

**Synthese und Evaluierung von neuen
Cystein-Proteaseinhibitoren und Inhibitoren der
Afrikanischen Trypanosomiasis**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

im Promotionsfach Chemie

dem Fachbereich Chemie, Pharmazie, Geographie und Geowissenschaften

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz vorgelegt von

Philipp Peter Klein

geboren in Adenau

Mainz, Januar 2023

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von August 2015 bis Januar 2023 am Institut für Organische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz im Arbeitskreis von Prof. Dr. Till Opatz angefertigt.

-D77-

Datum der mündlichen Prüfung: 01. März 2023

Dekan: Prof. Dr. [REDACTED]

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Till Opatz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. [REDACTED]

Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. [REDACTED]

Für meine Familie.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	xi
Zusammenfassung	xiii
Abstract	xv
Eigenständigkeitserklärung	xvii
Bemerkungen	xix
Abkürzungsverzeichnis	xxiii
I. Synthese und Untersuchung neuer kovalenter Cystein-Proteaseinhibitoren basierend auf elektrophilen Aromaten	1
1. Einleitung	3
1.1. Einteilung der Proteasen	4
1.1.1. Cysteinproteasen	6
1.1.2. Strukturelle Unterschiede und Gemeinsamkeiten von Proteasen der Papain-Familie	8
1.1.3. Der Hydrolysemechanismus von Cysteinproteasen	9
1.2. Proteaseinhibitoren	10
1.2.1. Kovalent-irreversible Inhibitoren	13
1.2.2. Kovalent-reversible Inhibitoren	17
1.2.3. Vergleich zwischen kovalent-reversiblen und kovalent-irreversiblen Inhibitoren	19
1.3. Chemische Proteomik	20
2. Zielsetzung und Motivation	23
3. Ergebnisse und Diskussion	25
3.1. Synthese der Dipeptide	25
3.2. Inhibitoren mit aromatischem elektrophilen Warhead	27
3.2.1. Synthese der Inhibitoren mit aromatischem elektrophilen Warhead	27

Inhaltsverzeichnis

3.2.2.	Reaktion mit einem niedermolekularen Thiol	30
3.2.3.	Biologische Testung - Enzymassays	32
3.2.4.	Spaltung des Benzylesters	35
3.2.5.	Berechnungen zum Inhibitionsmechanismus	36
3.2.6.	Docking-Studien	38
3.2.7.	Zusammenfassung	41
3.3.	Inhibitoren mit Naphthochinon-Warhead	41
3.3.1.	Synthese der Naphthochinoninhibitoren	41
3.3.2.	Reaktion mit einem niedermolekularen Thiol	42
3.3.3.	Biologische Untersuchungen zu Inhibitoren mit Naphthochinon-Warhead .	44
3.3.4.	Untersuchungen zur Geschwindigkeit der Spaltung der verschiedenen Ester	45
3.3.5.	Berechnungen zu möglichen Angriffspunkten eines Thiols	47
3.3.6.	Zusammenfassung	48
3.4.	Neue kovalente Enzyminhibitoren für die markierungsfreie chemische Proteomik .	48
3.4.1.	Synthese der Inhibitoren mit Azid-Tag	48
3.4.2.	Synthese der Inhibitoren mit Biotin-Tag	50
3.4.3.	Zusammenfassung	51
4.	Zusammenfassung	53
II.	Neue Inhibitoren der essenziellen Oxidoreduktase Tryparedoxin aus <i>Trypanosoma brucei</i>	55
5.	Einleitung	57
5.1.	Die afrikanische Trypanosomiasis	57
5.1.1.	Ansteckung und Krankheitsverlauf	59
5.1.2.	Therapie und Medikamente	60
5.1.3.	Redoxkaskade des Erregers als Angriffspunkt und Unterschied zum Menschen	63
5.1.4.	Entdeckung von CFT als Inhibitor	64
6.	Motivation und Zielsetzung	67
7.	Ergebnisse und Diskussion	69
7.1.	Synthese des kovalenten Tryparedoxin-Inhibitors	69
7.2.	Versuche zur Synthese des Furan-Derivats	71
7.3.	Versuche zur Synthese des Selen-Derivats	73
7.4.	Wechselwirkung zwischen Inhibitor und Tryparedoxin	74
7.5.	Versuche zur Synthese eines alternativen Tryparedoxin-Inhibitors	77

8. Zusammenfassung	81
9. Experimenteller Teil	83
9.1. Allgemeine Arbeitstechniken und Messgeräte	83
9.1.1. Lösemittel und Reaktionsführung	83
9.1.2. Destillation	84
9.1.3. Chromatographie	84
9.1.4. Schmelzpunkte	85
9.1.5. NMR-Spektroskopie	85
9.1.6. IR-Spektroskopie	85
9.1.7. Polarimetrie	85
9.1.8. Massenspektrometrie	86
9.1.9. Kristallstrukturanalyse	86
9.1.10. Anwendung des DP4+-Modells zur Bestimmung der Regiochemie in Unter- abschnitt 3.2.2	86
9.2. Synthesen	88
9.2.1. Synthesen zu Teil I	88
9.2.2. Synthesen zu Teil II	112
10. Literatur	119
Anhang	129
Anhang A - Kristallstrukturanalysen	130
Anhang B - NMR-Spektren	141
Anhang C - Lebenslauf	197

Danksagung

Viele verschiedene Menschen hatten Teil daran, dass diese Arbeit erfolgreich zu einem Ende gefunden hat. Einige dieser Menschen möchte ich im Folgenden hervorheben und mich im Voraus bei denen entschuldigen, die ich leider vergessen habe. Großer Dank gilt Herr Prof. Dr. Till Opatz für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die Möglichkeit diese Doktorarbeit dort anzufertigen. Ich bedanke mich für die von ihm gewährten Freiheiten, die Geduld und die Möglichkeit viele schöne Konferenzen zu besuchen.

Ebenfalls großer Dank geht an Herrn Prof. Dr. [REDACTED] für die Begutachtung der Arbeit sowie die wissenschaftliche Begleitung in weiten Teilen des Studiums. Für die Kooperation und gemeinsame Forschung möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. [REDACTED] bedanken, ohne die viele der gezeigten Ergebnisse nicht zustande gekommen wären. Außerdem bedanke ich mich bei ihr für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes der Promotionsprüfung. Weitere Kooperationspartner, denen ich danken möchte, sind Herr Prof. Dr. [REDACTED], Herr Prof. Dr. [REDACTED] und nicht zuletzt Frau Prof. Dr. [REDACTED] und Dr. [REDACTED].

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei der Analytik-Abteilung, vor allem bei Herr Dr. [REDACTED] [REDACTED] und bei Herr Dr. [REDACTED]. Dem gesamten AK Opatz bin ich zu Dank verpflichtet. Die Zeit in der Arbeitsgruppe wird mir durch die immer angenehme Arbeitsatmosphäre in guter Erinnerung bleiben. Hervorheben möchte ich Dr. [REDACTED] für zügige NMR-Messungen sowie das Anfertigen diverser computergestützter Rechnungen. Für das Korrekturlesen der Arbeit danke ich Dr. [REDACTED].

Meinen Bachelorstudenten [REDACTED] danke ich für die Unterstützung bei meinen Forschungsarbeiten. Ein besonderer Dank geht an den leider nicht mehr existenten 1. Stock mit seinen vielen Mitgliedern, die mich während meiner Zeit begleitet haben (in alphabetischer Reihenfolge): [REDACTED]

Ich danke [REDACTED] von der Firma [REDACTED] für die tolle Zeit und viele spannende Synthesen.

Natürlich gibt es auch ein Leben abseits der Chemie. Daher möchte ich meiner Familie danken, die mich immer unterstützt hat und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Außerdem danke ich meinen Freunden [REDACTED]

Mein allergrößter Dank gilt meiner Frau [REDACTED], die ein unvorstellbares Maß an Geduld auf sich genommen hat, um mich bei der Anfertigung dieser Arbeit zu unterstützen.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Synthese und Evaluierung von Enzyminhibitoren. Der erste Teil bezieht sich dabei auf neue Cystein-Proteaseinhibitoren. Cysteinproteasen spielen eine wichtige Rolle bei verschiedenen vernachlässigten tropischen Krankheiten, wie z.B. der Afrikanischen Trypanosomiasis, Chagas-Krankheit, Leishmaniose oder Malaria. Cathepsine, ebenfalls Cysteinproteasen, werden mit Krebs, Alzheimer oder Osteoporose in Verbindung gebracht. Es sollten Inhibitoren für bestimmte Proteasen dieser Art hergestellt werden, die jedoch, im Gegensatz zu gängigen Cystein-Proteaseinhibitoren, einen elektrophilen Aromaten als reaktive Spezies am N-Terminus besitzen. Die synthetisierten Inhibitoren basieren auf dem Dipeptid Phenylalanin-Leucin, das C-terminal mit unterschiedlichen Gruppierungen geschützt wurde. Bei der Testung der Inhibitoren wurde eine unerwartete Reaktion des Enzyms Rhodesain beobachtet, welches eine C-terminale Benzylgruppe abspaltet und die freie Säure freisetzt, die einen um ein Vielfaches potenteren Inhibitor darstellt. Dieses „pro-drug“-ähnliche Verhalten konnte für verschiedene reaktive Spezies gezeigt werden. Außerdem wurde gezeigt, dass die anschließende Inhibition des Enzyms durch den elektrophilen Aromaten nicht über eine nukleophile aromatische Substitution geschieht. Berechnungen und Docking-Studien legen nahe, dass es sich um einen Meisenheimer-Komplex handeln könnte.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Synthese von 2-(Chlormethyl)-5-(4-fluorphenyl)-thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3*H*)-on und seinen Derivaten. Dieses Molekül stellt einen Tryparedoxin-Inhibitor dar. Tryparedoxin ist eine Oxidoreduktase und spielt eine wichtige Rolle im Stoffwechsel der Erreger der Afrikanischen Schlafkrankheit, *Trypanosoma brucei*. Der Inhibitor konnte dabei wie geplant über eine 3-stufige Synthese dargestellt werden, die Modifikationen an interessanten Positionen innerhalb des Moleküls zulässt. Ebenso konnte die Synthese der Verbindung ohne Abgangsgruppe bewerkstelligt werden, was wichtig für weitere Untersuchungen des Inhibitionsmechanismus war. Genauere Einblicke in die Bindung des Inhibitors an das Enzym zeigten, dass es sich bei 2-(Chlormethyl)-5-(4-fluorphenyl)-thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3*H*)-on um einen „small-molecule-dimerizer“ handelt, d.h. sich zwei Inhibitoren und zwei Enzyme zusammenlagern. Dabei tendieren weder Inhibitor noch Enzym alleine zur Dimerisierung.

Abstract

This thesis describes the synthesis and evaluation of enzyme inhibitors. The first part is about cysteine protease inhibitors. Cysteine proteases play a crucial role in different neglected tropical diseases like African trypanosomiasis, chagas disease or malaria. Cathepsins, which are also cysteine proteases, are associated with cancer, Alzheimer's disease or osteoporosis. The main goal of this work was to synthesize inhibitors of these proteases, which in contrast to common cysteine protease inhibitors have an electrophilic aromatic system as a reactive species at the N-terminus. The synthesized inhibitors contain the dipeptide phenylalanine-leucine, which is protected at the C-terminus by different groups. While testing these inhibitors, an uncommon reaction with Rhodesain was found. The enzyme cleaves the C-terminal benzyl group and releases the free acid, which is a far more potent inhibitor. This „pro-drug“-like behavior was found for different inhibitors. Furthermore, it was shown that the mechanism of inhibition by an electrophilic aromatic system is not a nucleophilic aromatic substitution. Calculations and docking studies suggest a Meisenheimer Complex as a stabilization.

The second part of this work is the synthesis of 2-(chloromethyl)-5-(4-fluorophenyl)-thieno[2,3-d]pyrimidine-4(3*H*)-one and its derivatives. This molecule is an inhibitor of Tryparedoxin. Tryparedoxin is an oxidoreductase and plays an important role in the metabolism of the parasite causing the African sleeping sickness, *Trypanosoma brucei*. The inhibitor was synthesized in a 3-step synthesis, which allowed modifications at interesting positions within the molecule. The synthesis of the inhibitor without a leaving group was also accomplished. This was important for studies about the mechanism of inhibition. A closer look at the binding of the inhibitor to the enzyme showed that 2-(chloromethyl)-5-(4-fluorophenyl)-thieno[2,3-d]pyrimidine-4(3*H*)-one is a „small-molecule-dimerizer“ which means that two inhibitors and two enzymes form a dimer although both alone do not tend to do this.

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle sinngemäß und wörtlich übernommenen Textstellen aus der Literatur bzw. dem Internet wurden unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Mainz, den 23. Januar 2023

Philipp Peter Klein

Bemerkungen

Der Inhalt der folgenden Arbeit beruht nicht nur auf eigens erzielten Forschungsergebnissen, sondern umfasst ebenso die Resultate anderer Personen, die an den Projekten mitgearbeitet haben. Dazu zählen die Synthesen in Abschnitt 3.4 zu neuen Inhibitoren für die markierungsfreie chemische Proteomik. Sie wurden von [REDACTED] im Rahmen seiner Bachelorarbeit durchgeführt. An den Synthesen zu einem alternativen Tryparedoxin-Inhibitor aus Abschnitt 7.5 war [REDACTED] beteiligt. Die Wirksamkeit der synthetisierten Inhibitoren auf verschiedene Enzyme in Unterabschnitt 3.2.3 und Unterabschnitt 3.3.3 wurde durch den Arbeitskreis von Prof. Dr. [REDACTED] getestet. Die biologischen Daten des Tryparedoxin-Inhibitors in Abschnitt 7.4 basieren auf den Arbeiten von Dr. [REDACTED] aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. [REDACTED]. Beiträge weiterer Personen sind an den entsprechenden Stellen kenntlich gemacht. Zudem wurden Teile dieser Arbeit bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht:

- [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
- [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
- [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
- [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

Abkürzungen

(HP)LC-MS	<i>(high performance) liquid chromatography-mass spectrometry</i>
3CLpro	3-Chymotrypsin-like Protease
ABPP	<i>activity-based probe profiling</i> (dt. affinitätsbasierte Proteomik)
ACE-Hemmer	Hemmer des Angiotensin-konvertierenden Enzyms
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i>
Ala, A	Alanin
AS	Aminosäure
Asp, D	Asparaginsäure
ATR	<i>attenuated total reflection</i> (dt. abgeschwächte Totalreflexion)
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
C-PCM	<i>conductor-like polarizable continuum model</i>
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CD	Circulardichroismus
CD4	<i>cluster of differentiation 4</i>
CFT	2-(Chlormethyl)-5-(4-fluorphenyl)thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3 <i>H</i>)-on
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
Cys, C	Cystein
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DENV PR	Serinprotease des Dengue Virus
DFT	Dichtefunktionaltheorie
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	Dimethylformamid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DP4(+)	<i>diastereomeric probability 4(+)</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid

ESI	Elektrosprayionisation
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie
Gln, Q	Glutamin
Gly, G	Glycin
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
HAT	Humane afrikanische Trypanosomiasis
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorphosphat
HCV	Hepatitis-C-Virus
HEG	Hexaethylenglycol
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i> (dt. hochaufgelöste Massenspektrometrie)
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
HTS	<i>high-throughput-screening</i>
IEFPCM	<i>integral equation formalism polarizable continuum model</i>
Ile, I	Isoleucin
ITC	<i>isothermal titration calorimetry</i>
Leu, L	Leucin
LMW	<i>low molecular weight</i>
Lys, K	Lysin
MAL-PEG	Maleimid-Polyethylenglycol
MD	Molekulardynamik
MFT	2-Methyl-5-(4-fluorphenyl)thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3 <i>H</i>)-on
MP2	Møller–Plesset-Störungstheorie 2. Ordnung
Ms	Mesyl (Methylsulfonyl)
MW	Mikrowelle
N.d.	nicht durchgeführt
NECT	<i>nifurtimox-eflornithine combination therapy</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (dt. Kernspinresonanz)
NS3-Protease	Nicht-Strukturprotein 3-Protease
NTD	<i>neglected tropical diseases</i>
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
Phe, F	Phenylalanin
PIFA	[Bis(trifluoracetoxy)iod]benzol
PPL	<i>porcine pancreas lipase</i> (dt. Schweinepankreaslipase)
Q-TOF	<i>Quadrupole - Time of Flight</i>

QM/MM	Quantenmechanik/ Molekulare Mechanik
RMSD	<i>root mean squared displacement</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S_NAr	nukleophile aromatische Substitution
SARS-CoV-2	<i>severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2</i>
SAXS	<i>small-angle X-ray scattering</i>
SCS	<i>spin-component-scaled</i> (dt. spinkomponentenskaliert)
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEC	<i>size-exclusion-chromatography</i>
spp.	<i>lat.: species pluralis</i>
<i>T. b. gambiense</i>	<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>
<i>T. b. rhodesiense</i>	<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>
<i>T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>TbCatB</i>	<i>Trypanosoma brucei</i> Cathepsin B-ähnliche Cysteinprotease
TCI	<i>targeted covalent inhibitor</i>
TEA	Triethylamin
TFA	<i>trifluoroacetic acid</i> (dt. Trifluoressigsäure)
Tpx	Tryparedoxin
Trp, W	Tryptophan
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem
Äq.	Äquivalente

Teil I.

Synthese und Untersuchung neuer kovalenter Cystein-Proteaseinhibitoren basierend auf elektrophilen Aromaten

1. Einleitung

Proteasen, auch Peptidasen, sind Enzyme, die die Hydrolyse von Proteinen beziehungsweise Peptiden katalysieren. Dabei wirken sie in vielen verschiedenen biologischen Prozessen mit, in denen sie unterschiedliche Aufgaben übernehmen. Eine der ersten entdeckten Peptidasen war das Verdauungsenzym Pepsin, welches 1836 von Theodor Schwann in Extrakten aus Tiermägen gefunden wurde.^[1] Man war zu dieser Zeit noch der Auffassung, diese Enzyme spalten sehr unspezifisch Peptidbindungen und seien hauptsächlich für die Verdauung verantwortlich, wie es bei Pepsin, Trypsin oder Chymotrypsin der Fall ist. Allerdings ist mittlerweile bekannt, dass neben sehr unspezifischen Peptidasen auch hochspezifische Enzyme existieren, die z.B. bei der Blutgerinnung, Entzündungen oder Infektionen eine Rolle spielen.^[2,3] Ihr Vorkommen beschränkt sich dabei nicht nur auf Tiere, man findet sie auch in Pflanzen, Bakterien, Parasiten und Viren. Aufgrund dessen können Proteasen mit vielen bekannten Krankheiten in Verbindung gebracht werden. Meist basieren diese nicht auf einer herabgesetzten, sondern auf einer erhöhten Aktivität der Proteasen. Dies ist beispielsweise bei vielen Krebsarten, Osteoporose und rheumatoider Arthritis der Fall.^[4,5] Die Beteiligung von Proteasen an verschiedenen parasitären Erkrankungen wie Malaria oder der Trypanosomiasis, macht sie zu einem attraktiven pharmakologischen Target.^[6] Gleiches gilt für das Dengue-Virus, das humane Immundefizienz-Virus (HIV) oder das Hepatitis-C-Virus (HCV), in denen Proteasen eine entscheidende Rolle übernehmen.^[7] Da das Ziel die Senkung der (pathogenen) Proteaseaktivität ist, konzentriert sich die Forschung auf die Entwicklung von spezifischen Inhibitoren der betroffenen Proteasen. Unter den auf dem Markt befindlichen Proteaseinhibitoren befinden sich HIV- und HCV-Proteaseinhibitoren oder Hemmer des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE-Hemmer), die zur Behandlung von Bluthochdruck eingesetzt werden.^[8] Ein weiteres Beispiel ist die Hemmung der 3-Chymotrypsin-like Protease (3CLpro) des Schweres-akutes-Atemwegssyndrom-Coronavirus Typ 2 (SARS-CoV-2) durch Nirmatrelvir. Dieses Medikament wurde im Dezember 2021 in den USA zugelassen und ist ein Cysteinproteaseinhibitor.^[9] Die vielen unterschiedlichen biologischen Funktionen von Proteasen und die großen strukturellen Gemeinsamkeiten einzelner Vertreter, sowie die sehr empfindlichen Regulationsmechanismen machen die Entwicklung selektiver Proteaseinhibitoren zu einem herausfordernden Gebiet.

1.1. Einteilung der Proteasen

Proteasen können in Endo- und Exopeptidasen eingeteilt werden. Endopeptidasen hydrolysieren eine Peptidbindung, die innerhalb eines Proteins liegt. In vielen Fällen erkennt die Protease einen bestimmten Sequenzabschnitt, an dem angegriffen und anschließend gespalten wird. Beispiele für Endopeptidasen sind die Verdauungsenzyme Chymosin, Elastase oder Trypsin. Exopeptidasen entfernen immer eine, zwei oder drei Aminosäuren am Ende eines Proteins. Sie zerlegen vor allem kleinere Peptide und können in Carboxypeptidasen und Aminopeptidasen unterteilt werden. Erstere spalten Aminosäuren vom C-Terminus her ab, letztere vom N-Terminus. Wird eine Aminosäuresequenz von zwei oder drei Aminosäuren abgespalten, spricht man von Di- bzw. Tripeptidylpeptidasen. Die unterschiedlichen Angriffspunkte sind in Abbildung 1.1 dargestellt.

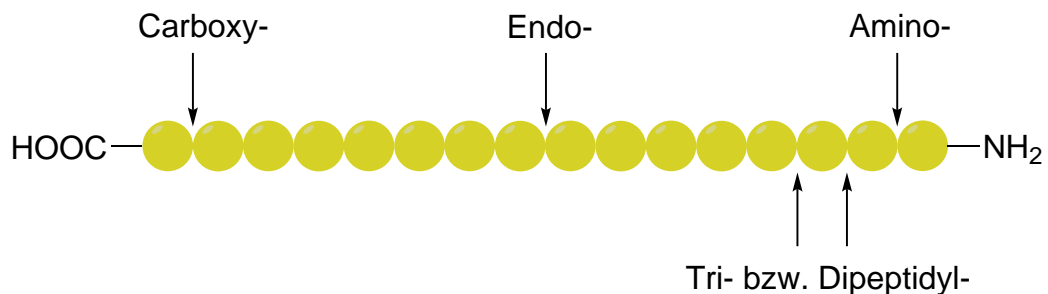


Abbildung 1.1.: Schematische Darstellung der verschiedenen Angriffspunkte unterschiedlicher Proteasen. Sowohl Carboxy- als auch Aminoproteasen gehören zu den Exoproteasen. Ein gelber Punkt symbolisiert eine Aminosäure.

Proteasen besitzen ein aktives Zentrum, in dem die Hydrolyse der Peptidbindung stattfindet. Daher können sie ebenso anhand der Art des aktiven Zentrums eingeteilt werden. Die meisten Proteasen gehören den folgenden Gruppen an: Cystein-, Serin-, Aspartat- und Metalloproteasen. Cysteinproteasen enthalten in ihrem aktiven Zentrum unter anderem die Aminosäuren Cystein und Histidin. Durch die Verankerung des Cysteins in der Enzymstruktur ist das Thiol nukleophiler als bei der freien Aminosäure.^[10] Die Nähe zum Histidin, welches als Protonenakzeptor dient, sorgt dafür, dass das Thiol meist deprotoniert vorliegt. Ein Beispiel für eine Cysteinprotease ist Papain aus der Papaya, mit dem sich die Pflanze vor Schädlingen schützt. Einige Cathepsine, die am Tumorwachstum beteiligt sind oder Rhodesain, aus dem Parasit *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T. b. rhodesiense*), dem Auslöser der afrikanischen Trypanosomiasis, sind ebenfalls Cysteinproteasen.^[11–14]

Wenn als katalytische Diade die Aminosäuren Histidin und Serin im aktiven Zentrum vorhanden sind (in manchen Fällen enthält das aktive Zentrum zusätzlich Asparaginsäure und liegt als katalytische Triade vor), handelt es sich um eine Serinprotease. Das Ausbilden einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen Asparaginsäure und dem N-H des Histidins, führt zu einer Polarisation der Hydroxygruppe des Serins und erhöht die Nukleophilie des Sauerstoffs stark. Beispiele für Serinproteasen sind die Verdauungsenzyme Trypsin und Chymotrypsin oder Thrombin, das eine wichtige

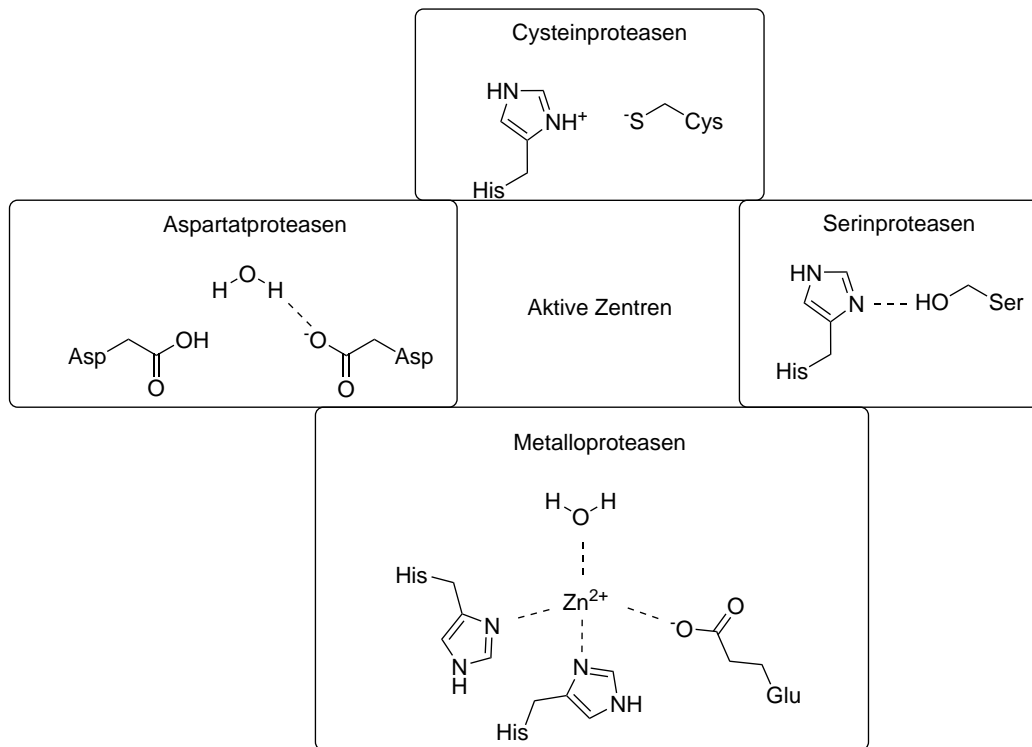


Abbildung 1.2.: Vereinfachte Darstellung der Aminosäuren im aktiven Zentrum der vier häufigsten Protease-Klassen.

Rolle bei der Blutgerinnung einnimmt.^[15,16] Bei dem Verdauungsenzym Pepsin handelt es sich um eine Aspartatprotease, die in ihrem aktiven Zentrum zweimal die Aminosäure Asparaginsäure trägt. Das für die Hydrolyse der Peptidbindung benötigte Wasser wird hier durch die Aspartate aktiviert und in die richtige Position gebracht. Alle Aspartatproteasen gehören zur Gruppe der Endopeptidasen. Metalloproteasen aktivieren für die Hydrolyse, ähnlich zu den Aspartatproteasen, ein Molekül Wasser. Dabei übernimmt ein Metallzentrum diese Rolle. In den meisten Fällen handelt es sich um ein Zink-Ion. Botulinumtoxin, oder Botox, beispielsweise ist eine solche Zink-Metalloprotease.^[17] Abbildung 1.2 zeigt eine vereinfachte Darstellung des aktiven Zentrums der häufigsten Protease-Klassen. Weitere Arten von Proteasen sind die Threonin- und Glutaminproteasen oder die Asparaginpeptidylasen, die aber im Vergleich zu den anderen Gruppen nur einen kleinen Teil ausmachen. Die zuvor genannten Eigenschaften kommen in der Einteilung nach der EC-Nummer (engl. Enzyme Commission numbers) zum Tragen.^[18] Proteasen gehören zu den Hydrolasen (EC 3.) und weiter in die Gruppe der Peptidasen (EC 3.4.). Die weiteren Untergruppen (EC 3.4.x.x) unterscheiden zwischen Serin-, Cystein- und Metalloproteasen und ob es sich um Endo- oder Exo-, Carboxy- oder Amino-peptidasen, Dipeptidyl- oder Tripeptidylpeptidasen handelt. Ein interessanter Aspekt zur Einteilung der Proteasen wird von der MEROPS-Datenbank berücksichtigt.^[19] Hier werden Ähnlichkeiten in der Tertiärstruktur der Proteasen in die Betrachtung mit einbezogen, was Rückschlüsse auf die

evolutionäre Entwicklung der Enzyme zulässt. Die Datenbank unterteilt Proteasen in Clans und Familien und stellt außerdem viele weiterführende Informationen zu Inhibitoren, Kristallstrukturen, Aminosäuresequenzen oder Fachliteratur zur Verfügung. Die übergeordneten Clans gruppieren die Familien und richten sich nach Art des aktiven Zentrums und einem Leitenzym. Die Tertiär- oder 3D-Strukturen der enthaltenen Familien müssen dem Leitenzym ähneln und deuten auf eine gemeinsame Abstammung hin. Zum Beispiel gehören die Familien C1 und C2 zu dem Clan der Papain-ähnlichen Cysteinproteasen CA. Innerhalb der Familien weisen die Proteasen eine ähnliche Aminosäuresequenz auf und teilen sich ein Typenbeispiel, wie z.B. Familie A1 mit Pepsin A, Familie C1 mit Papain oder Familie C2 mit Calpain.^[20]

1.1.1. Cysteinproteasen

Cysteinproteasen befinden sich in nahezu jedem Organismus. Nach der MEROPS-Datenbank unterteilen sie sich in insgesamt 11 Clans, wobei einer dieser Clans nicht zugeordnete Proteasen enthält. Von den 79 Familien entfallen alleine 44 auf den CA-Clan, dessen Leitprotease das Papain aus der Papaya darstellt. Einige wichtige Proteasen sind Teil dieser Familie wie z.B. die humanen Cathepsine B und L oder die viralen Proteasen Rhodesain und die Falcipaine 1-3 (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1.: Wichtige Cysteinproteasen mit ihrem Vorkommen und ihrer Bedeutung

Clan	Familie	Protease	Vorkommen
CA	C1	Papain	<i>Carica papaya</i>
		Cathepsine B, L, S, K, H, ...	<i>Homo sapiens</i>
		Falcipaine 1-3	<i>Plasmodium falciparum</i>
		Rhodesain	<i>Trypanosoma brucei</i>
		Cruzain	<i>Trypanosoma cruzi</i>
	C2	Calpaine	<i>Homo sapiens</i>
	C10	Streptopain	<i>Streptococcus pyogenes</i>
CD	C16	SARS CoV PL ^{Pro}	<i>Humanes SARS-Coronavirus</i>
	C47	Staphopain A+B	<i>Staphylococcus aureus</i>
	C11	Clostripain	<i>Clostridium histolyticum</i>
CL	C14	Caspasen	<i>Homo sapiens</i>
	C60	Sortase	<i>Staphylococcus aureus</i>
CM	C18	HCV Peptidase 2	<i>Hepatitis C Virus</i>

Wie bereits erwähnt, sind die wichtigsten, im Menschen vorkommenden, Cysteinproteasen die Cathepsine. Aus dem Altgriechischen übersetzt von καθιψειν „verdauen“, ist ihre Funktion im leicht sauren Milieu der Lysosomen der nicht-selektive Abbau von Proteinen. Dass das optimale pH-Fenster der meisten Cathepsine bei ca. 5 liegt und sie im neutralen oder basischen Bereich instabil sind, stellt einen wichtigen Regulationsmechanismus dar.^[21,22] Allerdings zeigt Tabelle 1.2, dass Cathepsine

nicht nur unselektiv Proteine abbauen, sondern auch an vielen anderen spezifischen Prozessen, wie der Hormonreifung oder dem Knochenumbau beteiligt sind.^[23–25]

Tabelle 1.2.: Physiologische Funktionen einiger humaner Cathepsine und damit verbundene Erkrankungen

Enzym	Physiologische Funktionen	Erkrankung bei Dysregulation
Cathepsin B	Proteinabbau, Hormonreifung, Knochenabbau	Krebs, Alzheimer, Pankreatitis
Cathepsin L	Epidermale Homöostase, Proteinabbau	Krebs, epidermale Hyperplasie
Cathepsin K	Knochenresorption und -remodelling	Osteoporose
Cathepsin S	Antigen-Präsentation und -Prozessierung	Rheumatoide Arthritis

Cathepsin B ist dabei für die Proteindegradation, Apoptose, Hormonreifung und den Knochenabbau verantwortlich. Eine fehlerhafte Regulation kann zu Krebs, Alzheimer oder Pankreatitis führen. Cathepsin K hingegen spielt eine Rolle in der Knochenresorption und wird mit Osteoporose assoziiert. Cathepsin S steht in Verbindung mit rheumatoider Arthritis. Aufgrund dieser Funktionen stellen die Cathepsine interessante *drug targets* für ebenjene Erkrankungen dar.

Allerdings besitzen auch Parasiten Cysteinproteasen der Papain-Familie, die, wie in Tabelle 1.3 zu sehen ist, für das Überleben des Erregers unterschiedliche Rollen einnehmen können.

Tabelle 1.3.: Einige parasitäre Cysteinproteasen, ihre Erreger und die resultierende Krankheit

Erreger	Protease	Funktion	Krankheit
<i>Trypanosoma brucei</i> <i>rhodesiense</i>	Rhodesain TbCatB	Passage der Blut-Hirn-Schranke, Abbau von Immunglobulinen, Vermeidung von Immunantwort Abbau von Wirt-Proteinen	Afrikanische Trypanosomiasis
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Cruzain	Essentiell in allen Stadien, Vermeidung von Immunantwort, Gewebeinvasion	Chagas-Krankheit
<i>Leishmanien</i>	CPA CPB CPC	Wachstum, Entwicklung, Gewebeinvasion, Wirt-Parasit-Interaktion	Leishmaniose
<i>Plasmodium falciparum</i>	Falcipain-1 Falcipain-2 Falcipain-3	Hämoglobinabbau, Wachstum, Wirt-Parasit-Interaktion	Malaria

Zu nennen ist hier der Erreger der Ostafrikanischen Trypanosomiasis (auch afrikanische Schlafkrankheit), *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Bei diesem Erreger konnten zwei Cysteinproteasen identifiziert werden, die das Überleben des Parasiten sichern: Rhodesain und die *Trypanosoma brucei* Cathepsin B-ähnliche Cysteinprotease (*TbCatB*). Rhodesain ermöglicht dem Erreger die Passage der Blut-Hirn-Schranke und verhilft damit der Krankheit in die zweite, immer tödlich verlaufende Phase fortzuschreiten. Außerdem verhindert es eine effiziente Immunantwort des Wirts. *TbCatB* sichert die Ernährung des Erregers durch Spaltung von Wirt-Proteinen.^[26,27]

Eine weitere parasitäre Cysteinprotease ist Cruzain aus dem Parasit *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), dem Erreger der Chagas-Krankheit. Diese Protease ist in allen Entwicklungsphasen des Erregers wichtig für die Differenzierung, Zellinvasion, intrazelluläre Vermehrung und Immunevasion.^[28]

In *Leishmanien*, die die sogenannte Leishmaniose verursachen, sorgen die Cysteinproteasen CPA, CPB und CPC für das Überleben des Parasiten und sind essentiell für die Replikation und den Krankheitsausbruch.^[29]

Das letzte Beispiel ist der Erreger von Malaria, *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*). In ihm wurden die Falcipaine 1-3 entdeckt, die zum einen das Wirt-Hämoglobin hydrolysieren und zum anderen die Invasion des Wirts und die Vervollständigung des Lebenszyklus sicherstellen.^[30]

1.1.2. Strukturelle Unterschiede und Gemeinsamkeiten von Proteasen der Papain-Familie

Cysteinproteasen, die zu der Papain-Familie gezählt werden, können anhand ihrer Struktur weiter unterteilt werden. Dabei unterscheidet man zwischen Cathepsin B-ähnlichen Proteasen, die einen sogenannten „occluding loop“ besitzen.^[31] Dieser blockiert zum einen teilweise die Bindungstasche für das Substrat, zudem sorgen zwei positiv geladene Histidinreste dafür, dass der C-Terminus des zu spaltenden Peptids festgehalten wird. Dies führt dazu, dass Cathepsin B eine hohe Dipeptidylcarboxypeptidase-Aktivität besitzt, d.h. es werden Dipeptide am C-Terminus abgespalten. Dieser Mechanismus tritt vornehmlich bei pH-Werten unter 5.5 auf. Bei höheren pH-Werten wird eine Endopeptidaseaktivität beobachtet. Ein Beispiel einer ähnlichen Protease ist das von *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) exprimierte *TbCatB*.

Die Gruppe der Cathepsin L-ähnlichen Proteasen eint, dass sie in der Prodomäne das ERFNIN-Motiv besitzen (Aminosäureabfolge Glu-Arg-Phe-Asn-Ile-Asn).^[32] Beispiele dieser Gruppe sind Cruzain, Falcipain-2 oder Rhodesain. Eine Überlagerung verschiedener Enzyme ist in Abbildung 1.3 zu sehen, bei der erkennbar wird, wie gering die strukturellen Unterschiede zwischen diesen ähnlichen Enzymen sind.

Abgesehen von der sehr ähnlichen Struktur ist allen Proteasen der Papain-Familie gemein, dass sie als inaktive Vorläuferenzyme gebildet werden, die neben der aktiven Domäne ein Signalpeptid enthalten, das für den Transport an den Wirkungsort wichtig ist. Zusätzlich enthalten sie eine N-terminale Prodomäne, die auch für den Weitertransport und für die korrekte Faltung verantwortlich

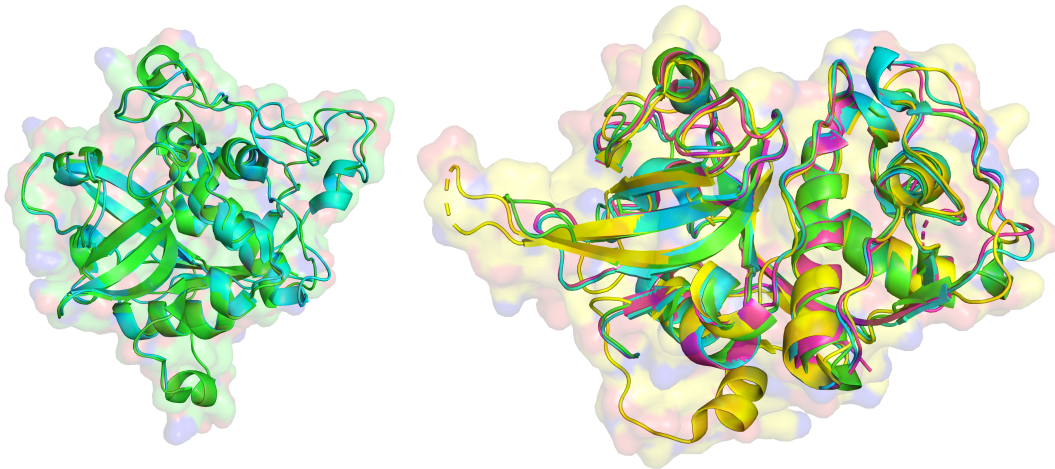


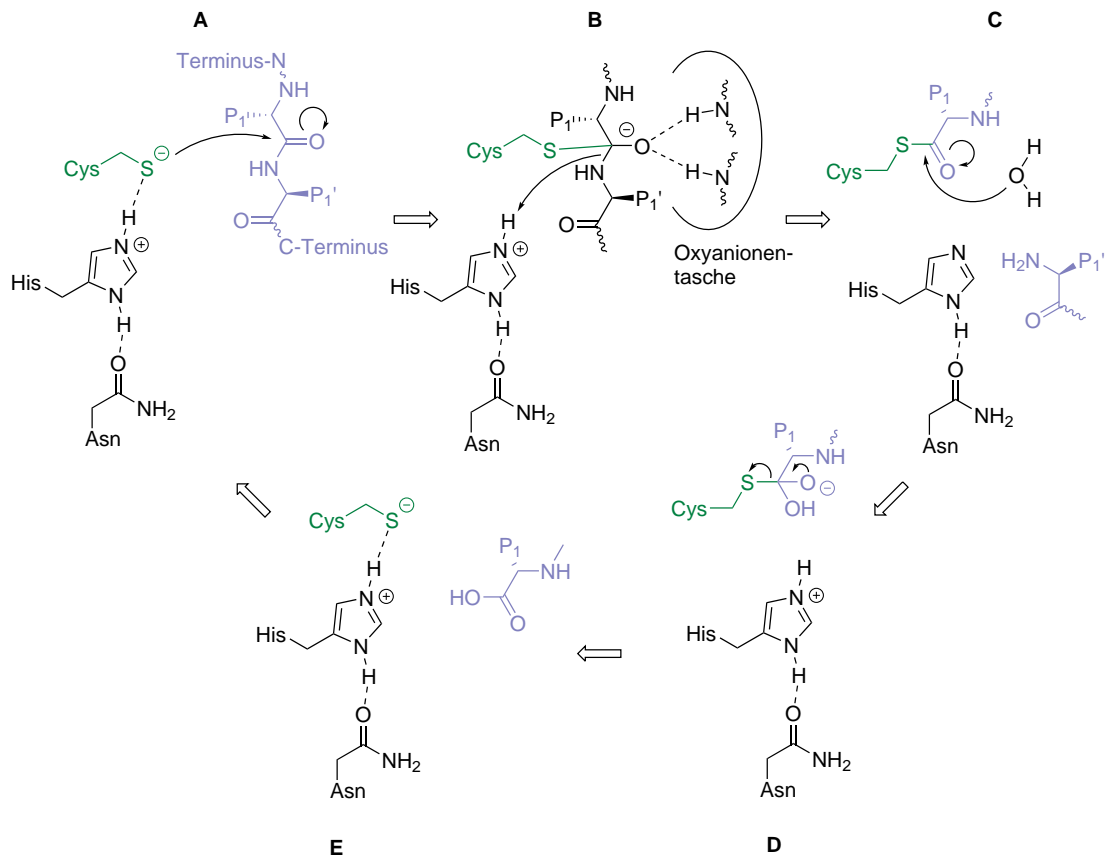
Abbildung 1.3.: Überlagerung verschiedener Enzyme, links: Cathepsin B (grün, PDB: 3HHI) und TbCatB (türkis, PDB: 1GMV), rechts: Cathepsin L (grün, PDB: 2YJ8), Rhodesain (türkis, PDB: 2P7U), Cruzain (fuchsia, PDB: 3I06) und Falcipain-2 (gelb, PDB: 3BPF). Die Grafiken wurden mit der freien Software PyMol erstellt.^[33]

ist.^[34–37] Die Prodomäne fungiert außerdem als hochaffiner Inhibitor, der das Enzym so lange inhibiert, bis es am Bestimmungsort angelangt ist und dort durch andere Enzyme oder autokatalytisch abgespalten wird. Sie ist dabei ein sehr spezifischer Inhibitor für das jeweilige und strukturell ähnliche Enzyme.^[38,39]

Die Tertiärstruktur ist geprägt von der L- und R-Domäne zwischen denen das katalytische Zentrum liegt.^[40] Die linksliegende L-Domäne trägt dabei das Cystein, welches innerhalb einer α -Helix liegt und wie schon erwähnt den nukleophilen Charakter des Thiols erhöht.^[10] Die rechts liegende R-Domäne enthält neben β -Faltblatt-Strukturen das Histidin der katalytischen Diade.

1.1.3. Der Hydrolysemechanismus von Cysteinproteasen

Der Hydrolysemechanismus von Cysteinproteasen findet innerhalb der katalytischen Diade bzw. Triade statt, wobei je nach Vorliegen geringe Unterschiede auftreten. Die Diade besteht aus einem Ionenpaar aus den Aminosäuren Cystein und Histidin, wobei das Thiol des Cysteins deprotoniert als Thiolat und das Histidin dementsprechend protoniert vorliegt. Im Fall einer katalytischen Triade, wird das protonierte Histidin zusätzlich durch, bei Papain-ähnlichen Proteasen, Asparagin stabilisiert. Bei anderen Cysteinproteasen kann diese Funktion auch Glutamin- oder Asparaginsäure übernehmen. Ein wesentlicher Punkt, der die Hydrolyse ermöglicht, ist die hohe Acidität des Thiols, welches einen pK_s -Wert von ca. 4 im Enzym besitzt. Im Vergleich zu freiem Cystein mit einem pK_s -Wert von 8–9 ist dieser Wert stark erniedrigt. Dies lässt sich zum Teil durch die Position des Cysteins in einer α -Helix und dem daraus resultierenden Dipol erklären.^[10] Ein anderer Grund ist die gute Stabilisation des Ionenpaars durch die schon genannten Aminosäuren und durch ein weites Netzwerk



Schema 1: Mechanismus der katalytischen Hydrolyse einer Peptidbindung durch eine Cysteinprotease.

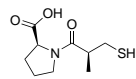
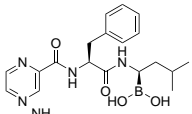
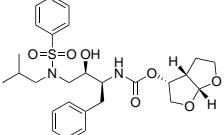
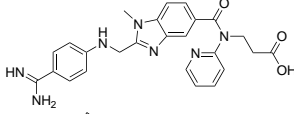
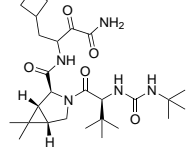
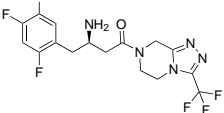
an Wasserstoffbrücken.^[41,42] Die Hydrolyse beginnt mit dem Angriff des Cysteinschwefels am Carbonyl-Kohlenstoff der zu spaltenden Peptidbindung (Schema 1, A). Der daraufhin entstehende negativ geladene tetraedrische Übergangszustand wird durch die „Oxyanion-Tasche“ stabilisiert (Schema 1, B). Als Nächstes wird der am Übergangszustand beteiligte Stickstoff durch Histidin protoniert, wodurch sich das Amin abspalten kann und ein Thioester vorliegt (Schema 1, C). Dieser wird durch ein aktiviertes Wassermolekül angegriffen, sodass schließlich die Säure freigesetzt wird und sich das Enzym regeneriert (Schema 1, D-E).

1.2. Proteaseinhibitoren

Proteasen sind weit verbreitet in vielen Teilen unseres Körpers und machen ca. 2 % des Genoms aus.^[43,44] Wie bereits in Unterabschnitt 1.1.1 erwähnt, kann eine falsche Regulierung zu verschiedensten Krankheitsbildern führen. Eine zu niedrige Proteaseaktivität spielt hierbei eine untergeordnete Rolle und in den meisten Fällen handelt es sich um eine zu hohe Aktivität. Diese kann zu Krankheiten

wie Krebs, Osteoporose oder Alzheimer führen. Nicht nur diese Erkrankungen, sondern auch die Rolle von Proteasen bei viralen Infekten wie HIV oder HCV sowie bei parasitären Krankheiten wie Malaria, dem Denguefieber oder der Trypanosomiasis, machen Proteasen zu einem wichtigen Target in der Wirkstoffentwicklung.^[26,45,46] Dabei sind bereits Proteaseinhibitoren als Medikamente gegen Bluthochdruck, Hepatitis C oder Diabetes Typ 2 auf dem Markt, wie in Tabelle 1.4 gezeigt. Ein Teil dieser Medikamente wirkt nach einem kovalenten Mechanismus.

Tabelle 1.4.: Proteaseinhibitoren, die als Medikament eingesetzt werden

Krankheit	Target	Arzneistoff	Struktur
Bluthochdruck	Angiotensin-konvertierendes Enzym	Captopril	
Krebs	Proteasom	Bortezomib	
AIDS	HIV-Protease	Darunavir	
Blutgerinnungsstörung	Thrombin	Dabigatran	
Hepatitis C	NS3-Protease	Boceprevir	
Diabetes mellitus Typ 2	Dipeptidyl-peptidase 4	Sitagliptin	

Proteaseinhibitoren können in kompetitive und nicht-kompetitive Inhibitoren unterteilt werden. Kompetitive Inhibitoren binden an das aktive Zentrum des Enzyms. Nicht-kompetitive Inhibitoren hingegen interagieren mit einer Stelle abseits des aktiven Zentrums und induzieren dadurch eine Strukturveränderung des Enzyms. Durch diese Strukturänderung wird die Aktivität herabgesetzt und es liegt eine Inhibition vor. Alle in dieser Arbeit betrachteten Inhibitoren sind allerdings kompetitiv.

Kompetitive Hemmstoffe können wiederum in kovalente und in nicht-kovalente Inhibitoren unterteilt werden, wobei in jeder dieser Gruppen noch einmal zwischen reversibel und irreversibel unterschieden werden kann. Jedoch sind nur wenige nicht-kovalente Cysteinproteaseinhibitoren bekannt.^[47,48]

1. | Einleitung

Die kovalenten Inhibitoren sind meist nach demselben Schema aufgebaut. Es existiert die Erkennungssequenz, welche oft peptidischer Natur ist. Um der Hydrolyse dieser vorzubeugen werden auch peptidomimetische Sequenzen verwendet. Diese sorgen dafür, dass der reaktive Teil des Inhibitors, der sogenannte Warhead, in einer geeigneten Position gehalten wird, um mit dem aktiven Zentrum zu interagieren. Diese Reaktion besteht im Fall von Cysteinproteasen aus einem nukleophilen Angriff des Thiols bzw. Thiolats auf den elektrophilen Warhead, was zur Ausbildung einer kovalenten Bindung führt. Dieser Prozess ist zweistufig und verläuft zuerst über einen Enzym-Inhibitor-Komplex, bei dem sich beide Reaktionspartner angenähert haben. Anschließend erfolgt die Reaktion zur Ausbildung der kovalenten Bindung. Ist die Energiedifferenz des letzten Schritts zu groß und eine Rückreaktion demnach nicht mehr möglich, handelt es sich um einen kovalent-irreversiblen Inhibitor.

Im Hinblick auf die Entwicklung neuer oder die Optimierung bekannter Proteaseinhibitoren spielt die Nomenklatur nach *Schechter und Berger* eine wichtige Rolle.^[49] Die Autoren beschreiben die chemische Umgebung des aktiven Zentrums eines Enzyms. In Abbildung 1.4 ist die Nomenklatur der verschiedenen Bindungstaschen dargestellt. Diese werden ausgehend von der Spaltstelle in Richtung des N-Terminus des Substrats (non-primed site) mit S_1 bis S_n beschrieben. Mit S_1' bis S_n' werden sie in Richtung des C-Terminus (primed site) bezeichnet. Die Bindungstaschen können sich in ihren Eigenschaften unterscheiden, z.B. der Polarität oder der Größe. Die Substratreste, die die Bindungstaschen besetzen, werden analog mit P_n beschrieben. Eine präzise Anpassung des Substrats an die Protease sorgt für eine starke Wechselwirkung mit dem Enzym und hilft bei der Entwicklung spezifischer Wirkstoffe.

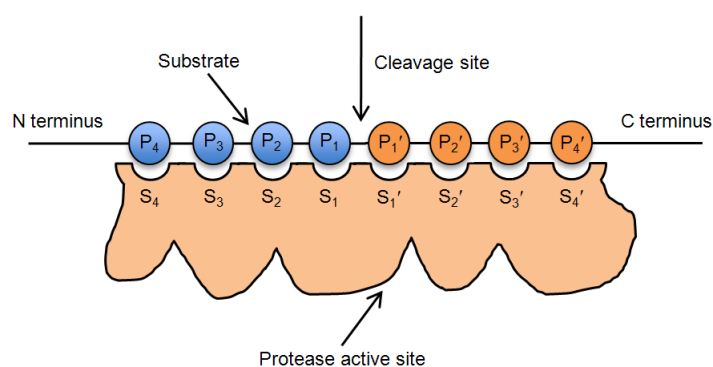
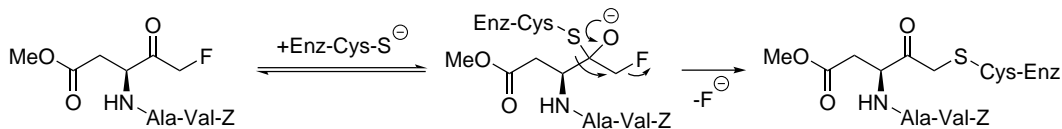


Abbildung 1.4.: Schematische Darstellung der Bindungstaschen einer Protease, besetzt durch ein Polypeptid als Substrat nach *Schechter und Berger*.^[50]

1.2.1. Kovalent-irreversible Inhibitoren

Halomethylketone

Halomethylketone sind eine Gruppe kovalent-irreversibler Proteaseinhibitoren. Sie liegen meist als Di- oder Tripeptid vor, welches einen geschützten N-Terminus besitzt und an dessen C-Terminus sich ein Halomethylketon befindet. Üblicherweise ist das Halogen Fluor oder Chlor. Ihre hohe chemische Reaktivität führt zu einer geringen Spezifität, da nicht nur andere Thiole wie Glutathion oder Cysteine als Nukleophil reagieren können, sondern auch z.B. Serinproteasen wie β -Chymotrypsin. Durch Variation der enthaltenen Aminosäuren kann deren Selektivität jedoch erhöht werden. Dennoch sind Halomethylketone nicht für *in vivo*-Anwendungen geeignet, sondern dienen der Erforschung weiterer Funktionen verschiedener Serin- und Cysteinproteasen. Der Mechanismus besteht aus einem nukleophilen Angriff des Thiolats auf den Carbonylkohlenstoff aus dem ein tetraedrisches Zwischenprodukt hervorgeht. Dieses setzt sich unter Eliminierung des Halogens zum finalen Produkt, dem kovalent modifizierten Enzym, um. (Schema 2)^[51,52]

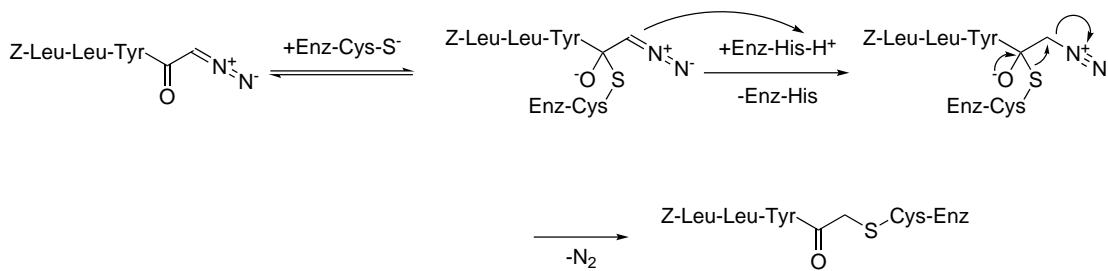


Schema 2: Inhibition einer Cysteinprotease durch das Z-VAD(OMe)-Fluormethylketon, einem irreversiblen Caspase-Inhibitor.

Diazomethylketone

Diazomethylketone sind ebenfalls kovalent-irreversible Proteaseinhibitoren. Sie ähneln der vorherigen Gruppe, da sie anstelle des Halogens eine Diazogruppe tragen. Im Gegensatz zu den Halomethylketonen wurde von Shaw *et al.* eine pH-Abhängigkeit beobachtet, wobei die Aktivität als Inhibitor mit sinkendem pH-Wert zunimmt.^[53] Die Autoren führten die pH-Abhängigkeit auf die zunehmende Protonierung des Thiols im Säuren zurück. Eine ähnliche Abhängigkeit wurde von Buchanan *et al.* für den Fall von Azaserin, einer natürlich vorkommenden Diazo-Form des Serins, beobachtet. Azaserin besitzt eine antibiotische Wirkung, die auf der Alkylierung der Glutamin Amidotransferase beruht.^[54] Die Reaktivität der Diazomethylketone ist verglichen mit den Halomethylketonen geringer, sodass sie nicht mit Serinproteasen reagieren. Auch freie Thiole sind ihnen gegenüber unreaktiv. Wie bei der vorherigen Gruppe kann durch gezielte Veränderungen der Aminosäuren eine höhere Selektivität erreicht werden. Obwohl eine Wirksamkeit gegen Formen von *T. brucei* und verschiedene *Streptokokken* gezeigt werden konnte, verhindert die Toxizität gegenüber Embryonen eine klinische Anwendung.^[55,56] Der Inhibitionsmechanismus ist in Schema 3 gezeigt und verläuft ebenfalls über ein tetraedrisches Intermediat. Dieses entsteht durch Angriff des Thiolats

1. | Einleitung

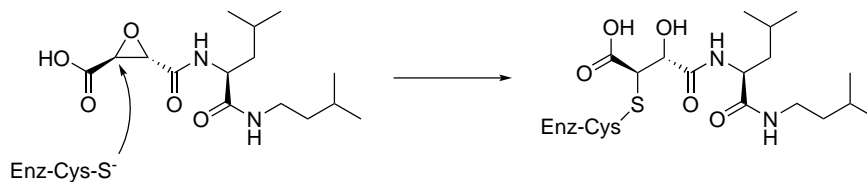


Schema 3: Mechanismus der Reaktion des Diazomethylketons Z-Leu-Leu-Tyr-CH₂N₂, einem Calpain-1 Inhibitor, mit einer Cysteinprotease unter Abspaltung von Stickstoff.

auf den Carbonyl-Kohlenstoff und wird durch das im aktiven Zentrum vorliegende Imidazolium protoniert. Anschließend wird Stickstoff abgespalten und das alkylierte Enzym gebildet.

Epoxide oder Epoxysuccinate

Epoxysuccinate spielen spätestens seit der Entdeckung von E-64 eine wichtige Rolle.^[57] E-64 ist ein Cysteinproteaseinhibitor mit einer Selektivität für Cysteinproteasen der Papain-Familie. Er wurde 1977 im Gießkannenschimmel *Aspergillus japonicus* entdeckt und reagiert unter physiologischen Bedingungen nicht mit freien Thiolen. Eine weniger hydrophile Variante des Moleküls (E-64c,



Schema 4: Inhibition einer Papain-ähnlichen Protease durch das peptidische, von E-64 abgewandelte Epoxid E-64c.

Schema 4) und dessen Ethylester (E-64d, als Prodrug) wurden gegen Muskeldystrophie entwickelt und schafften es bis in die klinische Phase III.^[58] Allerdings wurden die Versuche aufgrund von niedriger Effizienz und zahlreicher Nebenwirkungen wie Leberschädigung oder einer teratogenen Wirkung gestoppt.^[59] Strukturelle Merkmale der Epoxysuccinate sind das *trans*-konfigurierte Epoxid sowie die *L*-konfigurierte Aminosäure. Ausgehend von E-64 wurden verschiedenste Moleküle synthetisiert, bei denen die freie Säure am Epoxid oder auch der peptidische Teil modifiziert wurden, um eine höhere Selektivität zu erhalten. Vorteilhaft bei diesen Molekülen ist die hohe Stabilität unter physiologischen Bedingungen und die bereits genannte Selektivität für Cysteinproteasen. Der Mechanismus der Inhibition ist in Schema 4 gezeigt und verläuft über einen Angriff des Thiolats am C-2 oder C-3 Kohlenstoff des Epoxids unter Ringöffnung. Welcher Kohlenstoff angegriffen wird, hängt u.a. davon ab, mit welcher Orientierung der Inhibitor im aktiven Zentrum des Enzyms liegt.^[60]

Aziridine

Eine logische Konsequenz war die Entwicklung der Aziridin enthaltenden Aza-Analoga ausgehend von den Epoxysuccinaten.

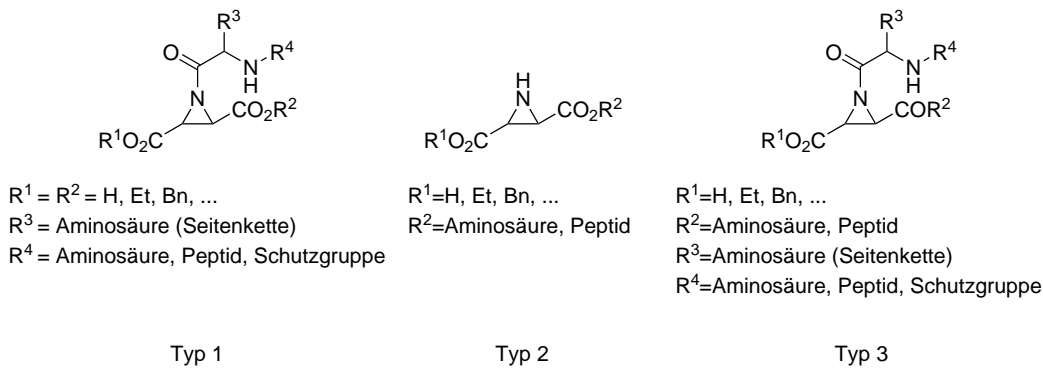


Abbildung 1.5.: Die drei Typen der Aziridin-basierten Proteaseinhibitoren.

Diese sind im direkten Vergleich die schwächeren Inhibitoren, was sich unter anderem auf die geringere Ringspannung, erhöhte Basizität oder vorhandene H-Brücken zurückführen lässt. Allerdings bietet der zusätzliche Stickstoff weitere Möglichkeiten zur Derivatisierung. Generell können Aziridin-Inhibitoren in drei Typen eingeteilt werden. Typ 1 ist am Aziridin-Stickstoff acyliert und der Ring befindet sich am C-Terminus einer Aminosäure oder eines Peptids. Typ 2 ist N-unsubstituiert und sitzt am N-Terminus einer Aminosäure oder eines Peptids. Bei Typ 3 befindet sich das Aziridin innerhalb einer Peptidkette (Abbildung 1.5).^[61] In der Natur kommen einige Aziridine vor. Ein

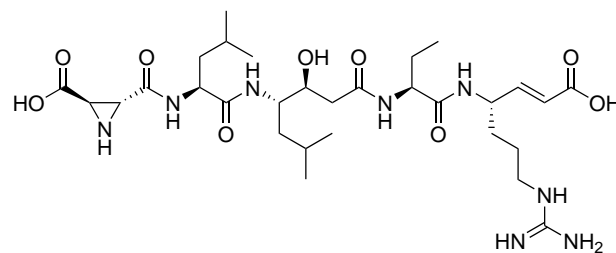


Abbildung 1.6.: Der Proteaseinhibitor Miraziridin A aus dem Schwamm *Theonella mirabilis*, der als Warhead sowohl ein Aziridin, als auch eine aktivierte Doppelbindung enthält.

Beispiel hierfür sind die Aziridin-2,3-dicarbonsäuren, die aus einer Art der *Streptomyces* isoliert werden konnten.^[62] Ein weiteres Beispiel eines natürlich vorkommenden Cysteinproteaseinhibitors ist Miraziridin A aus dem Schwamm *Theonella mirabilis* (Abbildung 1.6).^[63] Dieser ist wirksam gegen Cathepsin B und enthält neben der substituierten Aziridin-2,3-dicarbonsäure eine aktivierte Doppelbindung, die für die Hemmung der Protease mitverantwortlich sein kann. Weitere Aziridin-basierte Inhibitoren wurden synthetisiert und zeigten unter anderem Selektivität für eine Cysteinprotease

von *Leishmania mexicana*, dem Erreger der Leishmaniose in Mexiko und Zentralamerika.^[64] Wie bei den Epoxysuccinaten erfolgt der Angriff des Thiols an C-2 oder C-3 des Aziridinrings.

Vinylsulfone und andere Michael-Akzeptoren

Einer der ersten Inhibitoren auf Basis eines Michael-Akzeptors war das Fumarsäure-Derivat von E-64c. Dabei wurde das Epoxid durch ein Fumarat ersetzt und so ein irreversibler Cathepsin B-Inhibitor erhalten.^[65] Weitere mögliche Inhibitoren auf Basis von Michael-Akzeptoren sind α,β -ungesättigte Carbonyle oder auch Vinylsulfone, wie K11777, die sich durch ihre gute Zugänglichkeit auszeichnen (Abbildung 1.7).

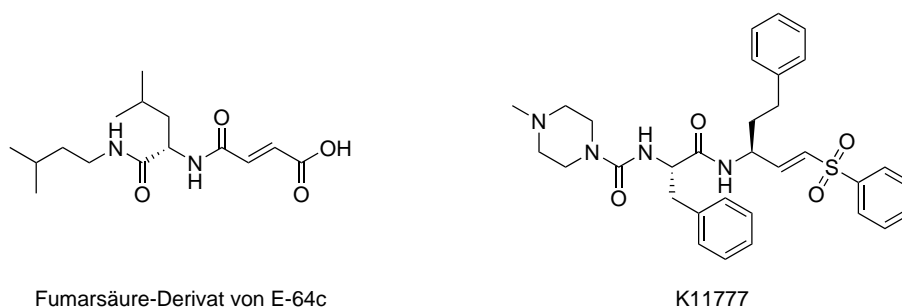
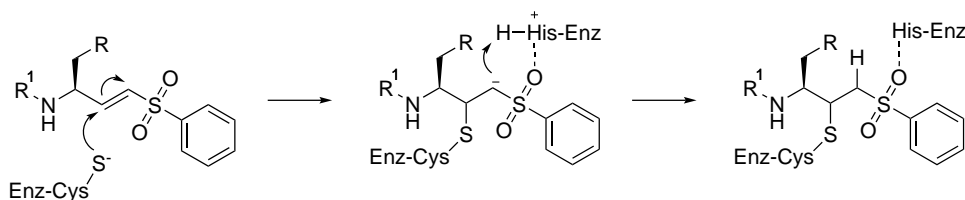


Abbildung 1.7.: Zwei irreversible Proteaseinhibitoren: links, das Fumarsäurederivat des Epoxids E-64c (vgl. Schema 4); rechts, das Vinylsulfon K11777.

Ein Vorteil der Vinylsulfone ist die Möglichkeit, beide Enden des Moleküls zu modifizieren und die Inhibitoren auf diese Weise spezifischer zu machen. Außerdem reagieren sie entweder gar nicht mit Serinproteasen oder sind nur schwache Inhibitoren. Der Mechanismus der Inhibition, dargestellt in Schema 5, basiert auf einer Michael-Addition an die Doppelbindung. Stärker elektronenziehende Gruppen führen zu einer schnelleren Reaktion und damit zu einer höheren Inhibitionsrate. Kürzlich zeigten Schirmeister *et al.*, dass eine Substitution an der Doppelbindung einen großen Einfluss auf den Inhibitionsmechanismus haben kann. Der in 1-Position fluorierte Inhibitor K11777 zeigt entgegen dem nicht-fluorierten Inhibitor eine reversible Inhibition.^[66]



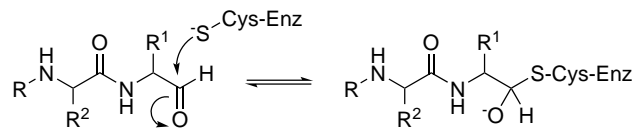
Schema 5: Inhibitionsmechanismus für den Fall der irreversiblen Hemmung mit unmodifizierten Vinylsulfonen (R= Aryl, Alkylkette, R¹= Aminosäuresequenz).

1.2.2. Kovalent-reversible Inhibitoren

Eine weitere Gruppe bilden die kovalent-reversiblen Inhibitoren. Bei dieser Art der Inhibition entsteht nur eine schwache kovalente Bindung, die wieder in ihre Ausgangsstoffe zurück reagieren kann. Kovalent-reversible Inhibitoren teilen Vorteile mit den kovalent-irreversiblen wie z.B. die lange Verweildauer am Enzym, ohne deren potentiell toxische Nebenwirkungen aufzuweisen.

Peptidylaldehyde

Eine Gruppe reversibler Proteaseinhibitoren sind die Peptidylaldehyde, die zum einen in der Gattung *Streptomyces* gefunden wurden und Calpain sowie andere Proteasen inhibieren.^[67] Zum anderen wurden weitere Peptidylaldehyde entwickelt, um den tetraedrischen Übergangszustand anderer Inhibitoren zu imitieren und so eine hohe Inhibierung zu erreichen.^[68] Die Anpassbarkeit der Aminosäuren in R¹- und R²-Position zur Steigerung der Selektivität ist zwar ein großer Vorteil, dennoch überwiegen die Nachteile, die den klinischen Einsatz verhindern. Zu diesen Nachteilen gehören die hohe Reaktivität der Aldehyde, die dafür sorgt, dass auch Serinproteasen wie Trypsin oder Thrombin inhibiert werden, Oxidations- und Reduktionsreaktionen oder die pH-abhängige Hydratisierung. Allerdings werden sie in der Forschung als Calpain-Inhibitoren eingesetzt. Dabei verläuft der Mechanismus im Fall von Cysteinproteasen über ein Hemithioacetal, im Fall von Serinproteasen über ein Halbacetal (Schema 6).

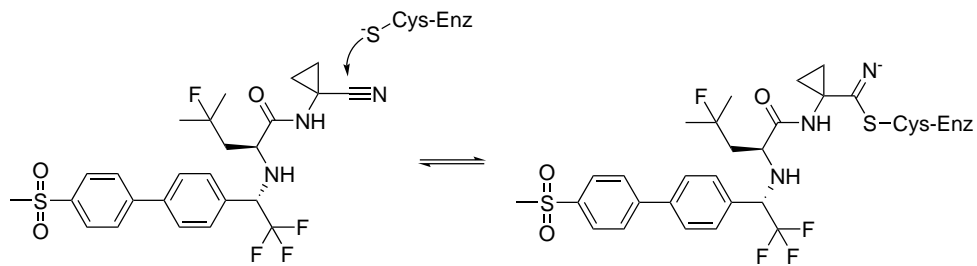


Schema 6: Mechanismus der Inhibition im Fall eines Peptidylaldehyds. R¹ und R² bezeichnen die einzelnen Aminosäurereste.

Nitrile

Ein Nitril als reaktiver Warhead ist eine weitere Möglichkeit zur reversiblen Inhibition, denn das dabei entstehende Isothioamid kann zu den Ausgangsstoffen zurück reagieren. Die Anbindung des Nitrils im Inhibitor kann über unterschiedliche Weisen erfolgen. Es existieren Inhibitoren mit einer Cyanomethyleneinheit, 2- oder N-Cyanopyrrolidine oder auch 1,3,5-Triazin-2-carbonitrile, die Cathepsin L, K oder B inhibieren.^[69–72] Ein Beispiel für einen Inhibitor mit Nitrilwarhead stellt Odanacatib dar (Schema 7). Diese Substanz wurde von der Firma MSD entwickelt und sollte gegen Osteoporose und Knochenmetastasen eingesetzt werden.^[73] Die Entwicklung wurde jedoch 2016 aufgrund eines erhöhten Risikos für Schlaganfälle eingestellt.

Höhere Reaktivität als Nitrile gegenüber nukleophiler Addition besitzen die Carbodiimide, die als Serinproteaseinhibitoren Anwendung finden.



Schema 7: Inhibitionsmechanismus von Odanacatib am Beispiel einer Cysteinprotease.

Weitere reversible Inhibitoren

Weitere bekannte kovalent-reversible Inhibitoren sind die Gruppe der Semicarbazone. Diese wurden bei der Synthese der entsprechenden Aldehyde entdeckt, besitzen aber meist eine niedrigere Wirksamkeit. Allerdings haben sie auch den Vorteil, dass man an beiden Enden des Moleküls derivatisieren und so die *primed-* als auch die *non-primed-site* adressieren kann. Ähnliche Eigenschaften besitzen die analogen Thiosemicarbazone, die in vielen Fällen allerdings potenter sind.^[74,75] Der

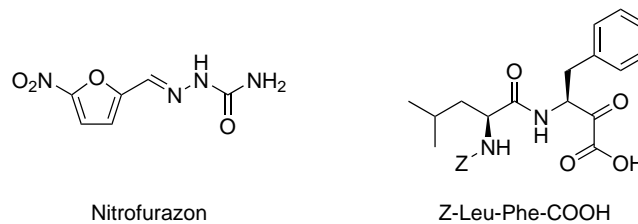


Abbildung 1.8.: Nitrofurazon, ein antibiotisches Nitrofuran und Semicarbazon, das bei der Behandlung einer Trypanosomiasis eingesetzt werden kann und die peptidische α -Ketosäure Z-Leu-Phe-COOH, ein Calpain-Inhibitor.

Inhibitionsmechanismus ist nicht genau bekannt. Vermutlich läuft er über eine Addition an die Doppelbindung des Semicarbazons. Allerdings wurde ebenfalls ein Mechanismus postuliert, bei dem das Semicarbazon als Prodrug fungiert und erst durch Hydrolyse die aktive Spezies, den Aldehyd, freisetzt.^[76]

Eine weitere Gruppe von Inhibitoren sind die α -Keto-Verbindungen.^[77] Dazu gehören α -Keto-Carbonsäuren, -Ester, -Amide oder auch -Heterocyclen. Sie besitzen alle eine elektrophile Stelle für den Angriff des Nucleophils aus Cystein-, Serin- oder Threoninproteasen. Dabei kann sich durch den Angriff ein tetraedrischer Übergangszustand bilden. Durch die Substitution des Aldehyd-Warheads durch eine α -Keto-Gruppe in Calpain-Inhibitoren wurden einige neue potente Substanzen entwickelt und die Unterschiede zwischen ihnen studiert. So zeigte sich, dass α -Ketosäuren wahrscheinlich durch eine H-Brückenbindung zum Histidin potenter sind als die analogen α -Ketoamide oder -ester (Abbildung 1.8).

1.2.3. Vergleich zwischen kovalent-reversiblen und kovalent-irreversiblen Inhibitoren

Die bisher gezeigten Inhibitoren gehören alle zu der Gruppe der kovalenten Hemmstoffe. Dem gegenüber steht die Gruppe der nicht kovalenten Inhibitoren, die weitaus verbreiteter sind und häufiger als Arzneimittel eingesetzt werden. Jede dieser Gruppen hat individuelle Vor- und Nachteile und kann jeweils in reversible und irreversible Inhibitoren unterteilt werden. Zu den Vorteilen der irreversible kovalenten Inhibitoren gegenüber reversiblen nicht-kovalenten Inhibitoren zählen vor allem die theoretisch unendlich große Verweildauer des Inhibitors am Enzym. Um die Enzymaktivität wieder herzustellen muss das Enzym abgebaut und neu gebildet werden, was eine geringe Dosierung ermöglicht. Außerdem ist die Wahrscheinlichkeit eines Wirkverlustes durch Mutationen des Enzyms im Falle irreversibler Inhibitoren niedriger als für reversible. Zielstrukturen, die eine wenig ausgeprägte Bindungstasche aufweisen und daher für klassische Inhibitoren als *undruggable* gelten, können unter Umständen durch Inhibitoren mit kovalentem Warhead adressiert werden.^[78]

Da sich diese Arbeit mit der Synthese und Testung kovalenter Inhibitoren auseinandersetzt, soll im folgenden auf die Unterschiede zwischen kovalent-reversiblen und kovalent-irreversiblen Inhibitoren eingegangen werden.

Grundsätzlich gibt es Bedenken gegenüber irreversiblen Hemmstoffen, die allerdings in den letzten Jahren abgenommen haben. Die daraus resultierende ablehnende Haltung ist zum Teil auf die Risiken einer *off-target* Reaktion des elektrophilen Warheads mit anderen Proteinen oder freien Nukleophilen wie z.B. Glutathion zurückzuführen. Ein anderer Kritikpunkt ist die Möglichkeit des Auslösens einer Immunantwort durch kovalent modifizierte Bruchstücke des abgebauten Enzyms. Zwar wurden seit Ende des 19. Jahrhunderts mit der Entdeckung von Acetylsalicylsäure viele kovalente Wirkstoffe entwickelt und eingesetzt, jedoch war deren Mechanismus teilweise nicht bekannt oder wurde erst nach der Zulassung aufgeklärt.^[79] Mittlerweile ist die Akzeptanz für kovalent-irreversible Inhibitoren wieder gestiegen, da ihre Vorteile erneut in den Fokus gerückt sind. Die Gefahr der idiosynkratischen Toxizität ist nicht wesentlich höher als bei klassischen reversiblen Inhibitoren und andere Faktoren wie die Dosis spielen eine größere Rolle.^[80,81] Die Gefahr von *off-target* Reaktionen kann zudem durch eine gezielte Strukturoptimierung minimiert werden.^[82] Außerdem können manche kovalent-irreversible Inhibitoren durch Modifikationen gezielt in kovalent-reversible Inhibitoren umgewandelt werden, die nur eine schwache kovalente Bindung aufbauen und daher zu den Ausgangsstoffen zurück reagieren können. Dies geschieht im Fall von Vinylsulfonen, die durch das Anbringen eines Fluors in 1-Position der Doppelbindung eine langsame reversible Inhibition zeigen.^[66] Die erhaltenen Inhibitoren sollen die Vorteile beider Arten verbinden, also die hohe Potenz sowie ein geringes Risiko einer Toxizität.

Von Thomas A. Baillie wurden drei Punkte formuliert, die für eine Verringerung der Toxizitätsrisiken bei kovalenten Inhibitoren eingehalten werden müssen.^[83] 1. Daten zeigen, dass *off-target* Bindungen zu einem größeren Toxizitätsrisiko führen können. Daher sollten diese minimiert werden.

Dies wird durch die Optimierung des nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex und durch den Einsatz von Bioinformatik, um die Platzierung des Warheads zu optimieren, erreicht.^[84] 2. Eine geringe Dosis sollte beibehalten werden. Die „Körperlast“ an Wirkstoff und Abbauprodukten sollte so gering wie möglich gehalten werden, da eine Dosierung von weniger als 10 mg/Tag nur bei sehr wenigen Arzneimitteln in Verbindung mit ernsthaften Toxizitäten gebracht wurden.^[85] 3. Die Möglichkeit zur Bildung reaktiver Metaboliten sollte ebenfalls so gering wie möglich gehalten werden. Dies wird durch das Ausschließen von Wirkstoffkandidaten erreicht, die anfällig für metabolische Aktivierung sind.^[86,87] Daraus schlussfolgert er: „An diesem Punkt scheint es daher vernünftig zu folgern, dass hoch selektive, niedrig dosierte *targeted covalent inhibitors* (TCIs), die keine metabolische Aktivierung erfahren, Sicherheitsprofile zeigen sollten, die denen konventioneller, nichtkovalenter Wirkstoffe gleichkommen, während sie gleichzeitig eine Reihe therapeutischer Vorteile bieten, die mit ihrer Bindungsweise über eine Nicht-Gleichgewichtsreaktion zusammenhängen.“^[83]

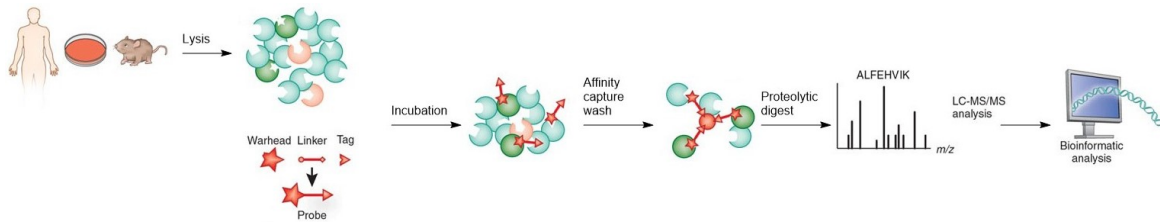
1.3. Chemische Proteomik

In Abschnitt 3.4 wurden Inhibitoren für die markierungsfreie chemische Proteomik synthetisiert, daher soll im Folgenden erklärt werden, wozu diese Hemmstoffe eingesetzt werden können.

Die Endung -omik wird bei Begriffen verwendet, bei denen nicht nur einzelne Felder des betroffenen Systems untersucht werden, sondern die Gesamtheit aller enthaltenen Teilbereiche. Beispiele hierfür sind die Genomik, die Metabolomik und eben auch die Proteomik. Diese befasst sich mit der Analyse des Proteoms, welches für die Gesamtheit aller Proteine einer Zelle oder eines Lebewesens steht. Bei dem Proteom handelt es sich außerdem um ein dynamisches System, das sich durch die Stimulation durch Hormone, Umwelteinflüsse, Krankheiten oder Medikamente stetig ändert. Daher ist für die Proteomik auch der Zustand des Proteoms zu einem bestimmten Zeitpunkt entscheidend. Das Ziel der Proteomik ist es die biologischen Systeme tiefgehend zu untersuchen und die Funktionen der verschiedenen Proteine zu erfassen.

Die affinitätsbasierte Proteomik (engl. activity-based probe profiling, ABPP) macht sich die Reaktivität der zu beobachtenden Enzyme zunutze. Dabei wird eine Affinitätssonde in das System eingebracht. Die Sonde enthält einen reaktiven elektrophilen Warhead, der mit den zu untersuchenden Enzymen reagiert. Als Warhead können verschiedene Gruppen eingesetzt werden, wie zum Beispiel Epoxide oder β -Lactone. Des Weiteren enthält die Sonde einen Linker, der die reaktive Kopfgruppe mit der funktionellen Gruppe verbindet. Zum Einsatz als Linker können unter anderem Alkyl- oder Polyethylenglycolketten kommen.^[88,89] Die funktionelle Gruppe soll entweder die untersuchten Proteine aus der komplexen Mischung detektierbar machen, etwa durch einen Fluoreszenz-Farbstoff, oder sie dient dazu die Proteine aus der Mischung zu entfernen und anzureichern um sie anschließend genauer zu betrachten. Für diese Methode kommen Azide oder Biotin zum Einsatz.^[90] Erstere lassen sich in einer dipolaren Cycloaddition mit Alkinen verknüpfen, Biotin

hingegen zeigt eine starke Affinität zu Avidin. So kann der Enzym-Substrat-Komplex angereichert oder an eine Matrix angebunden werden (Schema 8).



Schema 8: Schematische Darstellung des Arbeitsablaufs in der chemischen Proteomik.^[91]

Der Arbeitsablauf der chemischen Proteomik beginnt mit der Inkubation der Affinitätssonde mit dem Zelllysate oder der intakten Zelle. Nachdem der Warhead mit den Zielmolekülen reagiert hat, wird die funktionelle Gruppe an einer Matrix befestigt, um nicht reagiertes Zellmaterial durch Waschen zu entfernen. Eine anschließende Verdauung durch Trypsin führt zu Proben, die per LC-MS analysiert werden können.

2. Zielsetzung und Motivation

Cysteinproteasen spielen eine wichtige Rolle bei vielen bekannten Krankheiten. Die humanen Cathepsine beispielsweise stehen in Verbindung mit der Entstehung von Krebs, Alzheimer, Osteoporose oder auch rheumatoider Arthritis.^[92–94] Eine Überexpression führt zu den genannten Krankheitsbildern, weshalb die Entwicklung neuer spezifischer Inhibitoren dieser Proteasen ein wichtiges Forschungsgebiet ist.

Rhodesain, ebenfalls eine Cysteinprotease der Papainfamilie, ist die Cathepsin L-ähnliche Protease des Parasiten *T. b. rhodesiense*, der Erreger der Ostafrikanischen Schlafkrankheit. Auch in diesem Fall stellt die Inhibierung der Protease einen Therapieansatz dar, da sie für den Erreger ein essenzielles Enzym ist.

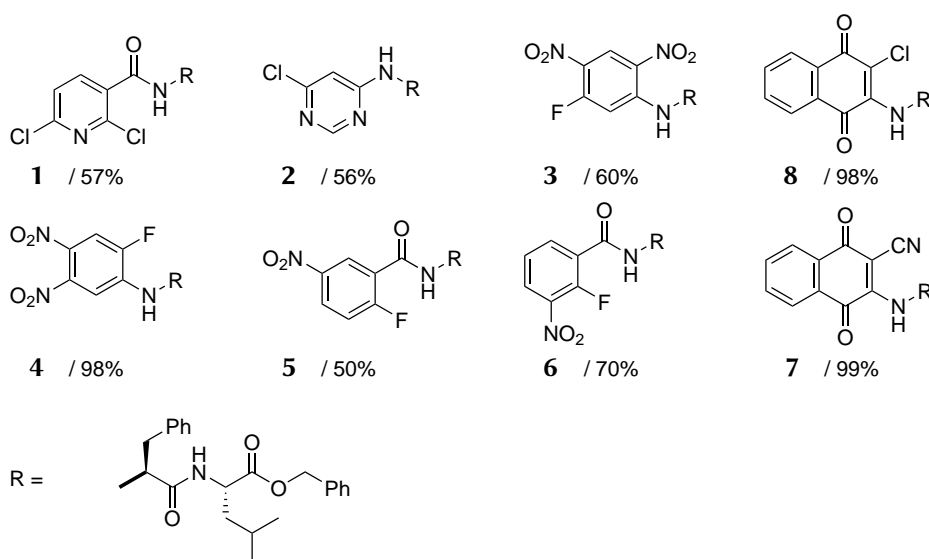


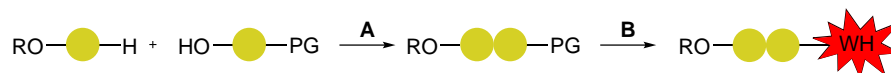
Abbildung 2.1.: In der Arbeitsgruppe Opatz synthetisierte Inhibitoren mit Angabe der prozentualen Inhibition von Cathepsin L bei einer Inhibitorkonzentration von 20 μM .^[95]

Elektrophile Aromaten können mit Nucleophilen zu π -Komplexen, zu Meisenheimerkomplexen oder zu den Produkten einer nucleophilen aromatischen Substitution reagieren. Daher können sie als aktive Kopfgruppe eines Proteaseinhibitors, ein sogenannter Warhead, eingesetzt werden um die Proteasen kovalent zu inhibieren. Die Möglichkeit, Cysteinproteasen mittels eines Inhibitionsmechanismus, der auf einer nucleophilen aromatischen Substitution basiert, kovalent zu hemmen, wurde

2. | Zielsetzung und Motivation

in der Literatur jedoch nur selten gezeigt.^[96–99] Aufgrund dessen wurden in der Arbeitsgruppe Opatz bereits Inhibitoren basierend auf diesem Struktur- und Inhibitionsmotiv eigens hergestellt.^[95]

Diese Hemmstoffe bestanden aus einer Erkennungssequenz auf Basis des Dipeptids Phenylalanin-Leucin und einem elektrophilen Aromaten, Heteroaromaten oder Naphthochinonderivat als Warhead. Die Strukturen der erhaltenen Inhibitoren sind in Abbildung 2.1 dargestellt. Die von der Gruppe [REDACTED] ermittelte prozentuale Hemmung von Cathepsin L bei einer Inhibitorkonzentration von 20 μM ist ebenfalls angegeben. Basierend auf diesen Ergebnissen sollte an den stärksten Inhibitoren (4, 7 und 8) weiter geforscht werden. Dabei sollte vor allem untersucht werden, ob es sich um eine kovalente oder nicht-kovalente, sowie die für beide Arten mögliche reversible oder nicht-reversible, Inhibition handelt. Darüber hinaus sollte der Einfluss der C-terminalen Schutzgruppe auf die Inhibition erörtert werden, indem verschiedene Schutzgruppen angebracht werden sollten. Die neuen Inhibitoren sollten nach demselben Schema, das bereits in der Arbeitsgruppe etabliert wurde, aufgebaut sein und die Synthese sollte ebenfalls über die gleichen Schritte verlaufen. In Schema 9 ist das Syntheschema dargestellt.^[95]



Schema 9: Schema der Inhibitorsynthese (gelb: Aminosäuren, rot: Warhead). Schritt A stellt die Carbodiimid-vermittelte Kupplung der Aminosäuren dar, Schritt B entspricht der *in situ* Entschützung des N-Terminus und anschließender Umsetzung mit dem Warhead um den fertigen Inhibitor zu erhalten.

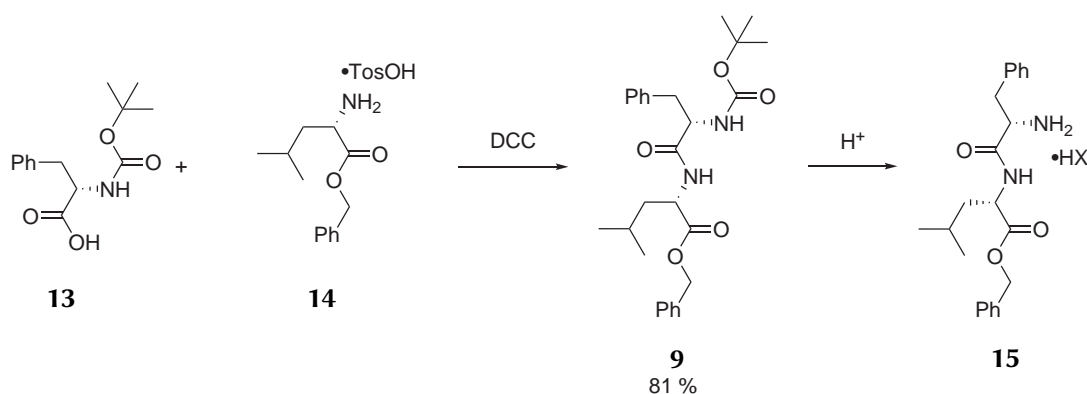
Darüber hinaus sollten weitere Eigenschaften und Funktionen der Inhibitoren mithilfe anderer Arbeitsgruppen untersucht werden. In der Arbeitsgruppe [REDACTED] sollten die Hemmwerte ermittelt, sowie Untersuchungen zu Selektivität und Inhibitionsmechanismus durchgeführt werden. Die Arbeitsgruppe Engels sollte dazu unterstützend quantenmechanische Rechnungen zu möglichen Reaktionsmechanismen durchführen. In der Arbeitsgruppe [REDACTED] sollten massenspektrometrische Messungen zu Rhodesain sowie mit Wirkstoff inkubiertem Rhodesain angefertigt werden und die Arbeitsgruppe [REDACTED] sollte die anti-trypanosomale Aktivität bestimmter Substanzen bestimmen.

3. Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Inhibitorensynthese dargestellt und diskutiert. Der erste Syntheseschritt war die Kupplung der einfach geschützten Aminosäuren um das gewünschte Dipeptid, das später als Erkennungssequenz genutzt werden sollte, zu erhalten. Anschließend wurde der N-Terminus deblockiert, damit das freie Amin in einer weiteren Reaktion mit den verschiedenen aromatischen Warheads im Zuge einer nukleophilen aromatischen Substitution (S_NAr) verknüpft werden konnte.

3.1. Synthese der Dipeptide

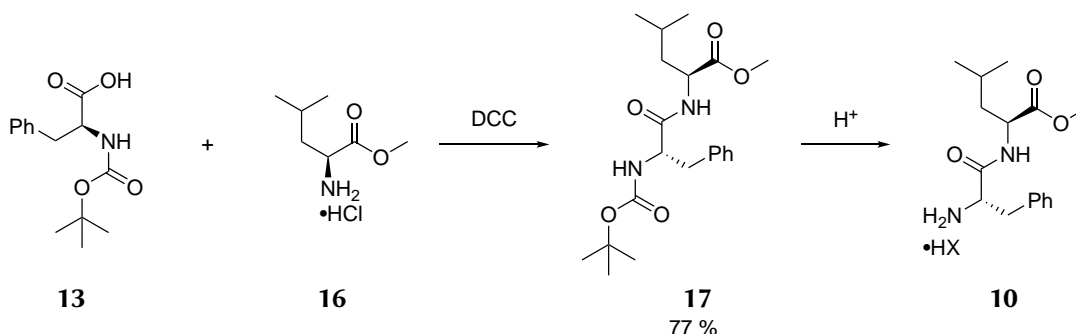
Durch die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen war bereits bekannt, dass das Dipeptid Phenylalanin-Leucin (Phe-Leu), welches schon in der Arbeitsgruppe Opatz verwendet wurde, eine geeignete Erkennungssequenz für Cysteinproteaseinhibitoren darstellt.^[100-102] Neben dem bereits bekannten Dipeptid Boc-Phe-Leu-OBn (**9**, Schema 10) sollten außerdem die -OMe und -^tBu geschützten Derivate (**10** und **11**, Schema 11 und Schema 12), sowie das C-terminal ungeschützte Dipeptid (**12**, Schema 13) hergestellt werden, um die Auswirkungen der installierten Schutzgruppe zu untersuchen.



Schema 10: Bereits in der Arbeitsgruppe Opatz durchgeführte Synthese von Benzyl(*tert*-butoxycarbonyl)-L-phenylalanyl-L-leucinat **9** und anschließende Deblockierung. Wie in anderen Beispielen wurde die Peptidkupplung mit DCC, die anschließende Deblockierung im sauren Milieu durchgeführt. X=Cl⁻ **15a** oder TFA⁻ **15b**.

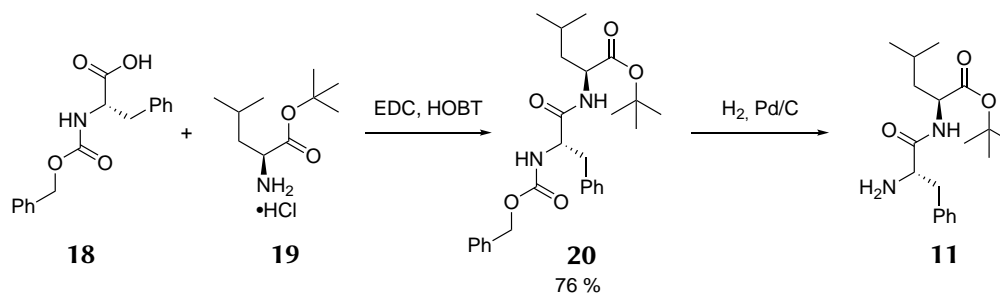
3. | Ergebnisse und Diskussion

Wie in Kapitel 2 beschrieben, wurde in der Arbeitsgruppe das doppelt geschützte Dipeptid Boc-Phe-Leu-OBn (**9**) nach Lawesson *et al.* in 81 % Ausbeute dargestellt.^[95] Die Synthese basierte auf der DCC-vermittelten Kupplung der beiden einseitig geschützten kommerziell erhältlichen Aminosäuren. Eine darauffolgende saure Entfernung der Boc-Gruppe führte zum freien Amin, das ohne weitere Reinigung mit dem gewünschten Warhead umgesetzt wurde und bereits in der Arbeitsgruppe Opatz etabliert wurde (Schema 10).^[95]



Schema 11: Synthese von Methyl(*tert*-butoxycarbonyl)-L-phenylalanyl-L-leucinat **10** über eine DCC vermittelte Peptidkupplung und anschließende Deblockierung des N-Terminus zur weiteren Umsetzung. X=Cl⁻ **10a** oder TFA⁻ **10b**.

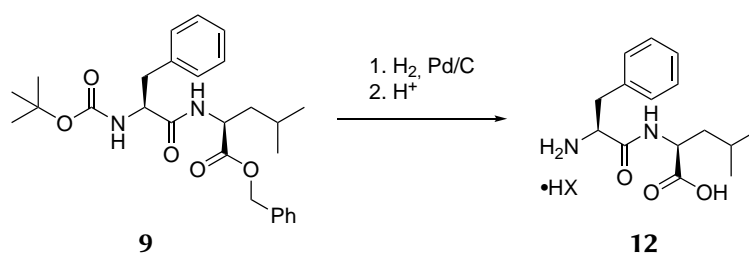
Die Synthese des Boc-geschützten Methylesters (Boc-Phe-Leu-OMe, **17**) gelang über die Kupplung von Leucin Methylester-Hydrochlorid (**16**) mit Boc-Phenylalanin (**13**) mit einer Ausbeute von 77 %. Die darauffolgende Deblockierung des N-Terminus erfolgte entweder mit TFA in DCM (1:2) oder HCl in 1,4-Dioxan (4 M), sodass das freie Amin (H-Phe-Leu-OMe•TFA, **10b**) als Salz vorlag und ohne weitere Reinigung weiter eingesetzt wurde (Schema 11).



Schema 12: EDC vermittelte Kupplung um *tert*-Butyl((benzyloxy)carbonyl)-L-phenylalanyl-L-leucinat **20** zu erhalten und anschließende hydrogenolytische Spaltung der Cbz-Schutzgruppe.

Für das am C-Terminus *tert*-Butyl-geschützte Dipeptid (Cbz-Phe-Leu-O^tBu, **20**) musste ein Umweg über die Cbz-Schutzgruppe gegangen werden, um eine saure Deblockierung auszuschließen, bei der der Ester hydrolysiert werden könnte. Das Produkt konnte nach Kupplung von Cbz-geschütztem Phenylalanin (**18**) mit Leucin *tert*-Butylester-Hydrochlorid (**19**) unter Einwirkung von EDC mit

76 % Ausbeute erhalten werden. Im nächsten Schritt wurde die Cbz-Schutzgruppe hydrogenolytisch entfernt, um das Amin (H-Phe-Leu-O^tBu, **11**) zu erhalten (Schema 12). Da eine Entschützung des C-Terminus am finalen Inhibitor mittels Schweinepankreaslipase (engl.: porcine pancreatic lipase, PPL) nicht möglich war, wurde ebenfalls das beidseitig ungeschützte Dipeptid (H-Phe-Leu-OH, **12**) benötigt. Ausgehend von vorhandenem Boc-Phe-Leu-OBn (**9**) wurde zuerst hydrogenolytisch mit Palladium auf Aktivkohle (Pd/C) in einer Wasserstoffatmosphäre die Benzylgruppe entfernt. Das C-terminal ungeschützte Peptid wurde in quantitativer Ausbeute erhalten und war bei Raumtemperatur über mehrere Wochen lagerbar. Anschließend wurde wie zuvor mit TFA in DCM oder HCl in Dioxan die Boc-Gruppe unmittelbar vor der weiteren Verwendung entfernt (Schema 13).



Schema 13: Beidseitige Deblockierung des Dipeptids Boc-Phe-Leu-OBn. X=Cl⁻ **12a** oder TFA⁻ **12b**.

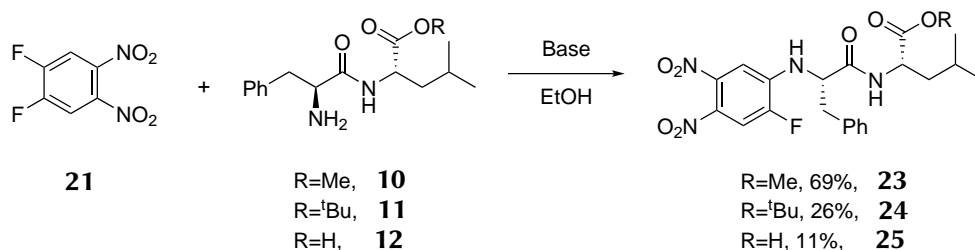
Um die gewünschten Inhibitoren zu erhalten, sollten die Amine (H-Phe-Leu-OMe•HX **10**, H-Phe-Leu-O^tBu **11**, H-Phe-Leu-OH•HX **12** und H-Phe-Leu-OBn•HX **15**) im nächsten Schritt mit den potentesten aus vorherigen Inhibitorsynthesen bekannten Warheads verknüpft werden. Dies sollte über den freien N-Terminus des Dipeptids geschehen. Da die gewünschten Warheads verschiedene Fluor-Nitroaromaten waren, sollte die Verknüpfung über eine nukleophile aromatische Substitution erfolgen. Diese Reaktion hatte sich in den Vorarbeiten in mehreren Beispielen als praktikabel erwiesen.

3.2. Inhibitoren mit aromatischem elektrophilen Warhead

3.2.1. Synthese der Inhibitoren mit aromatischem elektrophilen Warhead

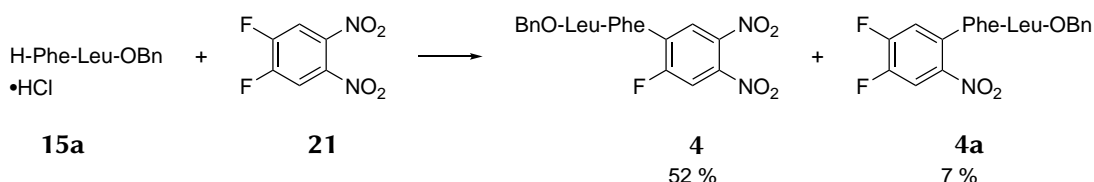
Die Peptide aus dem vorigen Abschnitt sollten im folgenden Schritt mit 1,2-Difluor-4,5-dinitrobenzol (**21**) und 1-Fluor-3,4-dinitrobenzol (**22**) in einer nukleophilen aromatischen Substitution umgesetzt werden, um die gewünschten Inhibitoren **23**, **24** und **25** zu erhalten (Schema 14). 1,2-Difluor-4,5-dinitrobenzol (**21**) wurde durch Nitrierung von 1,2-Difluorbenzol synthetisiert.^[95] 1-Fluor-3,4-dinitrobenzol (**22**) wurde durch Nitrierung von 1-Fluor-3-nitrobenzol erhalten und sollte im Inhibitor als Warhead ohne Möglichkeit einer nukleophilen aromatischen Substitution dienen. Das gewünschte Produkt konnte in allen Fällen erhalten werden, allerdings mit unterschiedlich hohen Ausbeuten. Dies könnte auf eine mögliche Nebenreaktion, die Substitution einer Nitro-Gruppe, zurückzuführen

3. Ergebnisse und Diskussion



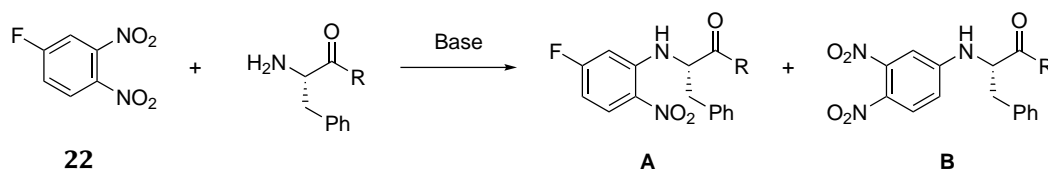
Schema 14: Synthese der Inhibitoren mit 2-Fluor-4,5-dinitrophenyl-Warhead, Phenylalanin-Leucin als dipeptidische Erkennungseinheit und unterschiedlichen C-terminalen Schutzgruppen.

sein. Dieses Nebenprodukt war massenspektrometrisch immer nachweisbar, wurde jedoch nicht isoliert. In einer früheren Synthese konnte im Fall von Benzyl-L-phenylalanyl-L-leucinat Hydrochlorid **15** bei einer Ausbeute von 52 % des gewünschten Produkts das Nebenprodukt mit 7 % isoliert werden (vgl. Tabelle 3.1, Schema 15).^[95] Bei der Reaktion mit 1-Fluor-3,4-dinitrobenzol **22** wurde eine andere



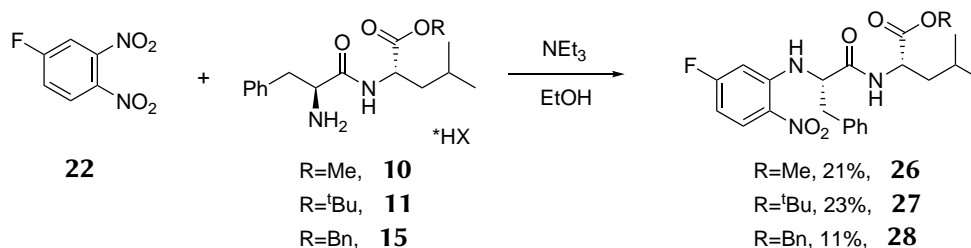
Schema 15: Erhaltene Produkte, die der Substitution eines Fluors oder einer Nitro-Gruppe entsprechen.

Produktverteilung beobachtet. Angestrebt wurde auch hier die Substitution des Fluors, wodurch ein Dinitrobenzol-Warhead (B) erhalten werden würde. Allerdings trat die Bildung des gewünschten Produkts in den Hintergrund und die Substitution einer Nitro-Gruppe (A) wurde zum Hauptprodukt (Schema 16). Die erhaltenen Ausbeuten befinden sich alle im niedrigen zweistelligen Prozentbereich



Schema 16: Die möglichen Produkte der nukleophilen aromatischen Substitution an 1-Fluor-3,4-dinitrobenzol (**22**).

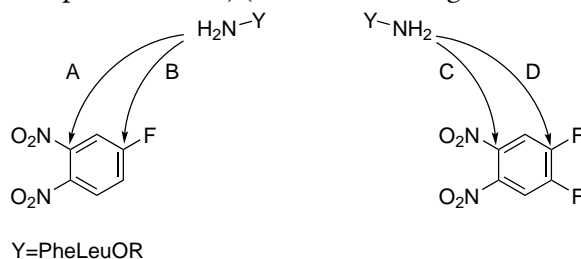
und sind damit etwas niedriger als die Produkte aus der Reaktion mit 1,2-Difluor-4,5-dinitrobenzol (**21**) (Schema 17). Dies könnte auf den weniger elektrophilen Charakter des Fluor-Nitroaromats zurückzuführen sein. Allerdings war die Reinigung der erhaltenen Produkte aufwendiger aufgrund eines ähnlichen Laufverhaltens an Kieselgel beider erhaltenen Substanzen. In Tabelle 3.1 sind die isolierten Ausbeuten der verschiedenen Substitutionsprodukte dargestellt. Aufgrund ähnlichen



Schema 17: Die erhaltenen Produkte der Substitutionsreaktion an 1-Fluor-3,4-dinitrobenzol (**22**) mit Phenylalanin-Leucin als dipeptidischer Erkennungseinheit und unterschiedlichen C-terminalen Schutzgruppen.

Laufverhaltens war die Trennung jedoch durchweg problematisch und führte in einigen Fällen nur zu wenigen Milligramm Substanz. Für die Produkte in Spalte C (Tabelle 3.1) konnte außer in einem Fall keine isolierte Ausbeute angegeben werden, da das Nebenprodukt anhand seines m/z -Verhältnisses nur per HPLC-MS detektiert wurde. Allerdings wurden in NMR- und Massenspektren immer Spuren des Nebenprodukts gefunden. Trotz der unerwarteten Substitution sollten die erhaltenen Inhibitoren auf ihre Hemmwirkung an verschiedenen Proteasen getestet werden, da so weitere Rückschlüsse auf den Hemmmechanismus möglich sein könnten. In Tabelle 3.1 sind die isolierten

Tabelle 3.1.: Ausbeuten der unterschiedlichen Substitutionsprodukte ausgehend von 1-Fluor-3,4-dinitrobenzol **22** (links, Produktspalte A und B) und 1,2-Difluor-4,5-dinitrobenzol **21** (rechts, Produktspalte C und D) (n.d.: nicht durchgeführt, x: nicht isoliert)



R	Ausbeute an A / %	Ausbeute an B / %	Ausbeute an C / %	Ausbeute an D / %
H	n.d.	n.d.	x	11
Me	21	9	x	69
^t Bu	23	4	x	26
Bn	11	7	7	52

Ausbeuten der verschiedenen Substitutionsprodukte dargestellt. Aufgrund ähnlichen Laufverhaltens war die Trennung jedoch durchweg problematisch und führte in einigen Fällen nur zu wenigen Milligramm Substanz. Für die Produkte in Spalte C (Tabelle 3.1) konnte außer in einem Fall keine isolierte Ausbeute angegeben werden, da das Nebenprodukt anhand seines m/z -Verhältnisses nur per HPLC-MS detektiert wurde. Allerdings wurden in NMR- und Massenspektren immer Spuren des

3. Ergebnisse und Diskussion

Nebenprodukts gefunden. Trotz der unerwarteten Substitution sollten die erhaltenen Inhibitoren auf ihre Hemmwirkung an verschiedenen Proteasen getestet werden, da so weitere Rückschlüsse auf den Hemmmechanismus möglich sein könnten.

3.2.2. Reaktion mit einem niedermolekularen Thiol

Die synthetisierten Inhibitoren sollten zunächst an den humanen Cathepsinen B und L sowie Rhodensain getestet werden. Da im aktiven Zentrum dieser Cysteinproteasen ein deprotoniertes Thiol vorliegt, sollte zunächst die Reaktion der Inhibitoren mit einem niedermolekularen Thiol untersucht werden. Dies sollte Aufschluss darüber geben, wie der Inhibitor mit dem Enzym reagieren könnte. Als Thiol wurde 2-Phenylethanthiol **29** gewählt. Der Inhibitor **4** wurde mit dem Thiol und Triethylamin in Ethanol vorgelegt. In verschiedenen Ansätzen wurde die nukleophile aromatische Substitutionsreaktion mit 2 bzw. 50 Äquivalenten an Base und Thiol durchgeführt. Außerdem wurde bei Raumtemperatur oder bei 80 °C gearbeitet. Nach 2 h, 6 h und 22 h wurde eine Probe genommen und die Produktverhältnisse per NMR bestimmt (Abbildung 3.1).

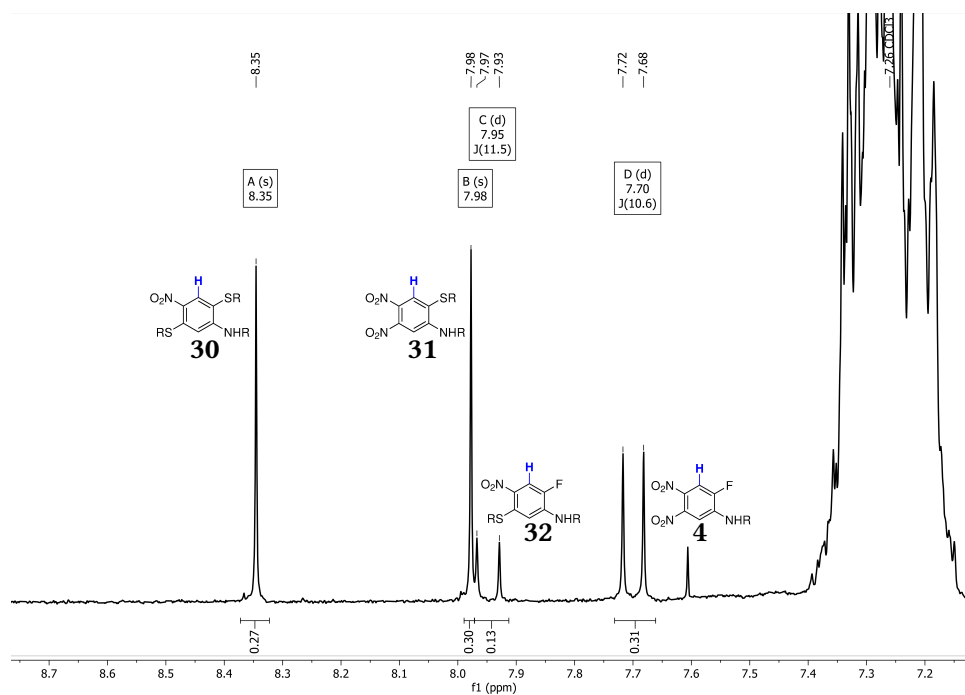
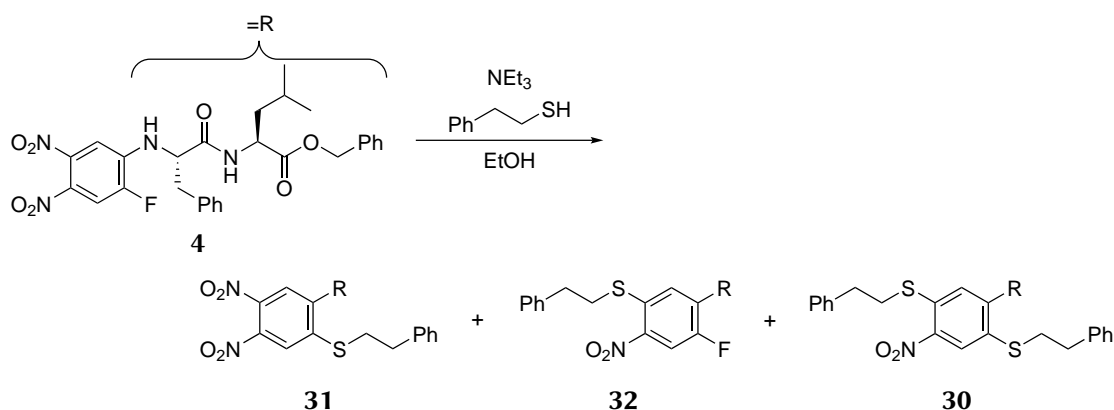


Abbildung 3.1.: Signale im NMR-Spektrum (¹H-NMR (300 MHz), CDCl₃) der verschiedenen Produkte der Reaktion mit 2 Äquivalenten 2-Phenylethanthiol **29** bei 80 °C nach 22 h.

Die daraus resultierenden Produktanteile sind in Tabelle 3.2 und Tabelle 3.3 dargestellt. Im zeitlichen Verlauf der verschiedenen Reaktionen wurden alle der drei erwarteten Substitutionsprodukte beobachtet (vgl. Schema 18). Die Temperatur und der Überschuss an Base und Thiol hatten dabei einen maßgeblichen Einfluss auf den Verlauf der Reaktion.



Schema 18: Bei der Reaktion von Inhibitor **4** mit 2-Phenylethanthiol **29** im Basischen beobachtete Produkte.

Mit jeweils 2 Äquivalenten Thiol und Base bei Raumtemperatur (Tabelle 3.2) verlief die Reaktion langsam und es waren nach 22 h noch 78 % des Edukts vorhanden. Die Verteilung der Produkte lag bei 12 % für das Fluor-Substitutionsprodukt (**31**), 7 % für die Substitution der Nitro-Gruppe (**32**) und für die Substitution beider Gruppen 4 % (**30**). Wurden die Anteile an Base und Thiol auf einen Überschuss von 50 Äquivalenten erhöht, waren bereits nach 2 h nur noch 12 % Startmaterial vorhanden. Nach 6 h war kein Edukt mehr detektierbar. Gleiches galt für das Fluor-substituierte Produkt **31**, von dem nach 2 h noch 4 % vorhanden waren, nach 6 h war es nicht mehr detektierbar. Dies könnte auf eine schnelle Reaktion weiter zu Produkt **30** zurückzuführen sein. Dafür war der Anteil der beiden weiteren Produkte deutlich höher. Für Produkt **32** lag dieser anfangs bei 22 % und stieg nach fast einem Tag Reaktionszeit auf 27 %. Bei der Substitution beider Gruppen (**30**) waren es anfangs 62 % und nach 22 h 73 %.

Tabelle 3.2.: NMR-Ausbeuten der Reaktion mit 2-Phenylethanthiol **29** bei Raumtemperatur (2 Äq. und 50 Äq.)

Zeit	2 Äq.				50 Äq.			
	Edukt 4 (%)	31 (%)	32 (%)	30 (%)	Edukt 4 (%)	31 (%)	32 (%)	30 (%)
2 h	93	5	2	0	12	4	22	62
6 h	88	7	4	1	0	0	28	72
22 h	78	12	7	4	0	0	27	73

Wurde die gleiche Reaktion bei erhöhter Temperatur durchgeführt (Tabelle 3.3), zeigte sich ein ähnliches Bild. Mit 2 Äquivalenten Base und Thiol wurde ein maximaler Umsatz von 73 % nach 22 h erreicht. Der Anteil an Fluor-Substitutionsprodukt **31** lag nach 6 h bei 28 % und erhöhte sich zum Ende leicht auf 30 %. Das Nitro-Substitutionsprodukt **32** lag hingegen anfangs mit 6 % vor und am Ende mit 13 %. Der Anteil an doppelt substituiertem Produkt lag nach 22 h bei 31 %. Eine

3. | Ergebnisse und Diskussion

stark vereinfachte Situation wurde vorgefunden, wenn bei erhöhter Temperatur ein Überschuss der Reaktanden zugegeben wurde. Bei 50 Äquivalenten und 80 °C war nach 2 h weder Edukt noch Fluor-Substitutionsprodukt **31** erkennbar. Im Laufe der Zeit änderte sich das Verhältnis der beiden übrigen Produkte noch geringfügig um ungefähr 4 % zugunsten des doppelt substituierten Produkts **30**.

Tabelle 3.3.: NMR-Ausbeuten der Reaktion mit 2-Phenylethanthiol bei 80 °C (2 Äq. und 50 Äq.)

Zeit	2 Äq.				50 Äq.			
	Edukt 4 (%)	31 (%)	32 (%)	30 (%)	Edukt 4 (%)	31 (%)	32 (%)	30 (%)
2 h	66	22	6	5	0	0	21	79
6 h	49	28	10	13	0	0	20	80
22 h	27	30	13	31	0	0	17	83

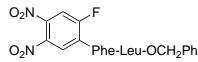
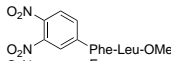
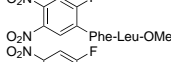
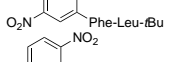
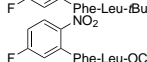
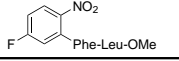

Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass der Inhibitor in der Lage ist, eine nukleophile aromatische Substitution mit einem Thiol einzugehen. Die Verteilung der erhaltenen Produkte hing dabei sehr stark von den verwendeten Reaktionsbedingungen ab, verschob sich aber mit längerer Reaktionszeit und einem Überschuss der Reaktanden in Richtung der Produkte **32** und **30**. Zudem konnte gezeigt werden, dass nicht nur Fluor, sondern auch eine Nitro-Gruppe substituiert werden kann. Allerdings lässt dieser Versuch keine Rückschlüsse auf eine Proteaseaktivität im Körper zu, da sich sowohl Lösemittel als auch Temperatur von physiologischen Bedingungen unterscheiden. Allerdings war es mit spektroskopischen Methoden nicht möglich, die Regiochemie des Produkts **30** eindeutig zu klären. Daher wurden in Kooperation mit Dr. J. Kühlborn DFT-Berechnungen und basierend darauf DP4+-Wahrscheinlichkeitsanalysen durchgeführt.^[103] Die experimentell erhaltenen NMR-Shifts wurden mit den berechneten Boltzmann-gewichteten Werten der Abschirmtensoren für beide Regioisomere verglichen. Die berechneten DP4+-Wahrscheinlichkeiten zeigten eindeutig, dass Produkt **30** erhalten wurde, bei dem beide Thioether *para* zueinander stehen. Die genauen Parameter dieser Bestimmung sind im Experimentalteil zu finden (Unterabschnitt 9.1.10).

3.2.3. Biologische Testung - Enzymassays

Durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. ██████████ sollte die inhibitorische Wirkung auf Cathepsin L und Rhodesain analysiert werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die synthetisierten Inhibitoren (Substanzen **23**, **24**, **26**, **27**, **28** und **33**) Cathepsin L oder Rhodesain mit Werten von 16 % bis 44 % Inhibition bei 20 µM Inhibitorkonzentration nur schwach hemmten. Verglichen mit Modellsubstanz **4**, die Cathepsin L mit 98 % und Rhodesain mit 45 % unter den gleichen Testbedingungen inhibierte, wurde eine deutliche Verringerung des inhibitorischen Potentials beobachtet. Die prozentuale Hemmung der synthetisierten Inhibitoren ist in Tabelle 3.4 dargestellt.

Substanzen **23** und **24** wurden im Vergleich zur ursprünglichen Struktur **4** lediglich in der C-

Tabelle 3.4.: Inhibitionskonstanten verschiedener Substanzen in % bei 20 μM Inhibitorkonzentration

Substanz	Struktur	Inhibition Cathepsin L	Inhibition Rhodensain
4		98 %	45 %
33		39 %	34 %
23		33 %	33 %
24		21 %	44 %
27		16 %	30 %
28		27 %	41 %
26		16 %	10 %

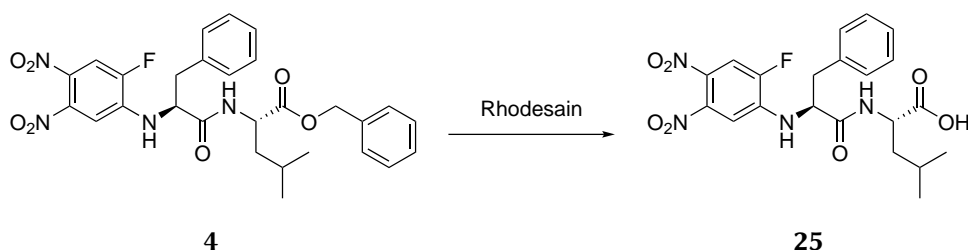
terminalen Säureschutzgruppe variiert, wobei es sich um den Methyl- bzw. *tert*-Butylester handelte. Für das Enzym Cathepsin L zeigten diese Inhibitoren eine schwache Hemmung von 33 % bzw. 21 %. Die in den vorangegangenen Synthesen erhaltenen Substanzen **26**, **27** und **28** (vgl. Abschnitt 3.2) sollten ebenfalls getestet werden. Sie besitzen eine gute Abgangsgruppe in Form des Fluors und sind damit prinzipiell in der Lage eine nukleophile Substitution einzugehen. Entgegen der Erwartung hemmten sie Cathepsin L ebenfalls schwach im niedrigen zweistelligen Prozentbereich. Die prozentuale Hemmung des Methyl- und des *tert*-Butylesters, **26** und **27**, fiel mit 16 % für beide Substanzen gleich gering aus. Eine leichte Erhöhung zeigte der Benzylester **28** mit einer Inhibition von 27 %. Substanz **33** wurde als einziges Beispiel für das gewünschte Produkt mit einem Warhead, der zwei Nitrogruppen trägt, isoliert. Allerdings hemmte sie Cathepsin L zu 39 %, trotz des Fehlens einer klassischen Abgangsgruppe für die nukleophile aromatische Substitution und damit am stärksten unter den genannten Beispielen. In Unterabschnitt 3.2.2 wurde allerdings gezeigt, dass auch die Nitrogruppe durch ein Thiol nukleophil substituiert werden kann. Weiterhin ist eine günstige geometrische Anordnung im aktiven Zentrum des Enzyms denkbar, was ebenfalls zu einer Inhibition führen kann. Jedoch wurden aufgrund der niedrigen Hemmung keine weiteren Nachforschungen zu diesen Substanzen angestellt.

Betrachtet man das Enzym Rhodensain, zeigt sich eine ähnliche Situation. Für die bereits in der Arbeitsgruppe Opatz hergestellte Substanz **4** wurde eine Hemmung von 45 % bei einer Inhibitorkonzentration von 20 μM beobachtet. Diese befand sich im gleichen Bereich wie die Aktivität des Methyl- bzw. *tert*-Butylester **23** und **24**, die Rhodensain mit 33 % und 44 % hemmten. Die Substanzen **26**, **27** und **28** zeigten bei Rhodensain keine Verbesserung. Für sie wurden Werte von 41 %, 10 % und 30 % Inhibition gemessen. Der Methylester **33** ohne Abgangsgruppe lag mit einer Hemmung von 34 % ebenfalls in diesem Bereich. Bis auf Substanz **26** mit einer sehr schwachen Inhibition lagen die Substanzen sowohl für Cathepsin L als auch für Rhodensain in einem Bereich von 16 % bis 44 %. Diese

3. Ergebnisse und Diskussion

Werte stellten keinerlei Verbesserung zu den bereits beobachteten Werten dar. Bei gleichem Warhead war der C-terminale Benzylester für beide Enzyme der stärkste Inhibitor. Ein starker Inhibitor war aber nur Benzylester **4**, in den anderen Fällen unterschieden sich die Werte nur um wenige Prozent.

Im Laufe verschiedener Experimente (genauer in Unterabschnitt 3.2.4) konnte gezeigt werden, dass im Fall von Verbindung **4** während der Inkubation mit Rhodesain eine Reaktion stattfand (Schema 19). Es stellte sich heraus, dass der Benzylester **4** hydrolysiert und daraus die Säure **25** freigesetzt wurde. Um herauszufinden, ob nur eine der beiden Spezies die aktive Form des Inhibitors ist, wurde die Säure synthetisiert und auf ihre biologischen Eigenschaften untersucht.



Schema 19: Durch Rhodesain verursachte Spaltung des Benzylesters **4** zu der freien Säure **25**.

In Tabelle 3.5 sind die Hemmkonstanten des Benzylesters **4** und der Säure **25** gegeben. Der K_i -Wert ist dabei die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes und gibt Aufschluss über die Bindungsaffinität. Je kleiner der K_i -Wert ist, desto größer ist die Bindungsaffinität des Inhibitors. In den Enzymassays mit Cathepsin L und B verhielten sich beide Moleküle ähnlich. Säure **25** besaß für Cathepsin L und B K_i -Werte von $3.0 \mu\text{M}$ und $1.5 \mu\text{M}$. Zum Vergleich besaß der Benzylester **4** K_i -Werte von $1.6 \mu\text{M}$ und $4.4 \mu\text{M}$. Allerdings wurde für Rhodesain ein enormer Abfall des K_i -Werts beobachtet. Der Ester inhibierte Rhodesain bei einer Inhibitorkonzentration von $20 \mu\text{M}$ lediglich zu 45 %, der K_i -Wert der Säure hingegen lag bei $(4.0 \pm 1.3) \text{ nM}$. Woher diese enorme Erhöhung des Inhibitions potentials kommt, sollte durch weitere Experimente untersucht werden und wird in Unterabschnitt 3.2.4 beschrieben.

Tabelle 3.5.: Vergleich der K_i -Werte von Benzylester **4** und Säure **25** ($K_i/\mu\text{M}$, %-Angaben entsprechen %-Inhibition bei $20 \mu\text{M}$ Inhibitorkonzentration)

Substanz	Struktur	K_i Cat L	K_i Cat B	K_i Rhod	Inhibition Sortase A
4		$1.6 \mu\text{M}$	$4.4 \mu\text{M}$	45 %	16 %
25		$3.0 \mu\text{M}$	$1.5 \mu\text{M}$	4.0 nM	0 %

Die Inhibitoren **4** und **25** wurden zudem an der Sortase A aus *Staphylococcus aureus* getestet (jeweils 16 % und 0 % Inhibition bei $20 \mu\text{M}$ Inhibitorkonzentration). Hierdurch konnte gezeigt werden, dass eine Selektivität für Cysteinproteasen aus dem CA-Clan (Cathepsine und Rhodesain) gegenüber

des CL-Clans (Sortase A) besteht.

Da aus den vorhandenen Daten der Substanzen **4** und **25** mit Cathepsin L und B sowie Rhodesain nicht mit Sicherheit geschlossen werden konnte, ob es sich um eine reversible oder eine irreversible Hemmung handelt, wurden die IC₅₀-Werte für Rhodesain in Abhängigkeit der Inkubationszeit von Enzym und Inhibitor (10 min und 45 min) ermittelt. Der IC₅₀-Wert gibt dabei an, bei welcher Konzentration eines Inhibitors, eine 50%ige Blockierung eines Enzyms eintritt. Außerdem wurden am Beispiel von Rhodesain Verdünnungsreihen durchgeführt, nachdem das Enzym durch Zugabe eines 100-fachen Überschuss an Inhibitor **25** vollständig inhibiert wurde. Da der IC₅₀-Wert keine Abhängigkeit von der Inkubationszeit zeigte und zusätzlich bei der Verdünnung eine langsame zeitabhängige Wiederherstellung der Enzymaktivität beobachtet wurde, konnte gezeigt werden, dass ein reversibler Inhibitionsmechanismus vorliegt.

Abschließend wurden die Substanzen **4** und **25** auf ihre antitrypanosomale Wirkung gegen *Trypanosoma brucei brucei* untersucht. Mit EC₅₀-Werten von (0.0953 ± 0.0402) μM für den Ester und (18.50 ± 4.97) μM für die Säure zeigten beide Spezies eine antitrypanosomale Wirkung. Allerdings war der lipophilere Ester ein um den Faktor 200 stärker wirksames Mittel gegen diese Art der Trypanosomen, obwohl die Säure den aktiven Inhibitor von Rhodesain darstellt, der aus dem Estern gebildet wird. Dies könnte unter anderem mit der höheren Zellpermeabilität des Esters zusammenhängen und wurde schon in früheren Publikationen erwähnt.^[104]

3.2.4. Spaltung des Benzylesters

Einen ersten Hinweis auf die Labilität von Substanz **4** lieferten die Ergebnisse des ¹⁹F-NMR-Spektrums in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. [REDACTED]. Es konnte beobachtet werden, dass Substanz **4** in einer Pufferlösung mit Rhodesain nur schwer löslich war, sich aber mit der Zeit immer besser zu lösen schien. Im NMR-Spektrum hingegen konnte beobachtet werden, dass das schwache Signal des Fluorids des Benzylesters ($\delta^{19}\text{F} = -126.6$ ppm) langsam verschwand und ein neues tieffeldverschobenes Signal auftrat. Dieses Signal bei $\delta^{19}\text{F} = -119.5$ ppm konnte später Inhibitor **25** zugeordnet werden und zeigte, dass in Anwesenheit von Rhodesain eine Spaltung des Benzylesters eintritt (Abbildung 3.2).

Weiter bekräftigt wurden diese Ergebnisse durch die Auswertung der Messungen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. [REDACTED]. Die Inhibitoren wurden hierbei mit Rhodesain inkubiert und anschließend mit einer Flüssigchromatographie, gekoppelt an eine nano-ESI-Q-TOF-MS massenspektrometrisch untersucht (siehe Abbildung 3.3, S. 37). Der Benzylester sowie die freie Säure zeigten hierbei übereinstimmende Spektren (Abbildung 3.3, B und C, S. 37). Bei diesen Spektren wurde eine Massendifferenz zwischen Enzym vor und nach der Inkubation gefunden, die der Molekülmasse abzüglich des Benzylesters entspricht.

Dies zeigte, dass der Ester hydrolysiert wurde. Die im Spektrum gefundene Massendifferenz zwischen Enzym und Enzym-Inhibitor-Komplex lag allerdings bei der Molekülmasse. Daraus konnte geschlossen werden, dass Enzym und Inhibitor nicht im Sinne einer nukleophilen Substitution

3. Ergebnisse und Diskussion

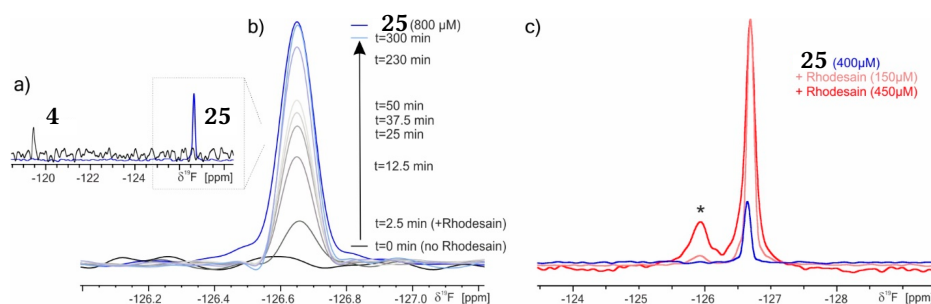


Abbildung 3.2.: a) ¹⁹F-NMR von Substanzen 4 und 25; b) Zeitabhängige NMR-Messungen, die die Rhodesain-bedingte Esterhydrolyse zeigen; c) Mit * gekennzeichnete Komplex zwischen Rhodesain und Säure 25.^[105]

reagierten, sondern die Interaktion eine Art π - oder Meisenheimer-Komplex sein könnte. Für Substanz 6 wurde das gleiche Verhalten gefunden (Abbildung 3.3, A, S. 37). Um zu bestätigen, dass die Hydrolyse des Inhibitors tatsächlich durch Rhodesain geschieht, wurden in der Gruppe von Prof. Dr. [REDACTED] weitere Experimente durchgeführt. Dazu wurde der Benzylester 4 mit Rhodesain, mit durch K11777 deaktiviertem Rhodesain und dem Reaktionspuffer inkubiert und die Reaktionsgemische mittels LC-MS untersucht. Während in den Proben mit deaktiviertem Enzym und Reaktionspuffer ausschließlich das Edukt gefunden werden konnte, wurde in der Probe mit Rhodesain ein kompletter Umsatz zu Substanz 25 beobachtet.

3.2.5. Berechnungen zum Inhibitionsmechanismus

Da für die Inhibitoren 4 und 25 eine reversible Inhibition gefunden wurde, ist die kovalent-irreversible Reaktion mit Phenylethanthiol und Triethylamin in Ethanol (Unterabschnitt 3.2.2) offensichtlich nicht geeignet, um die Situation im Enzym nachzustellen. Um einen genaueren Einblick in die Vorgänge zu erhalten und mehr über den Mechanismus zu erfahren, wurden die relativen Stabilitäten der auftretenden Meisenheimer-Komplexe bei einem Angriff eines Thiolats auf drei verschiedene Kohlenstoffe des Inhibitors (CF, CNO₂, CH) *in silico* durch die Gruppe von Prof. Dr. Engels berechnet. Dabei wurde der Inhibitor zu einem substituierten aromatischen Ring, genauer gesagt zu 2-Fluor-*N*-methyl-4,5-dinitroanilin, vereinfacht (Abbildung 3.4). Für das aktive Zentrum wurde zwischen drei verschiedenen Situationen unterschieden. Im ersten Fall wurde das aktive Zentrum als einfaches Thiolat beschrieben, was am ehesten der Situation ohne Enzym entspricht (Abbildung 3.4, links). Im zweiten Fall wurde die Reaktion des Inhibitors mit einem Ionenpaar von Thiolat und 4-Methylimidazolium beschrieben. Dies wiederum soll die Begebenheiten im Enzym besser widerspiegeln (Abbildung 3.4, rechts). Da sich während der Rechnungen die Positionen einzelner Komponenten veränderten, was im als starr betrachteten Enzym nicht der Fall sein kann, wurde in einer dritten Rechnung der Abstand zwischen Thiolat-Schwefel und dem angegriffenen Kohlenstoff auf 1.9 Å festgesetzt.

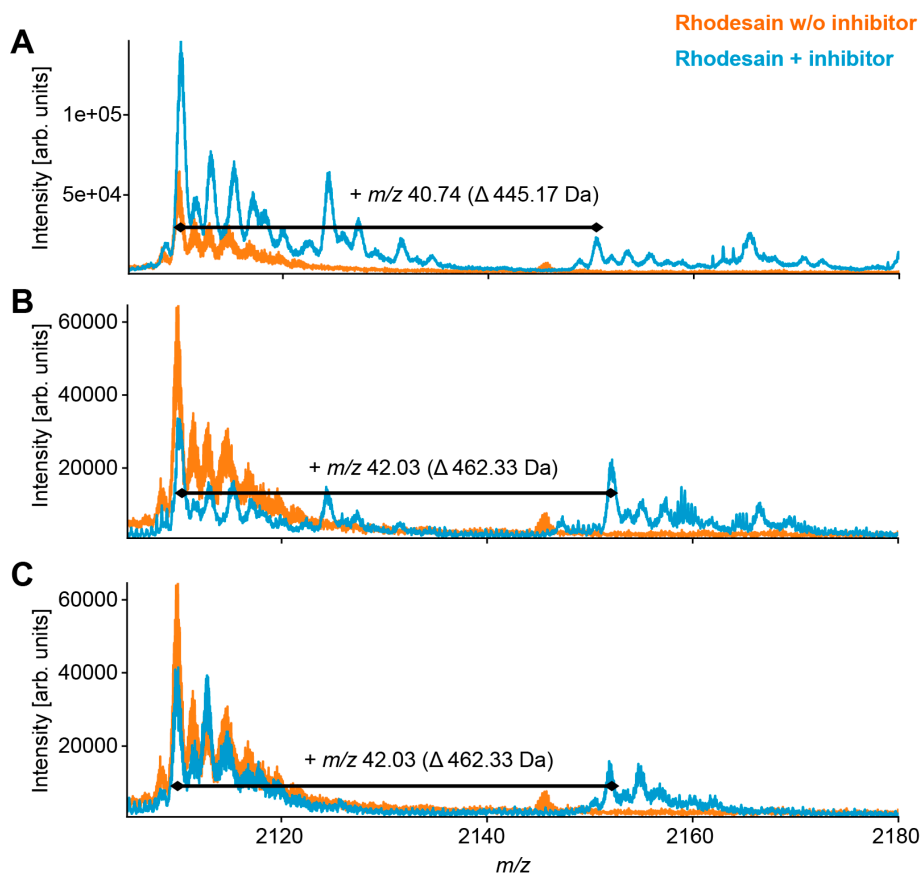


Abbildung 3.3.: ESI-Massenspektren von Rhodesain ($[M + 11 H]^{11+}$ bei $m/z=2109.9 \pm 20$ ppm) in An- (blau) und Abwesenheit (orange) der Inhibitoren **6**, **4** und **25** (A, B, C).^[105]

Es wurden die verschiedenen Ansätze verglichen, allerdings wurden auch verschiedene Methoden verwendet, die ebenfalls untereinander verglichen werden sollten. Genutzt wurden das ω B97XD-Funktional, die Møller–Plesset-Störungstheorie 2. Ordnung (MP2) und die spin-komponentenskalierte MP2 (SCS-MP2). Das polare Umfeld wurde durch den IEFPCM-Ansatz (*Integral equation formalism Polarizable Continuum Model*) für Wasser dargestellt. Alle Berechnungen wurden mit dem 6-31+G*-Basissatz durchgeführt.^[106–109]

Die Berechnungen zeigten, dass der erste Fall dem eines nukleophilen Angriff des Thiolats nahekommt. Der Abstand zwischen Schwefel und dem angegriffenen Kohlenstoff blieb bei dem festgelegten Startwert von 1.9 Å. Die Bindung dieses Kohlenstoffs zu der Abgangsgruppe X (X= F, NO₂, H) war aber schon deutlich verlängert. Dieser Zustand kann als Meisenheimer-Komplex aufgefasst werden, der das Zwischenprodukt einer nukleophilen Substitution darstellt. Laut den Berechnungen auf Basis von MP2 oder SCS-MP2 waren diese Komplexe Minima auf der Energiehyperfläche, die etwa 4 kcal mol⁻¹ bis 13 kcal mol⁻¹ unter den Edukten lagen. Das ω B97XD-Dichtefunktional un-

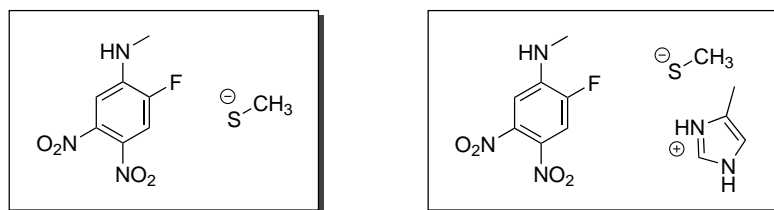


Abbildung 3.4.: Links: Vereinfachte Darstellung des Inhibitors und des Thiolats. Rechts: Zusätzlich zum Thiolat wurde ein Imidazoliumion hinzugefügt, in beiden Fällen wurde ein polares Umfeld in Form von Wasser simuliert.

terschätzte diese Stabilitäten deutlich. Außerdem bildete sich ein weiterer Vorkomplex mit einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen NH und Thiolat, der laut MP2- oder SCS-MP2-Rechnungen eine ähnliche Stabilität wie die Meisenheimer-Komplexe hatte.

Durch das Hinzufügen eines 4-Methylimidazoliumions sollte sich die Berechnung an die Bedingungen im Enzym annähern, da auch hier eine katalytische Diade aus Cystein und Histidin vorlag. Als Ausgangspunkt wurde wieder ein Abstand von 1.9 Å zwischen Thiolat und angegriffenem Kohlenstoff gewählt. Die erhaltenen Daten zeigten stabile Komplexe, unter Beachtung, dass das System sich in Thiolat-Imidazolium-Komplex und Inhibitor aufspaltete. Die durch MP2- und SCS-MP2-Berechnungen vorhergesagten Komplexe waren mit ungefähr 20 kcal mol⁻¹ sogar stabiler als die zuvor erhaltenen Meisenheimer-Komplexe. Eine Streckung der CX-Bindung zwischen Kohlenstoff und Abgangsgruppe lag nicht vor. Außerdem konnten die Ergebnisse des Angriffs auf die CF- oder CNO₂-Bindung nicht in die Betrachtung mit einbezogen werden, da im ersten Fall eine Umorientierung des aromatischen Rings stattfand, im zweiten Fall tauschten Thiolat und Imidazolium die Position. Dies kann im Enzym nicht auftreten.

Daher wurde in einem dritten Experiment die Bindungslänge zwischen Thiolat und angegriffenem Kohlenstoff auf 1.9 Å festgesetzt. Die erhaltenen Komplexe waren hierbei um ca. 4 kcal mol⁻¹ bis 10 kcal mol⁻¹ weniger stabil, was wiederum als Indiz dafür gewertet werden konnte, dass im Enzym kein Meisenheimer-artiger Komplex vorliegt. Diese Berechnungen unterstützten die These, dass im Enzym keine nukleophile aromatische Substitution stattfindet. Allerdings bildet sich wahrscheinlich auch kein Meisenheimer-Komplex, sondern eine Art π -Komplex, der trotz des Abstands zwischen katalytischer Diade und aromatischem Ring des Inhibitors stabil ist.

3.2.6. Docking-Studien

Um weitere Einblicke in die Bindungseigenschaften von Ester **4** und der korrespondierenden freien Säure **25** zu erhalten, wurden Docking-Studien in der Gruppe von Prof. Dr. [REDACTED] durchgeführt. Dafür wurde sich der Kristallstruktur von Rhodesain, inhibiert durch das Vinylsulfon K11777 (vgl. Abbildung 1.7), bedient (PDB: 2p7u). Die Studien wurden zuerst mit dem Benzylester **4** durchgeführt. Dabei wurden drei verschiedene Arten von Posen gefunden. In einer ersten Pose befand sich der

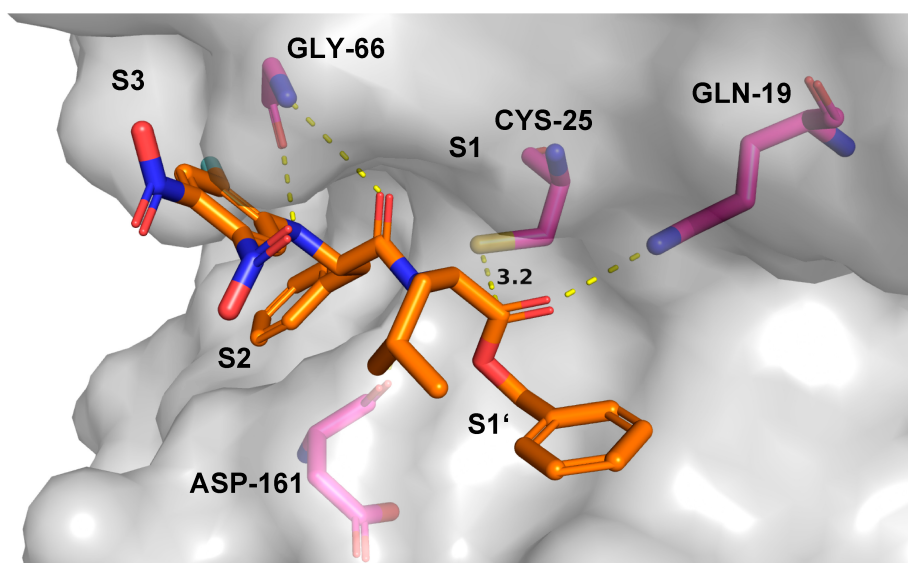


Abbildung 3.5.: Substrat-ähnliche Anordnung von Ester 4 im aktiven Zentrum von Rhodesain (grau: Oberfläche Rhodesain, magenta: Kohlenstoffe von AS von Rhodesain, orange: Kohlenstoffe von 25, blau: Stickstoff, rot: Sauerstoff, gelb: Schwefel, cyan: Fluor).^[105]

elektrophile Ring in der S1'-Tasche, also nicht in direkter Nähe zum aktiven Zentrum. In weiteren Posen, die als etwas weniger stabil berechnet wurden, befand er sich im aktiven Zentrum. Bei der dritten Pose handelte es sich um eine Substrat-ähnliche Position. Der Ester am anderen Ende des Moleküls befand sich also in direkter Nähe zum Cystein des katalytischen Zentrums (Abbildung 3.5) und ausgehend von dieser Position wäre die gefundene Esterhydrolyse denkbar.

Um die Stabilitäten der einzelnen Posen zu untersuchen, wurden verschiedene MD-Simulationen durchgeführt. Sie zeigten, dass die „normale“ Position des Inhibitors relativ stabil war und der Komplex nie gänzlich gespalten wurde, der Abstand zwischen Aromat und Cystein aber zu groß ist, als das eine nukleophile aromatische Substitution eintreten könnte. Für die Substrat-ähnliche Anordnung, die zu der beobachteten Spaltung des Esters führen könnte, wurde ein mit der Zeit zunehmender Abstand simuliert. Dennoch könnte die Zeit, in der sich das aktive Zentrum und die Esterbindung in räumlicher Nähe zueinander befinden, ausreichen, um eine Spaltung zu bewirken. Weitere MD-Simulationen, die mit der freien Säure in der Substrat-ähnlichen Pose starten, also unmittelbar nach einer fiktiven Esterspaltung im Enzym, zeigen eine rasche Dissoziation des Komplexes, die wahrscheinlich durch repulsive Kräfte angetrieben wird. Docking-Studien, bei denen sich die Säure mit dem Warhead im aktiven Zentrum befindet, zeigen eine Vielzahl von Interaktionen. Unter anderem interagiert das Peptid-Backbone mit Asp-161 und Gly-66, zusätzlich werden die verschiedenen Taschen durch Reste angesprochen. Eine der stärksten Stabilisatoren ist die Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Thiolat des aktiven Zentrums und dem -NH des aromatischen Rings (Abbildung 3.6). Eine Änderung der Positionen wie bei den Berechnungen für

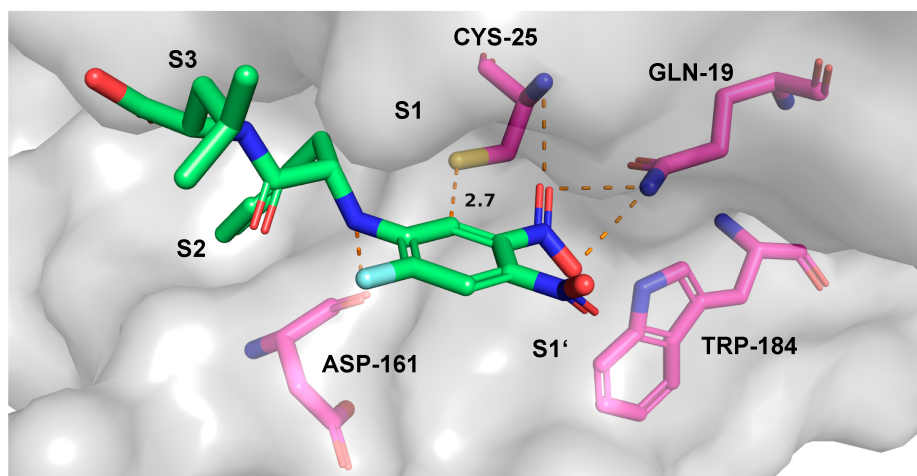


Abbildung 3.6.: Vorhergesagte Anordnung von Säure **25** im aktiven Zentrum von Rhodesain (grau: Oberfläche Rhodesain, magenta: Kohlenstoffe von AS von Rhodesain, grün: Kohlenstoffe von **25**, blau: Stickstoff, rot: Sauerstoff, gelb: Schwefel, cyan: Fluor).^[105]

den Benzylester wurde in diesem Fall nicht gefunden. Vergleicht man beide Inhibitoren, zeigt sich, dass im Fall des Esters der Abstand zwischen Thiolat und NH größer ist, was darauf hindeutet, dass diese Interaktion zu der stärkeren Hemmung durch die freie Säure beiträgt. Der weiter oben als π -Komplex bezeichnete Zustand stellt ein Energieminimum dar, das für eine gute Hemmung benötigt wird. Gleichzeitig verhindert dieses Energieminimum eine weitere Annäherung der Reaktanden, was zu einer S_NAr -Reaktion führen würde. Da aber schon die Reversibilität der Inhibition und die gefundenen Massenspektren von Inhibitor und Enzym zeigen, dass eine S_NAr -Reaktion nicht stattfindet, unterstützen die erhaltenen Daten dies.

Um weitere Einblicke in die Bindungssituation von Säure **25** und Rhodesain zu erhalten, wurde sich QM/MM-Berechnungen bedient. Dabei begrenzte sich der QM-Teil auf 35 Atome und wurde, wie zuvor gezeigt, per SCS-MP2/6-31+G* beschrieben. Die restlichen Atome (mehr als 5200) wurden mit dem AMBER16 Kraftfeld beschrieben. Um zu zeigen, wie sich die relativen Energien bei verschiedenen Annäherungen verhalten, wurde das Näherkommen des Cystein-Schwefels zu verschiedenen Punkten im Inhibitor simuliert. Dabei wurden als erreichbare Punkte jeweils das aromatische CH und ein CNO_2 gewählt. Die relativen Energien zeigen Energieminima, für CH bei ca. 3.1 Å und 3.3 Å und für CNO_2 bei ca. 3.9 Å. Damit liegen sie im Bereich der vorherigen Berechnung der Komplexe. Durch die steigende Energie bei weiterer Annäherung kann gezeigt werden, dass ein Meisenheimer-Komplex nicht erzeugt werden kann, was eine nukleophile aromatische Substitution unmöglich macht. Neben der starken Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Thiolat und dem aromatischen NH müssen die weiteren Kräfte, die für die starken inhibitorischen Eigenschaften von Substanz **25** verantwortlich sind, noch entdeckt werden.

3.2.7. Zusammenfassung

Die Modifikationen der in der Arbeitsgruppe Opatz bereits bekannten Inhibitoren konnten erfolgreich durchgeführt werden. Allein die Synthese der Dinitro-Derivate ausgehend von 1-Fluor-3,4-dinitrobenzol **22** gestaltete sich schwierig, da die nukleophile aromatische Substitution nicht wie geplant am Fluor-tragenden Kohlenstoff stattfand, sondern eine der Nitro-Gruppen substituiert wurde. Die erhaltenen Moleküle zeigten sich als schwache Inhibitoren der getesteten Enzyme Cathepsin B und L sowie Rhodocystin. Da in verschiedenen Experimenten Indizien auftraten, nach denen der Benzylester **4** durch Rhodocystin hydrolysiert wurde, wurde die entsprechende freie Säure **25** synthetisiert. Sie inhibierte die Cathepsine B und L in gleichem Maße wie der Ester. Im Fall von Rhodocystin wurde allerdings ein enormer Anstieg im inhibitorischen Potential gefunden. In mehreren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Spaltung des Benzylesters durch Rhodocystin verursacht wurde und das Inhibitorpaar bestehend aus Benzylester und freier Säure das Konzept einer Prodrug erfüllt. Um Einblick in die Esterspaltung und den Wirkungsmechanismus zu erhalten, wurden verschiedene Berechnungen bzw. Simulationen angestellt. Zum einen zeigten sie, dass die nukleophile aromatische Substitution zwischen Inhibitor und 2-Phenylethanthiol **29** in Ethanol keine Rückschlüsse auf die Situation im Enzym zulässt. Im Enzym erfolgt die Inhibition durch einen starken π -Komplex und es findet keine Substitutionsreaktion statt. Zum anderen zeigten Docking-Studien, dass, der π -Komplex des Benzylesters in Übereinstimmung mit den Inhibitionskonstanten weniger stark als der der freien Säure ist. Zudem existiert für den Ester eine Substrat-ähnliche Bindungspose, was die Esterhydrolyse erklärt. Die freie Säure hingegen bildet starke π -Komplexe aus. Bei weiterer Annäherung würde es zu einem Meisenheimer-Komplex kommen, der einen Zwischenschritt der Substitution darstellt. Die auftretenden repulsiven Kräfte lassen dies nicht zu und sind eine Erklärung für die reversible Inhibition.

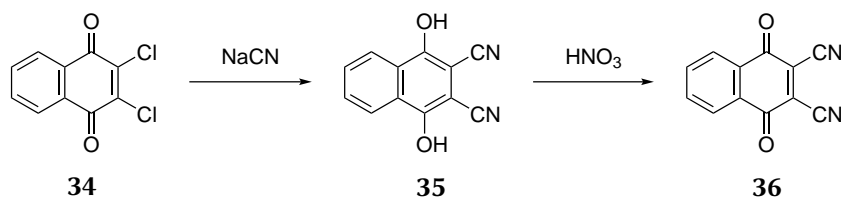
3.3. Inhibitoren mit Naphthochinon-Warhead

3.3.1. Synthese der Naphthochinoninhibitoren

Um die gewünschten Inhibitoren mit einem substituierten Naphthochinon als reaktive Spezies zu erhalten, wurde zuerst das kommerziell erhältliche 2,3-Dichlor-1,4-naphthochinon **34** nach Budni *et al.* mithilfe von Natriumcyanid und anschließender Oxidation mit Salpetersäure zu 2,3-Dicyano-1,4-naphthochinon **36** in 35 % Ausbeute umgesetzt (Schema 20).^[110]

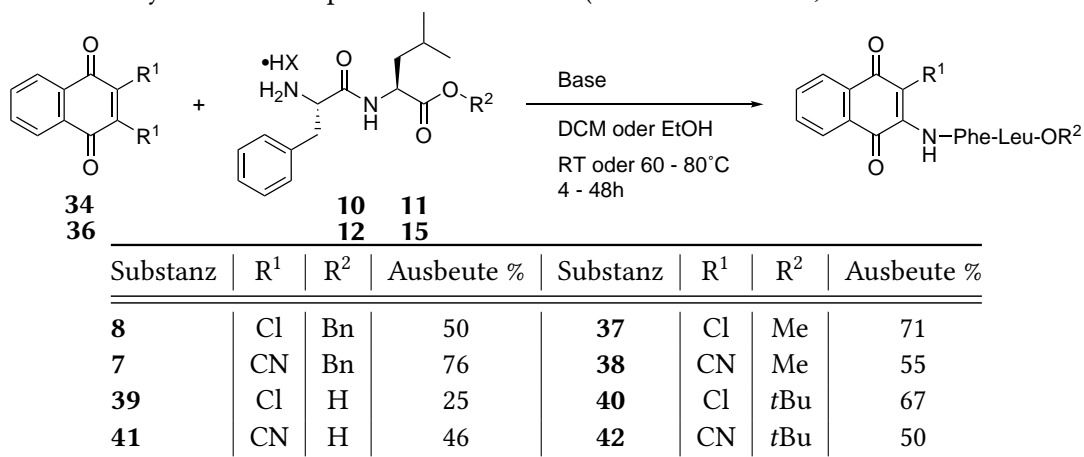
Anschließend wurden beide Chinone mit den in Abschnitt 3.1 beschriebenen Dipeptiden zur Reaktion gebracht. In Tabelle 3.6 sind die Ausbeuten der verschiedenen Produkte angegeben. Über einen Additions-Eliminierungs-Mechanismus wurden die Produkte in akzeptablen Ausbeuten erhalten, wobei in manchen Fällen bei Raumtemperatur gearbeitet wurde. In anderen Fällen wurde die Reaktionsmischung erhitzt. Als Lösemittel wurde entweder Dichlormethan oder Ethanol verwendet.

3. | Ergebnisse und Diskussion



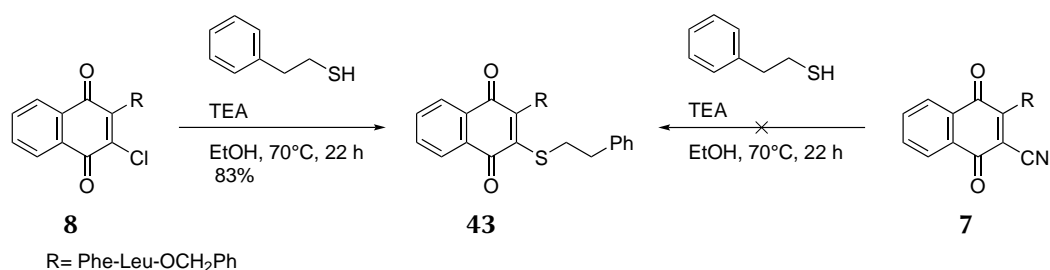
Schema 20: Synthese von 3,4-Dicyanonaphthochinon **36** ausgehend von 3,4-Dichlornaphthochinon **34** über 1,4-Dihydroxynaphthalen-2,3-dicarbonitril **35**.

Tabelle 3.6.: Synthese der Naphthochinonderivate (HX=HCl oder TFA, für R²=*t*Bu entfällt HX)



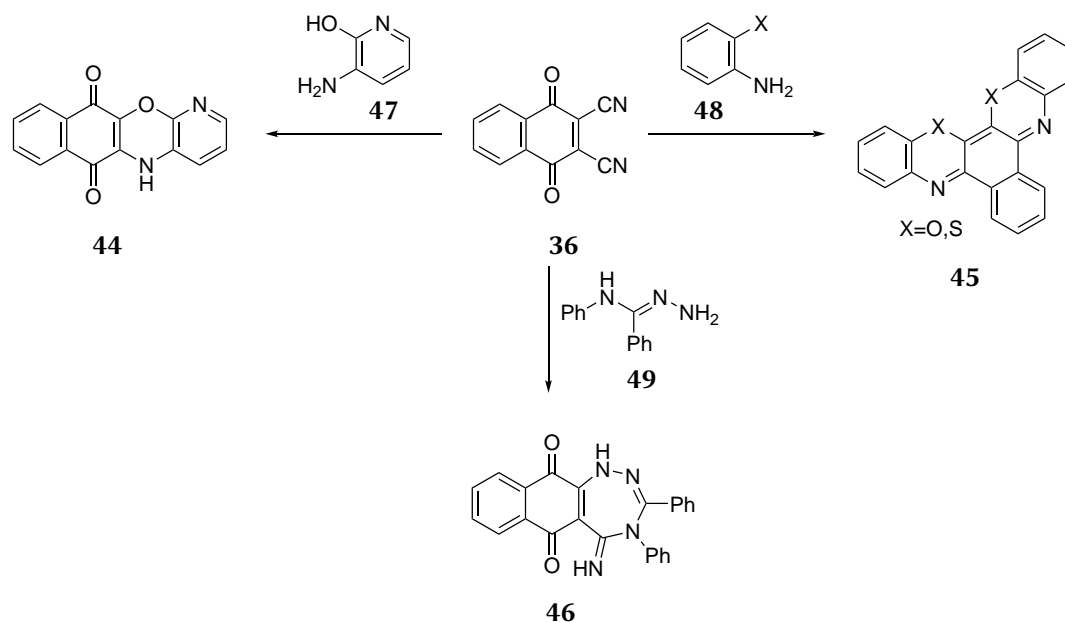
3.3.2. Reaktion mit einem niedermolekularen Thiol

Da die gezeigten Inhibitoren ebenfalls auf ihre Wirkung gegenüber Cysteinproteasen getestet werden sollten, wurde wie in Unterabschnitt 3.2.2 die Reaktion mit 2-Phenylethanthiol **29** untersucht. Dabei zeigte sich, dass unter identischen Bedingungen (Überschuss Thiol und Base in Ethanol, 70 °C, 22 h) nur die Chlor-Spezies **8** reagiert (vgl. Schema 21). Das Additions-Eliminierungsprodukt **43** konnte in 83 % Ausbeute isoliert werden. Im Fall des substituierten 3-Cyanonaphthochinons **7** konnte keine Reaktion beobachtet werden.



Schema 21: Reaktion der Substanzen **7** und **8** mit 2-Phenylethanthiol **29**, von denen unter gleichen Bedingungen nur Inhibitor **8** eine Reaktion eingeht.

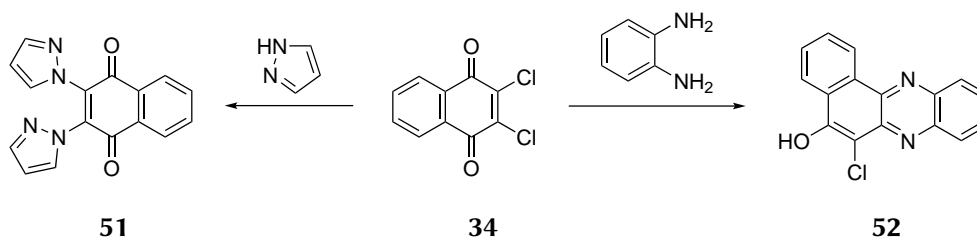
In Unterabschnitt 3.2.4 wurde bereits erläutert, dass das System bestehend aus 2-Phenylethanthiol im Lösemittel Ethanol nicht geeignet ist, um die Begebenheiten im Enzym nachzustellen. Die Reaktion zeigt, dass eine Reaktivität gegenüber Nucleophilen besteht. Die Inhibitoren zeigten eine Hemmung der untersuchten Enzyme. Die Reaktivität gegenüber dem Thiol und die damit in einem Fall einhergehende nukleophile Substitution muss allerdings keine Rückschlüsse auf den Inhibitionsmechanismus oder die Inhibitionspezialität zulassen.



Schema 22: Verschiedene Reaktionen von 2,3-Dicyano-1,4-naphthochinon **36**, oben: Shaker *et al.*, unten: Fahmi *et al.*

Der Grund für das Ausbleiben einer Reaktion von Substanz **7** ist nicht bekannt. In der Literatur wurden unterschiedliche Reaktionen beider Moleküle beschrieben. Shaker *et al.* zeigten die nukleophile Substitution beider Cyanogruppen durch 3-Aminopyridin-2-ol (**50**) um 5H-Naphtho[2,3-b]pyrido[3,2-e][1,4]oxazin-6,11-dion (**44**) zu erhalten. Wurde stattdessen 2-Aminophenol **48**, X=OH oder 2-Aminothiophenol **48**, X=SH im Überschuss eingesetzt gelangten sie zu Benzo[a]benzo[5,6][1,4]oxazino[3,2-c]phenoxazin bzw. Benzo[a]benzo[5,6][1,4]thiazino[3,2-c]phenothiazin (**45**, Schema 22).^[111] Fahmi *et al.* zeigten die Reaktion von 2,3-Dicyano-1,4-naphthochinon **36** mit verschiedenen Amidrazonen **49**. Bei dieser Reaktion addierte zuerst das Hydrazon-NH₂ an C-2, anschließend wurde HCN eliminiert. Im nächsten Schritt wurde die übrige Cyanogruppe durch die Azomethingruppe angegriffen und bildete unter Ringschluss 5-Imino-3-phenyl-4-aryl-4,5,5a,11a-tetrahydro-1H-naphtho[2,3-f][1,2,4]triazepin-6,11-dion (**46**, Schema 22).^[112]

Katritzky *et al.* erhielten ausgehend von 2,3-Dichlor-1,4-naphthochinon (**34**) 2,3-Di-(1-pyrazolyl)-1,4-naphthochinon (**51**) oder 6-Chlor-5-hydroxybenzo[a]phenazin (**52**) (Schema 23).^[113]



Schema 23: Verschiedene Reaktionen von 2,3-Dichlor-1,4-naphthochinon **34** nach Katritzky *et al.*

3.3.3. Biologische Untersuchungen zu Inhibitoren mit Naphthochinon-Warhead

Das Inhibitionspotential der Naphthochinon-Derivate an Cathepsin L und B, sowie Rhodesain und der Dengue-Virus Protease wurde ebenfalls durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. ████████ analysiert. Die Testergebnisse sind in Tabelle 3.7 dargestellt. Bei einer Inhibition von mehr als 60 % bei 20 μM Inhibitorkonzentration wurde der $K_i^{(*)}$ -Wert bestimmt. Im Gegensatz zu dem K_i -Wert, der die Dissoziationskonstante des initialen nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes darstellt, ist der K_i^* -Wert die Dissoziationskonstante des finalen Enzym-Inhibitor-Komplexes. Der $K_i^{(*)}$ -Wert wurde aus Auftragungen des IC_{50} -Werts gegen die Substratkonzentration erhalten und ist ebenfalls ein Maß für die Enzym-Inhibitor-Affinität.

Tabelle 3.7.: Inhibitionsdaten der Inhibitoren mit Naphthochinon-Warhead, prozentuale Inhibition bei 20 μM Inhibitorkonzentration, $K_i^{(*)}$ in nM

Subst.	Inhib. Cath. L	Cath. L $K_i^{(*)}$	Inhib. Cath. B	Cath. B $K_i^{(*)}$	Inhib. Rhod.	Rhod. $K_i^{(*)}$	Inhib. DENV PR	DENV PR $K_i^{(*)}$
8		1140	53 %			2900	41 %	N.d.
7		33		1900		180		4100
39		57	25 %	N.d.		24	43 %	N.d.
41		17	45 %	N.d.		0.15	38 %	N.d.
37	45 %	N.d.	N.d.	N.d.	48 %	N.d.	N.d.	N.d.
38	40 %	N.d.	N.d.	N.d.		1235	N.d.	N.d.
40	38 %	N.d.	N.d.	N.d.	51 %	N.d.	N.d.	N.d.
42	21 %	N.d.	N.d.	N.d.	38 %	N.d.	N.d.	N.d.

Die beiden Benzylester **7** und **8** zeigten eine starke Inhibition von Cathepsin L. Der $K_i^{(*)}$ -Wert von Substanz **8** lag im einstelligen micromolaren Bereich, das Cyanoderivat **7** zeigte sogar eine Affinität von 33 nM. Eine Inhibition von Cathepsin B und Rhodesain war ebenfalls vorhanden, aber deutlich schwächer. Jedoch zeigte Substanz **7** bei beiden Enzymen eine höhere Affinität. Um die Selektivität zu untersuchen wurde die Serinprotease des Dengue-Virus, DENV PR, analysiert. Sie wurde nur schwach durch die synthetisierten Substanzen gehemmt. Für die beiden Benzylester **7** und **8** wurde eine lineare Abhängigkeit der IC_{50} -Werte von der Substratkonzentration [S] gefunden

(steigende IC_{50} -Werte bei ebenfalls steigender Substratkonzentration [S]). Dies zeigte, dass es sich um eine kompetitive Inhibition handelt. Verdünnungsassays zeigten, dass diese Inhibition reversibel ist. Für die Substanzen **7** und **8** konnte für Cathepsin L eine vollständige Reaktivierung des Enzyms beobachtet werden. Nur im Fall von Rhodesain und Substanz **8** wurde eine Reaktivierung auf lediglich 40 % bis 50 % der ursprünglichen Aktivität beobachtet.

Tabelle 3.7 ist zu entnehmen, dass Cathepsin L durch die Substanzen **37**, **38**, **40** und **42** (Methyl und *tert*-Butylester beider Naphthochinonderivate) nur schwach inhibiert wird. Die prozentuale Hemmung lag zwischen 21 % und 45 %. Die Inhibition von Rhodesain lag in einem ähnlichen Bereich von 38 % und 51 %. Lediglich der Cyano-Methylester **38** zeigte eine höhere Inhibition mit einem $K_i^{(*)}$ -Wert von $1.2 \mu\text{M}$. Die Inhibition von Cathepsin B und DENV PR wurde jedoch nicht getestet. Durch die Spaltung der Benzylester wurden die beiden Säuren **39** und **41** erhalten. Beide zeigten $K_i^{(*)}$ -Werte im zweistelligen nanomolaren Bereich. Damit ist der $K_i^{(*)}$ -Wert von Säure **41** um einen Faktor 2 niedriger als der des entsprechenden Benzylesters **7**. Eine größere Differenz zeigt sich beim Vergleich der beiden Chlor-Derivate **8** und **39**, denn hier hat die Säure einen um Faktor 20 niedrigeren $K_i^{(*)}$ -Wert. Beim Vergleich der Werte für Rhodesain zeigten sich allerdings noch größere Unterschiede. Durch die Ergebnisse aus Unterabschnitt 3.2.3 wurde für die beiden Säuren **39** und **41** eine deutliche Verbesserung der Inhibitionswerte erwartet. Die Säure **39** zeigte dies mit einem $K_i^{(*)}$ -Wert von 24 nM, der eine um Faktor 120 höhere Affinität darstellt. Das Cyano-Derivat **41** zeigte ebenfalls eine deutliche Verbesserung. Der $K_i^{(*)}$ -Wert lag bei 0.15 nM und damit um den Faktor 1200 niedriger als der des Benzylesters **7**. Die Inhibition von Cathepsin B und der Dengue-Virus-Protease hingegen zeigte keine Verbesserung.

Um zu überprüfen, ob bei der Inhibition von Cathepsin L bzw. Rhodesain durch die Säuren **39** und **41** ein reversibler Mechanismus vorliegt, wurden Verdünnungsassays angefertigt. Dabei wurde bei einer InhibitorKonzentration, die dem 5-fachen des IC_{50} -Werts entspricht und einer anschließenden 50-fachen Verdünnung eine vollständige Reaktivierung des Enzyms beobachtet. Lediglich bei einer InhibitorKonzentration die dem 20-fachen IC_{50} -Wert entspricht, wurde für Substanz **41** und Rhodesain nur eine langsame Reaktivierung beobachtet. Als Referenz diente der irreversible Inhibitor K11777, bei dem keine Reaktivierung auftrat. Durch die erhaltenen kinetischen Daten konnte ermittelt werden, dass maßgeblich für die starke Inhibition, der initiale nicht-kovalente Enzym-Inhibitor-Komplex [E-I] ist und nicht die Ausbildung einer kovalenten Bindung.

Der Benzylester **7** wurde ebenfalls auf seine antitrypanosomale Aktivität untersucht und zeigte mit einem EC_{50} -Wert von $(0.12 \pm 0.13) \mu\text{M}$, wie erwartet, einen guten Wert.

3.3.4. Untersuchungen zur Geschwindigkeit der Spaltung der verschiedenen Ester

Aufgrund des ähnlichen Aufbaus der Substanzen, verglichen mit den Inhibitoren aus Abschnitt 3.2 und der gefundenen Spaltung des Benzylesters (vgl. Unterabschnitt 3.2.4), sollte auch hier überprüft werden, ob Rhodesain eine Esterspaltung verursacht.

3. | Ergebnisse und Diskussion

Dafür wurden die beiden Benzylester **7** und **8** in der Arbeitsgruppe von Prof. [REDACTED] mit Rhodessain inkubiert und mittels LC-MS untersucht. Dabei zeigte sich, wie auch zuvor beobachtet, dass der Benzylester durch Rhodessain hydrolysiert wurde. Wie in Abbildung 3.7 zu sehen ist, wurde eine Massenzunahme des Enzyms von 468.27 Da bzw. 459.14 Da beobachtet. Dies passt zu einer Spaltung des Benzylester und anschließenden Addition an das Enzym. Es wurde keine Eliminierung von HCl oder HCN beobachtet, was Voraussetzung für die kovalent-reversiblen Inhibition ist.

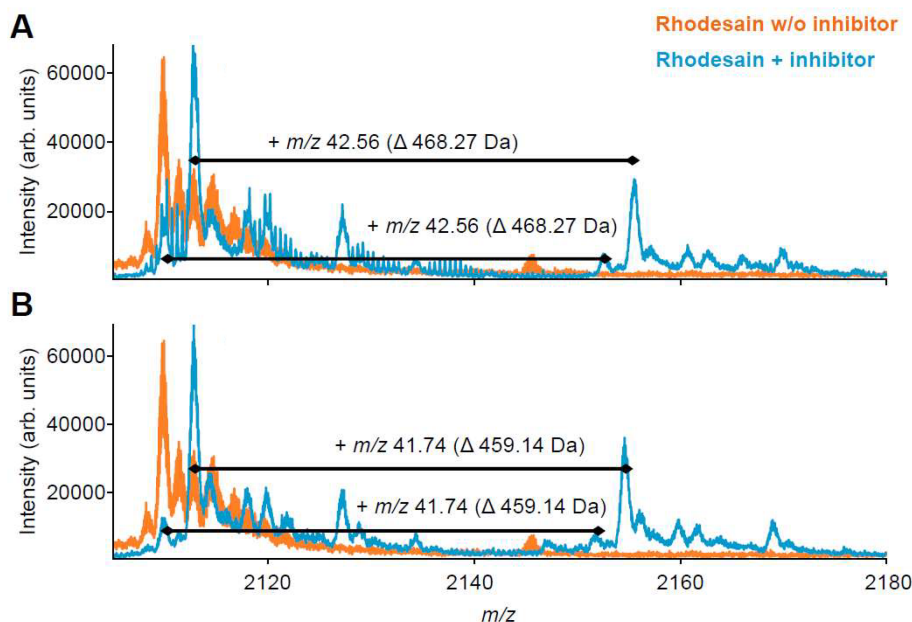


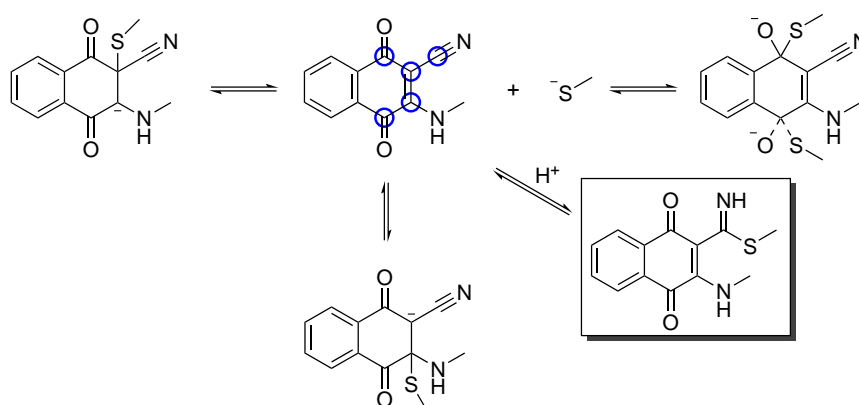
Abbildung 3.7.: ESI-Massenspektren von Rhodessain ($[M + 11 H]^{11+}$ bei $m/z=2109.9 \pm 20$ ppm) in An- (blau) und Abwesenheit (orange) der Inhibitoren **7** und **8** (A, B).^[114]

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse, sollte untersucht werden, ob eine Esterhydrolyse auch bei den Methyl- und *tert*-Butylestern auftrat. In der Arbeitsgruppe von Prof. [REDACTED] wurden die Inhibitoren **7**, **8**, **37**, **38**, **40** und **42** mit Rhodessain inkubiert und anschließend per LC-MS untersucht. Im Fall der Benzyl- sowie der Methylester wurden die Abbauprodukte, die entsprechenden freien Säuren, gefunden. Die *tert*-Butylester zeigten keine Veränderung. Die erhaltenen Massenspuren bestätigten zudem, dass die Inhibition nach der Hydrolyse durch eine nukleophile Addition und nicht über einen Additions-Eliminierungsschritt verläuft, da eine Massendifferenz gefunden wurde, die der Masse des Spaltprodukts entspricht, aber keiner Substitution des Chlors oder des Nitrils. Der zeitabhängige Verlauf der Hydrolyse ergab für den Benzylester **7** eine Halbwertszeit von $t_{1/2}=3.41$ min. Der entsprechende Methylester **38** wurde mit $t_{1/2}=10.2$ min langsamer hydrolysiert. Dies könnte ein Grund für die schwächere Inhibition der Methylester sein. Unter der Vermutung, dass das inhibitorische Potential der Benzylester aus der Hydrolyse und der anschließenden Freisetzung der aktiveren Säure kommt, könnte für die Methylester gelten, dass die aktive Spezies langsamer

gebildet wird und dadurch die Aktivität, verglichen mit den Benzylestern, geringer ist, da weniger freie Säure vorliegt.

3.3.5. Berechnungen zu möglichen Angriffspunkten eines Thiols

Durch verschiedene Experimente wurde bereits gezeigt, dass die Reaktion mit einem LMW-Thiol nicht die Situation im Enzym widerspiegelt. Im Enzym scheint zwar eine kovalente Bindung ausgebildet zu werden, wodurch ein kovalent-reversibler Inhibitionsmechanismus gefunden wurde. Allerdings kann diese kovalente Bindung nicht durch eine Substitutionsreaktion, wie sie für die Substanz **8** mit 2-Phenylethanthiol gefunden wurde, zustande kommen. Dies wurde durch die durchgeführten Versuche in Unterabschnitt 3.3.4 bestätigt, bei dem nie eine Massendifferenz gefunden wurde, die einer Freisetzung von HCl oder HCN entspricht. Um genauere Einblicke in die Energien zu erwartender Zwischenschritte zu erhalten, wurden durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Engels QM-Rechnungen durchgeführt. Dabei wurde der Inhibitor wie in Schema 24 zu sehen ist zu 2-Chlor-3-methylamino-1,4-naphthochinon bzw. 2-Cyano-3-methylamino-1,4-naphthochinon vereinfacht und das aktive Zentrum des Enzyms zu Methanthiol. Die umgebenden Wassermoleküle wurden durch den „conductor-like polarizable continuum model“ (C-PCM) Ansatz angenähert. Die Rechnungen beschränkten sich dabei auf die Reaktionsenergien im Lösemittel. Daher wurden weder die Umgebung des Enzyms noch die Entropie oder kinetische Effekte mit einbezogen. Es wurden die verschiedenen möglichen Angriffspunkte des Thiols betrachtet und die Energien der entstehenden Produkte berechnet. Die dabei erhaltenen Ergebnisse unterstützen die Daten der Assays, indem sie zeigen, dass die reversible Addition an die Doppelbindung energetisch begünstigt ist. Zu zeigen, welche Reaktion stattfindet, können sie nicht, da wie schon erwähnt eine sehr vereinfachte Darstellung des Systems genutzt wurde und für die genaueren Berechnungen wie z.B. QM/MM bzw. QM/MM/MD eine Kristallstruktur des inhibierten Enzyms benötigt wird.



Schema 24: Mögliche Angriffspunkte für das vereinfachte System für die quantenchemischen Berechnungen (für das Chlor-Derivat entfällt der eingerahmte Angriff am Nitril-Kohlenstoff).

3.3.6. Zusammenfassung

Die Synthese der geplanten Inhibitoren konnte erfolgreich durchgeführt werden. Die in 3-Position mit einer elektronenziehenden Gruppe substituierten Naphthochinone wurden an verschiedenen Enzymen getestet. Dabei ist besonders Substanz **41** hervorzuheben, die eine subnanomolare Affinität zu Rhodesain besitzt. Um mehr über den Wirkungsmechanismus zu erfahren, wurden verschiedene massenspektrometrische Experimente und kinetische Messungen durchgeführt, die zeigten, dass, wie in Unterabschnitt 3.2.4 für die anderen Inhibitoren gefunden, eine Hydrolyse des Benzylesters eintritt, welche den aktiven Inhibitor freisetzt. Außerdem wurde gezeigt, dass eine kovalent-reversible Inhibition auftritt. Dies wurde durch biologische Daten, massenspektrometrische Untersuchungen sowie QM-Rechnungen bekräftigt.

3.4. Neue kovalente Enzyminhibitoren für die markierungsfreie chemische Proteomik

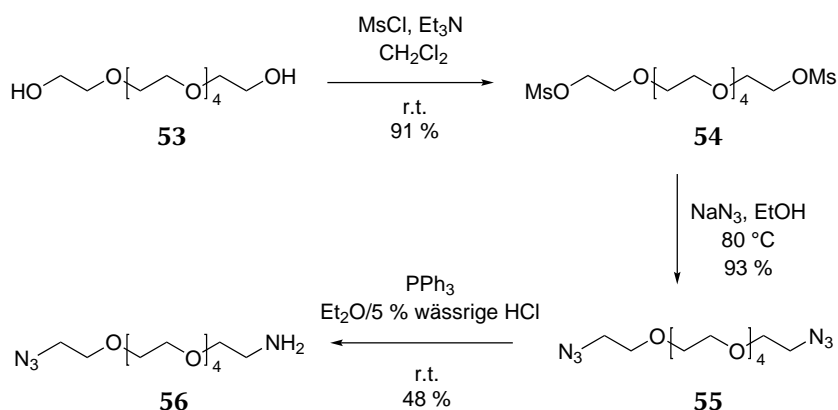
Die folgenden Synthesen und Ergebnisse wurden von Daniel Kodura im Rahmen seiner Bachelorarbeit unter meiner Betreuung erzielt.

Aufbauend auf den Ergebnissen aus Abschnitt 3.2 und Abschnitt 3.3 sowie der vorhergegangenen Inhibitorsynthesen in der Arbeitsgruppe sollte versucht werden einige der elektrophilen aromatischen Inhibitoren für die Anwendung in der markierungsfreien chemischen Proteomik zu modifizieren. Dazu sollten verschiedenen Proteomik-Sonden über einen Linker an das Molekül angebracht werden. Diese Sonden sollten eine endständige Azid-Gruppierung aufweisen, um eine spätere Reaktion via Azid-Alkin-Cycloaddition zu ermöglichen. Eine weitere Sonde sollte endständig Biotin enthalten, welches als Affinitätslabel agieren sollte. Für die Azid-Gruppe sollte ein auf Polyethylenglykol basierender Linker genutzt werden, Biotin sollte über eine Ethylendiamin-Brücke angebunden werden. Ziel war es den Linker mit der Sonde zu verknüpfen und anschließend ein freies Amin zu erhalten, das im letzten Schritt mit dem Warhead reagieren sollte.

3.4.1. Synthese der Inhibitoren mit Azid-Tag

Die Synthese des Azid-Tags ist in Schema 25 dargestellt. Durch Umsetzung mit zwei Äquivalenten Methansulfonylchlorid wurde ausgehend von Hexaethylenglycol **53** das doppelt mesylierte Produkt **54** in 91 % erhalten. Dieses wurde mit Natriumazid zum Diazid **55** umgesetzt und in 93 % erhalten. Die letzte Stufe war eine STAUDINGER-Reaktion, die in einem zweiphasigen Gemisch durchgeführt wurde, das aus einer 5%igen wässrigen HCl-Lösung und Diethylether bestand.

Das in der Reaktion entstehende Amin **56** sollte so in die wässrige Phase wandern, während Triphenylphosphin und unumgesetztes Edukt in der organischen Phase verbleiben sollten. Entgegen der Beschreibung in der Literatur wurde in dieser Reaktion lediglich eine Ausbeute von



Schema 25: Sytheschema des modifizierten Linkers ausgehend von Hexaethylglycol **53** mit Azid-Tag.

48 % erhalten.^[115] Der Grund könnte in der nicht erfolgten Reinigung der Vorstufe liegen. Eine Anpassung der Vorschrift an Calenbergh *et al.* oder der Wechsel zu Toluol als Lösemittel brachten keine Verbesserung.^[116]

Anschließend sollte der Linker an die in Abbildung 3.8 gezeigten Warheads angebracht werden.

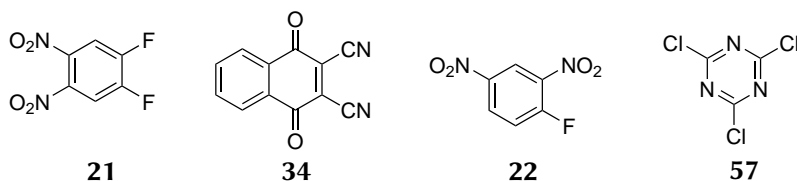


Abbildung 3.8.: Warheads, die für die Proteomik mit einem Tag versehen werden sollten.

Die Reaktion mit Difluordinitrobenzol **21** gelang mit einer akzeptablen Ausbeute von 47 % d. Th.. Ein Grund für die vergleichsweise niedrige Ausbeute war die Nebenreaktion, bei der eine Nitrogruppe anstelle eines Fluors substituiert wurde, was in vielen weiteren Reaktionen von Nitrofluoraromaten bereits beobachtet wurde. Diese unerwünschte Reaktion fand zu 14 % statt. Weiterhin wurde beobachtet, dass eine säurekatalysierte Zersetzung des Produkts in Chloroform auftrat. Die Reaktion mit Substanz **34** fand ebenfalls mit mäßiger Ausbeute statt. Das Produkt wurde unter vielen Nebenprodukten mit 53 % d. Th. isoliert. Um eine Sonde ohne reaktiven Warhead zu erhalten, sollte 1-Fluor-4-nitrobenzol ebenfalls umgesetzt werden. Bei Raumtemperatur fand jedoch keine Reaktion zum gewünschten Produkt statt, sodass stattdessen 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol **22** umgesetzt wurde. Diese Reaktion verlief mit einer Ausbeute von 69 % d. Th. Als letztes Beispiel wurde der PEG-Linker **56** mit Trichlortriazin **57** umgesetzt und das Produkt mit 50 % d. Th. erhalten.

Um für die spätere Anwendung sicherzustellen, dass keine Zersetzung in wässrigem Medium stattfand, wurde das Triazinderivat **58** 24 h in 50 % Wasser:Acetonitril-Lösung bei Raumtemperatur gelagert. Nach dieser Zeit konnte keine Zersetzung beobachtet werden. Die erhaltenen Produkte

3. Ergebnisse und Diskussion

sind in Abbildung 3.9 gezeigt.

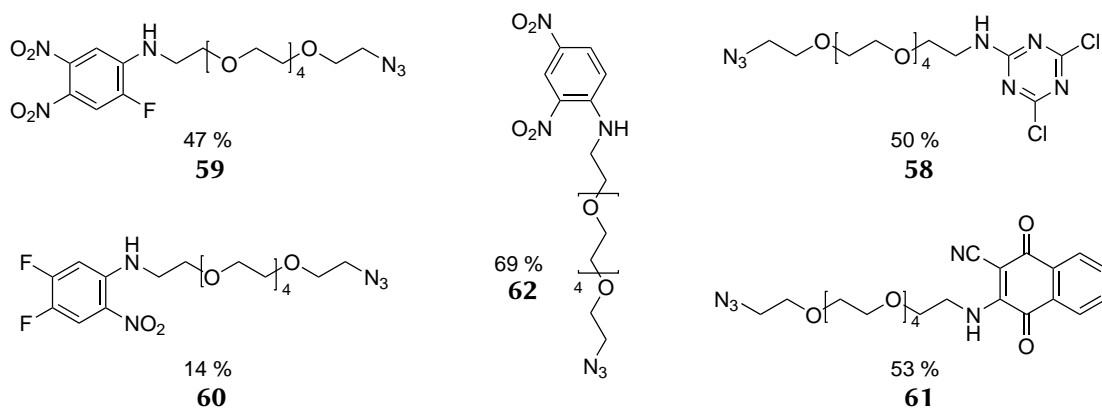
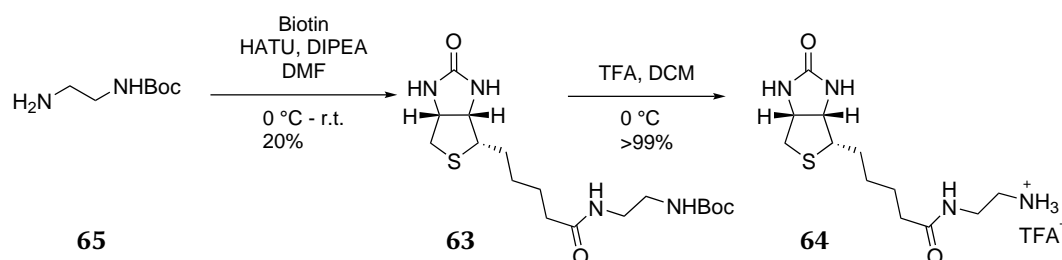


Abbildung 3.9.: Erhaltene Proteomik Sonden mit elektrophilem Warhead, Ethylenglycol-Spacer und Azid-Tag.

3.4.2. Synthese der Inhibitoren mit Biotin-Tag

Im Anschluss sollte anstelle des Azids, Biotin als Affinitätssonde dienen. In diesem Fall macht man sich die starke Wechselwirkung zwischen Biotin und Avidin zunutze.^[117] Dazu wurde in einem ersten Schritt Ethylendiamin nach Kazmaier *et al.* auf einer Seite Boc geschützt (nicht in Schema 26 gezeigt).^[118] Die Reaktion verlief mit einer hohen Ausbeute von 93 % (bezogen auf Di-*tert*-butyldicarbonat). Die anschließende HATU vermittelte Kupplung von Boc-Ethylendiamin **63** an Biotin erreichte lediglich Ausbeuten im Bereich von 20 % d. Th. Dies wurde auf die geringe Löslichkeit des Biotins und damit einhergehende Probleme bei der Reaktionsführung sowie der Reinigung zurückgeführt. In der Literatur wurden für diese Reaktion Ausbeuten von 39 % bzw. 56 % beschrieben, was ebenfalls zeigt, dass die Reaktion nur mäßige Ausbeuten liefert.^[119,120] Das anschließende Entfernen der Boc-Schutzgruppe zum Erhalt des gewünschten Produkts **64** wurde mit einer 20 % TFA-Lösung in Dichlormethan realisiert. Dies wurde in allen Fällen unmittelbar vor der Reaktion mit dem gewünschten Warhead durchgeführt, da das Boc-geschützte Derivat besser handhabbar und lagerbar war (Schema 26).

Die anschließende Reaktion des modifizierten Biotins mit den Warheads aus Abbildung 3.8 stellte sich als schwierig heraus. Hauptproblem der Reaktion war die geringe Löslichkeit sowohl des Edukts, als auch des Produkts. Anfängliche Reaktionen in Dichlormethan zeigten aufgrund dessen keinen Umsatz. Der Wechsel zu DMF als Lösemittel erwies sich als praktikabel, jedoch wurden in allen Fällen Substanzgemische erhalten, die durch Säulenchromatographie über Kieselgel nur schwer bis gar nicht trennbar waren. Für Substanzen **66**, **67** und **68** konnten angereicherte Proben erhalten werden, jedoch enthielten alle weitere Signale im NMR-Spektrum, die einem Triethylammoniumsalz zugeordnet werden konnten (Abbildung 3.10).



Schema 26: Syntheschema des Linkers ausgehend von geschütztem Ethylendiamin mit Biotin als Affinitätssonde.

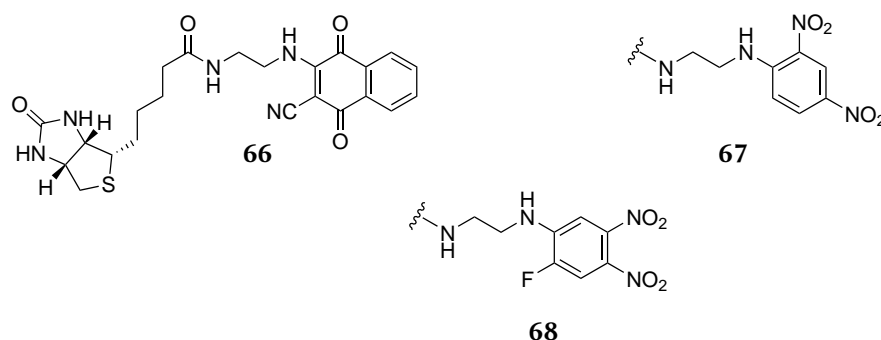


Abbildung 3.10.: Erhaltene Produkte mit Biotin als Affinitäts-Tag.

Im zeitlichen Rahmen der Bachelorarbeit konnten diese Substanzen nicht weiter gereinigt oder neu synthetisiert werden.

3.4.3. Zusammenfassung

Die vierstufige Synthese der mit HEG modifizierten Warheads gelang mit kleineren Schwierigkeiten. Eine davon war die STAUDINGER-Reaktion, die nur mäßige Ausbeuten lieferte. Hierbei könnte eine Reaktionsoptimierung oder der Wechsel auf ein anderes Reduktionsmittel Abhilfe schaffen. Die Verknüpfung mit dem Warhead im letzten Schritt gelang, allerdings unter einer Vielzahl von Nebenreaktionen. Da diese nicht analysiert wurden, kann keine genaue Aussage getroffen werden, jedoch sollte in weiteren Versuchen nicht mehr auf die Zugabe einer Base verzichtet werden, um die entstehende Säure abzufangen. Die Synthese des Biotin-Derivats gestaltete sich als komplizierter. Sowohl die Peptidkupplung zwischen *N*-Boc-Ethylendiamin 65 und Biotin als auch die nachfolgende Reaktion mit den verschiedenen Warheads war problematisch. Da die Peptidkupplung nicht optimiert wurde, steckt in dieser Reaktion viel Verbesserungspotential. Allerdings könnte auch ein verlängerter Alkyl-Linker zu einer besseren Löslichkeit beitragen, was eines der Hauptprobleme zu sein schien. Dieses Problem beeinträchtigt auch die Umsetzung mit den Warheads. Auch konnte aufgrund der Polarität des Produkts keine säulenchromatographische Trennung von ebenfalls sehr polaren Verunreinigungen erfolgen.

4. Zusammenfassung

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Weiterentwicklung der bereits bekannten Proteaseinhibitoren erfolgreich war und zu neuen interessanten Inhibitoren geführt hat. In der Synthese mit 1-Fluor-3,4-dinitrobenzol (**22**) wurde die Präferenz zur Substitution einer Nitro-Gruppe anstelle eines Fluors gefunden, was die Synthese des gewünschten Produkts erschwerte. Im Fall der Inhibitoren mit einem aromatischen Warhead wurden, im Vergleich zu den bereits bekannten Benzylester-Derivaten, durch die Veränderung des Esters keine stärkeren Inhibitoren erhalten. Lediglich im Fall der freien Säure **25** wurde ein enormer Anstieg im Inhibitionspotential gegenüber Rhodesain gefunden (Abbildung 4.1). NMR-Experimente und ESI-Massenspektren von Rhodesain in Anwesenheit der Inhibitoren zeigten, dass die Spaltung des Benzylester durch Rhodesain verursacht wurde, zeigten aber auch, dass der Inhibitionsmechanismus keine nukleophile aromatische Substitution sein kann. Dies wurde durch Berechnungen zu den Stabilitäten der auftretenden Meisenheimer-Komplexe sowie Docking-Studien unterstützt.

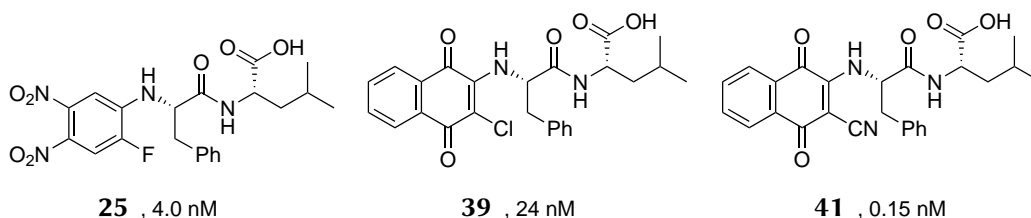


Abbildung 4.1.: Stärkste erhaltene Inhibitoren, die sowohl als Prodrug durch Rhodesain vom Benzylester ausgehend gespalten werden, als auch synthetisiert wurden (K_i in nM).

Auch für die Inhibitoren mit Naphthochinon-Warhead konnten neue Beispiele synthetisiert werden. Ähnlich zum vorherigen Abschnitt zeigten auch diese Inhibitoren ohne Schutzgruppe am C-Terminus eine enorme Verstärkung der Wirkung auf Rhodesain. Durch massenspektrometrische Untersuchungen wurde auch hier eine nukleophile Substitution als Mechanismus der Inhibition ausgeschlossen. Dies konnte ebenfalls durch QM-Berechnungen bekräftigt werden, die zeigen, dass eine Addition des Thiols an die Doppelbindung des Naphthochinons energetisch begünstigt ist (Abbildung 4.1).

In einem weiteren Abschnitt wurde die Anwendung von Warheads aus dieser Arbeit in der markierungsfreien chemischen Proteomik untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Synthese der Proteomik-Sonden mit einem Azid-Tag erfolgreich verlief, es aber noch deutliches Optimie-

4. | Zusammenfassung

rungspotential gibt. Die Synthese der Sonden mit Biotin als Affinitätslabel konnte nicht erfolgreich abgeschlossen werden. Das Produkt wurde zwar detektiert aber konnte aufgrund unterschiedlicher Schwierigkeiten wie Polarität oder Löslichkeit nicht isoliert werden. Die Anwendung dieser Proteomik-Sonden wurde leider nicht weiter untersucht, könnte jedoch einige interessante Details hervorbringen.

Teil II.

**Neue Inhibitoren der essenziellen
Oxidoreduktase Tryparedoxin aus
*Trypanosoma brucei***

5. Einleitung

5.1. Die afrikanische Trypanosomiasis

Als humane afrikanische Trypanosomiasis (HAT), auch afrikanische Schlafkrankheit, versteht man die Erkrankung, ausgelöst durch einen Befall mit dem Parasit der Art *Trypanosoma brucei*. Überträger der Krankheit sind infizierte Tsetsefliegen der Art *Glossina spp.* (species pluralis), die den Parasit auf den Menschen übertragen (Abbildung 5.1). Daher tritt die Erkrankung vor allem im sogenannten Tsetse-Gürtel auf, ein ca. 10 000 000 km² großes Gebiet zwischen dem 14. nördlichen und 29. südlichen Breitengrad.^[121,122] Bei ausbleibender Behandlung endet die Erkrankung tödlich. Erkrankungen beim Menschen sind auf zwei Unterarten zurückzuführen, *Trypanosoma brucei gambiense* und *Trypanosoma brucei rhodesiense*.



Abbildung 5.1.: links: Blutstromform von *Trypanosoma brucei brucei* (schwarzer Balken 10 µm),^[123] rechts: Tsetsefliege im Nationalpark Gorongosa, Mosambik.^[124]

Während der Erreger *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T.b. rhod.*) Auslöser der ostafrikanische Schlafkrankheit ist, handelt es sich bei *Trypanosoma brucei gambiense* (*T.b. gamb.*) um den Auslöser der westafrikanischen Schlafkrankheit. Der zuletzt genannte ist für 98 % der Fälle der humanen afrikanischen Trypanosomiasis verantwortlich. Allerdings ist der Krankheitsverlauf der ostafrikanischen Trypanosomiasis deutlich ausgeprägter und schwerer.^[125,126] Der Rückgang der Infektionszahlen in den letzten Jahren ist den steten Bemühungen der WHO und anderen Institutionen zuzuschreiben, die sich eine vollständige Eliminierung der Krankheit (d.h. keine Neuinfektionen mehr) bis zum Jahr 2030 als Ziel gesetzt haben. Der Plan sah vor, dass im Jahr

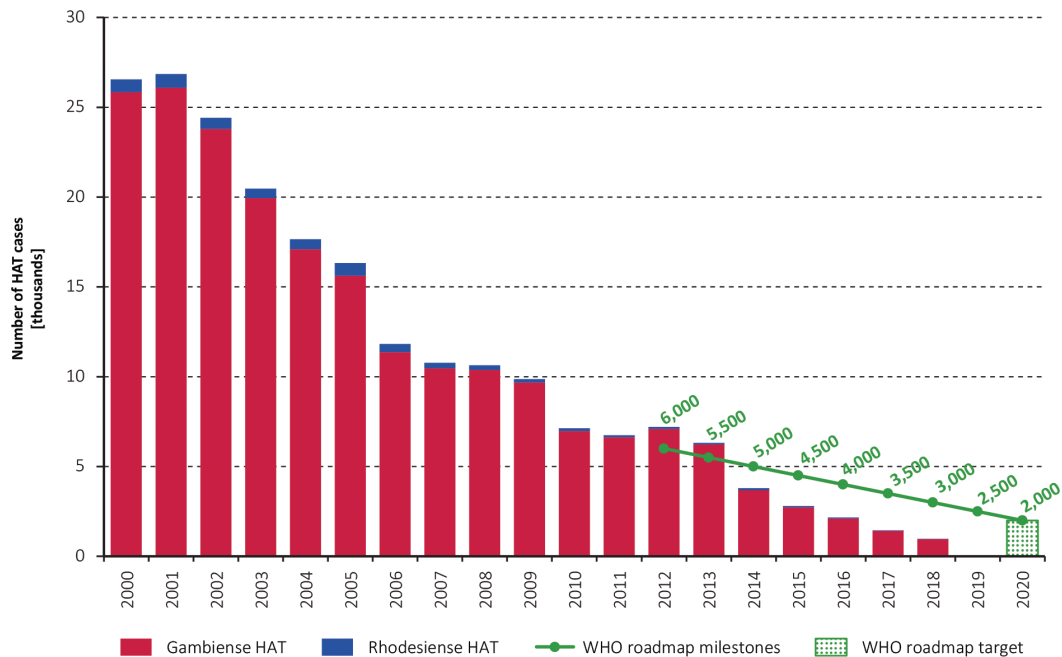


Abbildung 5.2.: Anzahl der Fälle von humaner afrikanische Trypanosomiasis mit Darstellung der festgelegten Ziele der WHO. Für 2019 wurden 980 Fälle gemeldet, was einen Anstieg um 3 Fälle im Vergleich zum Vorjahr bedeutet.^[127]

2020 die Krankheit kein Risiko mehr für die öffentliche Gesundheit darstellen sollte, was mit weniger als 2000 Neuinfektionen gleichzusetzen ist (Abbildung 5.2).^[128] Im Jahr 2019 wurden 864 Infektionen mit *T.b. gamb.* und 116 Infektionen mit *T.b. rhod.* gemeldet, was einen Anstieg von 3 Fällen im Vergleich zum Vorjahr bedeutet. Allerdings ist die Zahl der Ansteckungen mit *T.b. rhod.* um fast das 5-fache angestiegen. Dies ist auf einen Ausbruch in Malawi zurückzuführen, bei dem vor allem die in den Naturschutzgebieten Vwaza Marsh und Nkhotakota lebenden Wildtiere als Hauptreservoir des Erregers betrachtet werden.^[128] Daher bedarf es der weiteren strengen Überwachung damit das Ziel für das Jahr 2030 erreicht werden kann. Denn nach mehreren Epidemien in den Jahren 1896 bis 1906 und 1920 war die Krankheit weitestgehend unter Kontrolle. Eine Lockerung der Überwachungsmaßnahmen führte zu einem Wiederaufkommen bis hin zu epidemieartigen Infektionszahlen bis ins Jahr 1970. Bis in die 90er Jahre bzw. ins frühe 21. Jahrhundert konnte durch die Bemühungen der WHO, Nichtregierungsorganisationen, bilaterale Zusammenarbeit und Kontrollprogramme die Infektionskurve wieder gedreht und so bis auf ein Minimum reduziert werden.^[126]

Neben den zuvor Genannten, existiert mit *Trypanosoma cruzi* ein weiterer Parasit der Gattung der Trypanosomen, der den Menschen befällt und die sogenannte (süd-)amerikanische Trypanosomiasis oder Chagas-Krankheit auslöst. Diese wird durch den Kot oder Urin einer Unterfamilie der Raubwanzen (*Triatoma*, *Rhodnius* oder *Panstrongylus*) übertragen und existiert, wie der Name vermuten lässt, in weiten Teilen Mittel- und Südamerikas.^[129]

Diese oder andere Trypanosomen können ebenfalls in (Nutz-)Tieren weitere Erkrankungen hervorrufen. Zu erwähnen sind hierbei zum einen die Tierseuche *Nagana* (Erreger: *Trypanosoma brucei brucei*, *T. congolense*, *T. simiae*, *T. vivax*), die u.a. bei Pferden, Rindern, Schweinen, Schafen, Eseln, Hunden oder Katzen auftritt. Zum anderen die Parasitose *Surra* (Erreger: *Trypanosoma evansi*, *T. suis*), die weniger Rinder, aber dafür Pferde, Kamele, Hunde oder den Asiatischen Elefanten befällt. Der Befall dieser Nutztiere kann die Viehhaltung in ländlichen afrikanischen Gebieten extrem einschränken.

5.1.1. Ansteckung und Krankheitsverlauf

Die Ansteckung mit der afrikanischen Trypanosomiasis erfolgt über den Stich der Tsetsefliege. Infizierte Fliegen übertragen beim Stich die parasitären Erreger über den Speichel, zusammen mit gerinnungshemmenden Stoffen, in den Menschen. Die Tsetsefliege wiederum erhält die Erreger über eine Blutmahlzeit an infizierten Säugetieren, wie z.B. Rindern und Huftieren, die als Erregerreservoir dienen. Die Durchseuchungsrate der Insekten variiert stark und liegt im Bereich von 1 %. Bei den unterschiedlichen Lebenszyklen der Trypanosomen muss zwischen dem Zyklus in der Fliege und dem Zyklus im Menschen unterschieden werden. Nimmt das Insekt eine Blutmahlzeit an einem infizierten Säugetier, übertragen sich die Trypomastigoten und wandern in den Mitteldarm der Fliege, wo sie zu prozyklischen Trypomastigoten heranreifen. Durch Zellteilung vermehren sie sich und werden zu Epimastigoten. Anschließend verlassen sie den Mitteldarm und siedeln sich als metacyclische Trypomastigoten in der Speicheldrüse an um von dort auf ein Säugetier übertragen zu werden.^[130]

Der Zyklus im Säugetier beginnt mit der Übertragung der metacyclischen Trypomastigoten, die sich über den Blutkreislauf im Körper verteilen.^[131] Je nachdem in welcher Körperflüssigkeit Parasiten nachgewiesen werden können, unterscheidet man zwischen zwei Phasen der Krankheit. In der 1. (hämolympathischen) Phase werden Erreger im Blut und in der Lymphe gefunden. In der 2. (meningoenzephalitischen) Phase ist der Erreger bereits in das zentrale Nervensystem vorgedrungen und kann in der Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit nachgewiesen werden. Im Blut vermehren sich die Parasiten über Zellteilung. Je nachdem mit welcher Trypanosomenart die Ansteckung erfolgt, beträgt die Inkubationszeit 1–3 Wochen für *T.b. rhod.* und mehrere Wochen und Monate für *T.b. gamb.* Die erste Phase ist gekennzeichnet durch Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen, Schüttelfrost und das Winterbottom-Zeichen, eine Anschwellung der Lymphknoten im Nacken. In einigen Fällen (5–20 %) tritt zusätzlich der Trypanosomenschanter, eine schmerzhaft Hautrötung im Bereich der Einstichstelle auf. Die 2. Phase beginnt nach dem Durchqueren des Parasiten durch die Blut-Hirnschranke. Dies ist für *T.b. rhod.* nach ca. 21–60 Tagen und für *T.b. gamb.* 300–500 Tagen der Fall. Eine Unterscheidung der beiden Phasen ausschließlich anhand klinischer Merkmale ist schwierig, eine sichere Aussage kann nur nach Untersuchung des *Liquor cerebrospinalis* getroffen werden.^[133] Die Symptome der 2. Phase haben der Krankheit ihren Namen *Schlafkrankheit* gegeben, da im Endstadium

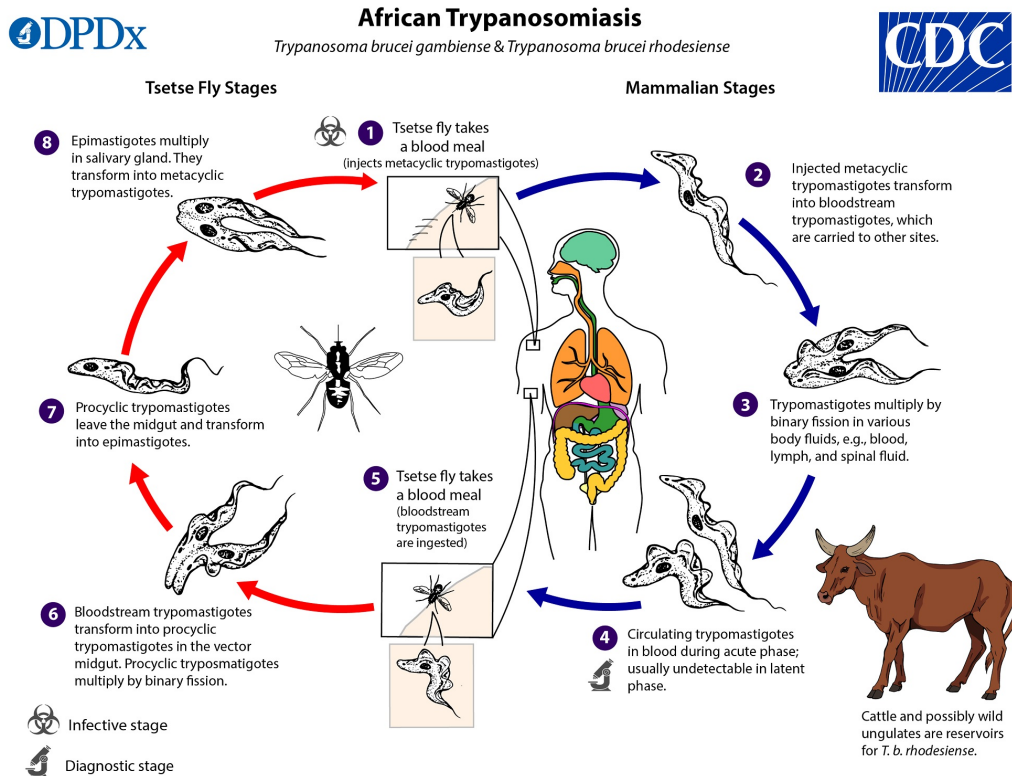


Abbildung 5.3.: Lebenszyklus und verschiedene Formen von *T.b. rhod.* und *T.b. gamb.* im Insekt (links, rot) und im Säugetier (rechts, blau).^[132]

ein kontinuierlicher Dämmerzustand auftritt, in dem der Erkrankte unter einem gestörten Schlaf-Wach-Rhythmus leidet, was zu Verwirrungszuständen, Gewichtsverlust und Apathie führt. Schäden, die in dieser Zeit am ZNS entstehen, sind irreparabel. Die Krankheit endet nach Monaten bis Jahren tödlich, wenn der Patient nicht behandelt wird.^[125,136]

5.1.2. Therapie und Medikamente

Da derzeit keine vorbeugenden Medikamente oder eine Impfung gegen die Schlafkrankheit existieren, ist die wichtigste Maßnahme, sich vor den Stichen der Tsetsefliege zu schützen. Dies geschieht durch das Tragen langer heller Kleidung, da die Fliegen bevorzugt auf dunklen Kleidungsstücken landen. Außerdem empfiehlt sich der Gebrauch von Repellents und für die Nacht der Einsatz von Insektennetzen. Allerdings kann keine dieser Methoden einen 100%igen Schutz bieten, da die Insekten äußerst aggressiv vorgehen. Dies macht Medikamente, die bei einer akuten Erkrankung eingesetzt werden können, unentbehrlich. Dabei werden in den unterschiedlichen Stadien auch verschiedenen Medikamente verwendet. Generell sind die Medikamente, die zur Behandlung der 1. Phase dienen, weniger toxisch. Medikamente für die 2. Phase enthalten in einem Fall Arsen, was zu

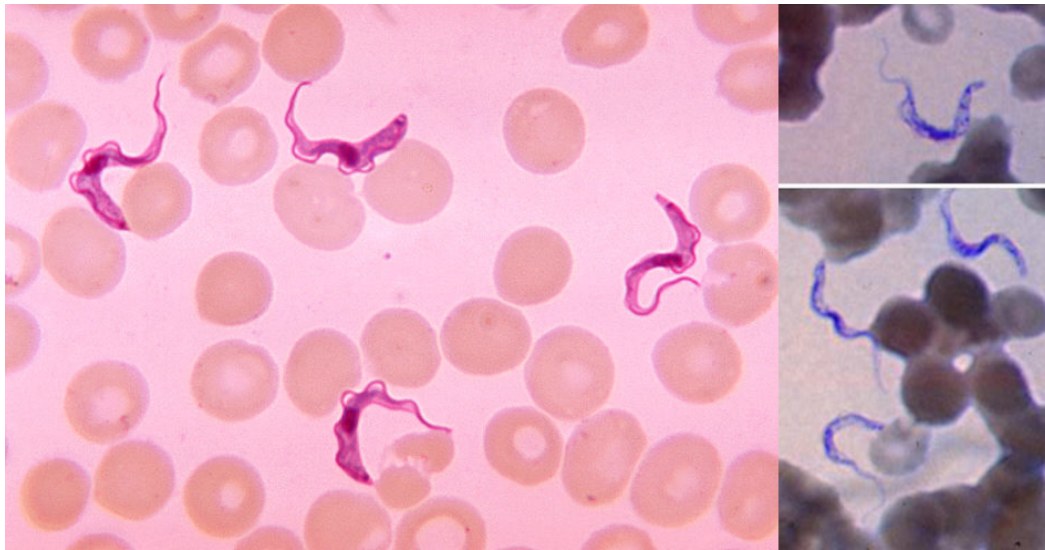


Abbildung 5.4.: links: Blutausstrich mit Trypanosomen nicht näher genannter Unterart eines Patienten mit HAT,^[134] rechts: Blutausstrich mit Giemsa-Färbung.^[135]

einer erhöhten Toxizität führt und müssen in einigen Fällen intravenös verabreicht werden, was die Anwesenheit von geschultem Personal voraussetzt.

Für die Infektion mit *T.b. gamb.* in der 1. Phase steht das Medikament Pentamidin zur Verfügung, welches 1937 von dem britischen Chemiker Arthur James Ewins gefunden wurde und seit 1940 bis heute im Einsatz ist. Es wird täglich über einen Zeitraum von 7–10 Tagen intramuskulär verabreicht. Die Nachteile sind die fehlende Wirksamkeit gegen *T.b. rhod.* und dass ausschließlich Erkrankungen in der 1. Phase therapiert werden können. Von Vorteil ist, dass keine Resistenzbildung bei den Parasiten beobachtet wurde.^[137,138]

Ein Mittel für die Bekämpfung der 1. Phase bei einer Erkrankung mit *T.b. rhod.* ist Suramin, ein farbloser Abkömmling des Bisazofarbstoffs Trypanblau. Erste Feldversuche mit Suramin fanden 1922 statt. Das Mittel wurde in fünf intravenösen Injektionen alle 3–7 Tage über 4 Wochen verabreicht. Auch mit diesem Medikament ist eine Behandlung der 2. Phase der Erkrankung nicht möglich, allerdings zeigte sich, dass Suramin unterstützend für Medikamente der 2. Phase wirken kann. Eine Resistenzentwicklung konnte hier ebenfalls nicht beobachtet werden.^[137,138]

Für die 2. Phase wurde unter anderem Melarsoprol genutzt. Dieses Medikament lässt sich auf die Strukturelemente Dimercaprol, Melamin und Arsen zurückführen und wurde 1949 eingeführt. Es muss intravenös verabreicht werden. Die Vorteile liegen darin, dass es wirksam gegen beide Erreger in der 2. Phase der Erkrankung ist. Damit ist es das einzige Mittel, das gegen die späte ostafrikanische Schlafkrankheit hilft. Allerdings wird eine steigende Resistenz gegenüber Melarsoprol beobachtet und zusätzlich besteht die bereits erwähnte hohe Toxizität durch das enthaltene Arsen. So erleiden 5–10 % der Patienten eine Enzephalopathie nach der Behandlung, die für ca. 50 % tödlich endet.^[137,138]

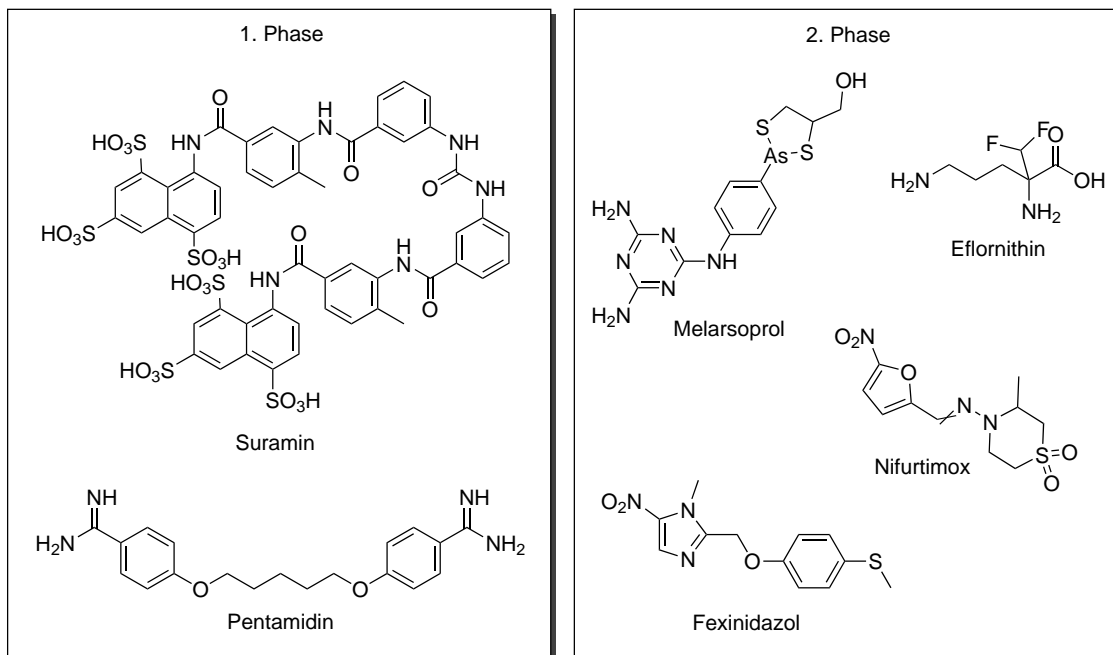


Abbildung 5.5.: Aktuelle und nicht mehr genutzte Medikamente, die für die Behandlung der unterschiedlichen Stadien der Humane afrikanische Trypanosomiasis zur Verfügung stehen.

Eflornithin wurde gegen *T.b. gamb.* eingesetzt und ist weniger toxisch als Melarsoprol. Es wird seit 2009 in einer Kombinationstherapie eingesetzt, wurde aber schon 1990 zur Behandlung der Trypanosomiasis zugelassen. Dabei machte es vor allem der zeitliche Aufwand unpraktikabel, da es 14 Tage lang alle 6 Stunden intravenös verabreicht werden musste.^[139]

Das 1967 zugelassene Nifurtimox wurde ursprünglich gegen die amerikanische Trypanosomiasis entwickelt. Jedoch zeigten Studien auch Wirksamkeit gegenüber *T.b. gamb.*, wonach es *off-label* verschrieben wurde. Die Wirksamkeit gegen *T.b. rhod.* ist allerdings wesentlich geringer. Von großem Vorteil ist die orale Verfügbarkeit, allerdings zeigt das Medikament nur geringe Wirksamkeit gegen die 2. Phase der Trypanosomiasis.^[140]

Die aktuellste Chemotherapie ist die bereits erwähnte Nifurtimox-Eflornithin Kombinationstherapie (aus dem Englischen: NECT). Die Therapie besteht aus 3 täglichen Dosen Nifurtimox in Tablettenform über 10 Tage und 14 Infusionen mit Eflornithin über 7 Tage. Das ist eine deutliche Reduktion im Vergleich zu der Eflornithin-Monotherapie. Zusätzlich kann speziell für die Eflornithin-Therapie ausgebildetes Personal ohne größere Umschulung die neue Therapie anwenden. Weitere Vorteile sind die geringeren Kosten für die Medikamente, aber auch geringere Transportkosten aufgrund des geringeren Volumens der Medikamenten-Kits. Dennoch können sich auch hier Resistenzen entwickeln, wodurch die Entwicklung neuer Medikamente wichtig ist.^[140]

Ein neues Medikament, das potentiell für beide Phasen der Krankheit eingesetzt werden kann, ist

Fexinidazol. Dieses Nitroimidazol wird oral über 10 Tage eingenommen und könnte einen Durchbruch bei der Bekämpfung der HAT darstellen (Abbildung 5.5). Andere Medikamente, die aber noch nicht angewendet werden, sind das Oxaborol SCYX-7158, welches sich gerade in der 3. klinischen Phase befindet oder Pafuramidin, ein Analogon von Pentamidin, welches es bis zur 3. klinischen Phase schaffte, die dann allerdings aufgrund von Leber- und Nierentoxizität gestoppt wurde (Abbildung 5.6).^[140] Alle Medikamente weisen ein großes Nebenwirkungsspektrum auf,

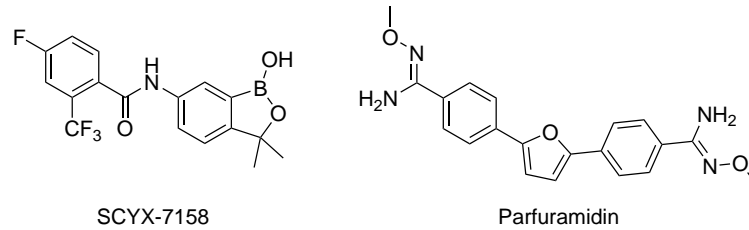


Abbildung 5.6.: Strukturen der beiden Medikamente SCYX-7158 und Pafuramidin.

wodurch auch weiterhin die Entwicklung neuer Pharmazeutika notwendig ist, um das Ziel, die permanente Ausrottung der Krankheit, zu erreichen.

5.1.3. Redoxkaskade des Erregers als Angriffspunkt und Unterschied zum Menschen

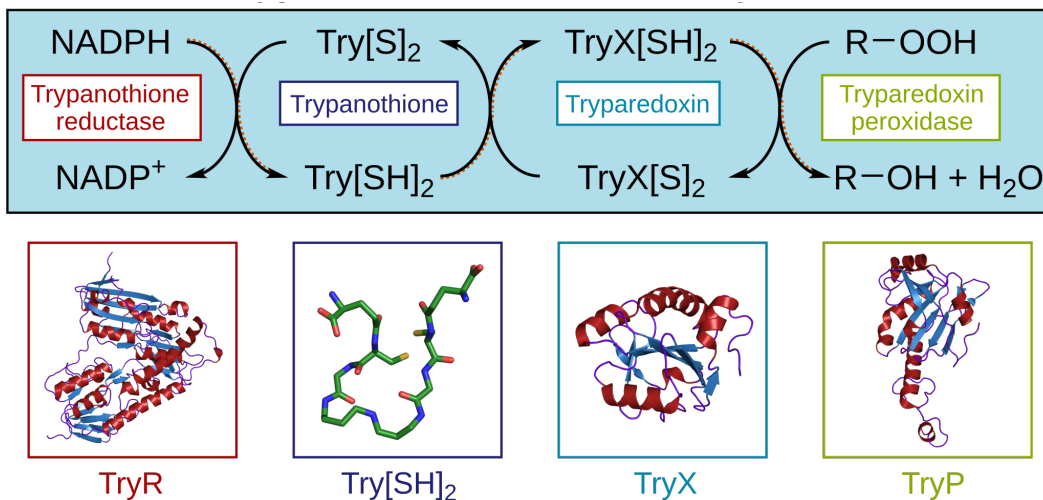


Abbildung 5.7.: Detoxifizierungskaskade von Hydroperoxiden in Trypanosomen (PDB-Nummer der Kristallstrukturen von links nach rechts: 1BZL, 1BZL, 1I5G, 4LLR).^[141]

Ein genutzter Angriffspunkt für die aktuelle Entwicklung von Medikamenten gegen *Trypanosoma brucei* ist der Mechanismus, mit dem sich der Parasit vor oxidativem Stress schützt. Darüber hinaus dient diese Redoxkaskade nicht nur der Zelldetoxifizierung, sondern auch der Proteinreparatur über

die Methioninsulfoxid Reduktase und der DNA Replikation über die Ribonukleotidreduktase, indem es für diese Prozesse benötigte Reduktionsäquivalente bereitstellt. Die Kaskade als Angriffspunkt ist deshalb so attraktiv, weil sie sich maßgeblich zu der von Säugetieren unterscheidet. Anstelle des im Menschen vorkommenden „Tripeptids“ Glutathion, welches ein wichtiges Antioxidationsmittel in allen Zellen darstellt, liegt im Parasit Trypanothion vor. Dieses setzt sich aus zwei Glutathion-Molekülen zusammen, die durch ein Spermidin verbunden sind. Dadurch erhält es seine einzigartige Reaktivität, die auf die Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke zurückzuführen ist.^[142] Die Redoxkaskade der Detoxifizierung von Peroxiden ist in Abbildung 5.7 gezeigt. Sie beginnt mit der Reduktion eines Peroxids über die Tryparedoxin-Peroxidase, wobei diese selbst oxidiert wird. Für die Reduktion der Peroxidase wird Tryparedoxin oxidiert, wobei sich eine Disulfidbindung zwischen Cystein-43 und Cystein-40 bildet. Diese Oxidation wird über Reduktion von Trypanothion rückgängig gemacht, welches wiederum durch die Trypanothion-Reduktase NADPH-abhängig reduziert gehalten wird. Obwohl die Trypanothion-Reduktase das am besten untersuchte Enzym dieser Kette darstellt und Inhibitoren bereits gefunden wurden, konnte gezeigt werden, dass eines der beiden Cysteine im Tryparedoxin (Cys-40 und Cys-43), die an der Disulfidbindung beteiligt sind, ebenso ein guter Angriffspunkt für kovalente Inhibitoren sein kann.^[143,144]

5.1.4. Entdeckung von CFT als Inhibitor

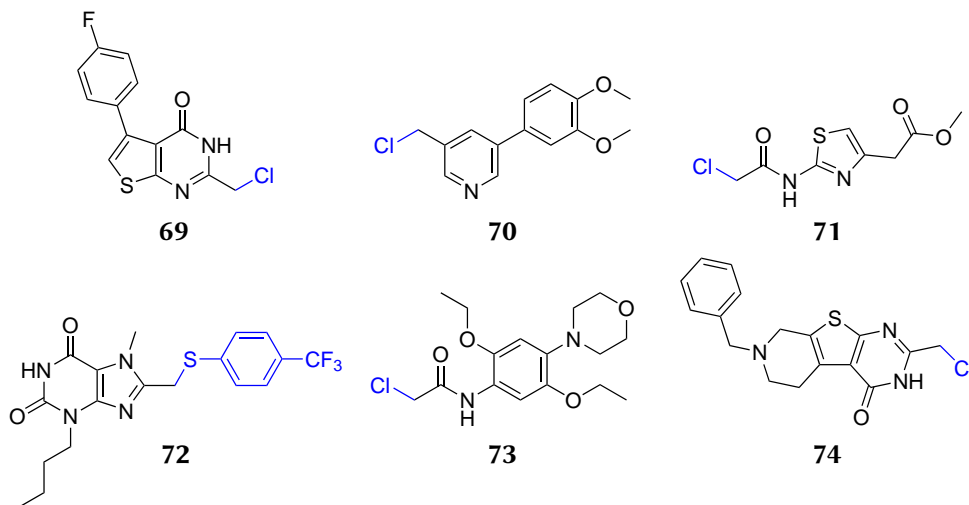


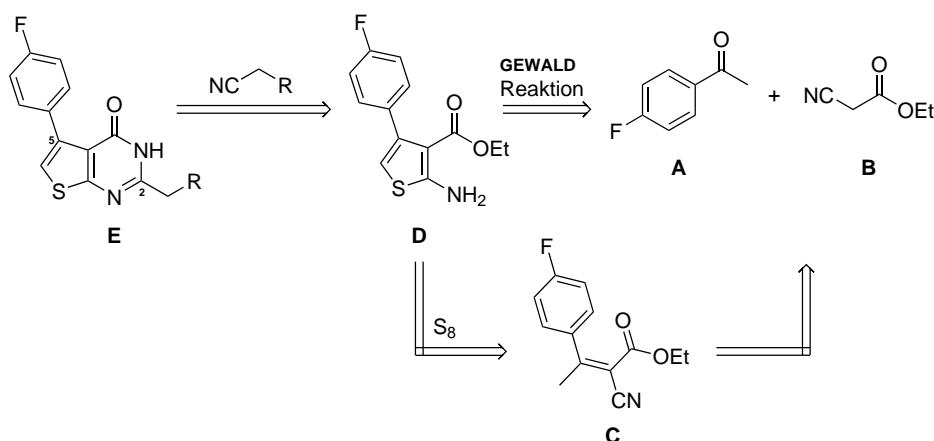
Abbildung 5.8.: Die sechs Molekülstrukturen aus dem HTS, die neben der höchsten Inhibition gegenüber Tryparedoxin auch die niedrigste Aktivität gegenüber HeLa-Zellen besitzen (Fluchtgruppe in blau).^[145]

Die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Krauth-Siegel untersuchte in einem Hochdurchsatz-Screening (aus dem Englischen, HTS) nahezu 80000 Chemikalien, auf ihre Wirkung auf das Peroxidase-System von *Trypanosoma brucei*, bestehend aus Trypanothion, Trypanothion-Reduktase, Trypanothion-

Peroxidase und Tryparedoxin.^[145] Hierbei konnten zwölf potente Inhibitoren des Systems gefunden werden. Um deren Selektivität beurteilen zu können, wurde die Toxizität sowohl in HeLa-Zellen als auch in Parasiten bestimmt. Die sechs aktivsten und gleichzeitig selektivsten Substanzen sind in Abbildung 5.8 gezeigt. Die entsprechenden EC_{50} -Werte lagen im Bereich von $0.6 \mu\text{M}$ – $4.2 \mu\text{M}$ und die Selektivitäten (Quotient aus den EC_{50} -Werten von HeLa und *T. brucei*) der Inhibitoren lagen zwischen 7 und über 83. Detaillierte Untersuchungen zeigten, dass das Ziel dieser Inhibitoren nicht wie zuvor angenommen die Trypanothion-Reduktase ist, sondern Tryparedoxin. Dies konnte anhand von HPLC-MS Daten belegt werden, bei denen eine Inkubation der reduzierten Form von Tryparedoxin mit den jeweiligen Inhibitoren immer zu einem entsprechenden Anstieg der gefundenen Masse führte. Die Massendifferenz war in allen Fällen eine Zunahme um die Masse des Inhibitors abzüglich der Fluchtgruppe. Genauere Tests konnten belegen, dass es sich tatsächlich um eine kovalente Modifikation des Schwefels am Cys-40 des Tryparedoxins bzw. um eine nukleophile Substitution des Chlorids handelte. Wie zuvor beschrieben bildet diese Aminosäure mit Cys-43 die Disulfidbrücke der oxidierten Form.

6. Motivation und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, den in Unterabschnitt 5.1.4 gezeigten Inhibitor **69** synthetisch zugänglich zu machen. Von Krauth-Siegel *et al.* wurde der Inhibitor lediglich auf seine biochemischen Eigenschaften untersucht, es wurde jedoch keine Synthese beschrieben.^[145] Da der Inhibitor nicht in der Literatur beschrieben war, musste eine Syntheseroute entwickelt werden. Um für eine einfache Zugänglichkeit weiterer Derivate zu sorgen, sollte die Synthese modular gestaltet werden. Zielmoleküle mit unterschiedlichen Substituenten in den Positionen 2 und 5 sollten dadurch ermöglicht werden (vgl. Schema 27).

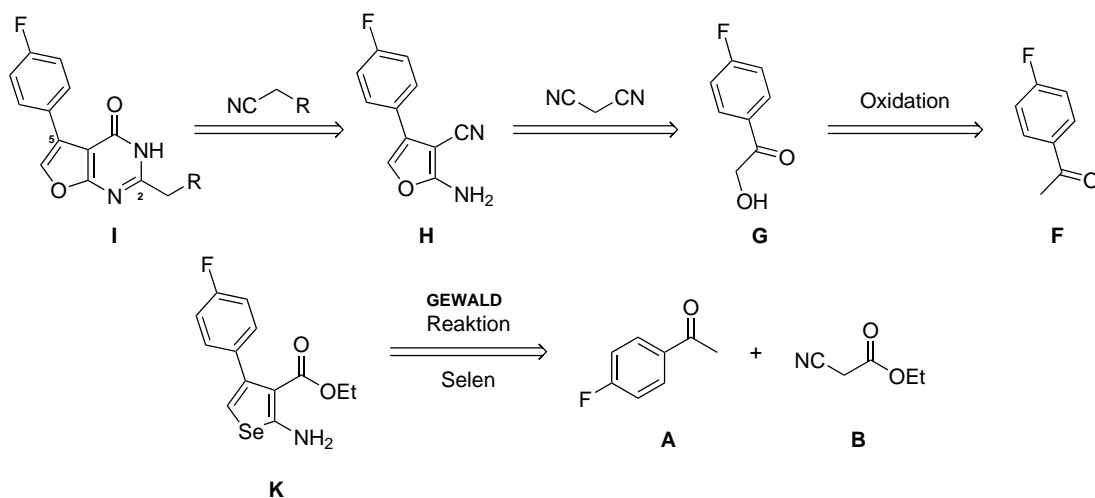


Schema 27: Retrosynthetische Analyse von 2-(Chlormethyl)-5-(4-fluorphenyl)thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-on **E** ausgehend von kommerziell erhältlichem Fluoracetophenon **A** und Cyanessigsäureester **B**.

Über die Wahl eines geeignet substituierten Acetophenons sollte Position 5 variiert werden können. Der Ringschluss zum Thienopyrimidinon (Schritt **E**) sollte unter sauren Bedingungen mit Chloracetonitril, für die bekannte Leitstruktur **69** (R=Cl) oder mit einem entsprechend substituierten Acetonitrilderivat stattfinden, wodurch eine Modularität in Position 2 erreicht wird. Das dafür benötigte Thiophen **D** sollte entweder über eine zweistufige Synthese erhalten werden, in der zuerst substituiertes Acetophenon **A** mit Cyanessigsäureethylester **B** in einer KNOEVENAGEL-Kondensation zu Produkt **C** reagiert. In der nächsten Stufe sollte mit elementarem Schwefel der Ringschluss und die anschließende Aromatisierung zum Thiophen erreicht werden. Diese beiden Schritte könnten auch *one-pot* in einer GEWALD-Reaktion durchgeführt werden, gemäß Schema 27. Es sollte vergli-

6. | Motivation und Zielsetzung

chen werden, ob die zweistufige Versuchsführung der *one-pot*-Synthese vorzuziehen ist. Zudem



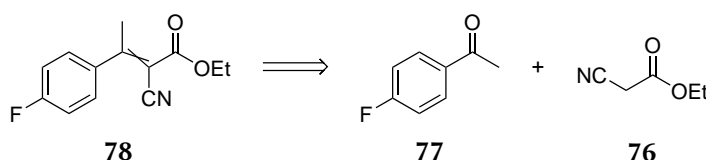
Schema 28: Mögliche Syntheseroute für die Darstellung des Furanopyrimidins **I** ausgehend von Startmaterial **F**, vorgeschlagene Route zu Selenopyrimidinon **K**.

sollten Synthesen entwickelt werden, die es ermöglichen das Thiophen durch ein Furan **I** oder durch ein Selenophen **K** zu ersetzen, um die unterschiedlichen Einflüsse dieser Heteroaromaten zu untersuchen (Schema 28). Da die GEWALD-Reaktion zu Thiophenen führt und nicht dazu genutzt werden kann, Furane darzustellen, sollte eine alternative Route entwickelt werden. Diese ist in Schema 28 dargestellt, wobei der Unterschied zu Schema 27 hauptsächlich in einer Oxidation des Startmaterials **F** zu Molekül **G** liegt, womit der Furan-Sauerstoff eingeführt wird. Anschließend sollte der Ringschluss mit Hilfe von Malonodinitril vollzogen werden, wobei Produkt **H** erhalten werden sollte. Dieses Zwischenprodukt unterscheidet sich in der Substitution an Position 3 und im Heteroaromaten im Vergleich zur Synthese des Thiophens. Der anschließende Ringschluss sollte analog zu Thiophen **E** erfolgen. Im Fall von Selen sollte getestet werden, ob beim Ringschluss der zweistufigen Synthese bzw. in der *one-pot* GEWALD-Reaktion eine Substitution von elementarem Schwefel durch Selen möglich ist. Die erhaltenen Produkte sollten auf ihre biologische Aktivität getestet und untereinander verglichen werden.

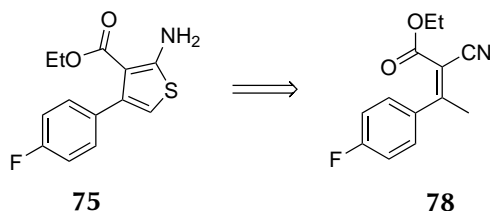
7. Ergebnisse und Diskussion

7.1. Synthese des kovalenten Tryparedoxin-Inhibitors

Das gewünschte Produkt **75** sollte, wie in Schema 29 und 30 gezeigt, über zwei Stufen synthetisiert werden. Dabei sollte der erste Schritt aus einer KNOEVENAGEL-Reaktion zwischen Cyanessigsäureethylester (**76**) und 4-Fluoracetophenon (**77**) bestehen und zu Produkt **78** führen. Im zweiten Schritt sollte der Ringschluss zum substituierten Thiophen durch Reaktion mit elementarem Schwefel erreicht werden.



Schema 29: KNOEVENAGEL-Kondensation als erster Schritt der Synthese.

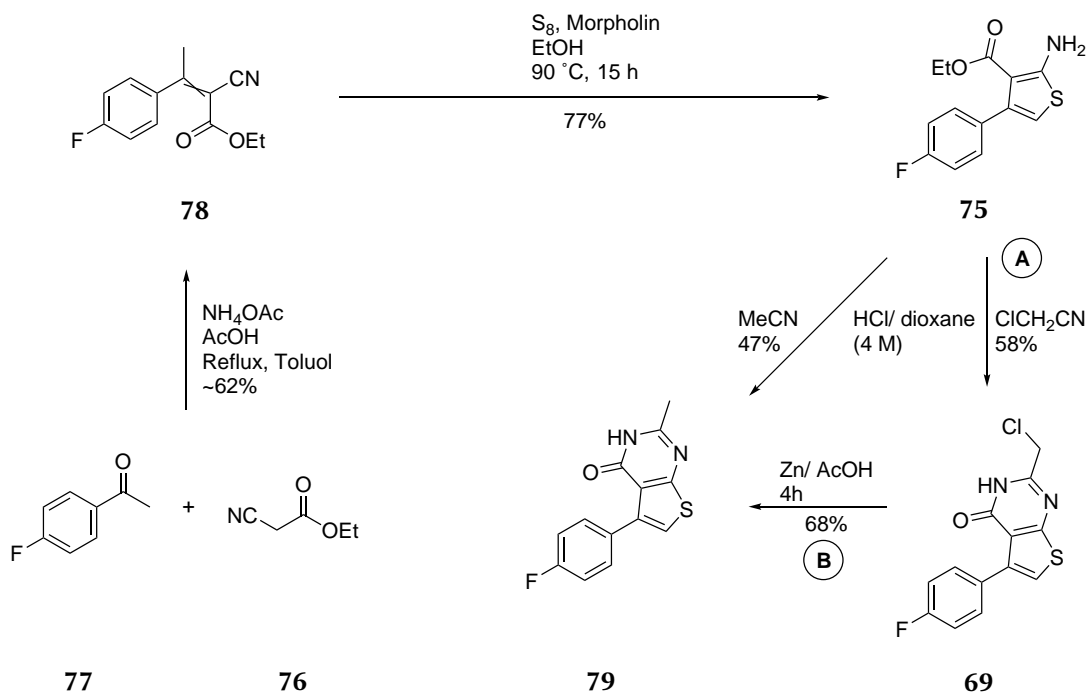


Schema 30: Ringschluss mit elementarem Schwefel zum 2-Aminothiophen.

In Anlehnung an Mignani *et al.* erfolgte der erste Schritt der Synthese mittels KNOEVENAGEL-Reaktion in Toluol mit einer Mischung aus Ammoniumacetat und Essigsäure in äquimolaren Mengen.^[146] Unter Wasserabscheidung mit Hilfe von azeotroper Destillation mit Toluol wurde die Mischung 22 h erhitzt. Dabei wurde das Produkt **78** als Mischung der (*E*)- und (*Z*)- Isomere in einem Verhältnis von 2:1 erhalten. Zusätzlich enthielt die Rohmischung noch beide Edukte in nicht geringen Mengen. Durch eine kurze Kieselgelfiltration konnte der Ethylester (**76**) abgetrennt werden und es lag nur noch das gewünschte Produkt mit einer Verunreinigung von ca. 20 % des Acetophenons (**77**) vor. Die Ausbeute lag bei ungefähr 62 % nach NMR. Da eine Trennung mittels Säulenchromatographie nicht möglich war und davon ausgegangen wurde, dass das Acetophe-

7. | Ergebnisse und Diskussion

non in der Folgereaktion nicht stören würde, wurde mit dieser Mischung ohne weitere Reinigung weitergearbeitet.



Schema 31: Synthese von 2-(Chlormethyl)-5-(4-fluorphenyl)thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-on **69** und 5-(4-Fluorphenyl)-2-methylthieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-on **79**, alternativ über Dechlorierung (B).

Der nächste Schritt sollte, wie in Schema 31 gezeigt, die Cyclisierung zum Thiophen im Basischen sein. Dabei wurde das mit Ausgangsmaterial verunreinigte Ethyl 2-cyano-3-(4-fluorphenyl)but-2-enoat (**78**) in einem druckbeständigen Gefäß zusammen mit Schwefel und Morpholin in Ethanol suspendiert. Nach Erhitzen auf 90°C wurde von unreaktiertem Schwefel filtriert und mit Ethanol gewaschen. Die Verunreinigung schien wie erwartet keinen Einfluss auf die Ausbeute zu haben, sodass nach Säulenchromatographie und Kristallisation aus *n*-Hexan das gewünschte Produkt in 77 % Ausbeute erhalten wurde. Die Autoren um A. Flinn beschreiben, dass ausschließlich das (*Z*)-Isomer des Butenoats zum gewünschten Produkt reagieren kann. Sie postulieren, dass sowohl eine Rückreaktion des KNOEVENAGEL-Produkts stattfinden, im Säuren aber auch ein Gleichgewicht zwischen den beiden Isomeren vorliegen kann.^[147] Ob eine Isomerisierung stattfindet, wurde nicht weiter untersucht.

Daher sollte bei der Durchführung in einer *one-pot*-Synthese darauf geachtet werden, dass sich zuerst das Gleichgewicht der KNOEVENAGEL-Reaktion einstellen kann, um anschließend portionsweise den Schwefel der Reaktion zuzuführen. M. Preuss konnte in seiner Masterarbeit bestätigen, dass durch eine portionsweise Zugabe die Ausbeuten höher ausfallen und weniger Nebenprodukte

gebildet werden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der Cyanessigsäureester in seiner freien Form Schwefeladdukte bilden kann.^[147,148]

Die anschließende Cyclisierung zum gewünschten Produkt wurde nach einer abgewandelten Vorschrift von Shishoo *et al.* unter Verwendung einer 4 M HCl-Lösung in 1,4-Dioxan durchgeführt.^[149] Die benötigte, in Dioxan gelöste, Salzsäure wurde zuerst durch die Reaktion eines leichten Überschuss Methanol mit Acetylchlorid in Dioxan hergestellt. Die so erhaltene Lösung konnte nach Kühlen auf Raumtemperatur sofort eingesetzt werden. Die anschließende Reaktion verlief ohne Probleme, wobei unter anderem die sehr harschen Bedingungen der refluxierenden sauren Dioxan-Lösung und die geringe Löslichkeit des Produkts für die mäßige Ausbeute von 58 % verantwortlich sind. Aufgrund der erhaltenen Menge, die für alle Tests ausreichend war, wurde auf eine Optimierung der Synthese verzichtet und es wurde nicht getestet, ob eine Reduzierung des Überschusses von Chloracetonitril möglich ist. Das gereinigte Produkt konnte aus Ethanol kristallisiert werden, sodass Kristalle erhalten wurden, die für eine Röntgenstrukturanalyse geeignet waren (siehe Abbildung 10.2 ff.).

Da der Inhibitionsmechanismus über eine nucleophile Substitution von Chlor durch ein Thiol(at) des Tryparedoxin verläuft (siehe Abschnitt 7.4), sollte ebenfalls das Dechlorderivat als unwirksames Referenzmolekül hergestellt werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz von Acetonitril unter den gleichen Bedingungen wie für Substanz **69** das Produkt **79** mit einer Ausbeute von 47 % erhalten wurde. In gängigen Lösemitteln besaß die Variante ohne Chlor-Substituent allerdings eine weitaus geringere Löslichkeit als Verbindung **69**, was zu Problemen bei der Reinigung führte. Letztlich konnte durch den Einsatz polarer Lösemittel sowie mehrfache Säulenchromatographie das reine Produkt erhalten werden.

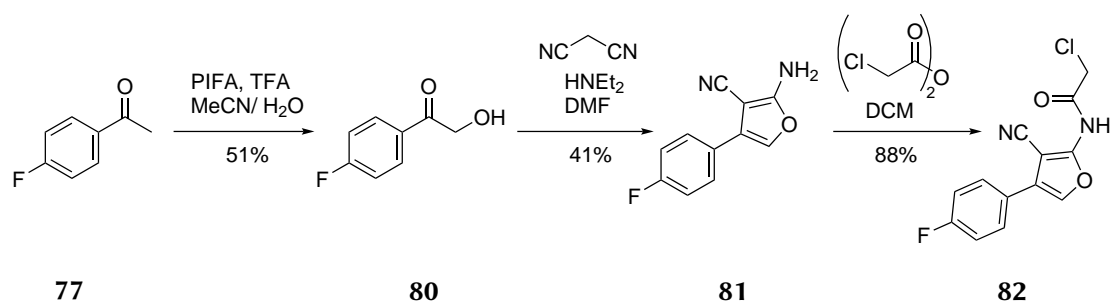
Die Umwandlung von Verbindung **69** durch Dechlorierung sollte als alternative Herstellungsmethode von Verbindung **79** untersucht werden. Dies wurde durch Behandlung mit Zink in Essigsäure mit Hilfe von Ultraschall erreicht. Nach 4 h konnte der vollständige Umsatz des Edukts **69** beobachtet werden. Nach Filtration, Waschen und Phasentrennung konnte durch das Protonenspektrum bestätigt werden, dass es sich bei der synthetisierten Verbindung um Molekül **79** handelt. Dabei ist die direkte Synthese von Verbindung **79** aufgrund des kürzeren Synthesewegs und der niedrigeren Kosten von Acetonitril gegenüber Chloracetonitril zu bevorzugen.

7.2. Versuche zur Synthese des Furan-Derivats

Ausgehend von Studien von Ding *et al.* sollte versucht werden, den Thiophen-Ring des Strukturmotifs durch Furan zu ersetzen.^[150] Dazu wurde ebenfalls von 4-Fluoracetophenon (**77**) ausgegangen. Dieses wurde in einer PIFA-vermittelten Oxidation zum α -Hydroxyketon, Acyloin **80** in 51 % Ausbeute, umgesetzt.^[151] Ausgehend von Hydroxyketon **80** konnte mit Hilfe von Malonodinitril Furan **81** aufgebaut werden (Schema 32). Der nachfolgende Ringschluss zum Furo[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-on

wurde ebenfalls von Ding *et al.* beschrieben.

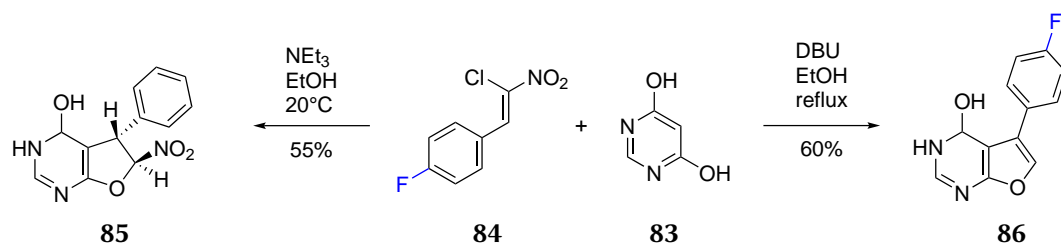
Allerdings wird in der Literatur die Reaktion mit Ameisensäure beschrieben, wobei das in 2-Position unsubstituierte Pyrimidin erhalten wird, wohingegen die gewünschten Produkte in 2-Position eine Methyl- oder eine Chlormethylgruppe tragen soll. Dies würde durch Substitution der Ameisensäure mit Essigsäure bzw. mit Chloressigsäure erhalten werden. Im Fall von Ding *et al.* wurde das Edukt mit Ameisensäure und Essigsäureanhydrid erst bei 0 °C und anschließend bei 125 °C gerührt. Leider konnte nach Modifikation der Reaktion in keinem Fall das gewünschte Produkt isoliert werden. Stattdessen wurde lediglich das N-acylierte Produkt erhalten, was für die Reaktion mit Chloressigsäure und deren Anhydrid durch eine Kristallstruktur bestätigt werden konnte. Versuche zur nachträglichen sauren Cyclisierung der acylierten Spezies **82**, wie im Fall des Thiophens, zeigten in allen Fällen kein Produkt, weshalb eine alternative Route untersucht wurde.



Schema 32: Gescheiterte Synthese des 2-(Chlormethyl)-5-(4-fluorphenyl)furo[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-ons.

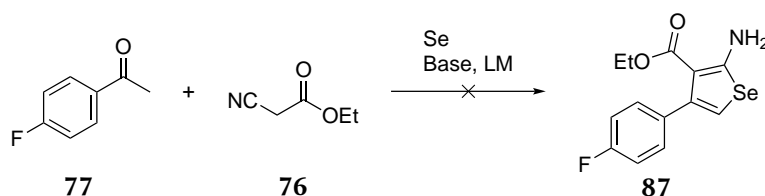
In der alternativen Route sollte der Pyrimidin-Ring **83** als erstes gebildet werden. Dieses Diol sollte in einem nächsten Schritt mit zuvor synthetisiertem 1-(2-Chlor-2-nitrovinyl)-4-fluorbenzol **84** reagieren. Analog zu der in Schema 33, rechts, von Dauzonne *et al.* gezeigten Reaktionsgleichung für das nicht substituierte Pyrimidin **83**.^[152] Die Synthese des benötigten Nitrostyrols **84** erfolgte ausgehend von 4-Fluorbenzaldehyd in einer KNOEVENAGEL-Reaktion mit Bromnitromethan und anschließender nucleophiler Substitution von Brom durch Chlor in refluxierendem Xylol in 66 % Ausbeute. Da das Produkt in HPLC-MS Experimenten nicht ionisiert werden kann und das Protonenspektrum keine eindeutige Charakterisierung zulässt, konnte mit Hilfe von GC-MS gezeigt werden, dass es sich um das beschriebene Produkt **84** handelt. Für die Cyclisierung beschreiben Dauzonne *et al.* verschiedene Produkte unter Verwendung verschiedener Basen (Schema 33).

Wird beispielsweise Triethylamin in Ethanol bei Raumtemperatur verwendet, werden Produkte des Typs 5,6-Dihydro-6-nitro-5-phenylfuro[2,3-d]pyrimidin-4(3''-on **85** erhalten. Die gewünschten 5-Phenylfuro[2,3-d]pyrimidin-4(3''-one **86** konnten von dieser Arbeitsgruppe durch Wechsel der Base zu DBU und Erhöhung der Temperatur zu refluxierendem Ethanol erhalten werden. Leider war die Synthese des benötigten Pyrimidin-Bausteins, 2-Chlormethylpyrimidin-4,6-diol, nicht erfolgreich. Die Umsetzung mit 2-Methylpyrimidin-4,6-diol und nachträgliche Chlorierung wurde von M.



Schema 33: Von Dauzonne *et al.* beschriebene Produkte unter Verwendung verschiedener Reaktionsbedingungen, gewünschtes Produkt in blau gekennzeichnet.

Tabelle 7.1.: Versuche zur Synthese des Ethyl 2-Amino-4-(4-fluorphenyl)selenophen-3-carboxylats mittels GEWALD-Reaktion



#	Base	T/°C	Lösemittel	Ausbeute
1	Morpholin	55 °C	Ethanol	kein Produkt
2	Triethylamin	80–100 °C (MW)	DMF	kein Produkt
3	Dimethylamin	85 °C	Ethanol	kein Produkt

Preuss im Rahmen seiner Masterarbeit durchgeführt, in der er zeigen konnte, dass die Synthese des Furans möglich, die nachträgliche Chlorierung aber unter verschiedenen Bedingungen nicht zum gewünschten Produkt führt.^[148]

7.3. Versuche zur Synthese des Selen-Derivats

Um die Gründe für das parallele Stacking des Inhibitors im Enzym-Inhibitor-Komplex (siehe Abschnitt 7.4) zu ermitteln, sollte die Synthese des Moleküls mit einem Selenophen anstelle des Thiophens durchgeführt werden. Dabei sollte eine SELENO-GEWALD-Reaktion genutzt werden, da so in der gesamten Reaktionssequenz lediglich elementarer Schwefel gegen Selen ausgetauscht werden müsste. Leider zeigte sich, dass eine Synthese über diesen Weg nicht durchführbar war. Trotz Variation der Base, des Lösemittels und weiterer Faktoren, konnte keine Produktbildung beobachtet werden (Tabelle 7.1). Dies ist in Übereinstimmung mit weiten Teilen der Literatur, die zum einen die verringerte Aktivität von Selen im Vergleich zu Schwefel als möglichen Grund nennen.^[153–158] Ein weiterer Grund ist die Reaktivität der Carbonylkomponente. Hier zeigt sich, dass bei aliphatischen Ketonen deutlich höhere Ausbeuten erreicht werden als bei aromatischen Ketonen.

7.4. Wechselwirkung zwischen Inhibitor und Tryparedoxin

Durch Dr. [REDACTED] aus der Gruppe von Prof. Dr. [REDACTED] in Mainz wurde die Enzym-Ligand-Wechselwirkung von Molekül **69** und Tryparedoxin näher untersucht. Durch vorherige Analysen war bereits bekannt, dass Substanz **69** ein Inhibitor des Enzyms Tryparedoxin im niedrigen μM -Bereich ist (Abschnitt 5.1.4).^[145] Um herauszufinden an welcher Stelle des Enzyms der Inhibitor angreift, ob er mehrfach bindet und ob eine kovalente Bindung ausgebildet wird, wurden verschiedene Experimente durchgeführt.

Durch eine PEGylierung des mit Inhibitor inkubierten Enzyms mit MAL-PEG (Maleimid-PEG (5475 Da)) konnte gezeigt werden, dass der Inhibitor nur einmal mit einem der zwei freien Thiole an Cys-40 und Cys-43 des Enzym reagiert. Die Massenzunahme entspricht für eine 1:1 Reaktion 5.5 kDa für mit Inhibitor inkubiertes Enzym. Wird die vorherige Behandlung nicht vollzogen, bleiben zwei freie Thiole und die Massenzunahme beträgt 11 kDa. Die Molmassenzunahme konnte mit Hilfe einer SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) und anschließendem Anfärben mit Coomassie Brilliant Blau sichtbar gemacht werden. Um zu zeigen, dass die beiden Cysteine (Cys-40 und Cys-43) die an der Reaktion beteiligten Aminosäuren sind, wurden Mutanten hergestellt, die an den beiden Positionen jeweils ein Serin tragen (C40S und C43S). Durch Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass die Sekundärstruktur des Enzyms durch die Mutation nicht verändert wurde. PEGylierung und anschließende SDS-Page sowie Größenausschlusschromatographie (SEC) zeigten, dass auch hier keine Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp (WT) auftraten. Beim Vergleich der Enzymaktivitäten trat wie zu erwarten ein Fehlen jeglicher Aktivität auf, da das aktive Zentrum verändert wird und so die chemische Reaktion nicht mehr stattfinden kann. Durch Experimente, in denen das modifizierte Enzym zuerst mit dem Inhibitor inkubiert und anschließend mit MAL-PEG umgesetzt wurde, konnte gezeigt werden, dass der Inhibitor eine kovalente Bindung zu Cys-40 eingeht.

Die Experimente zeigten außerdem, dass es sich bei Inhibitor **69** um einen sogenannten Dimerizer handelt. Diese Moleküle veranlassen Enzyme dazu zu dimerisieren. Durch die Kristallstruktur des Enzyms in Verbindung mit dem Inhibitor (PDB: 6GXG und 6GXY) konnte gezeigt werden, dass der Enzym-Inhibitor-Komplex im Festkörper als Dimer vorliegt. Die Einheitszelle enthält den Komplex jeweils drei Mal, wobei die dritte Kette eine erhöhte Mobilität und eine andere Konformation besitzt. Die zwei übrigen Ketten besitzen eine C_2 -Symmetrie, bei der die beiden Inhibitormoleküle parallel zwischen den Enzymketten liegen. Verschiedene Interaktionen zwischen den Inhibitoren, den Enzymketten und zwischen Enzym und Inhibitor sorgen für die Stabilität des Dimers. Die größten Beiträge sind hierbei das Stacking des Tryptophans W39' mit der Methylengruppe des jeweils anderen Inhibitors (Abbildung 7.1, b)), eine gegenseitige Salzbrücke zwischen Lysin und Glutaminsäure (K102 und E107' bzw. K102' und E107) (Abbildung 7.1, a)) und auf Seiten des Inhibitors ist es π - π -Stacking zwischen den Thienopyrimidonringen und lone-pair- π -Stacking zwischen dem

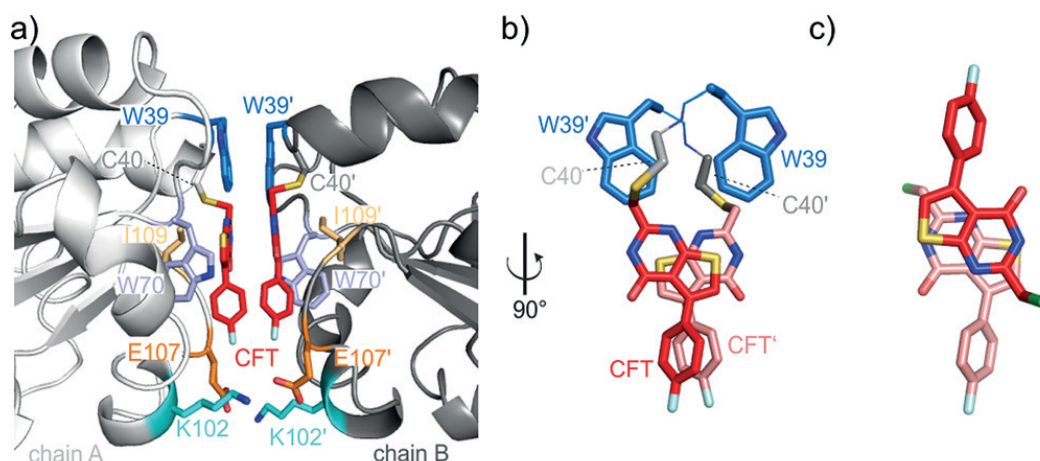


Abbildung 7.1.: a) Ansicht des Dimers mit parallelem Stacking beider Inhibitormoleküle, Salzbrücke zwischen K102/E107' und K102'/E107; b) Ansicht des gebundenen parallel orientierten Inhibitors, Interaktion zwischen W39 bzw. W39' un dem Inhibitor; c) Antiparalleles Stacking des isolierten Inhibitors im Kristall. Bild mit Erlaubnis von Wiley aus *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, 58, 3640–3644, S. 3641, Figure 2.^[159]

Thiophenschwefel und dem Pyrimidonring.

Um zu bestätigen, dass die Dimerisierung kein Artefakt der Kristallisation ist, sondern auch in Lösung stattfindet, wurden verschiedene Experimente, darunter SAXS (small-angle x-ray scattering), Größenausschluss-Chromatographie und NMR-Spektroskopie, durchgeführt. Die SAXS-Daten zeigen, dass der Gyrationradius einer Mischung aus Monomer und Dimer entspricht, was durch *ab initio*-Rechnung bekräftigt wurde. Die beobachtete Linienverbreiterung im ^1H - ^{15}N -HSQC konnte ebenfalls dem Vorliegen eines Dimer-Paares zugesprochen werden. Der Vergleich der Kristallstrukturen des Inhibitors bzw. des Enzym-Inhibitor-Dimers zeigt, dass der Inhibitor alleine antiparallel kristallisiert (Abbildung 7.1, c)), in Verbindung mit dem Enzym allerdings eine parallele Anordnung annimmt (Abbildung 7.1, b)), was aufgrund von verschiedenen Interaktionen der Fall ist. Durch GPC-Messungen wurde gezeigt, dass der Dimer auch nach 24 h noch vorliegt. Die Dissoziationskonstante des Tpx-CFT-Dimers liegt bei $(5.7 \pm 1.4) \mu\text{M}$ und zeigt die hohe Stabilität des Komplexes.

Der Fakt, dass Tpx in Abwesenheit des Inhibitors nicht zur Dimerisierung neigt, der Inhibitor alleine aber anders als im Dimer kristallisiert, zeigt, dass das Staking zwischen den Inhibitoren nicht der einzige Grund für die Dimerisierung sein kann. MD Simulationen zeigten, dass die Wurzel der mittleren quadratischen Verschiebung (root mean squared displacement, RMSD) erhöht bzw. erniedrigt ist, wenn man die Ab- bzw. Anwesenheit von CFT betrachtet.

Um die Beiträge der einzelnen Aminosäuren zum Dimerisierungsverhalten herauszufinden, wurden Punktmutationen an folgenden Stellen durchgeführt: W39, C40, W70, K102, I109. Die erhaltenen Mutanten wurden auf ihre Struktur mittels CD-Spektroskopie, GPC und SAXS untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass keine der Modifikationen einen Einfluss auf die Tertiärstruktur hatte. Stark

beeinflusst wurde hingegen die Aktivität im Peroxidase-Assay. Wie zu erwarten verhinderte jegliche Mutation des aktiven Zentrums (C40S, C43S) die Aktivität. Die Mutanten W39A, W70A und I109A erreichten jeweils $(2.3 \pm 0.8) \%$, $(21.6 \pm 1.9) \%$ bzw. $(32.4 \pm 1.5) \%$ der Aktivität des Wildtyps. Mutante K102E hingegen zeigte eine erhöhte Aktivität von $(159.6 \pm 12.2) \%$. Durch SDS-Page konnte gezeigt werden, mit welchem Thiol der Inhibitor reagiert. Dazu wurden Mutationen des Cysteins (C40S und C43S) eingeführt. Eine Probe des Proteins oder einer Mutante wurde zuerst mit dem Inhibitor inkubiert. Anschließend folgte eine Inkubation mit Maleimid-PEG, das mit vorhandenen freien Thiolen kovalent reagiert. Die durch PEGylierung erhaltene Massendifferenz konnte per SDS-Page detektiert werden. Dabei wurde in Abwesenheit des Inhibitors eine doppelte PEGylierung beobachtet, in Anwesenheit hingegen eine Einfache, da ein Thiol kovalent an den Inhibitor gebunden war. Die Mutante C43S zeigte in Anwesenheit des Inhibitors keine PEGylierung und Mutante C40S zeigte wiederum sowohl in An- oder Abwesenheit eine einfache PEGylierung. Dies zeigte, dass der Inhibitor mit dem Thiol von Cystein-40 eine kovalente Bindung eingehen muss. Um weiterführend das Dimerisierungsverhalten zu untersuchen wurde mittels GPC und SAXS eine Lösung des mutierten Enzyms und des Inhibitors untersucht. Die Mutanten W70A und I109A verhalten sich wie der Wildtyp und Dimerisieren. W39A tut dies nicht und für K102E wird ein Gyrationradius erhalten, der zwischen dem des Monomers und des Dimers liegt. In Übereinstimmung mit MD Simulationen wurde vermutet, dass eine teilweise Dimerbildung stattfindet, die aber aufgrund der fehlenden Salzbrücke zwischen K102/E107' und K102'/E107 deutlich geschwächt ist. Dies konnte mittels ITC-Messungen bestätigt werden, die zeigten, dass die Dissoziationskonstante etwa 15-fach höher als beim Wildtyp ist $((83.1 \pm 32.2) \mu\text{M})$. Bei hohen Konzentrationen von $400 \mu\text{M}$ dimerisiert K102E-CFT, W39A allerdings nicht, auch nicht wenn die Konzentration auf $850 \mu\text{M}$ erhöht wird. Das zeigt, dass die Salzbrücke eine wichtige aber zweitrangige Interaktion für die Dimerisierung ist, die Stabilisierung zwischen W39 und dem Inhibitor aber eine essentielle Interaktion darstellt.

Für die Dimerisierung sind also einerseits Inhibitor-Inhibitor Wechselwirkungen wichtig. Andererseits spielen auch intermolekulare Protein-Inhibitor Wechselwirkungen und die Salzbrücke zwischen K102/E107' und K102'/E107 eine Rolle.

Durch das Vorhandensein der Kristallstrukturen in Kombination mit den NMR-Daten, insbesondere der ^{19}F -NMR-Daten, konnte gezeigt werden, dass der Trend der chemischen Verschiebung des Fluors, von CFT, CFT ohne Chlor, Tpx-CFT-Dimer, Tpx-CFT-Monomer (Pose 1) bzw. Tpx-CFT-Monomer (Pose 2) jeweils in Lösung berechnet werden konnte. Dabei bezeichnet Pose 1 die Anordnung zwischen Tpx und CFT wie in den Ketten A und B der Kristallstruktur (PDB: 6GXY), Pose 2 bezieht sich auf die Anordnung des Inhibitors wie bei Kette C in der selben Kristallstruktur. In Kooperation mit der Gruppe von Prof. Dr. Christian Ochsenfeld wurde für diese Berechnungen ein QM/MM-Ansatz gewählt. Dabei wurden MD-Simulationen genutzt um die einzelnen Konformere möglichst gleichmäßig zu werten. Für jeden „Snapshot“ (insgesamt 200 pro Simulation, die gleichmäßig über die Zeit verteilt lagen) wurde die QM-Region, in einem Bereich von 7 \AA , gelegt. Der Rest des

Moleküls wurde mittels MM gerechnet. Es konnte gezeigt werden, dass die Shifts relativ zueinander richtig berechnet wurden. Dabei haben CFT und MFT einen sehr ähnlichen Shift, wohingegen der Dimer von Tpx und CFT relativ dazu tieffeldverschoben ist. Noch weiter tieffeldverschoben ist der Tpx-CFT Monomer in Pose 1, der experimentell durch die Mutante W39A „simuliert“ wurde, die nicht zum dimerisieren neigt. Der berechnete Wert für Pose 2 liegt zwischen freiem CFT und dem Dimer. Da für diese Pose in den Experimenten kein Signal auftaucht, legen die Ergebnisse nahe, dass der im Kristall beobachtete Zustand keinerlei Rolle in Lösung spielt. Auch wenn die Verschiebung relativ zueinander in den Berechnungen richtig wiedergegeben wurde, überschätzt sie die Differenz zwischen den einzelnen Signalen. Dieser Effekt könnte minimiert werden, wenn ein höheres Theorielevel, ein größerer Basissatz oder genauere Dynamiken (QM/MM-MD statt MM-MD) verwendet würden. Dennoch konnte die Anwendbarkeit und der Nutzen solcher Methoden gezeigt werden.^[160]

7.5. Versuche zur Synthese eines alternativen Tryparedoxin-Inhibitors

Die im nachfolgenden Abschnitt vorgestellten Ergebnisse wurden u.a. von Katja Huber im Rahmen des praktischen Teils ihrer Bachelorarbeit unter meiner Aufsicht erzielt.

Ausgehend von kommerziell erhältlichen Chemikalien sollte das in Abbildung 7.2, links dargestellte 4-Chlorpyrido[3,2-d]pyrimidin-6(5H)-on **88** dargestellt werden. Ausgehend von Diethylmalonat

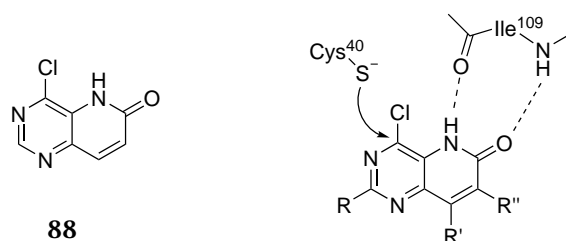
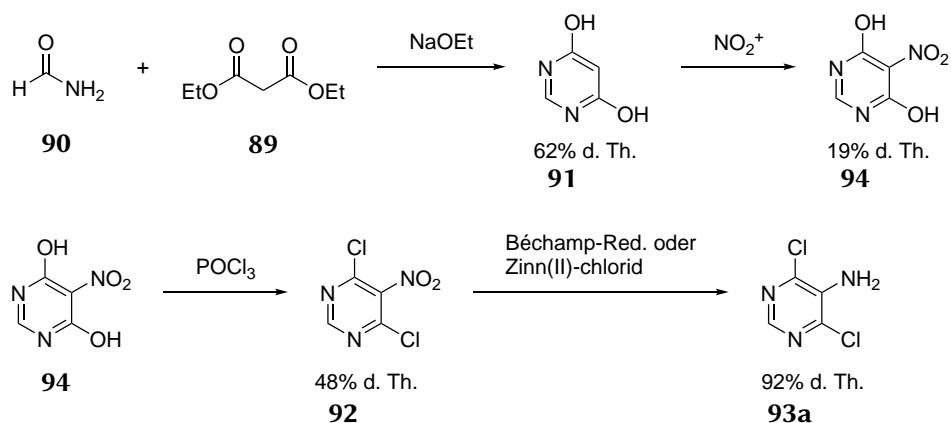


Abbildung 7.2.: links: das gewünschte Chlorpyridopyrimidinon; rechts: die günstige Platzierung im aktiven Zentrum von Tryparedoxin.

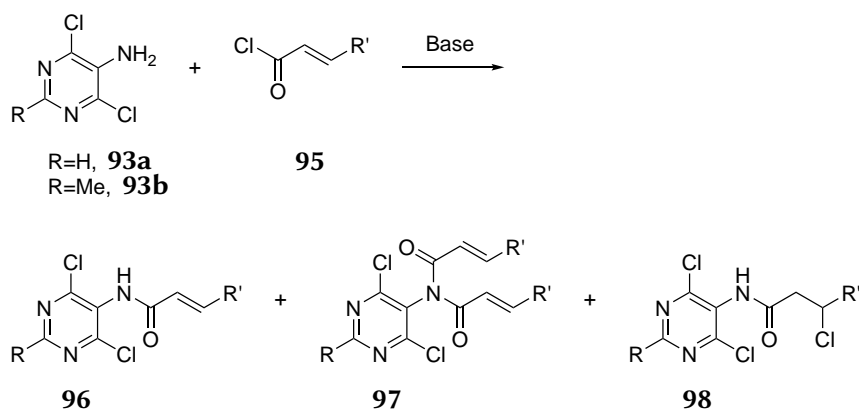
89, das mit Formamid **90** zu 4,6-Dihydroxypyrimidin **91** umgesetzt wurde, sollte anschließend nitriert und chloriert werden um das gewünschte 4,6-Dichlor-5-nitropyrimidin **92** zu erhalten. In einer BÉCHAMP-Reduktion oder mit Hilfe von Zinn(II)-chlorid sollte die Nitrogruppe zum Amin **93** reduziert werden, welches anschließend mit einem Acrylsäurechlorid-Derivat umgesetzt werden sollte, welches in einem letzten entscheidenden Schritt Pd(0) katalysiert in einer intramolekularen HECK-Reaktion zum finalen Produkt führen sollte. Die erhaltenen Produkte sollten auf ihre inhibitorischen Eigenschaften gegenüber Tryparedoxin untersucht werden, da sich eine günstige Anordnung im aktiven Zentrum versprochen wurde (Abbildung 7.2, rechts).

7. | Ergebnisse und Diskussion



Schema 34: Synthese von 4,6-Dichlor-5-aminopyrimidin ausgehend von Formamid und Diethylmalonat.

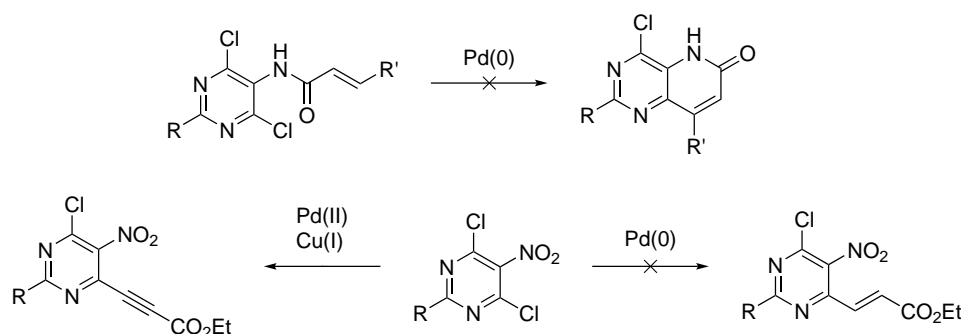
Die Synthese wurde in Anlehnung an Latli *et al.* durchgeführt.^[161] Die Literaturausbeuten von 99 % für die Cyclisierung zu **91** konnten nicht reproduziert werden und es wurden lediglich 62 % d. Th. erreicht. Die nachfolgende Nitrierung zu **94** verlief laut Literatur ebenfalls mit einer hohen Ausbeute von 74 %. Diese konnte wieder nicht erreicht werden. Verschiedene Versuche, die Bedingungen der Nitrierung zu ändern, indem Salpetersäure mit Essigsäure verdünnt wurde, führten zu einer maximalen Ausbeute von 19 % d. Th. Eine mögliche Erklärung liefern Latypov *et al.*, die beschrieben, wie 2-Methyl-4,6-dihydroxypyrimidin unter bestimmten Bedingungen bis zu 4-fach nitriert und anschließend im Sauren gespalten wird. Die Chlorierung mit Phosphoroxychlorid, um **92** zu erhalten, gelang mit akzeptablen 48 % d. Th., lag aber auch hier wieder unter den Literaturangaben. Die anschließende Reduktion mit Zinn(II)-chlorid zu **93a** verlief hingegen problemlos mit 92 % d. Th. (Schema 34). Der



Schema 35: Acylierung von 4,6-Dichlor-5-aminopyrimidinen und die daraus resultierenden, zum Teil nicht trennbaren Produkte.

nächste Schritt stellte sich als problematisch heraus. Das zuvor dargestellte 5-Amino-4,6-dichloropyrimidin **93a**, sowie das kommerziell erhältliche 5-Amino-4,6-dichlor-2-methylpyrimidin **93b** (R=Me)

sollten mit verschiedenen ungesättigten Säurechloriden **95** N-acyliert werden. Als α,β -ungesättigte Säurechloride kamen Acrylsäurechlorid ($R'=H$), Crotonsäurechlorid ($R'=CH_3$) und Zimtsäurechlorid ($R'=Ph$) zum Einsatz. Der Versuch 5-Amino-4,6-dichlorpyrimidin **93a** mit verschiedenen Säurechloriden zu acylieren führte in einigen Fällen zu keinem Umsatz, in anderen Fällen wurde eine Mehrfachacylierung **97** nachgewiesen und in anderen Fällen wurde die Addition von HCl **98** an das gewünschte Produkt beobachtet. Leider konnte in keinem Fall das gewünschte Produkt **96** erhalten werden.



Schema 36: Getestete Pd-katalysierte Kupplungen an 4,6-Dichlor-2-methyl-5-nitropyrimidin.

Mehrfachacylierungen **97** konnten beobachtet werden, wenn relativ starke Basen wie Triethylamin ($pK_b=3.24$), Kalium- oder Natriumcarbonat ($pK_b=3.66$) verwendet wurden.^[162] Dies wird auch von Skobridis *et al.* für 2-Aminopyrimidine beschrieben.^[163] Außerdem wurde eine Addition von HCl an die Doppelbindung beobachtet. Dies geschah nicht nur bei Reaktionsbedingungen ohne Base, sondern auch unter Anwesenheit von Natriumcarbonat. Auch der Einsatz der schwächeren Base Pyridin ($pK_b=8.77$) führte nicht zu einer nennenswerten Reaktion zum gewünschten Produkt.

Durch den Einsatz von *N*-Methyl-2-pyrrolidon als Lösemittel und den Verzicht auf eine Base konnte ein besserer Umsatz beobachtet werden. Allerdings wurde wieder eine HCl-Addition beobachtet. Diese beiden Produkte ließen sich chromatographisch nicht trennen und es lag ein Gemisch mit ca. 17 % des Nebenprodukts vor (Schema 35). Die anschließenden Versuche einer Pd-katalysierten intramolekularen Heck-Reaktion scheiterten. Unter verschiedenen Bedingungen bei denen sowohl der Ligand, die Base oder das Lösemittel geändert wurden, konnte kein Produkt detektiert werden und es wurden alternative Routen getestet. Dabei sollte 4,6-Dichlor-2-methyl-5-nitropyrimidin in der 4- bzw. 6-Position funktionalisiert werden. Dies würde die Probleme der intramolekularen Reaktion umgehen. Leider führten weder eine Heck-Reaktion, noch eine SONOGASHIRA-Reaktion zu dem gewünschten Produkt (Schema 36). Auch eine Lithierung und anschließende Umsetzung mit einem Alkin zeigten keinen eindeutigen Reaktionsverlauf. Daher wurde das Projekt nicht weiter verfolgt.

8. Zusammenfassung

Die geplante Synthese von 2-(Chlormethyl)-5-(4-fluorphenyl)thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-on **69** konnte nach der in Schema 31 gezeigten Route erfolgreich durchgeführt werden. Dabei bietet die Syntheseroute Modularität bei den Resten in 2- und 5-Position durch geeignete Wahl der Startmaterialien. Die lineare dreistufige Synthese lässt sich sogar noch auf zwei Stufen verkürzen, indem die ersten beiden Schritte als *one-pot*-Reaktion durchgeführt werden. Die beiden Produkte **69** und **79** wurden in Ausbeuten von 28 % bzw. 22 % erhalten.

Beide Syntheserouten zum Furan Derivat waren nicht erfolgreich (vgl. Abschnitt 7.2). Durch M. Preuss konnte gezeigt werden, dass eine Synthese des Dechlor-Grundkörpers möglich ist, aber die nachträgliche Chlorierung zum Erhalt des Produkts mit verschiedensten Reagenzien nicht zum gewünschten Produkt führt. Die Einführung der Chlor-Spezies in einem früheren Teil der Synthese scheitert an der Verfügbarkeit bzw. Produzierbarkeit der entsprechenden Amidine, die zur Synthese des Pyrimidins benötigt werden. Die Einführung anderer reaktiver Gruppen, die nachträglich in das Chlorid überführt werden können, scheiterte an der gleichen Problemstellung. Die Synthese über 2-Amino-3-cyano-4-arylfurane scheiterte an der Cyclisierung des Pyrimidin-Rings. Hierbei konnte lediglich die Acylierung des Amins erreicht werden. Eine Cyclisierung im Sauren, analog zum Thiophen-Derivat wurde nicht beobachtet, auch wenn es für den Fall des in 2-Position unsubstituierten Produkts in der Literatur beschrieben ist (Schema 32).^[150]

Die Synthese des Selenophen-Grundkörpers wurde ebenfalls nicht erreicht. Die Reaktivität der Carbonylkomponente und auch maßgeblich die Reaktivität des Selens führten dazu, dass die GEWALD-Reaktion nicht ablief. In der Literatur findet man widersprüchliche Angaben zu ähnlichen Reaktionsverläufen. Die Forscher um Schiesser *et al.* konnten allerdings für Ethyl-2-amino-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[b]selenophen-3-carboxylat zeigen, dass es sich bereits in unbehandeltem Chloroform durch minimale Spuren von HCl zersetzt.^[153] Da der nächste Schritt der Synthese die saure Cyclisierung des Pyrimidins gewesen wäre, hätte, selbst bei Erhalt des Selenophens, die Instabilität des Heterocyclus vermutlich nicht zum Produkt führen können.

Durch die biologische Testung des Inhibitors konnte gezeigt werden, dass es sich um einen „small-molecule-Dimerizer“ handelt, der mit hoher Affinität an Tryparedoxin bindet und dazu führt, dass sich jeweils zwei Protein-Inhibitor-Komplexe zusammen lagern. Das Enzym alleine tendiert nicht zur Dimerisierung und der Inhibitor liegt im Kristall in einer antiparallelen Anordnung vor (vgl. dazu parallel im Dimer mit Enzym). Dr. ████████ konnte zeigen, dass die Dimerisierung sowohl im

8. | Zusammenfassung

Kristall als auch in Lösung auftritt. Die Tests beinhalteten u.a. Größenausschlusschromatographie, (Kleinwinkel)röntgenstreuung, MD Simulationen, ITC und NMR-Spektroskopie. Durch Mutation verschiedener Aminosäuren wurden die einzelnen Beiträge aufgezeigt und konnten als essentiell oder nicht essentiell eingeordnet werden. Außerdem wurde an diesem Inhibitor-Enzym System ein Vergleich zwischen berechneten und experimentell erhaltenen ^{19}F -NMR-Shifts gezogen, da es sich durch das Vorhandensein von experimentellen NMR-Daten sowie Kristallstrukturen bestens dazu eignete. Es konnte gezeigt werden, dass die Berechnungen den Trend der NMR-Shifts richtig wiedergeben können, allerdings noch Fehler bei der absoluten Verschiebung bzw. bei der ppm-Differenz verschiedener Zustände auftreten.

9. Experimenteller Teil

9.1. Allgemeine Arbeitstechniken und Messgeräte

9.1.1. Lösemittel und Reaktionsführung

Alle Reaktionen wurden, falls nicht anders vermerkt, mit vorher nicht gereinigten Lösemitteln mit dem Reinheitsgrad *pro analysi* (p.a.) und an der Luft durchgeführt. Alle weiteren Chemikalien wurden, wenn nicht vermerkt, ohne weitere Reinigung eingesetzt. Feuchtigkeitsempfindliche Reaktionen wurden in vorher getrockneten und unter Schutzgasatmosphäre destillierten Lösemitteln durchgeführt. Alternativ wurden absolutierte Lösemittel aus einer Lösemitteltrocknungsanlage des Typ *MBraun MB-SPS5/7* bezogen. Die genutzten Trocknungsmittel waren die folgenden:

- Aceton: Drierite™ (CaSO₄)
- Acetonitril: Calciumhydrid
- *tert*-Buthylmethylether (^tBME): Natriumhydrid
- Dichlormethan: Calciumhydrid
- Diethylether: Natrium/ Benzophenon
- 1,4-Dioxan: Natrium/ Benzophenon
- Methanol (MeOH): Natrium
- Tetrahydrofuran (THF): Kalium/ Benzophenon
- Toluol: Natrium/ Benzophenon
- Triethylamin: Calciumhydrid

N,N-Dimethylformamid (DMF, 99.8 %, ExtraDry über Molekularsieb, AcroSeal™) und Dimethylsulf-oxid (DMSO, 99.7 %, ExtraDry über Molekularsieb, AcroSeal™) wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt. Sauerstoffempfindliche Reaktionen wurden im Inertgasstrom (Argon oder Stickstoff) entgast. Cyclohexan und Essigsäureethylester für die Flüssigchromatographie wurden in technischer Qualität bezogen und vor der Benutzung destilliert. Deuterierte Lösemittel für die NMR-Spektroskopie wurden bis auf Chloroform ohne Reinigung eingesetzt. Zur Entfernung von Säurespuren wurde

deutერიertes Chloroform über basischem Aluminiumoxid gelagert.

9.1.2. Destillation

Wenn nicht anders angegeben, wurden Lösemittel im Vakuum mit Hilfe eines Rotationsverdampfers mit angeschlossener Membranpumpe bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C entfernt. Wasser wurde an einem Lyophilisator des Typs *Alpha 2-4 LDplus* der Firma *Martin Christ* entfernt.

9.1.3. Chromatographie

Dünnschichtchromatographie

Für die analytische Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel 60 F_{254} -DC-Fertigfolien der Firma *Merck* genutzt. Die Laufmittelverhältnisse entsprechen den Volumenverhältnissen der angegebenen Lösemittel. Die Detektion der Chemikalien erfolgte durch UV-Licht der Wellenlänge ($\lambda=254$ nm) und mithilfe von SEEBACH-Reagenz (Lösung von 1 g Cer(IV)-Sulfat und 2.5 g Molybdätophosphorsäure in 94 mL Wasser und 6 mL konz. Schwefelsäure), Kaliumpermanganat-Lösung (Lösung von 3.0 g Kaliumpermanganat und 20.0 g Kaliumcarbonat in 5 mL Natronlauge (5 %) und 300 mL Wasser) oder Dinitrophenylhydrazin-Reagens (Lösung von 1.0 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 5 mL Schwefelsäure (konz.), 25 mL Ethanol und 8 mL Wasser).

Säulenchromatographie

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel des Typs 60 M (230-400 Mesh) der Firma *Macherey-Nagel* genutzt. Dieses wurde entweder in selbst gepackten Glassäulen mit Stickstoffüberdruck verwendet oder in selbst gepackten SNAP-Kartuschen in einem automatischen Säulenautomaten *Isolera One* der Firma *Biotage* mit UV-Diodenarraydetektor (DAD). Die angegebenen Laufmittelverhältnisse entsprechen den Volumenverhältnissen der verwendeten Lösemittel.

HPLC/ESI-MS

HPLC/ESI-MS-Massenspektren wurden entweder auf einem *Agilent 1260 Infinity II* HPLC-System mit binärer Pumpe und integriertem DAD gekoppelt an ein *Agilent Infinitylab LC/MSD*-Massenspektrometer oder auf einem *Agilent 1100* gekoppelt an ein *Bruker LC/MSD-Trap XCT*-Massenspektrometer mit einer Elektrosprayionenquelle aufgenommen. Es wurde eine *Ascentis Express C18* Säule (Partikelgröße: 2.7 μm , 30 mm \times 2.1 mm) bei einer Temperatur von 40 °C genutzt. Zu vermessende Proben wurden auf eine maximale Konzentration von 1 mg mL⁻¹ verdünnt. Als Laufmittel wurden Gemische aus Acetonitril und Wasser (mit 0.1 % Ameisensäure) mit einer Flussrate von 1 mL min⁻¹ genutzt.

Präparative HPLC

Präparative HPLC-Analysen wurden an einem *Agilent 1290 Infinity II*-Gerät mit *1290 Infinity II* präparativer binärer Pumpe, *1260 Infinity II*-DAD und *1290 Infinity II*-Fraktionssammler durchgeführt. Als mobile Phase wurden Gemische aus Acetonitril und Wasser bei einer Flussrate von 37.5 mL min^{-1} eingesetzt. Die stationäre Phase bestand aus einer ACE C_{18} -PPF-Säule ($5 \mu\text{m}$, $150 \text{ mm} \times 30 \text{ mm}$).

9.1.4. Schmelzpunkte

Schmelzpunkte wurden mit einer Apparatur nach DR. TOTTOLI der Firma *Büchi* bestimmt. Die Schmelzpunkte wurden auf ganze °C gerundet und unkorrigiert angegeben.

9.1.5. NMR-Spektroskopie

Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgte, wenn nicht anders vermerkt, mit den Geräten der Firma *Bruker*:

- Avance 3 HD 300: ^1H -NMR (300 MHz), ^{13}C -NMR (75 MHz), ^{19}F -NMR (282 MHz), COSY, HSQC, HMBC.
- Avance 2 400: ^1H -NMR (400 MHz), ^{13}C -NMR (101 MHz), COSY, HSQC, HMBC.
- Avance 3 600: ^1H -NMR (600 MHz), ^{13}C -NMR (151 MHz), COSY, HSQC, HMBC.

Die ^{13}C -Spektren wurden ^1H -entkoppelt aufgenommen und die HSQC-Spektren wurden phasensensitiv durchgeführt (CH und CH_3 positiv, CH_2 negativ). Die ^1H - und ^{13}C -Spektren wurden auf den Restgehalt an undeutertem Lösemittel referenziert (Tab.: 9.1).^[164]

Die Auswertung erfolgte mit der Software *MestReNova* der Firma *Mestrelab Research S.L.* Jedes Spektrum wurde vor der Auswertung einer automatischen Phasen- sowie Basislinienkorrektur unterzogen.

9.1.6. IR-Spektroskopie

Infrarot-Spektren wurden mit einem Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer der Firma *Bruker* aufgenommen (*Tensor 27*). Die Messungen erfolgten mit einer Diamant-ATR-Einheit.

9.1.7. Polarimetrie

Zur Bestimmung der spezifischen Drehwerte wurde ein *Perkin-Elmer*-Polarimeter 241 verwendet. Es wurde mit Hilfe einer Quecksilberdampfampe bei den Wellenlängen $\lambda = 546 \text{ nm}$ und 578 nm gemessen und anschließend auf die Wellenlänge der Natrium-D-Linie nach THALER *et al.* extrapoliert.^[165]

Tabelle 9.1.: Chemische Verschiebung nur teilweise deuterierter oder undeuterierter Lösemittel in NMR-Experimenten

Lösemittel	Kern	δ/ppm	Multiplizität
CDCl ₃	¹ H	7.26	s
	¹³ C	77.16	t
DMSO- <i>d</i> ₆	¹ H	2.50	quin
	¹³ C	39.52	sept
CD ₃ CN	¹ H	1.94	quin
	¹³ C	118.26	s
		1.32	sept
CD ₃ OD	¹ H	3.31	quin
	¹³ C	49.00	sept

Die verwendeten Lösemittel sind bei den einzelnen Verbindungen vermerkt. Auf die Angabe der Einheit des spezifischen Drehwertes ($^{\circ} \text{ mL dm}^{-1} \text{ g}^{-1}$) wird im Folgenden verzichtet.

9.1.8. Massenspektrometrie

ESI- sowie hochaufgelöste ESI-Massenspektren wurden auf einem *Q-ToF-Ultima 3* der Firma *Waters* mit einem Lockspray Interface aufgenommen. Die Proben wurden in Acetonitril gelöst abgegeben mit einer Konzentration von höchstens 0.01 mg mL^{-1} . Zur Aufnahme von FD-Massenspektren stand ein *MAT 90* Gerät der Firma *Finnigan* zur Verfügung.

9.1.9. Kristallstrukturanalyse

Die Kristallstrukturbestimmung wurde auf einem Diffraktometer des Typs *IPDS 2T* der Firma *STOE* aufgenommen. Für die Auswertung wurde die Software *SIR-2004* sowie *SHELXL-2014* verwendet. Für weitere Informationen, siehe Abschnitt 9.2.2.

9.1.10. Anwendung des DP4+-Models zur Bestimmung der Regiochemie in Unterabschnitt 3.2.2

Das Konformerensemble wurde mit *Spartan'10*^[166] erstellt, wobei der thorough oder sparse Suchalgorithmus auf dem PM6-^[167] oder MMFF-Theorielevel^[168] verwendet wurde. Die darauffolgende Geometrieoptimierung und Frequenzanalyse der Konformere wurde mit *Gaussian 16*, Rev. A.03^[169] mittels der Kombination von B3LYP/6-31G(d)^[170-176] vollzogen. Ein zusätzlicher Reoptimierungsschritt auf dem semiempirischen PM6 Level wurde durchgeführt, wenn die Konformerensuche mit MMFF stattfand. Mithilfe der Frequenzanalyse wurden alle Konformere als lokale Minima ($N_{\text{imag}} = 0$) bestätigt. Duplikate wurden entfernt und nur die Konformere innerhalb eines relativen Energiebereichs von $4.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ für die Berechnung der Abschirmungstensoren eingesetzt. Sie wurden

mit der GIAO-Methode auf dem mPW1PW91/6-31G+(d,p) Level^[174–181] unter Einbeziehung ungegerichteter Lösungsmittelleffekte mittels IEFPCM^[108,182,183] berechnet. Diese Abschirmungstensoren wurden Boltzmann-gewichtet und das wahrscheinlichste Regioisomer mithilfe des DP4+-Modells^[103] berechnet.

Eingabezeilen

MMFF/PM6-Konformerensuche

```
SEARCHMETHOD=THOROUGH FINDBOATS KEEPALL CONF_SELECTION_RULE=5
```

oder

```
SEARCHMETHOD=SPARSE FINDBOATS KEEPALL CONF_SELECTION_RULE=5
```

DFT-Reoptimierung und Frequenzkalkulation

```
#p opt=tight freq=noraman b3lyp 6-31g(d)
```

Berechnung der NMR-Abschirmungstensoren

```
#p nmr=giao mpw1pw91 6-31g(d,p) scrf=(iefpcm,solvent=chloroform)
```

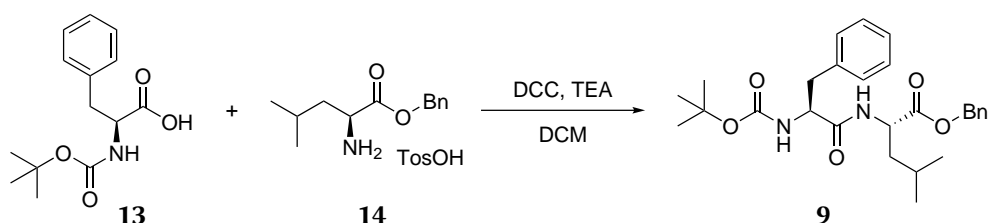
Tabelle 9.2.: (DP4+)-Ergebnisse für Produkt 30

	5-nitro	4-nitro
sDP4+ (H data)	100.00 %	0.00 %
sDP4+ (C data)	0.00 %	100.00 %
sDP4+ (all)	100.00 %	0.00 %
uDP4+ (H data)	0.00 %	100.00 %
uDP4+ (C data)	0.00 %	100.00 %
uDP4+ (all)	0.00 %	100.00 %
DP4+ (H data)	100.00 %	0.00 %
DP4+ (C data)	0.00 %	100.00 %
DP4+ (all)	0.00 %	100.00 %

9.2. Synthesen

9.2.1. Synthesen zu Teil I

Benzyl-*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*L*-phenylalanyl-*L*-leucinat (**9**)



Das Produkt wurde in Anlehnung an Laweson *et al.* synthetisiert.^[184] Unter Inertgasatmosphäre wurden *N*-Boc-*L*-phenylalanin (**13**, 0.67 g, 2.54 mmol), *L*-Leucin Benzylester *p*-Toluolsulfonat (**14**, 1.00 g, 2.54 mmol) und Triethylamin (360 μ L, 2.54 mmol) wurden in Dichlormethan (7 mL) vorgelegt. Die Suspension wurde auf -18°C gekühlt und es wurde *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (**99**, 0.52 g, 2.54 mmol) zugegeben. Die Mischung wurde 1 h bei dieser Temperatur und anschließend 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Essigester (10 mL) aufgenommen und mit Salzsäure- (0.1 M), Natriumhydrogencarbonat- (0.5 M), sowie ges. Kochsalzlösung (je 2.5 mL) gewaschen. Es wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel entfernt. Nach Kristallisation aus Diethylether:Petrolether (1:3, 4 mL) wurde das Produkt (970 mg, 2.07 μ mol, 81 %) als farbloser Feststoff erhalten.

$R_f = 0.70$ (SiO_2 , Petrolether:Ethylacetat, 2:1).

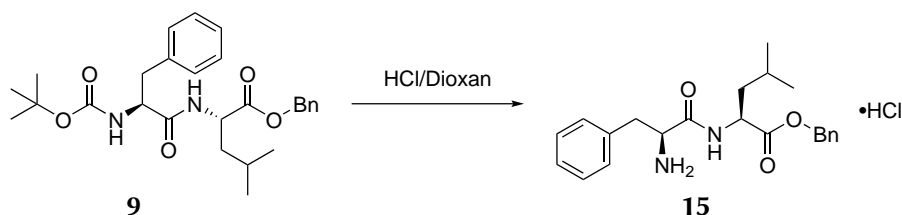
$^1\text{H-NMR}$, COSY (300 MHz, CDCl_3): $\delta/\text{ppm} = 7.43\text{--}7.15$ (m, 10 H, H^{arom}), 6.28 (d, $J = 8.2$ Hz, 1 H, NH), 5.15 (d, $J = 12.3$ Hz, 1 H, OCH_2^{Bn}), 5.10 (d, $J = 12.3$ Hz, 1 H, OCH_2^{Bn}), 5.00 (br s, 1 H, NH), 4.61 (m, 1 H), 4.34 (dd, $J = 7.3, 6.3$ Hz, 1 H), 3.05 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 1.67–1.43 (m, 3 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$, $\gamma\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 1.42 (s, 9 H, CH_3^{Boc}), 0.88 (d, $J = 6.1$ Hz, 3 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$), 0.86 (d, $J = 6.1$ Hz, 3 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$).

$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (75 MHz, CDCl_3): $\delta/\text{ppm} = 172.4$ (C=O), 171.0 (C=O), 155.5 (C=O^{Boc}), 136.7 (C_q^{Ar}), 135.5 (C_q^{Ar}), 129.5, 128.8, 128.7, 128.5, 128.4, 127.1 (C^{Ar}), 80.4 (C_q^{Boc}), 67.1 (CH_2^{Ph}), 55.8 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 51.0 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 41.7 ($\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$), 38.2 ($\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 28.4 (CH_3^{Boc}), 24.8 ($\gamma\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 22.9, 22.0 ($\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$).

ESI-MS: $m/z = 469.3$ (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 491.3 (28 %, $[\text{M}+\text{Na}]^+$).

Die analytischen Daten sind in Übereinstimmung mit der Literatur.^[184]

Benzyl-L-phenylalanyl-L-leucinat Hydrochlorid (15)



Die Deblockierung wurde in Anlehnung an Hruby *et al.* durchgeführt.^[185] Unter Schutzgasatmosphäre wurde das Dipeptid (**9**, 500 mg, 1.07 mmol) in eine Lösung aus HCl in Dioxan (4 M, 5 mL) bei 0 °C gegeben. Das Eisbad wurde entfernt und die Lösung weitere 30 min rühren gelassen. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt filtriert und mit Diethylether gewaschen. Es wurde als farbloser Feststoff (430 mg, 1.06 μmol , >99 %) erhalten und ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt.

$^1\text{H-NMR}$, COSY (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ/ppm = 9.03 (d, J = 7.6 Hz, 1 H, NH^{Leu}), 8.19 (br s, 3 H, NH_3^{Phe}), 7.45–7.21 (m, 10 H, H^{arom}), 5.17 (d, J = 12.4 Hz, 1 H, OCH_2^{Bn}), 5.11 (d, J = 12.4 Hz, 1 H, OCH_2^{Bn}), 4.47–4.33 (m, 1 H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 4.07 (dd, J = 8.0, 5.2 Hz, 1 H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 3.11 (dd, J = 14.1, 5.2 Hz, 1 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 2.89 (dd, J = 14.1, 8.1 Hz, 1 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 1.61 (m, 3 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$, $\gamma\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 0.90 (d, J = 6.4 Hz, 3 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$), 0.86 (d, J = 6.3 Hz, 3 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$).

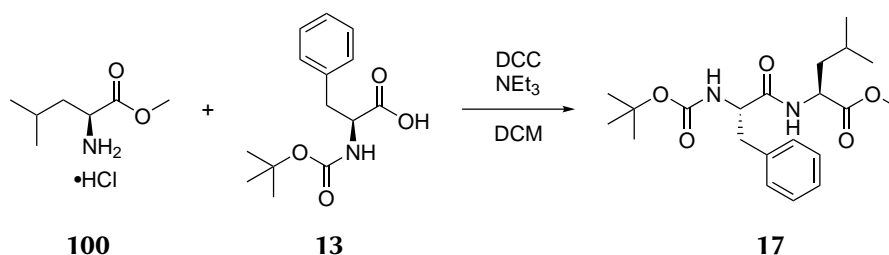
Die Deblockierung konnte auch mittels Trifluoressigsäure durchgeführt werden. Dafür wurde das geschützte Dipeptid (**9**, 113 mg, 0.24 mmol) in eine auf 0 °C gekühlte Lösung aus Trifluoressigsäure und Dichlormethan (1 mL:2 mL) gegeben. Nach 10 min wurde das Eisbad entfernt und die Lösung 2 h bei Raumtemperatur rühren gelassen. Das Produkt (116 mg, 0.24 μmol , >99 %) wurde nach Entfernen des Lösemittels erhalten und ebenfalls ohne weitere Reinigung umgesetzt.

$^1\text{H-NMR}$, COSY (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ/ppm = 8.89 (d, J = 7.6 Hz, 1 H, NH^{Leu}), 8.11 (br s, 3 H, NH_3^{Phe}), 7.37–7.13 (m, 10 H, H^{arom}), 5.17 (d, J = 12.4 Hz, 1 H, OCH_2^{Bn}), 5.11 (d, J = 12.4 Hz, 1 H, OCH_2^{Bn}), 4.41 (q, J = 7.5 Hz, 1 H), 4.03 (dd, J = 8.3, 5.0 Hz, 1 H), 3.08 (dd, J = 14.2, 4.9 Hz, 1 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 2.86 (dd, J = 14.2, 8.4 Hz, 1 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 1.70–1.53 (m, 3 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$, $\gamma\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 0.91 (d, J = 6.2 Hz, 3 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$), 0.86 (d, J = 6.2 Hz, 3 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$).

Methyl-N-(tert-butoxycarbonyl)-L-phenylalanyl-L-leucinat (17)

Eine Lösung bestehend aus Methyl L-Leucinat Hydrochlorid (**100**, 500 mg, 2.75 mmol), Boc-L-Phenylalanin (**13**, 730 mg, 2.75 mmol) und Triethylamin (380 μL , 2.75 mmol) in Dichlormethan (4 mL) wurde auf –18 °C gekühlt und es wurde Dicyclohexylcarbodiimid (567 mg, 2.75 mmol) gelöst in Dichlormethan (1.5 + 1.0 mL) langsam zugegeben. Die Mischung wurde über Nacht auf Raumtemperatur auftauen lassen. Nach 16 h wurde die Suspension filtriert, der Rückstand mit Dichlormethan

9. | Experimenteller Teil



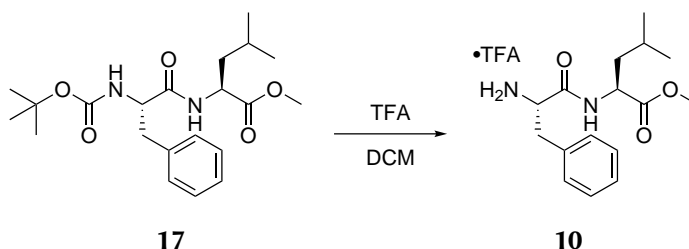
gewaschen und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Feststoff wurde in Ethylacetat (150 mL) aufgenommen und mit 0.1 N HCl, 0.5 N NaHCO₃-Lösung und ges. Kochsalzlösung (je 50 mL) gewaschen. Das Produkt **17** (833 mg, 2.12 mmol, 77 %) wurde als farbloser Feststoff nach Säulenchromatographie (SiO₂, Cyclohexan:Ethylacetat, 9:1 auf 1:9) erhalten.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 7.35–7.16 (m, 5 H, H^{arom}), 6.24 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H, NH), 4.99 (br s, 1 H, NH), 4.57 (td, *J* = 8.5, 5.2 Hz, 1 H, α-CH), 4.34 (q, *J* = 7.1 Hz, 1 H, α-CH), 3.69 (s, 3 H, OMe), 3.07 (d, *J* = 6.8 Hz, 2 H, β-CH₂^{Phe}), 1.66–1.45 (m, 3 H, β-CH₂^{Leu}, γ-CH^{Leu}), 1.41 (s, 9 H, ^tBu), 0.83 (app-t, *J* = 6.0 Hz, 6 H, δ-CH₃^{Leu}).

ESI-MS: *m/z* = 293.3 (100 %, [M-Boc+H]⁺), 415.3 (69 %, [M+Na]⁺).

Die analytischen Daten sind in Übereinstimmung mit der Literatur.^[186]

Methyl-L-phenylalanyl-L-leucinat trifluoracetat (**10**)

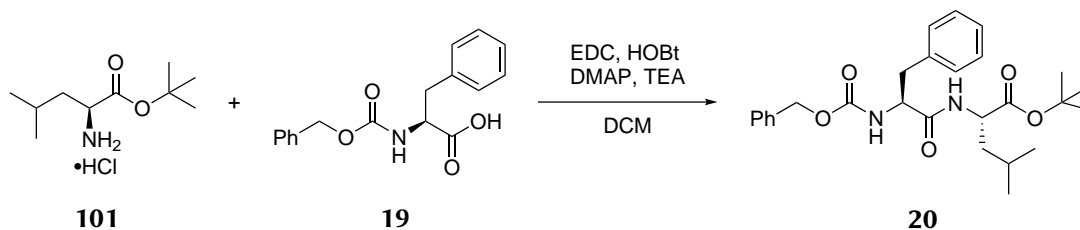


Methyl-*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-L-phenylalanyl-L-leucinat (**17**, 221 mg, 0.56 mmol) wurde in Dichlormethan (2 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dann wurde eine Lösung aus TFA und DCM (je 2 mL) zutropft. Nach 2 h wurden die Lösemittel im Stickstoffstrom entfernt und verbleibende Reste durch Koevaporieren mit Chloroform, Toluol und Ethanol (je 5 mL) entfernt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten und ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt.

ESI-MS: *m/z* = 293.3 (100 %, [M+H]⁺), 315.2 (15 %, [M+Na]⁺).

tert-Butyl-*N*-((benzyloxy)carbonyl)-L-phenylalanyl-L-leucinat (**20**)

Z-Phenylalanin (**101**, 299 mg, 1.00 mmol), Leucin *tert*-Butyl Ester (**19**, 223 mg, 1.00 mmol), HOBT Hydrat (**102**, 154 mg, 1.00 mmol), EDC-Hydrochlorid (**103**, 194 mg, 1.00 mmol) und DMAP (**104**,



14 mg, 0.11 mmol) wurden in 5 mL DCM gegeben und im Eisbad so lange gerührt, bis alles gelöst war. Anschließend wurde Triethylamin (139 μL , 1.00 mmol) in 2 mL langsam zugetropft und die Lösung langsam aufwärmen lassen. Nach 48 h wurde DCM (10 mL) zugegeben und die organische Phase mit ges. Ammoniumchloridlösung, Wasser und ges. Natriumchloridlösung (je 15 mL) gewaschen. Das Produkt **20** (356 mg, 0.76 mmol, 76 %) wurde nach Säulenchromatographie (SiO_2 , Cyclohexan:Ethylacetat, 9:1 auf 1:9) als farbloser Feststoff erhalten.

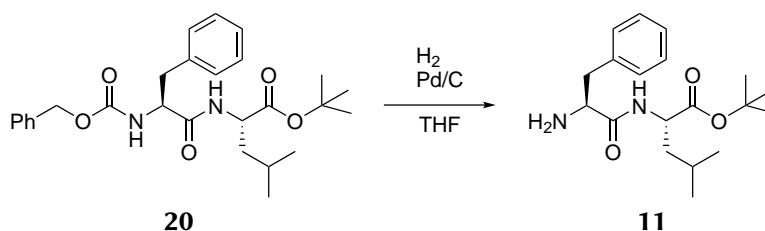
$^1\text{H-NMR}$, COSY (300 MHz, CDCl_3): $\delta/\text{ppm} = 7.41\text{--}7.13$ (m, 10 H, H^{arom}), 6.31 (d, $J = 8.2$ Hz, 1 H, NH^{Leu}), 5.38 (d, $J = 8.3$ Hz, 1 H, NH^{Phe}), 5.08 (s, 2 H, OCH_2Bn), 4.51–4.37 (m, 2 H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Phe,Leu}}$), 3.08 (d, $J = 6.8$ Hz, 2 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 1.60–1.41 (m, 3 H, CH, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$, $\gamma\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 1.45 (s, 9H, tBu), 0.90 (d, $J = 2.7$ Hz, 3 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$), 0.88 (d, $J = 2.9$ Hz, 3 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$).

$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (75 MHz, CDCl_3): $\delta/\text{ppm} = 171.7$ ($\text{C}=\text{O}^{\text{Leu}}$), 170.4 ($\text{C}=\text{O}^{\text{Phe}}$), 156.0 (COO), 136.3, 136.3, 129.5, 128.7, 128.6, 128.3, 128.1, 127.1 (CH^{Ar}), 82.0 (CtBu), 67.1 (OCH_2Ph), 56.1 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 51.5 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 41.9 ($\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$), 38.5 ($\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 28.1 (tBu), 24.9 ($\gamma\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 22.8 ($\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$), 22.2 ($\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$).

ESI-MS: $m/z = 413.4$ (74 %, $[\text{M}-\text{O}^t\text{Bu}+\text{H}_2\text{O}]^+$), 491.3 (100 %, $[\text{M}+\text{Na}]^+$).

ESI-HRMS: ber. für $[\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{NaO}_5]^+$: $m/z=491.2516$, gef.: $m/z=491.2512$.

tert-Butyl-L-phenylalanyl-L-leucinat (11)



Zu einer Lösung aus *tert*-Butyl-*N*-((benzyloxy)carbonyl)-*L*-phenylalanyl-*L*-leucinat (**11**, 325 mg, 0.694 mmol) in THF (30 mL) wurde Palladium auf Aktivkohle (20 mg) gegeben. Der Reaktionskolben wurde drei Mal evakuiert und mit Wasserstoff geflutet. Nach 19 h Rühren bei Raumtemperatur wurde eine weitere Portion Palladium auf Aktivkohle (20 mg) zugegeben. Nach insgesamt 43 h Rühren bei

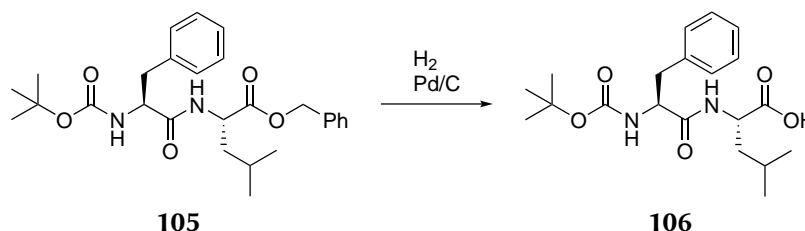
9. | Experimenteller Teil

Raumtemperatur wurde die Mischung über Kieselgur filtriert. Es wurde ein farbloses Öl (193 mg, 0.580 mmol, 84 %) erhalten, das ohne weitere Reinigung verwendet wurde.

$^1\text{H-NMR}$, COSY (300 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 7.59 (d, J = 7.9 Hz, 1 H, NH^{Leu}), 7.35–7.16 (m, 5 H, H^{arom}), 4.44–4.31 (m, 1 H, $\alpha\text{-CH}$), 4.19–4.11 (m, 1 H, $\alpha\text{-CH}$), 3.28 (dd, J = 13.9, 5.7 Hz, 1 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 3.09 (dd, J = 13.7, 6.8 Hz, 1 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 1.70–1.54 (m, 3 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$, $\gamma\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 1.43 (s, 9 H, tBu), 0.89 (d, J = 2.7 Hz, 3 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$), 0.87 (d, J = 2.6 Hz, 3 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$).

ESI-MS: m/z = 279.2 (100 %, $[\text{M}-\text{O}^t\text{Bu}+\text{H}_2\text{O}]^+$), 335.2 (13 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$).

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*L*-phenylalanyl-*L*-leucin (**106**)

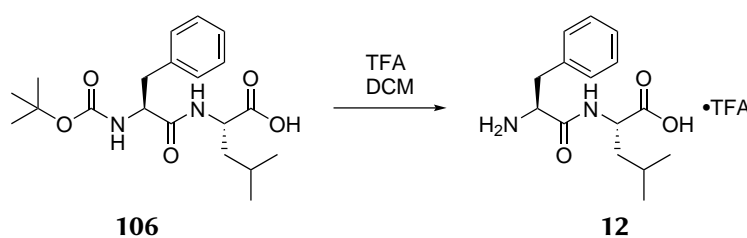


Zu Benzyl *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*L*-phenylalanyl-*L*-leucinat (**105**, 120 mg, 0.26 mmol) gelöst in THF (5 mL), wurde Pd/C (20 mg) zugegeben. Die Mischung wurde in einer Wasserstoffatmosphäre 2 h gerührt und anschließend über Celite filtriert. Der Filterkuchen wurde mit THF (15 mL) gewaschen und das Lösemittel entfernt. Das verbleibende farblose Öl wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

Ausbeute: 89 mg farbloses Öl, (0.26 mmol, >99 %).

ESI-MS: m/z = 279.1 (100 %, $[\text{M}-\text{Boc}]^+$).

L-Phenylalanyl-*L*-leucin trifluoressigsäure (**12**)

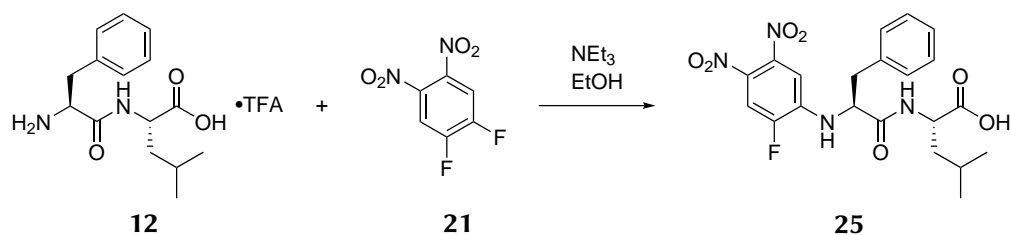


N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*L*-phenylalanyl-*L*-leucin (**106**, 89 mg, 0.26 mmol) wurde in DCM (2 mL) gelöst und Trifluoressigsäure (1 mL) wurde tropfenweise zugegeben. Die Lösung wurde 1 h gerührt und anschließend die Lösemittel in einem Stickstoffstrom entfernt. Letzte Reste Lösemittel wurde durch Korotieren mit Chloroform, Toluol und Ethanol (je 5 mL) entfernt. Zurück blieb ein farbloser Feststoff.

Ausbeute: 88 mg farblose Kristalle, (0.22 mmol, 85 %).

ESI-MS: $m/z = 279.1$ (100 %, $[M+H]^+$).

***N*-(2-Fluor-4,5-dinitrophenyl)-L-phenylalanyl-L-leucin (25)**



L-Phenylalanyl-L-leucin trifluoracetat (**12**, 23 mg, 0.081 mmol) wurde gemeinsam mit 1,2-Difluor-4,5-dinitrobenzol (**21**, 25 mg, 0.122 mmol) in Ethanol (3 mL) gelöst und es wurde 1 Tropfen Triethylamin zugegeben. Die Lösung wurde sofort gelblich und nach 10 min entstand ein farbloser Niederschlag. Nach 17 h war noch Startmaterial vorhanden, daher wurde in einem geschlossenen Gefäß 21 h auf 80 °C erhitzt. Nach dieser Zeit war kein Niederschlag mehr erkennbar und es lag eine intensiv gelbgefärbte Lösung vor. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt. Säulenchromatographie (SiO₂, DCM:MeOH, 20:1 auf 10:1) ergab eine Mischung des gewünschten Produkts und des Nitro-substituierten Produkts. Durch präparative HPLC (ACE C₁₈-PPF, 5 µm, 150 mm × 30 mm, 37.5 mL min⁻¹, MeCN:Wasser 1:1) wurde das Produkt (4 mg, 9 µmol, 11 %) erhalten.

$R_f = 0.15$ (SiO₂, Chloroform:Methanol, 10:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 3380, 3086, 3031, 2960, 2872, 1720, 1656, 1619, 1546, 1469, 1326, 1240, 1213, 1154, 1110$.

¹H-NMR, COSY (400 MHz, CDCl₃): $\delta/\text{ppm} = 7.68$ (d, $J = 10.4$ Hz, 1 H, H³), 7.38–7.26 (m, 3 H, H^{arom}), 7.24–7.17 (m, 2 H, H^{arom}), 6.86 (d, $J = 7.0$ Hz, 1 H, H⁶), 6.59 (d, $J = 8.2$ Hz, 1 H, NH^{Leu}), 5.30 (t, $J = 4.6$ Hz, 1 H, NH^{Phe}), 4.61 (s, 1 H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 4.53–4.06 (m, 2 H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$, OH), 3.31 (dd, $J = 14.1, 4.9$ Hz, 1 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 3.17 (dd, $J = 14.1, 7.6$ Hz, 1 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 1.71–1.47 (m, 3 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$, $\gamma\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 0.94 (app-s, 3 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$), 0.93 (app-s, 3 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$).

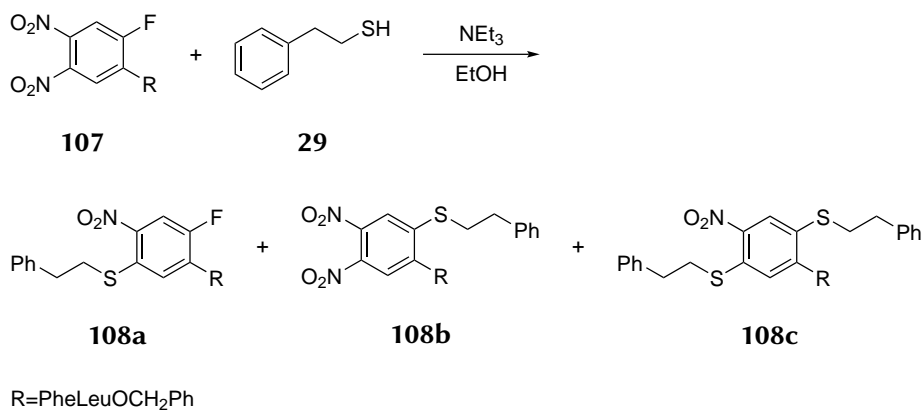
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (101 MHz, CDCl₃): $\delta/\text{ppm} = 176.1$ (COOH), 171.1 (C=O^{Phe}), 149.5 (d, $J = 250.4$ Hz, C²), 142.6 (d, $J = 3.0$ Hz, C⁵), 141.0 (d, $J = 12.5$ Hz, C¹), 135.0 (C^{1'}), 130.3 (d, $J = 7.7$ Hz, C⁴), 129.4 (C^{2'/6'}), 129.2 (C^{3'/5'}), 128.1 (C^{4'}), 112.5 (d, $J = 25.2$ Hz, C³), 108.0 (d, $J = 4.5$ Hz, C⁶), 59.4 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 51.2 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 40.8 ($\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$), 39.0 ($\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 25.0 ($\gamma\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 22.9 ($\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$), 21.7 ($\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$).

ESI-MS: $m/z = 463.2$ (100 %, $[M+H]^+$), 485.1 (23 %, $[M+Na]^+$).

ESI-HRMS: ber. für $[C_{21}H_{23}FN_4NaO_7]^+$: $m/z=485.1443$, gef.: $m/z=485.1434$.

$[\alpha]_D^{22} = -94.9$ ($c=0.27$, $CHCl_3$).

Reaktion von Benzyl-*N*-(2-fluor-4,5-dinitrophenyl)-*L*-phenylalanyl-*L*-leucinat mit Phenylethanthiol



Benzyl-*N*-(2-fluor-4,5-dinitrophenyl)-*L*-phenylalanyl-*L*-leucinat (**107**, 47 mg, 85 μ mol) wurde in Ethanol (1 mL) gelöst. Triethylamin (24 μ L) wurde zugegeben und unter Rühren wurde Phenylethanthiol (**29**, 23 μ L, 170 μ mol) zugegeben. Nach 28 h wurde weiteres Phenylethanthiol (**29**, 23 μ L, 170 μ mol) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde weitere 24 h bei 80 °C gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels und Säulenchromatographie (SiO₂, Cyclohexan:Essigsäureethylester, 5:1) wurde eine Mischung aus allen drei Produkten erhalten, die durch präparative HPLC (ACE C₁₈-PPF, 5 μ m, 150 mm \times 30 mm, 37.5 mL min⁻¹, MeCN:water 7:3) getrennt werden konnten (**108a**, 8 mg, 12 μ mol, 14 %, **108b**, 2 mg, 3 μ mol, 4 %, **108c**, 21 mg, 28 μ mol, 33 %).

2(*S*)-2-[Benzyl(*N*-2-fluor-4-nitro-4-[(2-phenylethyl)sulfanyl]phenyl)-*L*-phenylalanyl)-amino]-4-methylpentanoat (**108a**)

$R_f = 0.27$ (SiO₂, Cyclohexan:Essigsäureethylester, 10:3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 3358, 2957, 1613, 1528, 1455, 1270, 1177, 1151, 1100, 733, 697$.

¹H-NMR, COSY (600 MHz, CDCl₃): $\delta/\text{ppm} = 7.95$ (d, $J = 11.4$ Hz, 1 H, H³), 7.35–7.17 (m, 15 H, H^{arom}), 6.42 (d, $J = 7.7$ Hz, 1 H, H⁶), 6.40 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H, NH^{Leu}), 4.99–4.97 (m, 1 H, NH^{Phe}), 4.97 (s, 2 H, OCH₂Ph), 4.65–4.58 (m, 1 H, α -CH^{Leu}), 4.09 (dt, $J = 7.5, 5.2$ Hz, 1 H, α -CH^{Phe}), 3.26 (dd, $J = 14.1, 5.3$ Hz, 1H), 3.19–3.15 (m, 1 H, β -CH₂^{Phe}), 3.14–3.09 (m, 2 H, CH₂CH₂S), 3.01–2.98 (m, 2 H, CH₂CH₂S), 1.60–1.57 (m, 1 H, β -CH₂^{Leu}), 1.50–1.47 (m, 1 H, γ -CH^{Leu}), 1.46–1.43 (m, 1 H, β -CH₂^{Leu}), 0.90 (d, $J = 6.3$ Hz, 3 H, δ -CH₃^{Leu}), 0.87 (d, $J = 6.4$ Hz, 3 H, δ -CH₃^{Leu}).

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (151 MHz, CDCl_3): $\delta/\text{ppm} = 172.2$ ($\text{C}=\text{O}^{\text{Leu}}$), 170.8 ($\text{C}=\text{O}^{\text{Phe}}$), 147.1 (d, $J = 241.9$ Hz, C^2), 140.3 (d, $J = 12.0$ Hz, C^1), 139.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_q^{\text{Ar}}$), 138.0 (d, $J = 2.2$ Hz, C^5), 135.3 (d, $J = 7.0$ Hz, C^4), 135.3 ($\gamma\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 135.2 ($\text{OCH}_2\text{C}^{\text{Ar}}$), 129.4 , 129.2 , 128.8 , 128.7 , 128.7 , 128.6 , 128.2 , 127.9 , 126.9 (CH^{Ar}), 113.2 (d, $J = 23.3$ Hz, C^3), 107.8 (d, $J = 2.3$ Hz, C^6), 67.3 (CH_2^{Bn}), 59.4 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 51.0 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 41.1 ($\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$), 38.9 ($\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 34.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 33.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 24.9 ($\gamma\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 22.9 ($\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$), 21.8 ($\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$).

ESI-MS: $m/z = 644.4$ (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 666.3 (23 %, $[\text{M}+\text{Na}]^+$).

ESI-HRMS: ber. für $[\text{C}_{36}\text{H}_{39}\text{FN}_3\text{O}_5\text{S}^+]$: $m/z=644.2589$, gef.: $m/z=644.2585$.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -50.3$ ($c=0.6$, CHCl_3).

2(S)-2-[Benzyl(N-4,5-dinitro-2-[(2-phenylethyl)sulfanyl]phenyl-L-phenylalanyl)amino]-4-methylpentanoat (108b)

$R_f = 0.26$ (SiO_2 , Cyclohexan:Essigsäureethylester, 10:3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 3314$, 2959 , 2931 , 1591 , 1545 , 1367 , 1324 , 1268 , 1150 , 699 .

^1H -NMR, COSY (600 MHz, CDCl_3): $\delta/\text{ppm} = 7.98$ (s, 1 H, H^3), $7.38\text{--}7.17$ (m, 15 H, H^{arom}), 6.51 (s, H^6), 6.23 (d, $J = 5.4$ Hz, 1 H, NH^{Phe}), 6.20 (d, $J = 8.5$ Hz, 1 H, NH^{Leu}), 5.10 (d, $J = 12.2$ Hz, 1 H, OCH_2Ph), 5.14 (d, $J = 12.2$ Hz, 1 H, OCH_2Ph), $4.68\text{--}4.63$ (m, 1 H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 4.10 (dt, $J = 8.0, 5.4$ Hz, 1 H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 3.29 (dd, $J = 14.1, 5.2$ Hz, 1 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 3.08 (dd, $J = 14.2, 8.0$ Hz, 1 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 2.94 (dt, $J = 12.7, 7.5$ Hz, 1 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 2.86 (ddd, $J = 12.7, 8.2, 6.5$ Hz, 1 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), $2.80\text{--}2.76$ (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), $1.63\text{--}1.59$ (m, 1 H, $\beta\text{-CH}_2$), $1.52\text{--}1.48$ (m, 1 H, $\gamma\text{-CH}^{\text{Leu}}$), $1.48\text{--}1.42$ (m, 1 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$), 0.89 (d, $J = 6.4$ Hz, 3 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$), 0.87 (d, $J = 6.4$ Hz, 3 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$).

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (151 MHz, CDCl_3): $\delta/\text{ppm} = 172.2$ ($\text{C}=\text{O}^{\text{Leu}}$), 169.9 ($\text{C}=\text{O}^{\text{Phe}}$), 151.3 (C^1), 145.8 (C^5), 138.8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}^{\text{Ar}}$), 135.3 ($\gamma\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 135.2 ($\text{OCH}_2\text{C}^{\text{Ar}}$), 131.7 (C^2), 130.6 (C^3), 129.4 , 128.8 , 128.7 , 128.6 , 128.5 , 128.0 , 127.1 (CH^{Ar}), 122.6 (C^2), 105.3 (C^6), 67.6 (CH_2^{Bn}), 59.6 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 51.1 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 41.3 ($\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$), 39.1 ($\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 36.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 35.8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 25.0 ($\gamma\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 22.8 ($\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$), 21.9 ($\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$).

ESI-MS: $m/z = 671.4$ (77 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 693.4 (53 %, $[\text{M}+\text{Na}]^+$).

ESI-HRMS: ber. für $[\text{C}_{36}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}^+]$: $m/z=671.2534$, gef.: $m/z=671.2528$.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -38.0$ ($c=0.2$, CHCl_3).

2(S)-2-[Benzyl(N-4-nitro-2,4-bis[(2-phenylethyl)sulfonyl]phenyl-L-phenylalanyl)amino]-4-methylpentanoat (108c)

$R_f = 0.29$ (SiO₂, Cyclohexan:Essigsäureethylester, 10:3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 3339, 3029, 2957, 2928, 1741, 1682, 1582, 1546, 1510, 1498, 1470, 1455, 1324, 1298, 1257, 1190, 1152, 1123, 752, 698$.

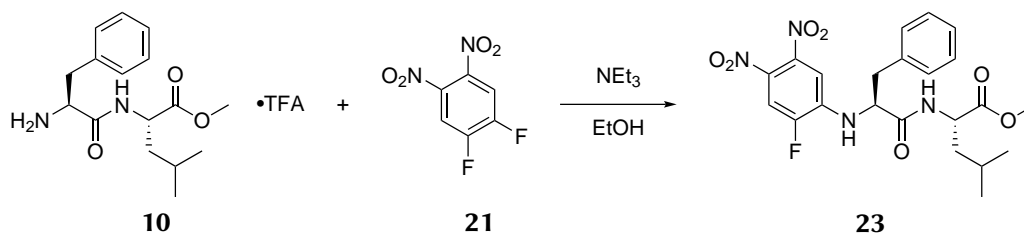
¹H-NMR, COSY (600 MHz, CDCl₃): $\delta/\text{ppm} = 8.35$ (s, 1 H, H³), 7.34–7.15 (m, 18 H, H^{arom}), 7.06–7.03 (m, 2 H, H^{arom}), 6.39 (d, $J = 8.3$ Hz, 1 H, NH^{Leu}), 6.33 (s, 1 H, H⁶), 6.08 (d, $J = 4.5$ Hz, 1 H, NH^{Phe}), 4.95 (s, 2 H, OCH₂Ph), 4.62–4.57 (m, 1 H, α -CH^{Leu}), 4.08 (dt, $J = 8.9, 4.7$ Hz, 1 H, α -CH^{Phe}), 3.33 (dd, $J = 14.2, 4.7$ Hz, 1 H, β -CH₂^{Phe}), 3.21–3.13 (m, 2 H, CH₂CH₂S), 3.08 (dd, $J = 14.2, 8.4$ Hz, 1 H, β -CH₂^{Phe}), 3.03–2.99 (m, 2 H, CH₂CH₂S), 2.75–2.56 (m, 4 H, CH₂CH₂S), 1.57–1.53 (m, 1 H, β -CH₂), 1.47–1.43 (m, 1 H, γ -CH^{Leu}), 1.43–1.39 (m, 1 H, β -CH₂^{Leu}), 0.87 (d, $J = 6.4$ Hz, 3 H, δ -CH₃^{Leu}), 0.83 (d, $J = 6.4$ Hz, 3 H, δ -CH₃^{Leu}).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (151 MHz, CDCl₃): $\delta/\text{ppm} = 172.1$ (C=O^{Leu}), 171.2 (C=O^{Phe}), 151.1 (C¹), 143.2 (C⁵), 139.7 (CH₂CH₂C^{Ar}), 139.4 (CH₂CH₂C^{Ar}), 136.5 (C⁴), 135.6 (γ -CH₂^{Phe}), 135.1 (OCH₂C^{Ar}), 134.7 (C³), 129.3, 129.2, 128.8, 128.7, 128.7, 128.6, 128.6, 128.2, 127.8, 126.8, 126.8 (CH^{Ar}), 115.2 (C²), 106.2 (C⁶), 67.3 (CH₂^{Bn}), 60.2 (α -CH^{Phe}), 51.0 (α -CH^{Leu}), 41.1 (β -CH₂^{Leu}), 39.0 (β -CH₂^{Phe}), 36.9 (CH₂CH₂S), 35.9 (CH₂CH₂S), 33.9 (CH₂CH₂S), 33.3 (CH₂CH₂S), 25.0 (γ -CH^{Leu}), 22.8 (δ -CH₃^{Leu}), 21.9 (δ -CH₃^{Leu}).

ESI-MS: $m/z = 762.6$ (100 %, [M+H]⁺), 784.4 (53 %, [M+Na]⁺).

ESI-HRMS: ber. für [C₄₄H₄₈N₃O₅S₂⁺]: $m/z=762.3030$, gef.: $m/z=762.3023$.

$[\alpha]_D^{25} = 1.0$ (c=0.5, CHCl₃).

Methyl (2-fluor-4,5-dinitrophenyl)-L-phenylalanyl-L-leucinat (23)

Das deblockierte Dipeptid (**10**, 76 mg, 188 μmol), der Aromat (**109**, 43 mg, 211 μmol) und Triethylamin (40 μL , 282 μmol) wurden in Ethanol (1 mL) vorgelegt und 14 h bei 80 °C gerührt. Es wurde weitere Base (40 μL , 282 μmol) zugegeben und weitere 22 h erhitzt. Anschließend wurde auf Raumtemperatur abkühlen lassen und die Reaktionsmischung wurde mit Ethylacetat (15 mL) verdünnt.

Es wurde drei Mal mit Wasser und ein Mal mit ges. Kochsalzlösung (je 10 mL) gewaschen. Das Produkt (62 mg, 130 μmol , 69 %) wurde als gelber amorpher Feststoff nach Säulenchromatographie (SiO_2 , Ethylacetat:Cyclohexan, 1:9 auf 9:1) erhalten.

$R_f = 0.16$ (SiO_2 , Ethylacetat:Cyclohexan, 1:3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 3352, 3068, 3033, 2959, 2873, 1737, 1658, 1621, 1550, 1470, 1455, 1439, 1372, 1328, 1209, 1154, 750, 701$.

$^1\text{H-NMR}$, COSY (400 MHz, CDCl_3): $\delta/\text{ppm} = 7.73$ (d, $J = 10.5$ Hz, 1 H, H^3), 7.35–7.28 (m, 3 H, H^{arom}), 7.23–7.19 (m, 2 H, H^{arom}), 6.66 (d, $J = 7.1$ Hz, 1 H, H^6), 6.25 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H, NH^{Leu}), 5.45 (dd, $J = 6.4, 3.6$ Hz, 1 H, NH^{Phe}), 4.66–4.59 (m, 1 H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 4.17 (dt, $J = 7.4, 5.8$ Hz, 1 H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 3.71 (s, 3 H, OCH_3), 3.27 (dd, $J = 14.0, 5.6$ Hz, 1 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 3.14 (dd, $J = 14.0, 7.6$ Hz, 1 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 1.68–1.44 (m, 3 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$, $\gamma\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 0.92 (d, $J = 6.4$ Hz, 3 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$), 0.91 (d, $J = 6.3$ Hz, 3 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$).

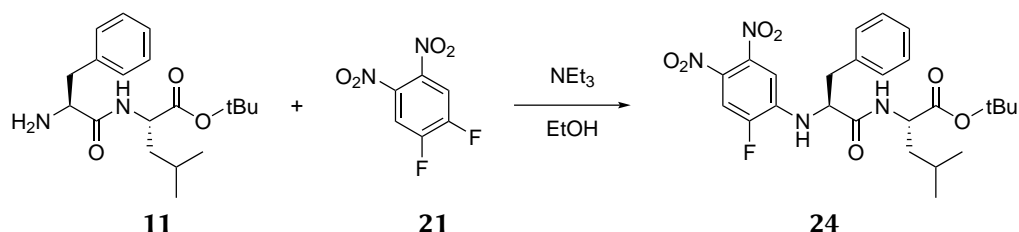
$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (101 MHz, CDCl_3): $\delta/\text{ppm} = 172.8$ ($\text{C}=\text{O}^{\text{Leu}}$), 169.7 ($\text{C}=\text{O}^{\text{Phe}}$), 149.4 (d, $J_{250.4}$, C^2), 142.7 (d, $J_{2.5}$, C^5), 140.6 (d, $J_{12.5}$, C^1), 135.1 (C^1), 130.3 (d, $J_{8.3}$, C^4), 129.4 ($\text{C}^{2'/6'}$), 129.3 ($\text{C}^{3'/5'}$), 128.1 (C^4), 112.7 (d, $J_{25.3}$, C^3), 107.2 (d, $J_{4.5}$, C^6), 58.9 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 52.7 (OCH_3), 51.2 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 41.4 ($\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$), 39.3 ($\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 25.0 ($\gamma\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 22.8 ($\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$), 21.9 ($\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$).

ESI-MS: $m/z = 477.3$ (10 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 499.3 (100 %, $[\text{M}+\text{Na}]^+$).

ESI-HRMS: ber. für $[\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{FN}_4\text{O}_7]^+$: $m/z=477.1780$, gef.: $m/z=477.1776$.

$[\alpha]_D^{22} = -34.6$ ($c=0.48$, CHCl_3).

tert-Butyl (2-fluor-4,5-dinitrophenyl)-L-phenylalanyl-L-leucinat (24)



Das deblockierte Dipeptid (**11**, 40 mg, 120 μmol), der Aromat (**21**, 37 mg, 180 μmol) und Triethylamin (25 μL , 180 μmol) wurden in Ethanol (1 mL) vorgelegt und 15 h bei 80 °C gerührt. Anschließend wurde auf Raumtemperatur abkühlen lassen und die Reaktionsmischung wurde mit Ethylacetat (15 mL) verdünnt. Es wurde mit Wasser und mit ges. Kochsalzlösung (je 10 mL) gewaschen. Das Produkt (24 mg, 46 μmol , 26 %) wurde als gelber amorpher Feststoff nach Säulenchromatographie (SiO_2 , Ethylacetat:Cyclohexan, 1:18 auf 18:1) erhalten.

9. | Experimenteller Teil

$R_f = 0.36$ (SiO₂, Ethylacetat:Cyclohexan, 1:2).

IR (ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 33\ 337, 3067, 3032, 2962, 2934, 2873, 1721, 1655, 1620, 1549, 1525, 1499, 1470, 1456, 1370, 1327, 1242, 1215, 1148, 750, 700$.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): $\delta/\text{ppm} = 7.72$ (d, $J = 10.5$ Hz, 1 H, H³), 7.36–7.24 (m, 3 H, H^{arom}), 7.24–7.15 (m, 2 H, H^{arom}), 6.64 (d, $J = 7.1$ Hz, 1 H, H⁶), 6.31 (d, $J = 8.3$ Hz, 1 H, NH^{Leu}), 5.48 (dd, $J = 6.4, 3.6$ Hz, 1 H, NH^{Phe}), 4.49 (td, $J = 8.5, 5.1$ Hz, 1 H, α -CH^{Leu}), 4.25–4.10 (m, 1 H, α -CH^{Phe}), 3.28 (dd, $J = 14.0, 5.3$ Hz, 1 H, β -CH₂^{Phe}), 3.12 (dd, $J = 14.0, 7.7$ Hz, 1 H, β -CH₂^{Phe}), 1.65–1.45 (m, 3 H, β -CH₂^{Leu}, γ -CH^{Leu}), 1.44 (s, 9 H, O^tBu), 0.93 (d, 3 H, $J = 6.1$ Hz, δ -CH₃^{Leu}), 0.92 (d, 3 H, $J = 6.3$ Hz, δ -CH₃^{Leu}).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75 MHz, CDCl₃): $\delta/\text{ppm} = 171.7$ (C=O^{Leu}), 169.5 (C=O^{Phe}), 149.4 (d, $J = 250.3$ Hz, C²), 142.8 (d, $J = 3.2$ Hz, C⁵), 140.6 (d, $J = 12.6$ Hz, C¹), 135.1 (C^{1'}), 130.2 (d, $J = 7.6$ Hz, C⁴), 129.3 (C^{2'/6'}), 129.3 (C^{3'/5'}), 128.0 (C^{4'}), 112.7 (d, $J = 25.2$ Hz, C³), 107.2 (d, $J = 4.8$ Hz, C⁶), 82.7 (–C(CH₃)₃), 58.9 (α -CH^{Phe}), 51.7 (α -CH^{Leu}), 41.7 (β -CH₂^{Leu}), 39.4 (β -CH₂^{Phe}), 28.1 (–C(CH₃)₃), 25.1 (γ -CH^{Leu}), 22.8 (δ -CH₃^{Leu}), 22.0 (δ -CH₃^{Leu}).

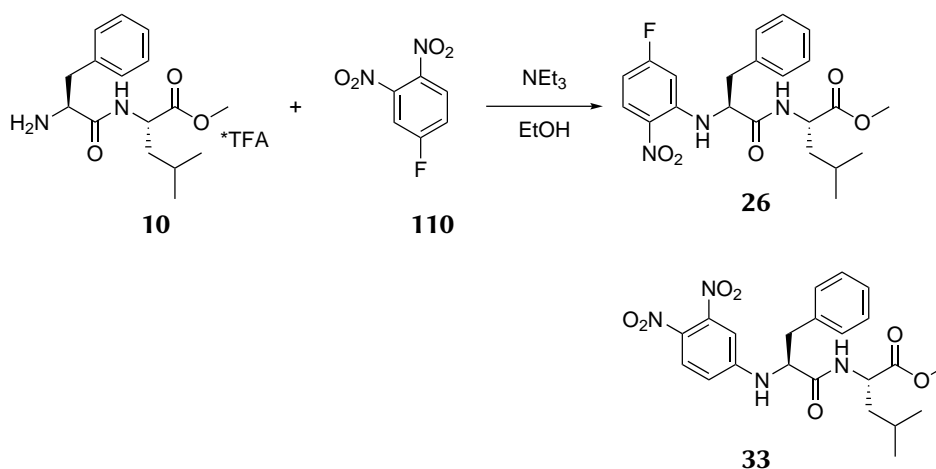
¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃): $\delta/\text{ppm} = -128.77$ (ddd, $J = 10.6, 7.3, 3.7$ Hz).

ESI-MS: $m/z = 463.3$ (100 %, [M - O^tBu+H]⁺), 541.4 (49 %, [M+Na]⁺).

ESI-HRMS: ber. für [C₂₅H₃₁FN₄NaO₇⁺]: $m/z=541.2069$, gef.: $m/z=541.2078$.

$[\alpha]_D^{23} = -31.5$ (c=0.26, CHCl₃).

Methyl (5-fluor-2-nitrophenyl)-L-phenylalanyl-L-leucinat (26) und Methyl (3,4-dinitrophenyl)-L-phenylalanyl-L-leucinat (33)



Das deblockierte Dipeptid (**10**, 76 mg, 188 μmol), der Aromat (**110**, 40 mg, 215 μmol) und Triethylamin (40 μL , 282 μmol) wurden in Ethanol (1 mL) vorgelegt und 14 h bei 80 °C gerührt. Anschließend wurde auf Raumtemperatur abkühlen lassen und die Reaktionsmischung wurde mit Ethylacetat (15 mL) verdünnt. Es wurde mit Wasser und mit ges. Kochsalzlösung (je 10 mL) gewaschen. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO_2 , Ethylacetat:Cyclohexan, 1:18 auf 18:1) gereinigt und ergab neben einer größeren Menge Edukt (>100 μmol) das nicht gewünschte Reaktionsprodukt, bei dem eine Nitrogruppe substituiert wurde (**26**, 17 mg, 39 μmol , 21 %). Weitere chromatographische Reinigung der erhaltenen Mischfraktionen ergab das gewünschte Produkt (**33**, 8 mg, 17 μmol , 9 %). Beide Produkte lagen als amorpher Feststoff vor.

Methyl (5-fluor-2-nitrophenyl)-L-phenylalanyl-L-leucinat (**26**):

$R_f = 0.30$ (SiO_2 , Ethylacetat:Cyclohexan, 1:3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 3367, 3295, 3088, 3030, 2958, 2873, 1741, 1658, 1630, 1578, 1543, 1505, 1455, 1437, 1420, 1336, 1324, 1255, 1228, 1211, 1143, 1078, 1069, 1003, 832, 751, 740, 699, 532$.

$^1\text{H-NMR}$, COSY (400 MHz, CDCl_3): $\delta/\text{ppm} = 8.38\text{--}8.31$ (m, 1 H, NH^{Phe}), 8.21 (dd, $J = 9.4, 5.9$ Hz, 1 H, H^3), 7.40–7.27 (m, 5 H, H^{arom}), 6.49 (ddd, $J = 9.6, 7.2, 2.6$ Hz, 1 H, H^4), 6.42 (dd, $J = 11.0, 2.6$ Hz, 1 H, H^6), 6.37 (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H, NH^{Leu}), 4.68–4.57 (m, 1 H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 4.14 (dt, $J = 7.5, 4.8$ Hz, 1 H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 3.64 (s, 3 H, O- CH_3), 3.33 (dd, $J = 14.1, 4.7$ Hz, 1 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 3.22 (dd, $J = 14.1, 7.5$ Hz, 1 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$), 1.663–1.41 (m, 3 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$, $\gamma\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 0.92 (d, $J = 6.4$ Hz, 3 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$), 0.90 (d, $J = 6.3$ Hz, 2 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$).

$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (101 MHz, CDCl_3): $\delta/\text{ppm} = 172.6$ (C=O $^{\text{Leu}}$), 170.8 (C=O $^{\text{Phe}}$), 167.5 (d, $J = 257.8$ Hz, C^5), 146.2 (d, $J = 12.9$ Hz, C^1), 135.5 (C^1), 130.2 (d, $J = 1.7$ Hz, C^2), 130.0 (d, $J = 12.1$ Hz, C^3), 129.5 ($\text{C}^{2'/6'}$), 129.2 ($\text{C}^{3'/5'}$), 127.8 (C^4), 106.1 (d, $J = 24.3$ Hz, C^4), 101.4 (d, $J = 27.6$ Hz, C^6), 60.5 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 52.4 (O- CH_3), 50.8 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 41.1 ($\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$), 38.9 ($\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 24.9 ($\gamma\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 22.9 ($\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$), 21.8 ($\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$).

$^{19}\text{F-NMR}$ (282 MHz, CDCl_3): $\delta/\text{ppm} = -99.25$ (m).

ESI-MS: $m/z = 432.4$ (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 454.3 (87 %, $[\text{M}+\text{Na}]^+$).

ESI-HRMS: ber. für $[\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{FN}_3\text{O}_5]^+$: $m/z=432.1929$, gef.: $m/z=432.1927$.

$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = 86.4$ (c=0.50, CHCl_3).

Methyl (3,4-dinitrophenyl)-L-phenylalanyl-L-leucinate (**33**)

$R_f = 0.12$ (SiO_2 , Ethylacetat:Cyclohexan, 1:3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 3352, 3282, 3087, 3031, 2958, 2872, 1743, 1661, 1609, 1548, 1513, 1455, 1438, 1371, 1327, 1258, 1208, 1148, 1059, 846, 746, 700$.

9. | Experimenteller Teil

$^1\text{H-NMR}$, COSY (300 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 7.93 (d, J = 9.6 Hz, 1 H, H^5), 7.37–7.26 (m, 3 H, H^{arom}), 7.25–7.16 (m, 2 H, H^{arom}), 6.70–6.59 (m, 2 H, H^2 , H^6), 6.30 (d, J = 8.3 Hz, 1 H, NH^{Leu}), 5.39 (d, J = 6.2 Hz, 1 H, NH^{Phe}), 4.60 (td, J = 8.6, 4.9 Hz, 1 H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 4.24–4.12 (m, 1 H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 3.70 (s, 3 H, OCH_3), 3.24 (dd, J = 14.0, 5.8 Hz, 1 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 3.13 (dd, J = 14.1, 7.2 Hz, 1 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 1.65–1.44 (m, 3 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$, $\gamma\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 0.92 (d, J = 6.2 Hz, 3 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$), 0.90 (d, J = 6.1 Hz, 3 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$).

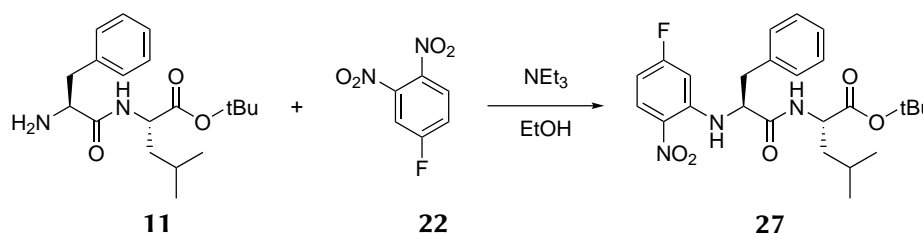
$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (75 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 172.8 ($\text{C}=\text{O}^{\text{Leu}}$), 170.2 ($\text{C}=\text{O}^{\text{Phe}}$), 151.4 (C^1), 146.8 (C^3), 131.1 (C^1), 135.2 (C^4), 129.3 ($\text{C}^{2'/6'}$), 129.3 ($\text{C}^{3'/5'}$), 128.1 (C^5), 128.0 (C^4), 114.0 (C^6), 107.9 (C^2), 59.0 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 52.7 (OCH_3), 51.1 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 41.4 ($\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$), 39.0 ($\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 25.0 ($\gamma\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 22.8 ($\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$), 21.9 ($\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$).

ESI-MS: m/z = 459.3 (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 481.2 (58 %, $[\text{M}+\text{Na}]^+$).

ESI-HRMS: ber. für $[\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_7]^+$: $m/z=459.1874$, gef.: $m/z=459.1876$.

$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -27.1$ ($c=0.45$, CHCl_3).

***tert*-Butyl (5-fluor-2-nitrophenyl)-L-phenylalanyl-L-leucinat (27)**



Das deblockierte Dipeptid (**11**, 40 mg, 120 μmol), der Aromat (**22**, 34 mg, 180 μmol) und Triethylamin (25 μL , 180 μmol) wurden in Ethanol (1 mL) vorgelegt und 16 h bei 80 °C gerührt. Anschließend wurde auf Raumtemperatur abkühlen lassen und die Reaktionsmischung wurde mit Ethylacetat (15 mL) verdünnt. Es wurde mit Wasser und ges. Kochsalzlösung (je 10 mL) gewaschen. Das Produkt (13 mg, 27 μmol , 23 %) wurde als gelber amorpher Feststoff nach Säulenchromatographie (SiO_2 , Ethylacetat:Cyclohexan, 1:9 auf 9:1) erhalten. *tert*-Butyl (3,4-dinitrophenyl)-L-phenylalanyl-L-leucinat wurde als Nebenprodukt durch HPLC-MS und hochaufgelöste Masse identifiziert. Es wurde jedoch nur in sehr geringer Ausbeute erhalten und konnte nicht rein isoliert werden.

$R_f = 0.27$ (SiO_2 , Ethylacetat:Cyclohexan, 1:3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 3365, 3315, 2960, 2933, 2872, 1737, 1658, 1630, 1578, 1538, 1504, 1455, 1439, 1418, 1392, 1368, 1341, 1261, 1227, 1147, 1069, 1001, 846, 749, 701$.

$^1\text{H-NMR}$, COSY (300 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 8.35 (dd, J = 5.4, 1.8 Hz, 1 H, NH^{Phe}), 8.20 (dd, J = 9.4, 5.9 Hz, 1 H, H^3), 7.40–7.21 (m, 5 H, H^{arom}), 6.50–6.35 (m, 3 H, H^4 , H^6 , NH^{Leu}), 4.50 (td, J = 8.7, 5.2 Hz, 1 H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 4.13 (dt, J = 7.8, 4.9 Hz, 1 H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 3.34 (dd, J = 14.0, 4.6 Hz, 1 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 3.20 (dd, J = 14.0, 7.8 Hz, 1 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$), 1.61–1.37 (m, 3 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$, $\gamma\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 1.35 (s, 9 H, $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 0.93 (d, J = 6.0 Hz, 3 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$), 0.92 (d, J = 6.2 Hz, 3 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$).

$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (75 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 171.3 ($\text{C}=\text{O}^{\text{Leu}}$), 170.4 ($\text{C}=\text{O}^{\text{Phe}}$), 167.5 (d, J = 257.8 Hz, C^5), 146.3 (d, J = 13.0 Hz, C^1), 135.6 (C^1), 130.1 (app s, C^2), 130.0 (d, J = 12.1 Hz, C^3), 129.4 ($\text{C}^{2'/6'}$), 129.2 ($\text{C}^{3'/5'}$), 127.7 (C^4), 105.9 (d, J = 24.3 Hz, C^4), 101.2 (d, J = 27.5 Hz, C^6), 82.2 ($\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 60.5 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 51.5 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 41.7 ($\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$), 39.0 ($\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 27.9 ($\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 25.0 ($\gamma\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 22.9 ($\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$), 22.1 ($\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376 MHz, CDCl_3): δ/ppm = -99.32 (m).

ESI-MS: m/z = 418.3 (100 %, $[\text{M} - \text{O}^t\text{Bu} + \text{H}]^+$), 496.3 (84 %, $[\text{M} + \text{Na}]^+$).

ESI-HRMS: ber. für $[\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{FN}_3\text{NaO}_5]^+$: $m/z=496.2218$, gef.: $m/z=496.2205$.

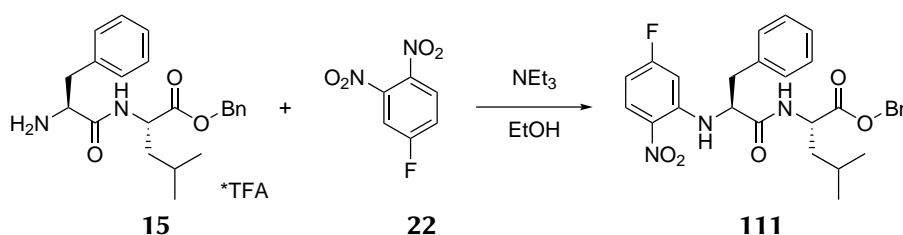
$[\alpha]_{\text{D}}^{24}$ = 50.8 ($c=0.26$, CHCl_3).

Für *tert*-Butyl (3,4-dinitrophenyl)-L-phenylalanyl-L-leucinat:

ESI-MS: m/z = 445.3 (100 %, $[\text{M} - \text{O}^t\text{Bu} + \text{H}]^+$), 523.3 (71 %, $[\text{M} + \text{Na}]^+$).

ESI-HRMS: ber. für $[\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{NaO}_7]^+$: $m/z=523.2163$, gef.: $m/z=523.2148$.

Benzyl (5-fluor-2-nitrophenyl)-L-phenylalanyl-L-leucinat (111)



Das deblockierte Dipeptid (**15**, 120 mg, 256 μmol), der Aromat (**22**, 71 mg, 384 μmol) und Triethylamin (54 μL , 384 μmol) wurden in Ethanol (5 mL) vorgelegt und 7 h bei Raumtemperatur und anschließend 48 h bei 80 °C gerührt. Anschließend wurde auf Raumtemperatur abkühlen lassen und die Reaktionsmischung wurde mit Ethylacetat (50 mL) verdünnt. Es wurde zwei Mal mit Wasser und ein Mal mit ges. Kochsalzlösung (je 25 mL) gewaschen. Das Produkt (15 mg, 29 μmol , 11 %) wurde als gelber amorpher Feststoff nach zweimaliger Säulenchromatographie (SiO_2 , 1. Chloroform:Cyclohexan, 1:20 auf 1:1, 2. 100 % Chloroform) erhalten. Über HPLC-MS konnte die Masse

9. | Experimenteller Teil

des Nebenprodukts Benzyl (3,4-dinitrophenyl)-L-phenylalanyl-L-leucinat detektiert werden, eine Isolierung war jedoch nicht möglich.

$R_f = 0.21$ (SiO₂, Ethylacetat:Cyclohexan, 1:3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 3356, 3088, 3066, 3033, 2959, 2932, 2872, 1742, 1656, 1630, 1578, 1505, 1455, 1439, 1417, 1386, 1369, 1341, 1312, 1261, 1230, 1149, 1069, 1001, 833, 750, 699$.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): $\delta/\text{ppm} = 8.35$ (dd, $J = 5.4, 1.9$ Hz, 1 H, NH^{Phe}), 8.19 (dd, $J = 9.4, 5.9$ Hz, 1 H, H³), $7.40\text{--}7.16$ (m, 10 H, H^{arom}), $6.52\text{--}6.35$ (m, 3 H, H⁴, H⁶, NH^{Leu}), 5.12 (d, $J = 12.3$ Hz, 1 H, OCH₂Ph), 5.04 (d, $J = 12.3$ Hz, 1 H, OCH₂Ph), 4.67 (td, $J = 8.8, 5.0$ Hz, 1 H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 4.14 (dt, $J = 7.6, 4.9$ Hz, 1 H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 3.33 (dd, $J = 14.0, 4.7$ Hz, 1 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 3.21 (dd, $J = 14.0, 7.6$ Hz, 1 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), $1.67\text{--}1.38$ (m, 3 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$, $\gamma\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 0.90 (d, $J = 6.3$ Hz, 3 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$), 0.88 (d, $J = 6.2$ Hz, 3 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75 MHz, CDCl₃): $\delta/\text{ppm} = 172.1$ (C=O^{Leu}), 170.7 (C=O^{Phe}), 167.5 (d, $J = 257.8$ Hz, C⁵), 146.2 (d, $J = 13.0$ Hz, C¹), 135.5 (C_{arom}), 135.3 (C_{arom}), 130.1 (d, $J = 1.8$ Hz, C²), 130.0 (d, $J = 12.1$ Hz, C³), $129.4, 129.2, 128.7, 128.6, 128.3, 127.8$ (C_{arom}), 106.0 (d, $J = 24.3$ Hz, C⁴), 101.3 (d, $J = 27.6$ Hz, C⁶), 67.2 (OCH₂Ph), 60.5 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 51.0 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 41.2 ($\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$), 38.9 ($\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 24.9 ($\gamma\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 22.9 ($\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$), 21.8 ($\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$).

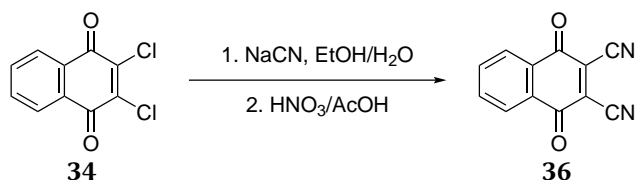
¹⁹F-NMR (282 MHz, CDCl₃): $\delta/\text{ppm} = -98.83\text{--}-99.14$ (m).

ESI-MS: $m/z = 508.4$ (99 %, [M+H]⁺), 530.3 (84 %, [M+Na]⁺).

ESI-HRMS: ber. für [C₂₈H₃₁FN₃O₅⁺]: $m/z=508.2242$, gef.: $m/z=508.2254$.

$[\alpha]_{\text{D}}^{28} = 66.0$ (c=0.3, CHCl₃).

2,3-Dicyano-1,4-naphthochinon (36)



Das Produkt wurde nach Budni *et al.* synthetisiert.^[110] Eine Lösung von Natriumcyanid (1.33 g, 20.5 mmol) in Wasser (6 mL) wurde zu einer Lösung von 2,3-Dichlor-1,4-naphthochinon (**34**, 1.00 g, 4.4 mmol) in Ethanol (17 mL) gegeben. Es wurde in einer Geschwindigkeit zugegeben, dass die Temperatur nicht über 40 °C stieg. Anschließend wurde die Mischung bei Raumtemperatur 3 h gerührt und mit kalter konzentrierte Salzsäure bis auf pH=1 gebracht. Der ausgefallene Feststoff, der

das Zwischenprodukt (1,4-Dihydroxynaphthalin-2,3-dinitril) darstellt, wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Oxidation zum Naphthochinon wurde anschließend mit Hilfe von Salpetersäure erreicht. Dafür wurde das Naphthalin in Essigsäure (10 mL) suspendiert und auf 100 °C erhitzt. In der Hitze wurde Salpetersäure (30 %, 1.5 mL) zugegeben. Anschließend wurde abkühlen gelassen und Eis zugegeben. Nach Absaugen wurde das Produkt (**36**, 319 mg, 1.53 mmol, 35 %) als gelber Feststoff erhalten.

$R_f = 0.60$ (SiO₂, Petrolether:Ethylacetat, 5:3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 1669, 1604, 1584, 1457, 1332, 1293, 1262, 1188, 979, 899, 863, 791, 711$.

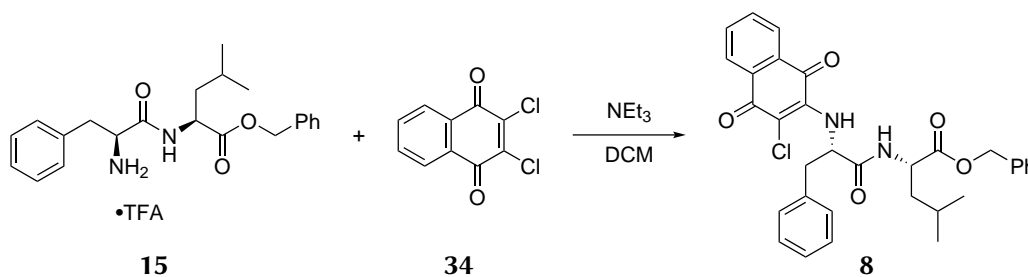
¹H-NMR, COSY(400 MHz, CDCl₃): $\delta/\text{ppm} = 8.27\text{--}8.18$ (m, 2 H), 8.00–7.92 (m, 2 H).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (101 MHz, CDCl₃): $\delta/\text{ppm} = 176.2, 136.4, 130.4, 129.8, 128.3, 110.4$.

ESI-HRMS: ber. für [C₁₂H₄N₂O₂Na⁺]: $m/z=231.0170$, gef.: $m/z=231.0169$.

In der genutzten Literaturstelle wurden keine bzw. unvollständige analytische Daten angegeben.^[110]

Benzyl-*N*-(3-chlor-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl)-*L*-phenylalanyl-*L*-leucinat (**8**)



Zu einer Lösung aus 2,3-Dichlor-1,4-naphthochinon (**34**, 114 mg, 0.50 mmol) und Hydrochlorid des Dipeptids (**15**, 202 mg, 0.50 mmol) in Dichlormethan (4 mL) wurde langsam eine Lösung von Triethylamin (70 μL , 0.50 mmol) in Dichlormethan (1 mL) zugetropft. Nach 24 h bei Raumtemperatur wurde mit Dichlormethan (10 mL) verdünnt und die organische Phase mit Natriumhydrogencarbonat- und ges. Kochsalzlösung gewaschen (je 10 mL). Nach Trocknen über Natriumsulfat und Entfernen des Lösemittels im Vakuum wurde das Produkt (179 mg, 0.32 mmol, 64 %) als roter Feststoff erhalten. Kristallisation aus Ethanol gab Kristalle, die einer Röntgenstrukturanalyse unterzogen wurden.

$R_f = 0.30$ (SiO₂, Petrolether:Ethylacetat, 4:1).

Smp. = 129 °C–132 °C.

9. | Experimenteller Teil

IR (ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3309, 2957, 1739, 1674, 1594, 1568, 1455, 1386, 1330, 1291, 1265, 1146, 990, 910, 844, 789, 720, 697, 682.

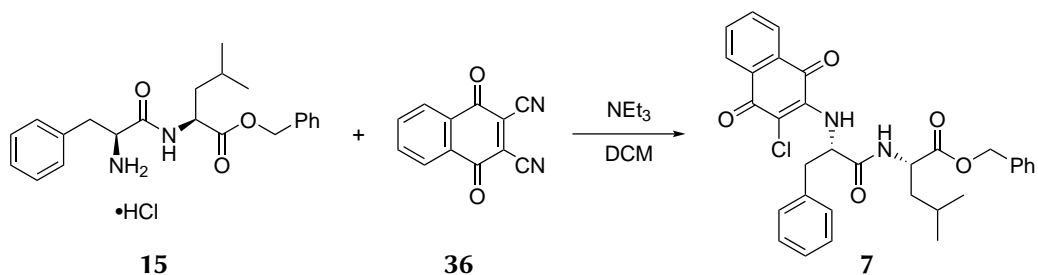
$^1\text{H-NMR}$, COSY (300 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 8.11 (dd, J = 7.6, 1.4 Hz, 1 H, $\text{H}^{5/8}$), 7.99 (dd, J = 7.6, 1.4 Hz, 1 H, $\text{H}^{5/8}$), 7.71 (td, J = 7.5, 1.4 Hz, 1 H, $\text{H}^{6/7}$), 7.63 (td, J = 7.5, 1.4 Hz, 1 H, $\text{H}^{6/7}$), 7.39–7.16 (m, 10 H, H^{arom}), 6.40 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, NH^{Phe}), 6.11 (d, J = 8.1 Hz, 1 H, NH^{Leu}), 5.25 (dt, J = 8.1, 6.6 Hz, 1 H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 5.14 (d, J = 12.2 Hz, 1 H, OCH_2^{Bn}), 5.08 (d, J = 12.2 Hz, 1 H, OCH_2^{Bn}), 4.70–4.60 (m, 1 H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 3.22 (dd, J = 13.8, 6.5 Hz, 1 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 3.14 (dd, J = 13.8, 6.6 Hz, 1 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 1.64–1.42 (m, 3 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$, $\gamma\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 0.88 (d, J = 6.1 Hz, 3 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$), 0.87 (d, J = 6.3 Hz, 3 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$).

$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (75 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 180.2 ($\text{C}^{1/4}$), 176.8 ($\text{C}^{1/4}$), 172.1 ($\text{C}=\text{O}^{\text{Leu}}$), 170.4 ($\text{C}=\text{O}^{\text{Phe}}$), 143.9 (C^3), 135.5 (C_q^{Phe}), 135.3 (C_q^{Bn}), 135.0 ($\text{C}^{6/7}$), 132.9 ($\text{C}^{6/7}$), 132.2, 130.0, 129.6, 129.0, 128.7, 128.6, 128.4, 127.6 (CHAr), 127.0 ($\text{C}^{5/8}$), 126.9 ($\text{C}^{5/8}$), 67.3 (CH_2^{Bn}), 58.9 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 51.3 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 41.7 ($\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$), 40.6 ($\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 24.9 ($\gamma\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 22.8 ($\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$), 22.1 ($\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$).

ESI-HRMS: ber. für $[\text{C}_{32}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_5\text{Na}_{35}\text{Cl}^+]$: m/z =581.1819, gef.: m/z =581.1802.

$[\alpha]_{\text{D}}^{26}$ = -28.0 ($c=1.00$, CH_2Cl_2).

Benzyl-*N*-(3-cyano-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl)-*L*-phenylalanyl-*L*-leucinat (7)



Zu einer Lösung aus dem Hydrochlorid des Dipeptids (**15**, 145 mg, 0.30 mmol) in Dichlormethan (3 mL) wurde langsam Triethylamin (41 μL , 0.30 mmol) zugegeben. Nach 10 min Rühren wurde das entsprechende Naphthochinon (**36**, 62 mg, 0.30 mmol) zugegeben und es wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem das Lösemittel entfernt wurde, wurde das Produkt (126 mg, 0.23 mmol, 76 %) als gelber Feststoff erhalten.

R_f = 0.28 (SiO_2 , Petrolether:Ethylacetat, 3:1).

Smp. = 67 °C–70 °C.

IR (ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3287, 2957, 2212, 1740, 1685, 1599, 1576, 1525, 1455, 1387, 1332, 1288, 1187, 1149, 1081, 966, 895, 812, 793, 749, 724, 697, 667.

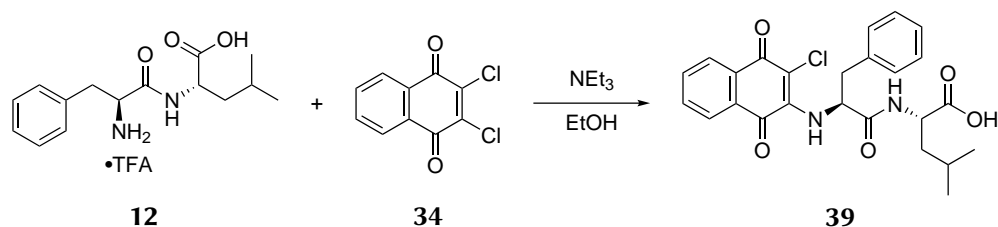
$^1\text{H-NMR}$, COSY (300 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 8.16 (dd, J = 7.8, 1.2 Hz, 1 H, $\text{H}^{5/8}$), 8.11 (dd, J = 7.8, 1.3 Hz, 1 H, $\text{H}^{5/8}$), 7.81 (m, 2 H, $\text{H}^{6/7}$, NH^{Phe}), 7.70 (td, J = 7.5, 1.4 Hz, 1 H, $\text{H}^{6/7}$), 7.41–7.32 (m, 5 H, H^{arom}), 7.28–7.20 (m, 5 H, H^{arom}), 6.13 (d, J = 7.8 Hz, 1 H, NH^{Leu}), 5.34 (ddd, J = 8.9, 7.4, 6.3 Hz, 1 H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 5.18 (d, J = 12.2 Hz, 1 H, OCH_2^{Bn}), 5.11 (d, J = 12.2 Hz, 1 H, OCH_2^{Bn}), 4.62–4.53 (m, 1 H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 3.35 (dd, J = 13.8, 6.2 Hz, 1 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 3.16 (dd, J = 13.8, 7.5 Hz, 1 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 1.66–1.49 (m, 3 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$, $\gamma\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 0.88 (d, J = 5.3 Hz, 6 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$).

$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (75 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 179.1 ($\text{C}^{1/4}$), 178.5 ($\text{C}^{1/4}$), 171.7 ($\text{C}=\text{O}^{\text{Leu}}$), 168.3 ($\text{C}=\text{O}^{\text{Phe}}$), 148.4, 136.0 ($\text{C}^{6/7}$), 135.3 (C_q^{Bn}), 134.5 (C_q^{Phe}), 133.5 ($\text{C}^{6/7}$), 132.6, 129.7 ($\text{C}^{4a/8a}$), 129.7, 129.1, 128.8, 128.7, 128.5, 127.8, 127.6 ($\text{C}^{5/8}$), 127.2 ($\text{C}^{5/8}$), 86.4 (C^3), 67.3 (CH_2^{Bn}), 56.7 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 51.6 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 41.4 ($\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$), 40.0 ($\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 24.9 ($\gamma\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 22.7 ($\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$), 22.1 ($\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$).

ESI-HRMS: ber. für $[\text{C}_{33}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_5]^+$: $m/z=550.2342$, gef.: $m/z=550.2324$.

$[\alpha]_{\text{D}}^{26} = -55.3$ ($c=1.00$, CH_2Cl_2).

(3-Chlor-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl)-L-phenylalanyl-L-leucin (39)



Zu dem beidseitig deblockierten Dipeptid (**12**, 54 mg, 137 μmol) in Ethanol (1.5 mL) wurde Triethylamin (29 μL , 210 μmol) und 2,3-Dichlor-1,4-naphthochinon (**34**, 34 mg, 150 μmol) gegeben. Nach 23 h bei 60 °C wurde weiteres Triethylamin (29 μL , 210 μmol) zugegeben und die Mischung 14 h bei 65 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel entfernt und der Rest in Ethylacetat (15 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit Wasser, 1 N HCl und ges. Kochsalzlösung (je 10 mL) gewaschen. Das Produkt (16 mg, 34 μmol , 25 %) wurde als rotes Öl nach Säulenchromatographie (SiO_2 , Dichlormethan:Methanol, 15:1) erhalten.

$R_f = 0.29$ (SiO_2 , Dichlormethan:Methanol, 15:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3307, 2957, 2361, 2342, 1717, 1653, 1601, 1332, 1293, 1266, 721.

9. | Experimenteller Teil

$^1\text{H-NMR}$, COSY (600 MHz, CD_3OD): δ/ppm = 7.99 (d, J = 7.6 Hz, 1 H, $\text{H}^{5/8}$), 7.94 (br d, J = 7.6 Hz, 1 H, $\text{H}^{5/8}$), 7.74 (td, J = 7.6, 1.3 Hz, 1 H, $\text{H}^{6/7}$), 7.67 (td, J = 7.6, 1.3 Hz, 1 H, $\text{H}^{6/7}$), 7.28 (m, 2 H, H^{arom}), 7.21 (t, J = 7.4 Hz, 2 H, H^{arom}), 7.14 (t, J = 7.4 Hz, 1 H, H^{arom}), 5.46 (dd, J = 8.0, 4.7 Hz, 1 H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 4.44 (t, J = 7.4 Hz, 1 H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 3.35 (dd, J = 14.1, 4.6 Hz, 1 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 3.10 (dd, J = 14.0, 8.0 Hz, 1 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 1.79–1.72 (m, 1 H, $\gamma\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 1.69–1.66 (m, 2 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$), 0.97 (d, J = 6.6 Hz, 3 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$), 0.93 (d, J = 6.5 Hz, 3 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$).

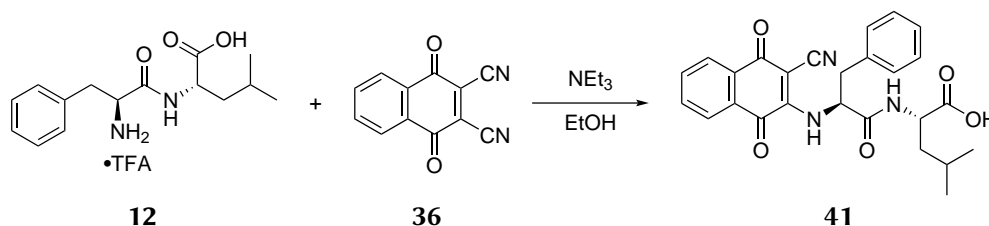
$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (151 MHz, CD_3OD): δ/ppm = 180.9 ($\text{C}^{1/4}$), 178.2 ($\text{C}^{1/4}$), 173.1 ($\text{C}=\text{O}^{\text{Phe}}$), 137.3 (C_q^{Ar}), 135.9 ($\text{C}^{6/7}$), 134.0 ($\text{C}^{6/7}$), 133.4 ($\text{C}^{4a/8a}$), 131.4 ($\text{C}^{4a/8a}$), 130.9, 129.6, 128.1 (C^{Ar}), 127.8 ($\text{C}^{5/8}$), 127.3 ($\text{C}^{5/8}$), 59.4 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 53.5 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 42.4 ($\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$), 41.3 ($\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 26.1 ($\gamma\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 23.6 ($\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$), 21.9 ($\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$).¹

ESI-MS: m/z = 469.4 (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 491.2 (9 %, $[\text{M}+\text{Na}]^+$).

ESI-HRMS: ber. für $[\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{ClN}_2\text{O}_5]^+$: $m/z=469.1525$, gef.: $m/z=469.1522$.

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -9.4$ ($c=0.16$, CHCl_3).

(3-Cyano-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl)-L-phenylalanyl-L-leucin (41)



Analog zu Produkt 39 wurden beidseitig deblockiertes Dipeptid (**12**, 55 mg, 140 μmol), Triethylamin (29 μL , 210 μmol) und 2,3-Dicyano-1,4-naphthochinon (**36**, 30 mg, 144 μmol) in Ethanol (1.5 mL) zusammengegeben. Nach 23 h bei 60 °C wurde weiteres Triethylamin (29 μL , 210 μmol) zugegeben und die Mischung 14 h bei 65 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel entfernt und der Rest in Ethylacetat (15 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit Wasser, 1 N HCl und ges. Kochsalzlösung (je 10 mL) gewaschen. Ein Produktgemisch (30 mg, 65 μmol , 46 %) wurde nach Säulenchromatographie (SiO_2 , Dichlormethan:Methanol, 15:1) erhalten. Weitere Reinigung durch präparative HPLC (ACE C_{18} -PPF, 5 μm , 150 mm \times 30 mm, 37.5 mL min^{-1} , MeCN:Wasser 1:1) ergab das gewünschte Produkt als gelbes Öl.

$R_f = 0.14$ (SiO_2 , Dichlormethan:Methanol, 15:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 3313, 2958, 2361, 2339, 2212, 1684, 1599, 1575, 1559, 1540, 1286, 726$.

¹Signale für Carboxyl-Kohlenstoff, C-2 und C-3 wurden nicht beobachtet.

$^1\text{H-NMR}$, COSY (600 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 8.19 (m, 2 H, $\text{H}^{5/8}$, NH^{Phe}), 8.15 (dd, J = 7.7, 1.3 Hz, 1 H, $\text{H}^{5/8}$), 7.84 (m, 2 H, $\text{H}^{6/7}$, NH^{Phe}), 7.73 (td, J = 7.5, 1.3 Hz, 1 H, $\text{H}^{6/7}$), 7.20 (t, J = 7.5 Hz, 2 H, H^{arom}), 7.13 (d, J = 7.4 Hz, 1 H, H^{arom}), 7.10 (m, 2 H, H^{arom}), 5.59 (dt, J = 9.3, 6.3 Hz, 1 H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 4.75 (m, 1 H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 3.24 (dd, J = 13.8, 6.1 Hz, 1 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 3.19 (dd, J = 13.8, 6.5 Hz, 1 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 1.74–1.67 (m, 2 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$), 1.65–1.58 (m, 1 H, $\gamma\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 0.96 (app-s, 3 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$), 0.95 (app-s, 3 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$).

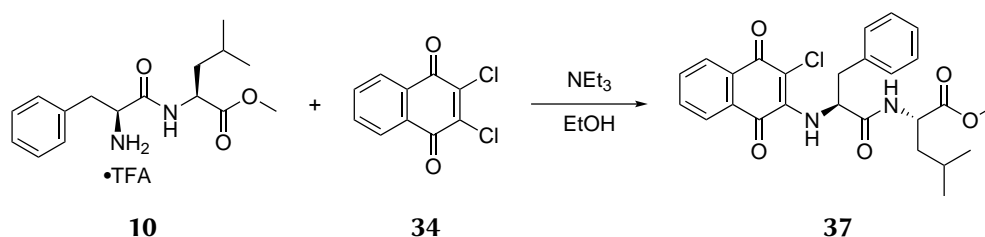
$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (151 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 179.1 ($\text{C}^{1/4}$), 178.0 ($\text{C}^{1/4}$), 175.7 ($\text{C}=\text{O}^{\text{Leu}}$), 168.1 ($\text{C}=\text{O}^{\text{Phe}}$), 148.7 (C^3), 136.2 ($\text{C}^{6/7}$), 134.2 (C_q^{Ar}), 133.6 ($\text{C}^{6/7}$), 132.6 ($\text{C}^{4a/8a}$), 130.0 (C^{Ar}), 129.7 ($\text{C}^{4a/8a}$), 128.7, 127.9 (C^{Ar}), 127.9 ($\text{C}^{5/8}$), 127.2 ($\text{C}^{5/8}$), 115.4 ($-\text{CN}$), 84.5 (C^2), 55.9 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 51.3 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 43.0 ($\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$), 40.8 ($\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 24.9 ($\gamma\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 22.7 ($\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$), 22.6 ($\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$).

ESI-MS: m/z = 460.4 (36 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 482.3 (100 %, $[\text{M}+\text{Na}]^+$).

ESI-HRMS: ber. für $[\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{NaO}_5]^+$: $m/z=482.1686$, gef.: $m/z=482.1680$.

$[\alpha]_{\text{D}}^{24}$ = 30.6 ($c=0.16$, CHCl_3).

Methyl-*N*-(3-chlor-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl)-*L*-phenylalanyl-*L*-leucinat (37)



Zum entschützten Dipeptid (**10**, 76 mg, 188 μmol) in Ethanol (1 mL) wurde Triethylamin (40 μL , 282 μmol) und das entsprechende Naphthochinon (49 μL , 216 μmol) gegeben. Es wurde 14 h bei 80 °C gerührt und anschließend mehr Triethylamin (40 μL , 282 μmol) zugegeben und weitere 22 h bei 80 °C gerührt. Dann wurde Ethylacetat (15 mL) zugegeben und die organische Phase drei Mal mit Wasser und ges. Kochsalzlösung (je 10 mL) gewaschen. Das Produkt (64 mg, 133 μmol , 71 %) wurde als rotes Öl nach Säulenchromatographie (SiO_2 , Cyclohexan:Ethylacetat, 9:1 auf 1:9) erhalten.

R_f = 0.11 (SiO_2 , Cyclohexan:Ethylacetat, 5:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3312, 3066, 3031, 2957, 2871, 1743, 1677, 1602, 1572, 1521, 1455, 1439, 1332, 1293, 1267, 1207.

$^1\text{H-NMR}$, COSY (600 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 8.11 (dd, J = 7.7, 1.3 Hz, 1 H, $\text{H}^{5/8}$), 8.01 (dd, J = 7.6, 1.4 Hz, 1 H, $\text{H}^{5/8}$), 7.71 (td, J = 7.5, 1.4 Hz, 1 H, $\text{H}^{6/7}$), 7.63 (td, J = 7.6, 1.4 Hz,

9. | Experimenteller Teil

1 H., H^{6/7}), 7.33–7.21 (m, 5 H, H^{arom}), 6.43 (br d, $J = 8.1$ Hz, 1 H, NH^{Phe}), 6.04 (d, $J = 8.2$ Hz, 1 H, NH^{Leu}), 5.25 (dt, $J = 8.1, 6.6$ Hz, 1 H, α -CH^{Phe}), 4.60 (td, $J = 8.4, 5.3$ Hz, 1 H, α -CH^{Leu}), 3.68 (s, 3 H, OMe), 3.24 (dd, $J = 13.8, 6.5$ Hz, 1 H, β -CH₂^{Phe}), 3.16 (dd, $J = 13.8, 6.8$ Hz, 1 H, β -CH₂^{Phe}), 1.62–1.42 (m, 3 H, β -CH₂^{Leu}, γ -CH^{Leu}), 0.89 (app-t, $J = 6.5$ Hz, 6 H, δ -CH₃^{Leu}).

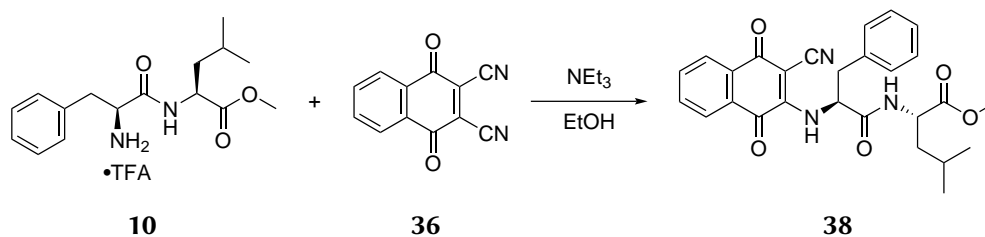
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (151 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 180.2 (C^{1/4}), 176.8 (C^{1/4}), 172.7 (C=O^{Leu}), 170.4 (C=O^{Phe}), 143.9 (C³), 135.6 (C_q^{Ar}), 135.0 (C^{6/7}), 132.9 (C^{6/7}), 132.3 (C^{4a/8a}), 130.1 (C^{4a/8a}), 129.7, 129.0, 127.6 (C^{Ar}), 127.0 (C^{5/8}), 126.9 (C^{5/8}), 110.1 (C–Cl), 58.9 (α -CH^{Phe}), 52.5 (OMe), 51.1 (α -CH^{Leu}), 41.7 (β -CH₂^{Leu}), 40.6 (β -CH₂^{Phe}), 24.9 (γ -CH^{Leu}), 22.8 (δ -CH₃^{Leu}), 22.1 (δ -CH₃^{Leu}).

ESI-MS: $m/z = 483.4$ (100 %, [M+H]⁺), 505.3 (40 %, [M+Na]⁺).

ESI-HRMS: ber. für [C₂₆H₂₈ClN₂O₅⁺]: $m/z=483.1681$, gef.: $m/z=483.1682$.

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -36.3$ (c=0.65, CHCl₃).

Methyl-*N*-(3-cyano-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl)-*L*-phenylalanyl-*L*-leucinat (38)



Das entschützte Dipeptid (**10**, 30 mg, 74 μ mol), Triethylamin (15 μ L, 110 μ mol) und 2,3-Dicyano-1,4-naphthochinon (23 μ L, 110 μ mol) wurden in Ethanol (2 mL) vorgelegt. Nach 17.5 h bei 80 °C wurde abkühlen lassen und Ethylacetat (50 mL) wurde hinzugefügt. Die organische Phase wurde mit Wasser und zwei Mal mit ges. Natriumchloridlösung (je 50 mL) gewaschen. Das Produkt (29 mg, 61 μ mol, 55 %) wurde als gelbes Öl nach Chromatographie (SiO₂, Cyclohexan:Ethylacetat, 9:1 auf 1:9) erhalten.

$R_f = 0.31$ (SiO₂, Cyclohexan:Ethylacetat, 2:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 3291, 3066, 3032, 2957, 2871, 2213, 1742, 1686, 1600, 1576, 1531, 1333, 1291, 1229.1206, 1154, 725$.

¹H-NMR, COSY (600 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 8.15 (dd, $J = 7.0, 1.3$ Hz, 1 H, H^{5/8}), 8.10 (dd, $J = 7.8, 1.3$ Hz, 1 H, H^{5/8}), 7.81 (m, 2 H, H^{6/7}, NH^{Phe}), 7.70 (td, $J = 7.6, 1.3$ Hz, 1 H, H^{6/7}), 7.32–7.21 (m, 5 H, H^{arom}), 6.24 (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H, NH^{Leu}), 5.35 (ddd, $J = 8.9, 7.6, 6.2$ Hz, 1 H, α -CH^{Phe}), 4.54 (td, $J = 8.1, 5.4$ Hz, 1 H, α -CH^{Leu}), 3.70 (s, 3 H, OMe), 3.39 (dd, $J = 13.8, 6.2$ Hz, 1 H,

β -CH₂^{Phe}, 3.21 (dd, $J = 13.8, 7.6$ Hz, 1 H, β -CH₂^{Phe}), 1.68–1.48 (m, 3 H, β -CH₂^{Leu}, γ -CH^{Leu}), 0.91 (app-s, 3 H, δ -CH₃^{Leu}), 0.89 (app-s, 3 H, δ -CH₃^{Leu}).

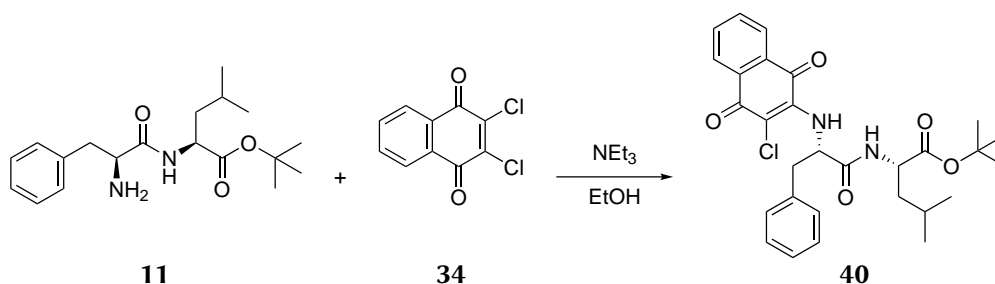
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (151 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 179.1 (C^{1/4}), 178.5 (C^{1/4}), 172.3 (C=O^{Leu}), 168.4 (C=O^{Phe}), 148.4 (C^{4a/8a}), 136.0 (C^{6/7}), 134.6 (C_q^{Ar}), 133.5 (C^{6/7}), 132.6 (C^{4a/8a}), 129.8, 129.0, 127.8 (C^{Ar}), 127.6 (C^{5/8}), 127.1 (C^{5/8}), 116.3 (CN), 86.3 (C–CN), 56.8 (α -CH^{Phe}), 52.5 (OMe), 51.5 (α -CH^{Leu}), 41.5 (β -CH₂^{Leu}), 40.0 (β -CH₂^{Phe}), 24.9 (γ -CH^{Leu}), 22.7 (δ -CH₃^{Leu}), 22.1 (δ -CH₃^{Leu}).

ESI-MS: $m/z = 474.4$ (76 %, [M+H]⁺), 496.3 (100 %, [M+Na]⁺).

ESI-HRMS: ber. für [C₂₇H₂₇N₃NaO₅⁺]: $m/z=496.1843$, gef.: $m/z=496.1846$.

$[\alpha]_D^{23} = -48.1$ (c=0.27, CHCl₃).

tert-Butyl-N-(3-chlor-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl)-L-phenylalanyl-L-leucinat (40)



Eine Lösung bestehend aus entschütztem Dipeptid (**11**, 20 mg, 60 μ mol), Triethylamin (13 μ L, 90 μ mol) und 2,3-Dichlor-1,4-naphthochinon (20 μ L, 90 μ mol) in Ethanol (1 mL) wurde 17 h auf 80 °C erhitzt. Nach Abkühlen wurde das Lösemittel entfernt und der Rückstand in Ethylacetat (15 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit Wasser und ges. Kochsalzlösung (je 10 mL) gewaschen. Es wurde über Natriumsulfat getrocknet. Das Produkt (21 mg, 40 μ mol, 67 %) wurde nach Säulenchromatographie (SiO₂, Cyclohexan:Ethylacetat, 9:1 auf 1:9) als rotes Öl erhalten.

$R_f = 0.17$ (SiO₂, Cyclohexan:Ethylacetat, 3:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 3316, 2959, 2933, 2871, 1732, 1678, 1603, 1573, 1522, 1498, 1456, 1392, 1369, 1332, 1292, 1267, 1228, 1149, 722, 701$.

¹H-NMR, COSY (600 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 8.11 (dd, $J = 7.6, 1.1$ Hz, 1 H, H^{5/8}), 8.01 (dd, $J = 7.8, 1.3$ Hz, 1 H, H^{5/8}), 7.71 (td, $J = 7.5, 1.5$ Hz, 1 H, H^{6/7}), 7.62 (td, $J = 7.6, 1.4$ Hz, 1 H, H^{6/7}), 7.32–7.17 (m, 5 H, H^{arom}), 6.41 (br d, $J = 7.5$ Hz, 1 H, NH^{Phe}), 6.14 (d, $J = 8.2$ Hz, 1 H, NH^{Leu}), 5.25 (dt, $J = 8.1, 6.5$ Hz, 1 H, α -CH^{Phe}), 4.47 (td, $J = 8.1, 5.5$ Hz, 1 H, α -CH^{Leu}), 3.21 (d, $J = 2.8$ Hz, 1 H, β -CH₂^{Phe}), 3.19 (d, $J = 2.8$ Hz, 1 H, β -CH₂^{Phe}), 1.62–1.42 (m, 3 H,

9. | Experimenteller Teil

β -CH₂^{Leu}, γ -CH^{Leu}, 1.42 (s, 9 H, tBu), 0.92 (d, $J = 2.0$ Hz, 3 H, δ -CH₃^{Leu}), 0.90 (d, $J = 2.0$ Hz, 3 H, δ -CH₃^{Leu}).

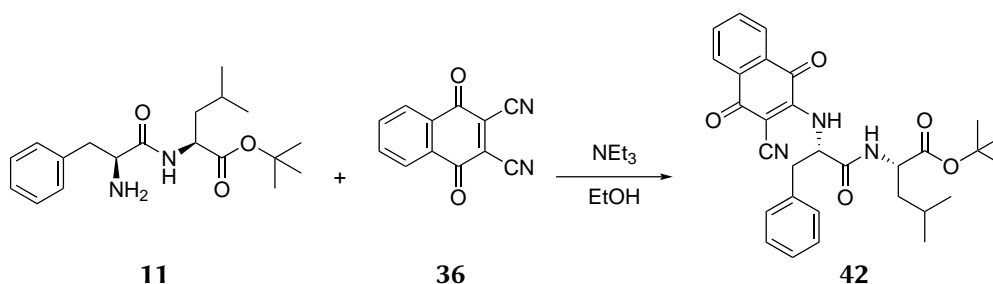
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (151 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 180.2 (C^{1/4}), 176.8 (C^{1/4}), 171.6 (C=O^{Leu}), 170.1 (C=O^{Phe}), 143.9 (C³), 135.5 (C_q^{Ar}), 134.9 (C^{6/7}), 132.9 (C^{6/7}), 132.3 (C^{4a/8a}), 130.1 (C^{4a/8a}), 129.6, 129.0, 127.6 (C^{Ar}), 127.0 (C^{5/8}), 126.9 (C^{5/8}), 82.3 (CtBu), 58.9 (α -CH^{Phe}), 51.7 (α -CH^{Leu}), 42.7 (β -CH₂^{Leu}), 40.6 (β -CH₂^{Phe}), 25.0 (γ -CH^{Leu}), 22.8 (δ -CH₃^{Leu}), 22.3 (δ -CH₃^{Leu}).

ESI-MS: $m/z = 469.4$ (100 %, [M-O^tBu+H₂O]⁺), 547.3 (40 %, [M+Na]⁺).

ESI-HRMS: ber. für [C₂₉H₃₃ClN₂NaO₅⁺]: $m/z=547.1971$, gef.: $m/z=547.1964$.

$[\alpha]_D^{23} = -18.3$ (c=0.23, CHCl₃).

tert-Butyl-N-(3-cyano-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl)-L-phenylalanyl-L-leucinat (42)



Analog zu Produkt **40** wurde eine Lösung bestehend aus entschütztem Dipeptid (**11**, 8 mg, 24 μ mol), Triethylamin (6 μ L, 45 μ mol) und 2,3-Dicyano-1,4-naphthochinon (11 μ g, 51 μ mol) in Ethanol (3 mL) 18 h auf 80 °C erhitzt. Nach Abkühlen wurde das Lösemittel entfernt und der Rückstand in Ethylacetat (50 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit Wasser und zwei Mal mit ges. Kochsalzlösung (je 50 mL) gewaschen. Es wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Produkt (6 mg, 12 μ mol, 50 %) wurde nach Säulenchromatographie (SiO₂, Cyclohexan:Ethylacetat, 9:1 auf 1:9) als gelbes Öl erhalten.

$R_f = 0.44$ (SiO₂, Cyclohexan:Ethylacetat, 2:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 3290, 2959, 2929, 2871, 2855, 2213, 1734, 1686, 1601, 1577, 1531, 1510, 1369, 1333, 1292, 1150$.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 8.18 (dd, $J = 7.8, 1.3$ Hz, 1 H, H^{5/8}), 8.12 (dd, $J = 7.7, 1.3$ Hz, 1 H, H^{5/8}), 7.82 (m, 2 H, H^{6/7}, NH^{Phe}), 7.71 (td, $J = 7.6, 1.4$ Hz, 1 H, H^{6/7}), 7.29–7.25 (m, 5 H, H^{arom}), 6.10 (d, $J = 7.9$ Hz, 1 H, NH^{Leu}), 5.33 (ddd, $J = 8.8, 7.3, 6.2$ Hz, 1 H,

α -CH^{Phe}), 4.41 (td, $J = 8.0, 5.5$ Hz, 1 H, α -CH^{Leu}), 3.36 (dd, $J = 13.8, 6.2$ Hz, 1 H, β -CH₂^{Phe}), 3.21 (dd, $J = 13.8, 7.3$ Hz, 1 H, β -CH₂^{Phe}), 1.72–1.49 (m, 3 H, β -CH₂^{Leu}, γ -CH^{Leu}), 0.92 (d, $J = 2.9$ Hz, 3 H, δ -CH₃^{Leu}), 0.90 (d, $J = 2.8$ Hz, 3 H, δ -CH₃^{Leu}).

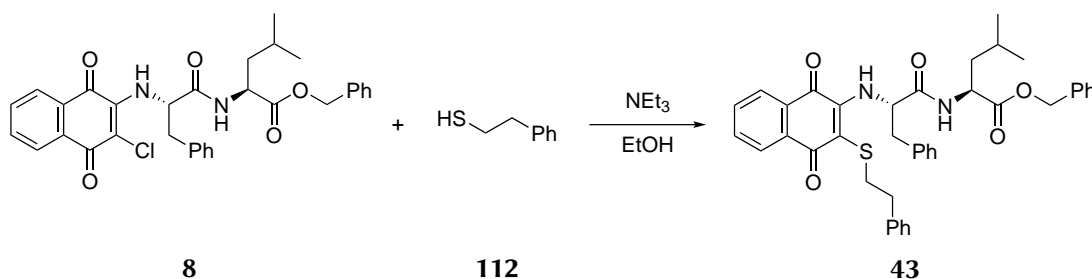
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 179.2 (C^{1/4}), 178.5 (C^{1/4}), 171.2 (C=O^{Leu}), 168.0 (C=O^{Phe}), 148.4, 136.1 (C^{6/7}), 134.5 (C_q^{Ar}), 133.5 (C^{6/7}), 132.7 (C^{Naph}), 129.8 (C^{Naph}), 129.7, 129.1, 127.9 (C^{Ar}), 127.7, 127.2 (C^{5/8}), 116.2 (CN), 86.5 (C–CN), 82.5 (CtBu), 56.8 (α -CH^{Phe}), 52.0 (α -CH^{Leu}), 41.9 (β -CH₂^{Leu}), 40.1 (β -CH₂^{Phe}), 28.1 (tBu), 25.0 (γ -CH^{Leu}), 22.7 (δ -CH₃^{Leu}), 22.3 (δ -CH₃^{Leu}).

ESI-MS: $m/z = 538.4$ (100 %, [M+Na]⁺), 547.3 (77 %, [M-O^tBu+H₂O]⁺).

ESI-HRMS: ber. für [C₃₀H₃₄N₃O₅⁺]: $m/z=516.2493$, gef.: $m/z=516.2491$.

$[\alpha]_D^{26} = -12.4$ (c=0.25, CHCl₃).

Benzyl-(1,4-dioxo-3-(phenethylthio)-1,4-dihydronaphthalen-2-yl)-L-phenylalanyl-L-leucinat (43)



Der dargestellte Inhibitor (**8**, 10 mg, 18 μ mol), 2-Phenylethanthiol (**112**, 2.6 μ L, 20 μ mol) und Triethylamin (2.7 μ L, 20 μ mol) wurden in Ethanol (2 mL) 12 h auf 70 °C erhitzt. Es wurde zusätzliches 2-Phenylethanthiol (**112**, 2.6 μ L, 20 μ mol) und Triethylamin (2.7 μ L, 20 μ mol) zugegeben und 10 h lang weiter erhitzt. Anschließend wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und der Rückstand ohne Aufarbeitung säulenchromatographisch (SiO₂, Cyclohexan:Ethylacetat, 4:1) gereinigt. Das Produkt (10 mg, 15 μ mol, 83 %) wurde als rotes Öl erhalten.

$R_f = 0.29$ (SiO₂, Cyclohexan:Ethylacetat, 3:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 3310, 3064, 3029, 2957, 2870, 1741, 1673.1591, 1552, 1497, 1455, 1386, 1327, 1289, 1269$.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 8.09 (dd, $J = 7.8, 1.2$ Hz, 1 H, H^{5/8}), 7.95 (dd, $J = 7.7, 1.3$ Hz, 1 H, H^{5/8}), 7.70 (td, $J = 7.5, 1.5$ Hz, 1 H, H^{6/7}), 7.60 (td, $J = 7.5, 1.4$ Hz, 1 H, H^{6/7}), 7.37–7.12 (m, 12 H, H^{arom}), 7.14–7.04 (m, 3 H, H^{arom}), 6.82 (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H, NH^{Phe}),

9. | Experimenteller Teil

6.03 (d, $J = 8.2$ Hz, 1 H, NH^{Leu}), 5.27 (q, $J = 7.0$ Hz, 1 H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 5.08 (d, $J = 12.2$ Hz, 1 H, OCH_2^{Bn}), 5.07 (d, $J = 12.2$ Hz, 1 H, OCH_2^{Bn}), 4.69–4.59 (m, 1 H, $\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 3.16–3.00 (m, 4 H, SCH_2 , $\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 2.86–2.78 (m, 2 H, SCH_2CH_2), 1.65–1.39 (m, 3 H, $\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$, $\gamma\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 0.87 (d, $J = 2.6$ Hz, 3 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$), 0.85 (d, $J = 2.6$ Hz, 3 H, $\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$).

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (75 MHz, CDCl_3): $\delta/\text{ppm} = 180.9$ (C^1), 180.1 (C^4), 172.3 ($\text{C}=\text{O}^{\text{Leu}}$), 170.7 ($\text{C}=\text{O}^{\text{Phe}}$), 140.1, 135.9, 135.3, 134.6, 133.4, 132.4, 130.9, 129.6, 129.0, 128.7, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 127.5, 126.7, 126.6, 126.5, 112.2 (CSCH_2), 110.7, 67.2 (CH_2Ph), 59.8 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Phe}}$), 51.1 ($\alpha\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 41.7 ($\beta\text{-CH}_2^{\text{Leu}}$), 40.2 ($\beta\text{-CH}_2^{\text{Phe}}$), 36.4 (SCH_2CH_2), 35.6 (SCH_2CH_2), 24.9 ($\gamma\text{-CH}^{\text{Leu}}$), 22.8 ($\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$), 22.1 ($\delta\text{-CH}_3^{\text{Leu}}$).

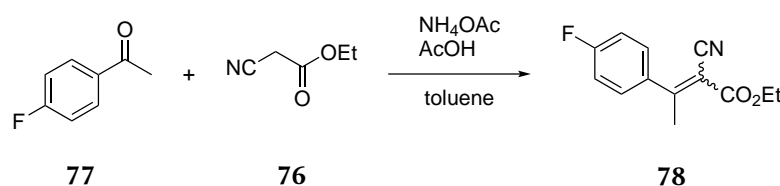
ESI-MS: $m/z = 661.5$ (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 683.3 (7 %, $[\text{M}+\text{Na}]^+$).

ESI-HRMS: ber. für $[\text{C}_{40}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}^+]$: $m/z=661.2731$, gef.: $m/z=661.2729$.

$[\alpha]_{\text{D}}^{26} = -80.0$ ($c=0.01$, CHCl_3).

9.2.2. Synthesen zu Teil II

Ethyl 2-cyano-3-(4-fluorphenyl)butanoat (78)



Gemäß der Vorschrift wurde 4'-Fluoracetophenon (77, 4.74 g, 34 mmol, 1 Äq.), Cyanessigsäureethylester (76, 5.17 g, 46 mmol, 1.35 Äq.), Ammoniumacetat (3.75 g, 49 mmol, 1.44 Äq.) und Essigsäure (2.77 g, 46 mmol, 1.35 Äq.) in Toluol (30 mL) unter Wasserabscheidung 22 h refluxiert.^[187] Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Reaktionsgemisch in Essigsäureethylester (130 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit Wasser (2x40 mL) und ges. Natriumchlorid-Lösung (2x40 mL) gewaschen und anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels blieben 7.67 g Rohprodukt, die neben den Ausgangsmaterialien sowohl das (*E*)- als auch das (*Z*)-Isomer, im Verhältnis von ca. 2:1 enthielten. Nach säulenchromatographischer Reinigung über Silicagel (Cyclohexan:Essigsäureethylester; 4:1) wurden 5.70 g Produktgemisch erhalten, die zu 80 % aus der Olefinmischung und zu 20 % aus dem Acetophenon bestanden. Das Öl wurde ohne Reingung weiter umgesetzt.

Ausbeute: 5.7 g farbloses Öl, (ca. 21 mmol, 62 %).

$R_f = 0.40$ (SiO_2 , Cyclohexan:Essigsäureethylester, 2:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 2985, 2225, 1726, 1601, 1508, 1228, 1162, 1047, 838.

Hauptprodukt:

$^1\text{H-NMR}$, COSY (300 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 7.52–7.41 (m, 2 H, H^2), 7.21–7.11 (m, 2 H, H^3), 4.34 (q, J = 7.1 Hz, 2 H, CH_2), 2.68 (s, 3 H, H^4), 1.38 (t, J = 7.1 Hz, 3 H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (151 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 171.3 (C^3), 163.9 (d, J = 251.1 Hz, C^4), 162.3 (C^1), 136.3 (d, J = 3.6 Hz, C^1), 129.6 (d, J = 8.9 Hz, $\text{C}^{2/6}$), 116.3 (-CN), 116.1 (d, J = 22.1 Hz, $\text{C}^{3/5}$), 105.4 (C^2), 62.3 (CH_2), 23.5 (C^4), 14.2 (CH_3).

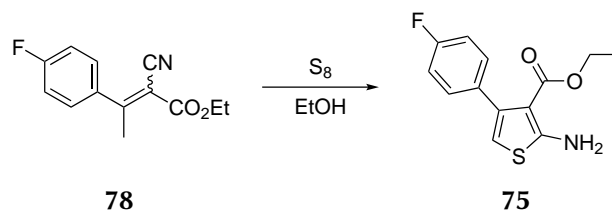
Nebenprodukt:

$^1\text{H-NMR}$, COSY (300 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 7.41–7.32 (m, 0.2 H, H^2), 7.21–7.11 (m, 2 H, H^3), 4.12 (q, J = 7.1 Hz, 0.3 H, CH_2), 2.53 (s, 0.5 H, H^4), 1.17 (t, J = 7.1 Hz, 0.5 H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (151 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 168.9 (C^3), 161.3 (d, J = 248.3 Hz, C^4), 161.4 (C^1), 134.8 (d, J = 3.5 Hz, C^1), 128.5 (d, J = 8.3 Hz, $\text{C}^{2/6}$), 115.6 (-CN), 115.6 (d, J = 22.1 Hz, $\text{C}^{3/5}$), 106.4 (C^2), 62.2 (CH_2), 27.1 (C^4), 13.9 (CH_3).

ESI-HRMS: ber. für $[\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{FNO}_2]^+$: m/z =234.0925, gef.: m/z =234.0925.

Ethyl 2-amino-4-(4-fluorphenyl)thiophen-3-carboxylat (75)



Das Edukt, Ethyl 2-cyano-3-(4-fluorphenyl)butanoat (4.00 g, 13.7 mmol, 1 Äq.), Schwefel (1.21 g, 37.7 mmol, 2.8 Äq.) und Morpholin (1.71 g, 19.7 mmol, 1.4 Äq.) wurden in Ethanol (42 mL) suspendiert und im geschlossenen Gefäß 15 h auf 90 °C erhitzt. Anschließend wurde die Mischung auf Raumtemperatur abgekühlt und filtriert. Der Filterkuchen wurde mit Ethanol gewaschen. Dann wurde das Lösemittel entfernt und das Öl in Ethylacetat (300 mL) aufgenommen. Die Lösung wurde mit 0.5 M HCl-Lösung, ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen (je 100 mL) und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels wurde das Produkt durch Säulenchromatographie (Cyclohexan:Essigsäureethylester, 9:1 auf 7:1) und anschließende Kristallisation aus η -Hexan erhalten.

Ausbeute: 2.80 g beige Kristalle, (10.6 mmol, 77 %).

R_f = 0.40 (SiO_2 , Cyclohexan:Essigsäureethylester, 2:1).

9. | Experimenteller Teil

IR (ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3428, 3310, 1637, 1584, 1498, 1475, 1268, 1217, 1134, 828, 786, 736.

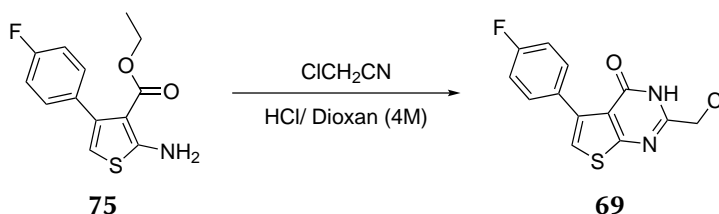
$^1\text{H-NMR}$, COSY (400 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 7.35–7.15 (m, 2 H, $\text{H}^{2'/6'}$), 7.11–6.89 (m, 2 H, $\text{H}^{3'/5'}$), 6.03 (s, 1 H, H^5), 6.2–5.7 (br s, 2 H, NH_2), 4.05 (q, J = 7.1 Hz, 2 H, CH_2), 0.97 (t, J = 7.1 Hz, 3 H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (101 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 165.7 ($\text{C}=\text{O}$), 164.1 (C^2), 162.1 (d, J = 245.2 Hz, C^4), 140.6 (C^4), 134.6 (d, J = 3.4 Hz, C^1), 130.6 (d, J = 7.9 Hz, C^2), 114.2 (d, J = 21.5 Hz, C^3), 106.1 (C^3), 105.7 (C^5), 59.7 (CH_2), 13.9 (CH_3).

ESI-MS: m/z = 220.2 (100 %, $[\text{M} - \text{OEt}]^+$), 266.1 (60 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 288.1 (4 %, $[\text{M}+\text{Na}]^+$).

ESI-HRMS: ber. für $[\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{FNO}_2\text{S}^+]$: m/z =266.0646, gef.: m/z =266.0648.

2-(Chlormethyl)-5-(4-fluorphenyl)thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-on (69)



Eine Lösung von HCl in Dioxan (4 M) wurde durch Hinzufügen von Methanol (8.5 mL, 0.21 mol) zu einer Lösung von Acetylchlorid (14.3 mL, 0.20 mol) in Dioxan (50 mL) unter starkem Rühren erhalten. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde, in Anlehnung an die Literatur, Ethyl-2-amino-4-(4-fluorphenyl)thiophen-3-carboxylat (**75**, 0.5 g, 1.89 mmol, 1 Äq.) zugegeben, gefolgt von der Zugabe von Chloracetonitril (6 mL, 95 mmol, 50 Äq.).^[188] Die bräunliche Lösung wurde 3.5 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde mit Wasser (100 mL) versetzt und drei mal mit Essigsäureethylester (je 75 mL) extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen wurden mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen (je 50 mL) und über Natriumsulfat getrocknet. Das Produkt **69** wurde durch Säulenchromatographie (Dichlormethan:Methanol 30:1) und anschließende Kristallisation aus Ethanol erhalten.²

Ausbeute: 323 mg farblose Kristalle, (1.10 mmol, 58 %).

R_f = 0.22 (SiO_2 , Cyclohexan:Essigsäureethylester, 2:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 2924, 2856, 1667, 1594, 1515, 1487, 1221, 1159, 1051, 833.

Smp.: 223.0 °C–224.5 °C

²Die aus der ethanolischen Lösung erhaltenen Kristalle wurden durch eine Röntgenstrukturanalyse untersucht (vgl. Abschnitt 9.2.2).

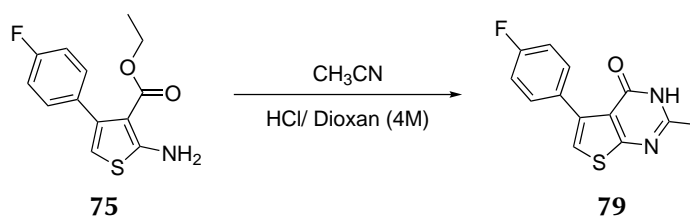
$^1\text{H-NMR}$, COSY (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ/ppm = 12.79 (s, 1 H, NH), 7.66–7.49 (m, 3 H, $\text{H}^{2'/6'}$), 7.28–7.16 (m, 2 H, $\text{H}^{3'/5'}$), 4.59 (s, 2 H, CH_2Cl).

$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ/ppm = 165.2 (C^{7a}), 161.8 (d, J = 244.2 Hz, C^4), 157.9 (C^4), 153.1 (C^2), 137.3 (C^5), 131.5 (C^1), 131.4 (d, J = 8.1 Hz, $\text{C}^{2'/6'}$), 121.8 (C^6), 119.9 (C^{4a}), 114.4 (d, J = 21.4 Hz, $\text{C}^{3'/5'}$), 42.5 (CH_2Cl).

ESI-MS: m/z = 295.1 (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 317.0 (21 %, $[\text{M}+\text{Na}]^+$).

ESI-HRMS: ber. für $[\text{C}_{13}\text{H}_9\text{ClFN}_2\text{OS}^+]$: $m/z=295.0103$, gef.: $m/z=295.0108$.

5-(4-Fluorphenyl)-2-methylthieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-on (79)



Produkt **79** wurde auf ähnliche Weise wie Substanz **69** hergestellt. Lediglich wurde das Edukt (**75**, 0.5 g, 1.89 mmol, 1 Äq.) gelöst in Acetonitril (5 mL, 95 mmol, 50 Äq.) zugegeben. Die erhaltene gelbe Lösung färbte sich nach 4 h unter Rückfluss violett. Das Lösemittel wurde entfernt und der Rückstand auf Kieselguhr aufgetragen. Das Produkt wurde nach Säulenchromatographie (Chloroform:Methanol 50:1) erhalten.

Ausbeute: 231 mg farblose Kristalle, (0.89 mmol, 47 %).

R_f = 0.16 (SiO_2 , Cyclohexan:Essigsäureethylester, 1:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 2860, 1668, 1597, 1489, 1241, 1212, 827, 785, 703.

Smp.: 293.0 °C–295.0 °C

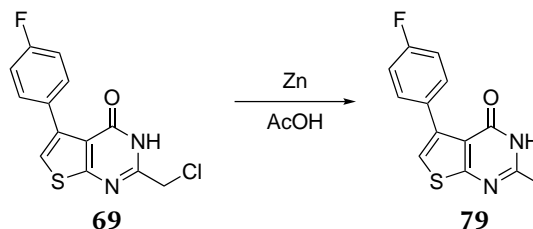
$^1\text{H-NMR}$, COSY (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ/ppm = 12.37 (s, 1 H, NH), 7.62–7.52 (m, 2 H, $2'/6'$ H), 7.41 (s, 1 H, 6 H), 7.26–7.14 (m, 2 H, $3'/5'$ H), 2.37 (s, 3 H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ/ppm = 166.3 (C^{7a}), 161.7 (d, J = 243.9 Hz, C^4), 158.2 (C^4), 155.5 (C^2), 137.1 (C^5), 131.7 (d, J = 3.2 Hz, C^1), 131.3 (d, J = 8.2 Hz, $\text{C}^{2'/6'}$), 119.7 (C^6), 118.5 (C^{4a}), 114.4 (d, J = 21.4 Hz, $\text{C}^{3'/5'}$), 20.8 (CH_3).

ESI-MS: m/z = 295.1 (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 317.0 (21 %, $[\text{M}+\text{Na}]^+$).

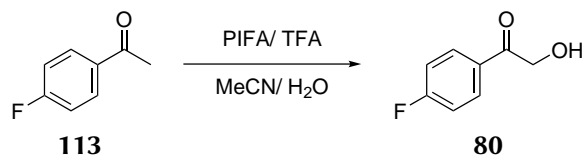
ESI-HRMS: ber. für $[\text{C}_{13}\text{H}_9\text{ClFN}_2\text{OS}^+]$: $m/z=295.0103$, gef.: $m/z=295.0108$.

5-(4-Fluorphenyl)-2-methylthieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-on (79)



Produkt **79** konnte innerhalb von 4 h auch über Dechlorierung von **69** (112 mg, 0.38 mmol) mit Hilfe von Zink (<10 μm , 31 μg , 0.47 μmol) in Essigsäure (0.5 mL) im Ultraschallbad erhalten werden. Nach der Reaktion wurde filtriert, mit Wasser und Essigsäureethylester (je 5 mL) gewaschen. Die Phasen wurden getrennt und die organische Phase mit 5 % Natriumhydrogencarbonat- und ges. Kochsalzlösung (je 5 mL) gewaschen. Das Produkt wurde nach Filtration über wenig Kieselgel (Essigsäureethylester:Cyclohexan; 2:1) als farbloser Feststoff erhalten (63 mg, 0.26 mmol, 68 %). Die analytischen Daten waren identisch mit denen des sauren Ringschlusses.

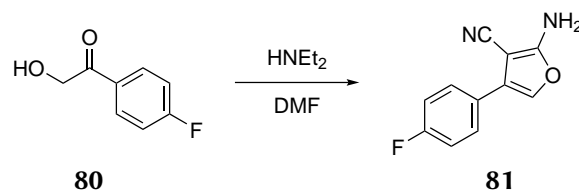
1-(4-Fluorphenyl)-2-hydroxyethan-1-on (80)



Das Produkt wurde in Anlehnung an Moriarty *et al.* synthetisiert.^[151] Zu einer Lösung von TFA (1.14 g, 10.0 mmol), Wasser (5 mL) und Acetonitril (25 mL) wurde das Acetophenon (**113**, 691 mg, 5.00 mmol) gegeben. Dann wurde PIFA (4.30 g, 10.0 mmol) hinzugefügt und 12 h refluxiert. Nach Abkühlen wurde ein Großteil des Lösemittels entfernt und es wurde Wasser (50 mL) hinzugegeben. Die wässrige Phase wurde drei Mal mit Dichlormethan (je 50 mL) extrahiert. Anschließend wurde die organische Phase mit ges. Kochsalzlösung (50 mL) gewaschen und getrocknet. Das Produkt (392 mg, 2.54 μmol , 51 %) wurde als amorpher Feststoff nach Säulenchromatographie (SiO_2 , Cyclohexan:Ethylacetat, 0 % auf 30 % Ethylacetat) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 8.02–7.89 (m, 2 H, H^{arom}), 7.24–7.14 (m, 2 H, H^{arom}), 4.85 (d, J = 4.5 Hz, 2 H, CH_2OH), 3.45 (t, J = 4.5 Hz, 1 H, CH_2OH).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376 MHz, CDCl_3): δ/ppm = -102.14 (tt, J = 8.1, 4.3 Hz).

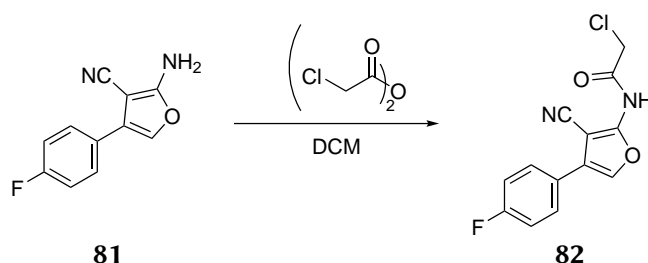
2-Amino-4-(4-fluorphenyl)furan-3-carbonitril (81)

Das Hydroxyketon (**80**, 392 mg, 2.54 mmol) und Malonodinitril (168 mg, 2.54 mmol) wurden in DMF (1.5 mL) gelöst und es wurde Diethylamin (93 mg, 1.27 mmol) zugegeben. Die Lösung verfärbte sich von braun-beige über rotbraun zu dunkelrot und wurde fast schwarz. Nach 1.5 h wurde das Lösemittel im Stickstoffstrom entfernt. Das Rohprodukt (376 mg) wurde nach Säulenchromatographie (SiO₂, Cyclohexan:Ethylacetat, 9:1 auf 1:9) erhalten. Durch Umkristallisation aus n-Hexan und wenig Ethylacetat bei 60 °C wurden bei -20 °C leicht beige Kristalle (209 mg, 1.03 μmol, 41 %) erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 7.58–7.46 (m, 2 H, H^{arom}), 7.15–7.04 (m, 2 H, H^{arom}), 6.96 (s, 1 H, H⁵), 4.90 (s, 2 H, NH₂).

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃): δ/ppm = -114.50 (m).

ESI-MS: *m/z* = 203.7 (100 %, [M+H]⁺).

2-Chlor-N-(3-cyano-4-(4-fluorphenyl)furan-2-yl)acetamid (82)

Das Edukt (**81**, 100 mg, 0.49 mmol) wurde in 0.5 mL Dichlormethan bei 0 °C vorgelegt. Unter Stickstoffatmosphäre wurde Chloressigsäureanhydrid (90 mg, 0.53 mmol) gelöst in Dichlormethan (0.5 mL) zugetropft. Es wurde 1 h bei 0 °C gerührt und anschließend 5 h bei Raumtemperatur. Es wurde mit 0.5 M Natriumhydrogencarbonatlösung (1 mL) 5 min gerührt. Anschließend wurde die wässrige Phase drei Mal mit Dichlormethan (3 mL) extrahiert und die organische Phase mit ges. Natriumchloridlösung (3 mL) gewaschen. Das Produkt wurde nach Säulenchromatographie (SiO₂, Chloroform:Methanol, 25:1) als farbloser Feststoff (57 mg, 0.21 μmol, 88 %) erhalten.

R_f = 0.46 (SiO₂, Chloroform:Methanol, 20:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3274, 3196, 3154, 3082, 2226, 1719, 1635, 1514, 1443, 1407, 1165, 838, 505.

9. | Experimenteller Teil

$^1\text{H-NMR}$, COSY (400 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 8.68 (s, 1 H, NH), 7.63–7.49 (m, 2 H, H^{arom}), 7.40 (s, 1 H, H^5), 7.17–7.11 (m, 2 H, H^{arom}), 4.29 (s, 2 H, CH_2Cl).

$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (101 MHz, CDCl_3): δ/ppm = 163.5 (s, C=O), 163.1 (d, J = 249.0 Hz, CF), 150.4 (s, C^2), 134.6 (s, C^5), 128.9 (d, J = 8.4 Hz, $\text{C}^{2'6'}$), 127.2 (s, C^4), 125.0 (d, J = 3.6 Hz, $\text{C}^{1'}$), 116.4 (d, J = 22.0 Hz, $\text{C}^{3'5'}$), 112.4 (s, -CN), 87.5 (s, C^3), 42.4 (s, CH_2Cl).

ESI-MS: m/z = 279.1 (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 301.0 (82 %, $[\text{M}+\text{Na}]^+$).

ESI-HRMS: ber. für $[\text{C}_{13}\text{H}_8\text{ClFN}_2\text{O}_2\text{Na}^+]$: $m/z=301.0151$, gef.: $m/z=301.0150$.

10. Literatur

- [1] M. Florkin, T. Schwann, *Rev. Med. Liege* **1957**, *12*, 139–144.
- [2] W.-D. Müller-Jahncke, C. Friedrich, U. Meyer, *Arzneimittelgeschichte, Bd. 2, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, Stuttgart, 2005*.
- [3] R. Sharony, P.-J. Yu, J. Park, A. C. Galloway, P. Mignatti, G. Pintucci, *J. Inflamm.* **2010**, *7*, 45.
- [4] K. C. Park, M. Dharmasivam, D. R. Richardson, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*.
- [5] F. Lucena, J. J. McDougall, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*.
- [6] H. Cai, R. Kuang, J. Gu, Y. Wang, *Curr. Genomics* **2011**, *12*, 417–427.
- [7] B. Millies, F. von Hammerstein, A. Gellert, S. Hammerschmidt, F. Barthels, U. Göppel, M. Immerheiser, F. Elgner, N. Jung, M. Basic, C. Kersten, W. Kiefer, J. Bodem, E. Hildt, M. Windbergs, U. A. Hellmich, T. Schirmeister, *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 11359–11382.
- [8] S. Scharpe, I. De Meester, D. Hendriks, G. Vanhoof, M. van Sande, G. Vriend, *Biochimie* **1991**, *73*, 121–126.
- [9] J. Hammond, H. Leister-Tebbe, A. Gardner, P. Abreu, W. Bao, W. Wisemandle, M. Baniecki, V. M. Hendrick, B. Damle, A. Simón-Campos, R. Pypstra, J. M. Rusnak, *N. Engl. J. Med.* **2022**, *386*, 1397–1408.
- [10] W. G. J. Hol, P. T. van Duijnen, H. J. C. Berendsen, *Nature* **1978**, *273*, 443–446.
- [11] J. A. Osato, L. A. Santiago, G. M. Remo, M. S. Cuadra, A. Mori, *Life Sci.* **1993**, *53*, 1383–1389.
- [12] M. M. Mohamed, B. F. Sloane, *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 764–775.
- [13] O. C. Olson, J. A. Joyce, *Nat. Rev. Cancer* **2015**, *15*, 712–729.
- [14] C. R. Caffrey, E. Hansell, K. D. Lucas, L. S. Brinen, A. Alvarez Hernandez, J. Cheng, S. L. Gwaltney, W. R. Roush, Y.-D. Stierhof, M. Bogyo, D. Steverding, J. H. McKerrow, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2001**, *118*, 61–73.
- [15] H. Neurath, R. Zwilling in *Semper Apertus. Sechshundert Jahre Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 1386–1986*, (Hrsg.: W. Doerr, P. A. Riedl), Springer, Berlin, Heidelberg, **1985**, S. 915–928.
- [16] C. M. Wells, E. Di Cera, *Biochemistry* **1992**, *31*, 11721–11730.

10. Literatur

- [17] C. Montecucco, J. Molgó, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2005**, *5*, 274–279.
- [18] A. G. McDonald, S. Boyce, K. F. Tipton, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *37*, D593–D597.
- [19] N. D. Rawlings, M. Waller, A. J. Barrett, A. Bateman, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *42*, D503–D509.
- [20] MEROPS database, <http://merops.sanger.ac.uk/> (besucht am 23. 04. 2021).
- [21] M. Bergmann, J. S. Fruton, *Science* **1936**, *84*, 89–90.
- [22] M. Bergmann, J. S. Fruton, H. Fraenkel-Conrat, *J. Biol. Chem.* **1937**, *119*, 35–46.
- [23] A. M. Cataldo, R. A. Nixon, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1990**, *87*, 3861–3865.
- [24] B. F. Sloane, K. Moin, E. Krepela, J. Rozhin, *Cancer Metastasis Rev.* **1990**, *9*, 333–352.
- [25] Y. Yasuda, J. Kaleta, D. Brömme, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, *57*, 973–993.
- [26] L. G. Ferreira, A. D. Andricopulo, *Pharmacol. Ther.* **2017**, *180*, 49–61.
- [27] R. Ettari, S. Previti, L. Tamborini, G. Cullia, S. Grasso, M. Zappalà, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2016**, *16*, 1374–1391.
- [28] J. R. Coura, P. A. Viñas, *Nature* **2010**, *465*, S6–S7.
- [29] E. Myburgh, G. H. Coombs, J. C. Mottram in *Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition)*, (Hrsg.: N. D. Rawlings, G. Salvesen), Academic Press, **2013**, S. 1923–1928.
- [30] P. J. Rosenthal in *Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition)*, (Hrsg.: N. D. Rawlings, G. Salvesen), Academic Press, **2013**, S. 1907–1912.
- [31] D. Musil, D. Zucic, D. Turk, R. A. Engh, I. Mayr, R. Huber, T. Popovic, V. Turk, T. Towatari, N. Katunuma, *EMBO J.* **1991**, *10*, 2321–2330.
- [32] K. M. Karrer, S. L. Peiffer, M. E. DiTomas, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90*, 3063–3067.
- [33] Schrödinger, LLC, „The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5.2“, **2021**.
- [34] B. Wiederanders in *Cellular Peptidases in Immune Functions and Diseases 2*, (Hrsg.: J. Langner, S. Ansorge), Springer US, Boston, MA, **2002**, S. 261–270.
- [35] K. Schilling, S. Pietschmann, M. Fehn, I. Wenz, B. Wiederanders, *Biol. Chem.* **2001**, *382*, 859–866.
- [36] K. Nissler, S. Kreuzsch, W. Rommerskirch, W. Strubel, E. Weber, B. Wiederanders, *Biol. Chem.* **1998**, *379*, 219–224.
- [37] R. L. Chapman, S. E. Kane, A. H. Erickson, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 8808–8816.
- [38] J. Guay, J.-P. Falgueyret, A. Ducret, M. D. Percival, J. A. Mancini, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 6311–6318.
- [39] F. C. G. Reis, T. F. R. Costa, T. Sulea, A. Mezzetti, J. Scharfstein, D. Brömme, R. Ménard, A. P. C. A. Lima, *FEBS J.* **2007**, *274*, 1224–1234.

- [40] M. E. McGrath, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1999**, *28*, 181–204.
- [41] M. Mladenovic, R. F. Fink, W. Thiel, T. Schirmeister, B. Engels, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8696–8705.
- [42] D. Wei, X. Huang, J. Liu, M. Tang, C.-G. Zhan, *Biochemistry* **2013**, *52*, 5145–5154.
- [43] X. S. Puente, L. M. Sánchez, C. M. Overall, C. López-Otín, *Nat. Rev. Genet.* **2003**, *4*, 544–558.
- [44] V. Quesada, G. R. Ordóñez, L. M. Sánchez, X. S. Puente, C. López-Otín, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *37*, D239–D243.
- [45] C. Nitsche, *Biophys. Rev.* **2019**, *11*, 157–165.
- [46] B. Turk, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 785–799.
- [47] K. Ratia, S. Pegan, J. Takayama, K. Sleeman, M. Coughlin, S. Baliji, R. Chaudhuri, W. Fu, B. S. Prabhakar, M. E. Johnson, S. C. Baker, A. K. Ghosh, A. D. Mesecar, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 16119–16124.
- [48] R. L. Thurmond, M. P. Beavers, H. Cai, S. P. Meduna, D. J. Gustin, S. Sun, H. J. Almond, L. Karlsson, J. P. Edwards, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4799–4801.
- [49] I. Schechter, A. Berger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, *27*, 157–162.
- [50] Nomenklatur nach Schechter und Berger, <https://prosper.erc.monash.edu.au/nomenclature.png> (besucht am 20. 10. 2021).
- [51] D. W. Nicholson, *Nature* **2000**, *407*, 810–816.
- [52] U. Bacha, J. Barrila, S. B. Gabelli, Y. Kiso, L. Mario Amzel, E. Freire, *Chem. Biol. Drug Des.* **2008**, *72*, 34–49.
- [53] R. Leary, D. Larsen, H. Watanabe, E. Shaw, *Biochemistry* **1977**, *16*, 5857–5861.
- [54] J. M. Buchanan in *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* John Wiley & Sons, Ltd, **1973**, S. 91–183.
- [55] S. Scory, C. R. Caffrey, Y.-D. Stierhof, A. Ruppel, D. Steverding, *Exp. Parasitol.* **1999**, *91*, 327–333.
- [56] J. L. Ambroso, C. Harris, *Teratology* **1994**, *50*, 214–228.
- [57] K. Hanada, M. Tamai, M. Yamagishi, S. Ohmura, J. Sawada, I. Tanaka, *Agric. Biol. Chem.* **1978**, *42*, 523–528.
- [58] E. Murray, M. Grisanti, G. Bentley, S. Murray, *Metabolism.* **1997**, *46*, 1090–1094.
- [59] E. Satoyoshi, *Intern. Med.* **1992**, *31*, 841–846.
- [60] T. Schirmeister, A. Klockow, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 585–596.
- [61] T. Schirmeister, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 560–572.

10. Literatur

- [62] H. Naganawa, N. Usui, T. Takita, M. Hamada, H. Umezawa, *J. Antibiot.* **1975**, *28*, 828–829.
- [63] Y. Nakao, M. Fujita, K. Warabi, S. Matsunaga, N. Fusetani, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10462–10463.
- [64] C. Schad, U. Baum, B. Frank, U. Dietzel, F. Mattern, C. Gomes, A. Ponte-Sucre, H. Moll, U. Schurig, T. Schirmeister, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60*, 797–805.
- [65] A. J. Barrett, A. A. Kembhavi, M. A. Brown, H. Kirschke, C. G. Knight, M. Tamai, K. Hanada, *Biochem. J.* **1982**, *201*, 189–198.
- [66] S. Jung, N. Fuchs, P. Johe, A. Wagner, E. Diehl, T. Yuliani, C. Zimmer, F. Barthels, R. Zimmermann, P. Klein, W. Waigel, J. Meyr, T. Opatz, S. Tenzer, U. Distler, H. J. Räder, C. Kersten, B. Engels, U. Hellmich, J. Klein, T. Schirmeister, *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 12322–12358.
- [67] W. Frommer, B. Junge, L. Müller, D. Schmidt, E. Truscheit, *Planta Med.* **2009**, *35*, 195–217.
- [68] J. O. Westerik, R. Wolfenden, *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 8195–8197.
- [69] V. Ehmke, J. E. Q. Quinsa, P. Rivera-Fuentes, C. Heindl, C. Freymond, M. Rottmann, R. Brun, T. Schirmeister, F. Diederich, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 5764–5768.
- [70] M. R. Yadav, A. K. Shinde, B. S. Chouhan, R. Giridhar, R. Menard, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2008**, *23*, 190–197.
- [71] N. Asaad, P. A. Bethel, M. D. Coulson, J. E. Dawson, S. J. Ford, S. Gerhardt, M. Grist, G. A. Hamlin, M. J. James, E. V. Jones, G. I. Karoutchi, P. W. Kenny, A. D. Morley, K. Oldham, N. Rankine, D. Ryan, S. L. Wells, L. Wood, M. Augustin, S. Krapp, H. Simader, S. Steinbacher, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 4280–4283.
- [72] Z. Tber, M. Wartenberg, J.-E. Jacques, V. Roy, F. Lecaille, D. Warszycki, A. J. Bojarski, G. Lalmanach, L. A. Agrofoglio, *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 4310–4319.
- [73] J. Y. Gauthier, N. Chauret, W. Cromlish, S. Desmarais, L. T. Duong, J.-P. Falgueyret, D. B. Kimmel, S. Lamontagne, S. Léger, T. LeRiche, C. S. Li, F. Massé, D. J. McKay, D. A. Nicoll-Griffith, R. M. Oballa, J. T. Palmer, M. D. Percival, D. Riendeau, J. Robichaud, G. A. Rodan, S. B. Rodan, C. Seto, M. Thérien, V.-L. Truong, M. C. Venuti, G. Wesolowski, R. N. Young, R. Zamboni, W. C. Black, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 923–928.
- [74] X. Du, C. Guo, E. Hansell, P. S. Doyle, C. R. Caffrey, T. P. Holler, J. H. McKerrow, F. E. Cohen, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2695–2707.
- [75] J. Schröder, S. Noack, R. J. Marhöfer, J. C. Mottram, G. H. Coombs, P. M. Selzer, *PLOS One* **2013**, *8*, e77460.
- [76] K. K. Adkison, D. G. Barrett, D. N. Deaton, R. T. Gampe, A. M. Hassell, S. T. Long, R. B. McFadyen, A. B. Miller, L. R. Miller, J. A. Payne, L. M. Shewchuk, K. J. Wells-Knecht, D. H. Willard, L. L. Wright, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 978–983.

- [77] Z. Li, G. S. Patil, Z. E. Golubski, H. Hori, K. Tehrani, J. Foreman, D. D. Eveleth, R. T. Bartus, J. C. Powers, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3472–3480.
- [78] A. D. Cox, S. W. Fesik, A. C. Kimmelman, J. Luo, C. J. Der, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 828–851.
- [79] R. A. Bauer, *Drug Discov. Today* **2015**, *20*, 1061–1073.
- [80] J. Singh, R. C. Petter, T. A. Baillie, A. Whitty, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 307–317.
- [81] C. Lammert, S. Einarsson, C. Saha, A. Niklasson, E. Bjornsson, N. Chalasani, *Hepatology* **2008**, *47*, 2003–2009.
- [82] C.-U. Lee, T. N. Grossmann, *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2012**, *51*, 8699–8700.
- [83] T. A. Baillie, *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2016**, *55*, 13408–13421.
- [84] B. R. Lanning, L. R. Whitby, M. M. Dix, J. Douhan, A. M. Gilbert, E. C. Hett, T. O. Johnson, C. Joslyn, J. C. Kath, S. Niessen, L. R. Roberts, M. E. Schnute, C. Wang, J. J. Hulce, B. Wei, L. O. Whiteley, M. M. Hayward, B. F. Cravatt, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 760–767.
- [85] C. Lammert, S. Einarsson, C. Saha, A. Niklasson, E. Bjornsson, N. Chalasani, *Hepatology* **2008**, *47*, 2003–2009.
- [86] D. C. Evans, A. P. Watt, D. A. Nicoll-Griffith, T. A. Baillie, *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 3–16.
- [87] S. Kumar, K. Kassahun, R. A. Tschirret-Guth, K. Mitra, T. A. Baillie, *Curr. opin. drug discov. dev.* **2008**, *11*, 43–52.
- [88] F. Gug, N. Oumata, D. Tribouillard-Tanvier, C. Voisset, N. Desban, S. Bach, M. Blondel, H. Galons, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 279–288.
- [89] H. Dückert, V. Pries, V. Khedkar, S. Menninger, H. Bruss, A. W. Bird, Z. Maliga, A. Brockmeyer, P. Janning, A. Hyman, S. Grimme, M. Schürmann, H. Preut, K. Hübel, S. Ziegler, K. Kumar, H. Waldmann, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 179–184.
- [90] I. A. Osterman, A. V. Ustinov, D. V. Evdokimov, V. A. Korshun, P. V. Sergiev, M. V. Serebryakova, I. A. Demina, M. A. Galyamina, V. M. Govorun, O. A. Dontsova, *PROTEOMICS* **2013**, *13*, 17–21.
- [91] U. Rix, G. Superti-Furga, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 616–624.
- [92] U. Schurig in *Innovative Rheumatology*, (Hrsg.: H. Matsuno), IntechOpen, Rijeka, **2013**, Kap. 13.
- [93] K. McCulloch, S. McGrath, C. Huesa, L. Dunning, G. Litherland, A. Crilly, L. Hultin, W. R. Ferrell, J. C. Lockhart, C. S. Goodyear, *Front. Endocrinol.* **2018**, *9*.
- [94] D. Brömme, F. Lecaille, *Expert Opin. Invest. Drugs* **2009**, *18*, 585–600.
- [95] P. Klein, Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2015**.

10. Literatur

- [96] L. M. Leesnitzer, D. J. Parks, R. K. Bledsoe, J. E. Cobb, J. L. Collins, T. G. Consler, R. G. Davis, E. A. Hull-Ryde, J. M. Lenhard, L. Patel, K. D. Plunket, J. L. Shenk, J. B. Stimmel, C. Therapontos, T. M. Willson, S. G. Blanchard, *Biochemistry* **2002**, *41*, 6640–6650.
- [97] M. Gehringer, S. A. Laufer, *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 5673–5724.
- [98] A. M. Spokoyny, Y. Zou, J. J. Ling, H. Yu, Y.-S. Lin, B. L. Pentelute, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5946–5949.
- [99] R. E. Dolle, D. Hoyer, J. M. Rinker, T. M. Ross, S. J. Schmidt, C. T. Helaszek, M. A. Ator, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1003–1006.
- [100] U. Machon, C. Büchold, M. Stempka, T. Schirmeister, C. Gelhaus, M. Leippe, J. Gut, P. J. Rosenthal, C. Kisker, M. Leyh, C. Schmuck, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5662–5672.
- [101] A. Breuning, B. Degel, F. Schulz, C. Büchold, M. Stempka, U. Machon, S. Heppner, C. Gelhaus, M. Leippe, M. Leyh, C. Kisker, J. Rath, A. Stich, J. Gut, P. J. Rosenthal, C. Schmuck, T. Schirmeister, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1951–1963.
- [102] R. Vicik, M. Busemann, C. Gelhaus, N. Stiefl, J. Scheiber, W. Schmitz, F. Schulz, M. Mladenovic, B. Engels, M. Leippe, K. Baumann, T. Schirmeister, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1126–1141.
- [103] N. Grimblat, M. M. Zanardi, A. M. Sarotti, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 12526–12534.
- [104] R. Vicik, V. Hoerr, M. Glaser, M. Schultheis, E. Hansell, J. H. McKerrow, U. Holzgrabe, C. R. Caffrey, A. Ponte-Sucré, H. Moll, A. Stich, T. Schirmeister, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2753–2757.
- [105] P. Klein, P. Johe, A. Wagner, S. Jung, J. Kühnborn, F. Barthels, S. Tenzer, U. Distler, W. Waigel, B. Engels, U. A. Hellmich, T. Opatz, T. Schirmeister, *Molecules* **2020**, *25*.
- [106] S. Grimme, *The Journal of Chemical Physics* **2003**, *118*, 9095–9102.
- [107] M. J. Frisch, J. A. Pople, J. S. Binkley, *J. Chem. Phys.* **1984**, *80*, 3265–3269.
- [108] J. Tomasi, B. Mennucci, E. Cancès, *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **1999**, *464*, 211–226.
- [109] J.-D. Chai, M. Head-Gordon, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 6615–6620.
- [110] G. M. Neelgund, M. L. Budni, *Monatsh. Chem* **2004**, *135*, 1395–1407.
- [111] A. A. Aly, A. A. Hassan, K. M. El-Shaieb, R. M. Shaker, *Z. Naturforsch. B: Chem. Sci.* **2005**, *60*, 999–1005.
- [112] A. A. Aly, A. M. NourEl-Din, M. A.-M. Gomaa, M. S. Fahmi, *Z. Naturforsch. B: Chem. Sci.* **2008**, *63*, 223–228.
- [113] A. R. Katritzky, W.-Q. Fan, Q.-L. Li, S. Bayyuk, *J. Heterocycl. Chem.* **1989**, *26*, 885–892.
- [114] P. Klein, F. Barthels, P. Johe, A. Wagner, S. Tenzer, U. Distler, T. A. Le, P. Schmid, V. Engel, B. Engels, U. A. Hellmich, T. Opatz, T. Schirmeister, *Molecules* **2020**, *25*.

- [115] L. N. Goswami, Z. H. Houston, S. J. Sarma, S. S. Jalisatgi, M. F. Hawthorne, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 1116–1126.
- [116] M. D. P. Risseeuw, D. J. H. De Clercq, S. Lievens, U. Hillaert, D. Sinnaeve, F. Van den Broeck, J. C. Martins, J. Tavernier, S. Van Calenbergh, *ChemMedChem* **2013**, *8*, 521–526.
- [117] N. M. Green, *Biochem. J.* **1963**, *89*, 599–609.
- [118] J. Hoffmann, U. Kazmaier, *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2014**, *53*, 11356–11360.
- [119] A. Eisenführ, P. S. Arora, G. Sengle, L. R. Takaoka, J. S. Nowick, M. Famulok, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 235–249.
- [120] Y.-D. Zhuang, P.-Y. Chiang, C.-W. Wang, K.-T. Tan, *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2013**, *52*, 8124–8128.
- [121] D. Steverding, *Parasites Vectors* **2008**, *1*, 3.
- [122] F. A. Kuzoe, *Acta Trop.* **1993**, *54*, 153–162.
- [123] T. Ochsenreiter, Trypanosoma brucei brucei (TREU667) bloodstream form cell, Phase contrast picture, black bar is 10 µm., **2005**, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tb_brucei.jpg (besucht am 29. 07. 2021).
- [124] J. Gallagher, Tsetse Fly - Glossina species, Gorongosa National Park, Mozambique, Lizenziert unter CC-BY-2.0, **2018**, [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tsetse_Fly_-_Glossina_species,_Gorongosa_National_Park,_Mozambique_\(42453576002\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tsetse_Fly_-_Glossina_species,_Gorongosa_National_Park,_Mozambique_(42453576002).jpg) (besucht am 29. 07. 2021).
- [125] P. Büscher, G. Cecchi, V. Jamonneau, G. Priotto, *Lancet* **2017**, *390*, 2397–2409.
- [126] W. H. Organization, Trypanosomiasis, human African (sleeping sickness), **2021**, [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness)) (besucht am 04. 08. 2021).
- [127] J. R. Franco, G. Cecchi, G. Priotto, M. Paone, A. Diarra, L. Grout, P. P. Simarro, W. Zhao, D. Argaw, *PLOS Negl. Trop. Dis.* **2020**, *14*, 1–18.
- [128] W. H. Organization, Sustained decline in sleeping sickness cases puts elimination within reach, **2020**, <https://www.who.int/news/item/23-06-2020-sustained-decline-in-sleeping-sickness-cases-puts-elimination-within-reach> (besucht am 04. 08. 2021).
- [129] N. authors listed, *Lancet* **2009**, *373*, 1820.
- [130] M. Duszenko, *Biol. unserer Zeit* **1984**, *2*, 33–41.
- [131] N. A. Dyer, C. Rose, N. O. Ejeh, A. Acosta-Serrano, *Trends Parasitol.* **2013**, *29*, 188–196.
- [132] DPDx, African Trypanosomiasis life cycle, **2019**, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Trypanosoma_African_life_cycle_CDC.jpg (besucht am 29. 07. 2021).

10. Literatur

- [133] R. Brun, J. Blum, F. Chappuis, C. Burri, *Lancet* **2010**, *375*, 148–159.
- [134] D. M. G. Schultz, Blood smear from patient with African trypanosomiasis. *Parasite*. **1970**, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Trypanosoma_sp._PHIL_613_lores.jpg (besucht am 29.07.2021).
- [135] U. C. for Disease Control, Prevention, Two areas from a blood smear from a patient with African trypanosomiasis (sleeping sickness). Thin blood smear stained with Giemsa. **2006**, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Afric_tryp_1a_DPDxi.jpg (besucht am 29.07.2021).
- [136] P. G. E. Kennedy, J. Rodgers, *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 39.
- [137] M. Wéry, *Int. J. Antimicrob. Agents* **1994**, *4*, 227–238.
- [138] A. J. Nok, *Parasitol. Res.* **2003**, *90*, 71–79.
- [139] A. H. Fairlamb, *Trends Parasitol.* **2003**, *19*, 488–494.
- [140] P. Babokhov, A. O. Sanyaolu, W. A. Oyibo, A. F. Fagbenro-Beyioku, N. C. Iriemenam, *Pathog. Glob. Health* **2013**, *107*, 242–252.
- [141] Hbf878, The Trypanothione peroxidase system in Trypanosomes. **2019**, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:TryP_cycle.svg (besucht am 29.07.2021).
- [142] K. Diederich, R. L. Krauth-Siegel, *BIOspektrum* **2016**, *22*, 344–347.
- [143] Z. González-Chávez, C. Vázquez, R. Moreno-Sánchez, E. Saavedra in *Trypanosomatids: Methods and Protocols*, (Hrsg.: P. A. M. Michels, M. L. Ginger, D. Zilberstein), Springer US, New York, NY, **2020**, S. 689–718.
- [144] A. E. Leroux, R. L. Krauth-Siegel, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2016**, *206*, 67–74.
- [145] F. Fueller, B. Jehle, K. Putzker, J. D. Lewis, R. L. Krauth-Siegel, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 8792–8802.
- [146] P. Jimonet, Y. Ribeill, G. A. Bohme, A. Boireau, M. Chevé, D. Damour, A. Doble, A. Genevois-Borella, F. Herman, A. Imperato, S. Le Guern, F. Manfré, J. Pratt, J. C. R. Randle, J.-M. Stutzmann, S. Mignani, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2371–2381.
- [147] V. M. Tormyshev, D. V. Trukhin, O. Y. Rogozhnikova, T. V. Mikhalina, T. I. Troitskaya, A. Flinn, *Synlett* **2006**, 2559–2564.
- [148] M. Preuss, Masterarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2019**.
- [149] C. Shishoo, M. Devani, V. Bhadti, K. Jain, I. Rathod, R. Goyal, T. Gandhi, R. Patel, S. Naik, *Arzneimittelforschung.* **1990**, *40*, 567–572.
- [150] L. Tan, Z. Zhang, D. Gao, J. Luo, Z.-C. Tu, Z. Li, L. Peng, X. Ren, K. Ding, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 6807–6825.

- [151] R. M. Moriarty, B. A. Berglund, R. Penmasta, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 6065–6068.
- [152] D. Dauzonne, A. Adam-Launay, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 3069–3080.
- [153] K. M. Aumann, P. J. Scammells, J. M. White, C. H. Schiesser, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1276–1281.
- [154] G. Revelant, S. Dunand, S. Hesse, G. Kirsch, *Synthesis* **2011**, *2011*, 2935–2940.
- [155] J. Šibor, P. Pazdera, *Molecules* **1996**, *1*, 157–162.
- [156] P. Seck, D. Thomae, E. Perspicace, S. Hesse, G. Kirsch, *ARKIVOC* **2012**, *2012*, 431–441.
- [157] S. H. Abdel-Hafez, *Russ. J. Org. Chem.* **2005**, *41*, 396–401.
- [158] V. P. Litvinov, Y. A. Sharanin, F. S. Babichev, *Sulfur Reports* **1986**, *6*, 97–128.
- [159] A. Wagner, T. A. Le, M. Brennich, P. Klein, N. Bader, E. Diehl, D. Paszek, A. K. Weickhmann, N. Dirdjaja, R. L. Krauth-Siegel, B. Engels, T. Opatz, H. Schindelin, U. A. Hellmich, *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2019**, *58*, 3640–3644.
- [160] J. C. B. Dietschreit, A. Wagner, T. A. Le, P. Klein, H. Schindelin, T. Opatz, B. Engels, U. A. Hellmich, C. Ochsenfeld, *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2020**, *59*, 12669–12673.
- [161] B. Latli, P.-J. Jones, D. Krishnamurthy, C. H. Senanayake, *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2008**, *51*, 54–58.
- [162] *Maßanalyse*, De Gruyter, Berlin, Boston, **2012**.
- [163] V. Theodorou, M. Gogou, A. Giannousi, K. Skobridis, *ARKIVOC* **2013**, *2014*, 11–23.
- [164] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512–7515.
- [165] G. Lippke, H. Thaler, *Starch/Stärke* **1970**, *22*, 344–351.
- [166] Wavefunction, Inc., *Spartan*, Version 0.9, **2009**.
- [167] J. J. P. Stewart, *J. Mol. Model.* **2007**, *13*, 1173–1213.
- [168] T. A. Halgren, *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 490–519.
- [169] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. V. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma,

10. Literatur

- O. Farkas, J. B. Foresman, D. J. Fox, Gaussian 16 Revision A.03, Gaussian Inc. Wallingford CT, **2016**.
- [170] A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5652.
- [171] C. Lee, W. Yang, R. G. Parr, *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785–789.
- [172] S. H. Vosko, L. Wilk, M. Nusair, *Can. J. Phys.* **1980**, *58*, 1200–1211.
- [173] P. J. Stephens, F. J. Devlin, C. F. Chabalowski, M. J. Frisch, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 11623–11627.
- [174] W. J. Hehre, R. Ditchfield, J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **1972**, *56*, 2257–2261.
- [175] P. C. Hariharan, J. A. Pople, *Theor. Chim. Acta* **1973**, *28*, 213–222.
- [176] M. M. Francl, W. J. Pietro, W. J. Hehre, J. S. Binkley, M. S. Gordon, D. J. DeFrees, J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **1982**, *77*, 3654–3665.
- [177] O. A. Vydrov, J. Heyd, A. V. Krukau, G. E. Scuseria, *J. Chem. Phys.* **2006**, *125*, 074106.
- [178] O. A. Vydrov, G. E. Scuseria, *J. Chem. Phys.* **2006**, *125*, 234109.
- [179] O. A. Vydrov, G. E. Scuseria, J. P. Perdew, *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 154109.
- [180] C. Adamo, V. Barone, *J. Chem. Phys.* **1998**, *108*, 664–675.
- [181] T. Clark, J. Chandrasekhar, G. W. Spitznagel, P. V. R. Schleyer, *J. Comput. Chem.* **1983**, *4*, 294–301.
- [182] B. Mennucci, R. Cammi, *Continuum solvation models in chemical physics: from theory to applications*, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.
- [183] B. Mennucci, E. Cancès, J. Tomasi, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 10506–10517.
- [184] K. Clausen, M. Thorsen, S.-O. Lawesson, A. F. Spatola, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1984**, 785–798.
- [185] G. Han, M. Tamaki, V. Hruby, *J. Peptide Res.* **2001**, *58*, 338–341.
- [186] V. Porte, M. Thioly, T. Pigoux, T.-X. Métro, J. Martinez, F. Lamaty, *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, *2016*, 3505–3508.
- [187] A. R. Longstreet, D. Rivalenti, D. T. McQuade, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 8583–8596.
- [188] T. J. Fyfe, B. Zarzycka, H. D. Lim, B. Kellam, S. N. Mistry, V. Katrich, P. J. Scammells, J. R. Lane, B. Capuano, *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 174–206.

Anhang

Anhang

Anhang A - Kristallstrukturanalysen

Dieser Abschnitt enthält Daten zu Kristallstrukturen, die während der Arbeit gemessen wurden. Es wird die asymmetrische Einheit als ORTEP-Darstellung gezeigt, sowie die wichtigen Daten zur Strukturbestimmung und die Endkoordinaten und Auslenkungsparameter.

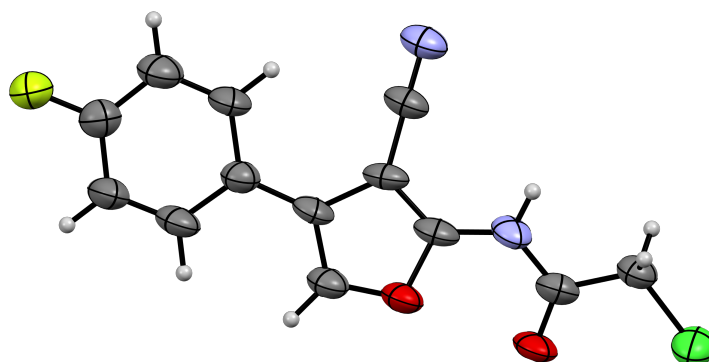


Abbildung 10.1.: Asymmetrische Einheit von **82** bei 193 K (ORTEP Ellipsoide mit 30 % Wahrscheinlichkeit, C: schwarz, H: grau, N: blau, F: gelb, Cl: grün).

Tabelle 10.1.: Kristallstrukturbestimmung von **82**

Kristalldaten:

Summenformel	$C_{13}H_8ClFN_2O_2$
Molare Masse	$278.66 \text{ g mol}^{-1}$
Kristallsystem	triklin
Raumgruppe	$P2_1/n$
Absorptionkoeffizient (μ)	0.337 mm^{-1}
Habitus	gelbe Platte
Kristallgröße	$0.02 \times 0.08 \times 0.11 \text{ mm}^3$
Gitterkonstanten (aus 3232 Reflexen mit $2.7^\circ < \Theta < 27.9^\circ$)	$a = 4.9850(6) \text{ \AA}$ $b = 25.626(3) \text{ \AA}$ $c = 9.3214(13) \text{ \AA}$ $\beta = 99.523(10)^\circ$ $V = 1174.3(2) \text{ \AA}^3$ $Z = 4$ $F(000) = 568$
Temperatur	-80°C
Dichte (berechnet)	1.567 g cm^{-3}

Datensammlung:

Diffraktometer	STOE IPDS 2T
----------------	--------------

Forts. auf nächster Seite

Anhang

Forts.

Strahlung	Mo-K α (Graphitmonochromator)
Scan-Typ	ω -Scans
Scan-Breite	1°
Meßbereich	$2^\circ \leq \Theta \leq 28^\circ$ $-6 \leq h \leq 6$ $-34 \leq k \leq 34$ $-10 \leq l \leq 12$
gemessene Reflexe	6353
unabhängige Reflexe	2910 ($R_{\text{int}} = 0.1015$)
beobachtete Reflexe	1225 ($ F /\sigma(F) > 4.0$)

Datenkorrektur, Strukturlösung und -verfeinerung:

Korrekturen	Lorentz- und Polarisationskorrektur
Lösung	SIR-2004 (Direkte Methoden)
Verfeinerung	SHELXL-2018 (Vollmatrixverfahren); 173 verfeinerte Parameter, gewichtete Verfeinerung: $\omega = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.0384 \cdot P)^2 + 5.17 \cdot P]$ wobei $P = (\max(F_o^2, 0) + 2 \cdot F_c^2)/3$; Wasserstoffatome geometrisch eingefügt und reitend verfeinert. Nichtwasserstoffatome anisotrop verfeinert.
Diskrepanzfaktor	$\omega R_2 = 0.261$ ($R_1 = 0.1133$ für beobachtete Reflexe, 0.246 für alle Reflexe)
Fitgüte (S)	1.092
maximale Änderung der Parameter	0.001 · e.s.d
maximale Peakhöhe in diff. Fouriersynthese	0.35 e Å ³ , -0.33 e Å ³

Tabelle 10.2.: Endkoordinaten und äquivalente Auslenkungsparameter (\AA^2)

Atom	X	Y	Z	$U_{\text{äq}}$
CL1	0.1428(4)	0.674 01(9)	0.4275(3)	0.0746(9)
F1	0.8092(9)	0.2312(2)	-0.0873(5)	0.074(2)
C1	0.504(1)	0.4243(3)	0.1137(8)	0.047(2)
C2	0.634(1)	0.4583(3)	0.2313(8)	0.050(3)
C3	0.471(1)	0.5012(3)	0.2330(8)	0.053(3)
O4	0.2520(9)	0.4980(2)	0.1242(5)	0.053(2)
C5	0.277(1)	0.4508(3)	0.0556(8)	0.052(3)
C6	0.587(1)	0.3733(3)	0.0659(8)	0.048(2)
C7	0.433(1)	0.3488(3)	-0.0549(8)	0.059(3)
C8	0.503(2)	0.3017(3)	-0.1060(9)	0.062(3)
C9	0.737(2)	0.2778(3)	-0.0365(9)	0.057(3)
C10	0.899(2)	0.3002(3)	0.0843(10)	0.065(3)
C11	0.821(1)	0.3477(3)	0.1340(9)	0.058(3)
C12	0.875(1)	0.4515(3)	0.3322(8)	0.052(3)
N13	1.068(1)	0.4460(3)	0.4174(7)	0.061(2)
N14	0.495(1)	0.5454(2)	0.3164(7)	0.054(2)
C15	0.300(1)	0.5822(3)	0.3247(8)	0.052(3)
O16	0.0674(9)	0.5780(2)	0.2594(6)	0.061(2)
C17	0.399(1)	0.6275(3)	0.4221(8)	0.053(3)

Tabelle 10.3.: Anisotrope Auslenkungsparameter

Atom	U_{11}	U_{22}	U_{33}
CL1	0.044(1)	0.075(1)	0.100(2)
F1	0.064(3)	0.067(3)	0.085(4)
C1	0.028(3)	0.062(5)	0.046(4)
C2	0.029(3)	0.075(5)	0.043(4)
C3	0.028(3)	0.075(5)	0.050(4)
O4	0.036(2)	0.070(3)	0.048(3)
C5	0.033(4)	0.069(5)	0.049(4)
C6	0.037(3)	0.054(4)	0.051(4)
C7	0.037(4)	0.082(6)	0.051(5)
C8	0.049(5)	0.076(6)	0.054(5)

Forts. auf nächster Seite

Anhang

Forts.

C9	0.051(4)	0.057(5)	0.061(5)
C10	0.043(4)	0.077(6)	0.070(6)
C11	0.037(4)	0.072(5)	0.058(5)
C12	0.035(4)	0.075(5)	0.043(4)
N13	0.039(3)	0.085(5)	0.056(4)
N14	0.028(3)	0.073(4)	0.057(4)
C15	0.040(4)	0.064(5)	0.047(4)
O16	0.032(3)	0.087(4)	0.056(3)
C17	0.039(4)	0.061(5)	0.055(5)

Atom	U_{12}	U_{13}	U_{23}
CL1	0.003(1)	-0.003(1)	-0.015(1)
F1	0.015(2)	-0.010(3)	-0.007(3)
C1	-0.006(3)	-0.010(3)	0.002(4)
C2	0.007(3)	-0.005(3)	0.012(4)
C3	-0.002(3)	-0.009(3)	0.007(4)
O4	0.002(2)	-0.009(2)	0.000(3)
C5	0.002(3)	-0.005(3)	0.000(4)
C6	0.002(3)	-0.002(3)	0.002(4)
C7	0.003(4)	-0.011(3)	0.001(5)
C8	0.013(4)	-0.012(4)	-0.006(4)
C9	0.002(4)	0.007(4)	0.006(4)
C10	0.003(4)	-0.009(4)	0.002(5)
C11	0.006(4)	-0.014(4)	-0.003(4)
C12	-0.004(4)	-0.005(3)	0.006(4)
N13	-0.001(3)	-0.006(3)	0.004(4)
N14	-0.001(3)	-0.006(3)	-0.011(4)
C15	0.000(4)	-0.006(3)	0.007(4)
O16	0.005(3)	-0.014(2)	-0.007(3)
C17	-0.001(3)	-0.007(3)	-0.001(4)

Tabelle 10.4.: Endkoordinaten und isotrope Auslenkungsparameter der Wasserstoffatome (\AA^2)

Atom	X	Y	Z	U_{iso}
H5	0.148 83	0.438 32	-0.023 90	0.062
H7	0.274 09	0.365 76	-0.103 17	0.070
H8	0.392 70	0.285 78	-0.187 17	0.075
H10	1.058 87	0.283 11	0.131 18	0.078
H11	0.929 12	0.363 40	0.216 26	0.070
H14	0.653 88	0.550 70	0.371 04	0.065
H17A	0.554 37	0.644 25	0.386 60	0.064
H17B	0.463 75	0.614 45	0.521 77	0.064

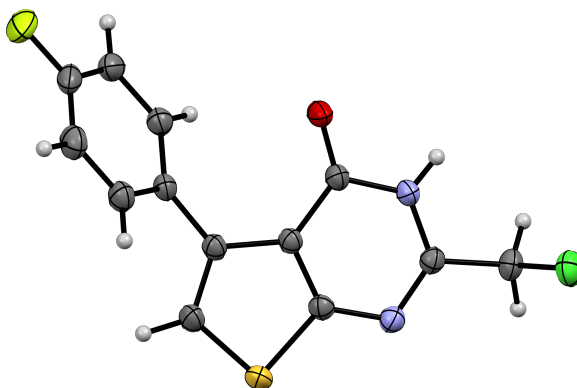


Abbildung 10.2.: Asymmetrische Einheit von **69** bei 193 K (ORTEP Ellipsoide mit 30 % Wahrscheinlichkeit, C: grau, H: weiß, N: blau, F: gelb, Cl: grün, S: orange).

Tabelle 10.5.: Kristallstrukturbestimmung von **69**

Kristalldaten:

Summenformel	$C_{13}H_8ClFN_2OS$
Molare Masse	294.7 g mol^{-1}
Kristallsystem	monoklin
Raumgruppe	$P2_1/c$
Absorptionkoeffizient (μ)	0.48 mm^{-1}
Habitus	gelber Block
Kristallgröße	$0.24 \times 0.34 \times 0.60 \text{ mm}^3$
Gitterkonstanten (aus 10782 Reflexen mit $2.2^\circ < \Theta < 28.3^\circ$)	$a = 7.4888(5) \text{ \AA}$ $b = 12.8101(6) \text{ \AA}$ $c = 13.1069(8) \text{ \AA}$ $\beta = 101.823(5)^\circ$ $V = 1230.70(13) \text{ \AA}^3$ $Z = 4$ $F(000) = 600$
Temperatur	-80°C
Dichte (berechnet)	1.591 g cm^{-3}

Datensammlung:

Diffraktometer	STOE IPDS 2T
----------------	--------------

Forts. auf nächster Seite

*Forts.*Strahlung Mo-K α (Graphitmonochromator)Scan-Typ ω -Scans

Scan-Breite 1°

Meßbereich $2^\circ \leq \Theta \leq 28^\circ$ $-9 \leq h \leq 67$ $-14 \leq k \leq 16$ $-107 \leq l \leq 17$

gemessene Reflexe 6448

unabhängige Reflexe 3004 ($R_{\text{int}} = 0.0134$)beobachtete Reflexe 2664 ($|F|/\sigma(F) > 4.0$)**Datenkorrektur, Strukturlösung und -verfeinerung:**

Korrekturen Lorentz- und Polarisationskorrektur

Lösung SIR-2004 (Direkte Methoden)

Verfeinerung SHELXL-2014 (Vollmatrixverfahren); 176 verfeinerte Parameter, gewichtete Verfeinerung:

$$\omega = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.0384 \cdot P)^2 + 5.17 \cdot P]$$

wobei

$$P = (\max(F_o^2, 0) + 2 \cdot F_c^2)/3;$$

Wasserstoffatome geometrisch eingefügt und reitend verfeinert, NH lokalisiert und isotrop verfeinert. Nichtwasserstoffatome anisotrop verfeinert.

Diskrepanzfaktor $\omega R_2 = 0.086$ ($R_1 = 0.0323$ für beobachtete Reflexe, 0.0376 für alle Reflexe)

Fitgüte (S) 1.036

maximale Änderung der Parameter 0.001 · e.s.d

maximale Peakhöhe in diff. Fouriersynthese $0.32 \text{ e \AA}^3, -0.35 \text{ e \AA}^3$

Tabelle 10.6.: Endkoordinaten und äquivalente Auslenkungsparameter (\AA^2)

Atom	X	Y	Z	$U_{\text{äq}}$
CL1	0.039 02(6)	0.265 10(4)	0.258 94(3)	0.0400(1)
S1	0.635 69(5)	0.588 88(3)	0.319 51(3)	0.0289(1)
F1	0.1794(2)	1.074 00(8)	0.5635(1)	0.0494(4)
O1	0.0906(2)	0.620 47(8)	0.479 43(9)	0.0328(4)
C2	0.4513(2)	0.5324(1)	0.3579(1)	0.0232(4)
N3	0.4155(2)	0.427 98(9)	0.344 45(9)	0.0253(4)
C4	0.2724(2)	0.3976(1)	0.3787(1)	0.0244(4)
N5	0.1653(2)	0.4622(1)	0.4223(1)	0.0260(4)
C6	0.1948(2)	0.5681(1)	0.4380(1)	0.0245(4)
C7	0.3533(2)	0.6052(1)	0.4027(1)	0.0226(4)
C8	0.4282(2)	0.7089(1)	0.4052(1)	0.0241(4)
C9	0.3579(2)	0.8042(1)	0.4475(1)	0.0249(4)
C10	0.3140(2)	0.8051(1)	0.5464(1)	0.0281(4)
C11	0.2540(2)	0.8961(1)	0.5857(1)	0.0325(5)
C12	0.2376(2)	0.9846(1)	0.5252(2)	0.0343(5)
C13	0.2779(2)	0.9865(1)	0.4280(2)	0.0372(5)
C14	0.3389(2)	0.8958(1)	0.3894(1)	0.0314(5)
C15	0.5794(2)	0.7093(1)	0.3620(1)	0.0288(4)
C16	0.2168(2)	0.2850(1)	0.3706(1)	0.0291(4)

Tabelle 10.7.: Anisotrope Auslenkungsparameter

Atom	U_{11}	U_{22}	U_{33}
CL1	0.0356(2)	0.0356(2)	0.0402(2)
S1	0.0310(2)	0.0310(2)	0.0299(2)
F1	0.0462(6)	0.0321(6)	0.0735(8)
O1	0.0331(6)	0.0219(5)	0.0488(7)
C2	0.0253(6)	0.0249(7)	0.0197(6)
N3	0.0285(6)	0.0227(6)	0.0251(6)
C4	0.0281(7)	0.0211(7)	0.0239(6)
N5	0.0281(6)	0.0209(6)	0.0319(6)
C6	0.0274(7)	0.0208(6)	0.0264(7)
C7	0.0262(7)	0.0209(6)	0.0213(6)

Forts. auf nächster Seite

Anhang A - Kristallstrukturanalysen

Forts.

C8	0.0282(7)	0.0228(7)	0.0221(6)
C9	0.0257(7)	0.0217(7)	0.0277(7)
C10	0.0287(7)	0.0278(7)	0.0282(7)
C11	0.0282(7)	0.0367(8)	0.0340(8)
C12	0.0270(7)	0.0260(7)	0.0506(10)
C13	0.0410(9)	0.0232(7)	0.0486(10)
C14	0.0380(8)	0.0250(7)	0.0323(8)
C15	0.0345(8)	0.0259(7)	0.0284(7)
C16	0.0326(8)	0.0215(7)	0.0325(7)

Atom	U_{12}	U_{13}	U_{23}
CL1	-0.0103(2)	0.0025(2)	-0.0073(2)
S1	-0.0057(1)	0.0151(1)	-0.0032(1)
F1	0.0000(5)	0.0204(6)	-0.0189(5)
O1	-0.0037(4)	0.0212(5)	-0.0031(5)
C2	-0.0026(5)	0.0056(5)	0.0007(5)
N3	-0.0009(5)	0.0065(5)	-0.0014(4)
C4	-0.0013(5)	0.0051(5)	-0.0005(5)
N5	-0.0044(5)	0.0127(5)	-0.0008(5)
C6	-0.0031(5)	0.0080(5)	-0.0002(5)
C7	-0.0030(5)	0.0062(5)	0.0006(5)
C8	-0.0048(5)	0.0069(5)	0.0010(5)
C9	-0.0054(5)	0.0063(5)	-0.0015(5)
C10	-0.0051(6)	0.0069(6)	-0.0017(6)
C11	-0.0068(6)	0.0094(6)	-0.0097(6)
C12	-0.0041(6)	0.0096(7)	-0.0112(7)
C13	-0.0033(6)	0.0117(7)	0.0018(7)
C14	-0.0059(6)	0.0102(6)	0.0007(6)
C15	-0.0080(6)	0.0121(6)	-0.0014(6)
C16	-0.0030(6)	0.0047(6)	-0.0023(6)

Tabelle 10.8.: Endkoordinaten und isotrope Auslenkungsparameter der Wasserstoffatome (\AA^2)

Atom	X	Y	Z	U_{iso}
H5	0.080(3)	0.435(2)	0.447(2)	0.034(5)
H10	0.325 45	0.742 90	0.586 70	0.0337
H11	0.224 90	0.897 23	0.652 89	0.0390
H13	0.264 10	1.048 83	0.387 86	0.0447
H14	0.368 33	0.896 07	0.322 25	0.0376
H15	0.647 65	0.770 73	0.356 00	0.0346
H16A	0.173 90	0.263 95	0.434 18	0.0349
H16 B	0.323 18	0.241 10	0.365 08	0.0349

Anhang B - NMR-Spektren

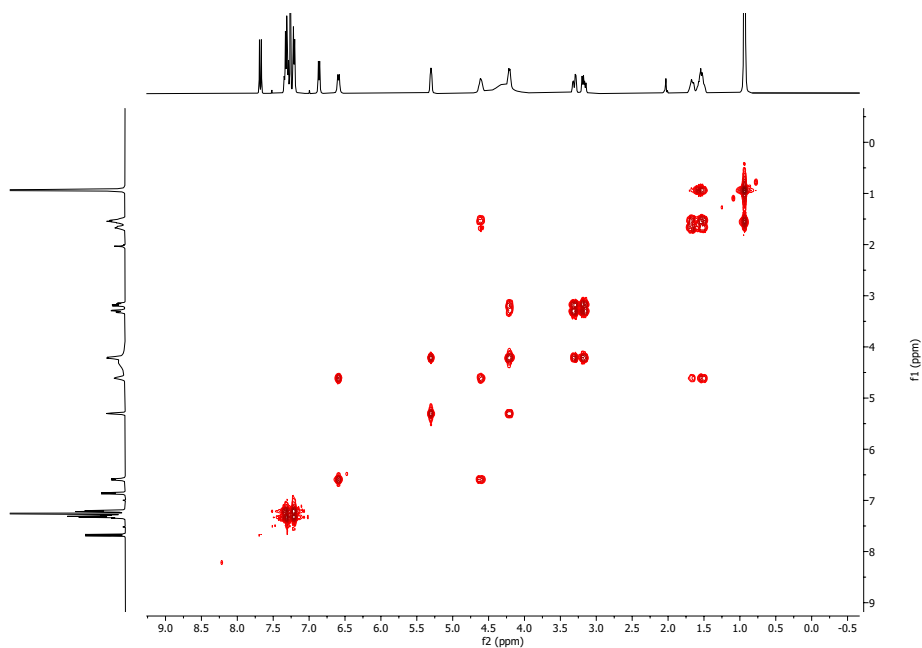


Abbildung 10.5.: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung 25.

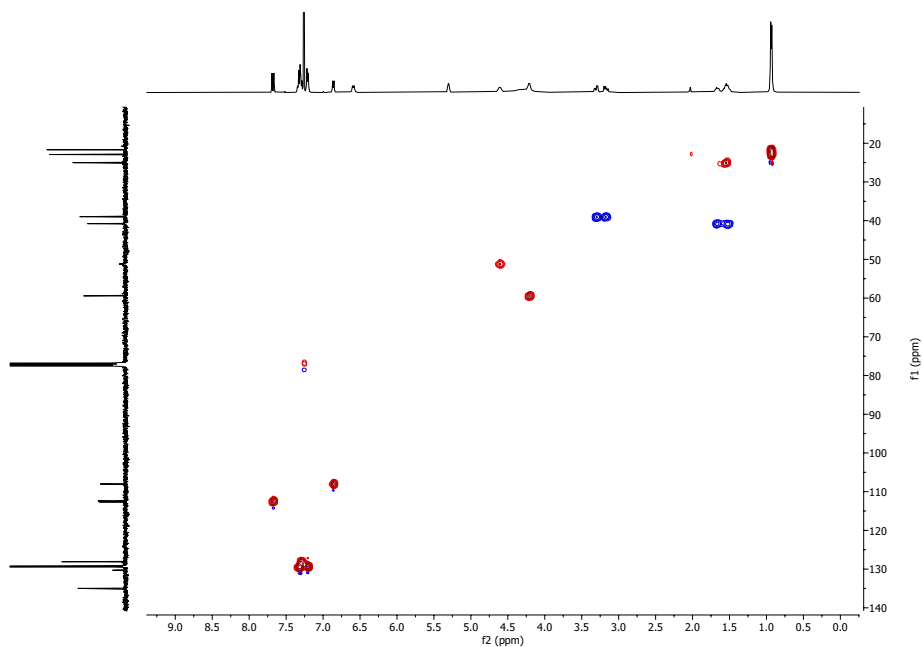


Abbildung 10.6.: ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung 25.

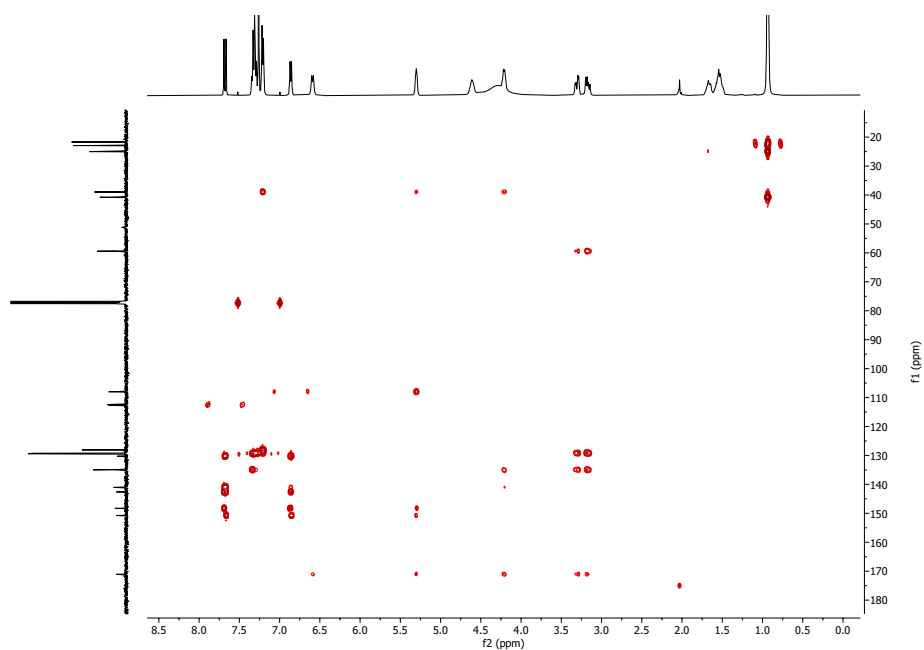


Abbildung 10.7.: ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung 25.

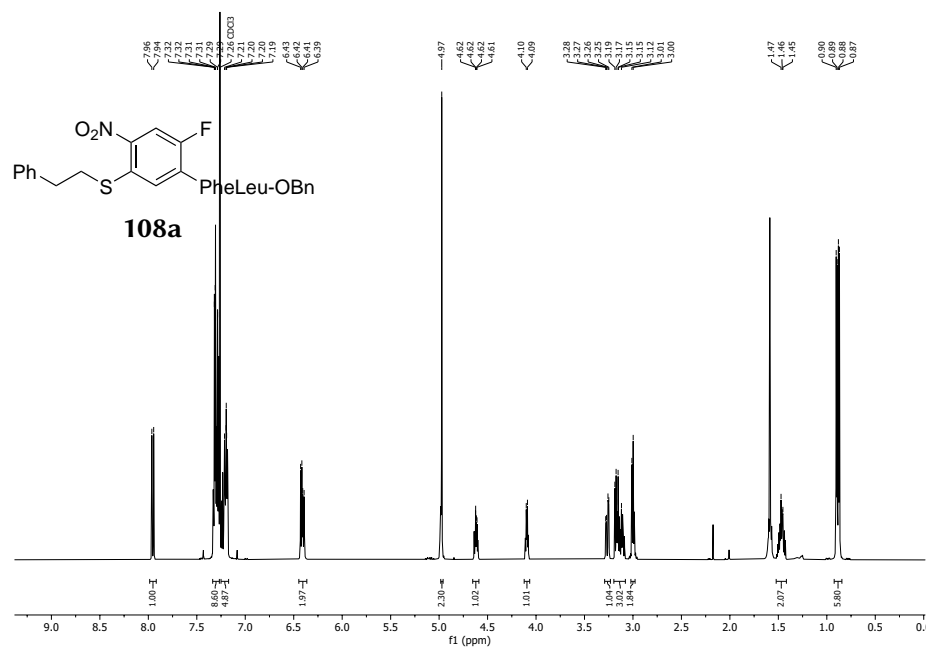


Abbildung 10.8.: ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) von Verbindung 108a.

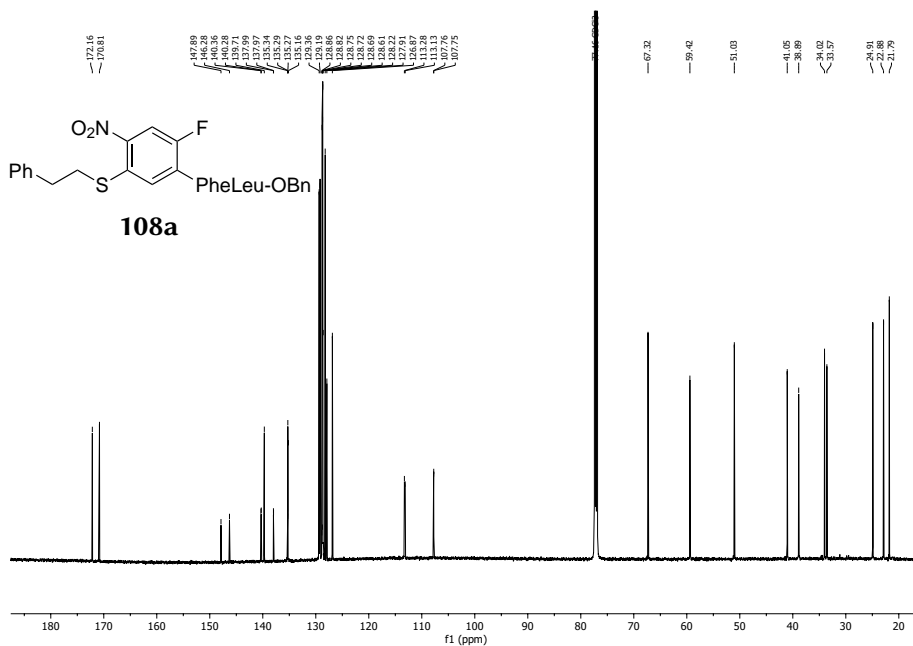


Abbildung 10.9.: ^{13}C -NMR (151 MHz, CDCl_3) von Verbindung **108a**.

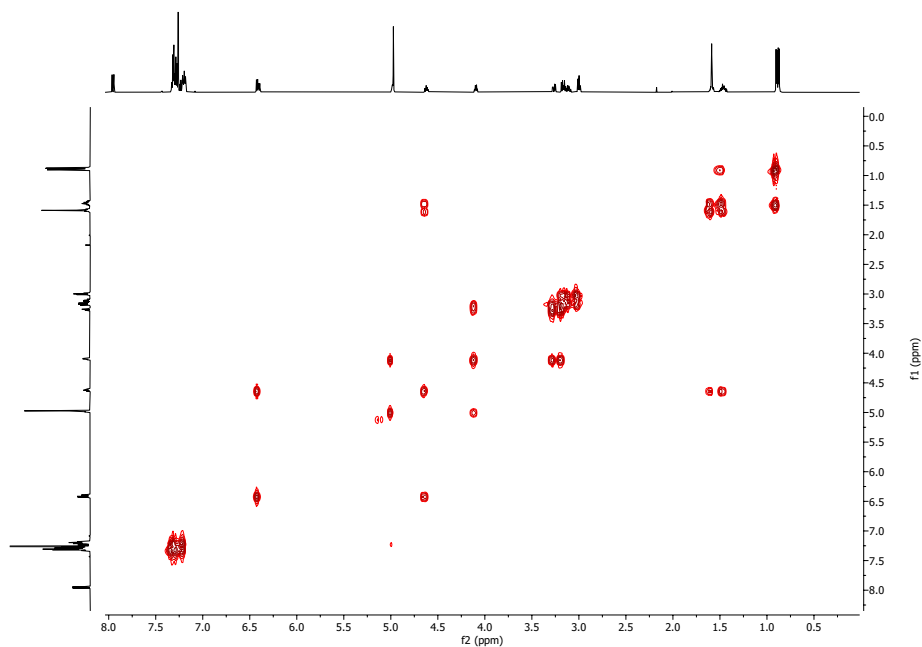


Abbildung 10.10.: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **108a**.

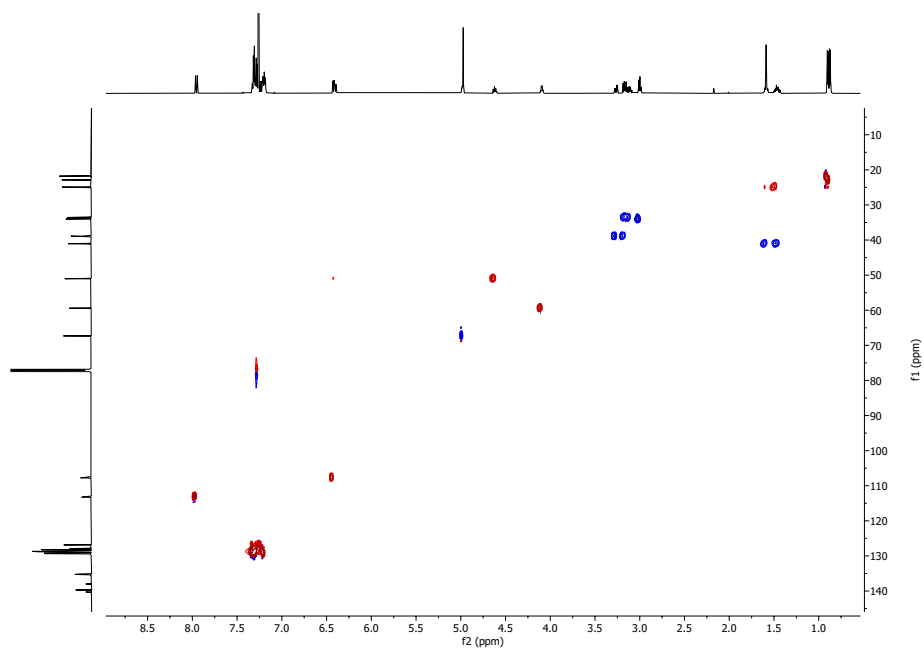


Abbildung 10.11.: ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **108a**.

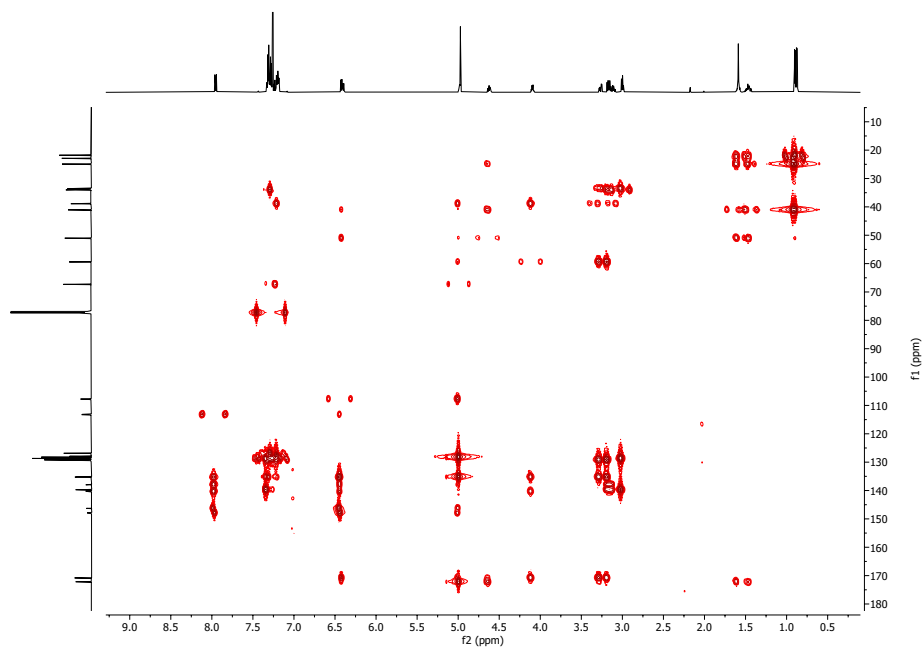


Abbildung 10.12.: ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **108a**.

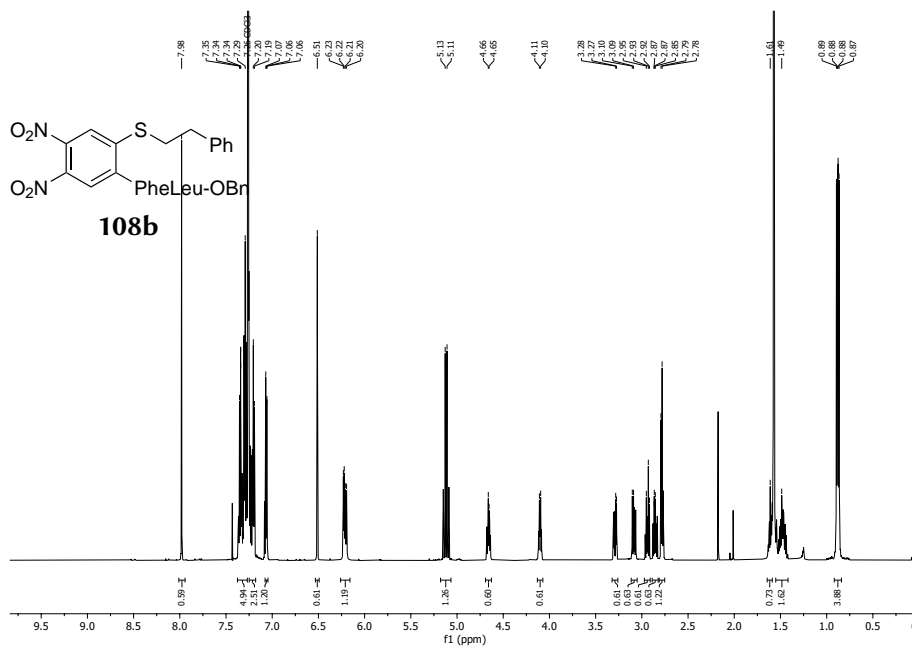


Abbildung 10.13.: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) von Verbindung **108b**.

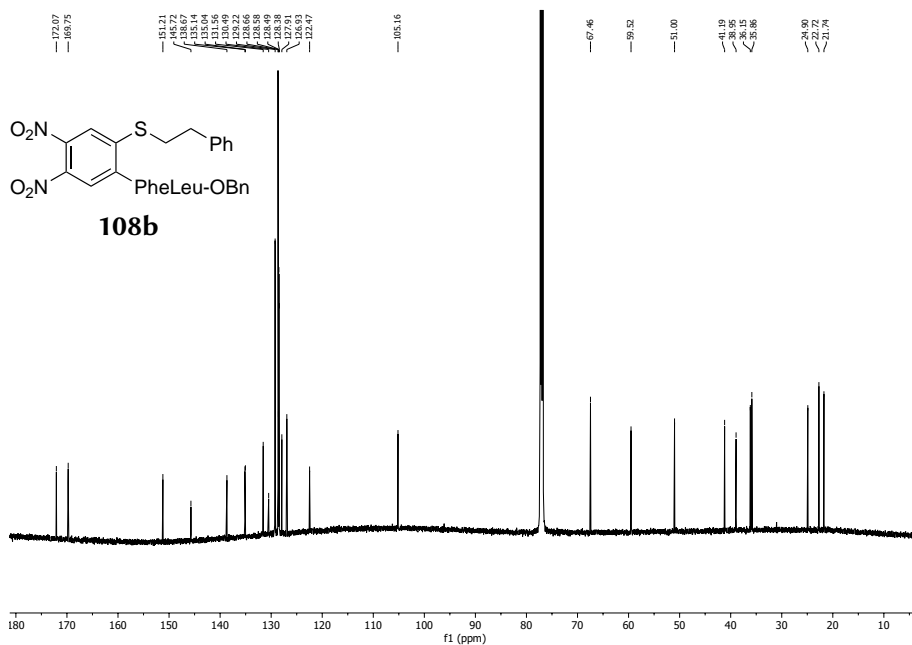


Abbildung 10.14.: $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) von Verbindung **108b**.

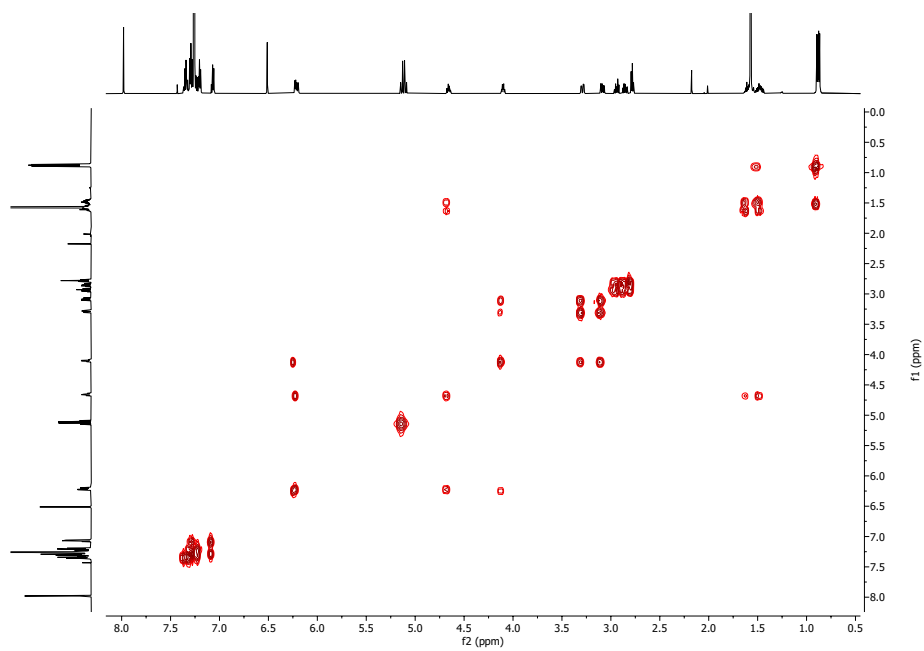


Abbildung 10.15.: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **108b**.

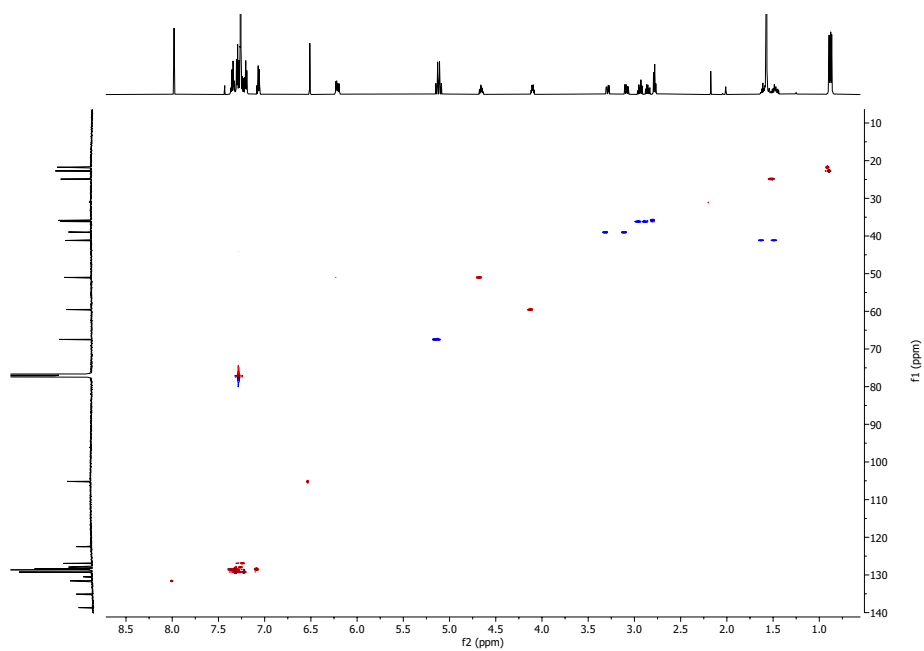


Abbildung 10.16.: ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **108b**.

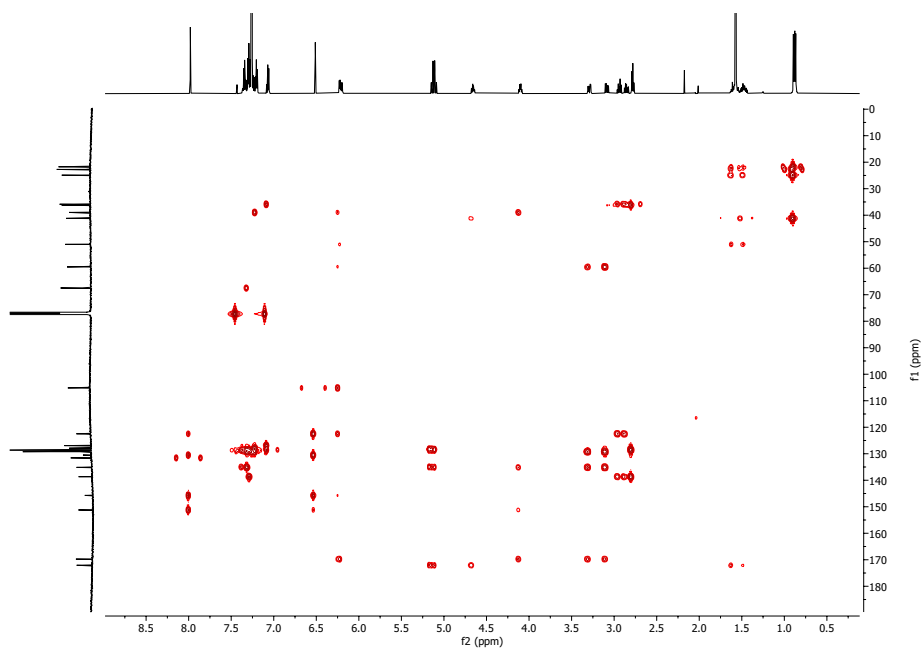


Abbildung 10.17.: ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **108b**.

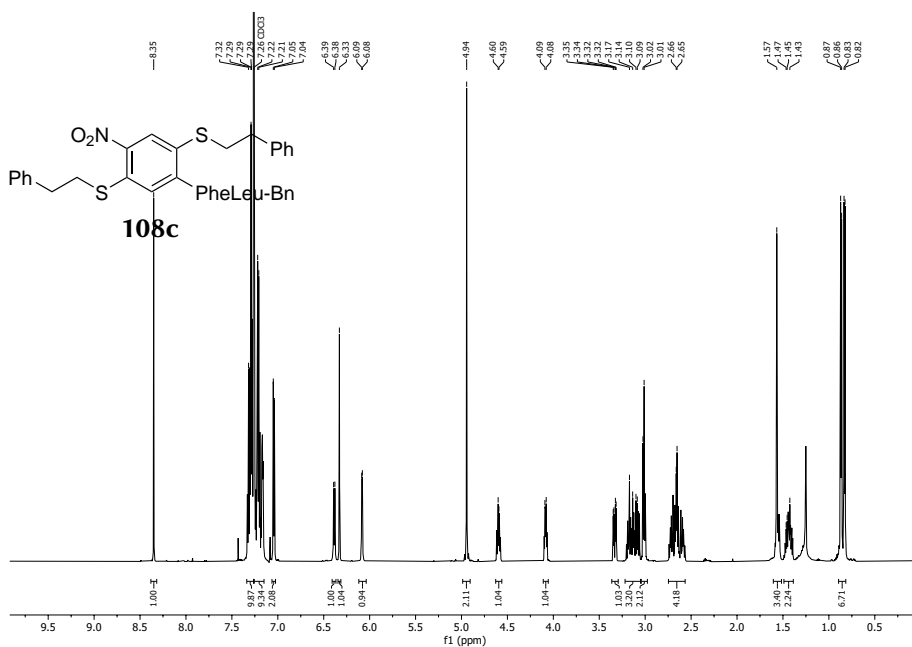


Abbildung 10.18.: ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) von Verbindung **108c**.

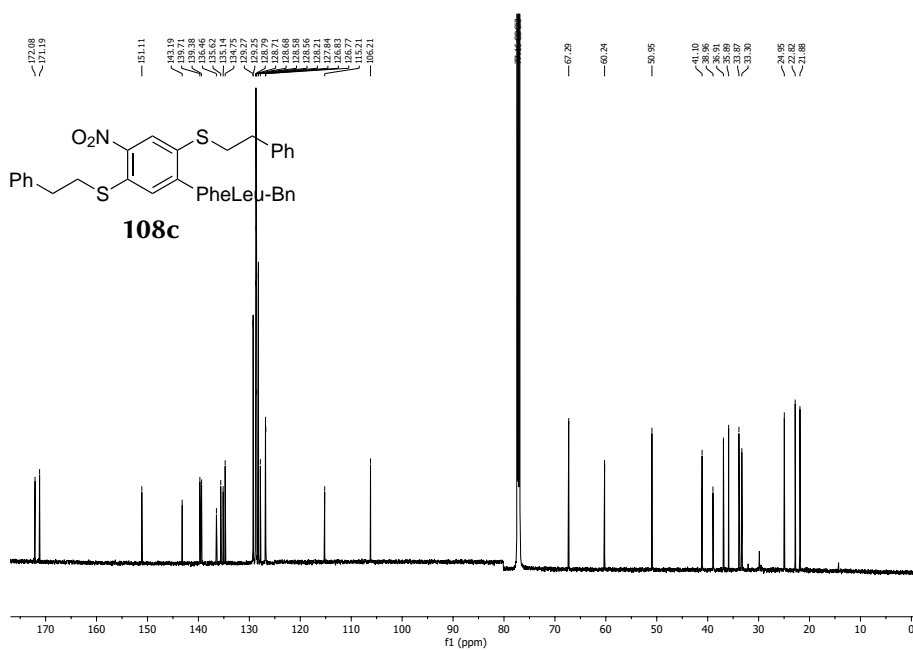


Abbildung 10.19.: ^{13}C -NMR (151 MHz, CDCl_3) von Verbindung **108c**.

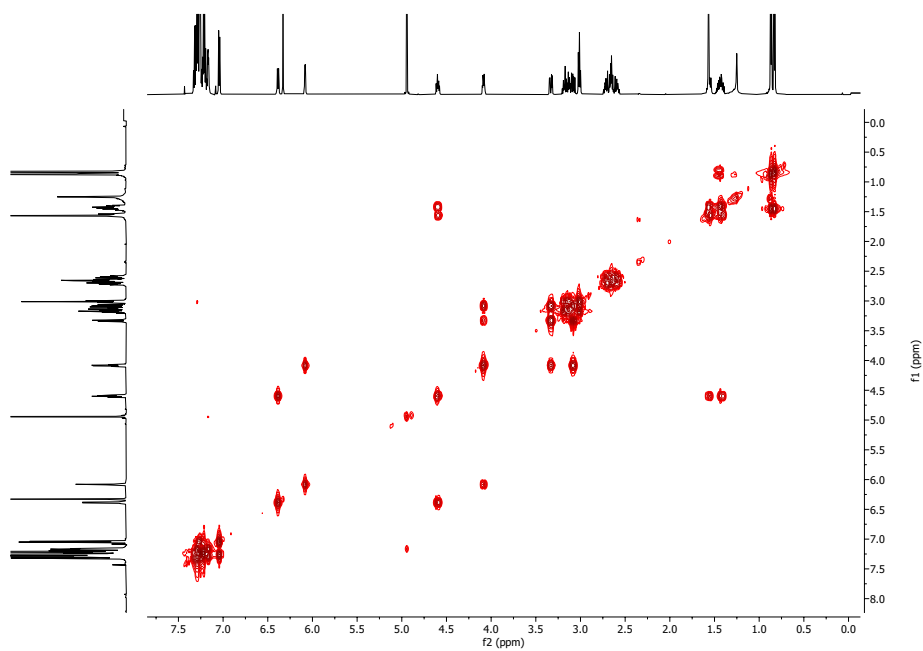


Abbildung 10.20.: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **108c**.

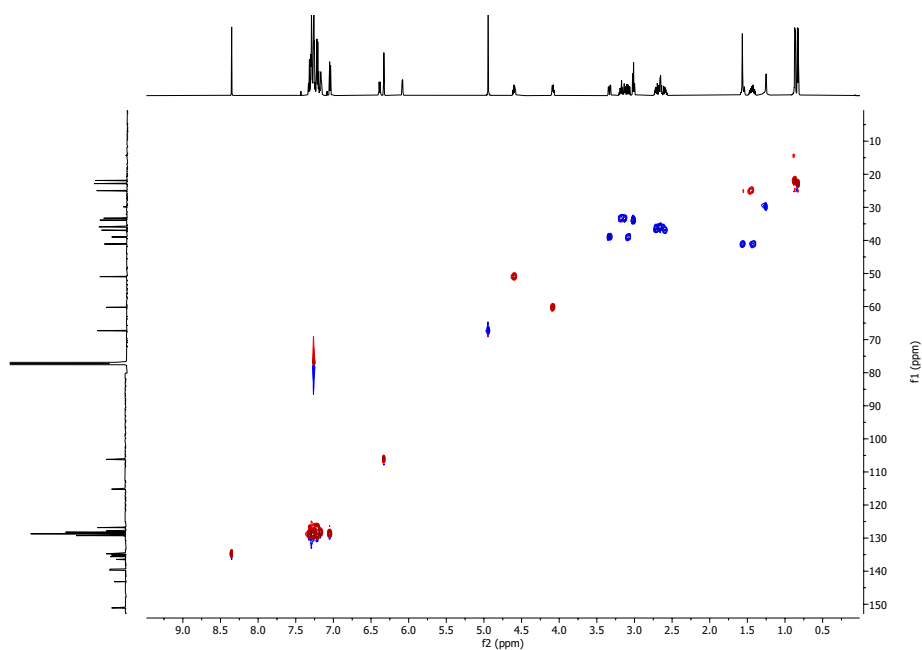


Abbildung 10.21.: ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **108c**.

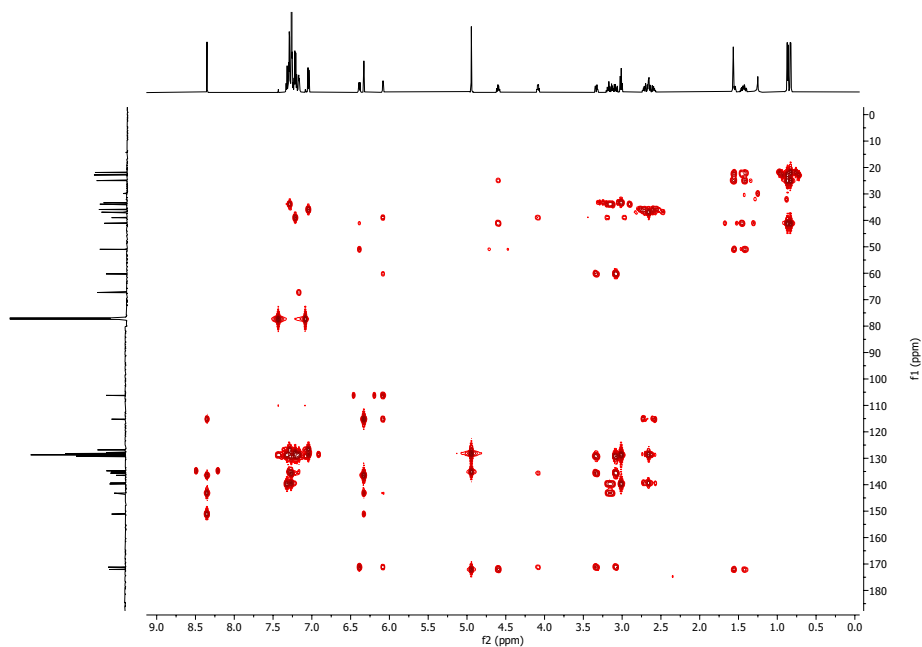


Abbildung 10.22.: ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **108c**.

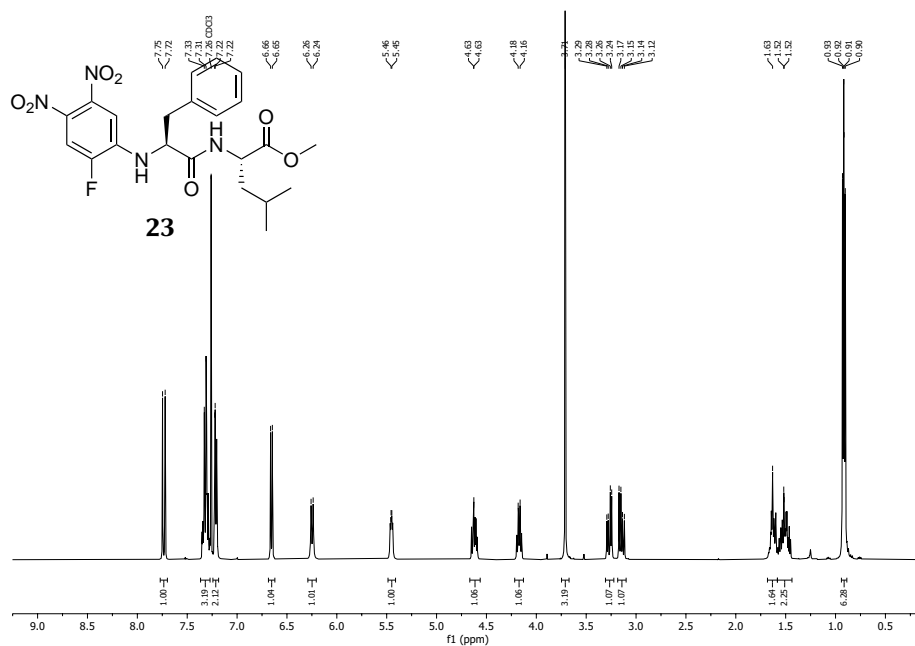


Abbildung 10.23.: ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) von Verbindung 23.

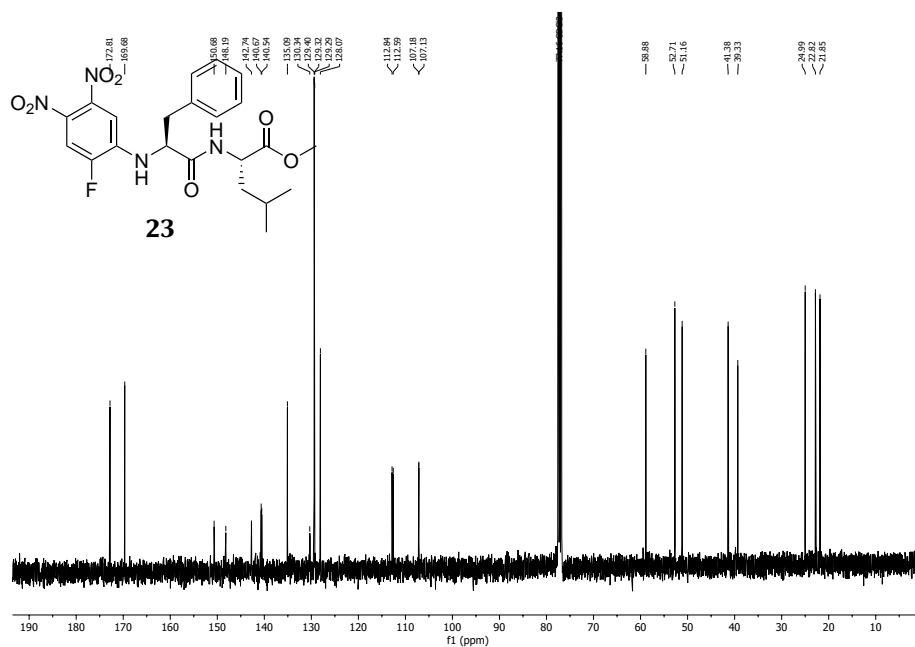


Abbildung 10.24.: ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) von Verbindung 23.

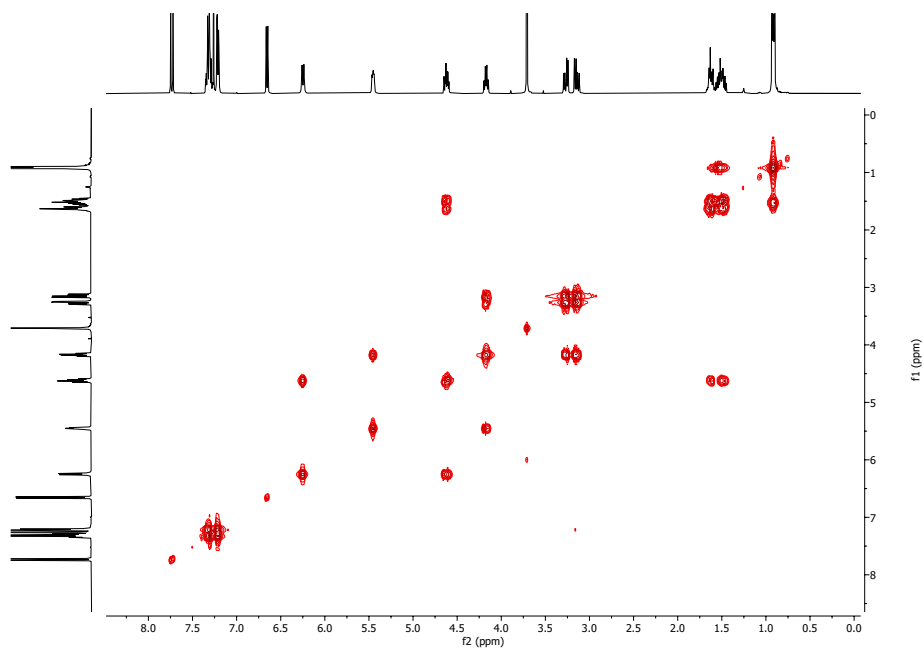


Abbildung 10.25.: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **23**.

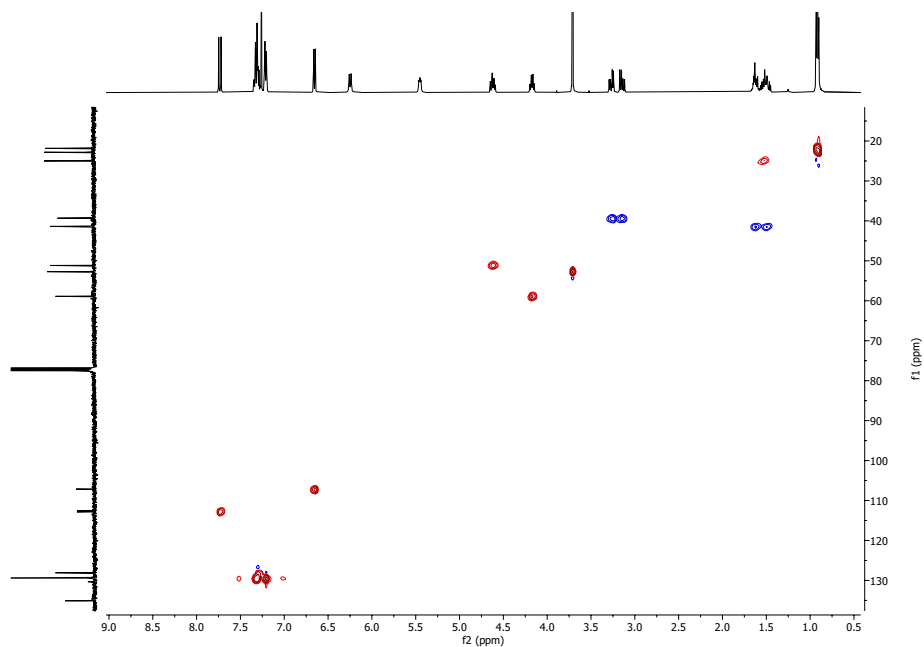


Abbildung 10.26.: ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **23**.

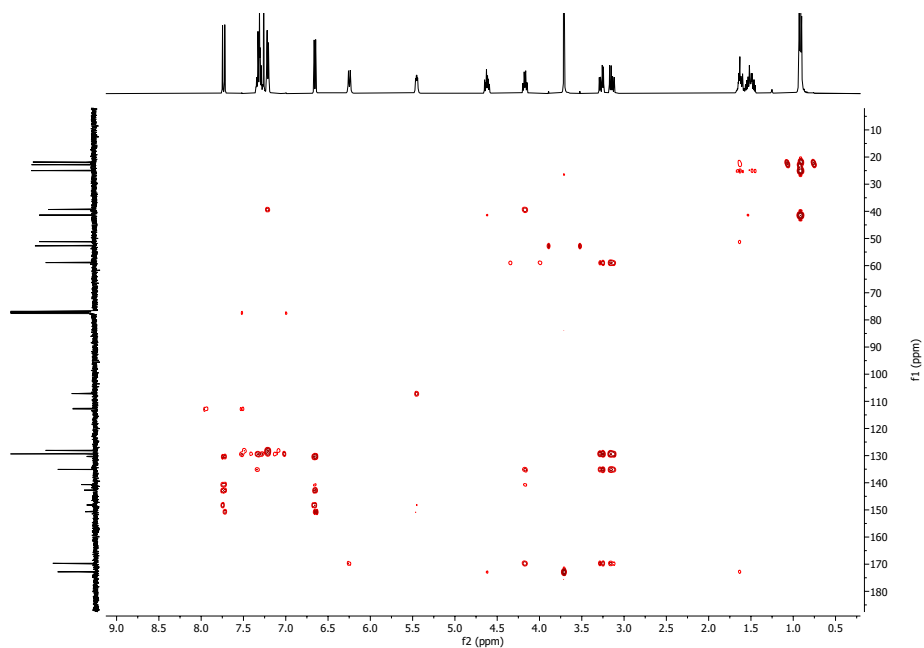


Abbildung 10.27.: ¹H-¹³C-HMBC-Spektrum (CDCl₃) von Verbindung 23.

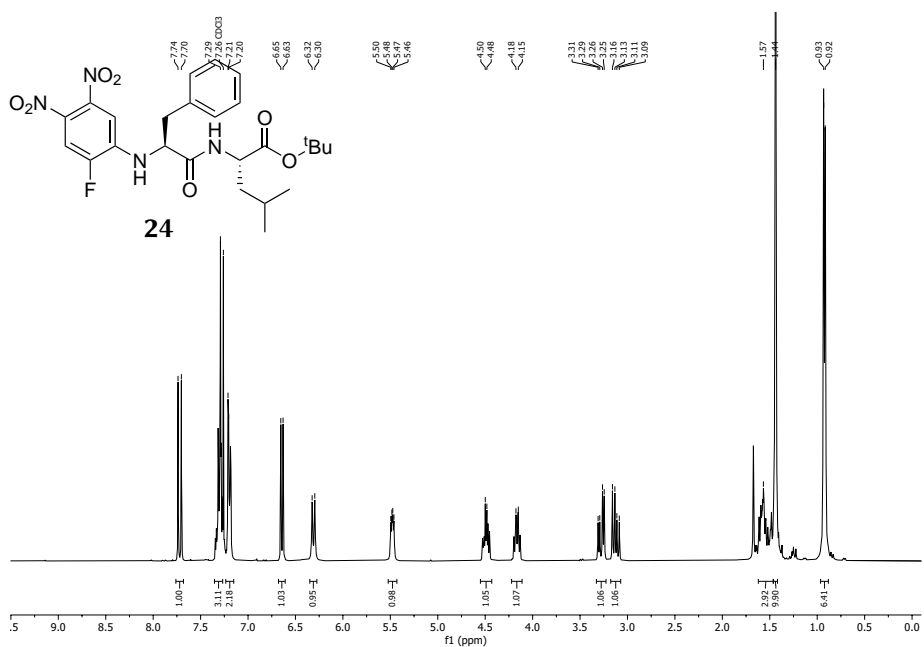


Abbildung 10.28.: ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) von Verbindung 24.

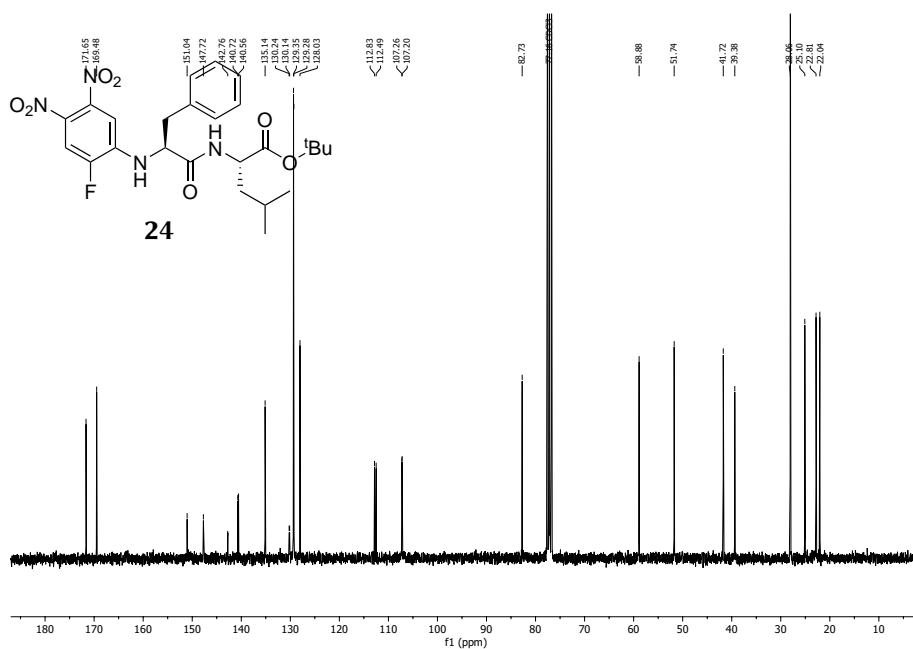


Abbildung 10.29.: ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl₃) von Verbindung 24.

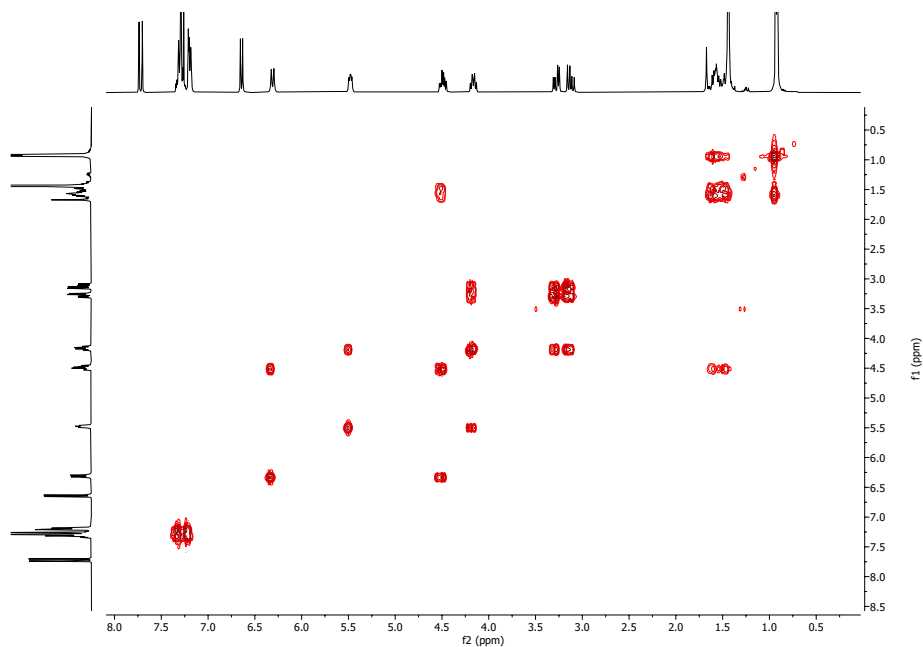


Abbildung 10.30.: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum (CDCl₃) von Verbindung 24.

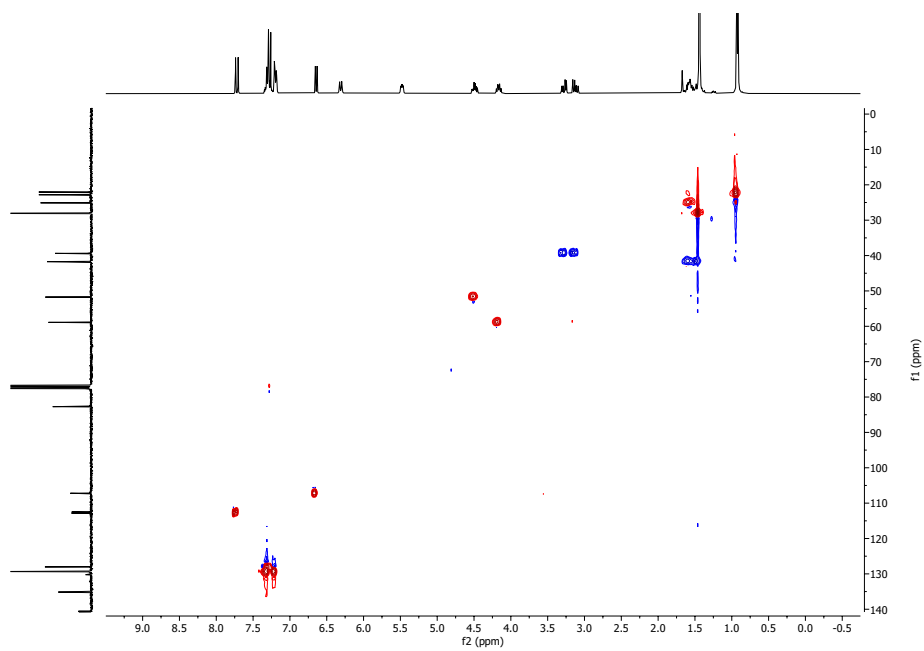


Abbildung 10.31.: ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung 24.

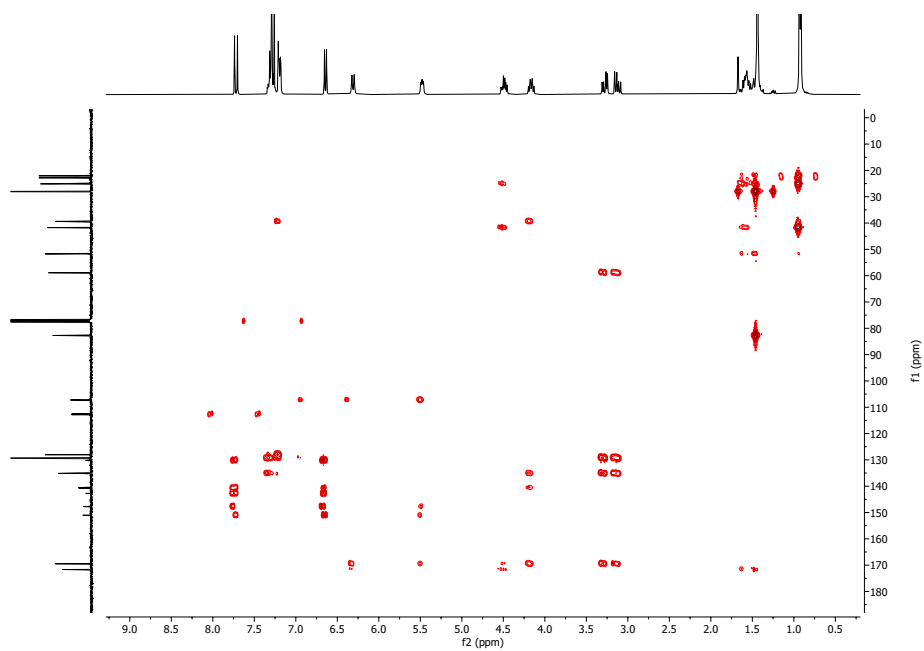


Abbildung 10.32.: ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung 24.

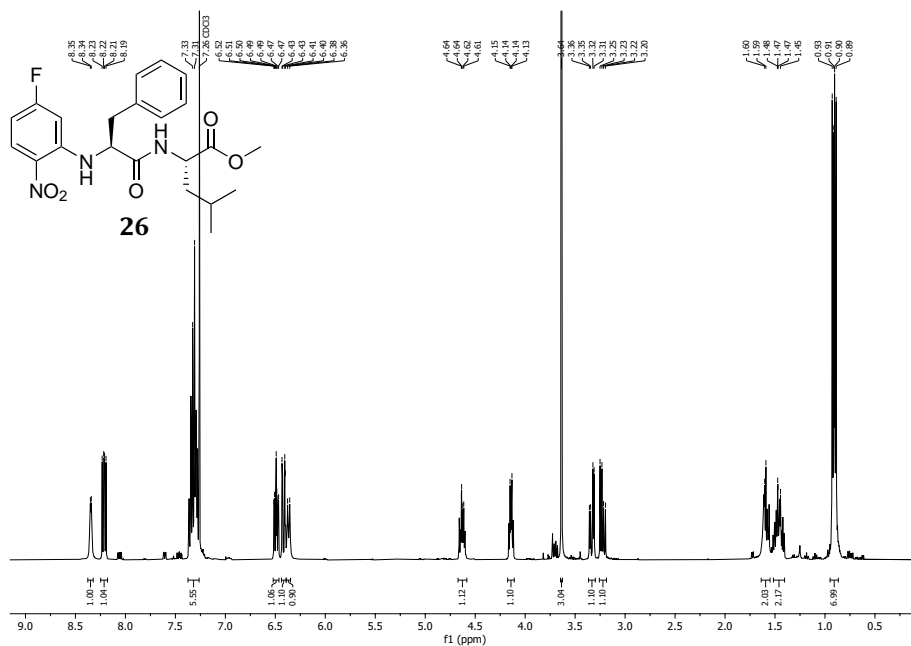


Abbildung 10.33.: ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) von Verbindung 26.

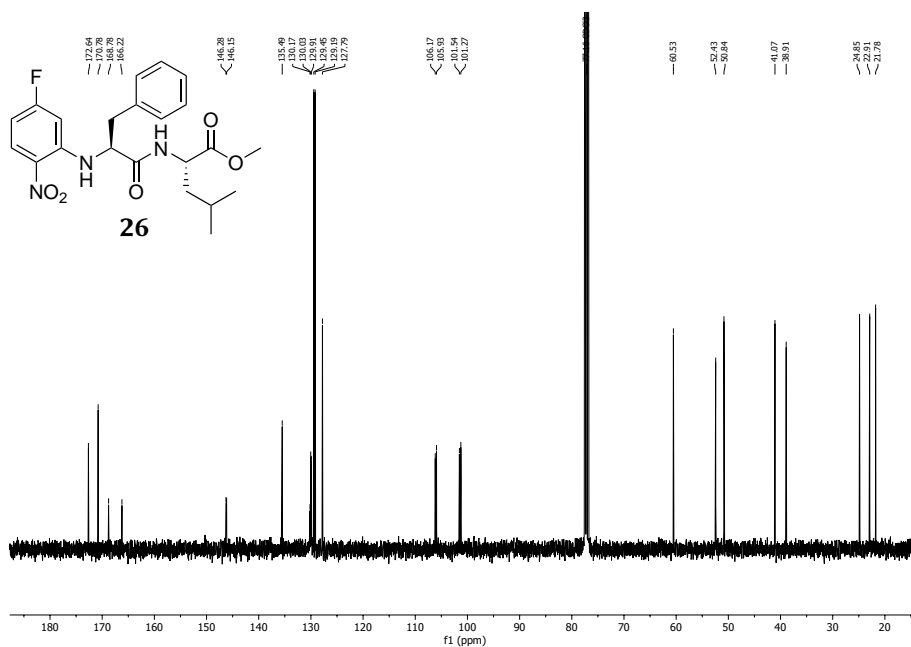


Abbildung 10.34.: ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) von Verbindung 26.

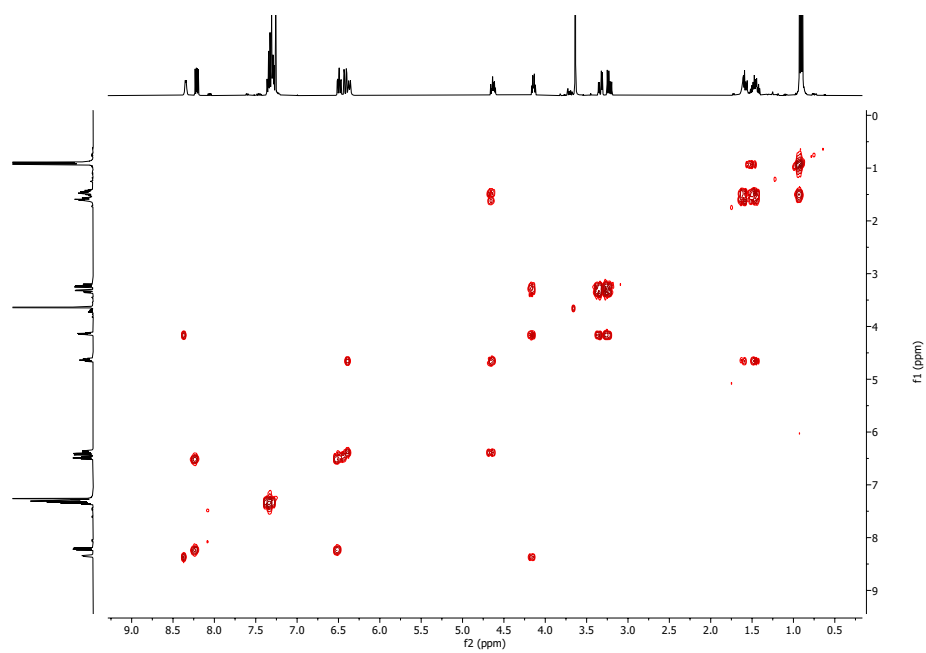


Abbildung 10.35.: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **26**.

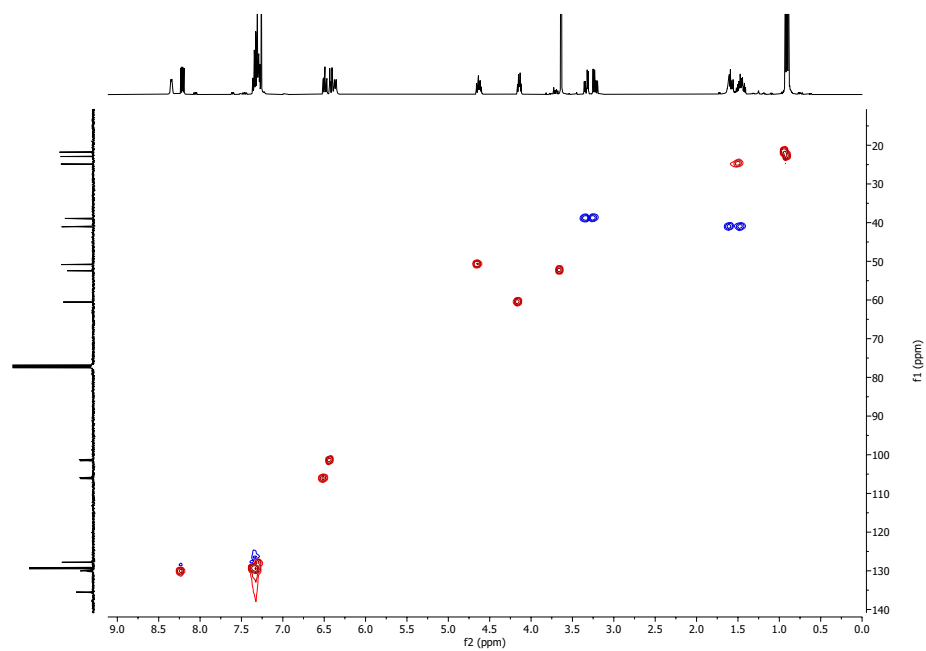


Abbildung 10.36.: ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **26**.

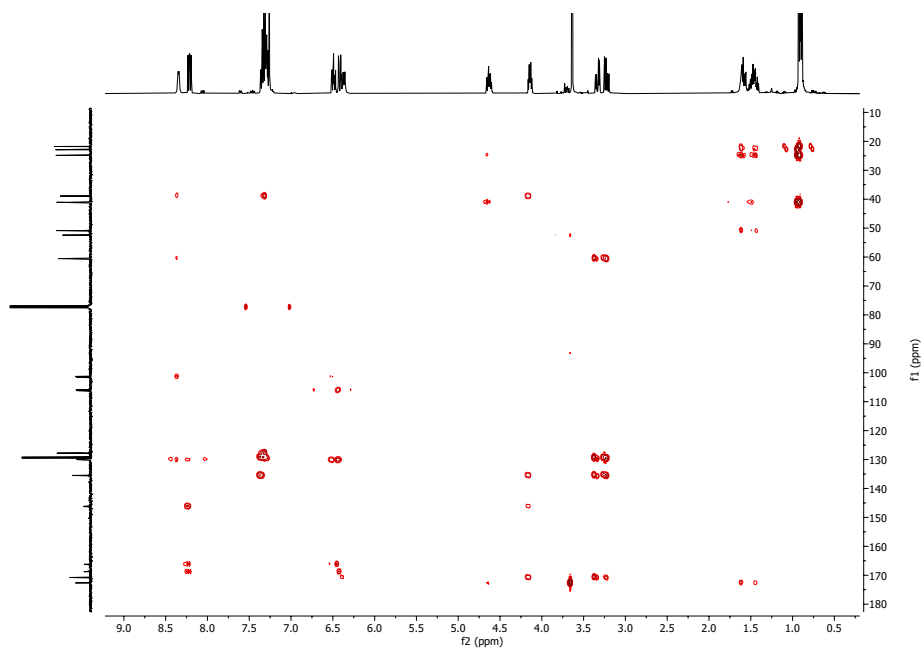


Abbildung 10.37.: ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung 26.

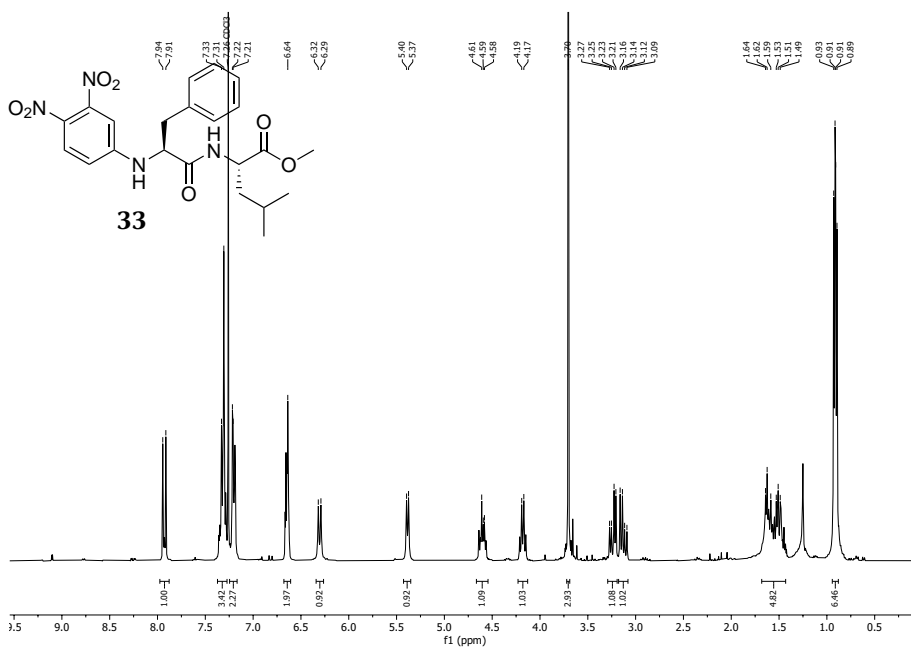


Abbildung 10.38.: ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) von Verbindung 33.

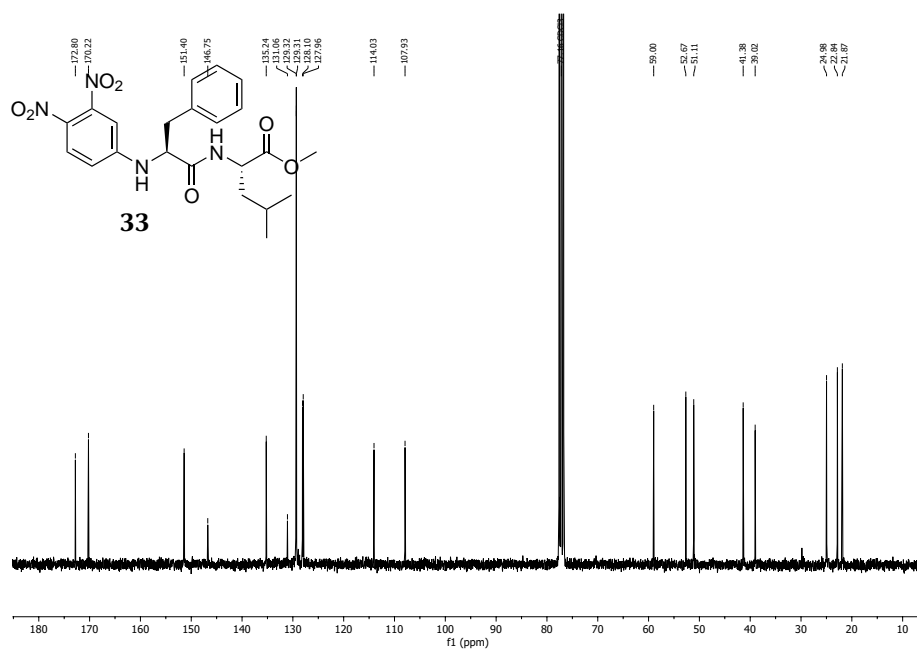


Abbildung 10.39.: ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) von Verbindung 33.

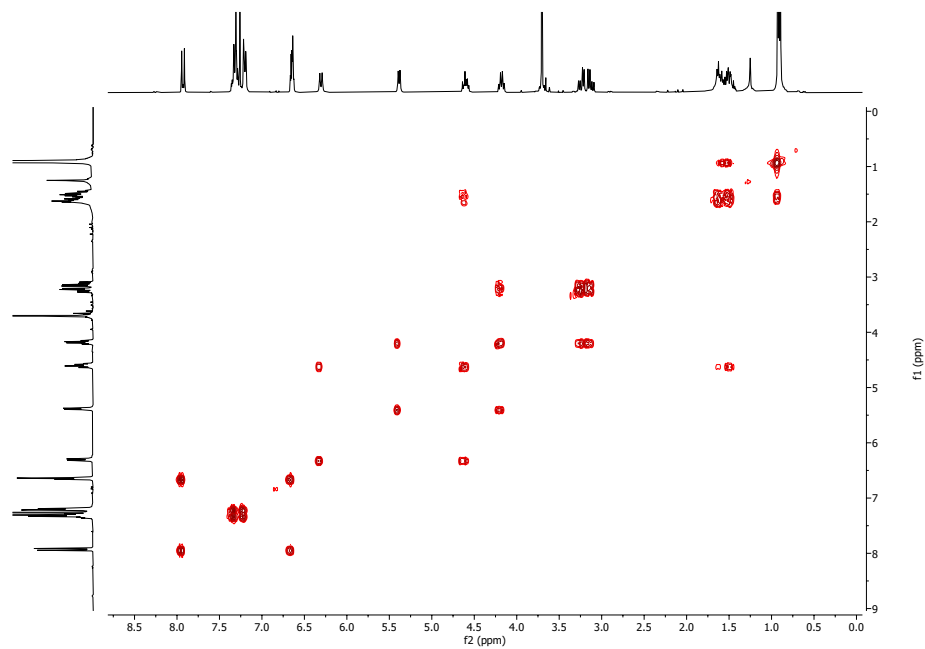


Abbildung 10.40.: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung 33.

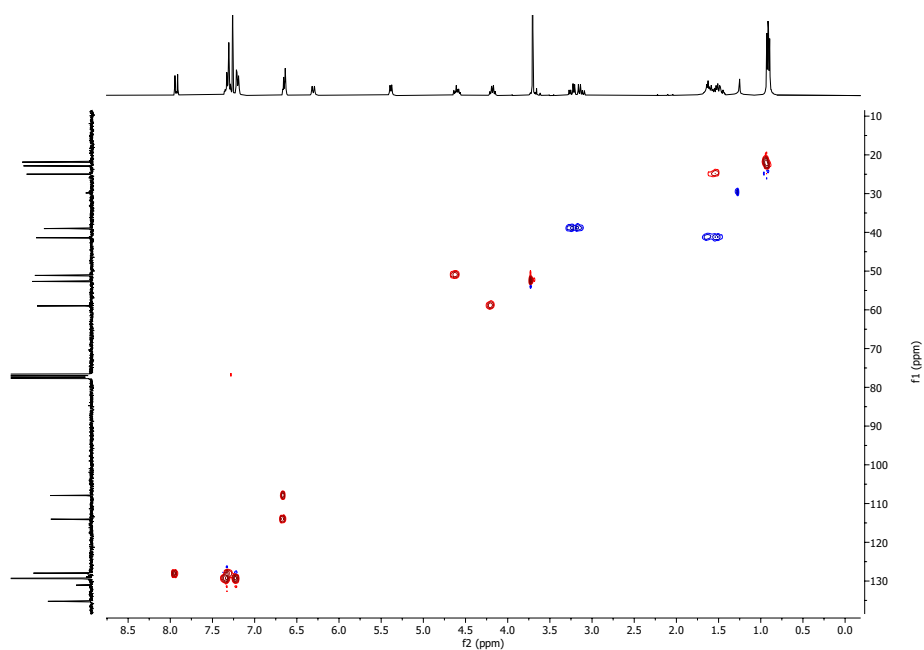


Abbildung 10.41.: ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **33**.

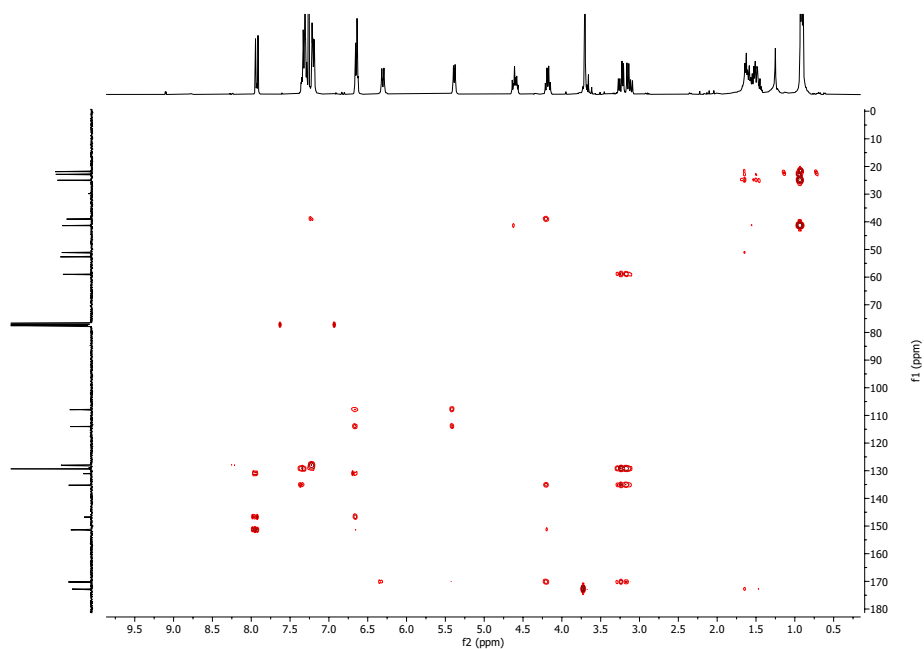


Abbildung 10.42.: ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **33**.

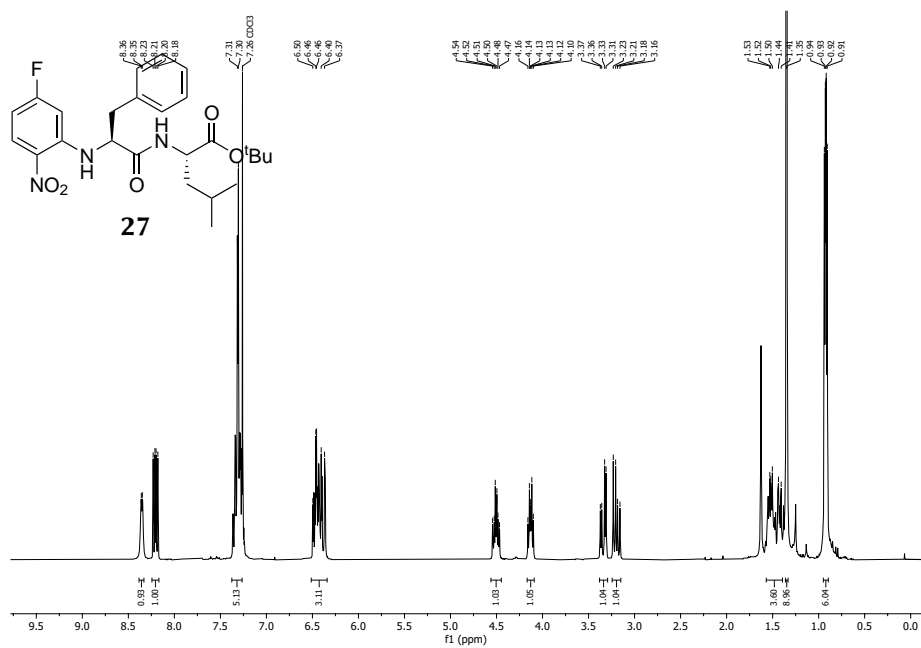


Abbildung 10.43.: $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) von Verbindung 27.

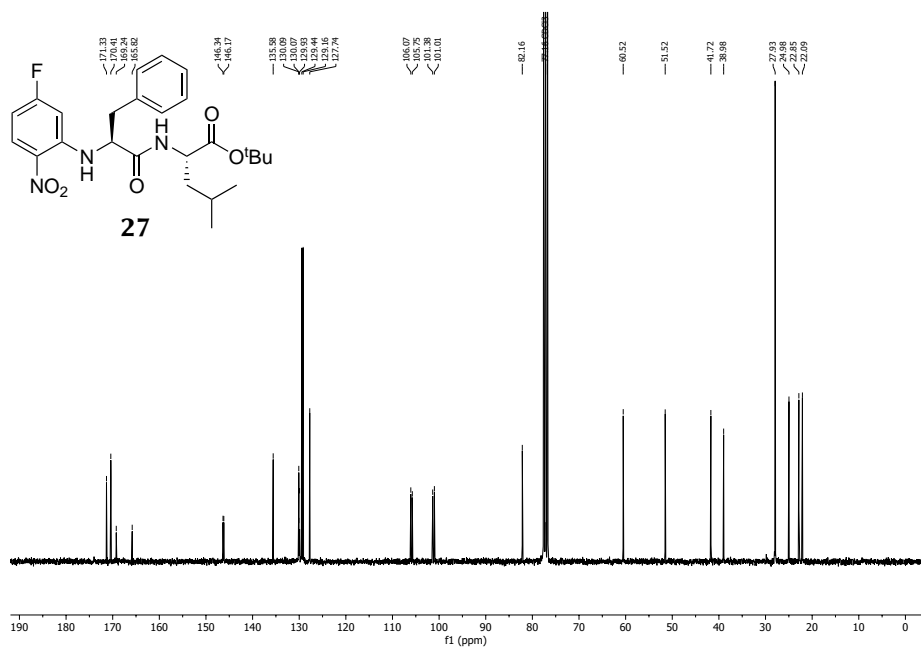


Abbildung 10.44.: $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) von Verbindung 27.

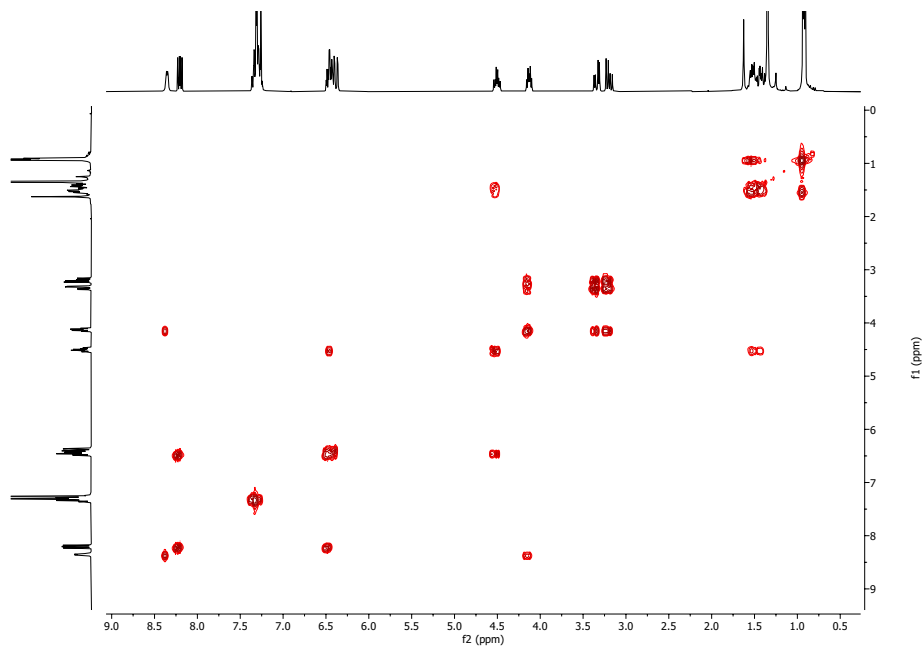


Abbildung 10.45.: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung 27.

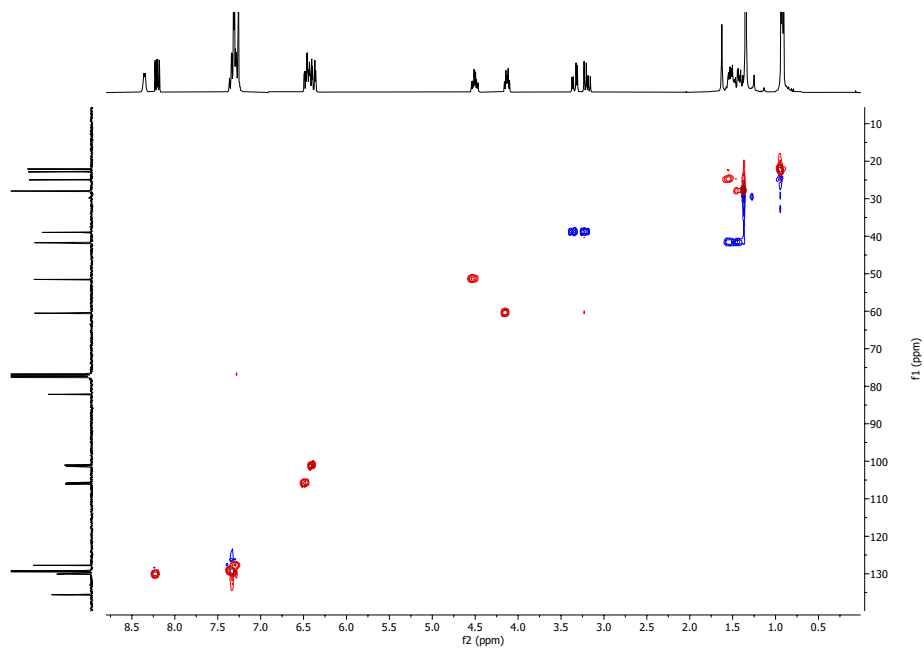


Abbildung 10.46.: ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung 27.

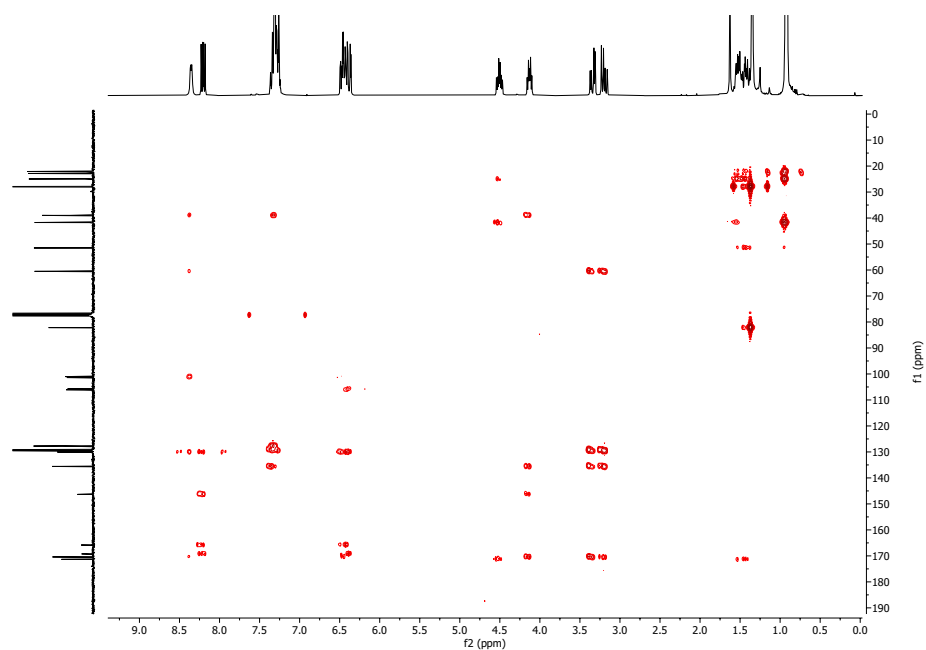


Abbildung 10.47.: ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung 27.

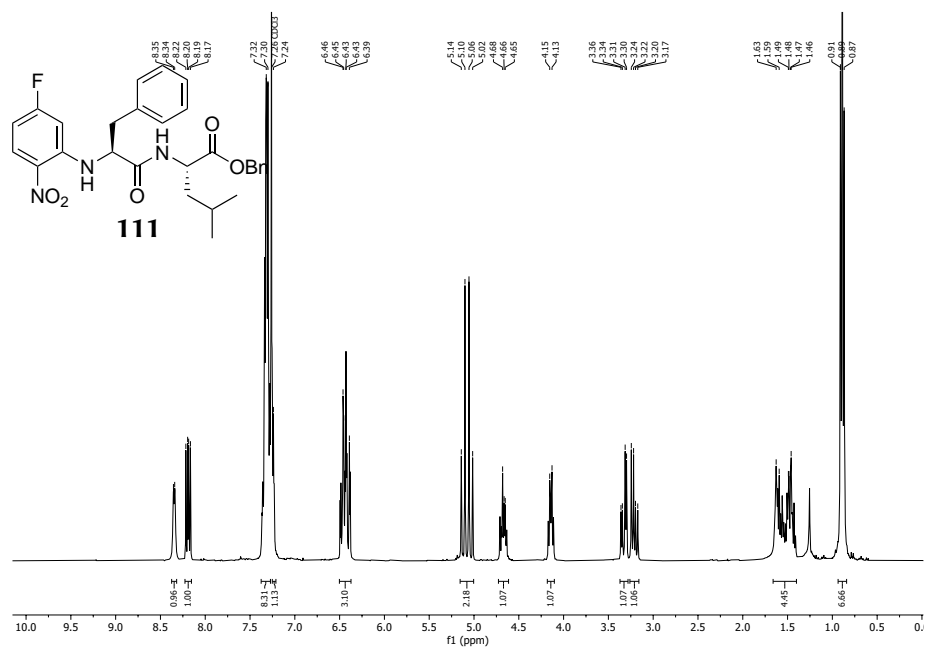


Abbildung 10.48.: ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) von Verbindung 111.

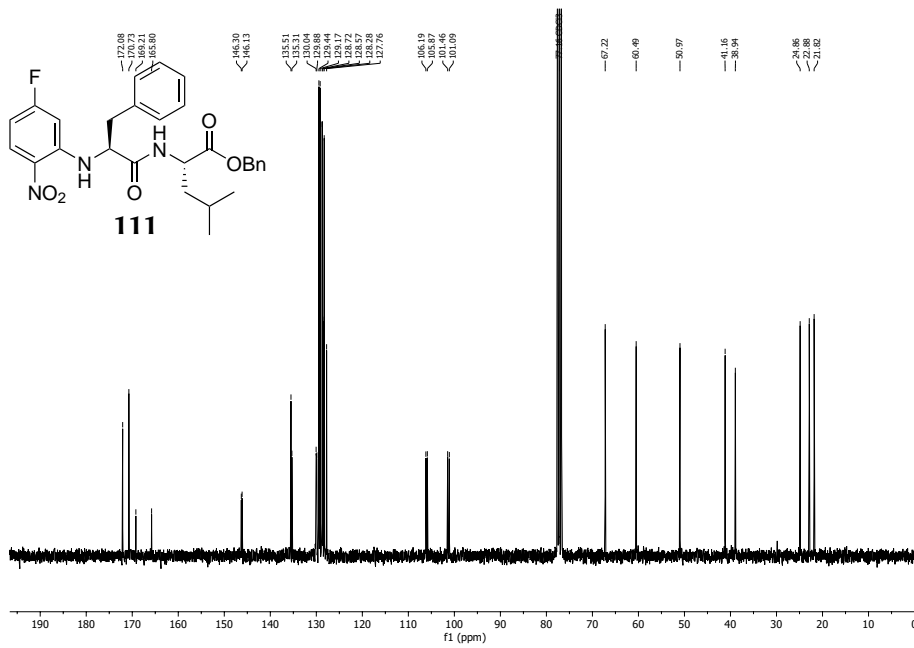


Abbildung 10.49.: ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) von Verbindung **111**.

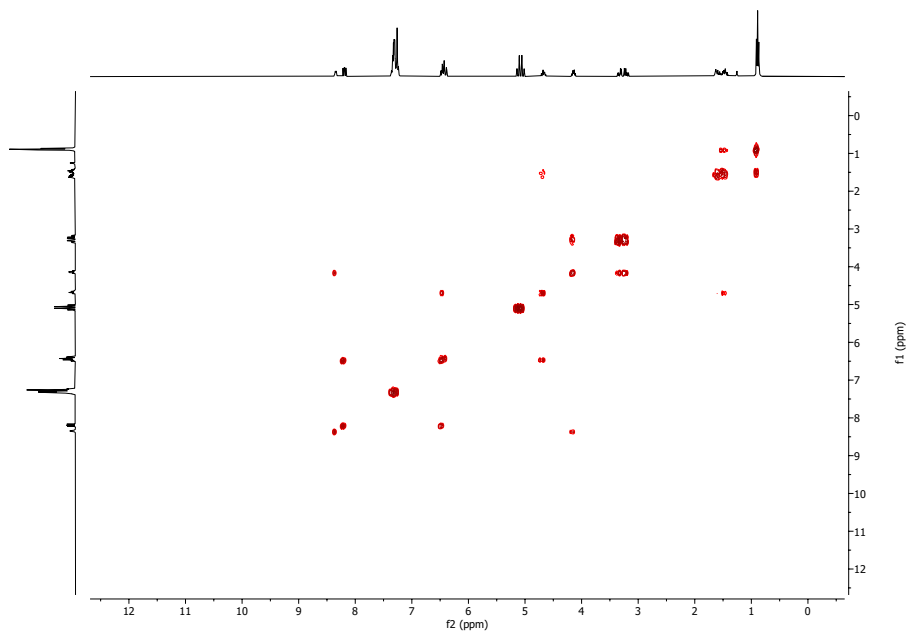


Abbildung 10.50.: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **111**.

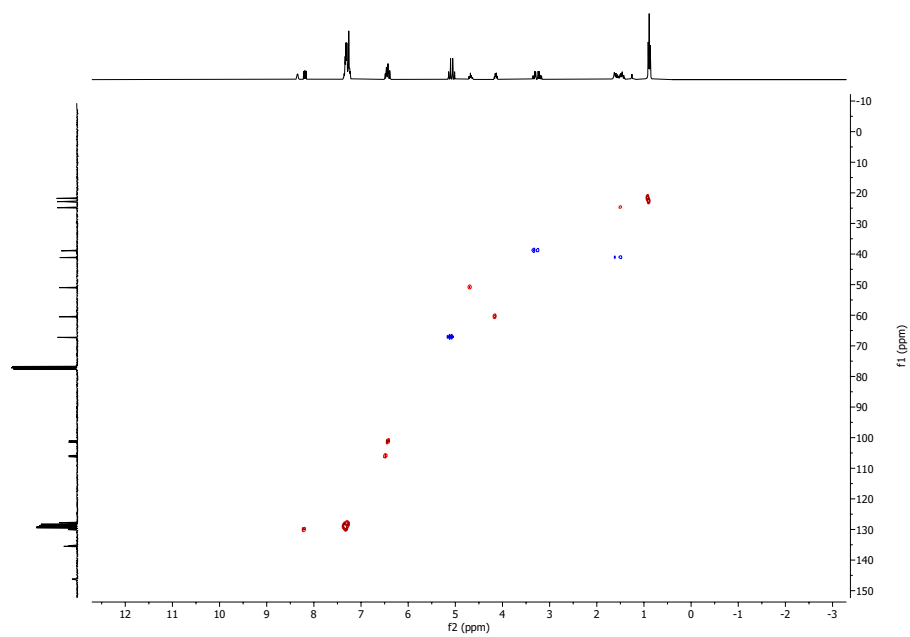


Abbildung 10.51.: ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **111**.

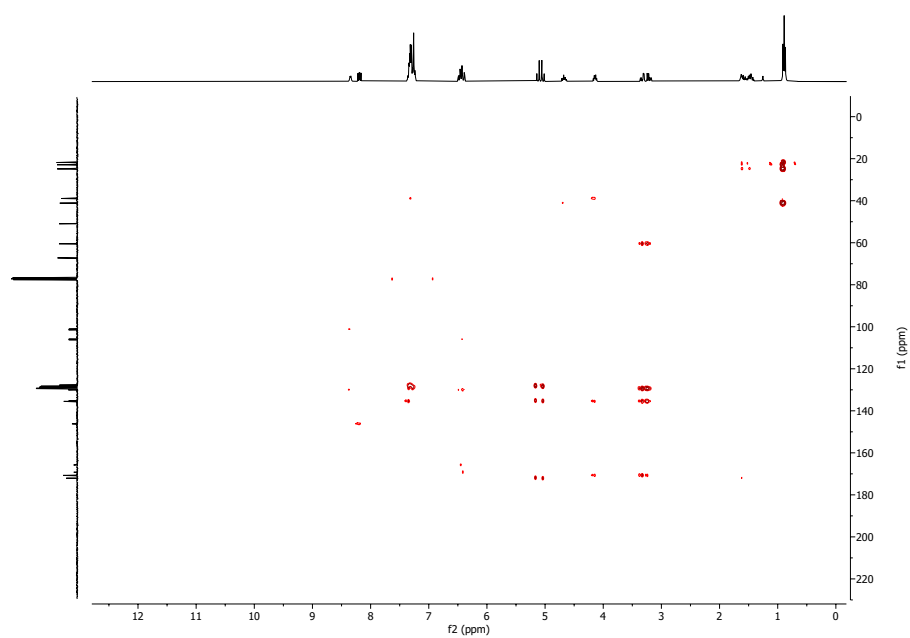


Abbildung 10.52.: ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **111**.

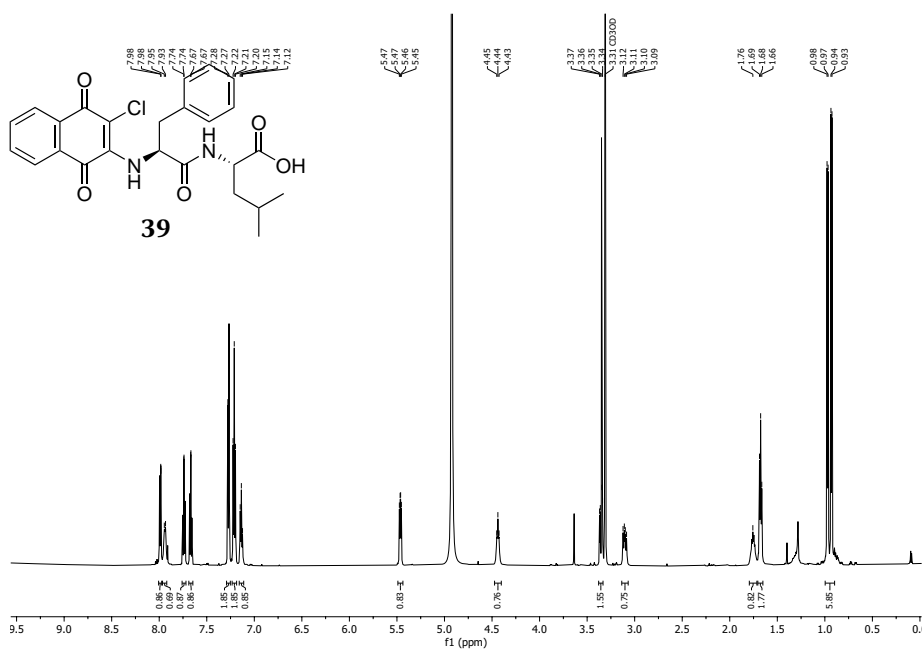


Abbildung 10.53.: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD) von Verbindung 39.

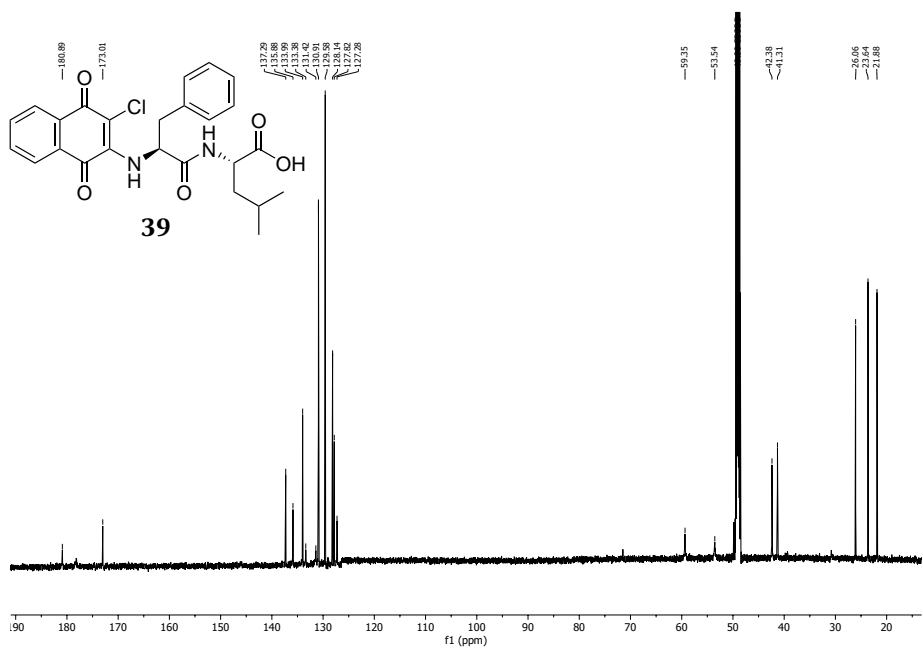


Abbildung 10.54.: $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, MeOD) von Verbindung 39.

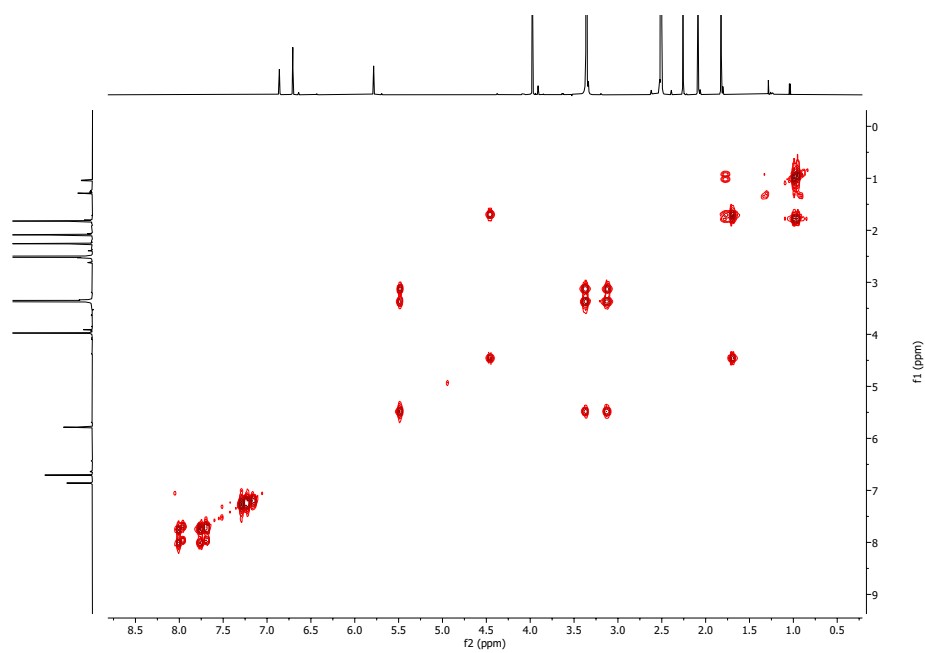


Abbildung 10.55.: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum (MeOD) von Verbindung **39**.

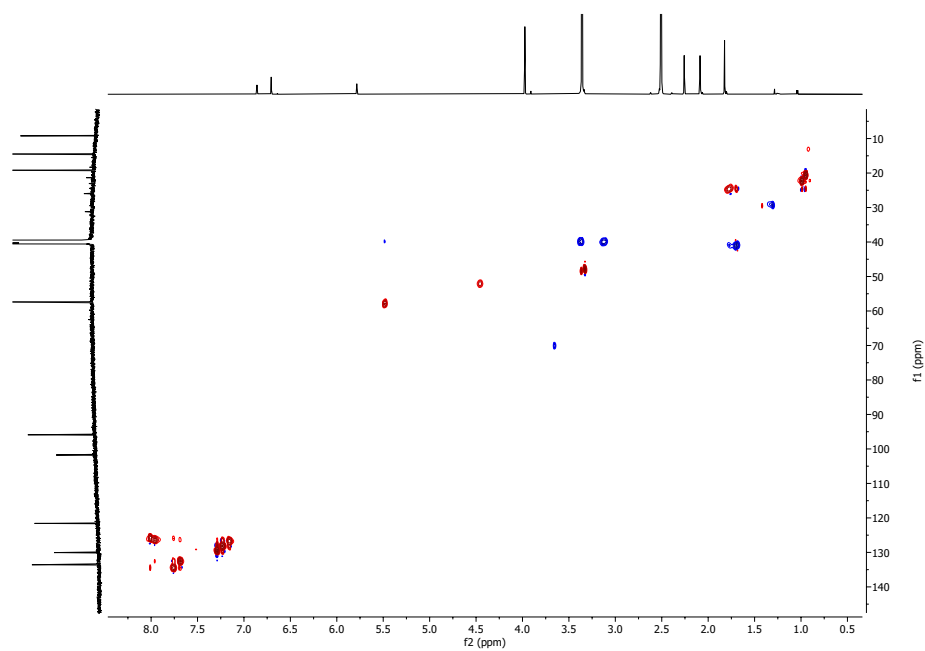


Abbildung 10.56.: ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (MeOD) von Verbindung **39**.

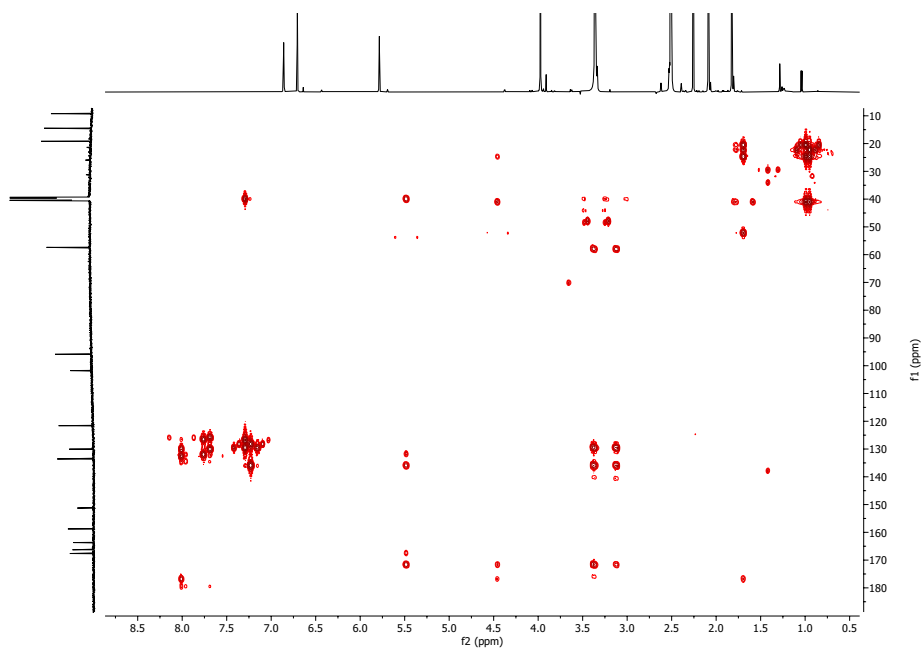


Abbildung 10.57.: ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum (MeOD) von Verbindung **39**.

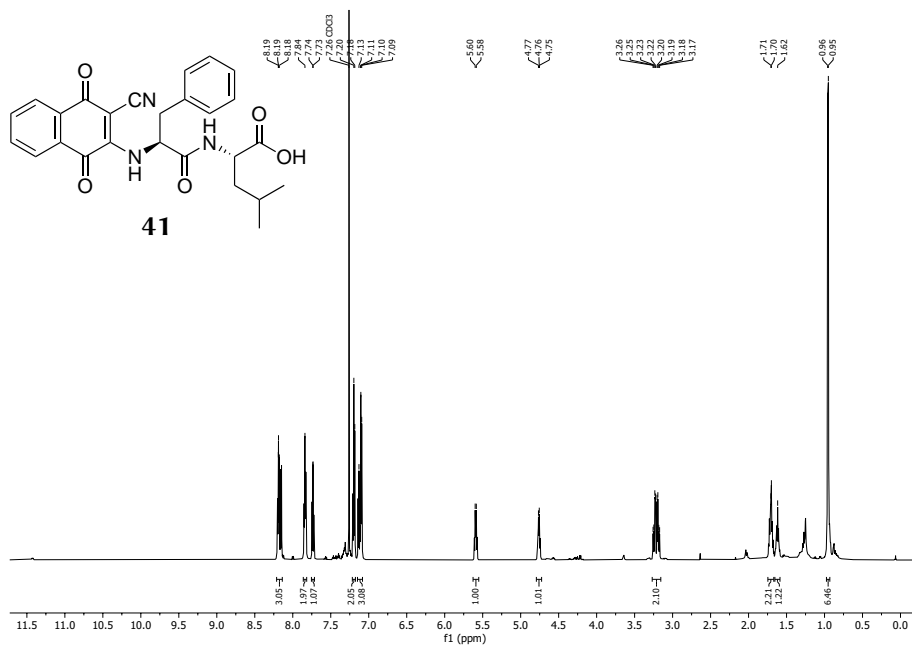


Abbildung 10.58.: ^1H -NMR (600 MHz, MeOD) von Verbindung **41**.

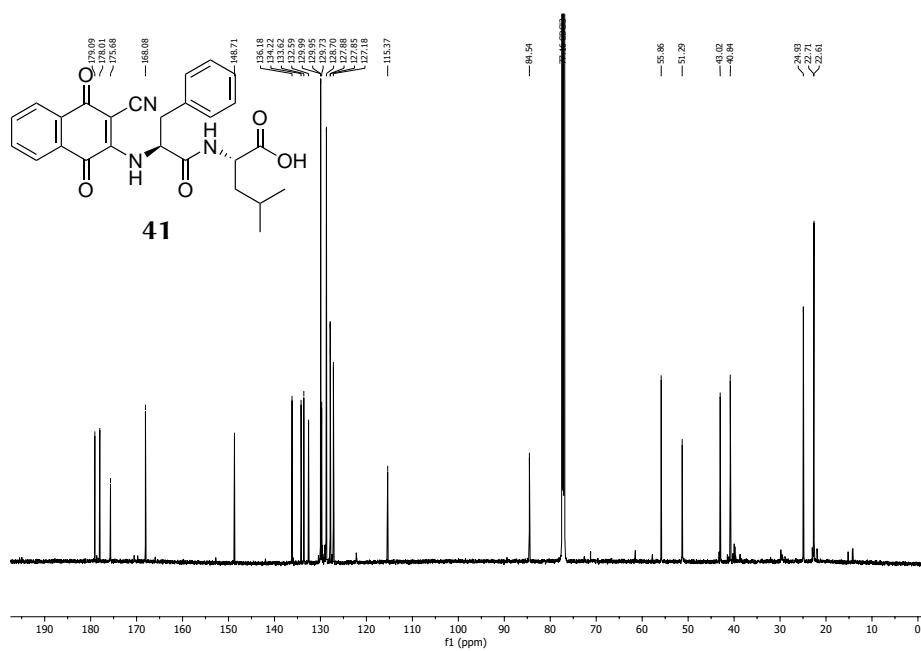


Abbildung 10.59.: ^{13}C -NMR (151 MHz, MeOD) von Verbindung **41**.

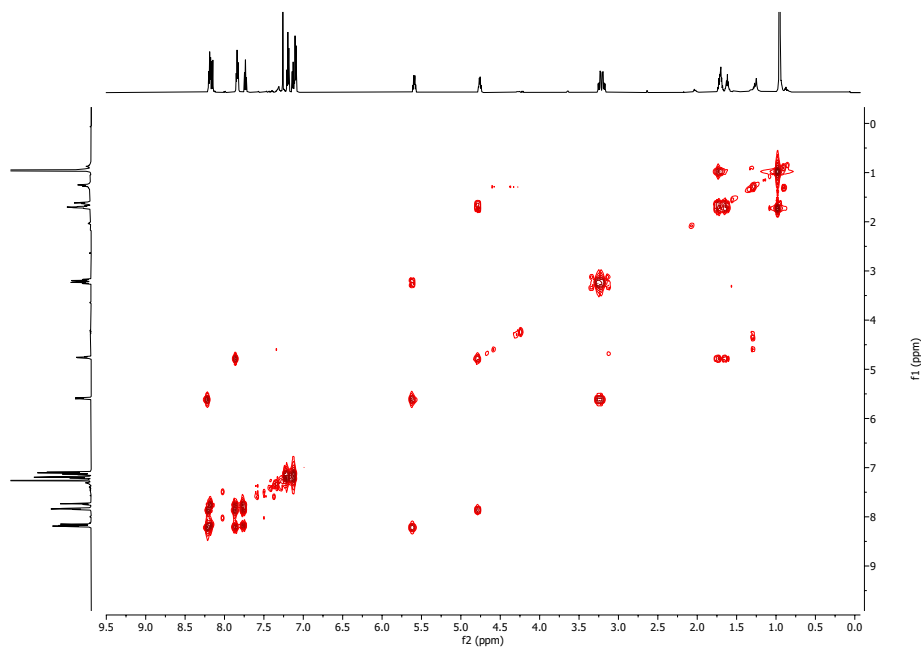


Abbildung 10.60.: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum (MeOD) von Verbindung **41**.

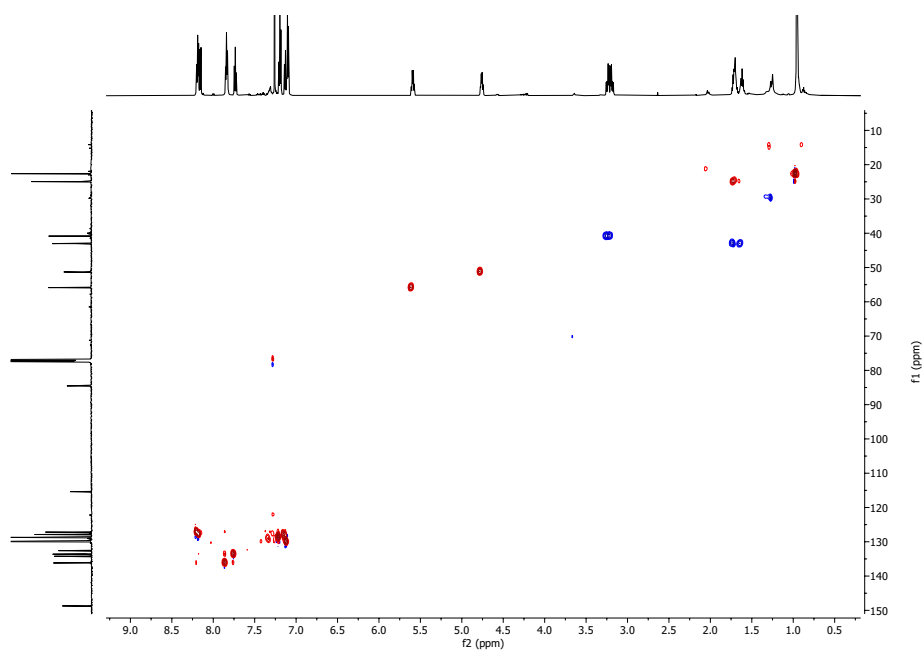


Abbildung 10.61.: ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (MeOD) von Verbindung **41**.

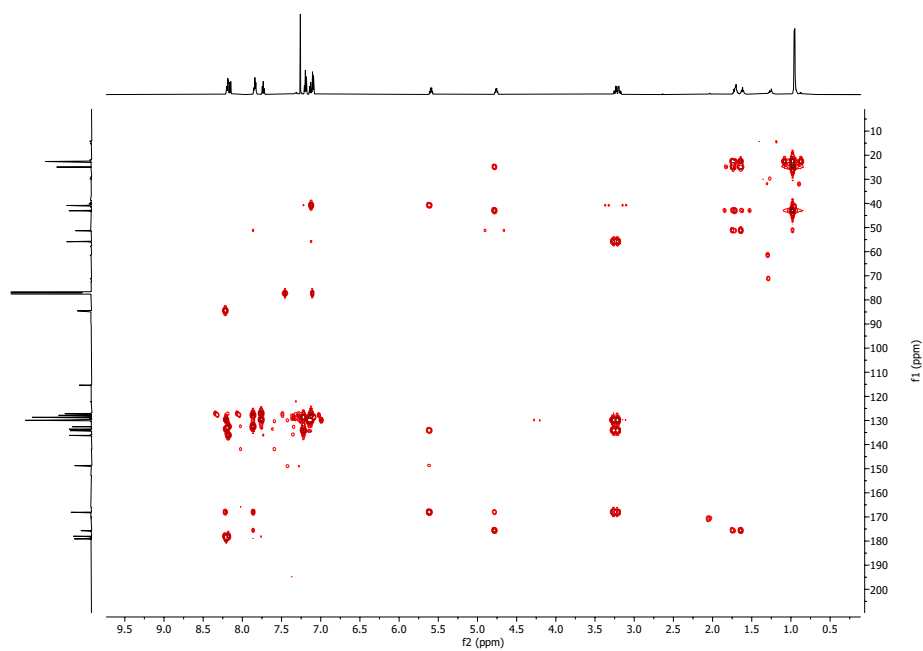


Abbildung 10.62.: ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum (MeOD) von Verbindung **41**.

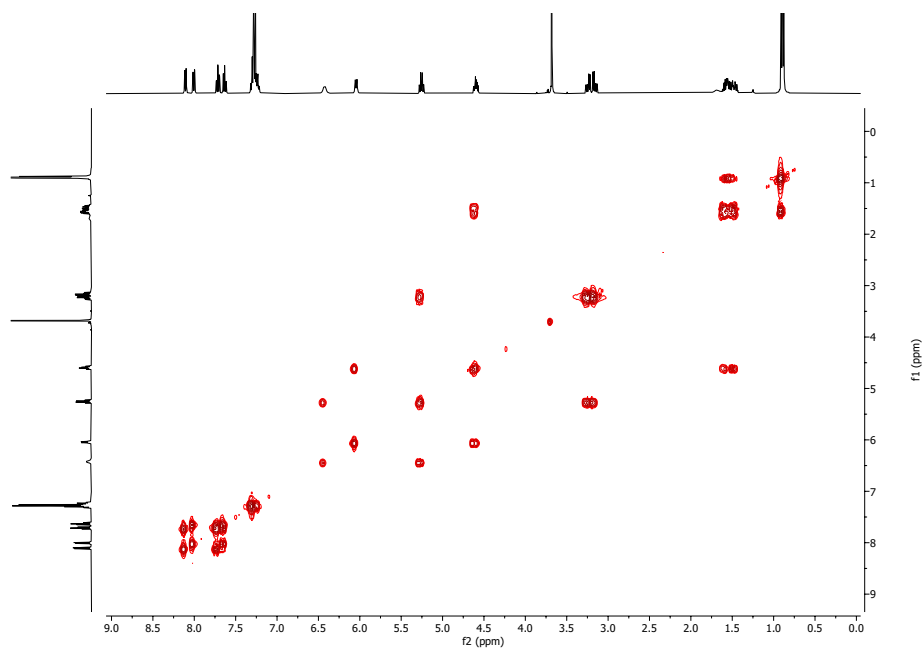


Abbildung 10.65.: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung 37.

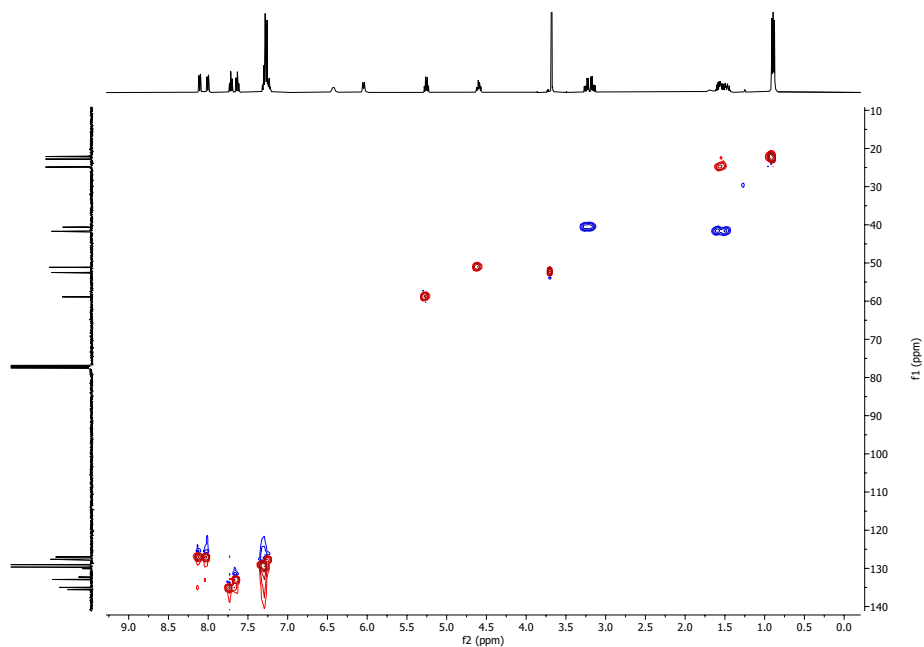


Abbildung 10.66.: ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung 37.

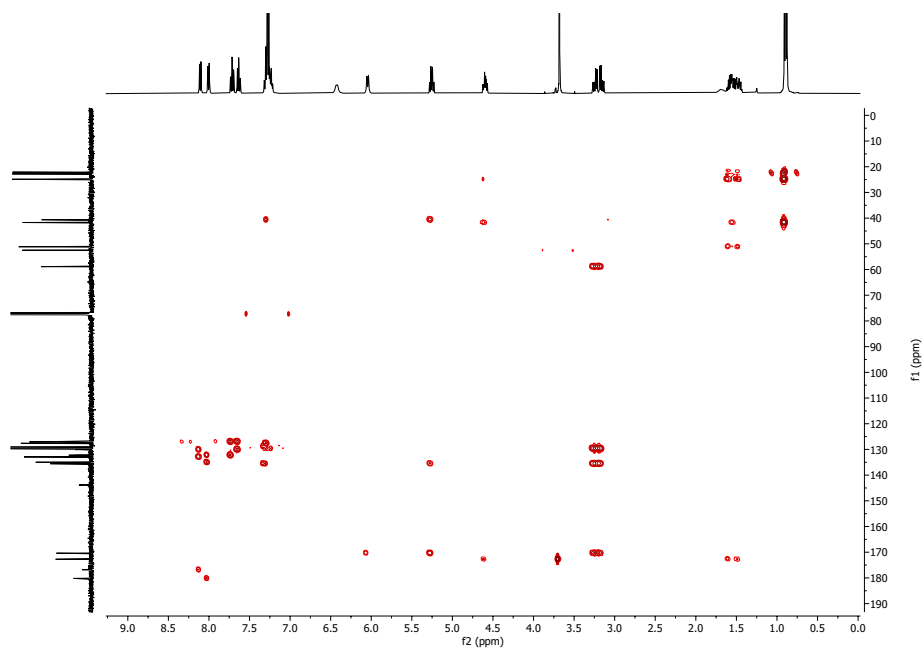


Abbildung 10.67.: ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung 37.

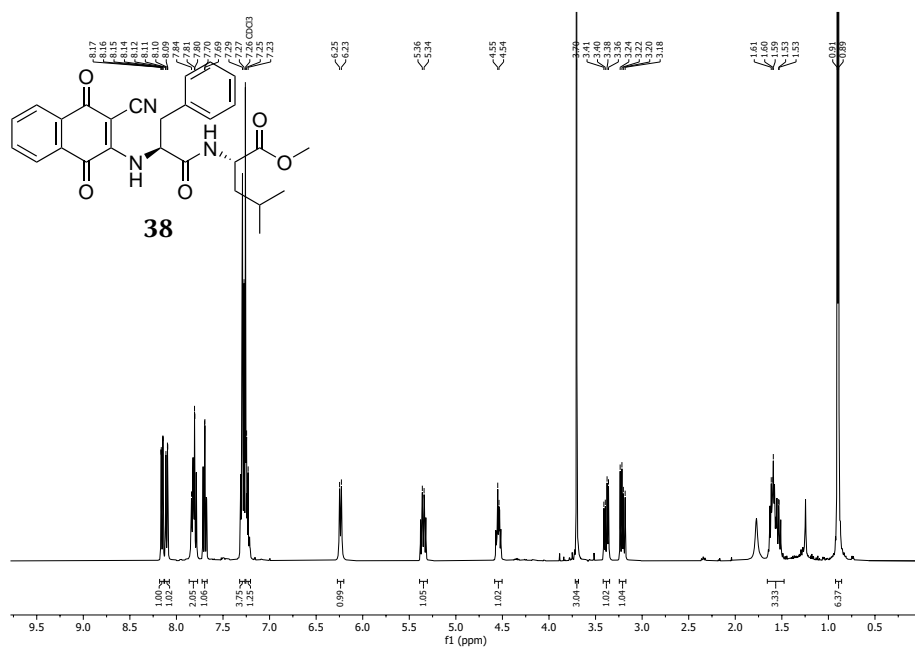


Abbildung 10.68.: ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) von Verbindung 38.

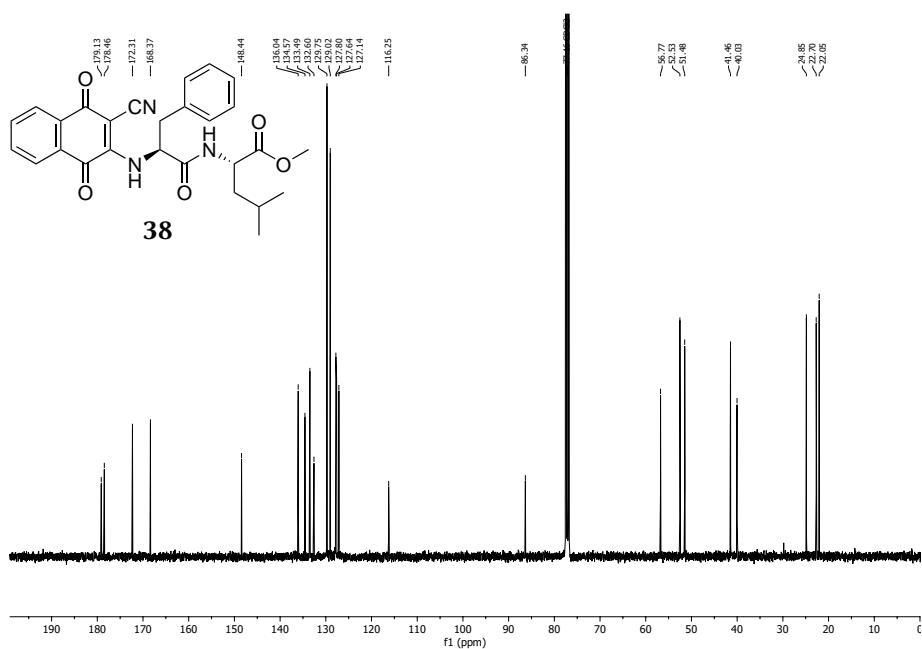


Abbildung 10.69.: ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3) von Verbindung **38**.

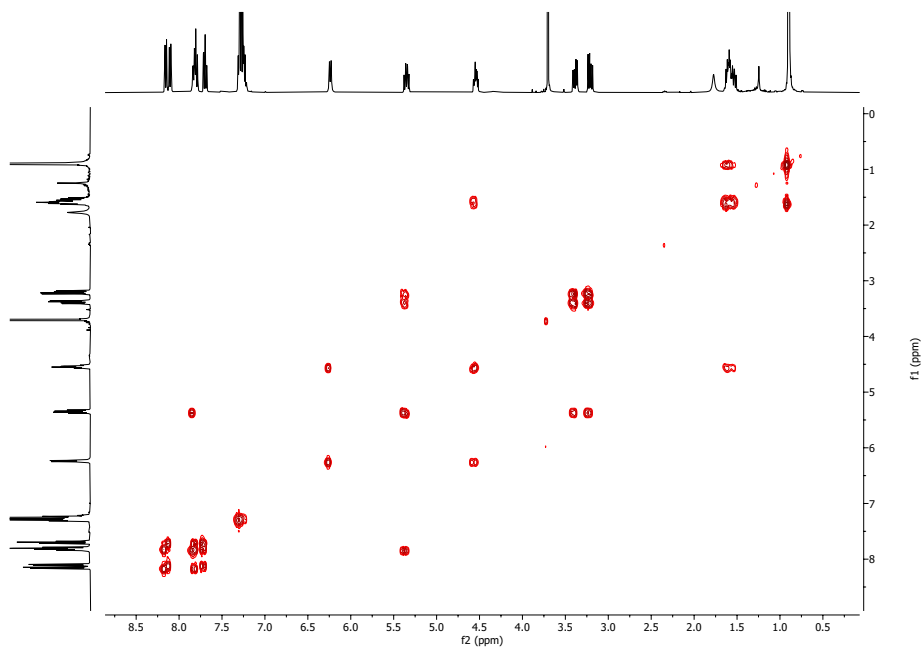


Abbildung 10.70.: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **38**.

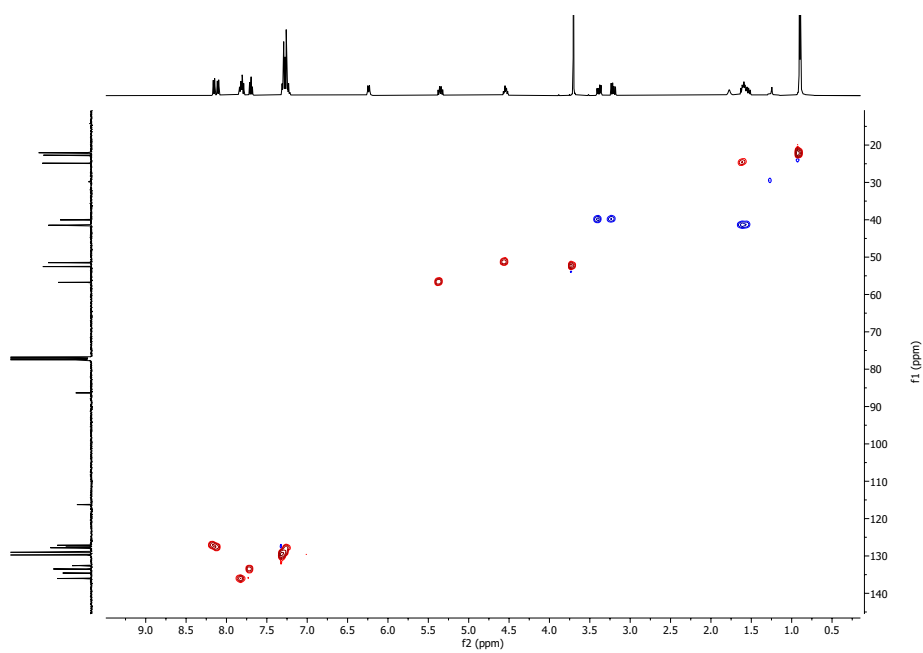


Abbildung 10.71.: ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **38**.

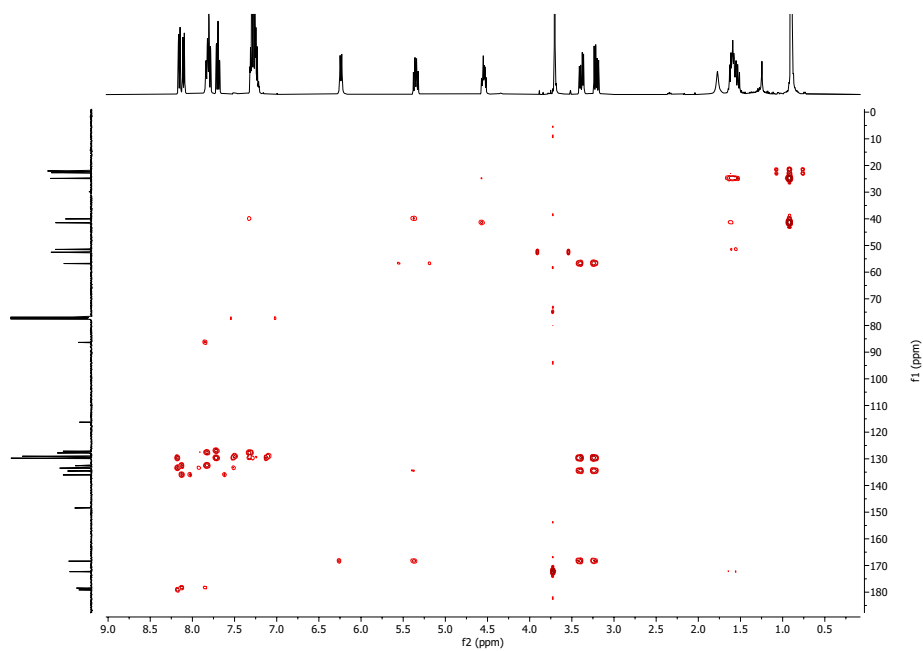


Abbildung 10.72.: ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **38**.

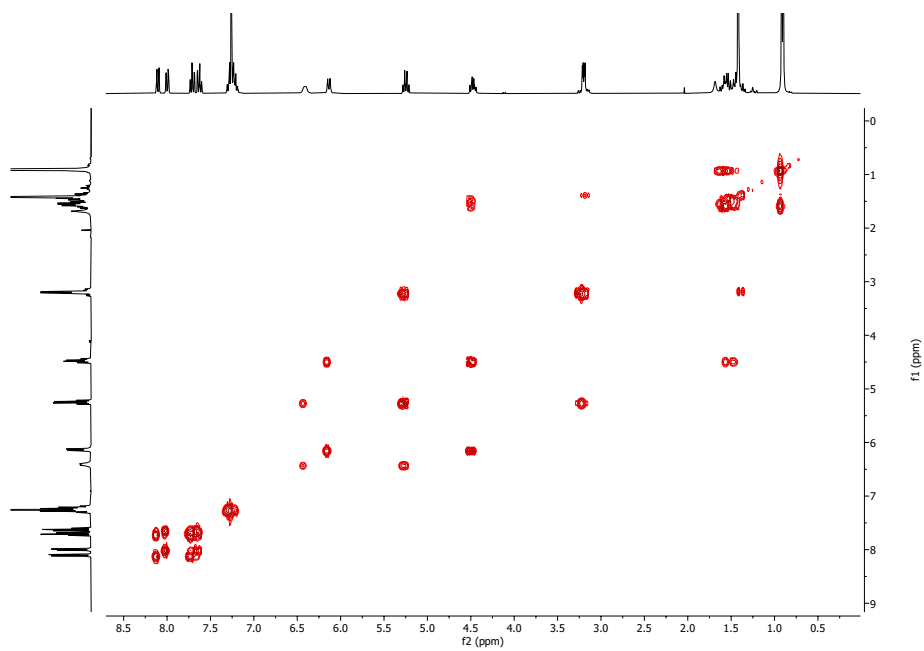


Abbildung 10.75.: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **40**.

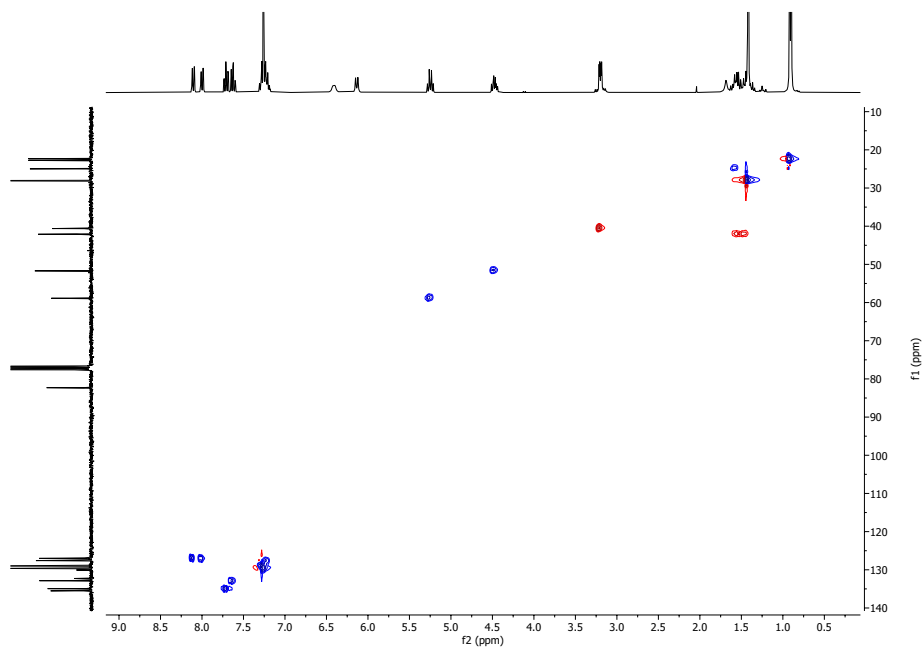


Abbildung 10.76.: ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **40**.

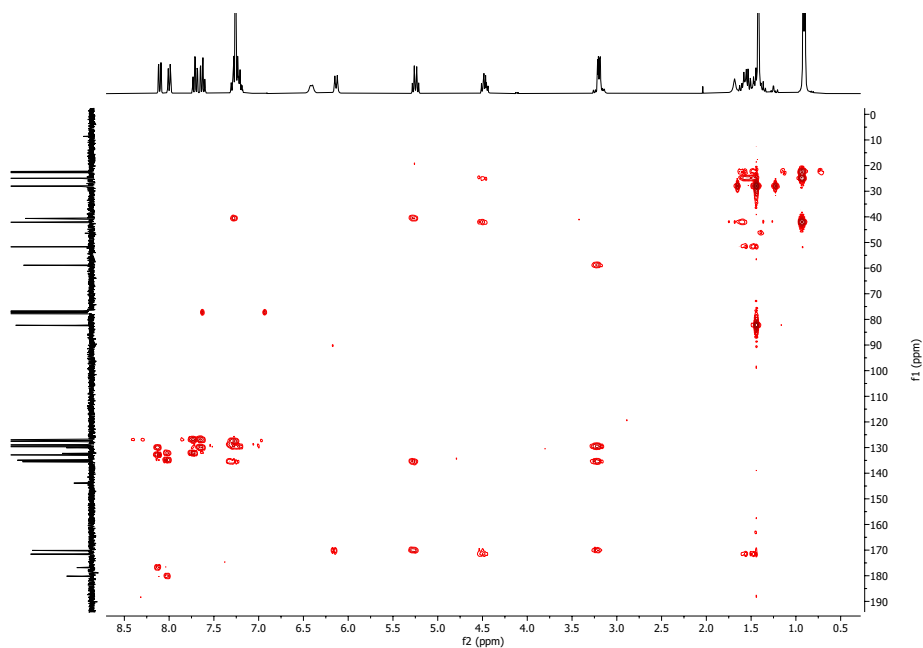


Abbildung 10.77.: ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **40**.

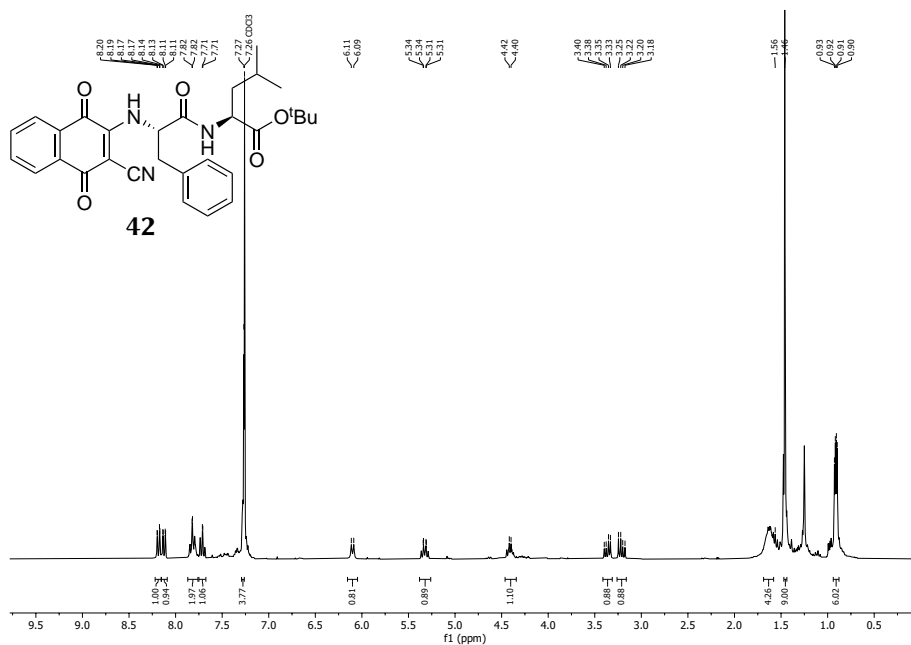


Abbildung 10.78.: ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) von Verbindung **42**.

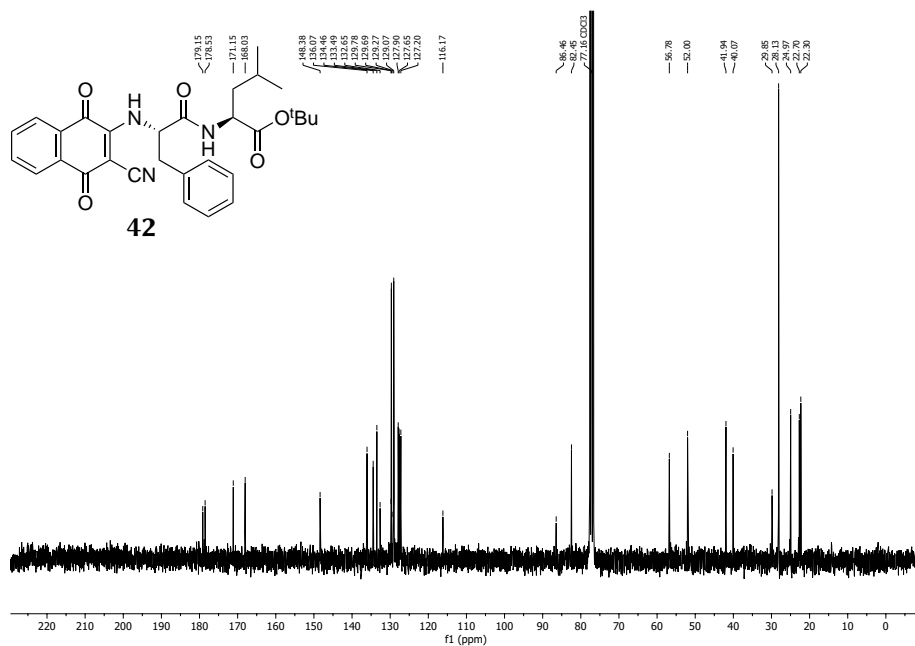


Abbildung 10.79.: ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) von Verbindung 42.

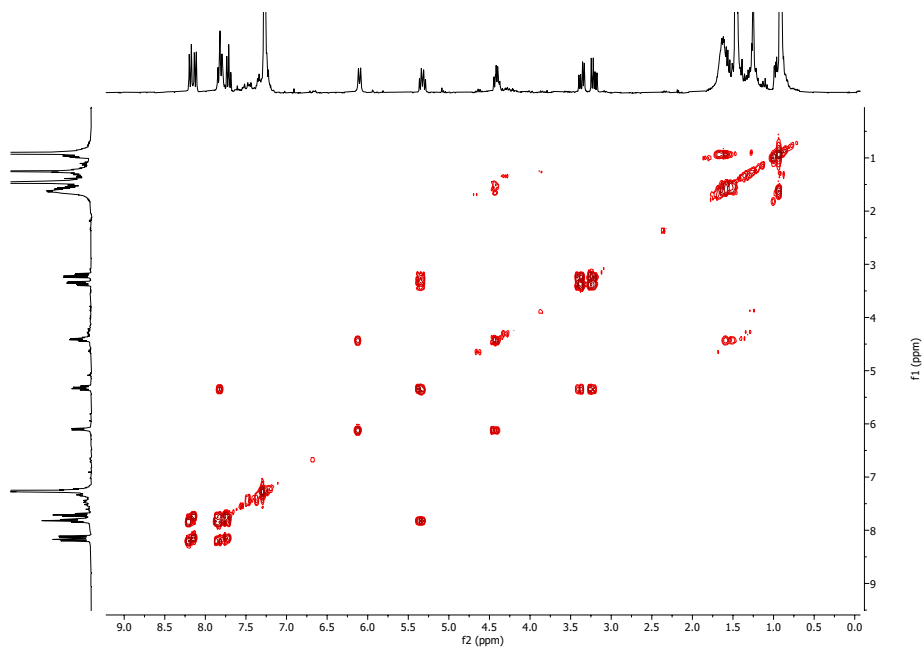


Abbildung 10.80.: ¹H-¹H-COSY-Spektrum (CDCl₃) von Verbindung 42.

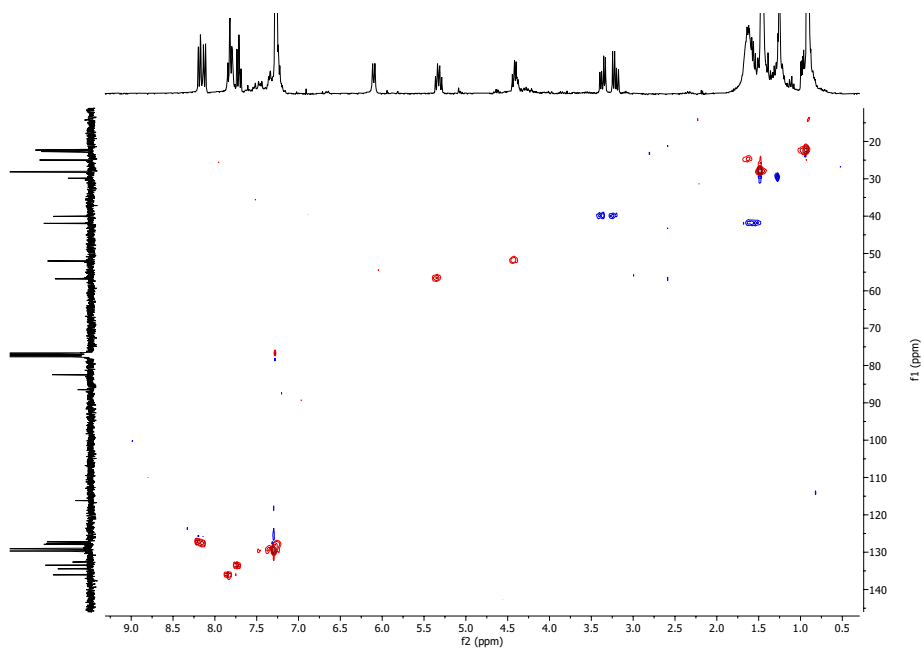


Abbildung 10.81.: ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **42**.

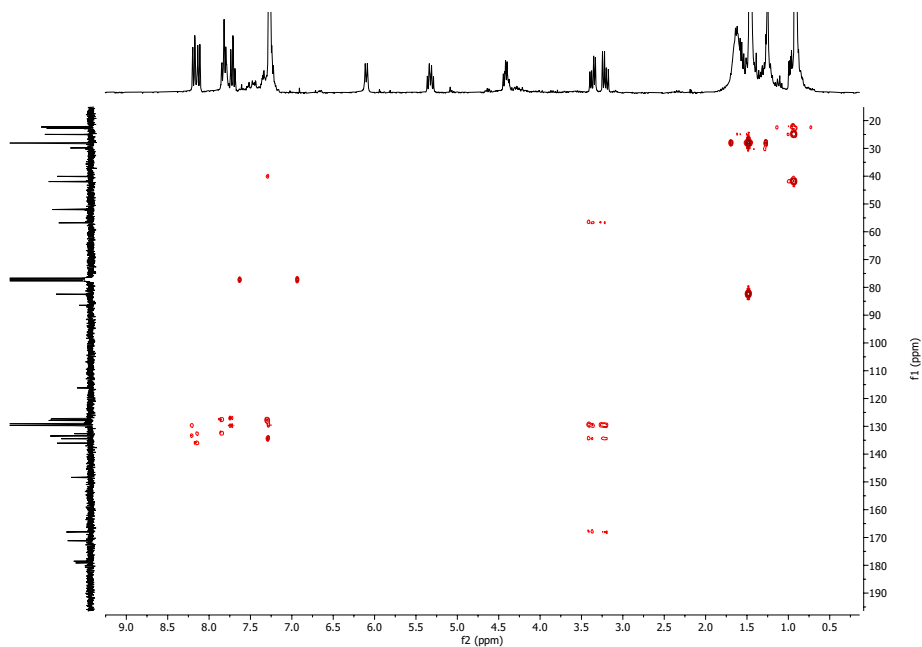


Abbildung 10.82.: ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **42**.

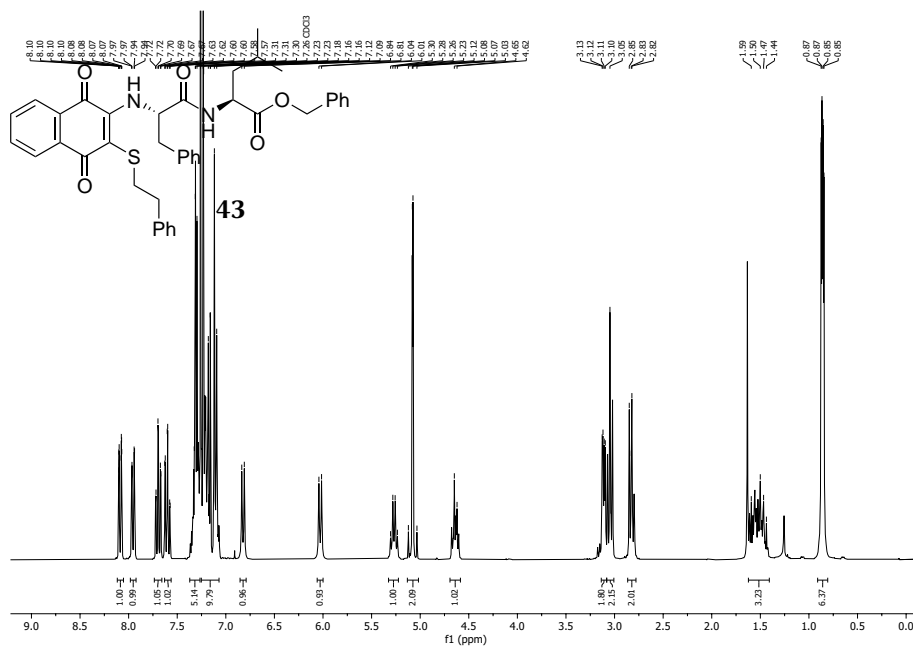


Abbildung 10.83.: $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) von Verbindung **43**.

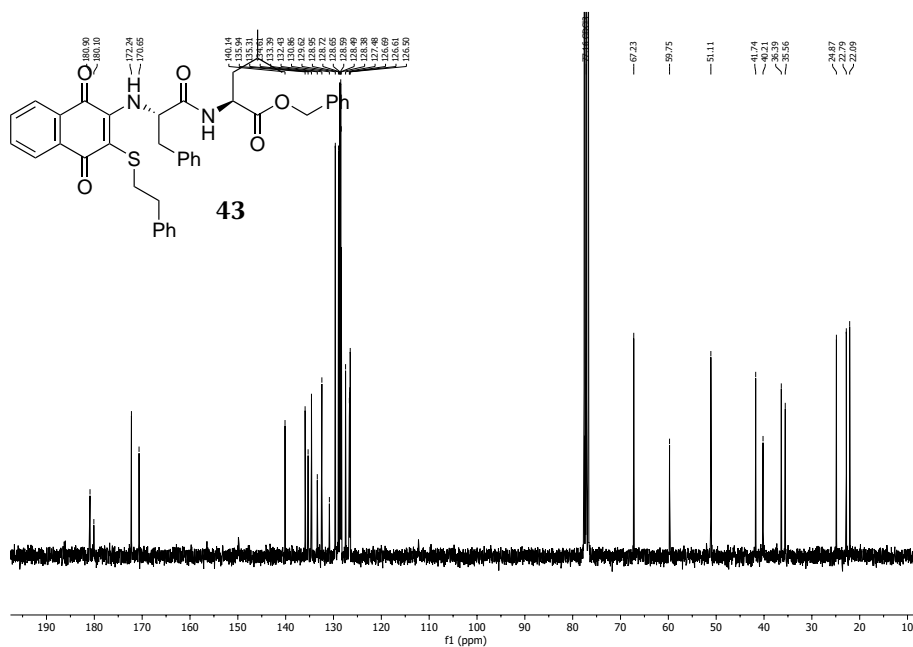


Abbildung 10.84.: $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) von Verbindung **43**.

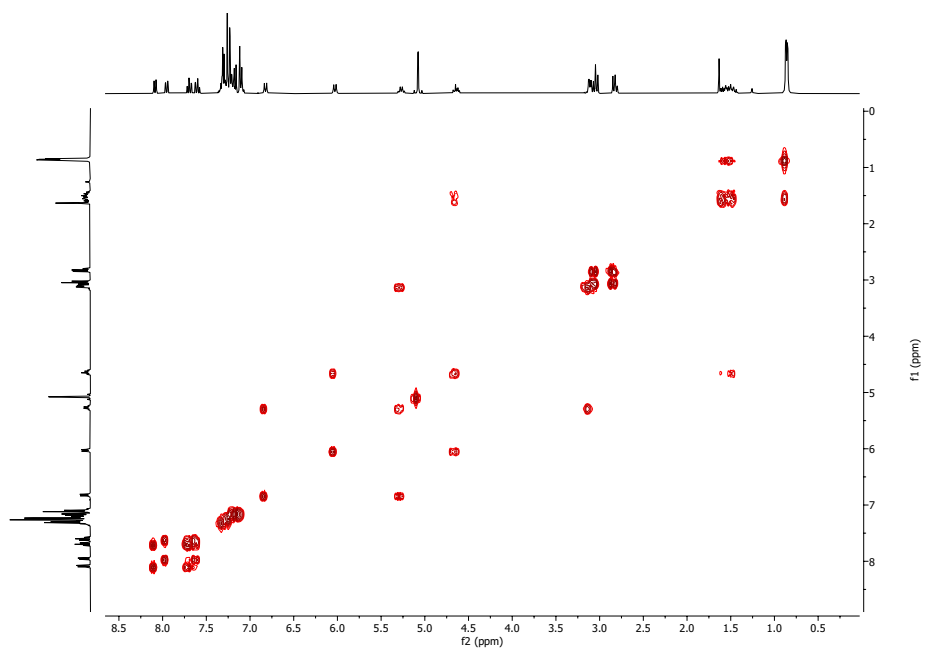


Abbildung 10.85.: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **43**.

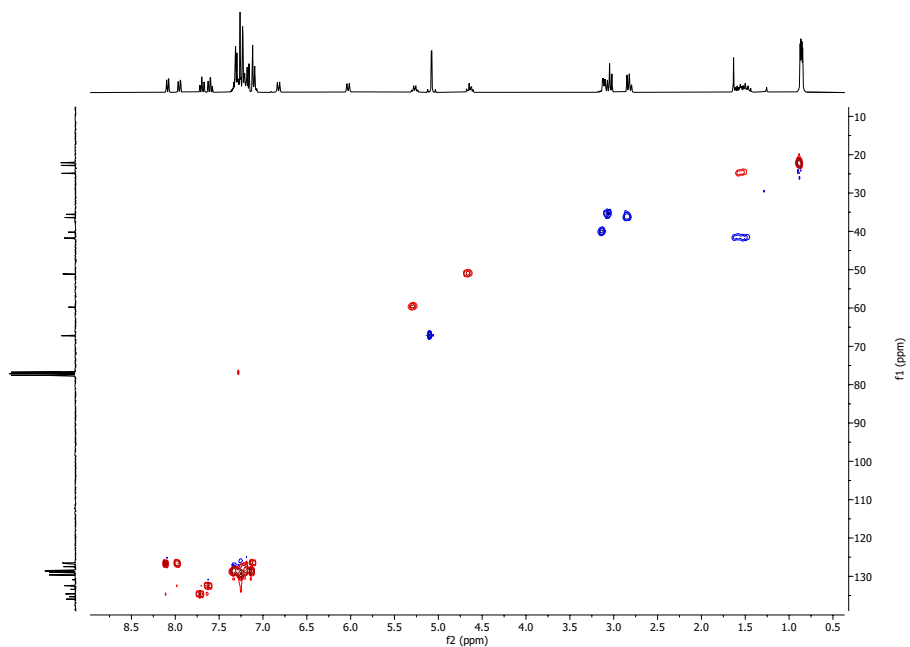


Abbildung 10.86.: ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **43**.

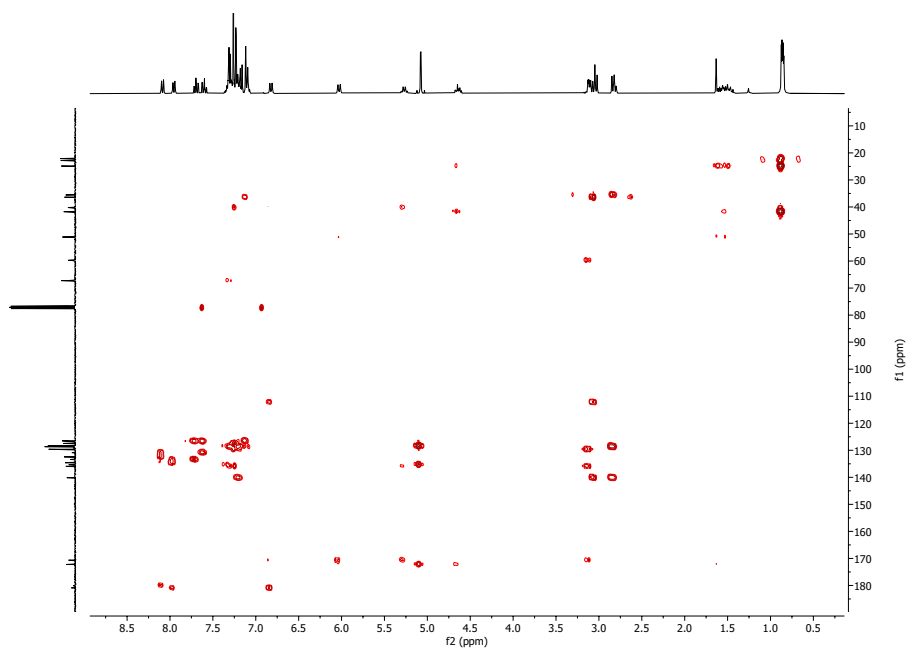


Abbildung 10.87.: ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **43**.

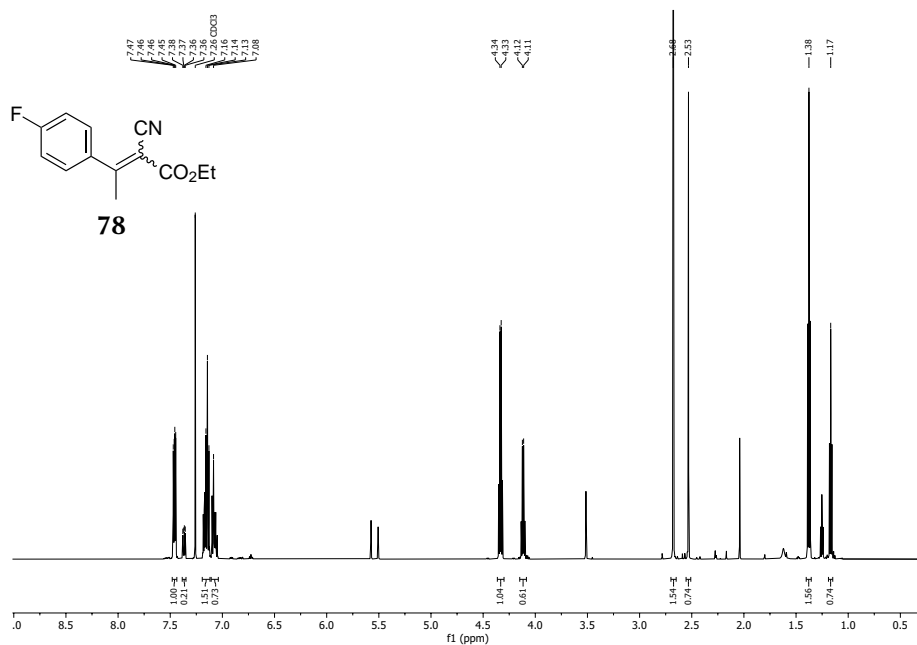


Abbildung 10.88.: ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) von Verbindung **78**.

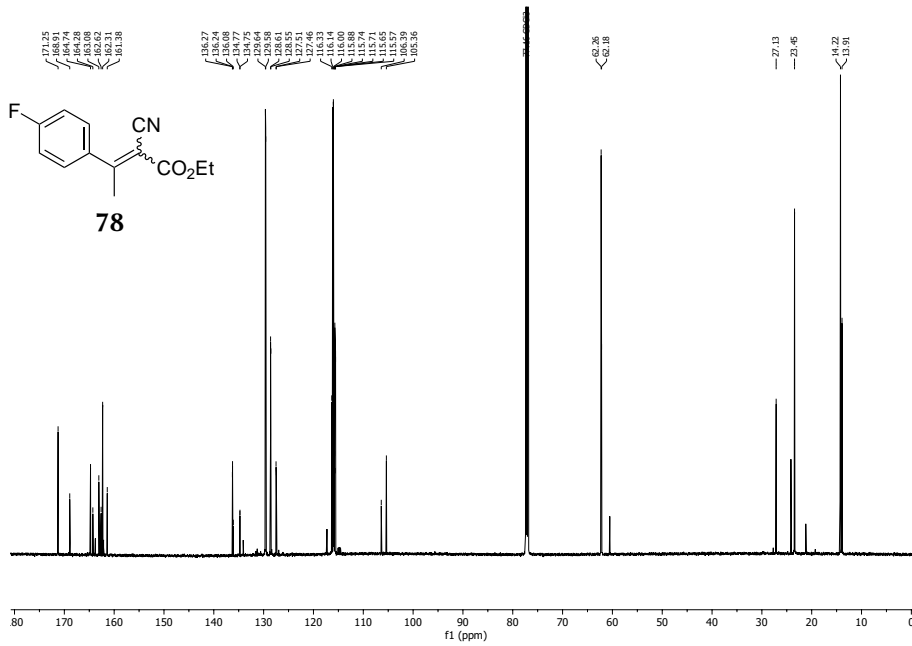


Abbildung 10.89.: ^{13}C -NMR (151 MHz, CDCl_3) von Verbindung 78.

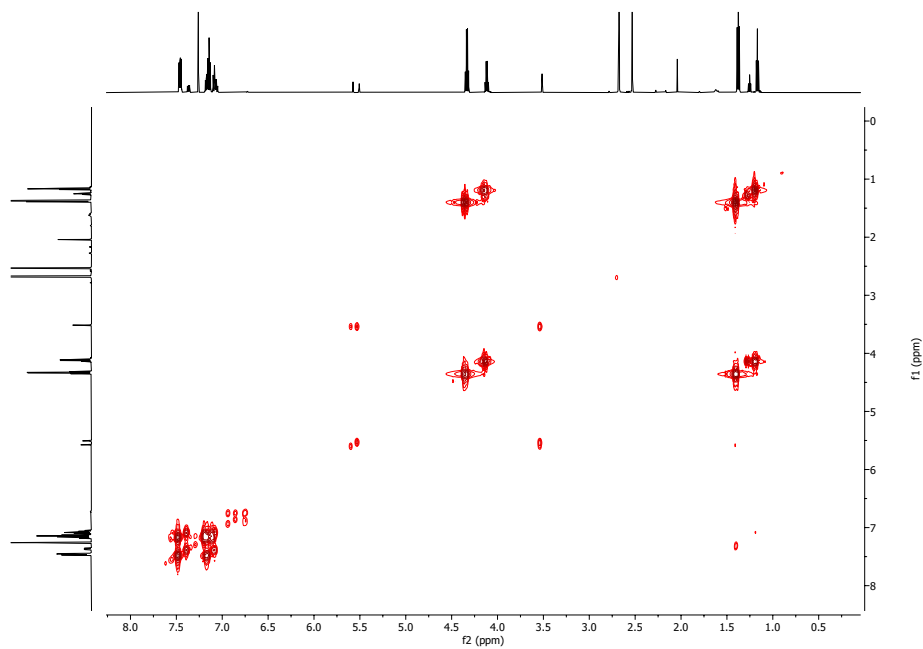


Abbildung 10.90.: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung 78.

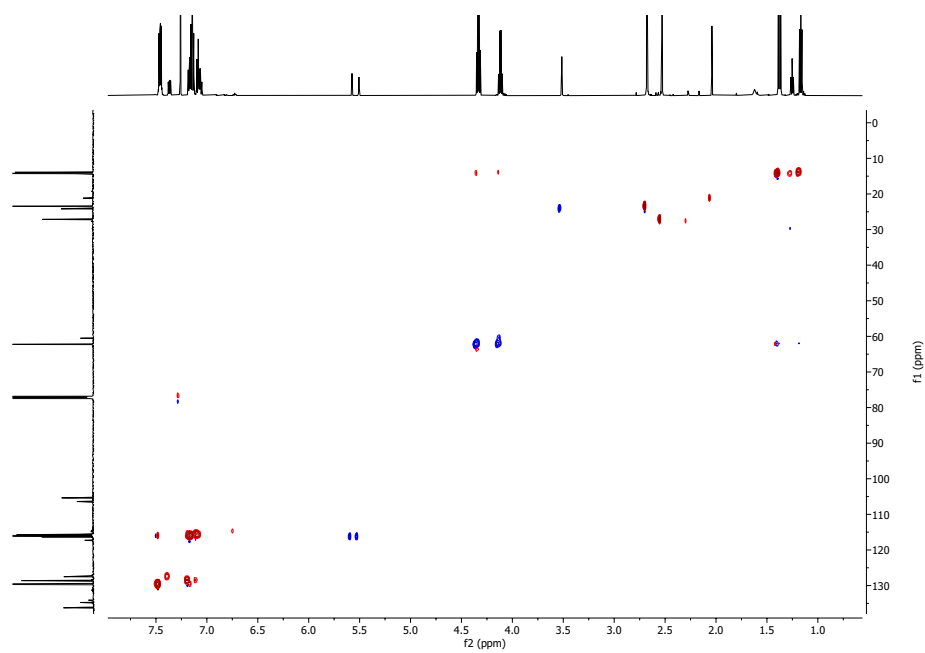


Abbildung 10.91.: ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **78**.

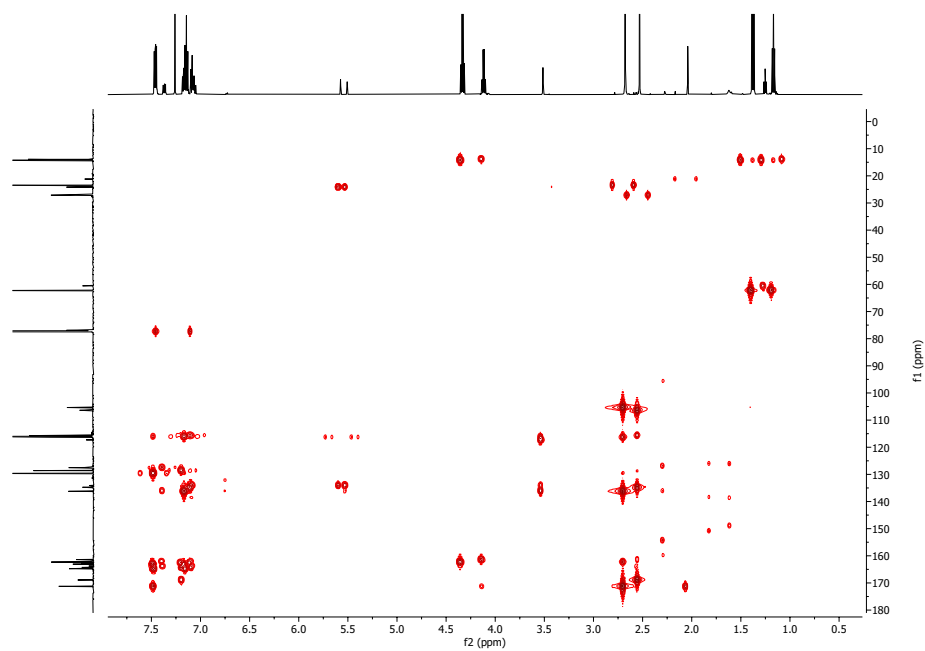


Abbildung 10.92.: ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **78**.

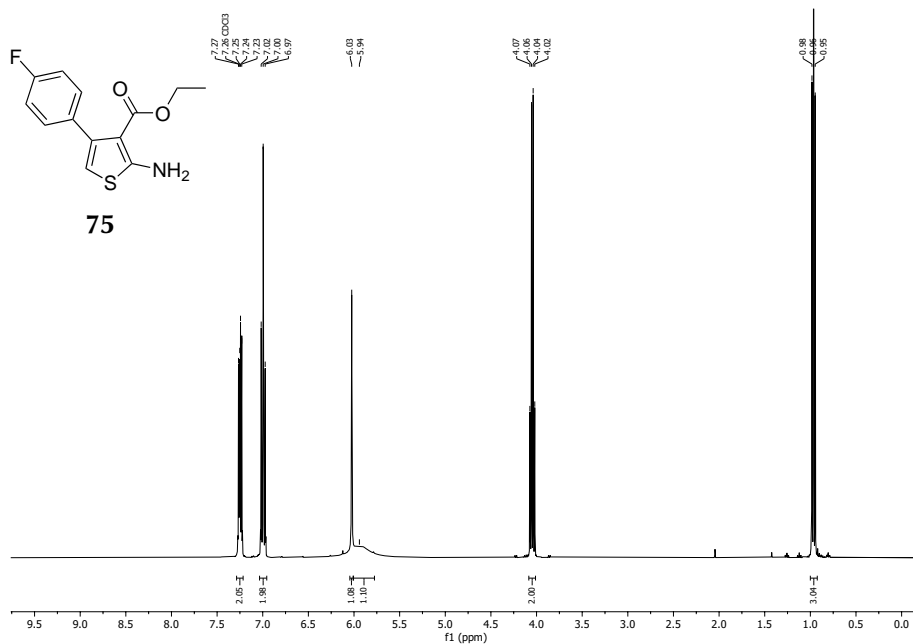


Abbildung 10.93.: ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) von Verbindung 75.

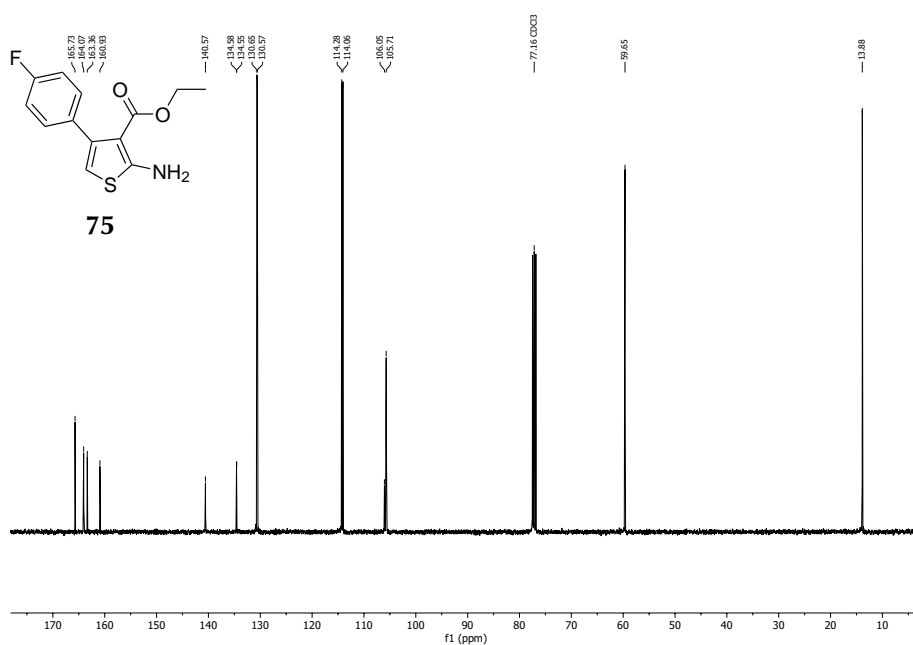


Abbildung 10.94.: ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) von Verbindung 75.

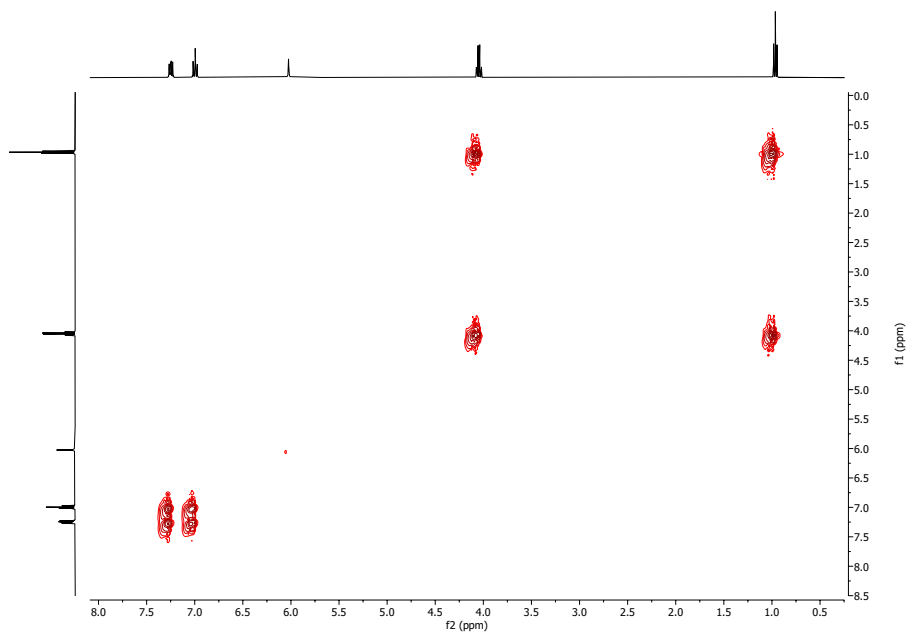


Abbildung 10.95.: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung 75.

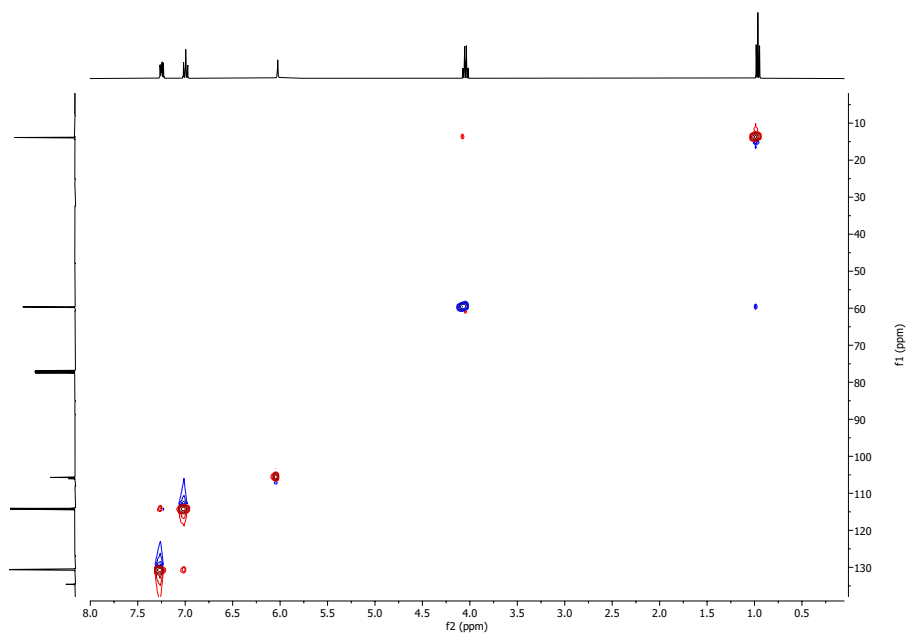


Abbildung 10.96.: ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung 75.

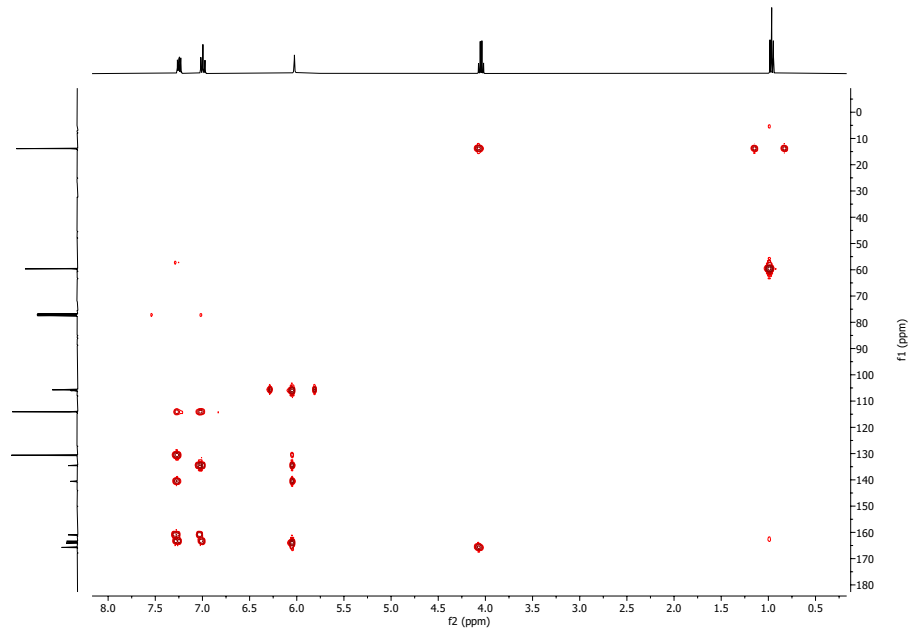


Abbildung 10.97.: ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung 75.

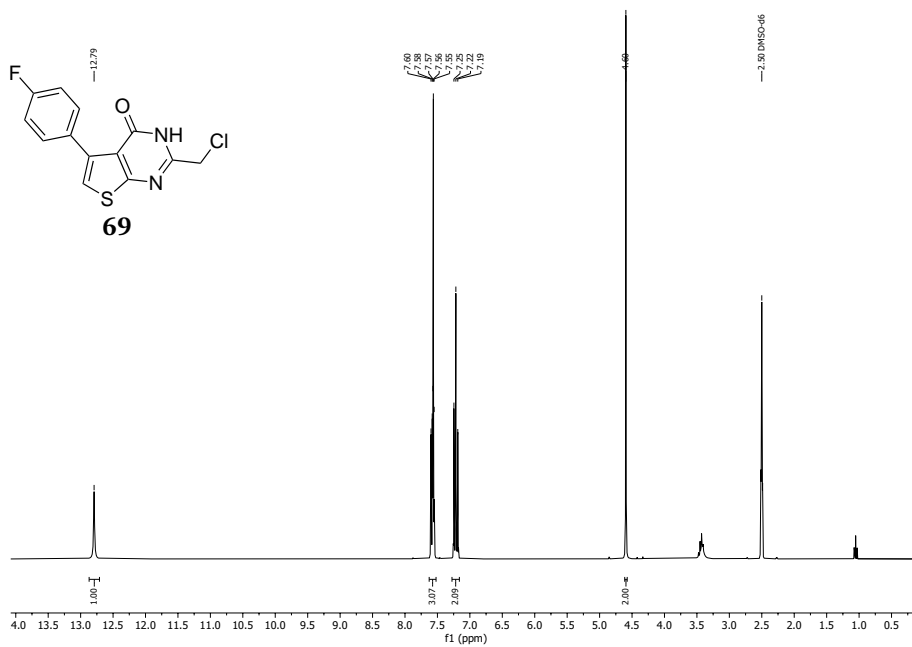


Abbildung 10.98.: ^1H -NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) von Verbindung 69.

Anhang

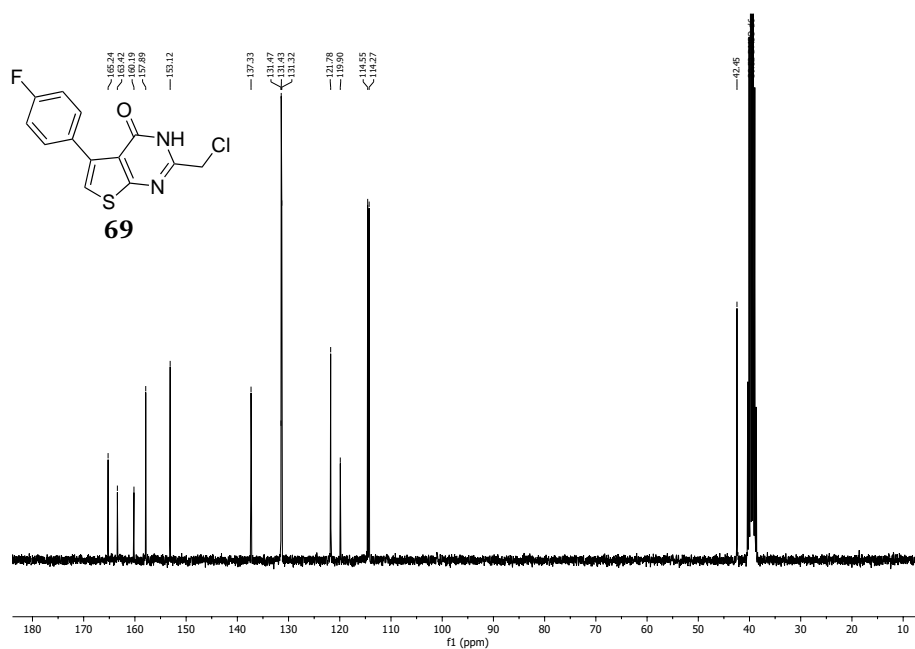


Abbildung 10.99.: ^{13}C -NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) von Verbindung **69**.

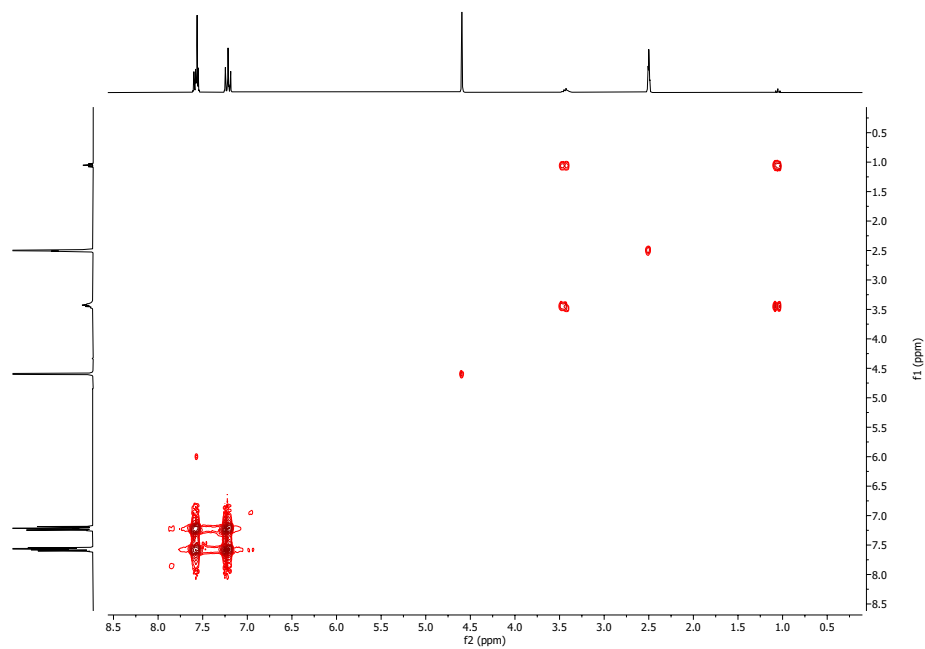


Abbildung 10.100.: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum ($\text{DMSO}-d_6$) von Verbindung **69**.

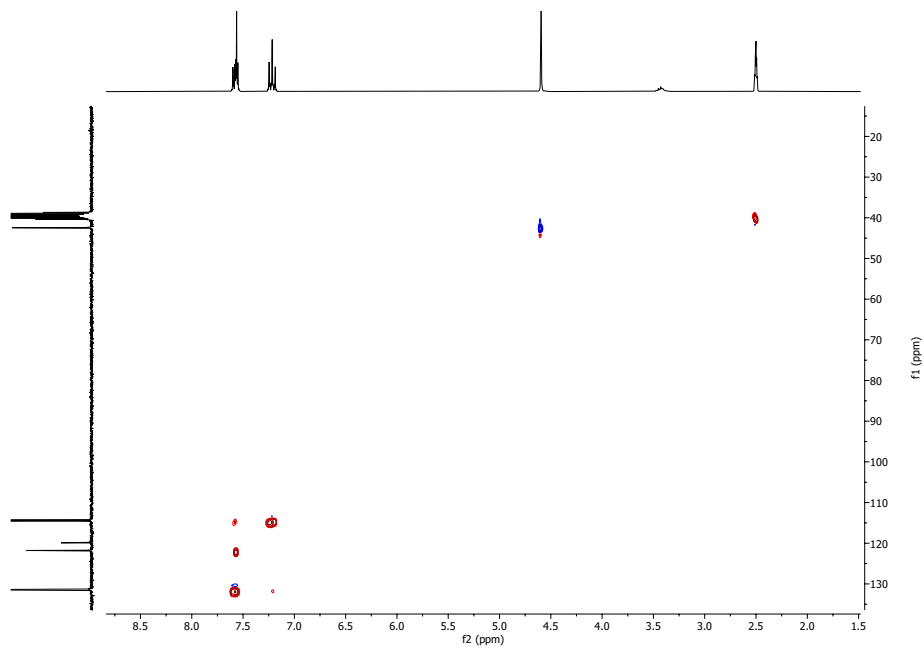


Abbildung 10.101.: ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum ($\text{DMSO}-d_6$) von Verbindung **69**.

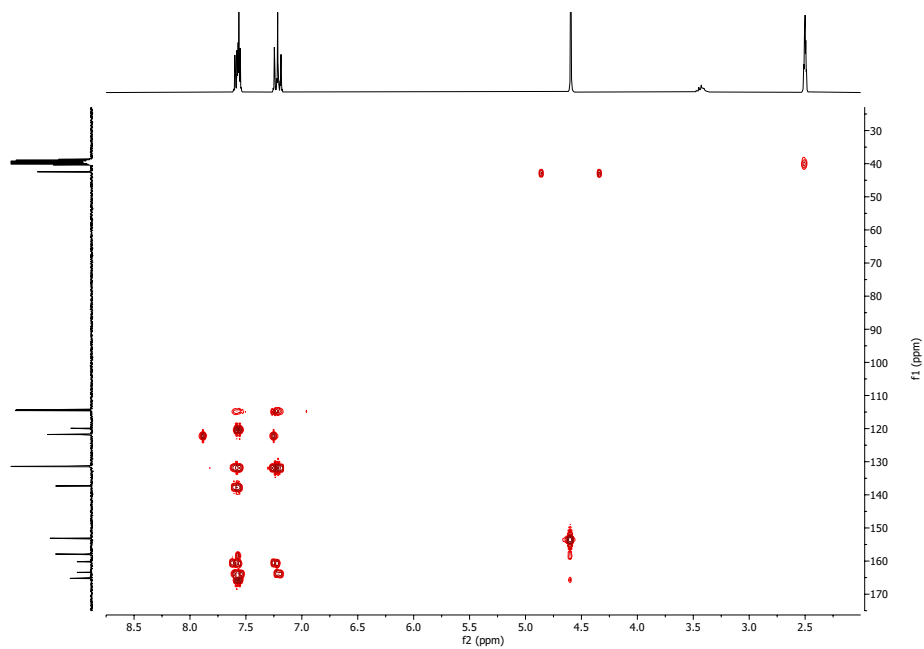


Abbildung 10.102.: ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum ($\text{DMSO}-d_6$) von Verbindung **69**.

Anhang

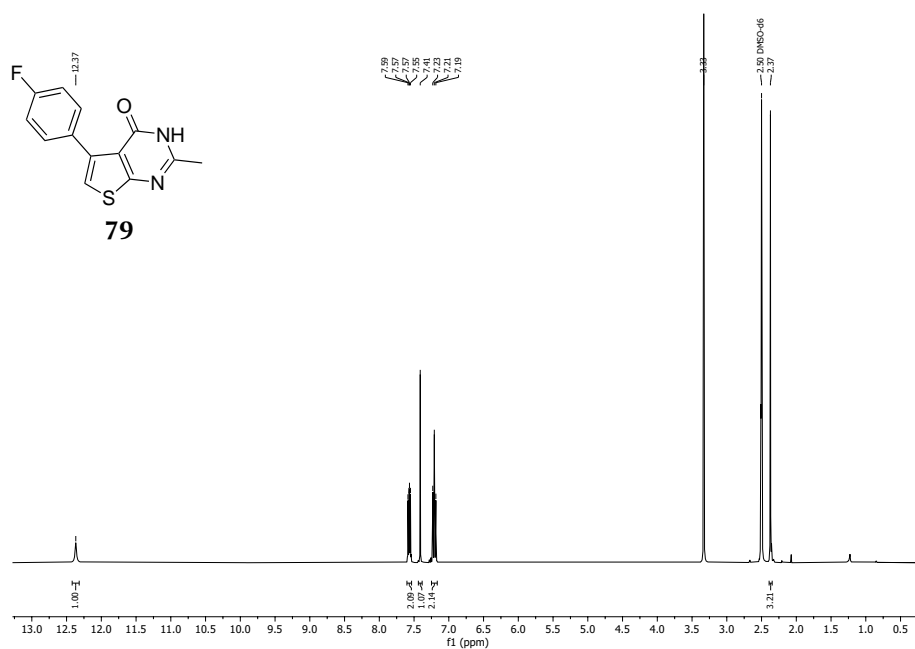


Abbildung 10.103.: ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) von Verbindung 79.

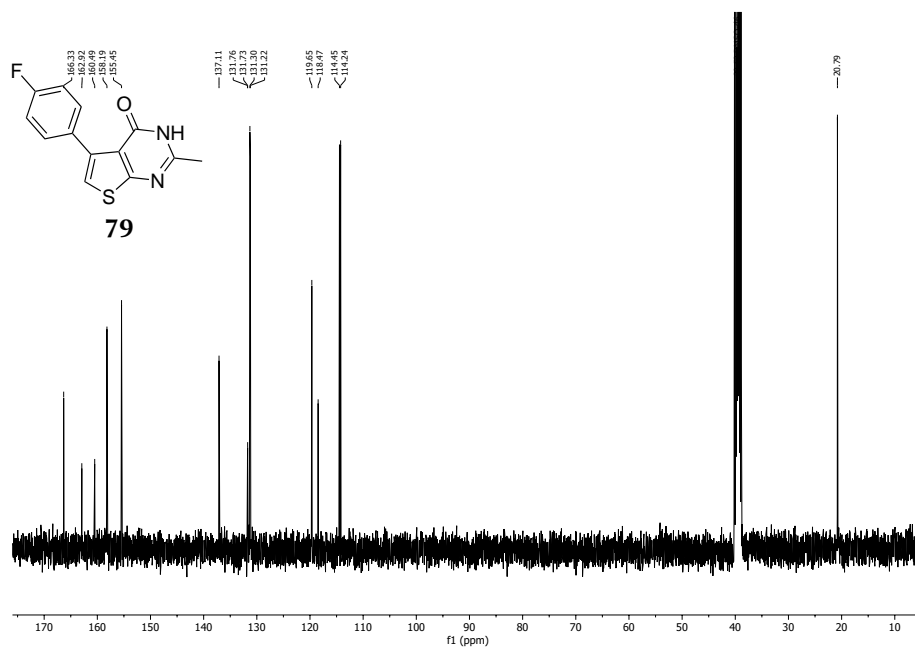


Abbildung 10.104.: ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) von Verbindung 79.

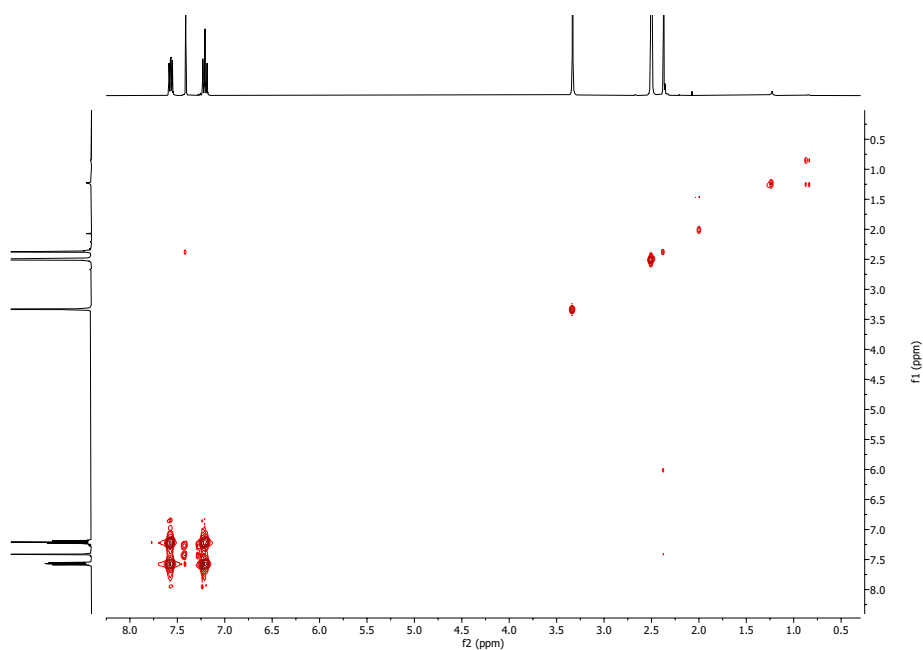


Abbildung 10.105.: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum ($\text{DMSO}-d_6$) von Verbindung 79.

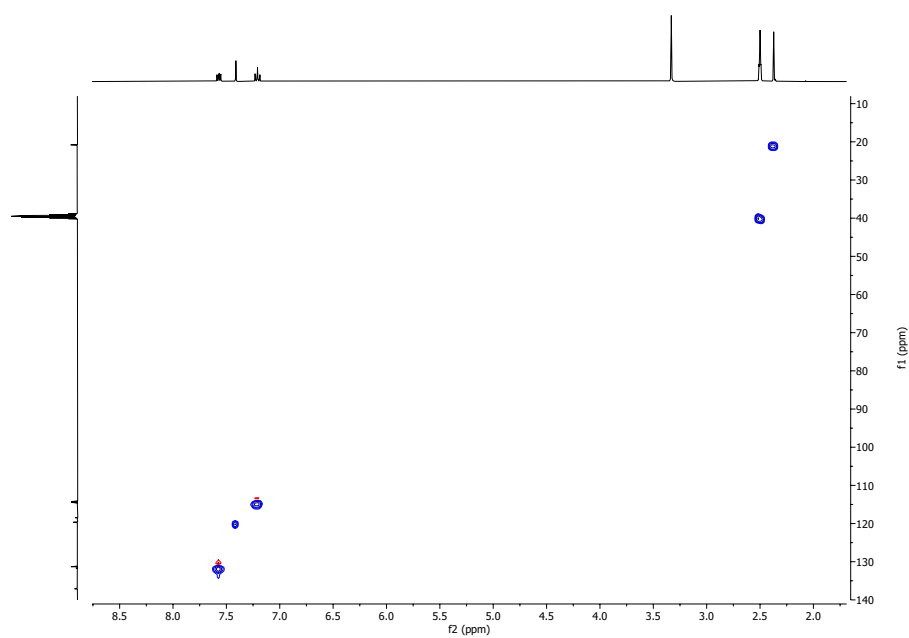


Abbildung 10.106.: ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum ($\text{DMSO}-d_6$) von Verbindung 79.

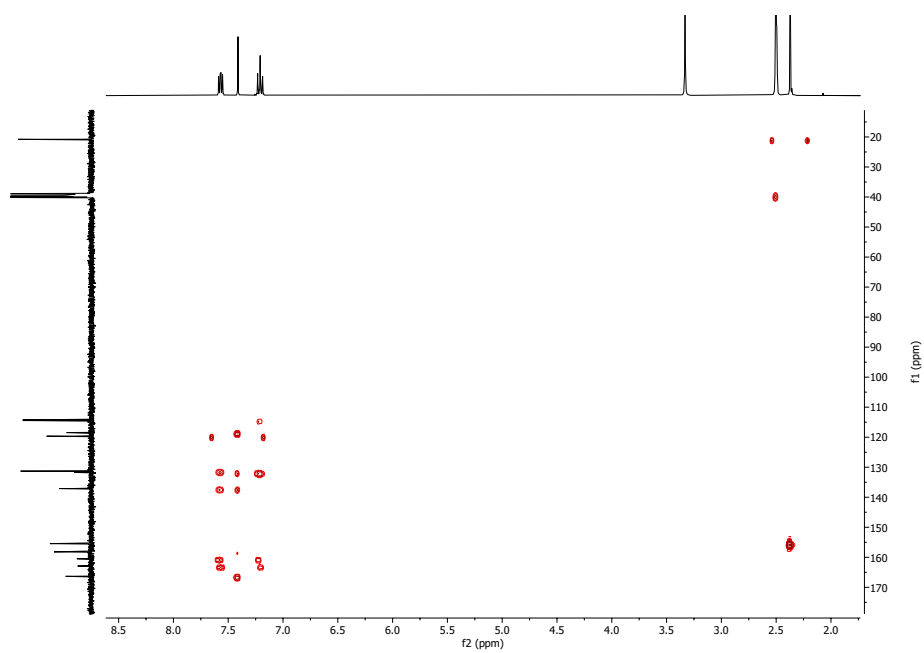


Abbildung 10.107.: ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum ($\text{DMSO}-d_6$) von Verbindung **79**.

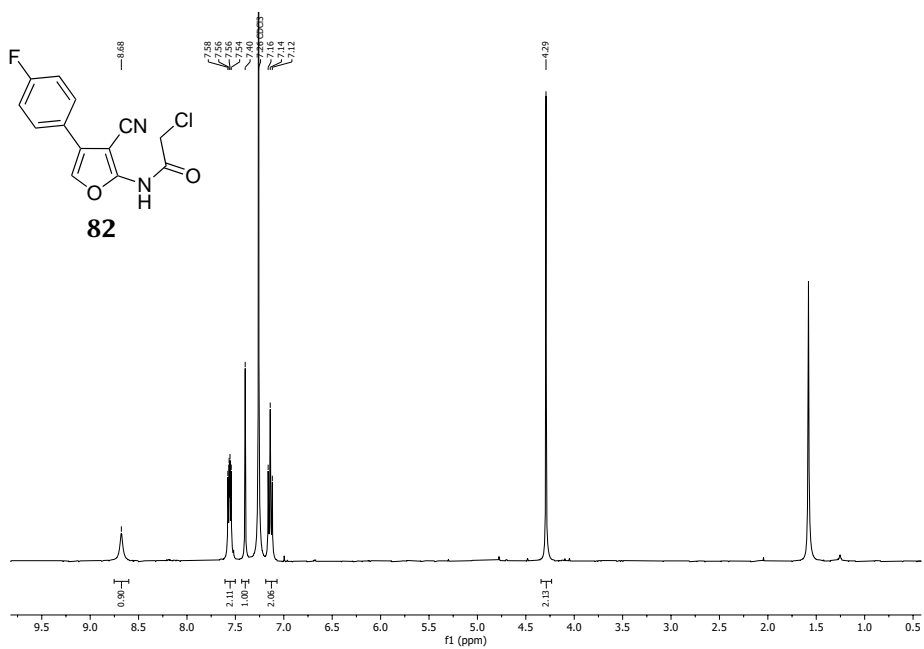


Abbildung 10.108.: ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) von Verbindung **82**.

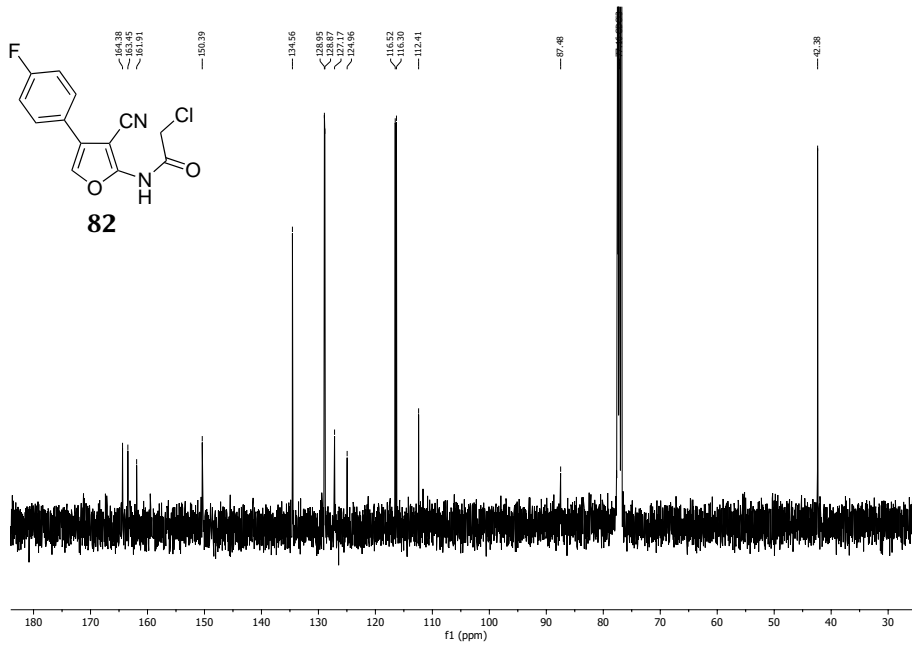


Abbildung 10.109.: ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3) von Verbindung **82**.

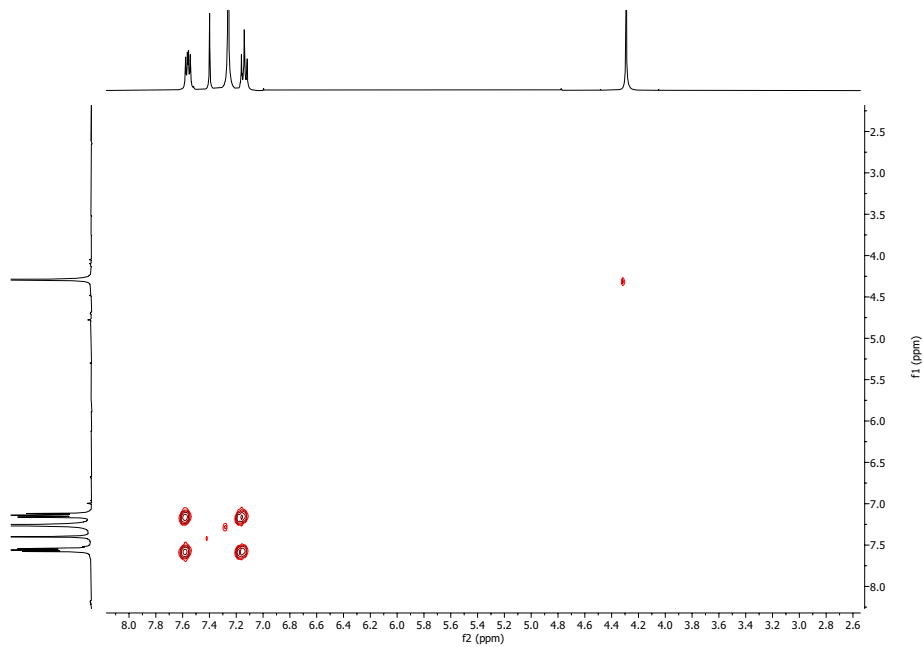


Abbildung 10.110.: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **82**.

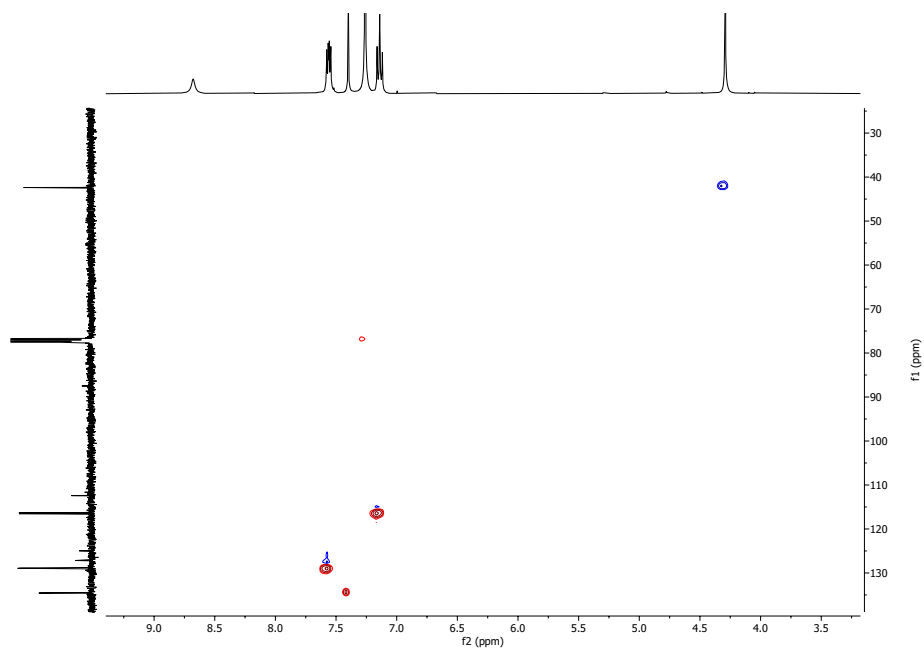


Abbildung 10.111.: ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **82**.

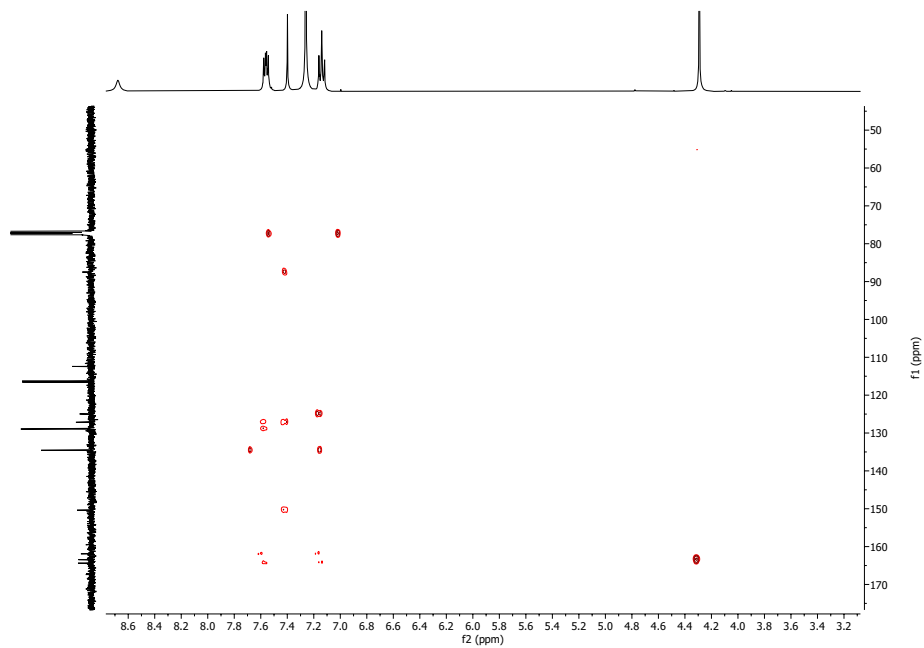


Abbildung 10.112.: ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum (CDCl_3) von Verbindung **82**.

Anhang C - Lebenslauf

Anhang

Anhang