

***Synthese und biochemische
Charakterisierung von
Metallo- β -Lactamasen-Inhibitoren***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Der Naturwissenschaften

Vorgelegt im Fachbereich 14

Der Johann Wolfgang Goethe-Universität

In Frankfurt am Main

von

Dominik Büttner

aus Langen

Frankfurt 2017

(D30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Michael Karas

1. Gutachter: Jun. Prof. Dr. Ewgenij Proschak

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Thomas A. Wichelhaus

Datum der Dissertation:

Für Michaela & Viola

„Ich habe gelernt, dass der Weg des Fortschritts weder kurz noch unbeschwerlich ist.“

Marie Curie (1867-1934)

„Auch aus Steinen, die einem in den Weg gelegt werden, kann man Schönes bauen.“

Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832)

Inhalt

1. Einleitung.....	1
1.1. β -Lactam-Antibiotika.....	1
1.2. Bakterielle Resistenzen gegenüber β -Lactam-Antibiotika	4
1.3. Bekannte Inhibitoren der Metallo- β -Lactamasen	7
1.4. Das Angiotensin-Konversionsenzym	10
2. Ziel der Arbeit	11
3. Material und Methoden	12
3.1. Verwendete Materialien	12
3.2. Synthese der Aminosäure- <i>tert</i> -butylester.....	14
3.2.1. DB223 - (<i>S</i>)- <i>tert</i> -Butyl-2-aminopropionat.....	14
3.2.2. DB255 - <i>tert</i> -Butyl- 2-(methylamino)acetat	15
3.2.3. DB317 - (<i>R</i>)- <i>tert</i> -Butyl-piperidin-2-carboxylat	16
3.2.4. DB344 - (<i>S</i>)- <i>tert</i> -Butyl-piperidin-2-carboxylat	17
3.2.5. DB216 - (<i>R</i>)- <i>tert</i> -Butyl-piperidin-3-carboxylat.....	18
3.3. Synthese der Amide	19
3.3.1. DB150 - <i>tert</i> -Butyl-1-(3-(acetylthio)-2-benzylpropanyl)pyrrolidin-2-carboxylat.....	19
3.3.2. DB381 - (2 <i>S</i>)- <i>tert</i> -Butyl-1-(3-(acetylthio)-2-benzylpropanyl)pyrrolidin-2-carboxylat ...	20
3.3.3. DB313 - (2 <i>S</i>)- <i>tert</i> -Butyl-2-(3-(acetylthio)-2-benzylpropanamido)propanoat.....	21
3.3.4. DB305 - <i>tert</i> -Butyl-2-(3-(acetylthio)-2-benzyl- <i>N</i> -methylpropanamido)acetat.....	22
3.3.5. DB318 - (2 <i>R</i>)- <i>tert</i> -Butyl-1-(3-(acetylthio)-2-benzylpropanyl)piperidin-2-carboxylat	23
3.3.6. DB354 - (2 <i>S</i>)- <i>tert</i> -Butyl-1-(3-(acetylthio)-2-benzylpropanyl)piperidin-2-carboxylat.....	24
3.3.7. DB233 - (3 <i>R</i>)- <i>tert</i> -Butyl-1-(3-(acetylthio)-2-benzylpropanyl)piperidin-3-carboxylat	25
3.3.8. DB277 - 1-(3-(Acetylthio)-2-benzylpropanyl)azetidin-3-carbonsäure.....	26
3.3.9. DB254 - 1-(3-(Acetylthio)-2-benzylpropanyl)piperidin-4-carbonsäure	27
3.3.10. DB245 - (<i>S</i>)-(2-Benzyl-3-(1,1-dioxidthiomorpholin)-3-oxopropyl)ethanthioat	28
3.3.11. DB349 - 3-(3-(Acetylthio)-2-benzylpropanyl)thiazolidin-4-carbonsäure.....	29
3.4. Entschützungen	30
3.4.1. DB314 - (2 <i>S</i>)-2-(2-Benzyl-3-mercaptopropanamid)propansäure.....	30
3.4.2. DB315 - 2-(2-Benzyl-3-mercapto- <i>N</i> -methylpropanamid)essigsäure.....	32
3.4.3. DB320 - (2 <i>R</i>)-1-(2-Benzyl-3-mercaptopropanyl)piperidin-2-carbonsäure	33
3.4.4. DB361- (2 <i>S</i>)-1-(2-Benzyl-3-mercaptopropanyl)piperidin-2-carbonsäure.....	34
3.4.5. DB151 - 1-(2-Benzyl-3-mercaptopropanyl)pyrrolidin-2-carbonsäure	35
3.4.6. DB269 - (3 <i>R</i>)-1-(2-Benzyl-3-mercaptopropanyl)piperidin-3-carbonsäure	36
3.4.7. DB272 - 1-(2-Benzyl-3-mercaptopropanyl)piperidin-4-carbonsäure	37
3.4.8. DB306 - 1-(2-Benzyl-3-mercaptopropanyl)azetidin-3-carbonsäure.....	38

3.4.9.	DB273 - 2-Benzyl-1-(1,1-dioxidthiomorpholin)-3-mercaptopropan-1-on.....	39
3.4.10.	DB358 - 3-(2-Benzyl-3-mercaptopropanyl)thiazolidin-4-carbonsäure.....	40
3.5.	Synthese der Piperazin-Derivate	41
3.5.1.	DB333 - 4-Benzylpiperazin-2-carbonsäure	41
3.5.2.	DB352 - 1-(<i>tert</i> -Butoxycarbonyl)-4-(2-phenylacetyl)piperazin-2-carbonsäure	42
3.5.3.	DB338 - 4-(2-Phenylacetyl)piperazin-2-carbonsäure	43
3.5.4.	DB369 - 1-(<i>tert</i> -Butoxycarbonyl)-4-(phenylcarbamyl)piperazin-2-carbonsäure	44
3.5.5.	DB371 - 4-(Phenylcarbamyl)piperazin-2-carbonsäure Hydrochlorid	45
3.5.6.	DB355 - 1-(<i>tert</i> -Butoxycarbonyl)-4-(phenylsulfonyl)piperazin-2-carbonsäure	46
3.5.7.	DB340 - 4-(Phenylsulfonyl)piperazin-2-carbonsäure	47
3.5.8.	DB398 - 2-Benzyl-1- <i>tert</i> -butyl 4-(2-phenylacetyl)piperazin-1,2-dicarboxylat	48
3.5.9.	DB402 - Benzyl-4-(2-phenylacetyl)piperazin-2-carboxylat Hydrochlorid.....	49
3.5.10.	DB395 - 2-Benzyl-1- <i>tert</i> -butyl-4-(phenylcarbamoyl)piperazin-1,2-dicarboxylat	50
3.5.11.	DB400 - Benzyl-4-(phenylcarbamyl)piperazin-2-carboxylat Hydrochlorid.....	51
3.5.12.	DB397 - 2-Benzyl-1- <i>tert</i> -butyl 4-(phenylsulfonyl)piperazin-1,2-dicarboxylat	52
3.5.13.	DB401 - Benzyl-4-(phenylsulfonyl)piperazin-2-carboxylat Hydrochlorid.....	53
3.5.14.	DB343 - 1-(3-(Acetylthio)-2-benzylpropanyl)-4-benzylpiperazin-2-carbonsäure.....	54
3.5.15.	DB406 - Benzyl-1-(3-(acetylthio)-2-benzylpropanyl)-4-(2-phenylacetyl)piperazin-2-carboxylat	55
3.5.16.	DB404 - Benzyl-1-(3-(acetylthio)-2-benzylpropanyl)-4-(phenylcarbamyl)piperazin-2-carboxylat	56
3.5.17.	DB405 - Benzyl-1-(3-(acetylthio)-2-benzylpropanyl)-4-(phenylsulfonyl)piperazin-2-carboxylat	57
3.5.18.	DB359 - 4-Benzoyl-1-(2-benzyl-3-mercaptopropanyl)piperazin-2-carbonsäure.....	58
3.5.19.	DK48 (DB410) - 1-(2-Benzyl-3-mercaptopropanyl)-4-(phenylcarbamyl)piperazin-2-carbonsäure.....	59
3.6.	Synthese Triazol-Derivate.....	60
3.6.1.	DK37 - 5-(4-Ethynylbenzyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion	60
3.6.2.	DK3 - 5-(4-Ethynylbenzyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion	61
3.6.3.	DK5 - Methyl-2-(4-ethynylbenzyl)acrylate	62
3.6.4.	DK50 - 2-(4-Ethynylbenzyl)acrylsäure	63
3.6.5.	DK55 - (<i>R</i>)- <i>tert</i> -Butyl-1-(2-(4-ethynylbenzyl)acrylyl)piperidin-2-carboxylat	64
3.6.6.	DK56 - (<i>R</i>)- <i>tert</i> -Butyl-1-(2-(4-(1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)benzyl)acrylyl)piperidin-2-carboxylat	65
3.6.7.	DK57 - (2 <i>R</i>)- <i>tert</i> -Butyl-1-(2-(4-(1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)benzyl)-3-(acetylthio)propanyl)-piperidin-2-carboxylat	66
3.6.8.	DK58 - (2 <i>R</i>)-1-(2-(4-(1 <i>H</i> -1,2,3-Triazol-4-yl)benzyl)-3-mercaptopropanyl)piperidin-2-carbonsäure.....	67

3.7. Synthese des Amidin-Derivates.....	68
3.7.1. DK46 - 4-((2,2-Dimethyl-4,6-dioxo-1,3-dioxan-5-yliden)methyl)benzonnitril.....	68
3.7.2. DK52 - 4-((2,2-Dimethyl-4,6-dioxo-1,3-dioxan-5-yl)methyl)benzonnitril.....	69
3.7.3. DK53 - Methyl-2-(4-cyanobenzyl)acrylat.....	70
3.7.4. DK41 - 2-(4-Cyanobenzyl)acrylsäure	71
3.7.5. DK42 - (<i>R</i>)- <i>tert</i> -Butyl-1-(2-(4-cyanobenzyl)acrylyl)piperidin-2-carboxylat	72
3.7.6. DK43 - (2 <i>R</i>)- <i>tert</i> -Butyl-1-(3-(acetylthio)-2-(4-carbamthioylbenzyl)propanyl)piperidin-2-carboxylat	73
3.7.7. DK44 - (2 <i>R</i>)- <i>tert</i> -Butyl-1-(3-(acetylthio)-2-(4-carbamimidylbenzyl)propanyl)piperidin-2-carboxylat	74
3.7.8. DK54 - (2 <i>R</i>)-1-(2-(4-Carbamimidylbenzyl)-3-mercaptopropanyl)piperidin-2-carbonsäure.....	75
3.8. Bestimmung der IC ₅₀ -Werte mittels fluoreszenz-basierenden Aktivitätsassay.....	76
3.9. Untersuchung der Schmelzpunktverschiebung mittels Thermal Shift Assay.....	78
3.10. Isothermale Titrationskalorimetrie	79
3.11. Bestimmung der LogD-Werte.....	80
3.12. Bestimmung der Minimalen Hemm-Konzentration	83
3.13. Untersuchung der Aktivität gegenüber des Angiotensin konvertierenden Enzyms	84
3.14. Untersuchung der Aktivität gegenüber der Leukotrien A ₄ -Hydrolase	85
3.15. Zellbasierte Proliferations-Assays	86
3.15.1. Zellproliferations-Assay mit WST-1	86
3.15.2. Zytotoxizitäts-Assay mit LDH-Aktivitätsmessung	87
3.16. Co-Kristallisation der VIM-2 mit Verbindung DB320.....	88
4. Ergebnisse und Diskussion	89
4.1. Übersicht der Synthesen	89
4.1.1. Einführung der Benzylgruppe.....	89
4.1.2. Einführung verschiedener Aminosäuren.....	90
4.1.3. Amidkupplungen mit ungeschützten Aminosäuren - Teil I	92
4.1.4. Einführung des <i>tert</i> -Butylesters	94
4.1.5. Amidkupplung mit ungeschützten Aminosäuren – Teil II	98
4.1.6. Amidkupplung der Aminosäureester	101
4.1.7. Hydrolyse der Esterfunktionen.....	102
4.1.8. Synthese der Piperazin-Derivate	104
4.1.9. Aufbau der Piperazin-Bausteine.....	106
4.1.10. Die abschließende Esterhydrolyse	110
4.1.11. Synthese der Propansäure-Derivate - Retrosynthetische Überlegungen	111
4.1.12. Substitutionen am Aromaten.....	114

4.1.13.	Einführung einer basischen Funktion am Aromaten.....	119
4.2.	Betrachtung der inhibitorischen Aktivitäten.....	123
4.2.1.	Substitutionen am westlichen Molekülteil - Teil 1.....	125
4.2.2.	Substitutionen am westlichen Molekülteil - Teil 2.....	128
4.2.3.	Derivate mit α -Aminosäurestruktur.....	131
4.2.4.	Derivate mit nicht α -Aminosäurestrukturen.....	136
4.2.5.	Derivate mit Piperazinstruktur.....	138
4.2.6.	Substitutionen am westlichen Molekülteil - Teil 3.....	140
4.2.7.	Untersuchung der Aktivität gegenüber der Mutante VIM-2.....	142
4.2.8.	Aufstellung von Struktur-Wirkungsbeziehungen.....	144
4.3.	Co-Kristallisation von VIM-2 und Verbindung DB320.....	146
4.4.	Ergebnisse des Thermal Shift Assays.....	147
4.5.	Untersuchung der Minimalen Hemm-Konzentration.....	150
4.6.	Untersuchung der Zytotoxizität.....	155
4.7.	Bestimmung der Aktivität gegenüber dem Angiotensin konvertierenden Enzym.....	158
4.8.	Bestimmung der Aktivität gegenüber LTA ₄ H.....	160
5.	Zusammenfassung.....	161
6.	Ausblick.....	163
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	164
8.	Literaturverzeichnis.....	167
9.	Eidesstattliche Erklärung.....	170
10.	Lebenslauf.....	171
11.	Publikationen.....	173
12.	Danksagung.....	174
13.	Anhang.....	176

1. Einleitung

1.1. β -Lactam-Antibiotika

Seit ihrer Entdeckung in den 1920er Jahren durch Alexander Fleming, sind β -Lactam-Antibiotika die wohl am häufigsten eingesetzten Wirkstoffe zur Behandlung von bakteriellen Infektionen.¹ Bei der Wirkstoffklasse der β -Lactam-Antibiotika handelt es sich um Hemmstoffe der bakteriellen Zellwand-Biosynthese. Die Grundstruktur dieser Wirkstoffe ist das viergliedrige β -Lactam.² In Abhängigkeit ihrer erweiterten Struktur werden diese noch einmal in die vier Unterklassen der Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme und Monobactame unterteilt (Abbildung 1).³

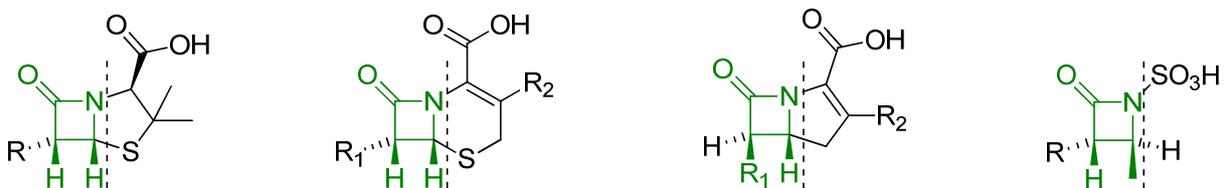


Abbildung 1: Grundstrukturen der β -Lactam-Antibiotika: Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme und Monobactame (β -Lactam jeweils in grün).³

Die Zellwand von Bakterien besteht zu einem großen Anteil aus Murein, welches aus Peptidoglykanen gebildet wird. Diese Polysaccharide werden durch die beiden wechselweise 1,4- β -glykosidisch verknüpften Monosaccharide *N*-Acetylglucosamin und *N*-Acetylmuraminsäure aufgebaut (Abbildung 2).²

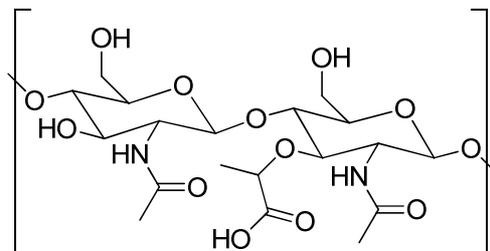


Abbildung 2: Ausschnitt eines Murein Glycan-Stranges: *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc, I.) und *N*-Acetylmuraminsäure (MurNAc, r.), 1,4- β -glykosidisch verknüpft (R = Polypeptidkette).⁴

Einleitung

Die einzelnen Stränge werden ihrerseits durch Polypeptidketten miteinander quervernetzt. Die *N*-Acetylmuraminsäure ist über ihre Säurefunktion mit dem *N*-Terminus des Polypeptids verbunden. Im Falle von *Staphylococcus aureus* besteht diese Peptidkette aus der Aminosäuresequenz L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala. Die Aminogruppe der Seitenkette von D-Lysin ist mit einer Pentaglycinkette verknüpft. Über den *N*-Terminus dieser Glycinkette erfolgt die Quervernetzung mit einem benachbarten Peptidoglykan-Strang (Abbildung 3). Die Bildung der neuen Peptidbindung wird durch Transpeptidasen katalysiert und verläuft unter Spaltung der D-Ala-D-Ala-Peptidbindung.²

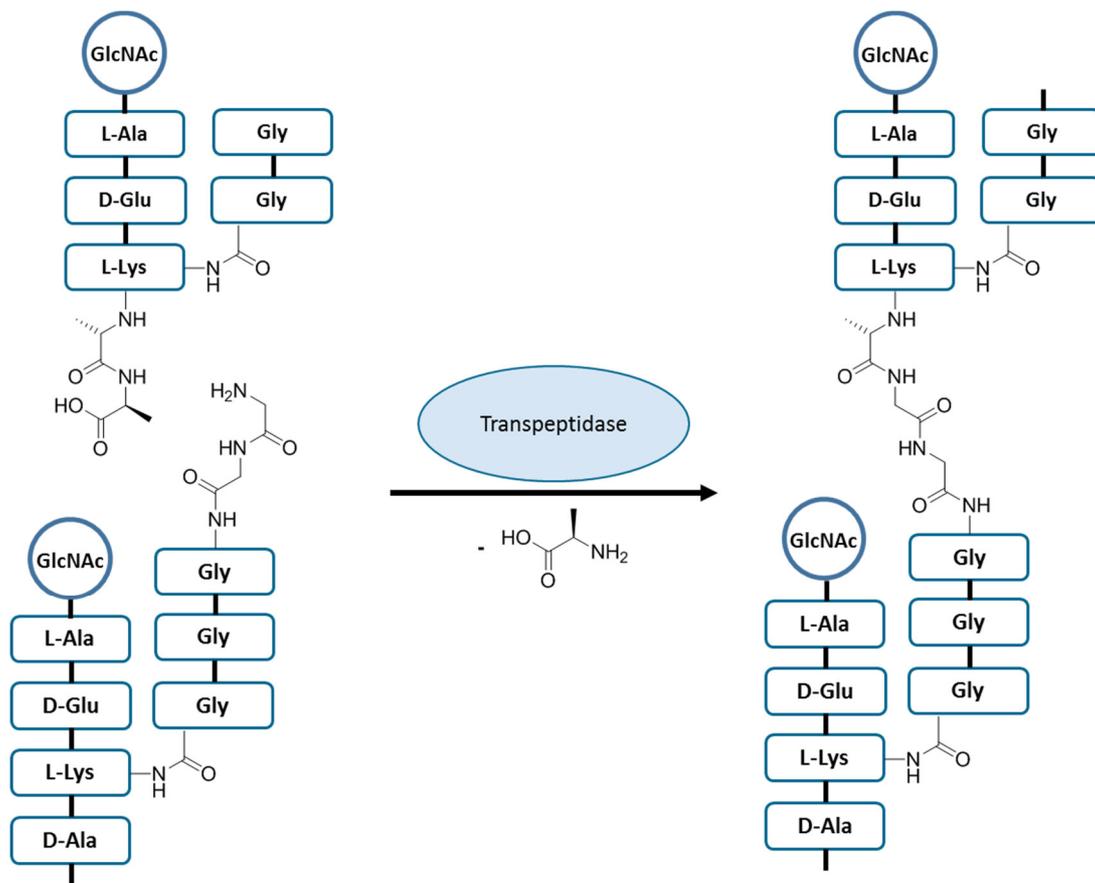


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Quervernetzung zweier Peptidoglycanstränge.²

Die bakteriellen Peptidoglycansynthetasen sind der Angriffspunkt von β -Lactam-Antibiotika. Die Grundstruktur dieser Antibiotika-Klasse ist der D-Ala-D-Ala-Struktur sehr ähnlich (Abbildung 4).³

Einleitung

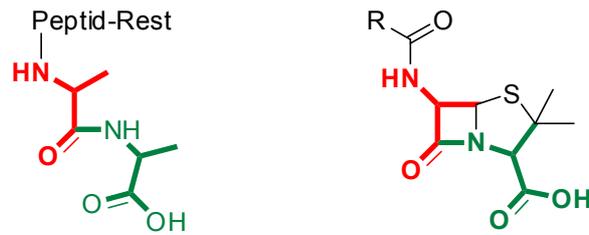


Abbildung 4: Vergleich der Strukturen einer D-Ala-D-Ala-Sequenz (l.) und eines Penicillins (r.).³

Auf Grund dieser strukturellen Ähnlichkeit wird das Antibiotikum von den Transpeptidasen fälschlicherweise als Zielstruktur erkannt. Nach der Anlagerung des Wirkstoffes an das Enzym, spaltet dieses das β -Lactam. Dabei wird das Enzym acyliert, also kovalent an das Substrat gebunden. Dies wiederum führt zur Inhibition der Transpeptidase.³

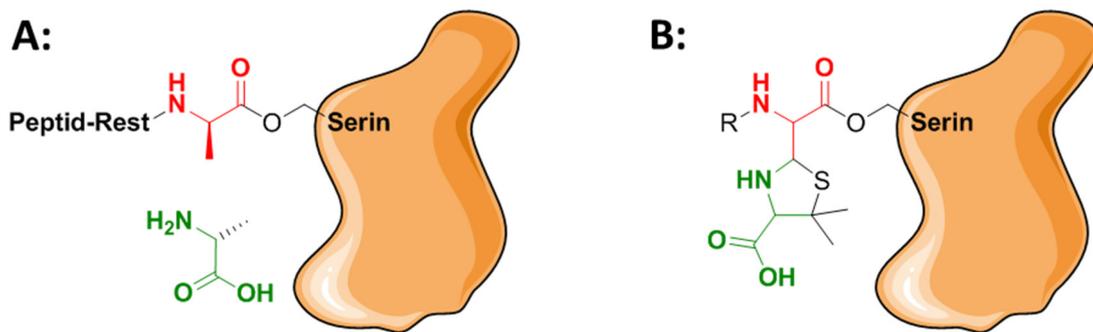


Abbildung 5: Transpeptidase (orange) während der Spaltung der D-Ala-D-Ala-Struktur (A) und durch ein Penicillin inhibiert (B).²

Der Anteil der Mureinschicht an der bakteriellen Zellwand beträgt rund 50 % bei grampositiven und bis zu etwa 10 % bei gramnegativen Erregern. Da eukaryotische Zellen über keine vergleichbare Struktur der Zellwand verfügen, besitzen β -Lactam-Antibiotika eine sehr gute Selektivität gegenüber bakteriellen Pathogenen.² Durch die Hemmung der Quervernetzung kommt es zu einer Deformierungen der Bakterie und Schäden innerhalb der Zellwand was schlussendlich zur Lyse führt. Daher gelten β -Lactam-Antibiotika als bakterizide Wirkstoffe.³

1.2. Bakterielle Resistenzen gegenüber β -Lactam-Antibiotika

Die häufigste Ursache für bakterielle Resistenzen gegenüber β -Lactam-Antibiotika sind β -Lactamasen. Diese Enzyme stammen wahrscheinlich von den Transpeptidasen ab und sind in der Lage, β -Lactame zu hydrolysieren und die entsprechenden Wirkstoffe somit zu inaktivieren.⁵

Grundsätzlich sind zwei verschiedene Arten von β -Lactamasen bekannt: zum einen die Serin- β -Lactamasen (SBL) und die Metallo- β -Lactamasen (MBL). Diese werden nach Ambler in vier verschiedene Klassen (A - D) eingeteilt. Die Serin- β -Lactamasen stellen die Mitglieder der Klassen A, C und D.⁶ Sie verfügen über einen nucleophilen Serin-Rest im aktiven Zentrum, über welchen die Hydrolyse des β -Lactams abläuft. Hierbei kommt es zu einer kovalenten Bindung zwischen den Lactamasen und dem Substrat.⁷

Die Metallo- β -Lactamasen der Klasse B werden ihrerseits noch einmal, abhängig von ihrer strukturellen Ähnlichkeit zueinander, in drei Unterklassen (B1, B2 und B3) aufgeteilt.⁸ Die dreidimensionalen Strukturen der Metallo- β -Lactamasen sind sich, im Unterschied zu ihren Aminosäuresequenzen, sehr ähnlich. So bilden alle bekannten Enzyme dieser Klassen eine $\alpha\beta\alpha$ -Struktur aus, bei der zwei β -Faltblätter im Inneren liegen, die ihrerseits von fünf α -Helices umgeben werden. Das aktive Zentrum befindet sich dabei stets am äußeren Ende der beiden β -Faltblätter (Abbildung 6).⁹

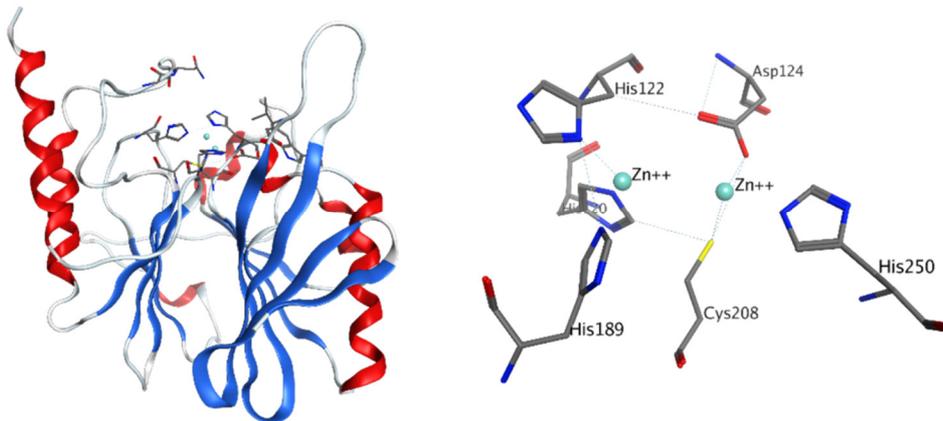


Abbildung 6: Kristallstruktur der NDM-1 (New Delhi Metallo- β -Lactamase-1) mit Captopril (nicht gezeigt) als Ligand (l.); aktives Zentrum mit beiden Zn^{2+} -Atomen; einmal koordiniert von drei Histidin Resten („Histidin“-Seite) und einmal koordiniert von Asp124, His250 und Cys208 („Cystein-Seite“, r., PDB: 4EXS).

Einleitung

Innerhalb des aktiven Zentrums befinden sich die ein bis zwei namensgebenden Zink-(II)-Ionen. Das eine Zn^{2+} -Ion wird von drei Histidin-Resten koordiniert („Histidin“-Seite). Das andere Ion wird, sofern vorhanden, von ebenfalls drei Aminosäuren koordiniert. Im Falle der Metallo- β -Lactamase NDM-1 von jeweils einem Asparaginsäure-, einem Cystein- und einem Histidin-Rest („Cystein“-Seite, s. Abbildung 6). Während das Histidin-Motiv in den Unterklassen B1 und B3 hoch konserviert ist, können die Aminosäuren des Cystein-Motivs abweichen. Zwischen den beiden Zink-Ionen ist ein polarisiertes Wassermolekül, bzw. Hydroxid-Ion lokalisiert.^{9,10}

Die Hydrolyse des β -Lactams verläuft bei Metallo- β -Lactamasen anders, als im Falle der SBLs. Nach dem Eintritt in das aktive Zentrum wird das Substrat durch die beiden Zink-Ionen koordiniert und die Amidbindung des Lactams polarisiert. Hierdurch wird die Elektrophilie am Carbonylkohlenstoff erhöht und es kommt zur nucleophilen Addition einer Hydroxylgruppe. Dies wiederum führt zu einer Spaltung der Amidbindung und das resultierende, inaktive Substrat verlässt das aktive Zentrum wieder (Abbildung 7). Im Unterschied zu den SBLs kommt es hierbei zu keiner kovalenten Bindung zwischen Enzym und Substrat.¹¹

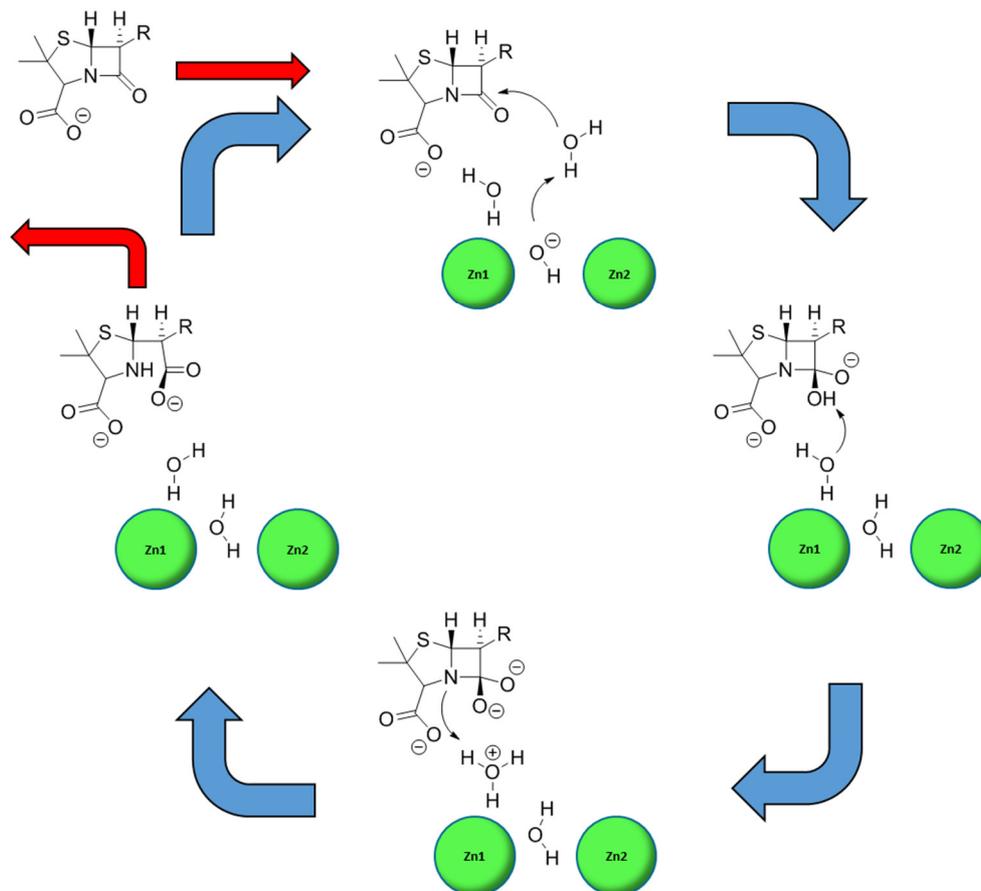


Abbildung 7: Vereinfachter Zyklus der Hydrolyse eines Penicillins durch eine Metallo- β -Lactamase.¹²

Einleitung

Während Crowder *et al.* 2006 noch einen direkten Angriff des von den Zink-Ionen koordinierten Hydroxid-Ions postulierten, schlugen Kim *et al.* 2013 einen alternativen basierenden Mechanismus vor, welcher auf Berechnungen und Experimenten gestützt ist. Dabei fungiert das Hydroxid-Ion nicht als Nucleophil, sondern als Base (Abbildung 7). Diese kann ein freies Wassermolekül deprotonieren, welches dann die Amidbindung angreift. Durch ein weiteres Wassermolekül wird das Proton aus dem Zwischenzustand auf den Stickstoff des Lactamrings übertragen und die Amidbindung wird gespalten.¹²

1.3. Bekannte Inhibitoren der Metallo- β -Lactamasen

Die stetig zunehmende Zahl an multiresistenten Erregern ist ein weltweites Problem und die Entwicklung neuer Antibiotika stagniert bereits seit einigen Jahren. Eine Alternative Möglichkeit zur Umgehung dieser Resistenzen ist die Entwicklung von β -Lactamase-Inhibitoren. Diese könnten die Resistenzenzyme blockieren und damit die ursprüngliche Aktivität der β -Lactam-Antibiotika wiederherstellen.¹³ Dabei besitzen die MBL-Inhibitoren in der Regel keine signifikante antibakterielle Wirkung. Vielmehr werden sie in Kombination mit β -Lactam-Antibiotika verabreicht.²

Während bereits einige Inhibitoren für Serin- β -Lactamasen bekannt und zugelassen sind, z.B. Clavulansäure, Sulbactam und Tazobactam,⁷ gibt es gegen Metallo- β -Lactamasen noch keine klinisch relevanten Inhibitoren.¹⁴ In der präklinischen Entwicklung befinden sich momentan (Sept. 2016) verschiedene Bis-Thiazolidine (BTZ) und ME1071, ein Maleinsäure-Derivat (Abbildung 8).¹⁴



Abbildung 8: Präklinische Inhibitoren: Grundstruktur der BTZ-Derivate (l.) und ME1071 (r.).¹⁴

Es gibt zahlreiche weitere Ansätze zur Entwicklung von Inhibitoren für Metallo- β -Lactamasen. Diese reichen von Naturstoffen und Verbindungen mit chelatisierenden Gruppen (z.B. EDTA¹⁵, Aspergillomarasmine A¹⁶, Bernsteinsäure-Derivate¹⁷) über kovalent bindende Substanzen und diversen Zink koordinierenden Gruppen¹⁸ (Abbildung 9), bis hin zu speziell auf entsprechende MBLs zugeschnittene DNA-Aptamere.¹⁹

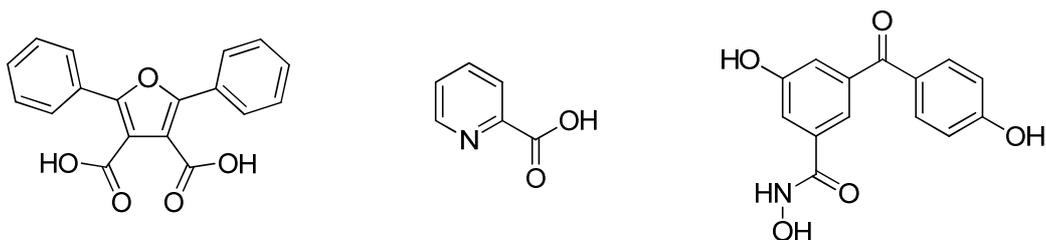


Abbildung 9: Beispiel für MBL-Inhibitoren: ein Derivat der 3,4-Furandicarbonsäure, Picolinsäure, und ein Hydroxamsäure-Derivat (v.l.n.r.).¹⁸

Einleitung

Brem *et al.* publizierten 2016 eine Reihe von cyclischen Boronaten als duale Inhibitoren für Serin- und Metallo- β -Lactamasen (Abbildung 10).²⁰

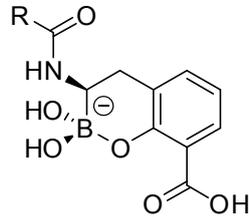


Abbildung 10: Grundstruktur der von Brem *et al.* publizierten cyclischen Boronate.²⁰

Der geläufigste Ansatz besteht aus Substanzen, welche eine Thiolgruppe besitzen. Diese kann die Zink-Ionen im aktiven Zentrum der Metallo- β -Lactamasen koordinieren.^{18,21} Unter anderem synthetisierten Liénard *et al.* diverse Thiol-Derivate, welche gegenüber allen Subklassen der Metallo- β -Lactamasen aktiv waren.²¹ Klingler *et al.* konnten zeigen, dass verschiedene zugelassene Wirkstoffe, welche eine freie Thiolgruppe tragen, in der Lage sind, Metallo- β -Lactamasen zu inhibieren. Davon besonders gut untersucht ist der ACE-Hemmer Captopril, welcher gegen mehrere Metallo- β -Lactamasen einen IC_{50} -Wert im einstelligen micromolaren Bereich aufweist²² und bereits mit NDM-1 (New Delhi Metallo- β -Lactamase-1) Co-kristallisiert werden konnte (Abbildung 11).

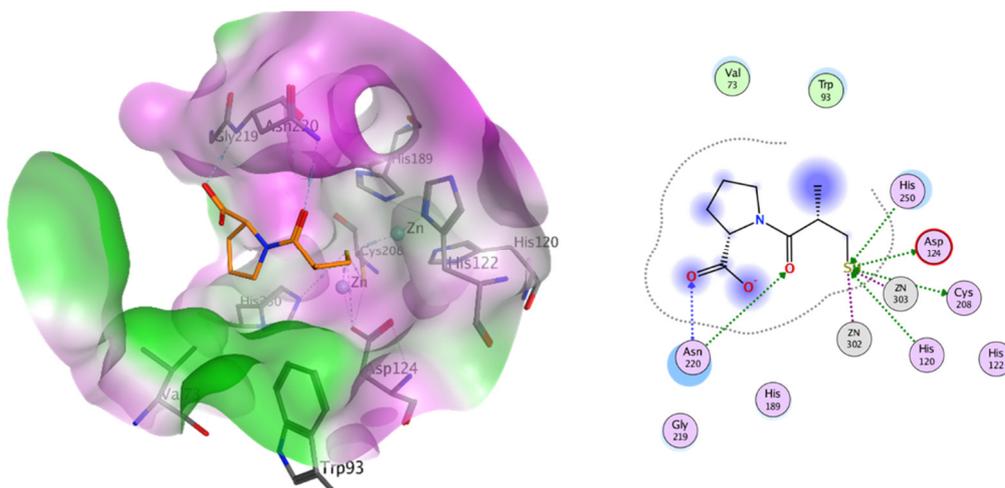


Abbildung 11: Der ACE-Hemmer Captopril in der Bindetasche von NDM-1 (I.), Übersichtskarte der Interaktionsstellen zwischen dem Inhibitor und Protein (*r.*, PDB: 4EXS).

Einleitung

Aus dieser Kristallstruktur ist ersichtlich, dass es zwei wichtige Interaktionsstellen zwischen dem Protein (NDM-1) und Captopril gibt. Dies ist zum einen die Thiolgruppe, welche zwischen die beiden Zink-Ionen koordiniert - wobei sie ein Wasser-Molekül verdrängt²³ - und die Carbonsäure, welche parallel zur Carboxylgruppe eine Wasserstoffbrückenbindung zur Aminosäure Asn220 ausbildet (Abbildung 11).²⁴ Eine Substitution oder Veresterung dieser Säuregruppe wird nicht toleriert und führt zu einem signifikanten Verlust an Inhibition.²⁵

1.4. Das Angiotensin-Konversionsenzym

Der Wirkstoff Captopril ist ein zugelassener Hemmstoff des Angiotensin-Konversionsenzyms (engl. *Angiotensin converting enzyme*, ACE). Dieses gehört zu den zinkhaltigen Metalloproteasen und ist Bestandteil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Das Dekapeptid Angiotensin I wird im Kapillarendothel der Lunge durch ACE C-terminal um zwei Peptideinheiten gekürzt und so zu Angiotensin II umgesetzt.² Angiotensin II interagiert mit dem AT₁-Rezeptor, was zur Vasokonstriktion und damit zum Anstieg des Blutdrucks führt. Eine Hemmung des ACE hat folglich eine Blutdruck senkende Wirkung.²⁶

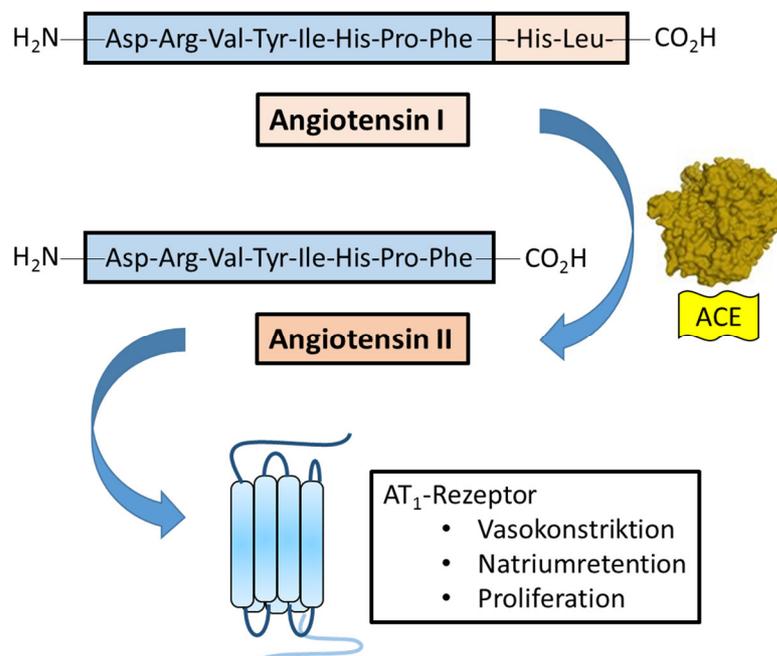


Abbildung 12: Ausschnitt aus dem RAAS. ^{2,26}

Des Weiteren ist ACE am Abbau des Peptidhormons Bradykinin beteiligt, welches zur Gruppe der Kinine gehört. Die Inhibition von ACE führt zu einer Zunahme an Bradykinin, welches mit dem Bradykinin-Rezeptor wechselwirkt, was unter anderem eine Zunahme der Kapillarpermeabilität zur Folge hat.²⁶

Die wichtigsten unerwünschten Arzneimittelwirkungen sind, unter anderen Reizhusten, Kopfschmerzen und Schwindelgefühl.²⁶

2. Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht in der Synthese neuer Inhibitoren von Metallo- β -Lactamasen der Subklasse B1. Im speziellen werden hierzu die rekombinanten Resistenzproteine NDM-1 (*New Delhi Metallo- β -Lactamase*), VIM-1 (*Verona integron-encoded Metallo- β -Lactamase*) und IMP-7 (*Imipenem hydrolyzing Metallo- β -Lactamase*) verwendet.

Die synthetisierten Inhibitoren sollen selbst keine bakteriziden oder bakteriostatischen Eigenschaften besitzen. Vielmehr sollen sie durch ihre inhibierende Wirkung gegenüber Resistenzproteinen die Wirkung von β -Lactam-Antibiotika, bei gemeinsamer Verabreichung, wiederherstellen.

Als Ausgangsstruktur der Synthesepaltung dient der zugelassene ACE-Hemmer Captopril. Durch Substitution verschiedener Teilstrukturen soll zu forderst die inhibitorische Aktivität gegenüber unterschiedlichen Metallo- β -Lactamasen verbessert werden. Hierzu soll zum einen der Prolinring durch verschiedene andere Aminosäure-Reste substituiert werden. Zum anderen soll die Methylgruppe durch unterschiedlich substituierte Aromaten erweitert werden.

Neben der Evaluierung der IC_{50} -Werte in einem proteinbasiertem Assay, sollen die Inhibitoren auch in einem *Microbroth Dilution Assay* auf ihr MHK gegenüber unterschiedlichen *E.Coli* Transformanten und klinische Isolate untersucht werden. Auch in einem Wachsmotten-Model (*Galleria mellonella*) soll ihre Aktivität erhalten bleiben.

Die polare Zellmembran gramnegativer Erreger wird von hydrophilen Stoffen deutlich leichter durchdrungen, als von weniger polaren.²⁷ Daher sollen die potentiellen Inhibitoren auch hinsichtlich ihrer Polarität optimiert werden.

Im Falle einer bakteriellen Infektion ist die Inhibition des ACE von großem Nachteil. Die dadurch ausgelöste Zunahme an Gewebeporosität erleichtert die Ausbreitung einer Infektion. Im Falle einer Sepsis, welche mit Blutdruckabfall einhergeht, könnte die Gabe eines Blutdrucksenkers verheerende Folgen haben. Da es sich bei der Ausgangssubstanz (Captopril) um einen zugelassenen ACE-Hemmer handelt, sollen die synthetisierten Verbindungen auch auf ihre Aktivität gegen das Angiotensin-konvertierende Enzym hin untersucht werden. Orning *et al.* zeigen, dass Captopril auch gegenüber der LTA_4 -Hydrolase ein inhibitorisches Potential besitzt.²⁸ Die LTA_4H ist an der Biosynthese von pro-inflammatorischen Mediatoren beteiligt. Eine Inhibition dieses Enzyms könnte einen negativen Einfluss auf die körpereigene Immunantwort auf eine bakterielle Infektion haben. Um einen Einfluss auf diesen Teil des humanen Immunsystems auszuschließen, sollen die potentiellen MBL-Inhibitoren auch auf ihre Wirkung gegenüber der LTA_4H hin untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1. Verwendete Materialien

Die verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel wurden über *abcr*, *Acros Organics*, *Alfa Aesar*, *Apollo Scientific*, *Matrix Scientific*, *Sigma Aldrich* und *TCI Europe* erworben und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Soweit nicht anders beschrieben, wurde für die chemischen Reaktionen stets demineralisiertes Wasser aus der Hausleitung verwendet. Sofern nicht anders angegeben, wurden für die Reaktionen p.a. Lösungsmittel und für die Aufreinigung der Syntheseprodukte technische Lösungsmittel verwendet.

Die Reaktionen unter Mikrowelleneinstrahlung wurden in einem *Biotage Initiator 2.0* von *Biotage*, bzw. einem *Explora SP48* Mikrowellengerät der Firma *CEM* durchgeführt.

Zur Aufreinigung mittels Säulenchromatographie wurde Kieselgel (Partikelgröße 60 μm) von *Macherey-Nagel* verwendet. Die Aufreinigung per Flash-Chromatographie erfolgte mittels *IntelliFlash 310* von *AnaLogix*. Hierbei wurden mit Kieselgel befüllte, fertig gepackte Säulen von *Varian* und *Biotage* (Partikelgröße 60 μm) verwendet.

Für die Bestimmung der R_f -Werte mittels Dünnschichtchromatographie wurde eine mit Kieselgel (0.2 mm, 60F₂₅₄) beschichtete Aluminiumfolie von *Merck* verwendet. Die Detektion erfolgte mit UV-Licht der Wellenlängen 254 nm und 366 nm. Als Färbereagenzien wurden eine ethanolische Ninhydrin-Lösung (200 mg Ninhydrin in 100 mL Ethanol), bzw. eine Cer-Molybdato-phosphorsäure-Tauchlösung (2.5 g Molybdato-phosphorsäure, 1.0 g Cer-(IV)-Sulfat in 100 mL Wasser und 8 mL konz. Schwefelsäure) verwendet.

Zur Reinheitsbestimmung und Analytik mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde eine C18-Säule (Luna 10 μ C18 (2) 100 A; 250 x 4.60 mm) von *phenomenex* verwendet. Die mobile Phase bestand aus einem Gradient aus ACN (Komponente A) und Milli-Q Wasser mit 0.1 Vol.-% Ameisensäure (Komponente B) mit einem Fluss von 1 mL/min verwendet.

Methode A: 0.01 Min.: 70 % B; 14.00 Min.: 10 % B; 17.00 Min.: 10 % B; 19.00 Min.: 70 % B; 20.00 Min.: Stop.

Die Aufreinigung mittels HPLC wurde mit einer C18-Säule (Luna 10 μ C18 (2) 100 A; 250 x 21.20 mm) von *phenomenex* als stationärer Phase durchgeführt. Als mobile Phase dienten verschiedene Gradienten aus einem Gemisch von Wasser (+ 0.1 Vol.-% Ameisensäure) und ACN mit einem Fluss von 21 mL/min. Methode B: 0.01 Min.: 60 % B; 25.00 Min.: Stop.

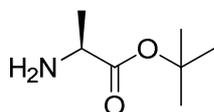
Material und Methoden

Die massenspektrometrische Analytik erfolgte mittels Elektronenspray-Ionisations-Geräten von *ThermoFisher* (Surveyor MSQ). Des Weiteren wurde ein Matrix-unterstütztes Laser-Desorption/Ionisations-Gerät mit Flugzeitanalysator von *Applied Biosystems* (Voyager-DE STR) und eine LCMS-2020 der Firma *Shimadzu* verwendet. Die hochaufgelösten Massenspektren wurden mittels *ThermoScientific* MALDI LTQ ORBITRAP XL aufgenommen.

Die Aufnahme der ^1H -NMR-Spektren erfolgte in den Lösungsmitteln DMSO- d_6 , MeOD- d_4 , CDCl_3 , Aceton- d_6 und D_2O von *euriso-top*. Es wurden die Geräte DPX-250 (250.13 MHz für ^1H -NMR), AV-300 (300.03 MHz für ^1H -NMR), AV-400 (400.13 MHz für ^1H -NMR) AV-500 (500.18 MHz für ^1H -NMR, 125.8 MHz für ^{13}C -NMR) von *Bruker* verwendet. Die erstellten Spektren wurden mit dem Programm TopSpin von *Bruker* ausgewertet. Die chemische Verschiebung δ bezieht sich auf den internen Standard Tetramethylsilan (TMS) wurde in ppm angegeben. Die Kalibrierung der ^1H - und ^{13}C -Spektren erfolgte auf die Restsignale der deuterierten Lösungsmittel als sekundärer Standard. Die Feinstruktur der Signale wurde mit *s* für Singulett, *d* für Duplett, *dd* für Duplett von Dupletts, *t* für Triplett, *q* für Quartett und *m* für Multipllett angegeben. Die Kopplungskonstanten *J* wurden in Hertz (Hz) angegeben.

3.2. Synthese der Aminosäure-*tert*-butylester

3.2.1. DB223 - (*S*)-*tert*-Butyl-2-aminopropionat



In einem 50 mL Rundkolben wurden 250 mg (1.0 eq, 2.81 mmol) *D*-Alanin in 10 mL (74.00 mmol) *tert*-Butylacetat suspendiert. Das Gemisch wurde mittels Eisbad gekühlt. Es wurden 0.45 mL (1.6 eq, 4.49 mmol) Perchlorsäure (60 Gew.-%) tropfenweise zugegeben. Das Eisbad wurde entfernt und das Reaktionsgemisch wurde über Nacht weitergerührt.

Das Gemisch wurde einmal mit 15 mL Wasser und einmal mit 10 mL HCl_(aq) (5 %) extrahiert. Die vereinten wässrigen Phasen wurden unter Rühren mit festem Kaliumcarbonat versetzt, bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten war. Das Gemisch wurde zweimal mit je 20 mL Diethylether extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Es wurde ein farbloses Öl erhalten.

Summenformel: C₇H₁₅NO₂

Ausbeute: 95 mg (23 %)

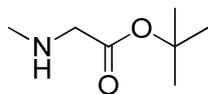
R_f: 0.86 DCM : MeOH (4:1)

¹H NMR (250.13 MHz, DMSO-d₆)

δ = 3.25 (q, ³J_{HH} = 7.0 Hz, 1H), 2.61 (bs, 2H), 1.40 (s, 9H), 1.12 (d, ³J_{HH} = 7.0 Hz, 3H).

ESI *m/z* [M + H]⁺: 146.0

3.2.2. DB255 - *tert*-Butyl- 2-(methylamino)acetat



In einem 50 mL Rundkolben wurden 500 mg (1.0 eq, 5.61 mmol) *N*-Methylglycin in 20 mL (148 mmol) *tert*-Butylacetat suspendiert. Die Suspension wurde mittels Eisbad gekühlt. 0.90 mL (1.6 eq, 8.98 mmol) Perchlorsäure (60 Gew.-%) wurden tropfenweise zugegeben. Das Eisbad wurde entfernt und das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur weitergerührt.

Das Gemisch wurde mit 15 mL Wasser extrahiert. Die organische Phase wurde dreimal mit je 10 mL HCl_(aq) (5 %) extrahiert. Die vereinten wässrigen Phasen wurden einmal mit 15 mL EE gewaschen. Die wässrige Phase wurde unter Rühren mit festem Kaliumcarbonat versetzt, bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten war. Das Gemisch wurde zweimal mit je 20 mL Diethylether extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Es wurde ein klares Öl erhalten.

Summenformel: C₇H₁₅NO₂

Ausbeute: 110 mg (14 %)

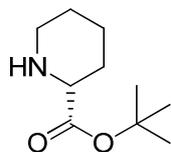
R_f: 0.61 DCM : MeOH (9:1, 1 % NEt₃)

¹H NMR (250.13 MHz, DMSO-d₆)

δ = 3.13 (s, 2H), 2.25 (s, 3H), 1.42 (s, 9H).

ESI *m/z* [M + H]⁺: 146.2

3.2.3. DB317 - (*R*)-*tert*-Butyl-piperidin-2-carboxylat



In einem 100 mL Rundkolben wurden 500 mg (1.0 eq, 3.87 mmol) (*R*)-Piperidin-2-carbonsäure in 30 mL *tert*-Butylacetat suspendiert. Das Gemisch wurde mittels Eisbad gekühlt. 0.62 mL (1.6 eq, 6.19 mmol) Perchlorsäure (60 Gew.-%) wurden tropfenweise zugegeben. Das Eisbad wurde entfernt und das Reaktionsgemisch wurde für 72 h bei Raumtemperatur weitergerührt.

Das Gemisch wurde dreimal mit je 30 mL Wasser extrahiert. Die vereinten wässrigen Phasen wurden unter Rühren mit gesättigter, wässriger NaHCO₃-Lsg. versetzt, bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten war. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 50 mL EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Es wurde ein gelbliches Öl erhalten.

Summenformel: C₁₀H₁₉NO₂

Ausbeute: 175 mg (24 %)

R_f: 0.46 DCM : MeOH (9:1)

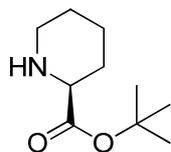
¹H NMR (250.13 MHz, DMSO-d₆)

δ = 3.26 (bs, 1H), 3.14-3.08 (m, 1H), 2.94-2.87 (m, 1H), 2.53 -2.44* (m, 1H), 1.78-1.63 (m, 2H), 1.43-1.24 (m, 13H).

*Durch das DMSO-Signal überlagert.

ESI *m/z* [M + H]⁺: 186.0

3.2.4. DB344 - (*S*)-*tert*-Butyl-piperidin-2-carboxylat



In einem 100 mL Rundkolben wurden 500 mg (1.0 eq, 3.87 mmol) (*S*)-Piperidin-2-carbonsäure in 30 mL *tert*-Butylacetat suspendiert. Unter Eisbadkühlung wurden 0.62 mL (1.6 eq, 6.19 mmol) Perchlorsäure (60 Gew.-%) zu getropft. Das Eisbad wurde entfernt und das Reaktionsgemisch wurde für 36 h bei Raumtemperatur weitergerührt.

Das Gemisch wurde dreimal mit je 30 mL Wasser extrahiert. Die vereinten wässrigen Phasen wurden unter Rühren mit gesättigter, wässriger NaHCO₃-Lsg. versetzt, bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten war. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 50 mL EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Es wurde ein gelbliches Öl erhalten.

Summenformel: C₁₀H₁₉NO₂

Ausbeute: 224 mg (31 %)

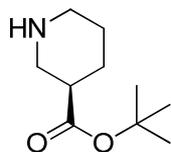
R_f: 0.44 DCM : MeOH (9:1)

¹H NMR (250.13 MHz, CDCl₃)

δ = 3.32-3.27 (m, 1H), 3.16-3.10 (m, 1H), 3.00 (s, 1H), 2.74-2.64 (m, 1H), 2.01-1.93 (m, 1H), 1.81-1.72 (m, 1H), 1.64-1.46 (m, 12H), 1.41-1.21 (m, 1H).

ESI *m/z* [M+H]⁺: 186.0

3.2.5. DB216 - (*R*)-*tert*-Butyl-piperidin-3-carboxylat



In einem 50 mL Rundkolben wurden 250 mg (1.0 eq, 1.94 mmol) (*R*)-Piperidin-3-carbonsäure in 10 mL *tert*-Butylacetat suspendiert. Die Lösung wurde mittels Eisbad gekühlt. Es wurden 0.31 mL (1.6 eq, 3.10 mmol) Perchlorsäure (60 Gew.-%) tropfenweise zugegeben. Das Eisbad wurde entfernt und das Reaktionsgemisch wurde über Nacht weitergerührt.

Das Gemisch wurde mit 15 mL Wasser extrahiert. Die organische Phase wurde mit 10 mL HCl_(aq) (5 %) extrahiert. Die vereinten wässrigen Phasen wurden unter Rühren mit festem Kaliumcarbonat versetzt, bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten war. Das Gemisch wurde zweimal mit je 20 mL Diethylether extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Es wurde ein klares, farbloses Öl erhalten.

Summenformel: C₁₀H₁₉NO₂

Ausbeute: 98 mg (27 %)

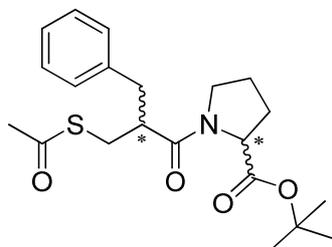
R_f: 0.37 DCM : MeOH (4:1)

¹H NMR (250.13 MHz, DMSO-d₆)

δ = 3.08 (bs, 1H), 2.99-2.93 (m, 1H), 2.79-2.74 (m, 1H), 2.52-2.34 (m, 2H), 2.27-2.16 (m, 1H), 1.88-1.79 (m, 1H), 1.56-1.40 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.34-1.23 (m, 1H).

ESI *m/z* [M + H]⁺: 186.0

3.3. Synthese der Amide

3.3.1. DB150 - *tert*-Butyl-1-(3-(acetylthio)-2-benzylpropanyl)pyrrolidin-2-carboxylat

In einem Schlenkcolben wurden in einer Argon-Atmosphäre 250 mg (1.0 eq, 1.05 mmol) 3-(Acetylthio)-2-benzylpropansäure in 5 mL DCM vorgelegt. Die Lösung wurde mittels Eisbad gekühlt und es wurden 0.15 mL (2.0 eq, 2.10 mmol) frisch destilliertes Thionylchlorid zugetropft. Das Eisbad wurde entfernt und die Reaktionslösung für 3 h zum Sieden erhitzt. Das Gemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt. Das Lösungsmittel und überschüssiges Thionylchlorid wurden unter reduziertem Druck entfernt. Das Säurechlorid wurde mit 3 mL ACN versetzt. Es wurden 163 mg (0.9 eq, 0.95 mmol) *tert*-Butyl-pyrrolidin-2-carboxylat und 329 mg (1.8 eq, 1.91 mmol) wasserfreies Kaliumcarbonat hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur, unter Argon, über Nacht gerührt. Das Gemisch wurde abfiltriert und das Filtrat unter reduziertem Druck verdampft. Der Rückstand wurde mit 10 mL Wasser versetzt und dreimal mit je 10 mL EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit 15 mL Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Silica, Hexan : EE 2:1) aufgereinigt. Es wurde ein gelbes Öl erhalten.

Summenformel: $C_{21}H_{29}NO_4S$

Ausbeute: 120 mg (32 %)

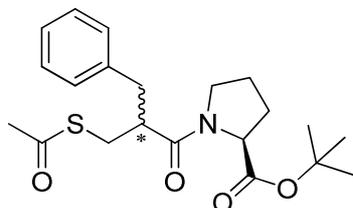
R_f : 0.68 Hexan : EE (2:1)

1H NMR (400.13 MHz, MeOD- d_4)

δ = 7.33-7.16 (m, 5H), 4.29-4.26 (m, 0.2H), 4.11-4.07 (m, 0.6H), 3.60-3.52 (m, 0.3H), 3.48-3.41 (m, 0.9H), 3.33-3.31 (m, 0.3H), 3.21-2.99 (m, 3H), 2.97-2.89 (m, 1H), 2.83-2.73 (m, 1.7H), 2.35-2.29 (m, 3H), 2.21-2.14 (m, 0.3H), 1.97-1.77 (m, 2.7H). 1.71-1.65 (m, 0.3H), 1.53-1.48 (m, 0.7H), 1.46-1.43 (m, 9H).

ESI m/z $[M + H]^+$: 393.0

3.3.2. DB381 - (2S)-tert-Butyl-1-(3-(acetylthio)-2-benzylpropanyl)pyrrolidin-2-carboxylat



Es wurden 330 mg (1.2 eq, 1.39 mmol) 3-(Acetylthio)-2-benzylpropansäure in 10 mL DCM gelöst. Es wurden ein Tropfen DMF und 0.25 mL (2.9 eq, 3.46 mmol) Thionylchlorid zugegeben. Das Gemisch wurde für 3 h zum Sieden erhitzt. Das Lösungsmittel und überschüssiges Thionylchlorid wurden unter reduziertem Druck entfernt. Der gelbe Rückstand wurde ohne weitere Aufreinigung mit 10 mL ACN versetzt. Die Lösung wurde mittels Eisbad gekühlt. Es wurden 250 mg (1.0 eq, 1.20 mmol) *tert*-Butylpyrrolidin-2-carboxylat Hydrochlorid und 0.42 mL (2.0 eq, 2.41 mmol) DIPEA hinzugefügt. Das Eisbad wurde entfernt und das Reaktionsgemisch über Nacht weiter gerührt. Es wurden 20 mL Wasser zugegeben und der pH-Wert mit 2 M HCl_(aq) auf 1 eingestellt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 15 mL EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit 15 mL 2 M HCl_(aq) und einmal mit 15 mL gesättigter, wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Silica, Hexan : EE 1:1) aufgereinigt.

Summenformel: C₂₁H₂₉NO₄S

Ausbeute: 233 mg (49 %)

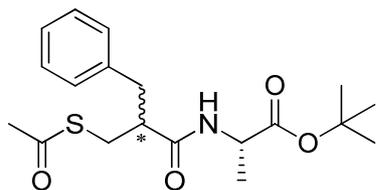
R_f: 0.66 Hexan : EE (2:1)

¹H NMR (250.13 MHz, DMSO-d₆)

δ = 7.31-7.14 (m, 5H), 4.19-4.14 (m, 0.3H), 4.02-3.97 (m, 0.5H), 3.66-3.61 (m, 0.2H), 3.58-3.51 (m, 0.3H), 3.45-3.37 (m, 1H), 3.05-2.85 (m, 3.6H), 2.82-2.73 (m, 1.3H), 2.69-2.57 (m, 0.6H), 2.32-2.25 (m, 3H), 2.18-2.05 (m, 0.5H), 1.94-1.50 (m, 3.7H), 1.38-1.37 (m, 9H).

ESI *m/z* [M + Na]⁺: 413.9

3.3.3. DB313 - (2S)-tert-Butyl-2-(3-(acetylthio)-2-benzylpropanamido)propanoat



In einem 50 mL Rundkolben wurden 250 mg (1.0 eq, 1.05 mmol) 3-(Acetylthio)-2-benzylpropanensäure in 5 mL DCM gelöst. Es wurden 0.19 mL (2.5 eq, 2.62 mmol) Thionylchlorid und ein Tropfen DMF zugegeben. Die Lösung wurde für 3 h zum Sieden erhitzt. Das Lösungsmittel und überschüssiges Thionylchlorid wurden unter reduziertem Druck entfernt. Das erhaltene Säurechlorid wurde unter Argon in 5 mL ACN gelöst. Es wurden 120 mg (0.6 eq, 0.66 mmol) *D*-Alanin-*O*-*tert*-butylester Hydrochlorid und 5 mL DMF hinzugefügt. Anschließend wurden 0.35 mL (1.9 eq, 1.98 mmol) DIPEA zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 60 °C gerührt.

Es wurden 20 mL Wasser hinzugegeben. Mit 2 M HCl_(aq) wurde der pH-Wert auf 1 eingestellt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 15 mL EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit je 15 mL 1 M NaOH_(aq) und einmal mit 10 mL gesättigter, wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Es wurde ein klares, viskoses Öl erhalten.

Summenformel: C₁₉H₂₇NO₄S

Ausbeute: 71 mg (19 %)

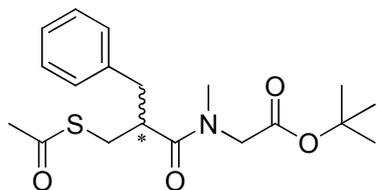
R_f: 0.50 Hexan : EE (2:1)

¹H NMR (250.13 MHz, CDCl₃)

δ = 7.30-7.15 (m, 5H), 5.93 (d, 0.5H, ³J_{HH} = 6.9 Hz), 5.78 (d, 0.5H, ³J_{HH} = 6.9 Hz), 4.40-4.26 (m, 1H), 3.18-3.03 (m, 2H), 3.01-2.80 (m, 2H), 2.64-2.51 (m, 1H), 2.33-2.32 (m, 3H), 1.43-1.42 (m, 9H), 1.31 (d, 1.5H, ³J_{HH} = 6.9 Hz), 1.06 (d, 1.5H, ³J_{HH} = 6.9 Hz).

ESI *m/z* [M + H]⁺: 365.9

3.3.4. DB305 - *tert*-Butyl-2-(3-(acetylthio)-2-benzyl-*N*-methylpropanamido)acetat



In einem Schlenkkolben wurden 275 mg (1.2 eq, 1.15 mmol) 3-(Acetylthio)-2-benzylpropansäure in 5 mL DCM gelöst. Es wurden 0.21 mL (2.8 eq, 2.62 mmol) Thionylchlorid und ein Tropfen DMF zugegeben. Die Lösung wurde 3 h zum Sieden erhitzt. Das Lösungsmittel und überschüssiges Thionylchlorid wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das Säurechlorid wurde unter Argon in 5 mL ACN gelöst. Das Gemisch wurde mit 135 mg (1.0 eq, 0.93 mmol) *tert*-Butyl-2-(methylamino)acetat und 0.24 mL (1.5 eq, 1.40 mmol) DIPEA versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Es wurden 40 mL Wasser hinzugegeben. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 20 mL EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden je einmal mit 30 mL 1 M NaOH_(aq), 2 M HCl_(aq) und gesättigter, wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Silica, Hexan : EE 2:1) aufgereinigt. Es wurde ein gelbes viskoses Öl erhalten.

Summenformel: C₁₉H₂₇NO₄S

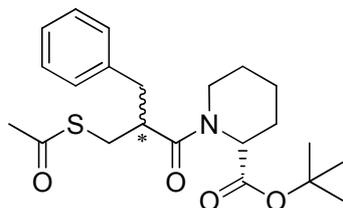
Ausbeute: 87 mg (26 %)

R_f: 0.60 Hexan : EE (2:1)

¹H NMR (250.13 MHz, CDCl₃)

δ = 7.31-7.27 (m, 1H), 7.25-7.15 (m, 4H), 4.11-4.04 (m, 0.7H), 3.84-3.77 (m, 0.7H), 3.75-3.68 (m, 0.3H), 3.57-3.50 (m, 0.3H), 3.30-2.80 (m, 8H), 2.32-2.30 (m, 3H), 1.45-1.43 (m, 9H).

ESI *m/z* [M + H]⁺: 365.9

3.3.5. DB318 - (2*R*)-*tert*-Butyl-1-(3-(acetylthio)-2-benzylpropanyl)piperidin-2-carboxylat

In einem 50 mL Rundkolben wurden 250 mg (1.3 eq, 1.05 mmol) 3-(Acetylthio)-2-methylpropansäure in 5 mL DCM gelöst. Es wurden 0.19 mL (3.0 eq, 2.62 mmol) Thionylchlorid und ein Tropfen DMF zugegeben. Die Lösung wurde für 3 h zum Sieden erhitzt. Das Lösungsmittel und überschüssiges Thionylchlorid wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das erhaltene Säurechlorid wurde in einer Argon-Atmosphäre mit 5 mL ACN versetzt. Es wurden 159 mg (1.0 eq, 0.86 mmol) (*R*)-*tert*-Butylpiperidin-2-carboxylat und 0.22 mL (1.5 eq, 1.29 mmol) DIPEA hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Es wurden 40 mL Wasser hinzugegeben. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 20 mL EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden je einmal mit je 30 mL 1 M NaOH_(aq), 2 M HCl_(aq) und gesättigter, wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Silica, Hexan : EE 2:1) aufgereinigt. Es wurde ein gelbes viskoses Öl erhalten.

Summenformel: C₂₂H₃₁NO₄S

Ausbeute: 211 mg (61 %)

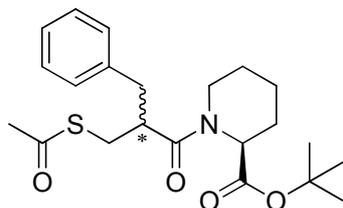
R_f: 0.56 Hexan : EE (2:1)

¹H NMR (250.13 MHz, CDCl₃)

δ = 7.33-7.15 (m, 5H), 5.33-5.24 (m, 0.8H) 4.69-4.50 (m, 0.3H), 4.15-4.11 (m, 0.2H), 3.82-3.77 (m, 0.3H), 3.56-3.51 (m, 0.5H), 3.35-3.20 (m, 1H), 3.17-2.99 (m, 3.2H), 2.95-2.84 (m, 1.3H), 2.79-2.71 (m, 0.5H), 2.63-2.51 (m, 0.2H), 2.34-2.29 (m, 3H), 2.25-2.19 (m, 0.4H), 2.11-2.07 (m, 0.4H), 1.83-1.61 (m, 1H), 1.46-1.44 (m, 9H), 1.33-1.16 (m, 2.5H), 1.11-0.98 (m, 0.7H), 0.50-0.30 (m, 0.7H).

ESI *m/z* [M + H]⁺: 405.9

3.3.6. DB354 - (2*S*)-*tert*-Butyl-1-(3-(acetylthio)-2-benzylpropanyl)piperidin-2-carboxylat



In einem 50 mL Rundkolben wurden 300 mg (1.1 eq, 1.26 mmol) 3-(Acetylthio)-2-methylpropansäure in 5 mL DCM gelöst. Es wurden 0.23 mL (2.8 eq, 3.15 mmol) Thionylchlorid und ein Tropfen DMF zugegeben. Die Lösung wurde 3 h zum Sieden erhitzt. DCM und überschüssiges Thionylchlorid wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das erhaltene Säurechlorid wurde in einer Argon-Atmosphäre mit 10 mL ACN versetzt. Die Lösung wurde mittels Eisbad gekühlt. Es wurden 208 mg (1.0 eq, 1.12 mmol) (*S*)-*tert*-Butylpiperidin-2-carboxylat und 0.29 mL (1.5 eq, 1.68 mmol) DIPEA hinzugefügt. Das Eisbad wurde entfernt und das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Es wurden 40 mL Wasser hinzugegeben. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 20 mL EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden je einmal mit je 30 mL 1 M NaOH_(aq), 2 M HCl_(aq) und gesättigter, wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Silica, Hexan : EE 2:1) aufgereinigt. Es wurde ein gelbes viskoses Öl erhalten.

Summenformel: C₂₂H₃₁NO₄S

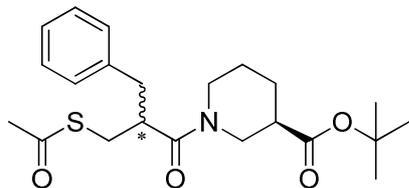
Ausbeute: 255 mg (56 %)

R_f: 0.71 Hexan : EE (2:1)

¹H NMR (250.13 MHz, DMSO-d₆)

δ = 7.31-7.15 (m, 5H), 5.08-4.93 (m, 0.7H), 4.41-4.28 (m, 0.4H), 3.95-3.90 (m, 0.3H), 3.65-3.59 (m, 0.4H), 3.32-2.57 (m, 6.1H), 2.43-2.36 (m, 0.3H), 2.31-2.27 (m, 3H), 2.24-1.77 (m, 1.3H), 1.68-1.51 (m, 1.4H), 1.41-1.36 (m, 9H), 1.33-1.24 (m, 0.9H), 1.19-1.06 (m, 1.1H), 1.03-0.85 (m, 0.5H), 0.58-0.46 (m, 0.6H).

ESI *m/z* [M + H]⁺: 405.9

3.3.7. DB233 - (3*R*)-*tert*-Butyl-1-(3-(acetylthio)-2-benzylpropanyl)piperidin-3-carboxylat

In einem Schlenkkolben wurden in einer Argon-Atmosphäre 160 mg (1.4 eq, 0.67 mmol) 3-(Acetylthio)-2-benzylpropansäure in 2 mL Thionylchlorid gelöst. Es wurde ein Tropfen DMF zugegeben. Die Lösung wurde für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Überschüssiges Thionylchlorid wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das erhaltene Säurechlorid wurde mit 3 mL ACN versetzt. Es wurden 90 mg (1.0 eq, 0.49 mmol) (*R*)-*tert*-Butylpiperidin-3-carboxylat und 168 mg (2.5 eq, 1.21 mmol) wasserfreies Kaliumcarbonat hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde in einer Argonatmosphäre, bei Raumtemperatur, für 24 h gerührt.

Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit 20 mL Wasser versetzt und dreimal mit je 20 mL EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit 20 mL gesättigter, wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Der ölige Rückstand wurde im Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Silica, Hexan : EE 2:1) aufgereinigt. Es wurde ein klares Öl erhalten.

Summenformel: $C_{22}H_{31}NO_4S$

Ausbeute: 54 mg (27 %)

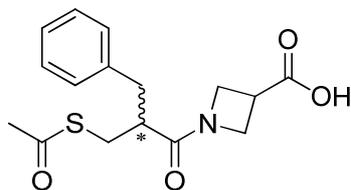
R_f: 0.54 Hexan : EE (2:1)

¹H NMR (250.14 MHz, CDCl₃)

δ = 7.30-7.13 (m, 5H), 4.74-4.68 (m, 0.5H), 4.63-4.36 (m, 0.5H), 3.71-3.56 (m, 0.5H), 3.51-3.46 (m, 0.5H), 3.31-3.20 (m, 1H), 3.17-3.09 (m, 2H), 2.99-2.81 (m, 2.5H), 2.75-2.57 (m, 0.5H), 2.57-2.40 (m, 1H), 2.32 (s, 3H), 2.30-2.19 (m, 0.5H), 2.03-1.92 (m, 0.5H), 1.80-1.60 (m, 1H), 1.55-1.45 (m, 1H), 1.43 (s, 9H), 1.36-1.32 (m, 0.5H), 1.18-1.00 (m, 0.5H), 0.94-0.83 (m, 0.5H), 0.40-0.22 (m, 0.5H).

ESI *m/z* [M + H]⁺: 406.0

3.3.8. DB277 - 1-(3-(Acetylthio)-2-benzylpropanyl)azetidin-3-carbonsäure



In einem 50 mL Rundkolben wurden 250 mg (1.5 eq, 0.42 mmol) 3-(Acetylthio)-2-benzylpropansäure in 5 mL DCM gelöst. Es wurden 0.08 mL (3.8 eq, 1.05 mmol) Thionylchlorid und drei Tropfen DMF hinzugegeben. Das Gemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Überschüssiges Thionylchlorid und DCM wurden unter reduziertem Druck entfernt. Das Säurechlorid wurde in 2.5 mL ACN gelöst. Es wurden 27 mg (1.0 eq, 0.27 mmol) Azetidin-3-carbonsäure in 2.5 mL DMF zugegeben und anschließend 0.17 mL (3.6 eq, 0.97 mmol) DIPEA zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 60 °C gerührt.

Es wurden 20 mL Wasser hinzugegeben und mit 2 M HCl_(aq) der pH-Wert auf 1 eingestellt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 15 mL EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit 15 mL gesättigter, wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Silica, Hexan : *i*-Propanol 3:1 [1 % AcOH]) aufgereinigt. Es wurde ein gelbes, viskoses Öl erhalten.

Summenformel: C₁₆H₁₉NO₄S

Ausbeute: 43 mg (50 %)

R_f: 0.48 Hexan : *i*-Propanol (3:1, + 1 % AcOH)

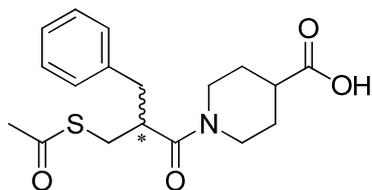
¹H NMR (250.14 MHz, CDCl₃)

δ = 7.34-7.15 (m, 5H), 4.17-3.98 (m, 2.6H), 3.31-3.28 (m, 1H), 3.25-3.16 (m, 0.5H), 3.10-3.07 (m, 1.5H), 3.04-2.92 (m, 0.7H), 2.88-2.85 (m, 1.7H), 2.72-2.60 (m, 1H), 2.35 (s, 3H).*

*Das Signal der Carbonsäure war nicht detektierbar.

ESI *m/z* [M - H]⁻: 319.9

3.3.9. DB254 - 1-(3-(Acetylthio)-2-benzylpropanyl)piperidin-4-carbonsäure



In einem Schlenkkolben wurden 490 mg (1 eq, 2.06 mmol) 3-(Acetylthio)-2-methylpropansäure in 3 mL Thionylchlorid gelöst. Es wurde ein Tropfen DMF zugegeben. Die Lösung wurde für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Überschüssiges Thionylchlorid wurde unter reduziertem Druck entfernt. In einem 50 mL Rundkolben wurden 150 mg (0.6 eq, 1.16 mmol) Piperidin-4-carbonsäure in 5 mL Wasser und 5 mL ACN gelöst. Es wurden 344 mg (2.2 eq, 4.10 mmol) Natriumhydrogencarbonat zugegeben. Das frisch hergestellte Säurechlorid wurde in 5 mL ACN aufgenommen und langsam zur Reaktionslösung getropft. Das Reaktionsgemisch wurde für 24 h bei Raumtemperatur gerührt.

Das organische Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Der flüssige Rückstand wurde mit 10 mL DCM gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit konz. $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ auf pH 2 eingestellt und dreimal mit je 10 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Silica, Hexan : *i*-Propan 3:1 [+ 1% AcOH]) aufgereinigt. Es wurde ein gelbstichiges, viskoses Öl erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{NO}_4\text{S}$

Ausbeute: 99 mg (24 %)

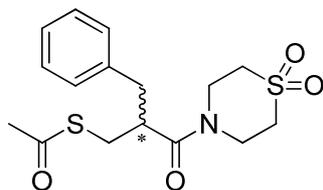
R_f : 0.33 Hexan : *i*-Propanol (5:1, + 1 % AcOH)

^1H NMR (250.14 MHz, CDCl_3)

δ = 7.29-7.14 (m, 5H), 4.50-4.44 (m, 0.5H), 4.27-4.20 (m, 0.5H), 3.60-3.45 (m, 1H), 3.26-3.17(m, 1H), 3.13-2.95 (m, 1.5H), 2.99-2.81 (m, 2.5H), 2.78-2.61 (m, 1H), 2.57-2.39 (m, 1H), 2.33 (s, 3H), 1.86-1.78 (m, 1H), 1.70-1.47 (m, 2H), 1.39-1.26 (m, 1H), 0.90-0.83 (m, 0.5H), 0.59-0.42 (m, 0.5H).

ESI m/z $[\text{M} - \text{H}]^-$: 348.1

3.3.10. DB245 - (S)-(2-Benzyl-3-(1,1-dioxidthiomorpholin)-3-oxopropyl)ethanthioat



In einem Schlenkkolben wurden in einer Argon-Atmosphäre 540 mg (1.2 eq, 2.27 mmol) 3-(Acetylthio)-2-benzylpropansäure in 2 mL Thionylchlorid gelöst. Es wurde ein Tropfen DMF zugegeben. Die Lösung wurde für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Überschüssiges Thionylchlorid wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das erhaltene Säurechlorid wurde mit 3 mL ACN versetzt. Es wurden 250 mg (1 eq, 1.85 mmol) Thiomorpholin-1,1-dioxid und 639 mg (2.5 eq, 4.62 mmol) wasserfreies Kaliumcarbonat hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur unter Argon über Nacht gerührt.

Das Gemisch wurde abfiltriert und das Filtrat unter reduziertem Druck verdampft. Der Rückstand wurde mit 20 mL gesättigter, wässriger NaHCO₃-Lsg. versetzt und dreimal mit je 20 mL EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit 20 mL gesättigter, wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Der ölige Rückstand wurde im Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Silica, Hexan : EE 2:1) aufgereinigt. Es wurde ein farbloses, viskoses Öl erhalten.

Summenformel: C₁₆H₂₁NO₄S₂

Ausbeute: 228 mg (35 %)

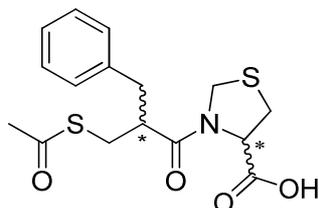
R_f: 0.48 Hexan : EE (1:1, + 1 % TFA)

¹H NMR (400.13 MHz, CDCl₃)

δ = 7.30-7.23 (m, 3H), 7.19-7.15 (m, 2H), 4.40-4.37 (m, 1H), 3.65-3.45 (m, 3 H), 3.22-3.15 (m, 1H), 3.09-3.07 (m, 2H), 2.96-2.82 (m, 3H), 2.69-2.62 (m, 1H), 2.57-2.51 (m, 1H), 2.33 (s, 3H), 1.59-1.52 (m, 1H).

ESI *m/z* [M + H]⁺: 355.7

3.3.11. DB349 - 3-(3-(Acetylthio)-2-benzylpropanyl)thiazolidin-4-carbonsäure



Es wurden 210 mg (1.2 eq, 0.88 mmol) 3-(Acetylthio)-2-benzylpropansäure in 10 mL DCM gelöst. Ein Tropfen DMF und 0.16 mL (2.9 eq, 2.20 mmol) Thionylchlorid wurden zugegeben. Das Gemisch wurde für 3 h zum Sieden erhitzt. Das Lösungsmittel und überschüssiges Thionylchlorid wurden unter reduziertem Druck abdestilliert. In einem 50 mL Rundkolben wurde das frisch hergestellte Säurechlorid mit 10 mL ACN versetzt. Die Lösung wurde mittels Eisbad gekühlt. Es wurden 100 mg (1.0 eq, 0.75 mmol) Thiazolidin-4-carbonsäure und 0.26 mL (2.0 eq, 1.50 mmol) DIPEA hinzugefügt. Das Eisbad wurde entfernt und das Reaktionsgemisch über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit 10 mL Wasser versetzt und mit 2 M HCl_(aq) der pH-Wert auf 1 eingestellt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit je 15 mL EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 10 mL gesättigter, wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC (C18, Methode B, t_R: 13.24 Min) aufgereinigt. Es wurde ein farbloses viskoses Öl erhalten.

Summenformel: C₁₆H₁₉NO₄S₂

Ausbeuten: 115 mg (43 %)

R_f: 0.52 Hexan : EE (2:1, 1 % AcOH)

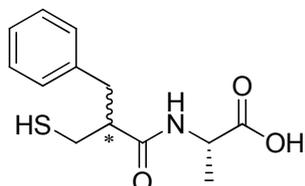
¹H NMR (250.13 MHz, CDCl₃)

δ = 7.33-7.16 (m, 5H), 5.01-4.97 (m, 0.2H), 4.83-4.80 (m, 0.3H), 4.60-4.44 (m, 0.6H), 4.36-4.32 (m, 0.3H), 3.75-3.69 (m, 0.6H), 3.40-3.26 (m, 0.7H), 3.16-2.81 (m, 6.5H), 2.72-2.66 (m, 0.3H), 2.36-2.31 (m, 3.5H).

ESI *m/z* [M - H]⁻: 351.8

3.4. Entschützungen

3.4.1. DB314 - (2S)-2-(2-Benzyl-3-mercaptopropanamid)propansäure



In einem 50 mL Rundkolben wurden 65 mg (1.0 eq, 0.18 mmol) (2S)-*tert*-Butyl-2-(3-(acetylthio)-2-benzylpropanamid)propanoat in 5 mL DCM gelöst. Es wurden 0.07 mL (5.0 eq, 0.89 mmol) TFA hinzugegeben. Das Gemisch wurde über Nacht zum Sieden erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und TFA Reste mit Toluol ko-evaporiert. Das Rohprodukt der Esterhydrolyse wurde in 12 mL Wasser suspendiert. Das Gemisch wurde mit Argon im Ultraschallbad entgast und anschließend im Eisbad gekühlt. Es wurde 1 mL 25 % Ammoniak_(aq) zugegeben. Das Eisbad wurde entfernt und das Gemisch bei Raumtemperatur für 3 h weitergerührt.

Der pH-Wert wurde mit 2 M HCl_(aq) auf 1 eingestellt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 10 mL EE extrahiert. Die organischen Phasen wurden einmal mit 10 mL gesättigter, wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC (C18, Methode B) aufgereinigt. Es wurde ein farbloses, viskoses Öl erhalten.

Summenformel:	C ₁₃ H ₁₇ NO ₃ S
Ausbeute:	16 mg (34 %)
R _f :	0.67 Hexan : EE (1:3, + 1 % AcOH)
HPLC t _R :	7.74 (C18, Methode B)

¹H NMR (500.18 MHz, CDCl₃)

δ = 7.30-7.27 (m, 2H), 7.23-7.19 (m, 1H), 7.16-7.15 (m, 2H), 5.98 (d, 0.4H, ³J_{HH} = 6.9 Hz), 5.83 (d, 0.6H, ³J_{HH} = 6.9 Hz), 4.55-4.44 (m, 1H), 2.97-2.82 (m, 3H), 2.62-2.53 (m, 2H), 1.67 (t, 0.5H, ³J_{HH} = 9.0 Hz), 1.53 (t, 0.5H, ³J_{HH} = 9.0 Hz), 1.42 (d, 1.3H, ³J_{HH} = 6.9 Hz), 1.20 (d, 1.3H, ³J_{HH} = 6.9 Hz).

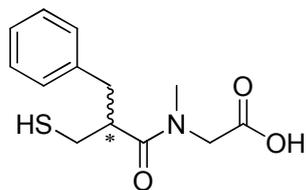
Material und Methoden

^{13}C NMR (125.77 MHz, CDCl_3).

$\delta = 175.74, 173.51, 138.45, 128.84, 126.77, 53.91, 53.32, 48.22, 38.45, 26.24, 17.79$.

HRMS m/z kalkuliert $[\text{M} + \text{H}]^+$: 268.1002, gefunden $[\text{M} + \text{H}]^+$: 268.1007, $\Delta = 1.8$ ppm

3.4.2. DB315 - 2-(2-Benzyl-3-mercapto-*N*-methylpropanamid)essigsäure



tert-Butyl-2-(3-(acetylthio)-2-benzyl-*N*-methylpropanamid)acetat: 80 mg (1.0 eq, 0.22 mmol). Die Verbindung wurde nach der Synthesevorschrift für DB314 dargestellt. Es wurde ein viskoses, farbloses Öl erhalten.

Summenformel: $C_{13}H_{17}NO_3S$

Ausbeute: 24 mg (42 %)

R_f : 0.73 Hexan : EE (1:3, + 1 % AcOH)

HPLC t_R : 8.21 (C18, Methode B)

1H NMR (500.18 MHz, $CDCl_3$)

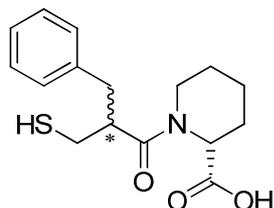
δ = 7.29-7.26 (m, 2H), 7.23-7.20 (m, 1H), 7.17-7.13 (m, 2H), 4.23-4.19 (m, 0.8H), 3.99-3.95 (m, 0.8H), 3.87-3.78 (m, 0.2H), 3.26-3.20 (m 1H), 3.02-2.91 (m, 2.4H), 2.89 (s, 2.6H), 2.84-2.78 (m, 1H), 2.55-2.49 (m, 1H), 1.68-1.65 (m, 1H).

^{13}C NMR (125.77 MHz, $CDCl_3$)

δ = 175.26, 172.99, 138.45, 128.99, 128.61, 126.79, 50.29, 48.25, 38.93, 37.03, 26.81.

HRMS m/z kalkuliert $[M + H]^+$: 268.1002, gefunden $[M + H]^+$: 268.1009, Δ = 2.5 ppm

3.4.3. DB320 - (2R)-1-(2-Benzyl-3-mercaptopropanyl)piperidin-2-carbonsäure



(2R)-*tert*-Butyl-1-(3-(acetylthio)-2-benzylpropanyl)piperidin-2-carboxylat: 203 mg (1.0 eq, 0.50 mmol).

Die Verbindung wurde nach der Synthesevorschrift für DB314 dargestellt. Es wurde ein farbloses, stark viskoses Öl erhalten.

Summenformel: $C_{16}H_{21}NO_3S$

Ausbeute: 47 mg (31 %)

R_f: 0.33 Hexan : EE (1:2, + 1 % AcOH)

HPLC t_R: 15.35 (C18, Methode B)

¹H NMR (500.18 MHz, CDCl₃)

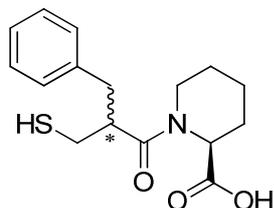
δ = 7.29-7.11 (m, 5H), 5.42-5.41 (m, 0.3H), 5.35 (bs, 0.6H), 4.93-4.92 (m, 0.04 H), 4.69-4.66 (m, 0.04H), 4.57-4.55 (m, 0.06H), 4.30-4.29 (m, 0.06H), 3.77-3.75 (m, 0.3H), 3.67-3.65 (m, 0.6H), 3.33-3.27 (m, 0.6H), 3.23-3.17 (m, 0.3H), 3.11-2.80 (m, 3.8H), 2.70-2.70 (m, 0.4H), 2.66-2.47 (m, 1.1H), 2.29-2.26 (m, 0.3H), 2.22-2.13 (m, 0.6H), 1.87-1.60 (m, 1.8H), 1.55-1.25 (m, 4H), 1.08-0.99 (m, 0.1H), 0.55-.40 (m, 0.7H).

¹³C NMR (125.77 MHz, CDCl₃)

δ = 175.28, 174.26, 138.76, 138.34, 129.00, 128.60, 126.65, 52.32, 47.79, 44.04, 43.50, 39.34, 38.51, 27.42, 26.43, 26.02, 25.28, 24.53, 20.74, 20.57.

HRMS *m/z* kalkuliert [M + H]⁺: 308.1315, gefunden [M + H]⁺: 308.1318, Δ = 1.0 ppm

3.4.4. DB361- (2S)-1-(2-Benzyl-3-mercaptopropanyl)piperidin-2-carbonsäure



(2S)-*tert*-Butyl-1-(3-(acetylthio)-2-benzylpropanyl)piperidin-2-carboxylat: 238 mg (1.0 eq, 0.59 mmol).

Die Verbindung wurde nach der Synthesevorschrift für DB314 dargestellt. Es wurde ein farbloses Harz erhalten.

Summenformel:	C ₁₆ H ₂₁ NO ₃ S
Ausbeute:	92 mg (51 %)
R _f :	0.52 DCM : MeOH (9:1)
HPLC t _R :	14.84 (C18, Methode B)

¹H NMR (500.18 MHz, DMSO-d₆)

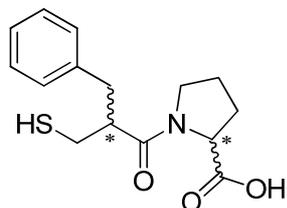
δ = 12.79 (bs, 1H), 7.29-7.16 (m, 5H), 5.17-5.16 (m, 0.2H), 5.09-5.05 (m, 0.5H), 4.48-4.43 (m, 0.3H), 4.34-4.31 (m, 0.2H), 3.92-3.90 (m, 0.3H), 3.74-3.71 (m, 0.5H), 3.26-3.18 (m, 1H), 3.06-2.83 (m, 1.9H), 2.76-2.55 (m, 2.3H), 2.46-2.36 (m, 0.7H), 2.32 (t, ³J_{HH} = 8.1 Hz, 0.1H), 2.28 (t, ³J_{HH} = 8.1 Hz, 0.3 H), 2.19-2.17 (m, 0.5H), 2.13-2.10 (m, 0.3H), 2.01-1.99 (m, 0.5H), 1.80-1.78 (m, 0.2H), 1.65-1.61 (m, 0.8H), 1.56-1.49 (m, 0.3H), 1.47-1.38 (m, 1H), 1.36-1.33 (m, 0.6H), 1.30-1.23 (m, 0.6H), 1.21-1.07 (m, 1.1H), 0.90-0.80 (m, 0.2H), 0.51-0.43 (m, 0.6H).

¹³C NMR (125.77 MHz, DMSO-d₆)

δ = 172.86, 139.49, 139.10, 129.62, 29.39, 128.78, 126.72, 51.89, 46.46, 46.18, 43.51, 43.27, 38.67, 37.57, 27.18, 26.63, 26.04, 25.65, 24.86, 21.24, 21.01.

HRMS *m/z* kalkuliert [M + H]⁺: 308.1315, gefunden [M + H]⁺: 308.1321, Δ = 1.9 ppm.

3.4.5. DB151 - 1-(2-Benzyl-3-mercapto-propyl)pyrrolidin-2-carbonsäure



In einem Rundkolben wurden 106 mg (1.0 eq, 0.27 mmol) *tert*-Butyl-1-(3-(acetylthio)-2-benzylpropyl)pyrrolidin-2-carboxylat mit 5 mL konzentrierter $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ versetzt und unter Argon für 1 h zum Sieden erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und an der Lyophilie getrocknet. Es wurde ein farbloses, harziges Öl erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{NO}_3\text{S}$

Ausbeute: 79 mg (99 %)

R_f : 0.49 Hexan : EE (1:1, + 1 % TFA)

HPLC t_R : 9.44 (C18, Methode B)

^1H NMR (250.14 MHz, MeOD-d_4)

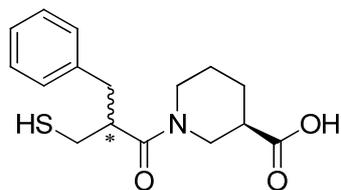
δ = 7.30-7.17 (m, 5H), 4.48-4.34 (m, 0.3H), 4.28-4.23 (m, 0.4H), 3.73-3.54 (m, 0.8H), 3.48-3.36 (0.4H), 3.27-3.23 (m, 0.2H), 3.22-3.04 (m, 0.7H), 3.01-2.73 (m, 3.6H), 2.69-2.34 (m, 2H), 2.27-2.04 (m, 0.7H), 2.02-1.81 (m, 2H), 1.78-1.44 (m, 0.9H).

^{13}C NMR (62.90 MHz, MeOD-d_4)

δ = 177.25, 140.24, 130.07, 129.55, 127.74, 60.26, 52.24, 39.91, 38.09, 30.24, 27.74, 25.98, 25.47.

HRMS m/z kalkuliert $[\text{M} + \text{H}]^+$: 294.1158, gefunden $[\text{M} + \text{H}]^+$: 294.1160, Δ = 0.7 ppm.

3.4.6. DB269 - (3*R*)-1-(2-Benzyl-3-mercaptopropanyl)piperidin-3-carbonsäure



In einem 50 mL Rundkolben wurden 54 mg (1.0 eq, 0.10 mmol) (3*R*)-*tert*-Butyl 1-(3-(acetylthio)-2-benzylpropanyl)piperidin-3-carbonsäure mit 10 mL konz. HCl_(aq) versetzt und für 2.5 h zum Sieden erhitzt. Das auf Raumtemperatur abgekühlte Gemisch wurde gefriergetrocknet. Es wurde ein farbloses, harziges Öl erhalten.

Summenformel: C₁₆H₂₁NO₃S

Ausbeute: 40 mg (98 %)

R_f: 0.38 Hexan : EE (1:2)

HPLC t_R: 9.43 (C18, Methode B)

¹H NMR (500.18 MHz, DMSO-d₆)

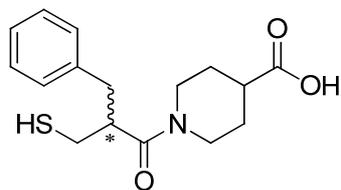
δ = 12.39 (bs, 1H), 7.27-7.24 (m, 2H), 7.21-7.19 (m, 1H), 7.17-7.14 (m, 2H), 4.47-4.40 (m, 0.5H), 4.11-4.09 (m, 0.5 H), 3.83-3.81 (m, 0.2H), 3.74-3.72 (m, 0.5H), 3.67-3.65 (m, 0.3H), 3.29-3.21 (m, 1H), 3.00-2.95 (m, 0.3H), 2.90-2.53 (m, 5H), 2.46-2.38 (m, 0.5H), 2.34-2.27 (m, 1H), 2.26-2.21 (m, 0.2H), 2.01-1.84 (m, 1H), 1.70-1.66 (m, 0.5H), 1.60-1.53 (m, 0.5H), 1.50-1.23 (m, 2H), 1.18-1.14 (m, 0.3H), 0.99-0.92 (m, 0.3H), 0.36-0.29 (m, 0.3H).

¹³C NMR (125.77 MHz, DMSO-d₆)

δ = 171.72, 139.71, 129.51, 126.75, 79.69, 47.44, 46.55, 43.84, 42.00, 41.16, 39.91, 27.29, 26.53, 25.44, 24.53.

HRMS *m/z* kalkuliert [M + H]⁺: 308.1315, gefunden [M + H]⁺: 308.1314, Δ = 0.3 ppm.

3.4.7. DB272 - 1-(2-Benzyl-3-mercaptopropanyl)piperidin-4-carbonsäure



In einem 50 mL Rundkolben wurden 80 mg (1.0 eq, 0.23 mmol) 1-(3-(Acetylthio)-2-benzylpropanyl)piperidin-4-carbonsäure mit 10 mL konzentrierter $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ versetzt und für 2.5 h zum Sieden erhitzt. Das auf Raumtemperatur abgekühlte Gemisch wurde gefriergetrocknet. Es wurde ein farbloses, stark viskoses Öl erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_3\text{S}$

Ausbeute: 68 mg (97 %)

R_f : 0.29 Hexan : EE (1:2)

HPLC t_R : 7.87 (C18, Methode B)

^1H NMR (500.18 MHz, DMSO-d_6)

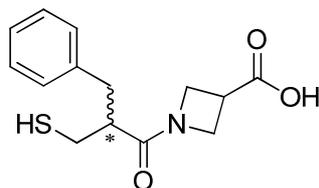
δ = 12.21 (bs, 1H), 7.30-7.23 (m, 2H), 7.20-7.19 (m, 1H), 7.16-7.14 (m, 2H), 4.25-4.15 (m, 1H), 3.73-3.70 (m, 1H), 3.26-3.21 (m, 1H), 2.97-2.82 (m, 1H), 2.80-2.64 (m, 4H), 2.62-2.54 (m, 1.5H), 2.40-2.26 (m, 1.5H), 1.71-1.68 (m, 1H), 1.56-1.54 (m, 1H), 1.48-1.30 (m, 1H), 1.10-1.01 (m, 0.5H), 0.56-0.48 (m, 0.5H).

^{13}C NMR (125.77 MHz, DMSO-d_6)

δ = 172.09, 138.71, 129.06, 128.72, 126.81, 50.33, 47.81, 40.34, 39.45, 36.75, 27.66, 24.97.

HRMS m/z kalkuliert $[\text{M} + \text{H}]^+$: 308.1315, gefunden $[\text{M} + \text{H}]^+$: 308.1315, Δ = 0.0 ppm.

3.4.8. DB306 - 1-(2-Benzyl-3-mercapto-propyl)azetidin-3-carbonsäure



In einem 50 mL Rundkolben wurden 32 mg (1.0 eq, 0.10 mmol) 1-(3-(Acetylthio)-2-benzylpropyl)azetidin-3-carbonsäure in 12 mL Wasser suspendiert. Das Gemisch wurde mit Argon entgast und anschließend im Eisbad gekühlt. Es wurde 1 mL 25 %iger Ammoniak_(aq) zugegeben. Das Eisbad wurde entfernt und das Gemisch bei Raumtemperatur weitergerührt.

Der pH-Wert wurde mit 2 M HCl_(aq) auf 1 eingestellt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 10 mL EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit 10 mL gesättigter, wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels HPLC aufgereinigt.

Summenformel: C₁₄H₁₇NO₃S

Ausbeute: 7 mg (25 %)

R_f: 0.45 Hexan : EE (1:3, + 1 % AcOH)

HPLC t_R: 6.12 Min (C18, Methode B)

¹H NMR (500.18 MHz, CDCl₃)

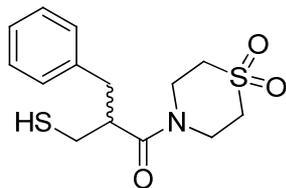
δ = 7.32-7.23 (m, 2.5H), 7.21-7.14 (m, 2.5H), 4.25 (t, ³J_{HH} = 8.6 Hz, 0.5H), 4.22-4.16 (m, 1H), 4.13-4.10 (m, 0.5H), 4.08-4.03 (m, 1H), 3.52-3.49 (m, 0.5H), 3.34-3.28 (m, 1H), 3.04-2.99 (m, 0.5H), 2.94-2.86 (m, 1H), 2.85-2.82 (m, 1.5H), 2.78-2.75 (m, 0.5H), 2.63-2.57 (m, 1H), 2.55-2.50 (m, 1H), 1.60-1.54 (m, 1H).

¹³C NMR (125.77 MHz, CDCl₃)

δ = 175.50, 173.51, 128.84, 128.66, 126.90, 52.03, 50.22, 48.53, 38.76, 31.50, 26.10.

HRMS *m/z* kalkuliert [M + H]⁺: 280.1002, gefunden [M + H]⁺: 280.1008, Δ = 2.1 ppm.

3.4.9. DB273 - 2-Benzyl-1-(1,1-dioxidthiomorpholin)-3-mercaptopropan-1-on



In einem 50 mL Rundkolben wurden 200 mg (1.0 eq, 0.56 mmol) S-(2-Benzyl-3-(1,1-dioxidthiomorpholin)-3-oxopropyl)ethanthioat mit 10 mL konzentrierter $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ versetzt und für 2.5 h zum Sieden erhitzt. Das auf Raumtemperatur abgekühlte Gemisch wurde gefriergetrocknet. Es wurde ein farbloses, stark viskoses Öl erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_3\text{S}_2$

Ausbeute: 173 mg (98 %)

R_f : 0.26 Hexan : EE (1:2)

HPLC t_R : 8.94 (C18, Methode B)

^1H NMR (500.18 MHz, CDCl_3)

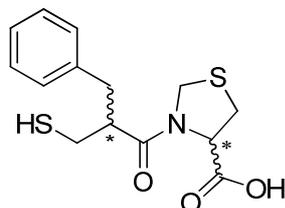
δ = 7.34-7.28 (m, 3 H), 7.17-7.16 (m, 2H), 4.35-4.33 (m, 1H), 3.77-3.68 (m, 2H), 3.63-3.58 (m, 1H), 3.19-3.13 (m, 1H), 3.03-2.97 (m, 1H), 2.94-2.85 (m, 3H), 2.77-2.72 (m, 1H), 2.71-2.64 (m, 2H), 1.70-1.66 (m, 1H), 1.52 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.94$ Hz).

^{13}C NMR (125.77 MHz, CDCl_3)

δ = 172.81, 138.57, 129.01, 127.53, 52.07, 51.67, 48.31, 43.90, 40.43, 39.83, 27.50.

HRMS m/z kalkuliert $[\text{M} + \text{H}]^+$: 352.0438, gefunden $[\text{M} + \text{H}]^+$: 352.0435, $\Delta = 0.9$ ppm.

3.4.10. DB358 - 3-(2-Benzyl-3-mercapto-propyl)thiazolidin-4-carbonsäure



Es wurden 72 mg (1.0 eq, 0.20 mmol) 3-(3-(Acetylthio)-2-benzylpropyl)thiazolidin-4-carbonsäure in 12 mL Wasser suspendiert. Das Gemisch wurde mit Argon im Ultraschallbad entgast und anschließend im Eisbad gekühlt. Es wurde 1 mL 25 % Ammoniak_(aq) zugegeben. Das Eisbad wurde entfernt und das Gemisch bei Raumtemperatur für 3 h weitergerührt.

Der pH-Wert wurde mit 2 M HCl_(aq) auf 1 eingestellt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 10 mL EE extrahiert. Die organischen Phasen wurden einmal mit 10 mL gesättigter, wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Es wurde ein farbloses, viskoses Öl erhalten.

Summenformel: C₁₄H₁₇NO₃S₂

Ausbeute: 25 mg (39 %)

R_f: 0.41 Hexan : EE (2:1, + 1 % AcOH)

HPLC t_R: 11.80 (C18, Methode B)

¹H NMR (500.18 MHz, DMSO-d₆)

δ = 12.84 (bs, 0.5H), 12.47 (bs, 0.5H), 7.31-7.16 (m, 5H), 5.39-5.37 (m, 0.1H), 4.93 (d, ³J_{HH} = 8.5 Hz, 0.2H), 4.90-4.88 (m, 0.2H), 4.75-4.71 (m, 0.3H), 4.57 (d, ³J_{HH} = 8.5 Hz, 0.2H), 4.47-4.44 (m, 0.2H), 4.38-4.34 (m, 0.3H), 4.27-4.22 (m, 0.3H), 3.19-3.03 (m, 1.2H), 3.00-2.67 (m, 3H), 2.65-2.54 (m, 1.4H), 2.46-2.23 (m, 1.4H).*

¹³C NMR (125.77 MHz, DMSO-d₆)

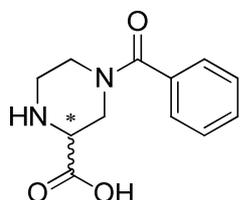
δ = 175.01, 171.68, 139.33, 129.72, 129.41, 128.92, 126.82, 61.56, 50.41, 49.42, 48.87, 48.56, 37.90, 36.85, 32.60, 26.74, 25.51.

*Die fehlenden Signale wurden von den Lösungsmittelsignalen überlagert

HRMS *m/z* kalkuliert [M + H]⁺: 312.0723, gefunden [M + H]⁺: 312.0725, Δ = 0.6 ppm.

3.5. Synthese der Piperazin-Derivate

3.5.1. DB333 - 4-Benzylpiperazin-2-carbonsäure



In einem 50 mL Rundkolben wurden 177 mg (1.0 eq, 1.45 mmol) Benzoesäure, 333 mg (1.2 eq, 1.74 mmol) EDC und 222 mg (1.0 eq, 1.45 mmol) HOBt in 10 mL DCM gelöst. Das Gemisch wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden 500 mg (1.5 eq, 2.17 mmol) 1-(*tert*-Butoxycarbonyl)piperazin-2-carbonsäure zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 72 h bei Raumtemperatur weiter gerührt. Die organische Phase wurde mit 10 mL DCM verdünnt und mit 20 mL 2 M HCl_(aq) gewaschen. Die wässrige Phase wurde zweimal mit je 15 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit je 15 mL 2 M HCl_(aq) und einmal mit 20 mL gesättigter, wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Aufarbeitung in 10 mL DCM gelöst. Es wurde 1 mL TFA zugegeben und das Gemisch wurde für 3 h zum Sieden erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Reste an TFA wurden dreimal mit Toluol koevaporiert. Der erhaltene Rückstand wurde aus EE : Cyclohexan : Ethanol (1:2:1) umkristallisiert. Es wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Summenformel: C₁₂H₁₄N₂O₃

Ausbeute: 107 mg (21 %)

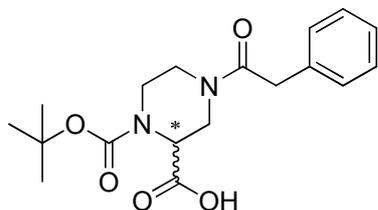
R_f: -

¹H NMR (250.13 MHz, D₂O)

δ = 7.66-7.50 (m, 5H), 4.40-4.35 (m, 0.5H), 4.18-4.12 (m, 0.5H), 3.94-3.25 (m, 6 H)

ESI *m/z* [M + H]⁺: 234.9

3.5.2. DB352 - 1-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-(2-phenylacetyl)piperazin-2-carbonsäure



In einem 50 mL Rundkolben wurden 197 mg (1.0 eq, 1.45 mmol) Phenyllessigsäure, 333 mg (1.2 eq, 1.74 mmol) EDC und 222 mg (1 eq, 1.45 mmol) HOBt in 10 mL DCM gelöst. Das Gemisch wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden 500 mg (1.5 eq, 2.17 mmol) 1-(*tert*-Butoxycarbonyl)piperazin-2-carbonsäure zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 72 h bei Raumtemperatur weiter gerührt. Das Gemisch wurde mit 10 mL DCM verdünnt und dreimal mit je 20 mL Wasser gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereint und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde aus EE : Isopropanol (3:1) umkristallisiert. Es wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Summenformel: $C_{18}H_{24}N_2O_5$

Ausbeute: 234 mg (46 %)

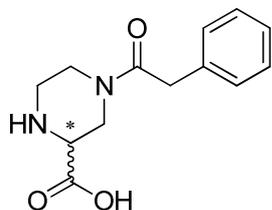
R_f: 0.62 DCM : MeOH (9:1)

¹H NMR (250.13 MHz, DMSO-d₆)

δ = 13.27 (bs, 0.5H), 12.88 (bs, 0.5H), 7.32-7.15 (m, 5H), 4.80-4.68 (m, 0.5H), 4.65-4.56 (m, 0.5H), 4.48-4.32 (m, 1H), 4.27-4.22 (m, 0.5H), 3.92-3.59 (m, 3.5H), 3.15-2.70 (m, 3H), 1.38 (s, 9H).

ESI *m/z* [M - H]⁻: 347.0

3.5.3. DB338 - 4-(2-Phenylacetyl)piperazin-2-carbonsäure



Es wurden 275 mg (1.0 eq, 0.79 mmol) 1-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-(2-phenylacetyl)piperazin-2-carbonsäure in 10 mL DCM gelöst. Es wurde 1 mL TFA zugegeben und das Gemisch wurde für 3 h zum Sieden erhitzt.

Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Reste an TFA wurden dreimal mit Toluol koevaporiert. Der erhaltene Rückstand wurde aus EE : Cyclohexan : Ethanol (1:2:1) umkristallisiert. Es wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Summenformel: $C_{13}H_{16}N_2O_3$

Ausbeute: 178 mg (91 %)

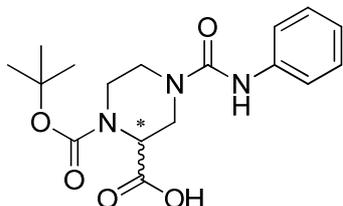
R_f: -

¹H NMR (250.13 MHz, DMSO-d₆)

δ = 9.54 (bs, 2H), 7.35-7.19 (m, 5H), 4.53-4.47 (m, 0.5H), 4.14-3.96 (m, 2.5H), 3.85-3.71 (m, 2H), 3.65-3.55 (m, 0.5H), 3.42-3.16 (m, 2.5 H), 3.01-2.92 (m, 1H).

ESI m/z [M - H]⁻: 246.8

3.5.4. DB369 - 1-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-(phenylcarbonyl)piperazin-2-carbonsäure



In einem Mikrowellengefäß wurden in 2.5 mL Dioxan 250 mg (1.0 eq, 1.09 mmol) 1-(*tert*-Butoxycarbonyl)piperazin-2-carbonsäure und 118 µL (1.0 eq, 0.43 mmol) Phenylisocyanat gemischt. Das Gemisch wurde unter Mikrowelleneinstrahlung für 30 Minuten auf 110 °C erhitzt.

Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Gemisch in 20 mL Wasser gegeben. Der ausgefallene Niederschlag wurde mittels Vakuumfiltration abgetrennt und im Vakuum getrocknet. Es wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Summenformel: $C_{17}H_{23}N_3O_5$

Ausbeute: 170 mg (45 %)

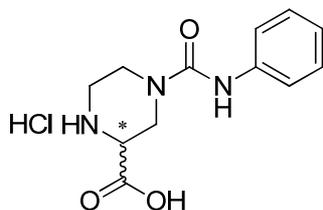
R_f: 0.64 DCM : MeOH (9:1)

¹H NMR (250.13 MHz, DMSO-d₆)

δ = 12.91 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 7.43 (d, ³J_{HH} = 7.7 Hz, 2H), 7.22 (t, ³J_{HH} = 7.7 Hz, 2H), 6.93 (t, ³J_{HH} = 7.7 Hz, 1H), 4.51-4.46 (m, 2H), 4.05-4.00 (m, 1H), 3.74-3.69 (m, 1H), 3.17-3.14 (m, 2H), 3.01-2.92 (m, 1H), 1.42-1.38 (m, 9H).

ESI m/z [M - H]⁻: 348.0

3.5.5. DB371 - 4-(Phenylcarbamyl)piperazin-2-carbonsäure Hydrochlorid



245 mg (1.0 eq, 0.70 mmol) 1-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-(phenylcarbamyl)piperazin-2-carbonsäure wurden mit 10 mL 6 M HCl_(aq) versetzt und für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wurde gefriergetrocknet. Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten.

Summenformel: C₁₂H₁₅N₃O₃·HCl

Ausbeute: 197 mg (98 %)

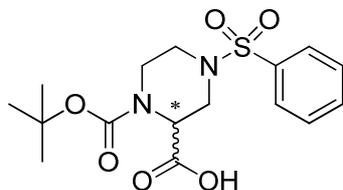
R_f: -

¹H NMR (250.13 MHz, D₂O)

δ = 7.47-7.41 (m, 2H), 7.32-7.22 (m, 3H), 4.40-4.33 (m, 1H), 4.23-4.17 (m, 1H), 3.77-3.67 (m, 1H), 3.63-3.52 (m, 2H), 3.37-3.26 (m, 2H).

ESI *m/z* [M - H]⁻: 284.1

3.5.6. DB355 - 1-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-(phenylsulfonyl)piperazin-2-carbonsäure



Es wurden 500 mg (1.0 eq, 2.17 mmol) 4-(*tert*-Butoxycarbonyl)piperidin-3-carbonsäure und 690 mg (3.0 eq, 6.51 mmol) festes Natriumcarbonat mit einem Gemisch aus je 10 mL Wasser und DCM versetzt. Es wurden 0.31 mL (1.1 eq, 2.39 mmol) Benzolsulfonylchlorid zugegeben. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt.

Das Gemisch wurde mit 40 mL *n*-Hexan gewaschen. Der pH-Wert der wässrigen Phase wurde mit 2 M HCl_(aq) auf pH 2 eingestellt. Der ausgefallene Niederschlag wurde abfiltriert und mit Wasser nachgewaschen. Es wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Summenformel: C₁₆H₂₂N₂O₆S

Ausbeute: 637 mg (79 %)

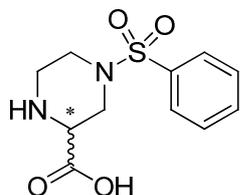
R_f: 0.40 DCM : MeOH (9:1)

¹H NMR (250.13 MHz, DMSO-d₆)

δ = 13.14 (bs, 1H), 7.80-7.59 (m, 5H), 4.66-4.59 (m, 1H), 4.07-4.03 (m, 1H), 3.84-3.78 (m, 1H), 3.62-3.55 (m, 1H), 3.21-3.11 (m, 0.5H), 3.07-2.96 (m, 0.5H), 2.45-2.35 (m, 1H), 2.19-2.09 (m, 1H), 1.37-1.34 (m, 9H).

ESI *m/z* [M - H]⁻: 368.8

3.5.7. DB340 - 4-(Phenylsulfonyl)piperazin-2-carbonsäure



Es wurden 366 mg (1.0 eq, 0.99 mmol) 1-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-(phenylsulfonyl)piperazin-2-carbonsäure in 10 mL DCM gelöst. Es wurde 1 mL TFA zugegeben und das Gemisch wurde für 3 h zum Sieden erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Reste an TFA wurden dreimal mit Toluol koevaporiert. Der Rückstand wurde aus Ethanol umkristallisiert. Es wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Summenformel: $C_{11}H_{14}N_2O_4S$

Ausbeute: 633 mg (64 %)

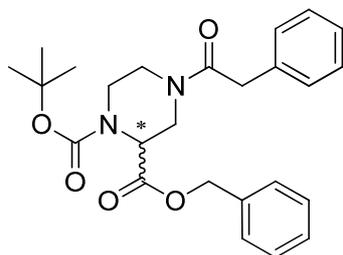
R_f: -

¹H NMR (250.13 MHz, D₂O)

δ = 7.94-7.90 (m, 2H), 7.86-7.81 (m, 1H), 7.76-7.71 (m, 2H), 4.02-3.93 (m, 2H), 3.77-3.72 (m, 1H), 3.60-3.52 (m, 1H), 3.35-3.25 (m, 1H), 3.11-2.94 (m, 2H).

ESI *m/z* [M - H]⁻: 268.8

3.5.8. DB398 - 2-Benzyl-1-*tert*-butyl 4-(2-phenylacetyl)piperazin-1,2-dicarboxylat



In einem 50 mL Rundkolben wurden 265 mg (1.0 eq, 0.76 mmol) 1-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-(2-phenylacetyl)piperazin-2-carbonsäure in 10 mL ACN suspendiert. Es wurden 158 mg (1.5 eq, 1.14 mmol) festes Kaliumcarbonat zugegeben. Die Suspension wurde mittels Eisbad gekühlt. Eine Lösung aus 143 mg (1.1 eq, 0.84 mmol) Benzylbromid in 2 mL ACN wurde langsam zugegeben. Das Eisbad wurde entfernt und das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur gerührt, bis mittels DC-Kontrolle keine weitere Umsetzung mehr stattfand?.

Das Gemisch wurde mit 30 mL EE verdünnt. Die organische Phase wurde zweimal mit je 20 mL gesättigter, wässriger NaHCO₃-Lösung und einmal mit 20 mL gesättigter, wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Es wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Summenformel: C₂₅H₃₀N₂O₅

Ausbeute: 293 mg (88 %)

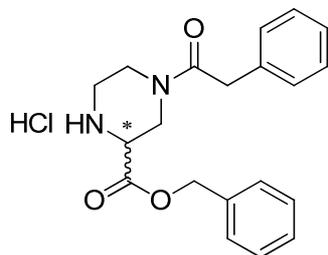
R_f: 0.17 Hexan : EE (3:1)

¹H NMR (250.13 MHz, DMSO-d₆)

δ = 7.46-7.08 (m, 10H), 5.18-5.05 (m, 2H), 4.80-4.61 (m, 1.5H), 4.33-4.20 (m, 1H), 3.94-3.61 (m, 3H), 3.48-3.36 (m, 0.5H), 3.16-2.65 (m, 3H), 1.38-1.28 (m, 9H).

ESI *m/z* [M + H]⁺: 439.0

3.5.9. DB402 - Benzyl-4-(2-phenylacetyl)piperazin-2-carboxylat Hydrochlorid



Es wurden 283 mg (1.0 eq, 0.65 mmol) 2-Benzyl-1-*tert*-butyl-4-(2-phenylacetyl)piperazin-1,2-dicarboxylat in 5 mL DCM gelöst. Es wurden 0.65 mL (4.0 eq, 2.58 mmol) 4 M HCl in Dioxan zugegeben. Das Gemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Es wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Summenformel: $C_{20}H_{22}N_2O_3 \cdot HCl$

Ausbeute: 240 mg (99 %)

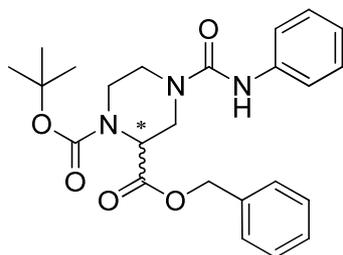
R_f: 0.70 DCM : MeOH (9:1, + 1 % NEt₃)

¹H NMR (250.13 MHz, DMSO-d₆)

δ = 9.97 (bs, 2H), 7.43-7.33 (m, 5H), 7.30-7.13 (m, 5H), 5.26 (s, 2H), 4.48-4.42 (m, 0.6H), 4.36-4.32 (m, 1H), 4.18-3.94 (m, 1.4H), 3.84-3.67 (m, 2.5H), 3.50-3.40 (m, 1H), 3.30-3.22 (m, 1.5H), 3.02-2.92 (m, 1H).

ESI *m/z* [M + H]⁺: 338.9

3.5.10. DB395 - 2-Benzyl-1-*tert*-butyl-4-(phenylcarbamoyl)piperazin-1,2-dicarboxylat



In einem 50 mL Rundkolben wurden 110 mg (1.0 eq, 0.32 mmol) 1-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-(phenylcarbamoyl)piperazin-2-carbonsäure in 5 mL ACN suspendiert. Es wurden 65 mg (1.5 eq, 0.47 mmol) festes Kaliumcarbonat zugegeben. Die Suspension wurde mittels Eisbad gekühlt und eine Lösung aus 62 mg (1.2 eq, 0.36 mmol) Benzylbromid in 5 mL ACN wurde langsam zugegeben. Das Eisbad wurde entfernt und das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur gerührt, bis mittels DC-Kontrolle (ca. 8 h) keine weitere Umsetzung mehr ersichtlich war.

Das Gemisch wurde mit 30 mL EE verdünnt. Die organische Phase wurde zweimal mit je 20 mL gesättigter, wässriger NaHCO₃-Lösung und einmal mit 20 mL gesättigter, wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Es wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Summenformel: C₂₄H₂₉N₃O₅

Ausbeute: 121 mg (87 %)

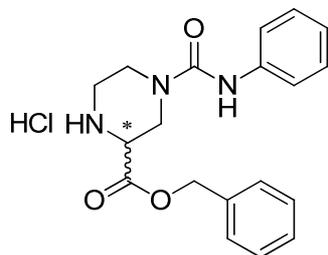
R_f: 0.68 Hexan : EE (1:1)

¹H NMR (250.13 MHz, DMSO-d₆)

δ = 8.61 (s, 1H), 7.45-7.42 (m, 2H), 7.29-7.21 (m, 7H), 6.95 (t, ³J_{HH} = 7.4 Hz, 1H), 5.19-5.09 (m, 2H), 4.71-4.50 (m, 2H), 4.05-4.02 (m, 1H), 3.76-3.71 (m, 1H), 3.25-3.11 (m, 2H), 3.06-2.91 (m, 1H), 1.40-1.31 (m, 9H).

ESI *m/z* [M - H]⁻: 438.1

3.5.11. DB400 - Benzyl-4-(phenylcarbamyl)piperazin-2-carboxylat Hydrochlorid



Es wurden 112 mg (1.0 eq, 0.26 mmol) 2-Benzyl-1-*tert*-butyl-4-(phenylcarbamyl)piperazin-1,2-dicarboxylat in 5 mL DCM gelöst. Es wurden 0.26 mL (4.0 eq, 1.02 mmol) 4 M HCl in Dioxan zugegeben. Das Gemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde aus Diethylether umkristallisiert und gefriergetrocknet. Es wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Summenformel: $C_{19}H_{21}N_3O_3 \cdot HCl$

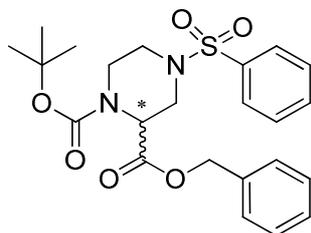
Ausbeute: 85 mg (89 %)

R_f: 0.68 DCM : MeOH (9:1, + 1 % NEt₃)

¹H NMR (250.13 MHz, DMSO-d₆)

δ = 8.81 (s, 1H), 7.47-7.33 (m, 7H), 7.24 (t, ³J_{HH} = 7.5 Hz, 2H), 6.95 (t, ³J_{HH} = 7.5 Hz, 1H), 5.24 (s, 2H), 4.23-4.09 (m, 2H), 3.93-3.88 (m, 1H), 3.47-3.39 (m, 2H), 3.26-3.19 (m, 2H), 2.98-2.87 (m, 1H).

ESI *m/z* [M + H]⁺: 339.9

3.5.12. DB397 - 2-Benzyl-1-*tert*-butyl 4-(phenylsulfonyl)piperazin-1,2-dicarboxylat

In einem 50 mL Rundkolben wurden 491 mg (1.0 eq, 1.33 mmol) 1-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-(phenylsulfonyl)piperazin-2-carbonsäure in 5 mL ACN suspendiert. Es wurden 274 mg (1.5 eq, 1.99 mmol) festes Kaliumcarbonat zugegeben. Die Suspension wurde mittels Eisbad gekühlt. Eine Lösung aus 249 mg (1.1 eq, 1.46 mmol) Benzylbromid in 5 mL ACN wurde langsam zugetropft. Das Eisbad wurde entfernt und das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur gerührt, bis mittels DC-Kontrolle keine weitere Umsetzung mehr ersichtlich war.

Das Gemisch wurde mit 30 mL EE verdünnt. Die organische Phase wurde zweimal mit je 20 mL gesättigter, wässriger NaHCO₃-Lösung und einmal mit 20 mL gesättigter, wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Es wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Summenformel: C₂₃H₂₈N₂O₆S

Ausbeute: 555 mg (91 %)

R_f: 0.45 Hexan : EE (3:1)

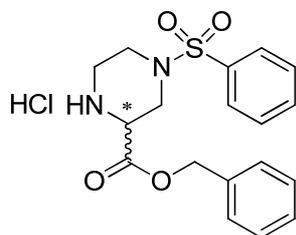
¹H NMR (250.13 MHz, DMSO-d₆)

δ = 7.79-7.63 (m, 5H), 7.47-7.30 (m, 5H), 5.22-5.19 (m, 2H), 4.86 (bs, 0.5H), 4.77 (bs, 0.5H), 4.14-4.06 (m, 1H), 3.85-3.79 (m, 1H), 3.64-3.56 (m, 1H), 3.16-2.91 (m, 1H), 2.45* (m, 1H), 2.25-2.14 (m, 1H), 1.39-1.26 (m, 9H).

*Durch das DMSO-Signal überlagert

ESI *m/z* [M + Na]⁺: 483.2

3.5.13. DB401 - Benzyl-4-(phenylsulfonyl)piperazin-2-carboxylat Hydrochlorid



Es wurden 529 mg (1.0 eq, 1.15 mmol) 2-Benzyl-1-*tert*-butyl-4-(phenylsulfonyl)piperazin-1,2-dicarboxylat in 5 mL DCM gelöst. Es wurden 1.15 mL (4.0 eq, 4.59 mmol) 4 M HCl in Dioxan zugegeben. Das Gemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde aus Diethylether umkristallisiert und gefriergetrocknet. Es wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Summenformel: $C_{18}H_{20}N_2O_4S \cdot HCl$

Ausbeute: 324 mg (71 %)

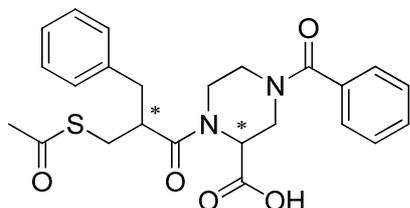
R_f: 0.87 DCM : MeOH (9:1, + 1 % NEt₃)

¹H NMR (250.13 MHz, DMSO-d₆)

δ = 9.81 (bs, 2H), 7.81-7.77 (m, 3H), 7.72-7.67 (m, 2H), 7.47-7.36 (m, 5H), 5.33-5.21 (m, 2H), 4.61-4.56 (m, 1H), 3.64-3.58 (m, 1H), 3.38-3.34 (m, 2H), 3.19-3.11 (m, 2H), 2.97-2.90 (m, 1H).

ESI *m/z* [M + H]⁺: 360.9

3.5.14. DB343 - 1-(3-(Acetylthio)-2-benzylpropanyl)-4-benzylpiperazin-2-carbonsäure



In einem Schlenkcolben wurden 130 mg (1.3 eq, 0.55 mmol) 3-(Acetylthio)-2-methylpropanonsäure in 10 mL DCM gelöst. Es wurden 0.10 mL (3.2 eq, 1.36 mmol) Thionylchlorid zugegeben. Die Lösung wurde 3 h zum Sieden erhitzt. DCM und überschüssiges Thionylchlorid wurden unter reduziertem Druck entfernt. In einer Argon-Atmosphäre wurden das Säurechlorid mit 5 mL ACN versetzt. Es wurden 100 mg (1.0 eq, 0.43 mmol) 4-Benzylpiperazin-2-carbonsäure, 0.11 mL (3.0 eq, 1.28 mmol) DIPEA und 5 mL DMF hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 60 °C gerührt.

Es wurden 40 mL Wasser hinzugegeben. Der pH-Wert wurde mit 2 M HCl_(aq) auf 1 eingestellt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 20 mL EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit je 30 mL 2 M HCl_(aq) und einmal mit 30 mL gesättigter, wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Hexan : EE 1:1 zu EE, + 1% AcOH) aufgereinigt.

Summenformel: C₂₄H₂₆N₂O₅S

Ausbeute: 40 mg (21 %)

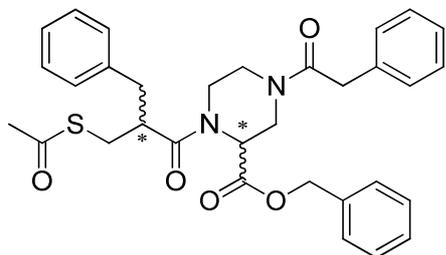
R_f: 0.63 EE (+ 1% AcOH)

¹H NMR (250.13 MHz, MeOD-d₄)

δ = 7.50-7.38 (m, 3H), 7.37-7.26 (m, 3H), 7.24-7.11 (m, 4H), 5.08-4.91 (m, 1.3H), 4.76-4.72 (m, 0.3H), 3.74-3.38 (m, 3H), 3.22-2.96 (m, 3.5H), 2.87-2.73 (m, 1H), 2.67-2.54 (m, 0.3H), 2.33-2.28 (m, 3H), 2.07-1.93 (m, 0.6H).

ESI *m/z* [M-H]⁻: 452.9

3.5.15. DB406 - Benzyl-1-(3-(acetylthio)-2-benzylpropanyl)-4-(2-phenylacetyl)piperazin-2-carboxylat



In einem Schlenkcolben wurden 190 mg (1.3 eq, 0.80 mmol) 3-(Acetylthio)-2-methylpropanonsäure in 5 mL DCM gelöst. Es wurden 0.15 mL (3.1 eq, 1.99 mmol) Thionylchlorid und ein Tropfen DMF zugegeben. Die Lösung wurde 3 h zum Sieden erhitzt. DCM und überschüssiges Thionylchlorid wurden unter reduziertem Druck entfernt. Das Säurechlorid wurde mit 5 mL ACN versetzt und die Lösung mittels Eisbad gekühlt. Es wurden 240 mg (1.0 eq, 0.64 mmol) Benzyl-4-(2-phenylacetyl)piperazin-2-carboxylat Hydrochlorid und 0.22 mL (2.0 eq, 1.28 mmol) DIPEA hinzugefügt. Das Eisbad wurde entfernt und das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Es wurden 40 mL Wasser hinzugegeben. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 20 mL EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit 25 mL 2 M HCl_(aq), zweimal mit je 25 mL gesättigter, wässriger NaHCO₃-Lösung und einmal mit 25 mL gesättigter, wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Hexan : EE 1:1) aufgereinigt. Es wurde ein gelbliches, viskoses Öl erhalten.

Summenformel: C₃₂H₃₄N₂O₅S

Ausbeute: 54 mg (15 %).

R_f: 0.51 Hexan : EE (1:1)

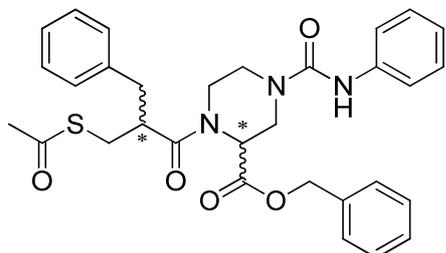
¹H NMR (250.13 MHz, MeOD-d₄)

δ = 7.34-6.98 (m, 15H), 5.20-5.10 (m, 2H), 4.65-4.17 (m, 1H), 4.12-3.87 (m, 0.5H), 3.75-3.44 (m, 3H), 3.39-3.23* (m, 2H), 3.16-2.91 (m, 4.5H), 2.87-2.83 (m, 1H), 2.78-2.67 (m, 1H), 2.32-2.23 (m, 4H).

*Durch das MeOD-Signal überlagert.

ESI *m/z* [M + H]⁺: 559.0

3.5.16. DB404 - Benzyl-1-(3-(acetylthio)-2-benzylpropanyl)-4-(phenylcarbamyl)piperazin-2-carboxylat



In einem Schlenkcolben wurden 70 mg (1.3 eq, 0.29 mmol) 3-(Acetylthio)-2-methylpropanonsäure in 5 mL DCM gelöst. Es wurden 0.09 mL (3.2 eq, 0.73 mmol) Thionylchlorid und ein Tropfen DMF zugegeben. Die Lösung wurde 3 h zum Sieden erhitzt. Überschüssiges Thionylchlorid und DCM wurden unter reduziertem Druck entfernt. Das Säurechlorid wurde in 5 mL ACN gelöst und die Lösung mittels Eisbad gekühlt. Es wurden 86 mg (1.0 eq, 0.23 mmol) Benzyl-4-(phenylcarbamyl)piperazin-2-carboxylat Hydrochlorid und 0.08 mL (2.0 eq, 0.46 mmol) DIPEA hinzugefügt. Das Eisbad wurde entfernt und das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Es wurden 40 mL Wasser hinzugegeben. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 20 mL EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 30 mL gesättigter, wässriger NaHCO₃-Lösung und einmal mit 30 mL gesättigter, wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels HPLC (HPLC-Methode A) aufgereinigt. Es wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Summenformel: C₃₁H₃₃N₃O₅S

Ausbeute: 32 mg (25 %)

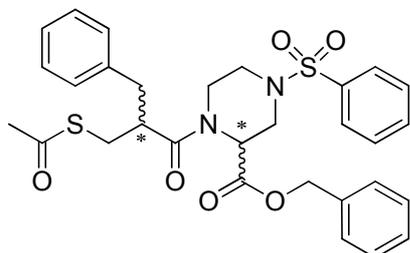
R_f: 0.23 Hexan : EE (2:1)

¹H NMR (250.13 MHz, DMSO-d₆)

δ = 8.63-8.53 (m, 1H), 7.45-7.38 (m, 2H), 7.27-7.19 (m, 12H), 6.97-6.91 (m, 1H), 5.14-5.01 (m, 2.5H), 4.70-4.45 (m, 1H), 4.37-4.15 (m, 0.5H), 4.07-3.97 (m, 1H), 3.82-3.76 (m, 0.5H), 3.63-3.57 (m, 0.5H), 3.27-3.23 (m, 1H), 3.21-3.05 (m, 1H), 3.02-2.77 (m, 5H), 2.68-2.58 (m, 0.5H), 2.30-2.22 (m, 3.5H).

ESI *m/z* [M + H]⁺: 560.1

3.5.17. DB405 - Benzyl-1-(3-(acetylthio)-2-benzylpropanyl)-4-(phenylsulfonyl)piperazin-2-carboxylat



In einem Schlenkkolben wurden 245 mg (1.2 eq, 1.03 mmol) 3-(Acetylthio)-2-methylpropansäure in 5 mL DCM gelöst. Es wurden 0.19 mL (3.1 eq, 2.57 mmol) Thionylchlorid und ein Tropfen DMF (abs.) zugegeben. Die Lösung wurde 3 h zum Sieden erhitzt. Das Lösungsmittel und überschüssiges Thionylchlorid wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das frisch hergestellte Säurechlorid wurde in 5 mL ACN gelöst. Die Lösung wurde mittels Eisbad gekühlt. Es wurden 330 mg (1.0 eq, 0.83 mmol) Benzyl-4-(phenylsulfonyl)piperazin-2-carboxylat Hydrochlorid und 0.29 mL (2.0 eq, 1.66 mmol) DIPEA hinzugefügt. Das Eisbad wurde entfernt und das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden 40 mL Wasser hinzugegeben. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 20 mL EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit 25 mL 2 M HCl_(aq), zweimal mit je 25 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung und einmal mit 25 mL gesättigter, wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Hexan : EE 1:1) aufgereinigt. Es wurde ein gelbes viskoses Öl erhalten.

Summenformel: C₃₀H₃₂N₂O₆S₂

Ausbeute: 100 mg (21 %)

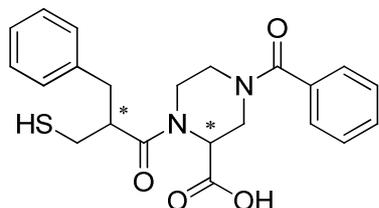
R_f: 0.78 Hexan : EE (1:1)

¹H NMR (250.13 MHz, DMSO-d₆)

δ = 7.88-7.61 (m, 5H), 7.39-7.32 (m, 5 H), 7.31-7.15 (m, 1.5H), 7.09-6.99 (m, 1.5H), 6.99-6.83 (m, 1.3H), 6.72-6.63 (m, 0.7H), 5.33-5.26 (m, 0.7H), 5.24-5.17 (m, 2H), 4.70-4.69 (m, 0.2H), 4.30-4.15 (m, 0.6H), 4.07-4.02 (m, 0.6H), 3.77-3.72 (m, 0.3H), 3.63-3.55 (m, 0.7H), 3.48-3.42 (m, 0.4H), 3.27-2.94 (m, 3.5H), 2.91-2.77 (m, 2H), 2.63-2.54 (m, 1H), 2.45-2.36 (m, 0.5H), 2.26-2.23 (m, 2.2H), 2.13-2.10 (m, 0.8H), 1.91-1.83 (m, 0.5H), 1.57-1.46 (m, 0.3H), 1.03-0.86 (m, 0.7H).

ESI *m/z* [M + H]⁺: 580.8

3.5.18. DB359 - 4-Benzoyl-1-(2-benzyl-3-mercapto-propyl)piperazin-2-carbonsäure



Es wurden 34 mg (1.0 eq, 0.08 mmol) 1-(3-(Acetylthio)-2-benzylpropyl)-4-benzylpiperazin-2-carbonsäure in 12 mL Wasser suspendiert. Das Gemisch wurde mit Argon im Ultraschallbad entgast und anschließend im Eisbad gekühlt. Es wurde 1 mL 25 %iger Ammoniak_(aq) zugegeben. Das Eisbad wurde entfernt und das Gemisch bei Raumtemperatur für 3 h weitergerührt.

Der pH-Wert wurde mit 2 M HCl_(aq) auf 1 eingestellt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 10 mL EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit 10 mL gesättigter, wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels HPLC aufgereinigt. Es wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Summenformel: C₂₂H₂₄N₂O₄S

Ausbeute: 8 mg (26 %)

R_f: 0.12 DCM : MeOH (9:1)

HPLC t_R: 12.79 (C18, Methode B)

¹H NMR (500.18 MHz, DMSO-d₆)

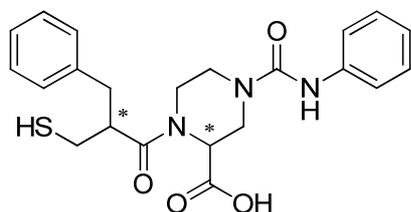
δ = 13.08 (bs, 1H), 7.47-7.41 (m, 3H), 7.35-7.15 (m, 7H), 5.06-4.90 (m, 1.2H), 4.46-4.03 (m, 2.1H), 3.73-3.51 (m, 1.8H), 3.21-3.00 (m, 1.6H), 2.96-2.86 (m, 1.5H), 2.76-2.72 (m, 1.2H), 2.68-2.52 (m, 2H), 2.44-2.40 (m, 0.5H), 2.37-2.21 (m, 1.1H).

¹³C NMR (125.77 MHz, DMSO-d₆)

δ = 173.42, 170.12, 139.26, 138.93, 135.82, 135.66, 130.23, 129.65, 129.60, 129.50, 128.82, 128.72, 127.45, 126.83, 126.72, 52.85, 46.49, 46.29, 38.48, 37.72, 37.37, 26.72.

HRMS *m/z* kalkuliert [M + H]⁺: 413.1530, gefunden [M + H]⁺: 413.1523, Δ = 1.7 ppm.

3.5.19. DK48 (DB410) - 1-(2-Benzyl-3-mercaptopropanyl)-4-(phenylcarbonyl)piperazin-2-carbonsäure



In einen 25 mL Rundkolben wurden 50 mg (1.0 eq, 0.09 mmol) Benzyl-1-(3-(acetylthio)-2-benzylpropanyl)-4-(phenylcarbonyl)piperazin-2-carboxylat und 9.6 mg (4.5 eq, 0.40 mmol) Lithiumhydroxid in 10 mL Wasser und 5 mL THF suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur für 22 h gerührt.

Es wurden 25 mL 2 M HCl_(aq) hinzugefügt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 20 mL EE extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels HPLC (C18, Methode A) aufgereinigt. Es wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Summenformel: C₂₂H₂₅N₃O₄S

Ausbeute: 25 mg (66 %)

R_f: 0.49 Hexan : EE (1:1, + 1 % AcOH)

HPLC t_R: 9.81 (Methode A)

¹H NMR (500.18 MHz, DMSO-d₆)

δ = 12.95 (bs, 1H), 8.60 (s, 0.1H), 8.58 (s, 0.3H), 8.49 (s, 0.6H), 7.44-7.38 (m, 2H), 7.32-7.15 (m, 7H), 6.95-6.92 (m, 1H), 5.15-5.14 (m, 0.1H), 5.00-4.99 (m, 0.2 H), 4.91-4.89 (m, 0.5H), 4.60-4.52 (m, 0.5H), 4.44-4.41 (m, 0.6H), 4.30-4.25 (m, 0.3H), 4.21-4.18 (m, 0.2H), 4.04-3.99 (m, 0.7H), 3.94-3.92 (m, 0.2H), 3.79-3.77 (m, 0.5H), 3.67-3.64 (m, 0.6H), 3.42-3.37 (m, 0.5H), 3.24-3.13 (m, 0.7H), 3.04-2.82 (m, 1.8H), 2.79-2.71 (m, 1.9H), 2.68-2.55 (m, 1.9H), 2.47-2.28 (m, 0.8H), 2.23-2.16 (m, 0.9H), 1.95-1.91 (m, 0.1H).

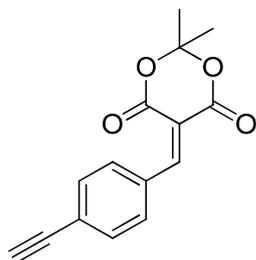
¹³C NMR (125.77 MHz, DMSO-d₆)

δ = 173.40, 171.69, 155.05, 140.62, 139.30, 129.50, 128.81, 128.78, 122.37, 120.03, 56.03, 52.74, 46.45, 44.16, 43.66, 42.75, 38.57, 37.39, 26.88, 25.96.

HRMS *m/z* kalkuliert [M + H]⁺: 428.1639, gefunden [M + H]⁺: 428.1635, Δ = 0.9 ppm.

3.6. Synthese Triazol-Derivate

3.6.1. DK37 - 5-(4-Ethynylbenzyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion



In einem ausgeheizten, mit wasserfreien CaCl_2 befüllten 100 mL Schlenk Kolben wurden in einer Argon-Atmosphäre 1.00 g (1.0 eq, 7.47 mmol) 4-Ethynylbenzaldehyd und 1.77 g (1.6 eq, 12.3 mmol) Meldrumsäure in 40 mL Chloroform gelöst. Das Gemisch wurde mittels Eisbad gekühlt. Es wurden 0.57 mL (0.5 eq, 3.84 mmol) DBU zugegeben und die Reaktion für 15 Minuten weiter gerührt. Das Eisbad wurde entfernt und die Reaktion für weitere 24 h gerührt.

Es wurden 20 mL 1 M Salzsäure zugegeben und anschließend einmal mit 60 mL DCM extrahiert. Die organische Phase wurde zweimal mit je 40 mL Wasser und zweimal mit je 40 mL gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Es wurde ein brauner Feststoff erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$

Ausbeute: 1.89 g (96 %)

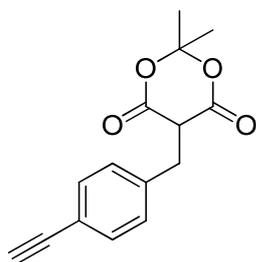
R_f: 0.59 Hexan : EE (1:1)

^1H NMR (250.13 MHz, CDCl_3)

δ = 8.38 (s, 1H), 8.01 (d, $^3J_{\text{HH}}$ = 8.1 Hz, 2H), 7.57 (d, $^3J_{\text{HH}}$ = 8.1 Hz, 2H), 3.30 (s, 1H). 1.81 (s, 6H).

ESI m/z [2M - H]⁻: 510.9

3.6.2. DK3 - 5-(4-Ethynylbenzyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion



In einem ausgeheizten 250 mL Schlenkkolben wurden unter Argon-Atmosphäre 1.89 g (1.0 eq, 7.36 mmol) 5-(4-Ethynylbenzyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion in 120 mL DCM bei 0 °C gelöst. Es wurden 13.1 mL (31.0 eq, 228 mmol) konz. Essigsäure zugegeben und das Gemisch für 15 min. gerührt. Über einen Zeitraum von 1 h wurden 2.23 g (8.0 eq, 58.9 mmol) NaBH₄ in kleinen Portionen zugegeben. Das Eisbad wurde entfernt und das Reaktionsgemisch für 1 h bei RT gerührt.

Nach Entfärbung des Gemisches wurde die Reaktionslösung langsam mit 0.5 M HCl_(aq) hydrolysiert. Die organische Phase wurde abgetrennt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit je 50 mL DCM extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Es wurde ein brauner Feststoff erhalten.

Summenformel: C₁₅H₁₄O₄

Ausbeute: 1.60 g (84 %)

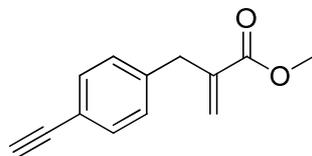
R_f: 0.79 DCM : MeOH (9:1)

¹H NMR (250.13 MHz, CDCl₃)

δ = 7.42 (d, ³J_{HH} = 8.1 Hz, 2H), 7.29 (d, ³J_{HH} = 8.1 Hz, 2H), 3.75 (t, ³J_{HH} = 4.9 Hz, 1H), 3.49 (d, ³J_{HH} = 4.9 Hz, 2H), 3.06 (s, 1H), 1.75 (s, 3H), 1.57 (s, 3H).

ESI *m/z* [M + 2Na]⁺: 331.0

3.6.3. DK5 - Methyl-2-(4-ethinylbenzyl)acrylate



In einem ausgeheizten 250 mL Schlenkkolben wurden in einer Argon-Atmosphäre 1.82 g 5-(4-Ethinylbenzyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (1.0 eq, 7.05 mmol) und 2.61 g Eschenmosersalz (2.0 eq, 14.10 mmol) in 80 mL MeOH bei 70 °C für 18 h gerührt.

Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand in 100 mL DCM aufgenommen. Die organische Phase wurde dreimal mit je 40 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie (Hexan : EE 4:1) aufgereinigt um das farblose, flüssige Produkt zu erhalten.

Summenformel: $C_{13}H_{12}O_2$

Ausbeute: 545 mg (39 %)

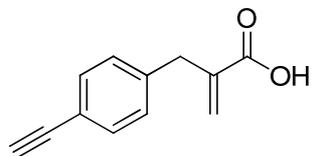
R_f: 0.32 Hexan : EE (4:1)

¹H NMR (250.13 MHz, CDCl₃)

δ = 7.42 (d, ³J_{HH} = 8.2 Hz, 2H), 7.16 (d, ³J_{HH} = 8.2 Hz, 2H), 6.25 (s, 1H), 5.48 (s, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.63 (s, 2H), 3.04 (s, 1H).

ESI *m/z* [M + Na]⁺: 223.0

3.6.4. DK50 - 2-(4-Ethynylbenzyl)acrylsäure



In einem 50mL Rundkolben wurden 606 mg (1.0 eq, 3.02 mmol) Methyl-2-(4-Ethynylbenzyl)acrylat und 324 mg (4.5 eq, 13.50 mmol) Lithiumhydroxid in 40 mL Wasser suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Das Reaktionsgemisch mit dreimal mit je 10 mL DCM gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit 1 M HCl_(aq) auf einen pH-Wert von 1 eingestellt und dreimal mit je 30 mL DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Es wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Summenformel: C₁₂H₁₀O₂

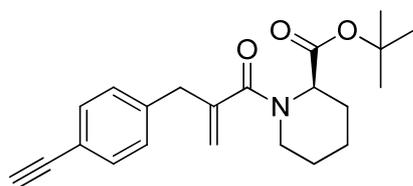
Ausbeute: 506 mg (90 %)

R_f: 0.32 Hexan : EE (4:1)

¹H NMR (250.13 MHz, CDCl₃)

δ = 7.43 (d, ³J_{HH} = 8.4 Hz, 2H), 7.16 (d, ³J_{HH} = 8.4 Hz, 2H), 6.39 (s, 1H), 5.60-5.59 (m, 1H), 3.63 (s, 2H), 3.05 (s, 1H).

ESI *m/z* [M - H]⁻: 185.0

3.6.5. DK55 - (R)-*tert*-Butyl-1-(2-(4-ethinylbenzyl)acrylyl)piperidin-2-carboxylat

In einem 50 mL Rundkolben wurden 0.56 mL Thionylchlorid (2.5 eq, 7.67 mmol) zusammen mit 4 Tropfen DMF in 25 mL DCM vorgelegt. Es wurden 571 mg (1.0 eq, 3.07 mmol) 2-(4-Ethinylbenzyl)acrylsäure zugegeben. Das Gemisch wurde für 3 h auf 50 °C erhitzt. Das Lösungsmittel und überschüssiges Thionylchlorid wurden destillativ entfernt und das Rohprodukt *in situ* in 6 mL 1,2-Dichlorethan suspendiert. Es wurden 625 mg (1.1 eq, 3.37 mmol) (*R*)-*tert*-Butylpiperidin-2-carboxylat und 1.6 mL (3.0 eq, 9.2 mmol) DIPEA zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde unter Mikrowellenstrahlung für 1 h auf 90 °C erhitzt.

Das abgekühlte Gemisch wurde mit 15 mL Wasser versetzt und viermal mit je 6 mL EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden viermal mit je 4 mL 2 M HCl_(aq) und dreimal mit je 4 mL gesättigter, wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das erhaltene Rohprodukt mittels Flash-Chromatographie (Hexan zu Hexan : EE 1:1) aufgereinigt. Es wurde eine gelbe Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: C₂₂H₂₇NO₃

Ausbeute: 342 mg (32 %)

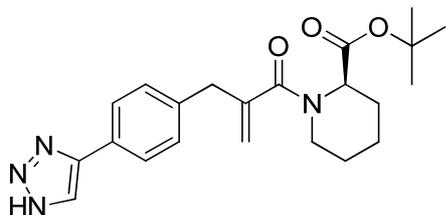
R_f: 0.71 Hexan : EE (1:1)

¹H NMR (250.13 MHz, CDCl₃)

δ = 7.43 (d, ³J_{HH} = 8.4 Hz, 2H), 7.19 (d, ³J_{HH} = 8.4 Hz, 2H), 5.28-5.26 (m, 0.6H), 5.11-5.07 (m, 2.2H), 4.55-4.44 (m, 0.7H), 3.79-3.45 (m, 3.1H), 3.14-3.05 (m, 1.5H), 2.75-2.65 (m, 0.4H), 2.23-2.18 (m, 0.6H), 2.00-1.94 (m, 0.4H), 1.66-1.62 (m, 0.4H), 1.52-1.38 (m, 11.9H), 1.36-1.30 (m, 1.2H).

ESI *m/z* [M + Na]⁺: 376.1

3.6.6. DK56 - (*R*)-*tert*-Butyl-1-(2-(4-(1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)benzyl)acrylyl)piperidin-2-carboxylat



In einem ausgeheizten Schlenkcolben wurden unter Argon-Atmosphäre 379 mg (1.0 eq, 1.07 mmol) *tert*-Butyl-1-{2-[(4-ethinylphenyl)methyl]prop-2-enyl}piperidin-2-carboxylat, 10.2 mg (0.05 eq, 0.05 mmol) CuI, 0.12 mL Methanol (0.05 eq, 2.9 mmol) sowie 2.36 mL DMF vorgelegt. Anschließend wurden 0.22 mL Trimethylsilylazid (1.5 eq, 1.61 mmol) tropfenweise hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 12 h auf 100 °C erhitzt.

Das Gemisch wurde abgekühlt und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in mittels Flash-Chromatographie (Hexan : EE 1:1) aufgereinigt. Es wurde ein gelber Feststoff erhalten.

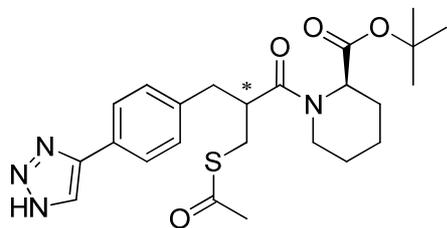
Summenformel: $C_{22}H_{28}N_4O_3$
 Ausbeute: 253 mg (60 %)
 R_f: 0.38 Hexan : EE (1:1)

¹H NMR (250.13 MHz, DMSO-d₆)

δ = 15.29 (bs, 0.2H), 14.91 (bs 0.5H), 8.51 (bs, 0.3H), 8.21 (bs, 0.7H), 7.80 (d, ³J_{HH} = 7.7 Hz, 2H), 7.28 (d, ³J_{HH} = 7.4 Hz, 2H), 5.21-5.16 (m, 1H), 5.03-4.98 (m, 1.5H), 4.43-4.28 (m, 0.8H), 3.71-3.47 (m, 2.7H), 3.04-2.93 (m, 0.6H), 2.64-2.59 (m, 0.3H), 3.41-3.35 (m, 0.6H), 3.04-2.94 (m, 0.6H), 2.63-2.53 (m, 0.6H), 2.09-2.03 (m, 0.4H) 1.55-1.39 (m, 12H), 1.31-1.20 (m, 1.2H).

ESI *m/z* [M + Na]⁺: 419.1

3.6.7. DK57 - (2*R*)-*tert*-Butyl-1-(2-(4-(1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)benzyl)-3-(acetylthio)propanyl)-piperidin-2-carboxylat



In einem Rundkolben wurden 253 mg (1.0 eq, 0.64 mmol) *tert*-Butyl 1-(2-([4-(1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)phenyl]methyl)prop-2-enyl)piperidin-2-carboxylat in 9.1 mL (200eq, 128 mmol) Thioessigsäure gelöst und das Gemisch für 66 h bei Raumtemperatur unter Argon-Atmosphäre gerührt.

Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 40 mL DCM gelöst und die organische Phase zweimal mit je 10 mL gesättigter, wässriger NaHCO₃-Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand mittels Flash-Chromatographie (Hexan zu Hexan : EE 1:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff erhalten.

Summenformel: C₂₄H₃₂N₄O₄S

Ausbeute: 291 mg (97 %)

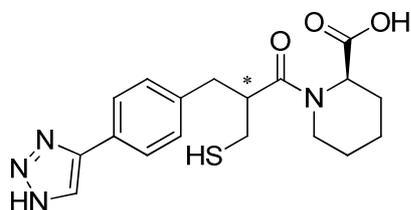
R_f: 0.63 Hexan : EE (2:1)

¹H NMR (250.13 MHz, CDCl₃)

δ = 8.42 (s, 0.2H), 8.12 (s, 0.8H), 7.85-7.78 (m, 2H), 7.36-7.29 (m, 2H), 5.32-5.23 (m, 0.7H), 4.68-4.51 (m, 0.3H), 4.25-4.22 (m, 0.1H), 3.82-3.77 (m, 0.3H), 3.64-3.58 (m, 0.5H), 3.38-3.23 (m, 1.2H), 3.20-3.18 (m, 0.9H), 3.13-3.03 (m, 2.6H) 2.99-2.95 (m, 0.9H), 2.92-2.90 (m, 0.8H), 2.87-2.85 (m, 2.5H), 2.25-2.12 (m, 0.7H), 1.71-1.54 (m, 2.5H), 1.46-1.37 (m, 12H).

ESI *m/z* [M + Na]⁺: 495.1

3.6.8. DK58 - (2*R*)-1-(2-(4-(1*H*-1,2,3-Triazol-4-yl)benzyl)-3-mercaptopropanyl)piperidin-2-carbonsäure



In einem 25 mL Rundkolben wurden 280 mg (1.0 eq, 0.59 mmol) (2*R*)-*tert*-Butyl-1-(2-(4-(1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)benzyl)-3-(acetylthio)propanyl)piperidin-2-carboxylat in 8 mL DCM vorgelegt. Unter Rühren wurden langsam 0.34 mL (57 eq, 33.8 mmol) TFA hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 50 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und überschüssige Trifluoressigsäure mit Toluol koevaporiert. Das Rohprodukt wurde in 8 mL Wasser suspendiert und unter Argon-Atmosphäre für eine halbe Stunde im Ultraschallbad entgast. Das Gemisch wurde mittels Eisbad auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden langsam 4 mL 25 %iger Ammoniak_(aq) hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 2 h bei Raumtemperatur unter einer Argon-Atmosphäre gerührt.

Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC (Gradient B) aufgereinigt.

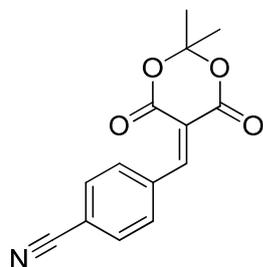
Summenformel: $C_{18}H_{22}N_4O_3S$

ESI m/z $[M - H]^-$: 373.4

Die Reinheit des Produktes beträgt nach der Aufreinigung nur 84 % (HPLC). Daher wurde auf eine weiterführende Analytik verzichtet. Die Hauptverunreinigung besteht aus dem Disulfid der Verbindung.

3.7. Synthese des Amidin-Derivates

3.7.1. DK46 - 4-((2,2-Dimethyl-4,6-dioxo-1,3-dioxan-5-yliden)methyl)benzonitril



Wasserfreies CaCl_2 wurde in einem 50 mL Schlenkcolben ausgeheizt. Unter einer Argon-Atmosphäre wurden 100 mg (1.0 eq, 0.75 mmol) 4-Cyanobenzaldehyd, 176 mg (1.6 eq, 1.20 mmol) Meldrumsäure und 10 mL Chloroform hinzugegeben. Unter Eisbadkühlung wurden 52 mg (1.0 eq, 0.76 mmol) Imidazol hinzugegeben. Nach 15 Minuten wurde das Eisbad entfernt und das Reaktionsgemisch für 72 h bei Raumtemperatur weiter gerührt.

Der Feststoff wurde abfiltriert und mit DCM nachgewaschen. Das Filtrat wurde unter reduziertem Druck eingengt. Der Rückstand wurde in 50 mL DCM aufgenommen. Die organische Phase wurde zweimal mit je 20 mL gesättigter, wässriger NaHCO_3 -Lösung und zweimal mit je 20 mL 1 M $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Es wurde ein gelber Feststoff erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_4$

Ausbeute: 148 mg (75 %)

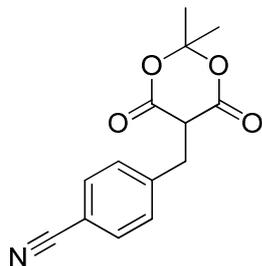
R_f: 0.83 Hexan : EE (1:1)

^1H NMR (250.13 MHz, CDCl_3)

δ = 8.40 (s, 1H), 8.02 (d, $^3J_{\text{HH}}$ = 8.2 Hz, 2H), 7.75 (d, $^3J_{\text{HH}}$ = 8.2 Hz, 2H), 1.82 (s, 6H).

ESI m/z [M + H]⁺: 258.0

3.7.2. DK52 - 4-((2,2-Dimethyl-4,6-dioxo-1,3-dioxan-5-yl)methyl)benzonitril



In einem ausgeheizten 25 mL Schlenkcolben wurden unter Argon-Atmosphäre 45 mg (1.0 eq, 0.18 mmol) 5-(4-Cyanobenzyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion in 10 mL DCM vorgelegt. Das Gemisch wurde mittels Eisbad gekühlt. Es wurden 0.31 mL (31.0 eq, 5.42 mmol) Essigsäure zugegeben. Nach 15 Minuten wurden über einen Zeitraum von 1 h 53 mg (8.0 eq, 1.40 mmol) NaBH₄ portionsweise zugegeben. Das Eisbad wurde entfernt und das Reaktionsgemisch für eine Stunde bei Raumtemperatur weiter gerührt.

Nach Entfärbung des gelben Reaktionsgemisches wurden langsam 10 mL 1 M HCl_(aq) zugegeben. Die organische Phase wurde abgetrennt und Die wässrige Phase erneut zweimal mit je 10 mL DCM extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Es wurde ein blass gelber Feststoff erhalten.

Summenformel: C₁₄H₁₃NO₄

Ausbeute: 45 mg (99 %)

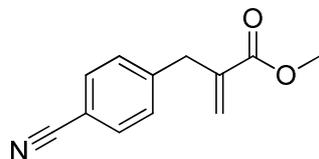
R_f: 0.72 Hexan : EE (1:1 + 1 % AcOH)

¹H NMR (300.03 MHz, CDCl₃)

δ = 7.59 (d, ³J_{HH} = 8.5 Hz, 2H), 7.47 (d, ³J_{HH} = 8.5 Hz, 2H), 3.78 (t, ³J_{HH} = 5.1 Hz, 1H), 3.53 (d, ³J_{HH} = 5.1 Hz, 2H) 1.79 (s, 3H), 1.65 (s, 3H).

ESI *m/z* [M - H]⁻: 257.9

3.7.3. DK53 - Methyl-2-(4-cyanobenzyl)acrylat



In einem ausgeheizten 10 mL Schlenk Kolben wurden unter Argon-Atmosphäre 30 mg (1.0 eq, 0.12 mmol) 5-(4-Cyanobenzyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion und 75 mg (3.5 eq, 0.41 mmol) Eschenmosersalz in 10 mL wasserfreiem Methanol gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde für 18 h bei 70 °C gerührt.

Das Gemisch wurde abgekühlt und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand in 20 mL DCM aufgenommen. Die organische Phase wurde dreimal mit je 10 mL Wasser gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und ein gelbes Öl erhalten.

Summenformel: $C_{12}H_{11}NO_2$

Ausbeute: 25 mg (99 %)

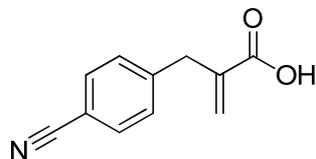
R_f: 0.75 Hexan : EE (1:1)

1H NMR (250.13 MHz, $CDCl_3$)

δ = 7.59 (d, $^3J_{HH}$ = 8.5 Hz, 2H), 7.32 (d, $^3J_{HH}$ = 8.5 Hz, 2H), 6.30 (s, 1H), 5.56-5.55 (m, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.69 (s, 2H).

ESI m/z [M + H + H₂O]⁺: 220.0

3.7.4. DK41 - 2-(4-Cyanobenzyl)acrylsäure



In einen 100 ml Rundkolben wurden 758 mg (1.0 eq, 3.77 mmol) Methyl-2-(4-Cyanobenzyl)acrylat und 1.30 g (2.5 eq, 9.42 mmol) Kaliumcarbonat in einem Gemisch aus 33 mL Methanol und 17 mL Wasser suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde für 4 h bei Raumtemperatur gerührt.

Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit 30 mL gesättigter, wässriger NaHCO₃-Lösung versetzt und dreimal mit je 10 mL DCM gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit 0.5 M HCl_(aq) auf einen pH-Wert von 2 eingestellt und dreimal mit je 40 mL DCM extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Es wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Summenformel: C₁₁H₉NO₂

Ausbeute: 333 mg (56 %)

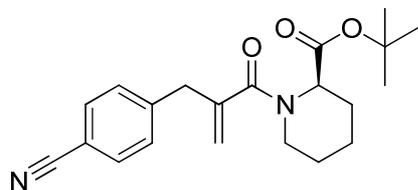
R_f: 0.76 Hexan : EE (1:1 + 1 % AcOH)

¹H NMR (250.13 MHz, CDCl₃)

δ = 7.59 (d, ³J_{HH} = 8.3 Hz, 2H), 7.32 (d, ³J_{HH} = 8.3 Hz, 2H), 6.44 (s, 1H), 5.68-5.67 (m, 1H), 3.68 (s, 2H).

ESI *m/z* [M - H]⁻: 186.9

3.7.5. DK42 - (*R*)-*tert*-Butyl-1-(2-(4-cyanobenzyl)acrylyl)piperidin-2-carboxylat



In einem 50 mL Rundkolben wurden 0.33 mL (2.5 eq, 4.45 mmol) Thionylchlorid und 4 Tropfen DMF in 15 mL DCM vorgelegt. Es wurden 333 mg (1.0 eq, 1.78 mmol) 2-(4-Cyanobenzyl)acrylsäure unter Rühren hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 3 h auf 50 °C erwärmt. Überschüssiges Thionylchlorid wurde, zusammen mit dem Lösungsmittel, mittels Destillation entfernt und das Rohprodukt *in situ* umgesetzt. Das frisch hergestellte Säurechlorid (1.0 eq, 1.78 mmol) wurde in einem 10 mL Mikrowellen-Vial in 8 mL 1,2-Dichlorethan suspendiert. Es wurden 363 mg (1.1 eq, 1.96 mmol) (*R*)-*tert*-Butyl-piperidin-2-carboxylat zugegeben. Dem Gemisch wurde langsam 1.0 mL DIPEA (3.0 eq, 5.34 mmol) zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Mikrowellenstrahlung für 1 h auf 90 °C erhitzt.

Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 40 mL DCM aufgenommen und zweimal mit 20 mL gesättigter, wässriger NaHCO₃-Lösung gewaschen und zweimal mit 0.5 M wässriger HCl gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Flash-Chromatographie (Hexan zu Hexan :EE 1:1) aufgereinigt. Es wurde ein gelbes viskoses Öl erhalten.

Summenformel: C₂₁H₂₆N₂O₃

Ausbeute: 222 mg (35 %)

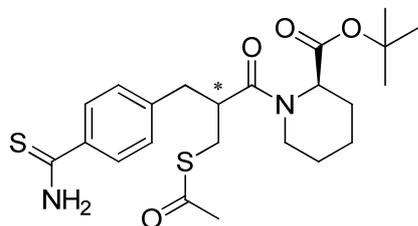
R_f: 0.64 Hexan : EE (1:1)

¹H NMR (250.13 MHz, CDCl₃)

δ = 7.60 (d, ³J_{HH} = 8.5 Hz, 2H), 7.35 (d, ³J_{HH} = 8.5 Hz, 2H), 5.24-5.12 (m, 2.7H), 4.53-4.46 (m, 0.7H), 3.82-3.52 (m, 2.9H), 3.15-3.04 (0.9H) 2.76-2.66 (m, 0.4H), 2.24-2.19 (m, 0.8H), 2.02-2.00 (m, 0.2H), 1.70-1.61 (m, 1.1H), 1.54-1.31 (m, 12.3H).

ESI *m/z* [M + Na]⁺: 377.1

3.7.6. DK43 - (2*R*)-*tert*-Butyl-1-(3-(acetylthio)-2-(4-carbamthioylbenzyl)propanyl)piperidin-2-carboxylat



In einem 50 mL Rundkolben wurden 222 mg (1.0 eq, 0.63 mmol) (*R*)-*tert*-Butyl-1-(2-(4-cyanobenzyl)acrylyl)piperidin-2-carboxylat in 9.2 mL (200 eq, 125 mmol) Thioessigsäure gelöst und das Gemisch für 66 h bei Raumtemperatur unter Argon-Atmosphäre gerührt.

Das Reaktionsgemisch wurde mit 25 mL Wasser verdünnt und dreimal mit je 20 mL DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden zweimal mit je 10 mL Wasser und anschließend einmal mit 10 mL gesättigter, wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem entfernt und das Rohprodukt mittels Flash-Chromatographie (Hexan : EE, 1:1) aufgereinigt. Es wurde ein rotes Öl erhalten.

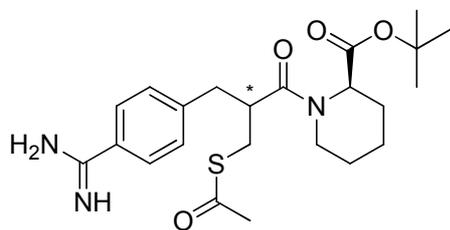
Summenformel: $C_{23}H_{32}N_2O_4S_2$
 Ausbeute: 170 mg (58 %)
 R_f: 0.43 Hexan : EE (1:1)

¹H NMR (250.13 MHz, CDCl₃)

δ = 7.80 (d, ³J_{HH} = 8.5 Hz, 1.5H), 7.68-7.62 (m, 0.5H), 7.57 (bs, 0.6H), 7.22 (d, ³J_{HH} = 8.5 Hz, 2H), 5.29-5.19 (m, 0.8H), 4.67-4.48 (m, 0.3H), 4.23-4.21 (m, 0.1H), 3.78-3.72 (m, 0.3H), 3.64-3.58 (m, 0.5H), 3.34-2.79 (m, 6.2H), 2.69-2.54 (m, 0.9H), 2.35-2.31 (m, 3H), 2.27-2.10 (m, 1H), 1.71-1.66 (m, 1.1H), 1.53-1.33 (m, 11.8H), 0.65-0.60 (m, 0.6H).*

*Schwache Amidin Signale bei 9.5-9.4 ppm.

ESI *m/z* [M + Na]⁺: 487.1

3.7.7. DK44 - (2*R*)-*tert*-Butyl-1-(3-(acetylthio)-2-(4-carbamimidylbenzyl)propanyl)piperidin-2-carboxylat

In einem 50 mL Schlenkkolben wurden 170 mg (1.0 eq, 0.37 mmol) (2*R*)-*tert*-Butyl-1-(3-(acetylthio)-2-(4-carbamthiopylbenzyl)propanyl)piperidin-2-carboxylat und 0.27 mL (1.5 eq, 0.55 mmol) Iodmethan (2 M in MTBE) unter Argon in 20 mL Diethylether gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde destillativ entfernt. Das Rohprodukt wurde unter einer Argon-Atmosphäre in 20 mL ACN gelöst. Es wurden 56 mg (2.0 eq, 0.73 mmol) Ammoniumacetat zugegeben und die Reaktionslösung für 2 h bei Raumtemperatur gerührt.

Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde in 20 mL EE aufgenommen. Die organische Phase wurde dreimal mit je 10 mL 0.5 M HCl_(aq) extrahiert. Die wässrigen Phasen wurden vereint und mittels Lyophille gefriergetrocknet.

Summenformel: C₂₃H₃₃N₃O₄S·HCl

Ausbeute: 175 mg (99 %, als Hydrochlorid)

R_f: 0.13 Hexan : EE (1:1 + 1 % NEt₃)

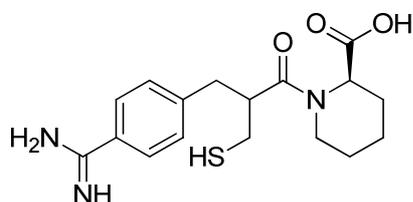
¹H NMR (250.13 MHz, CDCl₃)

δ = 7.83-7.79 (m, 1.2H), 7.71-7.60 (m, 0.8H), 7.41-7.27 (m, 0.8H), 7.24-7.20 (m, 1.2H), 5.29-5.17 (m, 0.8H), 4.68-4.56 (m, 0.3H), 4.23-4.20 (m, 0.1H), 3.78-3.72 (m, 0.3H), 3.65-3.59 (m, 0.4H), 3.35-2.57 (m, 5.4H), 2.56-2.29 (m, 2.6H), 2.23-2.13 (m, 0.7H), 2.07-2.00 (m, 3.8H), 1.71-1.51 (m, 1.8H), 1.46-1.38 (m, 9.2H), 1.33-1.17 (m, 3.2H), 0.68-0.58 (m, 0.4H).*

*Das HCl-Signal konnte nicht detektiert werden. Bei etwa 5.5 ppm ist ein sehr breites Signal zu sehen.

ESI *m/z* [M + ACN]⁺: 487.1

3.7.8. DK54 - (2*R*)-1-(2-(4-Carbamimidylbenzyl)-3-mercaptopropanyl)piperidin-2-carbonsäure



In einem 50 mL Rundkolben wurden 175 mg (1.0 eq, 0.39 mmol) (2*R*)-*tert*-Butyl-1-(3-(acetylthio)-2-(4-carbamimidylbenzyl)propanyl)piperidin-2-carboxylat in 13 mL DCM vorgelegt. Unter Rühren wurden langsam 3.6 mL 4 M HCl in Dioxan hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 50 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde in 8 mL Wasser suspendiert und unter Argon-Atmosphäre für eine halbe Stunde im Ultraschallbad entgast. Das Gemisch wurde mittels Eisbad gekühlt und anschließend langsam mit 4 mL 25 % Ammoniak_(aq) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt.

Der pH-Wert wurde mit 2 M HCl_(aq) auf eins eingestellt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit je 5 mL DCM gewaschen und das Lösungsmittel anschließend destillativ entfernt.

Das Produkt konnte nicht aufgereinigt werden.

3.8. Bestimmung der IC₅₀-Werte mittels fluoreszenz-basierenden Aktivitätsassay

Um die inhibitorische Aktivität der synthetisierten Verbindungen zu evaluieren, wurde ein kinetischer proteinbasierter Aktivitätsassay durchgeführt. Dabei wurde die Umsetzung des Substrats Fluorocillin Green (*ThermoFisherScientific*, ehemals *life technologies*) zum fluoreszierenden Spaltprodukts (Abbildung 13) über die Zeit detektiert.

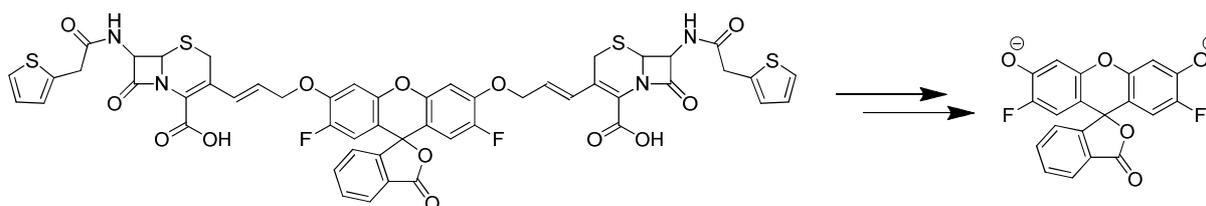


Abbildung 13: Das Substrat Fluorocillin Green (l.) und das Spaltprodukt (r.).

Der Assay wurde in 96 well Polystyrol-Platte mit einem Assay-Volumen von 100 µL durchgeführt. Die zu untersuchenden Proteine wurden in den finalen Konzentrationen 5 pM (NDM-1), 4 nM (VIM-1) und 0.1 nM (IMP-7) eingesetzt. Es wurde ein 50 mM HEPES-Puffer (pH 7.8) mit 0.01 % Triton X-100 als Detergens verwendet. Die Testsubstanzen wurden in DMSO gelöst und vorverdünnt. Das Substrat Fluorocillin Green (*life technologies*) wurde im Assay-Puffer gelöst und mit einer Endkonzentration von 888 nM eingesetzt. Es wurde 1 µL der Inhibitor-DMSO-Lösung vorgelegt. Für die Positivkontrolle (ohne Inhibitor) und die Hintergrundmessung ohne Protein wurde reines DMSO verwendet. Die finale DMSO-Konzentration lag bei 1 %. Nach der Zugabe von 89 µL der Protein-Puffer-Lösung wurde das Gemisch für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10 µL der Substrat-Lösung hinzu pipettiert und direkt mit der Fluoreszenzdetektion begonnen. Die einer Anregung lag bei 495 nm und die Emission bei 525 nm. Es wurden bei Raumtemperatur 30 Messzyklen zu jeweils 45 Sekunden aufgenommen. Durch Formel 1 wurden die in Excel ermittelten Steigungen *m* der drei resultierenden Kurven miteinander in Beziehung gesetzt und die jeweiligen prozentualen Inhibitionen berechnet.

$$\text{Inhibition [\%]} = \frac{m(\text{Positivkontrolle}) - m(\text{Inhibitor})}{m(\text{Positivkontrolle}) - m(\text{Blank})} * 100$$

Formel 1: Berechnung der Inhibition aus den einzelnen Steigungen (Excel).

Material und Methoden

Die Messungen wurden mit mindestens sechs verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen durchgeführt. Nach der Auftragung der dekadischen Logarithmen der Konzentrationen gegen die jeweiligen Inhibitionen, konnte durch das Anlegen einer sigmoidalen Annäherungskurve und Formel 2 der jeweilige IC₅₀-Wert bestimmt werden. Die Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism 5.

$$y = \text{min} + \frac{\text{max} - \text{min}}{1 + 10^{(\log(\text{IC}_{50}) - x) * \text{Hillslope}}}$$

Formel 2: Berechnung des IC₅₀. Max/Min = maximale/minimale Inhibition

3.9. Untersuchung der Schmelzpunktverschiebung mittels Thermal Shift Assay

Werden Protein kontinuierlich erhitzt, beginnen sie ab einer bestimmten Temperatur sich zu entfalten. Diese Temperatur wird auch als Schmelzpunkt des Proteins bezeichnet. Wird das Protein nun mit einem Liganden versetzt, welcher im aktiven Zentrum bindet, sollten die daraus resultierenden Wechselwirkungen die Struktur des Proteins zusätzlich stabilisieren, was eine wiederum eine Erhöhung des Schmelzpunktes zur Folge haben sollte. Die genaue Temperatur, bei der sich ein Protein entfaltet, kann durch einen *Thermal Shift Assay* (TSA, engl.: Thermaler Verschiebungssassay) bestimmt werden. Dabei wird ein Protein-Puffer-Gemisch mit einem fluoreszierenden Stoff versetzt. Im nativen Zustand kann dieser nicht mit der hydrophilen Oberfläche des Proteins wechselwirken und die Fluoreszenz wird durch die wässrige Umgebung ausgelöscht. Beginnt das Protein sich durch die Temperaturzunahme zu entfalten, kann der fluoreszierende Stoff an die hydrophoben Bereiche im Inneren des Proteins binden. Hierdurch kommt es zu einer Zunahme an Fluoreszenz, die detektiert werden kann.^{29,29,30}

Für die Bestimmung der Schmelzpunkte wurde eine PCR-Platte mit einem Assay-Volumen von 40 µL verwendet. Als Pufferlösung wurde ein 47.6 mM Tris-Puffer mit 476 mM NaCl, 4.7 % Glycerol und 0.95 µM ZnCl₂ mit einem pH (HCl) von 8 verwendet. Das zu untersuchende Protein wurde im Assay-Puffer so vorverdünnt, dass die finale Konzentration bei 5 µM lag. SYPRO Orange (*ThermoFisherScientific*) wurde 1:200 im Assay-Puffer vorverdünnt (finale Konzentration: 2.5x). Alle Testsubstanzen wurden in DMSO gelöst und vorverdünnt, sodass ihre Endkonzentration bei 100 µM und der finale DMSO-Anteil bei 0.42 % lag. Alle Messungen erfolgten als Triplikate.

Für die Messung der Protein-Schmelzpunkte wurde eine Probe ohne Inhibitor gemessen. Um den Einfluss der Testsubstanzen zu bestimmen, wurden 32 µL des Protein-Puffer-Gemisches vorgelegt. Anschließend wurden 4 µL der Substrat-Lösung und anschließende 4 µL der Inhibitor-Lösung zugegeben. Die Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz erfolgte durch die Messung einer Probe ohne Protein. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte mittels einer *i cycler IQ single color real time PCR* (*BioRad*) bei einer Extinktion von 490 nm und einer Emission von 570 nm. Die Starttemperatur lag bei 25.0 °C und wurde bis zum Erreichend er maximalen Temperatur von 79.8 °C alle 24 Sekunden um 0.2 °C erhöht. Die erste Ableitung der Messdaten wurde durch das Programm *MyIQ 1.0* erstellt und in *Excel* übertragen, wo die jeweiligen Maxima ermittelt wurden. Diese wurden als Schmelzpunkte betrachtet.

3.10. Isothermale Titrationskalorimetrie

Die isothermale Titrationskalorimetrie (ITC, engl.: *Isothermal titration calorimetry*) erlaubt es, genauere Aussagen über die Art der Bindung zwischen einem Enzym und einem Liganden zu treffen. Das Experiment beruht auf der Tatsache, dass es bei jeder Reaktion, wie zum Beispiel der Bindung eines Inhibitors im aktiven Zentrum eines Proteins, zu einer Änderung der Enthalpie kommt. Dies äußert sich, je nach nachdem, ob es sich um eine endo- oder exotherme Reaktion handelt, durch die Aufnahme oder Abgabe an Wärme. Dies kann mittels ITC direkt gemessen werden. Dies geschieht, indem in der temperierten Messzelle eine Proteinlösung vorgelegt wird. Über eine Spritze wird ein definierte Menge Ligand zur Proteinlösung zugetropft, wodurch es zu einer Änderung der Temperatur in der Messzelle kommt. Als Abgleich dient eine Referenzzelle, in welcher zu Beginn der Messung die gleiche Temperatur herrscht. Die Temperatur in der Messzelle wird durch elektrisches Heizen wieder ausgeglichen. Durch die hierfür aufgebrachte Heizleistung kann auf die freigesetzte Wärme rückgeschlossen werden, welche dann gegen das molare Verhältnis von Enzym zu Ligand aufgetragen werden kann. Neben der Bindungskonstante können auch die entropischen (ΔS) und die enthalpischen (ΔH) Beiträge zur Bindung ermittelt werden.³¹

Die Testsubstanzen wurden mit einer Konzentration von 50 mM, bzw. 100 mM in DMSO gelöst. Das Protein und die Inhibitoren wurden in einem 47.6 mM Tris-Puffer mit 476 mM NaCl, 4.7 % Glycerol und 0.95 μM ZnCl_2 , bei (HCl) pH 8 verdünnt, sodass die finale Konzentration an DMSO bei 2 % lag. Die Konzentration der Inhibitoren wurde variiert, um die Gestalt der resultierenden Kurve zu optimieren.

Für die Durchführung der ITC-Messungen wurde ein *Nano ITC (TA Instruments, Waters GmbH)* verwendet. Die Inhibitor-Lösung wurde über eine 250 μL Spritze portionsweise alle 200 Sekunden zur Protein-Lösung in der 940 μL Probenzelle zugetropft. Die Messungen wurden bei 25 °C und 350 upm durchgeführt. Ausgenommen der Leermessungen wurde für alle weiter Messungen tiefgefrorene Protein-Stocks verwendet. Die finale Konzentration des Proteins, sowie die Anzahl der Titrationsschritte (20-25) und jeweils zugegebene Menge (8-10 μL) wurden für die einzelnen Experimente leicht angepasst. Für die Analyse der erhaltenen Daten wurden das Programm *NanoAnalyze Data Analysis Version 3.5.0* der Firma *TA Instruments* verwendet.

3.11. Bestimmung der LogD-Werte

Die hier beschriebenen Arbeiten wurden von Marcel Walter und Marvin Krug unter der Betreuung von Markus Hartmann durchgeführt.

Brown *et al.* konnten zeigen, dass hydrophile Verbindungen gegenüber gramnegativer Erreger eine deutlich gesteigerte Aktivität besitzen, als hydrophobere.²⁷ Eine von Kern *et al.* publizierte Methode erlaubt die Abschätzung der Polarität von Verbindungen mittels HPLC-MS.³² Das Messprinzip dieser Methode beruht auf dem Zusammenhang zwischen der Polarität einer Verbindung und deren Wechselwirkung mit der stationären Phase während einer Umkehrphasenchromatographie. Je polarer ein Molekül war, desto leichter wird das Molekül von der stationären Phase verdrängt und somit umso kürzer die Retentionszeit sein. Um den direkten Zusammenhang zwischen $\log D_{7.4}$ und Retentionszeit bestimmen zu können, wurde eine Kalibriergrade erstellt. Dazu wurden 24 zugelassene Wirkstoffe mit literaturbekannten $\log D_{7.4}$ -Werten³³ auf ihre Retentionszeiten hin untersucht.

Für die Messungen wurde eine *Shimadzu Prominence LCMS-2020* HPCL-Anlage mit einer RP-Säule der Firma *phenomenex (Kinetex 2.6 μ C18 100 Å (100 x 2.1 mm))* verwendet. Als mobile Phase diente ein Gradient aus ACN (Solvent A) und einer wässrigen 10 mM NH_4OAc (pH7.4) Lösung (Solvent B) mit sich verändernden Konzentrationen (Tabelle 1). Die Flussgeschwindigkeit lag bei 0.3 mL/min.

Tabelle 1: Gradient zur Bestimmung der Retentionszeiten aus Tabelle 2

t [min]	0.0	3.5	6.5	6.7	10
Konz. B [%]	95	5	5	95	95

Material und Methoden

Tabelle 2: Übersicht der 24 vermessenen Wirkstoffe mit den bekannten $\log D_{7,4}$ Werten und der entsprechenden Retentionszeit. Sortiert nach abnehmender Polarität.

Arzneistoff	$\log D_{7,4}$ ^a	t_R [min] ^b
Levodopa	-2.57	1.222
Salicylsäure	-2.11	3.266
Atenolol	-1.38	3.405
Sotalol	-1.35	3.477
Acetylsalicylsäure	-1.14	3.022
Furosemid	-1.02	4.446
Allopurinol	-0.44	2.818
Coffein	-0.07	3.754
Theophyllin	-0.02	3.446
Cimetidin	0.00	3.920
Doxycyclin	0.00	4.440
Metoprolol	0.06	4.572
Procain	0.33	4.381
Indometacin	0.90	5.329
Ibuprofen	1.00	5.348
Chloramphenicol	1.14	5.062
Propranolol	1.26	5.394
Dexamethason	1.83	5.626
Verapamil	1.99	6.706
Carbamazepin	2.19	5.574
Phenytoin	2.30	5.639
Amitriptylin	3.20	6.948
Chlorpromazin	3.38	7.281
Clotrimazol	5.20	7.733

^aAbsorption and Drug Development: Solubility, Permeability, and Charge State³³, ^bAlle Werte als Triplikate.

Werden die $\log D_{7,4}$ Literaturwerte gegen die ermittelten Retentionszeiten (Tabelle 2) aufgetragen, so erhält man die in Abbildung 14 gezeigte Gerade. Wie durch $R^2 = 0.85$ gezeigt wurde, war der Zusammenhang zwischen $\log D_{7,4}$ und t_R nur sehr bedingt linear. Dies war vor allem darauf zurückzuführen, dass die untersuchten Stoffe sich in wässriger Lösung nicht alle neutral verhalten, sondern auch sauren oder basischen Charakter haben. Vor allem die Verbindungen mit sauren Eigenschaften zeigen eine erhebliche Varianz in der Abhängigkeit von $\log D_{7,4}$ und Retentionszeit. Daher eignet sich diese Methode nicht, um für die hier zu untersuchenden Inhibitoren belastbare absolute Werte zu generieren. Zu einer Abschätzung der relativen Polaritäten der Verbindungen untereinander sollte sie jedoch als hinreichend aussagekräftig betrachtet werden.

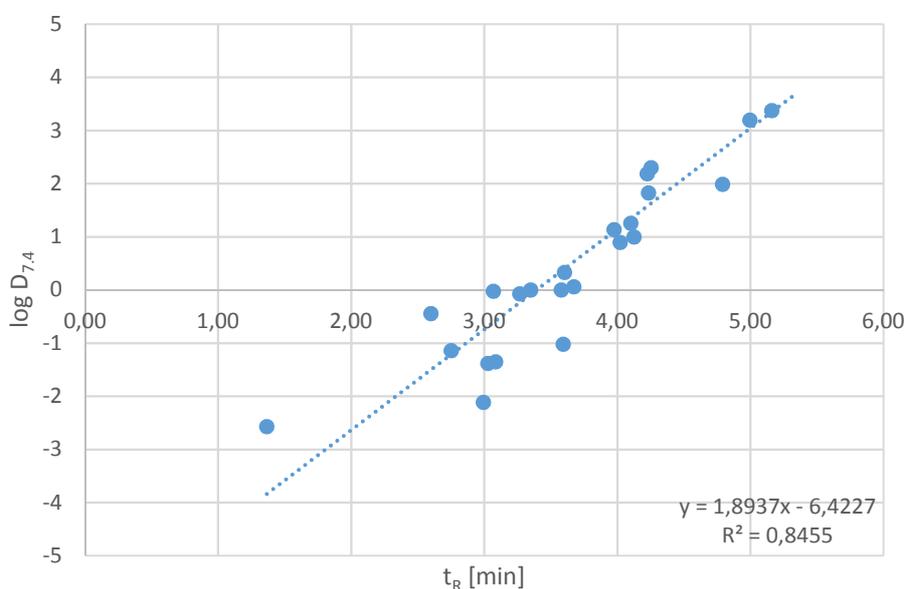


Abbildung 14: Graphische Darstellung der $\log D_{7,4}$ -Werte in Abhängigkeit der Retentionszeiten.

Zur Abschätzung der $\log D_{7,4}$ -Werte für die synthetisierten Verbindungen, wurden deren Retentionszeiten ermittelt und als X-Werte in die Gleichung aus Abbildung 14 eingefügt.

3.12. Bestimmung der Minimale Hemm-Konzentration

Inhibitoren der Metallo- β -Lactamasen sollen zusammen mit β -Lactam-Antibiotika verabreicht werden, um deren Aktivität gegen resistente Bakterien wiederherzustellen. Um die Wirkung der Inhibitoren über reine *in vitro* Assay-Systeme hinaus weiter zu verifizieren, wurde ein Microbroth-Verdünnungsassay durchgeführt. Hierbei werden bakterielle Erreger verwendet, welche gegen das β -Lactam-Antibiotikum Imipenem resistent sind. Durch die zusätzliche Gabe von MBL-Inhibitoren sollte diese Resistenz aufgehoben und das Antibiotikum wieder wirksam werden. Die geringste Konzentration an Inhibitor, bei welcher wieder eine antibakterielle zu beobachten ist, wird als Minimale Hemm-Konzentration (MHK) bezeichnet.

Die hier vorgestellten Arbeiten wurden am Klinikum der Goethe-Universität Frankfurt am Main in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Wichelhaus von Frau Denia Frank durchgeführt.

Die Testsubstanzen wurden auf ihre Wirksamkeit gegenüber verschiedenen klinische Isolaten und *E.coli* Transformanten hin untersucht. Die Bakterien wurden in CAMBH-Medium für 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 4400 upm über 10 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in einer 0.9 %igen Natriumchloridlösung suspendiert, bis eine OD (optische Dichte) von 0.5 (McFarland Standard) erreicht wurde. Durch eine anschließende 1:10 Verdünnung wurde eine Erregerkonzentration von etwa 10^7 KBE/mL erreicht.

Es wurde eine Imipenem-Lösung von 12.8 mg/mL in Milli-Q Wasser angesetzt. Die Lösung wurde 1:100 mit CAMBH verdünnt, um die maximale Testkonzentration von 128 μ g/mL zu erreichen. Diese wurde wiederum in einer Verdünnungsreihe pro Schritt um den Faktor 2 verdünnt, bis eine minimale Testkonzentration von 0.25 μ g/mL erreicht wurde.

Die Testsubstanz wurde in CAMBH gelöst und mit einer finalen Konzentration von 128 mg/mL verwendet. Es wurden 100 μ L eines Gemisches der entsprechenden Imipenem-Lösung mit der jeweiligen Testsubstanz vorgelegt. Anschließend wurden 5 μ L der Bakterien-Lösung zugegeben und für 20 h bei 37 °C inkubiert. Parallel wurden eine Sterilitätskontrolle der geringsten Imipenem-Konzentration und eine Wachstumskontrolle einer reinen Bakterien-Lösung durchgeführt. Die Auswertung der Platten erfolgte visuell. Ein eventuelles Wachstum der Bakterien führte zu einem Niederschlag am Boden der Platte.

3.13. Untersuchung der Aktivität gegenüber des Angiotensin konvertierenden Enzyms

Das für diese Arbeit maßgebende Captopril ist ein zugelassener Inhibitor des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE, engl.: *angiotensin converting enzyme*). Da sich die in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen strukturell stark an Captopril orientieren, wurde diese auf ihre Aktivität gegenüber des ACE hin untersucht.

Hierzu wurde ein fluoreszenzbasierter Endpunkt-Assay³⁴ in einer schwarzen 96-well MicroAmp-Platte mit einem Assay-Volumen von 120 µL durchgeführt. Das kommerziell erworbene ACE-Puffer-Gemisch (*Sigma Aldrich*) wurde mit 50 % Glycerol verdünnt. Anschließend wurde durch Verdünnung mit 0.15 M Tris-Puffer (pH 8.3, 0.1 mM ZnCl₂) eine Proteinaktivität von 6.7 mU/mL eingestellt. Das Substrat (Abz-Gly-p-nitro-Phe-Pro-OH Trifluoracetat, *Bachem Holding, Schweiz*) wurde mit einer finalen Konzentration von 300 µM in einem 150 mM Tris-Puffer mit 1.125 M NaCl bei pH 8.3 gelöst. Die Testsubstanzen wurden in DMSO gelöst und mit Puffer vorverdünnt, sodass deren Endkonzentrationen bei 30 µM, bzw. 10 µM und der finale DMSO-Anteil bei 0.4 % lag.

Für die Untersuchung der Testsubstanzen wurden 20 µL der ACE-Lösung vorgelegt und anschließend 20 µL der Inhibitor-Lösung zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 37 °C wurden 80 µL der Substrat-Lösung hinzu pipettiert. Nach 30 Minuten wurde die Fluoreszenz bei einer Anregung von 350 nm und einer Emission von 420 nm mittels eines *Tecan Infinite 200 pro* (*Tecan Group Ltd*) ausgelesen. Die Aktivität aller Testsubstanzen wurde in Triplikaten gemessen. Die Berechnung der Inhibition erfolgte nach Formel 3.

$$\text{Inhibition [\%]} = \frac{m(\text{Positivkontrolle}) - m(\text{Blank}) - m(\text{Inhibitor})}{m(\text{Positivkontrolle}) - m(\text{Blank})} * 100$$

Formel 3: Berechnung der Prozentualen Inhibition von ACE (m = Steigung).

3.14. Untersuchung der Aktivität gegenüber der Leukotrien A₄-Hydrolase

Wie oben beschrieben, kann der ACE-Hemmer Captopril unerwünschte Wechselwirkungen mit der Leukotrien A₄-Hydrolase (LTA₄H) eingehen. Auf Grund der strukturellen Ähnlichkeiten mit Captopril sollten die hier synthetisierten Substanzen in einem fluoreszenzbasierten Assay³⁵ auf ihre Aktivität gegenüber der LTA₄H hin untersucht wurden. Da die LTA₄H bevorzugt Tripeptide spaltet, welche N-terminal einen Arginin-Rest tragen, wurde als Substrat L-Arginin-7-amido-4-methylcoumarin gewählt. Dieses wird von der LTA₄H zum fluoreszierenden 7-Amino-4-methylcoumarin umgesetzt (Abbildung 15).

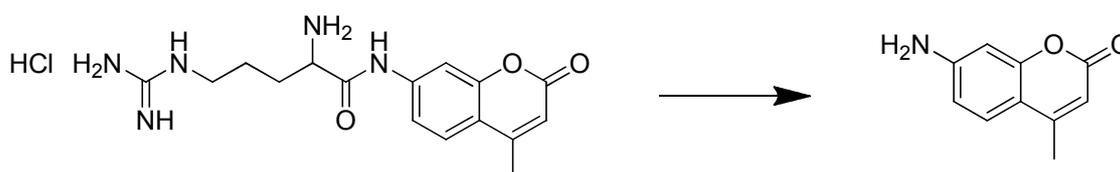


Abbildung 15: Das Substrat (l.) und das Spaltprodukt (r.) des LTA₄H Aktivitätsassays.

Für die Durchführung des Assays wurden 96 well Polystyrol-Platte mit einem Assay-Volumen von 100 µL verwendet. Das Protein wurde in einer finalen Konzentration von 0.25 µM in einem 50 mM Tris-Puffer mit 50 mM NaCl und 0.01 % Triton-X 100 bei pH 8.0 eingesetzt. Die Testsubstanzen wurden in DMSO gelöst und vorverdünnt. Die Endkonzentrationen lagen bei 30 µM, bzw. 10 µM, der finale Anteil an DMSO bei 1 %. Das Substrat L-Arginin-7-amido-4-methylcoumarin (*Sigma Aldrich*) wurde im oben beschriebenen Puffer auf eine Endkonzentration von 200 µM verdünnt. Es wurde jeweils 1 µL der in DMSO gelöst und vorverdünnten Testsubstanzen vorgelegt. Für die Positivkontrolle (ohne Inhibitor) und die Blank-Messung (ohne Protein) wurde DMSO verwendet. Anschließend wurden 89 µL der Protein-Puffer-Lösung hinzu pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurden 10 µL der Substratlösung zugegeben und umgehend mit der Detektion der Fluoreszenz begonnen. Dabei lag die Anregung bei 370 nm und die Emission bei 460 nm. Es wurden, bei Raumtemperatur, jeweils 30 Messzyklen zu jeweils 60 Sekunden aufgenommen. Zur Berechnung der prozentualen Inhibition wurde die Steigungen $m(\text{Inhibitor})$ mittels Excel in Relation zu den Steigungen Positiv- und Blank-Messung gesetzt (Formel 4).

$$\text{Inhibition [\%]} = \frac{m(\text{Inhibitor}) - m(\text{Blank})}{m(\text{Positivkontrolle}) - m(\text{Blank})} * 100$$

Formel 4: Berechnung der Prozentualen Inhibition der LTA₄H.

3.15. Zellbasierte Proliferations-Assays

Zur Evaluierung der antiproliferativen Eigenschaften der synthetisierten Endverbindungen, wurden zwei zellbasierte Proliferations-Assays durchgeführt. Für die Testung wurde die Zelllinie HeLa (Gebärmutterhalskrebszellen) herangezogen. Die entsprechenden Arbeiten wurden extern im Arbeitskreis Steinhilber (Goethe-Universität Frankfurt am Main) von Frau A. Brüggerhoff durchgeführt. Die Zelllinie wurde vom Leibniz-Institut DMSZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH bezogen.

3.15.1. Zellproliferations-Assay mit WST-1

Wurden lebende vitale Zellen mit der blassroten Verbindung Dinatriummono(4-(3-(4-iodphenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-tetrazol-3-ium-5-yl)benzol-1,3-disulfonat (WST-1) behandelt, wurde diese zu einem dunkelroten, löslichen Formazan umgesetzt. Die Reduktion des Tetrazoliumsalses findet hauptsächlich an der Oberfläche der Zellen statt und steht in direktem Zusammenhang mit einer intakten, zellulären Atmungskette. Daher kann aus der Menge an entstandenem Formazan direkt auf die Anzahl metabolisch aktiver und somit vitaler Zellen geschlossen werden.

Die Zelllinie wurde in einer 96-well Mikrotiter-Platte kultiviert und für 48 h bei 37 °C mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert. Anschließend erfolgt eine 45-minütige Inkubation mit WST-1 Substrat (Roche) bei 37 °C. Die Messung der Extinktion (450 nm) erfolgt durch einen Tecan Infinite 200 (Tecan Group Ltd). (Roche: Apoptosis, Cell Death and Cell Proliferation)

3.15.2. Zytotoxizitäts-Assay mit LDH-Aktivitätsmessung

Wurde die zelluläre Plasmamembran beschädigt, z.B. durch eine stattfindende Nekrose, treten die Bestandteile der Zellmembran in die Umgebung aus. Das zytoplasmatische Enzym Lactat-Dehydrogenase (LDH) kommt im Normalfall nicht außerhalb der Zelle vor, wurde aber bei nicht intakter Zellmembran schnell in das Medium abgegeben, wo es nachgewiesen werden kann.

Die Zellkulturen wurden für 48 h mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert. Anschließend wurde das Zellmaterial abzentrifugiert und der Überstand mit dem Zytotoxizität-Detektions-Set inkubiert. Das Set besteht aus dem Katalysator Diaphorase und NAD^+ , sowie dem Farbstoff (2-(4-Iodphenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2*H*-terazol-3-iumchlorid (INT) und Natriumlactat. Das NAD^+ wurde von der LDH zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ reduziert, indem das Lactat zum Pyruvat oxidiert wurde. Das erzeugte Proton wurde durch den Katalysator auf das gelbe Tetrazolium-Salz übertragen, welches dabei zum roten Formazan-Farbstoff (Absorptionsmaximum: 490 nm) gespalten wurde. Die entstehende Menge an Farbstoff korreliert dabei direkt mit der Menge an freigesetzter LDH. Die Quantifizierung erfolgt dabei durch ein ELISA Plattenlesegerät. (Roche: Apoptosis, Cell Death and Cell Proliferation)

3.16. Co-Kristallisation der VIM-2 mit Verbindung DB320

Die im Folgenden beschriebenen Arbeiten wurden von Jan Kramer durchgeführt. Für die Kristallisation der Metallo- β -Lactamase VIM-2 wurden folgende Bedingungen gewählt: 34 % PEG3350, 250 mM Magnesiumformiat, 5 mM β -ME. Es wurde schockgefrostetes Protein verwendet, welches nach dem Auftauen für 10 Minuten bei maximaler Drehzahl zentrifugiert wurde. Die Kristallisationsexperimente wurden nach der *sitting drop* Dampfdiffusions-Methode bei 290.15 K durchgeführt. Der Kristallisationsprozess zog sich über einen Zeitraum von ein bis zwei Wochen. Für alle Experimente wurde die Proteinlösung (A) und die Niederschlagslösung (B) in drei verschiedenen Mischungen (1 μ L A + [0.5 μ L; + 1.0 μ L; + 1.5 μ L] B) verwendet. Für die Kristallisation von DB320 wurde die Niederschlagslösung (B) um 2.5 % einer 1 M Inhibitor-DMSO-Lösung ergänzt. Als Reservat wurde die reine Niederschlagslösung verwendet. Die erhaltenen Proteinkristalle wurden für 20 Sekunden in Kryopuffer (25 % PEG 3350, 200 mM MgCl₂, 15 % Ethylenglycol, 50 mM HEPES, pH 7.2) überführt und anschließend mit flüssigem Stickstoff schockgefrostet.

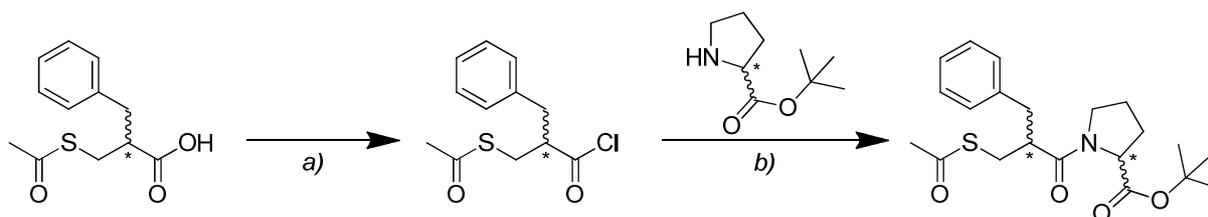
Die Proteinkristalle wurden an der Strahlenlinie ID30a3 der *European Synchrotron Radiation Facility* (ERSF) vermessen. Alle Röntgenbeugungsdaten wurden an einem einzigen Kristall mit einer Auflösung von 1.5 Å bestimmt. Die Prozessierung der Daten erfolgte mit *XDS*. Die anisotropischen Daten der koordinierten Zink-Ionen wurden verwendet, um eine Karte der Elektronendichte zu generieren. Sofern nötig, wurde das über die Funktion *autobuild* erstellte Model mittels des Programms *coot* manuell ergänzt. Um die Kristallstruktur zu lösen, wurde die resultierende PDB einer Domäne ohne Wasser, aber mit Zink, in *phaser* verwendet. Das Model mit dem Liganden DB320 wurde so lange verfeinert, bis abschließend ein R-Wert von 0.1869 und ein R_{frei}-Wert von 0.2113 erhalten wurde.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Übersicht der Synthesen

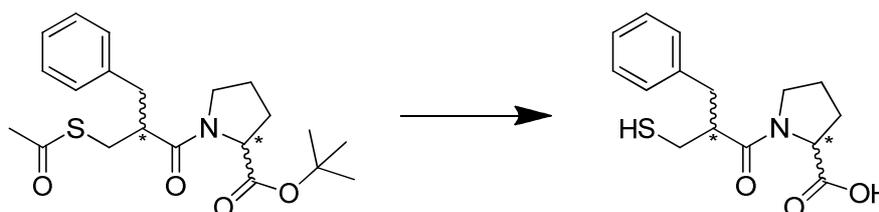
4.1.1. Einführung der Benzylgruppe

Das erste Derivat der Serie entstand durch die Substitution der Methylgruppe von Captopril gegen eine Benzylgruppe. Dies erfolgte durch eine Amidkupplung zwischen der 3-(Acetylthio)-2-benzylpropansäure und dem Hydrochlorid des Prolin-*tert*-Butylesters (Schema 1). Beide Edukte wurden käuflich erworben. Die Carbonsäure wurde mit Thionylchlorid zum korrespondierenden Säurechlorid aktiviert und anschließend in Acetonitril mit dem Amin gekuppelt. Als Base wurde Kaliumcarbonat verwendet.



Schema 1: : Amidkupplung zwischen 3-(Acetylthio)-2-benzylpropansäure und Prolin-*tert*-Butylester: a) 2.0 eq SOCl_2 , DCM, Reflux, 3 h; b) 1.1 eq Säurechlorid, 1.0 eq Amin, 2.5 eq K_2CO_3 , ACN, R.T., ü.N., 32 %.

Um das gewünschte Endprodukt zu erhalten, wurden der *tert*-Butylester und der Thioacetyl-Ester parallel hydrolysiert (Schema 2). Hierzu wurde das Produkt der Amidkupplung mit konzentrierter wässriger Salzsäure versetzt und für eine Stunde zum Sieden erhitzt. Das Produkt wurde als farbloses, viskoses Öl erhalten.



Schema 2: Parallele Hydrolyse beider Estergruppen: 37 % $\text{HCl}_{(\text{aq.})}$, Reflux, 1 h, 99 %.

4.1.2. Einführung verschiedener Aminosäuren

Im Folgenden sollte der Pyrrolidin-Rest der Verbindung DB151 durch unterschiedliche cyclische und offenkettige Reste ersetzt werden. Um den Einfluss der Ringgröße auf die Aktivität der Verbindung zu ermitteln, wurden Piperidin-Derivate und ein Azetidin-Derivat eingeführt. Als nicht-cyclische Reste wurden *N*-Methylglycin (Sarkosin) und die Aminosäure L-Alanin verwendet (Abbildung 16).

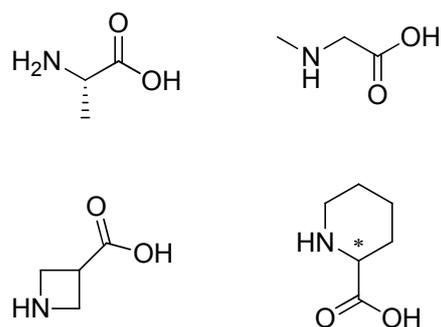


Abbildung 16: Grundstrukturen der eingeführten Aminosäuren.

Alle eingeführten Reste sollten über eine Carbonsäure-Funktion verfügen. Das Azetidin-Derivat war, im Unterschied zu den Piperidin-Derivaten, nur als β -Aminosäure erhältlich. Ebenfalls sollte untersucht werden, welche Rolle die relative Position der Carbonsäure bezüglich der Aminofunktion spielt. Hierzu wurden Piperidin-Derivate mit der Säurefunktion in 2-, 3-, bzw. 4-Position eingeführt (Abbildung 17).

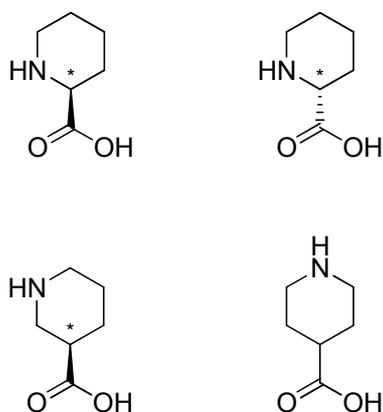


Abbildung 17: Piperidin-Derivate mit dem Carbonsäure-Rest in verschiedenen Positionen und Konfigurationen.

Ergebnisse und Diskussion

Ebenfalls sollte untersucht werden, in wie weit die absolute Konfiguration der Säuregruppe von Belang ist. Es wurden beide Isomere der 2-Piperidincarbonsäure (2-Pipecolinsäure), das *R*-Isomer der 3-Piperidincarbonsäure (*R*-Nipecotinsäure), sowie 4-Piperidincarbonsäure verwendet. Als weitere Substituenten wurden Thiazolidin-4-carbonsäure und Thiomorpholin-1,1-dioxid eingeführt (Abbildung 18).

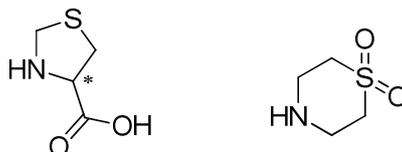
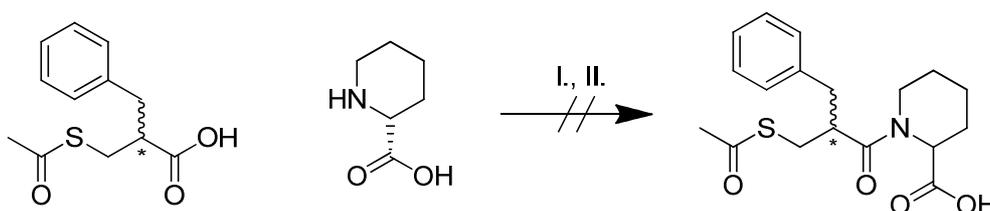


Abbildung 18: Thiazolidin-4-carbonsäure mit Schwefel als weiteres Heteroatom im Ring, und Thiomorpholin-1,1-dioxid mit einer Sulfongruppe als Bioisoster der Carbonsäure

4.1.3. Amidkupplungen mit ungeschützten Aminosäuren - Teil I

Ein erster Versuch die neuen Teilstrukturen einzuführen bestand darin, die freien Aminosäuren direkt an das Propansäure-Derivat zu koppeln. Hierzu wurden die Reaktionsbedingungen der Synthese von DB151 verwendet. Die Propansäure wurde mit Thionylchlorid aktiviert. Anschließend wurde das Säurechlorid mit den entsprechenden Aminosäuren versetzt und entstehende HCl mit Kaliumcarbonat neutralisiert (Schema 3).



Schema 3: Versuch einer Amidkupplung mit freier Aminosäure; I.: 3 mL SOCl_2 , R.T., 16 h; II.: 1.0 eq Säurechlorid, 0.6 eq Aminosäure, 2.2 eq K_2CO_3 , ACN, R.T., 16 h.

Unter diesen Bedingungen konnte bei keiner der eingesetzten Aminosäuren das gewünschte Produkt isoliert werden. Dies konnte zum einen damit begründet werden, dass α -Aminosäuren in Lösung in der Regel als Zwitterion vorliegen, sprich die Säurefunktion das Amin protoniert und selbst als Carboxylat vorliegt. Dies führt zu einem Verlust der Nucleophilie am Stickstoffatom. Gleichzeitig könnte eine Nebenreaktion ablaufen, bei welcher das Carboxylat seinerseits das Säurechlorid nucleophil angreifen könnte. Das hierbei entstehende gekreuzte Anhydrid könnte wiederum an beiden elektrophilen Zentren von einem Nucleophil angegriffen werden, sei es durch eine Carboxylat- oder eine Aminogruppe, und weitere Nebenprodukte erzeugen (Abbildung 19).

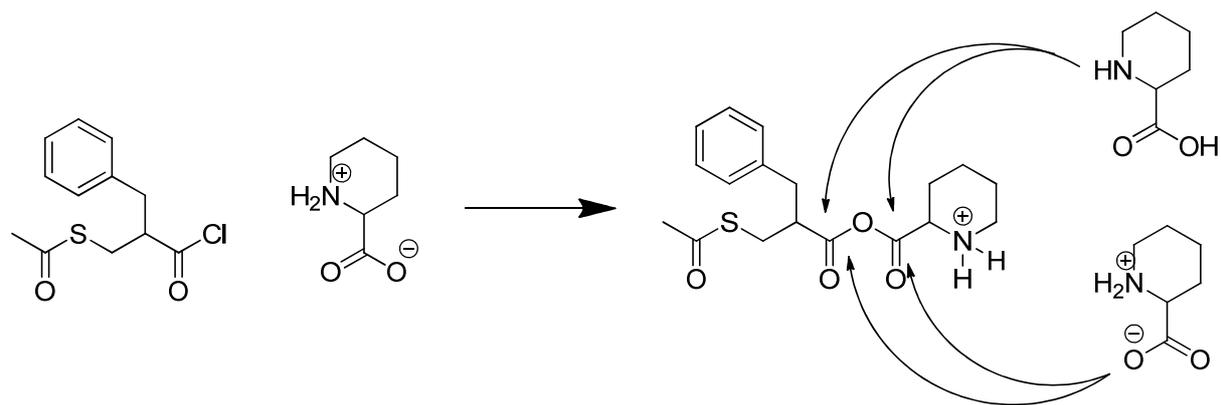


Abbildung 19: Übersicht von möglichen Nebenreaktionen der Kopplungsreaktion zwischen Säurechlorid und freier Aminosäure.

Alternativ zum Säurechlorid wurden auch eine Reaktion mit EDC als Kopplungsreagenz durchgeführt. Allerdings konnte auch hier kein Produkt isoliert werden.

Um die Problematik der freien Aminosäuren zu umgehen, sollte deren Säurefunktion verestert werden.

4.1.4. Einführung des *tert*-Butylesters

Prinzipiell gibt es zwei grundlegende Varianten, Säure- in Ester-Funktionen zu überführen. Möglichkeit A besteht darin die Säure im entsprechenden Alkohol (z.B. Methanol für einen Methyl ester) unter Säurekatalyse zu erhitzen. Alternativ kann, unter basischen Bedingungen, das entsprechende Alkylhalogenid (z.B. Methyljodid) verwendet werden. Im vorliegenden Fall war allerdings nur Variante A von Belang, da die Aminogruppe durch die zweite Methode sehr wahrscheinlich ebenfalls alkyliert worden wäre.

Die Hydrolyse eines Carbonsäureesters erfolgt in aller Regel bei hoher Temperatur und ggf. erhöhtem Druck, in einem basisch wässrigen Milieu. Eine Ausnahme bildet der *tert*-Butylester, welcher auch unter basischen Bedingungen stabil, aber hydrolyseempfindlich gegenüber Säuren ist (Abbildung 20).

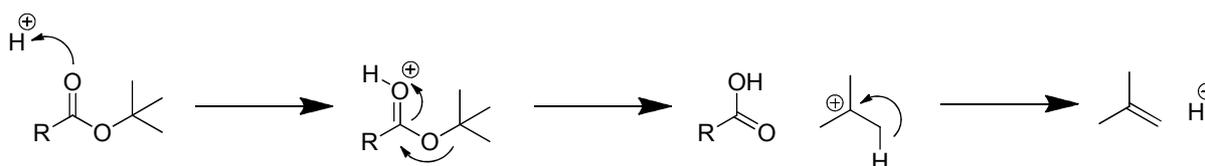


Abbildung 20: Reaktionsmechanismus der sauren Hydrolyse eines *tert*-Butylesters.^{36,36,37}

Da eine starke Base zu einer unerwünschten Nebenreaktion führen würde (s Kapitel 4.1.6), wurde der *tert*-Butylester gewählt. Hierdurch konnten die Bedingungen einer basischen Esterhydrolyse vermieden werden.

Die Einführung des *tert*-Butylesters erwies sich als unerwartet kompliziert. Eine klassische Methode zur Synthese von Estern besteht darin, die Carbonsäure mit dem entsprechenden Alkohol unter saurer Katalyse in der Hitze umzusetzen. Dies würde im vorliegenden Fall allerdings zur oben beschriebenen Eliminierungsreaktion führen.

Eine weitere Alternative wäre eine Steglich-Reaktion. Hierbei wird die Carbonsäure mit einem Carbodiimid aktiviert und anschließend mit dem gewünschten Alkohol verestert. Diese Methode, welches sich in der Regel gut für die Veresterung mit sperrigen Alkoholen eignet, würde aber wahrscheinlich ebenfalls nicht funktionieren. Durch die freie Aminogruppe steht ein potentes Konkurrenz-Nucleophil zur Verfügung, sodass es wahrscheinlich zur Ausbildung einer Amidbindung zwischen zwei Aminosäuren kommen würde.

Ergebnisse und Diskussion

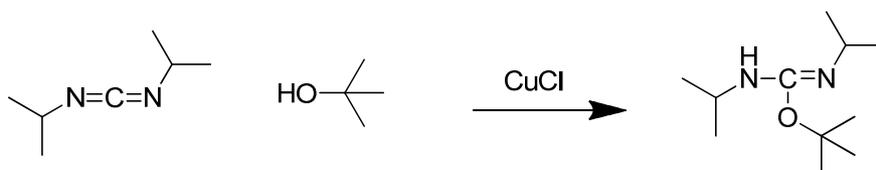


Abbildung 21: Allgemeine Reaktionsgleichung der Synthese des Isoharnstoff-Derivats.³⁶

Der nächste Ansatz bestand darin, aus *tert*-Butanol, *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) und katalytischen Mengen CuCl ein Isoharnstoff-Derivat herzustellen (Abbildung 21). Hierbei wurde das Carbodiimid in einem leichten Überschuss an *tert*-Butanol gelöst. Nach der Zugabe von einem Molprozent CuCl wurde das Gemisch bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Produkt konnte mittels Vakuumdestillation mit einer Ausbeute von 88 % erhalten werden.

Da so erzeugte Reagenz sollte als *tert*-Butyl-Quelle fungieren. Ein möglicher Mechanismus wären die Freisetzung des *tert*-Butyl-Kations, welches dann von einem Nucleophil angegriffen würde. Im Unterschied zu vielen anderen Carbo-Kationen ist das *tert*-Butyl-Kation vergleichsweise stabil, da die positive Ladung durch die drei Methylgruppen sterisch abgeschirmt und die Ladung durch deren +I-Effekt stabilisiert wird. Denkbar wäre auch noch die Weiterreaktion des Kations zum 2-Methylpropen, welches dann *in situ* mit einem Nucleophil reagieren könnte. Allerdings handelt es sich bei 2-Methylpropen um ein flüchtiges Gas.

Die Umsetzung des *O-tert*-Butyl-*N,N'*-diisopropylisoharnstoffes mit den gewünschten Aminosäuren führte nicht zur Bildung des gewünschten Produktes. Der Grund hierfür lag vermutlich darin, dass die Aminofunktion das stärkere Nucleophil war, als das Carboxylat.

Erfolg brachte schließlich die Umsetzung mit *tert*-Butylacetat. Hierzu wurde die entsprechende Aminosäure in einem Überschuss an *tert*-Butylacetat suspendiert. Anschließend wurde unter Eisbadkühlung langsam 1.6 Äquivalente wässrige Perchlorsäure (60 %) zugetropft.

Im Unterschied zur oben beschriebenen Isoharnstoff-Variante wurde hier zusätzlich eine starke Säure verwendet. Dadurch wurde gewährleistet, dass das Amin protoniert vorlag und nicht mehr als Konkurrenz-Nucleophil an der Reaktion teilnahm. Der Überschuss an Perchlorsäure (pK_s : -10) katalysierte die eigentliche Reaktion. Ein möglicher Mechanismus wäre, dass die Perchlorsäure die Carbonylfunktion des Esters protoniert und dadurch das *tert*-Butyl-Kation freigesetzt wird. Dieses könnte dann von der Säurefunktion der Aminosäure nucleophil angegriffen werden (Abbildung 22).

Ergebnisse und Diskussion

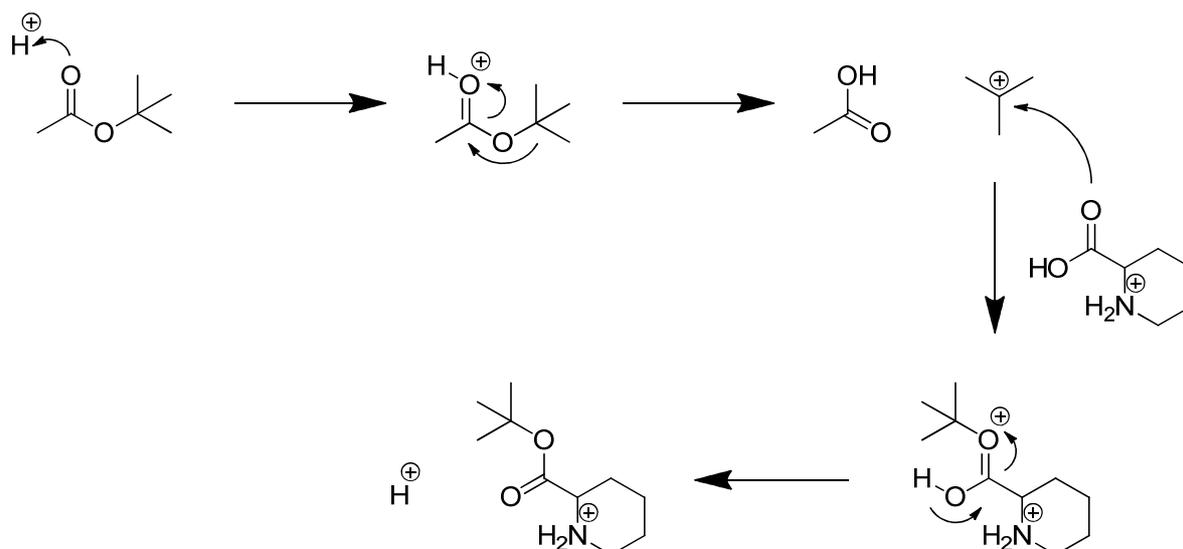


Abbildung 22: Reaktionsmechanismus der sauren Umesterung, ausgehend von tert-Butylacetat.³⁸

Ein interessanter Aspekt war, dass deutlich bessere Ausbeuten erzielt werden konnten, desto weniger Energie man der Reaktion zuführte. So konnten die besten Ausbeuten erzielt werden, indem das Reaktionsgemisch über zwei bis drei Tage bei Raumtemperatur nur sehr langsam durchmengt wurde.

Diese Beobachtungen unterstützen den oben vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus. Das tert-Butylkation ist nur bedingt stabil und könnte sehr leicht ein Proton eliminieren und zu 2-Methylpropen umlagern. Dieses wiederum ist flüchtig und würde aus dem Reaktionsgemisch entweichen.

Diese Variante der Veresterung erbrachte für die α -Aminosäuren Ausbeuten im Bereich von 23-58 %. Für das 3-Carbonsäurepiperidin konnten allerdings nur 27 % erreicht und das 4-Carbonsäure-Derivat, sowie der Azetidin-Ring konnten nur zu sieben Prozent, bzw. gar nicht umgesetzt werden.

Es war klar zu erkennen, dass es einen Zusammenhang zwischen der Position der Carbonsäure relativ zum Amin und der Ausbeute der Reaktion geben musste. Allerdings konnte nicht abschließend geklärt werden, worin der Einfluss der Aminogruppe lag. Eine mögliche Erklärung ist in Abbildung 23 aufgezeigt.

Ergebnisse und Diskussion

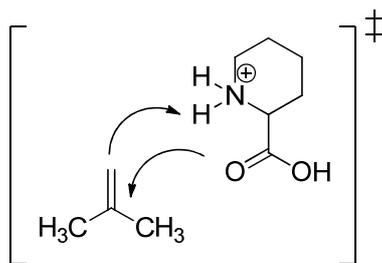


Abbildung 23: Vorschlag eines Übergangszustandes während der Veresterung der Carbonsäure zum tert-Butylester.

In Abbildung 23 ist ein Übergangszustand gezeigt, bei dem das protonierte und damit positiv geladene Stickstoffatom eine katalytische Rolle in der Veresterung der Säurefunktion einnimmt. Im Unterschied zum oben vorgestellten Mechanismus, liefere diese Reaktion allerdings nicht über das Carbo-Kation, sondern über das 2-Methylpropen ab. Dabei würden die π -Elektronen der Doppelbindung über das endständige Kohlenstoffatom eines der Protonen am Stickstoff angreifen. Dadurch würde am zentralen Kohlenstoff eine positive Partialladung ausgebildet werden, welche dann ihrerseits vom Carbonylsauerstoff der Säuregruppe angegriffen werden könnte. Dieser Mechanismus wäre eine schlüssige Erklärung dafür, warum die Veresterung nur mit α -Aminosäuren, bei denen die Amino- und die Säuregruppe nahe bei einander liegen, gut funktioniert.

4.1.5. Amidkupplung mit ungeschützten Aminosäuren – Teil II

Für die beiden Aminosäure-Derivate, welche nicht verestert werden konnten, wurde nach Kopplungsbedingungen gesucht, welche auch für ungeschützte Aminosäuren funktional waren.

Für die Azetidin-3-carbonsäure wurden zuerst ein geeignetes Lösungsmittel ermittelt. Es zeigte sich, dass die Verbindung weder in Acetonitril noch in DCM oder THF und nur schlecht in Chloroform löslich war. DMF erweis sich als gutes Lösungsmittel, allerdings brachte die Amidkupplung mit diesem Lösungsmittel keine Umsetzung. Ein weiterer Ansatz bestand darin, Pyridin als Lösungsmittel zu verwenden. Dadurch hätte stets ausreichend Base zur Verfügung gestanden. Des Weiteren kann Pyridin Säurechloride aktivieren und die Elektrophilie am Carbonylkohlenstoff noch weiter erhöhen (Abbildung 24).

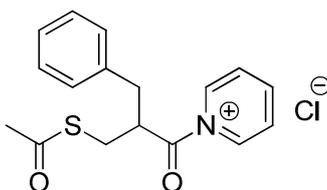


Abbildung 24: Chlorid-Salz des Aktivesters von S-(2-Benzyl-3-chloro-3-oxopropyl)ethanthioate mit Pyridin

Allerdings zeigte sich, dass die Azetidin-3-carbonsäure nicht in Pyridin löslich war. Erwartungsgemäß brachte die Kopplungs-Reaktion auch keine Umsetzung. Um die Reaktanden trotz des Löslichkeitsproblems miteinander in Kontakt zu bringen, wurde die Reaktion in einem Ultraschallbad durchgeführt. Allerdings konnte auch in diesem Fall kein Produkt nachgewiesen werden.

Ein Gemisch aus äquivalenten Mengen ACN und DMF erwies sich schlussendlich als geeignet. Als Base wurden Triethylamin (NEt_3), DIPEA und Pyridin getestet (Tabelle 3)

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 3: Ausbeuten der Amidkupplung mit Azetidin-3-carbonsäure in ACN und DMF (1:1) in Abhängigkeit von verschiedenen Basen, deren Äquivalenten und Reaktionstemperaturen. Reaktionszeit: 16 h; n.f.: nicht feststellbar.

Base	Äquivalente	Temperatur [°C]	Ausbeute [%]
K ₂ CO ₃	2.5	R.T.	0
Pyridin	Überschuss	R.T.	0
NEt ₃	3	R.T.	n.f.
NEt ₃	3	40 °C	26
NEt ₃	3	60 °C	> 10
DIPEA	1.5	60 °C	50
DIPEA	3	60 °C	32

Während die Reaktion mit Pyridin keine nennenswerte Ausbeute lieferte (Tabelle 3) konnten mit drei Äquivalente NEt₃ und 40 °C noch 26 % Umsatz erreicht werden. Eine weitere Erhöhung der Reaktionstemperatur hatte zur Folge, dass die Ausbeute auf unter zehn Prozent fiel. Am erfolgreichsten verlief die Reaktion mit 1.5 Äquivalente DIPEA und 60 °C. Hier konnten 50 % Produkt isoliert werden.

Die Piperidin-4-carbonsäure konnte nach dieser Methode nicht erfolgreich umgesetzt werden. Das Piperidin-Derivat erwies sich als nur in Wasser und mäßig in Methanol löslich. Ein Versuch, die Kopplung mit NaHCO₃ in Wasser³⁹ durchzuführen brachte keinen Erfolg. Ein weiterer Ansatz bestand darin, das Säurechlorid des Propansäure-Derivats in DCM zu lösen und eine wässrige Lösung aus Natriumcarbonat und 4-Carbonsäurepiperidin hinzu zu tropfen⁴⁰. Jedoch konnte auch auf diesem Weg keine Umsetzung erreicht werden.

Daher wurde das Piperidin-Derivat in einem Gemisch aus Acetonitril und Wasser (2:1) gelöst und mit 3.5 Äquivalenten Natriumhydrogencarbonat versetzt. Das frisch aktivierte Säurechlorid wurde in Acetonitril gelöst und zur Reaktionslösung hinzugegeben. Auf diesem Weg konnte eine Ausbeute von 24 % erzielt werden.

Ergebnisse und Diskussion

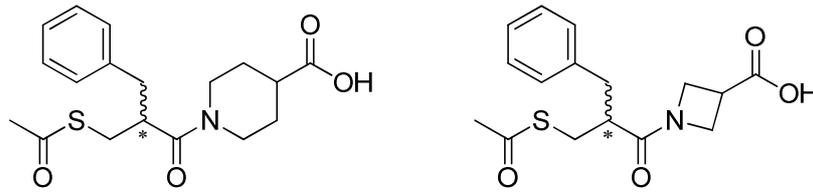
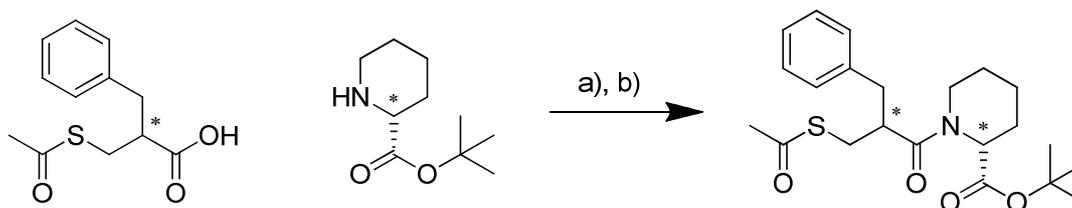


Abbildung 25: Produkte der erfolgreichen Amidkupplung mit freien Aminosäuren

Interessanterweise konnten die gefundenen Bedingungen, abgesehen von dem Thiazolidin-Derivat, nicht auf die α -Aminosäure-Derivate übertragen werden.

4.1.6. Amidkupplung der Aminosäureester

Die Aminosäure-Derivate, welche erfolgreich verestert werden konnten, wurden nachfolgend an das Propansäure-Derivat gekoppelt. Dieses wurde mit Thionylchlorid zum korrespondierendem Säurechlorid umgesetzt. Die eigentliche Amidkupplung wurde in einem Gemisch aus ACN und DMF (1:1) durchgeführt. Als Base diente DIPEA (Schema 4).



Schema 4: a) 2.5 eq SOCl_2 , DCM, 50 °C, 3 h; b) 0.9 eq Amin, 1.5 eq DIPEA, ACN, DMF (1:1), R.T., 16 h (61 %).

Hierbei zeigte sich, dass eine Reaktion bei Raumtemperatur und die Verwendung von 1.5 Äquivalenten Base gute Ausbeuten (61 %) erbrachten. Diese konnte nochmals auf bis zu 81 % gesteigert werden indem die Reaktion in reinem Acetonitril durchgeführt und die Menge an Base auf 2.5 Äquivalente erhöht wurde. Reaktionstemperaturen von 40 °C oder gar 60 °C, bzw. mehr als 2.5 Äquivalente DIPEA, führten zu einer deutlichen Braunfärbung der Reaktionslösung. In einem vergleichbaren Maße, in welchen die Färbung zunahm, sank die Ausbeute an Produkt. Gleichzeitig konnte auf einer durchgeführten Dünnschichtchromatographie (DC) ein neuer, nicht zu zuordnender Spot detektiert werden, welcher allerdings nicht isoliert werden konnte.

Eine mögliche Erklärung hierfür bestand in der Annahme, dass es zu einer Basenkatalysierten Eliminierung von Thioessigsäure kam (Abbildung 26).

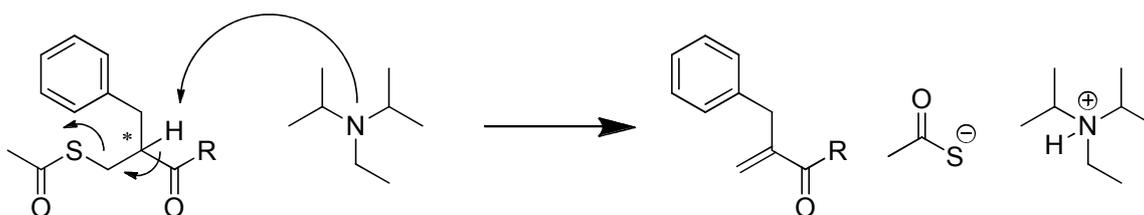


Abbildung 26: Eliminierung von Thioessigsäure als mögliche Nebenreaktion während der Amidkupplung.

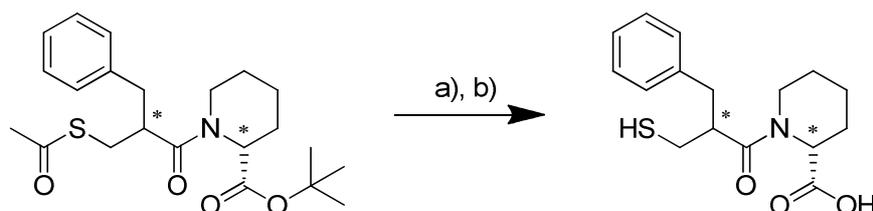
4.1.7. Hydrolyse der Esterfunktionen

Um die gewünschten Endverbindungen zu erhalten, mussten die oben beschriebenen Zwischenstufen noch an zwei Positionen hydrolysiert werden. Zum einen sollte der *tert*-Butylester gespalten werden, um so die, für die Inhibition der MBLs essentielle, Carbonsäurefunktion zu erhalten. Auf der anderen Seite musste die Thiolgruppe durch eine Hydrolyse des Thioesters freigesetzt werden.

Da die oben beschriebene Hydrolyse mit konzentrierter wässriger Salzsäure (vgl. Schema 2) nahezu quantitative Ausbeuten erbrachte, sollten auch die anderen Derivate auf diese Weise hydrolysiert werden. Für die Piperidin-Derivate mit der Carbonsäure in 3-, bzw. 4-Position führte diese Strategie auch zum gewünschten Erfolg. Im Falle der anderen Derivate kam es allerdings auch zur Hydrolyse der Amid-Bindung.

Als wasserfreie Alternative wurde die Esterspaltung mit Trifluoressigsäure in DCM durchgeführt. Nach einer Reaktionszeit von sechs Stunden bei 40 °C konnte mittels DC-Kontrolle kein Edukt mehr nachgewiesen werden. Der Thioester erwies sich unter diesen Bedingungen als stabil. Dies war allerdings vorhersehbar, da an der Reaktion kein geeignetes Nucleophil teilnahm, welches die Esterfunktion hätte spalten können. Die Spaltung des *tert*-Butylesters hingegen lief über eine Eliminierungsreaktion, welche kein Nucleophil benötigte (Abbildung 20).

Als letzter Schritt sollte die acetylierte Thiolgruppe freigesetzt werden. Thioester sind dafür bekannt, labil gegenüber primären Aminen zu sein, was in verschiedenen Vorversuchen bestätigt werden konnte. So wurde die Acetylgruppe unter anderem mit β -Alanin abgespalten. Milde und effektive Bedingungen lieferte die Verwendung von verdünnter wässriger Ammoniak-Lösung. Die Vorteile dieser Variante lagen darin, dass keine weiteren Reagenzien benötigt wurden und das Produkt durch simple, wässrig-saure Aufarbeitung gewonnen werden konnte. Allerdings zeigte sich auch, dass die Thiolgruppe unter basischen, bzw. oxidativen Bedingungen sehr schnell zur Ausbildung von Disulfid-Bindungen neigten.



Schema 5: Hydrolyse des *tert*-Butyl- und des Thioesters. a): 2.5 eq TFA, DCM, 40 °C, 6 h; b): 1 M NH₃, 0 °C, R.T., 1 h (81 %, bzgl. a) + b)).

Ergebnisse und Diskussion

Diese unerwünschte Nebenreaktion konnte reduziert werden, indem das Edukt in 12 mL Wasser suspendiert wurde und das Gemisch anschließend mittels Ultraschalbad und Argon für ca. 20 Minuten entgast wurde. Anschließend wurde das Gemisch mit einem Eisbad gekühlt und 1 mL einer wässrigen Ammoniak-Lösung (25 %) zugegeben. Nach einer 60-minütigen Reaktionszeit konnte das Produkt mit Ausbeuten von bis zu 81 % isoliert werden (Schema 5).

4.1.8. Synthese der Piperazin-Derivate

Nachdem sich gezeigt hatte, dass Verbindung DB320 die besten IC_{50} -Werte besaß, sollte überprüft werden, ob eine weitere Substitutionen am Piperidin-Ring toleriert werden würde. Im Folgendem sollte dazu der Piperidin-Ring gegen eine Piperazin-Ring substituiert werden. Die Carboxylfunktion in Position 2 des Ringes sollte erhalten bleiben. Über die Aminofunktion in Position 4 des Piperazin-Rings sollten unterschiedliche Reste eingeführt werden (Abbildung 27). Im Rahmen der Optimierung der Synthese, wurde das Stereozentrum an Position 2 des Piperazin vorerst ignoriert und das racemische Gemisch verwendet.

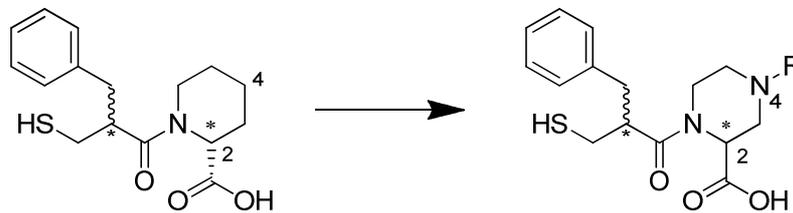


Abbildung 27: Substitution der Piperidin-2-carbonsäure gegen Piperazin-2-carbonsäure

Prinzipiell wurden hierfür zwei mögliche Syntheserouten erwogen. Die erste Möglichkeit bestand darin, das 2-Carbonsäurepiperazin direkt an das Propansäure-Derivat zu koppeln und anschließend die gewünschten Teilstrukturen in Position 4 einzuführen (Abbildung 28).

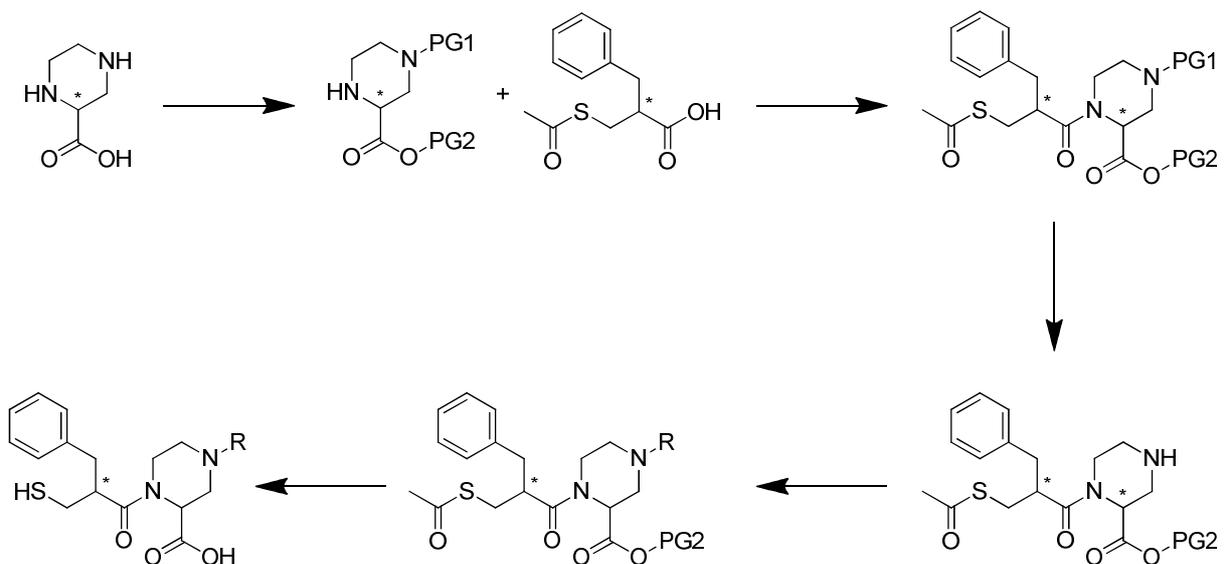


Abbildung 28: Syntheseroute A zur Darstellung der Piperazin-Derivate (PG = Protecting Group, engl. Schutzgruppe).

Hierzu hätten sowohl die Aminofunktion in Position 4, als auch die Carbonsäure geschützt werden müssen, sinnvollerweise mit einer orthogonalen Schutzgruppenstrategie. Nach der Amidkupplung hätte das geschützte Amin wieder freigesetzt werden müssen. Dabei wäre darauf zu achten gewesen, dass die Bedingungen hierzu die Thioesterfunktion nicht in Mitleidenschaft gezogen hätten. Dies wäre auch bei den weiteren Synthesen zur Einführung der neuen Teilstrukturen zu beachten gewesen.

Um diese Probleme zu umgehen, wurde eine zweite Syntheseroute gewählt. Hierbei wurden zuerst die gewünschten Reste am käuflich erworbenen Piperazin-Derivat eingeführt. Die so erzeugten Derivate wurden anschließend mit dem Propansäure-Derivat zum Amid gekoppelt (Abbildung 29).

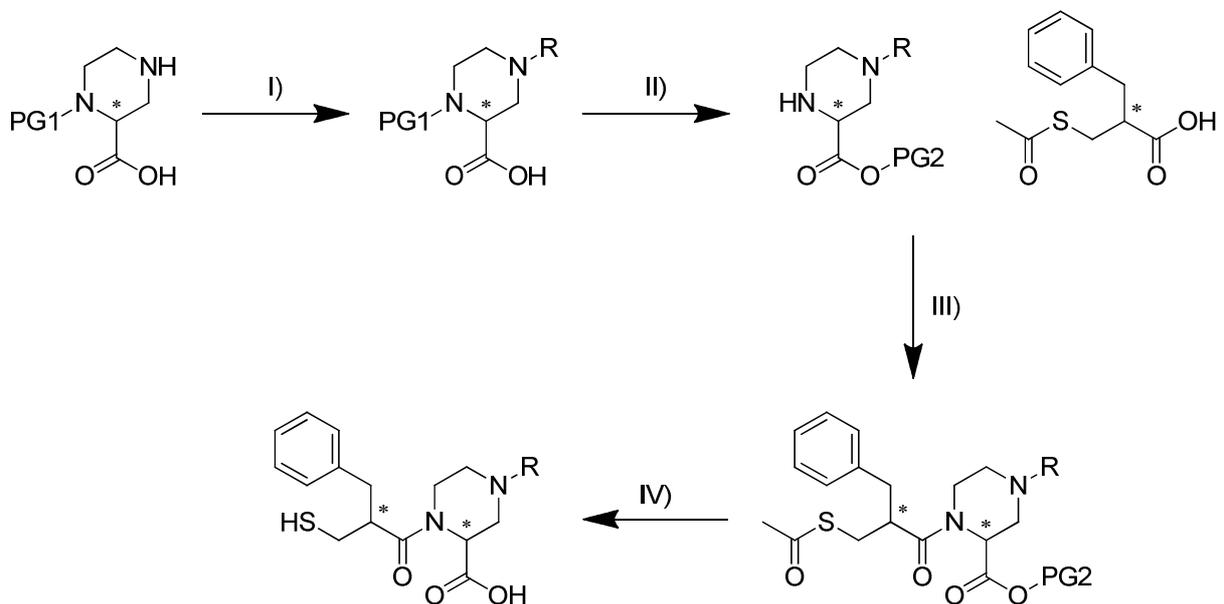


Abbildung 29: Syntheseroute B zur Darstellung der Piperazin-Derivate. I): Einführung der gewünschten Reste; II): Schützung der Säurefunktion. Parallel dazu Entschützung der Aminofunktion; III): Amidkupplung; IV): Hydrolyse der Esterfunktionen.

Gerade in Bezug auf die Synthesen zur Derivatisierung der Propansäure (s.a. Kapitel 4.1.11) war diese Syntheseroute vorteilhaft, da das Propansäure-Derivat erst relativ spät eingeführt werden konnte und die über mehrere Stufen synthetisierten Propansäuren nicht durch mäßige Ausbeuten einzelner Syntheseschritte verschwendet wurden.

4.1.9. Aufbau der Piperazin-Bausteine

Der erste Schritt im Aufbau der Endverbindungen war die Einführung der gewünschten Teilstrukturen an Position 4 des Piperazin-Rings. Hier sollten die Amide der Benzoesäure und der Phenyllessigsäure, ein Phenylharnstoff-Derivat und ein Phenylsulfonamid eingeführt werden (Abbildung 30). Als Ausgangsedukt wurde 1-(*tert*-Butoxycarbonyl)piperazin-2-carbonsäure verwendet, welche käuflich erworben wurde.

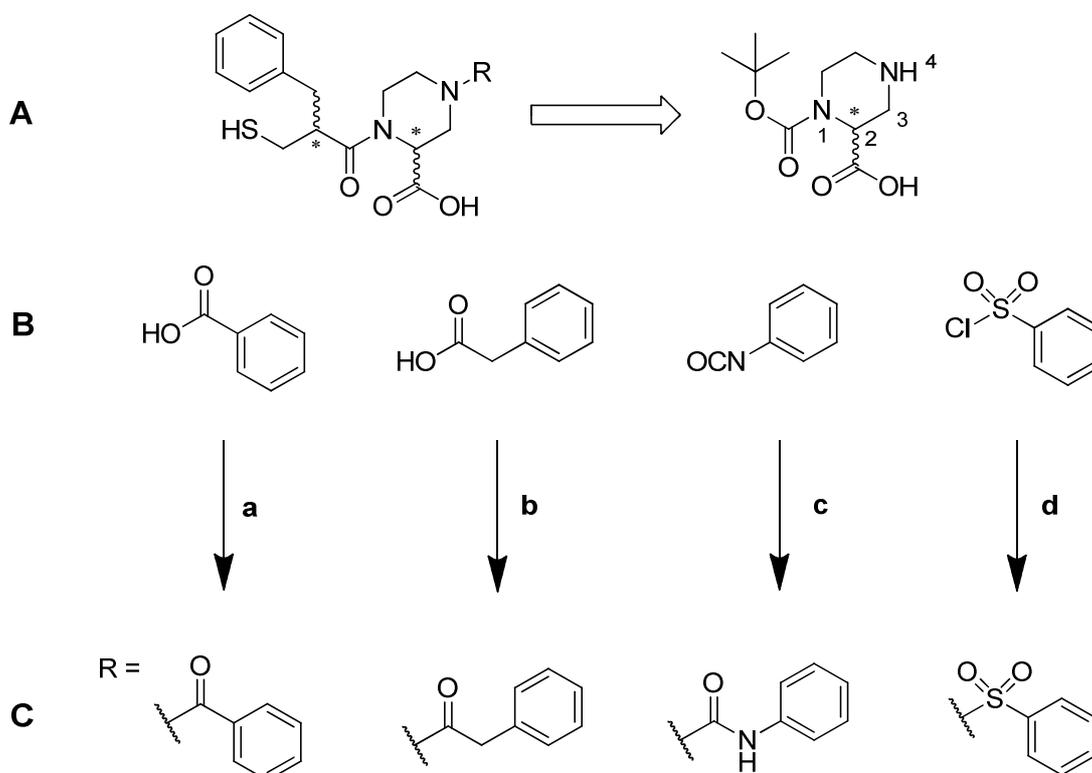


Abbildung 30: Synthon (r.) der Synthese der Piperazin-Derivate (I., A); Übersicht der Edukte (B: Benzoesäure, Phenyllessigsäure, Phenylisocyanat und Phenylsulfonylchlorid (v.l.n.r.); a)/b) 1.0 eq Benzoesäure/Phenyllessigsäure, 1.2 eq EDC, 1.0 eq HOBt, DCM, R.T., 1 h, 1.5 eq Piperazin-Derivat, R.T., 72 h; c) 1.0 eq Piperazin-Derivat, 1.0 eq Phenylisocyanat, Dioxan, 110 °C (MW), 0.5 h; d) 1.0 eq Piperazin-Derivat, 1.1 eq Benzolsulfonylchlorid, 3.0 eq Na₂CO₃, DCM/H₂O (1:1), R.T., ü.N.; Die an Position 4 eingeführten Teilstrukturen (C).

Die Teilstrukturen **a** und **b** (Abbildung 30) wurden mittels Amidkupplungen eingeführt. Hierzu wurde Benzoe-, bzw. Phenyllessigsäure mit den Kopplungsreagenzien 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) in DCM suspendiert. Die Carbonsäure wird durch EDC aktiviert (Abbildung 31, I.). Das bei dieser Reaktion entstehende

Ergebnisse und Diskussion

Isoharnstoff-Derivat wird durch HOBt substituiert (II.). Der resultierende Aktivester wird nun von der freien Aminofunktion des Piperazin nucleophil angegriffen (III.).

Um Nebenreaktionen zu vermeiden, wurden die Säuren jeweils eine Stunde mit den Kopplungsreagenzien vorgerührt und anschließend das Amin zugegeben. Auf diese Weise sollte verhindert werden, dass die Carbonsäure am Piperazin ebenfalls aktiviert wird, was wiederum eine Amidkupplung zwischen zwei Piperazin-Derivaten zur Folge hätte haben können.

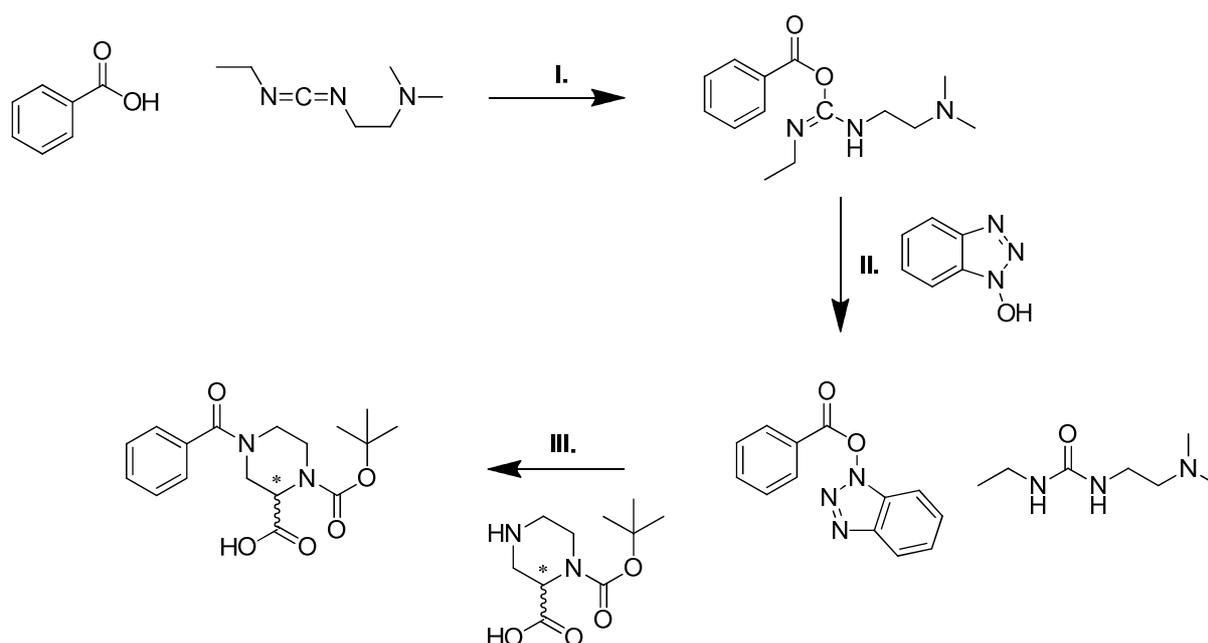


Abbildung 31: Allgemeine Reaktionsgleichung einer Amidkupplung mit den Kopplungsreagenzien EDC und HOBt am Beispiel von Benzoesäure und 1-(tert-Butoxycarbonyl)piperazin-2-carbonsäure; I: Aktivierung der Carbonsäure durch EDC zum entsprechendem Isoharnstoff-Derivat; II: Bildung des Aktivesters mit HOBt und Freisetzung des Harnstoff-Derivats; III: Umsetzung des Aktivesters zum Amid.

Das Harnstoff-Derivat (Abbildung 30, c) wurde mittels Mikrowellenchemie synthetisiert. Als Reagenz wurde hier Phenylisocyanat verwendet. Die beiden Edukte wurden in äquimolarer Menge in Dioxan gelöst und die Reaktionslösung anschließend für 30 Minuten unter Mikrowelleneinstrahlung auf 110 °C erhitzt. Im Anschluss wurde die Lösung mit einem Überschuss an Wasser verdünnt und das nicht wasserlösliche Produkt konnte mittels Vakuumfiltration als weißer Feststoff abgetrennt werden.

Die Synthese des Sulfonamids (Abbildung 30, d) erfolgte in einem Zweiphasensystem aus DCM und Wasser. Dabei wurde das Piperazin-Derivat vorgelegt und das Phenylsulfonylchlorid tropfenweise zugegeben. Um die entstehende Salzsäure abzufangen wurde festes Natriumcarbonat beigemischt.

Alle synthetisierten Derivate (**a-d**) konnten durch Umkristallisation aufgereinigt werden.

Der nächste Schritt bestand in der Benzylisierung der freien Carbonsäure (Abbildung 32). Hierzu wurden die oben beschriebenen Zwischenprodukte mit Benzylbromid und festem Kaliumcarbonat umgesetzt. Die Reaktion erfolgte in Acetonitril und lieferte Ausbeuten zwischen 87-91 %.

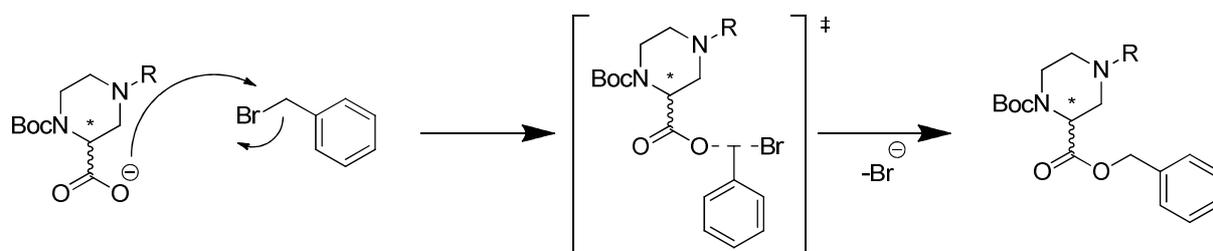


Abbildung 32: Reaktionsmechanismus der Benzylisierung nachdem Mechanismus einer S_N2 -Reaktion.

Der abschließende Schritt bestand aus der Abspaltung der Boc-Schutzgruppe. Die *tert*-Butyloxycarbonyl-Gruppe ist eine säurelabile Schutzgruppe. Während der sauren Hydrolyse entstehen als Nebenprodukte 2-Methylpropen und Kohlendioxid. Beide Nebenprodukte sind flüchtige Gase, welche der Reaktionslösung entweichen. Dadurch verschiebt sich das Gleichgewicht der Reaktion auf die Produktseite (Abbildung 33).

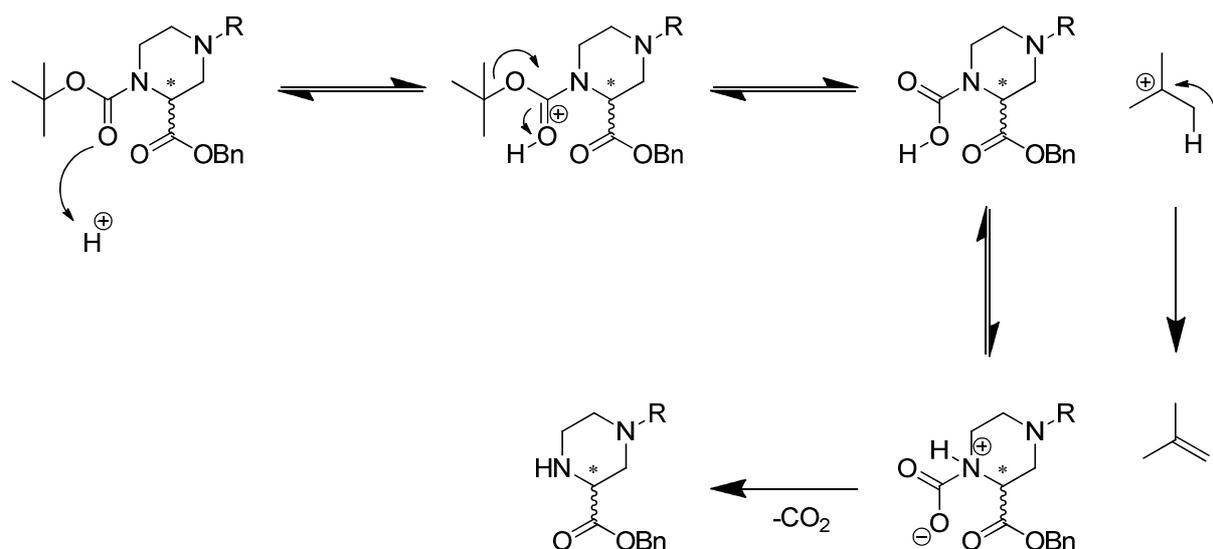


Abbildung 33: Mechanismus der säurekatalysierten Hydrolyse von BOC-Schutzgruppen.

Obwohl für diese Reaktion bereits verdünnte, wässrige Salzsäure ausreichend gewesen wäre, wurde deren Verwendung verzichtet. Grund hierfür war zum einen, dass der Benzylester bei höheren Temperaturen unter wässrig sauren Bedingungen ebenfalls hydrolysiert hätte werden könnte. Zum anderen sind auch Amide gegenüber wässriger Salzsäure nicht dauerhaft stabil.

Stattdessen wurde eine Hydrogenchloridlösung (4 M in Dioxan) verwendet. Neben der erhöhten Stabilität der oben beschriebenen Gruppen, war das entstehende Hydrochlorid-Salz der freigesetzten Aminogruppe nicht in Dioxan löslich und fiel aus.

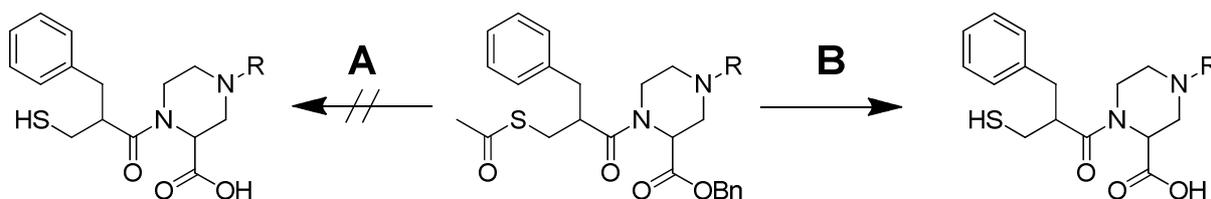
Eine weitere Alternative war die Verwendung von absoluter Trifluoressigsäure (TFA) in DCM. Der Nachteil dieser Methode lag jedoch darin, dass Reste an TFA nur schwer zu entfernen waren und wiederholt mit Toluol co-evaporiert werden mussten.

Die anschließende Kopplungsreaktion zwischen den nun freien Aminen und dem Propansäure-Derivat erfolgte analog zur in Kapitel 4.1.6 beschriebenen Vorgehensweise.

4.1.10. Die abschließende Esterhydrolyse

Der finale Schritt bestand in der Hydrolyse der beiden Esterfunktionen. Benzylschutzgruppen werden in aller Regel hydrogenolytisch entfernt, zum Beispiel mit Wasserstoff und Palladium auf Kohle (Pd/C). Da auch Thioester empfindlich gegenüber Hydrogenolyse sind, sollten auf diesem Weg beide Schutzgruppen parallel entfernt werden. Ein weiterer Vorteil dieser Reaktion bestand darin, dass keine Gefahr bestand, Thioessigsäure zu eliminieren und unter den reduktiven Bedingungen keine Disulfide entstehen sollten.

Die Produkte der Amidkupplung wurden in Ethanol gelöst. Es wurden fünf Gewichtsprozent von 10 % Pd/C hinzugegeben. Anschließend wurde die Reaktion bei Raumtemperatur in einer Wasserstoff-Atmosphäre für 6 Stunden gerührt. Eine anschließende Aufarbeitung und Analytik erbrachten hauptsächlich Edukt. Eine weiterführende Untersuchung mittels HPLC zeigte, dass zum einem geringen Anteil das freie Thiol entstanden war. Ein vollständig entschütztes Produkt, oder ein Produkt der Hydrogenolyse des Benzylesters konnten nicht gefunden werden. Es zeigte sich, dass Thiole in der Lage sind, Pd-Katalysatoren zu vergiften. Folglich konnte davon ausgegangen werden, dass die Hydrogenolyse solange funktionierte, bis eine bezüglich des Palladium äquimolare Menge Thiol freigesetzt wurde. Nachdem dann der Katalysator vollständig vergiftet war, stoppte die Reaktion. Diese Ergebnisse zeigen auch, dass Thioester gegenüber Hydrogenolyse empfindlicher sind, als Benzylester.



Schema 6: Parallele Spaltung des Benzyl- und des Thioesters. A: 10 Gew.-% Pd/C (10 %); B: 4.5 eq LiOH, Wasser/THF (2:1). R.T., ü.N.

Das gewünschte Produkt konnte erhalten werden, indem das veresterte Edukt in einem 2:1 Gemisch aus Wasser und THF suspendiert und mit 4.5 Äquivalenten Lithiumhydroxyd über Nacht bei Raumtemperatur gerührt wurde (Schema 6).

4.1.11. Synthese der Propansäure-Derivate - Retrosynthetische Überlegungen

Nach der Synthese der verschiedenen Piperazin-Derivate, sollte der Phenylring der 3-(Acetylthio)-2-benzylpropansäure substituiert werden. Da die Auswahl an käuflich erwerbbaeren 3-(Acethylthio)propansäuren-Derivaten sehr eingeschränkt war, musste ein Weg gefunden werden, diese selbst zu synthetisieren.

Den Ansatzpunkt für eine entsprechende Synthesestrategie gab die Nebenreaktion der oben beschriebenen Amidkupplung, während der Thioessigsäure eliminiert wurde. Die daraus resultierende α,β -ungesättigte Carbonyl-Verbindung konnte ihrerseits als Akzeptor für eine Michael-Addition dienen (Abbildung 34).

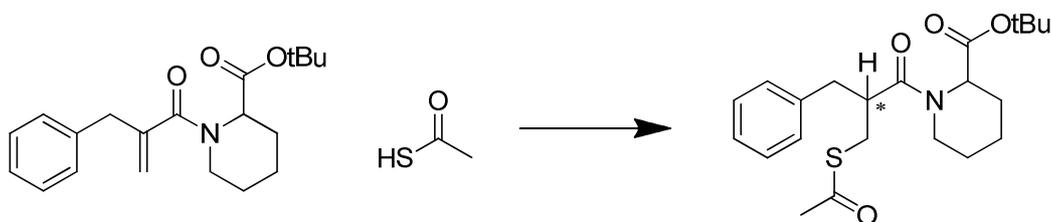


Abbildung 34: Allgemeine Reaktionsgleichung einer 1,4-Addition von Thioessigsäure an eine exo-Methylenverbindung.

Dieser Ansatz erlaubte es, die Thiol-Funktion erst zu einem späteren Zeitpunkt der Synthese einzuführen. Dies brachte den Vorteil mit sich, dass keine Rücksicht auf den vergleichsweise empfindlichen Thioester genommen werden musste.

Der nächste logische retrosynthetische Schritt war die Spaltung der Amid-Bindung. Die beiden Synthons für die Synthese waren die in α -Position substituierte Acrylsäure und das entsprechende Amin (Abbildung 35).

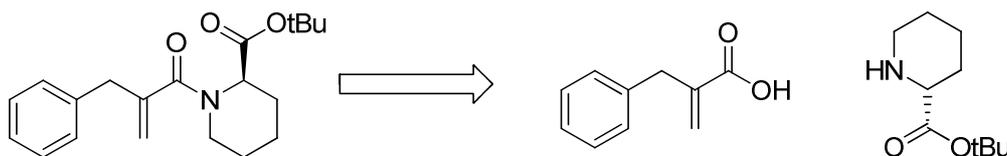


Abbildung 35: Mögliche Synthons der Retrosynthese des Acrylamids..

Obwohl eine Vielzahl an Derivaten der Acrylsäure kommerziell erwerbbar gewesen wäre, erschien es erstrebenswerter, die Retrosynthese noch einen Schritt weiter zu treiben und die gewünschten Derivate selbst zu synthetisieren.

Die Acrylsäure ist nicht nur eine α,β -ungesättigte Carbonyl-Verbindung, sondern auch eine *exo*-Methylen-Verbindung. Diese lassen sich generell mittels Mannich-Reaktionen darstellen. Hierbei wird der α -Kohlenstoff einer Carbonylverbindung, unter Verwendung des Eschenmoser-Salz, zunächst um eine $\text{CH}_2\text{-N}(\text{Me}_2)$ -Einheit verlängert. Die so erzeugte Mannich-Base kann anschließend am Stickstoff methyliert werden. Durch eine baseninduzierte Eliminierung des Amins wird dann die *exo*-Methylen-Gruppe erzeugt (Abbildung 36).

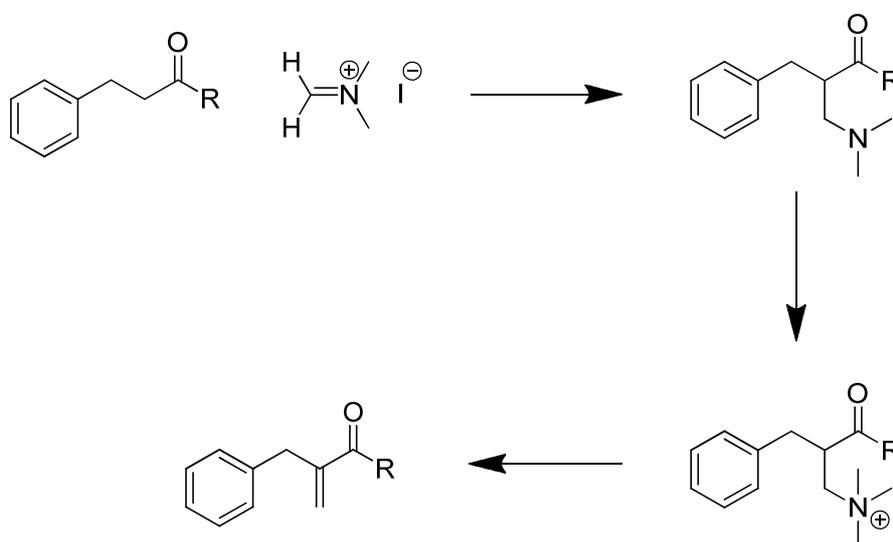


Abbildung 36: Stark vereinfachte Darstellung der Reaktionsschritte einer Mannich-Reaktion mit anschließender N-Methylierung der Mannich-Base und E1cb Reaktion ($R = \text{H}$, Alkyl).

Der Nachteil dieser Reaktion besteht darin, dass sie nur mit Aldehyden, bzw. Ketonen sauber abläuft. Die α -Kohlenstoffe von Carbonsäuren, einfachen Estern und Amiden sind in aller Regel, auf Grund der mesomeriestabilisierten Carbonylgruppen, nicht reaktiv genug.

Weitere Möglichkeiten zur Synthese von α,β -ungesättigten *exo*-Methylen-Verbindungen wären Metall katalysierte Reaktionen, oder eine Wittig-Horner-Reaktion mit Formaldehyd gewesen.

Frost et al. publizierten eine elegante Synthesestrategie zur Darstellung von Acrylestern, ausgehend von Meldrumsäure und Aldehyden.⁴¹ Der erste Schritt erfolgte nach einer Knoevenagel Kondensation

(Abbildung 37, I.). Die resultierende C-C-Doppelbindung wurde mit *in situ* generierten $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ reduziert (II.).

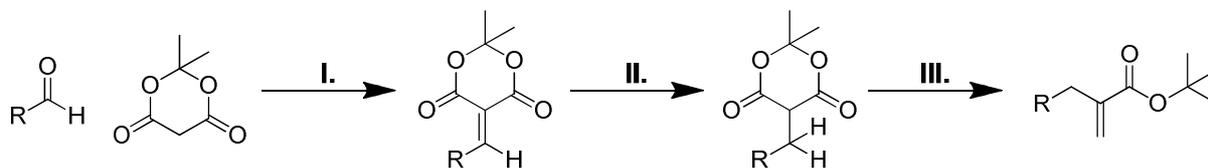


Abbildung 37: Die einzelnen Reaktionsschritte vom Aldehyd, hin zum Acryl-Ester. I.: Knoevenagel-Reaktion mit Meldrumssäure, II.: Reduktion der C-C-Doppelbindung, III.: Cycloeliminierung und Umesterung.⁴¹

Im abschließendem Schritt kam es, unter der Verwendung des Eschenmoser-Salz und *tert*-Butanol zur Ringöffnung der Meldrumsäure, wobei gleichzeitig die *exo*-Methylen-Gruppe und der *tert*-Butylester erzeugt wurden (III.).

Diese Methoden ermöglichte es, die gewünschten Acrylsäure-Derivate aus mannigfaltig verfügbaren Aldehyden herzustellen. Im Rahmen einer Abschlussarbeit zur Erlangung des akademischen Grads „Master of Science“ Chemie wurde diese Syntheseroute von Christian G. Kurz für ausgewählte Aldehyde unter meiner Betreuung optimiert. Im Folgenden sollen der gewählte Syntheseweg und die durchgeführten Reaktionen aufgezeigt werden. Für tiefere Details sei auf die Abschlussarbeit von Herrn M.Sc. Ch. G. Kurz verwiesen (Kurz, Christian G., Optimierung des synthetischen Zugangs zu Thiol-basierten Inhibitoren der Metallo-beta-Lactamasen, Goethe-Universität Frankfurt, FB14, Frankfurt 2015).

4.1.12. Substitutionen am Aromaten

Der Phenylring der ursprünglichen Verbindung sollte durch einen Vanillin-, ein 4-Bromphenyl- und einen Thiophen-Rest ersetzt werden (Abbildung 38).

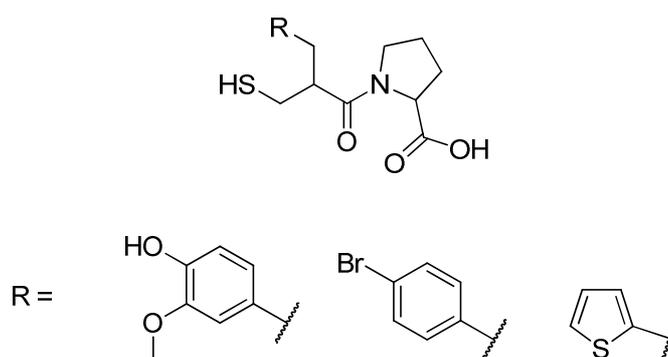
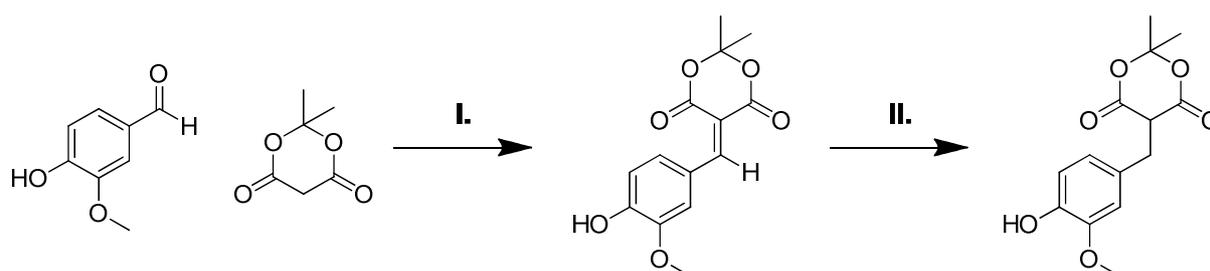


Abbildung 38: Übersicht der substituierten aromatischen Ringe: Vanillin, 4-Bromphenyl und Thiophen (v.l.n.r.)

Für die Optimierung der Synthesen wurden Vanillin als Edukt gewählt. Im ersten Schritt wurde, abweichend von der klassischen Methode, eine säurekatalysierte Variante der Knoevenagel-Kondensation durchgeführt (Schema 7, I.). Die Verwendung von nicht nucleophilen basischen Aminen brachte keine nennenswerte Umsetzung.



Schema 7: I.: 0.9 eq Aldehyd, 1.0 eq Meldrumsäure, 0.1 eq, AcOH, i-PrOH, 75 °C, 2 h (72 %); II.: 31 eq AcOH, 8 eq NaBH₄, DCM, 0 °C, 1 h, R.T., 1 h, Argon, 98 %

Die säurekatalysierte Methode lief allerdings nur bei der Verwendung von Vanillin (72 % Ausbeute) und dem Thiophen-2-carbaldehyd (67 %) sauber ab. Bei der Umsetzung der Meldrumsäure mit

4-Brombenzaldehyd konnte das erwünschte Zwischenprodukt nachgewiesen, aber nicht isoliert werden. Die weiteren Umsetzungen erfolgten daher mit dem Rohprodukt.

Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass es sich bei Vanillin und Thiophen, im Gegensatz zum 4-Brombenzaldehyd, um elektronenreiche Aromaten handelt. Um den Einfluss der Aromaten auf die Reaktion hervorzuheben, soll hier detaillierter auf den Mechanismus der Knoevenagel-Reaktion eingegangen werden.

Die klassischen Bedingungen einer Knoevenagel-Reaktion, welche ihrerseits eine Variante der Aldol-Reaktion, bzw. -Kondensation ist, sind die Verwendung einer C-H-aziden 1,3-Dicarbonyl-Verbindung (z.B. Meldrumsäure), welche mit einem Aldehyd reagiert und einer Aminbase. Alternativ zur Dicarbonyl-Verbindung können die entsprechenden Ester oder Meldrumsäure verwendet werden. Die C-H-azide Verbindung wird von der Base deprotoniert (Abbildung 39) und es entsteht das korrespondierende Enolat. Dieses kann nun den elektrophilen Carbonylkohlenstoff des Aldehyds nucleophil angreifen.

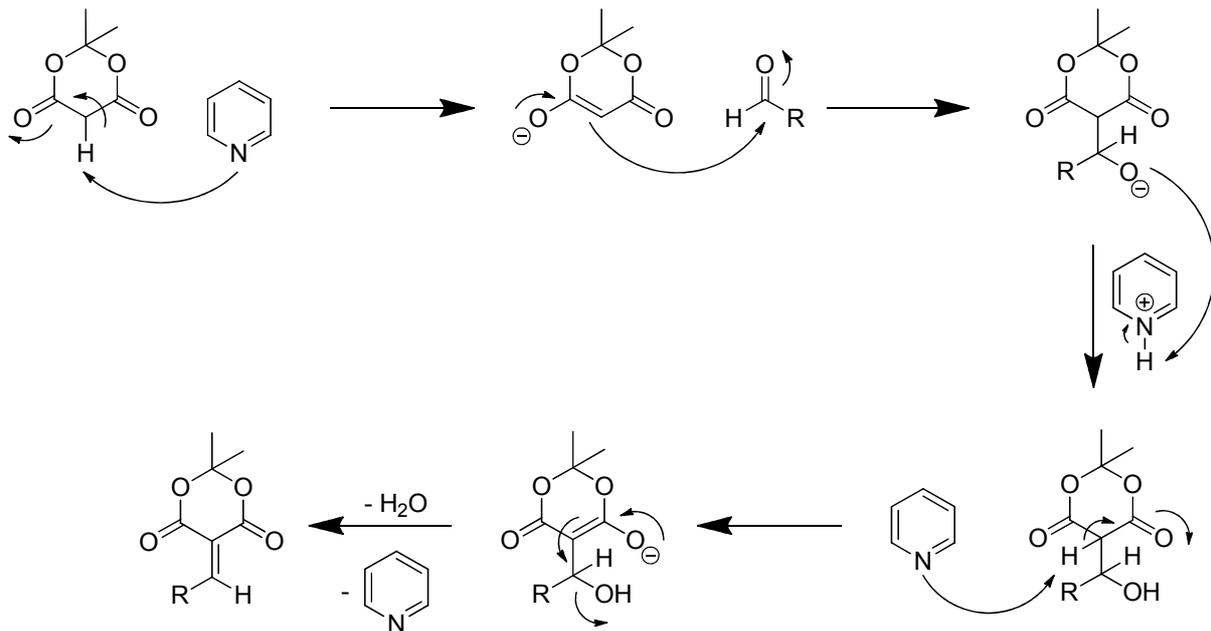


Abbildung 39: Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus der Knoevenagel-Reaktion am Beispiel von Meldrumsäure, einem Aldehyd ($R \neq H$) und Pyridin als Base.

Das dabei entstehende Aldol kann nun nach einem E1cb Mechanismus Eliminieren, wobei formal ein Äquivalent Wasser entsteht.

Der verwendeten Base kommen hierbei zwei Aufgaben zu. Zum einen wird durch Deprotonierung der C-H aziden Verbindung (hier Meldrumsäure) das nucleophile Enolat erzeugt, zum anderen unterstützt sie den abschließenden Eliminierungs-Schritt.

Prinzipiell kann diese Reaktion auch unter saurer Katalyse verlaufen. Allerdings würde dadurch die Eliminierung wahrscheinlich nicht mehr nach einem stabilisiertem E1cb, sondern nach einem E1 Mechanismus ablaufen. Hierbei müsste ein Carbo-Kation als Zwischenstufe durchlaufen werden. Dies gelingt umso besser, desto höher die Elektronendichte am entsprechendem Kohlenstoff ist. Ist der Rest R (Abbildung 39), wie in der vorliegenden Arbeit, ein Aromat, spielt es eine entscheidende Rolle, wie elektronenreich dieser ist. Die aromatischen Ringe von Vanillin und Thiophen besitzen einen Überschuss an Elektronendichte, und üben daher keinen nennenswerten Elektronenzug auf das Kohlenstoff-Atom, welches die potentielle Abgangsgruppe trägt, aus. Der Brom-Substituent am 4-Bromphenyl hat einen -I-Effekt, woraus ein elektronenarmer Aromat resultiert. Dieser wiederum hat einen elektronenziehenden Effekt auf das Kohlenstoffatom. Auf Grund des dadurch entstehenden, energetisch ungünstigen Kations, findet die Reaktion nicht statt.

Folglich ließ sich die saure Variante der Knoevenagel-Reaktion nur mit elektronenreichen Aromaten mit befriedigendem Erfolg durchführen.

Die entstandene C-C-Doppelbindung wurde anschließend mit dem milden Reduktionsmittel Natriumtriacetoxyborhydrid reduziert. Dieses wurde durch Zugabe von Natriumborhydrid in die essigsäure Reaktionslösung *in situ* generiert.

Im folgendem Schritt wurde das reduzierte Zwischenprodukt mit 3.5 Äquivalenten Eschenmoser-Salz umgesetzt. Dabei liefen mehrere Reaktionen nacheinander ab. Zu Beginn wurde das Eschenmoser-Salz in einer Mannich-Reaktion an das nucleophile Kohlenstoffatom des Meldrumsäure-Restes addiert (Abbildung 40).

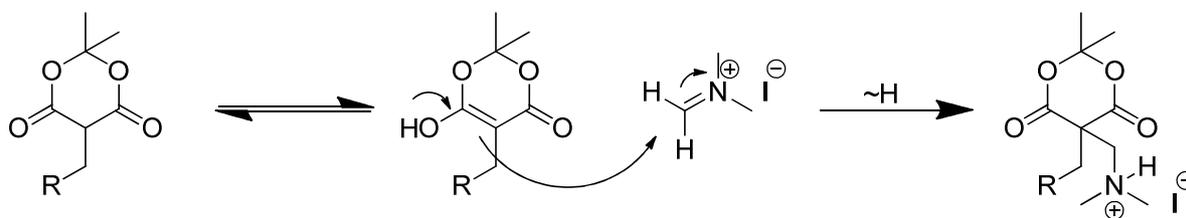


Abbildung 40: Mannich-Reaktion zwischen Meldrumsäure-Derivat und Eschenmoser-Salz

Ergebnisse und Diskussion

Als Lösungsmittel wurden wahlweise ein Gemisch aus *tert*-Butanol und THF oder reines Methanol verwendet. Die zweite ablaufende Reaktion war eine Cycloeliminierung der Meldrumsäure. Während dieser Reaktion entstand zum einen die *exo*-Methylengruppe und zum anderen, abhängig vom gewählten Alkohol, der entsprechende Ester (Abbildung 41).

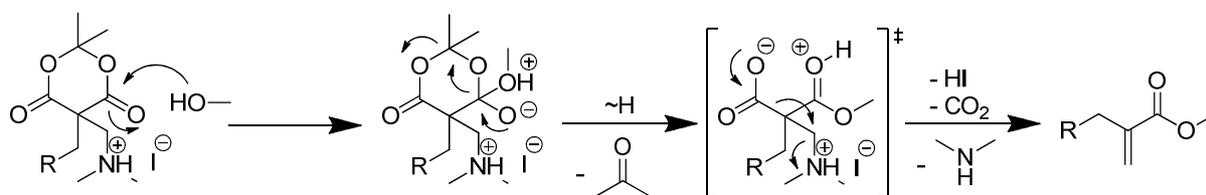
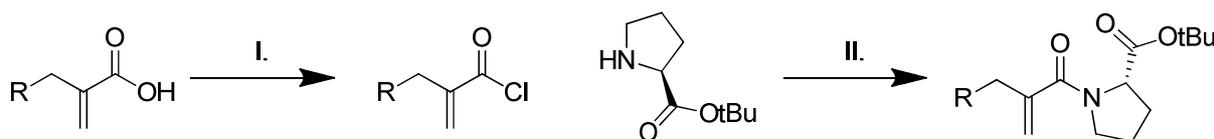


Abbildung 41: Vorgeschlagener Mechanismus zur Cycloeliminierung und Esterbildung, mit gleichzeitiger Ausbildung der C-C-Doppelbindung

Ein möglicher Reaktionsmechanismus wäre jener, dass die Meldrumsäure vom verwendeten Alkohol nucleophil angegriffen wird. Die ablaufende Umesterung führt zu einer Eliminierung von Aceton und anschließender Decarboxylierung. Die Reaktion wurde bei 75 °C durchgeführt. Dadurch wurden sowohl das Aceton dem Reaktionsgleichgewicht entzogen (Sdp. 56 °C) als auch die Decarboxylierung begünstigt. Eine weitere Triebkraft sollte die elektronenziehende Wirkung des Amins gewesen sein, welche seinerseits eine gute Abgangsgruppe war. Die guten Ausbeuten von Frost *et al.* konnten reproduziert, bei der Verwendung von Methanol sogar noch auf über 80 % verbessert werden.

Die anschließende Esterhydrolyse wurde in wässriger 1 M Natriumhydroxid-Lösung bei 100 °C unter Mikrowellenbestrahlung durchgeführt und lieferte sehr gute Ausbeuten.

Die Amidkupplung zwischen dem generierten Acrylsäure-Derivat und *L*-Prolin-*tert*-Butylester wurde ebenfalls unter Mikrowellenbestrahlung durchgeführt. Hierzu wurde die Säure vorab mit Thionylchlorid zum korrespondierendem Säurechlorid umgesetzt. Anschließend erfolgte die Kopplung zum Amid (Schema 8).



Schema 8: I.: 2.5 eq SOCl_2 , DCM, kat. DMF, 50 °C, 1 h; II.: 1.1 eq Amin, 3.0 eq DIPEA, 90 °C, μW , 1 h, 55-73 %.

Ergebnisse und Diskussion

Im folgenden Syntheseschritt wurde, unter Ausbildung eines Stereozentrums, die Thioacetat-Gruppe eingeführt. Dies erfolgte im Sinne einer Michael-Addition (Abbildung 42). Die besten Ausbeuten konnten erzielt werden, indem das Acrylamid-Derivat in einem zweihundert-fachen Überschuss an Thioessigsäure für 66 Stunden bei Raumtemperatur gerührt wurde (78-83 %).

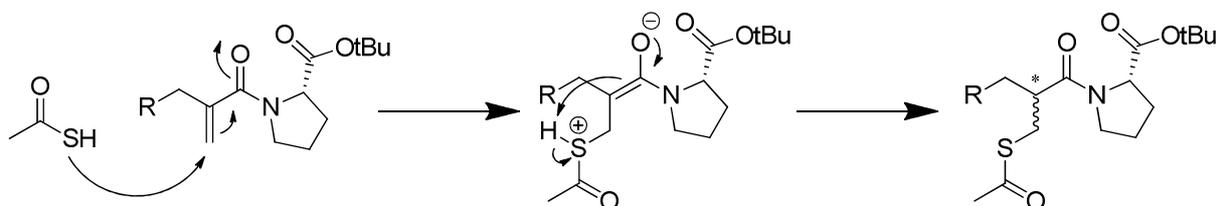


Abbildung 42: Mechanismus der Michael-Addition von Thioessigsäure

Die abschließende Hydrolyse der beiden Ester-Gruppen des Moleküls erfolgte analog zu den weiter oben beschriebenen Methoden.

4.1.13. Einführung einer basischen Funktion am Aromaten

Auf Grund einer Docking-Studie sollte am Phenylring der Verbindung DB320 noch ein Wasserstoffbrücken-Akzeptor eingeführt werden. Dies sollte die Ausbildung einer weiteren Wasserstoffbrücken-Bindung zwischen den MBLs und dem Inhibitor zur Folge haben. Als mögliche Substitutionen wurden ein primäres Amin und ein Triazol-Ring erwogen (Abbildung 43). Die im folgenden beschriebenen Arbeiten wurden von Daniel Kohnhäuser im Rahmen seines praktischen Jahres zur Zulassung zum dritten Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung durchgeführt.

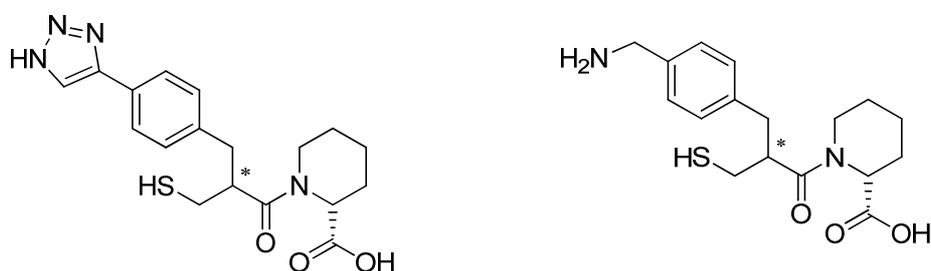


Abbildung 43: Derivate der Verbindung DB320: mit einem unsubstituierten Triazol in para-Position (DBDK58, l.) und einem Benzylamin, anstatt des Phenylrings (DBDK-Amin r.).

Als Edukt für die Synthese der Verbindung DBDK48 wurde 4-Ethynylbenzaldehyd verwendet. Dieses wurde, parallel zur oben beschriebenen Syntheserouten, in einer Knoevenagel-artigen Reaktion mit Meldrumsäure umgesetzt. Da unter saurer Katalyse kein Produkt isoliert werden konnte, wurde die Reaktion unter basischen Bedingungen durchgeführt. Als Base wurde DBU verwendet. Zusätzlich wurde CaCl_2 hinzugefügt, um das bei der Reaktion entstehende Wasser abzufangen. Dadurch konnten Ausbeuten von bis zu 96 % erreicht werden. Die anschließende Reduktion der Doppelbindung erfolgte wie oben beschrieben.

Bei der folgenden Umsetzung mit Eschenmoser-Salz, kam es zu einer unerwarteten Nebenreaktion. Neben der angestrebten Mannich-Reaktion mit anschließender Eliminierung, reagierte auch die Ethin-Gruppe mit dem Eschenmoser-Salz. Dabei kam es zu einer Substitution des Protons an der C-C-Dreifachbindung (Abbildung 44).

Um diese unerwünschte Nebenreaktion zu unterdrücken, wurde die Menge an Eschenmoser-Salz auf zwei Äquivalente reduziert. Hierdurch konnte der Anteil an Nebenprodukt deutlich reduziert werden. Allerdings sank auch die Ausbeute auf 39 %.

Ergebnisse und Diskussion

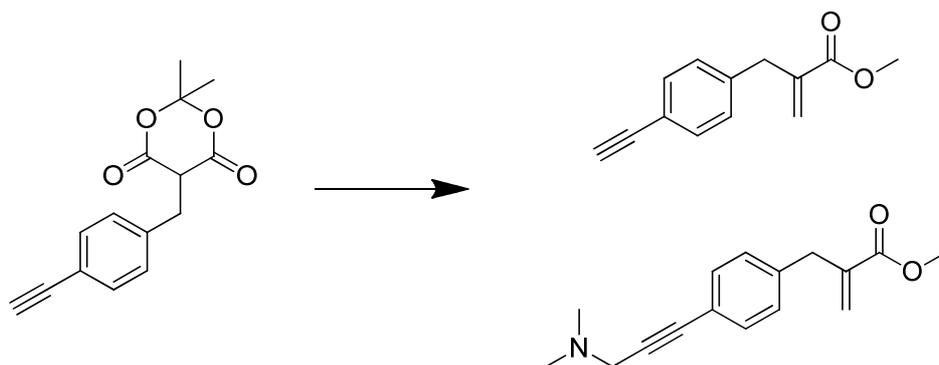
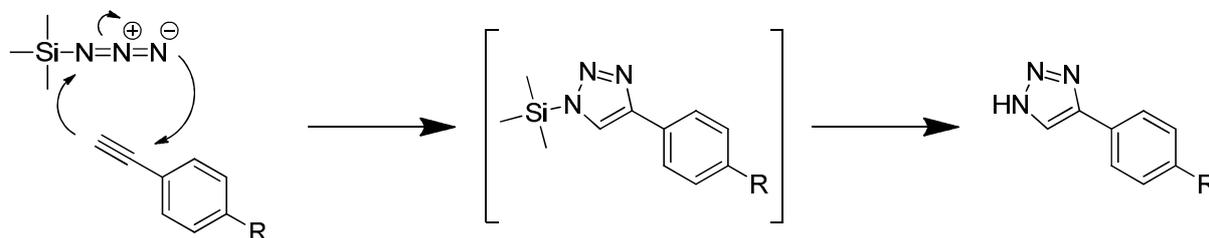


Abbildung 44: Produkt (o.) und Nebenprodukt (u.) der Reaktion von DBDK5 mit 3.5 eq Eschenmoser-Salz.

Die nachfolgende Esterhydrolyse, sowie die Amidkupplungen mit 2-Pipecolinsäure-*tert*-butylester wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

Der Aufbau des Triazols erfolgte durch die Umsetzung von Verbindung DBDK56 mit TMS-Azid. Die beiden Edukte reagierten nach dem Mechanismus einer Kupfer katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition (Schema 9).



Schema 9: Cycloaddition zwischen TMS-Azid und der Ethynylbindung am Aromaten. 1.5 eq Azid, 0.05 eq CuI, MeOH, DMF, Argon, 100 °C, 12 h, 60 %.

Das isolierte Produkt enthielt keine TMS-Schutzgruppe mehr. Ob diese bereits während der Reaktion, oder im Rahmen der Aufarbeitung abgespalten wurde, konnte nicht geklärt werden.

Die nachfolgende Addition von Thioessigsäure erfolgte wiederum nach dem oben beschriebenen Protokoll. Ebenso die Spaltung des *tert*-Butylesters mit TFA und die Hydrolyse des Thioesters mit wässriger Ammoniaklösung.

Die Aufreinigung der Endverbindung DBDK58 erwies sich als schwierig. Wie auch bei den früheren Derivaten, erbrachte eine Umkristallisation keinen Erfolg. Auch die Aufreinigung mittels präparativer HPLC führte nur zu einer Reinheit von 84 %.

Die Verbindung DBDK-Amin sollte, ausgehend von 4-Cyanobenzaldehyd, analog zur Syntheseroute von DBDK58 umgesetzt werden. Nach der Hydrolyse der beiden Esterfunktionen, sollte die Nitril-Gruppe zum primären Amin reduziert werden.

Während der Addition von Thioessigsäure an die terminale Doppelbindung der Acrylverbindung DBDK42 entstand neben dem gewünschten Thioester auch ein primäres Thioamid an Stelle der Cyano-Funktion (Abbildung 45).

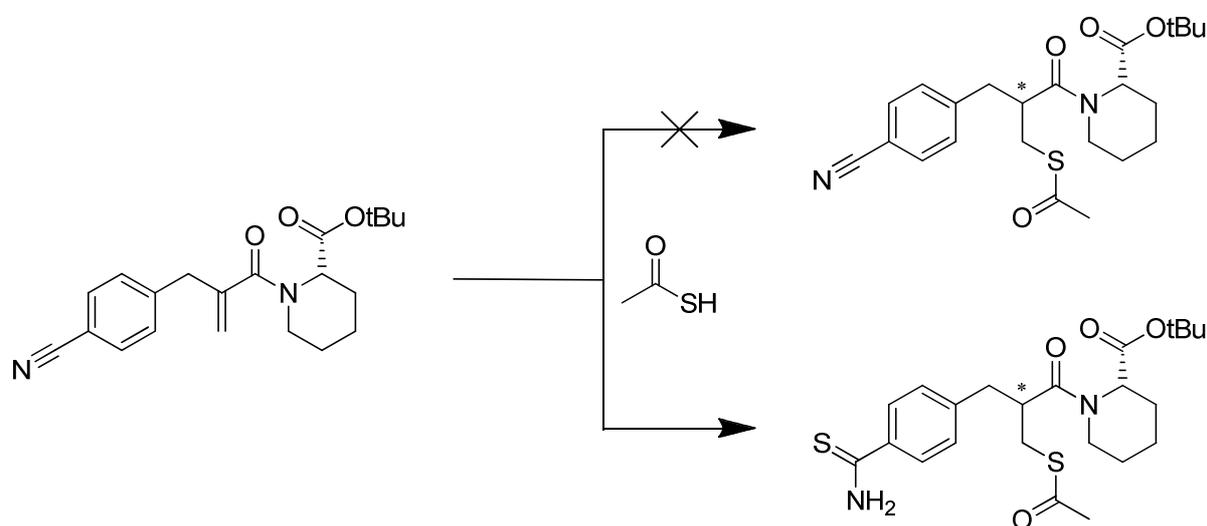
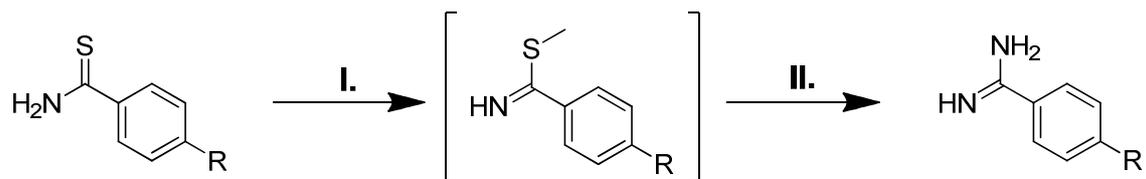


Abbildung 45: Nebenreaktion während der Addition von Thioessigsäure an DBDK42. Rechts oben das gewünschte Produkt, unten die erhaltene Struktur DBDK43.

Alternativ zur angestrebten Amin-Struktur, wurde beschlossen, das Thioamid zu einem Amidin umzusetzen. Dazu wurde das isolierte Thioamid in Methyl-*tert*-Butylether gelöst und mit 1.5 Äquivalenten Iodmethan versetzt. Das Zwischenprodukt wurde ohne weitere Aufarbeitung in Acetonitril gelöst und unter Einsatz von zwei Äquivalenten Ammoniumacetat konnte das Amidin erhalten werden (Schema 10).

Ergebnisse und Diskussion



Schema 10: Synthese des Benzamidin. I.: 1.5 eq Iodmethan, MTBE, R.T., 23 h; II.: 2 eq $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, ACN, R.T., 2 h.

Abweichend von der oben beschriebenen Methode wurde für die Hydrolyse des *tert*-Butylesters in diesem Fall 4 M HCl in Dioxan verwendet. Die Spaltung des Thioesters erfolgte wiederum mit 1 M wässriger Ammoniaklösung.

Das erhaltene Rohprodukt konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgereinigt werden.

4.2. Betrachtung der inhibitorischen Aktivitäten

In der vorliegenden Arbeit wurden, basierend auf der Leitstruktur von Captopril, verschiedene Inhibitoren für Metallo- β -Lactamasen synthetisiert (Abbildung 46).

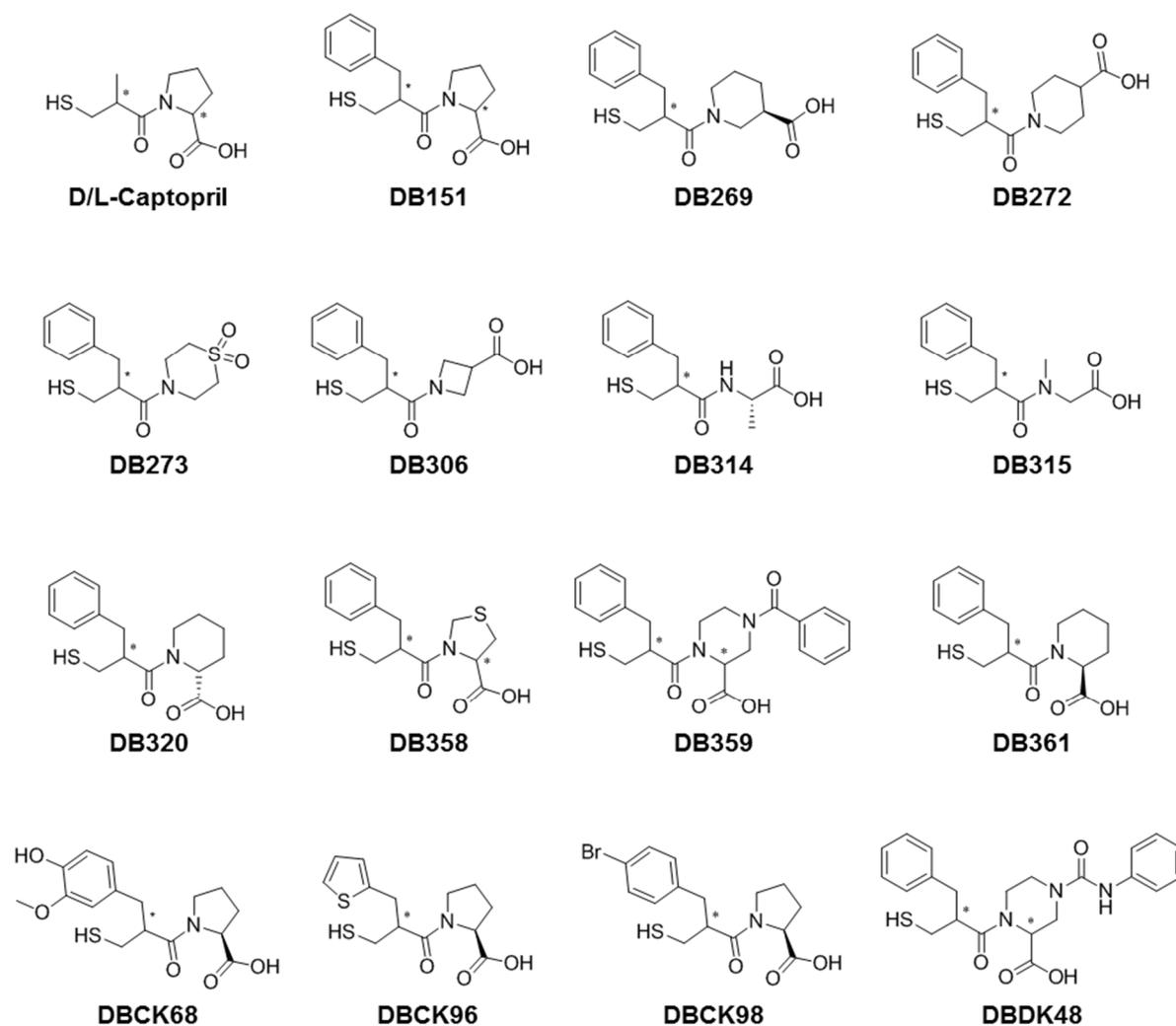


Abbildung 46: Übersicht der in dieser Arbeit synthetisierten und auf ihre Aktivität hin untersuchten Verbindungen.

Die synthetisierten Verbindungen wurden in einem *in vitro* Assay auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber den Metallo- β -Lactamasen NDM-1, VIM-1 und IMP-7 hin untersucht. Die ermittelten IC_{50} -Werte der jeweiligen Substanzen sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4 Übersicht der ermittelten IC_{50} -Werte gegen die einzelnen Lactamasen. Die Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen. Die einzelnen Werte wurden in Triplikaten gemessen.

	Konfig. ^a	NDM-1	VIM-1	IMP-7
DL-Captopril	R/S	6.4 ± 2.50 ^b	6.8 ± 1.20 ^b	2.9 ± 0.90 ^b
DB151	R/S	3.2 ± 0.29	16.3 ± 2.63	4.6 ± 0.17
DB269	R	1.6 ± 0.25	1.4 ± 0.16	2.2 ± 0.03
DB272	ac. ^c	1.8 ± 0.51	2.6 ± 0.32	1.6 ± 0.09
DB273	ac.	2.4 ± 0.51	2.9 ± 0.27	7.9 ± 0.48
DB306	ac.	2.2 ± 0.48	n.f. ^d	7.4 ± 1.06
DB314	S	1.7 ± 0.15	12.1 ± 1.48	6.1 ± 0.90
DB315	ac.	2.6 ± 0.71	4.9 ± 0.70	4.7 ± 0.79
DB320	R	0.7 ± 0.05	4.6 ± 0.85	0.9 ± 0.06
DB358	R/S	6.70 ± 0.57	16.2 ± 2.81	2.9 ± 0.27
DB359	R/S	2.5 ± 0.33	4.5 ± 0.69	0.3 ± 0.01
DB361	S	4.5 ± 0.95	4.9 ± 0.62	1.1 ± 0.06
DBCK68	S	25.2 ± 4.66	23.1 ± 2.37	30.4 ± 5.43
DBCK96	S	17.0 ± 1.09	6.8 ± 0.74	8.7 ± 1.73
DBCK98	S	6.2 ± 0.25	16.1 ± 4.20	7.7 ± 1.65
DBDK48	R/S	47.7 ± 9.48	7.0 ± 0.78	0.3 ± 0.25

^aKonfiguration am α -Kohlenstoff des Aminosäure-Rest, ^bKlingler et al., ^cachiral, ^dnicht feststellbar.

4.2.1. Substitutionen am westlichen Molekülteil - Teil 1

Die erste Substitution an der Captopril-Leitstruktur bestand in der Substitution der Methyl- durch die Benzylgruppe (Abbildung 47).

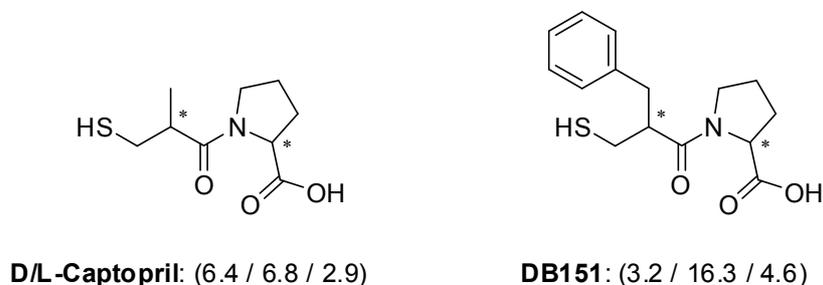


Abbildung 47: Captopril und DB151. In Klammern die jeweiligen IC_{50} -Werte in μM bezüglich (NDM-1 / VIM-1 / IMP-7).

Die hierdurch generierte Verbindung DB151 zeigte in einem *in vitro* Assay mit Captopril vergleichbare IC_{50} -Werte gegenüber den Metallo- β -Lactamasen NDM-1 und IMP-7. Die neu eingeführte Phenylgruppe scheint hier keinen nennenswerten Einfluss zu besitzen. Im Falle von VIM-1 jedoch verschlechtert sich der IC_{50} von 6.8 μM (Captopril) auf 16.3 μM .

In Abbildung 48 ist die Proteinoberfläche der Metallo- β -Lactamase NDM-1 in unmittelbarer Umgebung des aktiven Zentrums dargestellt.

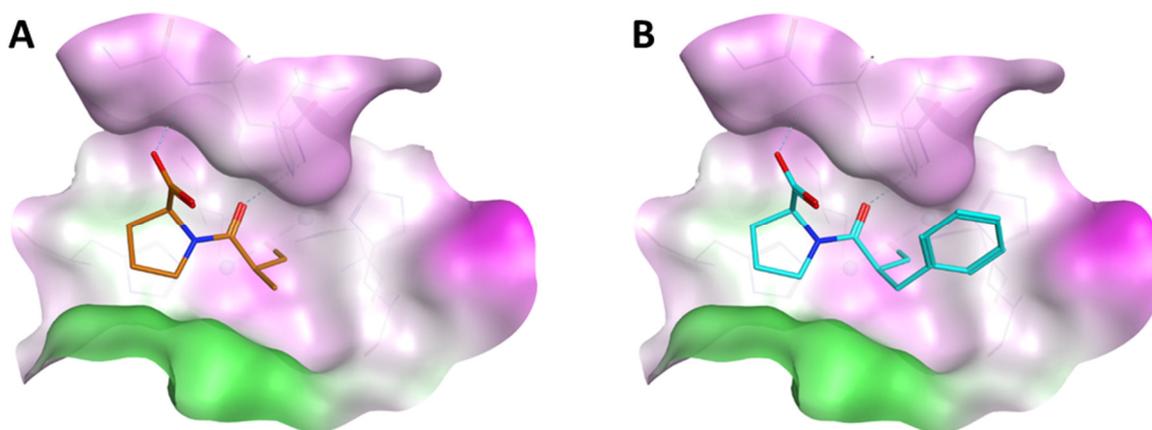


Abbildung 48: **A:** L-Captopril (orange) in der Bindetasche von NDM-1 (PDB: 4EXS) mit farbcodierter Darstellung der Proteinoberfläche (Grün: Hydrophob, Magenta: Hydrophil). Die Thiolgruppe (gelb) koordiniert die beiden Zink-(II)-Ionen. Die Säuregruppe bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Peptid-Rückgrat aus; der Sauerstoff der Amidbindung mit der Seitenkette von Asn220. **B:** Die simulierte Pose von DB151 (cyan).

Ergebnisse und Diskussion

Bei dem Liganden in der Bindetasche handelt es sich um *L*-Captopril. Die Methylgruppe der Verbindung ragt in dieser Pose weg vom Protein in Richtung Umgebung. Es ist ersichtlich, dass die Einführung einer Phenylgruppe an dieser Stelle zu keiner zusätzlichen Interaktion mit dem Protein führen sollte. Da sich Verbindung DB151 strukturell nicht weiter von Captopril unterscheidet, ist es nachvollziehbar, dass für diese beiden Inhibitoren vergleichbare IC_{50} -Werte gemessen werden.

Die Region um das katalytische Zentrum der Metallo- β -Lactamase IMP-7 unterscheidet sich gegenüber NDM-1 am deutlichsten durch die Aminosäure Trp46. Bedingt durch die aromatische Seitenkette dieser Aminosäure bildet die Proteinoberfläche an dieser Stelle eine tunnelförmige Bindetasche aus (Abbildung 49).

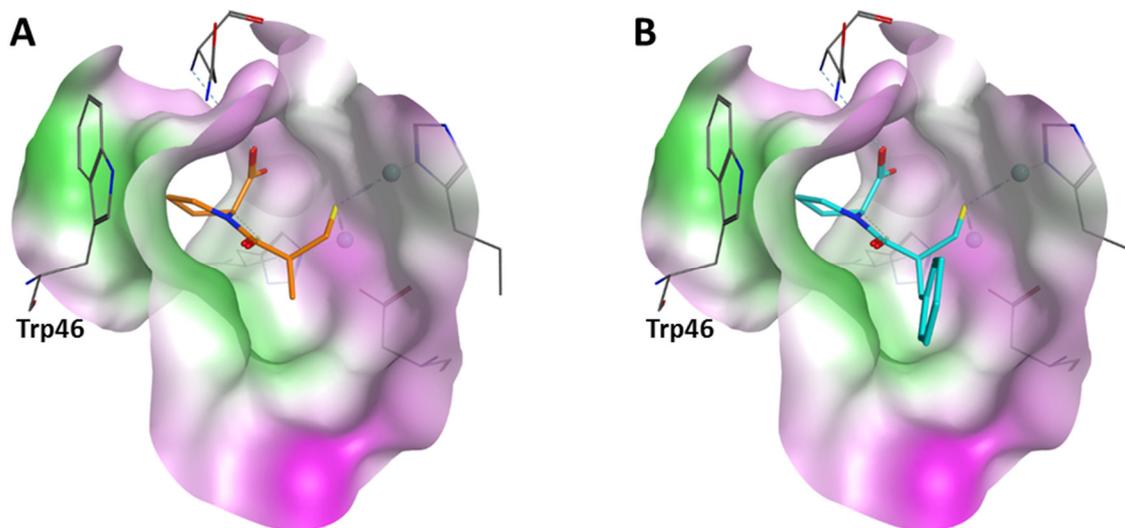


Abbildung 49: Die Binderegion der Metallo- β -Lactamase IMP-7. Die Seitenkette der Aminosäure Trp46 verengt das aktive Zentrum zu einem Tunnel. **A:** *L*-Captopril (PDB: 4C1F); Da von IMP-7 keine Kristallstruktur vorliegt, wurde die Struktur von IMP-1 herangezogen. Alle Aminosäuren, die sich in den beiden Mutanten voneinander unterscheiden, liegen mindestens 6 Å vom Liganden entfernt, was eventuelle direkte Wechselwirkungen mit dem Liganden ausschließen sollte; Grün: hydrophob, Magenta: hydrophil), **B:** Das *S*-Isomer von DB151.

Dennoch unterscheiden sich die IC_{50} -Werte der beiden Verbindungen Captopril und DB151 gegenüber IMP-7 ebenfalls kaum voneinander. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die neu eingeführte Phenylgruppe zu keinen repulsiven Wechselwirkungen führt.

Gegenüber der Metallo- β -Lactamase VIM-1 besteht ein deutlicher Unterschied zwischen den inhibitorischen Aktivitäten der beiden Verbindungen. Der IC_{50} -Wert von DB151 ist mit 16.3 μ M um etwa den Faktor 2.5 schlechter, als der von Captopril (6.8 μ M). Hier scheint die zusätzliche Phenylgruppe einen negativen Einfluss zu besitzen.

Da die MBL VIM-1 bislang noch nicht kristallisiert wurde, gestaltet sich eine genauere Begründung des Aktivitätsverlustes schwierig. Die MBL VIM-2 wurde mit dem Liganden *L*-Captopril co-kristallisiert. Die jeweiligen Aminosäuresequenzen der beiden Proteine unterscheiden sich in 15 Aminosäuren. Davon befindet sich keine Aminosäure in unmittelbarer Umgebung ($< 5 \text{ \AA}$) des Liganden. Dadurch kann angenommen werden, dass sich die Wechselwirkungen zwischen dem Liganden und den Enzymen im aktiven Zentrum der jeweiligen Mutante nicht sonderlich voneinander unterscheidet. Im Folgenden soll, aufbauend auf dieser Annahme, die Kristallstruktur von VIM-2 (PDB: 4C1D) als vergleichbar für die Struktur von VIM-1 gelten.

Betrachtet man die Kristallstruktur von VIM-2, fällt auf, dass die Carbonsäurefunktion am Pyrrolidinring von *L*-Captopril keine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Amid der Aminosäure Asn210 ausbildet. Dafür besteht eine solche Wechselwirkung zwischen Asn210 und dem Carbonyl-Sauerstoff der Amid-Bindung. Die Aktivität gegenüber VIM-1 verschlechtert sich durch die Einführung der Phenylgruppe von $6.8 \mu\text{M}$ (Captopril) auf $16.3 \mu\text{M}$ (DB151). Eine Erklärung hierfür könnten zwei Wassermoleküle sein, welche im aktiven Zentrum von VIM-2 koordiniert sind (Abbildung 50). Diese könnten vom Phenylring verdrängt werden, ohne dass eine neue energetisch positive Wechselwirkung zwischen Ligand und Protein ausgebildet wird.

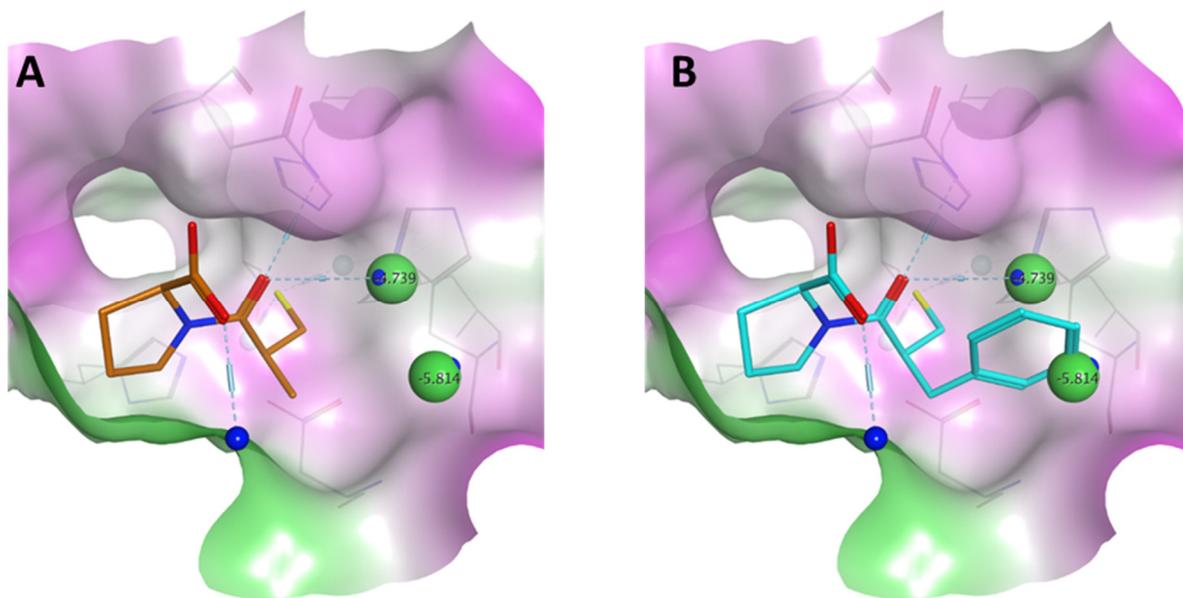


Abbildung 50: Darstellung des aktiven Zentrums von VIM-2. In Grün die untersuchten Wassermoleküle. Für die Untersuchung wurde das in MOE implementierte Lösungsmittelanalyse-Tool verwendet. Hierüber können die Aufenthaltsorte von Wassermoleküle vorhergesagt und die freie Energie (ΔG) dieses Wassers berechnet werden. Dabei ist es energetisch günstiger, Wassermoleküle mit einem positiven Beitrag ($\Delta G > 0$) zu ersetzen, als solche mit einem negativen Beitrag ($\Delta G > 0$). A: *L*-Captopril (orange) in der Binderegion der MBL VIM-2 (PDB: 4C1D). B: Simulation der Verbindung DB151 (cyan) in der VIM-2 Bindetasche.

4.2.2. Substitutionen am westlichen Molekülteil - Teil 2

Der nächste Schritt der Derivatisierung bestand in einer Variation der Phenylgruppe durch andere aromatische Teilstrukturen. Dabei wurden ein Vanillin-, und ein Thiophen-Rest, sowie ein *para*-Brom substituiertes Phenylring eingeführt (Abbildung 51). Gleichzeitig wurde durch die Verwendung von *L*-Prolin eine absolute Stereoinformation eingeführt.

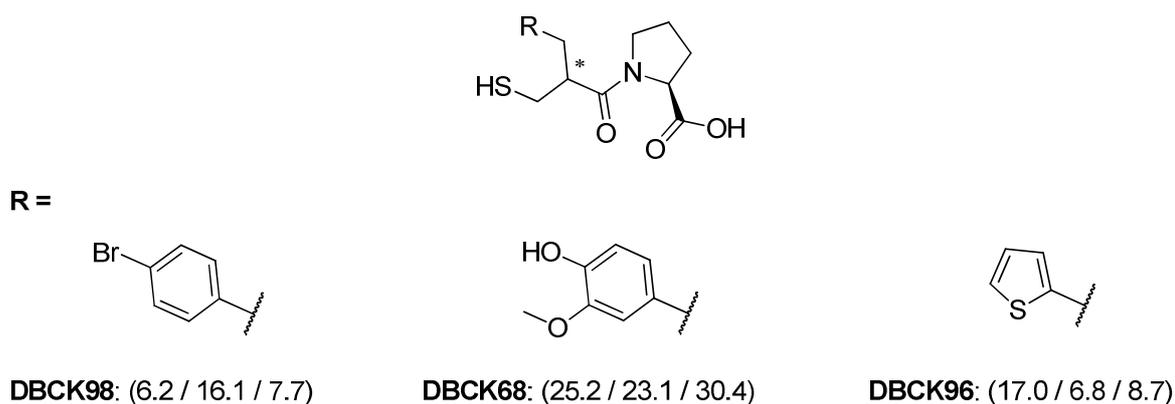


Abbildung 51: Die drei Derivate mit Substitutionen am Aromaten: Das *para*-Brom-Derivat, ein Vanillin-artiger Rest und ein Thiophenring (v.l.n.r). In Klammern die jeweiligen IC_{50} -Werte in μM bezüglich (NDM-1 / VIM-1 / IMP-7)

Die Verbindung DBCK98 unterscheidet sich in ihren IC_{50} -Werten kaum von der nicht bromierten Struktur DB151, obwohl das Brom-Atom deutlich größer und die C-Br-Bindung nahezu doppelt so groß wie die C-H-Bindungslänge ist.

Deutlich anders verhält es sich mit der Verbindung DBCK68. Die inhibitorische Leistung verschlechtert sich gegenüber allen untersuchten Metallo- β -Lactamasen. Die 2-Hydroxyanisol-Struktur von DBCK68 trägt eine Hydroxygruppe in *para*-Position und eine Methoxygruppe in *meta*-Position. Durch die Einführung dieser beiden Gruppen verschlechtert sich der IC_{50} -Wert gegenüber DB151 (3.2 μM) um etwa den Faktor acht auf 25.2 μM . Dieser Effekt könnte eventuell elektrostatische Gründe haben. Die Proteinoberfläche von NDM-1 ist im Bereich des phenolischen Hydroxylfunktion von DBCK68 negativ polarisiert. Da die Sauerstoffatome der neu eingeführten Substituenten ebenfalls negative Partialladungen tragen, könnte es hier zu energetisch ungünstigen elektrostatischen Wechselwirkungen (Abbildung 52).

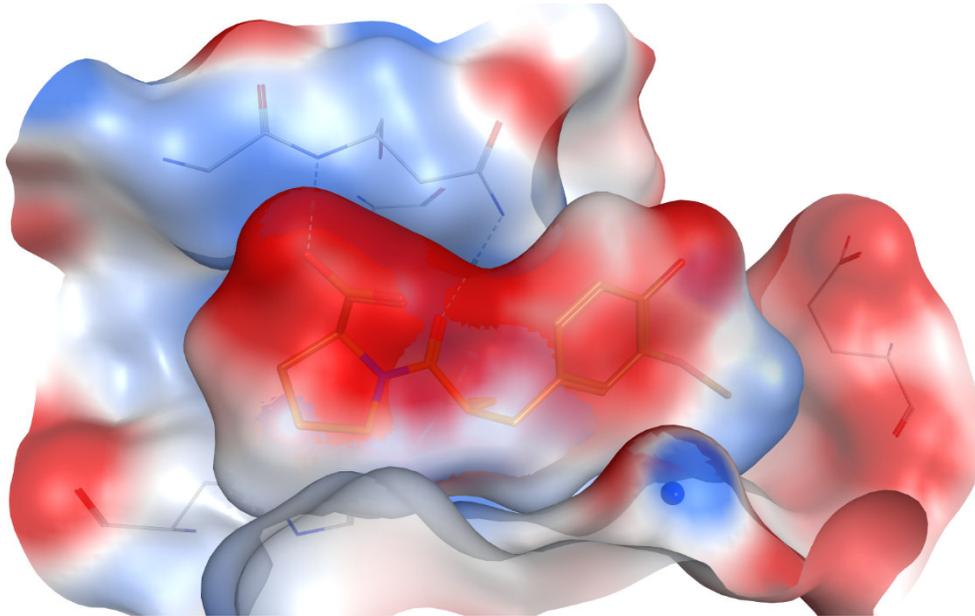


Abbildung 52: Docking der Verbindung DBCK68 in der NDM-1 Bindetasche (PDB: 4EXS; Elektrostatik der Proteinoberfläche: rot: negativ, blau: positiv, weiß: neutral).

Gegenüber IMP-7 zeigt DBCK68 einen IC_{50} -Wert von 30.4 μ M und ist damit deutlich weniger aktiv als Verbindung DB151 (4.6 μ M). Die genaue Ursache für diesen Aktivitätsverlust konnte nicht geklärt werden. Denkbare wäre, dass die beiden zusätzlichen Gruppen am Aromaten zu sterisch Hinderungen führen.

Im Vergleich mit DB151 zeigt DBCK68 eine nur leicht schwächere Aktivität (23.1 μ M) gegenüber VIM-1. Dies könnte ebenfalls mit der Verdrängung der koordinierten Wassermoleküle begründet werden (vgl. Abbildung 50).

Die Verbindung DBCK96 zeigt mit einem IC_{50} -Wert von 17.0 μ M ebenfalls eine verringerte Aktivität gegenüber NDM-1 als DB151. Das Molekül trägt anstelle eines substituierten Phenylrestes einen Thiophenring. Dieser ist rund um das Schwefelatom negativ polarisiert. Da der Aromat in einem Bereich liegt, in welchem die Proteinoberfläche teilweise ebenfalls negativ polarisiert ist. Dadurch könnte es hier, vergleichbar mit DBCK68, zu elektrostatischen Repulsionen kommen.

Das inhibitorische Potential der Verbindung DBCK96 unterscheidet sich gegenüber IMP-7 nur unwesentlich von denen der Verbindungen DB151 und DBCK98. Alle diese Derivate sind am Aromaten sterisch weniger anspruchsvoll, als DBCK68. Dies könnte dies ein weitere Hinweis darauf sein, dass im Falle von IMP-7 an dieser Position größere Reste nicht toleriert werden.

Interessant ist, dass DBCK96, verglichen DB151 und DBCK68/98 eine verbesserte Inhibition von VIM-1 zeigt. Der Thiophenring ist kleiner als ein Phenylring. Dies könnte dazu führen, dass die oben beschriebenen Wassermoleküle in diesem Fall nicht verdrängt werden.

Im Rahmen der hier beschriebenen Substitutionen zeigte das Derivat mit dem unsubstituierten Phenylring die beste inhibitorische Aktivität gegenüber allen untersuchten MBLs. Ein weiterer Vorteil dieser Teilstruktur besteht darin, dass sie synthetisch leicht zugänglich ist. Die Einführung größere aromatischer Teilstrukturen, sowie negative Partialladungen im Bereich des Aromaten werden an dieser Position nicht toleriert. Daher wurde Phenylrestest für die weiteren Synthesen beibehalten.

Da Phenylringe durch eine Hydroxylierung in *para*-Position metabolisiert werden können⁴², ist erstrebenswert, diese Position durch die Einführung eines Substituenten (z.B. ein Halogen) zu schützen. Da die in *para*-Position bromierte Verbindung DBCK98 ähnliche Aktivitäten zeigt, wäre es auf Grund der potentiell verbesserten metabolischen Stabilität denkbar, in einem fortgeschrittenen Stadium der Struktur-Wirkungsbeziehung-Studien auf das Bromphenyl-Derivat zurückzugreifen.

4.2.3. Derivate mit α -Aminosäurestruktur

Im Folgenden wurde der Prolinring durch unterschiedliche Aminosäuren substituiert. Der neu eingeführte Phenylring wurde dabei als Teilstruktur nicht mehr variiert. In diesem Kapitel sollen die Derivate betrachtet werden, bei denen die Säurefunktion in α -Position zur Amidgruppe steht (Abbildung 53).

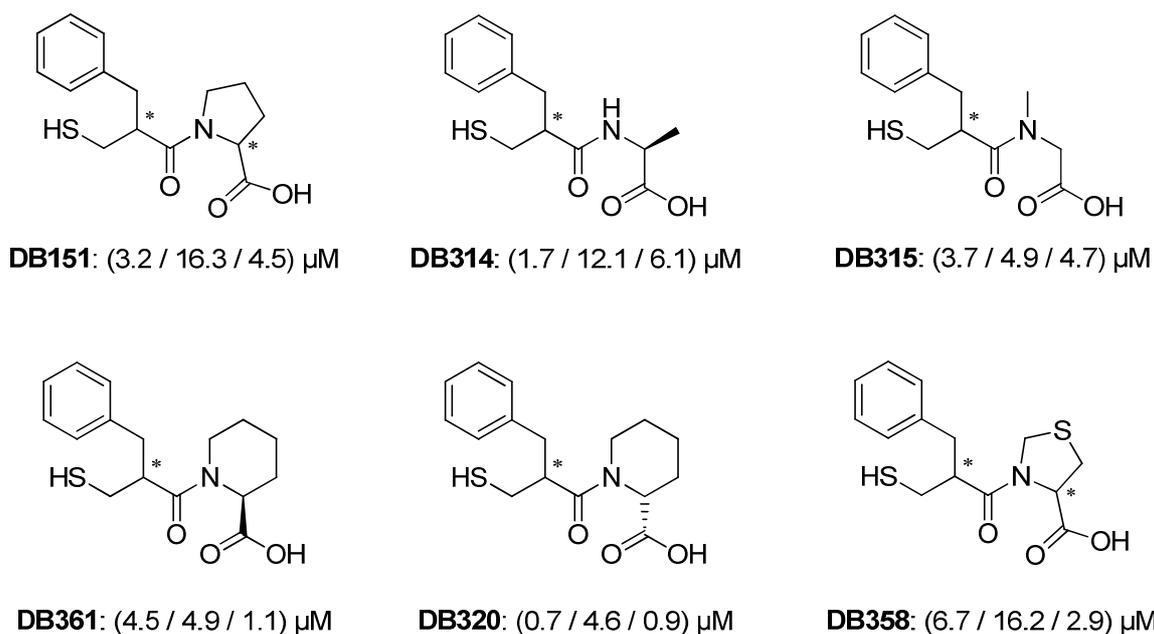


Abbildung 53: Die sechs Derivate mit der Säurefunktion in α -Position zur Amidgruppe. In Klammern die jeweiligen IC_{50} -Werte in μM bezüglich (NDM-1 / VIM-1 / IMP-7).

Gegenüber NDM-1 ist für die gezeigten Derivate nur eine geringe Varianz der IC_{50} -Werten zu beobachten gewesen. Sowohl die beiden nicht cyclischen Teilstrukturen (DB314, DB315), als auch ein weiteres Heteroatom im Fünfring (DB358) werden toleriert. Eine Verbesserung in den submikromolaren Bereich wird durch die Einführung eines Sechsrings mit *R*-konfiguriertem α -Kohlenstoff (DB320) erreicht. Betrachtet man Abbildung 48, erkennt man, dass die Proteinoberfläche um das aktive Zentrum herum in eine hydrophile (Magenta) und eine lipophile Region (grün) geteilt ist. Der unpolare Teil des Prolinringes kann mit der lipophilen Oberfläche interagieren. Die Verbindung DB320 ist auf Grund des Sechsrings etwas unpolarer als DB151. Hierdurch könnte es zu einer verstärkten hydrophoben Wechselwirkung zwischen Protein und Ligand kommen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die sesselförmige Konformation des Sechsrings die Bindetasche sterisch besser ausfüllt.

Vergleicht man die Stereochemie am α -Kohlenstoffes des Sechsrings der Verbindungen DB320 (*R*) und DB361 (*S*), wird deutlich, dass die absolute Konfiguration am α -Kohlenstoffes eine wichtige Rolle für die inhibitorische Potenz der Verbindung einnimmt. Der IC_{50} -Wert des *R*-Isomers DB320 ($0.7 \mu\text{M}$) ist etwa Sechsfaches niedriger, als der des *S*-Isomers DB361 ($4.5 \mu\text{M}$). Dieser Zusammenhang zwischen der absoluten Konfiguration und der Aktivität ist auch für die beiden Isomere von Captopril bekannt. Hier ist ebenfalls das *R*-Isomer (bzgl. des Fünfrings) deutlich aktiver (IC_{50} : $1.3 \mu\text{M}$), als das *S*-Isomer ($39.0 \mu\text{M}$).²⁴ Vergleicht man die Kristallstruktur des *R*-Isomers in der Bindetasche von NDM-1 (PDB: 4EXS) mit einer darauf basierenden Simulation der Pose des *S*-Isomers, kann man erkennen, dass die Säuregruppe jeweils unterschiedliche Wechselwirkungen eingeht (Abbildung 54).

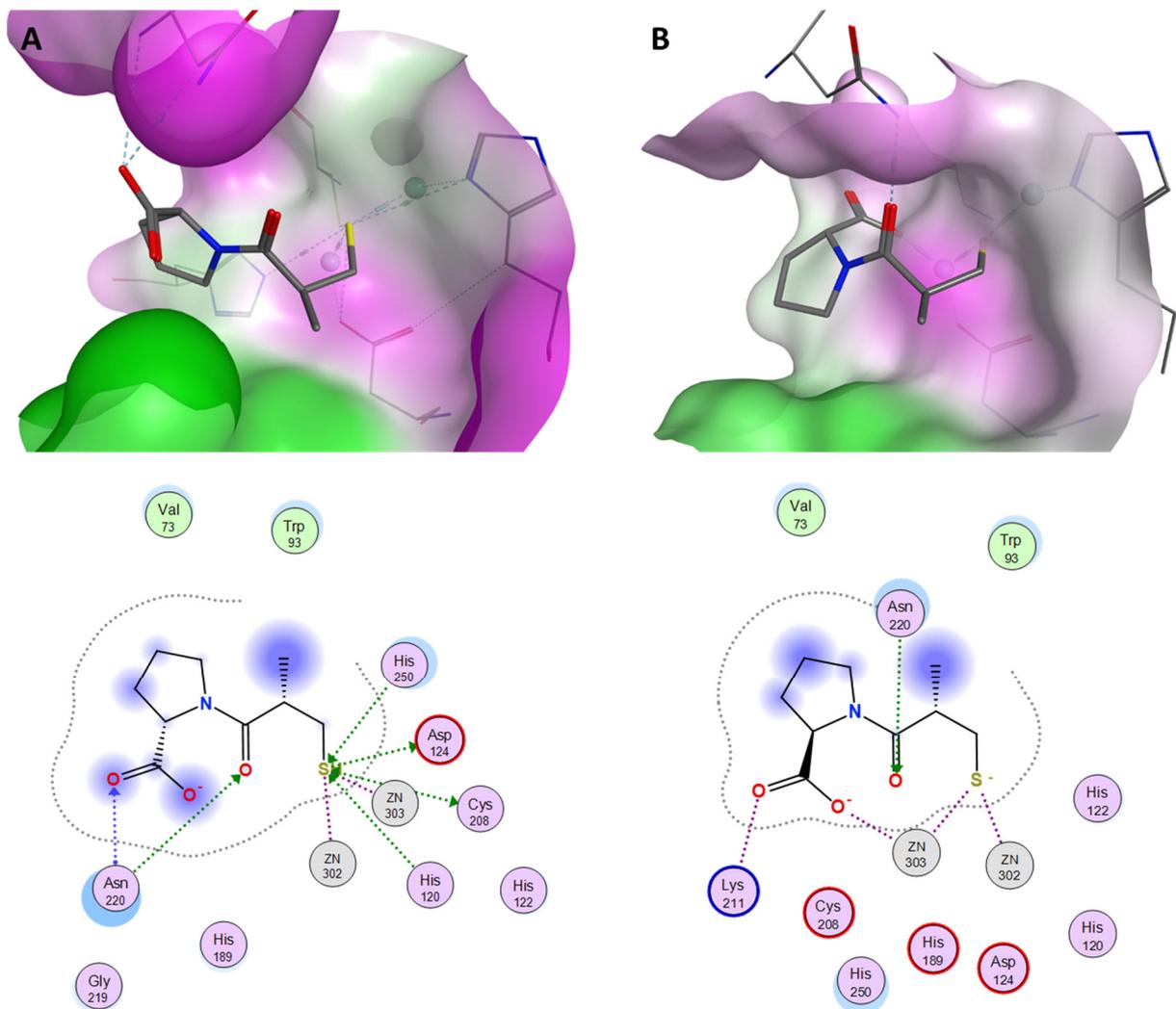


Abbildung 54: Die beiden Isomere von Captopril in der Bindetasche von NDM-1 (oben) und die entsprechende Interaktions-Karte (unten); A: (S,S)-Captopril (PDB: 4EXS); B: (R,S)-Captopril. Zur Abschätzung der Bindungsverhältnisse des *R*-Isomers, wurde die absolute Konfiguration der Säuregruppe, basierend auf der Kristallstruktur des *S*-Isomers, händig geändert und anschließend Energie minimiert.

In der bildlichen Darstellung und der Interaktions-Karte ist erkennbar, dass das *S*-konfigurierte Carboxylat (Abbildung 54, A) eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Backbone-Stickstoff von Asn220 ausbildet. Der Carboxysauerstoff kann mit der Seitenkette der Aminosäure Asn220 eine Wasserstoffbrückenbindung ausbilden. Im Falle des *R*-Isomers (Abbildung 54, B) geht die Wechselwirkung zwischen der Säurefunktion und Asn220 verloren. Dafür interagiert das Carboxylat mit einem der Zink-Ionen, wodurch dieses sowohl durch die Säurefunktion, als auch durch die Thiolgruppe koordiniert wird. Gleichzeitig kommt es zu einer Wechselwirkung mit Lys211. Da ionischen Interaktionen tendenziell energetisch stärker sind, als Wasserstoffbrückenbindungen,^{43,44} wäre dies eine Erklärung dafür, warum das *R*-Isomer von Captopril eine bessere Aktivität aufweist, als das *S*-Isomer.

Die oben beschriebenen Effekte könnten auch eine Erklärung für die unterschiedlichen Aktivitäten der Verbindungen DB320 und DB361 sein. Überträgt man die absolute Konfiguration am α -Kohlenstoff auf die Sesselkonformation des Sechsrings, so steht die Säurefunktion im *S*-konfigurierten DB361 in axialer und im Falle des *R*-konfigurierten DB320 in äquatorialer Position (Abbildung 55).

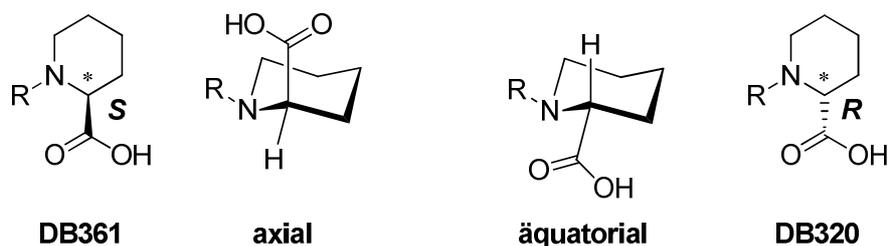


Abbildung 55: Die absolute Konfigurationen der Verbindungen DB361 und DB320 als Keilstrichformel (außen) und die Position der Carbonsäurefunktion in der Sesselkonformation (innen).

Durch die unterschiedliche räumliche Ausrichtung der Säurefunktion, wechselwirkt diese in der Binderegion mit unterschiedlichen Partnern. Um dies zu veranschaulichen wurde wiederum die Kristallstruktur von NDM-1 mit Captopril (PDB: 4EXS) herangezogen. Der Pyrrolidinring wurde gegen einen Piperidinring mit entsprechend konfigurierter Carbonsäure ausgetauscht und anschließend Energie minimiert (Abbildung 56).

In Abbildung 56 ist erkennbar, dass DB320 Wechselwirkungen eingehen sollte, die mit denen von *R*-Captopril (Abbildung 54, B) vergleichbar sind. Auch hier kommt es zu einem chelatisierenden Effekt der Carbonsäure und der Thiolgruppe am Zink-Ion, während DB361 stattdessen mit Asn220 interagieren sollte.

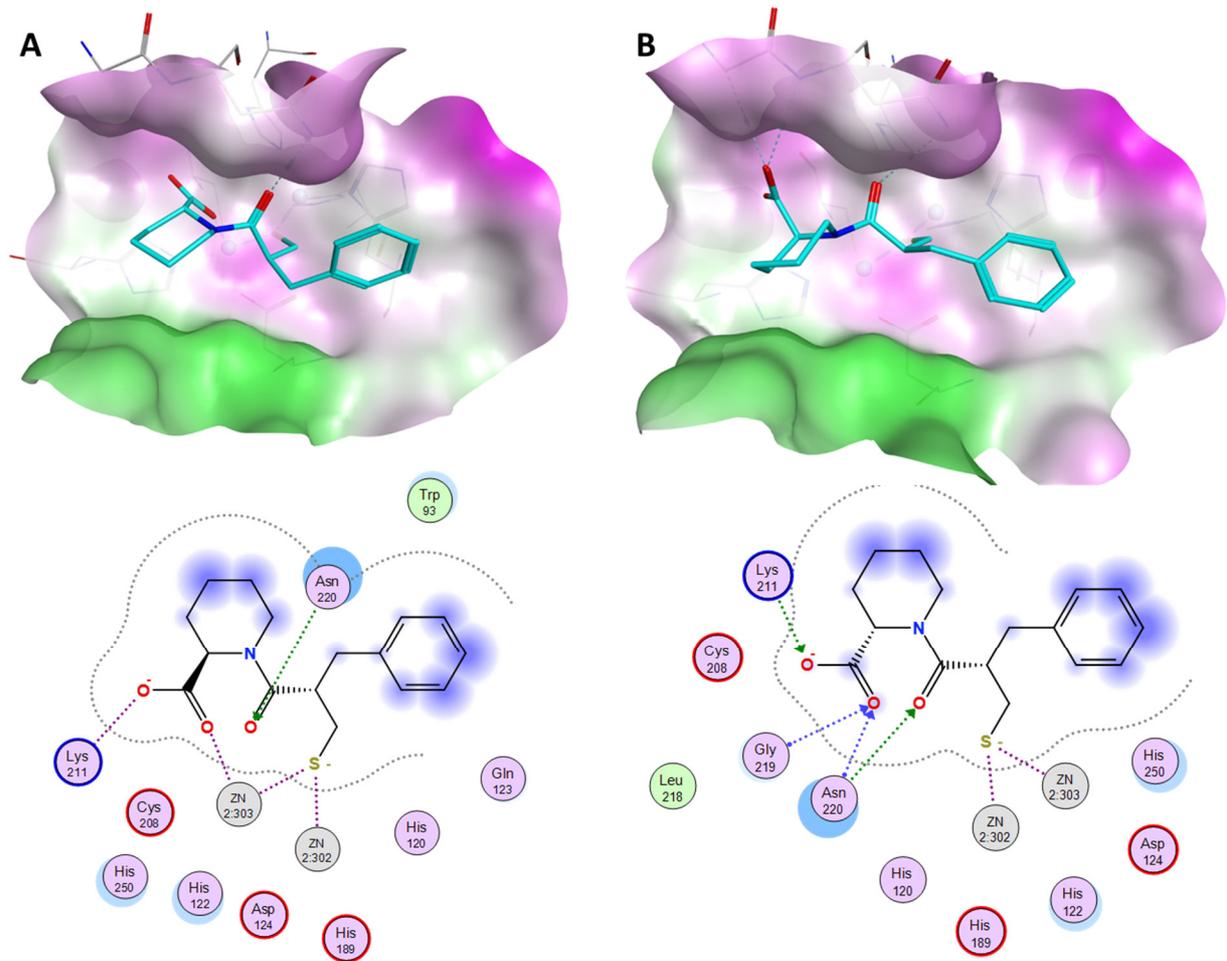


Abbildung 56: Die beiden Isomere DB320 und DB361 in der Bindetasche von NDM-1. **A:** Die R-konfigurierte Verbindung DB320 mit der Säuregruppe in äquatorialer Stellung und dem resultierenden Chelat-Effekt am Zink-Ion. **B:** Die Säure-Funktion des S-konfigurierten DB361 geht eine Wasserstoffbrückenbindung mit Asn220 ein.

Gegenüber IMP-7 ist es wiederum die Verbindungen DB320, sowie zusätzlich DB361, welche sich im Vergleich zu den anderen vier α -Carbonsäure-Derivate durch eine verbesserte Aktivität hervorheben. Interessant ist hierbei auch die Tatsache, dass die beiden Isomere, im Unterschied zu NDM-1, in diesem Fall eine nahezu gleiche inhibitorische Aktivität zeigen. Die für die Inhibition von NDM-1 entscheidende Stereochemie scheint hier keine Rolle zu spielen. Betrachtet man die Interaktionen, welche die beiden Liganden eingehen (Abbildung 57), wird deutlich, dass die Carbonsäurefunktion bei beiden Isomeren in der Lage sein könnte, eines der Zink-Ionen zu koordinieren. Dies bedeutet, dass es in beiden Fällen zum oben beschriebenen chelatisierenden Effekt kommen kann. Dies könnte erklären, warum die absolute Konfiguration an dieser Stelle von nicht so großer Relevanz ist, wie im Falle von NDM-1.

Ergebnisse und Diskussion

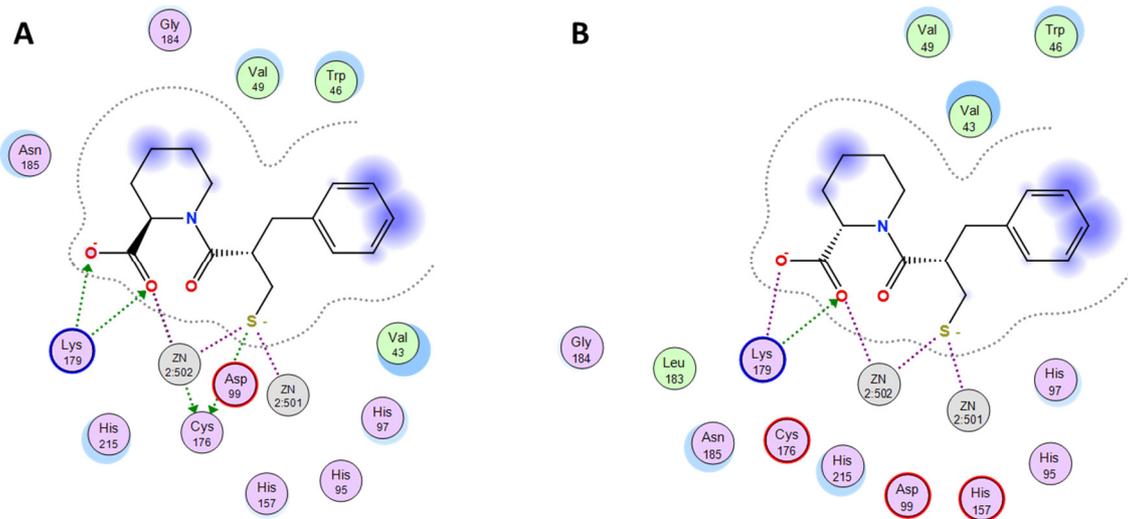


Abbildung 57: Simulation der Liganden-Interaktions-Karten von DB320 (A) und DB361 (B) im aktiven Zentrum von IMP-7.

Zusätzlich zur Koordination des Zink-Ions, kommt es in beiden Fällen zu einer Wechselwirkung zwischen der Säurefunktion und dem Aminosäurerest Lys179.

Die Einführung der Phenylgruppe (DB151) hatte gegenüber VIM-1 eine Verschlechterung des IC_{50} -Wertes zur Folge. Dieser Trend blieb auch bei den Verbindungen DB358 (IC_{50} : 16.2 μ M) und DB314 (12.1 μ M) erhalten. Die Inhibitoren DB320 und DB361 zeigen auch gegenüber VIM-1 eine bessere Inhibition (4.6 μ M, bzw. 4.9 μ M) als die oben genannten Strukturen. Dies könnte auch hier wieder auf den höheren unpolaren Anteil der Heterocyclen und der damit einhergehend verstärkten hydrophoben Wechselwirkung am aktiven Zentrums zurück zu führen sein. Die Rolle der Stereochemie scheint in diesem Fall jedoch nicht so ausgeprägt zu sein, wie bei NDM-1.

Interessant ist die Tatsache, dass auch die Verbindung DB315 einen vergleichsweise guten IC_{50} -Wert (4.9 μ M) gegenüber VIM-1 zeigt. Diese Verbindung besitzt keine nennenswerte unpolare Teilstruktur und keine stereochemische Information am α -Kohlenstoff des Glycinrestes. Da sich an diesem Kohlenstoff keine weiteren Reste, oder gar Ringstrukturen befinden, dürfte hier eine nur sehr geringe energetische Rotationsbarriere vorliegen, was wiederum eine hohe Beweglichkeit der Säurefunktion zur Folge hat. Dadurch könnte die Säuregruppe eine entsprechende Wechselwirkung eingehen, ohne einen anderen Substituenten (vgl. die Methylgruppe von DB314) in eine gegebenenfalls ungünstigere Position zu zwingen.

4.2.4. Derivate mit nicht α -Aminosäurestrukturen

Im Folgenden werden jene Derivate beschrieben, deren Säurefunktion nicht in α -Position zur Amidbindung stehen (Abbildung 58). Es ist auffällig, dass die absolute Position der Säurefunktion am Sechsring keinen entscheidenden Einfluss auf die Aktivitäten zu haben scheint. Gegenüber NDM-1 gibt es keine signifikanten Unterschiede in den IC_{50} -Werten. Die Säuregruppe wird am Sechsring in allen Positionen toleriert. Das S-konfigurierte Isomer zu Verbindung DB269 war nicht zugänglich, wäre jedoch für eine weitere Interpretation der Rolle der Stereochemie von Interesse. Betrachtet man die beiden möglichen Isomere wiederum, wie oben beschrieben, basierend auf der Kristallstruktur von Captopril und NDM-1, könnte die Säurefunktion von DB269 eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Seitenkette der Aminosäure Lys211 ausbilden.

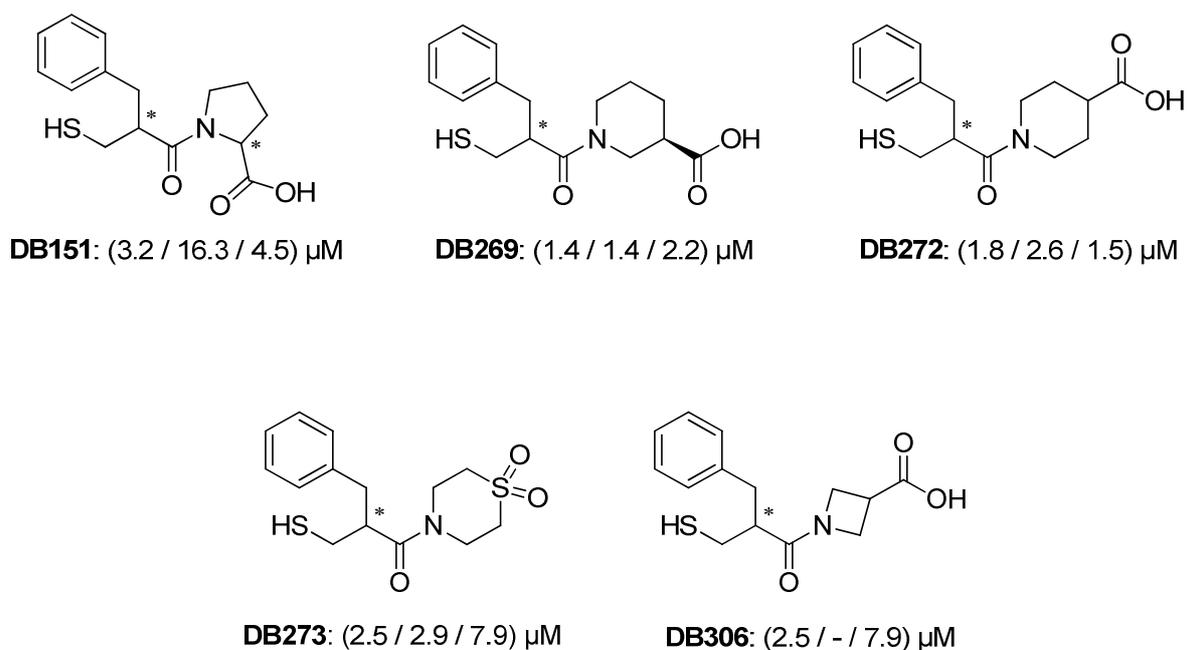


Abbildung 58: Die Derivate, deren Säurefunktion nicht in α -Position zur Amidgruppe steht, bzw. welche über eine bioisostere Gruppe zur Carbonsäure verfügen. In Klammern die jeweiligen IC_{50} -Werte bezüglich (NDM-1 / VIM-1 / IMP-7). Für DB306 konnte keine inhibitorische Aktivität gegenüber VIM-1 festgestellt werden.

Die Verbindung DB272 trägt am Piperidinring kein Stereozentrum. Die Säurefunktion kann dennoch in axialer oder äquatorialer Position stehen. Die oben beschrieben computergestützte Simulation erlaubt für keine der beiden Konformationen eine Interaktion der Carbonsäure mit dem Zink-Ion. Allerdings sollte im Falle einer äquatorialen Position der Säure eine Wasserstoffbrückenbindung mit der

Aminosäure Lys211 möglich sein. Diese Wechselwirkung wäre auch für Verbindung DB273, mit der zur Carbonsäure bioisostere Sulfongruppe denkbar.

Die Verbindung DB306 unterscheidet sich in ihrer Aktivität nicht von den bis hier beschriebenen Derivaten. Auch hier könnte es mit einer axial positionierten Säurefunktion zur Chelatisierung kommen, allerdings wiederum zum Preis der energetisch ungünstigen, intramolekularen sterischen Repulsion.

Eine tendenziell erhöhte Inhibition gegenüber IMP-7 zeigen die Verbindungen DB269 und DB272. Dies erscheint insofern unerwartet, da keine der beiden Strukturen ist, im Rahmen einer Simulation, in der Lage, über ihre Säurefunktion eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Aminosäure Lys179 auszubilden (vgl. Abbildung 57). Vielmehr scheint es in beiden Fällen wieder zur Wechselwirkung zwischen der Amidgruppe des Liganden und der Seitenkette der Aminosäure Asn185 zu kommen. Diese Interaktionen könnten eine Erklärung für die sehr ähnlichen IC_{50} -Werte der Verbindungen sein. Die etwas verbesserte Aktivität im Vergleich zu den Verbindungen DB273 und DB306 könnte auf den wiederum höheren apolaren Anteil der cyclischen Teilstruktur zurückzuführen sein. Dieser ist bei der Vierring-Struktur (DB306) kleiner, als bei einem Sechsring. Durch die raumgreifende, in den Ring integrierte Sulfongruppe wird die Ringstruktur der Verbindung DB273 ebenfalls deutlich polarer als die anderen Sechsringderivate.

Die Derivate DB273 und DB306 zeigen gegenüber IMP-7 die gleiche Inhibition. Wie bei allen beschriebenen Derivaten, koordiniert wahrscheinlich auch in diesen Fällen die Thiolgruppe mit den beiden Zink-Ionen im aktiven Zentrum der MBL. Zusätzlich kommt es bei der Verbindung DB306 noch zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen Lys179 des Preoteins IMP-7 und der Carbonsäurefunktion des Inhibitors. Diese Wechselwirkung fehlt jedoch beim Liganden DB273, welche eine zur Carbonsäure bioisostere Sulfongruppe trägt. Im Unterschied zu DB306 deutet die Simulation hier allerdings auf eine Wechselwirkung zwischen dem Carbonylkohlenstoff der Amidbindung und der Aminosäure Asn185 hin. Des Weiteren ist der unpolare Anteil am Sechsring deutlich höher und folglich die Wechselwirkung mit dem hydrophoben Teil der Binderegion stärker ausgeprägt, als im Falle des kleineren Azetidinringes der Verbindung DB306.

Die Verbindung DB306 zeigt gegenüber VIM-1 bis zu einer Konzentration von 50 μ M keine messbare Aktivität. Für die anderen drei Derivate wurden untereinander vergleichbare IC_{50} -Werte ermittelt. Dies deutet darauf hin, dass, ähnlich wie bei NDM-1, die Position der Carbonsäurefunktion am Sechsring nicht maßgeblich zu sein scheint. Allerdings zeigen alle in Abbildung 58 gezeigten Piperidin-Derivate im Vergleich mit DB151 eine höhere Inhibition.

4.2.5. Derivate mit Piperazinstruktur

Die Variation der Heterocyclen zeigt, dass verschiedene Ringgrößen toleriert werden. Dies eröffnet die Möglichkeit, an dieser Stelle des Moleküls weitere Reste einzuführen. Die Verbindungen mit den höchsten inhibitorischen Potential, DB320 und DB361, tragen beide einen Piperidinring mit einer Säurefunktion in Position zwei. Daher wurde für die weiteren Substitutionen jene Grundstruktur verwendet. Das Piperidingerüst wurde durch einen Piperazinring ersetzt, über dessen Stickstoffatom in Position vier weitere Reste eingeführt werden können (Abbildung 59).

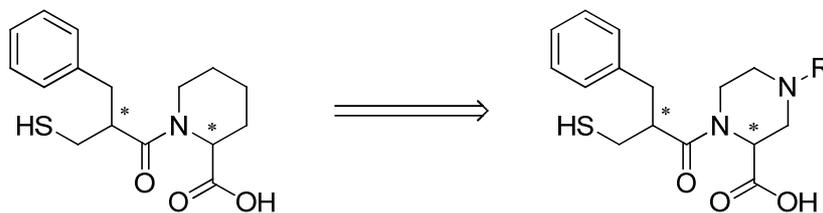


Abbildung 59: Das Grundgerüst der potentesten Inhibitoren DB320 und DB361 mit Piperidinring (l.) und die darauf basierende Derivatisierung mit einem Piperazinring (r.).

Es konnten zwei Piperazin-Derivate synthetisiert und erfolgreich aufgereinigt werden. Diese tragen am Stickstoff in Position 4 einen Benzoyl- (DB359), bzw. einem Anilid-Rest (DBDK48, Abbildung 60).

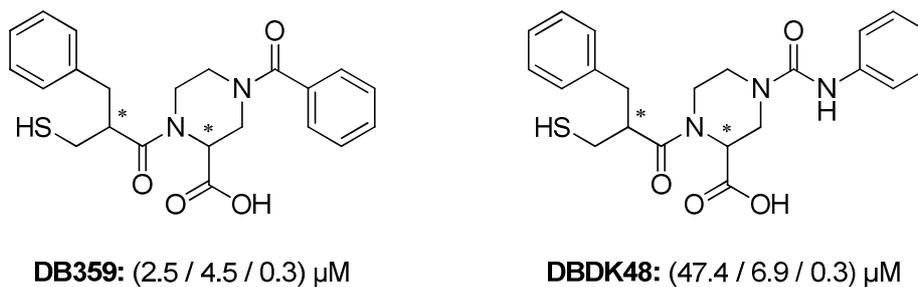


Abbildung 60: Die beiden Piperazin-Derivate In Klammern die jeweiligen IC_{50} -Werte bezüglich (NDM-1 / VIM-1 / IMP-7).

Der IC_{50} -Wert der Verbindung DB359 gegenüber NDM-1 liegt zwischen denen von DB320 und DB361. Wie bereits oben gezeigt, ist die Stereochemie am α -Kohlenstoff im Falle von NDM-1 für die Aktivität des Inhibitors von hoher Bedeutung. Aus Kostengründen wurde für die Etablierung der Synthesen der

Piperazin-Derivate zuerst auf ein racemisches Ausgangsedukt zurückgegriffen. Die eingeführte Benzoylgruppe scheint keinen negativen Effekt zu haben. Die Computersimulation deutet vielmehr darauf hin, dass die für DB320 beschriebenen Wechselwirkungen (Abbildung 56) im Falle des *S*-Isomers noch um eine weitere Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Carbonylsauerstoff der Benzoylgruppe und der Aminosäure Lys211 ergänzt werden könnte. Für ein *R*-Isomer wird diese Wechselwirkung nicht vorhergesagt. Unabhängig von der Simulation, sprechen die Assay-Daten dafür, dass die Einführung der Benzoylgruppe keinen negativen Einfluss auf die Inhibition von NDM-1 zur Folge hat. Allerdings wäre hier die Untersuchung einer stereochemisch reinen Struktur von hohem Interesse, da der IC_{50} -Wert dadurch noch einmal verbessert werden sollte.

Das inhibitorische Potenzial gegenüber IMP-7 verbessert sich im Vergleich mit Verbindung DB320 um den Faktor drei. Ein Grund für diese Verbesserung ist nicht direkt ersichtlich. Die Metallo- β -Lactamase VIM-1 wird durch DB359 in gleichem Maße inhibiert, wie auch durch die beiden Verbindungen DB320, bzw. DB361. Dies zeigt, dass eine Benzoylgruppe in dieser Position toleriert wird. Darauf aufbauend könnte die SAR durch weitere Substitutionen an dieser Stelle erweitert werden.

Die Verbindung DBDK48 trägt statt der Benzoylgruppe ein Phenylcarbamidrest. Diese Teilstruktur wird im Falle von VIM-1 und IMP-7 toleriert und führt zu vergleichbaren Inhibitionswerten (7.0 μ M, bzw. 0.3 μ M). Gegenüber NDM-1 kommt es allerdings zu einem signifikanten Aktivitätsverlust. Durch die Einführung der Harnstoffgruppe verschlechtert sich der IC_{50} -Wert um rund das zwanzigfache auf 47.7 μ M. Auf Basis der Computersimulation lässt sich vermuten, dass es durch die rigide Strukturvorgabe der Harnstoffgruppe zu sterischen Repulsionen zwischen dem phenylischen Stickstoff und der Seitenkette der Aminosäure His250 kommt. Im Falle des entsprechenden *trans*-Isomers der Verbindung DBDK48, würde die Phenylgruppe direkt in die Proteinoberfläche ragen.

In der Summe scheint die Einführung des Piperazinringes ein lohnender Schritt gewesen zu sein. Die Erweiterung der Molekülstruktur in diese Richtung wird prinzipiell toleriert und verbessert gegenüber IMP-7 die inhibitorische Aktivität.

4.2.6. Substitutionen am westlichen Molekülteil - Teil 3

Eine weitere Überlegung bestand darin, am Phenylring der Verbindung DB320 einen Rest einzuführen, welcher in der Lage ist, Wasserstoffbrücken auszubilden. Eine solche Gruppe sollte in der Lage sein, gegenüber NDM-1 mit der Säurefunktion der Seitenketten der Aminosäuren Glu152 zu wechselwirken (Abbildung 61). Der Abstand zwischen dem Phenylring und der Säurefunktion von Glu152 sollte laut der Simulation etwa 3.6 Å betragen. Eine am Ring eingeführter Aminogruppe zum Beispiel, sollte folglich eine Wasserstoffbrückenbindung mit Glu152 ausbilden können.

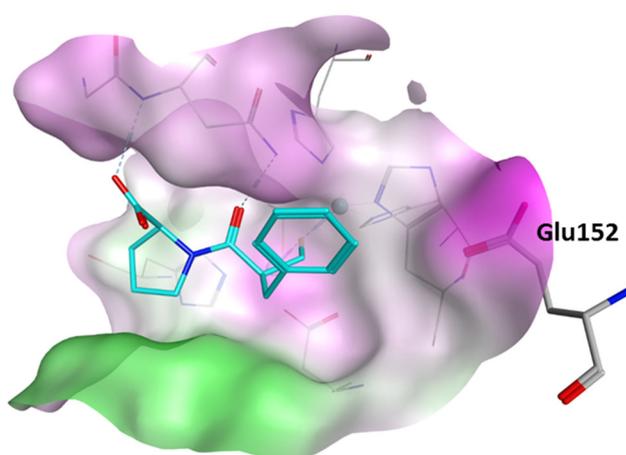


Abbildung 61: Simulation der Verbindung DB151 in der Bindetasche von NDM-1 (basierend auf der PDB: 4EXS).

Wie beschrieben, konnte hiervon allerdings nur das Triazol-Derivat (DBDK58, Abbildung 62) isoliert werden. Die erhaltene Gesamtmenge war sehr gering und nur zu 84 % rein. Auf Grund dieser Umstände konnte Verbindung DBDK58 nur auf die MBL VIM-1, und dort nur mit N = 2 getestet werden, womit die hier gezeigten Werte nur bedingt aussagekräftig sind.

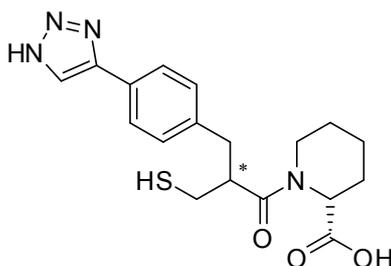


Abbildung 62: Struktur der Verbindung DBDK58.

Ergebnisse und Diskussion

Nichts desto trotz, dürfen diese ersten Ergebnisse als vielversprechend gelten. Der IC_{50} -Wert der Verbindung liegt nach zwei Messungen bei $0.1 \mu\text{M}$ und scheint damit gegenüber VIM-1 deutlich potenter zu sein, als alle anderen hier synthetisierten Verbindungen.

Im Rahmen einer Computersimulation, basierend auf der Kristallstruktur von VIM-2 mit *L*-Captopril (PDB: 4C1D), ist zu erkennen, dass der neu eingeführte Triazolring mit einer der oben genannten Säuregruppen (hier: Glu146) interagieren könnte, was die deutlich verbesserte Aktivität erklären könnte. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass für eine endgültigere Aussage eine Reinheit von größer 95 % vorliegen sollte.

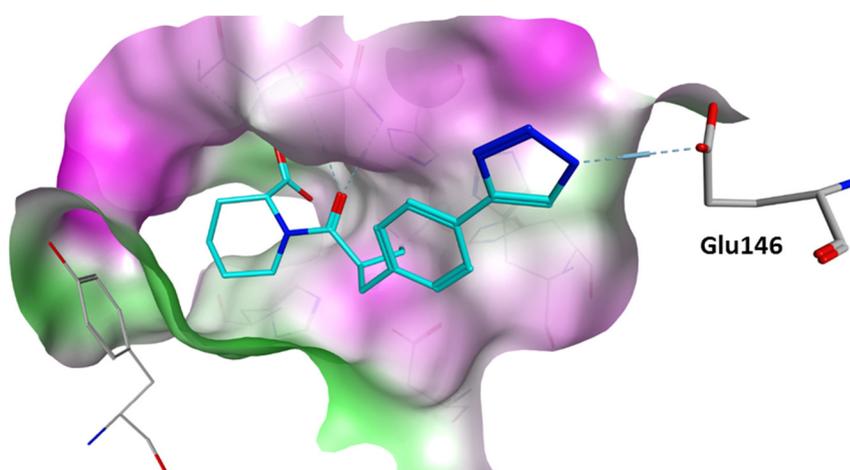


Abbildung 63: Simulation der Pose von Verbindung DBDK58 in der Bindetasche von VIM-2 (basierend auf der in Kapitel 4.3 gezeigten Kristallstruktur).

4.2.7. Untersuchung der Aktivität gegenüber der Mutante VIM-2

Wie weiter unten beschrieben (s. Kapitel 4.3, konnte die Verbindung DB320 mit der Metallo- β -Lactamase VIM-2 co-kristallisiert werden. Für die Bestimmung der IC_{50} -Werte der Inhibitoren wurde allerdings die, bis dahin ausschließlich verfügbare, Mutante VIM-1 verwendet. Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Mutationen von VIM-1 zu VIM-2 auf die Aktivität der Verbindungen haben wurden die Strukturen DB151, DB320 und DBDK48 auch gegen VIM-2 getestet.

Tabelle 5: Vergleich der IC_{50} -Werte [μM] der Verbindungen DB151, DB320 und DBDK48 gegenüber den beiden Mutanten VIM-1 und VIM-2.

	VIM-1	VIM-2
DB151	16.3 \pm 2.63	13.7 \pm 8.30
DB320	4.6 \pm 0.85	0.3 \pm 0.09
DBDK48	7.0 \pm 0.78	0.2 \pm 0.12

Die Aktivitäten von DB151 unterscheiden sich, unabhängig von der Mutante, nicht voneinander. Für die beiden anderen Verbindungen gibt es allerdings einen deutlichen Unterschied. Der IC_{50} -Wert der Verbindung DB320 verbessert sich signifikant um den Faktor 20 (Tabelle 5). Verbindung DBDK48 zeigt für die VIM-2-Mutante ebenfalls eine deutlich gesteigerte inhibitorische Aktivität (0.2 μM). Dies könnte auf die zusätzliche Wasserstoff-Brückenbindung zwischen der Seitenkette der Aminosäure Arg205 und dem Carbonyl-Sauerstoff der Harnstoff-Funktion zurück zu führen sein. VIM-1 trägt an dieser Position statt des Arginins ein Serin, welches die oben beschriebene Wechselwirkung nicht ausbilden kann. Des Weiteren unterscheiden sich die Bindungsregionen der beiden VIM-Mutanten nur noch im Valin223, welches in VIM-2 zu Isoleucin mutiert ist. Alle anderen Mutationen sind in deutlicher Entfernung zum aktiven Zentrum zu finden. Insgesamt unterscheiden sich die beiden Mutanten in 14 Aminosäuren (Tabelle 6).

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 6: Vergleich der mutierten Aminosäuren zwischen VIM-2 (PDB: 4C1D) und VIM-1 (GenBank: ADE18863.1)

VIM-2	Ser37	Val145	Ser192	Ile200	Tyr201	Arg205	Ile223
VIM-1	Asn37	Ala145	Asn192	Val200	His201	Ser205	Val223

VIM-2	Gln228	Gln234	Phe235	Lys250	Thr253	Thr260	Val265
VIM-1	Lys228	Glu234	Val235	Gln250	Ala253	Lys260	Ala265

4.2.8. Aufstellung von Struktur-Wirkungsbeziehungen

Fasst man die erhobenen Aktivitätsdaten zusammen, lassen sich für die jeweiligen Proteine Struktur-Wirkungsbeziehungen herleiten.

... gegenüber NDM-1

- Die Einführung der zusätzlichen Phenylgruppe verbessert die Aktivität um den Faktor zwei im Vergleich zur Methylgruppe (Captopril). Weitere Substitutionen am Aromaten werden allerdings nicht toleriert.
- Es werden verschiedene Heterocyclen toleriert und auch die relative Position der Säurefunktion am Ring scheint keinen Einfluss auf die Aktivität zu besitzen.
- Einen deutlichen Einfluss hat die absolute Stereochemie der Säurefunktion. Zumindest für die Strukturen mit Säurefunktion in α -Position sind die *R*-konfigurierten Derivate deutlich aktiver.
- Das zur Carbonsäure bioisostere Sulfon wird ebenfalls toleriert.
- Die Piperazin-Struktur führt, verglichen mit Captopril, zu keiner Verbesserung der Aktivität.

... gegenüber VIM-1

- Die Einführung eines aromatischen Restes führt in Kombination mit fünfgliedrigen Heterocyclen zu einer Abnahme der inhibitorischen Aktivität.
- Die Piperidin-Derivate zeigen im Vergleich mit anderen Aminosäure-Derivaten, eine höhere Aktivität. Diese ist nochmals leicht erhöht, wenn sich die Säurefunktion nicht in α -Position befindet. Der Azetidinring wird nicht toleriert.
- Die absolute Konfiguration der Säuregruppe hat keinen Einfluss auf die Aktivität.
- Das Sulfon-Derivat führt zu einer verbesserten Inhibition.
- Die Piperazin-Struktur wird toleriert.

... gegenüber IMP-7

- Die Einführung der Phenylgruppe wird toleriert, weitere Substitutionen am Aromaten jedoch nicht.
- Nur die sechsgliedrigen Heterocyclen führen zu einer Verbesserung der Aktivität. Die Säurefunktion wird in allen Positionen toleriert, führt aber nur in α -Position zu einer verbesserten Inhibition.
- Die absolute Konfiguration der Säurefunktion ist vernachlässigbar.
- Die Sulfonyl-Gruppe wird nicht toleriert.
- Die Piperazin-Struktur führt zu einer deutlichen Verbesserung der inhibitorischen Aktivität.

4.3. Co-Kristallisation von VIM-2 und Verbindung DB320

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Bindung des Inhibitors DB230 an die Metallo- β -Lactamase VIM-2 durch eine Röntgenkristallstruktur bestätigt werden.

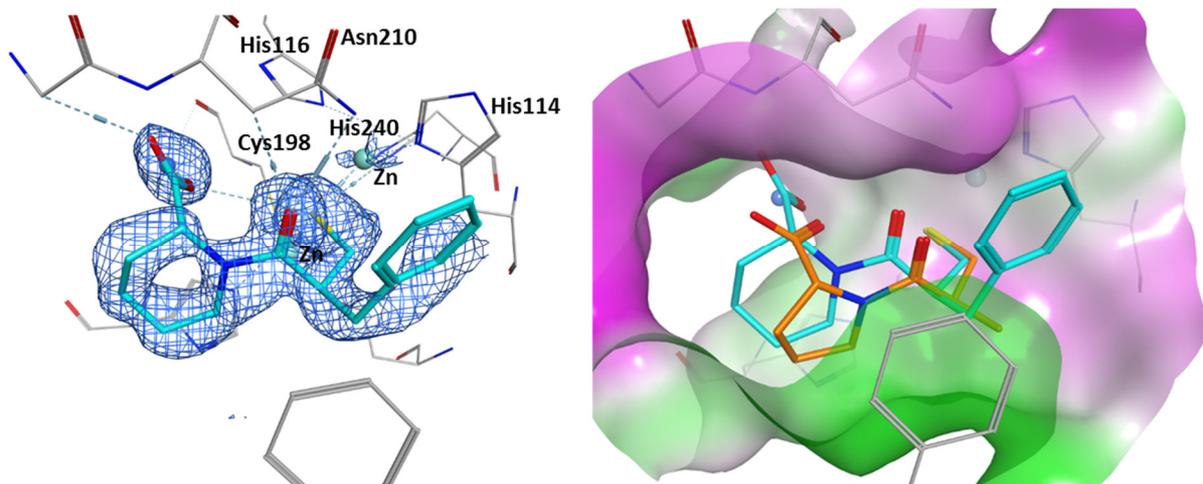


Abbildung 64: Kristallstruktur von VIM-2 mit DB320 als Liganden im aktiven Zentrum. **A:** Die Elektronendichte des Liganden; **B** Graphische Darstellung des aktiven Zentrums (Magenta: hydrophil; grün: lipophil). Überlagerung der beiden Liganden DB320 (Cyan) und D-Captopril (Orange, PDB: 4C1E).

In Abbildung 64 ist zu erkennen, dass die Bindungspose von DB320 und Captopril stark ähneln. Während der unpolare Anteil des Liganden zum lipophilen Oberfläche (Grün) hin ausgerichtet ist, zeigen die polaren Gruppen zur hydrophilen Oberfläche (Magenta) des Proteins. Die Thiolgruppe koordiniert dabei an die beiden Zink-Ionen im aktiven Zentrum. Auch die Carbonsäure am Heterocyclus wechselwirkt mit dem aktiven Zentrum. Der Carbonylsauerstoff der Amidbindung bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Seitenkette von Asn210 aus.

Der Phenylring ist in Richtung des Solvens ausgerichtet. Die Unschärfe der Elektronendichte am Aromaten (Abbildung 64 **A**) kann dadurch erklärt werden, dass dieser in der Bindetasche relativ frei beweglich ist. Dies wiederum ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass der Phenylring keine positiven Wechselwirkungen mit dem Protein eingeht. Dadurch ist diese Position für weitere Substitutionen im Rahmen der Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung prädestiniert.

4.4. Ergebnisse des Thermal Shift Assays

Um die Ergebnisse aus der proteinbasierten Aktivitätstestung zu validieren, wurden die Verbindungen DB151, DB320, DBDK48 und Captopril in einem Thermal Shift Assay (TSA) untersucht.

Tabelle 7: Die Verschiebungen des Schmelzpunktes (+ ΔT) in [°C].

	NDM-1	VIM-2	IMP-7
Captopril	1.9 ± 0.6	6.3 ± 0.2	2.5 ± 0.2
DB151	0.9 ± 0.5	2.4 ± 0.2	1.8 ± 0.2
DB320	1.3 ± 0.2	6.3 ± 0.2	2.7 ± 0.3
DBDK48	2.6 ± 0.3	10.1 ± 0.2	6.0 ± 0.2

Aus Tabelle 7 ist ersichtlich, dass alle untersuchten Strukturen zu einer Erhöhung des Schmelzpunktes führen. Die Ergebnisse für die Schmelzpunktverschiebung von VIM-2 decken sich nahtlos mit den Ergebnissen der IC_{50} -Werte. Vor allem die sehr starke Verschiebung von 10 °C für DBDK48 ($IC_{50} = 0.2 \mu M$) deckt sich mit der Annahme, dass es zur Ausbildung einer weiteren Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Carbonyl-Sauerstoff der Harnstoffgruppe und Arg205 kommt.

Ein vergleichbarer Trend offenbart sich gegenüber IMP-7. Auch hier verbessert sich der IC_{50} -Wert von DB151 (4.5 μM) über DB320 (0.9 μM) hin zu DBDK48 (0.3 μM) kontinuierlich. Dies spiegelt sich auch in den Schmelzpunktverschiebungen wieder.

Im Unterschied zu den anderen untersuchten MBLs wird NDM-1 vergleichsweise schwach stabilisiert. Auffällig ist dabei, dass die Verschiebung des Schmelzpunktes in keinerlei Kontext zu den ermittelten IC_{50} -Werten zu stehen scheint. Für die im Aktivitätsassay potente Verbindung DB320 ($IC_{50} = 0.7 \mu M$) wurde eine Erhöhung des Schmelzpunktes um +1.3 °C gemessen. Für Verbindung DBDK48, welche die mit Abstand schlechteste Aktivität gegenüber NDM-1 aufweist ($IC_{50} = 47.7 \mu M$), wurde die tendenziell stärkste Verschiebung der Schmelztemperatur gemessen ($\Delta T = +2.6 \text{ °C}$).

Ergebnisse und Diskussion

Da diese Ergebnisse so nicht zu erwarten waren, wurden die beiden Strukturen DB320 und DBDK48 mittels isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) weiter untersucht. Dabei wurde das Enzym NDM-1 gegen den jeweiligen Inhibitor titriert. Mittels dieser Methode lassen sich u.a. direkt Aussagen über Dissoziationskonstante (K_d) sowie Änderung der Enthalpie (ΔH), Entropie (ΔS) und freier Energie (ΔG) treffen.⁴⁵

Wie Lo et al. gezeigt haben, besteht ein Zusammenhang zwischen der Dissoziationskonstante einer Verbindung und deren IC_{50} -Wert gegenüber einem Protein. Ein niedriger IC_{50} -Wert geht in der Regel mit einem niedrigen K_d -Wert einher.⁴⁶ Der K_d -Wert beschreibt das Verhältnis zwischen an Protein gebundenen und ungebundenem Liganden und ist somit ein Maß für die Bindungsaffinität eines Moleküls an ein Protein. Dabei gilt, je niedriger der K_d -Wert, desto größer ist der Anteil an gebundenem Inhibitor im Gleichgewichtszustand.⁴⁷ Dieser Zusammenhang spiegelt sich auch in den hier gezeigten Messergebnissen wieder. In Abbildung 65 sind die entsprechenden Titrationskurven und die dazugehörigen Messwerte dargestellt. Für die im Aktivitätsassay weniger potente Verbindung DBDK48 wurde auch ein höherer, und damit für die Inhibitionsleistung ungünstigerer K_d -Wert ($13.2 \mu M$) als für DB320 ($7.8 \mu M$) ermittelt.

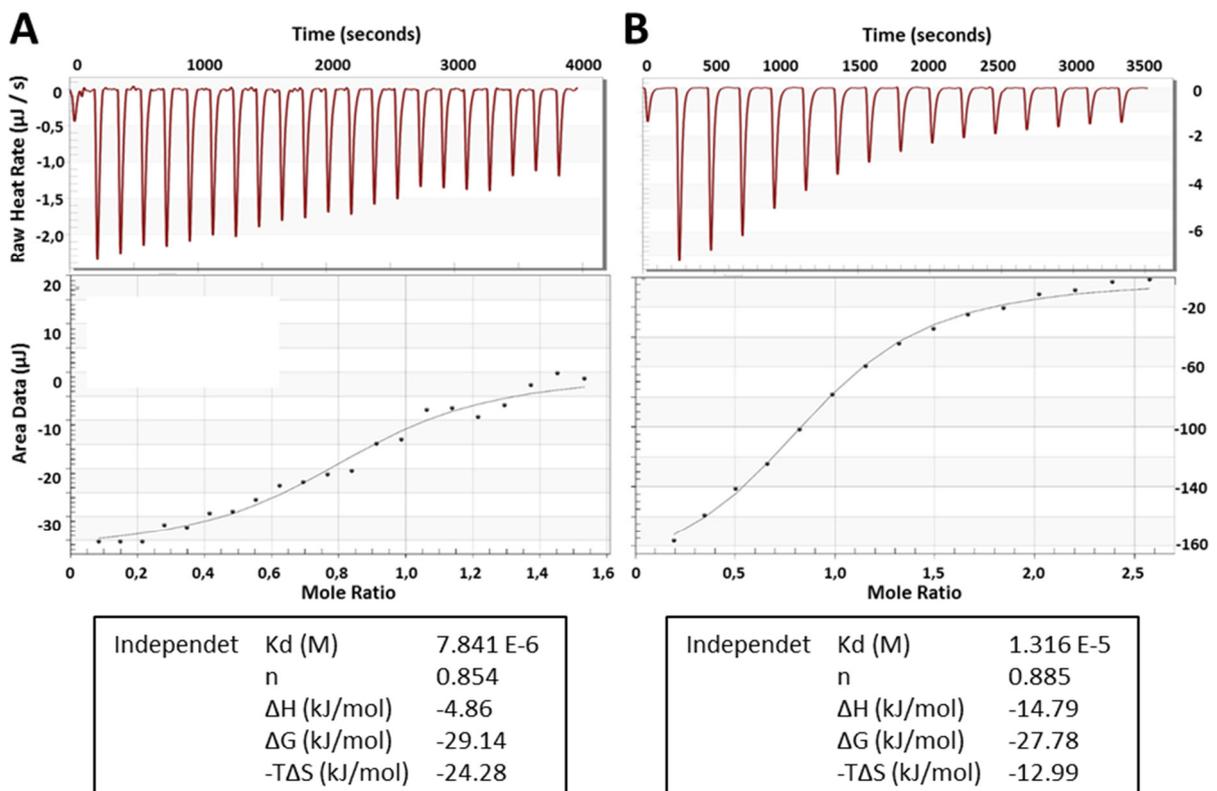


Abbildung 65: Titrationskurve von NDM-1 und A: DB320 (MBL: $130 \mu M$; Inhibitor: $700 \mu M$, $10.98 \mu L$ /Titrationsschritt) und B: DBDK48 (MBL: $100 \mu M$, Inhibitor: $1000 \mu M$, $10.98 \mu L$ /Titrationsschritt).

Die Ergebnisse der ITC-Experimente zeigen auch, dass die Bindung von DB320 an NDM-1 entropischer getrieben ist. Dem entropischen Beitrag von -24.28 kJ/mol ($-T\Delta S$) steht ein enthalpischer Beitrag von -4.86 kJ/mol (ΔH) gegenüber. Im Falle von DBDK48 sind die energetischen Beiträge ausgeglichen. Der enthalpische Beitrag ist, im Vergleich mit DB320, mit -14.79 kJ/mol um mehr als den Faktor drei günstiger. Der Wert ΔH ist ein Maß für die Anzahl oder die Stärke nicht kovalenter Bindungen zwischen Inhibitor und Protein. Ein niedrigerer ΔH -Wert weist auf zusätzliche, bzw. stärkere Bindungen hin,⁴⁵ was wiederum zu einer höheren Stabilisierung des Proteins und damit zu einer stärkeren Verschiebung des Schmelzpunktes (ΔT) führen sollte.⁴⁶ Dieser Effekt erklärt, warum für die Verbindung DBDK48 eine höhere Schmelzpunktverschiebung gemessen wurde, als für DB320.

Ladbury et al. konnten zeigen, dass im Rahmen der Optimierung eines Wirkstoffes der enthalpische Beitrag zur Bindung in der Regel zunimmt.⁴⁵ Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen aber auch, dass ein höherer enthalpischer Beitrag zu einer stabileren Bindung des Liganden an ein Protein führt, dies jedoch nicht zwingend eine verbesserte Inhibition des Proteins zur Folge hat. Der Grund für das geringe inhibitorische Potential der Verbindung DBDK48 konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Allerdings wurde für die Verbindung DB359, welche ebenfalls einen Piperazinring trägt, ein deutlich besserer IC_{50} -Wert ($2.5 \mu\text{M}$) gegenüber NDM-1 ermittelt. Sollte dieser Ligand in einem ITC-Experiment mit DBDK48 vergleichbare Ergebnisse liefern, so wäre die Piperazin-Teilstruktur ein vielversprechender Ansatz für weitere Studien zur Struktur-Wirkungsbeziehung.

4.5. Untersuchung der Minimalen Hemm-Konzentration

Im Rahmen proteinbasierten *in vitro* Testung, erwies sich der MBL-Inhibitor DB320 als die Verbindung mit den besten inhibitorischen Aktivitäten gegenüber allen drei getesteten Metallo- β -Lactamasen. Anschließend wurde überprüft, ob diese Inhibitionsleistung auch in einem zellbasierten Testsystem erhalten bleibt. Dazu wurden verschiedene bakterielle Erreger mit unterschiedlichen Resistenzproteinen mit dem β -Lactam-Antibiotikum Imipenem behandelt. Auf Grund der Resistenzproteine sollte diese Behandlung keine Wirkung zeigen. Parallel dazu wurden die gleichen Erreger mit Imipenem und den hier vorgestellten Inhibitoren behandelt. Blicke die Inhibitionswirkung der Verbindungen erhalten, sollte das Antibiotikum wieder wirksam sein und es zur Lyse der Bakterien kommen.

Tabelle 8: Übersicht der verschiedenen bakteriellen Erreger und der MHK-Werte von Imipenem.

Isolate ¹		Imipenem MHK in mg/L ² (Faktor der Senkung der MHK ⁵)		
		+ DB151 ^{3,4}	+ DB320 ^{3,4}	+ Captopril ^{3,4}
<i>E. coli</i> TOP10 T2359 (NDM-1)	128	32 (4)	16 (8)	4 (32)
<i>E. coli</i> TOP10 T2360 (IMP-1)	2	1 (2)	1 (2)	0.5 (4)
<i>E. coli</i> TOP10 T2361 (VIM-1)	1	0.5 (2)	1 (1)	0.5 (2)
<i>E. coli</i> pET24a T2377 (NDM-1)	32	2 (16)	2 (16)	1 (32)
<i>E. coli</i> pET24a T2378 (IMP-7)	4	1 (4)	0.5 (8)	0.5 (8)
<i>E. coli</i> pET24a T2379 (VIM-1)	64	32 (2)	2 (32)	2 (32)
<i>K. pneumoniae</i> T2301 (NDM-1)	16	16 (1)	8 (2)	4 (4)
<i>P. aeruginosa</i> T2325 (IMP-1)	8	4 (2)	4 (2)	4 (2)
<i>P. aeruginosa</i> T2226 (IMP-7)	64	32 (2)	32 (2)	32 (2)
<i>K. pneumoniae</i> T2216 (VIM-1)	8	8 (1)	4 (2)	4 (2)

¹Transformanten mit entsprechendem Resistenzprotein in TOPO-Vector, pET24a-Vector und klinische Isolate.

²Als Median aus drei Experimenten. ³DB151, DB320 und Captopril wurden in konstanter Konzentration von 128 mg/mL und in Kombination mit Imipenem getestet. ⁴DB151, DB320 und Captopril zeigten bei der verwendeten Konzentration keine intrinsische antibakterielle Aktivität. ⁵Der Faktor, um welchen die MHK durch Zugabe eines Inhibitors abgesenkt wird. Signifikante Änderungen (≥ 4) sind in Fettdruck dargestellt.

In Tabelle 8 sind die MHK-Werte für Imipenem, mit und ohne MBL-Inhibitoren, gegenüber verschiedenen *E. coli* Transformanten und klinischen Isolaten aufgeführt. In der ersten Spalte der MHK-Werte ist die Konzentration angegeben, bei welcher Imipenem optisch eine Hemm-Wirkung gegen das Wachstum der Bakterien erzielt. In den folgenden Spalten sind dann die Hemm-Wirkungen bei Zugabe von 128 mg/L Inhibitor aufgeführt. In Klammern steht der Faktor, um welchen die Minimale Hemm-Konzentration gesenkt wurde. Dabei gilt, dass ein kleinerer MHK-Wert mit einer erhöhten Anfälligkeit der Erreger gegenüber Imipenem einhergeht, was sich wiederum in einer geringeren Medikamentenbelastung von Patienten widerspiegeln könnte.

An Hand der Tabelle wird deutlich, dass vor allem gegenüber den verschiedenen Laborstämmen signifikante Verbesserungen der MHK-Werte erreicht werden konnten. Gegenüber den klinischen Isolaten zeigten die Inhibitoren keine signifikante Wirkung.

Vergleicht man die Werte von Captopril mit denen von DB151, fällt auf, dass die Einführung der Phenylgruppe keine Verbesserung mit sich brachte. Dieser Trend deckt sich mit den IC_{50} -Werten, welche für DB151 ermittelt wurden.

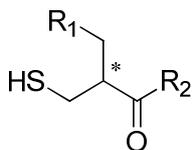
Die Verbindung DB320 zeigt im Schnitt bessere Werte, als DB151, erreicht dabei aber nicht immer die MHK-Werte von Captopril. Obwohl die IC_{50} -Werte für DB320 im Vergleich mit Captopril im ersten Moment andere Ergebnisse hätten vermuten lassen können, sind die gefundenen Werte durchaus zu erklären. Im Unterschied zum proteinbasierten Assay spiegeln die hiergezeigten Werte nicht nur die reine inhibitorische Aktivität der Verbindungen gegenüber dem Zielprotein wieder, sondern auch die Fähigkeit, die bakterielle Zellwand zu passieren. Für gramnegative Erreger eignen sich polare Verbindungen deutlich besser zur Penetration der Zellwand, als unpolare Strukturen.²⁷

Die Polarität der hier vorgestellten Substanzen sollte an Hand einer HPLC-basierten Studie abgeschätzt werden. Dazu wurden die Retentionszeiten der einzelnen Verbindungen gegen eine stationäre C_{18} -Phase mit denen von zugelassenen Wirkstoffen mit bekannten $\text{LogD}_{7,4}$ -Werten verglichen. Als Grundlage für die Berechnungen der $\text{LogD}_{7,4}$ -Werte wurde eine Kalibriergrade erstellt (s. Kapitel 3.11).

In Tabelle 9 sind die Retentionszeiten der einzelnen Strukturen, sowie die entsprechenden berechneten $\text{LogD}_{7,4}$ -Werte aufgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 9: Übersicht der auf ihre Polarität hin untersuchten Verbindungen, welche nach abnehmender Hydrophilie sortiert sind.



Verbindung	R ₁	R ₂ ¹	t _R ²	logD _{7,4} ³
DBCK68	4-Hydroxy-3-methoxyphenyl	Prolin	3,265	-0,43
DB306	Phenyl	Azetidin-2-carbonsäure	3,459	0,00
DB314	Phenyl	L-Alanin	3,486	0,05
DBCK96	Thiophen-2-yl	Prolin	3,508	0,10
DB315	Phenyl	<i>N</i> -Methylglycin	3,533	0,16
DB272	Phenyl	Piperidin-4-carbonsäure	3,546	0,19
DB358	Phenyl	Thiazolidin-2-carbonsäure	3,597	0,30
DB269	Phenyl	(<i>R</i>)-Piperidin-3-carbonsäure	3,625	0,36
DB320	Phenyl	(<i>R</i>)-Piperidin-2-carbonsäure	3,685	0,49
DB361	Phenyl	(<i>S</i>)-Piperidin-2-carbonsäure	3,717	0,56
DB359	Phenyl	4-Bz-Piperidin-2-carbonsäure	3,794	0,74
DBCK98	4-Bromphenyl	Prolin	3,815	0,78

¹R₂ liegt stets als Amid vor. ²Retentionszeit in Minuten; ³berechneter logD_{7,4} (s.a. Kapitel 3.11).

Es gilt, vereinfacht ausgedrückt, je länger die Retentionszeit, desto lipophiler die Verbindung. Wie zu erwarten, ist Verbindung DBCK68 jene, welche den niedrigsten LogD_{7,4}-Wert (-0.43) aufweist. Die 2-Hydroxyanisol-Teilstruktur ist, im Vergleich mit den nicht substituierten Phenylringen, deutlich polarer. Im weiteren Verlauf folgt die Abnahme der Polarität streng nach zwei Prinzipien. Zum Einen

nimmt die Lipophilie mit der Ringgröße des Heterocyclus zu. Dies ist leicht durch die gleichzeitige Zunahme der unpolaren Kohlenwasserstoff-Bindungen zu erklären. Zum Anderen spielt die Position der Carbonsäure, relativ zur Amidbindung, eine große Rolle. Dies ist gut an den Piperidin-Derivaten zu erkennen. Im Falle von DB272 steht die Säurefunktion an Position 4. Hierdurch sind die polaren Teilstrukturen des Moleküls (Amid, Thiol, Carbonsäure) über die gesamte Struktur verteilt. Hierdurch besitzt das Molekül eine vergleichsweise höhere polare Oberfläche. Verschiebt sich die Position der Säure in Richtung Amid, kommt es zu einer Ballung der polaren Teilstrukturen und polare Anteil der Oberfläche nimmt ab. Das Molekül wird unpolarer.

Obwohl die hier durchgeführte Methode nur bedingt zu absoluten Werten führt, sind die relativen Ergebnisse jedoch schlüssig. Dies gilt in besonderem Maße auch für die Verbindungen DB320 und DB361. Zwar sind sich die ermittelten Werte sehr ähnlich, dennoch ergeben sich für das *R*-Isomer etwas frühere Retentionszeiten. Dieser Effekt lässt sich durch intramolekulare Wechselwirkungen erklären, welche durch die absolute Position der Säurefunktion bedingt werden. Steht diese in axialer Stellung, kann eine Wechselwirkung mit dem Carbonylsauerstoff der Amidgruppe ausgebildet werden (vgl. Abbildung 66). Dadurch wird der polare Charakter der Säuregruppe leicht reduziert. Dieser Effekt sollte beim anderen Isomer nicht auftreten können.

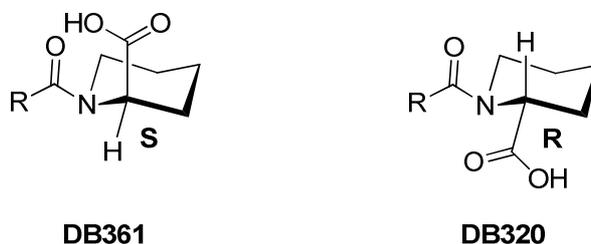


Abbildung 66: Vergleich der absoluten Positionen der Säuregruppen der beiden Isomere DB361 (*S*) und DB320 (*R*).

Brown et al. haben 3200 chemische Verbindungen, anhand deren logD- und clogD-Werten, bezüglich ihrer Polarität und ihrer Wirkung gegenüber Bakterien untersucht. Dabei konnten sie zeigen, dass Wirkstoffe, welche gegenüber gramnegativen Erregern wirksam sind, in der Regel einen clogD von unter null aufweisen. Ausnahmen bilden *E. coli* (clogD ca. 0.5) und *H. influenza* (ca. 0.1), welche auch von etwas unpolareneren Verbindungen erreicht werden können.²⁷ Captopril (logD_{7.4} -1,63)³³ zeigt in der MIC-Bestimmung die besten Ergebnisse. Die Verbindung DB320 verfügt zwar über die besseren Aktivitäten in der *in vitro* Testung, erreicht jedoch nicht die MIC-Werte von Captopril. Nach der hier

Ergebnisse und Diskussion

vorgestellten Methode hat DB320 einen empirisch ermittelten $\log D_{7.4}$ -Wert von 0.55 und liegt damit deutlich am oberen Ende der von Brown et al. vorgestellten Skala.

Diese Ergebnisse untermauern die oben aufgestellte Annahme, dass die hier auf ihre MIC-Werte getesteten Substanzen zwar über ein verbessertes inhibitorisches Potential verfügen, aber die Zellwand gramnegativer Erreger nicht überwinden können.

4.6. Untersuchung der Zytotoxizität

Die vier Verbindungen Captopril, DB151, DB320 und DBCK48 wurden auch hinsichtlich ihrer zytotoxischen Eigenschaften hin untersucht. Im Rahmen eines Zellproliferations-Assays mit WST-1 wurde die Vitalität der mit den Inhibitoren für 48 h inkubierten Zellen (U937) evaluiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen.

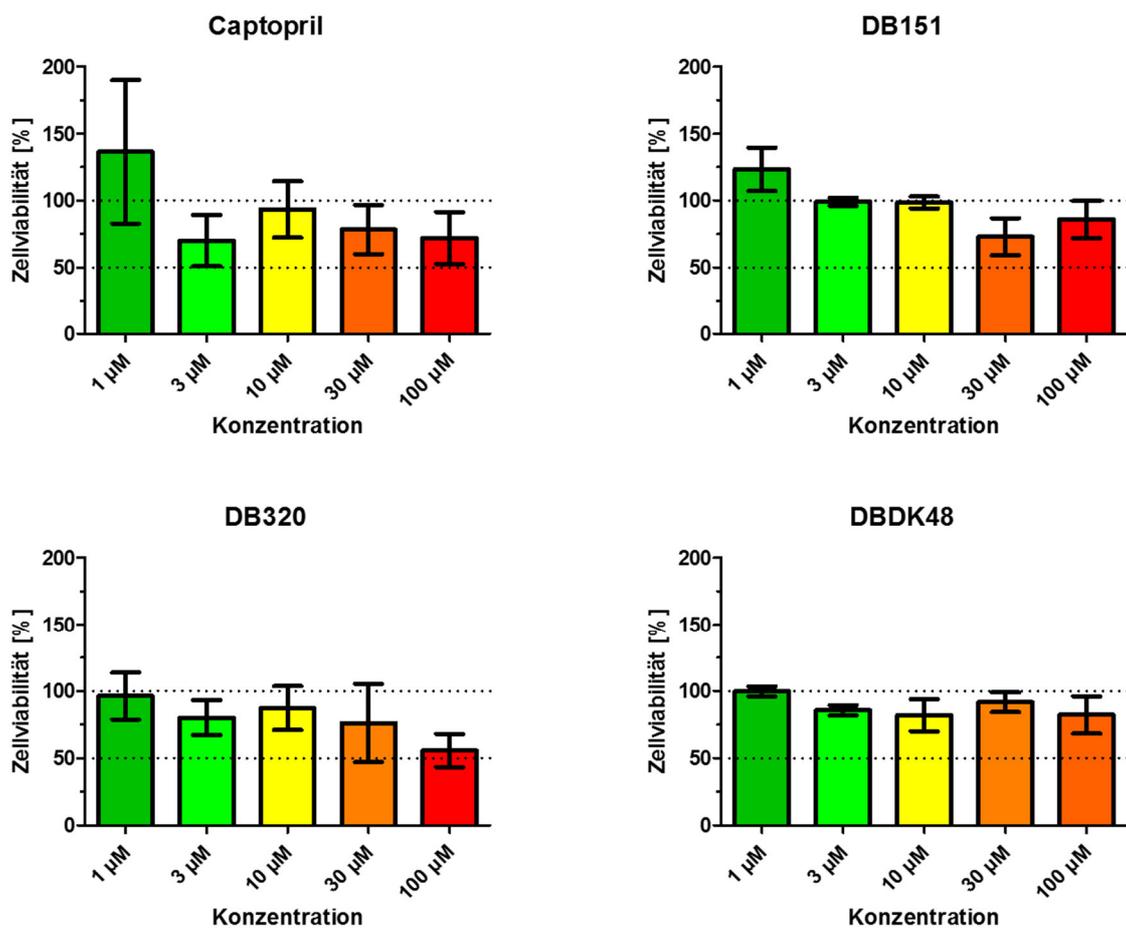


Abbildung 67: Graphische Darstellung der Ergebnisse des WST-1 Assays. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Alle Werte beziehen sich auf unbehandelte Zellen.

Die Behandlung mit Captopril führt mit zunehmender Dosis zu einer Abnahme der Zellviabilität. Eine Interpretation der exakten Daten ist auf Grund der hohen Abweichung zwischen den Messungen nicht einfach. Dennoch lässt sich aus dem in Abbildung 67 gezeigten Graphen ein Trend zu einer dosisabhängigen Wirkung erahnen. Bei der höchsten getesteten Konzentration von 100 µM, sind im Mittel allerdings immer noch 72 % der Zellen metabolisch aktiv.

Ergebnisse und Diskussion

Nach einer Inkubation mit DB151 ist nur bei den Wirkstoffkonzentrationen von 30 μM und 100 μM eine schwache Wirkung feststellbar. Hier sind bei der höchsten Dosis noch etwa 85 % der Zellen vital. Sehr ähnlich verhält es sich mit DBDK48. Auch hier ist mit zunehmender Konzentration kein nennenswerter Effekt zu beobachten.

Bei Verbindung DB320 ist mit zunehmender Konzentration wiederum ein Einfluss auf die Zellviabilität zu beobachten. Auch hier machen die großen Messwertabweichungen eine Auswertung schwierig. Zu einem Einfluss auf die Zellviabilität scheint es erst ab einer Konzentration von 30 μM zu kommen. Allerdings sind auch hier bei einer Wirkstoffkonzentration von 100 μM noch rund 56 % der untersuchten Zellen vital.

Parallel wurde ein Zytotoxizitäts-Assay auf Grundlage der LDH-Aktivität (Lactat-Dehydrogenase) außerhalb der Zellen durchgeführt. Da die LDH in der Regel nicht außerhalb der Zellen vorkommt, ist eine Umsetzung des Substrates ein Hinweis auf eine Beeinträchtigung der Permeabilität der Plasmamembran.

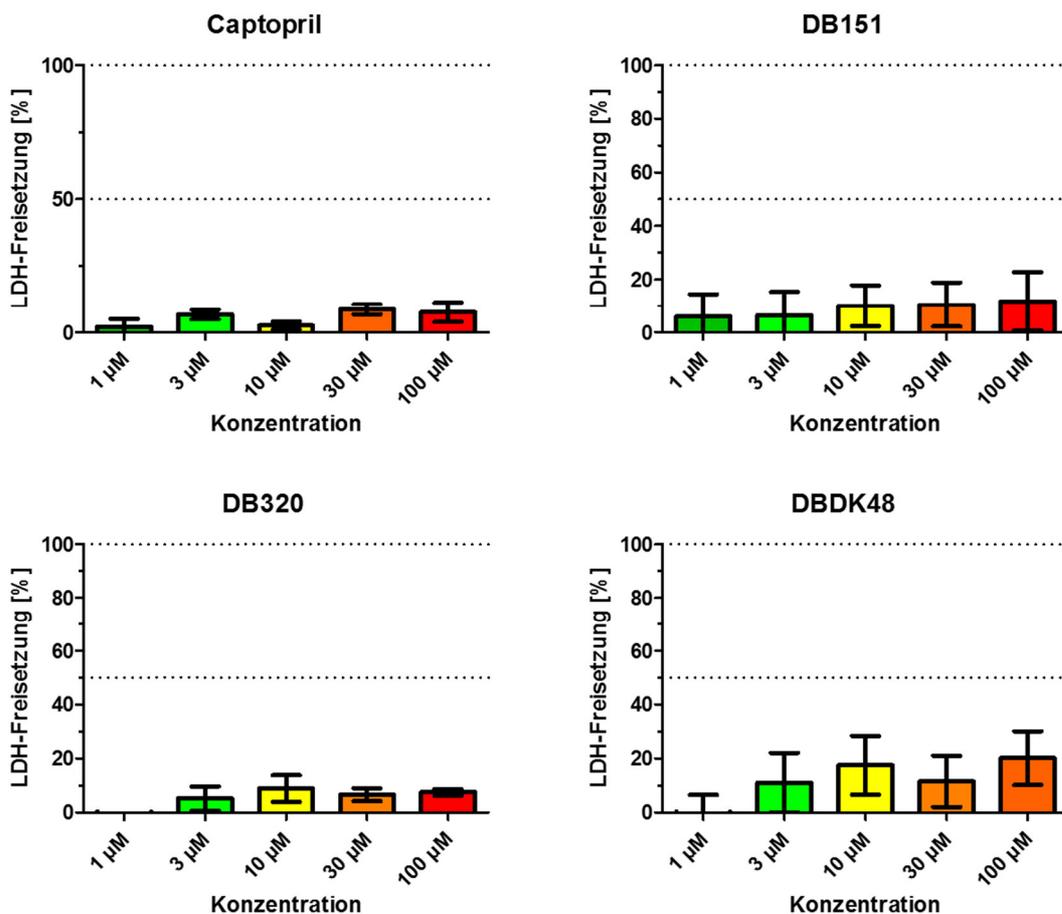


Abbildung 68: Graphische Darstellung der Ergebnisse des LDH-Aktivitätsassays. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Alle Werte beziehen sich auf unbehandelte Zellen.

Ergebnisse und Diskussion

Wie in Abbildung 68 gut zu erkennen ist, gibt es bei keiner der getesteten Substanzen eine auffällig hohe LDH-Freisetzung. Nur bei DBDK48 zeigt sich bereits bei einer Konzentration von 10 μM eine Freisetzung von 20 %.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier gezeigten Strukturen über keine nennenswerte Zytotoxizität verfügen.

4.7. Bestimmung der Aktivität gegenüber dem Angiotensin konvertierenden Enzym

Bei Captopril, der Ausgangsstruktur der hier vorgestellten Arbeit, handelt es sich um einen ACE-Hemmer, also einen Blutdrucksenker. Da die hier synthetisierten Verbindungen über eine ausgeprägte strukturelle Ähnlichkeit mit Captopril verfügen, ist es naheliegend, dass sie auch mit den gleichen Ziel-Proteinen wechselwirken und vergleichbare Effekte hervorrufen könnten. Im Falle einer akuten Sepsis muss die zusätzliche Absenkung des Blutdrucks als lebensbedrohlich erachtet werden. Auf Grund dieser Tatsachen wurden die Verbindungen Captopril, DB151, DB320 und DB359 in einem ACE-Aktivitätsassay untersucht.

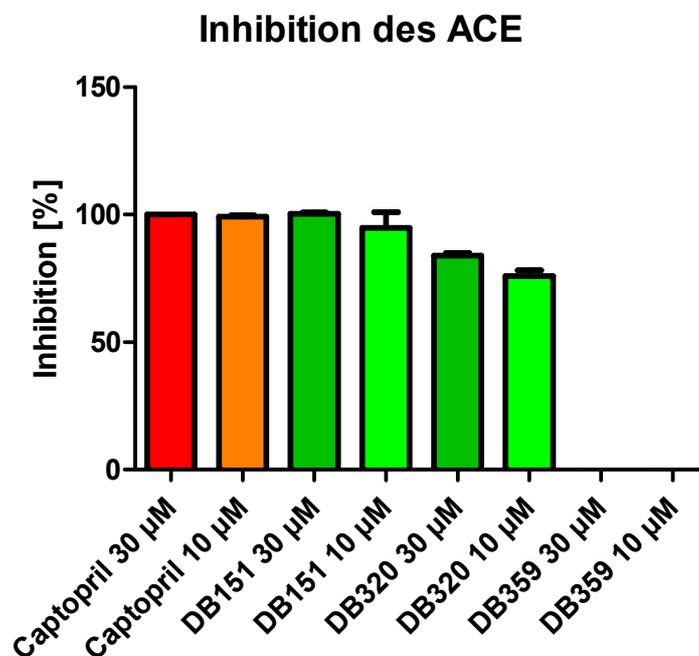


Abbildung 69: Inhibition des ACE (in %) durch die Substanzen Captopril, DB151, DB320 und DB359 bei Konzentrationen von 30 µM und 10 µM. Der Wert der maximalen Inhibition von Captopril bei einer Konzentration von 30 µM wurde hierbei gleich 100 % gesetzt. Alle anderen Werte sind relativ auf diese maximale Inhibition von Captopril bezogen.

Captopril zeigt erwartungsgemäß bei beiden getesteten Konzentrationen (30 µM, bzw. 10 µM) eine Inhibition von 100 Prozent (Abbildung 69). Verbindung DB151, welche sich nur durch die neu eingeführte Phenylgruppe von Captopril, zeigt ebenfalls eine nahezu vollständige Inhibition.

Die Erweiterung der Pyrrolidin-Struktur zum sechsgliedrigen Piperidinring (DB320) setzt diesen Trend zwar fort, allerdings liegt die Inhibition von ACE immer noch bei 84 Prozent (30 μM), bzw. 76 Prozent (10 μM). Diese Konzentrationen sind zwar vergleichsweise hoch gegenüber den IC_{50} -Werten von DB320, allerdings deutlich unter den Konzentrationen, welche einen Einfluss auf die MHK-Werte zeigen. Die dort verwendete Konzentration liegt für DB320 bei umgerechnet 417 μM . Dabei ist natürlich zu berücksichtigen, dass die für die ACE-Hemmung ermittelten Werte in einem reinen *in vitro* Testsystem ermittelt wurden. Bei den MHK-Werten wurden vitale Bakterien verwendet. Damit lassen sich die Werte nur bedingt miteinander vergleichen.

Die Verbindung DB359 zeigt ihrerseits keinerlei Aktivität mehr gegenüber des Angiotensin-konvertierenden Enzyms. Da die Inhibitionen der einzelnen MBLs durch DB359 mit denen von DB320 vergleichbar sind und die Wirkung auf das *off-target* ACE entfällt, wäre die Piperazin-Teilstruktur eine gute Leitstruktur für eine weitergehende Struktur-Wirkungsbeziehung-Studie.

4.8. Bestimmung der Aktivität gegenüber LTA₄H

Wie beschrieben, stellt auch die LTA₄H ein *off-Target* von Captopril dar. Daher wurden die hier dargestellten Strukturen auch auf ihre Aktivität gegen die LTA₄H hin getestet.

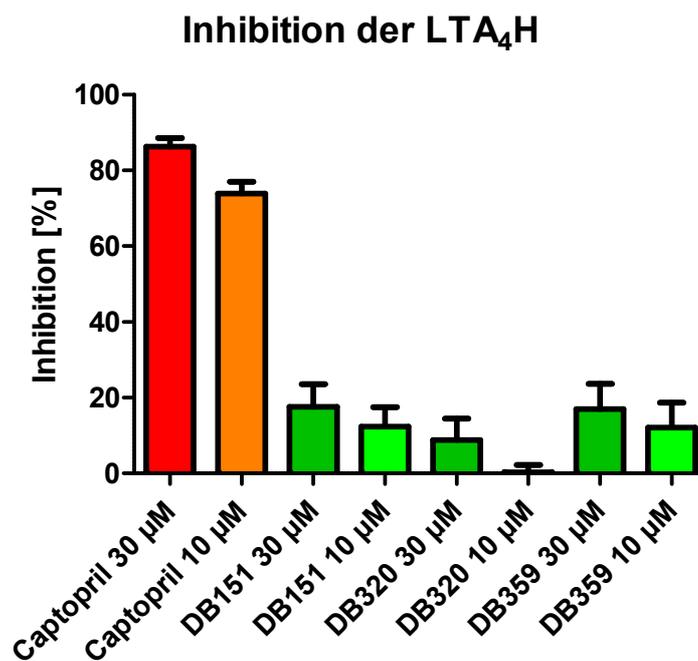


Abbildung 70: Inhibition der LTA₄H (in %) durch die Substanzen Captopril, DB151, DB320 und DB359 bei konstanten Konzentrationen von 30 µM und 10 µM.

Die Messungen erfolgten mit einer Inhibitor-Konzentration von 30 µM, bzw. 10 µM. Die Werte von Captopril erreichen dabei eine Inhibition von 86 % und 74 % (Abbildung 70). Die Verbindung DB151 inhibiert die LTA₄H bei den angegebenen Konzentrationen nur noch zu 18 %, bzw. 12 %, also in deutlich geringerem Ausmaß. DB320 erreicht nur bei 30 µM noch eine messbare Inhibition von rund 9 %. Die Werte von DB359 liegen interessanter Weise wieder im Bereich von DB151 (17 % und 12 %), jedoch immer noch deutlich unter denen von Captopril.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Strukturen keine nennenswerte Inhibition der LTA₄H aufweisen.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Inhibitoren der bakteriellen Resistenzproteine New Delhi Metallo- β -Lactamase 1 (NDM-1), die beiden Mutanten der Verona-Integron Encoded Metallo- β -Lactamase 1 und 2 (VIM-1, bzw. -2), sowie die Imipenemase 7 (IMP-7) entwickelt.

Auf Grund natürlicher Selektion, aber vor allem auch bedingt durch den unüberlegten und verschwenderischen Einsatz von β -Lactam-Antibiotika, ist eine weltweite Zunahme an multiresistenten Erregern zu beobachten. Einer der Hauptgründe dieser Resistenzen sind die Metallo- β -Lactamsen (MBL), welche vor allem in Gramnegativen Bakterien vertreten sind und für die Hydrolyse und damit der Desaktivierung der β -Lactam-Wirkstoffe verantwortlich sind. Neben der Suche nach anderweitig wirkenden Antibiotika, ist die Entwicklung von Inhibitoren der MBLs von vordringlicher Bedeutung.

Basierend auf der Grundstruktur des ACE-Hemmers Captopril, wurden trotz synthetischer Herausforderungen erfolgreich mehrere Strukturen mit inhibitorischer Aktivität gegenüber den MBLs synthetisiert. Der Prolinring von Captopril wurde in einer neuen Variante der Captopril-Synthese durch verschiedene Ring- und nicht cyclische Teilstrukturen ersetzt. Durch die Entwicklung einer Schutzgruppenstrategie, konnte die Ringstruktur durch einen Piperazin-Rest ersetzt werden. Dies erlaubt es, die Molekülstruktur auf dieser Seite zu erweitern. Des Weiteren wurde eine neue Syntheseroute etabliert, welche es auf elegante Weise ermöglicht, weitere Derivatisierungen an der Methylgruppe des Captoprils durchzuführen.

In einem proteinbasierten Testsystem wurden die synthetisierten Substanzen auf ihr inhibitorisches Potential hin untersucht. Dabei wurden IC_{50} -Werte im niedrig einstelligen mikromolaren, für drei Verbindungen sogar im sub-mikromolaren Bereich ermittelt. Die erhaltenen Ergebnisse wurden für die drei aktivsten Inhibitoren durch eine Erhöhung des Schmelzpunktes in einem TSA-Testsystem erfolgreich verifiziert. Mittels ITC-Untersuchungen konnte die unterschiedlichen Gewichtungen der entropischen und enthalpischen Beiträge zur Bindung der Inhibitoren an die untersuchten MBLs aufgezeigt werden. Hierdurch konnten die scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse der ermittelten IC_{50} -Werte und Schmelzpunktverschiebungen für die Verbindung DBDK48 bezüglich der NDM-1 aufgeklärt werden.

Die Strukturen DB320 konnte erfolgreich mit VIM-2 co-kristallisiert werden. Dies ermöglicht eine genauere Untersuchung und qualifizierte Aussagen über die Bindungsverhältnisse zwischen Protein und Ligand.

Zusammenfassung

Für zwei der synthetisierten Inhibitoren sollte untersucht werden, ob deren Aktivität *in vitro* auch in Bakterien erhalten bleibt. Dazu wurden pathogene klinische Isolate und Laborstämme, welche mit dem Resistenzplasmid transfiziert wurden, und gegen Imipenem resistent sind, herangezogen. Durch die Zugabe der Inhibitoren konnte die Wirksamkeit von Imipenem wiederhergestellt werden.

Es konnte eine HPLC-Methode etabliert werden, welche eine Abschätzung der Polaritäten in Abhängigkeit der Retentionszeiten erlaubt. Dadurch konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Polarität der Verbindungen und dem Grad der Wirksamkeit im MIC-Testsystem aufgezeigt werden.

Durch die Untersuchung der Inhibitoren auf die Proteine ACE und LTA₄H, konnten zwei Ziel-Proteine der Captopril-Grundstruktur als unerwünschte Nebenziele ausgeschlossen werden. Des Weiteren führte die Behandlung von U937-Zellen, selbst bei einer hohen Konzentration von 100 µM, weder zu Auffälligkeiten in einem WST-1 Assay, noch zu einer erhöhten Freisetzung von LDH. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Verbindungen über keine zytotoxischen Eigenschaften verfügen.

6. Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit lag darin, ausgehend von der Molekülstruktur von Captopril, Inhibitoren für verschiedene Metallo- β -Lactamasen zu entwickeln. Die synthetisierten Verbindungen sollten selbstredend eine gegenüber der Leitstruktur verbesserte inhibitorische Aktivität besitzen. Dies konnte zwar vor allem mit den Verbindungen DB320, DB359 und DBDK48 nachweislich erreicht werden, allerdings war diese Wirkung der Substanzen gegenüber vitalen Bakterien deutlich schwächer. Dies ist vor allem auf die vergleichsweise unpolaren Eigenschaften der Substanzen zurückzuführen. Wie bereits beschrieben, sind polare Moleküle deutlich besser in der Lage, die Zellwände gramnegativer Erreger zu penetrieren. Dies bedeutet, die hier vorgestellten Strukturen sollten um polare Gruppen erweitert werden, um ihre Effizienz zu erhöhen. Eine Möglichkeit wäre eine Aminogruppe, was auf Grund der bereits in der Molekülstruktur vorhandenen Säurefunktion zu einer zwitterionischen, und damit deutlich polarerer Verbindung führen würde. Die Einführung der Amidin-Struktur am Phenylring war ein erster Versuch in diese Richtung. Wie durch die Kristallstruktur gezeigt werden konnte, trägt der Phenylring nicht zur Bindung bei. Auf Grund seines sterischen Anspruches verdrängt er koordinierte Wassermoleküle, was energetisch ungünstig ist. Hier erscheint es sinnvoll, die Ringstruktur durch eine sterisch weniger anspruchsvolle Teilstruktur, z.B. einer Alkylkette, zu ersetzen. Eine basische Funktion am Ende einer solchen Kette, könnte zu einer Wasserstoffbrücke mit der Seitenkette einer Glutaminsäure führen. Eine weitere Möglichkeit könnte in der Erweiterung des Moleküls mittels der Piperazin-Teilstruktur liegen. Diese wird von allen untersuchten MBLs toleriert und zeigt darüber hinaus gegenüber IMP-7 die stärkste Inhibitionsleistung. Die Kombination aus der oben beschriebenen Aminofunktion und der Piperazin-Struktur erscheint besonders vielversprechend.

Mit den in dieser Arbeit etablierten Syntheserouten ist ein entscheidender Grundstein für die Synthesen weiterer Derivate gelegt. Sowohl für eine Derivatisierung am Phenylring, als auch für den Umgang mit der problematischen Thiolgruppe stehen nun synthetische Wege und Bausteine zur Verfügung. Eine Achillesferse bleiben die Stereozentren der Inhibitoren. Vor allem die absolute Stereoinformation am α -Kohlenstoff der Aminosäure, aber wahrscheinlich auch an jenem in Nachbarschaft zur Mercaptogruppe haben einen maßgeblichen Einfluss auf die Aktivität der Inhibitoren. Hier ist dringend die Etablierung einer stereochemisch reinen Synthese geboten.

Abschließen lässt sich sagen, dass das hier vorgestellte Grundgerüst einige Herausforderungen mit sich bringt. Mit den Erkenntnissen aus dieser Arbeit sollte eine zielführende Fortsetzung dieses Projektes jedoch möglich sein.

7. Abkürzungsverzeichnis

$^3J_{\text{HH}}$	Kopplungskonstante
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
aq	Wässrig
Asn	Asparagin
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BTZ	Bis-Thiazolidin
CAMBH	<i>cation adjusted Mueller Hinton Broth</i>
CDCl ₃	Deuteriochloroform
D ₂ O	Deuteriumoxid
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , Kolibakterium
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Ethylacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
eq	Äquivalente
ERSF	<i>European Synchrotron Radiation Facility</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethan-sulfonsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)

Abkürzungsverzeichnis

HRMS	Hochauflösende Massenspektroskopie (<i>High resolution mass spectroscopy</i>)
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
IMP-1 / -7	Imipenem hydrolyzing Metallo-β-Lactamase 1 / 7
INT	(2-(4-iodphenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-terazol-3-iumchlorid
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
KBE	Kolonie bildende Einheit
KBE	Kolonie-bildende Einheit
K _D	Dissoziationskonstante
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LTA ₄ H	Leukotrien A ₄ -Hydrolase
MBL	Metallo-β-Lactamase
MeOD	Deuteromethanol
MeOH	Methanol
MIC	Minimale Hemm-Konzentration (<i>minimal inhibitory concentration</i>)
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -buthylether
MurNAc	<i>N</i> -Acetylmuraminsäure
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte/reduzierte Form)
NDM-1	New Delhi Metallobetalactamase-1
NDM-1	New Delhi Metallo-β-Lactamase 1
NEt ₃	Triethylamin
NMR	Nukleare magnetische Resonanz
OD	Optische Dichte
PG	Schutzgruppe (engl.: protective group)
ppm	Parts per million
R.T.	Raumtemperatur
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
SAR	Struktur-Wirkungsbeziehung (<i>structure activity relationship</i>)
SBL	Serin-β-Lactamase
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
t _R	Retentionszeit
TSA	Thermischer Verschiebungssassay (<i>thermal shift assay</i>)

Abkürzungsverzeichnis

Ü.N.	Über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
VIM-1 /-2	Verona integron-encoded Metallo- β -Lactamase 1 / 2
WST-1	Wasserlösliches Tetrazolium 1: Dinatriummono(4-(3-(4-iodphenyl)-2-(4-nitro-phenyl)-2H-tetrazol-3-ium-5-yl)benzol-1,3-di-sulfonat (<i>Water soluble tetrazolium 1</i>)

8. Literaturverzeichnis

- (1) Bush, K.; Bradford, P. A. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **2016**, *6*.
- (2) Steinhilber, D.; Schubert-Zsilavec, M.; Roth, H. J. *Medizinische Chemie: Targets - Arzneistoffe - chemische Biologie*; 191 Tabellen, 2., völlig neu bearb. und erw. Aufl.; Dt. Apotheker-Verl., Stuttgart, 2010.
- (3) Aktories, K.; Forth, W. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker*; mit 305 Tabellen; [Plus im Web, mediscript], 11. überarb. Aufl.; Elsevier Urban & Fischer, München, 2013.
- (4) Vollmer, W.; Bertsche, U. *Biochimica et biophysica acta* **2008**, *1778*, 1714–1734.
- (5) Klebe, G. *Wirkstoffdesign: Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen*, 2. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2009.
- (6) Hall, B. G.; Barlow, M. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **2005**, *55*, 1050–1051.
- (7) Olsen, I. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* **2015**, *34*, 1303–1308.
- (8) Galleni, M.; Lamotte-Brasseur, J.; Rossolini, G. M.; Spencer, J.; Dideberg, O.; Frere, J. M. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2001**, *45*, 660–663.
- (9) Bebrone, C. *Biochemical pharmacology* **2007**, *74*, 1686–1701.
- (10) Zhang, H.; Hao, Q. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2011**, *25*, 2574–2582.
- (11) Crowder, M. W.; Spencer, J.; Vila, A. J. *Accounts of chemical research* **2006**, *39*, 721–728.
- (12) Kim, Y.; Cunningham, M. A.; Mire, J.; Tesar, C.; Sacchettini, J.; Joachimiak, A. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2013**, *27*, 1917–1927.
- (13) Groundwater, P. W.; Xu, S.; Lai, F.; Varadi, L.; Tan, J.; Perry, J. D.; Hibbs, D. E. *Future medicinal chemistry* **2016**, *8*, 993–1012.
- (14) Papp-Wallace, K. M.; Bonomo, R. A. *Infectious disease clinics of North America* **2016**, *30*, 441–464.
- (15) Haruta, S.; Yamaguchi, H.; Yamamoto, E. T.; Eriguchi, Y.; Nukaga, M.; O'Hara, K.; Sawai, T. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2000**, *44*, 2304–2309.
- (16) Koteva, K.; King, A. M.; Capretta, A.; Wright, G. D. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2016**, *55*, 2210–2212.

- (17) Toney, J. H.; Hammond, G. G.; Fitzgerald, P. M.; Sharma, N.; Balkovec, J. M.; Rouen, G. P.; Olson, S. H.; Hammond, M. L.; Greenlee, M. L.; Gao, Y. D. *The Journal of biological chemistry* **2001**, *276*, 31913–31918.
- (18) Fast, W.; Sutton, L. D. *Biochimica et biophysica acta* **2013**, *1834*, 1648–1659.
- (19) Kim, S.-K.; Sims, C. L.; Wozniak, S. E.; Drude, S. H.; Whitson, D.; Shaw, R. W. *Chemical biology & drug design* **2009**, *74*, 343–348.
- (20) Brem, J.; Cain, R.; Cahill, S.; McDonough, M. A.; Clifton, I. J.; Jimenez-Castellanos, J.-C.; Avison, M. B.; Spencer, J.; Fishwick, C. W. G.; Schofield, C. J. *Nature communications* **2016**, *7*, 12406.
- (21) Lienard, B. M. R.; Garau, G.; Horsfall, L.; Karsisiotis, A. I.; Damblon, C.; Lassaux, P.; Papamicael, C.; Roberts, G. C. K.; Galleni, M.; Dideberg, O.; Frere, J.-M.; Schofield, C. J. *Organic & biomolecular chemistry* **2008**, *6*, 2282–2294.
- (22) Klingler, F.-M.; Wichelhaus, T. A.; Frank, D.; Cuesta-Bernal, J.; El-Delik, J.; Muller, H. F.; Sjuets, H.; Gottig, S.; Koenigs, A.; Pos, K. M.; Pogoryelov, D.; Proschak, E. *Journal of medicinal chemistry* **2015**, *58*, 3626–3630.
- (23) Heinz, U.; Bauer, R.; Wommer, S.; Meyer-Klaucke, W.; Papamichaels, C.; Bateson, J.; Adolph, H.-W. *The Journal of biological chemistry* **2003**, *278*, 20659–20666.
- (24) King, D. T.; Worrall, L. J.; Gruninger, R.; Strynadka, N. C. J. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 11362–11365.
- (25) Li, N.; Xu, Y.; Xia, Q.; Bai, C.; Wang, T.; Wang, L.; He, D.; Xie, N.; Li, L.; Wang, J.; Zhou, H.-G.; Xu, F.; Yang, C.; Zhang, Q.; Yin, Z.; Guo, Y.; Chen, Y. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2014**, *24*, 386–389.
- (26) Mutschler, E. *Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie ; mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie ; 264 Tabellen und 1357 Strukturformeln, 9., vollst. neu bearb. und erw. Aufl.; Wiss. Verl.-Ges, Stuttgart, 2008.*
- (27) Brown, D. G.; May-Dracka, T. L.; Gagnon, M. M.; Tommasi, R. *Journal of medicinal chemistry* **2014**, *57*, 10144–10161.
- (28) L Orning, G Krivi, G Bild, J Gierse, S Aykent and F A Fitzpatrick. *The Journal of biological chemistry* **1991**, *266*, 16507–16511.
- (29) Vollrath, F.; Hawkins, N.; Porter, D.; Holland, C.; Boulet-Audet, M. *Scientific reports* **2014**, *4*, 5625.
- (30) Niesen, F. H.; Berglund, H.; Vedadi, M. *Nature protocols* **2007**, *2*, 2212–2221.
- (31) Praefcke, G. J. K., and C. Herrmann. *BIOspektrum* **2005**, 44–47.
- (32) Kerns, E. H.; Di, L.; Petusky, S.; Kleintop, T.; Huryn, D.; McConnell, O.; Carter, G. *Journal of Chromatography B* **2003**, *791*, 381–388.

- (33) Avdeef, A. *Absorption and drug development: Solubility, permeability, and charge state*; Wiley-Interscience, Hoboken, N.J., 2010.
- (34) Fernández, M.; Benito, M. J.; Martín, A.; Casquete, R.; Córdoba, J. J.; Córdoba, M. G. *Heliyon* **2016**, *2*, e00093.
- (35) Wittmann, S. K.; Kalinowsky, L.; Kramer, J. S.; Bloecher, R.; Knapp, S.; Steinhilber, D.; Pogoryelov, D.; Proschak, E.; Heering, J. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2016**, *24*, 5243–5248.
- (36) *US5602264 A*.
- (37) Clayden, J., Ed. *Organic chemistry*, Reprinted.; Oxford Univ. Press, Oxford, 2009.
- (38) Taschner, E.; Wasielewski, C.; Biernat, J. F. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1961**, *646*, 119–122.
- (39) Marco A. Ciufolini, Delphine Valognes, Ning Xi. *Tetrahedron Letters*, 1999, 3693–3696.
- (40) *PCT, WO 03068725A2*.
- (41) Frost, C.; Penrose, S.; Gleave, R. *Synthesis* **2009**, *2009*, 627–635.
- (42) Santagati, N. A.; Ferrara, G.; Marrazzo, A.; Ronsisvalle, G. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2002**, *30*, 247–255.
- (43) Jeffrey, G. A. *An introduction to hydrogen bonding*; Oxford Univ. Press, New York, 1997.
- (44) Johnson, D. A. *Metals and chemical change*; Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2002.
- (45) Ladbury, J. E. *Nature Reviews* **2010**, 23–27.
- (46) Lo, M.-C.; Aulabaugh, A.; Jin, G.; Cowling, R.; Bard, J.; Malamas, M.; Ellestad, G. *Analytical biochemistry* **2004**, *332*, 153–159.
- (47) Bisswanger, H. *Enzyme kinetics: Principles and methods*, 2nd. rev. and updated ed.; Wiley-VCH, Weinheim (Federal Republic of Germany), 2008.

9. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Ich versichere, die Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis beachtet und nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben. Die Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form oder auszugsweise im Rahmen einer anderen Prüfung nicht vorgelegt worden.

Frankfurt am Main, den 30.05.2017:

.....

10. Lebenslauf

Personalien

Name: Dominik Büttner
Adresse: Offenbacher Straße 131
63263 Neu-Isenburg

Ausbildung

Seit 04/2013 Goethe-Universität Frankfurt
Doktorand am Institut für pharmazeutische Chemie
Arbeitsgruppe von Jun. Prof. Dr. Ewgenij Proschak

10/2004-03/2012 Goethe-Universität Frankfurt
Diplom Chemie (Nebenfach: Medizinische Chemie)
Gesamtnote: 1.2
Diplomarbeit am Institut für pharmazeutische Chemie
Arbeitsgruppe von Jun. Prof. Dr. Ewgenij Proschak
Titel: „Design und Synthese von Styrylbenzimidazolen als sEH-
Inhibitoren mit antiproliferativen Eigenschaften“

08/1994-07/2003 Goethe-Gymnasium, Neu-Isenburg
Abitur
Note: 2.5

Berufserfahrung

08/2013-04/2013 Goethe-Universität und Klinikum der Goethe Universität Frankfurt
Wissenschaftlicher Mitarbeiter

10/2004-07/2008 Bewachungsinstitut Eufinger GmbH

Zivildienst

10/2003-07/2004 Klinikum Offenbach
 Hausapotheke

Sprachen

Deutsch (Muttersprache)
Englisch (fließend)
Latinum

Persönliche Interessen

Mitglied der Freiwilligen Feuerwehr Neu-Isenburg
Laufsport
Lesen
Kochen
Brettspiele

Konferenzbesuche

- Discovery Chemistry Congress, März 2012, München, Deutschland
- Novel Agents Against Infectious Diseases, November 2013, Würzburg, Deutschland
- 23rd International Symposium on Medicinal Chemistry, September 2014, Lissabon, Portugal
- DPhG Jahrestagung, September 2014, Frankfurt, Deutschland
- Frontiers in Medicinal Chemistry, März 2016, Bonn, Deutschland
- DPhG Doktorandentagung 2017, März 2017, Frankfurt am Main, Deutschland

11. Publikationen

Franca-Maria Klingler, Daniel Moser, Dominik Büttner, Thomas A. Wichelhaus, Frank Löhr, Volker Dötsch, Ewgenij Proschak, Probing metallo- β -lactamases with molecular fragments identified by consensus docking, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 25, **2015**, 5243–5246.

Estel la Buscató & Dominik Büttner, Astrid Brüggerhoff, Franca-Maria Klingler, Julia Weber, Bastian Scholz, Aleksandra Zivkovic, Rolf Marschalek, Holger Stark, Dieter Steinhilber, Helge B. Bode, Ewgenij Proschak. From a Multipotent Stilbene to Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors with Antiproliferative Properties, *ChemMedChem*, **2013**, 8, 6, 919-923.

12. Danksagung

Ich hatte die große Ehre, quasi als Bindeglied, zwei Generationen von Mitgliedern der Arbeitsgruppe Proschak erleben zu dürfen. Daher gilt es nun einer Menge Leute, welchen alle ihren Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, meinen Dank auszusprechen.

Zu allererst möchte ich Juniorprofessor Dr. Ewgenij Proschak meinen tiefen Dank dafür aussprechen, dass ich diese Arbeit unter seiner Betreuung durchführen durfte. Danke für die ehrliche und aufrechte Unterstützung, das Vertrauen und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Einen besonderen Dank möchte ich an Prof. Dr. Dr. Thomas Wichelhaus richten. Danke für die Begutachtung meiner Arbeit, die Erfahrungen, Vorträge und Diskussionen am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, sowie für jedwede Unterstützung.

Ein herzliches Dankeschön an die 1. Generation von Doktoranden im Arbeitskreis. Danke an Dr. Franca Klingler für die gemeinsame Zeit und Unterstützung am MBL-Projekt, die gemeinsamen Konferenzen, das Rücken freihalten und die gelebte Diplomatie. Danke an Julia Weber, Janosch Achenbach und Daniel Moser (allesamt Dr.) für den bioinformatischen Support, die Lehr- und stets hilfreichen Weisheiten und die unbeschreibliche Geduld. Vielen Dank an Dr. Sandra Wittmann für ACE, LTA₄H, ehrliche Worte und gemeinsames Durchhalten. Danke auch an Steffen Hahn für biochemische und kulinarische Einblicke und Dr. Rene Blöcher für die gemeinsame Zeit im Synthie-Lab. Allen zusammen einen Dank für Kaffee, Sonnendeck, Weihnachten, den Blog der Weisheiten und Eierlikör (u.a.).

Einen zumindest ebenso herzlichen Dank an die Folgegeneration. Danke an Jan Kramer für biochemische Unterstützung, Optimierungspläne, Abenteuerausflüge und Unverzagtheit. Danke an Lena Kalinowski für Bilder, Organisation, kulinarischen Disput und freundschaftliche Worte. Danke an Felix Lillich für immer helfende Hände, fachliche Diskussionen und alles Leckere. Danke an Markus Hartmann für fachliche und chemische Unterstützung, HPLC-Support, unerschütterliche Ruhe, wissendes Grinsen und Katzen. Vielen Dank an Kerstin Hiesinger für stete Hilfsbereitschaft, klare Ansagen, Körpertreffer, offene Ohren und immer da sein, kurz: für Deine Freundschaft. Allen zusammen Danke für Zusammenhalten, Kaffee und Wizzard.

Danke auch an Daniel Kohnhäuser für chemische Grundsatzdiskussionen und überraschende Ideen. Danke an Theresa Kircher für tiefgründige (Fach)-Gespräche und, aha, Granatapfel.

Einen besonderen Dank an meinen treuen Wegbegleiter Christian Kurz für all die gemeinsamen Jahre, die Erfolge und ~~Misserfolge~~ Erfahrungen, verjüngende und humoristische Abenteuer, nasale Überraschungen, Alu-Folie, Kürbissuppe und für ewig gute Laune!

Meinen tiefen Dank an das Team vom Synthie-Sommer 2015 für Abkühlung, geniale Ideen, deren grandiose Umsetzungen, infantile An- und Ausfälle, gemeinsames Aufräumen und einfach eine geile Zeit.

Ein weiterer besonderer Dank an die Monster AG für Geduld, Unterstützung und nicht auffressen.

Danke an die Special Force 3. Semester, bestehend aus Käpt'n Dr. Thomas Hanke, Kerstin Hiesinger, Felix Lillich, Sun-Yee Cheung, Sandra Röhm, Marek Wanior und die Mitstreiter a.D. Dr. Andreas Lill und Dr. Stefano Woltersdorf.

Danke an Astrid Brüggerhoff, Sven George, Renate Halfmann, Elke Schniebs, Katrin Carlsburg und alle, ohne deren Anwesenheit nichts mehr funktioniert.

Danksagung

Danke an Lilia Weizel für unzählige Testungen und gemeinsame Busfahrten. Danke an Dr. Uwe Hener für fachliche Unterstützung rund um Massenspektroskopie und HPLC. Und für Kekse. Danke an Denia Frank für die umfangreichen Testungen.

Danke an meine Freunde und die FF Neu-Isenburg für Unterstützung und die Erinnerung, dass Köpfchen viel, aber nicht alles ist.

Vielen lieben Dank an meine Eltern und meine Schwestern. Danke für eure liebevolle Unterstützung und euren Rückhalt!

Von ganzem Herzen Danke an Michaela und Viola für Geduld, Verständnis, Liebe, Unterstützung, zuhören und Knuddeln!

13. Anhang

DOI: 10.1002/cmdc.201300057

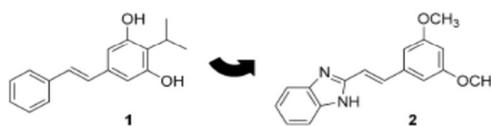
From a Multipotent Stilbene to Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors with Antiproliferative Properties

Estel.la Buscató,^[a] Dominik Büttner,^[a] Astrid Brüggerhoff,^[a] Franca-Maria Klingler,^[a] Julia Weber,^[a] Bastian Scholz,^[b] Aleksandra Živković,^[a] Rolf Marschalek,^[b] Holger Stark,^[a] Dieter Steinhilber,^[a] Helge B. Bode,^[c] and Ewgenij Proschak^{*[a]}

Inhibitors of soluble epoxide hydrolase (sEH) are in the focus of pharmaceutical research for numerous indications including cardiovascular disorders, diabetes and inflammatory processes.^[1–5] sEH is an enzyme located in the branch of the arachidonic acid cascade that hydrolyses the epoxyeicosatrienoic acids (EETs),^[6] products resulting from CYP epoxygenases, into dihydroxyeicosatrienoic acids (DHETs). Although several inhibitors reached clinical trials, the role of EETs and sEH in cancer growth and metastasis remains rather ambiguous.^[7] Using genetic and pharmacological alteration of EET levels, it has been demonstrated that EETs are critical for primary tumor growth and metastasis in mouse models of cancer.^[8] EETs promote metastasis by triggering secretion of the vascular endothelial growth factor (VEGF) by the endothelium, which is critical for EET cancer stimulating activity. The postulated mechanism^[9] for EETs to promote tumor growth is via epidermal growth factor receptor/phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B (EGFR/PI3K/Akt) and EGFR/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways^[10] to promote cancer cell survival. However, sorafenib,^[11,12] which was originally designed as a multikinase inhibitor,^[13] was found to inhibit sEH in the nanomolar concentration range, which contributes to its profile in vivo.^[14,15] Looking at these studies concisely, EETs act as a double-edged sword in cancer development and treatment.

Polypharmacological compounds have gained special attention in the field of cancer treatment due to the complexity of pathways involved in cancer pathogenesis.^[16–18] Natural products are one of the major sources for novel antiproliferative compounds, exhibiting various modes of cytostatic action.^[19] Often natural products exhibit polypharmacological activity,

targeting several pathways relevant^[20] for cancer pathogenesis.^[21,22] The principle of addressing multiple targets by natural products can be transferred to synthetic multitarget ligands.^[23] In this study, we intended to discover chemical compounds exhibiting cytotoxic profiles and simultaneously targeting sEH. We started with a small library of compounds isolated from entomopathogenic bacteria, namely *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*.^[24] These bacteria live in symbiosis with soil-dwelling nematodes and together are able to infect and kill different insect larvae^[25,26] using protein toxins but also small molecules. Key compounds required to evade the insect immune system are phenoloxidase inhibitors, with rhabduscin as the most prominent example.^[27] Assuming that also other insect enzymes, like juvenile hormone epoxide hydrolase (JHEH),^[28] are targeted by *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* natural products, we analyzed our in-house compound library against the JHEH-related target sEH. We found that the pluripotent isopropylstilbene (IPS, 1) from *Photorhabdus*^[29] exhibited the desired properties by inhibiting sEH with an IC₅₀ value of 10 μM (Table 1, Scheme 1).



Scheme 1. Natural product inspired design of stilbene-derived sEH inhibitors.

Stilbenes like resveratrol^[30,31] or erbstatin^[32] are known to possess chemopreventive or antiproliferative properties. Similarly, IPS exhibited a wide range of antiproliferative properties on different cancer cell lines, including HepG2 (hepatocarcinoma), HeLa (cervical cancer), MCF-7 (breast adenocarcinoma), A498 (renal carcinoma) and U937 (histiocytic lymphoma; Table 2).

The synthesis of IPS is not straightforward,^[33] therefore, we followed the natural product inspired approach and intended to identify compounds with similar properties and simple synthetic accessibility. We screened a small collection of compounds exhibiting the stilbene scaffold (chalcones and resveratrol analogues) which was available in-house (Supporting Information, SF 3). We identified (*E*)-styryl-1*H*-benzo[*d*]imidazoles as analogues of IPS that carry a benzimidazole moiety, which was previously identified as a novel sEH pharmacophore in our

[a] E. Buscató,^{*} D. Büttner,^{*} A. Brüggerhoff, F.-M. Klingler, J. Weber, Dr. A. Živković, Prof. Dr. H. Stark, Prof. Dr. D. Steinhilber, Prof. Dr. E. Proschak
Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe Universität Frankfurt am Main
Max-von-Laue Str. 9, 60438 Frankfurt am Main (Germany)
E-mail: proschak@pharmchem.uni-frankfurt.de

[b] B. Scholz, Prof. Dr. R. Marschalek
Institut für Pharmazeutische Biologie
Goethe Universität Frankfurt am Main
Max-von-Laue Str. 9, 60438 Frankfurt am Main (Germany)

[c] Prof. Dr. H. B. Bode
Merck Stiftungsprofessur für Molekulare Biotechnologie
Fachbereich Biowissenschaften, Goethe Universität Frankfurt am Main
Max-von-Laue Str. 9, 60438 Frankfurt am Main (Germany)

[*] These authors contributed equally to this work.

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.201300057>.

Compd	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ [μM] ^[b]	Compd	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ [μM] ^[b]
AUDA	–	–	–	0.1 ± 0.01	74	3-(pyridin-3-yl)	H	H	0.8 ± 0.23
IPS (1)	–	–	–	10.0 ± 0.96	75	3-DHBD ^[c]	H	H	1.5 ± 0.36
3	H	H	H	5.9 ± 0.60	31	4-F	H	H	6.1 ± 0.45
7	2-CF ₃	H	H	0.6 ± 0.13	34	4-CF ₃	H	H	6.5 ± 0.50
10	2-NO ₂	H	H	2.0 ± 0.39	37	4-OCH ₃	H	H	7.5 ± 1.52
13	2-OCH ₃	H	H	18.3 ± 1.35	40	4-NO ₂	H	H	9.8 ± 3.94
16	2-Cl	H	H	1.7 ± 0.12	43	2-OCH ₃	5-OCH ₃	H	17.3 ± 3.11
19	2-F	H	H	2.6 ± 0.21	46	3-OCH ₃	4-OCH ₃	H	4.3 ± 0.57
22	2-Br	H	H	32.1 ± 10.10	2	3-OCH ₃	5-OCH ₃	H	5.4 ± 0.74
25	3-Cl	H	H	1.4 ± 0.11	49	4-Cl	2-Cl	H	9.7 ± 0.32
28	3-Br	H	H	4.3 ± 0.49	52	2-CF ₃	H	3-F	1.9 ± 0.16
29	3-NO ₂	H	H	4.6 ± 0.03	55	2-CF ₃	H	3-CH ₃	1.6 ± 0.37
30	3-OCH ₃	H	H	5.8 ± 1.73	58	2-CF ₃	H	3-Cl	2.7 ± 0.76
73	3-(furan-2-yl)	H	H	1.2 ± 0.16	61	2-CF ₃	H	3-OCH ₃	4.9 ± 1.10

[a] Structures are given in Schemes 2–3 and full chemical names can be found in the Supporting Information. [b] Data are the mean ± SD of sEH inhibition of three different experiments. IC₅₀ values were determined with recombinant sEH using PHOME as substrate. [c] DHBD: 3-(2,3-dihydrobenzo[*b*][1,4]dioxin-6-yl).

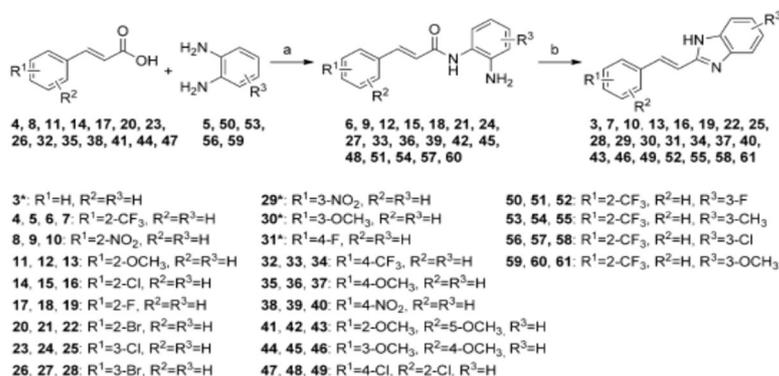
Compd	EC ₅₀ [μM] ^[a]					
	HepG2	HeLa	MCF-7	A498	U937	
IPS (1)	4.7 ± 0.94	10.4 ± 2.00	ia	n.d. (73.1% ± 14.65) ^[b]	2.7 ± 0.27	
16	n.d. (115.1% ± 7.21) ^[b]	n.d. (63.3% ± 28.91) ^[b]	n.t.	n.d. (111.8% ± 17.09) ^[b]	1.1 ± 0.11	
19	4.7 ± 0.25	n.d. (18.0% ± 5.20) ^[b]	n.t.	n.d. (96.1% ± 19.23) ^[b]	2.1 ± 0.11	
74	21.8 ± 5.31	18.4 ± 5.49	15.7 ± 2.43	n.d. (26.3% ± 1.00) ^[b]	10.2 ± 0.23	
75	21.0 ± 2.38	19.8 ± 3.03	15.1 ± 1.04	n.d. (50.7% ± 10.42) ^[b]	9.2 ± 0.51	

[a] All EC₅₀ values were determined by at least three independent experiments using WST-1 cell viability assay and are expressed as EC₅₀ ± SD. Abbreviations: n.d. = not determinable, n.t. = not tested, ia = inactive at 30 μM. [b] Cell viability [%] at 30 μM.

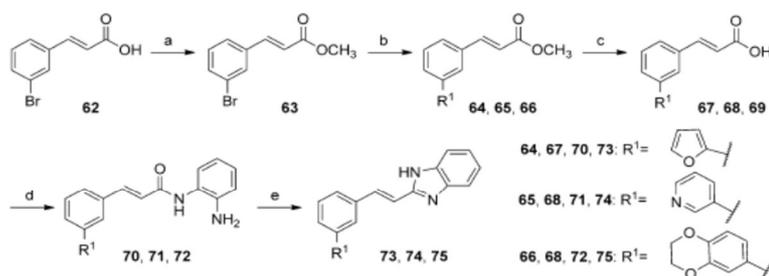
group.^[34] The introduction of a benzimidazole does not abolish the desired antiproliferative properties, since this class of compounds showed a wide spectrum of pharmacological characteristics,^[35] including antiallergic, analgesic, anti-inflammatory and antibacterial activities. Compound 2 inhibited sEH with an IC₅₀ value of 5.4 μM and was used as a starting point for further optimization.

For the synthesis of a compound collection based on an (*E*)-benzimidazole stilbene scaffold, we used a previously published^[36] procedure (Scheme 2) that involves the condensation of substituted *o*-phenylenediamine 5, 50, 53, 56, or 59 with the appropriately substituted (*E*)-cinnamic acid derivative 4, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 32, 35, 38, 41, 44, or 47 in the presence of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-

wave radiation. Compounds 3, 29, 30 and 31 were purchased. Inhibitory activity of styryl benzimidazole derivatives was investigated on human recombinant sEH expressed in *E. coli*^[37]



Scheme 2. Synthesis of (*E*)-styryl-1*H*-benzo[*d*]imidazoles. Reagents and conditions: a) EDC (1.5 equiv), DMAP (0.05 equiv), imidazole (0.05 equiv), RT, 4 h, 21–84%; b) 6 M aq HCl, EtOH, 120 °C, 10 min, MW, 20–92%. Compounds 3, 29, 30, and 31 were purchased.



Scheme 3. Synthesis of (*E*)-styryl-1*H*-benzo[d]imidazoles **73**, **74** and **75** through introduction of aromatic residues at position 3. **Reagents and conditions:** a) MeOH, H₂SO₄ (0.1 equiv), reflux, 16 h, 70%; b) R¹-B(OH)₂ (2.0 equiv), Pd(PPh₃)₄ (0.1 equiv), 1 M aq Na₂CO₃, toluene/EtOH (4:1), 85 °C, 16 h, 26–49%; c) KOH (2.85 equiv), MeOH, 25 °C, 3.5 h, 64–95%; d) EDC (1.5 equiv), DMAP (0.05 equiv), *o*-phenylenediamine (1.0 equiv), imidazole (0.05 equiv), RT, 4 h, 8–32%; e) 6 M aq HCl, EtOH, 120 °C, 10 min, MW, 34–63%.

using a synthetic epoxide as a substrate (3-phenyl-cyano(6-methoxy-2-naphthalenyl)methyl ester-2-oxiraneacetic acid, PHOME).^[38] As shown in Table 1, we examined the different substitutions at the phenyl ring of the styryl moiety (western part) and the substitutions at the benzimidazole scaffold (eastern part). Regarding the western part of the molecule, several compounds were synthesized bearing *ortho*, *meta* and *para* substitutions. *Ortho*-substituted compounds (**7**, **10**, **13**, **16**, **19**) yielded highest inhibitory activity, with the exception of bromo-substituted **22**. Electron-donating groups like methoxy (compound **13**) were less tolerated (IC₅₀ = 18.3 μM), and the best inhibition was obtained with trifluoromethyl-substituted compound **7** (IC₅₀ = 0.6 μM). Unsubstituted compound **3** resulted in a 10-fold loss of potency compared with the best compound **7**. With the exception of bromo-substituted **22** (IC₅₀ = 32.1 μM), halogen groups in the *ortho* position exhibited moderate inhibition with IC₅₀ values in the range of 1.7 to 2.6 μM.

Lower inhibitory activity was observed for **29** and **30**, indicating that *meta* substitution is less favored than *ortho* substitution. However, we confirmed the tendency concerning the electron-donating properties of the substituent, as compound **30** decreases the inhibitory activity (IC₅₀ = 5.8 μM). The introduction of heterocyclic moieties, such as furane (**73**), pyridine (**74**) or 2,3-dihydrobenzo[*b*][1,4]dioxine (**75**), increased the inhibitory potency (**73**: IC₅₀ = 1.2 μM, **74**: IC₅₀ = 0.8 μM, **75**: IC₅₀ = 1.5 μM, Table 1). In contrast to the positive substituent effect observed for *ortho*-substituted compounds, *para*-substitution pattern resulted in a weaker inhibitory activity regardless of the electron-donating nature of the substituent.

Additionally, double substitution at the phenyl moiety was explored and led to a decrease in the inhibitory activity. 2,5-Methoxy-substituted compound **43** (IC₅₀ = 17.3 μM) exhibited the lowest inhibitory activity, which could be restored by a 3,4-dimethoxy (**46**, IC₅₀ = 4.3 μM) or 3,5-dimethoxy substitution pattern (**2**, IC₅₀ = 5.2 μM). The potency was not completely restored by exchanging the methoxy groups to a 3,4-dichloro pattern (**49**, IC₅₀ = 9.7 μM).

After exploring the phenyl moiety, we could conclude that the best substitution pattern was *ortho*-trifluoromethyl (compound **7**, IC₅₀ = 0.6 μM). Therefore, derivatives of compounds bearing altered eastern substitution were synthesized. Electron-donating groups as in methoxy-substituted **61** (IC₅₀ = 4.9 μM) exhibited inhibitory activity; however, **52** (IC₅₀ = 1.9 μM), **55** (IC₅₀ = 1.6 μM) and **58** (IC₅₀ = 2.7 μM) bearing electron-withdrawing groups partially restored the activity.

The structure–activity relationship (SAR) of the investigated styryl benzimidazoles on sEH are

rather flat, which correlates with the possible binding mode proposed by the molecular docking experiment of the most potent compound **7** (Figure 1, see the Supporting Information

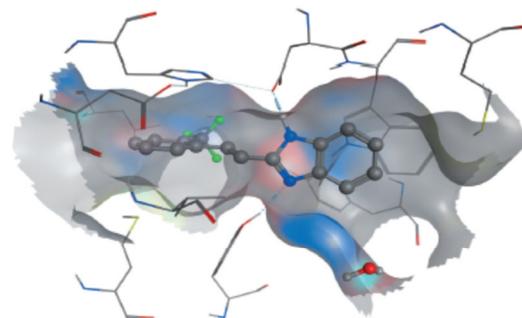


Figure 1. Docking pose of (*E*)-styryl-1*H*-benzo[d]imidazole **7** in the binding pocket of the catalytic domain of sEH (PDB: 3K0D).

for details). Both nitrogen atoms of the benzimidazole core seem to interact with the catalytic center of sEH (Tyr381, Asp333, Tyr465). The largest part of the benzimidazole scaffold is enclosed in the Trp334 niche (15 Å) capable for aryl interactions. The phenyl moiety showed π-stacking with Met419^[39] and His524, and the benzimidazole core showed π-stacking with Trp334. The additional space around both aromatic cores correlates with the high tolerability of different substituents, as demonstrated by the SAR.

We evaluated the effect of compounds IPS (**1**; IC₅₀ = 10.0 μM), **16** (IC₅₀ = 1.7 μM), **19** (IC₅₀ = 2.6 μM), **74** (IC₅₀ = 1.2 μM) and **75** (IC₅₀ = 0.8 μM) on cell viability of several cancer lines (Table 2). IPS inhibited the proliferation activity of all cell lines except MCF-7. In the water-soluble tetrazolium salt (WST-1) assay, EC₅₀ values were in the range of 2.7 to 10.4 μM. *Ortho*-substituted compounds **16** and **19** affected the proliferation

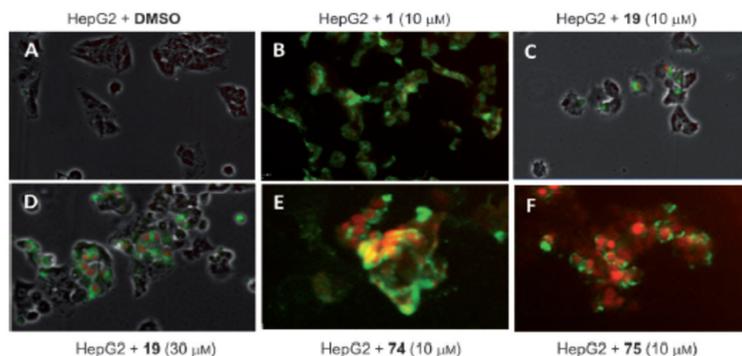


Figure 2. Annexin V/PI staining of HepG2 cells incubated with A) 1% DMSO for 48 h, B) 1 (10 μM) for 24 h, C) 19 (10 μM) for 48 h, D) 19 (30 μM) for 48 h, E) 74 (10 μM) for 24 h, F) 75 (10 μM) for 24 h.

activity of HeLa and U937 (suspension cells). *Ortho*-fluoro-substituted compound 19 inhibited cell proliferation of HepG2 (EC_{50} = 4.7 μM) and U937 (EC_{50} = 2.1 μM) and slightly of HeLa cells (30 μM , 18%).

Compounds 74 and 75 affected the cell growth of the different cancer cell lines to a lesser extent. Compound 74 inhibited the growth of HepG2 (EC_{50} = 21.8 μM), HeLa (EC_{50} = 18.4 μM), MCF-7 (EC_{50} = 15.7 μM), U937 (EC_{50} = 10.2 μM), and to some extent A498 cell lines (resulting in only 26% cell viability at 30 μM). Similarly, compound 75 displayed inhibitory activity on all cancer cell lines. EC_{50} values ranged from 9.2 to 21.5 μM (Table 2). Interestingly all compounds inhibited the cell proliferation of suspension cells U937.

In order to distinguish between an apoptotic or necrotic mechanism, we stained HepG2 cells after treatment with compounds 19, 74 and 75 during 24–48 h with annexin V/propidium iodide (PI; Figure 2). Cells treated with 19 clearly showed apoptosis in a concentration-dependent manner compared to vehicle (dimethyl sulfoxide) after staining. With compound 74 cells showed progressing apoptosis, whereas cells treated with 75 showed a more late apoptotic/necrotic phenotype over the same time course. IPS (1)-treated cells were clearly early apoptotic.

In conclusion, inspired by the initial hit compound, IPS, a series of (*E*)-styryl-1*H*-benzo[*d*]imidazole derivatives were synthesized and evaluated with recombinant sEH, which led to potent sEH inhibitors exhibiting antiproliferative activities. Although the benzimidazole stilbenes presented in this work do not reach the picomolar potencies of urea-based sEH inhibitors,^[3] they represent an unprecedented scaffold for further development. Following the approach of natural product inspired design recently proposed by Waldmann et al.,^[40] we were able to transfer and even enhance the desired biological activity from a bacterial secondary metabolite to a synthetic compound series. The resulting compounds are accessible via a facile synthetic route and offer the possibility to investigate structure–activity relationships. The natural product inspired drug design extends the valuable role of natural products as

drugs and drug precursors to templates for fully synthetic bioactive molecules.

Acknowledgements

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (PR 1405/2-1), LOEWE Schwerpunkt Insektenbiotechnologie (to H.B.B.), Oncogenic Signaling Frankfurt (OSF), Deutsches Konsortium für Translationale Krebsforschung (DKTK), and LOEWE-Schwerpunkt, Anwendungsorientierte Arzneimittelforschung. E.B. thanks the Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD)-La Caixa, J.W. thanks Beilstein Institute for a fellowship.

Keywords: benzimidazoles · cancer · polypharmacology · soluble epoxide hydrolase · stilbenes

- [1] A. E. EnayetAllah, A. Luria, B. Luo, H.-J. Tsai, P. Sura, B. D. Hammock, D. F. Grant, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 36592–36598.
- [2] O. Jung, F. Jansen, A. Mieth, E. Barbosa-Sicard, R. U. Pliquett, A. Babelova, C. Morisseau, S. H. Hwang, C. Tsai, B. D. Hammock, L. Schaefer, G. Geisslinger, K. Amann, R. P. Brandes, *PLoS One* **2010**, *5*, e11979.
- [3] H. C. Shen, B. D. Hammock, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1789–1808.
- [4] W. Zhang, L. P. Koemer, R. Noppens, M. Grafe, H.-J. Tsai, C. Morisseau, A. Luria, B. D. Hammock, J. R. Falck, N. J. Alkayed, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2007**, *27*, 1931–1940.
- [5] J. D. Imig, B. D. Hammock, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2009**, *8*, 794–805.
- [6] C. Morisseau, B. D. Hammock, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2013**, *53*, 37–58.
- [7] D. Wang, R. N. Dubois, *J. Clin. Invest.* **2012**, *122*, 19–22.
- [8] D. Panigrahy, M. L. Edin, C. R. Lee, S. Huang, D. R. Bielenberg, C. E. Butterfield, C. M. Barnés, A. Mammoto, T. Mammoto, A. Luria et al., *J. Clin. Invest.* **2012**, *122*, 178–191.
- [9] L. Liu, C. Chen, W. Gong, Y. Li, M. L. Edin, D. C. Zeldin, D. W. Wang, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2011**, *339*, 451–463.
- [10] L. Cheng, J. Jiang, Z. Sun, C. Chen, R. T. Dackor, D. C. Zeldin, D. Wang, *Acta Pharmacol. Sin.* **2010**, *31*, 211–218.
- [11] B. I. Rini, *Expert Opin. Pharmacother.* **2006**, *7*, 453–461.
- [12] S. Wilhelm, C. Carter, M. Lynch, T. Lowinger, J. Dumas, R. A. Smith, B. Schwartz, R. Simantov, S. Kelley, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 835–844.
- [13] T. Ahmad, T. Eisen, *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 6388S–6392S.
- [14] H. Inoue, S. H. Hwang, A. T. Weckler, B. D. Hammock, R. H. Weiss, *Cancer Biol. Ther.* **2011**, *12*, 827–836.
- [15] J.-Y. Liu, S.-H. Park, C. Morisseau, S. H. Hwang, B. D. Hammock, R. H. Weiss, *Mol. Cancer Ther.* **2009**, *8*, 2193–2203.
- [16] Z. A. Knight, H. Lin, K. M. Shokat, *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 130–137.
- [17] A. C. Dar, T. K. Das, K. M. Shokat, R. L. Cagan, *Nature* **2012**, *486*, 80–84.
- [18] A. L. Hopkins, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 682–690.
- [19] M. W. Karaman, S. Herrgard, D. K. Treiber, P. Gallant, C. E. Atteridge, B. T. Campbell, K. W. Chan, P. Ciceri, M. I. Davis, P. T. Edeen et al., *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 127–132.
- [20] J. Mestres, E. Gregori-Puigjané, S. Valverde, R. V. Solé, *Mol. Biosyst.* **2009**, *5*, 1051–1057.
- [21] J. Mann, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 143–148.
- [22] A. Nagle, W. Hur, N. S. Gray, *Curr. Drug Targets* **2006**, *7*, 305–326.

- [23] T. Voigt, C. Gerding-Reimers, T. T. Ngoc Tran, S. Bergmann, H. Lachance, B. Schölermann, A. Brockmeyer, P. Janning, S. Ziegler, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 428–432; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 410–414.
- [24] H. B. Bode, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 224–230.
- [25] K. E. Murfin, A. R. Dillman, J. M. Foster, S. Bulgheresi, B. E. Slatko, P. W. Sternberg, H. Goodrich-Blair, *Biol. Bull.* **2012**, *223*, 85–102.
- [26] N. R. Waterfield, T. Ciche, D. Clarke, *Annu. Rev. Microbiol.* **2009**, *63*, 557–574.
- [27] J. M. Crawford, C. Portmann, X. Zhang, M. B. J. Roeffaers, J. Clardy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 10821–10826.
- [28] S. Debemard, C. Morisseau, T. F. Severson, L. Feng, H. Wojtasek, G. D. Prestwich, B. D. Hammock, *Insect Biochem. Mol. Biol.* **1998**, *28*, 409–419.
- [29] S. A. Joyce, A. O. Brachmann, I. Glazer, L. Lango, G. Schwär, D. J. Clarke, H. B. Bode, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1968–1971; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1942–1945.
- [30] M. Jang, L. Cai, G. O. Udeani, K. V. Slowing, C. F. Thomas, C. W. Beecher, H. H. Fong, N. R. Farnsworth, A. D. Kinghorn, R. G. Mehta, R. C. Moon, J. M. Pezzuto, *Science* **1997**, *275*, 218–220.
- [31] O. P. Mgbonyebi, J. Russo, I. H. Russo, *Int. J. Clin. Oncol.* **1998**, *12*, 865–869.
- [32] M. Imoto, K. Umezawa, K. Komuro, T. Sawa, T. Takeuchi, H. Umezawa, *Jpn. J. Cancer Res.* **1987**, *78*, 329–332.
- [33] G. Chen, J. M. Webster, J. Li, K. Hu, W. Liu, J. Zhu, *Anti-inflammatory and Psoriasis Treatment and Protein Kinase Inhibition by Hydroxy Stilbenes and Novel Stilbene Derivatives and Analogues*, US 2005/0059733, 2004.
- [34] D. Moser, J. M. Wisniewska, S. Hahn, J. Achenbach, E. Buscató, F.-M. Klingler, B. Hofmann, D. Steinhilber, E. Proschak, *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 155–158.
- [35] Y. Bansal, O. Silakari, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 6208–6236.
- [36] D. van den Berg, K. R. Zoellner, M. O. Ogunrombi, S. F. Malan, G. Terre' Blanche, N. Castagnoli, J. J. Bergh, J. P. Petzer, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 3692–3702.
- [37] S. Hahn, J. Achenbach, E. Buscató, F.-M. Klingler, M. Schroeder, K. Meirer, M. Hieke, J. Heering, E. Barbosa-Sicard, F. Loehr, I. Fleming, V. Doetsch, M. Schubert-Zsilavec, D. Steinhilber, E. Proschak, *ChemMedChem* **2011**, *6*, 2146–2149.
- [38] C. Morisseau, M. Bemay, A. Escaich, J. R. Sanborn, J. Lango, B. D. Hammock, *Anal. Biochem.* **2011**, *414*, 154–162.
- [39] L. M. Salonen, M. Ellermann, F. Diederich, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 4908–4944; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4808–4842.
- [40] S. Wetzel, R. S. Bon, K. Kumar, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 10990–11018; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 10800–10826.

Received: February 6, 2013

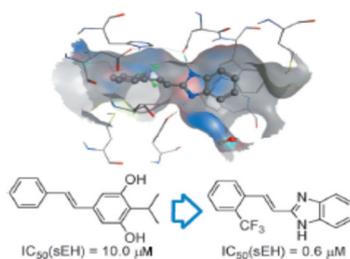
Published online on ■■■■■ 0000

COMMUNICATIONS

E. Buscató, D. Büttner, A. Brüggerhoff,
F.-M. Klingler, J. Weber, B. Scholz,
A. Živković, R. Marschalek, H. Stark,
D. Steinhilber, H. B. Bode, E. Proschak*

■■■-■■■

From a Multipotent Stilbene to
Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors
with Antiproliferative Properties



Inspired by nature: Natural product isopropylstilbene was identified as an inhibitor of soluble epoxide hydrolase exhibiting antiproliferative properties. Following the natural product inspired design approach, a library of (*E*)-styryl-1*H*-benzo[*d*]imidazoles was synthesized and evaluated with recombinant enzyme and on several cancer cell lines.