), 30.1 (C-3), 24.6 (C-4), 20.9 (C-14).

IR: ν [cm⁻¹] = 3305, 2963, 1740, 1698, 1549, 1489, 1435, 1328, 1289, 1268, 1238, 1222, 1200, 1153, 1090, 1066, 1041, 1001, 864, 821, 775, 688.

ESI-MS: $m/z = 520.1$ [M+H]⁺ (berechnet: [M] = 519.1)

Reinheit: 96% (H₂O/ACN 55:45)

5.9.1.4 (S)-N-(5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-1-((4-(hydroxymethyl)phenyl)sulfonyl)pyrrolidin-2-carboxamid ((S)-**64**)



74 (90 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.) und LiOH (41 mg, 1.73 mmol, 10.0 Äq.) wurden in einem Kolben vorgelegt und THF (12 mL) und Wasser (3 mL) hinzugegeben. Die Lösung wurde für 16 h gerührt und anschließend mit Wasser (10 mL) versetzt. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (3 x 10 mL) extrahiert und anschließend die organische Phase mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen (10 mL). Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand per Säulenchromatographie (CH/EE 1:2) aufgereinigt. Es wurde *N*-(5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-1-((4-(hydroxymethyl)phenyl)sulfonyl)pyrrolidin-2-carboxamid (70 mg, 0.15 mmol, 85% d. Theorie) als gelber Feststoff erhalten.

R_f: 0.13 (CH/EE 1:2)

Smp: 64 – 66 °C

Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = -129$ ($c = 10 \frac{mg}{ml}$, Acetonitril)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.86 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, *H*-7, *H*-11), 7.63 – 7.53 (m, 3H, *H*-8, *H*-10, *H*-4'), 7.31 (s, 1H, *H*-7'), 5.47 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, OH), 4.62 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H, *H*-12), 4.46 – 4.33 (m, 1H, *H*-2), 3.84 (s, 3H, *H*-9'), 3.82 (s, 3H, *H*-8'), 3.57 – 3.43 (m, 1H, *H*-5), 3.26 – 3.13 (m, 1H, *H*-5), 1.96 – 1.81 (m, 3H, *H*-3, *H*-4), 1.59 – 1.42 (m, 1H, *H*-4).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 170.7 (C-1), 156.1 (C-2'), 149.0 (C-9'), 148.4 (C-6), 147.1 (C-8'), 142.5 (C-3a'), 134.9 (C-9), 127.3 (C-7, C-11), 126.9 (C-8, C-10), 123.0 (C-7a'), 103.7 (C-4'), 103.5 (C-7'), 62.2 (C-12), 60.8 (C-2), 56.0 (C-OCH₃), 55.8 (C-OCH₃), 49.2 (C-5), 31.0 (C-3), 24.5 (C-4).

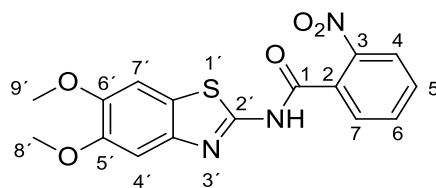
IR: ν [cm⁻¹] = 3277, 2923, 2853, 1693, 1545, 1485, 1437, 1409, 1339, 1285, 1219, 1200, 1156, 1089, 1062, 1013, 993, 832, 674.

ESI-MS: m/z = 478.1 [M+H]⁺ (berechnet: [M] = 477.1)

Reinheit: >99% (H₂O/ACN 55:45)

5.10 Hybridinhibitor

5.10.1 N-(5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-2-nitrobenzamid (78)



Methode: A1, Reaktionsdauer: 3 d

Ansatz:	2-Nitrobenzoesäure	250 mg (1.50 mmol, 1.0 Äq.)
	41	314 mg (1.50 mmol, 1.0 Äq.)
	TBTU	321 mg (1.65 mmol, 1.1 Äq.)
	DIPEA	0.48 mL (3.74 mmol, 2.5 Äq.)
	DMF	20 mL

Ausbeute: 352 mg (0.98 mmol, 65% d. Theorie), gelber Feststoff

R_f: 0.46 (CH/EE 1:1)

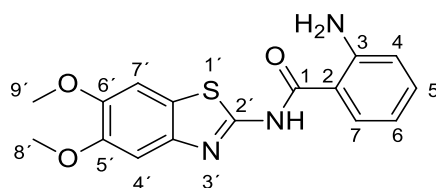
Smp: 121 – 122 °C

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.20 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, *H*-4), 7.95 – 7.77 (m, 3H, *H*-5 – *H*-7), 7.60 (s, 1H, *H*-4'), 7.34 (s, 1H, *H*-7'), 3.83 (s, 6H, *H*-8', *H*-9').

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] 165.2 (*C*-1), 155.6 (*C*-2'), 149.5 (*C*-5'), 147.7 (*C*-6'), 146.8 (*C*-2), 143.0 (*C*-3a'), 134.8 (*C*-5), 132.2 (*C*-6), 130.9 (*C*-3), 130.2 (*C*-7), 124.9 (*C*-4), 123.4 (*C*-7a'), 104.1 (*C*-4'), 104.0 (*C*-7'), 56.4 (*C*-8', *C*-9').

IR: ν [cm⁻¹] = 3271, 1680, 1623, 1528, 1518, 1487, 1435, 1285, 1267, 1235, 1142, 1068, 845.

5.10.22-Amino-N-(5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-benzamid (79)



78 (115 mg, 0.32 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Methanol (35 mL) gelöst und Palladium auf Aktivkohle (5 mg) hinzugegeben. Die Suspension wurde unter Wasserstoff (4 bar) für 1 h gerührt, anschließend filtriert und das organische Lösemittel bei vermindertem Druck entfernt.

79 (65 mg, 0.20 mmol, 62% d. Theorie) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

R_f: 0.33 (CH/EE 1:1)

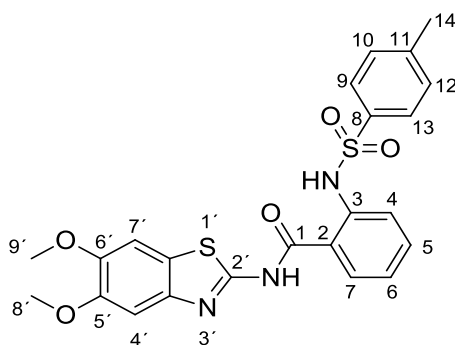
Smp: 83 – 86 °C

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.89 (dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz, 1H, *H*-7), 7.57 (s, 1H, *H*-4'), 7.31 – 7.22 (m, 3H, *H*-5, *H*-7'), 6.81 (dd, *J* = 8.3, 1.2 Hz, 1H, *H*-4), 6.59 (ddd, *J* = 8.1, 6.9, 1.2 Hz, 1H, *H*-6), 3.85 (s, 3H, *H*-8'), 3.84 (s, 3H, *H*-9').

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 168.1 (*C*-1), 157.9 (*C*-2'), 151.4 (*C*-2), 149.4 (*C*-5'), 147.4 (*C*-6'), 142.6 (*C*-3a'), 133.9 (*C*-5), 129.7 (*C*-7), 123.3 (*C*-7a'), 117.2 (*C*-4), 115.2 (*C*-6), 112.0 (*C*-3), 104.2 (*C*-4'), 103.6 (*C*-7'), 56.4 (*C*-8'), 56.2 (*C*-9').

IR: ν [cm⁻¹] = 3531, 3285, 1672, 1633, 1528, 1427, 1293, 1255, 1221, 1145, 1062, 837.

5.10.3 N-(5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-2-(4-methylphenylsulfonamido)-benzamid (80)



Methode: B1

Ansatz: **79** 100 mg (0.30 mmol, 1.0 Äq.)

Tosylchlorid 64 mg (0.33 mmol, 1.1 Äq.)

Pyridin 15 mL

Ausbeute: 71 mg (0.15 mmol, 48% d. Theorie), gelber Feststoff

R_f: 0.48 (CH/EE 2:1)

Smp: 181 °C

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.92 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, *H*-7), 7.65 – 7.56 (m, 3H, *H*-9, *H*13, *H*-4'), 7.54 – 7.44 (m, 1H, *H*-5), 7.37 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, *H*-4), 7.28 (s, 1H, *H*-7'), 7.23 (dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz, 3H, *H*-6, *H*-10, *H*-12), 3.84 (s, 3H, *H*-8'), 3.84 (s, 3H, *H*-9'), 2.24 (s, 3H, *H*-14).

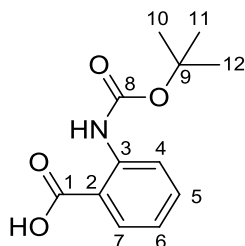
¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 169.9 (*C*-1), 156.5 (*C*-2'), 149.6 (*C*-5'), 147.7 (*C*-6'), 144.2 (*C*-11), 139.5 (*C*-3a'), 137.8 (*C*-2), 136.4 (*C*-8), 133.4 (*C*-5), 130.6 (*C*-7), 130.2 (*C*-10, *C*-12), 127.3 (*C*-9, *C*-13), 124.8 (*C*-6), 124.3 (*C*-3), 122.3 (*C*-7a'), 122.2 (*C*-4), 104.5 (*C*-4'), 102.3 (*C*-7'), 56.5 (*C*-9'), 56.3 (*C*-8'), 21.4 (*C*-14).

IR: ν [cm⁻¹] = 2980, 1655, 1616, 1544, 1486, 1437, 1396, 1286, 1244, 1202, 1162, 1062, 837.

ESI-MS: *m/z* = 484.1 [M+H]⁺ (berechnet: [M] = 483.1)

Reinheit: 99% (H₂O/ACN 45:55)

5.10.42-((tert-Butoxycarbonyl)amino)benzoesäure (82)



Methode: C1

Ansatz:	Anthranilsäure	1.00 g (7.29 mmol, 1.0 Äq.)
	Boc ₂ O	1.59 g (7.29 mmol, 1.0 Äq.)
	K ₂ CO ₃	2.11 g (15.31 mmol, 2.1 Äq.)
	Dioxan	40 mL
	Wasser	10 mL

Ausbeute: 1.19 g (5.04 mmol, 69% d. Theorie(Lit.: 63%^[139]), farbloser Feststoff

R_f: 0.29 (CH/EE 3:1)

Smp: 151 – 153 °C (Lit.: 155 – 157 °C^[140])

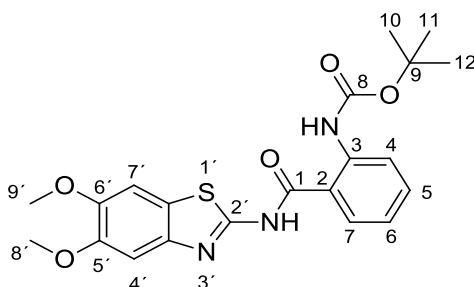
¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.28 (dd, *J* = 8.5, 1.1 Hz, 1H, *H*-4), 7.96 (dd, *J* = 7.9, 1.7 Hz, 1H, *H*-7), 7.56 (ddd, *J* = 8.7, 7.3, 1.7 Hz, 1H, *H*-5), 7.07 (ddd, *J* = 8.1, 7.3, 1.2 Hz, 1H, *H*-6), 1.48 (s, 9H, *H*-10 – *H*-12).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 169.7 (*C*-1), 152.0 (*C*-8), 141.5 (*C*-2), 134.2 (*C*-5), 131.3 (*C*-7), 121.5 (*C*-6), 118.0 (*C*-4), 115.2 (*C*-3), 80.1 (*C*-9), 27.9 (*C*-10 – *C*-12).

IR: ν [cm⁻¹] = 3307, 2983, 2933, 2635, 2566, 1725, 1665, 1606, 1585, 1520, 1471, 1453, 1415, 1389, 1367, 1321, 1265, 1246, 1228, 1146, 1096, 1044, 1023, 900, 840, 807, 775, 756, 745, 710, 662.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[141]

5.10.52-(tert-Butoxycarbonylamino)-N-(5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)benzamid (83)



Methode: A1, Reaktionsdauer: 3 d

Ansatz: **82** 300 mg (1.43 mmol, 1.0 Äq.)

41 339 mg (1.43 mmol, 1.0 Äq.)

TBTU 504 mg (1.57 mmol, 1.1 Äq.)

DIPEA 0.97 mL (5.71 mmol, 4.0 Äq.)

DMF 30 mL

Ausbeute: 593 mg (1.38 mmol, 97% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.33 (CH/EE 2:1)

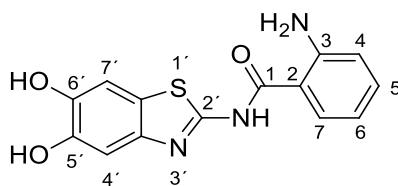
Smp: 132 – 134 °C

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 8.41 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, *H*-4), 7.78 (dd, *J* = 7.9, 1.4 Hz, 1H, *H*-7), 7.54 – 7.40 (m, 1H, *H*-5), 7.20 (s, 1H, *H*-4'), 6.89 – 6.79 (m, 1H, *H*-6), 6.60 (s, 1H, *H*-7'), 3.94 (s, 3H, *H*-9'), 3.64 (s, 3H, *H*-8'), 1.55 (s, 9H, *H*-10 – *H*-12).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 167.1 (*C*-1), 158.2 (*C*-8), 152.9 (*C*-2'), 149.3 (*C*-5'), 147.7 (*C*-6'), 141.4 (*C*-2), 141.1 (*C*-3a'), 134.0 (*C*-5), 128.4 (*C*-7), 123.1 (*C*-7a'), 122.0 (*C*-6), 120.4 (*C*-4), 118.4 (*C*-3), 102.6 (*C*-4'), 102.4 (*C*-7'), 80.9 (*C*-9), 56.3 (*C*-9'), 55.9 (*C*-8'), 28.4 (*C*-10 – *C*-12).

IR: ν [cm⁻¹] = 3253, 3158, 2967, 2929, 2853, 1730, 1701, 1655, 1561, 1519, 1436, 1389, 1365, 1283, 1236, 1155, 1048, 1022, 996, 834, 790, 737, 723, 703.

5.10.62-Amino-N-(5,6-dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)benzamid (84)



Methode: D1

Ansatz: **83** 350 mg (0.81 mmol, 1.0 Äq.)

BBr₃ (1 M in DCM) 6.52 mL (6.52 mmol, 8.0 Äq.)

DCM 15 mL

Ausbeute: 211 mg (0.70 mmol, 86% d. Theorie), gelber Feststoff

R_f: 0.32 (CH/EE 1:1)

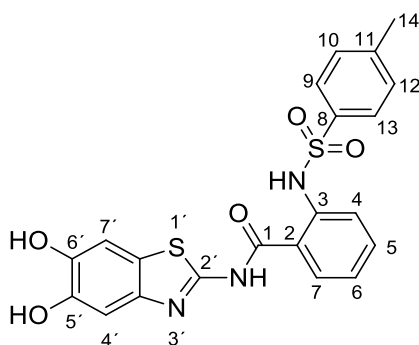
Smp: 230 – 232 °C

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.05 (dd, *J* = 7.9, 1.3 Hz, 1H, *H*-7), 7.55 (ddd, *J* = 8.6, 7.3, 1.3 Hz, 1H, *H*-5), 7.36 – 7.20 (m, 2H, *H*-4, *H*-4'), 7.27 – 7.21 (m, 1H, *H*-6), 7.14 (s, 1H, *H*-7').

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 160.2 (*C*-1), 156.7 (*C*-2'), 150.4 (*C*-2), 148.1 (*C*-5'), 147.0 (*C*-6'), 143.1 (*C*-3a'), 136.4 (*C*-5), 127.3 (*C*-7), 125.2 (*C*-6), 123.2 (*C*-7a'), 120.1 (*C*-3), 120.0 (*C*-4'), 118.7 (*C*-4), 116.5 (*C*-7').

IR: ν [cm⁻¹] = 3409, 3200, 1691, 1597, 1556, 1487, 1453, 1292, 1171, 1144, 1088.

5.10.7N-(5,6-Dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-2-(4-methylphenylsulfonamido)benzamid (76)

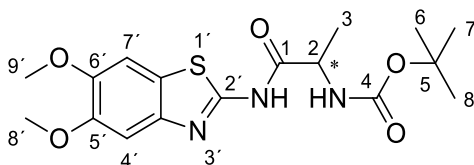


Methode:	B1	
Ansatz:	84	70 mg (0.23 mmol, 1.0 Äq.)
	Tosylchlorid	58 mg (0.30 mmol, 1.3 Äq.)
	Pyridin	10 mL
Ausbeute:	98 mg (0.22 mmol, 93% d. Theorie), gelber Feststoff	
R _f :	0.7 (CH/EE 1:1 + TFA)	
Smp:	205 °C	
¹ H-NMR:	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ [ppm] = 7.62 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 2H, <i>H</i> -9, <i>H</i> -13), 7.53 – 7.37 (m, 2H, <i>H</i> -6, <i>H</i> -7), 7.35 – 7.14 (m, 5H, <i>H</i> -4, <i>H</i> -5, <i>H</i> -10, <i>H</i> -12, <i>H</i> -4'), 7.10 (m, 1H, <i>H</i> -7'), 2.25 (s, 3H, <i>H</i> -14).	
¹³ C-NMR:	¹³ C NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ [ppm] = 174.8 (<i>C</i> -1), 152.8 (<i>C</i> -2'), 146.2 (<i>C</i> -6'), 146.1 (<i>C</i> -5'), 144.2 (<i>C</i> -11), 143.7 (<i>C</i> -3a'), 140.6 (<i>C</i> -2), 135.9 (<i>C</i> -8), 132.9 (<i>C</i> -7), 130.6 (<i>C</i> -5) 129.7 (<i>C</i> -10, <i>C</i> -12), 126.8 (<i>C</i> -9, <i>C</i> -13), 124.0 (<i>C</i> -4) 123.3 (<i>C</i> -7a'), 121.3 (<i>C</i> -6), 113.3 (<i>C</i> -3), 107.1 (<i>C</i> -4'), 106.9 (<i>C</i> -7'), 20.9 (<i>C</i> -14).	
IR:	ν [cm ⁻¹] = 3196, 2979, 2974, 1680, 1598, 1560, 1478, 1448, 1341, 1279, 1158, 1092, 1037, 851, 698, 661.	
ESI-MS:	m/z = 456.2 [M+H] ⁺ (berechnet: [M] = 455.1)	
Reinheit:	99% (H ₂ O/ACN 55:45)	

5.11 Aminosäurenaustausch

5.11.1 Alanin

5.11.1.1 (R)- und (S)-2-(tert-Butoxycarbonylamino)-N-(5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)propionamid ((R)- und (S)-92)



Methode: A1, Reaktionsdauer: 3 d

Ansatz:	(R)- oder (S)-41	1.0 Äq.
	Boc-Ala-OH	1.0 Äq.
	TBTU	1.1 Äq.
	HOBt	1.0 Äq.
	DIPEA	4.0 Äq.
	Ethylacetat	20 mL

Ausbeute R: 561 mg, 1.47 mmol (77% d. Theorie), farbloser Feststoff

Ausbeute S: 864 mg, 2.27 mmol (48% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.37 (CH/EE 2:1)

Smp R: 83 – 85 °C

Smp S: 93 – 100 °C

Drehwert R: $[\alpha]_{589}^{25} = +43$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, EE)

Drehwert S: $[\alpha]_{589}^{25} = -39$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, EE)

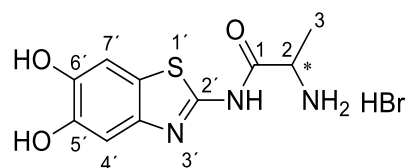
¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ = 7.31 (s, 1H, H-4'), 7.23 (s, 1H, H-7'), 4.01 – 3.81 (m, 7H, OCH₃, CH), 1.56 – 1.34 ppm (m, 12H, CH₃).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ = 171.8 (C-1), 157.3 (C-4), 155.8 (C-2'), 149.7 (C-5'), 147.9 (C-6'), 141.3 (C-3a'), 123.3 (C-7a'), 103.0 (C-4'), 102.9 (C-

7'), 80.9 (C-5), 56.5 (6'-OCH₃), 56.3 (5'-OCH₃), 50.6 (C-2), 28.4 (CH₃-Boc), 18.1 ppm (C-3).

IR: ν [cm⁻¹] = 3358, 2975, 2936, 1698, 1556, 1520, 1487, 1450, 1435, 1365, 1286, 1271, 1249, 1222, 1202, 1156, 1064, 1019, 996, 835, 781.

5.11.1.2 (R)- und (S)-2-Amino-N-(5,6-dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)propionamid hydrobromid ((R)- und (S)-**101**)



Methode: D1

Ansatz: (R)- oder (S)-**92** 1.0 Äq.

BBr₃ (1M in Dichlormethan) 8.0 Äq.

Ausbeute R: 326 mg, 0.98 mmol (93% d. Theorie), farbloser Feststoff

Ausbeute S: 292 mg, 0.78 mmol (66% d. Theorie), farbloser Feststoff

Smp R: 149 – 153 °C

Smp S: 148 – 152 °C

Drehwert R: $[\alpha]_{589}^{25} = 0$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, DMF)

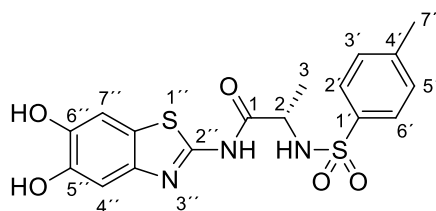
Drehwert S: $[\alpha]_{589}^{25} = 0$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, DMF)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.27 (s, 1H, H-4'), 7.13 (s, 1H, H-7'), 4.23 – 4.08 (m, 1H, H-2), 1.48 ppm (d, J = 7.0 Hz, 3H, H-3).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 169.3 (C-1), 155.5 (C-2'), 144.7 (C-5'), 144.0 (C-6'), 142.3 (C-3a'), 122.2 (C-7a'), 107.0 (C-4'), 106.3 (C-7'), 49.1 (C-2), 17.2 ppm (C-3).

IR: ν [cm⁻¹] = 3182, 2865, 1564, 1484, 1446, 1291, 1180, 723.

5.11.1.3 (R)- und (S)-N-(5,6-Dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-2-(4-methylphenylsulfonamido)-propionamid ((R)- und (S)-**109**)



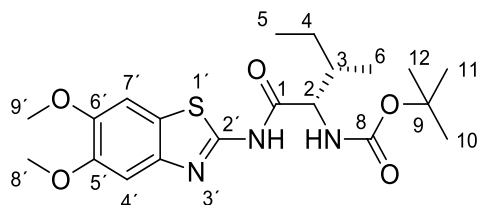
Methode:	B1	
Ansatz:	(R)- oder (S)- 101	100 mg (0.30 mmol, 1.0 Äq.)
	Tosylchlorid	57 mg (0.30 mmol, 1.0 Äq.)
	Pyridin	10 mL
Ausbeute R:	85 mg (0.21 mmol, 70% d. Theorie), farbloser Feststoff	
Ausbeute S:	35 mg (0.09 mmol, 29% d. Theorie), farbloser Feststoff	
R _f :	0.45 (CH/EE 1:1 + TFA)	
Smp R:	196 – 199 °C	
Smp S:	180 – 190 °C	
Drehwert R:	[α] ₅₈₉ ²⁵ = + 30 (c = 5 $\frac{mg}{ml}$, Methanol)	
Drehwert S:	[α] ₅₈₉ ²⁵ = – 32 (c = 5 $\frac{mg}{ml}$, Methanol)	
¹ H-NMR:	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ = 7.65 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 2H, <i>H</i> -2', <i>H</i> -6'), 7.27 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 2H, <i>H</i> -3', <i>H</i> -5'), 7.20 (s, 1H, <i>H</i> -4'), 7.09 (s, 1H, <i>H</i> -7'), 4.16 – 3.99 (m, 1H, <i>H</i> -2), 2.22 (s, 3H, <i>H</i> -7'), 1.18 ppm (d, <i>J</i> = 7.0 Hz, 3H, <i>H</i> -3).	
¹³ C-NMR:	¹³ C NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ = 170.4 (C-1), 158.2 (C-2''), 145.6 (C-5''), 144.0 (C-6''), 142.7 (C-4'), 142.2 (C-3a'), 137.8 (C-1'), 129.4 (C-3', C-5'), 126.6 (C-2', C-6'), 122.0 (C-7a'), 106.5 (C-7'), 106.3 (C-4'), 51.6 (C-2), 20.9 (C-7'), 18.7 ppm (C-3).	
IR:	ν [cm ⁻¹] = 3424, 3216, 1715, 1674, 1447, 1199, 1182, 1025, 996, 973, 830, 796, 768, 718.	
ESI-MS:	m/z = 408.1 [M+H] ⁺ (berechnet: [M] = 407.1)	

Reinheit *R*: 95% (H₂O/ACN 65:35)

Reinheit *S*: 98% (H₂O/ACN 65:35)

5.11.2 Isoleucin

5.11.2.1 (S,S)-2-(tert-Butoxycarbonylamino)-N-(5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-3-methylpentansäureamid (**93**)



Methode: A1, Reaktionsdauer: 3 d

Ansatz:	Boc-Ile-OH	400 mg (1.73 mmol, 1.0 Äq.)
	41	364 mg (1.73 mmol, 1.0 Äq.)
	TBTU	611 mg (1.90 mmol, 1.1 Äq.)
	HOBt	234 mg (1.73 mmol, 1.0 Äq.)
	DIPEA	1.12 mL (6.92 mmol, 4.0 Äq.)
	DMF	15 mL

Ausbeute: 540 mg (1.27 mmol, 74% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.47 (CH/EE 1:1)

Smp: 99 – 103 °C

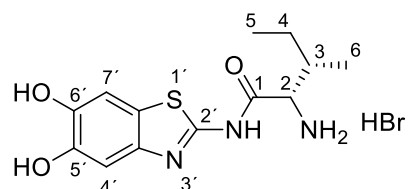
Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = -14$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, EE)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ = 7.39 (s, 1H, H-4'), 7.17 (s, 1H, H-7'), 4.40 – 4.25 (m, 1H, H-2), 3.89 (s, 3H, H-9'), 3.89 (s, 3H, H-8'), 1.83 – 1.68 (m, 1H, H-3), 1.46 – 1.27 (m, 10H, H-4, H-10, H-11, H-12), 1.05 – 0.83 (m, 1H, H-4), 0.78 – 0.58 ppm (m, 6H, H-5, H-6).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ = 171.5 (C-1), 157.9 (C-8), 156.0 (C-2'), 149.9 (C-6'), 148.0 (C-5'), 140.5 (C-3a'), 122.8 (C-7a'), 102.9 (C-4'), 102.7 (C-7'), 80.4 (C-9), 59.4 (C-2), 56.5 (C-9'), 56.4 (C-8'), 37.6 (C-3), 28.4 (C-10, C-11, C-12), 24.7 (C-4), 15.5 (C-6), 11.1 ppm (C-5).

IR: ν [cm⁻¹] = 2966, 2931, 1694, 1556, 1487, 1436, 1366, 1286, 1250, 1222, 1201, 1160, 1065, 838.

5.11.2.2 (S,S)-2-Amino-N-(5,6-dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-3-methylpentansäureamid
Hydrobromid (**102**)



Methode: D1

Ansatz: **93** 350 mg (0.83 mmol, 1.0 Äq.)

BBr₃ (1 M in DCM) 5.78 mL (7 Äq.)

DCM 15 mL

Ausbeute: 308 mg (0.82 mmol, 99% d. Theorie), farbloser Feststoff

Smp: 281 – 283 °C

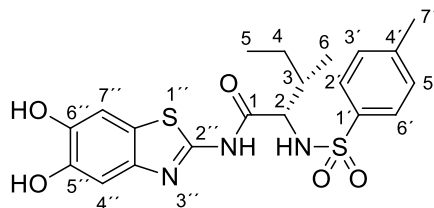
Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = +29$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, DMF)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.26 (s, 1H, *H*-4'), 7.13 (s, 1H, *H*-7'), 4.06 – 3.86 (m, 1H, *H*-2), 2.04 – 1.90 (m, 1H, *H*-3), 1.66 – 1.45 (m, 1H, *H*-4), 1.26 – 1.05 (m, 1H, *H*-4), 0.99 – 0.81 ppm (m, 6H, *H*-5, *H*-6).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 167.6 (*C*-1), 154.8 (*C*-2'), 146.4 (*C*-6'), 145.9 (*C*-5'), 144.4 (*C*-3a'), 121.9 (*C*-7a'), 106.6 (*C*-4'), 106.5 (*C*-7'), 56.8 (*C*-2), 36.3 (*C*-3), 24.1 (*C*-4), 14.7 (*C*-6), 11.1 ppm (*C*-5).

IR: ν [cm⁻¹] = 3429, 3124, 2932, 2684, 1707, 1603, 1559, 1500, 1469, 1398, 1356, 1328, 1282, 1241, 1211, 1178, 1153, 1113.

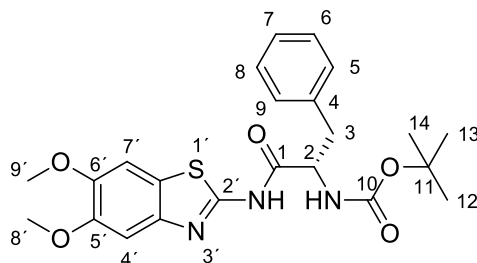
5.11.2.3 (S,S)-N-(5,6-Dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-3-methyl-2-(4-methylphenylsulfonylamido)pentansäureamid (**110**)



Methode:	B1	
Ansatz:	102	100 mg (0.27 mmol, 1.0 Äq.)
	Tosylchlorid	51 mg (0.27 mmol, 1.0 Äq.)
	Pyridin	10 mL
Ausbeute:	47 mg (0.10 mmol, 39% d. Theorie), farbloser Feststoff	
R _f :	0.35 (CH/EE 1:1 + TFA)	
Smp:	253 – 256 °C	
Drehwert:	[α] ₅₈₉ ²⁵ = –30 (c = 5 $\frac{mg}{ml}$, Methanol)	
¹ H-NMR:	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ [ppm] = 7.62 (d, <i>J</i> = 8.2, 2H, <i>H</i> -2', <i>H</i> -6'), 7.21 – 7.12 (m, 3H, <i>H</i> -3', <i>H</i> -5', <i>H</i> -4'), 7.08 (s, 1H, <i>H</i> -7'), 3.92 – 3.72 (m, 1H, <i>H</i> -2), 2.07 (s, 3H, <i>H</i> -7'), 1.73 – 1.62 (m, 1H, <i>H</i> -3), 1.56 – 1.39 (m, 1H, <i>H</i> -4), 1.15 – 0.97 (m, 1H, <i>H</i> -4), 0.83 – 0.63 (m, 6H, <i>H</i> -5, <i>H</i> -6).	
¹³ C-NMR:	¹³ C NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ [ppm] = 169.6 (<i>C</i> -1), 154.7 (<i>C</i> -2''), 145.5 (<i>C</i> -6''), 143.9 (<i>C</i> -3a''), 142.5 (<i>C</i> -4'), 141.8 (<i>C</i> -5''), 137.7 (<i>C</i> -1'), 129.2 (<i>C</i> -3', <i>C</i> -5'), 126.6 (<i>C</i> -2', <i>C</i> -6'), 122.0 (<i>C</i> -7a''), 106.5 (<i>C</i> -7''), 106.2 (<i>C</i> -4''), 60.1 (<i>C</i> -2), 36.7 (<i>C</i> -3), 24.2 (<i>C</i> -4), 20.7 (<i>C</i> -7'), 14.9 (<i>C</i> -6), 10.2 (<i>C</i> -5).	
IR:	ν [cm ⁻¹] = 3253, 3099, 2966, 2878, 1666, 1553, 1492, 1451, 1364, 1347, 1319, 1279, 1160, 1090.	
ESI-MS:	m/z = 450.2 [M+H] ⁺ (berechnet: [M] = 449.1)	
Reinheit:	95% (H ₂ O/ACN 55:45)	

5.11.3 Phenylalanin

5.11.3.1 (S)-2-(tert-Butoxycarbonylamino)-N-(5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-3-phenylpropionsäureamid (**94**)



Methode: A1, Reaktionsdauer: 3 d

Ansatz:	Boc-Phe-OH	300 mg (1.13 mmol, 1.0 Äq.)
	41	238 mg (1.13 mmol, 1.0 Äq.)
	TBTU	399 mg (1.24 mmol, 1.1 Äq.)
	HOBt	153 mg (1.13 mmol, 1.0 Äq.)
	DIPEA	0.77 mL (4.52 mmol, 4 Äq.)
	DMF	20 mL

Ausbeute: 370 mg (0.81 mmol, 72% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.70 (CH/EE 1:1)

Smp: 96 – 98 °C

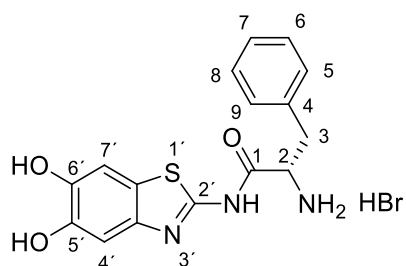
Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = +24$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, EE)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 7.32 (s, 1H, *H*-4'), 7.24 (s, 1H, *H*-7'), 7.21 – 7.14 (m, 3H, *H*-5, *H*-7, *H*-9), 7.09 – 6.98 (m, 2H, *H*-6, *H*-8), 4.87 – 4.60 (m, 1H, *H*-2), 3.96 (s, 3H, *H*-9'), 3.90 (s, 3H, *H*-8'), 3.26 – 2.99 (m, 2H, *H*-3), 1.39 (s, 9H, *H*-12 – *H*-14).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 170.9 (*C*-1), 157.8 (*C*-10), 155.6 (*C*-2'), 150.0 (*C*-5'), 148.1 (*C*-6'), 139.8 (*C*-3a'), 135.7 (*C*-4), 129.2 (*C*-6, *C*-8), 128.8 (*C*-5, *C*-9), 127.3 (*C*-7), 122.6 (*C*-7a'), 102.8 (*C*-7'), 102.6 (*C*-4'), 77.4 (*C*-11), 56.5 (*C*-9'), 56.4 (*C*-8'), 56.1 (*C*-2), 38.3 (*C*-3), 28.3 (*C*-12 – *C*-14).

IR: ν [cm⁻¹] = 2970, 2931, 1685, 1560, 1487, 1436, 1391, 1366, 1287, 1222, 1201, 1160, 1065.

5.11.3.2 (S)-2-Amino-N-(5,6-dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-3-phenylpropionsäureamid
Hydrobromid (**103**)



Methode: D1

Ansatz: **94** 300 mg (0.66 mmol, 1.0 Äq.)

BBr₃ (1 M in DCM) 5.25 mL (5.25 mmol, 8.0 Äq.)

DCM 15 mL

Ausbeute: 231 mg (0.56 mmol, 86% d. Theorie), farbloser Feststoff

Smp: 254 – 256 °C

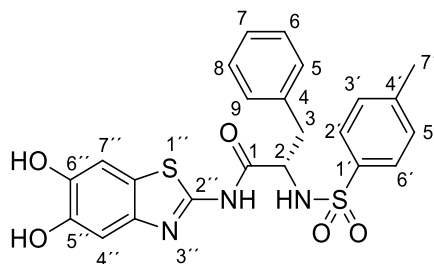
Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = +13$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, DMF)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.35 – 7.21 (m, 6H, *H*-5 – *H*-9, *H*-4'), 7.11 (s, 1H, *H*-7'), 4.41 – 4.27 (m, 1H, *H*-2), 3.27 – 3.08 (m, 2H, *H*-3).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 167.4 (*C*-1), 146.3 (*C*-2'), 145.9 (*C*-6'), 144.6 (*C*-5'), 144.4 (*C*-3a'), 134.4 (*C*-4), 129.6 (*C*-7a'), 128.7 (*C*-6, *C*-8), 127.5 (*C*-5, *C*-9), 121.9 (*C*-7), 106.6 (*C*-4'), 106.5 (*C*-7'), 53.9 (*C*-2), 36.8 (*C*-3).

IR: ν [cm⁻¹] = 3190, 2668, 1702, 1573, 1494, 1456, 1397, 1354, 1295, 1228, 1186, 1152, 768, 719.

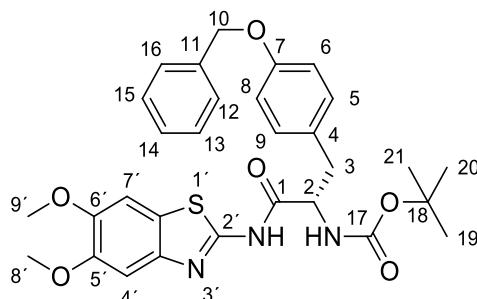
5.11.3.3 (S)-N-(5,6-Dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-2-(4-methylphenylsulfonylamido)-3-phenylpropionsäureamid (**111**)



Methode:	B1	
Ansatz:	103	100 mg (0.25 mmol, 1.0 Äq.)
	Tosylchlorid	48 mg (0.25 mmol, 1.0 Äq.)
	Pyridin	5 mL
Ausbeute:	40 mg (0.09 mmol, 35% d. Theorie), farbloser Feststoff	
R _f :	0.28 (CH/EE 1:1 + TFA)	
Smp:	209 – 213 °C	
Drehwert:	[α] ₅₈₉ ²⁵ = + 8 (c = 5 $\frac{mg}{ml}$, Methanol)	
¹ H-NMR:	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ [ppm] = 7.41 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 2H, <i>H</i> -2', <i>H</i> -6'), 7.23 – 7.12 (m, 6H, <i>H</i> -5 – <i>H</i> -9, <i>H</i> -4'), 7.12 – 7.05 (m, 3H, <i>H</i> -3', <i>H</i> -5', <i>H</i> -7'), 4.42 – 4.20 (m, 1H, <i>H</i> -2), 3.02 – 2.87 (m, 1H, <i>H</i> -3), 2.81 – 2.68 (m, 1H, <i>H</i> -3), 2.13 (s, 3H, <i>H</i> -7').	
¹³ C-NMR:	¹³ C NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ [ppm] = 169.6 (<i>C</i> -1), 154.9 (<i>C</i> -2'), 145.6 (<i>C</i> -6'), 144.0 (<i>C</i> -3a'), 142.4 (<i>C</i> -4'), 141.8 (<i>C</i> -5'), 137.7 (<i>C</i> -1'), 136.5 (<i>C</i> -4), 129.3 (<i>C</i> -3', <i>C</i> -5'), 129.2 (<i>C</i> -5, <i>C</i> -9), 128.1 (<i>C</i> -6, <i>C</i> -8), 126.6 (<i>C</i> -7), 126.4 (<i>C</i> -2', <i>C</i> -6'), 122.0 (<i>C</i> -7a'), 106.5 (<i>C</i> -7'), 106.3 (<i>C</i> -4'), 57.4 (<i>C</i> -2), 38.1 (<i>C</i> -3), 20.8 (<i>C</i> -7').	
IR:	ν [cm ⁻¹] = 3213, 3066, 2922, 2870, 1668, 1546, 1496, 1452, 1350, 1287, 1201, 1156, 1085.	
ESI-MS:	m/z = 484.2 [M+H] ⁺ (berechnet: [M] = 483.1)	
Reinheit:	96% (H ₂ O/ACN 55:45)	

5.11.4 Tyrosin

5.11.4.1 (S)-3-(4-(Benzyloxy)phenyl)-2-(tert-butoxycarbonylamino)-N-(5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-propionsäureamid (**95**)



Methode: A1, Reaktionsdauer: 3 d

Ansatz:	41	400 mg (1.90 mmol, 1.0 Äq.)
	Boc-Tyr(Bzl)-OH	707 mg (1.90 mmol, 1.0 Äq.)
	TBTU	672 mg (2.09 mmol, 1.1 Äq.)
	HOBt	257 mg (1.90 mmol, 1.0 Äq.)
	DIPEA	1.29 mL (7.61 mmol, 4.0 Äq.)
	DMF	30 mL

Ausbeute: 1039 mg (1.84 mmol, 97% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.59 (CH/EE 1:1)

Smp: 86 – 88 °C

Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = -38$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, Chloroform)

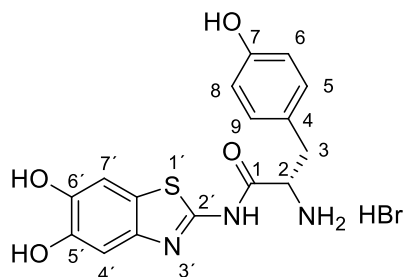
¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 7.46 – 7.23 (m, 7H, H-12 – H-16, H-4', H-7'), 6.87 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H-6, H-8), 6.75 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H-5, H-9), 4.95 (s, 2H, H-10), 4.81 – 4.63 (m, 1H, H-2), 3.96 (s, 3H, H-9'), 3.91 (s, 3H, H-8'), 3.18 – 2.86 (m, 2H, H-3), 1.40 (s, 9H, H-19 – H-21).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 170.9 (C-1), 157.9 (C-7), 157.3 (C-2'), 155.6 (C-17), 149.7 (C-5'), 147.8 (C-6'), 142.0 (C-3a'), 137.0 (C-11), 130.2 (C-6, C-8), 128.6 (C-13, C-15), 128.0 (C-14), 127.9 (C-4), 127.6 (C-12,

C-16), 123.5 (C-7a'), 115.0 (C-5, C-9), 103.4 (C-4'), 102.8 (C-7'), 70.0 (C-10), 69.9 (C-2), 56.5 (C-9'), 56.3 (C-8'), 38.7 (C-18), 37.6 (C-3), 28.4 (C-19 – C-21).

IR: ν [cm⁻¹] = 2975, 2931, 1698, 1610, 1556, 1510, 1487, 1453, 1436, 1366, 1287, 1242, 1222, 1201, 1161, 1064, 1019, 835.

5.11.4.2 (S)-2-Amino-N-(5,6-dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-3-(4-hydroxyphenyl)propionamid Hydrobromid (**104**)



Methode: D1

Ansatz: **95** 400 mg (0.71 mmol, 1.0 Äq.)

BBr₃ (1 M in DCM) 7.10 mL (7.1 mmol, 10.0 Äq.)

DCM 20 mL

Ausbeute: 286 mg (0.67 mmol, 95% d. Theorie), farbloser Feststoff

Smp: 190 – 195 °C

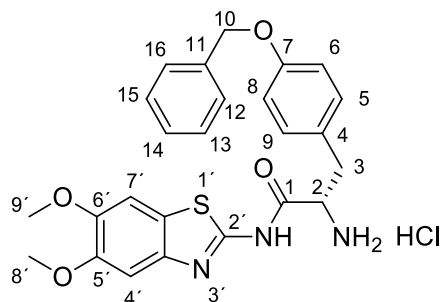
Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = +96$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, H₂O)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.26 (s, 1H, H-4'), 7.12 (s, 1H, H-7'), 7.02 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-6, H-8), 6.68 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-5, H-9), 4.35 – 4.14 (m, 1H, H-2), 3.23 – 2.93 ppm (m, 2H, H-3).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 170.5 (C-1), 156.8 (C-7), 154.9 (C-2'), 146.3 (C-6'), 144.5 (C-5'), , 143.7 (C-3a'), 142.0 (C-5'), 130.6 (C-6, C-6), 124.3 (C-4), 121.9 (C-7a'), 115.5 (C-5, C-9), 106.6 (C-4'), 106.6 (C-7'), 54.2 (C-2), 36.1 ppm (C-3).

IR: ν [cm⁻¹] = 3183, 2955, 1726, 1591, 1514, 1487, 1346, 1296, 1174, 1117, 1038, 800, 722, 681.

5.11.4.3 (S)-2-Amino-N-(5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-3-(4-benzyloxyphenyl)propionamid Hydrochlorid (**116**)



Methode: D2

Ansatz: **95** 500 mg (0.89 mmol, 1.0 Äq.)

HCl (4 M in Dioxan) 15 mL

Ausbeute: 387 mg (0.77 mmol, 87% d. Theorie), gelber Feststoff

Smp: 215 – 219 °C

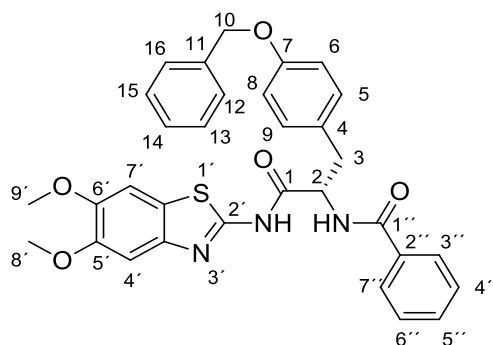
Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = +46$ ($c = 10 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$, DMSO)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.58 (s, 1H, *H*-4'), 7.47 – 7.25 (m, 6H, *H*-12 – *H*-16, *H*-7'), 7.26 – 7.11 (m, 2H, *H*-5, *H*-9), 7.01 – 6.86 (m, 2H, *H*-6, *H*-8), 5.07 (s, 1H, *H*-10), 5.03 (s, 1H, *H*-10), 4.43 – 4.33 (m, 1H, *H*-2), 3.85 – 3.76 (m, 6H, *H*-8', *H*-9'), 3.24 – 3.05 (m, 2H, *H*-3).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 170.3 (*C*-1), 157.6 (*C*-2'), 155.4 (*C*-7), 149.1 (*C*-6'), 147.3 (*C*-5'), 142.3 (*C*-3a'), 137.1 (*C*-11), 130.7 (*C*-5, *C*-9), 128.4 (*C*-13, *C*-15), 127.8 (*C*-14), 127.7 (*C*-12, *C*-16), 127.0 (*C*-4), 123.0 (*C*-7a'), 114.8 (*C*-6, *C*-8), 103.8 (*C*-4'), 103.7 (*C*-7'), 69.2 (*C*-10), 56.0 (*C*-OCH₃), 55.8 (*C*-OCH₃), 53.3 (*C*-2), 35.8 (*C*-3).

IR: ν [cm⁻¹] = 2868, 1737, 1698, 1611, 1570, 1512, 1488, 1453, 1438, 1420, 1274, 1251, 1230, 1197, 1176, 1138, 1113, 1057, 1027, 817, 729, 691.

5.11.4.4 (S)-N-(3-(4-(Benzyloxy)phenyl)-1-((5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)benzamid (**119**)



Methode: A2, Aufreinigung per Säulenchromatographie (CH/EE 1:1)

Ansatz: **116** 300 mg (0.60 mmol, 1.0 Äq.)

Benzoylchlorid 0.08 mL (0.66 mmol, 1.1 Äq.)

Triethylamin 0.17 mL (1.26 mmol, 2.1 Äq.)

Dichlormethan 10 mL

Ausbeute: 241 mg (0.42 mmol, 71% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.38 (CH/EE 1:1)

Smp: 182 – 184 °C

Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = -18$ (c = 5 $\frac{mg}{ml}$, Dichlormethan)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 7.85 – 7.77 (m, 2H, *H*-3'', *H*-7''), 7.47 – 7.24 (m, 10H, *H*-12 – *H*-16, *H*-4', *H*-7', *H*-4'' – *H*-6''), 7.01 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, *H*-5, *H*-9), 6.79 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, *H*-6, *H*-8), 5.37 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, *H*-2), 4.95 (d, *J* = 1.2 Hz, 2H, *H*-10), 3.99 (s, 3H, *H*-9'), 3.89 (s, 3H, *H*-8'), 3.28 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, *H*-3).

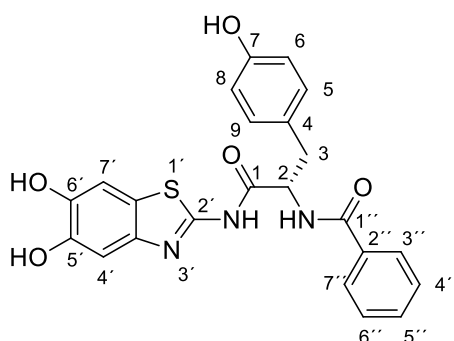
¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 170.6 (*C*-1), 167.8 (*C*-1'), 158.1 (*C*-7), 157.4 (*C*-2'), 149.8 (*C*-5'), 148.0 (*C*-6'), 141.6 (*C*-3a'), 137.0 (*C*-11), 133.4 (*C*_{arom}), 132.2 (*C*-2''), 130.4 (*C*-5, *C*-9), 128.7 (*C*-4), 128.7 (*C*_{arom}), 128.1 (*C*_{arom}), 127.8 (*C*_{arom}), 127.6 (*C*-12, *C*-16), 127.4 (*C*-3'', *C*-7''), 123.4 (*C*-7a'), 115.2 (*C*-6, *C*-8), 103.3 (*C*-4'), 102.9 (*C*-7'), 70.0 (*C*-10), 56.5 (*C*-9'), 56.3 (*C*-8'), 55.4 (*C*-2), 37.5 (*C*-3).

IR: ν [cm⁻¹] = 3292, 2947, 1688, 1654, 1625, 1545, 1512, 1485, 1437, 1340, 1319, 1289, 1242, 1223, 1206, 1174, 1158, 1065, 1012, 836, 801, 738, 696.

ESI-MS: m/z = 568.3 [M+H]⁺ (berechnet: [M] = 568.2)

Reinheit: 95% (H₂O/ACN 45:55)

5.11.4.5 (S)-N-(1-((5,6-Dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)amino)-3-(4-hydroxyphenyl)-1-oxopropan-2-yl)benzamid (**122**)



Methode: D1, Aufreinigung per Säulenchromatographie (CH/EE 1:1 + TFA)

Ansatz: **119** 150 mg (0.26 mmol, 1.0 Äq.)

BBr₃ (1 M in Dichlormethan) 2.64 mL (2.64 mmol, 10.0 Äq.)

Dichlormethan 10 mL

Ausbeute: 92 mg (0.20 mmol, 77% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.49 (CH/EE 1:1)

Smp: 121 – 125 °C

Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = +9$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, Methanol)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.90 – 7.75 (m, 2H, *H*-3'', *H*-7''), 7.58 – 7.39 (m, 3H, *H*-4'' – *H*-6''), 7.23 (s, 1H, *H*-4'), 7.20 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, *H*-6, *H*-8), 7.12 (s, 1H, *H*-7'), 6.65 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, *H*-5, *H*-9), 4.91 – 4.78 (m, 1H, *H*-2), 3.15 – 2.90 (m, 2H, *H*-3).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 171.4 (C-1), 166.9 (C-1'), 156.0 (C-2'), 146.2 (C-7), 144.2 (C-6'), 143.4 (C-5'), 141.6 (C-3a'), 133.8 (C-2''),

132.0 (C-5'') 130.3 (C-5, C-9), 128.4 (C-4'', C-6''), 127.8 (C-4), 127.6 (C-3'', C-7''), 123.9 (C-7a'), 115.1 (C-6, C-8), 106.5 (C-7'), 106.5 (C-4'), 55.8 (C-2), 36.0 (C-3).

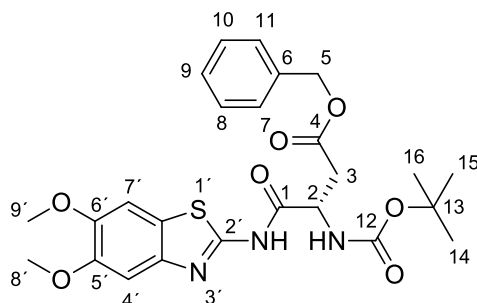
IR: ν [cm⁻¹] = 3268, 1652, 1603, 1579, 1514, 1446, 1341, 1288, 1139, 1047, 839, 798, 724, 693.

ESI-MS: $m/z = 450.1$ [M+H]⁺ (berechnet: [M] = 450.1)

Reinheit: 98% (H₂O/ACN 55:45)

5.11.5 Asparaginsäure

5.11.5.1 (S)-Benzyl 3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-4-((5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)amino)-4-oxobutanoat (**96**)



Methode: A1, Reaktionsdauer: 3 d

Ansatz: Boc-Asp(OBzl)-OH 400 mg (1.24 mmol, 1.0 Äq.)
41 260 mg (1.24 mmol, 1.0 Äq.)
TBTU 437 mg (1.36 mmol, 1.1 Äq.)
HOBt 167 mg (1.24 mmol, 1.0 Äq.)
DIPEA 0.84 mL (4.95 mmol, 4.0 Äq.)
DMF 10 mL

Ausbeute: 604 mg (1.17 mmol, 95% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.36 (CH/EE 1:2)

Smp: 73 – 75 °C

Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = -17$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, Dichlormethan)

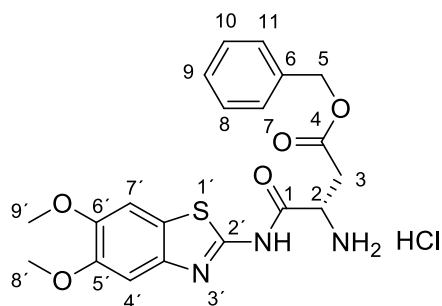
¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 7.35 – 7.30 (m, 5H, *H*-7 – *H*-11), 7.29 (s, 1H, *H*-4'), 7.22 (s, 1H, *H*-7'), 4.91 – 4.69 (m, 1H, *H*-2), 5.14 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H, *H*-5) 3.94 (s, 3H, *H*-9'), 3.93 (s, 3H, *H*-8'), 3.20 (dd, *J* = 17.5, 4.6 Hz, 1H, *H*-3), 2.87 (dd, *J* = 17.5, 5.6 Hz, 1H, *H*-3), 1.47 (s, 9H, *H*-14 – *H*-16).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 171.3 (*C*-4), 169.1 (*C*-1), 155.9 (*C*-2'), 155.6 (*C*-12), 149.4 (*C*-5'), 147.7 (*C*-6'), 142.4 (*C*-3a'), 135.1 (*C*-6), 128.6 (*C*-8, *C*-10), 128.5 (*C*-9), 128.3 (*C*-7, *C*-11), 123.8 (*C*-7a'), 103.5 (*C*-4'),

102.7 (C-7'), 81.5 (C-13), 67.2 (C-5), 56.4 (C-9'), 56.2 (C-8'), 51.3 (C-2), 35.7 (C-3), 28.3 (C-14 – C-16).

IR: ν [cm⁻¹] = 2974, 1699, 1548, 1486, 1436, 1387, 1366, 1286, 1249, 1221, 1200, 1158, 1063.

5.11.5.2 (S)-Benzyl 3-amino-4-((5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)amino)-4-oxobutanoat Hydrochlorid (**117**)



Methode: D2

Ansatz: **96** 496 mg (0.96 mmol, 1.0 Äq.)

HCl (4 M in Dioxan) 15 mL

Ausbeute: 414 mg (0.92 mmol, 95% d. Theorie), gelber Feststoff

Smp: 178 – 180 °C

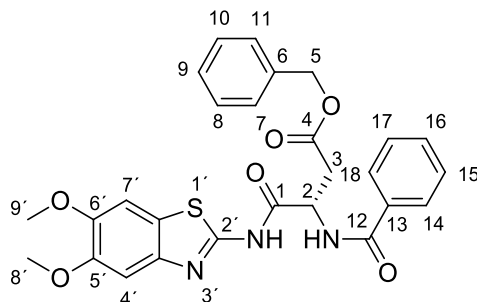
Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = + 35$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, Wasser)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.58 (s, 1H, H-4'), 7.38 – 7.23 (m, 6H, H-7 – H-11, H-7'), 5.13 (s, 2H, H-5), 4.55 – 4.42 (m, 1H, H-2), 3.83 (s, 3H, H-9'), 3.81 (s, 3H, H-8'), 3.20 (d, *J* = 6.2, 2H, H-3).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 168.8 (C-4), 167.0 (C-1), 156.1 (C-2'), 149.1 (C-9'), 147.3 (C-8'), 141.9 (C-3a'), 135.6 (C-6), 128.4 (C-8, C-10), 128.2 (C-9), 128.1 (C-7, C-11), 122.9 (C-7a'), 103.8 (C-7'), 103.4 (C-4'), 66.4 (C-5), 56.0 (C-9'), 55.8 (C-8'), 49.2 (C-2), 34.8 (C-3).

IR: ν [cm⁻¹] = 3036, 1722, 1568, 1489, 1456, 1436, 1404, 1364, 1323, 1276, 1234, 1185, 1144, 1103, 1059, 991, 750, 696.

5.11.5.3 (S)-Benzyl 3-benzamid-4-((5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)amino)-4-oxobutanoat
(120)



Methode: A2, Aufreinigung per Säulenchromatographie (CH/EE 1:1)

Ansatz: **117** 300 mg (0.66 mmol, 1.0 Äq.)

Benzoylchlorid 0.08 mL (0.73 mmol, 1.1 Äq.)

Triethylamin 0.19 mL (1.39 mmol, 2.1 Äq.)

Dichlormethan 20 mL

Ausbeute: 286 mg (0.51 mmol, 76% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.28 (CH/EE 1:1)

Smp: 191 – 192 °C

Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = -6$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, DCM)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 7.81 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, *H*-14, *H*-18), 7.56 – 7.48 (m, 1H, *H*-16), 7.47 – 7.38 (m, 2H, *H*-15, *H*-17), 7.37 – 7.29 (m, 5H, *H*-7 – *H*-11), 7.27 (s, 1H, *H*-4'), 7.20 (s, 1H, *H*-7'), 5.40 – 5.29 (m, 1H, *H*-2), 5.19 (s, 2H, *H*-9), 3.94 (s, 3H, *H*-9'), 3.91 (s, 3H, *H*-8'), 3.27 (dd, *J* = 17.0, 4.5 Hz, 1H, *H*-3), 2.95 (dd, *J* = 17.0, 5.8 Hz, 1H, *H*-3).

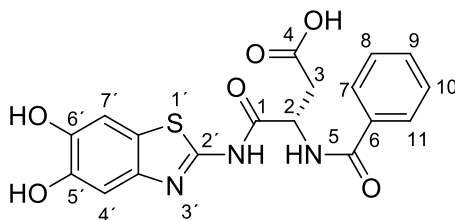
¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 171.9 (*C*-4), 168.7 (*C*-1), 168.0 (*C*-12), 156.1 (*C*-2'), 149.6 (*C*-5'), 147.8 (*C*-6'), 142.2 (*C*-3a'), 135.2 (*C*-6), 132.6 (*C*-16), 128.9 (*C*-15, *C*-17), 128.8 (*C*-8, *C*-10), 128.7 (*C*-9), 128.5 (*C*-7, *C*-11), 128.3 (*C*-6) 127.5 (*C*-14, *C*-18), 123.7 (*C*-7a'), 103.5 (*C*-4'), 102.7 (*C*-7'), 67.5 (*C*-5), 56.5 (*C*-9'), 56.2 (*C*-8'), 50.2 (*C*-2), 35.1 (*C*-3).

IR: ν [cm⁻¹] = 3295, 1725, 1704, 1640, 1553, 1525, 1486, 1457, 1445, 1430, 1385, 1318, 1272, 1236, 1222, 1202, 1151, 1075, 1061, 1000, 956, 840, 726, 709, 697.

ESI-MS: $m/z = 520.2$ $[M+H]^+$ (berechnet: $[M] = 520.2$)

Reinheit: $>99\%$ (H_2O/ACN 45:55)

5.11.5.4 (S)-3-Benzamido-4-((5,6-dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)amino)-4-oxobutansäure
(123)



Methode: D5

Ansatz: **120** 100 mg (0.19 mmol, 1.0 Äq.)

AlCl₃ 257 mg (1.92 mmol, 10.0 Äq.)

Ethanthiol 1 mL

Dichlormethan 15 mL

Ausbeute: 67 mg (0.17 mmol, 87% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.28 (CH/EE 1:1+ TFA)

Smp: 175 – 178 °C

Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = +5$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, MeOH)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.99 – 7.80 (m, 2H, *H*-7, *H*-11), 7.61 – 7.39 (m, 3H, *H*-8 – *H*-10), 7.23 (s, 1H, *H*-4'), 7.11 (s, 1H, *H*-7'), 5.07 – 4.91 (m, 1H, *H*-2), 3.00 – 2.72 (m, 2H, *H*-3).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 172.2 (*C*-4), 170.9 (*C*-1), 167.3 (*C*-5), 156.4 (*C*-2'), 146.5 (*C*-5'), 144.8 (*C*-6'), 142.3 (*C*-3a'), 134.5 (*C*-6), 132.4 (*C*-9), 129.1 (*C*-8, *C*-11), 128.4 (*C*-7, *C*-11), 122.6 (*C*-7a'), 107.2 (*C*-4'), 107.2 (*C*-7'), 51.5 (*C*-2), 36.3 (*C*-3).

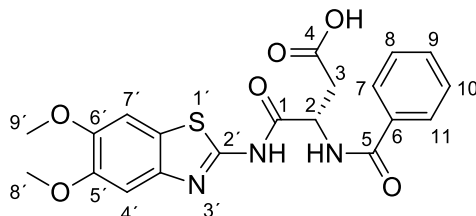
IR: ν [cm⁻¹] = 3061, 1758, 1686, 1639, 1557, 1530, 1487, 1438, 1283, 1221, 1204, 1164, 1064, 836, 713, 693.

ESI-MS: m/z = 402.1 [M+H]⁺ (berechnet: [M] = 401.1)

Reinheit: 95% (H₂O/ACN 65:35)

5.11.6 Asparaginderivate

5.11.6.1 (S)-3-Benzamid-4-((5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)amino)-4-oxobutansäure (124)



Methode: D3

Ansatz: **120** 2.19 g (4.22 mmol, 1.0 Äq.)

LiOH 1.01 g (42.19 mmol, 10.0 Äq.)

THF 50 mL

Wasser 50 mL

Ausbeute: 1.77 g (4.12 mmol, 98% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.34 (CH/EE 1:2 + TFA)

Smp: 210 – 211 °C

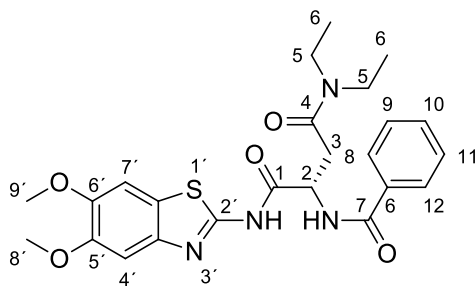
Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = +39$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, DMF)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.99 – 7.84 (m, 2H, *H*-7, *H*-11), 7.64 – 7.41 (m, 4H, *H*-8 – *H*-10, *H*-4'), 7.29 (s, 1H, *H*-7'), 5.14 – 4.89 (m, 1H, *H*-8'), 3.82 (s, 3H, *H*-9'), 3.80 (s, 3H, *H*-2), 3.01 – 2.75 (m, 2H, *H*-3).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 171.8 (*C*-4), 170.7 (*C*-1), 166.9 (*C*-5), 156.8 (*C*-2'), 149.4 (*C*-5'), 147.4 (*C*-6'), 143.0 (*C*-3a'), 134.1 (*C*-6), 132.0 (*C*-9), 128.7 (*C*-8, *C*-9), 128.0 (*C*-7, *C*-11), 123.4 (*C*-7a'), 104.1 (*C*-9'), 104.0 (*C*-8'), 56.4 (*C*-4'), 56.2 (*C*-7'), 51.1 (*C*-2), 35.9 (*C*-3).

IR: ν [cm⁻¹] = 3271, 2925, 2823, 1685, 1655, 1638, 1556, 1537, 1487, 1448, 1431, 1330, 1282, 1247, 1220, 1201, 1164, 1066, 1002, 836, 801, 694.

5.11.6.2 (S)-3-Benzamido-N¹-(5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-N⁴-diethylsuccinamid
(125)



Methode: A1, Reaktionsdauer: 3 d

Ansatz:	124	500 mg (1.16 mmol, 1.0 Äq.)
	Diethylamin	0.12 mL (1.16 mmol, 1.0 Äq.)
	TBTU	411 mg (1.29 mmol, 1.1 Äq.)
	HOBt	157 mg (1.16 mmol, 1.0 Äq.)
	DIPEA	0.79 mL (4.66 mmol, 4.0 Äq.)
	DMF	15 mL

Ausbeute: 200 mg (0.41 mmol, 35% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.32 (CH/EE 1:1)

Smp: 121 – 123 °C

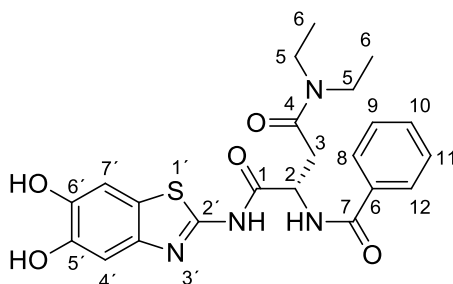
Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = + 2$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, Dichlormethan)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 7.90 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, *H*-8, *H*-12), 7.59 – 7.39 (m, 3H, *H*-9 – *H*-11), 7.29 (s, 1H, *H*-4'), 7.19 (s, 1H, *H*-7'), 5.28 (td, *J* = 6.8, 3.0 Hz, 1H, *H*-2), 3.93 (s, 3H, *H*-8'), 3.92 (s, 3H, *H*-9'), 3.54 – 3.24 (m, 5H, *H*-5, *H*-3), 2.84 – 2.63 (m, 1H, *H*-3), 1.28 – 1.19 (m, 6H, *H*-6).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 170.3 (C-1), 169.6 (C-4), 167.4 (C-7), 156.4 (C-2'), 149.5 (C-5'), 147.7 (C-6'), 141.6 (C-3a'), 133.0 (C-6), 132.2 (C-10), 128.7 (C-9, C-11), 127.4 (C-8, C-12), 123.2 (C-7a'), 103.2 (C-4'), 102.6 (C-7'), 56.4 (C-8'), 56.1 (C-9'), 50.6 (C-2), 42.6 (C-5), 40.8 (C-5), 34.4 (C-3), 14.1 (C-6), 13.0 (C-6).

IR: ν [cm⁻¹] = 3316, 2972, 2932, 1682, 1645, 1545, 1485, 1462, 1436, 1407, 1380, 1317, 1285, 1263, 1219, 1200, 1156, 1060, 1028, 987, 831, 786, 714, 690, 668.

5.11.6.3 (S)-3-Benzamido-N¹-(5,6-dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-N⁴,N⁴-diethylsuccinamid
(127)



Methode: D5

Ansatz: **125** 100 mg (0.21 mmol, 1.0 Äq.)

AlCl₃ 165 mg (1.24 mmol, 6.0 Äq.)

Ethanthiol 1 mL

Dichlormethan 15 mL

Ausbeute: 41 mg (0.09 mmol, 44% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.22 (CH/EE 1:2 + TFA)

Smp: 162 – 164 °C

Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = +3$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, Methanol)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.89 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, *H*-8, *H*-12), 7.61 – 7.39 (m, 3H, *H*-9 – *H*-11), 7.23 (s, 1H, *H*-4'), 7.11 (s, 1H, *H*-7'), 5.23 – 4.98 (m, 1H, *H*-2), 3.32 (q, *J* = 7 Hz, 2H, *H*-5), 3.27 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, *H*-5), 3.04 – 2.86 (m, 2H, *H*-3), 1.13 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, *H*-6), 0.99 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, *H*-6).

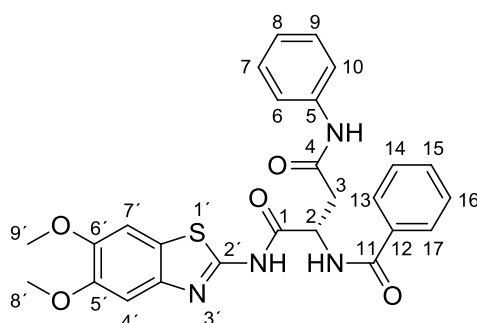
¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 170.5 (C-1), 168.1 (C-4), 166.3 (C-7), 155.4 (C-2'), 145.5 (C-5'), 143.9 (C-6'), 141.9 (C-3a'), 133.8 (C-6), 131.5 (C-10), 128.3 (C-9, C-11), 127.5 (C-8, C-12), 121.9 (C-7a'), 106.6 (C-7'), 106.4 (C-4'), 50.8 (C-2), 41.3 (C-5), 39.4 (C-5), 34.1 (C-3), 14.0 (C-6), 13.0 (C-6).

IR: ν [cm⁻¹] = 3334, 2976, 2934, 1679, 1628, 1601, 1548, 1484, 1447, 1408, 1381, 1343, 1307, 1268, 1213, 1168, 1098, 1075, 926, 840, 789, 690.

ESI-MS: m/z = 457.1 [M+H]⁺ (berechnet: [M] = 456.1)

Reinheit: 95% (H₂O/ACN 65:35)

5.11.6.4 (S)-3-Benzamido-N¹-(5,6-dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-N⁴-phenylsuccinamid
(126)



Methode: A1, Reaktionsdauer: 3 d

Ansatz: **124** 120 mg (0.28 mmol, 1.0 Äq.)

Anilin 25 μ L (0.28 mmol, 1.0 Äq.)

TBTU 99 mg (0.31 mmol, 1.1 Äq.)

HOBt 38 mg (0.28 mmol, 1.0 Äq.)

DIPEA 0.19 mL (1.12 mmol, 4.0 Äq.)

Ethylacetat 10 mL

Ausbeute: 88 mg (0.18 mmol, 65% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.17 (CH/EE 1:1)

Smp: 205 – 208 °C

Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = +3$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, Dichlormethan)

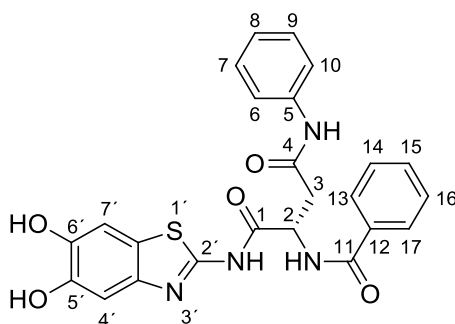
¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.93 (d, J = 7.5 Hz, 2H, *H*-13, *H*7), 7.65 (d, J = 8.0 Hz, 2H, *H*-6, *H*-10), 7.57 – 7.42 (m, 4H, *H*-14 – *H*-16), 7.35 –

7.23 (m, 3H, *H*-14, *H*-16, *H*-4'), 7.05 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, *H*-8), 5.14 – 5.01 (m, 1H, *H*-2), 3.82 (s, 3H, *H*-8'), 3.80 (s, 3H, *H*-9'), 3.22 – 3.01 (m, 2H, *H*-3).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 170.0 (*C*-1), 169.3 (*C*-4), 166.9 (*C*-11), 156.7 (*C*-2'), 149.4 (*C*-5'), 147.4 (*C*-6'), 143.0 (*C*-3a'), 139.5 (*C*-5), 134.3 (*C*-12), 131.9 (*C*-15), 129.1 (*C*-7, *C*-9), 128.7 (*C*-14, *C*-16), 128.0 (*C*-13, *C*-17), 123.8 (*C*-8), 123.3 (*C*-7a'), 119.8 (*C*-6, *C*-10), 104.2 (*C*-4'), 104.0 (*C*-7'), 56.5 (*C*-8'), 56.2 (*C*-9'), 51.5 (*C*-2), 37.5 (*C*-3).

IR: ν [cm⁻¹] = 3296, 3201, 3081, 2999, 2944, 1672, 1661, 1626, 1600, 1556, 1529, 1488, 1469, 1443, 1409, 1372, 1318, 1289, 1244, 1219, 1201, 1159, 1063, 1046, 1003, 833, 779, 748, 715, 689.

5.11.6.5 (*S*)-3-Benzamido-*N*¹-(5,6-dimethoxybenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*N*⁴-phenylsuccinamid
(128)



Methode: D5

Ansatz: **126** 77 mg (0.15 mmol, 1.0 Äq.)

AlCl₃ 244 mg (1.83 mmol, 12.0 Äq.)

Ethanthiol 1 mL

Dichlormethan 15 mL

Ausbeute: 62 mg (0.13 mmol, 85% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.40 (CH/EE 1:2 + TFA)

Smp: 209 – 211 °C

Drehwert: [α]₅₈₉²⁵ = + 8 (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, Methanol)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.91 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, *H*-13, *H*-17), 7.64 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, *H*-6, *H*-10), 7.57 – 7.41 (m, 3H, *H*-14 – *H*-16), 7.36 – 7.25 (m, 2H, *H*-7, *H*-9), 7.22 (s, 1H, *H*-4'), 7.13 (s, 1H, *H*-7'), 7.09 – 6.97 (m, 1H, *H*-8), 5.14 – 4.98 (s, 1H, *H*-2), 3.20 – 2.91 (m, 2H, *H*-3).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 170.0 (*C*-1), 169.1 (*C*-4), 166.9 (*C*-11), 155.9 (*C*-2'), 146.1 (*C*-5'), 144.4 (*C*-6'), 141.9 (*C*-3a'), 139.5 (*C*-5), 134.3 (*C*-12), 131.9 (*C*-15), 129.1 (*C*-7, *C*-9), 128.7 (*C*-14, *C*-16), 128.0 (*C*-13, *C*-17), 123.8 (*C*-8), 122.0 (*C*-7a'), 119.8 (*C*-6, *C*-10), 106.9 (*C*-4'), 106.8 (*C*-7'), 51.5 (*C*-2), 37.6 (*C*-3).

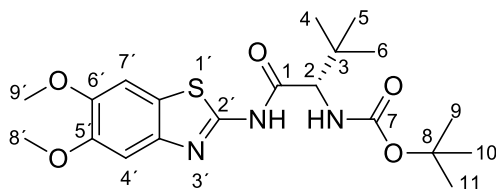
IR: ν [cm⁻¹] = 3365, 3285, 3197, 3063, 2970, 2928, 1698, 1637, 1601, 1564, 1521, 1485, 1450, 1430, 1418, 1405, 1367, 1284, 1247, 1215, 1196, 1154, 1065, 692.

ESI-MS: *m/z* = 477.1 [M+H]⁺ (berechnet: [M] = 476.1)

Reinheit: 95% (H₂O/ACN 55:45)

5.11.7 tert-Leucin

5.11.7.1 (S)-2-(tert-Butoxycarbonylamino)-N-(5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-3,3-dimethylbutansäureamid (**97**)



Methode: A1, Reaktionsdauer: 3 d

Ansatz:	Boc-tert-Leu-OH	1.000 g (4.32 mmol, 1.0 Äq.)
	41	0.910 g (4.32 mmol, 1.0 Äq.)
	TBTU	1.670 g (5.19 mmol, 1.1 Äq.)
	HOBt	0.600 g (4.32 mmol, 1.0 Äq.)
	DIPEA	3.00 mL (17.29 mmol, 4.0 Äq.)
	DMF	20 mL

Ausbeute: 1.499 g (3.55 mmol, 82% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.51 (CH/EE 1:1)

Smp: 185 – 195 °C

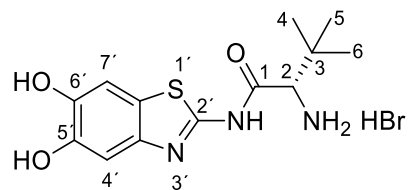
Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = +9$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, DCM)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.54 (s, 1H, *H*-4'), 7.29 (s, 1H, *H*-7'), 4.22 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, *H*-2), 3.82 (s, 3H, *H*-8'), 3.80 (s, 3H, *H*-9'), 1.37 (s, 9H, *H*-9 – *H*-11), 0.96 (s, 9H, *H*-4 – *H*-6).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) [ppm] = δ 170.9 (*C*-1), 170.4 (*C*-7), 155.9 (*C*-2'), 148.9 (*C*-5'), 147.0 (*C*-6'), 142.5 (*C*-3a'), 122.9 (*C*-7a'), 103.7 (*C*-4'), 103.5 (*C*-7'), 78.4 (*C*-8), 62.1 (*C*-2), 56.0 (*C*-9'), 55.7 (*C*-8'), 34.0 (*C*-3), 28.2 (*C*-9 – *C*-11), 26.5 (*C*-4 – *C*-6).

IR: ν [cm⁻¹] = 3366, 2963, 2934, 2350, 1694, 1559, 1488, 1364, 1163, 1064.

5.11.7.2 (S)-2-Amino-N-(5,6-dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-3,3-dimethylbutansäureamid
Hydrobromid (**105**)



Methode: D1

Ansatz: **97** 500 mg (1.18 mmol, 1.0 Äq.)
 BBr₃ (1 M in DCM) 11.81 mL (11.81 mmol, 10 Äq.)
 DCM 10 mL

Ausbeute: 292 mg (0.78 mmol, 66% d. Theorie), farbloser Feststoff

Smp: 140 – 150 °C

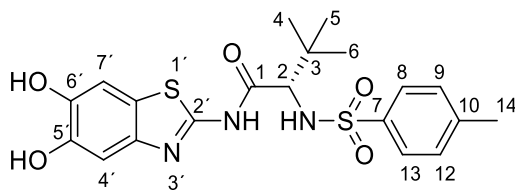
Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = + 34$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, Methanol)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.27 (s, 1H, *H*-4'), 7.14 (s, 1H, *H*-7'), 3.97 – 3.79 (m, 1H, *H*-2), 1.03 (s, 9H, *H*-4 – *H*-6).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 170.5 (*C*-1), 166.9 (*C*-2'), 145.9 (*C*-5'), 144.4 (*C*-6'), 143.7 (*C*-3a'), 121.8 (*C*-7a'), 106.5 (*C*-4'), 106.5 (*C*-7'), 60.4 (*C*-2), 33.5 (*C*-3), 26.2 (*C*-4 – *C*-6).

IR: ν [cm⁻¹] = 3385, 3129, 2958, 2359, 1714, 1567, 1491, 1284, 1215, 1160.

5.11.7.3 (S)-N-(5,6-Dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-3,3-dimethyl-2-(4-methylphenylsulfonamido)butansäureamid (**112**)



Methode: B1

Ansatz: **105** 200 mg (0.53 mmol, 1.0 Äq.)

TosCl 102 mg (0.53 mmol, 1.0 Äq.)

Pyridin 5 mL

Ausbeute: 80 mg (0.18 mmol, 34% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.43 (CH/EE 1:1 + TFA)

Smp: 254 – 256 °C

Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = -29$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, Methanol)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.63 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, *H*-8, *H*-13), 7.17 (s, 1H, *H*-4'), 7.11 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, *H*-9, *H*-13), 7.07 (s, 1H, *H*-4'), 3.80 (s, 1H, *H*-2), 1.95 (s, 3H, *H*-14), 0.89 (s, 9H, *H*-4 – *H*-6).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 168.4 (*C*-1), 165.6 (*C*-2'), 145.5 (*C*-5'), 143.8 (*C*-6'), 142.5 (*C*-10), 141.8 (*C*-3a'), 137.4 (*C*-7), 129.0 (*C*-9, *C*-12), 126.8 (*C*-8, *C*-13), 121.9 (*C*-7a'), 106.4 (*C*-7'), 106.2 (*C*-4'), 63.6 (*C*-2), 34.3 (*C*-3), 26.2 (*C*-4 – *C*-6), 20.6 (*C*-14).

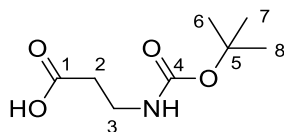
IR: ν [cm⁻¹] = 3302, 3116, 2945, 2353, 1668, 1549, 1489, 1297, 1152, 1083.

ESI-MS: *m/z* = 450.1 [M+H]⁺ (berechnet: [M] = 449.1)

Reinheit: 99% (H₂O/ACN 55:45)

5.11.8β-Alanin

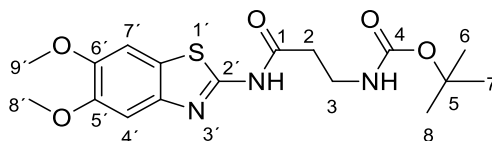
5.11.8.1 3-((tert-Butoxycarbonyl)amino)propionsäure (87)



Methode:	C1	
Ansatz:	3-Aminopropionsäure	1.00 g (11.2 mmol, 1.0 Äq.)
	Boc ₂ O	2.45 g (11.2 mmol, 1.0 Äq.)
	K ₂ CO ₃	3.26 g (23.6 mmol, 1.0 Äq.)
	H ₂ O	20 mL
	Dioxan	20 mL
Ausbeute:	1.86 g (9.9 mmol, 87% d. Theorie (Literatur: 98% ^[142])), farbloser Feststoff	
R _f :	0.74 (CH/EE 1:1)	
Smp:	76 – 77 °C (Lit.: 81 °C ^[143])	
¹ H-NMR:	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ = 12.14 (s, 1H, COOH), 6.88 – 6.65 (m, 1H, NH), 3.11 (td, <i>J</i> = 7.1, 5.6 Hz, 2H, <i>H</i> -3), 2.34 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 2H, <i>H</i> -2), 1.36 ppm (s, 9H, <i>H</i> -6, <i>H</i> -7, <i>H</i> -8).	
¹³ C-NMR:	¹³ C NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ = 172.9 (<i>C</i> -1), 155.5 (<i>C</i> -4), 77.7 (<i>C</i> -5), 36.2 (<i>C</i> -3), 34.3 (<i>C</i> -2), 28.3 ppm (<i>C</i> -6, <i>C</i> -7, <i>C</i> -8).	
IR:	ν [cm ⁻¹] = 3438, 3005, 2966, 2911, 1697, 1509, 1439, 1407, 1365, 1353, 1291, 1236, 1215, 1159, 978, 937.	

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[144]

5.11.8.2 3-(tert-Butoxycarbonylamino)-N-(5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)propionamide
(98)



Methode: A1, Reaktionsdauer: 3 d

Ansatz: **87** 1.000 g (5.2 mmol, 1.0 Äq.)
41 1.111 g (5.2 mmol, 1.0 Äq.)
TBTU 1.868 g (5.7 mmol, 1.1 Äq.)
HOBT 0.857 g (5.2 mmol, 1.0 Äq.)
DIPEA 3.55 mL (21.2 mmol, 4.0 Äq.)
DMF 20 mL

Ausbeute: 1.581 g (4.1 mmol, 78% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.23 (CH/EE 1:1)

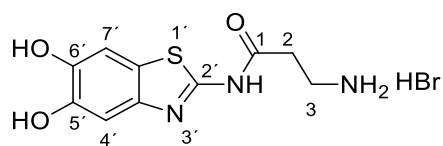
Smp: 130 – 135 °C

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.53 (s, 1H, *H*-4'), 7.28 (s, 1H, *H*-7'), 3.82 (s, 3H, *H*-8'), 3.80 (s, 3H, *H*-9'), 3.30 – 3.19 (m, 2H, *H*-3), 2.63 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, *H*-2), 1.36 (s, 9H, *H*-6 – *H*-8).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 170.0 (*C*-1), 156.3 (*C*-2'), 155.5 (*C*-4), 148.9 (*C*-5'), 146.9 (*C*-6'), 142.5 (*C*-3a'), 122.8 (*C*-7a'), 103.7 (*C*-4'), 103.5 (*C*-7'), 77.7 (*C*-5), 55.9 (*C*-8'), 55.7 (*C*-9'), 36.0 (*C*-3), 35.6 (*C*-2), 28.2 (*C*-6 – *C*-8).

IR: ν [cm⁻¹] = 3392, 2975, 2929, 2356, 1711, 1686, 1510, 1483, 1246, 1158.

5.11.8.3 3-Amino-N-(5,6-dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)propionamide Hydrobromid (**106**)



Methode: D1

Ansatz: **98** 400 mg (1.05 mmol, 1.0 Äq.)

BBr₃ (1 M in DCM) 8.39 mL (8.39 mmol, 8.0 Äq.)

DCM 10 mL

Ausbeute: 326 mg (0.98 mmol, 93% d. Theorie), farbloser Feststoff

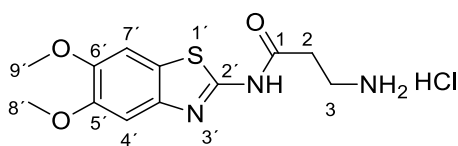
Smp: 255 – 257 °C

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.23 (s, 1H, *H*-4'), 7.11 (s, 1H, *H*-7'), 3.32 – 3.02 (m, 2H, *H*-3), 2.95 – 2.77 (m, 2H, *H*-2).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 168.7 (*C*-1), 155.1 (*C*-2'), 145.6 (*C*-5'), 143.9 (*C*-6'), 141.5 (*C*-3a'), 121.8 (*C*-7a'), 106.5 (*C*-4'), 106.4 (*C*-7'), 34.4 (*C*-3), 32.5 (*C*-2).

IR: ν [cm⁻¹] = 3332, 2906, 1714, 1596, 1566, 1534, 1497, 1452, 1393, 1358, 1298, 1257, 1232, 1161, 1148, 1090, 1053, 1038, 867, 737.

5.11.8.4 3-Amino-N-(5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)propionamide Hydrochlorid (**115**)



Methode: D2

Ansatz: **98** 500 mg (1.14 mmol, 1.0 Äq.)

HCl (4 M in Dioxan) 12 mL

Ausbeute: 291 mg (0.92 mmol, 70% d. Theorie), farbloser Feststoff

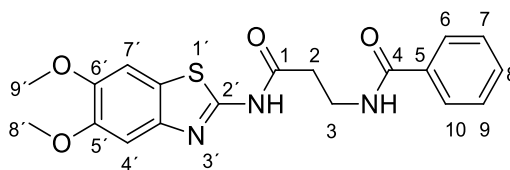
Smp: 225 – 235 °C

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.54 (s, 1H, *H*-4'), 7.29 (s, 1H, *H*-7'), 3.81 (s, 3H, *H*-8'), 3.79 (s, 3H, *H*-9'), 3.18 – 3.03 (m, 2H, *H*-3'), 2.98 – 2.86 (m, 2H, *H*-2').

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 169.1 (*C*-1), 156.1 (*C*-2'), 149.0 (*C*-5'), 147.0 (*C*-6'), 142.5 (*C*-3a'), 122.8 (*C*-7a'), 103.8 (*C*-4'), 103.6 (*C*-7'), 56.0 (*C*-8'), 55.8 (*C*-9'), 34.3 (*C*-3), 32.5 (*C*-2).

IR: ν [cm⁻¹] = 3436, 3167, 2816, 2706, 2361, 1713, 1559, 1488, 1284, 1183, 1058.

5.11.8.5 3-Benzoylamido-N-(5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)propionamide (**118**)



Methode: A2

Ansatz: **115** 250 mg (0.79 mmol, 1.0 Äq.)

Benzoylchlorid 0.10 mL (0.87 mmol, 1.1 Äq.)

Triethylamin 0.23 mL (1.65 mmol, 2.1 Äq.)

DCM 20 mL

Ausbeute: 120 mg (0.31 mmol, 40% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.28 (CH/EE 1:1)

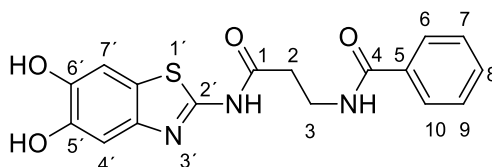
Smp: 124 – 127 °C

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.88 – 7.80 (m, 2H, *H*-6, *H*-10), 7.53 (s, 1H, *H*-4'), 7.52 – 7.39 (m, 3H, *H*-7 – *H*-9), 7.28 (s, 1H, *H*-7'), 3.82 (s, 3H, *H*-8'), 3.80 (s, 3H, *H*-9'), 3.59 (dt, *J* = 6.6, 5.5 Hz, 2H, *H*-3), 2.79 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, *H*-2).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 170.5 (*C*-1), 166.8 (*C*-4), 156.8 (*C*-2'), 149.3 (*C*-5'), 147.3 (*C*-6'), 143.0 (*C*-3a'), 134.8 (*C*-5), 131.6 (*C*-8), 128.7 (*C*-7, *C*-9), 127.6 (*C*-6, *C*-10), 123.3 (*C*-7a'), 104.1 (*C*-4'), 103.9 (*C*-7'), 56.4 (*C*-8'), 56.2 (*C*-9'), 35.9 (*C*-3), 35.6 (*C*-2).

IR: ν [cm⁻¹] = 3368, 3259, 3201, 3064, 3009, 2971, 2928, 1698, 1640, 1602, 1562, 1520, 1484, 1465, 1452, 1430, 1418, 1405, 1367, 1302, 1287, 1266, 1246, 1215, 1196, 1178, 1157, 1065, 1030, 1015, 986, 825, 777, 715, 693, 674, 658.

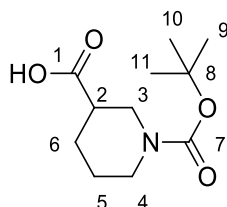
5.11.8.6 3-Benzoylamido-N-(5,6-dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)propionamide (**121**)



Method:	D1	
Ansatz:	118	72 mg (0.19 mmol, 1.0 Äq.)
	BBr ₃ (1 M in DCM)	1.87 mL (1.87 mL, 10 Äq.)
	DCM	10 mL
Ausbeute:	58 mg (0.16 mmol, 87% d. Theorie), farbloser Feststoff	
R _f :	0.26 (CH/EE 1:2)	
Smp:	118 – 120 °C	
¹ H-NMR:	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ [ppm] = 7.96 – 7.70 (m, 2H, <i>H</i> -6, <i>H</i> -10), 7.56 – 7.34 (m, 3H, <i>H</i> -7 – <i>H</i> -9), 7.24 (s, 1H, <i>H</i> -4'), 7.11 (s, 1H, <i>H</i> -7'), 3.72 – 3.42 (m, 2H, <i>H</i> -3), 2.93 – 2.61 (m, 2H, <i>H</i> -2).	
¹³ C-NMR:	¹³ C NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ [ppm] = 170.7 (<i>C</i> -1), 166.8 (<i>C</i> -4), 156.4 (<i>C</i> -2'), 143.7 (<i>C</i> -5'), 141.8 (<i>C</i> -6'), 140.9 (<i>C</i> -3a'), 134.8 (<i>C</i> -5), 131.7 (<i>C</i> -8), 128.7 (<i>C</i> -7, <i>C</i> -9), 127.6 (<i>C</i> -6, <i>C</i> -10), 122.0 (<i>C</i> -7a'), 103.8 (<i>C</i> -4'), 103.6 (<i>C</i> -7'), 35.5 (<i>C</i> -3), 32.5 (<i>C</i> -2).	
IR:	ν [cm ⁻¹] = 3167, 2924, 1703, 1590, 1560, 1450, 1359, 1273, 1157, 1103, 1040, 847, 793, 701.	
ESI-MS:	m/z = 358.1 [M+H] ⁺ (berechnet: [M] = 357.1)	
Reinheit:	95% (H ₂ O/ACN 65:35)	

5.11.9 Piperidin-3-carbonsäure

5.11.9.1 1-(*tert*-Butoxycarbonyl)piperidin-3-carbonsäure (rac-89)



Nicotinsäure (5.00 g, 40 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 2 M HCl (40 mL) gelöst, PtO₂ (30 mg) hinzugegeben und mit H₂ für 4 Tage bei 4 bar hydriert. Die Mischung wurde über Celite filtriert und mit NaOH ein leicht alkalischer pH-Wert eingestellt. Dioxan (40 mL) und Boc₂O (8.9 g, 40 mmol, 1.0 Äq.) wurden hinzugefügt und für 16 h gerührt. Das organische Lösemittel wurde entfernt und die Kristallisation durch Zugabe von 2 M HCl eingeleitet. Durch Filtration wurde 1-(*tert*-Butoxycarbonyl)piperidin-3-carbonsäure (1.56 g, 6.8 mmol, 17% d. Theorie) als farbloser Feststoff erhalten.

R_f: 0.56 (CH/EE 1:1 + TFA)

Smp: 155 – 157 °C (Lit.: 160 – 162 °C^[145])

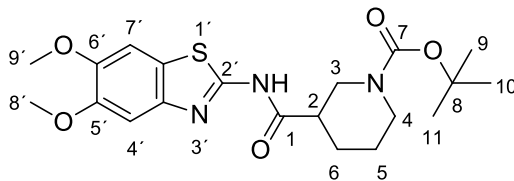
¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 3.83 (m, 2H, *H*-3, *H*-6), 2.93 – 2.73 (m, 2H, *H*-3, *H*-6), 2.47 – 2.31 (m, 1H, *H*-2), 1.86 – 1.69 (m, 2H, *H*-6), 1.47 – 1.28 (m, 11H, *H*-5, *H*-9 – *H*-11).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 175.6 (*C*-1), 153.9 (*C*-7), 78.6 (*C*-8), 42.8 (*C*-3), 42.5 (*C*-2), 40.4 (*C*-2), 28.1 (*C*-9 – *C*-11), 27.8 (*C*-5), 27.7 (*C*-4).

IR: ν [cm⁻¹] = 3153, 2930, 1731, 1659, 1474, 1434, 1392, 1368, 1305, 1271, 1239, 1212, 1143, 850.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[145]

5.11.9.2 *tert*-Butyl 3-((5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)carbamoyl)piperidin-1-carboxylat
(rac-**99**)



Methode: A1, Reaktionsdauer: 3 d

Ansatz: *rac*-**89** 400 mg (1.74 mmol, 1.0 Äq.)

41 366 mg (1.74 mmol, 1.0 Äq.)

TBTU 616 mg (1.92 mmol, 1.1 Äq.)

DIPEA 1.19 mL (6.98 mmol, 4 Äq.)

EtOAc 20 mL

Ausbeute: 620 mg (1.47 mmol, 84% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.26 (CH/EE 1:1)

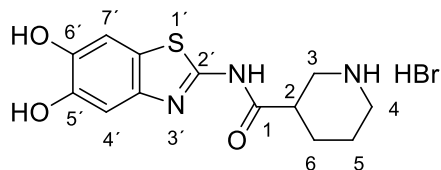
Smp: 97 – 99 °C

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 7.25 (s, 1H, *H*-4'), 7.21 (s, 1H, *H*-7'), 4.22 – 4.04 (m, 2H, *H*-3, *H*-4), 3.94 (s, 3H, *H*-9'), 3.92 (s, 3H, *H*-8'), 3.36 – 3.20 (m, 1H, *H*-2), 2.76 – 2.54 (m, 2H, *H*-3, *H*-4) 1.79 – 1.63 (m, 2H, *H*-6), 1.54 – 1.35 (m, 11H, *H*-5, *H*-9 – *H*-11).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 171.7 (*C*-1), 155.7 (*C*-7), 154.8 (*C*-2'), 150.0 (*C*-6'), 148.3 (*C*-5'), 138.0 (*C*-3a'), 122.1 (*C*-7a'), 102.9 (*C*-7'), 102.9 (*C*-4'), 77.4 (*C*-8), 56.5 (*C*-9'), 56.4 (*C*-8'), 44.7 (*C*-3), 44.4 (*C*-4), 43.0 (*C*-2), 28.5 (*C*-9 – *C*-11), 27.7 (*C*-6), 24.1 (*C*-5).

IR: ν [cm⁻¹] = 2931, 2859, 1686, 1545, 1486, 1435, 1365, 1287, 1263, 1221, 1200, 1159, 1064, 835.

5.11.9.3 N-(5,6-Dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)piperidin-3-carbonsäureamid Hydrobromid
(rac-107)



Methode: D1

Ansatz: *rac*-99 300 mg (0.71 mmol, 1.0 Äq.)

BBr₃ (1 M in DCM) 4.27 mL (4.27 mmol, 6.0 Äq.)

DCM 15 mL

Ausbeute: 266 mg (0.71 mmol, 1.0 Äq., 99%), farbloser Feststoff

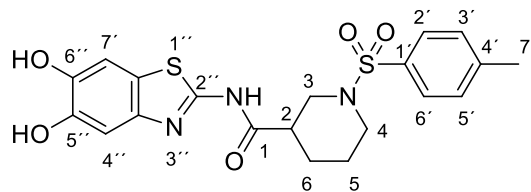
Smp: 268 – 270 °C

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.23 (s, 1H, 4'), 7.11 (s, 1H, 7'), 3.48 – 3.31 (m, 1H, *H*-3), 3.26 – 2.80 (m, 4H, *H*-2 – *H*-4), 2.14 – 2.00 (m, 1H, *H*-5), 1.87 – 1.51 (m, 3H, *H*-5, *H*-6).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ [ppm] = 171.1 (*C*-1), 155.2 (*C*-2'), 145.7 (*C*-6'), 144.0 (*C*-3a'), 141.6 (*C*-5'), 121.8 (*C*-7a'), 106.5 (*C*-4'), 106.5 (*C*-7'), 43.6 (*C*-3), 43.0 (*C*-4), 38.9 (*C*-2), 25.9 (*C*-5), 21.1 (*C*-6).

IR: ν [cm⁻¹] = 3193, 2938, 1696, 1589, 1498, 1447, 1383, 1297, 1184, 1133, 1032.

5.11.9.4 N-(5,6-Dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-1-(4-methylphenylsulfonyl)piperidin-3-carbonsäureamid (rac-**113**)



Methode: B1

Ansatz: *rac*-**107** 100 mg (0.27 mmol, 1.0 Äq.)

Tosylchlorid 51 mg (0.27 mmol, 1.0 Äq.)

Pyridin 10 mL

Ausbeute: 32 mg (0.07 mmol, 27% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.35 (CH/EE 1:1 + TFA)

Smp: 137 – 139 °C

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.65 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, *H*-2', *H*-6'), 7.46 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, *H*-3', *H*-5'), 7.20 (s, 1H, *H*-4'), 7.09 (d, 1H, *H*-7'), 3.84 – 3.69 (m, 1H, *H*-3), 3.63 – 3.50 (m, 1H, *H*-4), 2.87 – 2.71 (m, 1H, *H*-2), 2.46 – 2.35 (m, 4H, *H*-3, *H*-7'), 2.29 – 2.14 (m, 1H, *H*-4), 1.94 – 1.72 (m, 2H, *H*-5), 1.58 – 1.31 (m, 2H, *H*-6).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 171.3 (C-1), 155.2 (C-2'), 145.6 (C-6'), 143.9 (C-3a'), 143.7 (C-4'), 141.8 (C-5'), 132.3 (C-1'), 129.9 (C-3', C-5'), 127.5 (C-2', C-6'), 121.9 (C-7a'), 106.5 (C-7'), 106.3 (C-4'), 47.7 (C-3), 46.0 (C-4), 41.4 (C-2), 26.2 (C-5), 23.5 (C-6), 21.0 (C-7).

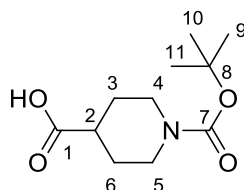
IR: ν [cm⁻¹] = 3272, 2926, 2855, 1686, 1549, 1489, 1449, 1305, 1284, 1158, 1090, 983, 943, 852.

ESI-MS: *m/z* = 448.2 [M+H]⁺ (berechnet: [M] = 447.1)

Reinheit: 95% (H₂O/ACN 55:45)

5.11.10 Piperidin-4-carbonsäure

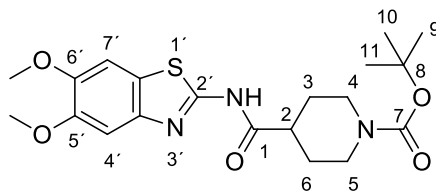
5.11.10.1 1-(tert-Butoxycarbonyl)piperidin-4-carbonsäure (88)



Methode:	C1	
Ansatz:	Piperidin-4-carbonsäure	1.00 g (7.74 mmol, 1.0 Äq.)
	Boc ₂ O	1.69 g (7.74 mmol, 1.0 Äq.)
	K ₂ CO ₃	2.25 g (16.26 mmol, 2.1 Äq.)
	Dioxan	25 mL
	Wasser	25 mL
Ausbeute:	1.67 g (7.28 mmol, 94% d. Theorie (Literatur: 99% ^[146])), farbloser Feststoff	
R _f :	0.56 (CH/EE 1:1 + TFA)	
Smp:	149 – 157 °C	
¹ H-NMR:	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ [ppm] = 3.94 – 3.73 (m, 2H, <i>H</i> -4, <i>H</i> -5), 2.96 – 2.71 (m, 2H, <i>H</i> -4, <i>H</i> -5), 2.45 – 2.34 (m, 1H, <i>H</i> -2), 1.87 – 1.69 (m, 2H, <i>H</i> -3, <i>H</i> -6), 1.51 – 1.28 (m, 11H, <i>H</i> -3, <i>H</i> -6, CH ₃).	
¹³ C-NMR:	¹³ C NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ [ppm] = 175.7 (<i>C</i> -1), 153.9 (<i>C</i> -7), 78.6 (<i>C</i> -4, <i>C</i> -5), 42.9 (<i>C</i> -8), 39.4 (<i>C</i> -2), 28.1 (<i>C</i> -9, <i>C</i> -10, <i>C</i> -11), 27.8 (<i>C</i> -3, <i>C</i> -6).	
IR:	ν [cm ⁻¹] = 3190, 2972, 2930, 1731, 1653, 1471, 1440, 1429, 1391, 1365, 1279, 1239, 1205, 1153, 1130, 1109, 1080, 1032, 922.	

Die analytischen Daten (Schmelzpunkt, ¹H-NMR, IR) stimmen mit der Literatur überein.^[147]

5.11.10.2 tert-Butyl 4-((5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)carbamoyl)piperidin-1-carboxylat (**100**)



Methode: A1, Reaktionsdauer: 3 d

Ansatz: **88** 100 mg, 1.74 mmol (1.0 Äq.)

41 366 mg, 1.74 mmol (1.0 Äq.)

TBTU 616 mg, 1.92 mmol (1.1 Äq.)

DIPEA 1.19 mL, 6.98 mmol (4.0 Äq.)

Ethylacetat 20 mL

Ausbeute: 366 mg (0.87 mmol, 50% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.14 (CH/EE 1:1)

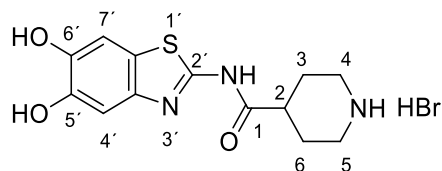
Smp: 79 – 81 °C

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 7.24 (s, 1H, *H*-4'), 7.21 (s, 1H, *H*-7'), 4.20 – 3.99 (m, 2H, *H*-4, *H*-5), 3.95 (s, 3H, OCH₃), 3.91 (s, 3H, OCH₃), 2.76 – 2.46 (m, 3H, *H*-2, *H*-4, *H*-5), 1.90 – 1.59 (m, 4H, *H*-3, *H*-6), 1.44 (s, 9H, *H*-9, *H*-10, *H*-11).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 173.0 (*C*-1), 158.5 (*C*-8), 154.6 (*C*-2'), 150.0 (*C*-5'), 148.2 (*C*-6'), 139.3 (*C*-3a'), 122.5 (*C*-7a'), 103.0 (*C*-4'), 102.1 (*C*-7'), 80.0 (*C*-8), 77.4 (*C*-2), 56.6 (OCH₃), 56.4 (OCH₃), 43.1 (*C*-4, *C*-5), 28.5 (*C*-9, *C*-10, *C*-11), 28.2 (*C*-3, *C*-6).

IR: ν [cm⁻¹] = 2931, 2851, 1686, 1548, 1485, 1434, 1365, 1318, 1287, 1239, 1220, 1199, 1154, 1064, 1040, 993, 953, 833, 771.

5.11.10.3 N-(5,6-Dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)piperidin-4-carbonsäureamid
Hydrobromid (**108**)



Methode: D1

Ansatz: **100** 300 mg, 0.71 mmol (1.0 Äq.)

BBr₃ (1M in Dichlormethan) 5.69 mL, 5.69 mmol (8.0 Äq.)

Ausbeute: 197 mg (0.53 mmol, 74% d. Theorie), farbloser Feststoff

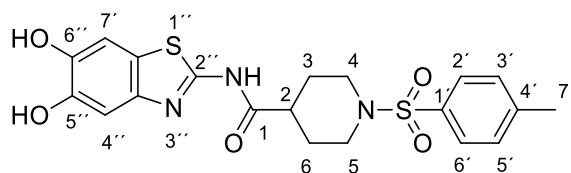
Smp: 289 – 291 °C

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.22 (s, 1H, *H*-4'), 7.09 (s, 1H, *H*-7'), 3.42 – 3.26 (m, 2H, *H*-4, *H*-5), 3.05 – 2.74 (m, 3H, *H*-2, *H*-4, *H*-5), 2.08 – 1.94 (m, 2H, *H*-3, *H*-6), 1.92 – 1.71 (m, 2H, *H*-3, *H*-6).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 172.3 (*C*-1), 155.4 (*C*-2'), 145.6 (*C*-6'), 143.9 (*C*-3a'), 141.6 (*C*-5'), 121.8 (*C*-7a'), 106.5 (*C*-4'), 106.4 (*C*-7'), 42.4 (*C*-4, *C*-5), 38.8 (*C*-2), 24.7 (*C*-3, *C*-6).

IR: ν [cm⁻¹] = 3056, 2989, 2946, 2787, 1723, 1555, 1522, 1486, 1333, 1299, 1286, 1171, 1141, 1130, 1113, 1031.

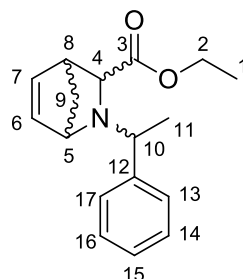
5.11.10.4 N-(5,6-Dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-1-(4-methylphenylsulfonyl)piperidin-4-carbonsäureamid (**114**)



Methode:	B1
Ansatz:	108 100 mg, 0.27 mmol (1.0 Äq.)
	Tosylchlorid 51 mg, 0.27 mmol (1.0 Äq.)
	Pyridin 5 mL
Ausbeute:	51 mg (0.11 mmol, 43% d. Theorie), farbloser Feststoff
R _f :	0.16 (EE/CH 1:1 + TFA)
Smp:	227 – 230 °C
¹ H-NMR:	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ [ppm] = 7.63 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 2H, <i>H</i> -2', <i>H</i> -6'), 7.45 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 2H, <i>H</i> -3', <i>H</i> -5'), 7.19 (s, 1H, <i>H</i> -4'), 7.07 (s, 1H, <i>H</i> -7'), 3.79 – 3.48 (m, 2H, <i>H</i> -4, <i>H</i> -5), 2.46 – 2.36 (m, 4H, <i>H</i> -2, <i>H</i> -7'), 2.33 – 2.19 (m, 2H <i>H</i> -4, <i>H</i> -5), 2.04 – 1.82 (m, 2H, <i>H</i> -3, <i>H</i> -6), 1.75 – 1.53 (m, 2H, <i>H</i> -3, <i>H</i> -6).
¹³ C-NMR:	¹³ C NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ [ppm] = 173.6 (<i>C</i> -1), 156.3 (<i>C</i> -2'), 146.4 (<i>C</i> -6'), 144.7 (<i>C</i> -5'), 144.5 (<i>C</i> -4'), 142.7 (<i>C</i> -3a'), 133.3 (<i>C</i> -1'), 130.8 (<i>C</i> -3', <i>C</i> -5'), 128.4 (<i>C</i> -2', <i>C</i> -6'), 122.7 (<i>C</i> -7a'), 107.3 (<i>C</i> -7'), 107.2 (<i>C</i> -4'), 46.2 (<i>C</i> -4, <i>C</i> -5), 41.0 (<i>C</i> -2), 28.2 (<i>C</i> -3, <i>C</i> -6), 21.9 (<i>C</i> -7').
IR:	ν [cm ⁻¹] = 3496, 3324, 2923, 2853, 1691, 1597, 1499, 1444, 1320, 1276, 1193, 1142, 1117, 1085, 1058, 1043, 1026, 943, 718.
ESI-MS:	<i>m/z</i> = 448.2 [M+H] ⁺ (berechnet: [M] = 447.1)
Reinheit:	99% (H ₂ O/ACN 55:45)

5.11.11 2-Azabicyclo[2.2.1]heptan-3-carbonsäure

5.11.11.1 (1S, 3S, 4R)- und (1R, 3R, 4S)-2-[1-(R)- oder (S)-Phenylethyl]-2-azabicyclo[2.2.1]hept-2-en-3-carbonsäure Ethylester ((1S, 3S, 4R)- und (1R, 3R, 4S)-138)



Nach einer Vorschrift von Tararov *et al.*^[120] wurde Glyoxylsäureethylester (50% in Toluol, 1.500 g, 14.69 mmol, 1.0 Äq.) in Dichlormethan (30 mL) gelöst und Molekularsieb (2 Å, 500 mg) zugegeben. Unter Kühlung mit einem Eisbad wurde (R)- oder (S)-1-Phenylethylamin (1.99 mL, 15.43 mmol, 1.05 Äq.) zugegeben und für 1 h gerührt. Anschließend wurde unter Kühlung mit einem Trockeneis-Aceton-Bad Trifluoressigsäure (1.12 mL, 15.43 mmol, 1.05 Äq.) und BF₃·OEt₂ (1.96 mL, 15.43 mmol, 1.05 Äq.) zugegeben, gefolgt von frisch destilliertem Cyclopentadien (1.58 mL, 19.10 mmol, 1.3 Äq.). Unter Kühlung wurde für 6 h gerührt, anschließend das Kältebad entfernt und für weitere 16 h gerührt. Nach Zugabe von gesättigter NaHCO₃-Lösung (15 mL) wurden die Phasen getrennt und die wässrigen Phasen mit Dichlormethan (3 x 20 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung des Rückstands (CH/EE 99:1 + NEt₃) ergab **138** ((1S, 3S, 4R): 1788 mg, 6.59 mmol, 75% d. Theorie; (1R, 3R, 4S): 1358 mg, 5.00 mmol, 32% d. Theorie (Literatur: 92%^[120])) als farblose Flüssigkeit.

R_f: 0.31 (CH/EE 9:1), Anfärbung mit Dragendorff

Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = -77$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, Dichlormethan) (1S, 3S, 4R)

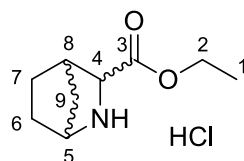
$[\alpha]_{589}^{25} = +80$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, Dichlormethan) (1R, 3R, 4S)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 7.37 – 7.16 (m, 5H, H-13 – H-17), 6.46 (t, *J* = 4.3 Hz, 1H, H-7), 6.31 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, H-6), 4.34 (s, 1H, H-5), 3.96 – 3.77 (m, 2H, H-2), 3.07 (q, *J* = 6.5 Hz, 1H, H-10), 2.94 (s, 1H, H-4), 2.24 (s, 1H, H-8), 2.16 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-9), 1.45 (d, *J* = 7.0 Hz, 4H, H-11, H-9), 0.99 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, H-1).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 174.5 (C-3), 145.2 (C-12), 136.6 (C-7), 133.1 (C-6), 128.2 (C-13, C-17), 128.1 (C-14, C-16), 127.2 (C-15), 65.2 (C-8), 64.1 (C-10), 62.7 (C-5), 60.4 (C-2), 49.2 (C-4), 45.5 (C-9), 22.7 (C-11), 14.2 (C-1).

IR: ν [cm⁻¹] = 3059, 2975, 2823, 1741, 1492, 1453, 1375, 1323, 1248, 1192, 1160, 1107, 1078, 1057, 1033, 835, 762, 700.

5.11.11.2 (1*R*, 3*S*, 4*S*)- und (1*S*, 3*R*, 4*R*)-2-Azabicyclo[2.2.1]hept-2-en-3-carbonsäure Ethylester Hydrochlorid ((1*R*, 3*S*, 4*S*)- und (1*S*, 3*R*, 4*R*)-**130**)



In Anlehnung an eine Vorschrift von TARAROV *et al.*^[120] wurde (1*S*, 3*S*, 4*R*)- oder (1*R*, 3*R*, 4*S*)-**138** (1.0 Äq.) in Ethanol (20 mL) gelöst und 5% Pd auf Aktivkohle (75 mg) hinzugegeben. Die Lösung wurde bei 4 bar für 4 h hydriert, anschließend filtriert, das Lösemittel bei vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Diethylether (25 mL) gelöst. Durch Zugabe von HCl (5 M in Dioxan, 5 mL) und anschließender Filtration wurde **130** ((1*R*, 3*S*, 4*S*): 1.052 mg, 5.12 mmol, 91% d. Theorie, (1*S*, 3*R*, 4*R*): 861 mg, 4.19 mmol, 84% d. Theorie (Literatur: 98%^[148])) als farblose Flüssigkeit erhalten.

R_f: 0.09 (CH/EE 9:1), Anfärbung mit Dragendorff

Smp: 133 °C (Lit.: 153 – 154 °C^[120]) (1*R*, 3*S*, 4*S*)

Smp: 141 – 143 °C (Lit.: 153 – 154 °C^[120]) (1*S*, 3*R*, 4*R*)

Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = +12$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, MeOH (Literatur: 16^[120])) (1*R*, 3*S*, 4*S*)

$[\alpha]_{589}^{25} = -17$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, MeOH (Literatur: -16^[120])) (1*S*, 3*R*, 4*R*)

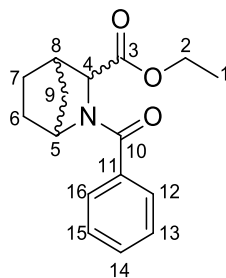
¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, Methanol-*d*₄) δ [ppm] = 4.32 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, *H*-2), 4.22 (s, 1H, *H*-4), 4.13 (s, 1H, *H*-5), 2.98 (s, 1H, *H*-8), 2.03 – 1.82 (m, 3H, *H*-9, *H*-6), 1.80 – 1.66 (m, 3H, *H*-7, *H*-6), 1.33 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, *H*-1).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, Methanol-*d*₄) δ [ppm] = 169.7 (C-3), 64.2 (C-2), 63.9 (C-4), 60.4 (C-5), 41.8 (C-8), 35.7 (C-7), 27.6 (C-6), 26.1 (C-6), 14.4 (C-1).

IR: ν [cm⁻¹] = 2858, 2760, 2731, 2648, 2598, 2541, 2521, 2471, 2364, 1752, 1588, 1454, 1381, 1301, 1287, 1231, 1205, 1171, 1158, 1084, 1045, 1015, 863.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[120]

5.11.11.3 (1*R*, 3*S*, 4*S*)- und (1*S*, 3*R*, 4*R*)-*N*-Benzoyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-2-en-3-carbonsäure Ethylester ((1*R*, 3*S*, 4*S*)- und (1*S*, 3*R*, 4*R*)-**131**)



Methode: A2, Aufreinigung durch Säulenchromatographie (CH:EE 3:1)

Ansatz: (1*R*, 3*S*, 4*S*)- oder (1*S*, 3*R*, 4*R*)-**130** 1.0 Äq.

Benzoylchlorid 1.1 Äq.

Triethylamin 2.5 Äq.

Ausbeute: 846 mg (3.10 mmol, 71% d. Theorie), farblose Flüssigkeit (1*R*, 3*S*, 4*S*)

Ausbeute: 984 mg (3.60 mmol, 94% d. Theorie), farblose Flüssigkeit (1*S*, 3*R*, 4*R*)

R_f: 0.19 (CH/EE 3:1)

Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = -49$ ($c = 10 \frac{mg}{ml}$, Dichlormethan) (1*R*, 3*S*, 4*S*)

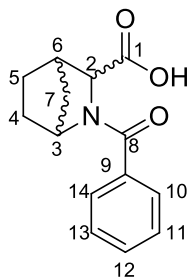
$[\alpha]_{589}^{25} = +48$ ($c = 10 \frac{mg}{ml}$, Dichlormethan) (1*S*, 3*R*, 4*R*)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 7.55 – 7.47 (m, 2H, *H*-12, *H*-16), 7.45 – 7.37 (m, 3H, *H*-13 – *H*-15), 4.34 – 4.18 (m, 3H, *H*-2, *H*-4), 4.15 (s, 1H, *H*-5), 2.77 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H, *H*-8), 2.14 (dt, $J = 10.2, 2.0$ Hz, 1H, *H*-9), 1.84 – 1.53 (m, 4H, *H*-6, *H*-7), 1.36 – 1.22 (m, 4H, *H*-1, *H*-9).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 170.1 (*C*-3), 168.6 (*C*-10), 136.4 (*C*-11), 129.9 (*C*-14), 128.4 (*C*-13, *C*-15), 127.1 (*C*-12, *C*-16), 63.9 (*C*-5), 61.1 (*C*-2), 59.7 (*C*-4), 41.6 (*C*-8), 35.6 (*C*-9), 31.8 (*C*-6), 27.7 (*C*-7), 14.2 (*C*-1).

IR: ν [cm⁻¹] = 2977, 2874, 1741, 1626, 1602, 1576, 1495, 1446, 1418, 1372, 1350, 1295, 1264, 1205, 1178, 1113, 1050, 1027, 815, 785, 702.

5.11.11.4 (1*R*, 3*S*, 4*S*)- und (1*S*, 3*R*, 4*R*)-*N*-Benzoyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-2-en-3-carbonsäure ((1*R*, 3*S*, 4*S*)- und (1*S*, 3*R*, 4*R*)-**132**)



Methode: D3

Ansatz:	(1 <i>R</i> , 3 <i>S</i> , 4 <i>S</i>)- oder (1 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>R</i>)- 131	1.0 Äq.
	LiOH	10.0 Äq.
	THF	15 mL
	H ₂ O	15 mL

Ausbeute: 530 mg (2.16 mmol, 80% d. Theorie), farbloser Feststoff (1*R*, 3*S*, 4*S*)

Ausbeute: 604 mg (2.46 mmol, 95% d. Theorie), farbloser Feststoff (1*S*, 3*R*, 4*R*)

R_f: 0.43 (CH/EE 1:1 + TFA)

Smp: 111 °C (1*R*, 3*S*, 4*S*)

Smp: 111 °C (1*S*, 3*R*, 4*R*)

Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = -71$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, DMSO) (1*R*, 3*S*, 4*S*)

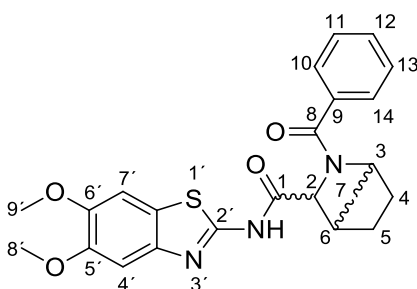
$[\alpha]_{589}^{25} = +71$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, DMSO) (1*S*, 3*R*, 4*R*)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.52 – 7.40 (m, 5H, *H*-10 – *H*-14), 4.11 (s, 1H, *H*-3), 3.94 (s, 2H, *H*-2), 2.68 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, *H*-6), 1.95 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, *H*-7), 1.80 – 1.48 (m, 4H, *H*-4, *H*-5), 1.31 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, *H*-7).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 171.3 (C-1), 167.4 (C-8), 136.5 (C-9), 129.9 (C-12), 128.6 (C-10, C-14), 126.9 (C-11, C-13), 63.5 (C-2), 59.3 (C-3), 41.2 (C-6), 35.2 (C-7), 31.4 (C-4), 27.3 (C-5).

IR: ν [cm⁻¹] = 3436, 3262, 3022, 2983, 2875, 1711, 1583, 1557, 1496, 1457, 1439, 1386, 1304, 1291, 1227, 1190, 719.

5.11.11.5 (1*R*, 3*S*, 4*S*)- und (1*S*, 3*R*, 4*R*)-2-Benzoyl-N-(5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-2-azabicyclo[2.2.1]hept-2-en-3-carbonsäure ((1*R*, 3*S*, 4*S*)- und (1*S*, 3*R*, 4*R*)-**133**



Methode: A1, Reaktionsdauer: 3 d

Ansatz: (1*R*, 3*S*, 4*S*)- oder (1*S*, 3*R*, 4*R*)-**132** 1.0 Äq.

41 1.0 Äq.

TBTU 1.1 Äq.

HOBt 1.0 Äq.

DIPEA 4.0 Äq.

DMF 15 mL

Ausbeute: 290 mg (0.66 mmol, 54% d. Theorie), farbloser Feststoff (1*R*, 3*S*, 4*S*)

Ausbeute: 142 mg (0.33 mmol, 16% d. Theorie), farbloser Feststoff (1*S*, 3*R*, 4*R*)

R_f: 0.35 (CH/EE 3:1)

Smp: 124 – 127 °C (1*R*, 3*S*, 4*S*)

Smp: 125 °C (1*S*, 3*R*, 4*R*)

Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = -12$ ($c = 10 \frac{mg}{ml}$, DMSO) (1*R*, 3*S*, 4*S*)

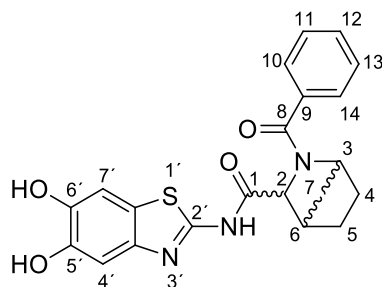
$$[\alpha]_{589}^{25} = + 13 \left(c = 10 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}, \text{DMSO} \right) (1S, 3R, 4R)$$

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 7.64 – 7.51 (m, 2H, *H*-10, *H*-14), 7.53 – 7.41 (m, 3H, *H*-11 – *C*-13), 7.39 (s, 1H, *H*-4'), 7.24 (s, 1H, *H*-7'), 4.55 (s, 1H, *H*-2), 4.37 (s, 1H, *H*-3), 3.97 (s, 3H, *H*-8'), 3.92 (s, 3H, *H*-9'), 3.05 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H, *H*-6), 2.39 – 2.20 (m, 1H, *H*-7), 1.89 – 1.72 (m, 1H, *H*-4), 1.68 – 1.58 (m, 2H, *H*-5), 1.54 – 1.43 (m, 2H, *H*-7, *H*-4).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 171.7 (*C*-8), 168.4 (*C*-1), 156.7 (*C*-2'), 149.3 (*C*-6'), 147.5 (*C*-5'), 142.3 (*C*-3a'), 135.7 (*C*-9), 130.5 (*C*-12), 128.5 (*C*-11, *C*-13), 127.3 (*C*-10, *C*-14), 123.5 (*C*-7a'), 103.4 (*C*-4'), 102.6 (*C*-7'), 65.7 (*C*-2), 60.4 (*C*-3), 56.2 (*C*-8'), 56.2 (*C*-9') 40.2 (*C*-6), 37.1 (*C*-7), 31.8 (*C*-5), 26.6 (*C*-4).

IR: ν [cm⁻¹] = 2971, 1740, 1718, 1616, 1544, 1487, 1448, 1436, 1288, 1221, 1161, 700.

5.11.11.6 (1*R*, 3*S*, 4*S*)- und (1*S*, 3*R*, 4*R*)-2-Benzoyl-*N*-(5,6-dihydroxybenzo[*d*]thiazol-2-yl)-2-azabicyclo[2.2.1]hept-2-en-3-carbonsäure ((1*R*, 3*S*, 4*S*)- und (1*S*, 3*R*, 4*R*)-**129**)



Methode: D1

Ansatz: (1*R*, 3*S*, 4*S*)- oder (1*S*, 3*R*, 4*R*)-**133** 1.0 Äq.

BBr₃ (1 M in DCM) 10.0 Äq.

DCM 10 mL

Ausbeute: 56 mg (0.14 mmol, 50% d. Theorie), farbloser Feststoff (1*R*, 3*S*, 4*S*)

Ausbeute: 75 mg (0.15 mmol, 50% d. Theorie), farbloser Feststoff (1*S*, 3*R*, 4*R*)

R_f: 0.13 (CH/EE 1:2 + TFA)

Smp: 200 – 202 °C (1*R*, 3*S*, 4*S*)

Smp: 194 °C (1*S*, 3*R*, 4*R*)

Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = + 10$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, DMF) (1*R*, 3*S*, 4*S*)

$[\alpha]_{589}^{25} = - 10$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, DMF) (1*S*, 3*R*, 4*R*)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.62 – 7.39 (m, 5H, *H*-10 – *H*-14), 7.21 (s, 1H, *H*-4'), 7.11 (s, 1H, *H*-7'), 4.65 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, *H*-2), 4.09 (s, 1H, *H*-3), 3.04 – 2.88 (m, 1H, *H*-6), 2.20 – 1.93 (m, 1H, *H*-7), 1.84 – 1.59 (m, 2H, *H*-4), 1.60 – 1.39 (m, 2H, *H*-5), 1.32 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, *H*-7).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 168.9 (*C*-1), 167.7 (*C*-8), 155.8 (*C*-2'), 146.0 (*C*-5'), 144.3 (*C*-6'), 142.3 (*C*-3a'), 136.1 (*C*-9), 130.8 (*C*-12), 128.8 (*C*-10, *C*-14), 127.9 (*C*-11, *C*-13), 122.3 (*C*-7a'), 106.9 (*C*-4'), 106.8 (*C*-7'), 63.5 (*C*-2), 61.4 (*C*-3), 42.3 (*C*-6), 35.7 (*C*-7), 31.7 (*C*-5), 30.3 (*C*-4).

IR: ν [cm⁻¹] = 3204, 2955, 1696, 1597, 1552, 1493, 1449, 1287, 1155, 1040, 848, 793, 721, 700.

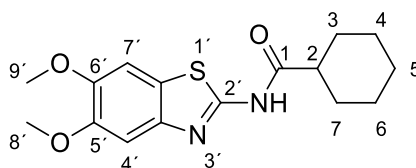
ESI-MS: *m/z* = 410.1 [M+H]⁺ (berechnet: [M] = 409.1)

Reinheit: 96% (H₂O/ACN 55:45) (1*R*, 3*S*, 4*S*)

Reinheit: 96% (H₂O/ACN 55:45) (1*S*, 3*R*, 4*R*)

5.11.12 Cyclohexyl

5.11.12.1 N-(5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-cyclohexancarbonsäureamid (140)



41 (300 mg, 1.43 mmol, 1.0 Äq.) wurde vorgelegt und Cyclohexylcarbonsäurechlorid (0.21 mL, 1.57 mmol, 1.1 Äq.) und DCM (20 mL), gefolgt von Triethylamin (0.22 mL, 1.57 mmol, 1.1 Äq.) hinzugefügt. Nach Rühren für 16 h wurde die Mischung mit Wasser versetzt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit Ethylacetat (3 x 10 mL) extrahiert. Die Phasen wurden getrennt und die organische Phase mit 2 M HCl (3 x 10 mL), gesättigter NaHCO₃-Lösung (3 x 10 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (3 x 10 mL) extrahiert. Das Lösemittel wurde entfernt und der Rückstand per Säulenchromatographie (CH/EE 3:1) aufgereinigt. Es wurde N-(5,6-Dimethoxybenzothiazol-2-yl)cyclohexancarbonsäureamid (324 mg, 1.01 mmol, 71% d. Theorie) als farbloser Feststoff erhalten.

R_f: 0.4 (CH/EE 1:1)

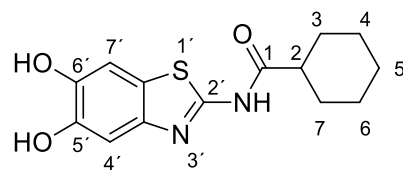
Smp: 184 – 187 °C

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ = 7.28 – 7.24 (m, 2H, *H*-4', *H*-7'), 3.96 (s, 3H, *H*-8'), 3.93 (s, 3H, *H*-9'), 2.30 (tt, *J* = 11.6, 7.0 Hz, 1H, *H*-2), 1.91 – 1.79 (m, 2H, *H*-3, *H*-7), 1.79 – 1.66 (m, 2H, *H*-4, *H*-6), 1.66 – 1.43 (m, 4H, *H*-4, *H*-6, *H*-3, *H*-7), 1.20 – 0.97 ppm (m, 2H, *H*-5).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ = 174.5 (*C*-1), 158.3 (*C*-2), 149.5 (*C*-6'), 147.7 (*C*-5'), 141.9 (*C*-3a'), 123.7 (*C*-7a'), 103.0 (*C*-4'), 103.0 (*C*-7'), 56.5 (*C*-8'), 56.2 (*C*-9'), 45.2 (*C*-2), 29.3 (*C*-3, *C*-5), 25.5 (*C*-4, *C*-6), 25.5 ppm (*C*-5).

IR: ν [cm⁻¹] = 3273, 2932, 1854, 1692, 1543, 1476, 1452, 1430, 1295, 1272, 1201, 1158, 1124, 1014, 985, 819.

5.11.12.2 N-(5,6-Dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-cyclohexancarbonsäureamid (**141**)

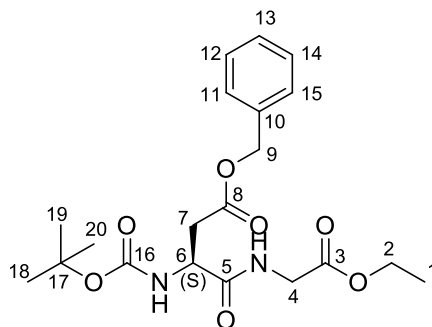


- Methode: D1, Aufreinigung per Säulenchromatographie (CH/EE 1:1 + TFA)
- Ansatz: **140** 100 mg (0.25 mmol, 1.0 Äq.)
- BBr₃ (1 M in DCM) 1.47 mL (1.47 mmol, 6.0 Äq.)
- DCM 15 mL
- Ausbeute: 61 mg (0.21 mmol, 85% d. Theorie), farbloser Feststoff
- R_f: 0.43 (CH/EE 1:1 + TFA)
- Smp: 232 – 234 °C
- ¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.20 (s, 1H, *H*-4'), 7.08 (s, 1H, *H*-7'), 2.46 – 2.44 (m, 1H, *H*-2), 1.90 – 1.54 (m, 6H, *H*-3, *H*-3, *H*-4, *H*-6, *H*-7), 1.50 – 1.11 (m, 4H, *H*-4 – *H*-6).
- ¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 174.9 (*C*-1), 156.2 (*C*-2'), 145.9 (*C*-6'), 144.2 (*C*-3a'), 141.9 (*C*-5'), 122.1 (*C*-7a'), 106.8 (*C*-4'), 106.7 (*C*-7'), 43.9 (*C*-2), 29.2 (*C*-3, *C*-7), 25.7 (*C*-5), 25.5 (*C*-4, *C*-6).
- IR: ν [cm⁻¹] = 3304, 3206, 2929, 2855, 1720, 1599, 1566, 1491, 1445, 1280, 1186, 1170, 1142, 1106, 1014, 850.
- ESI-MS: *m/z* = 293.1 [M+H]⁺ (berechnet: [M] = 292.1)
- Reinheit: 98% (H₂O/ACN 55:45)

5.12 Synthese cyclischer Inhibitoren

5.12.16-Ring

5.12.1.1 Boc-Asp(OBn)-Gly-OEt (**149**)



Methode: A1, Reaktionsdauer: 3 d

Ansatz: Boc-Tyr(Bn)-OH 1000 mg (2.69 mmol, 1.0 Äq.)

ClH₃N-Gly-OEt 368 mg (2.69 mmol, 1.0 Äq.)

TBTU 951 mg (2.96 mmol, 1.1 Äq.)

HOBt 364 mg (2.69 mmol, 1.0 Äq.)

DIPEA 4.83 mL (10.77 mmol, 4.0 Äq.)

Ausbeute: 1092 mg (2.67 mmol, 99% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.23 (CH/EE 2:1)

Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = +10$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, Dichlormethan)

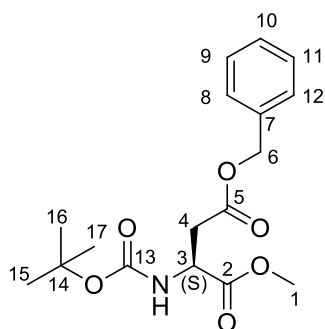
¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 7.39 – 7.30 (m, 5H, *H*-11 – *H*-15), 5.13 (s, 2H, *H*-9), 4.64 – 4.52 (m, 1H, *H*-6), 4.20 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, *H*-2), 3.99 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H, *H*-4), 3.06 (dd, *J* = 17.1, 4.5 Hz, 1H, *H*-7), 2.74 (dd, *J* = 17.1, 6.1 Hz, 1H, *H*-7), 1.45 (s, 9H, *H*-18 –), 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, *H*-1).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 171.8 (C-8), 171.0 (C-5), 169.5 (C-3), 155.6 (C-16), 135.5 (C-10), 128.7 (C-12, C-14), 128.5 (C-13), 128.4 (C-11, C-15), 80.8 (C-17), 67.0 (C-9), 61.6 (C-2), 50.6 (C-6), 41.6 (C-4), 36.2 (C-7), 28.4 (C-18 – C-20), 14.2 (C-1).

IR: ν [cm⁻¹] = 3326, 2978, 2934, 1735, 1674, 1521, 1456, 1367, 1160, 1049, 1023, 749, 697.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[149]

5.12.1.2 Boc-Asp(OBn)-OMe (**154**)



Nach einer Vorschrift von JIANG *et al.*^[123] wurden Boc-Asp(OBn)-OH (1000 mg, 3.09 mmol, 1.0 Äq.) und K₂CO₃ (641 mg, 4.64 mmol, 1.5 Äq.) in DMF (10 mL) gelöst. Unter Kühlung mit einem Eisbad wurde Methyljodid (0.39 mL, 6.19 mmol, 2.0 Äq.) langsam zugetropft und die Lösung für 3 Stunden gerührt. Anschließend wurde Wasser hinzugegeben und mit Ethylacetat (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und NaCl-Lösung (jeweils 3 x 20 mL) gewaschen und anschließend mit MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des organischen Lösemittels unter verminderten Druck wurde **154** (998 mg, 3.09 mmol, 96% d. Theorie) als farbloser Feststoff erhalten.

R_f: 0.93 (CH/EE 3:1)

Smp: 61 – 64 °C

Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = +26$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, DCM)

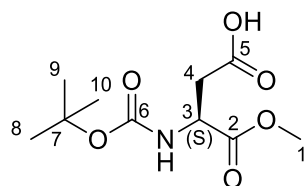
¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 7.38 – 7.31 (m, 5H, *H*-8 – *H*-12), 5.13 (s, 2H, *H*-6), 4.62 – 4.52 (m, 1H, *H*-3), 3.70 (s, 3H, *H*-1), 3.05 (dd, *J* = 17.0, 4.6 Hz, 1H, *H*-4), 2.86 (dd, *J* = 16.9, 4.7 Hz, 1H, *H*-4), 1.44 (s, 9H, *H*-15 – *H*-17).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 171.5 (*C*-1), 170.8 (*C*-5), 155.4 (*C*-13), 135.4 (*C*-7), 128.6 (*C*-9, *C*-12), 128.5 (*C*-10), 128.3 (*C*-8, *C*-12), 80.2 (*C*-14), 66.8 (*C*-6), 52.7 (*C*-1), 50.0 (*C*-3), 36.9 (*C*-4), 28.3 (*C*-15 – *H*-17).

IR: ν [cm⁻¹] = 3399, 2976, 1734, 1701, 1505, 1464, 1455, 1443, 1420, 1386, 1371, 1349, 1294, 1251, 1217, 1151, 1073, 1043, 1032, 987, 979, 957, 918, 849, 781, 745, 697.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[150]

5.12.1.3 Boc-Asp-OMe (151)



Methode: D4

Ansatz: **154** 1.13 g (3.35 mmol, 1.0 Äq.)

Palladium auf Aktivkohle 50 mg

Methanol 50 mL

Ausbeute: 0.66 (2.67 mmol, 80% d. Theorie), farbloser Feststoff.

R_f: 0.83 (CH/EE 3:1)

Smp: 85 – 87 °C

Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = -31$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, DMSO)

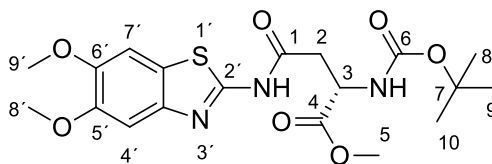
¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 4.52 (dd, *J* = 4.6, 4.6 Hz, 1H, *H*-3), 3.69 (s, 3H, *H*-1), 3.00 (dd, *J* = 17.5, 4.6 Hz, 1H, *H*-4), 2.80 (dd, *J* = 17.5, 4.6 Hz, 1H, *H*-4), 1.38 (s, 9H, *H*-8 – *H*-10).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 175.9 (*C*-5), 171.4 (*C*-2), 155.5 (*C*-6), 80.4 (*C*-7), 60.5 (*C*-1), 49.7 (*C*-3), 36.6 (*C*-4), 28.3 (*C*-8 – *C*-10).

IR: ν [cm⁻¹] = 3417, 3281, 3024, 2986, 2968, 2935, 2913, 1736, 1691, 1507, 1456, 1442, 1404, 1396, 1371, 1361, 1344, 1318, 1251, 1219, 1158, 1129, 1048, 1029, 953, 883, 813, 781, 763.

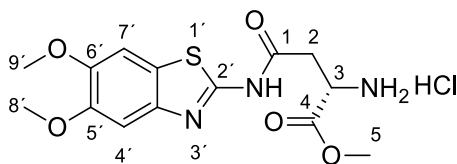
Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[151]

5.12.1.4 (S)-Methyl-2-((tert-butoxycarbonylamino)-4-(5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)amino)-4-oxobutanoate (**152**)



Methode:	A1, Reaktionsdauer: 3 d	
Ansatz:	151	650 mg (2.63 mmol, 1.0 Äq.)
	41	553 mg (2.63 mmol, 1.0 Äq.)
	TBTU	929 mg (2.89 mmol, 1.1 Äq.)
	HOBt	355 mg (2.63 mmol, 1.0 Äq.)
	DIPEA	1.79 mL (10.52 mmol, 5.0 Äq.)
	DMF	15 mL
Ausbeute:	930 mg (2.12 mmol, 80% d. Theorie), farbloser Feststoff	
R _f :	0.23 (CH/EE 1:1)	
Smp:	81 – 83 °C	
Drehwert:	[α] ₅₈₉ ²⁵ = + 42 (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, Dichlormethan)	
¹ H-NMR:	¹ H NMR (300 MHz, Chloroform- <i>d</i>) δ [ppm] = 7.32 (s, 1H, <i>H</i> -4'), 7.20 (s, 1H, <i>H</i> -7'), 4.75 – 4.60 (m, 1H, <i>H</i> -2), 3.95 (s, 3H, <i>H</i> -8'), 3.93 (s, 3H, <i>H</i> -9'), 3.77 (s, 3H, <i>H</i> -5), 3.25 (dd, <i>J</i> = 16.7, 4.9 Hz, 1H, <i>H</i> -2), 3.06 (dd, <i>J</i> = 16.6, 4.5 Hz, 1H, <i>H</i> -2), 1.42 (s, 9H, <i>H</i> -8 – <i>H</i> -10).	
¹³ C-NMR:	¹³ C NMR (75 MHz, Chloroform- <i>d</i>) δ [ppm] = 171.8 (<i>C</i> -4), 168.9 (<i>C</i> -1), 157.4 (<i>C</i> -6), 155.7 (<i>C</i> -2'), 149.6 (<i>C</i> -6'), 147.8 (<i>C</i> -5'), 141.9 (<i>C</i> -3a'), 123.4 (<i>C</i> -7a'), 103.2 (<i>C</i> -4'), 102.7 (<i>C</i> -7'), 80.4 (<i>C</i> -7), 56.5 (<i>C</i> -8'), 56.3 (<i>C</i> -9'), 53.0 (<i>C</i> -5), 50.1 (<i>C</i> -2), 38.3 (<i>C</i> -2), 28.4 (<i>C</i> -8 – <i>C</i> -10).	
IR:	ν [cm ⁻¹] = 2975, 1691, 1556, 1487, 1436, 1392, 1366, 1286, 1219, 1201, 1159, 1064, 1026, 1006.	

5.12.1.5 (S)-Methyl-2-amino-4-(5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)amino)-4-oxobutanoat
Hydrochlorid (**153**)



Methode: D2

Ansatz: **152** 420 mg (0.96 mmol, 1.0 Äq.)

HCl (4 M in Dioxan) 15 mL

Ausbeute: 355 mg (0.94 mmol, 99% d. Theorie), farbloser Feststoff

Smp: 130 – 133 °C

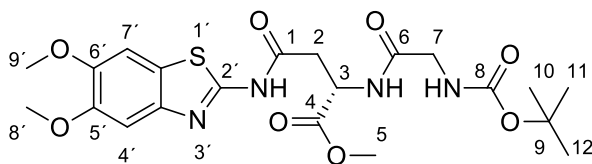
Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = +23$ ($c = 10 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$, DMSO)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.53 (s, 1H, *H*-4'), 7.30 (s, 1H, *H*-7'), 4.58 – 4.34 (m, 1H, *H*-3), 3.81 (s, 3H, *H*-8'), 3.80 (s, 3H, *H*-9'), 3.55 (s, 3H, *H*-5), 3.41 – 3.15 (m, 2H, *H*-2).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 169.0 (*C*-4), 167.7 (*C*-1), 155.9 (*C*-2'), 148.9 (*C*-5'), 147.0 (*C*-6'), 142.4 (*C*-3a'), 122.8 (*C*-7a'), 103.7 (*C*-4'), 103.6 (*C*-7'), 56.0 (*C*-8'), 55.8 (*C*-9'), 53.1 (*C*-5), 48.1 (*C*-3), 35.1 (*C*-2).

IR: ν [cm⁻¹] = 2837, 2359, 2343, 1751, 1712, 1574, 1492, 1439, 1387, 1284, 1251, 1225, 1197, 1167, 1114, 1063, 856.

5.12.1.6 (S)-Methyl-2-(2-((tert-butoxycarbonyl)amino)acetamido)-4-((5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)amino)-4-oxobutanoat (**155**)



Methode: A1, Reaktionsdauer: 3 d

Ansatz: **153** 840 mg (2.24 mmol, 1.0 Äq.)

Boc-Gly-OH 391 mg (2.24 mmol, 1.0 Äq.)

TBTU 789 mg (2.46 mmol, 1.1 Äq.)

HOBt 302 mg (2.24 mmol, 1.0 Äq.)

DIPEA 1.52 mL (8.94 mmol, 4.0 Äq.)

DMF 15 mL

Ausbeute: 735 mg (1.48 mmol, 66% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.21 (CH/EE 1:1)

Smp: 69 – 71 °C

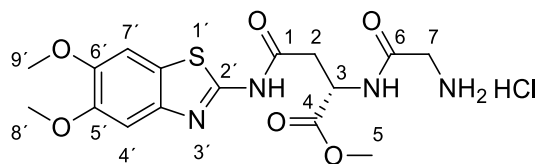
Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = +47$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, Dichlormethan)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 7.23 (s, 1H, *H*-4), 7.12 (s, 1H, *H*-7'), 4.99 – 4.87 (m, 1H, *H*-2), 3.90 (s, 8H, *H*-7, *H*-8', *H*-9'), 3.79 (s, 3H, *H*-5), 3.29 (d, *J* = 4.6 Hz, 2H, *H*-2), 1.33 (s, 9H, *H*-10 – *H*-12).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 170.9 (*C*-4), 170.8 (*C*-1), 168.5 (*C*-6), 156.7 (*C*-8), 156.3 (*C*-2'), 149.3 (*C*-5'), 147.5 (*C*-6'), 141.9 (*C*-3a'), 123.3 (*C*-7a'), 103.2 (*C*-4'), 102.5 (*C*-7'), 80.0 (*C*-9), 56.2 (*C*-8', *C*-9'), 53.1 (*C*-5), 49.1 (*C*-3), 44.1 (*C*-7), 37.5 (*C*-2), 28.3 (*C*-10 – *C*-12).

IR: ν [cm⁻¹] = 3262, 2933, 1668, 1552, 1488, 1436, 1366, 1286, 1249, 1219, 1201, 1159, 1064, 1005, 836, 777.

5.12.1.7 (S)-Methyl-2-(2-amino-acetamido)-4-((5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)amino)-4-oxobutanoat Hydrochlorid (**156**)



Methode: D2

Ansatz: **155** 710 mg (1.43 mmol, 1.0 Äq.)

HCl (4 M in Dioxan) 15 mL

Ausbeute: 617 mg (1.43 mmol, 99% d. Theorie), farbloser Feststoff

Smp: 127 – 129 °C

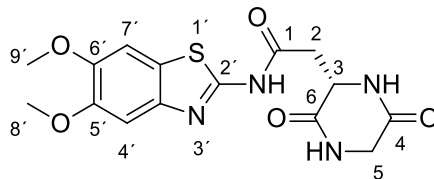
Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = +74$ ($c = 10 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$, DMSO)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.53 (s, 1H, *H*-4'), 7.29 (s, 1H, *H*-7'), 4.91 – 4.76 (m, 1H, *H*-2), 3.82 (s, 3H, *H*-8'), 3.80 (s, 3H, *H*-9'), 3.65 (s, 3H, *H*-5), 3.62 – 3.57 (m, 2H, *H*-7), 3.15 – 2.88 (m, 2H, *H*-2).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 171.1 (*C*-4), 168.4 (*C*-2'), 166.2 (*C*-1), 156.2 (*C*-6), 149.0 (*C*-5'), 147.0 (*C*-6'), 142.5 (*C*-3a'), 122.8 (*C*-7a'), 103.7 (*C*-4'), 103.6 (*C*-7'), 66.4 (*C*-7), 56.0 (*C*-9'), 55.8 (*C*-8'), 52.4 (*C*-5), 48.4 (*C*-3), 36.9 (*C*-2).

IR: ν [cm⁻¹] = 2951, 1738, 1679, 1552, 1490, 1437, 1379, 1342, 1284, 1222, 1164, 1064.

5.12.1.8 (S)-N-(5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-2-(3,6-dioxopiperazin-2-yl)acetamid
(148)



In einer Lösung von HCl (0.1 M in Isopropanol, 20 mL) wurde **156** (500 mg, 1.16 mmol, 1.0 Äq.) zusammen mit Triethylamin (0.21 mL, 1.50 mmol, 1.3 Äq.) für 24 h zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde nach Abkühlen auf Raumtemperatur durch Filtration **148** (403 mg, 1.11 mmol, 96% d. Theorie) als brauner Feststoff erhalten.

R_f: 0.26 (CH/EE 1:2)

Smp: 225 – 227 °C

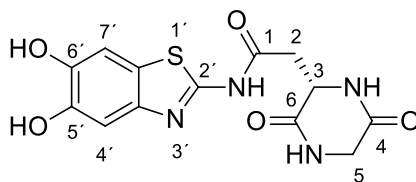
Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = +16$ ($c = 5 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$, DMSO)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.53 (s, 1H, *H*-4'), 7.29 (s, 1H, *H*-7'), 4.33 – 4.19 (m, 1H, *H*-3), 3.89 – 3.73 (m, 8H, *H*-5, *H*-8', *H*-9'), 3.05 – 2.84 (m, 2H, *H*-2).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 168.7 (*C*-1), 167.6 (*C*-6), 166.2 (*C*-4), 156.2 (*C*-2'), 148.9 (*C*-5'), 146.9 (*C*-6'), 142.5 (*C*-3a'), 122.8 (*C*-7a'), 103.7 (*C*-4'), 103.5 (*C*-7'), 56.0 (*C*-9'), 55.7 (*C*-8'), 50.7 (*C*-3), 44.7 (*C*-5), 37.6 (*C*-2).

IR: ν [cm⁻¹] = 3314, 3183, 2915, 2362, 1661, 1614, 1587, 1557, 1491, 1456, 1435, 1410, 1334, 1288, 1222, 1198, 1162, 1095, 1062, 1026, 999, 969, 833, 782, 706.

5.12.1.9 (S)-N-(5,6-Dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-2-(3,6-dioxopiperazin-2-yl)acetamid
(144)



148 (100 mg, 0.27 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Dichlormethan (15 mL) suspendiert und anschließend unter Kühlung mit einem Kältebad aus Ethanol und flüssigem Stickstoff BBr_3 (1 M in Dichlormethan, 2.74 mL, 2.74 mmol, 10.0 Äq.) zugetropft. Das Kältebad wurde nach 30 Minuten entfernt und die Lösung bei Raumtemperatur für 16 h gerührt. Anschließend wurde unter Kühlung mit einem Eis-Wasser-Bad Wasser langsam zugetropft. Durch Filtration wurde **144** (45 mg, 0.13 mmol, 49% d. Theorie) als farbloser Feststoff erhalten.

R_f: 0.30 (CH/EE 1:2)

Smp: 288 – 291 °C

Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = +15$ (c = 10 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$, DMF)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.20 (s, 1H, *H*-4'), 7.08 (s, 1H, *H*-7'), 4.32 – 4.18 (m, 1H, *H*-3), 3.91 – 3.63 (m, 2H, *H*-5), 3.03 – 2.83 (m, 2H, *H*-2).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 168.9 (*C*-1), 168.0 (*C*-6), 166.6 (*C*-4), 155.7 (*C*-2'), 146.0 (*C*-5'), 144.3 (*C*-6'), 142.2 (*C*-3a'), 122.3 (*C*-7a'), 106.9 (*C*-7'), 106.8 (*C*-4'), 51.2 (*C*-3), 45.1 (*C*-5), 38.1 (*C*-2).

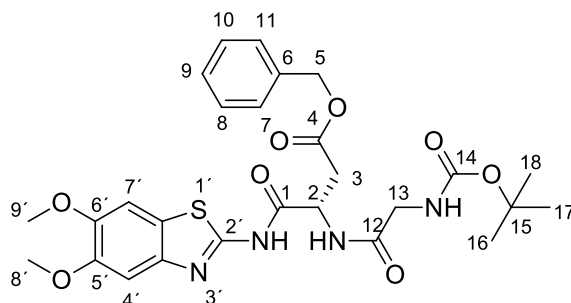
IR: ν [cm⁻¹] = 3264, 1661, 1550, 1449, 1403, 1328, 1285, 1161, 1087.

ESI-MS: *m/z* = 337.1 [M+H]⁺ (berechnet: [M] = 336.1)

Reinheit: 99% (H₂O/ACN 90:10)

5.12.27-Ring

5.12.2.1 (S)-Benzyl-3-(2-((tert-butoxycarbonyl)amino)acetamido)-4-((5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)amino)-4-oxobutanoat (159)



Methode: A1, Reaktionsdauer: 3 d

Ansatz: **117** 980 mg (2.17 mmol, 1.0 Äq.)
Boc-Gly-OH 381 mg (2.17 mmol, 1.0 Äq.)
TBTU 768 mg (2.39 mmol, 1.1 Äq.)
HOBt 294 mg (2.17 mmol, 1.0 Äq.)
DIPEA 1.48 mL (8.69 mmol, 4.0 Äq.)

Ausbeute: 1099 mg (1.92 mmol, 88% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.32 (CH/EE 2:1)

Smp: 70 – 72 °C

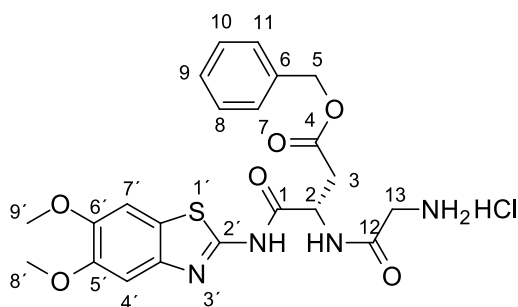
Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = +16$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, Dichlormethan)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 7.34 – 7.32 (m, 5H, *H*-7 – *H*-11), 7.30 (s, 1H, *H*-4'), 7.22 (s, 1H, *H*-7'), 5.31 – 5.21 (m, 1H, *H*-2), 5.14 (s, 2H, *H*-5), 3.96 (s, 3H, *H*-8'), 3.94 (s, 3H, *H*-9'), 3.92 (s, 2H, *H*-13), 3.32 – 3.14 (m, 1H, *H*-3), 3.02 – 2.86 (m, 1H, *H*-3), 1.46 (s, 9H, *H*-16 – *H*-18).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 171.3 (*C*-4), 170.9 (*C*-1), 168.9 (*C*-12), 156.6 (*C*-14), 156.3 (*C*-2'), 149.4 (*C*-6'), 147.7 (*C*-5'), 142.1 (*C*-3a'), 135.2 (*C*-6), 128.7 (*C*-7, *C*-11), 128.6 (*C*-9), 128.4 (*C*-8, *C*-10), 123.6 (*C*-7a'), 103.5 (*C*-4'), 102.6 (*C*-7'), 80.9 (*C*-15), 67.3 (*C*-5), 56.5 (*C*-8'), 56.3 (*C*-9'), 49.4 (*C*-2), 45.2 (*C*-13), 35.5 (*C*-3), 28.4 (*C*-16 – *C*-18).

IR: ν [cm⁻¹] = 3269, 2976, 1663, 1550, 1486, 1436, 1389, 1366, 1286, 1248, 1221, 1200, 1158, 1064, 1029, 994, 836, 777, 748, 698.

5.12.2.2 (S)-Benzyl 3-(2-aminoacetamido)-4-((5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)amino)-4-oxobutanoat Hydrochlorid (**157**)



Methode: D2

Ansatz: **159** 851 mg (1.49 mmol, 1.0 Äq.)

HCl (4 M in Dioxan) 12 mL

Ausbeute: 753 mg (1.48 mmol, 99% d. Theorie), farbloser Feststoff

Smp: 99 – 101 °C

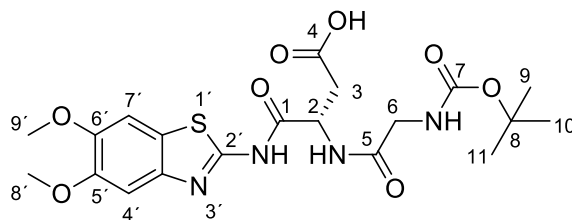
Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = -24$ ($c = 10 \frac{mg}{ml}$, DMSO)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.55 (s, 1H, *H*-4'), 7.40 – 7.21 (m, 6H, *H*-7 – *H*-11, *H*-7'), 5.12 (s, 2H, *H*-5), 3.82 (s, 3H, *H*-8'), 3.80 (s, 3H, *H*-9'), 3.70 – 3.51 (m, 2H, *H*-13), 3.00 (dd, *J* = 16.5, 5.6 Hz, 1H, *H*-3), 2.87 (dd, *J* = 16.5, 8.0 Hz, 1H, *H*-3).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 169.5 (*C*-4), 169.4 (*C*-1), 166.4 (*C*-12), 156.2 (*C*-2'), 149.0 (*C*-5'), 147.1 (*C*-6'), 142.4 (*C*-3a'), 135.9 (*C*-6), 128.4 (*C*-7, *C*-11), 128.1 (*C*-9), 128.0 (*C*-8, *C*-10), 123.0 (*C*-7a'), 103.7 (*C*-4'), 103.5 (*C*-7'), 66.4 (*C*-5), 66.0 (*C*-8'), 55.8 (*C*-9'), 49.7 (*C*-2), 40.6 (*C*-13), 35.9 (*C*-3).

IR: ν [cm⁻¹] = 2945, 2362, 2342, 1736, 1681, 1558, 1491, 1438, 1379, 1282, 1224, 1163, 1063.

5.12.2.3 (S) 3-(2-((tert-Butoxycarbonyl)amino)acetamido)-4-((5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)amino)-4-oxobutanoat (**160**)



Methode: D3

Ansatz: **157** 750 mg (1.31 mmol, 1.0 Äq.)
 LiOH 314 mg (13.1 mmol, 10.0 Äq.)
 THF 20 mL
 Wasser 20 mL

Ausbeute: 270 mg (0.56 mmol, 43% d. Theorie), farblose viskose Flüssigkeit

R_f: 0.58 (CH/EE 1:1 + TFA)

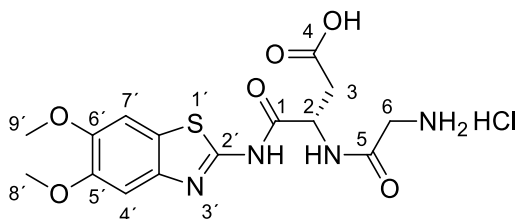
Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = -8$ ($c = 10 \frac{mg}{ml}$, DMSO)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.55 (s, 1H, *H*-4'), 7.29 (s, 1H, *H*-7'), 5.27 – 5.11 (m, 1H, *H*-2), 3.82 (s, 3H, *H*-8'), 3.80 (s, 3H, *H*-9'), 3.62 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, *H*-6), 2.79 (dd, *J* = 16.9, 5.8 Hz, 1H, *H*-3), 2.68 (dd, *J* = 16.9, 5.8 Hz, 1H, *H*-3), 1.38 (s, 9H, *H*-9 – *H*-11).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 171.8 (*C*-4), 170.5 (*C*-1), 170.1 (*C*-5), 156.7 (*C*-7), 156.3 (*C*-2'), 149.4 (*C*-5'), 147.5 (*C*-6'), 143.0 (*C*-3a'), 126.9 (*C*-7a'), 104.1 (*C*-4'), 103.9 (*C*-7'), 78.6 (*C*-8), 56.4 (*C*-4'), 56.2 (*C*-7'), 50.0 (*C*-2), 43.5 (*C*-6), 36.1 (*C*-3), 28.6 (*C*-9 – *C*-11).

IR: ν [cm⁻¹] = 3310, 2976, 2942, 1684, 1549, 1487, 1453, 1437, 1392, 1367, 1284, 1248, 1220, 1202, 1161, 1063, 1028, 997.

5.12.2.4 (S)-3-(2-Aminoacetamido)-4-((5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)amino)-4-oxobutanoat Hydrochlorid (**161**)



Methode: D2

Ansatz: **160** 1070 mg (2.18 mmol, 1.0 Äq.)

HCl (4 M in Dioxan) 12 mL

Ausbeute: 830 mg (1.98 mmol, 89% d. Theorie), farbloser Feststoff

Smp: 88 – 90 °C

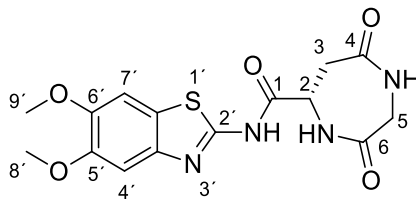
Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = -27$ ($c = 10 \frac{mg}{ml}$, DMSO)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.54 (s, 1H, *H*-4'), 7.29 (s, 1H, *H*-7'), 4.98 – 4.80 (m, 1H, *H*-2), 3.81 (s, 3H, *H*-8'), 3.79 (s, 3H, *H*-9'), 3.66 – 3.57 (m, 2H, *H*-6), 2.89 – 2.69 (m, 2H, *H*-3).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 171.1 (*C*-4), 169.8 (*C*-1), 166.4 (*C*-5), 156.3 (*C*-2'), 149.0 (*C*-5'), 147.1 (*C*-6'), 142.4 (*C*-3a'), 122.9 (*C*-7a'), 103.7 (*C*-4'), 103.5 (*C*-7'), 56.0 (*C*-9'), 55.8 (*C*-8'), 49.9 (*C*-2), 36.0 (*C*-3).

IR: ν [cm⁻¹] = 2943, 1718, 1697, 1592, 1562, 1490, 1437, 1282, 1223, 1199, 1167, 1059.

5.12.2.5 (S)-N-(5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-3,7-dioxo-1,4-diazepane-5-carboxamide
(158)



161 (800 mg, 1.91 mmol, 1.0 Äq.), TBTU (613 mg, 1.91 mmol, 1.0 Äq.) und HOBt (258 mg, 1.91 mmol, 1.0 Äq.) wurden in Ethylacetat (20 mL) vorgelegt und anschließend unter Kühlung mit einem Eis-Wasser-Bad DIPEA (1.30 mL, 7.64 mmol, 1.0 Äq.) hinzugegeben. Nach Rühren für 16 h wurde durch Filtration **158** (204 mg, 0.56 mmol, 29% d. Theorie) als brauner Feststoff erhalten.

R_f: 0.29 (CH/EE 1:2)

Smp: 215 – 217 °C

Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = +12$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, DMSO)

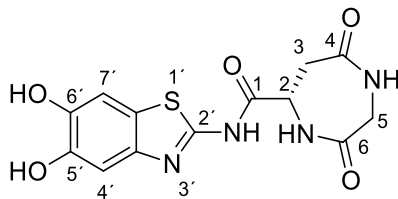
¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.53 (s, 1H, *H*-4'), 7.29 (s, 1H, *H*-7'), 4.35 – 4.24 (m, 1H, *H*-2), 3.82 (s, 3H, *H*-8'), 3.80 (s, 3H, *H*-9'), 3.65 – 3.47 (m, 2H, *H*-5), 3.12 – 3.00 (m, 2H, *H*-3).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 170.8 (C-4), 169.1 (C-1), 168.0 (C-5), 156.6 (C-2'), 149.3 (C-5'), 147.4 (C-6'), 142.9 (C-3a'), 123.2 (C-7a'), 104.1 (C-4'), 104.0 (C-7'), 56.4 (C-9'), 56.2 (C-8'), 51.1 (C-2), 45.1 (C-5), 38.1 (C-3).

IR: ν [cm⁻¹] = 3337, 3182, 2918, 1660, 1614, 1586, 1552, 1489, 1461, 1434, 1407, 1333, 1288, 1221, 1201, 1163, 1064.

ESI-MS: $m/z = 365.1$ [M+H]⁺ (berechnet: [M] = 364.1)

5.12.2.6 (S)-N-(5,6-Dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-3,7-dioxo-1,4-diazepane-5-carboxamide
(145)



Methode: D1

Ansatz: **158** 100 mg (0.27 mmol, 1.0 Äq.)
BBr₃ (1 M in Dichlormethan) 2.74 mL (2.74 mmol, 10.0 Äq.)
Dichlormethan 10 mL

Ausbeute: 52 mg (0.15 mmol, 56% d. Theorie), brauner Feststoff

R_f: 0.12 (CH/EE 1:2)

Smp: 278 – 280 °C

Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = +12$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, DMF)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.21 (s, 1H, *H*-4'), 7.09 (s, 1H, *H*-7'), 4.32 – 4.15 (m, 1H, *H*-2), 3.93 – 3.62 (m, 2H, *H*-5), 3.00 – 2.77 (m, 2H, *H*-3).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 168.9 (*C*-4), 168.0 (*C*-1), 166.6 (*C*-5), 155.7 (*C*-2'), 146.0 (*C*-5'), 144.3 (*C*-6'), 142.1 (*C*-3a'), 122.2 (*C*-7a'), 106.9 (*C*-4'), 106.8 (*C*-7'), 51.2 (*C*-2), 45.1 (*C*-5), 38.1 (*C*-3).

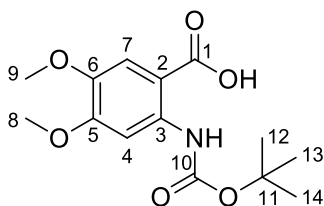
IR: ν [cm⁻¹] = 3192, 1661, 1558, 1450, 1327, 1287, 1163.

ESI-MS: *m/z* = 337.1 [M+H]⁺ (berechnet: [M] = 336.1)

Reinheit: >99% (H₂O/ACN 90:10)

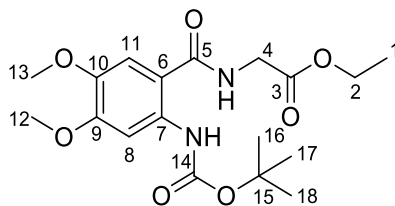
5.12.3 Benzodiazepin

5.12.3.1 2-((tert-Butoxycarbonyl)amino)-4,5-dimethoxybenzoesäure (**165**)



Methode:	C1
Ansatz:	2-Amino-4,5-dimethoxybenzoesäure 164 500 mg (2.54 mmol, 1.0 Äq.)
	Boc ₂ O 664 mg (3.04 mmol, 1.2 Äq.)
	Triethylamin 0.921 mL (7.61 mmol, 3.0 Äq.)
	Dioxan 10 mL
	Wasser 10 mL
Ausbeute:	688 mg (2.31 mmol, 91% d. Theorie (Literatur: 99% ^[126]), farbloser Feststoff
R _f :	0.51 (CH/EE 3:1 + TFA)
Smp:	167 °C
¹ H-NMR:	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ [ppm] = 8.00 (s, 1H, <i>H</i> -4), 7.39 (s, 1H, <i>H</i> -7), 3.82 (s, 3H, <i>H</i> -9), 3.73 (s, 3H, <i>H</i> -8), 1.48 (s, 9H, <i>H</i> -12 – <i>H</i> -14).
¹³ C-NMR:	¹³ C NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ [ppm] = 169.8 (<i>C</i> -1), 154.0 (<i>C</i> -6), 152.6 (<i>C</i> -10), 143.2 (<i>C</i> -5), 137.9 (<i>C</i> -2), 113.4 (<i>C</i> -3), 106.6 (<i>C</i> -7), 101.7 (<i>C</i> -4), 80.5 (<i>C</i> -11), 56.0 (<i>C</i> -9), 56.0 (<i>C</i> -8), 28.4 (<i>C</i> -12 – <i>C</i> -14).
IR:	ν [cm ⁻¹] = 3240, 2978, 2929, 2831, 2361, 1691, 1593, 1524, 1381, 1354, 1249, 1152.

5.12.3.2 2-(2-((tert-Butoxycarbonyl)amino)-4,5-dimethoxybenzamido)essigsäure Ethylester
(166)



Methode: A1, Reaktionsdauer: 2 d

Ansatz: **165** 500 mg (1.68 mmol, 1.0 Äq.)

Glycineethylester Hydrochlorid 234 mg (1.68 mmol, 1.0 Äq.)

TBTU 594 mg (1.85 mmol, 1.1 Äq.)

HOBt 227 mg (1.68 mmol, 1.0 Äq.)

DIPEA 1.14 mL (6.73 mmol, 4.0 Äq.)

Ausbeute: 530 mg (1.39 mmol, 83% d. Theorie), farblose viskose Flüssigkeit

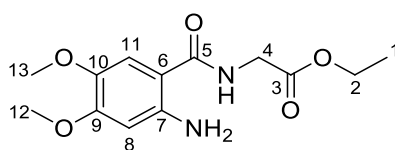
R_f: 0.05 (CH/EE 3:1)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 8.08 (s, 1H, *H*-8), 6.95 (s, 1H, *H*-11), 4.25 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, *H*-2), 4.16 (d, *J* = 3.7 Hz, 2H, *H*-4), 3.94 (s, 3H, *H*-13), 3.85 (s, 3H, *H*-12), 1.56 – 1.44 (m, 9H, *H*-16 – *H*-18), 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, *H*-1).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 170.2 (*C*-3), 168.7 (*C*-5), 152.9 (*C*-10), 143.2 (*C*-9), 136.6 (*C*-6), 109.7 (*C*-11), 109.6 (*C*-7) 103.0 (*C*-8), 80.1 (*C*-15), 61.8 (*C*-2), 56.5 (*C*-13), 56.1 (*C*-12), 41.7 (*C*-4), 28.4 (*C*-16 – *C*-18), 14.2 (*C*-1).

IR: ν [cm⁻¹] = 3383, 2978, 2929, 1724, 1667, 1634, 1597, 1524, 1467, 1401, 1344, 1266, 1201, 1156.

5.12.3.3 2-(2-Amino-4,5-dimethoxybenzamido)essigsäure Ethylester (**162**)



Methode: D2

Ansatz: **166** 500 mg (1.31 mmol, 1.0 Äq.)

HCl (4 M in Dioxan) 12 mL

Ausbeute: 348 mg (1.09 mmol, 83% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.19 (CH/EE 2:1)

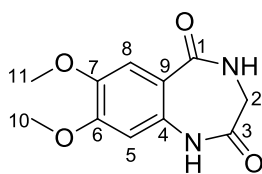
Smp: 207 °C

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.56 (s, 1H, *H*-11), 7.03 (s, 1H, *H*-8), 4.12 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, *H*-2), 4.00 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H, *H*-4), 3.84 (s, 3H, *H*-12), 3.80 (s, 3H, *H*-13), 1.21 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, *H*-2).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 170.1 (*C*-3), 167.3 (*C*-5), 152.1 (*C*-10), 146.7 (*C*-9), 129.8 (*C*-6), 115.4 (*C*-7), 111.9 (*C*-11), 107.4 (*C*-8), 61.0 (*C*-2), 56.8 (*C*-12), 56.3 (*C*-13), 41.6 (*C*-4), 14.6 (*C*-1).

IR: ν [cm⁻¹] = 3289, 2942, 2835, 2705, 2529, 2018, 1736, 1634, 1601, 1552, 1511, 1454, 1364, 1197.

5.12.3.4 7,8-Dimethoxy-3,4-dihydro-1H-benzof[1,4-e]diazepin-2,5-dion (**163**)



In Anlehnung an eine Vorschrift von BIHEL *et al.*^[125] wurde **162** (100 mg, 0.31 mmol, 1.0 Äq.) in Eisessig (10 mL) für 12 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde Pentan zur Kristallisation hinzugegeben und **163** durch Filtration als farbloser Feststoff erhalten (70 mg, 0.30 mmol, 94% d. Theorie).

R_f: 0.64 (EE/MeOH 6:1)

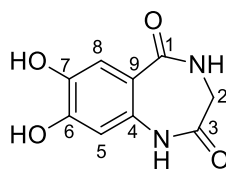
Smp: 284 °C (Lit.: 286 – 288 °C^[152])

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.21 (s, 1H, *H*-8), 6.68 (s, 1H, *H*-5), 3.77 (s, 3H, *H*-11), 3.76 (s, 3H, *H*-10), 3.56 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, *H*-2).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 170.8 (*C*-3), 167.9 (*C*-1), 151.8 (*C*-7), 145.2 (*C*-6), 131.7 (*C*-9), 117.1 (*C*-4), 112.2 (*C*-8), 104.1 (*C*-5), 55.6 (*C*-11), 55.5 (*C*-10), 44.6 (*C*-2).

IR: ν [cm⁻¹] = 3591, 3326, 3203, 3093, 2974, 2843, 1687, 1654, 1614, 1524, 1495, 1211.

5.12.3.5 7,8-Dimethoxy-3,4-dihydro-1H-benzo[e][1,4]diazepin-2,5-dion (**146**)

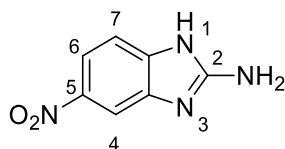


Methode:	D1	
Ansatz:	163	62 mg (0.26 mmol, 1.0 Äq.)
	BBr ₃ (1 M in DCM)	2.10 mL (2.10 mmol, 8.0 Äq.)
	DCM	5 mL
Ausbeute:	46 mg (0.22 mmol, 84% d. Theorie), brauner Feststoff	
R _f :	0.18 (EE/MeOH 6:1)	
Smp:	320 – 323 °C	
¹ H-NMR:	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ [ppm] = 7.10 (s, 1H, <i>H</i> -8), 6.49 (s, 1H, <i>H</i> -5), 3.51 (d, <i>J</i> = 5.6 Hz, 2H, <i>H</i> -2).	
¹³ C-NMR:	¹³ C NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ [ppm] = 171.3 (<i>C</i> -3), 168.5 (<i>C</i> -1), 149.8 (<i>C</i> -7), 142.6 (<i>C</i> -6), 130.8 (<i>C</i> -9), 117.0 (<i>C</i> -4), 116.8 (<i>C</i> -8), 108.0 (<i>C</i> -5), 45.1 (<i>C</i> -2).	
IR:	ν [cm ⁻¹] = 3239, 3037, 2929, 1637, 1612, 1592, 1534, 1486, 1472, 1439, 1416, 1371, 1347, 1290, 1233, 1190, 1166, 1144, 1055, 982, 879, 781, 737, 690, 670.	
ESI-MS:	m/z = 209.1 [M+H] ⁺ (berechnet: [M] = 208.1)	
Reinheit:	97% (H ₂ O/ACN 90:10)	

5.13 Scaffold Hopping

5.13.1 Benzimidazol

5.13.1.1 2-Amino-5-nitro-1H-benzimidazol **169**



Nach einer Vorschrift von FREI *et al.*^[153] wurde 4-Nitrophenyl-1,2-diamin (0.629 g, 4.11 mmol, 1.0 Äq.) in einem Gemisch gleicher Volumentanteile von Wasser und Methanol (15 mL) vorgelegt und bei Raumtemperatur Bromcyan (1.306 g, 12.3 mmol, 3.0 Äq.) hinzugegeben. Die Lösung wurde bei 50 °C für 1 h gerührt und anschließend bei vermindertem Druck eingengt. Der pH-Wert wurde durch Na₂CO₃ alkalisch gestellt und 2-Amino-5-nitro-1H-benzimidazol (0.696 g, 3.90 mmol, 95% d. Theorie (Literatur: 94%^[153]) als gelber Feststoff erhalten.

Smp: 206 – 208 °C (Lit.: 211 – 212 °C^[153])

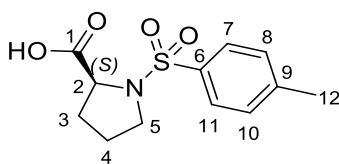
¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.94 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, *H*-4), 7.86 (dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 1H, *H*-6), 7.17 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, *H*-7).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 159.7 (*C*-2), 147.6 (*C*-5), 139.5 (*C*-7a), 137.3 (*C*-3a), 116.6 (*C*-6), 111.4 (*C*-7), 106.0 (*C*-4).

IR: ν [cm⁻¹] = 3348, 3112, 1677, 1650, 1629, 1570, 1492, 1461, 1383, 1331, 1289, 1225, 1128, 1073, 946, 861, 814, 758, 732, 692.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[153]

5.13.1.2 (S)-1-Tosylpyrrolidin-2-carbonsäure **171**



Nach einer Vorschrift von UGWU *et al.*^[128] wurden *L*-Prolin (0.40 g, 3.47 mmol, 1.0 Äq.), *p*-Tosylchlorid (0.79 g, 4.14 mmol, 1.2 Äq.) und NaHCO₃ (0.44 g, 4.15 mmol, 1.2 Äq.) in Wasser (40 mL) gelöst und bei Raumtemperatur für 5 h gerührt. Die Lösung wurde anschließend mit 2 M HCl angesäuert und mit Ethylacetat extrahiert (3 x 10 mL). Nach trocknen mit Na₂SO₄ wurde das organische Lösemittel entfernt und (*S*)-1-Tosylpyrrolidin-2-carbonsäure (0.60 g, 2.22 mmol, 64% d. Theorie (Literatur: 98%^[128]) als farbloser Feststoff erhalten.

R_f: 0.47 (CH/EE 1:1 + TFA)

Smp: 47 – 49 °C (Lit.: 50.40 – 50.70 °C^[128])

Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = -89$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, Methanol)

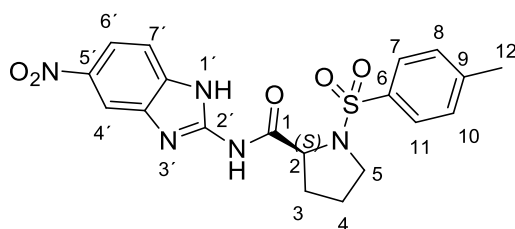
¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.71 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, *H*-7, *H*-11), 7.42 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, *H*-8, *H*-10), 4.12 – 4.04 (m, 1H, *H*-2), 3.43 – 3.27 (m, 1H, *H*-5), 3.20 – 3.08 (m, 1H, *H*-5), 2.40 (s, 3H, *H*-12), 1.93 – 1.71 (m, 3H, *H*-3, *H*-4), 1.65 – 1.49 (m, 1H, *H*-4).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 173.2 (*C*-1), 143.4 (*C*-9), 134.6 (*C*-6), 129.9 (*C*-8, *C*-10), 127.2 (*C*-7, *C*-11), 60.4 (*C*-2), 48.4 (*C*-5), 30.4 (*C*-3), 24.2 (*C*-4), 21.0 (*C*-12).

IR: ν [cm⁻¹] = 2981, 1721, 1597, 1442, 1343, 1305, 1196, 1155, 1092, 1010, 816, 661.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[128]

5.13.1.3 (S)-N-(5-Nitrobenzimidazol-2-yl)-1-tosyl-pyrrolidin-2-carbonsäureamid **168**



Methode: A1, Reaktionsdauer: 3 d, Aufreinigung per Säulenchromatographie (CH/EE 1:1)

Ansatz:	169	100 mg, 0.56 mmol (1.0 Äq.)
	171	151 mg, 0.56 mmol (1.0 Äq.)
	TBTU	198 mg, 0.62 mmol (1.1 Äq.)
	HOBt	76 mg, 0.56 mmol (1.0 Äq.)
	DIPEA	0.38 mL, 2.25 mmol (4.0 Äq.)
	DMF	10 mL

Ausbeute: 36 mg (0.08 mmol, 15% d. Theorie), hellbrauner Feststoff

R_f: 0.32 (CH/EE 1:1)

Smp: 115 – 118 °C

Drehwert: $[\alpha]_{589}^{25} = -217$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, DMF)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.35 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, *H*-4'), 8.06 (dd, *J* = 8.8, 2.3 Hz, 1H, *H*-6'), 7.78 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, *H*-7, *H*-11), 7.62 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, *H*-7'), 7.45 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, *H*-8, *H*-10), 4.53 – 4.23 (m, 1H, *H*-2), 3.23 – 3.09 (m, 2H, *H*-5), 2.40 (s, 3H, *H*-12), 2.02 – 1.84 (m, 3H, *H*-3, *H*-4), 1.68 – 1.48 (m, 1H, *H*-4).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 172.3 (C-1), 150.6 (C-2'), 144.2 (C-9), 142.4 (C-5'), 137.9 (C-7a'), 134.4 (C-6), 130.4 (C-8, C-10), 127.8 (C-7, C-11), 122.2 (C-3a'), 117.9 (C-6'), 115.2 (C-7'), 110.6 (C-4'), 61.5 (C-2'), 49.5 (C-5'), 31.5 (C-3), 24.9 (C-4), 21.5 (C-12).

IR: ν [cm⁻¹] = 3335, 2900, 1707, 1636, 1599, 1558, 1515, 1462, 1427, 1383, 1337, 1307, 1290, 1196, 1156, 1091, 1067, 1035, 1004, 884, 815, 739, 708, 663.

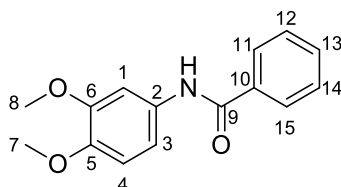
ESI-MS: $m/z = 430.2$ $[M+H]^+$ (berechnet: $[M] = 429.1$)

Reinheit: 97% (H₂O/ACN 55:45)

5.14 Fragmente

5.14.1 Catechol

5.14.1.1 N-(3,4-Dimethoxyphenyl)benzamid (174)



Methode: A2

Ansatz:	3,4-Dimethoxyanilin	250 mg (1.63 mmol, 1.0 Äq.)
	Benzoylchlorid	0.21 mL (1.80 mmol, 1.1 Äq.)
	Triethylamin	0.25 mL (1.80 mmol, 1.1 Äq.)
	Dichlormethan	20 mL

Ausbeute: 417 mg (1.62 mmol, 99% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.49 (CH/EE 2:1)

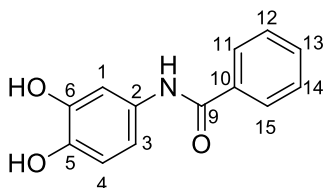
Smp: 188 °C

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 7.85 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, *H*-11, *H*-15), 7.58 – 7.37 (m, 4H, *H*-1, *H*-12 – *H*-14), 7.01 (dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 1H, *H*-3), 6.82 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, *H*-4), 3.86 (s, 6H, *H*-7 – *H*-8).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 166.1 (*C*-9), 149.5 (*C*-5'), 146.5 (*C*-6'), 135.4 (*C*-9), 132.2 (*C*-13), 132.0 (*C*-10), 129.2 (*C*-12, *C*-14), 127.4 (*C*-11, *C*-15), 112.7 (*C*-3), 111.7 (*C*-4), 105.7 (*C*-1), 56.5 (*C*-5'), 56.3 (*C*-6').

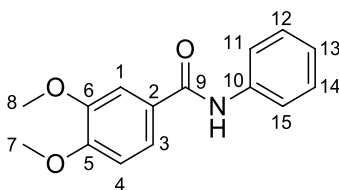
IR: ν [cm⁻¹] = 3244, 3050, 1752, 1641, 1604, 1508, 1447, 1413, 1327, 1234, 1135, 1024.

5.14.1.2 N-(3,4-Dihydroxyphenyl)benzamid (**172**)



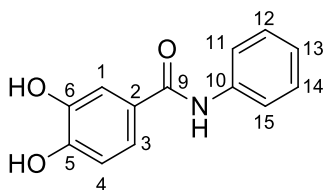
- Methode: D1, Aufreinigung per semipräparativer HPLC (H₂O/ACN 80:20)
- Ansatz: **174** 100 mg (0.39 mmol, 1.0 Äq.)
BBr₃ (1 M in DCM) 2.33 mL (2.33 mmol, 6.0 Äq.)
DCM 15 mL
- Ausbeute: 53 mg (0.23 mmol, 59% d. Theorie), farbloser Feststoff
- R_f: 0.22 (CH/EE 2:1 + TFA)
- Smp: 184 – 186 °C
- ¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.97 – 7.87 (m, 2H, *H*-11, *H*-15), 7.62 – 7.43 (m, 3H, *H*-12 – *H*-14), 7.30 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, *H*-1), 6.98 (dd, *J* = 8.5, 2.5 Hz, 1H, *H*-4), 6.68 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, *H*-3).
- ¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 164.9 (*C*-9), 144.8 (*C*-5), 141.7 (*C*-6), 135.3 (*C*-10), 131.2 (*C*-2), 131.1 (*C*-13), 128.3 (*C*-12, 14), 127.5 (*C*-11, *C*-15), 115.1 (*C*-4), 111.8 (*C*-3), 109.2 (*C*-1).
- IR: ν [cm⁻¹] = 3379, 3318, 1623, 1610, 1574, 1530, 1447, 1433, 1391, 1359, 1287, 1244, 1202, 1181, 1115, 852, 804, 688.
- ESI-MS: *m/z* = 230.1 [M+H]⁺ (berechnet: [M] = 229.1)
- Reinheit: 99% (H₂O/ACN 80:20)

5.14.1.3 3,4-Dimethoxy-N-phenylbenzamid (179)



Methode:	A1, Reaktionsdauer: 2 d	
Ansatz:	3,4-Dimethoxybenzoesäure	500 mg (2.74 mmol, 1.0 Äq.)
	Anilin	0.25 mL (2.74 mmol, 1.0 Äq.)
	TBTU	969 mg (3.02 mmol, 1.1 Äq.)
	HOBt	371 mg (2.74 mmol, 1.0 Äq.)
	DIPEA	1.87 mL (10.98 mmol, 4.0 Äq.)
	DMF	20 mL
Ausbeute:	560 mg (2.18 mmol, 79% d. Theorie), farbloser Feststoff	
R _f :	0.41 (CH/EE 1:2)	
Smp:	168 °C	
¹ H-NMR:	¹ H NMR (300 MHz, Chloroform- <i>d</i>) δ [ppm] = 7.69 – 7.59 (m, 2H, <i>H</i> -11, <i>H</i> -15), 7.47 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz, 1H, <i>H</i> -1), 7.43 – 7.29 (m, 3H, <i>H</i> -3, <i>H</i> -12, <i>H</i> -14), 7.18 – 7.04 (m, 1H, <i>H</i> -13), 6.84 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H, <i>H</i> -4) 3.90 (s, 1H, <i>H</i> -8), 3.88 (s, 1H, <i>H</i> -7).	
¹³ C-NMR:	¹³ C NMR (75 MHz, Chloroform- <i>d</i>) δ [ppm] = 165.5 (<i>C</i> -9), 152.1 (<i>C</i> -6), 149.2 (<i>C</i> -5), 138.2 (<i>C</i> -10), 129.1 (<i>C</i> -12, <i>C</i> -14), 127.6 (<i>C</i> -2), 124.5 (<i>C</i> -13), 120.4 (<i>C</i> -11, <i>C</i> -15), 119.6 (<i>C</i> -3), 110.8 (<i>C</i> -1), 110.4 (<i>C</i> -4), 56.1 (<i>C</i> -8), 56.1 (<i>C</i> -7).	
IR:	ν [cm ⁻¹] = 3313, 2360, 2337, 2224, 2017, 1645, 1597, 1510, 1436, 1318, 1268, 1219.	

5.14.1.4 3,4-Dihydroxy-N-phenylbenzamid (**173**)



Aluminiumchlorid (207 mg, 1.55 mmol, 4.0 Äq.) wurde vorgelegt und Ethanthiol (1 mL) unter Kühlung mit einem Eisbad hinzugefügt. Nach 10 Minuten Rühren wurde eine Lösung von **179** (100 mg, 0.39 mmol, 1.0 Äq.) in Dichlormethan (10 mL) hinzugegeben. Das Eisbad wurde entfernt und die Suspension für 16 h gerührt. Anschließend wurde konz. HCl unter Kühlung mit einem Eisbad hinzugefügt und durch Filtration das Produkt (56 mg, 0.24 mmol, 63%) als farbloser Feststoff erhalten.

R_f: 0.13 (CH/EE 1:1 + TFA)

Smp: 163 – 165 °C

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.74 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, *H*-11, *H*-15), 7.43 – 7.25 (m, 4H, *H*-1, *H*-12 – *H*-14), 7.11 – 6.99 (m, 1H, *H*-3), 6.83 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, *H*-4).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 165.8 (*C*-9), 149.3 (*C*-6), 145.4 (*C*-5), 140.0 (*C*-10), 129.0 (*C*-12, *C*-14), 126.4 (*C*-2), 123.7 (*C*-3), 120.7 (*C*-10, *C*-15), 120.1 (*C*-13), 115.9 (*C*-1), 115.4 (*C*-4).

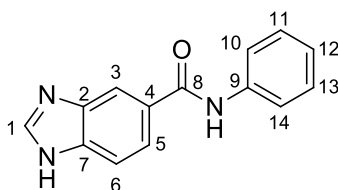
IR: ν [cm⁻¹] = 3459, 3330, 1644, 1626, 1589, 1520, 1500, 1447, 1377, 1322, 1292, 1243, 1195, 1175, 1133, 756, 688.

ESI-MS: *m/z* = 230.1 [M+H]⁺ (berechnet: [M] = 229.1)

Reinheit: 99% (H₂O/ACN 80:20)

5.14.2 Imidazol

5.14.2.1 N-Phenylbenzo[d]imidazol-5-carbonsäureamid (**181**)



Nach einer Vorschrift von GONZÁLEZ-VERA *et al.*^[131] wurde Benzo[d]imidazol-5-carbonsäure (200 mg, 1.23 mmol, 1.0 Äq.) in Thionylchlorid (8 mL) und Toluol (20 mL) für 7 h zum Sieden erhitzt. Anschließend wurden die Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und Anilin (0.11 mL, 1.23 mmol, 1.0 Äq.) und THF (20 mL) hinzugegeben und für weitere 6 h zum Sieden erhitzt. Durch Filtration konnte **181** (214 mg, 0.90 mmol, 73% d. Theorie (Lit.: 75%^[131])) als grauer Feststoff erhalten werden.

R_f: 0.16 (CH/EE 1:9)

Smp: 121 – 123 °C (Lit.: 120 – 123 °C^[131])

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 9.67 (s, 1H, *H*-1), 8.50 (s, 1H, *H*-3), 8.18 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, *H*-5), 7.96 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, *H*-6), 7.83 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, *H*-10, *H*-14), 7.37 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, *H*-11, *H*-13), 7.12 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, *H*-12).

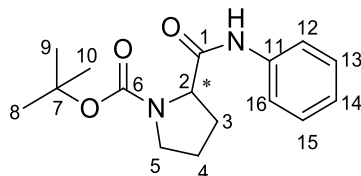
¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 164.7 (*C*-8), 142.3 (*C*-1), 139.1 (*C*-9), 133.2 (*C*-4), 132.3 (*C*-2), 131.1 (*C*-7), 128.6 (*C*-11, *C*-13), 125.4 (*C*-5), 123.8 (*C*-12), 120.6 (*C*-10, *C*-14), 114.6 (*C*-3), 114.3 (*C*-5).

IR: ν [cm⁻¹] = 3278, 3103, 3055, 2891, 2756, 1697, 1641, 1611, 1595, 1530, 1501, 1474, 1439, 1369, 1320, 1254, 1242, 1189, 1122, 1072, 882, 846, 834, 801, 762, 750, 687.

ESI-MS: *m/z* = 238.1 [M+H]⁺ (berechnet: [M] = 237.1)

Reinheit: 97% (H₂O/ACN 80:20)

5.14.2.2 (R)- und (S)-1-(tert-Butoxycarbonyl)-N-phenylpyrrolidin-2-carboxamid (R)- und (S)-
191



(R)- oder (S)-Prolin (1000 mg, 4.65 mmol, 1.0 Äq.) wurden zusammen mit EDC (980 mg, 5.11 mmol, 1.1 Äq.) und Anilin (0.42 mL, 4.65 mmol, 1.0 Äq.) in Dichlormethan (40 mL) für 30 Minuten gerührt. Anschließend wurde Wasser (20 mL) hinzugegeben, die Phasen getrennt und drei Mal mit Dichlormethan (20 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und mit 2 M HCl, gesättigter NaHCO₃- und NaCl-Lösung (jeweils 3 x 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und durch Entfernen des Lösemittels (R)- oder (S)-**191** (R: 1102 mg, 3.81 mmol, 82% d. Theorie; S: 1097 mg, 3.79 mmol, 82% d. Theorie (Lit.: 92%^[154])) als farbloser Feststoff erhalten.

R_f: 0.45 (CH/EE 2:1)

Smp R: 182 – 185 °C

Smp S: 183 - 185 °C (Lit.: 185 – 188 °C^[155])

Drehwert R: $[\alpha]_{589}^{25} = + 133$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, CHCl₃)

Drehwert S: $[\alpha]_{589}^{25} = - 137$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, CHCl₃, Lit.: - 138^[155])

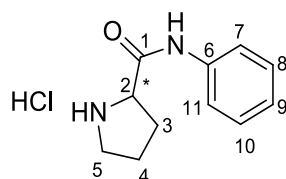
¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 7.51 (dd, *J* = 7.7, 1.5 Hz, 2H, *H*-12, *H*-16), 7.335 – 7.22 (m, 2H, *H*-13, *H*-15), 7.07 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, *H*-14), 4.64 – 4.27 (m, 1H, *H*-2), 3.64 – 3.21 (m, 2H, *H*-5), 2.63 – 2.39 (m, 1H, *H*-3), 2.06 – 1.84 (m, 3H, *H*-3, *H*-4), 1.49 (s, 9H, *H*-8 – *H*-10).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] = 170.1 (C-1), 156.8 (C-6), 138.3 (C-11), 129.0 (C-13, C-15), 124.1 (C-14), 119.8 (C-12, C-16), 81.0 (C-7), 60.7 (C-2), 47.3 (C-5), 28.5 (C-8 – C-10), 27.3 (C-3), 24.7 (C-4).

IR: ν [cm⁻¹] = 3311, 3288, 3137, 3080, 2972, 2875, 1693, 1668, 1601, 1544, 1494, 1442, 1404, 1367, 1347, 1299, 1275, 1246, 1160, 1126, 1089, 981, 916, 870, 855, 758, 694.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[155]

5.14.2.3 (R)- und (S)-N-Phenylpyrrolidin-2-carboxamid Hydrochlorid ((R)- und (S)-192)



Methode: D2

Ansatz: (R)- oder (S)-**191** 1 Äq.

HCl (4 M in Dioxan) 12 mL

Ausbeute *R*: 778 mg (3.45 mmol, 99% d. Theorie), farbloser Feststoff

Ausbeute *S*: 579 mg (2.57 mmol, 75% d. Theorie), farbloser Feststoff

Smp *R*: 208 – 212 °C

Smp *S*: 213 – 215 °C

Drehwert *R*: $[\alpha]_{589}^{25} = + 43$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, DMF)

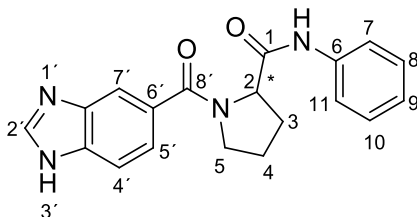
Drehwert *S*: $[\alpha]_{589}^{25} = - 38$ (c = 10 $\frac{mg}{ml}$, DMF)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.67 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, *H*-7, *H*-11), 7.38 – 7.27 (m, 2H, *H*-8, *H*-10), 7.09 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, *H*-9), 4.56 – 4.28 (m, 1H, *H*-2), 3.36 – 3.10 (m, 2H, *H*-5), 2.54 – 2.33 (m, 1H, *H*-3), 2.06 – 1.80 (m, 3H, *H*-3, *H*-4).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 167.2 (*C*-1), 138.8 (*C*-6), 129.3 (*C*-8, *C*-10), 124.5 (*C*-9), 119.9 (*C*-7, *C*-11), 59.9 (*C*-2), 46.0 (*C*-5), 30.3 (*C*-3), 24.1 (*C*-4).

IR: ν [cm⁻¹] = 3154, 3112, 3008, 2976, 2850, 2474, 1677, 1596, 1537, 1496, 1484, 1444, 1398, 1383, 1349, 1313, 1294, 1257, 1218, 1169, 1151, 1072, 1041, 942, 752, 729, 689.

5.14.2.4 (R)- und (S)-1-(1H-Benzo[d]imidazol-5-carbonyl)-N-phenylpyrrolidin-2-carboxamid
((R)- und (S)-**190**)



Methode: A1, Reaktionsdauer: 16 h, säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 19:1)

Ansatz: (R)- oder (S)-**192** 140 mg (0.62 mmol, 1.0 Äq.)

Benzimidazol-5-carbonsäure 100 mg (0.62 mmol, 1.0 Äq.)

TBTU 218 mg (0.68 mmol, 1.1 Äq.)

HOBt 83 mg (0.62 mmol, 1.0 Äq.)

DIPEA 0.31 mL (1.85 mmol, 3.0 Äq.)

DMF 5 mL

Ausbeute R: 56 mg (0.17 mmol, 27% d. Theorie), farbloser Feststoff

Ausbeute S: 83 mg (0.25 mmol, 40% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.50 (DCM/MeOH 19:1)

Smp R: 92 – 95 °C

Smp S: 92 – 95 °C

Drehwert R: $[\alpha]_{589}^{25} = +34$ (c = 4 $\frac{mg}{ml}$, Methanol)

Drehwert S: $[\alpha]_{589}^{25} = -34$ (c = 4 $\frac{mg}{ml}$, Methanol)

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.32 (s, 1H, H-2'), 7.82 (s, 1H, H-7'), 7.71 – 7.55 (m, 3H, H-7, H-11, H-5'), 7.42 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-4'), 7.38 – 7.15 (m, 2H, H-8, H-10), 7.04 (t, J = 7.4 Hz, 1H, H-9), 4.73 – 4.55 (m, 1H, H-2), 3.82 – 3.50 (m, 2H, H-5), 2.42 – 2.15 (m, 1H, H-3), 2.12 – 1.69 (m, 3H, H-3, H-4).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 171.2 (C-1), 169.4 (C-8'), 144.05 (C-2'), 139.7 (C-6), 136.5 (C-6'), 132.4 (7a'), 130.6 (3a'), 129.1 (C-8, C-10),

123.6 (C-9), 121.9 (C-4'), 119.7 (C-7, C-11), 112.3 (C-7'), 112.1 (C-5'), 61.4 (C-2), 50.8 (C-5), 30.2 (C-3), 25.6 (C-4).

IR: ν [cm⁻¹] = 3193, 3084, 2971, 1674, 1598, 1552, 1491, 1442, 1350, 1295, 1251, 1179, 751, 692.

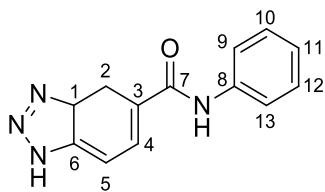
ESI-MS: m/z = 335.1 [M+H]⁺ (berechnet: [M] = 334.1)

Reinheit R: 98% (H₂O/ACN 80:20)

Reinheit S: 95% (H₂O/ACN 80:20)

5.14.3 Triazol

5.14.3.1 N-Phenylbenzo[d][1,2,3]triazol-5-carbonsäureamid (183)



Methode: A1, Reaktionsdauer: 2 d

Ansatz:	Benzo[d][1,2,3]triazol-5-carbonsäure	200 mg (1.23 mmol, 1.0 Äq.)
	Anilin	0.11 mL (1.23 mmol, 1.0 Äq.)
	TBTU	433 mg (1.35 mmol, 1.1 Äq.)
	HOBt	165 mg (1.23 mmol, 1.0 Äq.)
	DIPEA	0.83 mL (4.90 mmol, 4.0 Äq.)
	DMF	15 mL

Ausbeute: 228 mg (0.95 mmol, 77% d. Theorie), brauner Feststoff

R_f: 0.32 (CH/EE 1:9)

Smp: 262 – 264 °C (Lit.: 266 – 268 °C^[156])

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.64 (s, 1H, H-2), 8.04 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H-4), 7.99 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H-3), 7.87 – 7.74 (m, 2H, H-9, H-13), 7.37 (t, J = 7.8 Hz, 2H, H-10, H-12), 7.18 – 7.04 (m, 1H, H-11).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 165.2 (C-7), 139.2 (C-3), 139.1 (C-8), 136.4 (C-1), 131.7 (C-6), 128.6 (C-10, C-12), 125.6 (C-4), 125.5 (C-4), 123.7 (C-11), 120.5 (C-9, C-13), 116.0 (C-1), 113.9 (C-5).

IR: ν [cm⁻¹] = 3277, 3254, 3077, 3055, 2981, 2891, 2780, 2621, 1655, 1596, 1536, 1502, 1488, 1437, 1417, 1329, 1252, 1200, 996, 754, 728, 690.

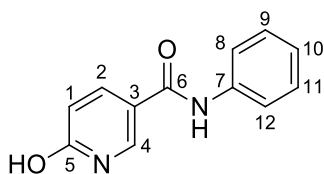
ESI-MS: m/z = 239.1 [M+H]⁺ (berechnet: [M] = 240.1)

Reinheit: 99% (H₂O/ACN 80:20)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[156]

5.14.42-Hydroxypyridin

5.14.4.1 2-Hydroxy-N-phenylpyridin-4-carbonsäureamid (**184**)



Methode: A1, Reaktionsdauer: 2 d

Ansatz:	2-Hydroxynicotinsäure	200 mg (1.44 mmol, 1.0 Äq.)
	Anilin	0.13 mL (1.44 mmol, 1.0 Äq.)
	TBTU	508 mg (1.58 mmol, 1.1 Äq.)
	HOBt	194 mg (1.44 mmol, 1.0 Äq.)
	DIPEA	0.98 mL (5.75 mmol, 4.0 Äq.)
	DMF	20 mL

Ausbeute: 158 mg (0.74 mmol, 51% d. Theorie), farbloser Feststoff

R_f: 0.36 (CH/EE 1:4)

Smp: 273 – 276 °C

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.24 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, *H*-4), 7.98 (dd, *J* = 9.7, 2.7 Hz, 1H, *H*-2), 7.71 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, *H*-8, *H*-12), 7.32 (t, *J* =

7.7 Hz, 2H, *H*-9, *H*-11), 7.07 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, *H*-10), 6.40 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, *H*-1).

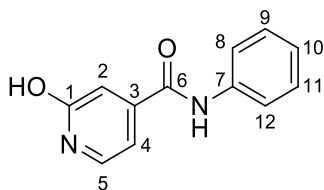
¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 163.1 (*C*-6), 162.8 (*C*-3), 139.8 (*C*-2), 139.6 (*C*-7), 138.6 (*C*-4), 129.0 (*C*-9, *C*-11), 123.9 (*C*-10), 120.7 (*C*-8, *H*-12), 119.6 (*C*-1), 113.1 (*C*-5).

IR: ν [cm⁻¹] = 3306, 3059, 3031, 2975, 2870, 1683, 1664, 1644, 1615, 1596, 1555, 1523, 1493, 1441, 1428, 1325, 1273, 1255, 1246, 1124, 896, 840, 759, 694.

ESI-MS: *m/z* = 215.1 [M+H]⁺ (berechnet: [M] = 214.1)

Reinheit: 99% (H₂O/ACN 80:20)

5.14.4.2 2-Hydroxy-N-phenylnicotinsäureamid (**185**)



Methode: A1, Reaktionsdauer: 2 d

Ansatz: 2-Hydroxypyridin-4-carbonsäure 200 mg (1.44 mmol, 1.0 Äq.)

Anilin 0.13 mL (1.44 mmol, 1.0 Äq.)

TBTU 508 mg (1.58 mmol, 1.1 Äq.)

HOBt 194 mg (1.44 mmol, 1.0 Äq.)

DIPEA 0.98 mL (5.75 mmol, 4.0 Äq.)

DMF 20 mL

Ausbeute: 233 mg (1.09 mmol, 76% d. Theorie, gelber Feststoff)

R_f: 0.24 (CH/EE 1:4)

Smp: 152 – 154 °C (Lit.: 153 – 155 °C^[157])

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.75 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, *H*-8, *H*-12), 7.51 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, *H*-5), 7.35 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, *H*-9, *H*-11), 7.13 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, *H*-10), 6.87 (s, 1H, *H*-2), 6.55 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, *H*-4).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 163.9 (*C*-5), 162.4 (*C*-3), 146.5 (*C*-1), 138.6 (*C*-7), 136.1 (*C*-5), 128.6 (*C*-9, *C*-11), 124.1 (*C*-10), 120.5 (*C*-8, *C*-12), 118.6 (*C*-2), 103.2 (*C*-4).

IR: ν [cm⁻¹] = 3349, 3053, 2946, 2831, 1650, 1603, 1530, 1498, 1475, 1454, 1440, 1331, 1254, 1230, 1002, 916, 875, 747, 682.

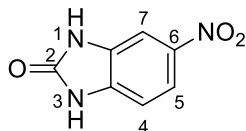
ESI-MS: *m/z* = 215.1 [M+H]⁺ (berechnet: [M] = 214.1)

Reinheit: 97 (H₂O/ACN 80:20)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[157]

5.14.52-Oxobenzimidazol

5.14.5.1 5-Nitro-1H-benzof[d]imidazol-2(3H)-on (**187**)



Nach einer Vorschrift von WYLIE *et al.*^[158] wurde 4-Nitrobenzol-1,2-diamin (500 mg, 3.26 mmol, 1.0 Äq.) zusammen mit Carbonyldiimidazol (795 mg, 4.90 mmol, 1.50 Äq.) in DMF unter Kühlung mit einem Eis-Wasser-Bad zusammen gegeben und anschließend bei Raumtemperatur für 16 h gerührt. Nach Zugabe von Wasser wurde **187** (552 mg, 3.08 mmol, 94% d. Theorie (Lit: 88%^[158]) als farbloser Feststoff durch Filtration erhalten.

R_f: 0.18 (CH/EE 1:1)

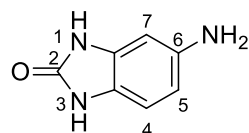
Smp: 308 – 310 °C (Lit.: 308 °C^[159])

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.92 (dd, *J* = 8.6, 2.3 Hz, 1H, *H*-5), 7.69 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, *H*-7), 7.08 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, *H*-4).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 155.9 (*C*-2), 141.7 (*C*-6), 136.1 (*C*-7a), 130.2 (*C*-3a), 118.2 (*C*-5), 108.5 (*C*-4), 104.1 (*C*-7).

IR: ν [cm^{-1}] = 3092, 3033, 1682, 1630, 1516, 1488, 1430, 1335, 1282, 1202, 1071, 1020, 944, 883, 865, 835, 827, 754, 733, 710.

5.14.5.2 5-Amino-1H-benzof[d]imidazole-2(3H)-on (**189**)



187 (500 mg, 2.79 mmol, 1.0 Äq) wurde in Ethanol (20 mL) gelöst und Palladium auf Aktivkohle (50 mg) hinzugegeben und für 3 h mit Wasserstoff (4.6 bar) versetzt. Anschließend wurde filtriert und **189** (342 mg, 2.29 mmol, 82% d. Theorie) als gelber Feststoff erhalten.

R_f: 0.08 (CH/EE 1:2)

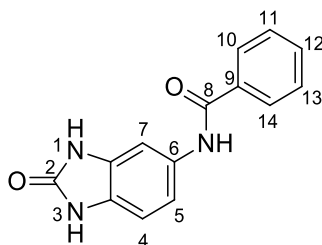
Smp: 246 – 248 °C

¹H-NMR: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 6.58 (d, J = 8.1 Hz, 1H, *H*-4), 6.24 (d, J = 2.0 Hz, 1H, *H*-7), 6.18 (dd, J = 8.1, 2.0 Hz, 1H, *H*-5).

¹³C-NMR: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 155.6 (*C*-2), 143.1 (*C*-7a), 130.6 (*C*-4a), 120.6 (*C*-6), 108.8 (*C*-4), 106.8 (*C*-5), 95.6 (*C*-7).

IR: ν [cm^{-1}] = 3402, 3361, 3300, 3109, 3004, 2803, 1701, 1638, 1512, 1481, 1402, 1372, 1331, 1267, 1207, 1171, 1027, 877, 793, 750, 713.

5.14.5.3 N-(2-Oxo-2,3-dihydro-1H-benzof[d]imidazol-5-yl)benzamid (**186**)



Methode: A2

Ansatz: **189** 100 mg (0.67 mmol, 1.0 Äq.)

Benzoylchlorid 0.09 mL (0.73 mmol, 1.1 Äq.)

	Triethylamin	0.10 mL (0.73 mmol, 1.1 Äq.)
	Dichlormethan	10 mL
Ausbeute:	57 mg (0.38 mmol, 57% d. Theorie), farbloser Feststoff	
R _f :	0.08 (CH/EE 1:3)	
Smp:	> 360 °C	
¹ H-NMR:	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ [ppm] = 7.94 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H, <i>H</i> -10, <i>H</i> -14), 7.68 – 7.41 (m, 4H, <i>H</i> -7, <i>H</i> -11 – <i>H</i> -13), 7.27 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H, <i>H</i> -5), 6.89 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H, <i>H</i> -4).	
¹³ C-NMR:	¹³ C NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ [ppm] = 165.2 (<i>C</i> -8), 155.6 (<i>C</i> -2), 135.2 (<i>C</i> -9), 132.7 (<i>C</i> -7a), 131.4 (<i>C</i> -12), 129.6 (<i>C</i> -3a), 128.4 (<i>C</i> -11, <i>C</i> -13), 127.6 (<i>C</i> -10, <i>C</i> -14), 126.0 (<i>C</i> -6), 113.2 (<i>C</i> -5), 108.2 (<i>C</i> -4), 101.9 (<i>C</i> -7).	
IR:	ν [cm ⁻¹] = 3311, 2999, 2837, 1739, 1637, 1580, 1542, 1506, 1473, 1369, 1337, 1282, 1254, 1206, 1027, 795, 766, 737, 715, 688, 670.	
ESI-MS:	m/z = 254.2 [M+H] ⁺ (berechnet: [M] = 253.1)	
Reinheit:	99% (H ₂ O/ACN 80:20)	

6 Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AS	Aminosäure
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
BMIM BF ₄	1-Butyl-3-methylimidazolium Tetrafluoroborat
Bz	Benzoyl
C	Capsid-Protein
CDI	Carbonyldiimidazol
CH	Cyclohexan
CYP	Cytochrom P450
DCC	<i>N, N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DIPEA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin
DMF	<i>N, N</i> -Dimethylformamid
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EE	Ethylacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>er</i>	Enantiomerenverhältnis
HOBt	1-Hydroxybenzo[<i>d</i>]triazol
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HTS	Hochdurchsatzscreening (<i>high throughput screening</i>)
LC-MS	Flüssigchromatographie mit angeschlossenem Massenspektrometer

M	Membran-Protein
MBP	Maltose-bindendes Protein
MD	Simulation der molekularen Dynamik (<i>molecular dynamics simulations</i>)
MST	<i>Microscale Thermophoresis</i>
Nos	4-Nitrophenylsulfonyl
prM	Vorläufer (<i>precursor</i>) Membran-Protein
PTSA	Thermaler Shift Assay (<i>protein thermal shift assay</i>)
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion (<i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
RF	Replikationsfabriken
RP	Umkehrphase (<i>reversed phase</i>)
SAR	Struktur-Wirkungsbeziehung (<i>structure-activity relationship</i>)
SPR	Oberflächenresonanzspektroskopie (<i>surface plasmon resonance</i>)
TBTU	(2-(1 <i>H</i> -Benzo[<i>d</i>]triazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat)
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Tos	Tosyl
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
WT	Wildtyp

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verbreitung des DENV. Länder und Regionen, welche rot eingefärbt sind, weisen Vorkommen des Virus auf.	2
Abbildung 2: Verbreitung des ZIKV.	5
Abbildung 3: Struktur und Aufbau von Flaviviren.	6
Abbildung 4: Schematische Darstellung des von der viralen RNA translatierten Polypeptides in der ER-Membran.	7
Abbildung 5: Vergleich der offenen (2FOM ^[53]) und geschlossenen (3UII ^[59]) Konformation der DENV NS2B/NS3-Protease. Grafik erstellt mit PyMOL. ^[38]	11
Abbildung 6: Modifikation des Peptidrückgrates von peptidischen kompetitiven Inhibitoren der DENV NS2B/NS3-Protease.	14
Abbildung 7: Die kompetitiven, nicht-peptidischen Inhibitoren 8 und 9	15
Abbildung 8: Flavonoide als nicht-kompetitive Inhibitoren der DENV NS2B/NS3-Protease.	15
Abbildung 9: Ellmanns Reagenz 13	16
Abbildung 10: Die Umgebung von Position 125 in Kristallstrukturen der DENV NS2B/NS3-Protease mit der Schleife um T120 links oben.	16
Abbildung 11: Der nicht-kompetitive Inhibitor der DENV2 NS2B/NS3-Protease 14 (DENV2 IC ₅₀ = 1.8 μM).	17
Abbildung 12: Der nicht-kompetitive Inhibitor der DENV NS2B/NS3-Protease 18	18
Abbildung 13: Existierende Wirkstoffe als nicht-kompetitive Inhibitoren der ZIKV NS2B/NS3-Protease:	19
Abbildung 14: Postulierte allosterische Tasche der DENV2 NS2B/NS3-Protease um N152.	20
Abbildung 15: Nicht-kompetitive Inhibitoren der DENV und ZIKV NS2B/NS3-Protease... ..	21
Abbildung 16: Nicht-kompetitive Inhibitoren der DENV NS2B/NS3-Protease. ^[86]	23
Abbildung 17: Boc-GRR-AMC als Substrat der NS2B/NS3-Protease, bestehend aus der Substratsequenz GRR und dem Fluorophor AMC.	24
Abbildung 18: ABZ-VKKRAAW-(3-NO ₂)Y-NH ₂ als intern fluoreszenzlöschendes Substrat der ZIKV NS2B/NS3-Protease.	24
Abbildung 19: Möglichkeiten der Auftragung zur Bestimmung von enzymkinetischen Konstanten.	26
Abbildung 20: IC ₅₀ -Kurve von 25 , erhalten durch die Messung der Enzymaktivität bei verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors.	27
Abbildung 21: Vergleich zwischen kompetitiver (A) und nicht-kompetitiver Inhibition (B). ..	28

Abbildung 22: Bestimmung von kompetitiver (A), beziehungsweise nicht-kompetitiver (B) Inhibition mittels Auftragung der Geschwindigkeit nach Lineweaver-Burk in Abhängigkeit von der Substratkonzentration mit (●) und ohne Inhibitor (○).	28
Abbildung 23: Cornish-Bowden-Plot zur Unterscheidung verschiedener Hemmungsarten. .	29
Abbildung 24: Übersicht der Ziele zur Modifikation der Leitstruktur 25	31
Abbildung 25: Die Lage der mutierten Aminosäuren in der allosterischen Tasche der DENV NS2B/NS3-Protease.	34
Abbildung 26: Maleimide für die Modifikation von Cystein-Mutanten der DENV2 NS2B/NS3-Protease.	34
Abbildung 27: Syntheseplan zur Darstellung von 31 über <i>N</i> -Maleimidglycin 32	35
Abbildung 28: Alternative Syntheseroute zu 31 , sodass das Maleimid erst im letzten Schritt gebildet wird.	36
Abbildung 29: Prozentuale Hemmung von verschiedenen Cysteinmutanten der DENV2 NS2B/NS3-Protease durch 32 und 31	38
Abbildung 30: Aktivität der DENV2 NS2B/NS3-Protease und verschiedener Cystein-Mutanten unter dem Einfluss von Maleimiden bei 20 μ M.	40
Abbildung 31: Vorhergesagte Bindeposen des kovalenten Docking von 32 (A) und 31 (B) an der Cystein-Mutante T118C.	41
Abbildung 32: Vorhergesagte Bindeposen des kovalenten Docking von 33 an den Cystein-Mutanten A164C (A) und T120C (B).	42
Abbildung 33: IC ₅₀ -Werte von 25 am Wildtyp und den verschiedenen Cystein-Mutanten, mit und ohne 33 und 34	43
Abbildung 34: IC ₅₀ -Werte von 25 an der ZIKV-Protease, bestimmt bei verschiedenen Substratkonzentrationen. D	45
Abbildung 35: Design der auf Prolin basierenden Inhibitoren.	47
Abbildung 36: Syntheseplan zum Aufbau von 45 ausgehend von der Kupplung des Benzothiazols 41 mit <i>N</i> -Boc Prolin aus.	48
Abbildung 37: Trennung der Enantiomere (<i>R</i>)- und (<i>S</i>)- 48 und (<i>R</i>)- und (<i>S</i>)- 53 auf einer chiralen Phase. Die Detektion erfolgte bei 254 nm.	52
Abbildung 38: Untersuchung der Stabilität von (<i>R</i>)- 48 unter verschiedenen Bedingungen...	54
Abbildung 39: Stabilität von (<i>R</i>)- 48 in dem Puffer des Assays. Aufgetragen sind die Signale der LC-MS bei 254 nm (<i>R</i>)- 48 relativ zu dem Zeitpunkt 0 h.	55
Abbildung 40: IC ₅₀ -Werte von (<i>R</i>)- 48 , bestimmt bei verschiedenen Substratkonzentrationen. Die Werte stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Doppelbestimmungen dar.	57

Abbildung 41: Docking der Inhibitoren mit Sulfonamid-Struktur.	60
Abbildung 42: Aminosäuren im Bereich der allosterischen Tasche der DENV2-Protease, welche sich von der ZIKV-Protease unterscheiden.	61
Abbildung 43: Viruslast von ZIKV in Vero-Zellen unter dem Einfluss verschiedener Inhibitoren.	64
Abbildung 44: Relative Viruslast von mit DENV2 infizierten Vero-Zellen unter dem Einfluss verschiedener Inhibitoren mit DMSO als Kontrolle.	65
Abbildung 45: Auftragung der Retentionszeiten der Prolin-basierten Inhibitoren und 25 gegen den berechneten SlogP zu dessen Validierung.	67
Abbildung 46: Visuelle Darstellung der LLE durch Auftragung des pIC ₅₀ gegen den SlogP. Die eingezeichneten Linien stellen die Grenzen der LLE dar.	68
Abbildung 47: Fragmentierung von 48 , 52 und m/z = 478.2 zur Aufklärung der Struktur von 64 durch den Vergleich der verschiedenen Fragmentierungsmuster.	73
Abbildung 48: Synthesepfad von (S)- 64 durch Reduktion der Carbonsäure von (S)- 69	74
Abbildung 49: Synthese von (S)- 64 über das Halogenalkan (S)- 70	76
Abbildung 50: Metabolisierung von (R)- und (S)- 52 durch Demethylierung der Methoxygruppen und Hydroxylierung der Tosylgruppe.	78
Abbildung 51: Bestimmung der Zellpermeabilität von (R)- 48 und (R)- 52 . Angegeben ist das Verhältnis der Signalflächen (LC-MS) von Donor- und Akzeptor-Lösung in Bezug auf die Kontrollversuche ohne Caco-2-Zellen.	79
Abbildung 52: Design von 76 als Hybrid aus den Strukturen von (R)- und (S)- 48 und 9	81
Abbildung 53: Syntheschema zur Darstellung von 76 über eine Nitrogruppe als Schutzgruppe der Aminofunktion von 79	82
Abbildung 54: Cornish-Bowden-Plot der Hemmung der ZIKV-Protease durch 76 . ^[93]	85
Abbildung 55: Von [REDACTED] synthetisierte und im Enzymassay getestete Inhibitoren basierend auf Glycin 85 und (R)- und (S)-Pipicolinsäure (R)- und (S)- 86 . ^[117]	87
Abbildung 56: Variation von cyclischen nicht-proteinogenen Aminosäuren ausgehend von 86	88
Abbildung 57: Syntheschema zur Synthese der Inhibitoren mit verschiedenen Aminosäuren.	88
Abbildung 58: Syntheschema zu den Aminosäuren-basierten Inhibitoren mit Amidgruppe.	92
Abbildung 59: Syntheschema für die Darstellung von 129 mit einer 2-Azanorbornan-1-carbonsäure als nicht-proteinogene Aminosäure.	95

Abbildung 60: <i>In situ</i> Generierung des Imins 134 und Ausbildung des aktiven Dienophils. ^[119]	96
Abbildung 61: Entstehung vier verschiedener Isomere von 138 durch Diels-Alder-Reaktion von 134 mit Cyclopentadien.	96
Abbildung 62: Beeinflussung der Stereoselektivität der Diels-Alder-Reaktion durch das chirale Zentrum von 134	97
Abbildung 63: Per Docking vorhergesagte Bindeposen von (<i>R</i>)- und (<i>S</i>)- 86 (A) und 114 (B) in der allosterischen Tasche der DENV2 NS2B/NS3-Protease (PDB ID: 2FOM ^[53]).	102
Abbildung 64: Per Docking vorhergesagte Bindepose (A) und schematische Darstellung der Interaktionen (B) von 85 in der allosterischen Tasche der DENV2 NS2B/NS3-Protease (PDB ID: 2FOM ^[53]).	105
Abbildung 65: Diketopiperazine als neue Strukturen und potentielle Inhibitoren der DENV und ZIKV NS2B/NS3-Protease. ^[121]	107
Abbildung 66: Potentielle Inhibitoren basierend auf Diketopiperazin 144 und Diketodiazepin 145	107
Abbildung 67: 146 als Zielstruktur, um die Möglichkeit von Benzo[<i>e</i>][1,4]diazepinen als neue Grundstruktur für Inhibitoren zu untersuchen.	108
Abbildung 68: Syntheschema zum Aufbau von 144 über das Dipeptid 149	109
Abbildung 69: Syntheschema zur Darstellung von 155 über die Amidbildung zwischen Aspartat und Benzothiazol 41 , vor dem Anknüpfen des Glycins.	110
Abbildung 70: Syntheschema zur Darstellung von 158 über eine thermische Amidbildung aus 157	113
Abbildung 71: Bildung des 6-Ringes 160 anstelle des 7-Ringes 158 durch Erhitzen von 157	114
Abbildung 72: Syntheschema zur Synthese von 158 über einen Ringschluss durch Kupplungsreagenzien ausgehend von 161	114
Abbildung 73: Aufbau von 146 über den Ringschluss von 162 zu 163	116
Abbildung 74: (<i>S</i>)- 167 bestehend aus einer 6-Nitrobenzo[<i>d</i>]thiazol-Struktur und die Zielstruktur (<i>S</i>)- 168 mit einer 5-Nitrobenzimidazol-Struktur. ^[99]	119
Abbildung 75: Docking von (<i>S</i>)- 168 und (<i>S</i>)- 167	121
Abbildung 76: Verschiedene Substitutionen am Benzo[<i>d</i>]thiazol, welche untersucht worden waren.	123
Abbildung 77: 172 und 173 als Referenzmoleküle für den Austausch der Catecholgruppe.	123
Abbildung 78: Austausch von Catechol gegen verschiedene Bioisostere.	124

Abbildung 79: Beobachtete Verunreinigung des Rohproduktes von 174	124
Abbildung 80: Mechanismus der Entschützung von Catecholgruppen durch BBr_3 . ^[130]	125
Abbildung 81: Gleichgewicht der beiden Tautomere von 185 : Lactim (links) und Lactam (rechts).....	127
Abbildung 82: Die Signale des Pyridinringes von 184 im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum.	128
Abbildung 83: Der neue submikromolare Inhibitor der ZIKV NS2B/NS3-Protease (<i>R</i>)- 50 .133	
Abbildung 84: Metabolismus von (<i>R</i>)- und (<i>S</i>)- 52 durch Rattenlebermikrosomen.....	135
Abbildung 85: 76 als Hybrid aus den Strukturen des kompetitiven Inhibitors 9 und den nicht-kompetitiven (<i>R</i>)- und (<i>S</i>)- 48 zeigte eine nicht-kompetitive Hemmung.....	136
Abbildung 86: Übersicht über den Austausch von Prolin zu proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren.	136
Abbildung 87: Vergleich zwischen dem Benzo[<i>d</i>]thiazol (<i>S</i>)- 167 und dem Benzo[<i>d</i>]imidazol (<i>S</i>)- 168	137
Abbildung 88: Fragment-basierter Ansatz zum Austausch der Catechol-Struktur.....	137
Abbildung 89: Struktur von (<i>R</i>)- und (<i>S</i>)- 190	137
Abbildung 90: Versuchsaufbau zur Bestimmung der Zellpermeabilität.....	145

8 Quellenverzeichnis

- [1] P. Simmonds, P. Becher, J. Bukh, E. A. Gould, G. Meyers, T. Monath, S. Muerhoff, A. Pletnev, R. Rico-Hesse, D. B. Smith et al., *J. Gen. Virol.* **2017**, 98, 2.
- [2] E. A. Gould, T. Solomon, *Lancet* **2008**, 371, 500.
- [3] S. Bhatt, P. W. Gething, O. J. Brady, J. P. Messina, A. W. Farlow, C. L. Moyes, J. M. Drake, J. S. Brownstein, A. G. Hoen, O. Sankoh et al., *Nature* **2013**, 496, 504.
- [4] M. G. Guzman, S. B. Halstead, H. Artsob, P. Buchy, J. Farrar, D. J. Gubler, E. Hunsperger, A. Kroeger, H. S. Margolis, E. Martínez et al., *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, 8, 7.
- [5] J. L. Kyle, E. Harris, *Annu. Rev. Microbiol.* **2008**, 62, 71.
- [6] M. S. Mustafa, V. Rasotgi, S. Jain, V. Gupta, *Med. J. Armed Forces India* **2015**, 71, 67.
- [7] M. Recker, K. B. Blyuss, C. P. Simmons, T. T. Hien, B. Wills, J. Farrar, S. Gupta, *Roy. Soc. B. - Biol. Sci.* **2009**, 276, 2541.
- [8] D. J. Gubler, *Clin. Microbiol. Rev.* **1998**, 11, 480.
- [9] M. Kakkar, *BMJ* **2012**, 345, e8574.
- [10] J. D. Stanaway, D. S. Shepard, E. A. Undurraga, Y. A. Halasa, L. E. Coffeng, O. J. Brady, S. I. Hay, N. Bedi, I. M. Bensenor, C. A. Castañeda-Orjuela et al., *Lancet Infect. Dis.* **2016**, 16, 712.
- [11] T. P. Endy, K. B. Anderson, A. Nisalak, I.-K. Yoon, S. Green, A. L. Rothman, S. J. Thomas, R. G. Jarman, D. H. Libraty, R. V. Gibbons, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2011**, 5, e975.
- [12] J. P. Messina, O. J. Brady, N. Golding, M. U. G. Kraemer, G. R. W. Wint, S. E. Ray, D. M. Pigott, F. M. Shearer, K. Johnson, L. Earl et al., *Nat. Microbiol.* **2019**.
- [13] J. Schmidt-Chanasit, M. Haditsch, I. Schoneberg, S. Gunther, K. Stark, C. Frank, *Eurosurveillance* **2010**, 15.
- [14] Doris Altmann, Mona Askar, Hermann Claus, Michaela Diercke, Inge Mücke, Juliane Seidel, *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2017*, Robert Koch-Institut, Berlin, **2018**.

- [15] a) B. Pluskota, A. Jöst, X. Augsten, L. Stelzner, I. Ferstl, N. Becker, *Parasitol. Res.* **2016**, *115*, 3245; b) N. Becker, M. Geier, C. Balczun, U. Bradersen, K. Huber, E. Kiel, A. Krüger, R. Lühken, C. Orendt, A. Plenge-Bönig et al., *Parasitol. Res.* **2013**, *112*, 1787.
- [16] M. U. G. Kraemer, R. C. Reiner, O. J. Brady, J. P. Messina, M. Gilbert, D. M. Pigott, D. Yi, K. Johnson, L. Earl, L. B. Marczak et al., *Nat. Microbiol.* **2019**, *4*, 854.
- [17] F. Baldacchino, B. Caputo, F. Chandre, A. Drago, A. Della Torre, F. Montarsi, A. Rizzoli, *Pest Manag. Sci.* **2015**, *71*, 1471.
- [18] S. Bandyopadhyay, L. C. S. Lum, A. Kroeger, *Trop. Med. Int. Health* **2006**, *11*, 1238.
- [19] F. J. Carod-Artal, O. Wichmann, J. Farrar, J. Gascón, *Lancet Neurol.* **2013**, *12*, 906.
- [20] J. G. Rigau-Pérez, G. G. Clark, D. J. Gubler, P. Reiter, E. J. Sanders, A. V. Vorndam, *Lancet* **1998**, *352*, 971.
- [21] L. Villar, G. H. Dayan, J. L. Arredondo-García, D. M. Rivera, R. Cunha, C. Deseda, H. Reynales, M. S. Costa, J. O. Morales-Ramírez, G. Carrasquilla et al., *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 113.
- [22] S. B. Halstead, *Vaccine* **2017**, 6355.
- [23] G.W.A. Dick, S.F. Kitchen, A.J. Haddow, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1952**, *46*, 509.
- [24] M. R. Duffy, T.-H. Chen, W. T. Hancock, A. M. Powers, J. L. Kool, R. S. Lanciotti, M. Pretrick, M. Marfel, S. Holzbauer, C. Dubray et al., *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 2536.
- [25] T. B. Casale, M. N. Teng, J. P. Morano, T. Unnasch, C. J. Lockwood, *J. Allergy Clin. Immunol.* **2018**, *141*, 482.
- [26] a) Centers for Disease Control and Prevention, "2017 Case Counts in the US", zu finden unter <https://www.cdc.gov/zika/reporting/2017-case-counts.html>, **2019**. 24.04.2019. Zuletzt geprüft am: 11.06.2019 17:22; b) R. Mittal, D. Nguyen, L. H. Debs, A. P. Patel, G. Liu, V. M. Jhaveri, S.-I. S Kay, J. Mittal, E. S. Bandstra, R. T. Younis et al., *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 486.
- [27] a) E. D'Ortenzio, S. Matheron, Y. Yazdanpanah, X. de Lamballerie, B. Hubert, G. Piorkowski, M. Maquart, D. Descamps, F. Damond, I. Leparac-Goffart, *N. Engl. J. Med.*

- 2016**, 374, 2195; b) D. T. Deckard, W. M. Chung, J. T. Brooks, J. C. Smith, S. Woldai, M. Hennessey, N. Kwit, P. Mead, *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2016**, 65, 372; c) D. Musso, C. Roche, T.-X. Nhan, E. Robin, A. Teissier, V.-M. Cao-Lormeau, *J. Clin. Virol.* **2015**, 68, 53; d) M. Besnard, S. Lastère, A. Teissier, V. Cao-Lormeau, D. Musso, *Eurosurveillance* **2014**, 19, 20751.
- [28] R. Huits, B. de Smet, K. K. Ariën, M. van Esbroeck, E. Bottieau, L. Cnops, *Bull. World Health Organ.* **2017**, 95, 802.
- [29] M. H. Collins, S. W. Metz, *Clin. Ther.* **2017**, 39, 1519.
- [30] D. Musso, H. Bossin, H. P. Mallet, M. Besnard, J. Broult, L. Baudouin, J. E. Levi, E. C. Sabino, F. Ghawche, M. C. Lanteri et al., *Lancet Infect. Dis.* **2018**, 18, 172-182.
- [31] T. Dos Santos, A. Rodriguez, M. Almiron, A. Sanhueza, P. Ramon, W. K. de Oliveira, G. E. Coelho, R. Badaró, J. Cortez, M. Ospina et al., *N. Engl. J. Med.* **2016**, 375, 1598.
- [32] T. V. B. de Araújo, R. A. d. A. Ximenes, D. d. B. Miranda-Filho, W. V. Souza, U. R. Montarroyos, A. P. L. de Melo, S. Valongueiro, M. F. P. M. de Albuquerque, C. Braga, S. P. B. Filho et al., *Lancet Infect. Dis.* **2018**, 18, 328.
- [33] J. Mlakar, M. Korva, N. Tul, M. Popović, M. Poljšak-Prijatelj, J. Mraz, M. Kolenc, K. Resman Rus, T. Vesnaver Vipotnik, V. Fabjan Vodusek et al., *N. Engl. J. Med.* **2016**, 374, 951.
- [34] L. Yuan, X.-Y. Huang, Z.-Y. Liu, F. Zhang, X.-L. Zhu, J.-Y. Yu, X. Ji, Y.-P. Xu, G. Li, C. Li et al., *Science (New York, N.Y.)* **2017**, 358, 933.
- [35] a) A. P. S. Rathore, W. A. A. Saron, T. Lim, N. Jahan, A. L. St John, *Sci. Adv.* **2019**, 5, 3208; b) D. F. Robbiani, P. C. Olsen, F. Costa, Q. Wang, T. Y. Oliveira, N. Nery, A. Aromolaran, M. S. do Rosário, G. A. Sacramento, J. S. Cruz et al., *J. Exp. Med.* **2019**.
- [36] D. Sirohi, Z. Chen, L. Sun, T. Klose, T. C. Pierson, M. G. Rossmann, R. J. Kuhn, *Science (New York, N.Y.)* **2016**, 352, 467.
- [37] ViralZone, "Flavivirus Virion Creative Commons Lizenz CC BY-NC-ND 4.0", zu finden unter https://viralzone.expasy.org/resources/Flaviviridae_virion.png. Zuletzt geprüft am: 13.06.2019, 16:45.
- [38] L. L.C. Schrödinger, *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8*, **2015**.

- [39] a) J. M. Smit, B. Moesker, I. Rodenhuis-Zybert, J. Wilschut, *Viruses* **2011**, *3*, 160; b) F. X. Heinz, S. L. Allison, *Adv. Virus Res.* **2003**, *59*, 63.
- [40] C. Nitsche, S. Holloway, T. Schirmeister, C. D. Klein, *Chem. Rev.* **2014**, 11348.
- [41] A. T. Bäck, A. Lundkvist, *Infect. Ecol. Epidemiol.* **2013**, *3*.
- [42] a) F. M. Kassim, M. N. Izati, T. A. R. TgRogayah, Y. M. Apandi, Z. Saat, *Se. Asian. J. Trop. Med.* **2011**, *42*, 562; b) B. D. Lindenbach, C. M. Rice, *J. Virol.* **1997**, *71*, 9608.
- [43] X. Xie, S. Gayen, C. Kang, Z. Yuan, P.-Y. Shi, *J. Virol.* **2013**, *87*, 4609.
- [44] F. Preugschat, C. W. Yao, J. H. Strauss, *J. Virol.* **1990**, *64*, 4364.
- [45] F. von Hammerstein, L. M. Lauth, S. Hammerschmidt, A. Wagner, T. Schirmeister, U. A. Hellmich, *FEBS Lett.* **2019**, 2204.
- [46] C. G. Patkar, R. J. Kuhn, *J. Virol.* **2008**, *82*, 3342.
- [47] a) P. Warrener, J. K. Tamura, M. S. Collett, *J. Virol.* **1993**, *67*, 989; b) D. Luo, T. Xu, C. Hunke, G. Grüber, S. G. Vasudevan, J. Lescar, *J. Virol.* **2008**, *82*, 173.
- [48] S. Welsch, S. Miller, I. Romero-Brey, A. Merz, C. K. E. Bleck, P. Walther, S. D. Fuller, C. Antony, J. Krijnse-Locker, R. Bartenschlager, *Cell Host Microbe* **2009**, *5*, 365.
- [49] a) S. Miller, S. Kastner, J. Krijnse-Locker, S. Bühler, R. Bartenschlager, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 8873; b) S. Miller, S. Sparacio, R. Bartenschlager, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 8854.
- [50] H. Dong, D. C. Chang, M. H. C. Hua, S. P. Lim, Y. H. Chionh, F. Hia, Y. H. Lee, P. Kukkaro, S.-M. Lok, P. C. Dedon et al., *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, 1002642.
- [51] M. Ackermann, R. Padmanabhan, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 39926.
- [52] M. A. M. Behnam, C. Nitsche, V. Boldescu, C. D. Klein, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 5622.
- [53] P. Erbel, N. Schiering, A. D'Arcy, M. Renatus, M. Kroemer, S. P. Lim, Z. Yin, T. H. Keller, S. G. Vasudevan, U. Hommel, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 372.
- [54] J. Lei, G. Hansen, C. Nitsche, C. D. Klein, L. Zhang, R. Hilgenfeld, *Science* **2016**, 353, 503.
- [55] N. D. Rawlings, *Nucleic Acids Res* **2004**, *32*, 160.

- [56] J. Ren, H. Lee, A. Kotak, M. E. Johnson, *Proteins* **2019**, 1.
- [57] J. Li, S. P. Lim, D. Beer, V. Patel, D. Wen, C. Tumanut, D. C. Tully, J. A. Williams, J. Jiricek, J. P. Priestle et al., *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 28766.
- [58] M. E. Hill, A. Kumar, J. A. Wells, T. C. Hobman, O. Julien, J. A. Hardy, *ACS Chem. Biol.* **2018**, 13, 2398.
- [59] C. G. Noble, C. C. Seh, A. T. Chao, P. Y. Shi, *J. Virol.* **2011**, 86, 438.
- [60] Y. Yao, T. Huo, Y.-L. Lin, S. Nie, F. Wu, Y. Hua, J. Wu, A. R. Kneubehl, M. B. Vogt, R. Rico-Hesse et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, 141, 6832.
- [61] Z. Zhang, Y. Li, Y. R. Loh, W. W. Phoo, A. W. Hung, C. Kang, D. Luo, *Science (New York, N.Y.)* **2016**, 354, 1597.
- [62] X. Chen, K. Yang, C. Wu, C. Chen, C. Hu, O. Buzovetsky, Z. Wang, X. Ji, Y. Xiong, H. Yang, *Cell Res.* **2016**, 26, 1260.
- [63] M. E. Hill, M. Yildiz, J. A. Hardy, *Biochemistry* **2018**, 58, 776.
- [64] L. de La Cruz, T. H. D. Nguyen, K. Ozawa, J. Shin, B. Graham, T. Huber, G. Otting, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 19205.
- [65] M. C. Mahawaththa, B. J. G. Pearce, B. Graham, C. D. Klein, C. Nitsche, G. Otting, *Antiviral Res.* **2017**, 142, 141.
- [66] A. Roy, L. Lim, S. Srivastava, Y. Lu, J. Song, *PLoS ONE* **2017**, 12, 0180632.
- [67] A. C. Gibbs, R. Steele, G. Liu, B. A. Tounge, G. Montelione, *Biochemistry* **2018**, 57, 1591.
- [68] C. Nitsche, L. Zhang, L. F. Weigel, J. Schilz, D. Graf, R. Bartenschlager, R. Hilgenfeld, C. D. Klein, *J. Med. Chem.* **2017**, 60, 511.
- [69] A. K. M. H. Jakob, T. R. Sundermann, C. D. Klein, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, 29, 1913.
- [70] T. R. Sundermann, C. V. Benzin, T. Dražić, C. D. Klein, *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 176, 187.
- [71] T. Knehans, A. Schüller, D. N. Doan, K. Nacro, J. Hill, P. Güntert, M. S. Madhusudhan, T. Weil, S. G. Vasudevan, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2011**, 25, 263.

- [72] H. Lee, J. Ren, S. Nocadello, A. J. Rice, I. Ojeda, S. Light, G. Minasov, J. Vargas, D. Nagarathnam, W. F. Anderson et al., *Antiviral Res.* **2017**, *139*, 49.
- [73] T. S. Kiat, R. Pippen, R. Yusof, H. Ibrahim, N. Khalid, N. A. Rahman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3337.
- [74] R. Othman, T. S. Kiat, N. Khalid, R. Yusof, E. I. Newhouse, J. S. Newhouse, M. Alam, N. A. Rahman, *J. Chem. Inf. Model.* **2008**, *48*, 1582.
- [75] de Sousa, L. R. F., H. Wu, L. Nebo, J. B. Fernandes, da Silva, Maria Fátima das Graças Fernandes, W. Kiefer, M. Kanitz, J. Bodem, W. E. Diederich, T. Schirmeister et al., *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 466.
- [76] M. Yildiz, S. Ghosh, J. A. Bell, W. Sherman, J. A. Hardy, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 2744.
- [77] M. Brecher, Z. Li, B. Liu, J. Zhang, C. A. Koetzner, A. Alifarag, S. A. Jones, Q. Lin, L. D. Kramer, H. Li, *PLoS Pathog.* **2017**, *13*, e1006411.
- [78] Z. Li, M. Brecher, Y.-Q. Deng, J. Zhang, S. Sakamuru, B. Liu, R. Huang, C. A. Koetzner, C. A. Allen, S. A. Jones et al., *Cell Res.* **2017**, *27*, 1046.
- [79] S. Pambudi, N. Kawashita, S. Phanthanawiboon, M. D. Omokoko, P. Masrinoul, A. Yamashita, K. Limkittikul, T. Yasunaga, T. Takagi, K. Ikuta et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *440*, 393.
- [80] K. Wichapong, S. Pianwanit, W. Sippl, S. Kokpol, *J. Mol. Recognit.* **2010**, *23*, 283.
- [81] A. Mukhametov, E. I. Newhouse, N. A. Aziz, J. A. Saito, M. Alam, *J. Mol. Graph. Model.* **2014**, *52*, 103.
- [82] Rhys Grinter, "Questionable Ligand Density: 6MO0, 6MO1, 6MO2", zu finden unter <https://www.mail-archive.com/ccp4bb@jiscmail.ac.uk/msg47072.html>, **2019**.
19.07.2019 6:22:41. Zuletzt geprüft am: 20.08.2019, 08:59.
- [83] Todd Jason Green, "Questionable Ligand Density: 6MO0, 6MO1, 6MO2", zu finden unter <https://www.mail-archive.com/ccp4bb@jiscmail.ac.uk/msg47086.html>, **2019**.
29.07.2019 16:06. Zuletzt geprüft am: 22.08.2019 09:09.

- [84] a) W. W. Phoo, Z. Zhang, M. Wirawan, E. C. J. Chen, C. B. Liang Alvin, J. Kouretova, T. Steinmetzer, D. Luo, *Antiviral Res.* **2018**, *160*, 17; b) E. Piccirillo, B. Merget, C. A. Sotriffer, A. T. do Amaral, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2016**, *30*, 251.
- [85] C. Nitsche, T. Passioura, P. Varava, M. C. Mahawaththa, M. M. Leuthold, C. D. Klein, H. Suga, G. Otting, *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 168.
- [86] H. Wu, S. Bock, M. Snitko, T. Berger, T. Weidner, S. Holloway, M. Kanitz, W. E. Diederich, H. Steuber, C. Walter et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 1100.
- [87] C. Steuer, K. H. Heinonen, L. Kattner, C. D. Klein, *J. Biomol. Screen.* **2009**, *14*, 1102.
- [88] N. Gruba, J. I. R. Martinez, R. Grzywa, M. Wysocka, M. Skoreński, A. Dabrowska, M. Łęcka, P. Suder, M. Sieńczyk, K. Pyrc et al., *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 1025.
- [89] M. M.L. Michaelis L., *Biochem. Z.* **1913**, 333.
- [90] H. Lineweaver, D. Burk, *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, *56*, 658.
- [91] C. Yung-Chi, W. H. Prusoff, *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099.
- [92] M. Dixon, *Biochem. J.* **1953**, *55*, 170.
- [93] A. Cornish-Bowden, *Biochem. J.* **1974**, *137*, 143.
- [94] N. J. Baumhover, K. Anderson, C. A. Fernandez, K. G. Rice, *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 74.
- [95] Chemical Computing Group ULC, *Molecular Operating Environment (MOE) 2019.1001*, 1010 Sheerbroke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada H3A 2R7, **2019**.
- [96] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927.
- [97] Keisuke Kurita, *Chem. Ind.* **1974**, 345.
- [98] Robert C. Weast, *Handbook of Chemistry and Physics*, 54. Aufl., CRC Press, Cleveland, Ohio, USA, **1973**.
- [99] Ulrike Göppel, *SAR-Studie an Inhibitoren der DENV- und ZIKV Protease mit Prolyl-Sulfonyl-Aminobenzothiazol-Struktur. Masterarbeit im Studiengang Biomedizinische Chemie*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Mainz, **2018**.
- [100] L. Horner, E. Geyer, *Chem. Ber.* **1965**, *98*, 2016.

- [101] I. Vicenti, A. Boccuto, A. Giannini, F. Dragoni, F. Saladini, M. Zazzi, *Virus Res.* **2018**, *244*, 64.
- [102] M. Cortese, S. Goellner, E. G. Acosta, C. J. Neufeldt, O. Oleksiuk, M. Lampe, U. Haselmann, C. Funaya, N. Schieber, P. Ronchi et al., *Cell Rep.* **2017**, *18*, 2113.
- [103] P. D. Leeson, B. Springthorpe, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 881.
- [104] S. A. Wildman, G. M. Crippen, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1999**, *39*, 868.
- [105] M. P. Gleeson, A. Hersey, D. Montanari, J. Overington, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 197.
- [106] J. D. Hughes, J. Blagg, D. A. Price, S. Bailey, G. A. Decrescenzo, R. V. Devraj, E. Ellsworth, Y. M. Fobian, M. E. Gibbs, R. W. Gilles et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4872.
- [107] E. Perola, *Journal of medicinal chemistry* **2010**, *53*, 2986.
- [108] A. Tarcsay, K. Nyíri, G. M. Keseru, *Journal of medicinal chemistry* **2012**, *55*, 1252.
- [109] M. D. Shultz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 5980.
- [110] a) J. Hukkanen, A. Lassila, K. Päivärinta, S. Valanne, S. Sarpo, J. Hakkola, O. Pelkonen, H. Raunio, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2000**, *22*, 360; b) Y. Ye, J. Zhu, Q. Ai, C. Wang, M. Liao, H. Fan, *J. Proteome Res.* **2019**, *18*, 1623.
- [111] N. Chauret, A. Gauthier, D. A. Nicoll-Griffith, *Drug Metab. Dispos.* **1998**, *26*, 1.
- [112] W. F. Busby, J. M. Ackermann, C. L. Crespi, *Drug Metab. Dispos.* **1999**, *27*, 246.
- [113] L. Di, E. H. Kerns, Y. Hong, T. A. Kleintop, O. J. McConnell, D. M. Huryn, *J. Biomol. Screen.* **2003**, *8*, 453.
- [114] A. Rieutord, I. Stupans, G. M. Shenfield, A. S. Gross, *Xenobiotica* **2008**, *25*, 1345.
- [115] S. Yamazaki, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 2129.
- [116] M. Zhao, J. Li, Z. Song, R. Desmond, D. M. Tschaen, E. J.J. Grabowski, P. J. Reider, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5323.
- [117] Jonas Busold, *Design und Synthese neuer INhibitoren der NS2B/NS4-Protease des Zika-Virus durch Austausch von Prolin*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Mainz, **2018**.

- [118] M. Node, K. Nishide, K. Fuji, E. Fujita, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 4275.
- [119] L. Stella, H. Abraham, J. Feneau-Dupont, B. Tinant, J. P. Declercq, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 2603.
- [120] V. I. Tararov, R. Kadyrov, Z. Kadyrova, N. Dubrovina, A. Börner, *Tetrahedron Asymmetry* **2002**, *13*, 25.
- [121] Tobias Ott, *Zyklische Peptide als Inhibitoren flaviviraler Proteasen. Masterarbeit im Studiengang Biomedizinische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Mainz, 2019.*
- [122] Axel R. Hentsch, *CADD - Virtuelle chemische Synthese und virtuelles Screening. Modulbericht Forschungsmodul, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Mainz, 2018.*
- [123] M. Jiang, Y. Jin, H. Yang, H. Fu, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 26161.
- [124] J. E. Baldwin, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1976**, 734.
- [125] F. J. J. Bihel, H. Justiniano, M. Schmitt, M. Hellal, M. A. Ibrahim, C. Lugnier, J.-J. Bourguignon, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 6567.
- [126] T. Asano, T. Yoshikawa, T. Usui, H. Yamamoto, Y. Yamamoto, Y. Uehara, H. Nakamura, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 3529.
- [127] Benedikt Millies, *Synthese und Testung von Dengue-Virus-Protease Inhibitoren durch "Scaffold Hopping". Masterarbeit im Studiengang Biomedizinische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Mainz, 2016.*
- [128] D. I. Ugwu, U. C. Okoro, P. O. Ukoha, S. Okafor, A. Ibezim, N. M. Kumar, *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *135*, 349.
- [129] N. A. Meanwell, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 2529.
- [130] J.F.W. McOmie, M. L. Watts, D. E. West, *Tetrahedron* **1968**, *24*, 2289.
- [131] J. A. González-Vera, R. A. Medina, M. Martín-Fontecha, A. Gonzalez, T. de La Fuente, H. Vázquez-Villa, J. García-Cárceles, J. Botta, P. J. McCormick, B. Benhamú et al., *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 41293.
- [132] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics* **2010**, *29*, 2176.

- [133] S. Ludewig, M. Kossner, M. Schiller, K. Baumann, T. Schirmeister, *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 368.
- [134] D. A. Case, I. Y. Ben-Shalom, S. R. Brozell, D. S. Cerutti, T. E. Cheatham, V. W. D. Cruzeiro, T. A. Darden, R. E. Duke, D. Ghoreishi, M. K. Gilson, H. Gohlke, A. W. Goetz, D. Greene, R. Harris, N. Homeyer, S. Izadi, A. Kovalenko, T. Kurtzman, T. S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, J. Liu, T. Luchko, R. Luo, D. J. Mermelstein, K. M. Merz, Y. Miao, G. Monard, C. Nguyen, H. Nguyen, I. Omelyan, A. Onufriev, F. Pan, R. Qi, D. R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, S. Schott-Verdugo, J. Shen, C. L. Simmerling, J. Smith, R. Salomon-Ferrer, J. Swails, R. C. Walker, J. Wang, H. Wei, R. M. Wolf, X. Wu, L. Xiao, D. M. York and P. A. Kollman, *Amber 2018*, University of California, San Francisco.
- [135] T. A. Halgren, *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 490.
- [136] P. Labute, *J. Comput. Chem.* **2008**, *29*, 1693.
- [137] G. Trapani, M. Franco, A. Latrofa, A. Reho, G. Liso, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *14*, 209.
- [138] S. Smiles, D. C. Harrison, *J. Chem. Soc., Trans.* **1922**, *121*, 2022.
- [139] M. Feigel, G. Lugert, J. Manero, M. Bremer, *Z. Naturforsch. B* **1989**, *44*, 1109.
- [140] D. A. Heyman, *J. Heterocycl. Chem.* **1978**, *15*, 1131.
- [141] K. M. Bromfield, J. Cianci, P. J. Duggan, *Molecules* **2004**, *9*, 427.
- [142] J.-W. Shen, D.-G. Qin, H.-W. Zhang, Z.-J. Yao, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 7479.
- [143] A. Ricouart, J. C. Gesquiere, A. Tartar, C. Sergheraert, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 73.
- [144] K. R. Barnes, A. Kutikov, S. J. Lippard, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 557.
- [145] A. Catalano, A. Carocci, F. Corbo, C. Franchini, M. Muraglia, A. Scilimati, M. de Bellis, A. de Luca, D. C. Camerino, M. S. Sinicropi et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 2535.
- [146] M. Perez, M. Lamothe, C. Maraval, E. Mirabel, C. Loubat, B. Planty, C. Horn, J. Michaux, S. Marrot, R. Letienne et al., *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5826.
- [147] A. M. Crider, T. T. Tita, J. D. Wood, C. N. Hinko, *J. Pharm. Sci.* **1982**, *71*, 1214.

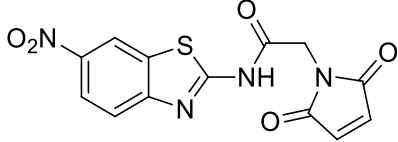
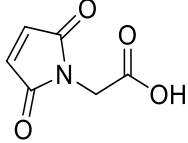
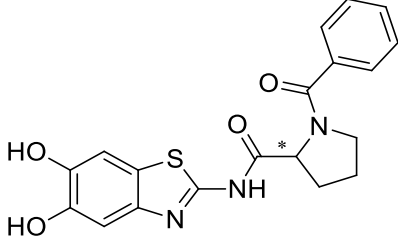
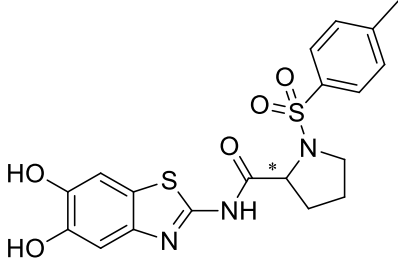
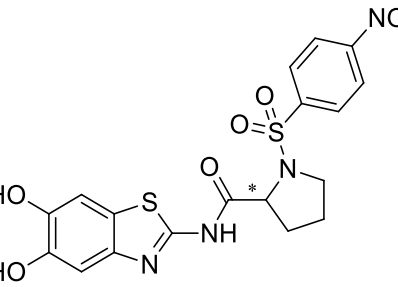
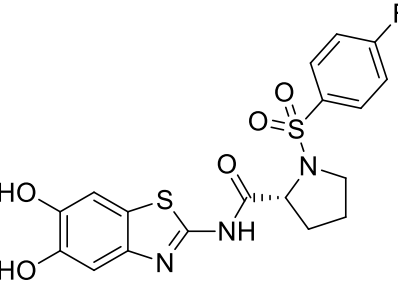
- [148] D. A. Alonso, S. K. Bertilsson, S. Y. Johnsson, S. J. M. Nordin, M. J. Södergren, P. G. Andersson, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2276.
- [149] J.-S. Suppo, G. Subra, M. Bergès, R. Marcia de Figueiredo, J.-M. Campagne, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 5389.
- [150] M. Maiti, M. Maiti, J. Rozenski, S. de Jonghe, P. Herdewijn, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 5158.
- [151] P. Moutevelis-Minakakis, C. Sinanoglou, V. Loukas, G. Kokotos, *Synthesis* **2005**, *2005*, 933.
- [152] D. H. Kim, T. Baum, *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 209.
- [153] R. Frei, A. S. Breitbach, H. E. Blackwell, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 5316.
- [154] T. Kanemitsu, A. Umehara, R. Haneji, K. Nagata, T. Itoh, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 3893.
- [155] S. Doherty, J. G. Knight, A. McRae, R. W. Harrington, W. Clegg, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008*, 1759.
- [156] Anna Puckowska, Danuta Bartulewicz, Kristina Midura-Nowacek, *Acta Pol. Pharm.* **2005**, *62*, 59.
- [157] A. R. Katritzky, W.-Q. Fan, A. E. Koziol, G. J. Palenik, *Tetrahedron* **1987**, *43*, 2343.
- [158] Palmer Wylie, Jones Philip, Liu Gang, Petrocchi Alessia, Reyna Naphtali, Subrumanian Govindan, Theroff Jay, Yau Anne, WO2016033416, **2015**.
- [159] O. Kym, L. Ratner, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1912**, *45*, 3238.

9 Anhang

9.1 Berechnete lipophile Ligandeneffizienzen (LLE-Werte)

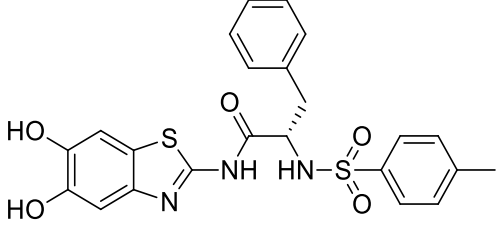
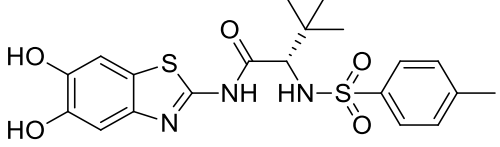
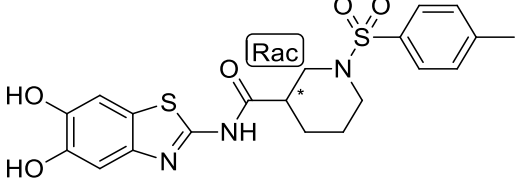
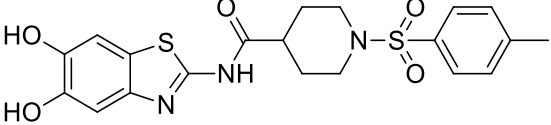
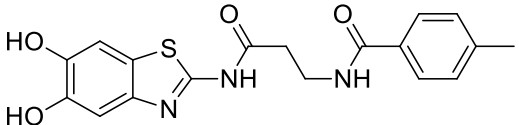
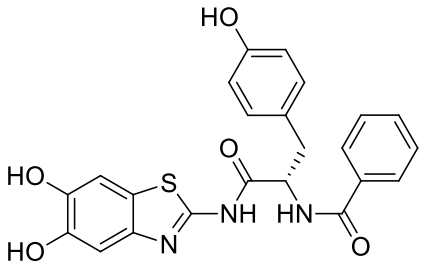
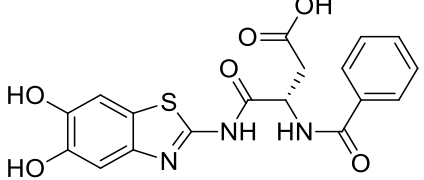
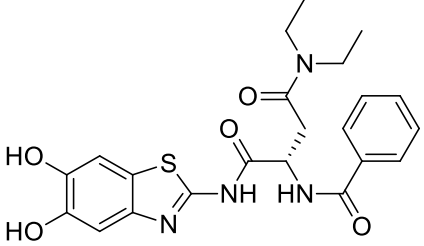
Nr.	SlogP	t _f [min]	pIC ₅₀	LLE
25	5.61	1.98	5.85	0.24
(R)-45	2.95	0.78	5.81	2.86
(S)-45	2.95	0.78	6.03	3.08
(R)-48	2.81	1.26	5.88	3.07
(S)-48	2.81	1.30	5.63	2.83
(R)-50	2.41	1.16	6.49	4.09
(S)-50	2.41	1.18	6.03	3.62
(R)-51	2.64	1.16	5.99	3.35
(R)-54	3.15	1.54	5.85	2.70
(S)-54	3.15	1.57	6.03	2.88
(R)-55	2.50	1.03	5.73	3.23
(S)-55	2.50	1.01	5.84	3.35
(R)-56	2.51	1.11	6.07	3.56
(S)-56	2.51	1.09	5.88	3.37
(R)-57	2.41	1.12	5.95	3.55
(S)-57	2.41	1.11	5.75	3.34
(R)-58	4.17	2.84	5.61	1.44
(S)-58	4.17	2.93	5.50	1.33
(R)-59	3.61	0.82	5.87	2.26
(S)-59	3.61	0.83	5.53	1.92

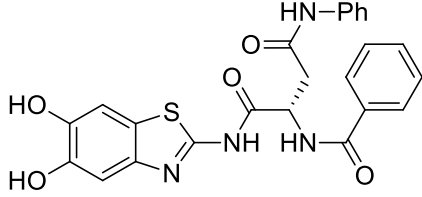
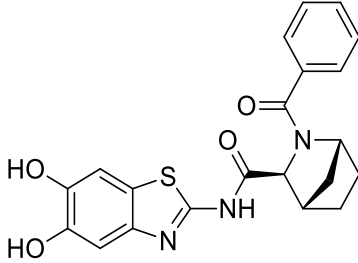
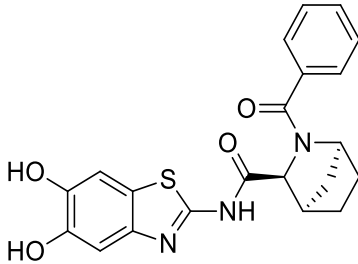
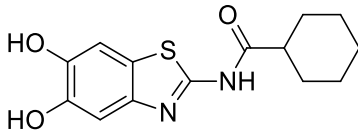
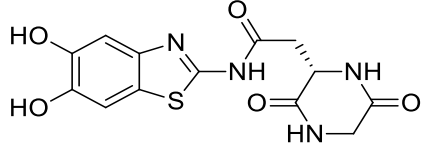
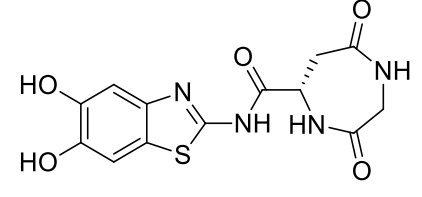
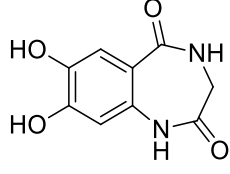
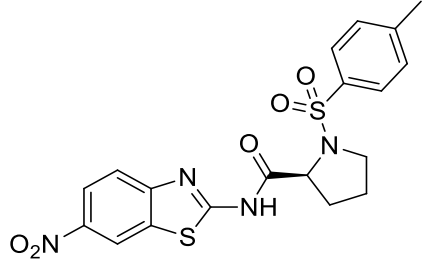
9.2 Übersicht der getesteten Verbindungen

Nr.	Name	Struktur
31	BM220	
32	BM193	
(<i>R</i>)-45	BM235 FB008 ^a	
(<i>S</i>)-45	BM237 FB018 ^a	
(<i>R</i>)-48	BM214	
(<i>S</i>)-48	BM224 FB012 ^a	
(<i>R</i>)-50	BM217 FB017 ^a	
(<i>S</i>)-50	BM225	
(<i>R</i>)-51	BM236	

(R)-52	BM226	
(S)-52	BM228	
(R)-53	BM239	
(S)-53	BM242	
(R)-54	UG020 ^b	
(S)-54	UG031 ^b	
(R)-55	UG013 ^b	
(S)-55	UG028 ^b	
(R)-56	UG014 ^b	
(S)-56	UG044 ^b	
(R)-57	UG025 ^b	
(S)-57	UG040 ^b	

(R)-58	UG042 ^b	
(S)-58	UG045 ^b	
(R)-59	UG015 ^b	
(S)-59	UG029 ^b	
76	BM216 FB011 ^a	
85	JB013 ^c	
(R)-86	JB07 ^c	
(S)-86	JB013 ^c	
(S)-109	BM252	
(R)-109	NF18M ^d	
110	BM281	

111	BM276	
112	NF21M ^d	
<i>rac</i> -113	BM271	
114	BM274	
121	BM350	
122	BM322	
123	BM390	
127	BM413	

128	BM416	
(1 <i>R</i> , 3 <i>S</i> , 4 <i>S</i>)-129	BM351	
(1 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>R</i>)-129	BM380	
141	BM286	
144	BM374	
145	BM375	
146	BM384	
167	UG046 ^b	

168	BM328	
172	BM392	
173	BM396	
181	BM402	
183	BM404	
184	BM405	
185	BM406	
186	BM377	
(R)-190	BM426	
(S)-190	BM425	

^aVerbindung wurde synthetisiert von [REDACTED]. ^bVerbindung wurde synthetisiert und getestet von [REDACTED]. ^cVerbindung wurde synthetisiert und getestet von [REDACTED]. ^dVerbindung wurde synthetisiert von [REDACTED].

