

# Synthese von Benzothiazinonen und Derivaten als DprE1 Hemmstoffe mit antimykobakterieller Aktivität



## Dissertation

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften

der

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Adrian Richter

geboren am 14.11.1988 in Bad Frankenhausen

verteidigt am 27.03.2017

Gutachter 1:

Prof. Dr. Peter Imming

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Wolfgang-Langenbeck-Str. 4, 06120 Halle (Saale)

Gutachter 2:

Prof. Dr. Bernhard Westermann

IBP Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Weinberg 3, 06120 Halle (Saale)

Gutachter 3:

Prof. Dr. Martin Schlitzer

Philipps-Universität Marburg, Marbacher Weg 6, 35032 Marburg

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>i</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>xi</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>xiv</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>xvii</b>
<b>1 Die Erkrankung Tuberkulose und ihr Erreger <i>Mycobacterium tuberculosis</i></b>	<b>1</b>
1.1 Epidemiologie eines weltweiten Gesundheitsnotstandes	1
1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> als Krankheitserreger	2
1.3 Die mykobakterielle Zellwand - Schutzschicht und Arzneistofftarget	5
1.4 Pharmakotherapie der Infektionskrankheit Tuberkulose	7
<b>2 Das Enzym DprE1 als bemerkenswertes Target</b>	<b>10</b>
2.1 Struktur und Funktion von DprE1	10
2.2 Irreversible DprE1 Hemmung - 8-Nitrobenzothiazinone	12
2.3 Reversible DprE1 Hemmung durch nicht-kovalente Inhibitoren	15
2.4 Zielstellung der Arbeit	17
<b>3 Synthesen</b>	<b>19</b>
3.1 Synthesewege der Benzothiazinone (BTZs)	19
3.1.1 Die Synthese von BTZ mittels des Thioharnstoffweges	20
3.1.2 Die klassische Synthese der BTZs	20
3.2 Synthese der Thioharnstoffe	21
3.2.1 Synthese von Thioharnstoffen mit Benzoylisothiocyanat (Methode A)	21
3.2.2 Synthese von Thioharnstoffen mit Trimethylsilylisothiocyanat (Methode B)	22
3.2.3 Synthese von Thioharnstoffen mit Thiocarbonyldiimidazol (Methode C)	23
3.2.4 Vergleich der Methoden zur Darstellung von Thioharnstoffen	23
3.3 Synthese neuer 8-Nitro BTZ Derivate	25
3.3.1 Synthese von BTZs mit 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin Substituenten	26
3.3.2 Synthese von BTZs mit N-Acylpiperazinsubstituenten	29
3.3.2.1 Modifizierter Syntheseweg für N-Acylpiperazin BTZs	32
3.3.2.2 Synthese von BTZs mit cyclopeptidischer Seitenkette	33
3.3.3 Synthese von BTZs mit Diazabicyclononansubstituenten	35
3.3.4 Synthese der Benzothiazinone mit Piperidinseitenkette	38

3.3.4.1 Herstellung des Sulfoxids und Sulfons aus <b>AR184</b>	41
3.3.4.2 Klassische BTZ Synthese von <b>AR120</b>	41
3.3.5 Herstellung von BTZs mit verschiedenen cyclischen Aminen als Seitenkette	43
3.3.6 Synthese von <b>BTZ043 (AR182)</b> über den Thioharnstoffweg	44
3.3.7 Synthese und Stabilitätsuntersuchung eines BTZthions	47
3.4 Synthese von Benzoxazinonen (BOZs)	50
3.5 Synthese von Benzazazinonen (BAZs)	51
3.6 Synthese von 8-Amino-, 8-Hydroxylamino- und 8-Nitroso-BTZs	52
3.7 Synthese von 8-Imido- und 8-Amido-BTZs	54
3.8 Synthese von 8-Cyano, 8-Formyl- und 8-Hydroxymethyl-BTZs	55
3.9 Synthese der aromatischen Ausgangsverbindung zur BTZ Herstellung	58
3.10 NMR Daten der dargestellten Verbindungen im Vergleich	59
3.10.1 Vergleich der NMR Daten von analogen BTZs, BOZs und BAZs	59
3.10.2 Vergleich der NMR Daten von BTZ und BTZthion	61
3.10.3 Vergleich der NMR Daten von Amino, Hydroxylamino, Nitroso und Nitro-BTZ	62
<b>4 Biologische Evaluierung der hergestellten Verbindungen</b>	<b>63</b>
4.1 Agardiffusionstest	63
4.2 Minimale Hemmkonzentrationen	68
4.3 Testung auf antiproliferative Aktivität und Zytotoxizität	72
<b>5 Charakterisierung von BTZs und BOZs am Target DprE1</b>	<b>75</b>
5.1 DprE1 Enzymassays - Aktivitätsunterschiede gegen das Targetenzym	75
5.1.1 Hemmkinetiken von BTZs bzw. BOZs verschiedener Aktivität gegen DprE1	77
5.1.2 Zeitabhängigkeit der DprE1 Hemmung	79
5.2 Ein neuer Mechanismus für kovalente DprE1 Hemmung - Hydroxylamino-BTZs als Substrate	81
5.3 BTZs und BOZs binden kovalent - Massenspektren	85
5.4 Kristallstrukturen verschiedener BOZs und BTZs	88
5.5 Vergleich zwischen DprE1 Hemmung und Wachstumshemmung im Zellassay	93
5.6 Bestimmung der Löslichkeit von BTZs/BOZs mit Hilfe von CLND Messungen	94

<b>6 Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>97</b>
6.1 Grundlagenforschung zu kovalenter DprE1 Hemmung	97
6.2 BTZs als hochwirksame Wirkstoffe	98
6.3 Synthese von BTZs und verwandten Verbindungen	99
6.4 Ausblick	100
<b>7 Experimenteller Teil</b>	<b>101</b>
7.1 Synthesen	101
7.1.1 Geräte und allgemeine Methoden	101
7.1.1.1 Allgemeine Methode 1 - Synthese von aromatischen Carbonsäurechloriden	103
7.1.1.2 Allgemeine Methode 2 - Synthese von Thioharnstoffen	103
7.1.1.3 Allgemeine Methode 3 - Synthese von Benzothiazinonen nach der Thioharnstoffmethode	103
7.1.1.4 Allgemeine Methode 4 - Synthese von Piperazinmonoamiden	103
7.1.2 Synthesevorschriften	104
7.1.2.1 1-(Cyclohexylmethyl)piperazin ( <b>AR75</b> )	104
7.1.2.2 4-(Cyclohexylmethyl)piperazin-1-thioharnstoff ( <b>AR76</b> )	105
7.1.2.3 2-[4-(Cyclohexylmethyl)piperazin-1-yl]-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3- benzothiazin-4-on hydrochlorid ( <b>AR77</b> )	106
7.1.2.4 4-(Cyclohexylmethyl)piperazin-1-harnstoff ( <b>AR78</b> )	107
7.1.2.5 2-[4-(Cyclohexylmethyl)piperazin-1-yl]-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3- benzoxazin-4-on ( <b>AR79</b> )	108
7.1.2.6 8-Amino-2-(piperidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on ( <b>AR81</b> )	109
7.1.2.7 8-(Hydroxyamino)-2-(piperidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3- benzothiazin-4-on ( <b>AR85</b> )	110
7.1.2.8 8-Nitroso-2-(piperidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on ( <b>AR86</b> )	111
7.1.2.9 2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure ( <b>AR96</b> )	112

7.1.2.10 8-(Hydroxyamino)-2-{2-methyl-1,4-dioxo-8-azaspiro[4.5]decan-8-yl}- 6(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on ( <b>AR97</b> )	113
7.1.2.11 2-{2-Methyl-1,4-dioxo-8-azaspiro[4.5]decan-8-yl}-8-nitroso-6- (trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on ( <b>AR98</b> )	114
7.1.2.12 3-Hydroxyazetidin-1-thioharnstoff ( <b>AR99</b> )	115
7.1.2.13 2-(3-Hydroxyazetidin-1-yl)-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3- benzothiazin-4-on ( <b>AR100</b> )	116
7.1.2.14 4-hydroxypiperidin-1-thioharnstoff ( <b>AR102</b> )	117
7.1.2.15 4-(Piperidin-1-yl)piperidin-1-thioharnstoff ( <b>AR103</b> )	118
7.1.2.16 Morpholin-4-thioharnstoff ( <b>AR104</b> )	119
7.1.2.17 4-[4-(Trifluormethoxy)phenoxy]piperidin-1-thioharnstoff ( <b>AR105</b> )	120
7.1.2.18 8-Nitro-2-{4-[4-(trifluormethoxy)phenoxy]piperidin-1-yl} -6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on ( <b>AR106</b> )	121
7.1.2.19 8-Nitro-2-[4-(piperidin-1-yl)piperidin-1-yl]-6-(trifluormethyl)-4H-1,3- benzothiazin-4-on ( <b>AR107</b> )	122
7.1.2.20 5-Benzyl-octahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2-thioharnstoff ( <b>AR109</b> )	123
2.1.2.21 2-(4-Hydroxypiperidin-1-yl)-8-nitro-6-(trifluormethyl)- 4H-1,3-benzothiazin-4-on ( <b>AR110</b> )	124
7.1.2.22 6-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-thioharnstoff ( <b>AR111</b> )	125
7.1.2.23 2-(6-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)- 8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on ( <b>AR112</b> )	126
7.1.2.24 2-{5-Benzyl-octahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2-yl}-8-nitro- 6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on ( <b>AR115</b> )	127
7.1.2.25 Piperidin-1-thioharnstoff ( <b>AR116</b> )	128
7.1.2.26 2-(2,6-Dimethylpiperidin-1-yl)-8-nitro-6-(trifluormethyl)- 4H-1,3-benzothiazin-4-on ( <b>AR120</b> )	129
7.1.2.27 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-2-harnstoff ( <b>AR122</b> )	130
7.1.2.28 N-[2-(4-Methoxyphenyl)ethyl]carbammat ( <b>AR123</b> )	130
7.1.2.29 7-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-1-on ( <b>AR124</b> )	131

7.1.2.30 8-Nitro-2-(1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)- 6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzoxazin-4-on (AR125)	132
7.1.2.31 7-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin (AR128)	133
7.1.2.32 7-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-thioharnstoff (AR129)	134
7.1.2.33 2-(7-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)-8-nitro- 6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR130)	135
7.1.2.34 3-Amino-2-chlor-5-(trifluormethyl)benzoesäure (AR131)	136
7.1.2.35 2-Chlor-3-cyano-5-(trifluormethyl)benzoesäure (AR132)	137
7.1.2.36 4-Oxo-2-(1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)- 6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazine-8-carbonitril (AR134)	138
7.1.2.37 4-Oxo-2-(1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3- benzothiazine-8-carbaldehyd (AR135)	139
7.1.2.38 1-[4-Oxo-2-(piperidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-8-yl]- 2,5-dihydro-1H-pyrrol-2,5-dion (AR140)	140
7.1.2.39 2-Chlor-3-formyl-5-(trifluormethyl)benzoesäure (AR143)	141
7.1.2.40 4-Oxo-2-(piperidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-8- carbaldehyd (AR145)	142
7.1.2.41 8-(Hydroxymethyl)-2-(piperidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H- 1,3-benzothiazin-4-on (AR146)	143
7.1.2.42 1-(Piperazin-1-yl)-2-propylpentan-1-on (AR147)	144
7.1.2.43 N-[4-(Methylsulfanyl)-1-oxo-1-(piperazin-1-yl) butan-2-yl]acetamid (AR148)	145
7.1.2.44 2-Ethyl-1-(piperazin-1-yl)hexan-1-on (AR150)	146
7.1.2.45 4-(2-Propylpentanoyl)piperazin-1-thioharnstoff (AR151)	147
7.1.2.46 N-[1-(4-Carbamothioylpiperazin-1-yl)-4-(methylsulfanyl)- 1-oxobutan-2-yl]acetamid (AR152)	148
7.1.2.47 N-[4-(Methylsulfanyl)-1-{4-[8-nitro-4-oxo-6-(trifluormethyl)-4H-1,3- benzothiazin-2-yl]piperazin-1-yl}-1-oxobutan-2-yl]acetamid (AR153)	149
7.1.2.48 8-Nitro-2-[4-(2-propylpentanoyl)piperazin-1-yl]-6-(trifluormethyl)- 4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR154)	150

7.1.2.49 tert-Butyl-N-[4-methyl-1-oxo-1-(piperazin-1-yl)pentan-2-yl] carbamat ( <b>AR155</b> )	151
7.1.2.50 4-(2-Ethylhexanoyl)piperazin-1-thioharnstoff ( <b>AR156</b> )	152
7.1.2.51 tert-Butyl N-[1-(4-carbamothioylpiperazin-1-yl)-4-methyl- 1-oxopentan-2-yl]carbamate ( <b>AR157</b> )	153
7.1.2.52 2-[4-(2-Ethylhexanoyl)piperazin-1-yl]-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H- 1,3-benzothiazin-4-on ( <b>AR158</b> )	154
7.1.2.53 4-[[tert-Butoxy]carbonyl]amino}butansäure ( <b>AR159</b> )	
7.1.2.54 N-(4-Methyl-1-{4-[8-nitro-4-oxo-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin- 2-yl]piperazin-1-yl}-1-oxopentan-2-yl)carbamate ( <b>AR160</b> )	156
7.1.2.55 tert-Butyl N-[4-oxo-4-(piperazin-1-yl)butyl]carbamate ( <b>AR161</b> )	157
7.1.2.56 N-(4-Methyl-1-{4-[8-nitro-4-oxo-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin- 2-yl]piperazin-1-yl}-1-oxopentan-2-yl)carbamate ( <b>AR162</b> )	158
7.1.2.57 tert-Butyl N-[4-(4-carbamothioylpiperazin-1-yl)-4-oxobutyl] carbamate ( <b>AR163</b> )	159
7.1.2.58 tert-Butyl N-(4-{4-[8-nitro-4-oxo-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin- 2-yl]piperazin-1-yl}-4-oxobutyl)carbamate ( <b>AR164</b> )	160
7.1.2.59 2-[4-(2-Methylpropyl)phenyl]-1-(piperazin-1-yl)propan-1-on ( <b>AR165</b> )	161
7.1.2.60 4-{2-[4-(2-Methylpropyl)phenyl]propanoyl}piperazin- 1-thioharnstoff ( <b>AR166</b> )	162
7.1.2.61 2-[4-(4-Aminobutanoyl)piperazin-1-yl]-8-nitro-6-(trifluormethyl)- 4H-1,3-benzothiazin-4-on ( <b>AR167</b> )	163
7.1.2.62 2-(4-{2-[4-(2-Methylpropyl)phenyl]propanoyl}piperazin-1-yl)-8-nitro-6- (trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on ( <b>AR168</b> )	164
7.1.2.63 1-(Heptan-1-sulfonyl)piperazin ( <b>AR169</b> )	165
7.1.2.64 1-(4-Methylbenzensulfonyl)piperazin ( <b>AR170</b> )	166
7.1.2.65 4-(4-Methylbenzensulfonyl)piperazin-1-thioharnstoff ( <b>AR171</b> )	167
7.1.2.66 2-[4-(4-Methylbenzensulfonyl)piperazin-1-yl]-8-nitro-6-(trifluormethyl)- 4H-1,3-benzothiazin-4-on ( <b>AR172</b> )	168
7.1.2.67 4-(Heptan-1-sulfonyl)piperazin-1-thioharnstoff ( <b>AR173</b> )	169

7.1.2.68 2-[4-(Heptan-1-sulfonyl)piperazin-1-yl]-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR175)	170
7.1.2.69 tert-Butylpiperazin-1-carboxylat (AR179)	171
7.1.2.70 (2S)-2-Methyl-1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]decan (AR180)	172
7.1.2.71 (2S)-2-methyl-1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]decane-8-thioharnstoff (AR181)	173
7.1.2.72 2-[(2S)-2-methyl-1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]decan-8-yl]-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR182)	174
7.1.2.73 Thiomorpholin-4-thioharnstoff (AR183)	175
7.1.2.74 8-Nitro-2-(thiomorpholin-4-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR184)	176
7.1.2.75 8-Nitro-2-(1-oxo-1 $\lambda$ <sup>4</sup> ,4-thiomorpholin-4-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR185)	177
7.1.2.76 8-Nitro-2-(piperidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR187)	178
7.1.2.77 tert-Butyl 6-Thioharnstoff-octahydro-1H-pyrrolo[3,4-b]pyridin-1-carboxylat (AR188)	179
7.1.2.78 6-Benzyl-octahydro-1H-pyrrolo[3,4-b]pyridin-1-thioharnstoff (AR189)	180
7.1.2.79 tert-Butyl 6-[8-nitro-4-oxo-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-2-yl]-octahydro-1H-pyrrolo[3,4-b]pyridine-1-carboxylate (AR190)	181
7.1.2.80 2-{6-benzyl-octahydro-1H-pyrrolo[3,4-b]pyridin-1-yl}-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR191)	182
7.1.2.81 8-Nitro-2-{octahydro-1H-pyrrolo[3,4-b]pyridin-6-yl}-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR192)	183
7.1.2.82 2-{1-Benzyl-octahydro-1H-pyrrolo[3,4-b]pyridin-6-yl}-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR194)	184
7.1.2.83 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-2-thioharnstoff (AR195)	185
7.1.2.84 8-Nitro-2-(1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR196)	186
7.1.2.85 8-Nitro-2-(1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)-6-(trifluormethyl)-1,4-dihydrochinazolin-4-on (AR199)	187

7.1.2.86 6,7-Dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-thioharnstoff ( <b>AR201</b> )	188
7.1.2.87 2-(6,7-Dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on ( <b>AR204</b> )	189
7.1.2.88 6-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolinhydrochlorid ( <b>AR205</b> )	190
7.1.2.89 N-[4-Oxo-2-(piperidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-8-yl]acetamid ( <b>AR207</b> )	191
7.1.2.90 1-[4-Oxo-2-(piperidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-8-yl]pyrrolidin-2,5-dion ( <b>AR208</b> )	192
7.1.2.91 4-Carbamothioylpiperazin-1-carboxylat ( <b>AR209</b> )	193
7.1.2.92 tert-Butyl 4-[8-nitro-4-oxo-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-2-yl]piperazin-1-carboxylat ( <b>AR210</b> )	194
7.1.2.93 8-Nitro-2-(piperazin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on ( <b>AR211</b> )	195
7.1.2.94 2-[4-[(2S)-2-[4-(2-Methylpropyl)phenyl]propanoyl]piperazin-1-yl]-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on ( <b>AR212</b> )	196
7.1.2.95 8-Nitro-2-(4-octanoylpiperazin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on ( <b>AR213</b> )	197
7.1.2.96 8-(Nitro-2-(4-octadecanoylpiperazin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on ( <b>AR214</b> )	198
7.1.2.97 Pyrrolidin-1-thioharnstoff ( <b>AR215</b> )	199
7.1.2.98 8-Nitro-2-(pyrrolidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on ( <b>AR216</b> )	200
7.1.2.99 4-[8-nitro-4-oxo-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-2-yl]-1 $\lambda$ <sup>6</sup> ,4-thiomorpholin-1,1-dion ( <b>AR217</b> )	201
7.1.2.100 8-Nitro-2-(piperidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-thion ( <b>AR218</b> )	202

7.1.2.101 tert-Butyl 3-[[[(2S,5S,8R,11S,14S,17R)-17-(3-[[[(tert-butoxy)carbonyl]amino}propyl)-5,8-bis(2-methylpropyl)-11-[[[(4-{4-[8-nitro-4-oxo-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-2-yl]piperazin-1-yl)-4-oxobutyl]carbamoyl]methyl}-3,6,9,12,15,18-hexaoxo-14-[[[(triphenylmethyl)carbamoyl]methyl]-1,4,7,10,13,16-hexaazacyclooctadecan-2-yl]methyl]-1H-indole-1-carboxylate ( <b>AR219</b> )	203
7.1.2.102 2-[[[(2S,5S,8R,11S,14S,17R)-8-(3-Aminopropyl)-5-(carbamoymethyl)-11-(1H-indol-3-ylmethyl)-14,17-bis(2-methylpropyl)-3,6,9,12,15,18-hexaoxo-1,4,7,10,13,16-hexaazacyclooctadecan-2-yl]-N-(4-{4-[8-nitro-4-oxo-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-2-yl]piperazin-1-yl}-4-oxobutyl)acetamid ( <b>AR220</b> )	205
7.1.3 Testverbindungen aus der Arbeit von Dr. Rudolph (Rudolph, 2013)	207
7.1.3.1 2-(Morpholin-4-yl)-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on ( <b>IR58</b> )	207
7.1.3.2 7-Chloro-8-nitro-2-(piperidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on ( <b>IR74</b> )	208
7.1.3.3 2-(2,6-Dimethylpiperidin-1-yl)-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzoxazin-4-on ( <b>IR95</b> )	209
7.1.3.4 8-Nitro-2-(piperidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzoxazin-4-on ( <b>IR112</b> )	210
7.1.3.5 2-(Morpholin-4-yl)-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzoxazin-4-on ( <b>IR113</b> )	211
7.1.3.6 Antimykobakterielle Aktivität der Testverbindungen aus der Arbeit von Dr. Rudolph (Rudolph, 2013)	212
7.2 Biologische Charakterisierung	213
7.2.1 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen (MHKs)	213
7.2.1.1 Agardiffusionstest und Bestimmung der MHKs gegen <i>M. vaccae</i> (HKI Jena)	213
7.2.1.2 Bestimmung der MHKs gegen <i>M. tuberculosis</i> (GSK, Tres Cantos)	215
7.2.1.3 Bestimmung der MHKs gegen <i>M. tuberculosis</i> (UIC ,Chicago)	216

7.2.2	Testung auf Zytotoxizität bzw. auf antiproliferative Wirksamkeit	218
7.3	Biochemische und physikalische Charakterisierung	219
7.3.1	Enzym assays	219
7.3.2	Massenspektrometrische Experimente	222
7.3.3	Protein-Kristallographie	232
7.3.4	Bestimmung der Löslichkeit mittels CLND	234
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>235</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>247</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>248</b>
	<b>Publikationen</b>	<b>249</b>
	<b>Eigenständigkeitserklärung</b>	<b>251</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Äq.	-	Äquivalente
AS	-	Aminosäure
BALB/c	-	Bagg albino laboratory-bred
Bn	-	Benzyl
CFU	-	colony forming unit
CLND	-	Chemi-Luminescent Nitrogen Detection
Cys	-	Cystein
FAD	-	Flavin-Adenin-Dinukleotid
DBU	-	Diazabicycloundecen
DCM	-	Dichlormethan
DIBAL	-	Diisobutylaluminiumhydrid
DMEM	-	Dulbecco's modified eagle Medium
DMF	-	Dimethylformamid
DMSO	-	Dimethylsulfoxid
DPA	-	Decaprenyl-P-D-arabinofuranose
DPR	-	Decaprenyl-P-ribofuranose
DprE1	-	Decaprenylphosphoryl- $\beta$ -D-ribofuranose-2'-epimerase 1
DprE2	-	Decaprenylphosphoryl- $\beta$ -D-ribofuranose-2'-epimerase 2
DPX	-	Decaprenyl-P-2'-keto-ribofuranose
EMB	-	Ethambutol
EtAc	-	Ethylacetat
Ethanol	-	EtOH
FPR	-	Farnesylphosphoryl- $\beta$ -D-ribose
FPX	-	Farnesylphosphoryl- $\beta$ -D-2'-keto-erythro-pentafuranose

GalN	-	nicht-N-Acetyliertes Galactosamin
Gly	-	Glycin
HAc	-	Essigsäure
HATU	-	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorphosphat
hERG	-	human Ether-à-go-go-Related Gene
His	-	Histidin
HUVEC	-	Human umbilical vein endothelial cell
INH	-	Isoniazid
LAM	-	Lipoarabinomannan
Leu	-	Leucin
LM	-	Laufmittel
LORA	-	Low oxygen recovery assay
Lys	-	Lysin
MABA	-	Microplate almar blue assay
m-CPBA	-	meta-Chlorperbenzoesäure
MDR	-	multi drug resistance
MeOH	-	Methanol
MHK	-	minimale Hemmkonzentration
NAG	-	N-Acetylglucosamin
NAM	-	N-Acetylmuraminsäure
n.b.	-	nicht bestimmt
NCCLS	-	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NOD2	-	nucleotide-binding oligomerization domain 2
Phe	-	Phenylalanin

PPG	-	Polypropylenglycol
PyBOP	-	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
PZA	-	Pyrazinamid
REMA	-	Resazurin Reduktions Mikrotiterassay
RIF	-	Rifampicin
ROS	-	reaktive Sauerstoffspezies
RT	-	Raumtemperatur
Ser	-	Serin
TBME	-	tert-Butylmethylether
t-Boc	-	tert-Butyloxycarbonyl
TDR	-	total drug resistance
TEA	-	Triethylamin
TFA	-	Trifluoressigsäure
THF	-	Tetrahydrofuran
TIPS	-	Triisopropylsilan
Trp	-	Tryptophan
WHO	-	World Health Organization
XDR	-	extensively drug resistance

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Mykobakterielle Zellwand (GalN nicht-N-Acetyliertes Galactosamin, NAM N-Acetylmuraminsäure, NAG N-Acetylglucosamin)	5
Abbildung 2. Arabinogalactan (Polygalactanstrang blau, Arabinoseketten rot) (Crick et al., 2001)	6
Abbildung 3. Grundstruktur der Mykolsäuren	7
Abbildung 4. Enzymatische Umsetzung von Decaprenyl-P-ribofuranose zu Decaprenyl-P-D-arabinofuranose (Mikušová et al., 2014)	11
Abbildung 5. Leitstruktur der 8-Nitrobenzothiazinone - <b>BTZ043</b> (Makarov et al., 2009)	12
Abbildung 6. Wirkmechanismus der 8-Nitrobenzothiazinone (Trefzer et al., 2012)	13
Abbildung 7. <b>PBTZ169</b> (Makarov (WO2012/066518A1) et al., 2012)	14
Abbildung 8. <b>TCA1</b> - nicht-kovalenter DprE1-Hemmstoff (Wang et al., 2013)	16
Abbildung 9. Leitstruktur der 1,4-Azaindole (Shirude et al., 2013)	16
Abbildung 10. Grundgerüst der BTZs und ihrer Derivate (X = S/O/NH)	17
Abbildung 11. Thioharnstoffweg zur BTZ Synthese	20
Abbildung 12. Klassischer Syntheseweg von BTZs	21
Abbildung 13. Thioharnstoffsynthese Methode A	22
Abbildung 14. Thioharnstoffsynthese Methode B	22
Abbildung 15. Thioharnstoffsynthese Methode C	23
Abbildung 16. Synthese der 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-BTZs	26
Abbildung 17. Synthese der Thioharnstoffe aus 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolinderivaten	26
Abbildung 18. Synthese von 6-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin	27
Abbildung 19. Synthese von 7-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin	28
Abbildung 20. Synthese der N-Acylpiperazin-BTZs	29
Abbildung 21. Synthese der Thioharnstoffe aus N-Acylpiperazinen	30
Abbildung 22. Synthese der Carbonsäureamide	31
Abbildung 23. Synthese der Sulfonsäureamide	31
Abbildung 24. Modifizierter Syntheseweg für N-Acylpiperazin BTZs	32
Abbildung 25. Synthese von BTZs mit cyclopeptidischer Seitenkette	34
Abbildung 26. Synthese der Diazabicyclononan BTZs	35

Abbildung 27. Thioharnstoffsynthese aus Diazabicyclononanen	36
Abbildung 28. Modifikation der Seitenkette von <b>AR190</b>	37
Abbildung 29. Synthese der BTZs mit Piperidinseitenkette und anderen Aminen	38
Abbildung 30. Synthese der Thioharnstoffe von Piperidinderivaten nach Methode C	39
Abbildung 31. Synthese von Thioharnstoffen von Piperidinderivaten nach Methode A	40
Abbildung 32. Oxidation des Thiomorpholins in <b>AR184</b>	41
Abbildung 33. Synthese von <b>AR120</b> nach dem klassischen BTZ Syntheseweg	42
Abbildung 34. Synthese der BTZs mit verschiedenen cyclischen Aminen als Seitenkette	43
Abbildung 35. Synthese der Thioharnstoffe aus verschiedenen cyclischen Aminen	44
Abbildung 36. Synthese von <b>BTZ043 (AR182)</b> über den Thioharnstoffweg	45
Abbildung 37. Sauerstoff-Schwefelaustausch zur Herstellung eines Benzothiazinonthions (BTZthions)	47
Abbildung 38. Zeitabhängige Zersetzung von <b>AR218</b> in Middlebrook 7H9 Kulturmedium	48
Abbildung 39. Synthese der BOZs	50
Abbildung 40. Synthese der asymmetrisch substituierten Harnstoffe	51
Abbildung 41. Tautomere des BAZs <b>AR199</b>	51
Abbildung 42. Synthese des Benzazazinons	52
Abbildung 43. Synthese von Amino-, Hydroxylamino- und Nitroso-BTZs	53
Abbildung 44. Synthese von 8-Imido- und 8-Amido-BTZs	54
Abbildung 45. Potentieller Wirkmechanismus von 8-Hydroxymethyl- bzw. 8-Formyl-BTZs	56
Abbildung 46. Synthese des 8-Formyl-BTZs <b>AR135</b> durch Reduktion von <b>AR134</b>	57
Abbildung 47. Synthese des 8-Hydroxymethyl-BTZs <b>AR146</b>	58
Abbildung 48. Synthese der aromatischen Ausgangsverbindung zur BTZ Herstellung	59
Abbildung 49. <sup>1</sup> H-NMR Spektren von BAZ <b>AR199</b> (schwarz, in CDCl <sub>3</sub> ), BTZ <b>AR196</b> (rot, in CDCl <sub>3</sub> ) und BOZ <b>AR125</b> (blau, in CDCl <sub>3</sub> )	60
Abbildung 50. <sup>1</sup> H-NMR Spektren von BTZ <b>AR187</b> (rot, in CDCl <sub>3</sub> ) und BTZthion <b>AR218</b> (schwarz, in CDCl <sub>3</sub> )	61
Abbildung 51. <sup>1</sup> H-NMR Spektren von Amino-BTZ <b>AR81</b> (schwarz, in CD <sub>3</sub> OD), Hydroxylamino-BTZ <b>AR85</b> (grün, in DMSO- <i>D</i> <sub>6</sub> ), Nitroso-BTZ <b>AR86</b> (blau, in CDCl <sub>3</sub> ) und Nitro-BTZ <b>AR187</b> (rot, in CDCl <sub>3</sub> )	62

Abbildung 52. Detaillierter Mechanismus der DprE1 Hemmung durch BTZs	75
Abbildung 53. Mechanismus des DprE1 Enzymassays (Batt et al., 2015)	76
Abbildung 54. <b>(A)</b> Repräsentative Zeitverläufe der zeitabhängigen Hemmung von DprE1 durch <b>AR187</b> <b>(B)</b> lineare Abhängigkeit von $k_{obs}$ gegen Hemmstoffkonzentration für verschiedene BTZs bzw. BOZs <b>(C)</b> und <b>(D)</b> nicht-lineare Abhängigkeit von $k_{obs}$ gegen Hemmstoffkonzentration für BTZs bzw. BOZs	78
Abbildung 55. Zeitabhängigkeit der $IC_{50}$ Werte im Enzymassay	
Abbildung 56. <b>(A)</b> Irreversible DprE1 ( <i>M. tuberculosis</i> ) Hemmung durch das Hydroxylamino-BTZ <b>AR85</b>	82
Abbildung 57. Massenspektrum von DprE1 nach Inkubation mit <b>IR58</b> (Bedingung A)	86
Abbildung 58. Massenspektrum von DprE1 nach Inkubation mit <b>AR86</b> (Bedingung A)	87
Abbildung 59. Kristallstrukturen von BTZs bzw. BOZs mit DprE1 ( <i>M. tuberculosis</i> ) und deren unterschiedliche Ausrichtung im aktiven Zentrum.	90
Abbildung 60. Strukturen der aktiven BTZ-Derivate <b>AR106</b> und <b>AR175</b>	98
Abbildung 61. Struktur der antimykobakteriellen 8-Formyl-BTZs <b>AR138</b>	99
Abbildung E1. Hemmkurven Enzymassay	220
Abbildung E2. Hemmkurven Enzymassay	221
Abbildung E3. Massenspektrum von DprE1 ohne Hemmstoff	225
Abbildung E4. Massenspektrum von DprE1 nach Inkubation mit <b>IR58</b> (Bedingung A)	226
Abbildung E5. Massenspektrum von DprE1 nach Inkubation mit <b>IR58</b> (Bedingung B)	227
Abbildung E6. Massenspektrum von DprE1 nach Inkubation mit <b>AR86</b> (Bedingung A)	228
Abbildung E7. Massenspektrum von DprE1 nach Inkubation mit <b>AR86</b> (Bedingung B)	229
Abbildung E8. Massenspektrum von DprE1 nach Inkubation mit <b>AR77</b> (Bedingung A)	230
Abbildung E9. Massenspektrum von DprE1 nach Inkubation mit <b>AR77</b> (Bedingung B)	231

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Therapieleitlinie Tuberkulose (Schaberg et al., 2012)	8
Tabelle 2. Vergleich der Methoden zur Thioharnstoffsynthese	24
Tabelle 3. Vergleich der BTZ Synthesewege	46
Tabelle 4. Klassifizierung der Ergebnisse des Agardiffusionstests	64
Tabelle 5. Ergebnisse des Agardiffusionstests	65
Tabelle 6. MHKs der getesteten Verbindungen gegen <i>M. vaccae</i> bzw. <i>M. tuberculosis</i>	69
Tabelle 7. Klassifizierung der 8-Nitro-BTZ Aktivität	71
Tabelle 8. Ergebnisse der Testung auf antiproliferative und zytotoxische Effekte	73
Tabelle 9. $k_{inact}/K_i$ Werte der getesteten Verbindungen	79
Tabelle 10. Übersicht zu den nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen BTZ/BOZ und DprE1	89
Tabelle 11. CLND Löslichkeit der getesteten BTZs und BOZs	95
Tabelle E1. MHKs der Testverbindungen aus der Arbeit von Dr. Rudolph (Rudolph, 2013)	212
Tabelle E2. Inlet Bedingungen für Agilent 6224 ToF	223
Tabelle E3. Inlet Bedingungen für Waters Q-ToF Ultima MS	224
Tabelle E4. Röntgenstrukturdaten	233



# **1 Die Erkrankung Tuberkulose und ihr Erreger *Mycobacterium tuberculosis***

## **1.1 Epidemiologie eines weltweiten Gesundheitsnotstandes**

Eine Inzidenz von 10.4 Millionen Neuerkrankungen und 1.4 Millionen Todesopfer im Jahr 2015 (WHO Global Tuberculosis Report, 2016) sind die weltweiten epidemiologischen Zahlen, welche die verheerende Aktualität der Infektionskrankheit Tuberkulose zeigen. In der öffentlichen Wahrnehmung ist dies jedoch noch immer unterrepräsentiert. Trotz dieser erschreckenden Zahlen hat die Tuberkulosebehandlung auch Erfolge zu verzeichnen. So konnten in den Jahren von 2000 bis 2015 schätzungsweise 49 Millionen tuberkulosebedingte Todesfälle durch Therapie verhindert werden (WHO Global Tuberculosis Report, 2016).

Die Hochinzidenzländer dieser Infektionskrankheit sind zwar eindeutig in Teilen Afrikas und Asiens gelegen, trotzdem wäre es vorschnell, Tuberkulose auf ein Problem der sogenannten Entwicklungsländer zu reduzieren. Eine Inzidenz von 340,000 Tuberkulosefällen und 36,200 Toten (WHO Surveillance Report, 2016) in der WHO Region Europa machen deutlich, dass *M. tuberculosis* auch in Industrienationen nicht ausgestorben ist. Durch unvollständige oder mangelhafte Therapie mehrt sich das Auftreten von MDR (multi drug resistant) Tuberkulose, insbesondere in Osteuropa. Die WHO schätzt die Anzahl der neuauftretenden MDR Tuberkulosefälle in der Region Europa auf 75,000 im Jahr 2014 - dies ist eine beträchtliche Anzahl Patienten, die einer langwierigen und kostenintensiven medizinischen Behandlung zugeführt werden müssen.

Auch in Ballungszentren Westeuropas gibt es, teilweise migrationsbedingt, eine nicht zu vernachlässigende Anzahl an Erkrankungen. Beispielsweise weist London eine Neuerkrankungsrate von 2,572 Fällen im Jahr 2014 auf (Tuberculosis in London: Annual review, 2014), ein schlagendes Beispiel dafür, dass Tuberkulose auch in Westeuropa nicht der Vergangenheit angehört.

Die epidemiologischen Daten der letzten Jahre weisen allerdings auf eine verhalten positive Entwicklung hin. Die Inzidenz und Mortalität ist in den letzten Jahren leicht rückläufig, so konnte die weltweite Anzahl der tuberkulosebedingten Todesfälle im Zeitraum von 2000 bis 2015 um

22 % reduziert werden. In Deutschland ist die Anzahl der Tuberkulosefälle seit Jahren niedrig (4,448 Neuerkrankungen im Jahr 2014) (Robert Koch Institut, Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für, 2014) und die sehr gute medizinische Versorgung ermöglicht hervorragende Therapieergebnisse, sodass 2014 97 Patienten an Tuberkulose verstarben. Im vergangenen Jahr ist jedoch ein Anstieg der Inzidenz auf niedrigem Niveau zu verzeichnen, so wurden im Jahr 2015 5,865 Fälle gemeldet (Robert Koch Institut, Epidemiologisches Bulletin 03/16, 2016).

## **1.2 *Mycobacterium tuberculosis* als Krankheitserreger**

Die Erreger, welche die Infektionskrankheit Tuberkulose verursachen, sind Vertreter der über 100 Arten umfassenden Gattung *Mycobacterium*. Diese Bakterien sind stäbchenförmige, obligat aerobe Mikroorganismen, die häufig saprophytisch leben und für den Menschen nicht pathogen sind. Der Zellwandaufbau (siehe Abschnitt 1.3) ist ein Charakteristikum dieser Gattung und bedingt die Säurefestigkeit von Mykobakterien, welche durch die Ziehl-Neelsen Färbung nachgewiesen wird.

Das Krankheitsbild Tuberkulose wird durch eine Gruppe von Mykobakterien, den *M. tuberculosis*-Komplex, hervorgerufen. Dieser umfasst die Arten *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. canettii* und *M. bovis*, wobei die meisten Infektionen durch *M. tuberculosis* hervorgerufen werden (Koch et al., 2012). In der Klinik ist Tuberkulose eine außerordentlich vielgestaltige Erkrankung, die im Rahmen dieser Arbeit nicht umfassend beschrieben werden kann. Häufig betrifft die primäre Infektion die Lunge, sodass die Erkrankung mit Husten und (blutigem) Auswurf einhergeht. Charakteristisch ist ein jahrelanger, schleichender Verlauf, mit zunehmender Auszehrung und Gewichtsverlust des Patienten, was der Tuberkulose auch die Bezeichnung Schwindsucht eingebracht hat.

Da die wissenschaftliche Betrachtung verallgemeinert, besteht die Gefahr, Anschaulichkeit und Tragik des einzelnen Falles zu übersehen, deshalb soll an dieser Stelle die Erscheinung der Krankheit durch eine Szene aus Tolstois Anna Karenina beschrieben sein. In der zitierten Stelle werden die Eindrücke des Gutsbesitzers Lewin geschildert, der seinem unheilbar an Tuberkulose erkrankten Bruder Nikolai gegenübertritt: „Er kam in ein kleines schmutziges Zimmer [...] und

sah auf einem von der Wand etwas abgerückten Bett einen sich unter der Decke abzeichnenden Körper liegen. Eine riesige Hand, wie ein Rechen so groß, die zu diesem Körper gehörte, lag auf der Decke und schien auf unerklärliche Weise an einem langen, vom Anfang bis zur Mitte gleichmäßig dünnen Stecken befestigt zu sein. Der auf dem Kissen liegende Kopf war mit dem Gesicht der Tür zugewandt. Das spärliche, Schweiß nasse Haar klebte an den Schläfen, und die von der Haut straff umspannte Stirn machte den Eindruck, als sei sie durchsichtig.“ (Tolstoi, 1878). Auch wenn die Beschreibung literarisch ist, liegt ihr eine hervorragende Beobachtungsgabe zu Grunde, sodass die Manifestation einer Tuberkuloseerkrankung im späten Stadium mit größter Eindrücklichkeit beschrieben ist und das Schicksal des einzelnen Patienten vor Augen führt.

Der Erreger dieser Erkrankung ist *M. tuberculosis*, der wegen seiner charakteristischen Eigenschaften schwer behandelbar ist. Die 1-4 µm langen und 0.2-0.6 µm breiten Stäbchen können nach Phagozytose im Phagosom überleben, diese werden daher als fakultativ intrazelluläre Pathogene bezeichnet, denen es möglich ist, die körpereigene Abwehr zu umgehen. Das Phagosom ist ein Zellkompartiment der Makrophagen, in welchem Krankheitserreger abgetötet und enzymatisch verdaut werden. Dies geschieht durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie dem Superoxid-Anion, Singulett-Sauerstoff und Hydroxid-Radikalen, sowie mittels Enzymen (Lysozym bzw. Proteasen) (Delves et al., 2006). Durch die ausgeprägt lipophile Zellwand und die Expression bestimmter Enzyme (Katalase, Superoxid-Dismutase) (Deretic et al., 2006) kann der Tuberkuloseerreger diese lebensfeindlichen Bedingungen überstehen und schwächt die Wirkung der Immunantwort ab. Bemerkenswert ist, dass sich *M. tuberculosis* nicht auf passive Schutzmaßnahmen beschränkt, sondern aktiv die Abwehrprozesse der Immunzellen stört. Die äußerste Schicht der Bakterienzellen, das Lipoarabinomannan (LAM), interferiert mit den Signalkaskaden des Phagosoms, wodurch die Abwehrfähigkeit der Immunzellen eingeschränkt wird (Briken et al., 2004).

*M. tuberculosis* ist in der Lage, während einer Infektion Fettsäure- und Cholesterolreserven des Wirtes als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Die Eigenschaft in einem metabolischen Ruhestadium zu überdauern, und die ausgeprägte Adaptivität des Stoffwechsels verleiht *M. tuberculosis* die Fähigkeit zur Persistenz (Bloch et al., 1956, Pandey et al., 2008). Die persistenten Keime sind unempfindlich gegen körpereigene Abwehr und medikamentöse Therapie.

Eine weitere Eigenheit des Tuberkuloseerregers ist seine lange Generationszeit, diese beträgt 12-24 h, während der Großteil der Bakterienarten sich alle 15-60 Minuten teilt (Koch et al., 2012). Die durch das langsame Wachstum bedingte geringe metabolische Aktivität, wie auch die ausgeprägte Anpassungsfähigkeit, erschweren die Behandlung einer *M. tuberculosis* Infektion mit Antituberkulotika zusätzlich.

Eine Herausforderung für die medikamentöse Behandlung ist das mutationsbedingte Auftreten von Arzneistoffresistenzen, das durch den Selektionsdruck einer unzulänglichen oder fehlerhaften Therapie erheblich verstärkt wird. Die Mutationsrate von *M. tuberculosis* ist abhängig von den Lebensbedingungen und weist beträchtliche Unterschiede zwischen *in vivo* und *in vitro* Modellen auf. Im Vergleich zu anderen Bakterienarten ist die Mutationshäufigkeit in *in vitro* Modellen nicht erhöht (McGrath et al., 2013, Ford et al., 2011). Bei der Nutzung von *in vivo* Modellen können erhöhte Mutationsraten auftreten, da die Bakterien im Wirt oxidativem Stress ausgesetzt sind (Ford et al., 2011). Die durchschnittliche Mutationsrate in einem Mausmodell beträgt  $1.80 \times 10^{-9}$  (Anzahl der Einzelnukleotid Polymorphismen) pro Generation, während der entsprechende Wert in einem *in vitro* Modell  $2.01 \times 10^{-10}$  beträgt, also Einzelnukleotidpolymorphismen ungefähr zehnmalseltener auftreten.

Die durch Mutationen hervorgerufenen Arzneistoffresistenzen besitzen klinische Relevanz und erschweren eine Therapie deutlich. Dabei ist eine Einteilung in MDR Tuberkulose (multi drug resistance, Resistenz gegen Isoniazid und Rifampicin) und XDR Tuberkulose (extensively drug resistance, MDR Tuberkulose mit Resistenz gegen ein Fluorchinolon und gegen eines der injizierbaren Zweittranzmedikamente) üblich. Für Bakterienstämme, die noch weitere Resistenzen aufweisen, wurde die Bezeichnung TDR Tuberkulose (total drug resistance) geprägt, welche bisher nur in Einzelfällen beschrieben ist (Rowland et al., 2012). Die Behandlung der Infektionen mit resistenten Keimen macht die Entwicklung von Arzneistoffen mit neuen Angriffspunkten notwendig (siehe Kapitel 1.4).

### 1.3 Die mykobakterielle Zellwand - Schutzschicht und Arzneistofftarget

Die Zellwand der Mykobakterien bietet durch ihren Lipidreichtum Schutz vor der Immunabwehr und trägt entscheidend zur Virulenz der Keime bei. Die Synthese der Zellwand ist überlebenswichtig für die Tuberkuloseerreger und stellt somit einen effektiven Angriffspunkt für Arzneistoffe dar.

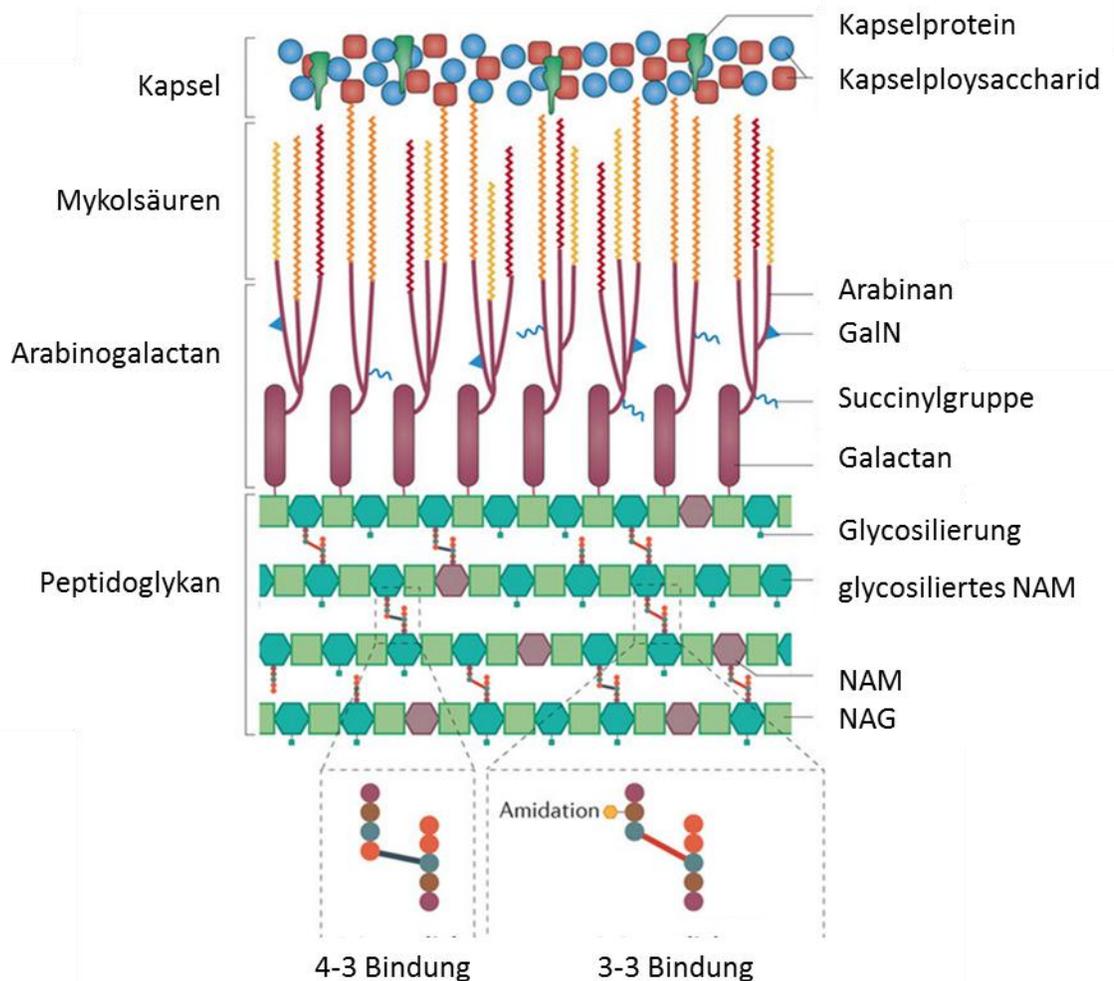


Abbildung 1. Mykobakterielle Zellwand (GalN nicht-N-Acetyliertes Galactosamin, NAM N-Acetylmuraminsäure, NAG N-Acetylglucosamin) (Kieser et al., 2014)

Der Aufbau der Zellwand lässt sich, wie in Abbildung 1 gezeigt, von innen nach außen in drei Bereiche einteilen. An die Plasmamembran der Bakterienzelle schließt sich eine Peptidoglycanschicht an, auf die ein Abschnitt mit Arabinogalactanen folgt, an welchen die

Mykolsäuren gebunden sind. Nach außen wird die Zellwand von einer Polysaccharidkapsel abgeschlossen.

Die Peptidoglykanschicht wird aus N-Acetylglucosamin (NAG) und N-Acetylmuraminsäure (NAM) gebildet, welche durch Peptidbrücken quervernetzt sind. Im Vergleich zu anderen Bakterienspezies ist die Quervernetzung sehr ausgeprägt, dabei liegen sowohl 4-3 wie auch 3-3 Verknüpfungen zwischen den Peptidketten der Peptidoglykanschicht vor (siehe Abbildung 1) (Kieser et al., 2014). Die glykosylierte N-Acetylmuraminsäure spielt als Antigen eine wichtige Rolle. Sie wird von der „nucleotide-binding oligomerization domain 2“ (NOD2) erkannt und induziert die Immunreaktion von Makrophagen. Da Mykobakterien eine Mureinschicht besitzen, werden sie zu den gram positiven Bakterien gezählt, wobei die Gram-Färbung durch die lipophilen Zellwandbereiche gestört wird (Hansen et al., 2014).

Darauf folgt eine Zone aus einem hydrophilen Arabinogalactanpolymer (siehe Abbildung 2), das aus einem Polygalactanstrang (blau) und Arabinoseketten (rot) zusammengesetzt ist.

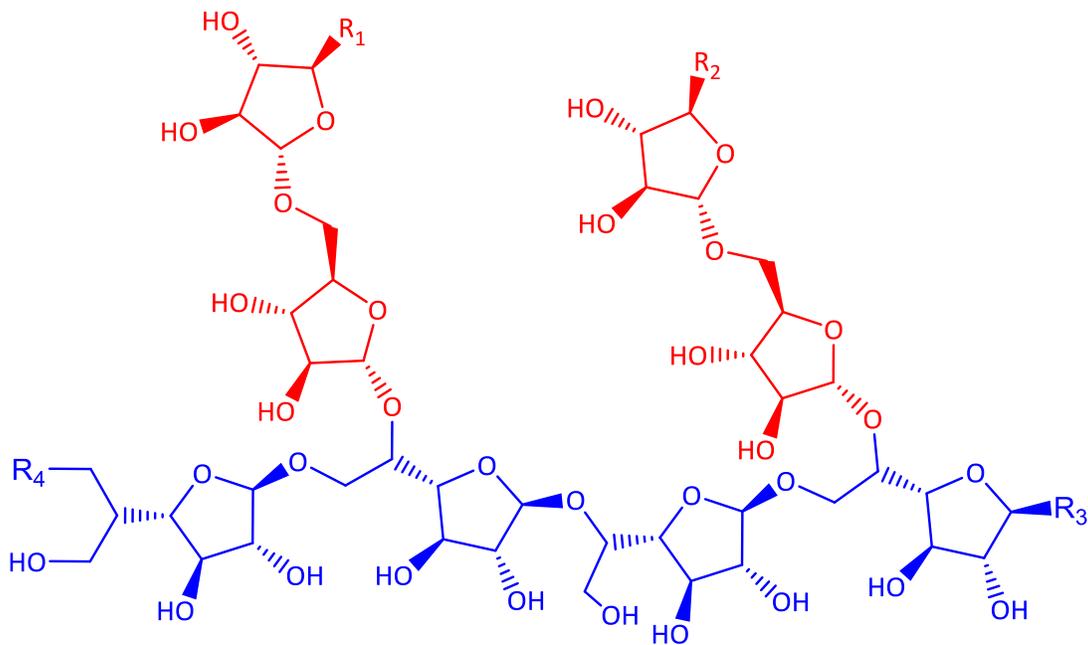


Abbildung 2. Arabinogalactan (Polygalactanstrang blau, Arabinoseketten rot) (Crick et al., 2001)

Das Arabinogalactan ist über den Polygalactanstrang mit der Peptidoglykanschicht (Phosphordiesterbindung) verknüpft und über die Arabinoseseitenketten mit den Mykolsäuren

verestert. Diese bilden mit freien Lipiden die äußere lipophile Zone der Zellwand. Bei Mykolsäuren handelt es sich um verzweigt-kettige Hydroxyfettsäuren.

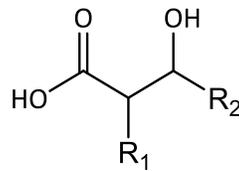


Abbildung 3. Grundstruktur der Mykolsäuren

In Abbildung 3 ist die Grundstruktur dieser Verbindungsklasse gezeigt, wobei Rest 1 aus komplexen Kohlenstoffketten mit bis zu 60 C-Einheiten besteht und Rest 2 eine lineare Kohlenstoffkette mit bis zu 24 C-Einheiten ist.

Der beschriebene Zellwandaufbau ist verantwortlich für die Robustheit von Mykobakterien und schirmt diese effektiv gegen äußere Einflüsse ab. Der hohe Lipidanteil (bis zu 50 % der Trockenmasse eines Bakteriums) macht die Zellwand zu einer lipophilen Barriere, die für Arzneistoffe schwer zu überwinden ist. Es ist hervorzuheben, dass die Zellwand sowohl hydrophile (Polysaccharide), wie auch lipophile Bereiche (Mykolsäuren, Lipide) besitzt. Wirkstoffe sollten entsprechend eine gewisse Affinität zu beiden Bereichen aufweisen, um die mykobakterielle Zellwand überwinden zu können.

## **1.4 Pharmakotherapie der Infektionskrankheit Tuberkulose**

Erst durch die Einführung von speziellen, gegen *M. tuberculosis* wirksamen Antibiotika in die Therapie wurde die Tuberkulose eine heilbare Erkrankung. Bei ausreichender Dauer und Intensität der Behandlung sind die Chancen für Heilung gut. Wie in Kapitel 1.1 genannt, erkrankten in Deutschland 2014 4,448 Patienten an Tuberkulose, während im gleichen Zeitraum 97 Todesfälle durch diese Erkrankung zu beklagen sind (Robert Koch Institut, Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für, 2014). Diese Zahlen illustrieren, dass eine adäquate Pharmakotherapie die mit Tuberkulose assoziierte Mortalität erheblich senken kann.

Tabelle 1. Therapieleitlinie Tuberkulose (Schaberg et al., 2012) (Erläuterung der Abkürzungen folgt im Text)

Art der Erkrankung	Therapiedauer	Medikamente
arzneistoffsensitive Tuberkulose	6 Monate	INH, RIF, PZA, EMB 2 Monate INH, RIF 4 Monate
MDR/XDR Tuberkulose	12-24 Monate oder länger	Erstrang-Medikament (WHO-Gruppe 1)
		INH, RIF, PZA, EMB
		Zweitrang-Medikamente
		Injizierbare Medikamente (WHO-Gruppe 2) Streptomycin, Amikacin, Capreomycin, Kanamycin
		Fluorchinolone (WHO-Gruppe 3) wie Levofloxacin,
		Medikamente mit gesicherter Wirkung gegen <i>M. tuberculosis</i> (WHO-Gruppe 4) wie Rifabutin, Protionamid, Terizidon, para-Aminosalicylsäure
Medikamente mit unklarer Wirkung gegen <i>M. tuberculosis</i> (WHO-Gruppe 5) wie Amoxicillin/Clavulansäure, Clarithromycin, Clofazimin, Imipenem, Linezolid		

Eine Zusammenfassung über die gebräuchlichen Antituberkulotika ist in Tabelle 1 dargestellt. Eine arzneistoffsensitive, pulmonale Tuberkuloseerkrankung wird mit einer Kombinationstherapie aus Isoniazid (INH), Rifampicin (RIF), Pyrazinamid (PZA) und Ethambutol (EMB) 2 Monate behandelt, anschließend wird die Therapie für weitere 4 Monate mit Rifampicin und Isoniazid fortgesetzt (Schaberg et al., 2012).

Zur Behandlung einer MDR/XDR Tuberkulose muss die Therapiedauer deutlich erhöht werden, dabei finden Zweitrang-Medikamente Anwendung, die häufig schlechtere Wirksamkeit bzw. ein ungünstigeres Nebenwirkungsprofil aufweisen. Die Gruppe der Zweitrang-Medikamente umfasst andere Antibiotikaklassen wie Fluorchinolone und Aminoglykoside, sowie bestimmte Wirkstoffe, die nur für die Indikation Tuberkulose verwendet werden (z.B.: Terizidon, para-Aminosalicylsäure).

Mit Bedaquilin wurde im Jahr 2012 die Palette der antimykobakteriellen Wirkstoffe zur Behandlung von MDR/XDR Tuberkulose um eine Option erweitert. Bei diesem Arzneistoff handelt es sich um den ersten (Zulassungs-)Erfolg intensiverter Forschung und Entwicklung im Bereich Tuberkulose seit über 40 Jahren (Diacon et al., 2009). Seit dem Jahr 2014 ist mit Delamanid (Matsumoto et al., 2006) ein weiterer Arzneistoff zur Behandlung von MDR/XDR Tuberkulose verfügbar (Zumla et al., 2014).

## 2 Das Enzym DprE1 als bemerkenswertes Target

### 2.1 Struktur und Funktion von DprE1

Das Enzym DprE1 (Decaprenylphosphoryl- $\beta$ -D-ribofuranose-2'-epimerase 1) (Makarov et al., 2009, Trefzer et al., 2010 u. 2012) spielt eine Schlüsselrolle bei der mykobakteriellen Arabinansynthese und ist ein vielversprechendes Arzneistofftarget. Eine Hemmung führt unmittelbar zum Tod der Bakterienzellen. Bei DprE1 handelt es sich um eine Oxidoreduktase, die aus zwei Proteindomänen aufgebaut ist und strukturelle Ähnlichkeiten mit der Familie der Vanillyl-Alkohol-Oxidasen hat, ähnlich wie diese besitzt DprE1 jeweils eine Domäne zur Substrat- und eine Domäne zur FAD-Bindung (Forneris et al., 2008 Batt et al., 2012). Dabei ist der Cofaktor bei DprE1 nicht-kovalent mit dem Enzym verbunden. DprE1-knockout Stämme von *M. smegmatis* sind nicht wachstumsfähig und die Biosynthese von Decaprenyl-P-D-arabinofuranose (DPA) in mykobakteriellen Zellen weist keine Redundanz auf (Crellin et al., 2011, Gaëlle et al., 2014). Ein ähnliches Verhalten von *M. tuberculosis* ist wahrscheinlich.

Das katalytische Zentrum liegt mittig in der Enzymstruktur in unmittelbarer Nähe zu einer flexiblen Aminosäuresequenz (AS 322-329, *M. smegmatis*-Nummerierung bzw. AS 316-322, *M. tuberculosis*-Nummerierung) (Neres et al., 2012, Batt et al., 2012). Die genannten Aminosäureabschnitte besitzen die Fähigkeit zur Konformationsänderung, diese beeinflusst die Interaktion zwischen DprE1 und Substrat bzw. Inhibitoren (Riccardi et al., 2013). Batt et al. (Batt et al., 2012) konnten zeigen, dass die Aminosäuren 316-322 (DprE1 *M. tuberculosis*) bei nicht-kovalenter Bindung von **CT319** - einem Nitrobenzamid - eine  $\alpha$ -Helix bilden, die das katalytische Zentrum bedeckt.

Wie in Abbildung 4 dargestellt, katalysiert DprE1 die Oxidation von Decaprenyl-P-ribofuranose (DPR) zu Decaprenyl-P-2'-keto-ribofuranose (DPX), unter Verbrauch des Coenzym FAD (Mikušová et al., 2005). Die Oxidation läuft im Rahmen der Epimerisierung von Decaprenyl-P-ribofuranose (DPR) zu Decaprenyl-P-D-arabinofuranose (DPA) ab. In der anschließenden Reduktion durch DprE2 (Decaprenylphosphoryl- $\beta$ -D-ribofuranose-2'-epimerase 2) wird der prochirale Carbonylkohlenstoff an Position 3 von DPX reduziert, wobei das entstehende Stereozentrum S konfiguriert ist. Als Reduktionsmittel fungiert das Coenzym  $\text{NADH} + \text{H}^+$ . Die auf

diesem Biosyntheseweg gebildeten Arabinofuranosemonomere sind Bausteine für das Arabinogalactan und Lipoarabinomannan der mykobakteriellen Zellwand.

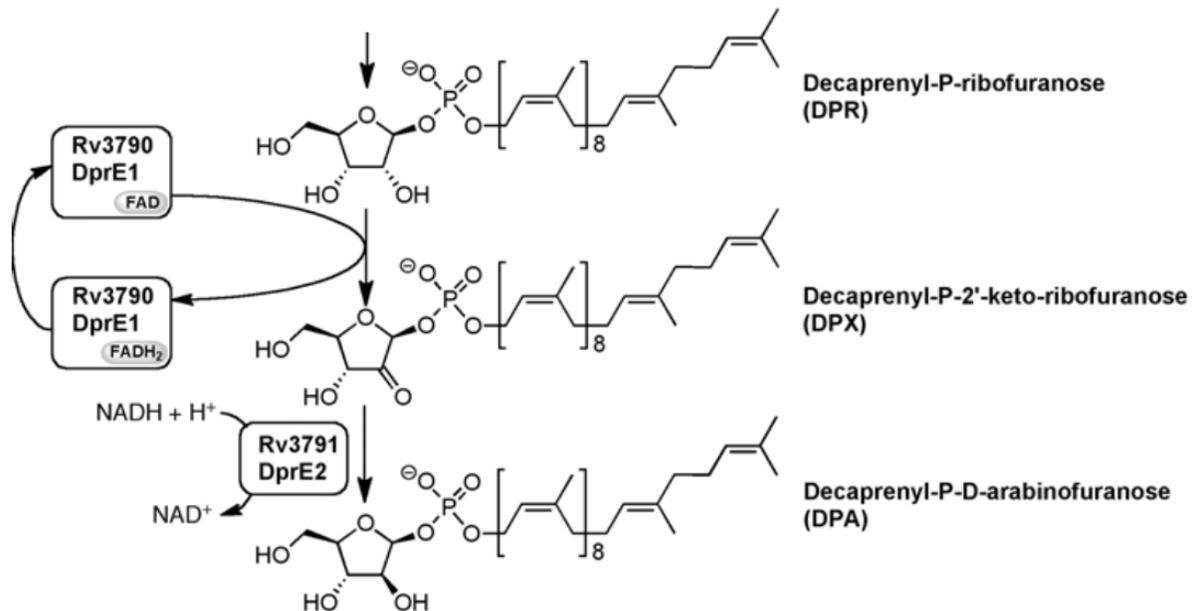


Abbildung 4. Enzymatische Umsetzung von Decaprenyl-P-ribofuranose zu Decaprenyl-P-D-arabinofuranose (Mikušová et al., 2014)

DprE1 und DprE2 liegen als Enzymkomplex im periplasmatischen Raum der mykobakteriellen Zellwand vor, sie sind also nicht im Cytoplasma lokalisiert (Brecik et al., 2015, Bhutani, et al. 2015). Diese Eigenschaft macht die Enzyme zu einem geeigneten Target, da ein Wirkstoff nicht die ganze Zellwand überwinden muss und bestimmte Resistenzmechanismen wie Effluxpumpen wirkungslos sind.

Für Forschungsarbeiten wird DprE1 von *M. smegmatis* (Neres et al., 2012) bzw. *M. tuberculosis* (Batt et al., 2012) verwendet. Die Enzyme beider Bakterienspezies weisen mit 83 % eine hohe Sequenzhomologie auf (Riccardi et al., 2013).

## 2.2 Irreversible DprE1 Hemmung - 8-Nitrobenzothiazinone

Mit den 8-Nitrobenzothiazinonen (BTZs) wurde eine Stoffklasse entdeckt, die durch irreversible DprE1-Hemmung eine ausgeprägte Wirksamkeit gegen *M. tuberculosis* zeigt (Makarov et al., 2007, Makarov et al., 2009). Die erste publizierte Leitstruktur ist das in Abbildung 5 dargestellte **BTZ043**, das mit einer minimalen Hemmkonzentration (MHK) von 2.3 nM gegen *M. tuberculosis* H37Rv eine exzellente *in vitro* Aktivität zeigt.

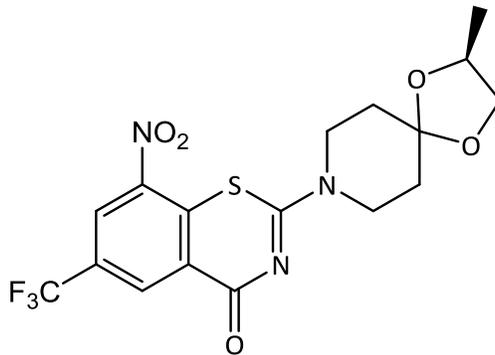


Abbildung 5. Leitstruktur der 8-Nitrobenzothiazinone - **BTZ043** (Makarov et al., 2009)

In einem Assay zur Aktivitätsmessung gegen intrazellulär (Makrophagen) lebende *M. tuberculosis* konnte eine MHK von <23 nM ermittelt werden. Im Tiermodell zeigt **BTZ043** eine signifikante Verringerung der Bakterienlast (chronische Tuberkulose, BALB/c Mäuse, 300 mg/kg, 4 Wochen Behandlung, Reduktion der Bakterienlast um ca. 1 log in der Lunge und ca. 2 log in Milz gegenüber unbehandelten Tieren) (Makarov et al., 2009). Bei höheren Konzentrationen (23 µM) zeigte **BTZ043** zwar einen zytotoxischen Effekt gegen Makrophagen, durch hohe Aktivität weist die Verbindung trotzdem einen guten Selektivitätsindex gegen *M. tuberculosis* Zellen auf (>100). Diese Eigenschaften machen **BTZ043** zu einem aussichtsreichen Arzneistoffkandidaten.

Durch die Züchtung von resistenten *M. tuberculosis* Stämmen konnte belegt werden, dass DprE1 als Target für BTZs essentiell ist. Bestimmte Punktmutationen führten zum Aktivitätsverlust von **BTZ043**. So tritt bei Stämmen, welche in DprE1 Cys387 durch Ser oder Gly ersetzen, eine komplette Resistenz auf. Auch führt der Austausch der Nitrogruppe in **BTZ043** durch eine Amino- oder Hydroxylaminofunktion zu starker Aktivitätsminderung. Zudem konnte

gezeigt werden, dass mit **BTZ043** behandelte Bakterienzellen DPR akkumulieren, da sie die Fähigkeit verloren haben, es zu DPA umzusetzen, was einen weiteren Hinweis auf die DprE1 Hemmung darstellt (Makarov et al., 2009). Diese Beobachtungen können durch den in Abbildung 6 gezeigten Wirkmechanismus erklärt werden.

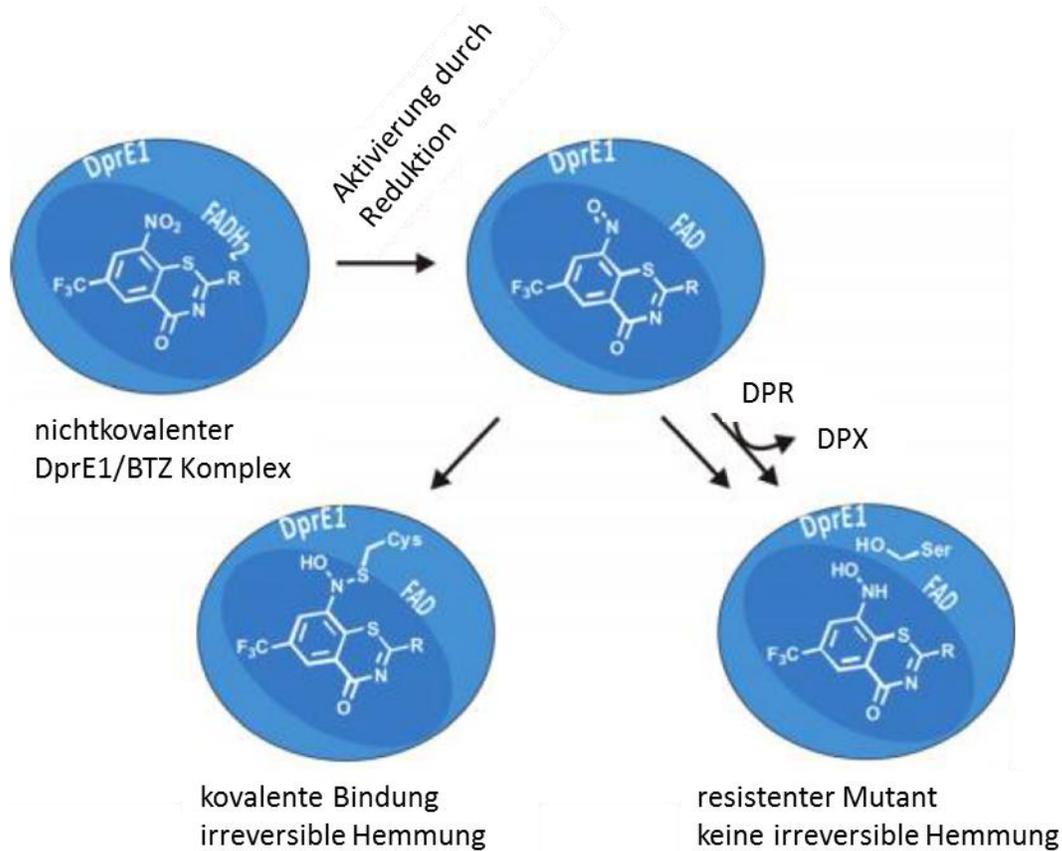


Abbildung 6. Wirkmechanismus der 8-Nitrobenzothiazinone (Trefzer et al., 2012)

Mit der Aufklärung der Kristallstruktur des kovalenten DprE1(*M. smegmatis*)/BTZ Komplexes konnte ein weiterer entscheidender Beleg für den Wirkungsmechanismus der BTZs geliefert werden (Neres et al., 2012, Makarov et al., 2014), da die kovalente Bindung zu Cys387 hier bestätigt werden konnte.

Die Nitro-BTZs reagieren nach Bioaktivierung als irreversible Inhibitoren mit DprE1, wie in Abbildung 6 dargestellt. Nach der Bildung eines nicht-kovalenten Komplexes zwischen DprE1 und dem Nitro-BTZ kommt es zur Reduktion der Nitrogruppe zur Nitrosogruppe, welche unmittelbar mit der Thiofunktion des Cys387 reagiert und das Enzym irreversibel hemmt. Bei

dieser nukleophilen Addition entsteht eine Stickstoff-Schwefelbindung zwischen DprE1 und dem BTZ, ein Semimercaptal-Addukt, welches massenspektroskopisch identifiziert werden konnte (Trefzer et al., 2010 und 2012, Neres et al., 2012). Der Hemmmechanismus wird als „mechanism based“ bezeichnet, weil zur Generierung des aktiven Hemmstoffes (Nitroso-BTZ) die katalytische Funktion des Targets (DprE1) genutzt wird, welches im Anschluss irreversibel gehemmt wird.

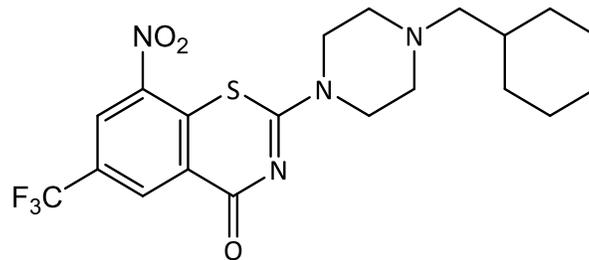


Abbildung 7. **PBTZ169** (Makarov et al., 2012)

Um die Eigenschaften von **BTZ043**, insbesondere die Wasserlöslichkeit, zu optimieren, wurden zahlreiche Nitro-BTZ Derivate synthetisiert und auf ihre antimykobakteriellen Eigenschaften getestet (Karoli et al., 2012, Gao et al., 2013, Makarov et al. 2014, Peng et al., 2015). Aus der Vielzahl der aktiven Derivate sticht das in Abbildung 7 gezeigte **PBTZ169**, wegen seiner geringen MHK ( $\leq 0.4$  nM) und der verbesserten *in vivo* Aktivität heraus. In einem Mausmodell erzielt **PBTZ169** eine Reduktion der Keimzahl um 1.5 log, während **BTZ043** mit 1.0 log einen schwächeren Effekt hervorruft, dabei wurden beide Testverbindungen 50 mg/kg Körpergewicht dosiert. Im direkten Vergleich zwischen INH als Referenzsubstanz und **PBTZ169** sind bei einer Dosierung von 25 mg/kg Körpergewicht keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Keimreduktion zwischen beiden Verbindungen auszumachen. In Kombination mit Bedaquilin und/oder Pyrazinamid zeigt **PBTZ169** einen deutlichen synergistischen Effekt, was seine Eignung als Wirkstoff in Kombinationstherapien unterstreicht (Makarov et al. 2014).

Wegen ihrer guten präklinischen Daten und der ausgeprägten Aktivität gegen den Tuberkuloseerreger sind für **BTZ043** wie auch für **PBTZ169** klinische Studien geplant.

Nachteile beider Nitro-BTZs (siehe Kapitel 5.6) ist ihre geringe Wasserlöslichkeit und die damit verbundene eingeschränkte Bioverfügbarkeit. In einer Bioverfügbarkeitsstudie in Mäusen (González-Martínez et al., 2015) wurde die geringe systemische Bioverfügbarkeit eindeutig

nachgewiesen: nach Gabe von 100 mg/kg  $c_{\max}$  **BTZ043** 4.06 µg/ml bzw.  $c_{\max}$  **PBTZ169** 1.74 µg/ml.

Die Nitrogruppe dieser Wirkstoffklasse wird kontrovers diskutiert, da die Bildung des reaktiven Nitroso-Derivates in humanen Zellen nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann. Nitroso-BTZs in humanen Zellen können unerwünschte Reaktionen mit Enzymen/Proteinen eingehen und daher toxisch sein. Insbesondere bei der langen Therapiedauer einer Tuberkulosebehandlung kann dies ein Ausschlusskriterium für mögliche Wirkstoffe darstellen.

Die durch Punktmutation mögliche Resistenzbildung stellt eine Schwachstelle der 8-Nitro-BTZs dar. Durch induzierte Mutation konnte gezeigt werden, dass *M. tuberculosis*-Stämme, bei denen Cys387 gegen andere Aminosäuren ersetzt ist, lebensfähig sind und eine deutlich geringere Sensitivität bzw. Resistenz gegen BTZs zeigen (Shi-Yan Foo et al., 2016). Inwiefern solche Mutationen spontan unter BTZ-Exposition auftreten und ob diese klinische Relevanz besitzen, kann noch nicht abgeschätzt werden.

Zusätzlich zu den Nitro-BTZs sind verschiedene kovalente DprE1-Hemmstoffe beschrieben, welche ebenfalls eine für die Wirksamkeit essentielle Nitrogruppe besitzen, deren MHKs jedoch nicht auf eine mit den BTZs vergleichbare Aktivität hinweisen. Dazu gehören die 5-Nitro-Chinoxaline (Magnet et al., 2010), Dinitrobenzamide (Christophe et al., 2009) und die Nitrobenzothiazole (Landge et al., 2015).

### **2.3 Reversible DprE1 Hemmung durch nicht-kovalente Inhibitoren**

Da DprE1 als sehr aussichtsreiches Arzneistofftarget identifiziert werden konnte, die Nitrogruppe als Pharmakophor der BTZs aber nicht unumstritten ist und Resistenzbildung durch Punktmutation auftreten kann, wurden alternative nicht-kovalente DprE1-Hemmstoffe gesucht und gefunden.

Mit **TCA1** (Wang et al., 2013) wurde eine Leitverbindung mit guter antimykobakterieller Aktivität *in vitro* (MHK von 0.51 µM gegen *M. tuberculosis*) beschrieben, die als nicht-kovalenter DprE1-Inhibitor ohne Nitrogruppe wirkt.

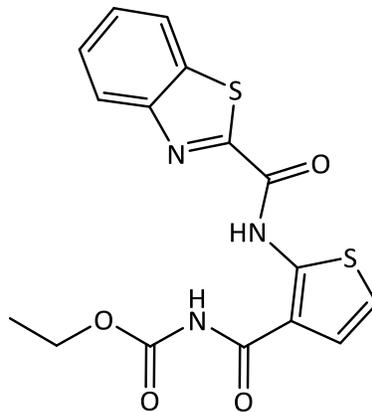


Abbildung 8. **TCA1** - nicht-kovalenter DprE1-Hemmstoff (Wang et al., 2013)

Die in Abbildung 8 gezeigte Verbindung weist *in vivo* eine gute Aktivität auf, so konnte in einem Mausmodell für chronische Tuberkulose eine Verringerung der Keimlast um 1 log erzielt werden (Dosierung 100 mg/kg), was eine mit den Nitro-BTZs vergleichbare Wirksamkeit darstellt (siehe Kapitel 2.2).

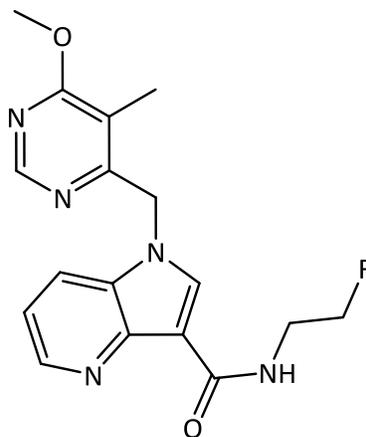


Abbildung 9. Leitstruktur der 1,4-Azaindole (Shirude et al., 2013)

Mit den 1,4-Azaindolen (Shirude et al., 2013) (siehe Abbildung 9) wurde eine weitere Klasse nicht-kovalenter DprE1 Hemmstoffe entdeckt, deren Leitstruktur trotz einer vergleichsweise hohen MHK von 1.56-3.12  $\mu\text{M}$  eine gute Wirksamkeit *in vivo* zeigt. Mit der in Abbildung 9 dargestellten Verbindung konnte bei einer Dosierung von 100 mg/kg eine Verringerung der Bakterienzahl um 1.5 log in einem Mausmodell der chronischen Tuberkulose erzielt werden.

Eine Übertragung des nicht-kovalenten Wirkmechanismus gelang Makarov et al. (Makarov et al., 2015) indem die Nitrogruppe in Position 8 des BTZ-Gerüsts durch einen Pyrrolring ersetzt wurde. Diese Strukturänderung geht jedoch mit einer Erhöhung der MHKs um mehr als das 100fache ( $> 0.35 \mu\text{M}$ ) und dem Verlust der *in vivo* Aktivität einher, sodass die publizierten 8-Pyrrolo-BTZs keine Alternative zu den Nitro-BTZs darstellen.

## 2.4 Zielstellung der Arbeit

Die Nitro-BTZs haben sich als hochwirksame, kovalente DprE1-Inhibitoren erwiesen, die eine außergewöhnliche *in vitro* Aktivität gegen *M. tuberculosis* besitzen und in Tiermodellen gute Wirksamkeit bei einer Tuberkuloseinfektion zeigen. Die folgende Arbeit befasst sich mit der Weiterentwicklung und Erforschung dieser Stoffklasse und des Targets DprE1.

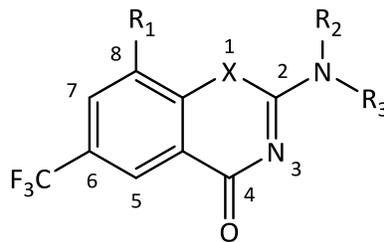


Abbildung 10. Grundgerüst der BTZs und ihrer Derivate ( $X = \text{S/O/NH}$ )

Ein Ziel der Arbeit ist die Synthese von neuen, bisher unveröffentlichten Nitro-BTZ Derivaten, die mit unterschiedlichen Substituenten an Position 2 des Grundgerüsts verknüpft sind (siehe Abbildung 10). Dieser Bereich im Molekül erlaubt eine gewisse Substitutionsfreiheit, unter Erhalt der Aktivität. Der Einfluss des variierten Substituenten auf die Wirksamkeit der Derivate ist ausgeprägt und erlaubt somit die Herstellung BTZs unterschiedlicher Aktivität. Bei der Derivatisierung der Nitro-BTZs steht neben dem Erhalt der nanomolaren Aktivität *in vitro* eine Verbesserung der Wasserlöslichkeit bzw. Bioverfügbarkeit im Vordergrund. Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Sauerstoffanaloga der BTZs (Rudolph, 2013) - den Benzoxazinonen (BOZs) - ist die Herstellung und Testung der entsprechenden Stickstoffanaloga (Benzazazinone, BAZs) ein Ziel dieser Arbeit.

Zur Synthese der Nitro-BTZ Derivate wird auf den von Dr. Rudolph entwickelten, gut reproduzierbaren Thioharnstoffweg (Rudolph, 2013) aufgebaut. Für eine breitere Anwendung des Thioharnstoffweges ist es notwendig, die Synthese von Thioharnstoffen aus sekundären Aminen zu optimieren.

Der Austausch der Nitrogruppe durch andere funktionelle Gruppen wird in dieser Arbeit mit Hilfe verschiedener Ansätze verfolgt. Zur besseren Aufklärung des molekularen Wirkungsmechanismus sollen Amino-, Hydroxylamino- und Nitroso-BTZs synthetisiert und getestet werden. Insbesondere die erstmalige Herstellung der reaktiven und instabilen Nitroso-BTZs ist ein wichtiges Ziel der Arbeit.

Weiterhin sollen BTZ-Derivate mit einer Aldehyd- bzw. Hydroxymethylfunktion an Position 8 des aromatischen Ringsystems hergestellt und auf ihren antimykobakteriellen Effekt getestet werden, mit der Absicht den kovalenten Wirkmechanismus zu erhalten und die Nitrofunktion zu ersetzen.

Zusammenfassend besteht die Motivation dieser Arbeit darin, mit der Synthese neuer BTZ-Derivate den molekularen Wirkmechanismus und das Target detaillierter zu beschreiben, sowie durch eine Optimierung der bekannten Verbindungen das Feld kovalenter DprE1-Inhibitoren zu ergänzen und deren Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu erforschen.

## **3 Synthesen**

Dieses Kapitel fasst die synthetischen Arbeiten, die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt wurden, zusammen und beleuchtet deren chemische Hintergründe. Im Abschnitt 3.1 werden die verwendeten BTZ-Synthesewege aufgezeigt und im Abschnitt 3.2 wird die Optimierung der Synthese von Thioharnstoffen beschrieben.

An die allgemeine Übersicht zu den häufig verwandten Synthesewegen schließt sich Kapitel 3.3 an, welches die Synthesen der 8-Nitro-BTZs beschreibt und dabei auch auf die Herstellung der Thioharnstoff bzw. Seitenketten eingeht. Die folgenden Abschnitte 3.4 und 3.5 beziehen sich auf die Synthese der BOZs und BAZs.

Die Kapitel 3.6, 3.7 und 3.8 behandeln die Herstellung von BTZ-Derivaten bei denen in Position 8 die Nitrogruppe durch eine andere funktionelle Gruppe ersetzt wurde. Dabei hat Kapitel 3.6 die Reduktion der Nitrofunktion zum Thema, während Kapitel 3.7 die Herstellung von Carbonsäureamiden/-imiden beschreibt. Abschließend wird in Abschnitt 3.8 der Syntheseweg für 8-Cyano, 8-Formyl- und 8-Hydroxymethyl-BTZs erläutert.

Das Kapitel 3.9 geht auf die Herstellung der aromatischen Ausgangsverbindungen ein, welche bei der BTZ Herstellung Verwendung finden.

### **3.1 Synthesewege der Benzothiazinone (BTZs)**

In Abbildung 10 ist die Grundstruktur der BTZs beziehungsweise ihrer Analoga gezeigt. Die nachfolgenden Synthesen gehen auf Strukturvariationen in Position 1, 2, 4 und 8 ein.

Für die Herstellung der BTZs werden zwei unterschiedliche Synthesewege genutzt. Wegen seiner Effizienz und guten Reproduzierbarkeit kann der Thioharnstoffweg nach Dr. Rudolph (siehe 3.1.1) (Rudolph, 2013) für die meisten Verbindungen angewendet werden. Für die BTZs, welche über diesen Syntheseweg nicht zugänglich sind, wird auf die klassische BTZ Synthese (siehe 3.1.2) zurückgegriffen (Makarov et al., 2007, Möllmann et al., 2009, Rudolph, 2013).

### 3.1.1 Die Synthese von BTZs mittels des Thioharnstoffweges

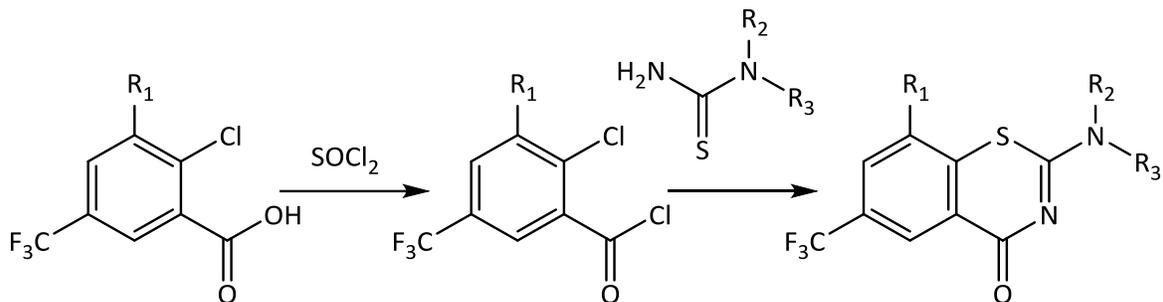


Abbildung 11. Thioharnstoffweg zur BTZ Synthese

Der in Abbildung 11 gezeigte Thioharnstoffweg (Rudolph, 2013, Rudolph et al., 2014) ermöglicht eine gute Zugänglichkeit zahlreicher BTZ Derivate. Im ersten Reaktionsschritt wird die entsprechende aromatische Carbonsäure mit SOCl<sub>2</sub> zum Carbonsäurechlorid aktiviert, anschließend erfolgt die Zugabe des Thioharnstoffes. Durch nukleophilen Angriff des Schwefels am Aromaten und des Stickstoffes am Carbonsäurechlorid entsteht das Thiazinonsystem.

### 3.1.2 Die klassische Synthese der BTZs

Der klassische BTZ-Syntheseweg, gezeigt in Abbildung 12, geht von der aromatischen Carbonsäure **AR96** aus, die mit SOCl<sub>2</sub> in Toluol zum entsprechenden Säurechlorid aktiviert wird. Anschließend erfolgt die Substitution des Chlorides durch KSCN zum Acylisothiocyanat (Koscik et al., 1983, Rudolph, 2013), welches als hochreaktives Zwischenprodukt direkt mit einem sekundären Amin umgesetzt wird. Bei dieser Reaktion entsteht ein N-Acylisothioharnstoff, der unter nukleophiler Substitution des Chlorides am Aromaten den Thiazinonring schließt.

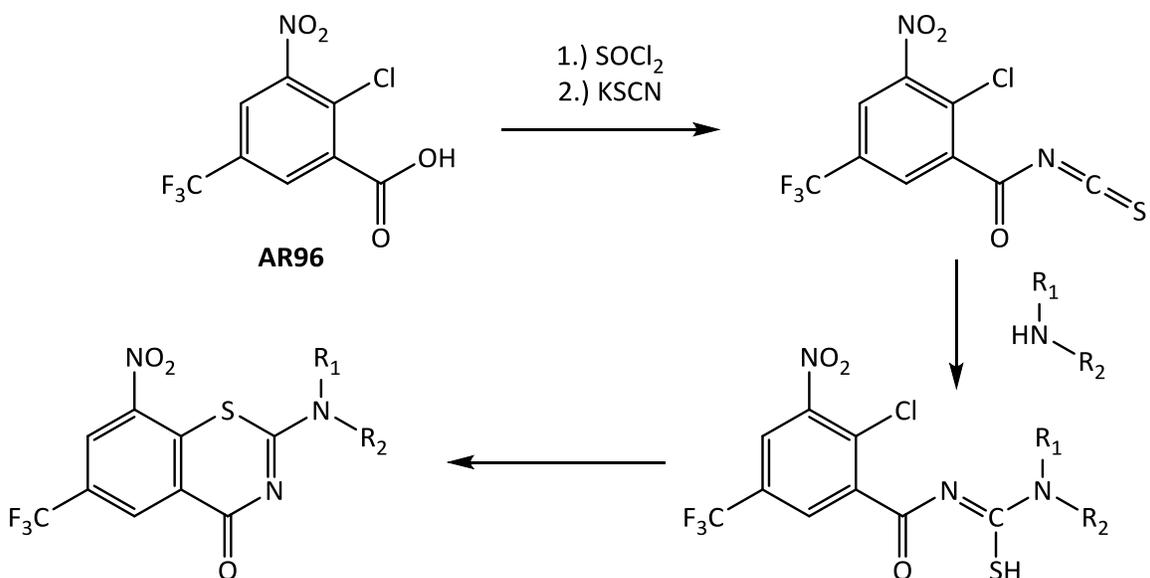


Abbildung 12. Klassischer Syntheseweg von BTZs

### **3.2 Synthese der Thioharnstoffe**

Ein wichtiges Zwischenprodukt für die Synthese von BTZs über den Thioharnstoffweg ist der Thioharnstoff selbst. Die synthetische Zugänglichkeit dieser Verbindungen ist Voraussetzung für die anschließenden Reaktionsschritte. Genutzt werden drei unterschiedliche chemische Vorgehensweisen, bei denen Benzoylisothiocyanat (Methode A) (Seybold et al., 1984), Trimethylsilylisothiocyanat (Methode B) (Narumi et al., 2011) und Thiocarbonyldiimidazol (Methode C) (Collins et al., 1998) als Reagenzien verwendet werden.

#### **3.2.1 Synthese von Thioharnstoffen mit Benzoylisothiocyanat (Methode A)**

Eine Möglichkeit zur Darstellung von Thioharnstoffen aus sekundären Aminen geht von Benzoylisothiocyanaten als reaktivem Intermediat aus. Im ersten Schritt der Reaktion wird Benzoylchlorid mit  $\text{NaSCN}$  umgesetzt, wie in Abbildung 13 dargestellt.

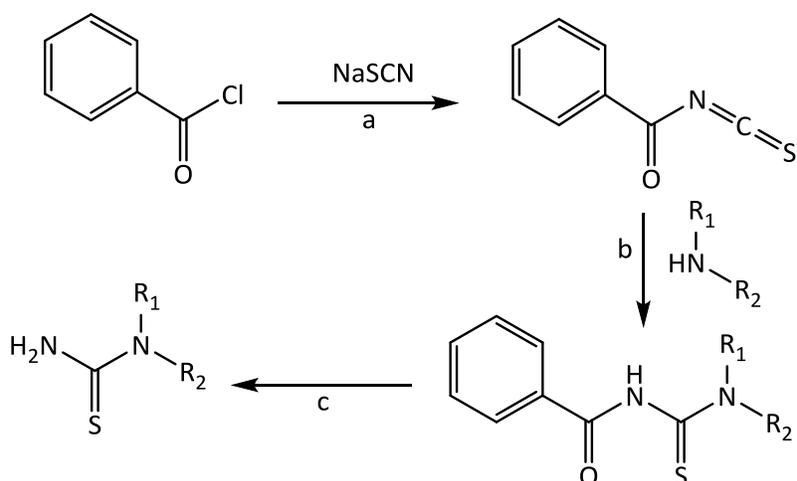


Abbildung 13. Thioharnstoffsynthese Methode A (**a** Aceton, 5 °C, Argon, 3.5 h, **b** RT, Argon, 3.5 h **c** HCl 36 %, 95 °C, 1.5 h)

Das Chlorid der aktivierten Carbonsäure wird nukleophil substituiert. Es bildet sich das reaktive Benzoylisothiocyanat, welches unmittelbar mit dem entsprechenden sekundären Amin zu N-Benzoylthioharnstoff umgesetzt wird. Durch anschließende saure Hydrolyse des N-Benzoylthioharnstoffes kann der eigentliche Thioharnstoff als Reaktionsprodukt gewonnen werden.

### 3.2.2 Synthese von Thioharnstoffen mit Trimethylsilylisothiocyanat (Methode B)

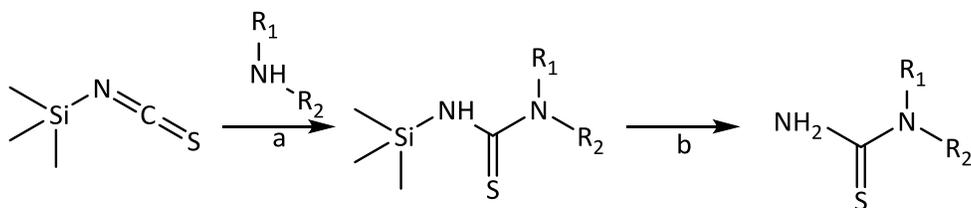


Abbildung 14. Thioharnstoffsynthese Methode B (a THF, RT, Argon, 48 h b Isopropanol/Wasser (9:1), Rückfluss, 5 Minuten) (Shikhaliev et al., 2003)

Wie in Abbildung 14 gezeigt, kann Trimethylsilylisothiocyanat als Reagenz zur Herstellung von Thioharnstoffen genutzt werden. Im ersten Reaktionsschritt wird das sekundäre Amin mit Trimethylsilylisothiocyanat in trockenem THF umgesetzt. Dabei kommt es zur nukleophilen

Addition des Aminostickstoffes an die CN-Doppelbindung des Isothiocyanates. Der entstandenen N-Trimethylsilylthioharnstoff kann durch kurzes Erhitzen in Gegenwart von Wasser zu dem entsprechenden Thioharnstoff hydrolysiert werden.

### **3.2.3 Synthese von Thioharnstoffen mit Thiocarbonyldiimidazol (Methode C)**

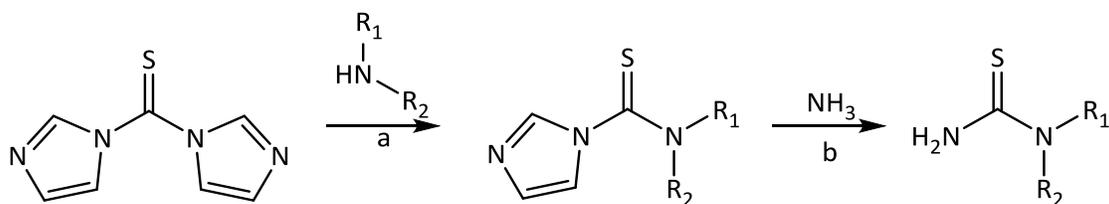


Abbildung 15. Thioharnstoffsynthese Methode C (**a** THF, Argon, RT, 2 h, anschließend 55 °C, Argon, 1 h **b** THF, 15 h, RT, anschließend 50 °C, 8 h)

Mit Hilfe von Thiocarbonyldiimidazol lassen sich Thioharnstoffe in einer effizienten Zweischriffsynthese herstellen, wie in Abbildung 15 gezeigt. Im ersten Reaktionsschritt wird Thiocarbonyldiimidazol mit dem sekundären Amin in THF umgesetzt. Dabei kommt es zur nukleophilen Substitution eines Imidazolringes am Thiocarbonylkohlenstoff durch den Aminostickstoff. Im zweiten Reaktionsschritt kommt es wiederholt zur nukleophilen Substitution eines Imidazols, in diesem Fall durch Ammoniak, welcher als 2 M Lösung in MeOH zugegeben wird. Eine Aufarbeitung des in Schritt a gebildeten Zwischenproduktes ist nicht notwendig.

### **3.2.4 Vergleich der Methoden zur Darstellung von Thioharnstoffen**

Um die Anwendbarkeit des Thioharnstoffweges zu erweitern und zu vereinfachen, ist eine effiziente und reproduzierbare Thioharnstoffsynthese notwendig. Wie Tabelle 2 zeigt, werden die drei unterschiedlichen Methoden ausgeführt und verglichen.

Die Methode A, welche Benzoylisothiocyanat als Reagenz nutzt, erweist sich als problematisch. Das reaktive Isothiocyanat führt zur Bildung zahlreicher Nebenprodukte und reduziert dadurch die Ausbeute.

Tabelle 2. Vergleich der Methoden zur Thioharnstoffsynthese (<sup>1</sup> Rudolph, 2013)

	Method A	Method B	Method C
Anzahl der Schritte	3	2	2
Reagenz zur Einführung der Thioharnstoffstruktur	Benzoylisothiocyanat	Trimethylsilyl-isothiocyanat	Thiocarbonyldiimidazol
Dauer	8.5 h	48 h	23 h
Ausbeute	16 % (AR104) 9 % (AR116) <sup>1</sup>	41 % (AR104) 30 % (AR116)	68 % (AR104) 43 % (AR116)

Die teilweise harschen Reaktionsbedingungen (1.5 h Erhitzen in 36 % HCl) schränken die Anwendbarkeit von Methode A auf säurestabile Verbindungen ein. Thioharnstoff-Derivate wie **AR102** oder **AR111** können nach dieser Methode nicht erfolgreich hergestellt werden.

Die Verwendung von Trimethylsilylisothiocyanat in Methode B erlaubt die Synthese von **AR104** bzw. **AR116** mit deutlich verbesserten Ausbeuten unter schonenden Reaktionsbedingungen. Die ausgeprägte Feuchtigkeitsempfindlichkeit des Reagenzes schränkt jedoch die Robustheit und Reproduzierbarkeit der Thioharnstoffsynthese nach dieser Methode ein.

Die Verwendung von Thiocarbonyldiimidazol in Methode C erlaubt eine effiziente und robuste Synthese von Thioharnstoffen. Die Ausbeuten sind im Vergleich zu Methode B optimiert und die milden Reaktionsbedingungen erlauben die Anwendung bei einer Vielzahl von sekundären Aminen. Eingeschränkt wird die Nutzung dieser Methode nur durch Substituenten in unmittelbarer Nachbarschaft zum Stickstoff des sekundären Amins. Es ist wahrscheinlich, dass die sterische Hinderung bei besagter Substitution eine Reaktion verhindert. Beispielsweise ist die Herstellung des Thioharnstoffes aus 2,6 Dimethyl-piperidin nicht möglich.

Unter Beachtung der genannten Einschränkung ist Methode C zur Herstellung von Thioharnstoffen aus sekundären Aminen sehr gut geeignet und wurde dementsprechend für zahlreiche Synthese angewendet.

### **3.3 Synthese neuer 8-Nitro BTZ-Derivate**

Wie publizierte Daten zeigen (Karoli et al., 2012, Gao et al., 2013, Makarov et al. 2014, Peng et al., 2016), ist der Aminosubstituent in Position 2 des 2-Amino-4H-1,3-benzothiazin-4-on Grundgerüsts gut für diverse Strukturvariationen geeignet. Eine Vielzahl solcher BTZ Derivate ist bereits patentiert (Makarov et al., 2007, Möllmann et al., 2009, Yu et al., 2011, Makarov et al., 2012, Cooper et al., 2012, Yu et al., 2012 Yu et al., 2013). Daraus wird ersichtlich, dass Variabilität hinsichtlich des Substitutionsmusters dieser Position besteht und die Wirksamkeit gegen *M. tuberculosis* erhalten bleibt.

Trotz besagter Variabilität ist der Einfluss des Aminosubstituenten in Position 2 auf die Aktivität der 8-Nitro-BTZs sehr ausgeprägt. So können kleine Strukturänderungen einen substantiellen Einfluss auf die Affinität zum Enzym und damit auch auf die MHK aufweisen. Das Ziel der synthetischen Arbeit ist die Herstellung von neuen BTZs mit antimykobakterieller Aktivität (gegen *M. tuberculosis*) und deren Vergleich mit den bekannten Leitsubstanzen **BTZ043/PBTZ169**.

Zu diesem Zweck wird eine Reihe unterschiedlicher sekundärer Amine anhand der publizierten Struktur-Wirkungs-Beziehungen ausgewählt, die erstmals als Partialstrukturen an BTZs genutzt werden. Eine Gruppe hier neu vorgestellter BTZs nutzt 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin als Substituenten, wobei unterschiedliche Substitutionsmuster mit Methoxygruppen am Aromaten des Tetrahydroisochinolins berücksichtigt werden. Für eine weitere Serie neuer BTZs finden monoacylierte Piperazine als Seitenkette Verwendung, welche als Carbon- bzw. Sulfonsäureamide substituiert sind. Der komplexe Diazabicyclononan-Heterozyklus, wie auch eine Reihe unterschiedlicher Piperidinderivate, sind weitere sekundäre Amine, die neu als Substituenten in Position 2 des BTZ-Grundgerüsts eingeführt werden.

### 3.3.1 Synthese von BTZs mit 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin Substituenten

Die Synthese der 8-Nitro-BTZs mit 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin als Substituent in Position 2 erfolgt über den Thioharnstoffweg (siehe Kapitel 3.1.1). Die Beschreibung beginnt in diesem Kapitel mit der Synthese des BTZs. Im Anschluss folgt die Darstellung von Thioharnstoff bzw. Tetrahydroisochinolinderivaten. Nach Aktivierung der Carbonsäure **AR96** zum Säurechlorid mit  $\text{SOCl}_2$  wird dieses mit dem Thioharnstoff umgesetzt, worauf sich das 8-Nitro-BTZs bildet.

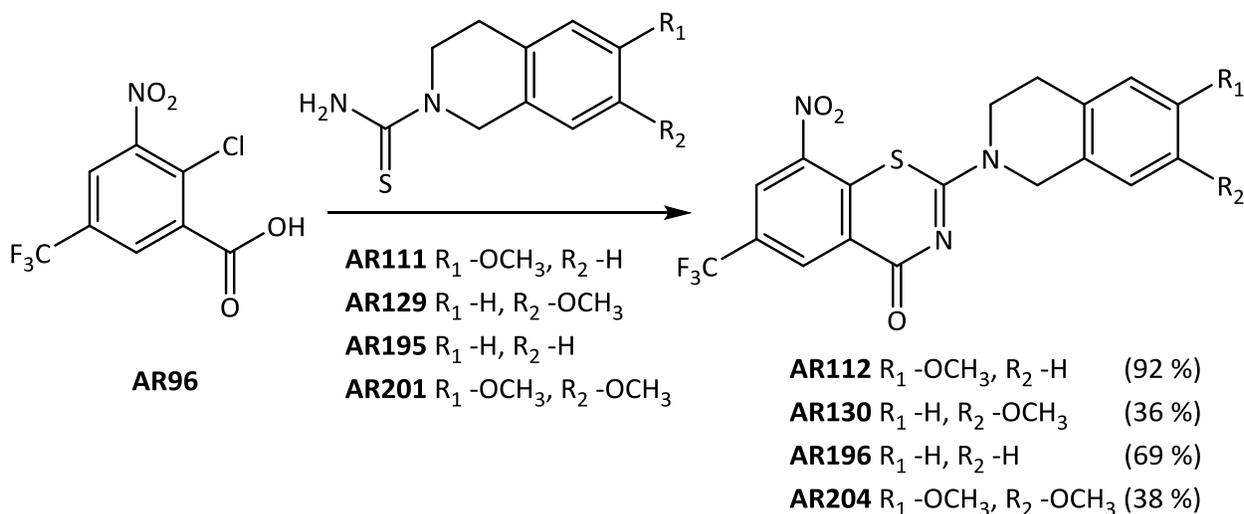


Abbildung 16. Synthese der 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-BTZs (**1**  $\text{SOCl}_2$ , Toluol, Rückfluss, 2 h **2** Zugabe von Thioharnstoffderivat, Toluol, Rückfluss, 1-2 h)

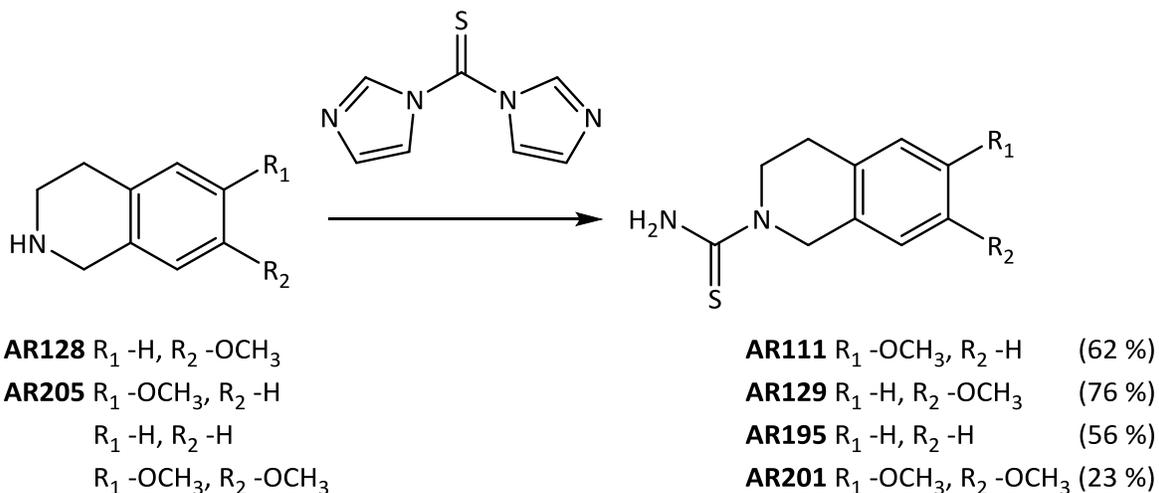


Abbildung 17. Synthese der Thioharnstoffe aus 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolinderivaten (**1** THF, Argon, RT, 2 h, anschließend 55 °C, Argon, 1 h **2** THF, 15 h, RT, anschließend 50 °C, 8 h)

Die Synthese der Thioharnstoffe wird nach Methode C unter Verwendung von Thiocarbonyldiimidazol durchgeführt, wobei im ersten Schritt das sekundäre Amin ein Imidazol substituiert. Anschließend wird durch Ammoniak (2 M in MeOH) der zweite Imidazolring substituiert.

Die Synthese von 6-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin (**AR205**) erfolgt ausgehend von 2-(3-Methoxyphenyl)ethylamin durch die Pictet-Spengler-Kondensation (Zhong et al., 2007) (siehe Abbildung 18).

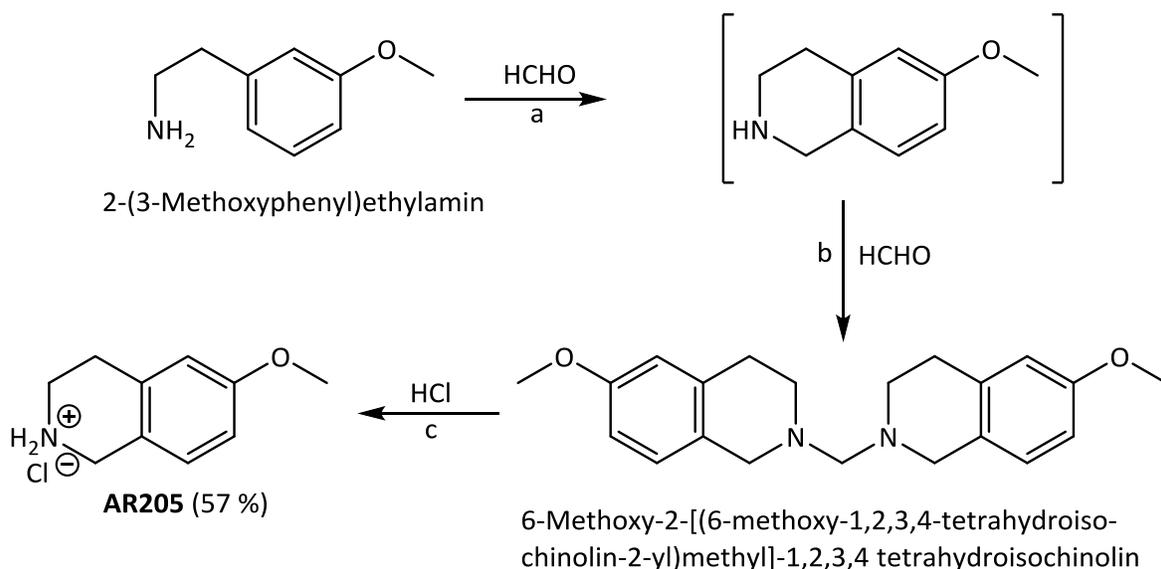


Abbildung 18. Synthese von 6-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin (**AR205**) (a MeOH, HCl, HCHO Lösung 37 %, Reflux, 3 h b Zugabe von 5 N NaOH, Extraktion mit Chloroform c Isopropanol, HCl, RT, 68 h)

Dafür wird im ersten Schritt 2-(3-Methoxyphenyl)ethylamin mit Formaldehyd unter Beisein von HCl umgesetzt. Hierbei reagiert der Aldehyd zuerst mit dem nukleophilen Aminostickstoff unter Bildung eines Iminiumkations, welches den Aromaten elektrophil substituiert. Anschließend kommt es zur Bildung des in Abbildung 18 gezeigten Vollaminals, da ein weiteres Molekül Formaldehyd mit dem sekundären Amin des 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolins reagiert. Durch Überführung in die freie Base mittels Zugabe von 5 M NaOH kann das Aminal durch Extraktion mit Chloroform isoliert werden. Anschließend erfolgt die saure Hydrolyse unter Abspaltung von Formaldehyd in Isopropanol/HCl bei RT.

Die Synthese von 7-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin (**AR128**) aus 2-(4-Methoxyphenyl)ethylamin ist über die Pictet-Spengler Kondensation, wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, nicht möglich. Da die elektrophile Substitution am Aromaten an der weniger aktivierten Metaposition zur Methoxygruppe erfolgen muss, ist der Ringschluss erschwert. Aus diesem Grund wird das Amin mit Chlorameisensäuremethylester in das entsprechende Methylcarbammat **AR123** überführt und dieses in heißer Polyphosphorsäure cyclisiert (Sall et al., 1987) (siehe Abbildung 19).

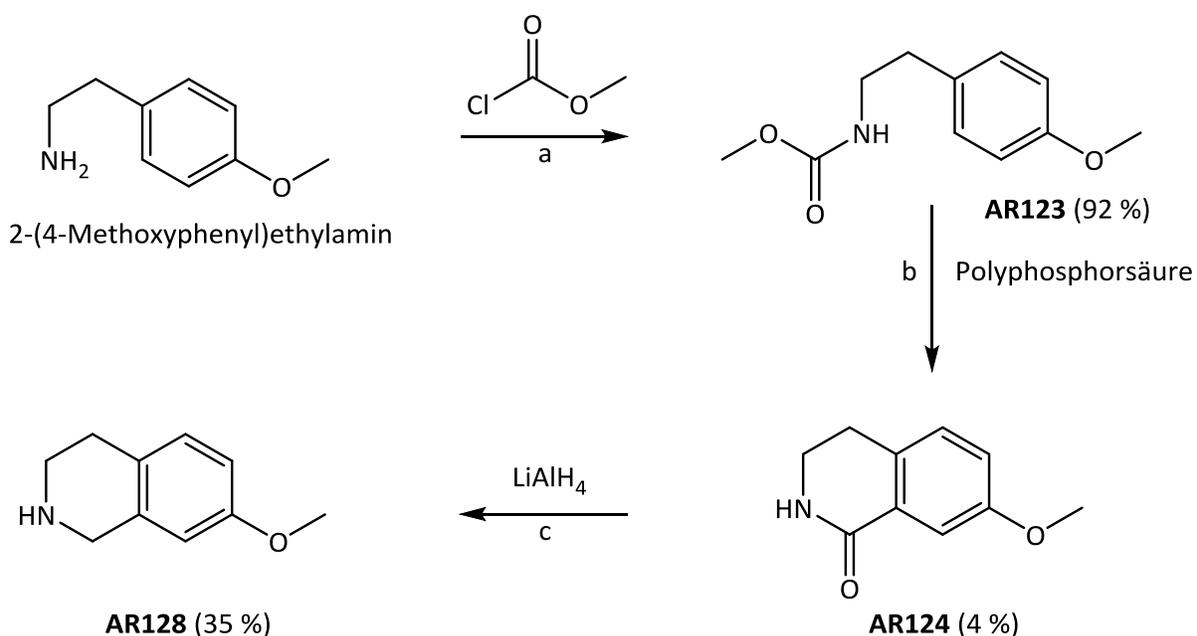


Abbildung 19. Synthese von 7-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin (**a** Triethylamin, THF, Argon, RT, 24 h **b** 145 °C, 10 Minuten **c** THF, Reflux, 2 h)

Das 7-Methoxy-3,4-dihydroisochinolin-1-on **AR124** bildet sich nur mit geringer Ausbeute und kann durch anschließende Reduktion des Amides zum Amin mit  $\text{LiAlH}_4$  in das 7-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin (**AR128**) überführt werden.

### 3.3.2 Synthese von BTZs mit N-Acylpiperazinsubstituenten

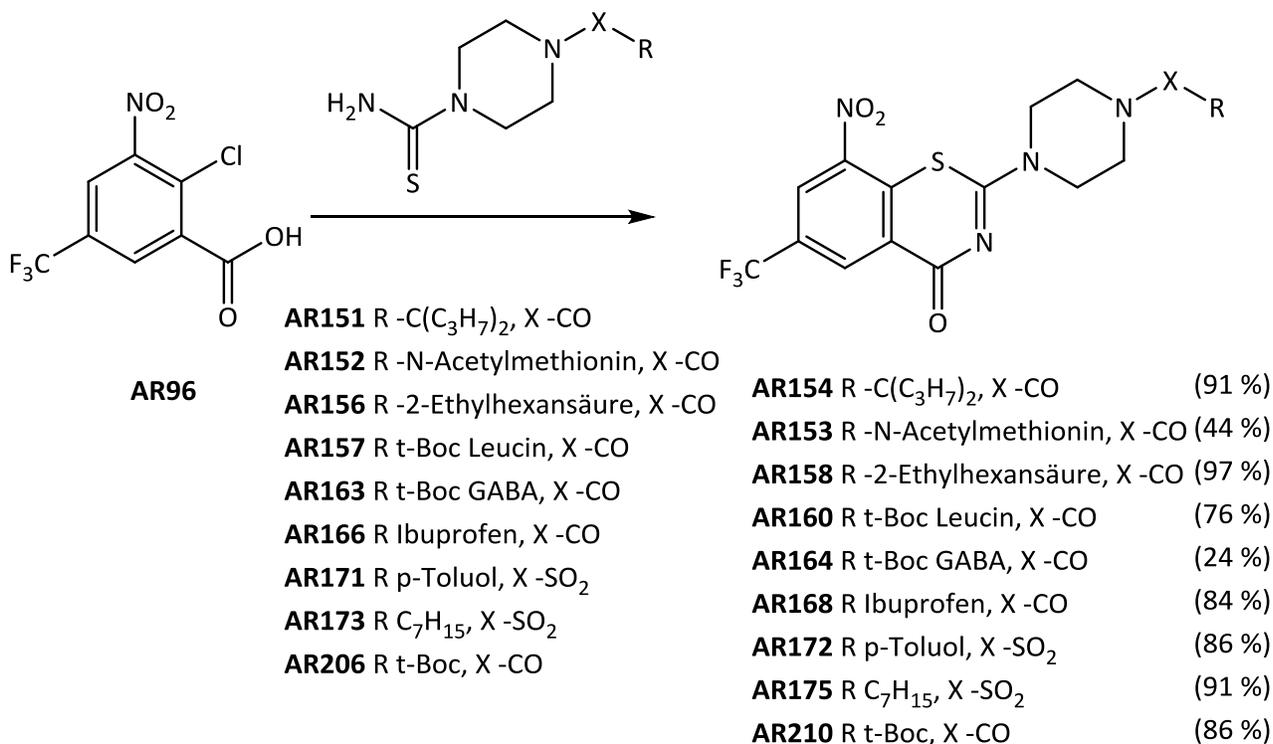
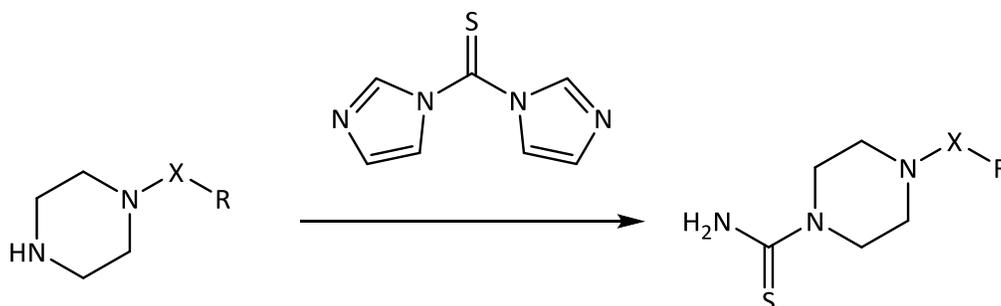


Abbildung 20. Synthese der N-Acylpiperazin-BTZs (**1.** SOCl<sub>2</sub>, Toluol, Rückfluss, 2 h **2.** Zugabe des Thioharnstoffderivates, Toluol, Rückfluss, 1-2 h)

Die Synthese einer Reihe von 8-Nitro-BTZs mit einem N-Acylpiperazin als Substituent an Position 2 des Thiazinonringes kann über den Thioharnstoffweg, wie unter 3.1.1 beschrieben, realisiert werden. Zur Acylierung des Piperazins werden unterschiedliche Carbon- und Sulfonsäuren verwendet, wobei auch auf Arzneistoffe wie Ibuprofen bzw. Aminosäuren zurückgegriffen wird, um eine gewisse Strukturvielfalt zu erreichen und Fragmente zu verwenden, deren Anwendbarkeit im Menschen belegt ist (siehe Abbildung 20). Die Synthese der Ausgangsverbindungen ist in folgenden Abschnitten beschrieben. Die meisten BTZs konnten mit guten Ausbeuten von >80 % gewonnen werden.

Durch eine deutlich geringere Ausbeute von 24 % fällt die Synthese von **AR164** auf. Dieser Sachverhalt ist der säurelabilen t-Boc Schutzgruppe geschuldet, welche durch Protonen aus der Carbonsäureaktivierung bzw. aus der folgenden Reaktion teilweise gespalten wird, was den Reaktionsablauf stört. Bei Synthese von anderen BTZ Derivaten mit t-Boc-Schutzgruppe, wie

**AR210** kann dieser Effekt durch die Zugabe von Hünig-Base unterdrückt werden, wodurch höhere Ausbeuten erzielt werden.



<b>AR147</b> R -C(C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> ) <sub>2</sub> , X -CO	<b>AR151</b> R -C(C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> ) <sub>2</sub> , X -CO	(72 %)
<b>AR148</b> R -N-Acetylmethionin, X -CO	<b>AR152</b> R -N-Acetylmethionin, X -CO	(60 %)
<b>AR150</b> R -2-Ethylhexansäure, X -CO	<b>AR156</b> R -2-Ethylhexansäure, X -CO	(61 %)
<b>AR155</b> R t-Boc Leucin, X -CO	<b>AR157</b> R t-Boc Leucin, X -CO	(58 %)
<b>AR161</b> R t-Boc GABA, X -CO	<b>AR163</b> R t-Boc GABA, X -CO	(70 %)
<b>AR165</b> R Ibuprofen, X -CO	<b>AR166</b> R Ibuprofen, X -CO	(63 %)
<b>AR170</b> R p-Toluol, X -SO <sub>2</sub>	<b>AR171</b> R p-Toluol, X -SO <sub>2</sub>	(35 %)
<b>AR169</b> R C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> , X -SO <sub>2</sub>	<b>AR173</b> R C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> , X -SO <sub>2</sub>	(84 %)
<b>AR179</b> R t-Boc, X -CO	<b>AR209</b> R t-Boc, X -CO	(69 %)

Abbildung 21. Synthese der Thioharnstoffe aus N-Acylpiperazinen (**1** THF, Argon, RT, 2 h, anschließend 55 °C, Argon, 1 h **2** THF, 15 h, RT, anschließend 50 °C, 8 h)

Die Herstellung der entsprechenden Thioharnstoffe wird mit Hilfe der unter 3.2.3 beschriebenen Methode C durchgeführt, wobei sich die breite Anwendbarkeit und große Zuverlässigkeit von Thiocarbonyldiimidazol zeigt. Diverse in Abbildung 21 dargestellte Thioharnstoffe können mit guten Ausbeuten zwischen 60-70 % gewonnen werden und stehen für die BTZ-Synthese zur Verfügung.

Im folgenden Abschnitt wird die Herstellung der mit Sulfonyl- bzw. Carbonsäure monoacylierten Piperazine erläutert.

Die Monocarbonsäureamide werden direkt aus Piperazin und der entsprechenden Carbonsäure mit dem Kupplungsreagenz PyBOP® synthetisiert (Coste et al., 1990, Dijk et al., 2008, Richter, 2013). Dabei wird auf die Verwendung von Schutzgruppen verzichtet. Damit die Bildung der unerwünschten Diamide verhindert wird, ist es notwendig, Piperazin im Überschuss vorzulegen

(3-5 Äq.) und eine Lösung aus Carbonsäure und PyBOP® zuzutropfen. Durch dieses Vorgehen ist es möglich, die Monoamide reproduzierbar und mit guter Ausbeute zu gewinnen.

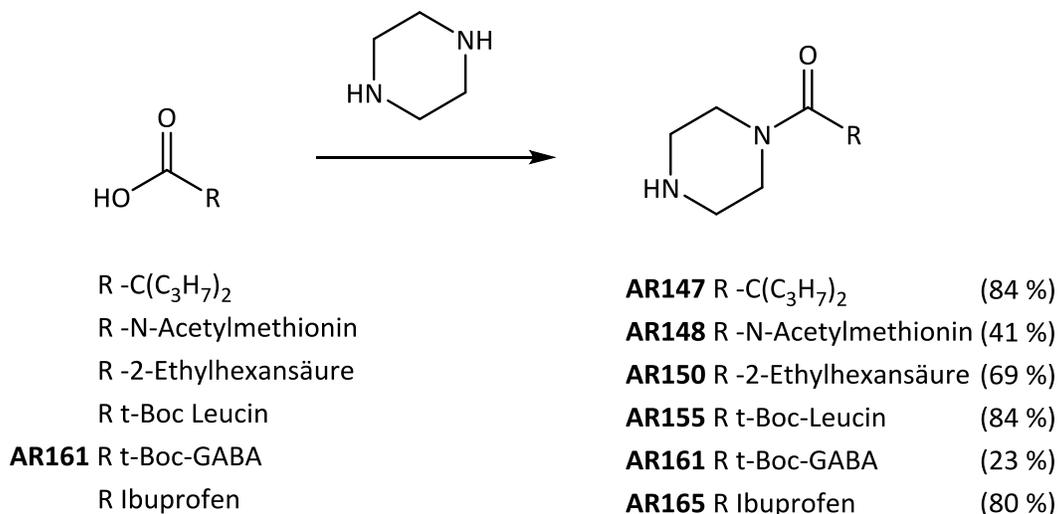


Abbildung 22. Synthese der Carbonsäureamide (PyBOP®, DMF, RT, 16 h)

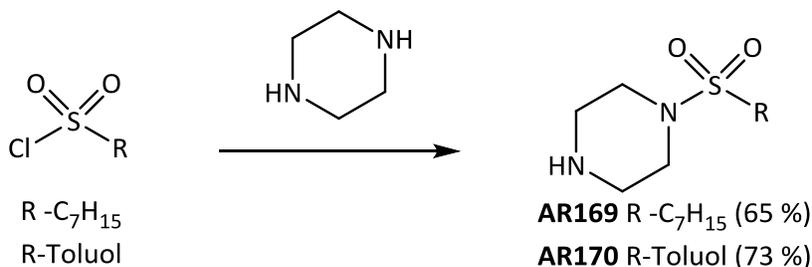


Abbildung 23. Synthese der Sulfonsäureamide (DMF, RT, über Nacht)

Für die Herstellung der Sulfonsäureamide wird Piperazin mit den entsprechenden Sulfonsäurechloriden umgesetzt (Yan et al., 2013) (siehe Abbildung 23). Analog zur Carbonsäureamidsynthese wird ein Überschuss Piperazin (5 Äq.) als Lösung vorgelegt und das reaktive Sulfonsäurechlorid zugegeben, wodurch die Bildung von Diamiden erfolgreich unterdrückt werden kann.

Die Aktivierung der Sulfonsäuren zu ihren Chloriden wird mit POCl<sub>3</sub> als Lösungsmittel (7.5 Äq.) und einstündigem Erhitzen auf 100 °C durchgeführt (Cesarz et al., 1989).

### 3.3.2.1 Modifizierter Syntheseweg für N-Acylpiperazin BTZs

Zur Erhöhung der Effizienz und einfacheren synthetischen Zugänglichkeit von neuen N-Acylpiperazin-BTZs wird der Syntheseweg, wie in Abbildung 24 gezeigt, modifiziert.

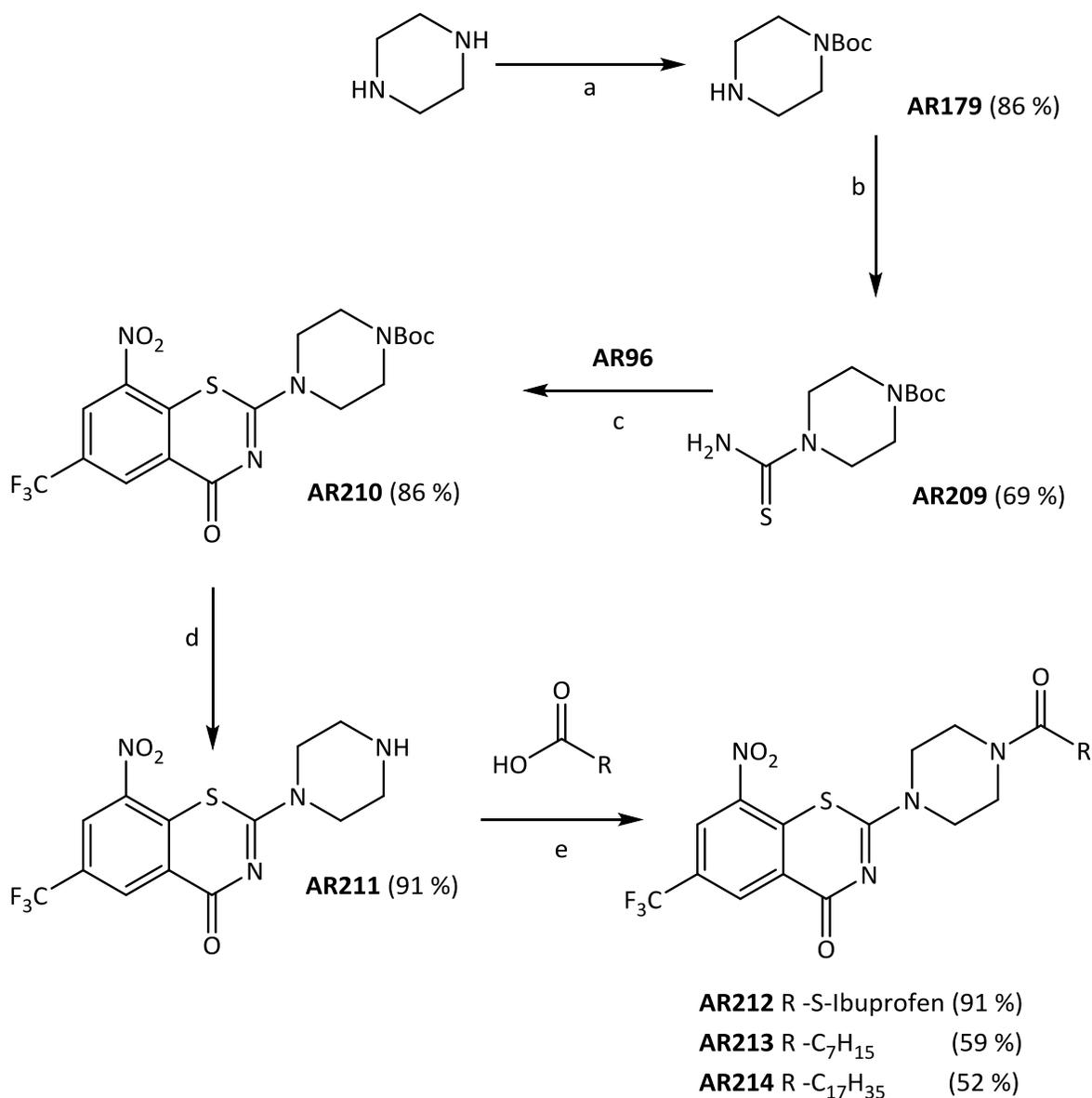


Abbildung 24. Modifizierter Syntheseweg für N-Acylpiperazin BTZs (**a** Di-tert-butyl dicarbonat, TEA, MeOH, RT, 4 h **b**<sub>1</sub> Thiocarbonyldiimidazol, THF, Argon, RT, 2 h, anschließend 55 °C, Argon, 1 h **b**<sub>2</sub> NH<sub>3</sub>, THF, 15 h, RT, anschließend 50 °C, 8 h **c**<sub>1</sub> **AR96**, SOCl<sub>2</sub>, Toluol, Rückfluss, 2 h **c**<sub>2</sub> **AR209**, Toluol, Rückfluss, 1-2 h **d** TFA, DCM, RT, 1 h **e** PyBOP®, Hünig-Base, DCM, RT, über Nacht)

Im ersten Schritt erfolgt die Herstellung von **AR179** aus Piperazin durch Umsetzung mit Di-tert-butylidicarbonat (Bala et al., 2015). Dabei kommt es zur Einführung einer t-Boc-Schutzgruppe an einem der Piperazinstickstoffe. Um die Selektivität der Reaktion zu gewährleisten und die Entstehung von Piperazinderivaten mit zwei t-Boc-Schutzgruppen zu vermeiden, wird 1 Äq. Piperazin mit 0.4 Äq. Di-tert-butylidicarbonat umgesetzt (siehe Abbildung 24).

Im folgenden Schritt wird die Synthese des Thioharnstoffes aus tert-Butylpiperazin-1-carboxylat (**AR179**) nach Methode C unter Verwendung von Thiocarbonyldiimidazol durchgeführt. Anschließend kann durch Umsetzung des Thioharnstoffes **AR209** mit dem Säurechlorid von **AR96** das BTZ **AR210** gewonnen werden (Abbildung 24, Schritt C). Durch saure Abspaltung der t-Boc-Schutzgruppe mit Hilfe von TFA wird **AR211** mit freier sekundärer Aminfunktion synthetisiert. Dieses Derivat kann in Grammmengen hergestellt werden und eignet sich ideal zur Derivatisierung. Es ist möglich, den Aminostickstoff in einer Ein-Schritt-Synthese mit einer Carbonsäure zu acylieren und neue BTZ-Derivate herzustellen. Dies stellt eine wesentliche Vereinfachung zum weiter oben beschriebenen Syntheseweg dar (siehe Kapitel 3.3.2). Die Knüpfung des Carbonsäureamides erfolgt unter Nutzung des Kupplungsreagenzes PyBOP® in DCM mit Hünig-Base.

### **3.3.2.2 Synthese von BTZs mit cyclopeptidischer Seitenkette**

Ausgehend von **AR164** werden im Rahmen der Arbeit BTZ-Derivate durch eine Amidbindung mit einem Cyclopeptid exocyclisch verknüpft. Die so erhaltenen Derivate **AR219** und **AR220** erweitern die Variabilität der hergestellten BTZ-Derivate hinsichtlich der Polarität und Größe des Restes in Position 2. Somit stehen zwei neue BTZ-Derivate zur Verfügung, die in Position 2 einen Substituenten besitzen, der deutlich raumfordernder und polarer ist als der der bekannten Derivate.

Der Syntheseweg für diese Derivate ist in Abbildung 25 dargestellt. Nach saurer Abspaltung der t-Boc-Schutzgruppe von **AR164** mit Hilfe von TFA in DCM steht in Verbindung **AR167** ein freies, primäres Amin zur Synthese eines Carbonsäureamides zur Verfügung. Im folgenden Schritt wird das Wollamid-Derivat **HA-3-29** (Asfaw, 2016) mit **AR167** unter Nutzung von HATU als

Kupplungsreagenz amidiert. Bei der Überführung von **AR219** in **AR220** kommt es zur sauren Abspaltung von zwei t-Boc- und einer Trityl-Schutzgruppe mit Hilfe von TFA.

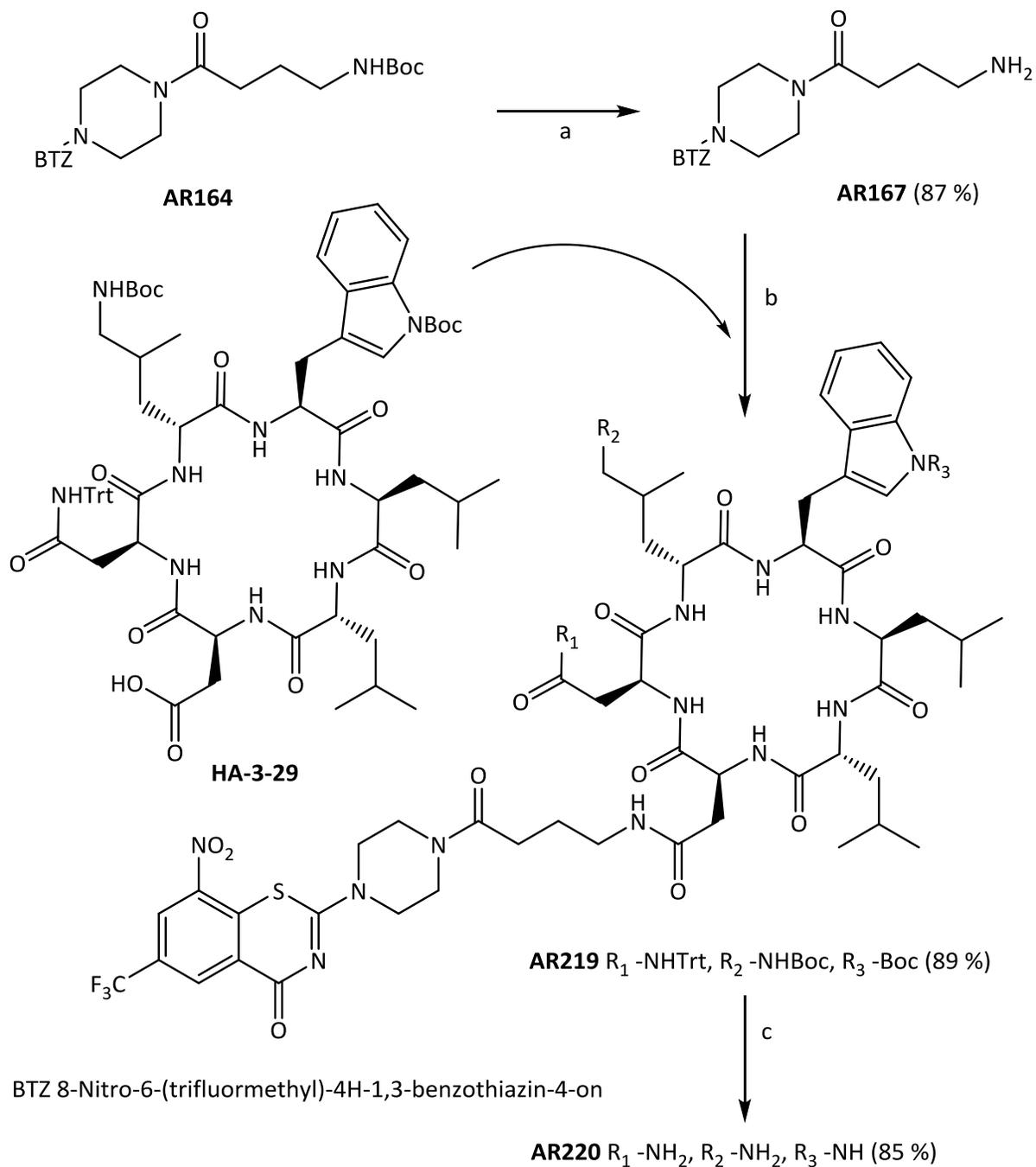


Abbildung 25. Synthese von BTZs mit cyclopeptidischer Seitenkette (a TFA, DCM, 1 h b HATU, Hünig-Base, DMF, 20 h c TFA, TIPS, H<sub>2</sub>O, 3 h)

### 3.3.3 Synthese von BTZs mit Diazabicyclononansubstituenten

In Anlehnung an **PBTZ169** erfolgt die Herstellung von BTZ-Derivaten mit dem Diazabicyclononanheterozyklus als Substituent in Position 2 des aromatischen Grundgerüsts. Die Synthese wird unter Verwendung des Thioharnstoffweges zur BTZ-Synthese, wie in Abbildung 26 gezeigt, durchgeführt. Im ersten Reaktionsschritt erfolgt die Aktivierung von **AR96** zum Carbonsäurechlorid und durch anschließende Zugabe des Thioharnstoffes der Ringschluss zum BTZ.

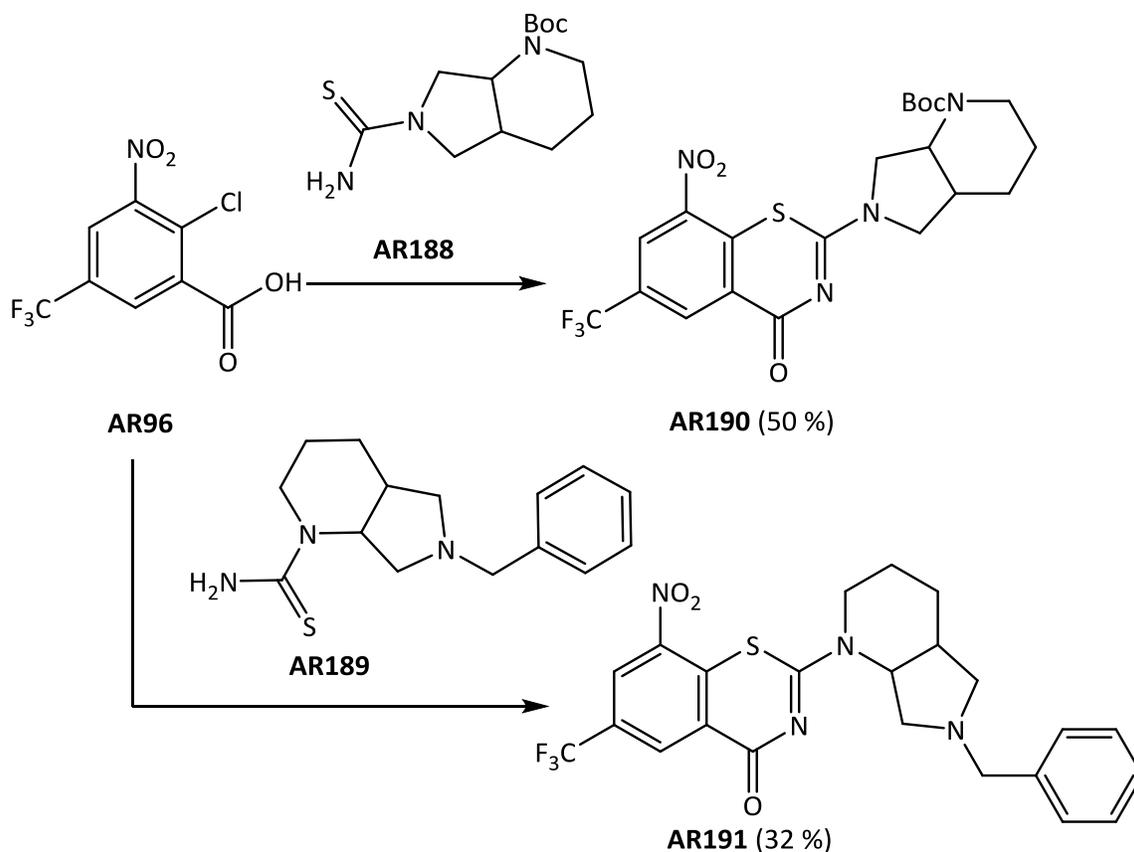


Abbildung 26. Synthese der Diazabicyclonon BTZs (1.  $\text{SOCl}_2$ , Toluol, Rückfluss, 2 h 2. Zugabe von Thioharnstoffderivat, Toluol, Rückfluss, 1-2 h)

Mit Hilfe der Methode C für die Thioharnstoffsynthese werden die Verbindungen **AR188** und **AR189** hergestellt (siehe Abbildung 27). Die Verwendung von Schutzgruppen ist bei dieser

Reaktion notwendig, um einen eindeutigen Reaktionsverlauf sicher zu stellen und selektiv den Pyrrolidin- bzw. den Piperidinthioharnstoff herzustellen.

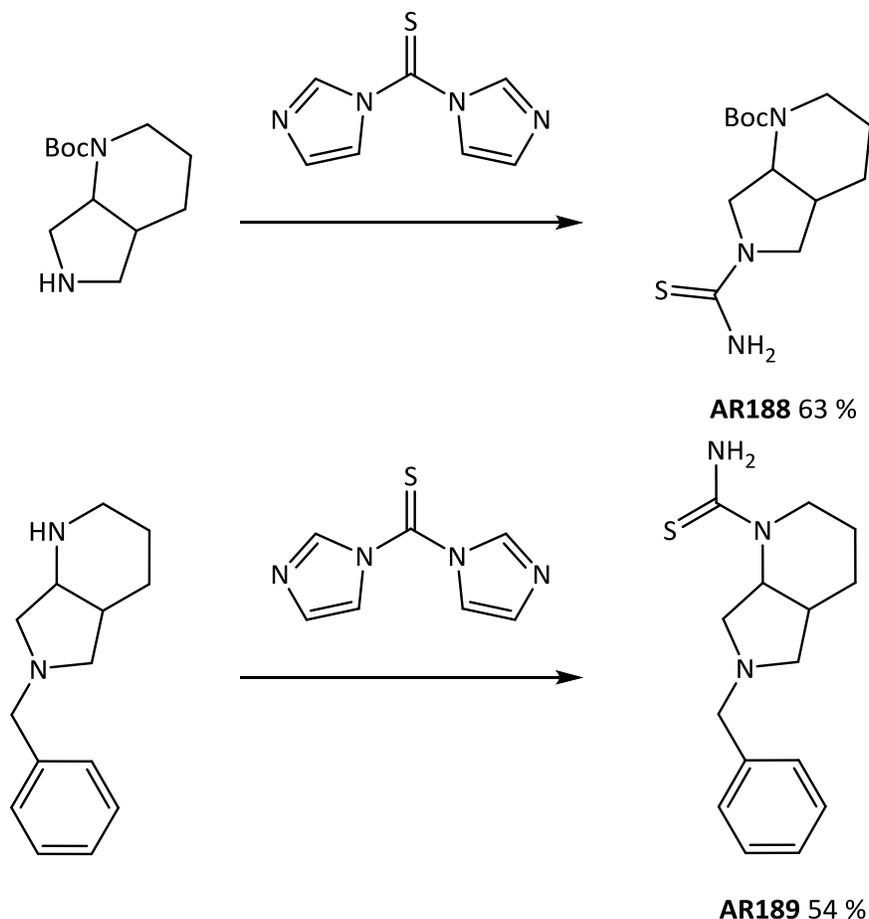
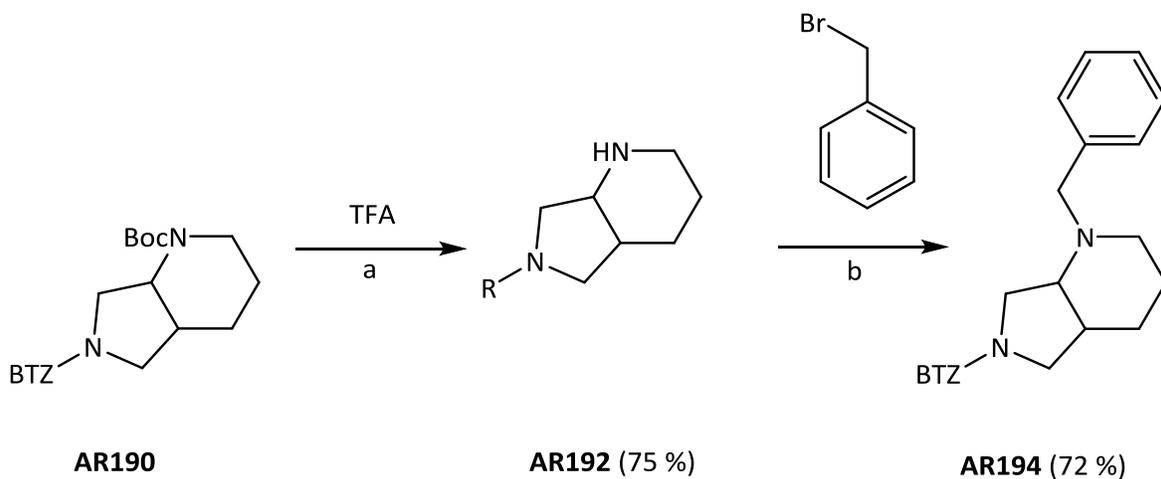


Abbildung 27. Thioharnstoffsynthese aus Diazabicyclononanen (**1** THF, Argon, RT, 2 h, anschließend 55 °C, Argon, 1 h **2** THF, 15 h, RT, anschließend 50 °C, 8 h)

Zur synthetischen Modifikation der Diazabicyclononan Seitenkette wird die t-Boc-Schutzgruppe bei **AR190** sauer mit TFA abgespalten und damit das ungeschützte Aminoderivat **AR192** hergestellt (siehe Abbildung 28). Durch Umsetzung mit Benzylbromid wird der freie Stickstoff in das entsprechende Benzylderivat überführt, wodurch **AR194** gewonnen wird, das Isomer zu **AR191** (Pham et al., 2008).



BTZ 8-Nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on

Abbildung 28. Modifikation der Seitenkette von **AR190** (a TFA, DCM, RT, 1.5 h b DCM, H<sub>2</sub>O, NaCO<sub>3</sub>, RT, 12 h)

### 3.3.4 Synthese der Benzothiazinone mit Piperidinseitenkette

Wie in Abbildung 29 gezeigt, werden verschiedene Piperidinderivate und andere Amine als Substituenten am BTZ-Gerüst berücksichtigt. Die Synthese erfolgt über den Thioharnstoffweg, der für alle Derivate verlässlich gute Ausbeuten >50 % ermöglicht. Als Substituenten werden, ausgehend von Piperidin, Verbindungen wie Thiomorpholin bzw. 4-Hydroxypiperidin genutzt. Doch auch komplexere Seitenketten wie das 4[-(4-Trifluormethoxy)phenoxy]piperidin (**AR106**), welches aus dem neuen Antituberkulotikum Delamanid bekannt ist, werden verwendet.

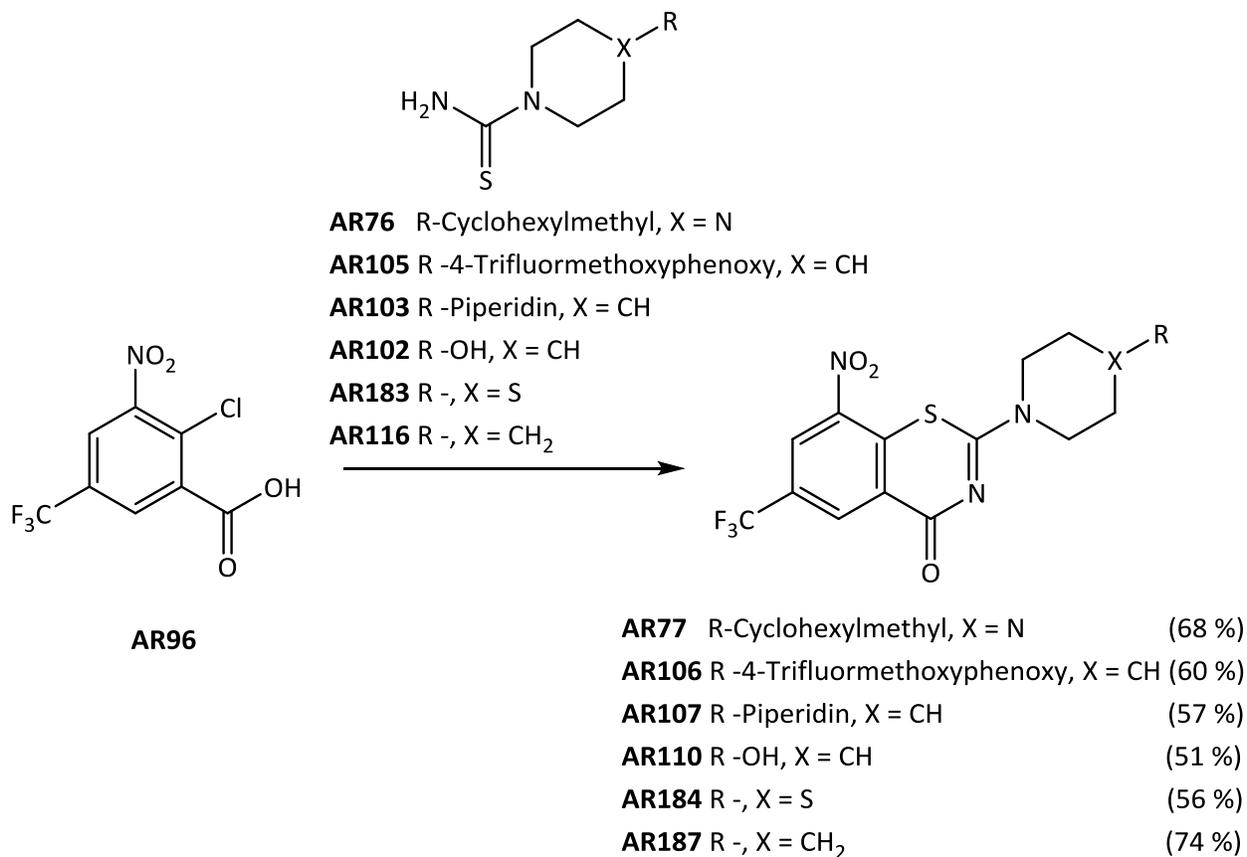
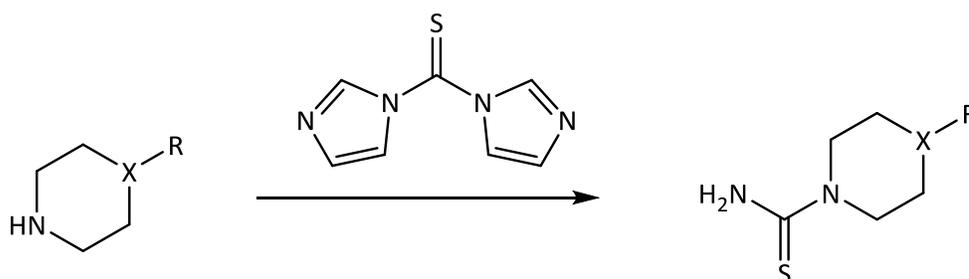


Abbildung 29. Synthese der BTZs mit Piperidinseitenkette und anderen Aminen (**1** SOCl<sub>2</sub>, Toluol, Rückfluss, 2 h **2** Zugabe von Thioharnstoffderivat, Toluol, Rückfluss, 1-2 h)

Wie bereits bei Rudolph (Rudolph, 2013) beschrieben, ist PBTZ169 (**AR77**) über diesen Syntheseweg gut zugänglich, weswegen PBTZ169 im Rahmen dieser Arbeit als Referenzverbindung hergestellt wurde. Bei der Synthese von **AR77** konnte eine Ausbeute von

68 % erzielt werden, die vergleichbar mit der von Makarov et al. (Makarov et al., 2012) publizierten Ausbeute ist (71 %).

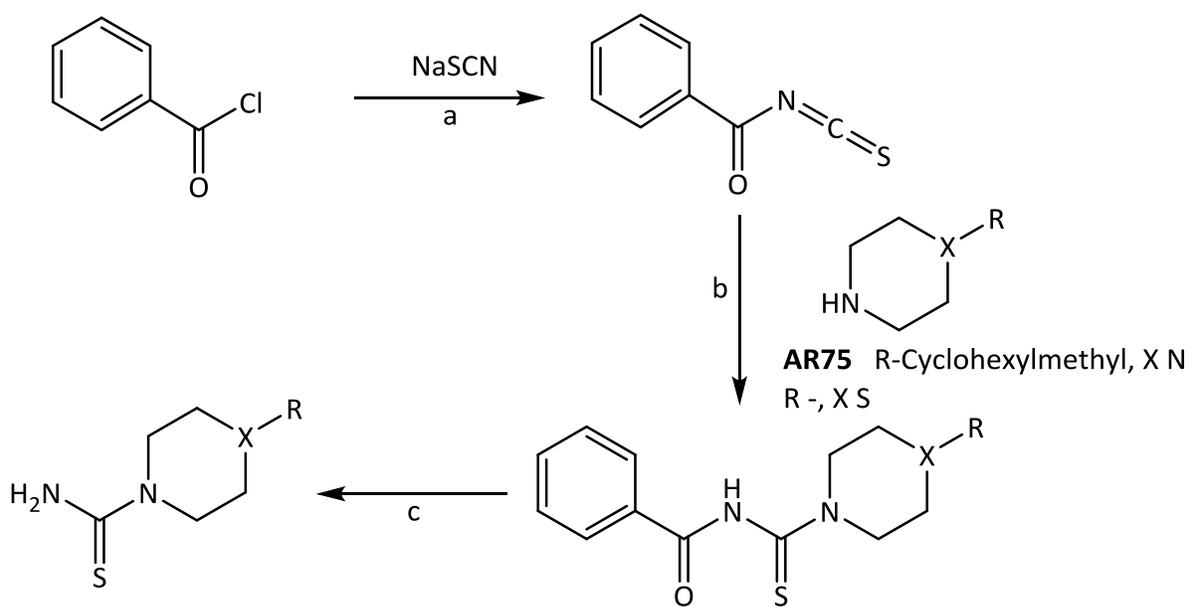
Die Synthese der Thioharnstoffderivate erfolgt nach Methode C (siehe Abbildung 30), die für alle verwendeten Amine erfolgreich genutzt wird und damit ihre breite Anwendbarkeit unter Beweis stellt. Insbesondere für 4-Hydroxypiperidin ist Methode A nicht geeignet um den Thioharnstoff **AR102** darzustellen, die Nutzung von Thiocarbonyldiimidazol ermöglicht die Synthese hingegen.



<b>AR75</b> R-Cyclohexylmethyl, X N	<b>AR76</b> R-Cyclohexylmethyl, X = N	(52 %)
R -, X O	<b>AR104</b> R -, X = O	(68 %)
R -4-Trifluormethoxyphenoxy, X CH	<b>AR105</b> R -4-Trifluormethoxyphenoxy, X = CH	(68 %)
R -Piperidin, X CH	<b>AR103</b> R -Piperidin, X = CH	(18 %)
R -OH, X CH	<b>AR102</b> R -OH, X = CH	(52 %)
R -, X CH <sub>2</sub>	<b>AR116</b> R -, X = CH <sub>2</sub>	(43 %)

Abbildung 30. Synthese der Thioharnstoffe von Piperidinderivaten nach Methode C (**1** THF, Argon, RT, 2 h, anschließend 55 °C, Argon, 1 h **2** THF, 15 h, RT, anschließend 50 °C, 8 h)

Zum Vergleich wird mit den sekundären Aminen Thiomorpholin und Cyclohexylmethylpiperazin die Thioharnstoffsynthese nach Methode A durchgeführt (siehe Abbildung 31). Durch Umsetzung des Amins mit N-Benzoylthiocyanat wird der N-Benzoylthioharnstoff gewonnen, der ohne weitere Aufarbeitung sauer mit HCl hydrolysiert werden kann. Die Herstellung der gezeigten Thioharnstoffe ist auch nach Methode A möglich, jedoch bei geringeren Ausbeuten. Die Synthese von **AR76** ergab nach Methode C (Thiocarbonyldiimidazol) eine Ausbeute von 52 %, unter Nutzung von Methode A (Benzoylthiocyanat) hingegen 21 %.



**AR76** R-Cyclohexylmethyl, X N (21 %)

**AR183** R -, X S (35 %)

Abbildung 31. Synthese von Thioharnstoffen von Piperidinderivaten nach Methode A (a NaSCN in Aceton suspendiert, Zugabe von Benzoylchlorid über 1 h, 5 °C, Argon, 3.5 h b Zugabe des Amins bei 12 °C, 3.5 h, Ar, RT c HCl 36 %, 95 °C, 1.5 h)

### 3.3.4.1 Herstellung des Sulfoxids und Sulfons aus AR184

Durch Oxidation des Schwefels im Thiomorpholin wird das analoge Sulfoxid und Sulfon aus **AR184** hergestellt (siehe Abbildung 32). Zur Überführung des Thioethers in das Sulfoxid wird  $\text{NaIO}_4$  als Oxidationsmittel in  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  verwendet (Gallego et al., 1993). Die höhere Oxidationstufe in Form des Sulfons (**AR217**) kann die Umsetzung mit m-CPBA (meta-Chlorperbenzoesäure) in DCM dargestellt werden (Gallego et al., 1993).

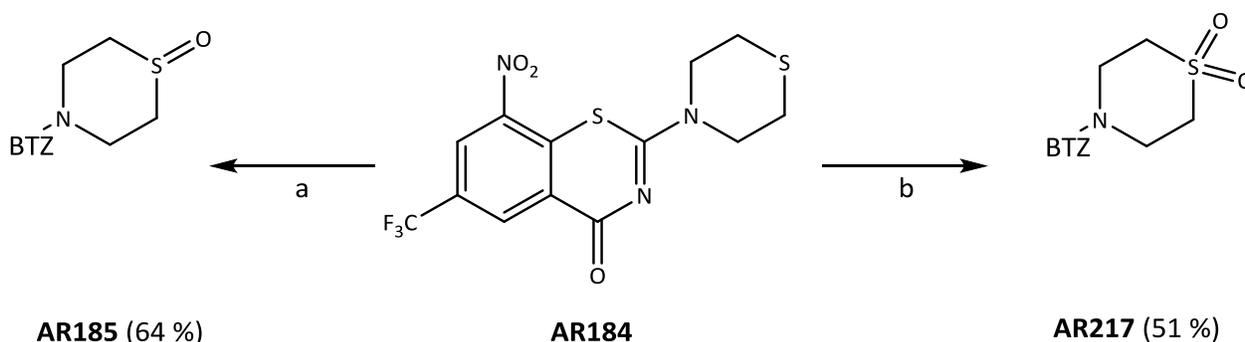


Abbildung 32. Oxidation des Thiomorpholins in **AR184** (a  $\text{NaIO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MeOH}$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 4 h b m-CPBA, DCM, RT, über Nacht)

### 3.3.4.2 Klassische BTZ Synthese von AR120

Zur Herstellung von **AR120** findet der klassische BTZ-Syntheseweg (Seybold et al., 1984, Hartmann et al., 1973, Rudolph, 2013) Anwendung, da die Herstellung des entsprechenden Thioharnstoffes aus 2,6-Dimethylpiperidin nach Methode C (Thiocarbonyldiimidazol) nicht möglich ist. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Dr. Rudolph (Rudolph, 2013), welche für die Synthese des Thioharnstoffes aus 2,6-Dimethylpiperidin nach Methode A lediglich eine Ausbeute von 2 % angibt. Es ist wahrscheinlich, dass die beiden Methylgruppen in 2,6-Dimethylpiperidin den nukleophilen Angriff des Aminostickstoffes durch sterische Hinderung erschweren und somit die Umsetzung mit Reagenzien zur Thioharnstoffherstellung (bspw. Thiocarbonyldiimidazol) behindern. Der in Abbildung 33 gezeigte klassische BTZ-Syntheseweg stellt in diesem Fall eine geeignete Alternative zur Umsetzung von 2,6 Dimethylpiperidin zu

**AR120** dar. Die hohe Reaktivität des genutzten Benzoylisothiocyanates überwiegt bei dieser Umsetzung die sterische Hinderung, welche durch die Methylgruppen verursacht wird.

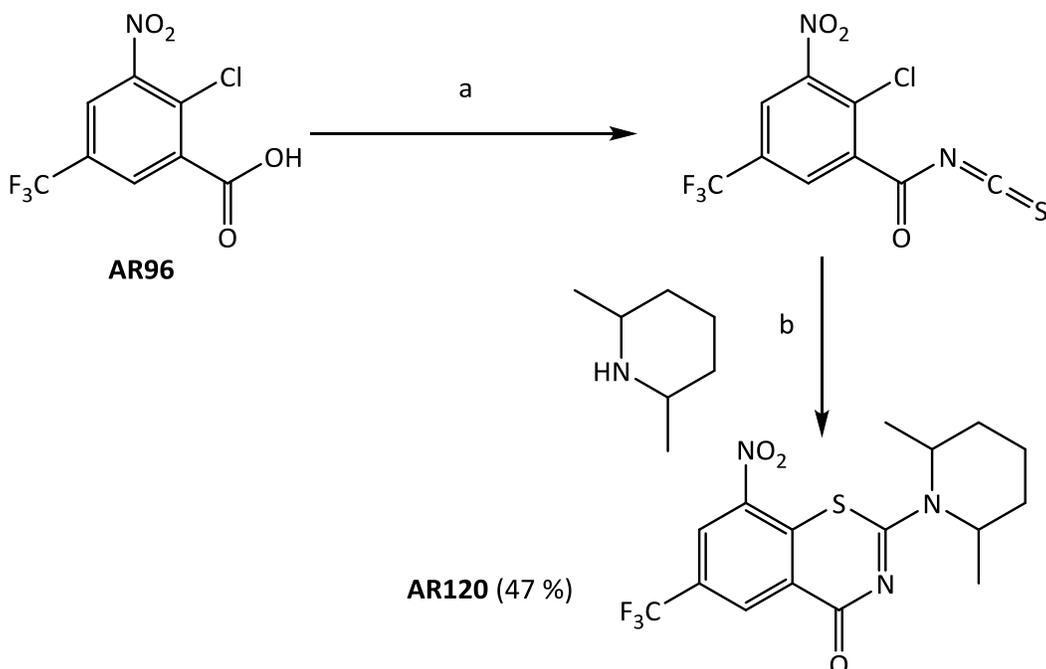


Abbildung 33. Synthese von **AR120** nach dem klassischen BTZ Syntheseweg (**a<sub>1</sub>** SOCl<sub>2</sub>, Toluol, Rückfluss, 2 h **a<sub>2</sub>** KSCN, Aceton, Ar, 5-10 °C, 2 h **b** 5-10 °C, 2 h)

Im ersten Reaktionsschritt erfolgt die Umsetzung von **AR96** mit SOCl<sub>2</sub> zum Säurechlorid, welches anschließend durch Zusatz von KSCN in das N-Acylisothiocyanat überführt wird. Darauf folgend wird 2,6-Dimethylpiperidin zugegeben, wobei sich nach nukleophilen Angriff des Stickstoffes am zentralen Kohlenstoff des Isothiocyanates intermediär ein N-Acylthioharnstoff bildet. Dieser Acylthioharnstoff substituiert ein Chlorid-Ion am Aromaten nukleophil substituiert und so das Thiazinonsystem bildet.

### 3.3.5 Herstellung von BTZs mit verschiedenen cyclischen Aminen als Substituent

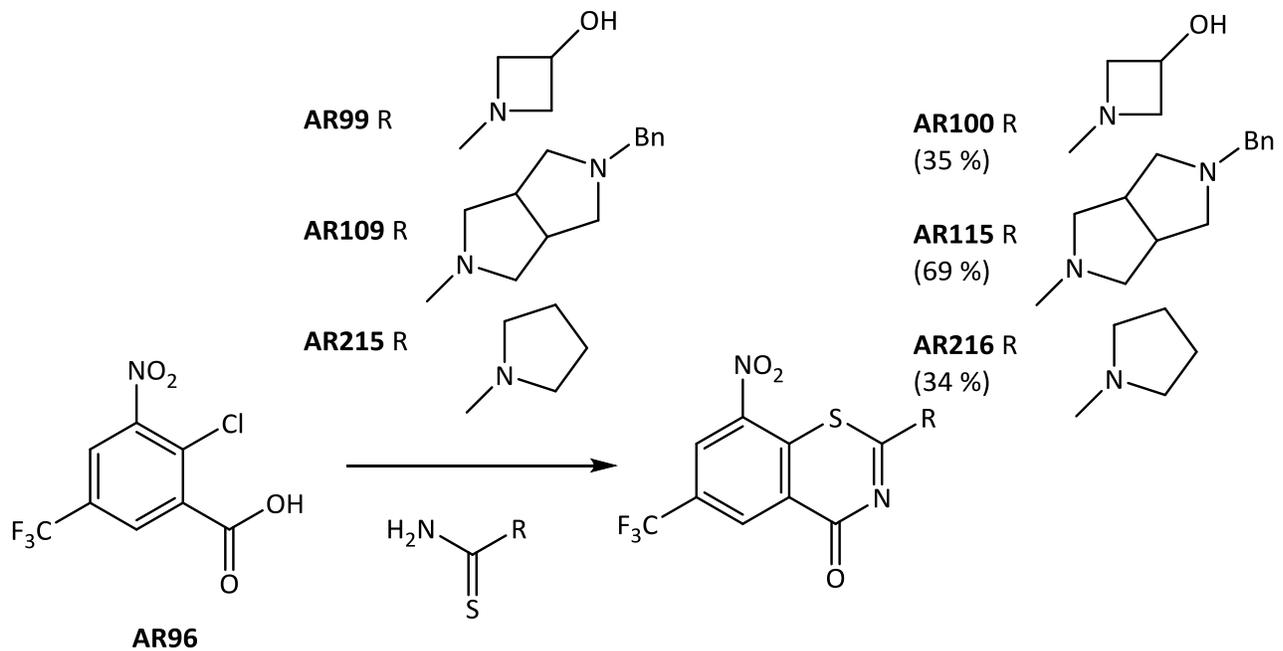


Abbildung 34. Synthese der BTZs mit verschiedenen cyclischen Aminen als Seitenkette (**1**  $\text{SOCl}_2$ , Toluol, Rückfluss, 2 h **2** Zugabe von Thioharnstoffderivat, Toluol, Rückfluss, 1-2 h)

Wie in Abbildung 34 gezeigt, werden im Rahmen der Arbeit auch BTZs mit Pyrrol- oder Azetidinring als Seitenkette an Position 2 des Ringsystems hergestellt. Für die Synthese wird der Thioharnstoffweg verwendet.

Zur Herstellung der Thioharnstoffe aus den entsprechenden Pyrrol- und Azetidin-Derivaten wird Thiocarbonyldiimidazol nach Methode A verwendet. Wie in Abbildung 35 gezeigt, ist es möglich, verschiedene Amine in ihre Thioharnstoffe umzusetzen.

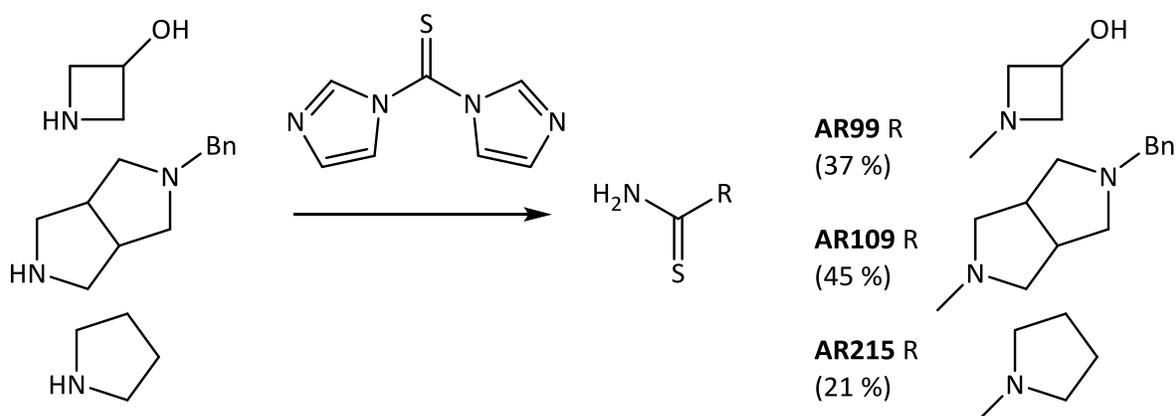


Abbildung 35. Synthese der Thioharnstoffe aus verschiedenen cyclischen Aminen (**1** THF, Argon, RT, 2 h, anschließend 55 °C, Argon, 1 h **2** THF, 15 h, RT, anschließend 50 °C, 8 h)

### 3.3.6 Synthese von BTZ043 (AR182) über den Thioharnstoffweg

Wie bereits beschrieben (Rudolph, 2013) und in dieser Arbeit bestätigt, eignet sich der Thioharnstoffweg gut für die Synthese von **PBTZ169 (AR77)** (siehe Kapitel 3.3.4). Dabei werden die in der Literatur (Makarov et al.; 2011) genannten Ausbeuten von 36 % (Alkylsulfanyl-Syntheseweg) erreicht und toxische Reagenzien (Schwefelkohlenstoff, Methyljodid) bzw. Lösungsmittel weitgehend vermieden. Im Folgenden soll gezeigt werden, dass die Herstellung von **BTZ043 (AR182)** analog möglich ist.

Wie in Abbildung 36 dargestellt, wird im ersten Schritt **AR180** aus 4-Piperidinon und S-1,2-Propandiol synthetisiert. Die Edukte werden am Wasserabscheider mit Anisol als Lösungsmittel umgesetzt (Tiwari et al., 2013 + supp. Information). Während der Reaktion kommt es zum nukleophilen Angriff der Hydroxyfunktionen des Diols am Carbonylkohlenstoff des Piperidinons. Über die Zwischenstufe des Halbketals kommt es unter Wasserabspaltung zur Bildung des Vollketals (**AR180**). Zur Katalyse der Umsetzung wird dem Reaktionsgemisch p-Toluolsulfonsäure zugesetzt.

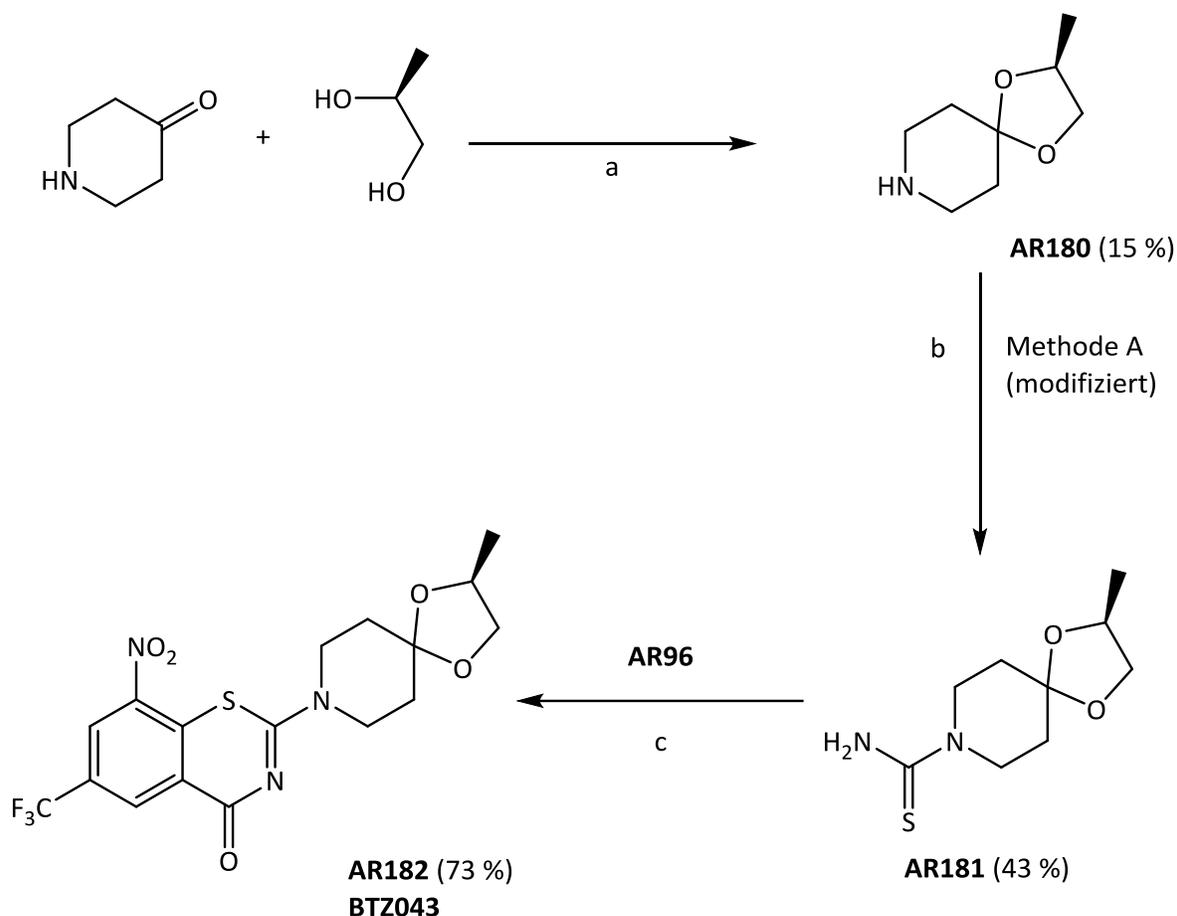


Abbildung 36. Synthese von **BTZ043 (AR182)** über den Thioharnstoffweg (**a** Anisol, p-Toluolsulfonsäure, Wasserabscheider, 4 h **b**<sub>1</sub> NaSCN in Aceton suspendiert, Zugabe von Benzoylchlorid über 1 h, 5 °C, Argon, 3.5 h **b**<sub>2</sub> Zugabe des Amins bei 12 °C, 3.5 h, Argon, RT **b**<sub>3</sub>  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ , Rückfluss, 24 h **c**<sub>1</sub>  $\text{SOCl}_2$ , Anisol, Rückfluss, 2 h **c**<sub>2</sub> Zugabe von **AR181**, Toluol, Rückfluss, 1-2 h)

Im zweiten Schritt wird die Spiroverbindung **AR180** in den Thioharnstoff **AR181** überführt, wobei eine modifizierte Variante von Methode A zur Thioharnstoffherstellung verwendet wird. Die Synthese des N-Benzoylthioharnstoffes erfolgt, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, durch Umsetzung mit Benzoylisothiocyanat (Methode A). Die hydrolytische Abspaltung der Benzoesäure ist bei **AR181** nicht im stark Säuren mit HCl möglich, da das Ketal hydrolysiert würde. Eine Umsetzung mit  $\text{K}_2\text{CO}_3$  in  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  ermöglicht eine selektive Abspaltung von Benzoesäure und die Gewinnung der Thioharnstoffes **AR181**. Dies stellt eine Modifizierung von Methode A zur Umsetzung säurelabiler Verbindungen dar.

Die Synthese von **BTZ043 (AR182)** gelingt durch Umsetzung von **AR181** mit dem Carbonsäurechlorid von **AR96** mit einer guten Ausbeute von 73 %. Somit steht mit dem Thioharnstoffweg ein effizientes synthetisches Vorgehen zur Darstellung von **BTZ043 (AR182)** zur Verfügung. Das Lösungsmittel Toluol wird in dieser Synthese durch Anisol ersetzt, da dieses weniger toxisch ist und die erlaubten Rückstandswerte lt. GMP höher sind (Grenzwert Toluol 850 ppm, Grenzwert Anisol 5,000 ppm) (Impurities: Guideline for residual solvents, 2011).

Tabelle 3. Vergleich der BTZ Synthesewege (<sup>1</sup>Makarov, 2011)

	<b>Alkylsulfanylweg</b>	<b>Thioharnstoffweg</b>
<b>Anzahl der Schritte</b>	3	4
<b>Einführung von S/N</b>	Benzamid, CS <sub>2</sub>	Thioharnstoff
<b>Toxische Reagenzien</b>	CS <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> I	Thioharnstoff
<b>Gesamtausbeute</b>	36 % ( <b>BTZ043</b> ) <sup>1</sup>	31 % ( <b>BTZ043</b> ) 66 % ( <b>AR154</b> ) 76 % ( <b>AR175</b> )

Im Vergleich zur Alkylsulfanyl-BTZ-Synthese von Makarov (Makarov, 2011) weist die beschriebene Synthese unter Verwendung des Thioharnstoffes Vorteile auf. In Hinblick auf eine GMP-konforme Herstellung ist die Vermeidung von toxischen Reagenzien wie Schwefelkohlenstoff und Iodmethan ein Vorteil gegenüber der von Makarov et al. patentierten Synthese. Hierbei muss erwähnt werden, dass die Thioharnstoffintermediate toxikologisch nicht charakterisiert sind und eine Toxizität dieser Verbindungen nicht ausgeschlossen werden kann. Die Gesamtausbeute beider Methoden ist vergleichbar: mit dem Alkylsulfanylweg ist eine Ausbeute von 36 % publiziert (Makarov, 2011), während mit der hier beschriebenen Thioharnstoffmethode 31 % erreicht werden.

Wie verschiedene andere BTZ-Synthesen zeigen, lässt sich die Effizienz des Thioharnstoffweges durch die Nutzung von Thiocarbonyldiimidazol zur Synthese von Thioharnstoffen (Methode C) beträchtlich steigern (Gesamtausbeute > 60 %) (siehe Tabelle 3).

### 3.3.7 Synthese und Stabilitätsuntersuchung eines BTZthions

In Bezug auf eine aktuelle Publikation (Gao et al., 2016) wird im Rahmen dieser Arbeit ein Benzothiazinonthion (BTZthion) synthetisiert, um die Stabilität dieser neuen antimykobakteriellen Stoffklasse zu untersuchen.

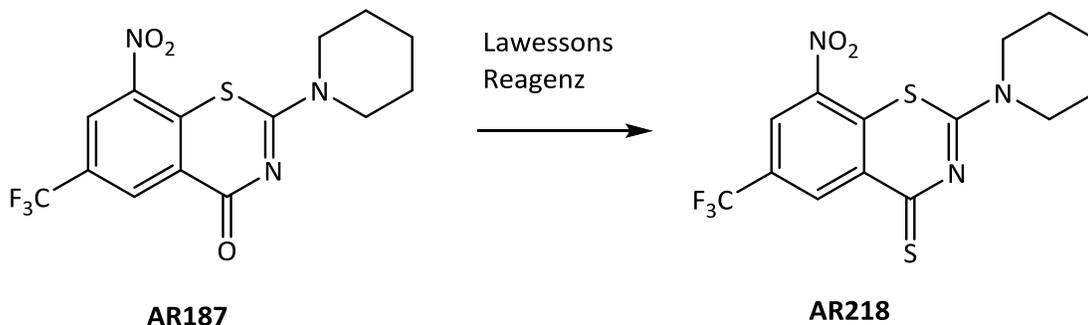


Abbildung 37. Sauerstoff-Schwefelaustausch zur Herstellung eines Benzothiazinonthions (BTZthions) (Toluol, Rückfluss, Argon, 2 h)

Entsprechend der Publikation von Gao et al. (Gao et al., 2016) wird **AR187** mit Lawessons Reagenz zum Benzothiazinonthion (BTZthion) **AR218** umgesetzt. Lawessons Reagenz ist eine Schwefel-Phosphorverbindung, die für den Austausch eines Carbonylsauerstoffes gegen ein Schwefelatom gebräuchlich ist (Jensberger et al., 2003).

Für die Umsetzung wird **AR187** in Toluol 2 h lang mit Lawessons Reagenz unter Rückfluss erhitzt. Auch wenn die Analyse des Reaktionsgemisches mit Massenspektrometrie und Dünnschichtchromatographie eine vollständige Umsetzung von **AR187** andeutet, sind nach wiederholter säulenchromatographischer Reinigung von **AR218** Spuren des Eduktes **AR187** mit  $^1\text{H-NMR}$  nachweisbar. Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten ist die Wasserempfindlichkeit der BTZthione und die damit verbundene Hydrolyse zu dem Edukt **AR218**. Um dies zu bestätigen, wird einer NMR-Probe von **AR218** in  $\text{CDCl}_3$  ein Tropfen  $\text{D}_2\text{O}$  zugesetzt und die Veränderung der Signalintensitäten der Probe mit  $^1\text{H-NMR}$  über mehrere Tage beobachtet. Es zeigte sich eine Abnahme des Anteils von **AR218**, während die Signalintensitäten, welche **AR187** entsprechen, zunehmen.

Zur weiteren Bestätigung dieser Beobachtung wird die Zersetzung von **AR218** im Middlebrook 7H9 Kulturmedium, welches auch für die MHK Bestimmung verwendet wird, mit Hilfe von HPLC Analytik bestimmt. Wie in Abbildung 38 dargestellt, nimmt der Gehalt von **AR218** rasch ab. Nach 18 h ist bereits nur noch die Hälfte der Ausgangskonzentration nachweisbar. Simultan wird in den Proben der Gehalt von **AR187**, dem Hydrolyseprodukt, bestimmt. Tatsächlich bildet sich durch die Hydrolysereaktion das Edukt **AR187**. Die Konzentration von **AR187** steigt jedoch nicht im gleichen Maße an, wie die Konzentration von **AR218** abnimmt. Es werden ca. 20 % des BTZthions in das BTZ **AR187** umgesetzt. Weitere, nicht näher bestimmte, Zersetzungsprozesse sind somit wahrscheinlich.

Die Experimente weisen eine Zersetzung von **AR218** im wässrigen Medium nach (Inkubationszeit <20 h). Da bei den MHK Bestimmungen BTZthione für 24 h im Kulturmedium inkubiert werden (Gao et al., 2016), ist es wahrscheinlich, dass auch unter den Assaybedingungen Zersetzung auftritt. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Ergebnisse durch die Entstehung der analogen BTZs bzw. weiterer Zersetzungsprodukte beeinflusst sind.

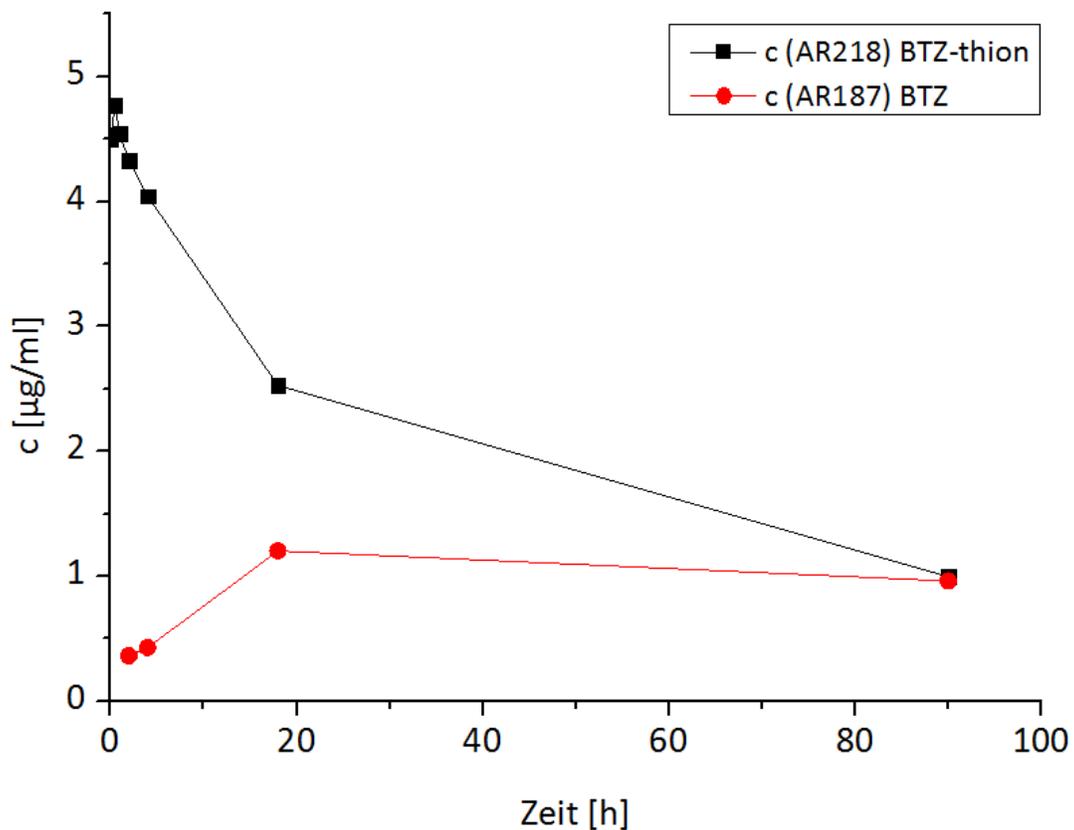


Abbildung 38. Zeitabhängige Zersetzung von **AR218** in Middlebrook 7H9 Kulturmedium

Die Experimente weisen deutlich auf eine Stabilitätsproblematik der BTZthione hin, die ihre Eignung als Arzneistoffe in Frage stellt. Hinsichtlich der publizierten, herausragenden *in vivo* Aktivität (Gao et al., 2016) (Minderung der Keimlast um 3.4 log nach 4 Wochen Gabe von 150 mg/kg) erscheinen weitere Experimente zum Nachweis ausreichender Stabilität dieser Substanzklasse gegenüber Wasser notwendig, um ihren Wert als antimykobakterielle Wirkstoffe einzuschätzen. Die von den Autoren berichtete Wachstumshemmung bzw. Keimlastminderung würde auch durch das hochwirksame BTZ hervorgerufen, selbst wenn im Assay nur ca. 20 % davon aus dem BTZthion entstünden. In welchem Ausmaß Zersetzung in einem *in vivo* Experiment auftritt, kann anhand der hier gezeigten Daten nicht abgeschätzt werden.

### 3.4 Synthese von Benzoxazinonen (BOZs)

Im Rahmen dieser Arbeit werden BTZ-Analoga hergestellt, bei denen der Schwefel im Thiazinonringsystem durch Sauerstoff ersetzt ist. Es sind bereits fünf der sogenannten Benzoxazinone (BOZs) durch Dr. Rudolph (Rudolph, 2013) beschrieben. Der Austausch des Schwefelatoms durch Sauerstoff verbessert die metabolische Stabilität, da eine Oxidation zum Sulfoxid bzw. Sulfon ausgeschlossen wird. Dies ist durch eine verbesserte mikrosomale Stabilität nachgewiesen wurden.

Die von Rudolph (Rudolph, 2013) ermittelten Daten zeigen jedoch deutlich, dass die BOZs im Vergleich zu ihren BTZ Analoga eine geringere antimykobakterielle Aktivität aufweisen. Die geringere Polarisierbarkeit und Größe des Sauerstoffes, sowie der damit verbundene Einfluss auf die Gestalt des Ringsystems, besitzen unter Umständen einen nachteiligen Einfluss auf die Interaktion mit dem Target DprE1 (siehe Kapitel 5.1.1). Die Synthese der hier gezeigten BOZs erfolgte somit zur Überprüfung der oben genannten Erkenntnis an einem weiteren Beispiel. Exemplarisch wurden hierfür die Verbindungen **AR79** und **AR125** synthetisiert (siehe Abbildung 39).

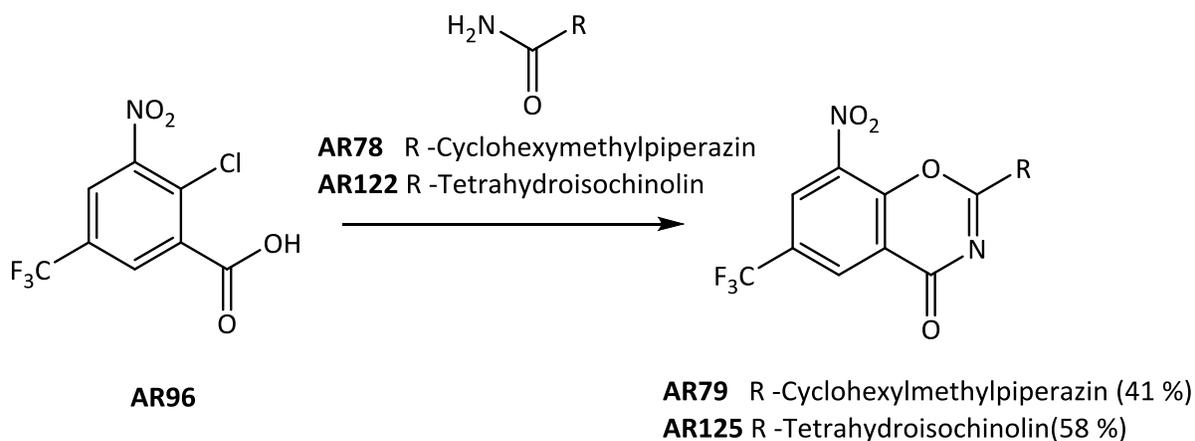


Abbildung 39. Synthese der BOZs (**1**  $\text{SOCl}_2$ , Toluol, Rückfluss, 2 h **2** Zugabe von Harnstoffderivat, Hünig Base, Toluol, Rückfluss, 1-2 h)

Die Synthese der BOZs ist analog zu der der BTZs über das Harnstoffintermediat möglich. Durch Umsetzung von asymmetrischen Harnstoffderivaten mit dem Benzoylchlorid von **AR96** kommt

es unter nukleophilen Substitutionen am Carbonylkohlenstoff und am Aromaten zur Bildung des Oxazinonringsystems. Im Gegensatz zur BTZ-Synthese ist die Zugabe von Hünig-Base notwendig. Die freiwerdende HCl wird dadurch gebunden und der Ringschluss ermöglicht.

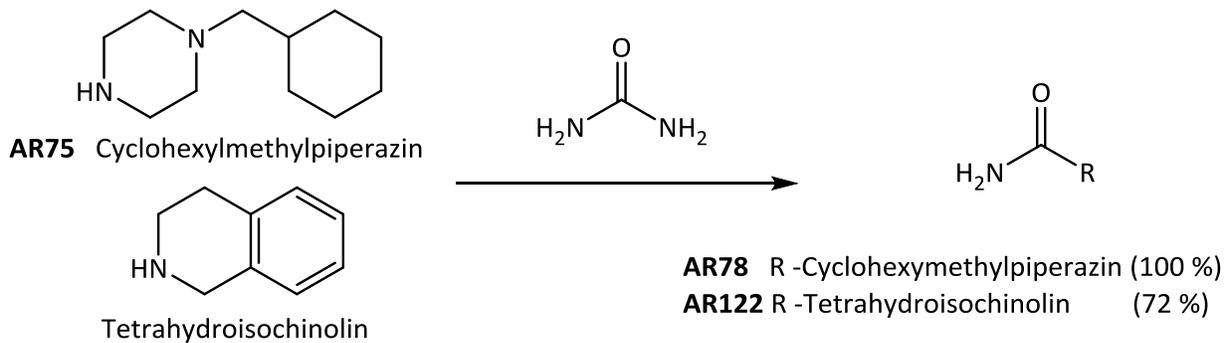


Abbildung 40. Synthese der asymmetrisch substituierten Harnstoffe (120 °C, 42 h)

Die Synthese der asymmetrisch substituierten Harnstoffe ist, wie in Abbildung 40 gezeigt, durch direkte Aminolyse von Harnstoff ohne Zusatz von weiterem Lösungsmittel möglich (Barry et al., 1983, Rudolph, 2013).

### 3.5 Synthese von Benzazazinonen (BAZs)

Ein weiteres Ziel der Arbeit ist der Ersatz des Schwefelatomes der BTZs gegen ein Stickstoffatom. Diese Verbindungen besitzen einen Azazinonring, somit wird die neue Substanzklasse als Benzazazine (BAZs) bezeichnet. Dafür wird der Thioharnstoffweg auf ein Guanidin übertragen und es bildet sich nach analogem Mechanismus das BAZ. Im Unterschied zu BTZs/BOZs weisen BAZs mit der NH-Gruppe einen Wasserstoffbrückendonator auf.

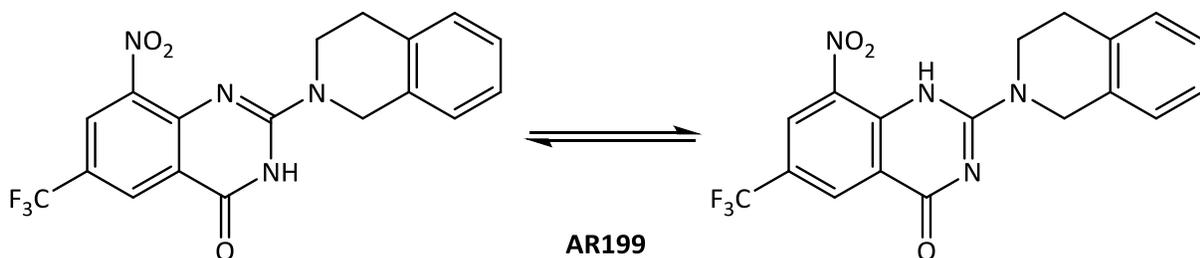


Abbildung 41. Tautomere des BAZs **AR199**

Die mögliche Tautomerie dieser Verbindungsklasse ist in Abbildung 41 dargestellt. Da für das rechte Tautomer eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zwischen Nitro- und NH-Gruppe möglich ist, wird angenommen, dass dieses Tautomer bevorzugt ist.

Für die Synthese des BAZs wird, ausgehend vom Thioharnstoffweg, ein unsymmetrisch substituiertes Guanidin mit dem Säurechlorid von **AR96** umgesetzt. Durch nukleophilen Angriff der Stickstoffatome des Guanidins wird unter Substitution von zwei Chlorid-Ionen der Azazinonring gebildet (siehe Abbildung 42).

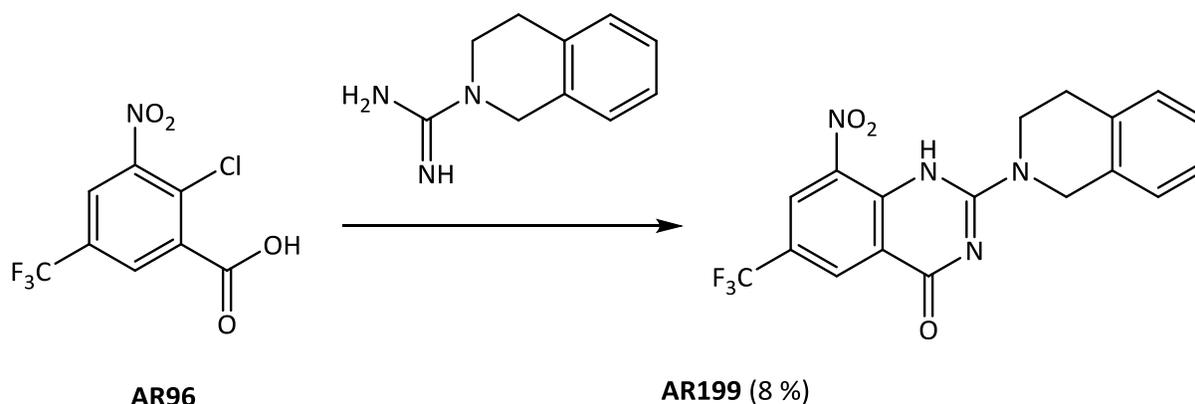


Abbildung 42. Synthese des Benzazazinons **AR199** (1  $SOCl_2$ , Toluol, Rückfluss, 2 h 2 Zugabe von Harnstoffderivat, DBU, Toluol, Rückfluss, 1-2 h)

Damit die nukleophile Substitution am Aromaten erfolgt, ist es notwendig, eine starke Base zuzusetzen, die selbst kein Nukleophil ist. Für die in Abbildung 42 gezeigte Reaktion wird DBU (1,8-Diazabicyclo(5.4.0)undec-7-en) verwendet, wobei die Ausbeute der Reaktion dennoch gering ausfällt. Dies weist darauf hin, dass der Angriff eines harten Nukleophils wie Stickstoff am Nitroaromaten deutlich erschwert ist.

### 3.6 Synthese von 8-Amino-, 8-Hydroxylamino- und 8-Nitroso-BTZs

Zur weiteren Erforschung des molekularen Wirkmechanismus werden die entsprechenden Amino-, Hydroxylamino- und Nitrosoderivate eines 8-Nitro-BTZs hergestellt. Insbesondere die Herstellung der Nitroso-BTZs, die von Trefzer et al. (Trefzer et al., 2010) als sehr anspruchsvoll beschrieben wurde und nicht durchgeführt werden konnte, gelang im Rahmen dieser Arbeit

zum ersten Mal (siehe Abbildung 43). Wie beschrieben (siehe Kapitel 2.2) stellen Nitroso-BTZs die eigentliche Wirkform der Nitro-BTZs dar. Sie sind somit ein wertvolles molekulares Werkzeug zur Untersuchung der Interaktion zwischen dem Inhibitor und dem Target DprE1.

Die Synthese des Amino-BTZs **AR81** erfolgt ausgehend von **AR187** durch Reduktion mit Hydrazin unter Pd/C-Katalyse (Wang et al., 2012). Dabei ist es möglich, die Nitrofunktion über die Reduktionsstufe des Hydroxylamins in die Aminfunktion zu überführen.

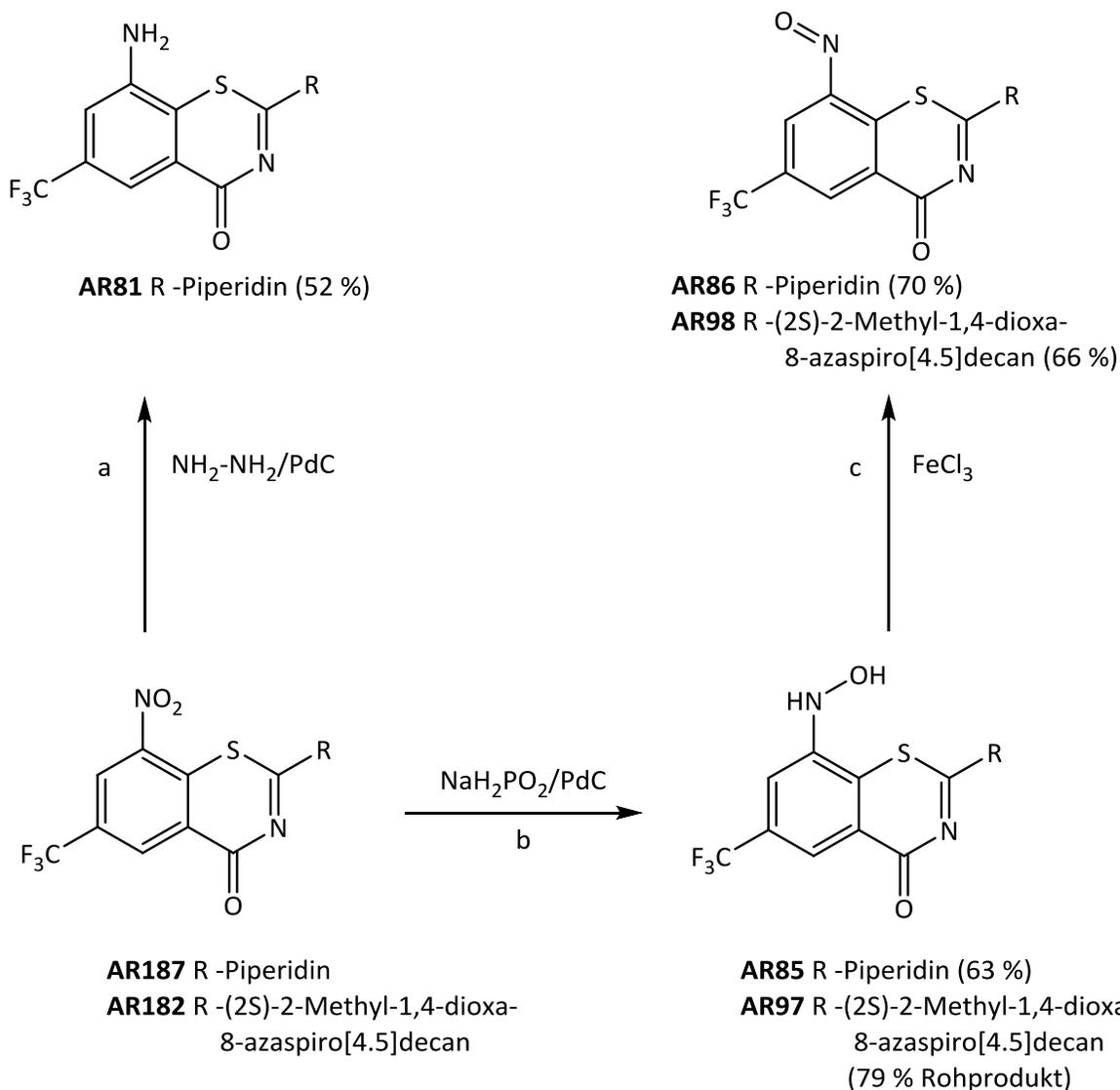


Abbildung 43. Synthese von Amino-, Hydroxylamino- und Nitroso-BTZs (a Argon, RT, 3 h b Argon, THF/H<sub>2</sub>O, 40 °C, 3-4 h c EtOH/H<sub>2</sub>O, RT)

Die Synthese des Nitroso-BTZs ist (siehe Abbildung 43) über zwei Reaktionsschritte möglich. Zu Beginn wird das Nitro-BTZ durch  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$  zum Hydroxylamino-BTZ (**AR85**, **AR97**) reduziert, welches im Fall von **AR85** auch isoliert wird und für die Testung nutzbar ist. Anschließend erfolgt die Oxidation am Hydroxylamino-Stickstoff mit Hilfe von  $\text{FeCl}_3$  unter Bildung des Nitroso-BTZs (Davey et al., 1999). Durch die elektronenarme Stickstoff/Sauerstoffdoppelbindung handelt es sich um sehr reaktive Verbindungen. Insbesondere Erwärmen ( $>30\text{ }^\circ\text{C}$ ) führt zur Zersetzung der Nitroso-Derivate und sollte bei Herstellung vermieden werden.

### 3.7 Synthese von 8-Imido- und 8-Amido-BTZs

Mit dem Ziel, eine kovalente DprE1-Hemmung ohne die Nitrofunktion in Position 8 zu erzeugen, werden die in Abbildung 44 gezeigten Imido- und Amido-BTZs ausgehend von **AR81** hergestellt.

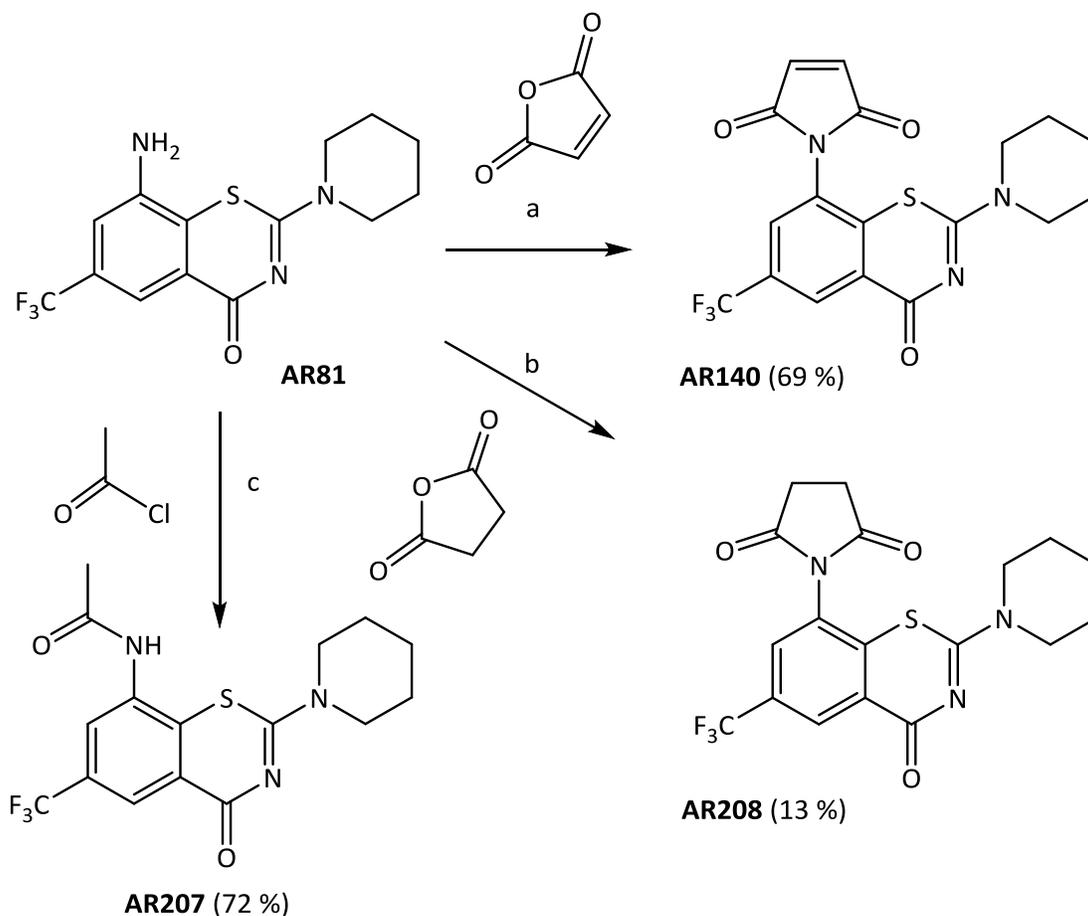


Abbildung 44. Synthese von 8-Imido- und 8-Amido-BTZs (a HAc, Rückfluss, 6 h b HAc, Rückfluss, 5 h c THF, Rückfluss, 1 h)

Die gezeigten Verbindungen zielen darauf ab, in Position 8 ein anderes Elektrophil als Nitroso anzubieten, das mit Cys387 in DprE1 reagiert. Durch Acylierung (**AR207**, **AR208**) oder durch Addition an einen elektronenarme Doppelbindung (**AR140**) könnte es auch zu kovalenter Bindung und dadurch zu Enzymhemmung kommen.

Die beiden Imido-BTZs **AR140** und **AR208** werden durch die Umsetzung der Aminofunktion von **AR81** mit Malein- bzw. Bernsteinsäureanhydrid in kochender Essigsäure hergestellt (Vamecq et al., 2000). Der Aminostickstoff greift bei der Reaktion zweifach als Nukleophil an den Carbonylkohlenstoffen der Säureanhydride an. Dabei kommt es unter Wasserabspaltung zur Bildung von fünfgliedrigen, cyclischen Carbonsäure-Imiden.

Die Acetylierung von **AR81** zu **AR207** wird unter Nutzung von Acetylchlorid in THF durchgeführt (Bloom et al., 2000). Es kommt durch den Aminostickstoff des BTZs zur nukleophilen Substitution des Chloridions am Carbonylkohlenstoff.

### **3.8 Synthese von 8-Cyano, 8-Formyl- und 8-Hydroxymethyl-BTZs**

Die Nitro-Gruppe in Position 8 des BTZ-Ringsystems soll gegen weitere funktionelle Gruppen ausgetauscht werden, die mit DprE1 reagieren können. Zu diesem Zweck werden BTZ Derivate mit Cyano-, Formyl- und Hydroxymethylfunktionen anstelle der Nitro-Gruppe hergestellt.

Die mechanistische Hypothese für diese Derivate ist in Abbildung 45 gezeigt. Ein 8-Hydroxymethyl-BTZ soll als „mechanism based“ Inhibitor von dem Targetenzym DprE1 zum entsprechenden Aldehyd oxidiert werden, welcher analog zum Nitroso-BTZ Cys387 kovalent binden könnte und zu einer irreversiblen Enzymhemmung führen würde. Zur Überprüfung dieser Hypothese werden die im Folgenden beschriebenen Verbindungen synthetisiert (siehe Abbildung 46 und 47).

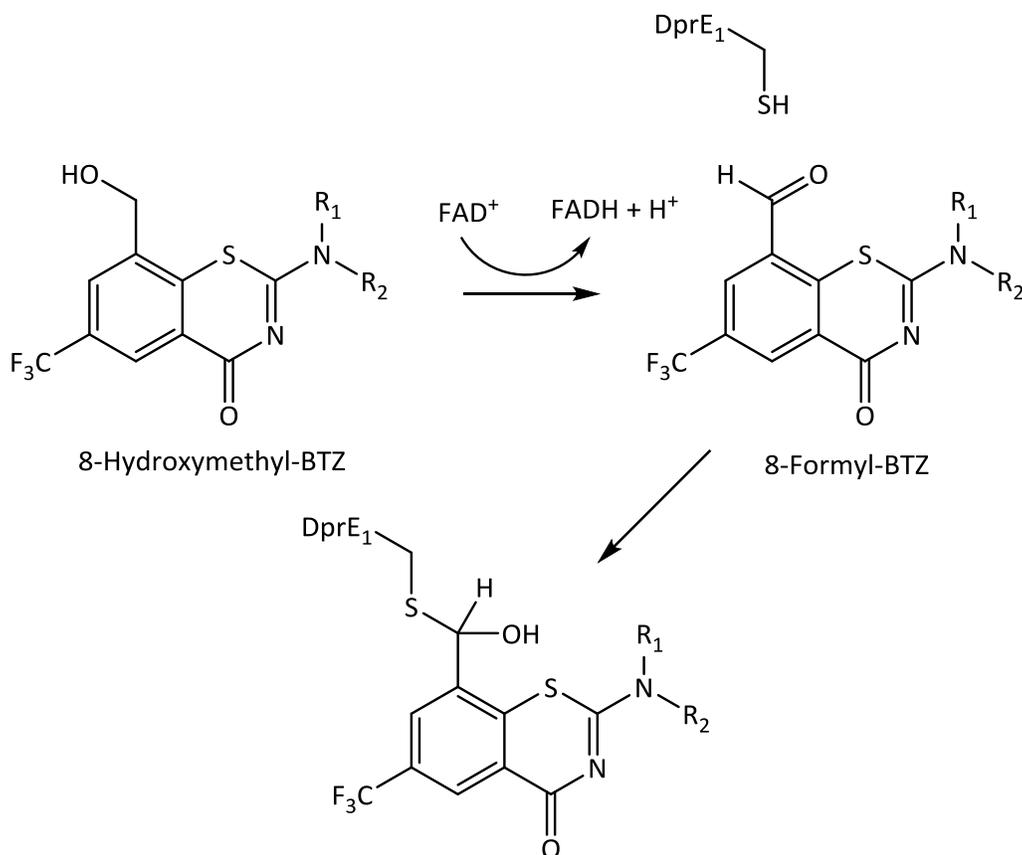


Abbildung 45. Potentieller Wirkmechanismus von 8-Hydroxymethyl- bzw. 8-Formyl-BTZs

Wie in Abbildung 46 dargestellt, erfolgt die Synthese des 8-Cyano-BTZs **AR134** ausgehend von der 3-Cyanocarbonsäure **AR132**, die mit  $\text{SOCl}_2$  in das Säurechlorid überführt wird. Durch die Umsetzung mit dem Thioharnstoff **AR195** wird nach der beschriebenen Thioharnstoffmethode der Thiazinonring von **AR134** gebildet (siehe Kapitel 3.1.1). Im Anschluss ist es möglich, die Cyanofunktion durch Reduktion mit DIBAL zum Imin und durch Hydrolyse in den Aldehyd zu überführen (Raap et al., 1999, Xiao et al., 2006).

Obwohl **AR135** auf diesem Weg gewonnen werden kann, ist die Ausbeute von 8 % gering. Laut NMR-Daten kommt es während der Reduktion simultan zu einem Angriff von DIBAL an der Kohlenstoff-Stickstoffdoppelbindung im Thiazinonring und damit zu einer Reduktion des BTZ-Ringsystems. Der genaue Verlauf der "Neben"reaktion wurde nicht weiter untersucht. Die geplante Umsetzung zum Benzylalkohol war wegen der geringen Ausbeute nicht möglich.

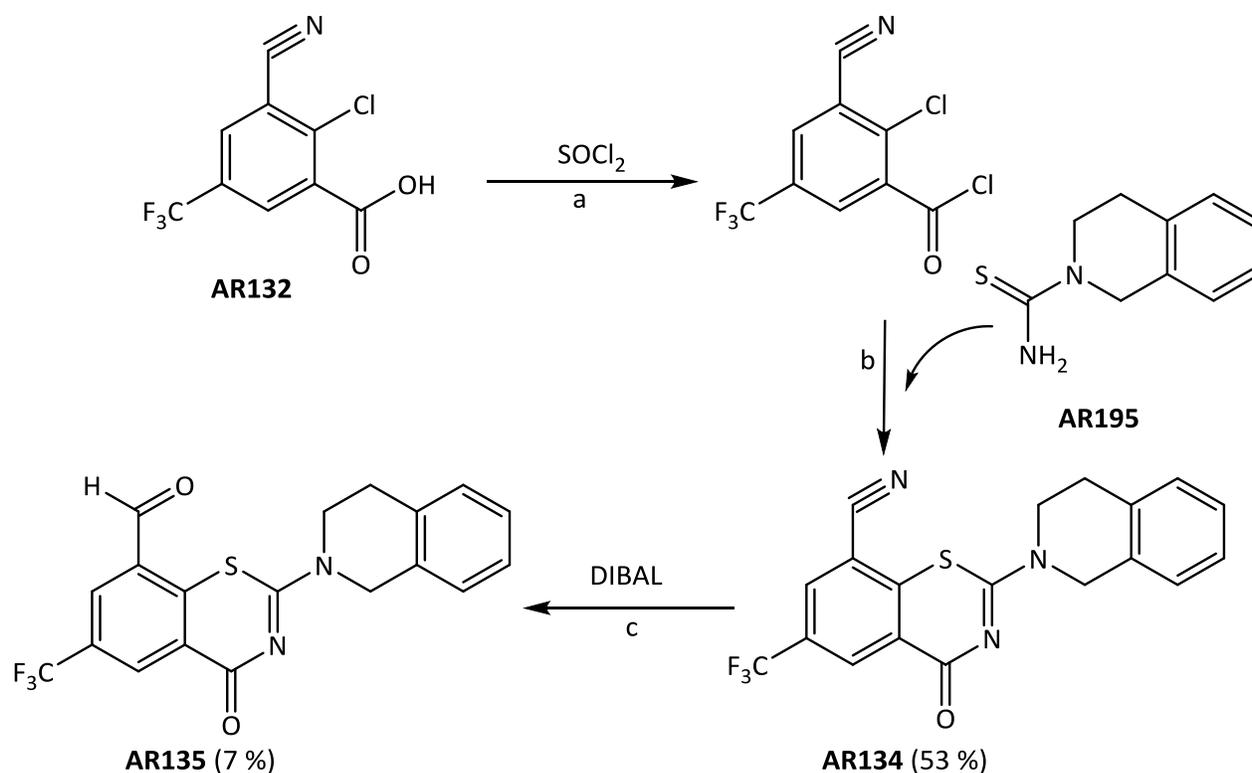


Abbildung 46. Synthese des 8-Formyl-BTZs **AR135** durch Reduktion von **AR134** (a Toluol, Rückfluss, 2 h b Toluol, Rückfluss, 1 h c DCM,  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ , Argon, 3 h)

Aufgrund dieser Problematik erfolgt die in Abbildung 47 gezeigte Optimierung des Syntheseweges. Die Cyanofunktion wird vor der Synthese des BTZs zum Aldehyd reduziert (siehe Abbildung 48). Die Verbindung **AR143** wird durch  $\text{SOCl}_2$  in ihr Carbonsäurechlorid überführt und mit dem Thioharnstoff **AR116** zum 8-Formyl-BTZ **AR145** umgesetzt. Die beschriebene Thioharnstoffmethode (siehe Kapitel 3.1.1) erweist sich hier auch in der Gegenwart reaktiver funktioneller Gruppen wie der Aldehydfunktion als zuverlässig. Anschließend kann das 8-Formyl-BTZ **AR145** durch  $\text{NaBH}_4$  in das 8-Hydroxymethyl-BTZ **AR146** überführt werden (Bolognesi et al., 1998). Im Vergleich zu DIBAL kommt es zu keiner unerwünschten Reaktion zwischen dem weniger potenten Reduktionsmittel  $\text{NaBH}_4$  und dem Thiazinonringsystem, sodass **AR146** in guter Ausbeute gewonnen werden kann.

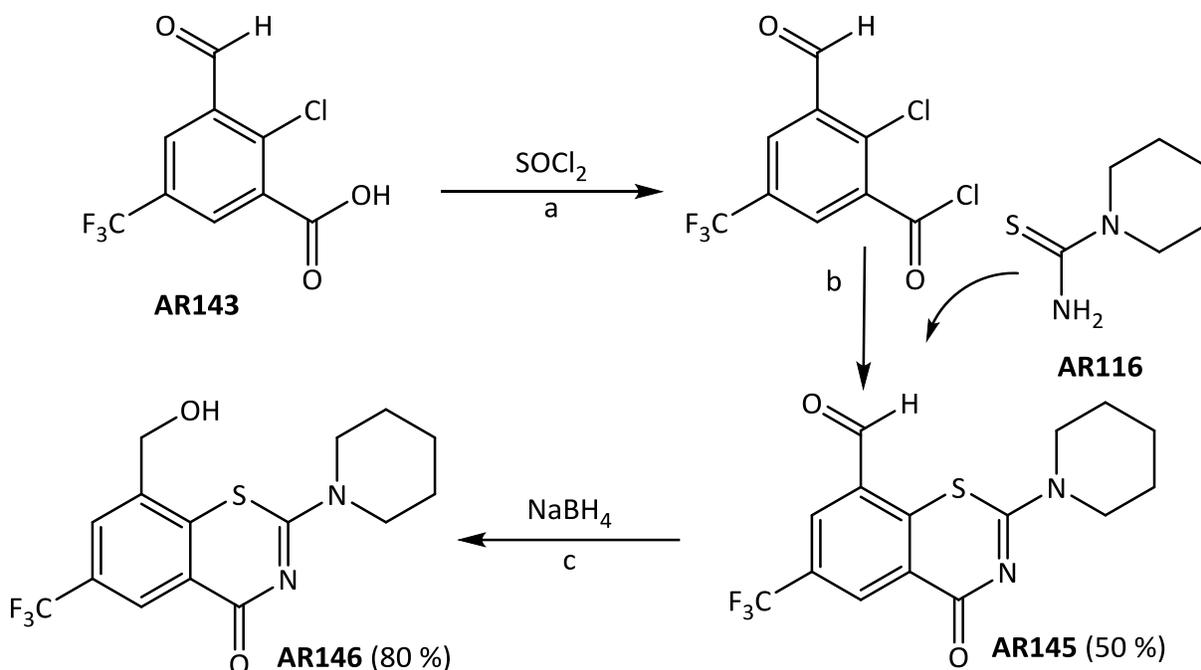


Abbildung 47. Synthese des 8-Hydroxymethyl-BTZs **AR146** (a Toluol, Rückfluss, 2 h b Toluol, Rückfluss, 1 h c EtOH, RT, 0.5 h)

### 3.9 Synthese der aromatischen Ausgangsverbindung zur BTZ Herstellung

Das Reaktionsschema in Abbildung 48 zeigt die Synthese der aromatischen Verbindungen, die für die BTZ-Synthese notwendig sind. Im ersten Schritt wird 2-Chlor-5-(trifluormethyl)benzonnitril mit einem Gemisch aus  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und  $\text{HNO}_3$  nitriert. Anschließend erfolgt während der wässrigen Aufarbeitung im Säuren die Hydrolyse des Nitrils zur Carbonsäure (Welch et al., 1969, Rudolph, 2013). Das auf diesem Weg gewonnene **AR96** ist der aromatische Baustein für alle Nitro-BTZs und besitzt damit für die Synthese zentrale Bedeutung.

Durch Hydrierung am Pd/C-Katalysator ist eine Reduktion der Nitrogruppe zum primären aromatischen Amin **AR131** möglich (Upadhyaya et al., 2013). Dieses wird durch Umsetzung im Säuren mit  $\text{NaNO}_2$  diazotiert (Clarke et al., 1941). Das instabile Diazoniumsalz wird direkt, ohne Aufarbeitung umgesetzt.

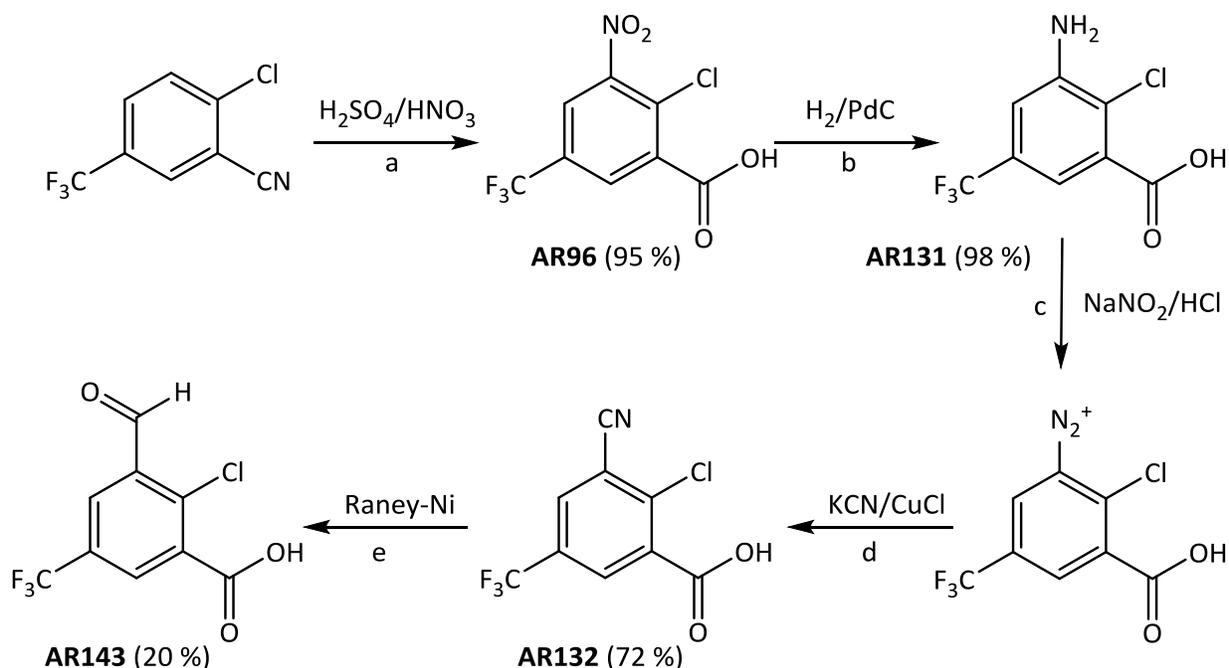


Abbildung 48. Synthese der aromatischen Ausgangsverbindung zur BTZ Herstellung (a 15 °C, 1 h, dann 100 °C, 1 h b EtAc, 4 bar  $\text{H}_2$ , 48 h c  $\text{H}_2\text{O}$ , 0 °C, 20 Minuten d  $\text{H}_2\text{O}$ , 60 °C, 30 Minuten e Ameisensäure, RT, 1 h)

Durch nukleophile Substitution von Stickstoff mit KCN wird im darauffolgenden Schritt das Cyanoderivat **AR132** dargestellt (Clarke et al., 1941, Nielsen et al., 2004). Mittels Reduktion zum Imin und anschließender Hydrolyse kann die Cyanofunktion von **AR132** zum aromatischen Aldehyd (**AR143**) umgewandelt werden. Die beschriebene Reaktion ist durch Umsetzung an **AR132** in Ameisensäure unter Katalyse von frischen Raney-Ni möglich (Houben Weyl E3, 1983).

### 3.10 NMR Daten der dargestellten Verbindungen im Vergleich

#### 3.10.1 Vergleich der NMR Daten von analogen BTZs, BOZs und BAZs

Im Rahmen der Arbeit werden BTZs, BOZs und BAZs hergestellt, die sich an Position 1 des Grundgerüsts im Heteroatom unterscheiden. Dieser Strukturunterschied wirkt sich in den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren aus, wie in Abbildung 49 gezeigt.

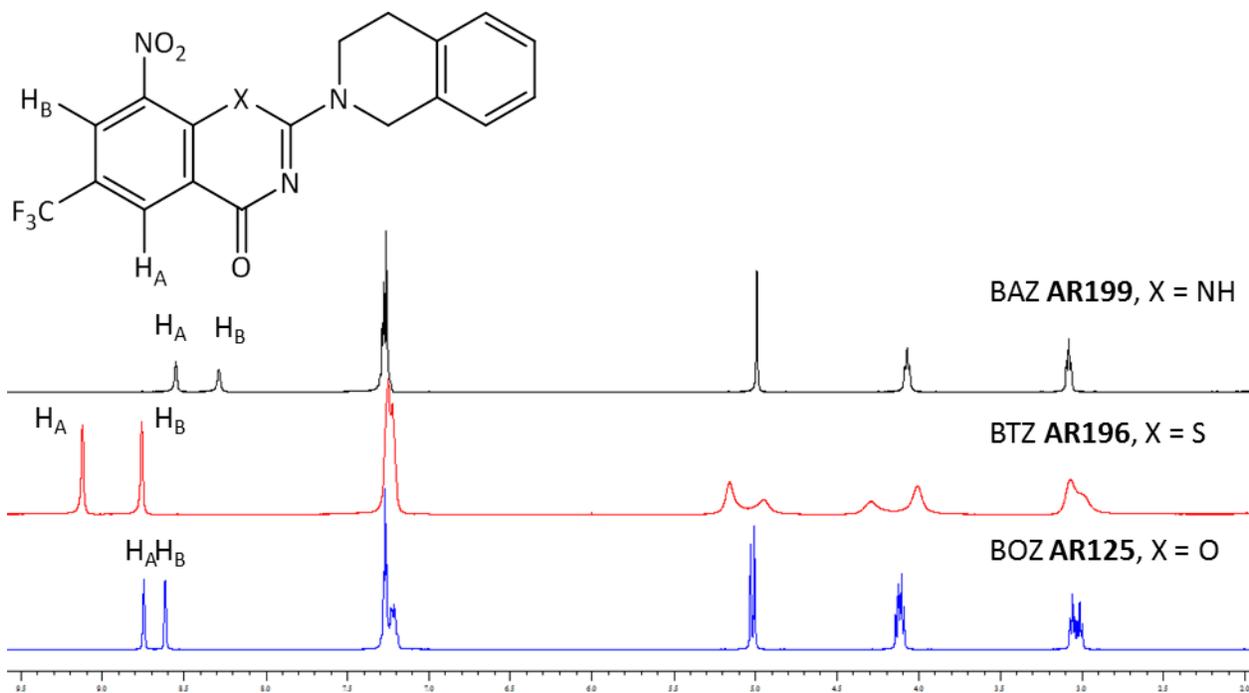


Abbildung 49.  $^1\text{H}$ -NMR Spektren von BAZ **AR199** (schwarz, in  $\text{CDCl}_3$ ), BTZ **AR196** (rot, in  $\text{CDCl}_3$ ) und BOZ **AR125** (blau, in  $\text{CDCl}_3$ )

Die Protonen des Nitroaromaten ( $\text{H}_\text{A}$  und  $\text{H}_\text{B}$ ) sind bei den drei Verbindungen unterschiedlich stark nach links verschoben. Am stärksten entschirmt sind beide Protonen des BTZs **AR196**, während das Sauerstoffatom im BOZ die Elektronendichte im Aromaten etwas erhöht und beim BAZ **AR199** die Signale vergleichsweise wenig entschirmt sind. Die aromatischen Protonen der Tetrahydroisochinolinseitenkette erzeugen bei den gezeigten Derivaten ein Signal mit derselben chemischen Verschiebung (7.2-7.3 ppm).

Die drei Methylengruppen der Seitenkette besitzen zwar eine ähnliche chemische Verschiebung bei BTZ, BOZ und BAZ, jedoch ist die Aufspaltung der Signale unterschiedlich. Während das BOZ **AR125** eine deutliche Signalaufspaltung zeigt, sind beim BTZ **AR196** die Signale undifferenziert und zeigen eine Aufspaltung in jeweils zwei breite Singuletts. Dies deutet auf eine eingeschränkte, verlangsamte Rotation des Tetrahydroisochinolinsubstituenten im BTZ hin, sodass zwei Rotationsisomere abgebildet werden können. Das BAZ **AR199** zeigt hingegen wieder besser aufgelöste Signale, jedoch ohne die differenzierte Aufspaltung des BOZs. Daraus kann gefolgert werden, dass das freie Elektronenpaar des Piperidin-Stickstoffatoms in BOZs am wenigsten in die Konjugation des BXZ-Systems einbezogen ist.

### 3.10.2 Vergleich der NMR Daten von BTZ und BTZthion

Der folgende Abschnitt beschreibt die Unterschiede eines BTZs und analogen BTZthions im  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum.

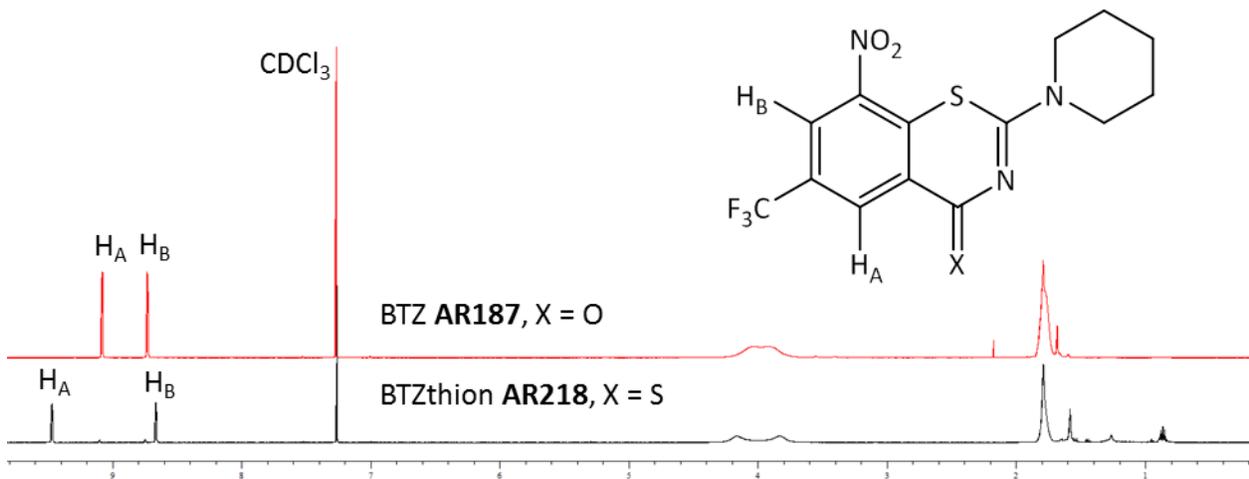


Abbildung 50.  $^1\text{H}$ -NMR Spektren von BTZ **AR187** (rot, in  $\text{CDCl}_3$ ) und BTZthion **AR218** (schwarz, in  $\text{CDCl}_3$ )

Der Austausch von Sauerstoff gegen Schwefel an Position 4 des Ringsystems wirkt sich im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum auf die chemische Verschiebung der aromatischen Protonen aus. Das Signal des Protons ( $\text{H}_A$ ,  $\delta$  9.09), welches im Spektrum von **AR187** am weitesten nach links verschoben ist, wird im BTZthion **AR218** noch stärker entschirmt und um ca. 0.4 ppm weiter nach links verschoben. Das Signal des zur Nitrofunktion ortho gebundenen Protons ändert hingegen seine chemische Verschiebung kaum. Man kann schlussfolgern, dass der 4-Thionsubstituent keinen nennenswerten Einfluss auf die Konjugation und Elektronenverteilung des Heterozyklus hat, sondern nur auf das zu ihm perizyklisch angeordnete H-Atom.

### 3.10.3 Vergleich der NMR-Daten von Amino-, Hydroxylamino-, Nitroso- und Nitro-BTZs

#### Nitro-BTZs

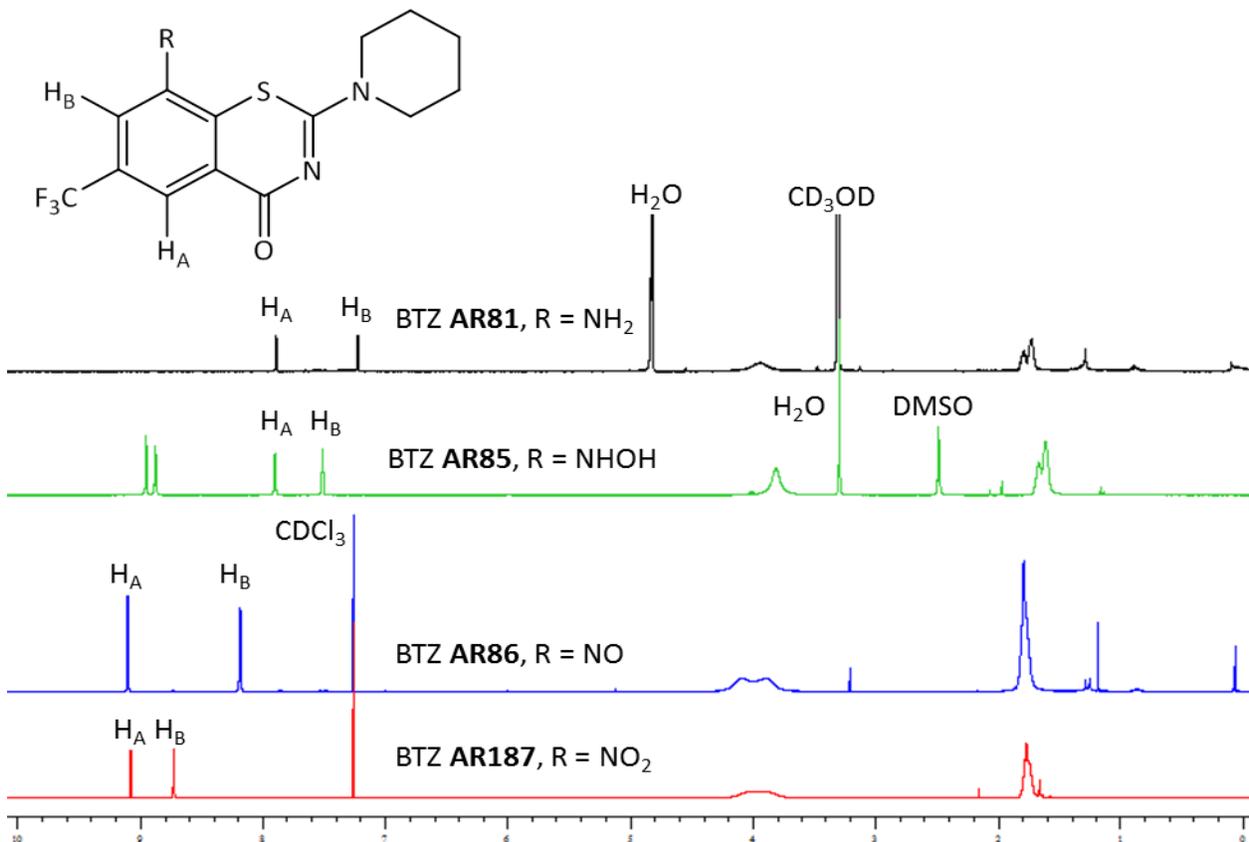


Abbildung 51. <sup>1</sup>H-NMR Spektren von Amino-BTZ **AR81** (schwarz, in CD<sub>3</sub>OD), Hydroxylamino-BTZ **AR85** (grün, in DMSO-*D*<sub>6</sub>), Nitroso-BTZ **AR86** (blau, in CDCl<sub>3</sub>) und Nitro-BTZ **AR187** (rot, in CDCl<sub>3</sub>)

Amino-, Hydroxylamino-, Nitroso- und Nitro-BTZs können leicht anhand der chemischen Verschiebung der aromatischen Protonen unterschieden werden. Der Vergleich der Spektren von **AR86** und **AR187** zeigt, dass das para-ständige Proton (H<sub>A</sub>), dessen Signal sich am weitesten links befindet, seine chemische Verschiebung nicht ändert. Das ortho-ständige Proton (H<sub>B</sub>) ist hingegen beim Nitroso-BTZ **AR86** deutlich weniger entschirmt.

Bei den Verbindungen **AR85** und **AR81** ist die Elektronendichte im aromatischen System erwartungsgemäß durch den +M-Effekt des Amins bzw. Hydroxylamins erhöht, was die Rechtsverschiebung der Signale erklärt. Im Spektrum von **AR85** können die NH- und OH-Signale des Hydroxylamins bei einer chemischen Verschiebung von ca. 9 ppm beobachtet werden.

## **4 Biologische Evaluierung der hergestellten Verbindungen**

Zur biologischen Evaluierung wurden die hergestellten Verbindungen unterschiedlichen Tests an Zellkulturen unterzogen. Dabei stellt der Agardiffusionstest eine einfache Vorprobe dar, um festzustellen, ob der getestete Stoff anti(myko)bakterielle Aktivität besitzt. Wenn im Agardiffusionstest Wirkung nachgewiesen wird, erfolgt anschließend die Bestimmung der MHK (minimale Hemmkonzentration) zur Quantifizierung der Aktivität.

Zusätzlich zur Bestimmung der antibakteriellen Wirkung werden die aktiven Verbindungen auf Zytotoxizität und antiproliferative Effekte getestet.

### **4.1 Agardiffusionstest**

Als einfacher Vortest wird der Agardiffusionstest herangezogen, um zu bestimmen, ob eine Testverbindung antibakterielle und/oder fungizide Aktivität besitzt. Für diesen Test werden in Agarplatten Vertiefungen gestanzt, in welche eine Lösung des zu testenden Stoffes pipettiert wird. Für die Testverbindungen wird eine Stammlösung in einem DMSO/MeOH Gemisch mit einer Konzentration von 100 µg/ml verwendet. Zur Auswertung wird das Wachstum des jeweiligen Mikroorganismus auf den Agarplatten makroskopisch erfasst. Eine Zone eingeschränkten Wachstums im Umfeld der Vertiefungen wird als Hemmhof bezeichnet und gilt als Aktivitätsnachweis.

Die Durchführung des Agardiffusionstests fand in Kooperation mit dem Hans-Knöll-Institut Jena unter Leitung von Frau Dr. Voigt nach der DIN-Norm 58940-8 (DIN-Norm 58940-8, 2002) statt. *M. vaccae* wird als Testorganismus zur Feststellung antimykobakterieller Aktivität genutzt. Dabei handelt es sich um ein nicht-pathogenes Mykobakterium, welches für die Testung von DprE1-Hemmstoffen einen geeigneten Ersatz für das Pathogen *M. tuberculosis* darstellt, weil genetisch eine große Homologie der Erbinformation von *M. tuberculosis* und *M. vaccae* besteht (Devulder et al., 2005). Mit *M. aurum* wird ein Mykobakterium für die Testung verwendet, welches natürliche Resistenz gegen kovalente DprE1-Hemmstoffe besitzt. Bei dieser Bakterienspezies ist das Cystein an der BTZ Bindungsstelle durch ein Serin ersetzt (De Jesus Lopes Ribeiro et al., 2011). Das Spektrum der verwendeten Bakterienspezies wird zusätzlich um

*B. subtilis* als gram positiven Keim, und um *E. coli*, als gram-negativen Mikroorganismus erweitert, um eine unspezifische antibakterielle Aktivität der Testverbindungen zu erfassen. Mit der Hefe *Sp. salmonicolor* wird zudem eine eukaryotische Zelllinie in die Testung integriert.

Der Nutzen des Agardiffusionstests besteht in der qualitativen Aussage über Aktivität. Eine Quantifizierung der Wirksamkeit ist nur eingeschränkt möglich, da die Größe des Hemmhofes nicht nur von der Potenz der Testverbindung, sondern auch von den Diffusionseigenschaften beeinflusst wird. Eine einfache Klassifizierung der Ergebnisse lässt die DIN-Norm 58940-8 (DIN-Norm 58940-8, 2002) anhand der Hemmhofgröße, wie in Tabelle 4 gezeigt, zu.

Tabelle 4. Klassifizierung der Ergebnisse des Agardiffusionstests

<b>Hemmhofdurchmesser [mm]</b>	<b>Klassifizierung der antibakteriellen Eigenschaften</b>
<15	keine Wirkung
15-20	moderate Wirkung
21-25	gute Wirkung
>25	sehr gute Wirkung

Erst ab einer Hemmhofgröße von 15 mm lässt sich eine Wirkung aus dem Agardiffusionstest ableiten. Bei einem Hemmhofdurchmesser von 15-20 mm liegt eine moderate Aktivität vor und bei 21-25 mm eine gute Wirkung. Hemmzonen mit einem Durchmesser von >25 mm werden mit einer sehr guten Wirkung assoziiert.

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse des Agardiffusionstests mit den für diese Arbeit hergestellten Verbindungen zusammengefasst.

Tabelle 5. Ergebnisse des Agardiffusionstests (<sup>1</sup>Testkonzentration **BTZ043** gegen *M. vaccae* und *M. aurum* 0.1 µg/ml, ansonsten 100 µg/ml, <sup>2</sup>Testkonzentration Ciprofloxacin 5 µg/ml, <sup>3</sup>Testkonzentration Amphotericin B 10 µg/ml, <sup>4</sup>Lösungsmittelkontrolle DMSO/MeOH 1:10, n.b. nicht bestimmt)

Testverbindung	Durchmesser der Hemmzone (mm) (n=1)				
	<i>M. vaccae</i> 10670	<i>M. aurum</i> SB 66	<i>B. subtilis</i> 6633	<i>E. coli</i> SG458	<i>Sp. salmoni-</i> <i>color</i> 549
<b>2-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-BTZs</b>					
AR112	36	0	0	0	0
AR130	38	0	0	0	0
AR196	40	0	0	0	0
AR204	44	0	0	0	0
<b>2-N-Acylpiperazin-BTZs</b>					
AR153	36	0	0	0	0
AR154	60	11	11	0	0
AR158	64	11	12	0	0
AR160	49	12	10	0	0
AR162	40	0	0	0	0
AR164	38	0	0	0	0
AR168	40	12	0	0	0
AR172	48	0	0	0	0
AR175	45	0	0	0	0
AR210	54	n.b.-	n.b.	n.b.	n.b.
AR211	28	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AR212	37	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AR213	46	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AR214	13	0	0	0	0
AR219	12	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AR220	24	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
<b>2-Diazabicyclononan-BTZs</b>					
AR190	46	0	10	0	0
AR191	42	0	10	0	0
AR192	43	12	12	0	0
AR194	46	13	10	0	0

Testverbindung	Durchmesser der Hemmzone (mm) (n=1)				
	<i>M. vaccae</i> 10670	<i>M. aurum</i> SB 66	<i>B. subtilis</i> 6633	<i>E. coli</i> SG458	<i>Sp. salmoni-</i> <i>color</i> 549
<b>2-Piperidin-BTZs und versch. Substituenten in Position 2</b>					
AR100	45	0	12	0	0
AR106	32	11	11	0	0
AR107	40	0	0	0	0
AR110	40	0	12	0	0
AR115	46	12	12	0	0
AR184	45	0	13	0	0
AR185	28	0	0	0	0
AR187	51	12	14	0	0
AR216	50	0	12	0	0
AR217	40	0	0	0	0
<b>BOZs und BAZ</b>					
AR79	44	0	0	0	0
AR125	28	0	0	0	0
AR199	19	0	0	0	0
<b>8-Amino-, 8-Hydroxylamino- und 8-Nitroso-BTZs</b>					
AR81	0	0	0	0	0
AR85	18	12	11	0	0
AR86	28	0	12	0	0
AR98	51	0	10	0	0
<b>8-Imido/8-Amido-BTZs</b>					
AR140	0	0	14	0	0
AR207	0	0	0	0	0
AR208	0	0	0	0	0
<b>8-Cyano, 8-Formyl- und 8-Hydroxymethyl-BTZs</b>					
AR134	12	0	0	0	0
AR135	38	11	0	0	0
AR145	0	0	0	0	0
AR146	0	0	0	0	0
<b>BTZthion</b>					
AR218	36	13	14	0	0

Testverbindung	Durchmesser der Hemmzone (mm) (n=1)				
	<i>M. vaccae</i> 10670	<i>M. aurum</i> SB 66	<i>B. subtilis</i> 6633	<i>E. coli</i> SG458	<i>Sp. salmoni-</i> <i>color</i> 549
<b>Referenzverbindungen</b>					
<b>BTZ043</b> <sup>1</sup>	37	0	15	0	14
Ciprofloxacin <sup>2</sup>	24	24	30	32	n.b.
Amphotericin B <sup>3</sup>	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	18
LM-Kontrolle <sup>4</sup>	0	0	0	0	0

Die 8-Nitro-BTZs verursachen einen Hemmhof >25 mm gegen *M. vaccae* (bis auf **AR214**), was auf gute antimykobakterielle Aktivität hinweist, ebenso erzeugt das getestete BOZ **AR125** einen Hemmhof von 28 mm gegen *M. vaccae*. Das BAZ **AR199** zeigt nur moderate Wirkung in diesem Assay, was sich aus dem Hemmhofdurchmesser von 19 mm ableiten lässt.

Das 8-Amino-BTZ **AR81** zeigt keine Hemmwirkung auf das Wachstum aller getesteten Mikroorganismen. Verbindung **AR85**, das zu **AR81** analoge 8-Hydroxylamino-BTZ, hingegen erzeugt einen Hemmhof von 18 mm und hat somit eine moderate Wirkung gegen *M. vaccae*. Die beiden getesteten 8-Nitroso-BTZs zeigen eine sehr gute Aktivität im Agardiffusionstest, dabei ist der Hemmhof von **AR98** mit 51 mm (Nitroso-Analogon von **BTZ043**) gegen *M. vaccae* deutlich ausgeprägter als der von **AR86** (28 mm).

Die 8-Imido und Amido-BTZs zeigen im Agardiffusionstest keine Wirkung auf das Wachstum aller verwendeten Mikroorganismen. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Affinität zum Target DprE1 wegen der Strukturänderungen zu gering ist. Wegen der hohen Carbonylreaktivität ist auch eine unspezifische Reaktion mit Bestandteilen des Agars bzw. des Mykobakteriums bei den BTZs mit Säureimidstruktur als Ursache für die Unwirksamkeit in Erwägung zu ziehen.

Die getesteten 8-Cyano, 8-Formyl- und 8-Hydroxymethyl-BTZs **AR134**, **AR145** und **AR146** zeigen ebenfalls keine Hemmhofbildung im Agardiffusionstest. Das 8-Formyl-BTZ **AR135** erzeugt bei dem Testkeim *M. vaccae* jedoch einen deutlichen Hemmhof (38 mm). Diese ausgeprägte Aktivität ist bemerkenswert, da sie erstmals für ein BTZ beschrieben wird, welches nicht über den Nitroso-Mechanismus wirken kann. Der in Kapitel 3.8 vorgeschlagene kovalente Hemmechanismus von DprE1 ist eine schlüssige Erklärung für dieses Verhalten, insbesondere da die Wirksamkeit spezifisch für den Testkeim *M. vaccae* ist.

Bei den anderen Keimen wurde keine Hemmzone mit einem Durchmesser >15 mm festgestellt, somit besitzen die Testverbindungen keine Aktivität gegen diese Mikroorganismen. Aus den gezeigten Daten lässt sich ableiten, dass die wirksamen Verbindungen eine selektive Toxizität für Mykobakterien besitzen und für ihre Wirksamkeit das Cystein im aktiven Zentrum von DprE1 mit großer Wahrscheinlichkeit essentiell ist.

## **4.2 Minimale Hemmkonzentrationen**

Die Verbindungen, die im Agardiffusionstest Aktivität gegen *M. vaccae* zeigen, werden anschließend zur besseren Quantifizierung der Wirksamkeit einer MHK-Bestimmung gegen dieses Bakterium unterzogen. Die MHK bezeichnet dabei die geringste Konzentration, bei der ein Stoff noch hemmend auf das Wachstum einer bestimmten Bakterienspezies wirkt. Für eine Auswahl der aktivsten BTZs wird im Anschluss eine MHK gegen *M. tuberculosis* ermittelt, um die Aktivität gegen das eigentliche Zielpathogen zu bestimmen. Die Feststellung der MHKs erfolgt in Zusammenarbeit mit dem HKI Jena, GlaxoSmithKline (GSK) Tres Cantos und der Universität von Illinois in Chicago.

Zur MHK-Bestimmung wird *M. vaccae*, wie bereits im Agardiffusionstest, als nicht-pathogener Testkeim genutzt. Die Auswertung der Testplatten erfolgt nach 48 h makroskopisch, dabei wird untersucht bis zu welcher Testsubstanzkonzentration Bakterienwachstum erkennbar ist. Nach 72 h wird durch eine Indikatorreaktion mit Resazurin der Assay abschließend ausgewertet (Palomino et al., 2002). Der genutzte Resazurin-Reduktions-Mikrotiterassay (REMA) beruht auf der Eigenschaft lebender Mykobakterien, das nicht-fluoreszierende blaue Resazurin zum fluoreszierenden, rosafarbenen Resorufin umzusetzen. Der REMA ist eine Standardmethode zur MHK Bestimmung (Franzblau et al., 2012). Die Testung gegen *M. vaccae* wurde in Kooperation mit dem HKI Jena durchgeführt. Für die MHK Bestimmung gegen *M. tuberculosis* werden MABA (Microplate Almar Blue Assay), wie LORA (Low oxygen recovery assay) als Assay genutzt. Eine detaillierte Beschreibung dieser Methoden findet sich im experimentellen Teil dieser Arbeit (siehe Kapitel 7.2.1).

Tabelle 6. MHKs der getesteten Verbindungen gegen *M. vaccae* bzw. *M. tuberculosis* (<sup>1</sup> GSK Tres Cantos, <sup>2</sup> Universität Illinois Chicago, (MABA), <sup>3</sup> Universität Illinois Chicago, (LORA), <sup>4</sup> Makarov et al., 2009, <sup>5</sup> Makarov et al., 2014)

Testverbindung	MHK			
	<i>M. vaccae</i> 10670 (n=1)		<i>M. tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv (n=1)	
	[µg/ml]	[µmol/l]	[µg/ml]	[µmol/l]
<b>2-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-BTZs</b>				
AR112	0.0016	0.004	0.03 <sup>2</sup> , >10 <sup>3</sup>	0.07 <sup>2</sup> , >22.9 <sup>3</sup>
AR130	0.025	0.057	0.09 <sup>2</sup> , 9.09 <sup>3</sup>	0.21 <sup>2</sup> , 20.8 <sup>3</sup>
AR196	0.0125	0.061	0.07 <sup>2</sup> , 1.22 <sup>3</sup>	0.17 <sup>2</sup> , 3.00 <sup>3</sup>
AR204	0.025	0.053	0.16 <sup>2</sup> , >10 <sup>3</sup>	0.34 <sup>2</sup> , >21.4 <sup>3</sup>
<b>2-N-Acylpiperazin-BTZs</b>				
AR153	0.4	0.75	n.b.	n.b.
AR154	0.0016	0.0032	0.03 <sup>2</sup> , >10 <sup>3</sup>	0.06 <sup>2</sup> , >20.6 <sup>3</sup>
AR158	0.0016	0.0032	0.01 <sup>2</sup> , >10 <sup>3</sup>	0.02 <sup>2</sup> , >20.6 <sup>3</sup>
AR160	0.025	0.04	1.38, >10 <sup>3</sup>	2.41, >17.5 <sup>3</sup>
AR162	0.4	0.85	n.b.	n.b.
AR164	0.05	0.09	0.86 <sup>2</sup> , >10 <sup>3</sup>	1.58 <sup>2</sup> , >18.4 <sup>3</sup>
AR167	3.12	7.01	n.b.	n.b.
AR168	0.0062	0.01	0.15 <sup>2</sup> , 3.67 <sup>3</sup>	0.27 <sup>2</sup> , 6.70 <sup>3</sup>
AR172	0.0031	0.006	0.06 <sup>2</sup> , >10 <sup>3</sup>	0.12 <sup>2</sup> , >19.5 <sup>3</sup>
AR175	0.0001	0.0002	<0.004 <sup>2</sup> , >10 <sup>3</sup>	<0.008 <sup>2</sup> , >19.1 <sup>3</sup>
AR210	0.0031	0.007	n.b.	n.b.
AR211	1.56	4.3	n.b.	n.b.
AR212	0.0125	0.023	n.b.	n.b.
AR213	0.0031	0.006	n.b.	n.b.
AR219	50	30.8	n.b.	n.b.
AR220	3.12	2.64	n.b.	n.b.
<b>2-Diazabicyclononan-BTZs</b>				
AR190	0.05	0.10	n.b.	n.b.
AR191	0.05	0.10	n.b.	n.b.
AR192	0.2	0.5	n.b.	n.b.
AR194	0.025	0.05	n.b.	n.b.

Testverbindung	MHK			
	<i>M. vaccae</i> 10670 (n=1)		<i>M. tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv (n=1)	
	[µg/ml]	[µmol/l]	[µg/ml]	[µmol/l]
<b>2-Piperidin-BTZs und versch. Substituenten in Position 2</b>				
AR100	0.2	0.5	n.b.	n.b.
AR106	0.0031	0.006	<0.004 <sup>2</sup> , >10 <sup>3</sup>	<0.007 <sup>2</sup> , >18.7 <sup>3</sup>
AR107	0.4	0.9	n.b.	n.b.
AR110	0.2	0.5	n.b.	n.b.
AR115	0.025	0.052	0.12 <sup>2</sup> , 6.36 <sup>3</sup>	0.25 <sup>2</sup> , 13.3 <sup>3</sup>
AR184	0.1	0.3	≤0.4 <sup>1</sup>	≤1 <sup>1</sup>
AR185	1.56	3.96	6.3 <sup>1</sup>	16 <sup>1</sup>
AR187	0.40	1.11	n.b.	n.b.
AR216	0.1	0.3	n.b.	n.b.
AR217	0.2	0.5	≤0.4 <sup>1</sup>	≤1 <sup>1</sup>
<b>BOZ und BAZ</b>				
AR125	0.78	1.99	n.b.	n.b.
AR199	6.25	16.03	n.b.	n.b.
<b>8-Amino-, 8-Hydroxylamino- und 8-Nitroso-BTZs</b>				
AR81	100	304	n.b.	n.b.
AR85	6.25	18.12	n.b.	n.b.
AR86	25	72.9	n.b.	n.b.
AR98	0.025	0.06	n.b.	n.b.
<b>BTZthion</b>				
AR218	0.78	2.08	n.b.	n.b.
<b>Referenzverbindungen</b>				
BTZ043	0.0008	0.0018	0.001 <sup>4</sup> , 6.97 <sup>3</sup>	0.0023 <sup>4</sup> , 16.2 <sup>3</sup>
PBTZ169	n.d.	n.d.	≤0.00019 <sup>5</sup>	≤0.0004 <sup>5</sup>

Alle 8-Nitro-BTZs, die im Agardiffusionstest Aktivität zeigten, konnten dieses Ergebnis bei der MHK-Bestimmung gegen *M.vaccae* bestätigen. Die ermittelten Werte reichen dabei von 30.8 µM bis 0.2 nM, die Spannweite der MHKs ist auf unterschiedliche Substitution in Position 2 des Grundgerüsts zurückzuführen. Das Ergebnis unterstreicht den substantiellen Einfluss der Struktur an Position 2 im Molekül auf die Aktivität der Verbindung. Zur vereinfachten Auswertung der Daten zeigt Tabelle 7 eine Einteilung der BTZs in Klassen verschiedener Aktivität, wobei diese Klassifizierung sich nur auf 8-Nitro-BTZs bezieht. Mit den Verbindungen

**AR106, AR112, AR154, AR158, AR168, AR172, AR175, AR210** und **AR213** konnten im Rahmen der Arbeit neun 8-Nitro-BTZs hergestellt werden, die eine hohe Wirksamkeit besitzen und unterschiedlich an Position 2 substituiert sind. Darunter finden sich Vertreter der 2-Piperidin, 2-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin und 2-N-Acylpiperazin-BTZs. Besonders hervorzuheben ist **AR175**, ein BTZ mit einem durch Heptansulfonsäure acylierten Piperazin als Seitenkette, welches 0.2 nM subnanomolare MHK gegen *M. vaccae* aufweist. Damit ist **AR175** der Referenzverbindung **BTZ043** (MHK 1.8 nM) in diesem Test überlegen. Die Verbindungen **AR106** und **AR175** bestätigen ihre starke Wirksamkeit auch gegen *M. tuberculosis* mit MHKs von  $\leq 8$  nM.

Tabelle 7. Klassifizierung der 8-Nitro-BTZ Aktivität

MHK [nM] ( <i>M. vaccae</i> )	Klassifizierung 8-Nitro BTZs
>100	schwach wirksame BTZs: <b>AR100, AR107, AR110, AR153, AR162, AR167, AR183, AR184, AR185, AR187, AR192, AR216, AR217, AR219, AR220</b>
100-10	gut wirksame BTZs: BTZs <b>AR115, AR130, AR160, AR164, AR190, AR191, AR194, AR196, AR204, AR212</b>
<10	hoch wirksame BTZs: <b>AR106, AR112, AR154, AR158, AR168, AR172, AR175, AR210, AR213</b>

Die weiteren 8-Nitro-BTZs **AR115, AR130, AR160, AR164, AR190, AR191, AR194, AR196, AR204** und **AR212** besitzen mit MHKs zwischen 10 und 100 nM eine gute Aktivität gegen *M. vaccae*, ohne die ausgeprägte Wirksamkeit von beispielsweise **AR175** zu erreichen.

Mit einer MHK von >100 nM weisen die Verbindungen **AR100, AR107, AR110, AR153, AR162, AR167, AR183, AR184, AR185, AR187, AR192, AR216, AR217, AR219** und **AR220** für 8-Nitro-BTZs eine eher schwache Aktivität auf.

Zur Bestimmung der Aktivität gegen nicht replizierende Keime werden bestimmte BTZ-Derivate im Low oxygen recovery assay (LORA) gegen *M. tuberculosis* getestet. Die Aktivität der getesteten 8-Nitro-BTZs im LORA ist auch mit unseren BTZ-Derivaten gering bzw. nicht vorhanden. Beim LORA handelt es sich um einen Assay, bei dem die Bakterien durch Sauerstoffausschluss in einen Zustand versetzt werden, in welchen sie sich nicht replizieren. Dies simuliert persistente Keime bei einer Infektion (Cho et al., 2007). Der erhebliche

Aktivitätsabfall, der auch bei der Leitverbindung **BTZ043 (AR182)** (siehe Tabelle 6) zu beobachten ist, legt nahe, dass metabolische Aktivität für eine gute Wirkung kovalenter DprE1-Inhibitoren notwendig ist. Vergleichbare Daten sind für 8-Nitro-BTZs bisher nicht veröffentlicht. Der nicht-kovalente DprE1-Hemmstoff **TCA1** (Wang et al., 2013) zeigt hingegen Aktivität gegen nicht replizierende *M. tuberculosis*. Die Testkeime wurden hierfür allerdings nicht durch Sauerstoffmangel, sondern durch Nährstoffmangel erzeugt.

Die MHK des BOZs **AR125** ist mit 1.99  $\mu\text{M}$  deutlich höher als die des analogen BTZs **AR196**, welches das Wachstum von *M. vaccae* noch bei einer Konzentration von 0.061  $\mu\text{M}$  hemmt. Dies deckt sich mit den von Rudolph (Rudolph, 2013) publizierten Daten, welche zeigen, dass ein Austausch des Schwefelatoms gegen Sauerstoff zu Aktivitätsverlust führt. Bei dem BAZ **AR199**, welches anstelle des Schwefels ein Stickstoffatom besitzt, ansonsten aber analog zu **AR196** aufgebaut ist, erhöht sich die MHK ebenfalls deutlich auf 16.03  $\mu\text{M}$ .

### **4.3 Testung auf antiproliferative Aktivität und Zytotoxizität**

Die gegen *M. vaccae* aktiven Testsubstanzen (siehe Tabelle 6) werden im Anschluss an die MHK Bestimmung einer Testung auf Zytotoxizität und antiproliferative Aktivität unterzogen. Für die Testung auf antiproliferative Eigenschaften fanden die Endothelzellen HUVEC bzw. die Leukämiezelllinie K-562 zur Ermittlung der  $\text{GI}_{50}$  Werte Verwendung. Der  $\text{GI}_{50}$  Wert bezeichnet die Konzentration eines Stoffes bei der das Wachstum von 50 % der Zellen gehemmt ist.

Die Zytotoxizitätsuntersuchungen werden an der HeLa Zelllinie durchgeführt, welche aus Epithelzellen des Zervixkarzinoms isoliert wurde. Zur Quantifizierung eines möglichen zytotoxischen Effektes erfolgte die Bestimmung der  $\text{CC}_{50}$  Werte, d.h. der Konzentration bei der eine Verbindung die Hälfte der lebenden Zellen abtötet. Die Untersuchungen finden in Zusammenarbeit mit dem HKI Jena unter Leitung von Frau Dr. Voigt statt.

Zur Testung werden Stammlösungen der Verbindungen in DMSO (1 mg/ml) hergestellt und mit DMEM (Dulbecco's modified eagle Medium) auf eine Anfangskonzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  verdünnt. Wegen der schlechten Wasserlöslichkeit der Testsubstanzen ist die Nutzung des Lösungsmittels DMSO, trotz seiner zytotoxischen Eigenschaften, notwendig (maximale DMSO Anteil der Stammlösungen ca. 5 %). Aus diesem Grund erfolgte keine Bestimmung der

antiproliferativen Aktivität und Zytotoxizität bei Konzentration von >5 µg/ml. Verbindungen, die bei dieser Konzentration keinen Effekt zeigten, wurden als nicht zytotoxisch bzw. nicht antiproliferativ eingeschätzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8. Ergebnisse der Testung auf antiproliferative und zytotoxische Effekte

Testverbindung	Antiproliferative Aktivität				Zytotoxizität		Therapeutischer Index <i>in vitro</i> CC <sub>50</sub> HeLa/ MIC ( <i>Mtb</i> )
	HUVEC Gi <sub>50</sub>		K-562 Gi <sub>50</sub>		HeLa CC <sub>50</sub>		
	[µg/ml]	[µmol/l]	[µg/ml]	[µmol/l]	[µg/ml]	[µmol/l]	
<b>2-(1,2,3,4)-Tetrahydroisochinolin-BTZs</b>							
AR112	>5	>11.4	>5	>11.4	>5	>11.4	>167
AR130	≥5	≥11.4	≥5	≥11.4	>5	>11.4	>56
AR196	>5	>12.3	>5	>12.3	>5	>12.3	>71
AR204	>5	>10.7	>5	>10.7	>5	>10.7	>31
<b>2-N-Acylpiperazin-BTZs</b>							
AR153	>5	>9.0	>5	>9.0	>5	>9.0	n.b.
AR154	>5	>10.3	>5	>10.3	>5	>10.3	>166
AR158	>5	>10.3	>5	>10.3	>5	>10.3	>500
AR160	>5	>8.7	>5	>8.7	>5	>8.7	>3.6
AR162	>5	>10.6	>5	>10.6	>5	>10.6	n.b.
AR164	>5	>9.2	>5	>9.2	>5	>9.2	>5.8
AR167	>5	>11.2	>5	>11.2	>5	>11.2	n.b.
AR168	>5	>9.1	>5	>9.1	>5	>9.1	>33
AR172	>5	>9.7	>5	>9.7	>5	>9.7	>83
AR175	>5	>9.8	>5	>9.8	>5	>9.8	>1250
AR210	>5	>10.9	>5	>10.9	>5	>10.9	n.b.
AR212	>5	>9.1	>5	>9.1	>5	>9.1	n.b.
AR213	>5	>10.3	>5	>10.3	>5	>10.3	n.b.
<b>2-Diazabicyclononan-BTZs</b>							
AR190	>5	>10.0	>5	>10.0	>5	>10.0	n.b.
AR191	>5	>10.2	>5	>10.2	>5	>10.2	n.b.
AR192	4.9	12.3	>5	>12.5	>5	>12.5	n.b.
AR194	>5	>10.2	>5	>10.2	>5	>10.2	n.b.
<b>2-Piperidin-BTZs und versch. Substituenten in Position 2</b>							
AR106	>5	>9.4	>5	>9.4	>5	>9.4	>1250
AR115	>5	>10.5	>5	>10.5	>5	>10.5	>42

Testverbindung	Antiproliferative Aktivität				Zytotoxizität		Therapeutischer Index <i>in vitro</i>
	HUVEC Gi <sub>50</sub>		K-562 Gi <sub>50</sub>		HeLa CC <sub>50</sub>		
	[µg/ml]	[µmol/l]	[µg/ml]	[µmol/l]	[µg/ml]	[µmol/l]	CC <sub>50</sub> HeLa/ MIC ( <i>Mtb</i> )
<b>AR184</b>	>5	>13.3	>5	>13.3	>5	>13.3	>13
<b>AR185</b>	>5	>12.7	>5	>12.7	1.6	4.1	0.25
<b>AR187</b>	>5	>13.9	>5	>13.9	>5	>13.9	n.b.
<b>AR216</b>	>5	>14.5	>5	>14.5	>5	>14.5	n.b.
<b>AR217</b>	>5	>12.2	>5	>12.2	>5	>12.2	>13
<b>BOZs und BAZ</b>							
<b>AR125</b>	>5	>12.8	4.2	10.7	>5	>12.8	n.b.
<b>AR199</b>	>5	>12.8	>5	>12.8	>5	>12.8	n.b.
<b>8-Amino-, 8-Hydroxylamino- und 8-Nitroso BTZs</b>							
<b>AR85</b>	>5	>14.5	>5	>14.5	>5	>14.5	n.b.
<b>AR86</b>	>5	>14.6	>5	>14.6	>5	>14.6	n.b.
<b>AR98</b>	>5	>12.1	>5	>12.1	>5	>12.1	n.b.

Bis auf die Verbindungen **AR125**, **AR130**, **AR185** und **AR192** zeigt keine der untersuchten Testsubstanzen antiproliferative bzw. zytotoxische Effekte, was mit Literaturdaten (Makarov et al., 2009, Makarov et al. 2014) übereinstimmt. Das BOZ **AR125** wie auch die 8-Nitro-BTZs **AR130** und **AR192** zeigen einen schwachen antiproliferativen Effekt. Die einzige Verbindung, die deutliche zytotoxische Wirkung aufweist, ist das 8-Nitro-BTZ **AR185** mit einem CC<sub>50</sub> Wert von 1.6 µg/ml (4.1 µmol/l) gegen HeLa-Zellen. Da strukturell ähnliche Verbindungen wie **AR184** bzw. **AR217** diesen zytotoxischen Effekt nicht zeigen, ist es wahrscheinlich, dass die Sulfoxid-Partialstruktur von **AR185** für die zytotoxische Wirkung verantwortlich ist.

Überraschenderweise konnten für die Nitroso-BTZs **AR86** und **AR98** weder antiproliferative noch zytotoxische Effekte nachgewiesen werden. Diese erschienen wegen der elektrophilen NO-Gruppe wahrscheinlich, die mit diversen Nukleophilen auf zellulärer Ebene Reaktionen eingehen kann. Eine Reaktion der instabilen Nitroso-BTZs mit den Bestandteilen des Nährmediums, welches auch Cystein enthält, ist wahrscheinlich. So ist es möglich, dass die Nitroso-BTZs mit der nukleophilen SH-Funktion des Cysteins im Nährmedium abreagieren. Andererseits sollten sie dann keine antimykobakterielle Aktivität aufweisen. Vermutlich reagieren sie sowohl mit DprE1 als auch in einer Weise mit verschiedenen Nukleophilen in den Kulturmedien.

## 5 Charakterisierung von BTZs und BOZs am Target DprE1

### 5.1 DprE1 Enzymassays - Aktivitätsunterschiede gegen das Targetenzym

Wie in Tabelle 6 gezeigt, besitzen verschiedene BTZs und BOZs eine große Spannweite antimykobakterieller Aktivität *in vitro*. Die MHKs reichen hierbei von mikromolaren bis in subnanomolare Konzentrationen. Unterschiedliche Faktoren können zu diesem Verhalten beitragen: einerseits Zellwandpermeabilität, Pharmakokinetik und Wirkstoffkonzentration am Wirkort, andererseits wird die unterschiedliche Aktivität auch durch die Wechselwirkung zwischen Hemmstoff und Target bedingt. Um diese Interaktion besser zu verstehen, werden Enzymassays mit verschiedenen BTZ- bzw. BOZ-Derivaten und DprE1 (rekombinant, *M. tuberculosis*) durchgeführt.

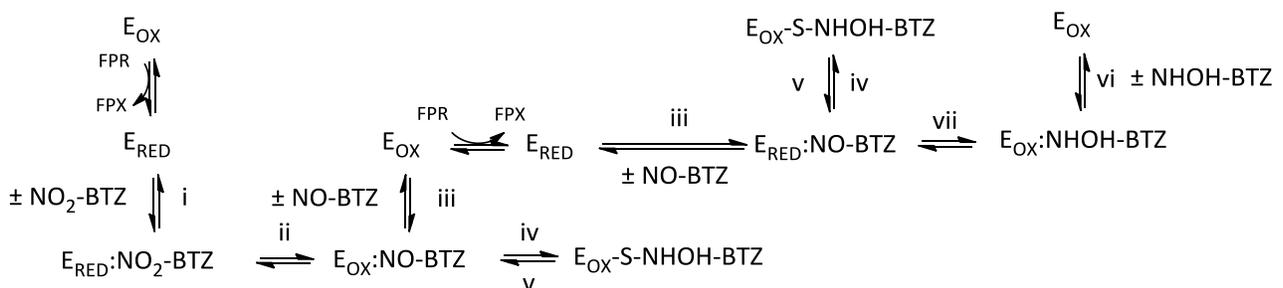


Abbildung 52. Detaillierter Mechanismus der DprE1 Hemmung durch BTZs ((i) nicht-kovalente Erkennung der Nitro-BTZs durch DprE1; (ii) Reduktion der Nitro-BTZs zu Nitroso-BTZs durch DprE1; (iii) Freisetzung der Nitroso-BTZs; (iv) kovalente Bindung der Nitroso-BTZs an Cys387; (v) Spaltung der Bindung zwischen BTZs und DprE1; (vi) nicht-kovalente Erkennung der Hydroxylamino-BTZs durch DprE1; (vii) Oxidation der Hydroxylamino-BTZs zu Nitroso BTZs durch DprE1, FPR - Farnesylphosphoryl-β-D-ribose, FPX - Farnesylphosphoryl-β-D-2'-keto-erythro-pentafuranose)

Die Abbildung 52 zeigt schematisch die Wechselwirkung zwischen BTZs und dem Targetenzym DprE1. Die einzelnen Schritte in Abbildung 52 illustrieren diese komplexe Reaktion: (i) nicht-kovalente Erkennung der Nitro-BTZs durch DprE1; (ii) Reduktion der Nitro-BTZs zu Nitroso-BTZs durch DprE1; (iii) Freisetzung der Nitroso-BTZs; (iv) kovalente Bindung der Nitroso-BTZs an

Cys387; **(v)** Spaltung der Bindung zwischen BTZs und DprE1; **(vi)** nicht-kovalente Erkennung der Hydroxylamino-BTZs durch DprE1; **(vii)** Oxidation der Hydroxylamino-BTZs zu Nitroso BTZs durch DprE1.

Die Darstellung umfasst auch einen neuen bisher nicht veröffentlichten Mechanismus: die kovalente Modifikation von Cys387 ausgehend von einem Hydroxylamino-BTZ, welches von DprE1 durch Oxidation in die reaktive Nitroso-Form umgewandelt wird (Schritt **iv**, siehe auch Kapitel 5.2).

In Kooperation mit GSK Stevenage war die Nutzung eines neu entwickelten fluoreszenzbasierten Enzymassays für DprE1 (rekombinant, *M. tuberculosis*) unter Anleitung von Dr. A. Argyrou möglich. Dieser Assay umfasst die Oxidation von Farnesylphosphoryl-β-D-ribose (FPR) zu Farnesylphosphoryl-β-D-2'-keto-erythro-pentafuranose (FPX). Während dieser Reaktion wird FAD zu FADH<sub>2</sub> umgesetzt. Die reduzierte Form des Coenzym ist nun in der Lage, Resazurin zum fluoreszierenden Resorufin umzusetzen (Batt et al., 2015), welches fluoreszenzspektroskopisch quantifiziert werden kann (siehe Abbildung 53).

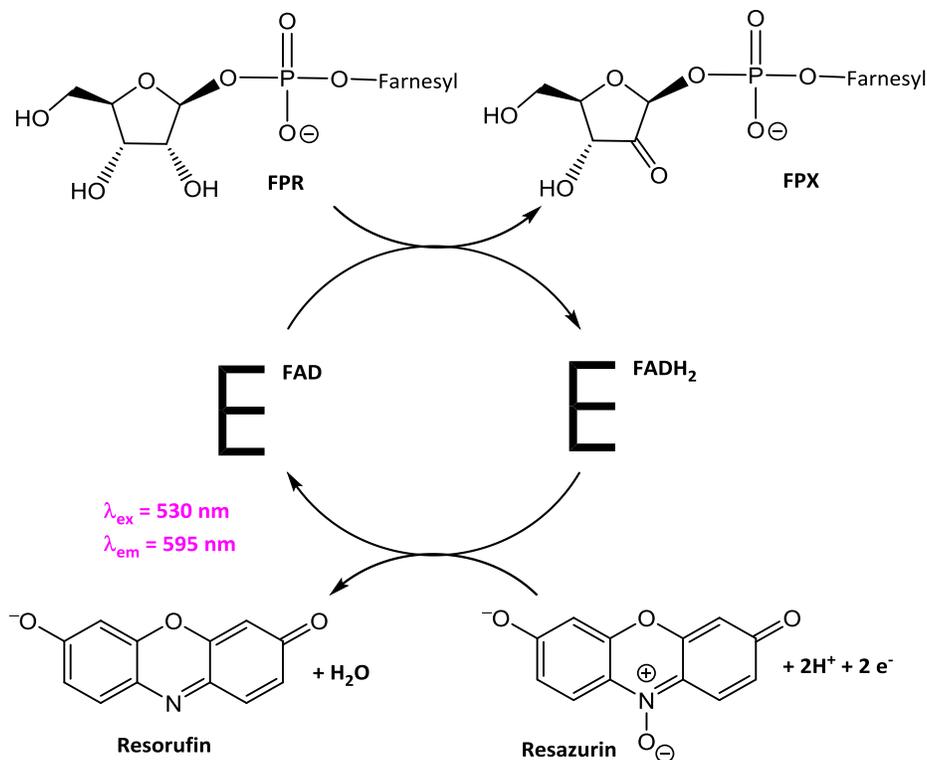


Abbildung 53. Mechanismus des DprE1 Enzymassays (Batt et al., 2015)

Da die Zeitverläufe ca. 100 Minuten lang linear sind und der Reaktionsverlauf kontinuierlich durch fluoreszenzspektroskopische Messung erfasst werden kann, ist dieser Assay hervorragend geeignet, den Wirkmechanismus von kovalenten Inhibitoren wie BTZs zu untersuchen. Mit diesem Assay war es erstmals möglich, deutlich zeitabhängige Hemmung von DprE1 durch BTZs zu beobachten und dadurch den komplexen Wirkmechanismus weiter auszuleuchten (siehe Abbildung 54). Die publizierten enzymkinetischen Daten (Neres et al.; 2012) stammen aus Assays, die nur 2 Minuten lang vermessen wurden und die hier beschriebenen Beobachtungen nicht ermöglichten. Im Folgenden werden die Hemmkinetiken von unterschiedlichen BTZ- und BOZ-Derivaten beschrieben.

### **5.1.1 Hemmkinetiken von BTZs bzw. BOZs verschiedener Aktivität gegen DprE1**

Abbildung 54 zeigt die Auswertung der Hemmdaten von kovalenten DprE1-Inhibitoren. Aus den Verlaufskurven der DprE1-Hemmung wird mit Hilfe einer exponentiellen Gleichung (siehe experimenteller Teil Kapitel 7.3.1) die beobachtete Hemmkonstante erster Ordnung ( $k_{obs}$ ) berechnet (Abbildung 54A/B und Abbildungen E1 und E2, experimenteller Teil). Es wird ein großer Bereich unterschiedlicher Hemmstoffkonzentrationen von 10 nM-100  $\mu$ M vermessen, dies geschieht unter Beachtung der Löslichkeit der eingesetzten Testverbindungen (siehe Tabelle 10).

Die Abhängigkeit zwischen  $k_{obs}$  und der Konzentration der Testverbindung enthält Informationen über die Anzahl der Schritte, die zur Enzymhemmung führen. Kovalente Hemmstoffe, die mit geringer Affinität an das Enzym binden und dieses in einem Ein-Schritt-Mechanismus hemmen (z.B. kovalente Modifikation eines katalytischen Cysteinrestes durch Iodacetamid) (Copeland, 2013), zeigen eine lineare Abhängigkeit von  $k_{obs}$  gegen die Konzentration des Hemmstoffes. Den Anstieg dieser linearen Funktion beschreibt die Hemmkonstante zweiter Ordnung:  $k_{inact}/K_i$ . Mit zunehmender Affinität des Hemmstoffes zum Enzym vergrößert sich der Anstieg.

Wenn die Enzymhemmung in einem Mehr-Schritt-Mechanismus erfolgt, zeigt  $k_{obs}$  Sättigungsverhalten mit zunehmender Hemmstoffkonzentration. Das ist bei BTZs der Fall. Dabei stellt die Geschwindigkeit der kovalenten Reaktion den geschwindigkeitsbegrenzenden Schritt

dar. Allerdings begrenzt bei geringer Konzentration des Mehr-Schritt-Inhibitors die nicht-kovalente Interaktion zwischen Hemmstoff und Target die Geschwindigkeit der Enzymhemmung.

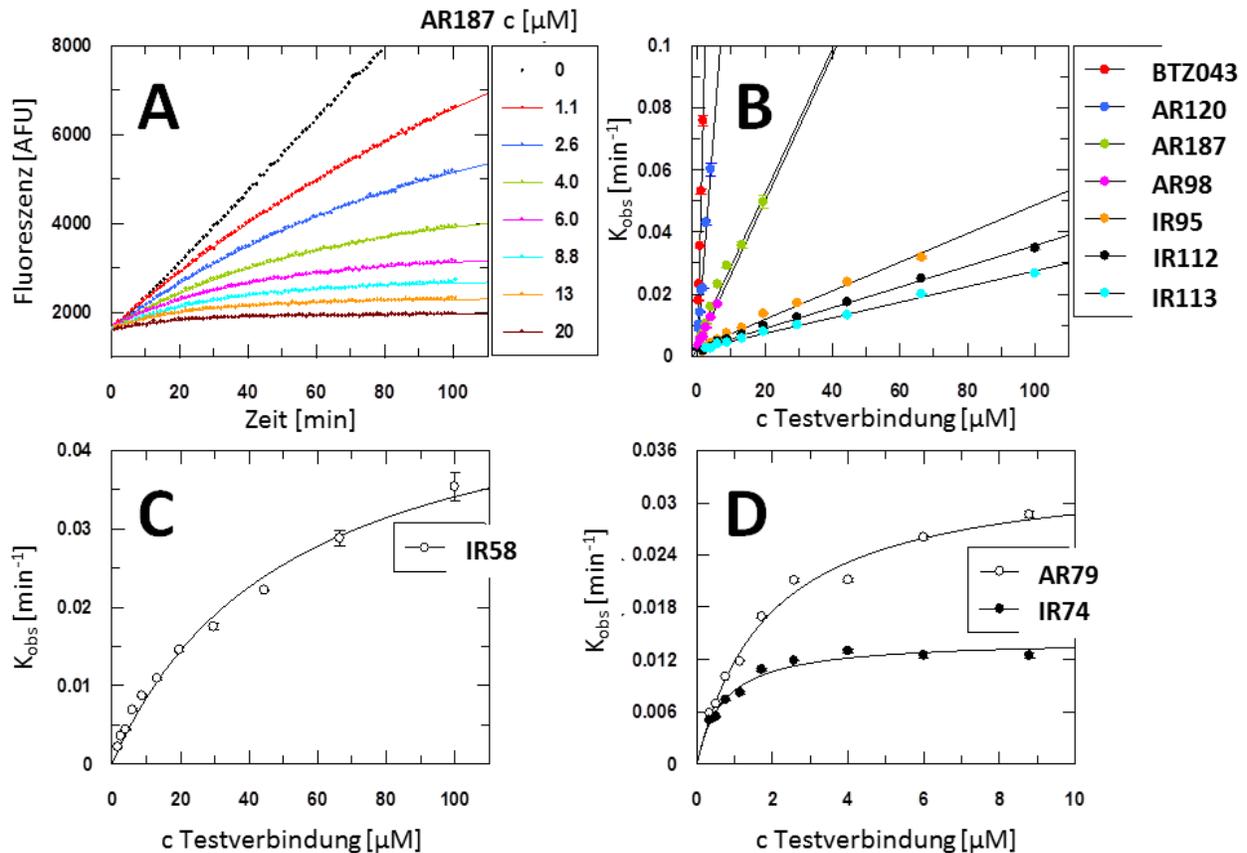


Abbildung 54. (A) Repräsentative Zeitverläufe der zeitabhängigen Hemmung von DprE1 durch **AR187** (B) lineare Abhängigkeit von  $k_{\text{obs}}$  gegen Hemmstoffkonzentration für verschiedene BTZs bzw. BOZs (C) und (D) nicht-lineare Abhängigkeit von  $k_{\text{obs}}$  gegen Hemmstoffkonzentration für BTZs bzw. BOZs

Die BTZs und BOZs (**BTZ043** (**AR182**), **AR120**, **AR187**, **AR98**, **IR95**, **IR112** und **IR113**) zeigen einen linearen Zusammenhang zwischen  $k_{\text{obs}}$  und der Konzentration des Hemmstoffes (siehe Abbildung 54 B) mit unterschiedlichen Werten für den Anstieg  $k_{\text{inact}}/K_i$  (siehe Tabelle 9). Dem gegenüber weisen drei Testverbindungen (**IR58**, **IR74** und **AR79**) hyperbolische Kurvenverläufe auf (Abbildung 54 C und D). Da BTZs wie auch BOZs einen mehrschrittigen Hemmechanismus besitzen, auf den auch der Redoxstatus des Enzyms ( $E_{\text{OX}}$  und  $E_{\text{RED}}$ ) Einfluss besitzt, sind die

Konstanten  $k_{\text{inact}}$  und  $K_I$  komplexe Parameter, welche sich aus den Geschwindigkeitskonstanten aller Einzelschritte (siehe Abbildung 52) zusammensetzen und in Summe den linearen bzw. hyperbolischen Zusammenhang zwischen  $k_{\text{obs}}$  und den Hemmstoffkonzentrationen ergeben. Unterschiede in der Struktur der Hemmstoffe können folgendes beeinflussen: (1) die initiale Affinität des nicht aktiven Hemmstoffs (Nitro-BTZ/BOZ) für  $E_{\text{RED}}$ , (2) die Affinität der Nitroso-Form des Inhibitors für  $E_{\text{OX}}$  und (3) die Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen chemischen Umsetzungen, d.h. die Reduktion der Nitro-Gruppe am katalytischen Zentrum und die Ausbildung der kovalenten Bindung zum Cys387. Deswegen ist es nicht möglich, anhand der  $k_{\text{inact}}/K_I$  Werte festzulegen, welcher der Einzelschritte für die unterschiedliche Aktivität der Testverbindungen verantwortlich ist und welche der einzelnen Geschwindigkeitskonstanten die begrenzend für die Gesamtgeschwindigkeit der Hemmreaktion ist. Nichtsdestotrotz ist für kovalente Hemmstoffe  $k_{\text{inact}}/K_I$  der aussagekräftigste Parameter zur Optimierung chemischer Strukturen, was sich in der guten Korrelation zwischen MHK und  $k_{\text{inact}}/K_I$  Werten widerspiegelt (Tabelle 6, 9 und Abbildung 54B).

Tabelle 9.  $k_{\text{inact}}/K_I$  Werte der getesteten Verbindungen

Stoffbezeichnung	$k_{\text{inact}}/K_I$ [ $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]	Stoffbezeichnung	$k_{\text{inact}}/K_I$ [ $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]
IR113	$4.2 \pm 0.1$	AR98	$39 \pm 1$
IR112	$5.6 \pm 0.1$	AR120	$240 \pm 16$
IR95	$7.7 \pm 0.3$	AR79	$300 \pm 40$
IR58	$17 \pm 2$	IR74	$340 \pm 50$
AR187	$39 \pm 2$	AR182 (BTZ043)	$720 \pm 20$

### 5.1.2 Zeitabhängigkeit der DprE1 Hemmung

Die Anstiege der Hemmkurven in Abbildung 54 und E1/E2 (siehe experimenteller Teil) werden in Abständen von 10 Minuten berechnet, um die Veränderung der  $IC_{50}$ -Werte als Funktion der Zeit zu bestimmen (siehe Abbildung 55). Alle bestimmten  $IC_{50}$ -Werte für BTZs und BOZs nehmen mit zunehmender Reaktionsdauer ab, wie für kovalente (zeitabhängige) Inhibitoren erwartet. Der  $IC_{50}$  Wert für einen irreversiblen Inhibitor sollte nach ausreichend langer Inkubationszeit

(>5 × t<sub>1/2</sub>) einen Grenzwert erreichen, welcher ungefähr bei der Hälfte der Konzentration des aktiven Enzyms im Assay liegt. Dies ist für die aktivsten Verbindungen **BTZ043 (AR182)** und **PBTZ169 (AR77)** (siehe Abbildung 55) im Enzymassay der Fall, bei welchen die Inkubationszeit von >5 × t<sub>1/2</sub> am besten erfüllt ist. (Die Konzentration des Enzyms DprE1 in diesem Assay beträgt 150 nM.)

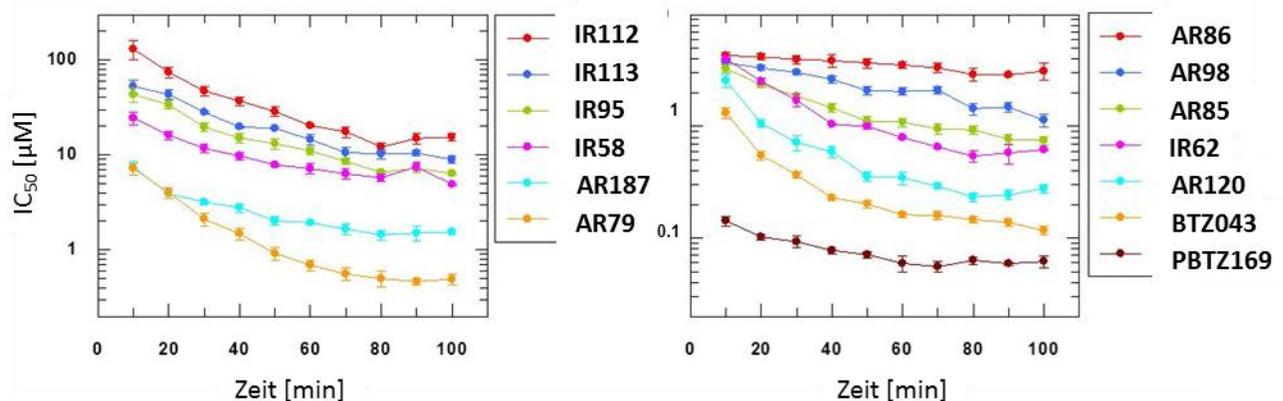


Abbildung 55. Zeitabhängigkeit der IC<sub>50</sub> Werte im Enzymassay

Neres et al. (Neres et al., 2012) ermittelten einen IC<sub>50</sub> Wert von 4.5 µM für die Hemmung von *M. smegmatis* DprE1 durch **BTZ043**. Unter Berücksichtigung der kürzeren Reaktionszeit in ihrem Enzymassay entspricht dies den in dieser Arbeit gemessenen Werten. Die MHKs von **BTZ043** gegen *M. smegmatis* bzw. *M. tuberculosis* betragen laut Literatur 9.2 nM und 2.3 nM (Makarov et al., 2009). Häufig ist ein erheblicher Aktivitätsverlust zwischen einem biochemischen Assay und einem Zellassay zu beobachten, dieser Effekt wird durch mangelnde Membranpermeabilität der Testverbindungen verursacht. Dies trifft auf zahlreiche nicht-kovalente DprE1-Inhibitoren zu, bei welchen die MHKs durchschnittlich 100x größer sind, als die im biochemischen Assay ermittelten IC<sub>50</sub> Werte (Chatterji et al., 2014, Shirude et al., 2014; Batt et al., 2015, Neres et al., 2015). Auf kovalente DprE1-Hemmstoffe wie **BTZ043** trifft das Gegenteil zu und die MHK-Werte sind durchschnittlich um den Faktor 1000 kleiner als die beobachteten DprE1-IC<sub>50</sub> Werte. Die in Abbildung 55 gezeigten Daten geben eine Erklärung für diese unerwartete Beobachtung. Für **BTZ043** nimmt der DprE1 IC<sub>50</sub>-Wert von ungefähr 1.5 µM nach 10 Minuten Reaktionszeit zu ca. 120 nM nach 100 Minuten ab. Bei einer längeren Reaktionszeit hätte der Grenzwert von 75 nM

erreicht werden können (dies entspricht der halben Enzymkonzentration im Assay). Es ist dem sehr langsamen Umsatz des Enzyms geschuldet (Batt et al., 2015), dass der genutzte Assay nicht empfindlich genug ist, um Messungen mit nanomolaren Enzymkonzentrationen zu erlauben. Wäre dies möglich, könnte man  $IC_{50}$ -Werte im picomolaren Bereich bei verlängerten Inkubationszeiten beobachten.

Abbildung 55 zeigt auch, dass das Nitroso-BTZ **AR98** deutlich langsamer DprE1 hemmt als das Nitro-Analogon **BTZ043**. Dies ist unerwartet, da **AR98** schon die aktive Form darstellt und keiner Bioaktivierung durch Reduktion bedarf. Wie bereits von Neres et al. (Neres et al., 2012) vermutet, legen diese Daten nahe, dass **BTZ043** nach Reduktion zu **AR98** unmittelbar mit Cys387 im aktiven Zentrum reagiert und diese mechanismusbasierte Präsentation der Nitroso-Gruppe höhere Effektivität der Hemmung aufweist.

## **5.2 Ein neuer Mechanismus für kovalente DprE1 Hemmung - Hydroxylamino-BTZs als Substrate**

Die Hemmkurven für **AR85** weisen ebenfalls auf einen kovalenten Wirkmechanismus hin (siehe Abbildung 56D). Dies ist sehr überraschend, da es sich bei **AR85** um ein 8-Hydroxylamino-BTZ handelt, welches die reduzierte Form des Nitroso-Analogons **AR86** darstellt. Eine zeitabhängige Enzymhemmung spricht für einen kovalenten Hemmechanismus, der bisher nur für die aus einem Nitro-BTZ gebildeten Nitroso-BTZs beschrieben ist (Makarov et al 2009, Neres et al., 2012). Diese Beobachtung kann erklärt werden, wenn **AR85** als alternatives Substrat von DprE1 fungiert, welches  $E_{Ox}$  unter Bildung des  $E_{Red}$ :**AR86** Komplexes reduziert und mit Ausbildung der kovalenten Bindung zu Cys387 DprE1 irreversibel hemmt (Abbildung 56A). Die bekannten antimykobakteriellen 8-Nitro-BTZs verhalten sich als umgekehrte Substrate von DprE1, d.h. sie müssen vom Enzym reduziert werden, während das natürliche Substrat (Decaprenyl-P-ribofuranose, DPR) oxidiert wird. Unsere Beobachtung zeigt erstmals, dass der natürliche Modus operandi, welcher auf einer Oxidationsreaktion beruht, auch zur DprE1 Hemmung genutzt werden kann. Die in Abbildung 56B gezeigten Massenspektren von DprE1 nach Inkubation mit **AR85** belegen diese Hypothese.

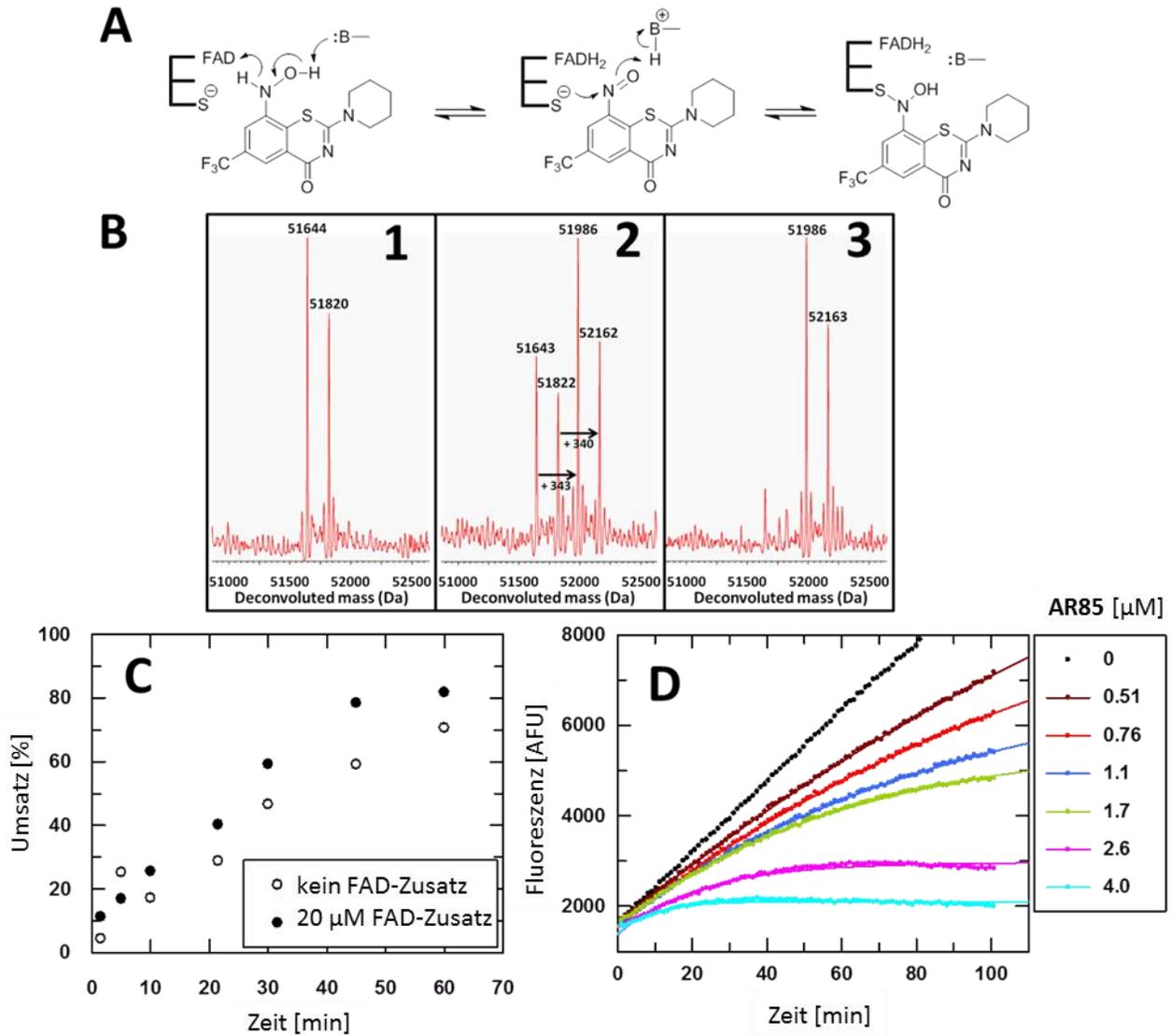


Abbildung 56. **(A)** Irreversible DprE1 (*M. tuberculosis*) Hemmung durch das Hydroxylamino-BTZ **AR85** **(B)** **1** Massenspektrum von DprE1 (*M. tuberculosis*) **2** partielle kovalente Modifikation von DprE1 (*M. tuberculosis*), 30 Minuten nach Inkubation mit **AR85** und 20 μM FAD **3** vollständige kovalente Modifikation von DprE1 (*M. tuberculosis*), 60 Minuten nach Inkubation mit **AR85** und 20 μM FAD **(C)** Zeitabhängigkeit der DprE1 (*M. tuberculosis*) Modifikation durch **AR85** mit und ohne Zugabe von 20 μM FAD **(D)** Hemmkurven aus dem DprE1 (*M. tuberculosis*) Enzymassay für **AR85**

Für die gezeigten Massenspektren wird DprE1 (*M. tuberculosis*, 10 μM) mit dem Hydroxylamino-BTZ **AR85** (20 μM) in Abwesenheit von FPR und Resazurin inkubiert. Im Anschluss wird die

Masse des Enzymes durch Massenspektrometrie bestimmt. Das Massenspektrum von DprE1 unmittelbar nach Zugabe von **AR85** zeigt ein Signal bei 51644 Da. Dieses Signal entspricht der theoretischen Molmasse der *des*-Methionin-Form von rekombinanten DprE1, welches für das Experiment verwendet wurde. Zudem konnte ein weiteres Signal bei 51820 Da beobachtet werden (siehe Abbildung 56B1), welches eine um 176 Da größere Masse als die 51644 Da Spezies aufweist. Eine unbekannte kovalente Modifikation, die während der rekombinanten Expression des Enzyms auftritt (mündliche Information Dr. M. Rees), ist die wahrscheinliche Ursache für die Beobachtung beider Enzymmassen (Abbildung 56B). Mit zunehmender Inkubationszeit nimmt die Intensität der beiden genannten Signale ab, wobei zwei neue Peaks mit Molmassen von 51986 Da und 52162 Da nachgewiesen werden können, welche um 340-343 Da größer sind als die Massen des nicht modifizierten Enzyms. Dies ist konsistent mit der Bildung eines Semimercaptals aus DprE1 und **AR85**, welche theoretisch eine Massenzunahme von 343 Da bewirkt (Abbildung 56B und 56C).

Diese Hypothese wird zusätzlich durch Kristallstrukturdaten belegt (Abbildung 59, siehe unten), die eine kovalente Bindung zu Cys387 nachweisen. Die räumliche Orientierung von **AR85** nach kovalenter Bindung im katalytischen Zentrum von DprE1 entspricht der seiner Nitro- bzw. Nitroso-Analoga. Auch die Geschwindigkeit, mit der die kovalente Modifikation von DprE1 durch **AR85** abläuft, entspricht der von 8-Nitro-BTZs und -BOZs. So ist die komplette Modifikation des Targetenzym erst nach einer Stunde Inkubation mit **AR85** erreicht (Abbildung 56C). Der Zusatz von FAD besitzt keinen signifikanten Einfluss auf die Geschwindigkeit der Hemmreaktion. Diese Beobachtung ist nicht überraschend, da das Verhältnis von Protein:FAD in gereinigtem, rekombinantem DprE1-Enzym 1:1 beträgt. Bei der hohen Enzymkonzentration, die in diesem Assay genutzt wird (10  $\mu$ M), ist eine Sättigung von DprE1 mit FAD zu erwarten, welches mit dem Enzym aufgearbeitet wurde.

Um auszuschließen, dass die DprE1-Hemmung von Abbauprodukten des Hydroxylamino-BTZs **AR85** herrührt, wird die Stabilität von **AR85** in DMSO durch  $^1\text{H}$ -NMR und ESI-MS Messungen überprüft. Die Verbindung wird 13 Tage lang in DMSO gelagert, wobei keine Abbauprodukte nachgewiesen werden konnten, insbesondere keine Nitro- oder Nitroso-Analoga von **AR85**.

Die beschriebenen Daten zeigen, dass es sich bei **AR85** um einen Suizidinhibitor handelt, welcher das Enzym "mechanism based", unter Nutzung der natürlichen Katalysefunktion,

hemmt. Dass für die kovalente Modifikation von DprE1 durch **AR85** kein Substrat (DPR oder FPR) notwendig ist, unterscheidet das Hydroxylamino-BTZ von den Nitro-Derivaten. Für diese Stoffklasse ist Substrat notwendig, bspw. FPR, damit die Hemmreaktion abläuft, da Nitro-BTZs FADH<sub>2</sub> im katalytischen Zentrum von DprE1 benötigen, um zur Nitroso-Form reduziert zu werden. Zur Kontrolle wird das Nitro-BTZ **AR182 (BTZ043)** in Abwesenheit vom Substrat mit DprE1 inkubiert, wobei keine kovalente Modifikation des Enzyms nachgewiesen werden konnte. Es ist auffällig, dass **AR85** trotz niedriger antimykobakterieller Aktivität (MHK = 6.25 µg/ml bzw. 18.12 µmol/l), im Enzymassay große Aktivität zeigt, sogar das Nitro-Analogon **AR187** übertrifft und fast die Aktivität von **AR182 (BTZ043)** erreicht.

In diesem Abschnitt sollen die Erkenntnisse über Hydroxylamino-BTZ **AR85** in Zusammenhang mit den veröffentlichten Informationen über **BTZ046**, dem Hydroxylamino-Analogon von **BTZ043** diskutiert werden. Für **BTZ046** konnte in DprE1 (*M. smegmatis*) Enzymassays ein IC<sub>50</sub>-Wert von 19.7 µM ermittelt werden. Eine kovalente Hemmung des Enzyms ist allerdings nicht beschrieben worden (Neres et al., 2012). Die MHK von **BTZ046** gegen *M. tuberculosis* beträgt 500 ng/ml bzw. 1.2 µmol/l (Makarov et al., 2009, Supplemental Information), was ungefähr 16x geringer ist als der enzymatische IC<sub>50</sub> Wert. Dies weist bereits darauf hin, dass der Wirkmechanismus von **BTZ046** in der Bakterienzelle komplexer als eine einfache reversible Bindung an DprE1 ist. Weitere Experimente sind nötig, um die Reaktion zwischen DprE1 und **BTZ046** zu beschreiben.

Die Verwendung eines Enzymassays, der längere Messzeiten erlaubt, würde die Beobachtung einer kovalenten, zeitabhängigen Hemmung ermöglichen. Ebenso könnten massenspektrometrische Messungen in Abwesenheit von Substrat, wie in Abbildung 56B, Daten über eine kovalente Modifikation von DprE1 erschließen, wie es in den beschriebenen Experimenten mit **AR85** möglich war. Bei der Studie zu **BTZ046** von Neres et al. (Neres et al., 2012) wurde DprE1 so behandelt, dass FAD komplett zu FADH<sub>2</sub> reduziert wurde, sodass unter Umständen keine Oxidationsäquivalente für die Bildung des Nitroso-BTZs zur Verfügung standen. Im Gegensatz dazu befindet sich das Enzym DprE1, welches für diese Arbeit verwendet wird, in der oxidierten Form, enthielt also FAD als Coenzym.

Die irreversible DprE1-Hemmung durch ein Hydroxylamino-BTZ eröffnet neue Möglichkeiten für den Angriff an diesem Target und somit für antimykobakterielle Wirkstoffe. Ein DprE1-

Hemmstoff zieht aus der Nutzung des natürlichen, katalytischen Zyklus des Enzyms den Vorteil, dass die Bioaktivierung direkt durch Reaktion mit E<sub>ox</sub> erfolgen kann und kein weiteres Substrat zur Bildung von FADH<sub>2</sub> als Reduktionsäquivalent notwendig ist.

Die Hydroxylaminofunktion weist jedoch einige für Arzneistoffe ungünstige Eigenschaften auf: starke Wasserstoffbrückenbindungen zu Proteinen, Neigung zur Komplexbildung mit Metallkationen und unzureichende Membranpermeabilität. Die Übertragung des mit **AR85** entdeckten Wirkmechanismus auf eine andere chemische Funktion mit günstigeren pharmakokinetischen Eigenschaften ist aus diesem Grund wünschenswert.

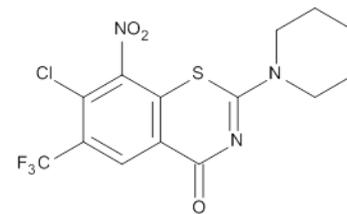
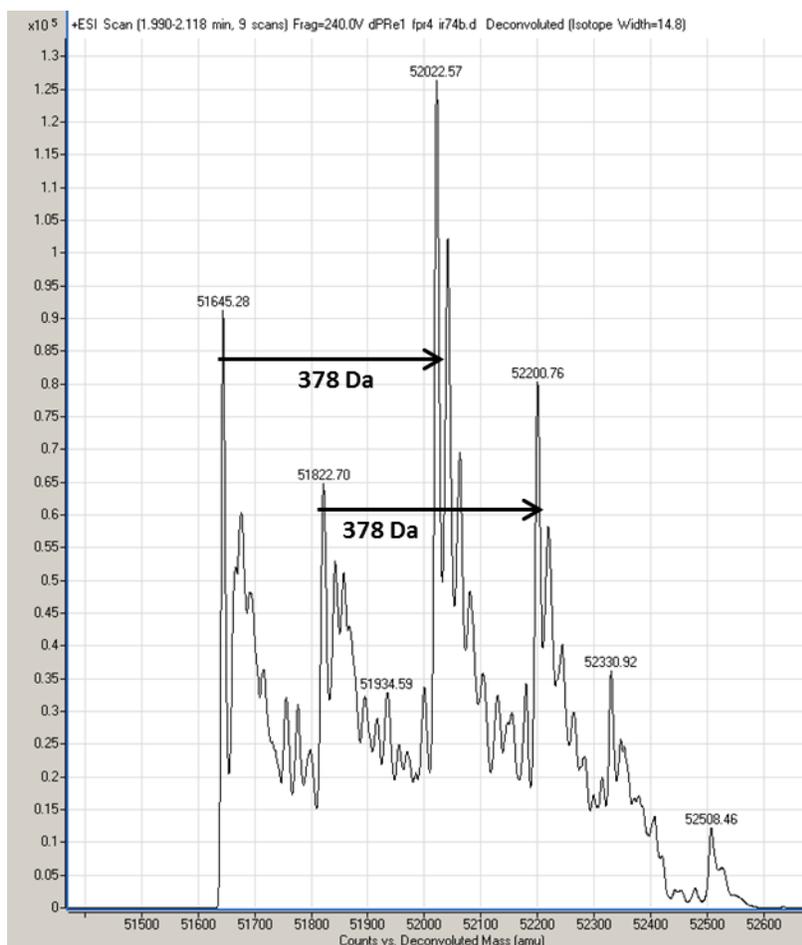
### **5.3 BTZs und BOZs binden kovalent - Massenspektren**

Um den Wirkmechanismus der BTZs aufzuklären, wurden massenspektrometrische Daten genutzt, die die kovalente Bindung eines Nitroso-BTZs an DprE1 belegen (Trefzer et al. 2012, Neres et al., 2012). Nichtsdestotrotz muss dieser Mechanismus nicht für alle BTZs zutreffen, dabei soll der von Tiwari et al. (Tiwari et al., 2013) vorgeschlagene alternative Wirkmechanismus, welcher eine nukleophile Substitution am Aromaten voraussetzt, nicht unerwähnt bleiben (von Richter Reaktion; siehe unten) (von Richter, 1871). Des Weiteren sei bemerkt, dass die Reaktion zwischen einem synthetisch hergestellten Nitroso-BTZ und DprE1 bisher noch nicht massenspektrometrisch untersucht wurde.

Für die im Folgenden beschriebenen Experimente werden sowohl ein Nitro-BTZ (**IR58**) als auch ein Nitroso-BTZ (**AR86**) unter Zusatz des Substratanalogons FPR und des Coenzym FAD mit DprE1 (*M. tuberculosis*) inkubiert. Im Anschluss wird das Reaktionsgemisch mittels LC-MS analysiert, wobei zwei unterschiedliche Inkubationsbedingungen eingesetzt werden (siehe experimenteller Teil Kapitel 7.3.2). Die entsprechende massenspektrometrische Analyse von **AR85** wurde bereits im vorhergehenden Abschnitt beschrieben (siehe Kapitel 5.2).

Das Nitro-BTZ **IR58** ist durch einen Chlorid Substituenten in Position 7 des BTZ Grundgerüsts gekennzeichnet. Nach Inkubation mit DprE1 kann ein Massenzuwachs von 378 Da beobachtet werden, was der Bildung des erwarteten Semimercaptals durch Reaktion des *in situ* gebildeten Nitroso-BTZs mit Cys387 entspricht (siehe Abbildung 57). Dieses Ergebnis schließt die von Tiwari et al. (Tiwari et al., 2013), in einer bemerkenswerten Publikation über die Reaktivität von BTZs

gegenüber Schwefel-Nucleophilen vorgeschlagene Hemmung nach einem von-Richter-Mechanismus aus. Bei diesem Mechanismus erfolgt der nukleophile Angriff an Position 7 des aromatischen Ringes der BTZ Struktur durch ein Thiol bzw. Thiolat, bevor die Reduktion zur Nitroso-Form erfolgt. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Mechanismus bei der nichtenzymatischen Reaktion von BTZs mit Thiolen abläuft. Die hier gezeigten Daten legen nahe, dass der von-Richter-Mechanismus bei der Reaktion zwischen BTZs und DprE1 nicht auftritt; denn im Falle von **IR58** müsste das Chloratom durch Cys387 substituiert werden. Die Substitution des Chloratoms hätte einen charakteristischen Massenverlust zur Folge, welcher in den durchgeführten Experimenten nicht nachgewiesen werden konnte. Der Mechanismus unter Bildung eines Nitroso-BTZs nach nichtkovalenter Bindung des Nitro-BTZs scheint auch mit **IR58** schneller zu erfolgen, obwohl dieses BTZ durch die einfache Substituierbarkeit des Chlorides für einen potentiellen von-Richter-Mechanismus besonders geeignet wäre.



**IR58**  
M = 394 Da

Abbildung 57. Massenspektrum von DprE1 nach Inkubation mit **IR58** (Bedingung A)

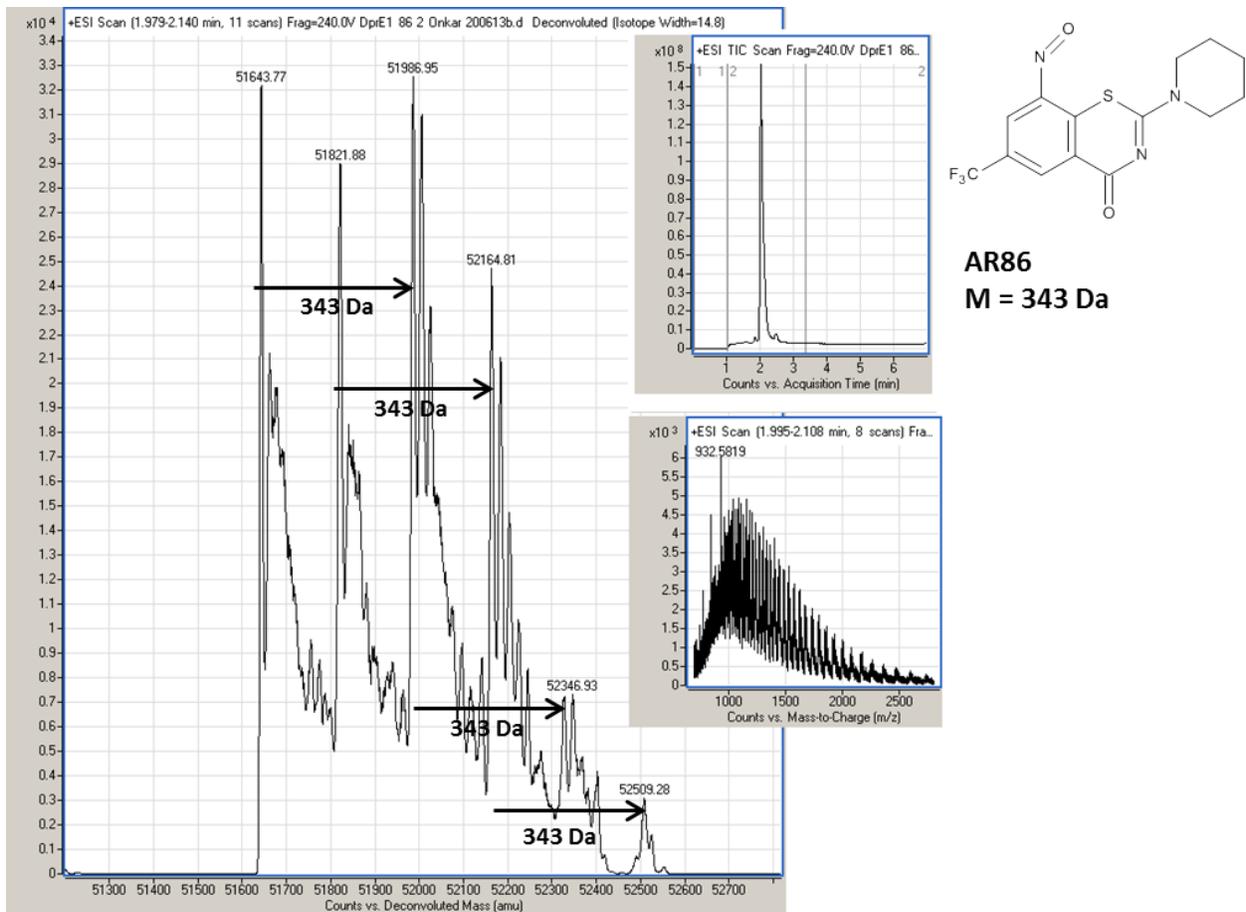


Abbildung 58. Massenspektrum von DprE1 nach Inkubation mit **AR86** (Bedingung A)

Unter den oben genannten Bedingungen wird auch das Nitroso-BTZ **AR86** mit DprE1 inkubiert und anschließend massenspektrometrisch analysiert. Nach der Reaktion mit dem BTZ können zwei neue Peaks nachgewiesen werden, die jeweils eine Massenzunahme um 343 Da gegenüber den Signalen des nicht modifizierten Enzyms zeigen (siehe Abbildung 58). Dies entspricht der beschriebenen kovalenten Bindung in Form eines Semimercaptals, welche hier erstmals nach Reaktion mit einem synthetisch hergestelltem Nitroso-BTZ beobachtet werden konnte. Die Ergebnisse sind ein weiterer Nachweis dafür, dass der Wirkmechanismus von Nitro-BTZs auf der Bildung von Nitroso-Derivaten *in situ* beruht und stellt eine Ergänzung zu den publizierten Daten dar (Neres et. al., 2012, Trefzer et al., 2012).

Auffällig ist eine kleine Signalgruppe im unteren Bildabschnitt (52346.93 Da, 52509.28 Da), die eine weitere Massenzunahme um 343 Da zeigt und somit eine zweite kovalente Modifikation

durch **AR86** vermuten lässt. Eine naheliegende Erklärung für diese Beobachtung ist die Reaktion des Nitroso-BTZs mit einer weiteren nukleophilen Gruppe in DprE1, beispielsweise dem Cys129.

#### **5.4 Kristallstrukturen verschiedener BOZs und BTZs**

Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich, für die Verbindungen **AR85**, **AR86**, und **BTZ043 (AR182)** Kristallstrukturen zur ermitteln. Diese werden mit den Daten für **AR120** und **IR95** aus der Dissertation von Dr. Rudolph (Rudolph, 2013) (Abbildung 59) verglichen. Vor der Kristallisation wird das Enzym DprE1 mit den BTZs bzw. BOZs und FPR inkubiert, um die Ausbildung der kovalenten Bindung, wie in der Literatur beschrieben (Neres et al., 2012), sicher zu stellen. Alle Strukturen sind in der Raumgruppe  $P2_1$  angeordnet und bilden einen dimeren DprE1-Inhibitor-Komplex in jeder asymmetrischen Einheit. Elektronendichtekarten, welche auf Grundlage von DprE1-Strukturdaten vor Bindung eines Liganden berechnet wurden, zeigen für alle fünf Verbindungen eine kovalente Bindung zur SH-Gruppe des Cysteins im aktiven Zentrum des Enzyms (Cys387) (Abbildung 59B-59E).

Die räumliche Orientierung der BTZs bzw. BOZs im aktiven Zentrum von DprE1 ist gleichartig, dies ist der kovalenten Semimercaptal-Bindung zum Cys387 geschuldet. Die sterischen Einschränkungen durch die Enzymstruktur verhindern eine mögliche  $180^\circ$ -Rotation um die C-N-Bindung an Position 8 des BTZ-Grundgerüsts. Entsprechend ist die Trifluormethylgruppe bei allen Testverbindungen den Aminosäuren Lys134, Gly133, His132, Lys367 und Phe369 zugewandt. Obwohl alle Testverbindungen an Cys387 binden und die Enzymstruktur die Beweglichkeit einschränkt, bestehen leichte Unterschiede hinsichtlich der Lage des BTZ bzw. BOZ-Bicyclus' in den gezeigten Kristallstrukturen. Beispielsweise unterscheiden sich **AR86** und **IR95** in der Ausrichtung des ebenen, aromatischen Benzothiazinongerüsts bzw. Benzoxazinongerüsts um einen Winkel von  $15^\circ$  (Abbildung 59F), während sich die anderen drei Testverbindungen (**AR85**, **AR120**, **BTZ043 (AR182)**) zwischen diesen beiden extremen Orientierungen ausrichten. Die Ausrichtung der Hydroxyfunktion des Semimercaptals ist ebenso variabel, wobei jedoch immer eine Wasserstoffbrückenbindung zu dem Lys418 ausgebildet ist. Die Substituenten an Position 2 weisen nur wenige Interaktionen auf, hier sind verschiedene Konformationen des Proteins wahrscheinlich (Abbildung 59G).

Die Tabelle 10 gibt einen Überblick der nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen Inhibitor und Enzym nach kovalenter Bindung (Mindestabstand von 4.0 Å). Bemerkenswert sind einige bei den individuellen Hemmstoffen unterschiedliche Interaktionen, beispielsweise mit Trp230 (**IR95**, **AR86**), einer aromatischen Seitenkette in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum, und mit Leu317 (**BTZ043** (**AR182**), **AR85**, **AR86**), welches in einer flexiblen Helix gelegen ist (Aminosäuren 315-329), die das katalytische Zentrum von DprE1 nach außen überspannt. Die offensichtliche Ähnlichkeit der Enzym/Inhibitor Interaktionen steht im deutlichen Kontrast zu der unterschiedlichen Aktivität der eingesetzten Testverbindungen.

Tabelle 10. Übersicht zu den nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen BTZ/BOZ und DprE1 (x - nicht-kovalente Wechselwirkung, - keine nicht-kovalente Wechselwirkung)

Verbindung	BTZ043	IR95	AR120	AR86	AR85
Aminosäure	(AR182)				
Gly117	x	x	x	x	x
His132	x	x	x	x	x
Gly133	x	x	x	x	x
Lys134	x	x	x	x	x
Ser228	x	x	x	x	x
Trp230	-	x	-	x	-
Leu317	x	-	-	x	x
Gln336	x	-	x	x	x
Leu363	x	-	-	-	-
Val365	x	x	x	x	x
Lys367	x	x	x	x	x
Phe369	x	x	x	-	x
Asn385	x	x	x	x	x
Lys418	x	x	x	x	x
FAD	x	x	x	x	x

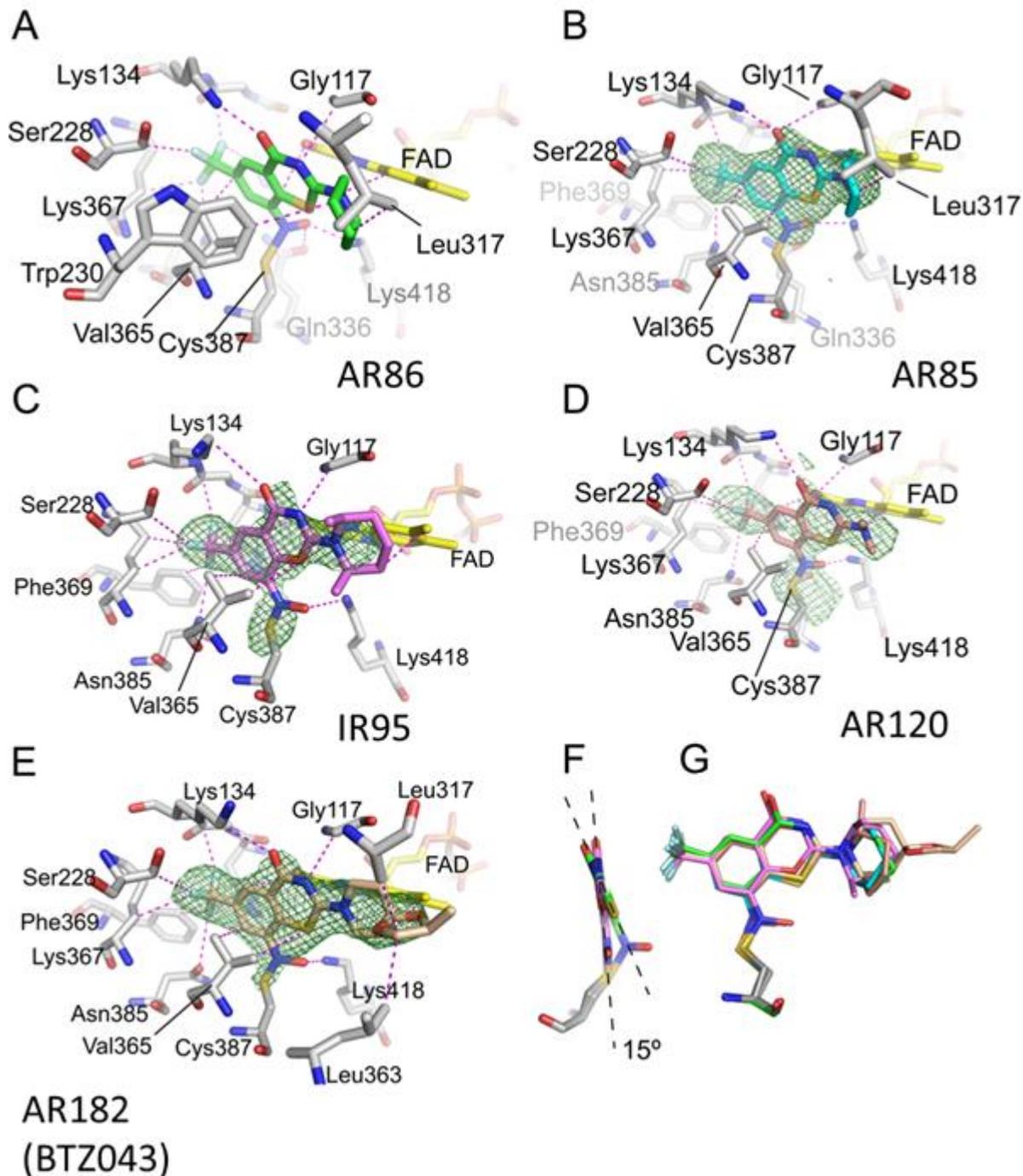


Abbildung 59. Kristallstrukturen von BTZs bzw. BOZs mit DprE1 (*M. tuberculosis*) und deren unterschiedliche Ausrichtung im aktiven Zentrum. (A)–(E) Kristallstrukturen und nicht-kovalente Wechselwirkungen (unterbrochene Linien in Magenta) zwischen BTZs/BOZ im aktiven Zentrum von DprE1 (Mindestabstand 4 Å). Die Kohlenstoffatome sind hellgrau (Protein), FAD gelb und die Inhibitoren entsprechend ihrer Identität eingefärbt. Die unkorrigierte Fo-Fc Dichte (Contour Level 3σ) in den Darstellungen B-E wurden nach DprE1-Strukturdaten vor Bindung eines

Liganden berechnet. In diese Koordinaten wurde die Struktur der Hemmstoffe eingebettet. In Darstellung **C** wurde Trp230 für eine bessere Übersichtlichkeit entfernt. **(F)** Vergleich der Orientierung des BTZ/BOZ Grundgerüsts von **AR86** und **IR95**. **(G)** Überlagerung von **AR86**, **AR85**, **AR120**, **IR95** und **BTZ043 (AR182)** nachdem die Proteinstrukturen nach ihrer Sekundärstruktur angeglichen wurden.

Den veröffentlichten DprE1 Strukturen sind zwei ungeordnete Aminosäuresequenzen gemeinsam (Aminosäuren 268-285 und 315-330) (Neres et al., 2012, Batt et al., 2012, Wang et al. 2013, Makarov et al., 2014). Diese Aminosäureschleifen bedecken, in Abhängigkeit von ihrer Konformation, das aktive Zentrum von DprE1. In bestimmten Fällen induziert die Bindung von BTZs/BOZs eine partielle Ordnung der Aminosäuresequenz 315-330 (Verbindungen **AR86**, **AR85** und **BTZ043 (AR182)**). In der Struktur von **BTZ043 (AR182)** ist nach Bindung an DprE1 eine Elektronendichte (unter 1.0 Sigma im Mittel) für die Aminosäuren 318-322 feststellbar. Mit dieser geringen Dichte ist es nicht möglich, die Konformation der Aminosäuresequenz exakt zu beschreiben, jedoch ermöglicht sie eine modellhafte Darstellung der Aminosäuren 318-322. In der Struktur von **BTZ043 (AR182)** (siehe Abbildung 59) wird ersichtlich, dass die Aminosäuren in der Sequenz 318-322 keine nicht-kovalenten Bindungen zum BTZ ausbilden, nachdem dieses kovalent an das Enzym gebunden hat.

Die stark ausgeprägten Aktivitätsunterschiede hinsichtlich der MHKs und  $IC_{50}$ -Werte, welche ausschließlich durch unterschiedliche Substituenten an Position 2 hervorgerufen werden, widersprechen der Annahme, dass nur die kovalente Bindung zu Cys387 und die konservierten nicht-kovalenten Bindungen Einfluss auf die Effektivität der Enzymhemmung besitzen, da dieser sich bei den getesteten BTZ-Derivaten nicht unterscheiden. Dabei ist zu bedenken, dass die Kristallstrukturen lediglich den Endpunkt der Hemmreaktion darstellen, welcher die nicht-kovalente Bindung der Hemmstoffe an das aktivierte Enzym ( $E_{Red}$ ) vorrausgeht. Während dieses Prozesses sind Wechselwirkungen mit der Aminosäuresequenz 315-330, welche in unmittelbarer Nähe zur Öffnung des aktiven Zentrums lokalisiert ist, wahrscheinlich von Bedeutung. Die Vermutung findet Bestätigung in der veröffentlichten Struktur der BTZ-ähnlichen Verbindung **CT319** (einem Nitrobenzamid), welche die Bindung der Nitro-Form als nicht-kovalenten Komplex im aktiven Zentrum von DprE1 zeigt, also den Augenblick vor der

Reduktionsreaktion abbildet. In dieser Struktur ist die Aminosäuresequenz 316-322 geordnet und kann dargestellt werden (Batt et al., 2012). Sie bildete eine  $\alpha$  Helix aus, welche das aktive Zentrum von DprE1 bedeckt und somit an der Stelle gelegen ist, an welcher auch der BTZ-Substituent in Position 2 lokalisiert ist (Batt et al., 2012). Es ist somit naheliegend, dass die Affinität zwischen BTZ/BOZ und DprE1 während der initialen Erkennung, welche der kovalenten Bindung vorausgeht (Abbildung 52), entscheidend durch den Substituenten an Position 2 bestimmt wird und somit die unterschiedliche Aktivität der BTZs differenziert.

Wie bereits von Dr. Rudolph (Rudolph, 2013) beschrieben, beeinflusst der Austausch von Schwefel gegen Sauerstoff an Position 1 (BOZ, **IR95**) den Bindungsmodus nicht (siehe Abbildungen 59C und 59D). Mit einem Sauerstoffatom an Position 1 ist der BOZ-Bicyclus planarer als die entsprechende BTZ-Struktur und der Carbonylsauerstoff ist im Vergleich zum BTZ leicht nach oben verschoben. Der identische kovalente Bindungsmodus von **AR120** und **IR95** steht im Kontrast zur schwächeren Aktivität der BOZs während des Enzymassays (in Bezug auf  $IC_{50}$ ) im Vergleich zu den analogen BTZs und zu ihren geringeren MHK-Werten. Wie bereits erwähnt, zeigen die Kristallstrukturen lediglich den Endpunkt der Hemmung, welcher nicht notwendig mit den bestimmten  $IC_{50}$ -Werten korreliert. Die Unterschiede von BTZs und BOZs hinsichtlich ihrer Effektivität in der DprE1-Hemmung wird also nicht durch finale Bindung, sondern durch die reversiblen Schritte vor der kovalenten Modifikation beeinflusst.

Der Bindungsmodus und die Orientierung des Nitroso-BTZs **AR86**, wie in Abbildung 59A gezeigt, entsprechen denen von Nitroso-BTZs, welche *in situ* d.h. im aktiven Zentrum von DprE1 aus Nitro-BTZs gebildet wurden.

**AR86** bindet auch in derselben Art und Weise wie **CT325** (Batt et al., 2012). Bei **CT325** handelt es sich um das Nitrosoderivat eines Nitrobenzamides, welches wegen seiner einfacheren synthetischen Zugänglichkeit als Modellverbindung genutzt wurde.

## 5.5 Vergleich zwischen DprE1-Hemmung und Wachstumshemmung im Zellassay

Im Folgenden wird die Aktivität, welche BTZs und BOZs am isolierten Enzym zeigen, mit deren *in vitro* MHKs verglichen (Tabelle 6). Wenn eine Testverbindung DprE1 effektiv hemmt, allerdings keinen Einfluss auf das mykobakterielle Wachstum hat, ist dies ein Hinweis auf schlechte Membranpermeabilität, Instabilität im Assaymedium oder raschen Metabolismus durch die Zielzelle. Erwartungsgemäß zeigen die 8-Nitro-BTZs die größte Aktivität in Enzym- und Bakterienzellassays gegen *M. vaccae* bzw. *M. tuberculosis*. Die unterschiedliche Aktivität der getesteten Verbindungen wird lediglich durch den Substituenten in Position 2 des BTZ-Bicyclus' hervorgerufen (Tabelle 6). Zusätzlich zu den beschriebenen hochwirksamen Referenzverbindungen **BTZ043 (AR182)** (Möllmann et al., 2009) und **PBTZ169 (AR77)** (Makarov et al., 2012) werden BTZs mit geringerer Aktivität für die Assays verwendet, um die Struktur-Wirkungsbeziehungen, die für hohe Aktivität verantwortlich sind, zu identifizieren.

**BTZ043 (AR182)** und **PBTZ169 (AR77)** hemmen das Targetenzym DprE1 am effektivsten, was sich auch in den hervorragenden MHKs von 2.3 nM bzw.  $\leq 0.04$  nM widerspiegelt. Die Aktivität von **AR120** im DprE1-Enzymassay ist ebenfalls sehr gut und erreicht fast die von **BTZ043 (AR182)**, doch die MHK gegen *M. tuberculosis* ist mit 800 nM bedeutend höher. Diese Beobachtung findet ihre Entsprechung in der *in vivo* Inaktivität von **AR120** in einem ultraschnellen Mausmodell (Rullas et al., 2010, Rudolph, 2013). Wie beschrieben (siehe Abschnitt 2.2) zeigen sowohl **BTZ043 (AR182)** als auch **PBTZ169 (AR77)** Aktivität in einem chronischen Mausmodell für Tuberkulose (Makarov et al., 2009, Makarov et al., 2014). Die beschriebenen Daten weisen darauf hin, dass nicht nur die Hemmung des Targetenzym DprE1 unter Assaybedingungen, sondern weitere Faktoren, wie beispielsweise Bioverfügbarkeit und metabolische Stabilität, für eine *in vivo* Wirksamkeit verantwortlich sind.

Auch wenn Nitroso-BTZs (**AR86**, **AR98**) DprE1 in derselben Weise hemmen wie ihre Nitro-Analoga zeigten sie sowohl im Enzym- wie auch in Bakterienzellassays eine geringere Aktivität. Der Aktivitätsverlust der Nitroso-BTZs ist höchstwahrscheinlich der ausgeprägten Reaktivität der Nitroso-Funktion gegenüber Nukleophilen und Redoxpartnern geschuldet, was aber nicht näher untersucht wurde.

Das Hydroxylamino-BTZ **AR85** zeigt bei der MHK-Bestimmung gegen *M. vaccae* eine vergleichsweise hohe MHK von 18.1  $\mu\text{mol/l}$ . In der Literatur ist eine MHK von 1.2  $\mu\text{mol/l}$  für **BTZ046**, das zu **BTZ043 (AR182)** analoge Hydroxylamin, beschrieben (Makarov et al., 2009). Deshalb war die gute Aktivität von **AR85** gegenüber DprE1 im Enzymassay überraschend (siehe Abbildung 56). Es ist wahrscheinlich, dass Eigenschaften wie Zellwandpermeabilität und metabolische Stabilität die begrenzenden Faktoren für die Aktivität im Zellaassay gegen *M. vaccae* sind. Die Hydroxylamin-Gruppe erhöht die Hydrophilie und kann Metallkationen komplexieren. Beide Eigenschaften wirken sich ungünstig auf die Zellwandpermeabilität aus. Eine Erklärung für die gute Aktivität am Enzym wird mit einem alternativen Wirkmechanismus in Abschnitt 5.2 gegeben.

Die BOZ-Derivate sind zwar die antimykobakteriell aktiv, die MHK ist allerdings deutlich erhöht, beispielsweise um Faktor 33 für das BOZ **AR125** im Vergleich zum analogen BTZ **AR196**. In Übereinstimmung mit veröffentlichten Daten über BOZs (Rudolph, 2013) ist das Schwefelatom nicht essentiell für die Aktivität, erhöht diese aber beträchtlich. Der DprE1-Hemmechanismus der BOZs ist dem der BTZs identisch.

Die Affinitäten der BTZs und BOZs gegen deren Target DprE1 konnten im Enzymassay bestimmt werden und sind in den  $k_{\text{inact}}/K_i$  Werten dargestellt (Tabelle 9). Auch wenn ein hoher  $k_{\text{inact}}/K_i$  Wert eine geringe MHK vermuten lässt, wie beispielsweise bei **BTZ043 (AR182)**, ist bei den BOZs keine generelle Korrelation zwischen den Daten der Enzymhemmung und der Wachstumshemmung in Zellaassays möglich.

## **5.6 Bestimmung der Löslichkeit von BTZs/BOZs mit Hilfe von CLND-Messungen**

Obwohl die Löslichkeit ein entscheidender Parameter für die Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffes ist, sind keine Löslichkeitsdaten für BTZs bzw. BOZs veröffentlicht. Für diese Arbeit ist die kinetische Löslichkeit verschiedener BTZ- und BOZ-Derivate mit Hilfe von CLND (Chemiluminescent Nitrogen Detection, siehe praktischer Teil) (Bhattachar et al., 2006) bestimmt worden. Die Tabelle 11 zeigt die - meist geringe - ermittelte Löslichkeit.

Tabelle 11. CLND Löslichkeit der getesteten BTZs und BOZs

Test- verbindung	Löslichkeit		Test- verbindung	Löslichkeit	
	[µg/ml]	[µmol/l]		[µg/ml]	[µmol/l]
<b>IR58</b>	>162	>449	<b>AR120</b>	34	87
<b>IR74</b>	4	11	<b>AR153</b>	49.1	92.2
<b>IR95</b>	48	128	<b>AR154</b>	5.6	11.6
<b>IR112</b>	>176	>513	<b>AR158</b>	5.7	11.8
<b>IR113</b>	>176	>509	<b>AR160</b>	3.00	5.24
<b>PBTZ169 (AR77)</b>	16	34	<b>AR162</b>	4.71	9.96
<b>AR79</b>	5	12	<b>AR164</b>	28.5	52.3
<b>AR81</b>	4	19	<b>AR168</b>	1.20	2.19
<b>AR85</b>	3	10	<b>AR172</b>	1.40	2.72
<b>AR86</b>	85	249	<b>AR175</b>	4.76	9.12
<b>AR98</b>	88	209	<b>BTZ043 (AR182)</b>	14	32
<b>AR106</b>	1.51	2.83	<b>AR187</b>	134	373
<b>AR112</b>	0.38	0.86			

Wie zu vermuten, hat der Substituent an Position 2 des BTZ-Grundgerüsts einen ausgeprägten Einfluss auf die Löslichkeit. Hydrophile Substituenten erhöhen die Löslichkeit in diesem Experiment. Unter den getesteten 8-Nitro-BTZs besitzt **IR58** eindeutig die größte Löslichkeit. Es ist in Position 2 mit einem relativ hydrophilen Morpholin substituiert. Das Piperidiny-BTZ **AR187** und Dimethylpiperidinanalogon **AR120** zeigen eine Abnahme der Löslichkeit, die durch zunehmende Lipophilie der Seitenkette verursacht wird. Der Chlor-Substituent von **IR74** in Position 7 senkt die Löslichkeit im Vergleich zu **AR187** drastisch. Auffällig ist, dass die aktivsten Verbindungen **PBTZ169 (AR77)** und **BTZ043 (AR182)** eine geringe Löslichkeit von ca. 30 µmol/l aufweisen, was eine wahrscheinliche Ursache für die schlechte Bioverfügbarkeit ist und somit die „Lücke“ zwischen der außergewöhnlichen *in vitro* Aktivität und der geringeren Potenz in *in vivo* Modellen erklärt (Makarov et al., 2014, Makarov et al., 2009). Die gut wirksamen BTZs **AR106** und **AR112** zeigen im Vergleich zu den Leitverbindungen eine um den Faktor 10 und mehr verringerte Löslichkeit.

Die Reihe der untersuchten Verbindungen mit einer Piperazinamid- bzw. Piperazinsulfonamid-Struktur ergab ein breites Spektrum an Löslichkeit. Beispielsweise sind **AR153** und **AR164** besser löslich (Löslichkeit von 92.2  $\mu\text{M}$  bzw. 52.3  $\mu\text{M}$ ) als **BTZ043/PBTZ169** (Löslichkeit von 32 bzw. 34  $\mu\text{M}$ ), wobei sie jedoch deutlich geringere Aktivität aufweisen. Hohe Wirksamkeit geht bei den gezeigten Verbindungen mit einer Zunahme der Lipophilie bzw. Abnahme der Löslichkeit einher. So zeigt das hochwirksame BTZ **AR175** mit 9.12  $\mu\text{M}$  eine verringerte Löslichkeit besitzt, die noch unter der von **BTZ043** (32  $\mu\text{M}$ ) liegt.

Eine verringerte Lipophilie und weniger aromatische Bereiche in der Molekülstruktur der BTZs sind Anforderungen an die Weiterentwicklung dieser Stoffklasse, wobei die hohe Aktivität gegen *M. tuberculosis* erhalten bleiben sollte.

Das Nitroso BTZ-**AR86** löst sich im Vergleich zum Nitroanalogon **AR187** etwas schlechter, wobei der Unterschied gering ist. Bei **AR98** und **BTZ043 (AR182)** zeigt sich durch den Austausch der Nitro- durch die Nitroso-Gruppe ein gegenteiliger Effekt - die Löslichkeit des Nitroso-BTZs ist erhöht. Die Hydroxylamino- (**AR85**) und Amino-BTZs (**AR81**) weisen mit 10 bzw. 19  $\mu\text{M}$  eine deutlich geringere Löslichkeit im Vergleich zum Nitroderivat auf.

Die Löslichkeit der getesteten BOZs ist im Vergleich zu den entsprechenden BTZ etwas erhöht, eine Ausnahme stellt dabei **AR79** dar, welches mit 12  $\mu\text{mol/l}$  deutlich schlechter löslich ist als das analoge BTZ **AR77 (PBTZ169)**.

Insgesamt ist festzuhalten, dass die Kombination von guter Wasserlöslichkeit und sehr hoher *in-vitro*-Aktivität ein Forschungsziel bei BTZs bleibt.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Die Wirkstoffklasse der 8-Nitro-BTZs wurde in den letzten Jahren etabliert. Die beiden Leitverbindungen **BTZ043** und **PBTZ169** stehen am Beginn ihrer klinischen Entwicklung. Die außergewöhnlich effektive Hemmung des Wachstums von *M. tuberculosis*, der Angriff an dem neuen Target DprE1 und die geringe Toxizität für eukaryotische Zellen machen Vertreter der BTZs zu innovativen Arzneistoffkandidaten.

Diese Arbeit leistet einen Beitrag zum besseren Verständnis der kovalenten DprE1-Hemmung, berichtet über die Entdeckung eines neuen Wirkungsmechanismus' am Target DprE1, fand ein BTZ mit einer neuen Ankergruppe am Target DprE1 und erweitert das verfügbare Spektrum (hoch)-wirksamer BTZs. Des Weiteren gelang es die synthetische Zugänglichkeit von 8-Nitro-BTZs und deren Derivaten zu erleichtern bzw. zu ermöglichen.

### 6.1 Grundlagenforschung zu kovalenter DprE1 Hemmung

Mittels der Durchführung von DprE1-Enzymassays mit einer Reihe kovalenter DprE1-Inhibitoren unterschiedlicher Aktivität ist das Verständnis der zeitabhängigen Enzymhemmung durch BTZs erweitert worden. Diese Daten werden durch verschiedene Röntgenkristallstrukturen und massenspektrometrische Untersuchungen ergänzt. Es konnten folgende Erkenntnisse gewonnen werden:

- 8-Hydroxylamino-BTZs sind kovalente DprE1-Inhibitoren, die durch einen in dieser Arbeit erstmals beschriebenen Mechanismus wirken.
- 8-Nitroso-BTZs hemmen DprE1 direkt: dies wurde erstmals in einem Enzymassay gegen DprE1 wie auch mittels Massenspektrometrie und Röntgenstrukturanalyse untersucht
- Die Ursache für die im Vergleich zu den MHKs hohen  $IC_{50}$  der 8-Nitro-BTZs liegt in dem langsamen Umsatz während des Enzymassays, sodass dieser nicht empfindlich genug ist, um nanomolare  $IC_{50}$  Werte abzubilden.

- Die durch Enzymassay und Röntgenkristallstrukturen ermittelten Daten zeigen, dass die initiale, nicht-kovalente Erkennung des 8-Nitro-BTZs durch DprE1 entscheidend für die Geschwindigkeit und Effizienz der Enzymhemmung ist.

## **6.2 BTZs als antimykobakterielle Wirkstoffe**

Von den im Verlauf der Arbeit hergestellten Verbindungen zeigen über 40 eine antimykobakterielle Wirksamkeit, meist handelt es sich dabei um 8-Nitro-BTZs. Somit konnte eine breite Auswahl an BTZs unterschiedlicher Aktivität beschrieben und charakterisiert werden. Folgende Ergebnisse bilden den Schwerpunkt dieses Arbeitsabschnittes:

- Synthese und Testung (MHK-Bestimmung gegen *M. vaccae* bzw. *M. tuberculosis*) von 8-Nitro-BTZs mit einer Vielzahl unterschiedlicher Substituenten in Position 2 des Benzothiazinonringsystems.
- Charakterisierung von zwei BTZs (**AR106** und **AR175**) mit außerordentlich hoher Aktivität gegen *M. tuberculosis* (MHK < 4 ng/ml).

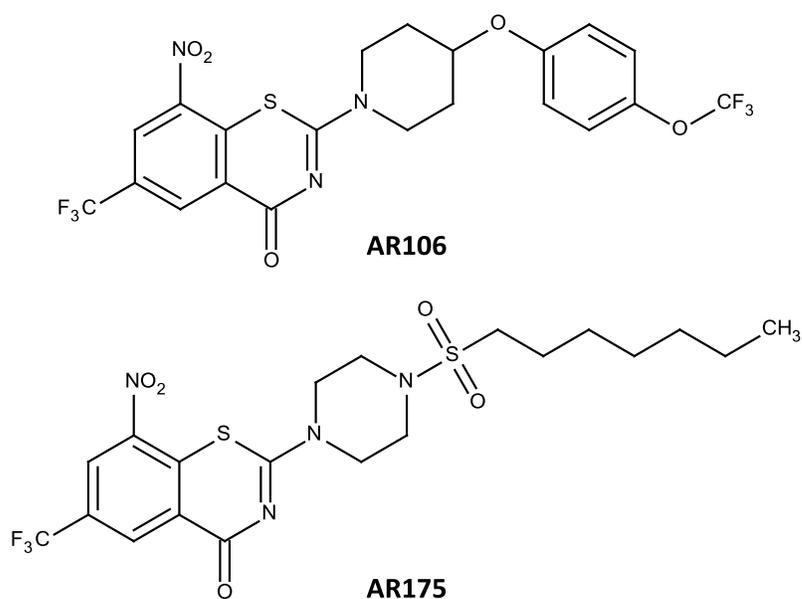


Abbildung 60. Strukturen der aktiven BTZ-Derivate **AR106** und **AR175**

- Bestimmung der kinetischen Löslichkeit von 25 BTZs mit Hilfe von CLND.
- Untersuchung der Stabilität von Benzothiazinonthionen im Kulturmedium, wodurch ein Stabilitätsproblem dieser Stoffklasse aufgezeigt werden konnte.
- Die erstmalige Beschreibung des antimykobakteriellen 8-Formyl-BTZs **AR138**, welches im Agardiffusionstest gegen *M. vaccae* Aktivität zeigt, die nicht durch den Nitroso-Mechanismus verursacht ist. Durch Wirksamkeit beruht mit hoher Wahrscheinlichkeit auf der nukleophilen Addition der Thiolgruppe des Cysteins in DprE1 an die elektronenarme Kohlenstoff-Sauerstoff-Doppelbindung der Aldehydfunktion.

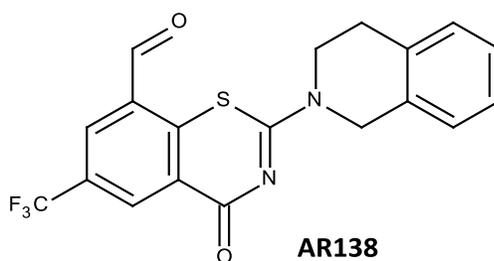


Abbildung 61. Struktur der antimykobakteriellen 8-Formyl-BTZs **AR138**

### 6.3 Synthese von BTZs und verwandten Verbindungen

Die chemische Zugänglichkeit stellt die Voraussetzung für die Beschreibung und Testung von neuen Substanzen dar. Einen substantziellen Anteil der Dissertationsschrift stellen das Erdenken und die praktische Umsetzung neuer Synthesestrategien dar. In untenstehender Aufzählung sind die wichtigsten Ergebnisse zusammengefasst:

- Optimierung des von Dr. Rudolph (Rudolph, 2013) entdeckten Thioharnstoffweges zur BTZ-Herstellung durch Einsatz von Thiocarbonyldiimidazol als Reagenz zur Darstellung von Thioharnstoffen aus sekundären Aminen (Methode C). Durch die erfolgreiche Optimierung ist der Thioharnstoffweg die effektivste und variabelste Synthese für BTZs, die bisher beschrieben ist.
- Erstmalige Synthese von 8-Nitroso-BTZs aus 8-Nitro-BTZs

- Erstmalige Synthese von Benzazazinonen aus dem entsprechenden Guanidin.
- Erstmalige Synthese von 8-Hydroxymehtyl, 8-Formyl-, 8-Cyano-, 8-Imido- und 8-Amido-BTZs
- Erstmalige Synthese von **BTZ043 (AR182)** über den Thioharnstoffweg, damit konnte ein Syntheseweg aufgezeigt werden, der ohne Schwefelkohlenstoff und Iodmethan auskommt und somit einfacher auf eine mögliche GMP Herstellung adaptierbar ist.

## **6.4 Ausblick**

Auch wenn die Leitverbindungen **BTZ043** und **PBTZ169** bereits auf dem Weg in die klinische Entwicklung sind, besitzen BTZs als kovalente DprE1-Inhibitoren noch großes Potential hinsichtlich Weiterentwicklung und Erforschung.

Eine Charakterisierung der neuen, hochwirksamen 8-Nitro-BTZs (**AR106** und **AR175**) hinsichtlich ihrer Pharmakokinetik und Pharmakodynamik *in vivo* ist wünschenswert, um ihre Eignung als Arzneistoffkandidaten im Vergleich zu Leitverbindungen bewerten zu können. Im Weiteren ist eine Optimierung der Verbindungen **AR106** und **AR175** insbesondere hinsichtlich der Löslichkeit aussichtsreich, da die beiden Substituenten in Position 2 des BTZ Grundgerüsts Möglichkeiten zur Derivatisierung bieten und die Zugänglichkeit von 8-Nitro BTZs durch diese Arbeit vereinfacht wurde.

Zusätzlich zu den bekannten 8-Nitro-BTZs, deren Nitroso-Form in der Lage ist, DprE1 kovalent zu hemmen, entfaltet das 8-Formyl-BTZ **AR138** antimykobakterielle Aktivität. Die Wirksamkeit ist mit großer Wahrscheinlichkeit durch kovalente DprE1-Hemmung, wie in Abbildung 45 gezeigt, verursacht. Zur Erhärtung dieser Hypothese steht an, die Reaktion zwischen 8-Formyl-BTZs und DprE1 in Enzymassays und durch Massenspektrometrie zu charakterisieren. In diesen Zusammenhang ist die Herstellung und Testung der analogen 8-Hydroxymehtyl- sowie der 8-Carboxyl-BTZs interessant. Es ist möglich, dass diese Verbindungen - analog zu 8-Hydroxylamino- bzw. 8-Nitro-BTZs - als „mechanism-based“ Inhibitoren von DprE1 wirken, indem sie von Enzym in die aktive 8-Formyl-Form umgewandelt werden. Dies ist ein innovativer Ansatz für die Entwicklung einer neuen Klasse kovalenter DprE1-Inhibitoren.

## **7 Experimenteller Teil**

### **7.1 Synthesen**

#### **7.1.1 Geräte und allgemeine Methoden**

##### **Chromatographie**

Für die Dünnschichtchromatographie werden ALUGRAM® SIL G/UV254-Platten der Firmen Merck oder Macherey-Nagel genutzt (beschichtet mit 0.20 mm Kieselgel 60). Detektion erfolgt mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge ( $\lambda = 254 \text{ nm}$  oder  $\lambda = 365 \text{ nm}$ ) oder durch eine Jodkammer.

Für die Säulenchromatographie ohne zusätzlichen Druck wird Kieselgel Geduran SI 60 (0.063-0.200 mm) verwendet.

Für die Produktreinigung mittels MPLC wird eine PuriFlash 430 von Interchim, Montluçon, Frankreich verwendet. Dabei werden vorgepackte Kieselgelsäulen mit unterschiedlichen Partikelgrößen (15-50  $\mu\text{m}$ ) und unterschiedlichen Kieselgelmengen (12-80 g), entsprechend dem Trennproblem, genutzt.

##### **Massenspektrometrie**

ESI Massen werden an einem LCQ-Classic-Spektrometer der Firma Thermo Finnigan gemessen. Dabei wird eine Kapillartemperatur von 220 °C, eine Spannung von 4.5 kV und ein Scanbereich von 50-2000 genutzt (positiver und negativer Modus). Der Vermessung der Proben erfolgte als methanolische Lösung.

APCI Massenspektren werden unter Verwendung eines Advion Expressio S Massenspektrometers erstellt. Die Vermessung erfolgt als methanolische Lösung der Testsubstanzen am ASAP Messkopf.

HRMS-Spektren (ESI als Ionisationsmethode) werden an einem Bruker Apex III 70e Fouriertransformations-Ionenzyklonresonanz Massenspektrometer vermessen.

### **Schmelzpunkt**

Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgt an einem Boëtius-Heiztischmikroskop. Es handelt sich um nicht korrigierte Schmelzpunkte bzw. Schmelzbereiche.

### **Elementaranalyse**

Zur Erstellung der Elementaranalyse wird ein LECO CHNS-932 Analysenautomat im automatischen Mikroverfahren genutzt.

### **Katalytische Hydrierung**

Für die katalytische Hydrierung fanden die Autoklaven der Serie 5500 oder der Serie 4790 der Firma Parr Instruments, Instrumental Company Verwendung.

### **NMR-Spektroskopie**

Die Messung der  $^1\text{H}$ - bzw.  $^{13}\text{C}$ -NMRs fand bei einer Temperatur von 25 °C statt. Dabei wurden folgende Geräte verwendet:

- VNMRS 400 (Agilent Technologies) mit 400 MHz Arbeitsfrequenz für  $^1\text{H}$ -NMR und 100 MHz für  $^{13}\text{C}$ -NMR
- INOVA 500 (Varian) mit 500 MHz Arbeitsfrequenz für  $^1\text{H}$ -NMR und 125 MHz für  $^{13}\text{C}$ -NMR

## **Allgemeine Synthesemethoden**

### **7.1.1.1 Allgemeine Methode 1 - Synthese von aromatischen Carbonsäurechloriden**

Die aromatische Carbonsäure wird in Toluol gelöst und nach Zugabe von  $\text{SOCl}_2$  (2 Äq.) für 2 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und das hergestellte Carbonsäurechlorid ohne weitere Aufarbeitung für den nächsten Reaktionsschritt verwendet.

### **7.1.1.2 Allgemeine Methode 2 - Synthese von Thioharnstoffen**

In einem Einhalskolben wird Thiocarbonyldiimidazol in THF gelöst, das in THF gelöste Amin zugegeben und die Reaktionsmischung 2 h bei RT gerührt, anschließend wird 1 h auf 55 °C erwärmt. Nach abgeschlossener Reaktion entfernt man 2/3 des THF Volumens unter Vakuum, gibt 2 M Ammoniak Lösung in MeOH (2-5 Äq. Ammoniak) zu und verschließt den Kolben gut. Nach 15 h Reaktion bei RT wird die Zugabe der 2 M Ammoniak (2-5 Äq. Ammoniak) Lösung wiederholt und der Ansatz 8 h auf 50 °C erwärmt. Das Lösungsmittel wird entfernt und der Thioharnstoff kann säulenchromatographisch oder durch Umkristallisation aus Isopropanol/Diisopropylether (1:1) gereinigt werden.

### **7.1.1.3 Allgemeine Methode 3 - Synthese von Benzothiazinonen nach der Thioharnstoffmethode**

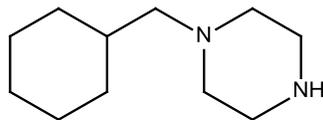
Der nach Methode 2 hergestellte Thioharnstoff wird in einem Mehrhalskolben in Toluol gegeben und die Suspension auf 70 °C erwärmt wobei sich der Thioharnstoff löst. Das Carbonsäurechlorid, hergestellt nach Methode 1, wird ebenfalls in Toluol gelöst und diese Lösung mittels eines Tropftrichter langsam zur warmen Lösung des Thioharnstoffes zugegeben. Nach vollständiger Zugabe des Säurechlorides erhitzt man das Reaktionsgemisch für 1 h unter Rückfluss und belässt es über Nacht bei RT. Das hergestellte Benzothiazinon kann säulenchromatographisch oder durch Umkristallisation aus Chloroform/Hexan (1:1) gereinigt werden.

### **7.1.1.4 Allgemeine Methode 4 - Synthese von Piperazinmonoamiden**

Piperazin (3-5 Äq.) und PyBOP® (1.15 Äq.) werden in DMF gelöst und langsam, mit Hilfe eines Tropftrichters, zu einer Lösung der entsprechenden Carbonsäure in DMF zugegeben. Der Reaktionsansatz wird über Nacht gerührt, anschließend das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und das hergestellte Piperazinmonoamid durch säulenchromatographische Aufarbeitung gereinigt.

## 7.1.2 Synthesevorschriften

### 7.1.2.1 1-(Cyclohexylmethyl)piperazin (AR75)



N-Formylpiperazin (1.32 ml, 12.8 mmol, 1.0 Äq.), Cyclohexylmethylbromid (1.97 ml, 14.1 mmol, 1.1 Äq.), KI (0.026 g, 0.18 mmol, 0.014 Äq.) und  $K_2CO_3$  (2.13 g, 15.4 mmol, 1.2 Äq.) werden in einem Rundkolben in 10 ml Acetonitril aufgenommen. Nach 23 h erhitzen unter Rückfluss wird der Reaktionsansatz filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt. Nach lösen des Rückstandes in 5 N NaOH Lösung (5.0 ml) und EtOH (9.3 ml), wird dieser 14 h unter Rückfluss erhitzt.

Nach abgeschlossener Reaktion wird das EtOH unter Vakuum entfernt, destilliertes Wasser zum Rückstand gegeben und dreimal mit DCM extrahiert. Die organischen Phasen werden gesammelt, über  $MgSO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt säulenchromatographisch mit dem Laufmittel Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 %. (9:1:0.1).

farbloses Öl, erstarrt im Kühlschrank

Ausbeute 1.83 g (79 %)

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  3.76 (bs, N-H, 1H), 2.95 (t,  $CH_2$ -N- $CH_2$ ,  $^3J=4.9$  Hz, 4H), 2.43 (bs,  $CH_2$ -N- $CH_2$ , 4H), 2.11 (d, N- $CH_2$ -CH,  $^3J=7.2$  Hz, 2H), 1.70 (m, Cyclohexyl, 5H), 1.46 (m,  $CH_2$ -CH-( $CH_2$ )<sub>2</sub>, 1H), 1.18 (m, Cyclohexyl, 3H), 0.86 (m, Cyclohexyl, 2H)

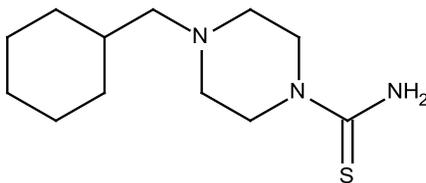
MS (ESI) 183.30 [ $M+H^+$ ]

$R_f$  0.69 (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 9:1:0.5)

$M_r$  182.31 g/mol

$C_{11}H_{22}N_2$

### 7.1.2.2 (4-(Cyclohexylmethyl)piperazin-1-thioharnstoff) (AR76)



Unter Argon wird in einem Rundkolben vorgetrocknetes NaSCN (0.46 g, 5.76 mmol, 1.0 Äq.) in Aceton (3.5 ml) suspendiert. Bei 5 °C erfolgt die Zugabe von Benzoylchlorid (0.661 ml, 5.76 mmol, 1.0 Äq.) langsam über eine Stunde, anschließend wird das Reaktionsgemisch 3.5 h gerührt. Es bildet sich ein weißer Niederschlag (NaCl).

Bei 12 °C wird das Cyclohexylmethylpiperazin (**AR75**) zugegeben (leichte Gelfärbung) und die Reaktion für 3.5 h bei RT belassen.

Nach entfernen des Lösungsmittels unter Vakuum wird der Rückstand in HCl 36 % aufgenommen, auf 95 °C erwärmt und 90 Min. auf dieser Temperatur gehalten. Zur Extraktion des Produktes wird mit Ammoniak Lsg. 36 % pH = 10 eingestellt und dreimal mit DCM extrahiert. Die organischen Phasen werden gesammelt, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt.

Der weitere Aufarbeitung erfolgt säulenchromatographisch mit dem Laufmittel Chlorform/MeOH/ Ammoniak Lsg. 36 % (98:2:0.5).

Ausbeute 226 mg (21 %)

#### Methode 2

Die Herstellung von **AR76** erfolgt nach der allgemeinen Methode 2, unter Verwendung von 3-Cyclohexylmethylpiperazin (**AR75**) (0.190 g, 1.04 mmol, 1 Äq.) und Thiocarbonyldiimidazol (0.214 g, 1.20 mmol, 1.15 Äq.). Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (LM Chloroform/MeOH 98:2).

Ausbeute 118 mg (52 %)

bräunlicher Feststoff

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.85 (m,  $\text{NH}_2$ , 2H), 3.83 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 4H), 2.47 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 4H), 2.17 (d,  $\text{N-CH}_2\text{-CH}$ ,  $^3J = 7.2$  Hz, 2H), 1.71 (m, cyclohexyl, 5H), 1.47 (m,  $\text{N-CH}_2\text{-CH}$ , 1H), 1.19 (m, cyclohexyl, 3H), 0.88 (m, cyclohexyl, 2H)

MS (ESI): 242.12 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]

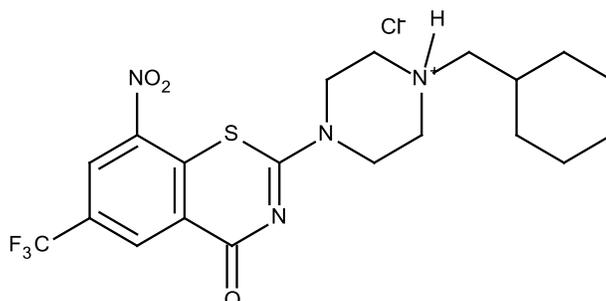
$R_f$  0.61 (Chloroform/MeOH 95:5)

$M_r = 241.40$  g/mol

Smp.: 167 °C

$\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{S}$

### 7.1.2.3 2-[4-(Cyclohexylmethyl)piperazin-1-yl]-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on hydrochlorid (AR77)



2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäurechlorid wird aus 2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR96**) (0.282 g, 1.04 mmol, 1.0 Äq.) nach der allgemeinen Methode 1 hergestellt. Die Synthese des Benzothiazinones erfolgt nach der allgemeinen Methode 3. Das ausgefallene Produkt (**AR77\*HCl**) wird abfiltriert und aus Aceton umkristallisiert.

leicht gelblicher Feststoff

Ausbeute 293 mg (68 %) als **AR77\*HCl**

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.09 (d, Ar-H,  $^4J = 2.0$ , 1H), 8.75 (d, Ar-H,  $^4J = 2.0$ , 1H), 3.98 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 4H), 2.56 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 4H), 2.20 (m, N- $\text{CH}_2\text{-CH}$ , 2H), 1.74 (m, cyclohexyl, 5H), 1.51 (m, N- $\text{CH}_2\text{-CH}$ , 1H), 1.22 (m, cyclohexyl, 3H), 0.89 (m, cyclohexyl, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.4, 162.0, 143.9, 134.1, 133.4 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.4$  Hz), 129.7 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 35.5$  Hz), 126.8, 126.0 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 122.4 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 273.1$  Hz), 65.1, 53.1, 46.6, 35.0, 31.7, 26.7, 26.0

ESI (MS) 457.18  $[\text{M}+\text{H}^+]$

HR MS 457.1512  $[\text{M}+\text{H}^+]$ , berechnet für  $[\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{F}_3\text{O}_3\text{S}]^+$  457.1521

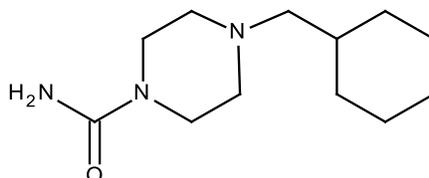
$R_f$  0.80 (TBME)

Smp.: 243 °C (Zersetzung als AR77-1\*HCl)

$M_r = 456.48$  g/mol (für  $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{F}_3\text{O}_3\text{S}$ )

$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{F}_3\text{O}_3\text{S}/\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{F}_3\text{O}_3\text{S}$

#### **7.1.2.4 4-(Cyclohexylmethyl)piperazin-1-harnstoff (AR78)**



Cyclohexylmethylpiperazin (0.500 g, 2.73, 2 Äq.) und Harnstoff (0.082 g, 1.37 mmol, 1 Äq.) werden in einen Kolben gegeben und 42 h auf 120 °C erhitzt (deutliche Braunfärbung).

Die Aufarbeitung des Rohproduktes erfolgte säuenchromatographisch mit dem Laufmittel Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % (95:5:1).

bräunlicher Feststoff

Ausbeute 308 mg (100 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.55 (m,  $\text{NH}_2$ , 2H), 3.37 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 4H), 2.36 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 4H), 2.11 (d, N- $\text{CH}_2\text{-CH}$ ,  $^3J = 7.0$  Hz, 2H), 1.70 (m, cyclohexyl, 5H), 1.47 (m, N- $\text{CH}_2\text{-CH}$ , 1H), 1.18 (m, cyclohexyl, 3H), 0.86 (m, cyclohexyl, 2H)

MS (ESI) 226.14  $[\text{M}+\text{H}^+]$

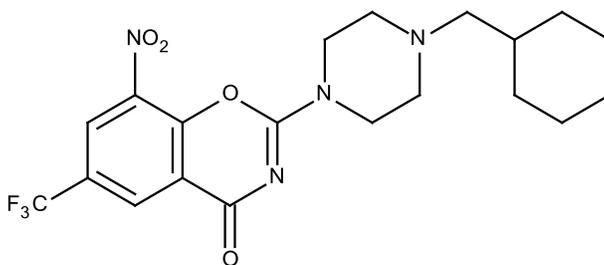
R<sub>f</sub> 0.42 (Chloroform/MeOH/ Ammoniak Lsg. 36 % 95:5:1)

Smp.: 150-151 °C

M<sub>r</sub> = 225.33 g/mol

C<sub>12</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O

### **7.1.2.5 2-[4-(Cyclohexylmethyl)piperazin-1-yl]-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzoxazin-4-on (AR79)**



2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäurechlorid wird aus 2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR96**) (0.266 g, 0.98 mmol, 1.0 Äq.) nach der allgemeinen Methode 1 hergestellt.

Das Carbonsäurechlorid wird in Toluol aufgenommen (5 ml) und langsam in eine Lösung von 4-(cyclohexylmethyl)piperazin-1-harnstoff (**AR78**) (0.200 g, 0.89 mmol, 0.9 Äq.) und Hünig Base (0.499 ml, 2.94 mmol, 3 Äq.) in Toluol bei 70 °C getropft. Nach 1 h Rückfluss kühlte die Reaktion über Nacht ab. Die Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch mit dem Laufmittel Chloroform/MeOH (98:2).

gelblich-weißer Feststoff

Ausbeute 162 mg (41 %)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.58 (d, Ar-H, <sup>4</sup>J = 2.3, 1H), 8.45 (d, Ar-H, <sup>4</sup>J = 2.2, 1H), 3.81 (m, CH<sub>2</sub>-N-CH<sub>2</sub>, 4H), 2.41 (m, CH<sub>2</sub>-N-CH<sub>2</sub>, 4H), 2.06 (m, N-CH<sub>2</sub>-CH, 2H), 1.60 (m, cyclohexyl, 5H), 1.38 (m, N-CH<sub>2</sub>-CH, 1H) 1.08 (m, cyclohexyl, 3H), 0.75 (m, cyclohexyl, 2H)

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.0, 155.2, 148.6, 136.2, 131.0 (q, <sup>3</sup>J<sub>C,F</sub> = 3.8 Hz), 127.5 (q, <sup>2</sup>J<sub>C,F</sub> = 35.3 Hz), 127.0 (q, <sup>3</sup>J<sub>C,F</sub> = 3.8 Hz), 122.1 (q, <sup>1</sup>J<sub>C,F</sub> = 273.3 Hz), 120.3, 65.1, 53.0, 52.5, 45.2, 44.7, 34.9, 31.7, 26.6, 26.0

MS (ESI) 441.20 [M+H<sup>+</sup>]

HR MS 441.1740 [M+H<sup>+</sup>], berechnet für [C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup> 441,1749

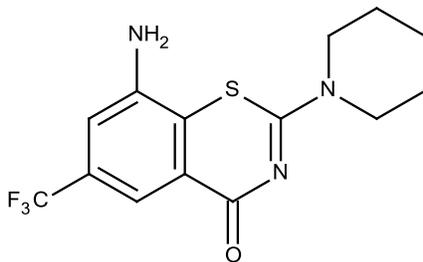
R<sub>f</sub> 0.82 (TBME)

Smp.: 199-201 °C

M<sub>r</sub> = 440.42 g/mol

C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>

### **7.1.2.6 8-Amino-2-(piperidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on** **(AR81)**



Zu einer Lösung von 8-Nitro-2-(piperidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (**AR187**) (0.500 g, 1.4 mmol, 1 Äq.) in 25 ml THF wird unter Schutzgas Pd/C Katalysator und Hydrazin Lösung 20 % (2.5 ml) gegeben. Nach 3 h bei RT wird das Reaktionsgemisch für 2 h unter Rückfluss erhitzt. Der Katalysator wird über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Die Aufarbeitung erfolgt säulenchromatographisch mit Chloroform/MeOH 95:5 als Laufmittel.

schmutzig gelber Feststoff

Ausbeute 240 mg (52 %)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.66 (d, <sup>4</sup>J = 1.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.18 (d, <sup>4</sup>J = 1.9 Hz, 1H, Ar-H), 5.99 (m, 2H, NH<sub>2</sub>), 3.82 (m, 4H, cyclohexyl), 1.63 (m, 6H, cyclohexyl)

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 167.9, 160.3, 145.6, 128.3 (q, <sup>2</sup>J<sub>C,F</sub> = 32.0 Hz), 124.5 (q, <sup>1</sup>J<sub>C,F</sub> = 272.4 Hz), 123.8, 120.6, 113.1, 112.0, 47.3, 25.8, 24.3

MS (ESI) 330.27 [M+H<sup>+</sup>]

HR MS 330.0882 [M+H<sup>+</sup>], berechnet für [C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>OS]<sup>+</sup> 330.0888, 352.0702 [M+Na<sup>+</sup>] berechnet für [C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>OSNa]<sup>+</sup> 352.0707

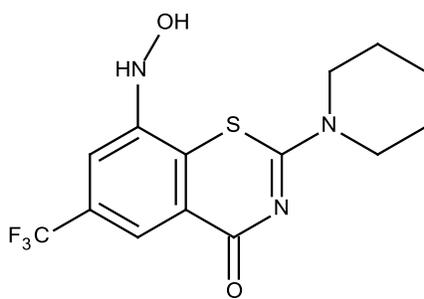
R<sub>f</sub> 0.33 (Chloroform/MeOH 99:1)

Smp.: 312-316 °C (unter Zersetzung)

M<sub>r</sub> = 329.34 g/mol

C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>OS

### **7.1.2.7 8-(Hydroxyamino)-2-(piperidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR85)**



Zu einer Lösung von 8-Nitro-2-(piperidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (**AR187**) (0.05 g, 0.14 mmol, 1.0 Äq.) in THF (5 ml) wird unter Schutzgas eine Lösung von NaH<sub>2</sub>PO<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (0.08 g, 0.35 mmol, 5.0 Äq.) in Wasser (5 ml) gegeben. Nun erfolgt die Zugabe von Pd/C Katalysator bei 0 °C (Eisbad). Das Reaktionsgemisch wird langsam auf 40 °C erwärmt (Bildung eines weißen Niederschalges).

Nach abgeschlossener Reaktion wird ausreichend EtAc zugegeben um den weißen Niederschalge zu lösen. Die organische Phase wird dreimal mit Wasser gewaschen und der Palladium Aktivkohlekatalysator durch Filtration über Celite entfernt. Die EtAc Phase wird anschließend über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Der weißliche, feste Rückstand wird mit Aceton gewaschen, um Verunreinigungen zu entfernen.

weißer Feststoff

Ausbeute 30 mg (63 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8.95 (s, 1H, OH), 8.87 (s, 1H, NH), 7.90 (s, 1H, Ar-H), 7.51 (s, 1H, Ar-H), 3.81 (m, 4H, H-cyclohexyl), 1.65 (m, 6H, H-cyclohexyl)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  167.1, 160.3, 148.4, 128.4 (q,  $^2J_{\text{C,F}}=32.4$  Hz), 124.4 (q,  $^1J_{\text{C,F}}=272.3$  Hz), 123.4, 122.9, 116.8, 110.8, 47.3, 25.8, 24.2

MS (ESI) 346.21  $[\text{M}+\text{H}^+]$ , 368.13  $[\text{M}+\text{Na}^+]$

HR MS 346.0827  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , berechnet für  $[\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2\text{S}]^+$  346.0832

$R_f$  0.81 (FM TBME)

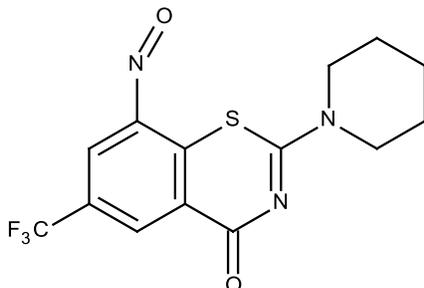
Smp.: 219-225 °C (unter Zersetzung)

$M_r = 345.34$  g/mol

$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$

### 7.1.2.8 8-Nitroso-2-(piperidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on

#### (AR86)



Zu einer Lösung von  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.129 g, 0.48 mmol, 5.3 Äq.) in Wasser (20 ml) wird das in EtOH (40 ml) gelöste 8-(Hydroxyamino)-2-(piperidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (**AR85**) (0.030 g, 0.09 mmol, 1 Äq.) tropfenweise zugegeben.

Nach abgeschlossener Reaktion (2-3 h bei RT) wird die wässrige Phase mit EtAc dreimal extrahiert, die organischen Phasen vereinigt und über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet.

Nach einengen der vereinigten organischen Phasen unter Vakuum, kann das Produkt säulenchromatographisch (LM TBME) gereinigt werden.

intensiv gelber Feststoff

Ausbeute 21 mg (70 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  9.10 (d,  $^4J = 2.0$  Hz, 1H, Ar-H), 8.18 (d,  $^4J = 2.0$  Hz, 1H, Ar-H), 3.98 (m, 4H, H-cyclohexyl), 1.79 (m, 6H, H-cyclohexyl)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  166.0, 162.1, 158.9, 133.3, 132.8, 129.6 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 34.3$  Hz), 125.3, 122.8 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 272.8$  Hz), 121.9, 47.9, 25.9, 24.3

MS (ESI) 344.12  $[\text{M}+\text{H}^+]$

HR MS 344.0673  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , berechnet für  $[\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2\text{S}]^+$  344.0675

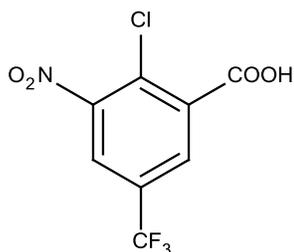
$R_f$  0.58 (LM TBME)

Smp.: 123-126 °C

$M_r = 343.32$  g/mol

$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$

### **7.1.2.9 2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (AR96)**



In 65.0 ml Schwefelsäure 98 % (1215.0 mmol, 50 Äq.) werden unter Eiskühlung 2-Chlor-5-(trifluormethyl)-benzonitril (5.00 g, 24.3 mmol, 1 Äq.) gelöst. Darauf erfolgte die Zugabe von 25.5 ml rauchender Salpetersäure (607.5 mmol, 25 Äq.) tropfenweise bei einer Temperatur von 15 °C über den Zeitraum von 1 h. Nach Erhitzen auf 100 °C für 1 h wird das Reaktionsgemisch unter Kühlung auf Eis gegossen. Nachdem die nitrosen Gase (brauner Rauch) unter dem Abzug entwichen sind, kann das Produkt abfiltriert und mit kaltem Wasser gewaschen werden.

weißer Feststoff

Ausbeute 6.21 g (95 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.07 (s, Ar-H, 1H), 8.32 (s, Ar-H, 1H)

$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  164.2, 149.6, 135.6, 129.6 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.6$  Hz), 128.7 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 34.2$  Hz), 127.1, 123.9 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.6$  Hz), 122.2 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 273.3$  Hz)

MS (ESI) 268.2 [M-H]<sup>-</sup>

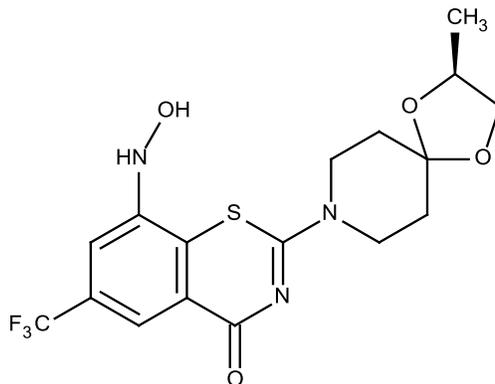
$R_f$  0.28 (Toluol/EtOH 1:1)

Smp.: 175-178 °C

$M_r = 269.56$  g/mol

$\text{C}_8\text{H}_3\text{ClF}_3\text{NO}_4$

### 7.1.2.10 8-(Hydroxyamino)-2-{2-methyl-1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]decan-8-yl}-6(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-o (AR97)



Zu einer Lösung von 2-[(2S)-2-Methyl-1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]decan-8-yl]-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (**AR182/BTZ043**) (0.02 g, 0.05 mmol, 1.0 Äq.) in THF (4 ml) wird unter Schutzgas eine Lösung von  $\text{NaH}_2\text{PO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0.028 g, 0.25 mmol, 5.0 Äq.) in Wasser (4 ml) gegeben. Im Anschluss erfolgt die Zugabe von Pd/C Katalysator bei 0 °C, unter Kühlung durch ein Eisbad. Das Reaktionsgemisch wird langsam auf RT erwärmt und nach 1 h ist die Reaktion abgeschlossen.

Der Reaktionsansatz wird mit Wasser verdünnt (20 ml) und der Pd/C Katalysator durch Filtration über Celite entfernt. Die wässrige Phase wird dreimal mit EtAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen unter Vakuum eingeeengt.

Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung zu 2-{2-Methyl-1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]decan-8-yl}-8-nitroso-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (**AR98**) umgesetzt.

Ausbeute 0.016 g (79 %, Rohprodukt)

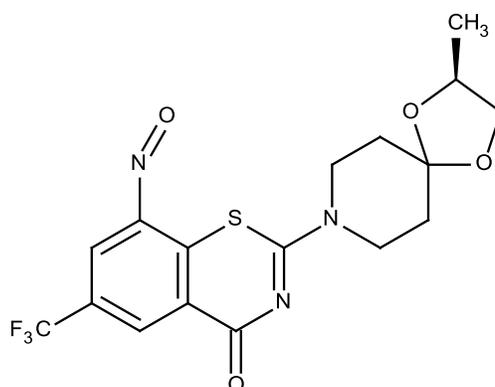
MS (ESI): 416.30 [M-H<sup>+</sup>]

R<sub>f</sub> 0.44 (LM TBME)

M<sub>r</sub> = 417.40 g/mol

C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S

### **7.1.2.11 2-{2-Methyl-1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]decan-8-yl}-8-nitroso-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR98)**



Zu einer Lösung von FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (0.06 g, 0.22 mmol, 5.5 Äq.) in Wasser (4 ml) wird, das in EtOH (7 ml) gelöste 8-(Hydroxyamino)-2-{2-methyl-1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]decan-8-yl}-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (**AR97**) (0.016 g, 0.04 mmol, 1Äq., Rohprodukt) tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 5 h bei RT gerührt.

Nach abgeschlossener Reaktion wird die wässrige Phase mit EtAc dreimal extrahiert. Nach einengen der vereinigten organischen Phasen, kann das Produkt (**AR98**) säulenchromatographisch (LM TBME) gereinigt werden.

intensiv gelber Feststoff

Ausbeute 11 mg (66 %)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.11 (d, <sup>4</sup>J = 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 8.20 (d, <sup>4</sup>J = 1.8 Hz, 1H, Ar-H), 4.30 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 4.15 (m, 4H, H-cyclohexyl), 4.13 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.51 (m, 1H, CH), 1.88 (m, 4H, H-cyclohexyl), 1.32 (d, <sup>3</sup>J = 6.1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>)

$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.1, 162.4, 158.8, 133.4, 132.6, 129.8 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 35.9$  Hz), 125.1, 123.5 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 273.1$  Hz), 122.1, 106.4, 72.5, 70.9, 44.8, 36.4, 35.2, 18.3

MS (ESI) 416.21  $[\text{M}+\text{H}^+]$

HR MS  $m/z$  416.0883  $[\text{M}+\text{H}^+]$ , calc. for  $[\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4\text{S}]^+$  416.0886

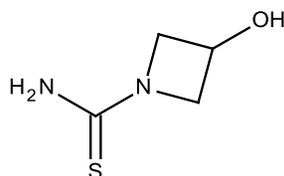
$R_f$  0.60 (LM TBME)

Smp.: 62-67 °C

$M_r = 415.39$  g/mol

$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$

### 7.1.2.12 3-Hydroxyazetidin-1-thioharnstoff (AR99)



Die Herstellung von **AR99** erfolgt nach der allgemeinen Methode 2, unter Verwendung von 3-Hydroxyazetidin\*HCl (0.100 g, 0.92 mmol, 1 Äq.) und Thiocarbonyldiimidazol (0.189 g, 1.06 mmol, 1.15 Äq.). Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (Chloroform/MeOH 95:5).

farblose, amorphe Substanz

Ausbeute 45 mg (37 %)

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  4.51 (m, CH, 1H), 4.27 (bs,  $\text{CH}_2$ , 2H), 3.85 (bs,  $\text{CH}_2$ , 2H)

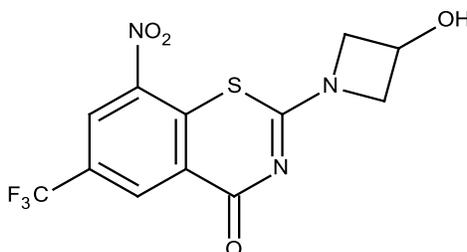
$R_f$  0.20 (Chloroform/MeOH 95:5)

MS (APCI) 133.1  $[\text{M}+\text{H}^+]$

$M_r = 132.18$  g/mol

$\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{OS}$

**7.1.2.13 2-(3-Hydroxyazetidin-1-yl)-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR100)**



2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäurechlorid wird aus 2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR96**) (0.045 g, 0.16 mmol, 1.1 Äq.) nach der allgemeinen Methode 1 hergestellt.

Die Herstellung von **AR100** erfolgt nach der allgemeinen Methode 3, unter Verwendung von 3-hydroxyazetidin-1-thioharnstoff (**AR99**) (0.020 g, 0.15 mmol, 1 Äq.)

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (Chloroform/MeOH 9:1).

gelber Feststoff

Ausbeute 18 mg (35 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.99 (s, Ar-H, 1H), 8.87 (s, Ar-H, 1H), 4.78 (bs, CH, 1H), 4.60 (bs,  $\text{CH}_2$ , 2H), 4.14 (m,  $\text{CH}_2$ , 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  166.7, 162.9, 144.0, 134.6, 132.1, 128.7 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 35.3$  Hz), 126.2, 125.8, 122.7 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 271.8$  Hz), 61.7, 61.5, 60.0

MS (ESI) 348.09  $[\text{M}+\text{H}^+]$

HR MS 348.0260  $[\text{M}+\text{H}^+]$ , berechnet für  $[\text{C}_{12}\text{H}_9\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4\text{S}]^+$  348.0266, 370.0079  $[\text{M}+\text{Na}^+]$  berechnet für  $[\text{C}_{12}\text{H}_8\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4\text{SNa}]^+$  370.0085

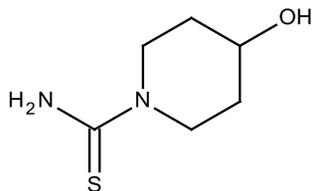
$R_f$  0.45 (Chloroform/MeOH 9:1)

Smp.: 179-183 °C

$M_r = 347.27$  g/mol

$\text{C}_{12}\text{H}_8\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$

### 7.1.2.14 4-hydroxypiperidin-1-thioharnstoff (AR102)



Die Herstellung von **AR102** erfolgt nach der allgemeinen Methode 2, unter Verwendung von 3-Hydroxypiperidin (0.285 g, 2.82 mmol, 1 Äq.) und Thiocarbonyldiimidazol (0.580 g, 3.25 mmol, 1.15 Äq.). Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (Chloroform/MeOH 9:1).

weißer Feststoff

Ausbeute 206 mg (52 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.41 (m, cyclohexyl, 1H), 4.09 (m, cyclohexyl, 1H), 3.66 (m, cyclohexyl, 1H), 3.33 (m, cyclohexyl, 1H), 3.14 (m, cyclohexyl, 1H), 1.98 (m, cyclohexyl, 1H), 1.80 (m, cyclohexyl, 1H), 1.51 (m, cyclohexyl, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  181.1, 65.6, 54.3, 32.2, 22.3

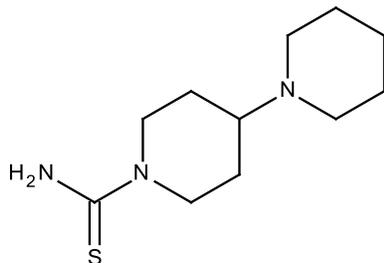
MS (ESI) 159.15  $[\text{M-H}^+]$

$R_f$  0.54 (Chloroform/MeOH 9:1)

$M_r = 160.24 \text{ g/mol}$

$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{OS}$

### 7.1.2.15 4-(Piperidin-1-yl)piperidin-1-thioharnstoff (AR103)



Die Herstellung von **AR103** erfolgt nach der allgemeinen Methode 2, unter Verwendung von 4-(Piperidin-1-yl)piperidin (0.100 g, 0.59 mmol, 1 Äq.) und Thiocarbonyldiimidazol (0.121 g, 0.68 mmol, 1.15 Äq.). Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (LM Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 90:10:1).

amorphe, farblose Substanz

Ausbeute 24 mg (18 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.76 (s,  $\text{NH}_2$ , 2H), 4.53 (s,  $\text{CH}$ , 1H), 3.06 (m, cyclohexyl, 2H), 2.51 (m, cyclohexyl, 5H), 1.88 (m, cyclohexyl, 2H), 1.60 (m, cyclohexyl, 7H), 1.43 (m, cyclohexyl, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  181.3, 61.7, 50.2, 47.8, 27.4, 26.1, 24.5

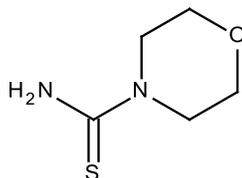
MS (ESI) 228.13 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]

$R_f$  0.52 (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 90:10:1)

$M_r = 227.36 \text{ g/mol}$

$\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{S}$

### 7.1.2.16 Morpholin-4-thioharnstoff (AR104)



Die Herstellung von **AR104** erfolgt nach der allgemeinen Methode 2, unter Verwendung von Morpholin (0.450 g, 5.17 mmol, 1 Äq.) und Thiocarbonyldiimidazol (1.058 g, 5.94 mmol, 1.15 Äq.). Das Rohprodukt wird durch Umkristallisation aus Isopropanol/Diisopropylether (1:1) aufgearbeitet.

weißer Feststoff

Ausbeute 515 mg (68 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  3.80 (m,  $\text{CH}_2$ , 4H), 3.67 (m,  $\text{CH}_2$ , 4H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  181.7, 65.9, 47.4 (unter LM. Peak)

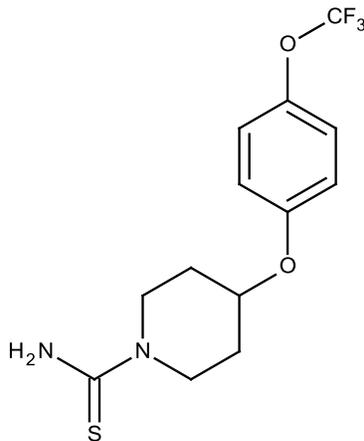
MS (ESI) 146.98 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]

$R_f$  0.58 (Chloroform/MeOH 9:1)

$M_r = 146.21$  g/mol

$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{OS}$

### 7.1.2.17 4-[4-(Trifluormethoxy)phenoxy]piperidin-1-thioharnstoff (AR105)



Die Herstellung von **AR105** erfolgt nach der allgemeinen Methode 2, unter Verwendung von 4-[4-(Trifluormethoxy)phenoxy]piperidin (0.100 g, 0,38 mmol, 1 Äq.) und Thiocarbonyldiimidazol (0.078 g, 0.44 mmol, 1.15 Äq.). Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (Chloroform/MeOH 9:1).

weißer Feststoff

Ausbeute 68 mg (56 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.18 (m, Ar-H, 2H), 7.03 (m, Ar-H, 2H), 4.65 (m, C-H, 1H), 4.05 (m, cyclohexyl, 2H), 3.82 (m, cyclohexyl, 2H), 2.01 (m, cyclohexyl, 2H), 1.78 (m, cyclohexyl, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  180.7, 156.0, 142.4, 122.2, 116.7, 71.7, 48.2, 29.9

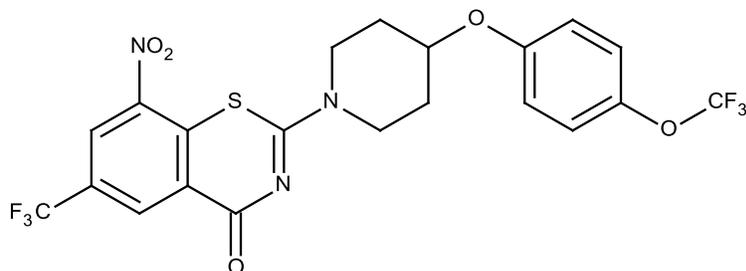
MS (ESI) 319.15 [ $\text{M-H}^+$ ]

$R_f$  0.38 (Chloroform/MeOH 9:1)

$M_r = 320.33$  g/mol

$\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$

**7.1.2.18 8-Nitro-2-{4-[4-(trifluormethoxy)phenoxy]piperidin-1-yl}-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR106)**



2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäurechlorid wird aus 2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR96**) (0.049 g, 0.18 mmol, 1.1 Äq.) nach der allgemeinen Methode 1 hergestellt.

Die Herstellung von **AR106** erfolgt nach der allgemeinen Methode 3, unter Verwendung von 4-[4-(Trifluormethoxy)phenoxy]piperidin-1-thioharnstoff (**AR105**) (0.050 g, 0.16 mmol, 1 Äq.)

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (Chloroform/MeOH 95:5).

beige farbener Feststoff

Ausbeute 52 mg (60 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.10 (d, Ar-H,  $^4J = 1.6$  Hz, 1H), 8.75 (d, Ar-H,  $^4J = 1.6$  Hz, 1H), 7.17 (m, Ar-H, 2H), 6.93 (m, Ar-H, 2H) 4.68 (m, C-H, 1H), 4.51 (bs, cyclohexyl, 1H), 3.98 (m, cyclohexyl, 3H), 2.06 (s, cyclohexyl, 4H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.5, 161.9, 155.2, 143.9, 143.3, 134.0, 133.4, 129.7 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 36.4$  Hz), 126.7, 126.0, 122.4 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 272.8$  Hz), 120.5 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 255.6$  Hz), 116.8, 70.8, 42.9, 30.3

MS (ESI) 536.10  $[\text{M}+\text{H}^+]$

HR MS 536.0707  $[\text{M}+\text{H}^+]$ , berechnet für  $[\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{F}_6\text{N}_3\text{O}_5\text{S}]^+$  536.0715, 558.0534  $[\text{M}+\text{Na}^+]$

berechnet für  $[\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{F}_6\text{N}_3\text{O}_5\text{SNa}]^+$  558.0527

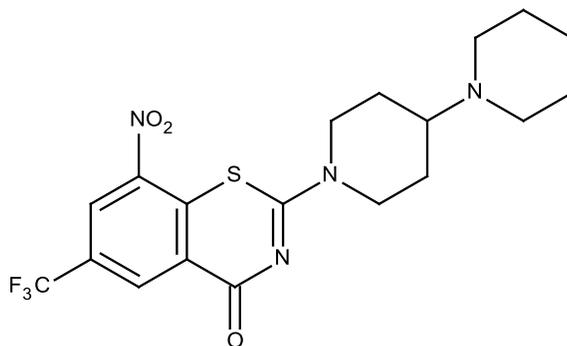
$R_f$  0.63 (LM Chloroform/MeOH 95:5)

Smp.: 175-177 °C

$M_r = 535.40$  g/mol

$\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{F}_6\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$

### 7.1.2.19 8-Nitro-2-[4-(piperidin-1-yl)piperidin-1-yl]-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR107)



2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäurechlorid wird aus 2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR96**) (0.024 g, 0.09 mmol, 1.1 Äq.) nach der allgemeinen Methode 1 hergestellt.

Die Herstellung von **AR107** erfolgt nach der allgemeinen Methode 3, unter Verwendung von 4-(piperidin-1-yl)piperidin-1-thioharnstoff (**AR103**) (0.018 g, 0.08 mmol, 1 Äq.).

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 98:2:1).

gelber Feststoff

Ausbeute 20 mg (57 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.10 (d, Ar-H,  $^4J = 1.6$  Hz, 1H), 8.74 (d, Ar-H,  $^4J = 1.6$  Hz, 1H), 5.22 (bs, cyclohexyl, 1H), 4.42 (bs, cyclohexyl, 1H), 3.18 (m, cyclohexyl, 2H), 2.65 (m, CH, 1H), 2.52 (m, cyclohexyl, 4H), 2.03 (m, cyclohexyl, 2H), 1.63 (m, cyclohexyl, 6H), 1.45 (m, cyclohexyl, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.5, 161.6, 143.9, 134.2, 133.3, 129.6 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 35.1$  Hz), 126.7, 125.9, 126.0, 122.4 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 273.1$  Hz), 61.8, 50.3, 46.1 28.1 26.2, 24.5

MS (ESI) 443.07  $[\text{M}+\text{H}^+]$

HR MS 443.1357  $[\text{M}+\text{H}^+]$ , berechnet für  $[\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{S}]^+$  443.1365, 465.1176  $[\text{M}+\text{Na}^+]$

berechnet für  $[\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{SNa}]^+$  465.1184

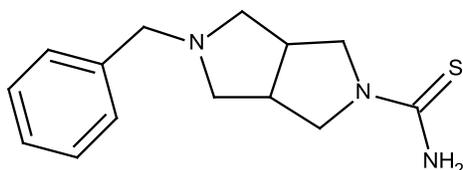
$R_f$  0.28 (LM Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 98:2:1)

Smp.: 175-178 °C

$M_r = 442.46 \text{ g/mol}$

$C_{19}H_{21}F_3N_4O_3S$

### **7.1.2.20 5-Benzyl-octahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2-thioharnstoff (AR109)**



Die Herstellung von **AR109** erfolgt nach der allgemeinen Methode 2, unter Verwendung von 2-Benzyl-octahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol (0.100 g, 0,49 mmol, 1 Äq.) und Thiocarbonyldiimidazol (0.101 g, 0.57 mmol, 1.15 Äq.). Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (Chloroform/MeOH 98:2).

weißer Feststoff

Ausbeute 58 mg (45 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.28 (m, Ar-H, 5H), 5.67 (bs,  $\text{NH}_2$ , 2H), 3.87 (bs, Octahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol, 2H), 3.59 (s,  $\text{CH}_2$ , 2H), 3.42 (bs, Octahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol, 2H), 2.94 (bs, Octahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol, 2H), 2.60 (m, Octahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol, 2H), 2.53 (m, Octahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol, 2H)

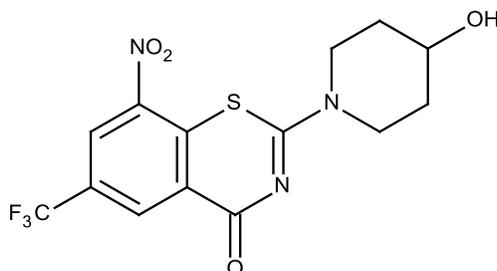
MS (ESI) 262.12 [ $\text{M-H}^+$ ]

$R_f$  0.51 (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 98:2:1)

$M_r = 261.39 \text{ g/mol}$

$C_{14}H_{19}N_3S$

### 2.1.2.21 2-(4-Hydroxypiperidin-1-yl)-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR110)



2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäurechlorid wird aus 2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR96**) (0.168 g, 0.63 mmol, 1.0 Äq.) nach der allgemeinen Methode 1 hergestellt.

Die Herstellung von **AR110** erfolgt nach der allgemeinen Methode 3, unter Verwendung von 4-Hydroxypiperidin-1-thioharnstoff (**AR102**) (0.100 g, 0.63 mmol, 1 Äq.).

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (Chloroform/MeOH 9:1) und aus EtAc/Hexan (1:1) umkristallisiert.

gelber Feststoff

Ausbeute 120 mg (51 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.06 (d, Ar-H,  $^4J = 1.6$  Hz, 1H), 8.74 (s, Ar-H, 1H), 4.05 (m, cyclohexyl, OH, 5H), 2.66 (s, CH, 1H), 2.02 (m, cyclohexyl, 2H), 1.82 (m, cyclohexyl, 1H), 1.68 (m, cyclohexyl, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.7, 162.9, 143.9, 134.3, 133.2, 129.6 (q,  $^2J_{C,F} = 35.9$  Hz), 126.5, 126.0, 122.3 (q,  $^1J_{C,F} = 273.1$  Hz), 65.9, 52.9, 47.5, 31.9, 22.0

MS (ESI) 374.17 [M-H<sup>+</sup>]

HR MS 376.0575 [M+H<sup>+</sup>], berechnet für  $[\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4\text{S}]^+$  376.0579

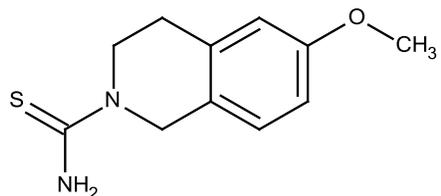
$R_f$  0.60 (Chloroform/MeOH 9:1)

Smp.: 162-164 °C

$M_r = 375.32$  g/mol

$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$

### 7.1.2.22 6-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-thioharnstoff (AR111)



Die Herstellung von **AR111** erfolgt nach der allgemeinen Methode 2, unter Verwendung von 6-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin (**AR205**) (0.358 g, 2.20 mmol, 1 Äq.) und Thiocarbonyldiimidazol (0.450 g, 2.52 mmol, 1.15 Äq.). Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (LM Chloroform/MeOH 95:5).

weißer Feststoff

Ausbeute 339 mg (62 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.08 (m, Ar-H, 1H), 6.79 (m, Ar-H, 2H), 4.83 (m,  $\text{CH}_2$ , 2H, z.T. unter Lsgm. Signal), 3.95 (m,  $\text{CH}_2$ , 2H), 3.79 (s,  $\text{CH}_3$ , 3H), 2.91 (t,  $\text{CH}_2$ ,  $^2J = 5.9$  Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  181.1, 158.4, 136.7, 127.6, 126.1, 113.4, 112.8, 55.5, 49.1, 45.4, 28.8

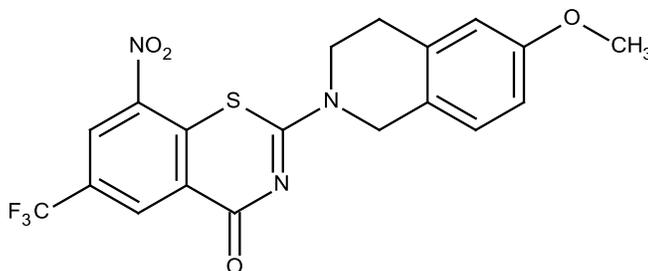
MS (ESI) 438.13 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ], 459.96 [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ]

$R_f$  0.39 (LM Chloroform/MeOH 95:5)

$M_r = 222.31$  g/mol

$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{OS}$

**7.1.2.23 2-(6-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR112)**



2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäurechlorid wird aus 2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR96**) (0.399 g, 1.49 mmol, 1.1 Äq.) nach der allgemeinen Methode 1 hergestellt.

Die Herstellung von **AR112** erfolgt nach der allgemeinen Methode 3, unter Verwendung von 6-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-thioharnstoff (**AR111**) (0.300 g, 1.35 mmol, 1 Äq.).

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (Chloroform/MeOH 99:1).

hellgelber Feststoff

Ausbeute 545 mg (92 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.13 (d, Ar-H,  $^4J = 1.6$  Hz, 1H), 8.76 (d, Ar-H,  $^4J = 1.6$  Hz, 1H), 7.14 (d, Ar-H,  $^3J = 8.4$  Hz, 1H), 6.81 (m, Ar-H, 1H), 6.75 (s, Ar-H, 1H), 5.01 (m,  $\text{CH}_2$ , 2H), 4.15 (m,  $\text{CH}_2$ , 2H), 3.80 (s,  $\text{CH}_3$ , 3H), 3.02 (m,  $\text{CH}_2$ , 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.1, 162.3, 159.0, 143.9, 134.2, 133.5, 129.7 (q,  $^2J_{\text{CF}} = 36.2$  Hz), 127.7, 126.9, 126.0, 122.4 (q,  $^1J_{\text{CF}} = 272.8$  Hz), 113.0, 55.4, 47.8, 44.5, 29.0

MS (ESI) 438.13 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ], 459.96 [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ]

HR MS 438.0735 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ], berechnet für  $[\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4\text{S}]^+$  438.0735, 460.0553 [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ]

berechnet für  $[\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4\text{S Na}]^+$  460.0555

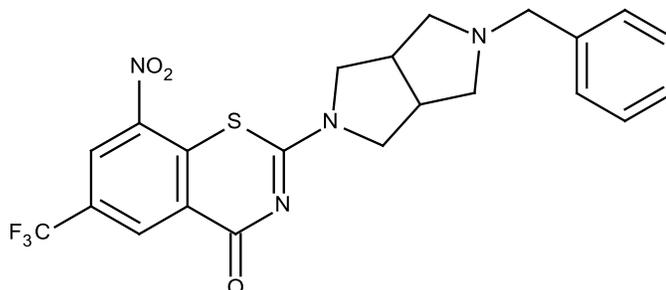
$R_f$  0.78 (Chloroform/MeOH 99:1)

Smp.: 228-230 °C

$M_r = 437.39$  g/mol

$\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$

**7.1.2.24 2-{5-Benzyl-octahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2-yl}-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR115)**



2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäurechlorid wird aus 2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR96**) (0.045 g, 0.17 mmol, 1.1 Äq.) nach der allgemeinen Methode 1 hergestellt.

Die Herstellung von **AR115** erfolgt nach der allgemeinen Methode 3, unter Verwendung von 5-Benzyl-octahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2-thioharnstoff (**AR109**) (0.040 g, 0.15 mmol, 1 Äq.).

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (Chloroform/MeOH 98:2).

hellgelber Feststoff

Ausbeute 50 mg (69 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.15 (s, Ar-H, 1H), 8.76 (s, Ar-H, 1H), 7.28 (m, Ar-H, 5H), 4.18 (m, Octahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol, 1H), 3.94 (m, Octahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol, 2H), 3.62 (bs,  $\text{CH}_2$ , 2H), 3.60 (m, Octahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol, 1H), 3.11 (bs, Octahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol, 1H), 2.99 (bs, Octahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol, 1H), 2.70 (m, Octahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol, 2H), 2.58 (m, Octahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol, 2H),

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165.9, 159.8, 143.6, 138.4, 134.6, 133.7 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 129.6 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 35.8$  Hz), 128.5, 128.4, 127.2, 126.8, 125.8 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 122.4 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 273.1$  Hz), 59.7, 59.6, 59.1, 56.3, 53.3, 41.8, 40.0

MS (ESI) 477.09 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ], 499.02 [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ]

HR MS 477.1206 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ], berechnet für  $[\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{S}]^+$  477.1208

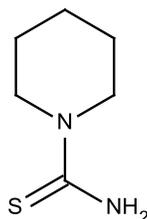
$R_f$  0.63 (Chloroform/MeOH 98:2)

Smp.: 124-125 °C

$M_r = 476.47 \text{ g/mol}$

$C_{22}H_{19}F_3N_4O_3S$

### **7.1.2.25 Piperidin-1-thioharnstoff (AR116)**



Die Herstellung von **AR116** erfolgt nach der allgemeinen Methode 2, unter Verwendung von Piperidin (1.000 g, 11.74 mmol, 1 Äq.) und Thiocarbonyldiimidazol (2.406 g, 13.50 mmol, 1.15 Äq.). Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (LM Chloroform/MeOH 98:2).

weißer Feststoff

Ausbeute 723 mg (43 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  3.78 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 4H), 1.67 (m,  $\text{CH}_2$ , 2H), 1.61 (m,  $\text{CH}_2$ , 4H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  180.0, 48.8, 25.3, 23.7

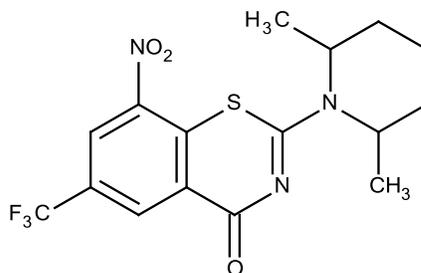
MS (ESI) 145.09 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]

$R_f$  0.28 (LM Chloroform/MeOH 98:2)

$M_r = 144.24 \text{ g/mol}$

$C_6H_{12}N_2S$

**7.1.2.26 2-(2,6-Dimethylpiperidin-1-yl)-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR120)**



2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäurechlorid wird aus 2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR96**) (0.500 g, 1.86 mmol, 1.0 Äq.) nach der allgemeinen Methode 1 hergestellt.

Das 2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäurechlorid wird in Aceton (5 ml) gelöst und zu einer Suspension von KSCN (0.181 g, 1.86 mmol, 1.0 Äq.) in Aceton (10 ml) bei 5 °C unter Schutzgas zu getropft. Das Reaktionsgemisch wird 2 h bei einer Temperatur von 5-10 °C gerührt. Anschließend wird Dimethylpiperidin (0.210 g, 1.86 mmol, 1 Äq.) in Aceton (5 ml) gelöst und über einen Tropftrichter zugegeben. Nach abgeschlossener Zugabe wird die Temperatur für weitere 2 h bei 5-10 °C gehalten.

Anschließend wird Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Reaktionsprodukt säulenchromatographisch aufgearbeitet (DCM).

beige farbener Feststoff

Ausbeute 340 mg (47 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.09 (s, Ar-H, 1H), 8.73 (s, Ar-H, 1H), 5.48, (bs, CH-CH<sub>3</sub>, 1H), 4.61 (bs, CH-CH<sub>3</sub>, 1H), 1.95 (m, CH<sub>2</sub>, 1H), 1.77 (bs, CH-CH<sub>3</sub>, 4H), 1.66 (bs, CH-CH<sub>3</sub>, 1H), 1.41 (bs, CH-CH<sub>3</sub>, 6H)

MS (ESI) 388.4 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]

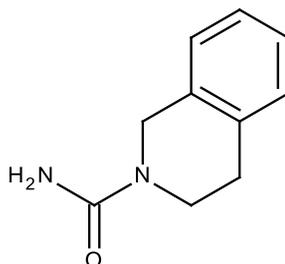
$R_f$  0.17 (DCM)

Smp.: 133-135 °C

$M_r$  = 387.38 g/mol

$\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$

### 7.1.2.27 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-2-harnstoff (AR122)



Tetrahydroisochinolin (1.000 g, 7.51 mmol, 2 Äq.) und Harnstoff (0.225 g, 3.76 mmol, 1 Äq.) in werden einen Kolben gegeben und 42 h auf 120 °C erhitzt (deutliche Braunfärbung).

Die Aufarbeitung des Rohproduktes erfolgt durch Umkristallisation aus Chloroform/Hexan (1:1).

brauner Feststoff

Ausbeute 479 mg (72 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  7.13 (m, Ar-H, 4H), 6.00 (bs,  $\text{NH}_2$ , 2H), 4.45 (s, N- $\text{CH}_2$ , 2H), 3.50 (t, N- $\text{CH}_2$ ,  $^3J = 5.9$  Hz, 2H), 2.74 (t,  $\text{CH}_2$ ,  $^3J = 5.9$  Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  158.5, 135.2, 134.7, 129.0, 126.6, 126.4, 45.7, 41.5, 28.7

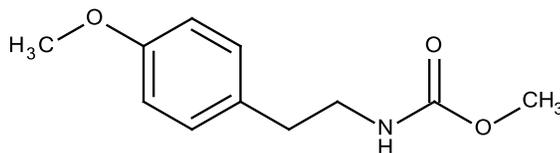
MS (APCI) 177.1 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]

$R_f$  0.29 (Chloroform/MeOH 95:5)

$M_r = 176.22$  g/mol

$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$

### 7.1.2.28 N-[2-(4-Methoxyphenyl)ethyl]carbamat (AR123)



In einem Rundkolben werden 4-Methoxyphenylethylamin (2.000 g, 13.2 mmol, 1 Äq.) und Triethylamin (1.603 g, 15.8 mmol, 1.2 Äq.) in THF (60 ml) gelöst. Der Ansatz wird auf 0 °C gekühlt und unter Schutzgas gesetzt, darauf erfolgt die Zugabe von

Chlorameisensäuremethylester (6.399 g, 67.7 mmol, 5.1 Äq.) langsam mittels Tropftrichter. Das Reaktionsgemisch wird für 24 h bei RT belassen.

Nach abgeschlossener Reaktion erfolgt die Zugabe von Wasser (8 ml), die wässrige Phase wird anschließend dreimal mit Diethylether extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen werden mit 1 N HCl, Wasser und Brine gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene Produkt kann ohne weitere Aufarbeitung verwendet werden.

weißer Feststoff

Ausbeute 2548 mg (92 %)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.10 (d, Ar-H, <sup>3</sup>J = 8.6 Hz, 2H), 6.85 (d, Ar-H, <sup>3</sup>J = 8.6 Hz, 2H), 4.67 (bs, NH, 1H), 3.79 (s, O-CH<sub>3</sub>, 3H), 3.65 (s, O-CH<sub>3</sub>, 3H), 3.39 (bs, CH<sub>2</sub>-Ar, 2H), 2.74 (t, NH-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz, 2H)

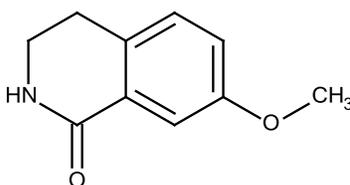
MS (APCI) 210.1 [M+H<sup>+</sup>]

R<sub>f</sub> 0.78 (Chloroform/MeOH 99:1)

M<sub>r</sub> = 209.24 g/mol

C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>

### **7.1.2.29 7-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-1-on (AR124)**



In 14.4 ml 145 °C heiße Polyphosphorsäure wird N-[2-(4-Methoxyphenyl)ethyl]carbamate (**AR123**) (2.548 g, 12.19 mmol, 1 Äq.) gegeben, dabei tritt eine sofortige Schwarzfärbung auf. Das Reaktionsgemisch wird für 10 Minuten bei 145 °C gehalten und anschließend auf Eiswasser gegossen. Die wässrige Phase wird sechsmal mit 20 ml DCM extrahiert, die organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Das Rohprodukt wird aus EtAc/Hexan (1:1) umkristallisiert und säulenchromatographisch aufgereinigt (LM EtAc).

amorpher farbloser Stoff

Ausbeute 88 mg (4 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.57 (d, Ar-H,  $^3J = 2.7$  Hz, 1H), 7.15 (s, NH, 1H), 7.10 (d, Ar-H,  $^3J = 8.2$  Hz, 1H), 6.99 (dd, Ar-H,  $^3J = 8.2$  Hz,  $^4J = 2.7$  Hz, 1H), 3.83 (s,  $\text{CH}_3$ , 3H), 3.53 (dt, NH- $\text{CH}_2$ ,  $^3J = 6.7$  Hz, 2H), 2.90 (t,  $\text{CH}_2$ ,  $^3J = 6.7$  Hz,  $^2J = 2.7$  Hz, 2H)

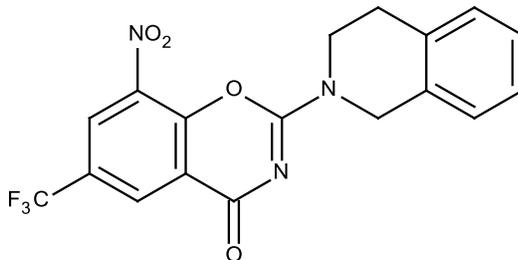
MS (ESI) 178.05 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]

$R_f$  0.25 (LM EtAc)

$M_r = 177.20$  g/mol

$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_2$

### **7.1.2.30 8-Nitro-2-(1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzoxazin-4-on (AR125)**



2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäurechlorid wird aus 2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR96**) (0.337 g, 1.25 mmol, 1.25 Äq.) nach der allgemeinen Methode 1 hergestellt.

Das Carbonsäurechlorid wird in Toluol aufgenommen (5 ml) und langsam in eine Lösung von 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-2-harnstoff (**AR122**) (0.200 g, 1.13 mmol, 1.0 Äq.) und Hünig-Base (0.438 ml, 3.39 mmol, 3 Äq.) in Toluol bei 70 °C getropft. Nach 1 h Rückfluss kühlt die Reaktion über Nacht ab und das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt. Die Aufreinigung erfolgt säuenchromatographisch mit dem Laufmittel Chloroform. Anschließend wird das Reaktionsprodukt in EtAc/Hexan (1:1) umkristallisiert.

gelblich-weißer Feststoff

Ausbeute 227 mg (58 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.74 (s, Ar-H, 1H), 8.61 (s, Ar-H, 1H), 7.23 (m, Ar-H, 4H), 5.03 (d,  $\text{CH}_2$ ,  $^2J = 8.0$  Hz, 2H), 4.13 (m,  $\text{CH}_2$ , 2H), 3.80 (s,  $\text{CH}_3$ , 3H), 3.06 (m,  $\text{CH}_2$ , 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  163.1, 162.9, 155.6, 155.5, 148.6, 136.3, 133.8, 133.4, 131.3, 131.1 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 130.9, 128.7, 128.4, 127.6, 127.5 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 36.2$  Hz), 127.4, 127.1, 127.0 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 126.9, 126.5, 126.4, 122.2 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 272.8$  Hz), 120.3, 47.1, 46.4, 43.6, 42.8, 28.6, 28.0

MS (APCI) 392.2  $[\text{M}+\text{H}^+]$

HR MS 392.0858  $[\text{M}+\text{H}^+]$ , berechnet für  $[\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4]^+$  392.0858

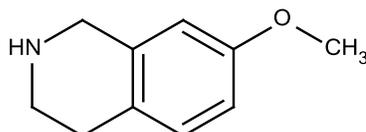
$R_f$  0.41 (Chloroform)

Smp.: 231-232 °C

$M_r = 391.30$  g/mol

$\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4$

### **7.1.2.31 7-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin (AR128)**



Zu einer Lösung von 7-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-1-on (**AR124**) (0.227 g, 1.28 mmol, 1 Äq.) in trockenem THF (6 ml) werden bei 0 °C (Schutzgas) 1.32 ml 1 M  $\text{LiAlH}_4$  (1.32 mmol, 1.03 Äq.) Lösung in THF zugegeben. Nach zwei Stunden erhitzen unter Rückfluss wird die Reaktion durch Zugabe von 2.2 ml Wasser und 2.2 ml 3 N NaOH Lösung beendet.

Die entstandene Suspension wird filtriert und der Filtrationsrückstand mit zweimal mit 6 ml Aceton und zweimal mit 6 ml Diethylether gewaschen. Das Filtrat wird teilweise unter Vakuum eingengt und mit 3 N HCl sauer eingestellt. Nachdem die saure Lösung zweimal mit Ether gewaschen wurde, wird der pH-Wert mit KOH (Feststoff) auf 11 eingestellt. Die basische wässrige Lösung wird fünfmal mit Ether extrahiert, diese organischen Phasen gesammelt, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt.

Die weitere Aufarbeitung erfolgt säulenchromatographisch (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 98:2:1).

weißer Feststoff

Ausbeute 73 mg (35 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.98 (d, Ar-H,  $^3J = 8.4$  Hz, 1H), 6.70 (dd, Ar-H,  $^3J = 8.2$  Hz,  $^4J = 2.5$  Hz, 1H), 6.54 (d, Ar-H,  $^4J = 2.5$  Hz, 1H), 5.95 (bs,  $\text{NH}_2$ , 2H), 3.96 (bs,  $\text{CH}_2$ , 2H), 3.75 (s,  $\text{CH}_3$ , 3H), 3.10 (t,  $\text{CH}_2$ ,  $^3J = 5.9$  Hz, 2H), 2.71 (t,  $\text{CH}_2$ ,  $^3J = 5.9$  Hz, 2H), 2.34 (bs, NH, 1H)

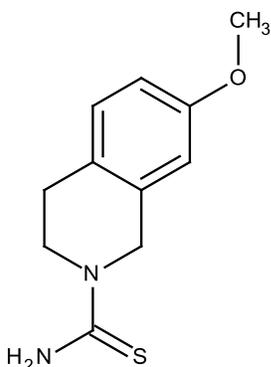
MS (ESI) 164.04 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]

$R_f$  0.16 (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 98:2:1)

$M_r = 163.22$  g/mol

$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}$

### **7.1.2.32 7-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-thioharnstoff (AR129)**



Die Herstellung von **AR129** erfolgt nach der allgemeinen Methode 2, unter Verwendung von 7-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin (**AR128**) (0.073 g, 0.45 mmol, 1 Äq.) und Thiocarbonyldiimidazol (0.092 g, 0.51 mmol, 1.15 Äq.). Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (LM Chloroform/MeOH /Ammoniak Lsg. 36 % 98:2:1).

weißer Feststoff

Ausbeute 76 mg (76 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.08 (d, Ar-H,  $^3J = 8.4$  Hz, 1H), 6.77 (dd, Ar-H,  $^3J = 8.2$  Hz,  $^4J = 2.5$  Hz, 1H), 6.71 (d, Ar-H,  $^4J = 2.5$  Hz, 1H), 5.95 (bs,  $\text{NH}_2$ , 2H), 4.89 (bs,  $\text{CH}_2$ , 2H), 3.90 (bs,  $\text{CH}_2$ , 2H), 3.77 (s,  $\text{CH}_3$ , 3H), 2.88 (t,  $\text{CH}_2$ ,  $^3J = 5.9$  Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  181.4, 158.4, 128.9, 126.6, 113.3, 111.4, 55.4, 49.9, 46.3, 28.0

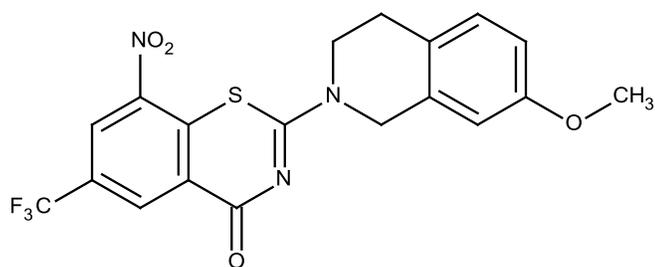
MS (ESI) 221.25  $[\text{M-H}^+]$

$R_f$  0.29 (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 98:2:1)

$M_r = 222.31$  g/mol

$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{OS}$

### 7.1.2.33 2-(7-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR130)



2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäurechlorid wird aus 2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR96**) (0.026 g, 0.10 mmol, 1.1 Äq.) nach der allgemeinen Methode 1 hergestellt.

Die Herstellung von **AR130** erfolgt nach der allgemeinen Methode 3, unter Verwendung von 7-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-thioharnstoff (**AR129**) (0.020 g, 0.09 mmol, 1 Äq.).

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (Chloroform/MeOH 98:2) und aus EtAc/Hexan (1:1) umkristallisiert.

gelber Feststoff

Ausbeute 14 mg (36 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.14 (s, Ar-H, 1H), 8.77 (s, Ar-H, 1H), 7.13 (d, Ar-H,  $^3J = 8.4$  Hz, 1H), 6.82 (d, Ar-H,  $^3J = 8.4$  Hz, 1H), 6.77 (s, Ar-H, 1H), 5.05 (m,  $\text{CH}_2$ , 2H), 4.16 (m,  $\text{CH}_2$ , 2H), 3.81 (s,  $\text{CH}_3$ , 3H), 3.00 (m,  $\text{CH}_2$ , 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.1, 162.4, 158.7, 143.9, 134.1, 133.6 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 129.8 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 35.1$  Hz), 129.0, 126.9, 126.3, 126.0 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 121.4 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 273.9$  Hz), 113.8, 111.3, 55.4, 48.4, 45.0, 28.0

MS (APCI) 438.2 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]

HR MS 438.0731 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ], berechnet für  $[\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4\text{S}]^+$  438.0735

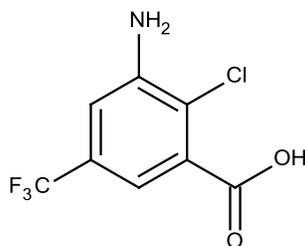
$R_f$  0.72 (Chloroform/MeOH 98:2)

Smp.: 204-206 °C

$M_r = 437.39$  g/mol

$\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$

### **7.1.2.34 3-Amino-2-chlor-5-(trifluormethyl)benzoesäure (AR131)**



2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR96**) (4.500 mg, 16.7 mmol) werden in 150 ml EtAc gelöst und nach Zusatz von Pd/C Katalysator für 48 h bei 4 bar hydriert. Nach abgeschlossener Reaktion wird der Katalysator abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt kann ohne weitere Aufreinigung verwendet werden.

brauner Feststoff

Ausbeute 3960 mg (98 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.20 (d, Ar-H,  $^4J = 2.2$  Hz, 1H), 7.08 (d, Ar-H,  $^4J = 2.2$  Hz, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  166.9, 144.4, 132.8, 129.1 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 32.8$  Hz), 123.5 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 271.6$  Hz), 120.9, 115.7, 114.5

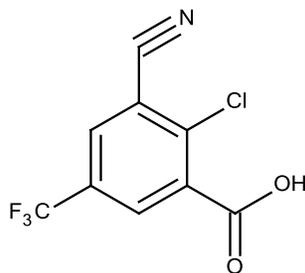
MS (ESI) 238.03 [ $\text{M}-\text{H}^+$ ]

$R_f$  0.38 (Chloroform/MeOH 9:1 mit 1 % Essigsäure)

$M_r = 239.58$  g/mol

$C_8H_5ClF_3NO_2$

### **7.1.2.35 2-Chlor-3-cyano-5-(trifluormethyl)benzoesäure (AR132)**



3-Amino-2-chlor-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR131**) (452 mg, 1.89 mmol, 1 Äq.) wird in 2.64 ml 2 N HCl bei 0 °C suspendiert. Zu dieser Suspension erfolgt Zugabe von  $NaNO_2$  gelöst in 0.9 ml Wasser (133 mg, 1.92 mmol, 1.02 Äq.) tropfenweise über 15 Minuten. Das Reaktionsgemisch wird für weitere 20 Minuten unter Eiskühlung gerührt und langsam zu einer 60 °C warmen Lösung von KCN (646 mg, 9.92 mmol, 5.25 Äq.) und CuCl (234 mg, 2.36 mmol, 1.25 Äq.) in 2 ml Wasser gegeben. Nach weiteren 15 Minuten wird der pH-Wert mit 2 N HCl auf 1 eingestellt und das Produkt dreimal mit EtAc extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen werden über  $MgSO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt kann ohne weitere Reinigung verwendet werden.

brauner Feststoff

Ausbeute 340 mg (72 %)

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  8.37 (s, Ar-H, 1H), 8.35 (s, Ar-H, 1H)

$^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  164.0, 139.2, 133.2 (q,  $^3J_{C,F} = 3.8$  Hz), 131.6 (q,  $^3J_{C,F} = 3.8$  Hz), 129.7 (q,  $^2J_{C,F} = 34.3$  Hz), 129.1, 122.5 (q,  $^1J_{C,F} = 272.4$  Hz), 116.5, 114.1

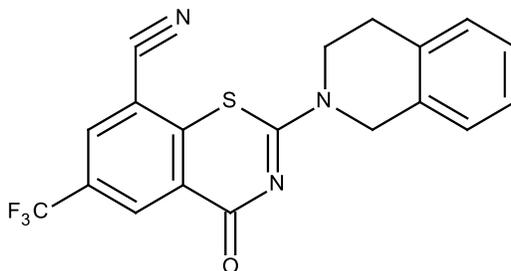
MS (ESI) 247.91 [M-H<sup>+</sup>]

$R_f$  0.68 (DCM/EtAc 9:1 mit 1 % Essigsäure)

$M_r = 249.57 \text{ g/mol}$

$\text{C}_9\text{H}_3\text{ClF}_3\text{NO}_2$

### **7.1.2.36 4-Oxo-2-(1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazine-8-carbonitril (AR134)**



2-Chlor-3-cyano-5-(trifluormethyl)benzoesäurechlorid wird aus 2-Chlor-3-cyano-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR132**) (0.428 g, 1.72 mmol, 1.1 Äq.) nach der allgemeinen Methode 1 hergestellt.

Die Synthese von **AR134** erfolgt nach der allgemeinen Methode 3, unter Verwendung von 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-2-thioharnstoff (**AR195**) (0.300 g, 1.56 mmol, 1 Äq.).

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (EtAc/Heptan 1:1).

weißer Feststoff

Ausbeute 320 mg (53 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.96 (d, Ar-H,  $^4J = 2.0 \text{ Hz}$ , 1H), 8.10 (d, Ar-H,  $^4J = 2.0 \text{ Hz}$ , 1H), 7.25 (m, Ar-H, 4H), 5.02 (m,  $\text{CH}_2$ , 2H), 4.12 (m,  $\text{CH}_2$ , 2H), 3.07 (m,  $\text{CH}_2$ , 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.0, 159.6 (bs), 140.5, 134.5 (bs), 133.6 (bs), 132.7 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8 \text{ Hz}$ ), 131.8 (bs), 131.6 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8 \text{ Hz}$ ), 130.8 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 35.1 \text{ Hz}$ ), 130.0 (bs), 128.7 (bs), 127.9 (bs), 127.6 (bs), 127.3 (bs), 127.1 (bs), 126.6 (bs), 126.4 (bs), 124.7, 122.4 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 273.1 \text{ Hz}$ ), 113.9, 110.9, 48.4, 44.9, 28.7 (bs), 28.3 (bs)

MS (ESI) 388.18  $[\text{M}+\text{H}^+]$ , 409.93  $[\text{M}+\text{Na}^+]$

HR MS 388.0731  $[\text{M}+\text{H}^+]$ , berechnet für  $[\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_3\text{OS}]^+$  388.0731

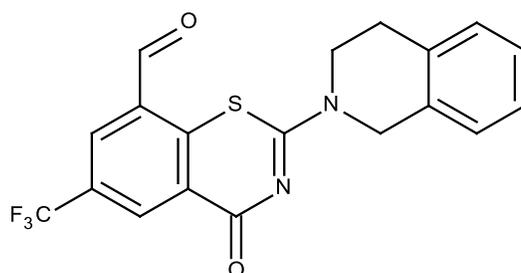
$R_f$  0.58 (EtAc/Heptan 1:1)

Smp.: 228-229 °C

$M_r$  = 387.38 g/mol

$C_{19}H_{12}F_3N_3OS$

### **7.1.2.37 4-Oxo-2-(1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazine-8-carbaldehyd (AR135)**



Zur Synthese von **AR135** wird 4-Oxo-2-(1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazine-8-carbonitril (**AR134**) (0.088 g, 0.23 mmol, 1.0 Äq.) in 4 ml DCM (getrocknet über Molsieb 4 Å) gelöst, auf -78 °C gekühlt und unter Schutzgas gesetzt. Zu dieser Lösung werden mit Hilfe einer Spritze 0.35 ml 1 M DIBAL Lösung in Heptan (entspricht 0.050 g, 0.35 mmol, 1.5 Äq.) über einen Zeitraum von 10 Minuten zugesetzt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch für 3 h bei -78 °C belassen, danach die Reaktion durch Zugabe von 0.7 ml MeOH gestoppt und auf RT erwärmt.

Nach Zusatz von 0.4 ml Wasser und 0.6 ml 1 N HCl zugesetzt wurden, belässt man Reaktion für 1.5 h bei RT. Danach wird das Reaktionsgemisch dreimal mit Chloroform extrahiert, die organischen Phasen gesammelt, über  $MgSO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (EtAc/Heptan 1:1).

amorpher, farbloser Feststoff

Ausbeute 6 mg (7 %)

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10.22 (s, CHO, 1H), 9.09 (d, Ar-H,  $^4J = 2.2$  Hz, 1H), 8.28 (d, Ar-H,  $^4J = 2.2$  Hz, 1H), 7.25 (m, Ar-H, 4H), 5.08 (m,  $\text{CH}_2$ , 2H), 4.18 (m,  $\text{CH}_2$ , 2H), 3.06 (m,  $\text{CH}_2$ , 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  190.3, 166.6, 138.0.5, 134.9 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 133.0 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 131.5, 130.0 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 34.3$  Hz), 128.7 (bs), 128.7 (bs), 127.9 (bs), 127.5 (bs), 127.2 (bs), 126.6 (bs), 125.0, 122.9 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 272.8$  Hz), 48.1, 44.6, 28.8

MS (APCI) 391.2 [ $\text{M} + \text{H}^+$ ]

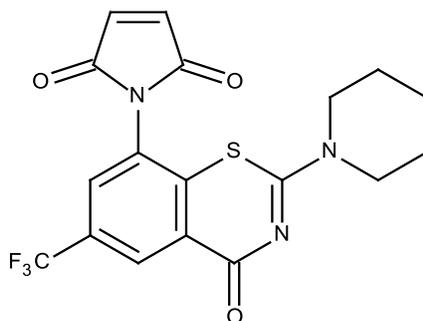
HR MS 391.0726 [ $\text{M} + \text{H}^+$ ], berechnet für  $[\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2\text{S}]^+$  388.0728

$R_f$  0.44 (EtAc/Heptan 1:1)

$M_r = 390.38$  g/mol

$\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$

### **7.1.2.38 1-[4-Oxo-2-(piperidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-8-yl]-2,5-dihydro-1H-pyrrol-2,5-dion (AR140)**



8-Amino-2-(piperidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (**AR81**) (0.118 g, 0.36 mmol, 1.0 Äq.) wird in 10 ml Essigsäure gelöst und eine Lösung von Maleinsäureanhydrid (0.052 g, 0.53 mmol, 1.5 Äq.) in 5 ml Essigsäure wird zugetropft. Im Anschluss wird der Reaktionsansatz für 6 h unter Rückfluss erhitzt.

Nachdem das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt wurde, erfolgt die Reinigung des Produktes säulenchromatographisch mit dem LM EtAc/Heptan 1:1.

weißer Feststoff

Ausbeute 102 mg (69 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.84 (d, Ar-H,  $^4J = 2.0$  Hz, 1H), 7.61 (d, Ar-H,  $^4J = 2.0$  Hz, 1H), 6.99 (s, CH-CH, 2H), 3.86 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 4H), 1.70 (m,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ , 6H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  167.9, 167.5, 159.6, 137.1, 135.0, 130.2 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 35.1$  Hz), 129.3, (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 128.4 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 128.0, 125.1, 122.9 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 273.1$  Hz), 47.8, 25.8, 24.3

MS (APCI) 410.2  $[\text{M}+\text{H}^+]$

HR MS 410.0792  $[\text{M}+\text{H}^+]$ , berechnet für  $[\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{S}]^+$  410.0786, 432.0613  $[\text{M}+\text{Na}^+]$ , berechnet für  $[\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{SNa}]^+$  432.0606

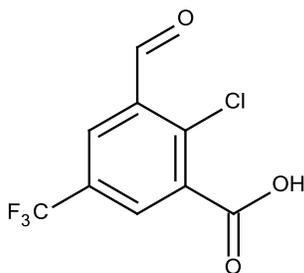
$R_f$  0.46 (EtAc/Heptan 1:1)

Smp.: 165-167 °C

$M_r = 409.38$  g/mol

$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$

### **7.1.2.39 2-Chlor-3-formyl-5-(trifluormethyl)benzoesäure (AR143)**



Zur Synthese von **AR143** wird Raney Nickel (0.164 g) für 40 Minuten in 2 N NaOH Lösung gerührt, anschließend wird der Überstand abdekantiert und der Rückstand zweimal mit Wasser gewaschen. Eine Lösung von 2-Chlor-3-cyano-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR132**) (0.236 g, 0.94 mmol, 1.0 Äq.) in Ameisensäure (3 ml) wird zum Raney Nickel gegeben und die Reaktion wird für 60 Minuten bei RT gerührt. Darauffolgend wird Zugabe von Raney Nickel (0.164 g), der wie oben beschrieben aktiviert wurde, wiederholt und die Reaktion für weitere 60 Minuten bei RT belassen.

Nach abgeschlossener Reaktion werden 5 ml einer Wasser/EtOH Mischung (2:1) zugesetzt und der Katalysator durch Filtration entfernt. Das erhaltene Filtrat wird dreimal mit Diethylether extrahiert, die organischen Phasen gesammelt, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (LM DCM/EtAc/Essigsäure 90:10:1).

bräunlicher Feststoff

Ausbeute 46 mg (20 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10.6 (s, CHO, 1H), 8.40 (d, Ar-H,  $^4J = 2.4$  Hz, 1H), 8.33 (d, Ar-H,  $^4J = 2.4$  Hz, 1H)

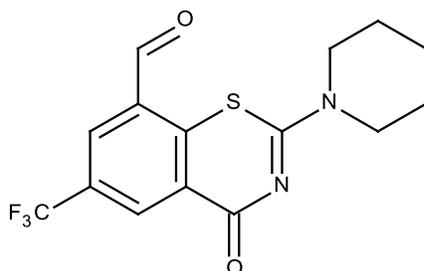
MS (APCI) 253.0  $[\text{M}+\text{H}^+]$

$R_f$  0.31 (DCM/EtAc/Essigsäure 90:10:1)

$M_r = 252.57$  g/mol

$\text{C}_9\text{H}_4\text{ClF}_3\text{O}_3$

#### **7.1.2.40 4-Oxo-2-(piperidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-8-carbaldehyd (AR145)**



2-Chlor-3-formyl-5-(trifluormethyl)benzoesäurechlorid wird aus 2-Chlor-3-formyl-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR143**) (0.103 g, 0.41 mmol, 1.1 Äq.) nach der allgemeinen Methode 1 hergestellt.

Die Synthese von **AR145** erfolgt nach der allgemeinen Methode 3, unter Verwendung von Piperidin-1-thioharnstoff (**AR116**) (0.054 g, 0.37 mmol, 1.0 Äq.).

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (EtAc/Heptan 1:1).

weißlicher Feststoff

Ausbeute 63 mg (50 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10.2 (s, CHO, 1H), 8.99 (d, Ar-H,  $^4J = 2.2$  Hz, 1H), 8.23 (d, Ar-H,  $^4J = 2.2$  Hz, 1H), 3.92 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 4H), 1.71 (m,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ , 6H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  190.3, 166.9, 162.5, 138.2, 134.8 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 133.0 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 131.4, 129.6 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 35.1$  Hz), 124.8, 122.9 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 272.4$  Hz), 47.6, 25.9, 24.3

MS (APCI) 343.2  $[\text{M}+\text{H}^+]$

HR MS 343.0728  $[\text{M}+\text{H}^+]$ , berechnet für  $[\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2\text{S}]^+$  343.0728

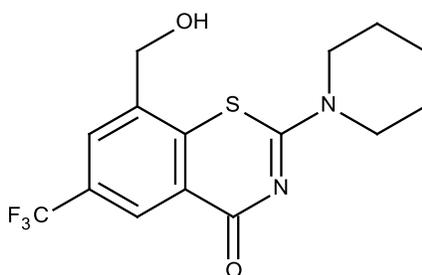
$R_f$  0.31 (EtAc/Heptan 1:1)

Smp.: 208-212 °C

$M_r = 342.34$  g/mol

$\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$

#### **7.1.2.41 8-(Hydroxymethyl)-2-(piperidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR146)**



Zu einer Lösung von 4-Oxo-2-(piperidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-8-carbaldehyd (**AR145**) (0.030 g, 0.09 mmol, 1.0 Äq.) in 2 ml EtOH werden 87  $\mu\text{l}$  einer 1 M  $\text{NaBH}_4$  Lösung in EtOH (entspricht 3.3 mg, 0.09 mol, 1.0 Äq.) gegeben. Nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten bei RT wird 1 ml Wasser zugegeben und anschließend das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (EtAc).

weißer Feststoff

Ausbeute 24 mg (80 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.48 (s, Ar-H, 1H), 7.80 (s, Ar-H, 1H), 4.79 (s,  $\text{CH}_2\text{-OH}$ , 2H), 3.89 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 4H), 2.82 (bs,  $\text{CH}_2\text{-OH/H}_2\text{O}$ , 2 H), 1.70 (m,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ , 6H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  169.0, 161.4, 138.4, 135.1, 129.0 (q,  $^2J_{\text{C,F}}=33.4$  Hz), 127.1 (q,  $^3J_{\text{C,F}}=3.8$  Hz), 126.0 (q,  $^3J_{\text{C,F}}=3.8$  Hz), 123.5 (q,  $^1J_{\text{C,F}}=272.8$  Hz), 122.7, 62.1, 47.6, 25.7, 24.3

MS (APCI) 345.2  $[\text{M}+\text{H}^+]$

HR MS 345.0878  $[\text{M}+\text{H}^+]$ , berechnet für  $[\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2\text{S}]^+$  345.0885

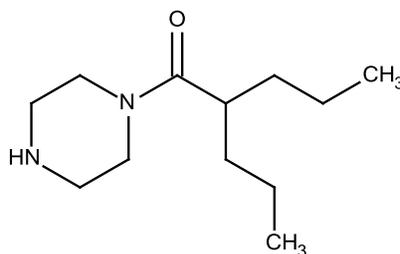
$R_f$  0.46 (EtAc)

Smp.: 205-208 °C

$M_r = 344.35$  g/mol

$\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$

### **7.1.2.42 1-(Piperazin-1-yl)-2-propylpentan-1-on (AR147)**



Die Synthese von **AR147** erfolgt nach der allgemeinen Methode 4. Dazu werden Natrium-Valproat (0.100 g, 0.60 mmol, 1.0 Äq.) und PyBOP® (0.359 g, 0.69 mmol, 1.15 Äq.) in DMF (10 ml) gelöst. Anschließend wird eine Lösung von Piperazin (0.259 g, 3.01 mmol, 5.0 Äq.) in DMF (5 ml) zugetropft. Nach 16 h bei RT, wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt säulenchromatographisch gereinigt (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 90:10:1).

farbloses Öl

Ausbeute 106 mg (84 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.58 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 2H), 3.47 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 2H), 2.78 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 4H), 2.60 (m,  $\text{CO-CH-(CH}_2)_2$ , 1H), 2.00 (bs, NH, 1H), 1.58 (m,  $\text{CH-CH}_2$ , 2H), 1.32 (m,  $\text{CH-CH}_2$ , 2H), 1.20 (m,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ , 4H), 0.82 (t,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ,  $^3J = 7.3$  Hz, 6H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174.7, 46.9, 46.6, 46.1, 42.8, 40.2, 35.2, 20.8, 14.2

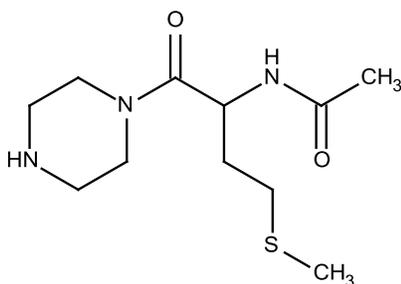
MS (APCI) 213.2  $[\text{M}+\text{H}^+]$

$R_f$  0.25 (Chloroform/MeOH /Ammoniak Lsg. 36 % 90:10:1)

$M_r$  = 212.33 g/mol

$C_{12}H_{24}N_2O$

**7.1.2.43      N-[4-(Methylsulfanyl)-1-oxo-1-(piperazin-1-yl)butan-2-yl]acetamid**  
**(AR148)**



Die Synthese von **AR148** erfolgt nach der allgemeinen Methode 4. Dazu werden N-Acetylcystein (0.244 g, 1.50 mmol, 1.0 Äq.) und PyBOP® (0.897 g, 1.73 mmol, 1.15 Äq.) in DMF (15 ml) gelöst. Anschließend wird eine Lösung von Piperazin (0.388 g, 4.50 mmol, 3.0 Äq.) in DMF (5 ml) zutropft. Nach 16 h bei RT, wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt säulenchromatographisch gereinigt (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 90:10:1).

farbloses Öl

Ausbeute 159 mg (41 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  6.67 (d, NH,  $^3J = 8.0$  Hz, 1H), 5.05 (m, CO-CH-NH, 1H), 3.56 (m,  $\text{CH}_2$ -N- $\text{CH}_2$ , 1H), 2.85 (m,  $\text{CH}_2$ -N- $\text{CH}_2$ , 1H), 2.47 (m,  $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -S, 2H), 2.06 (s, - $\text{CH}_3$ , 3H), 1.98 (s, - $\text{CH}_3$ , 3H), 1.95 (m, CH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ , 1H), 1.79 (m, CH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ , 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  169.9, 169.8, 47.7, 46.7, 46.2, 45.7, 43.1, 32.9, 30.1, 23.2, 15.6

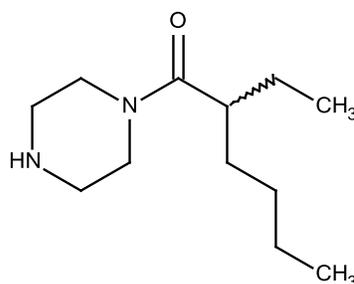
MS (ESI) 260.64 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ], 283.15 [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ]

$R_f$  0.23 (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 90:10:1)

$M_r$  = 259.37 g/mol

$C_{11}H_{21}N_3O_2S$

#### **7.1.2.44 2-Ethyl-1-(piperazin-1-yl)hexan-1-on (AR150)**



Die Synthese von **AR150** erfolgt nach der allgemeinen Methode 4. Dazu werden 2-Ethylhexansäure (0.300 g, 2.08 mmol, 1.0 Äq.) und PyBOP® (1.244 g, 2.39 mmol, 1.15 Äq.) in DMF (20 ml) gelöst. Anschließend wird eine Lösung von Piperazin (0.537 g, 6.25 mmol, 3.0 Äq.) in DMF (10 ml) zugetropft. Nach 16 h bei RT, wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt säulenchromatographisch gereinigt (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 90:10:1).

farbloses Öl

Ausbeute 284 mg (69 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.57 (t,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ ,  $^3J = 4.9$  Hz, 2H), 3.46 (t,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ ,  $^3J = 4.9$  Hz, 2H), 2.76 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 4H), 2.49 (m,  $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2$ , 1H), 2.02 (bs,  $\text{NH}$ , 1H), 1.57 (m,  $\text{CH-CH}_2$ , 2H), 1.37 (m,  $\text{CH-CH}_2$ , 2H), 1.16 (m,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ , 4H), 0.79 (m,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ , 6H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  174.5, 46.9, 46.6, 46.2, 42.8, 42.2, 32.3, 29.8, 25.9, 22.8, 13.9, 12.0

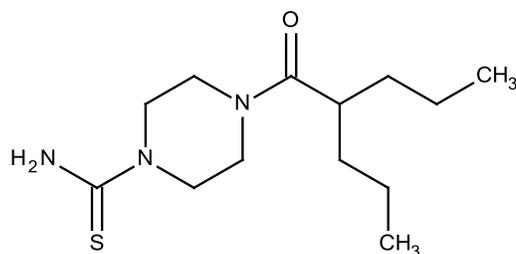
MS (APCI) 213.2 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]

$R_f$  0.26 (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 90:10:1)

$M_r = 198.31$  g/mol

$\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}$

### 7.1.2.45 4-(2-Propylpentanoyl)piperazin-1-thioharnstoff (AR151)



Die Herstellung von **AR151** erfolgt nach der allgemeinen Methode 2, unter Verwendung von 1-(Piperazin-1-yl)-2-propylpentan-1-on (**AR147**) (0.106 g, 0.50 mmol, 1.0 Äq.) und Thiocarbonyldiimidazol (0.102 g, 0.58 mmol, 1.15 Äq.). Die Reinigung erfolgt mit Hilfe der MPLC (PuriFlash System, EtAc/Heptan Gradient).

weißer Feststoff

Ausbeute 98 mg (72 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.23 (bs,  $\text{NH}_2$ , 2H), 4.03 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 2H), 3.73 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 4H), 3.66 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 2H), 2.62 (m,  $\text{CO-CH-(CH}_2)_2$ , 1H), 1.58 (m,  $\text{CH-CH}_2$ , 2H), 1.38 (m,  $\text{CH-CH}_2$ , 2H), 1.22 (m,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ , 4H), 0.86 (t,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ,  $^3J = 7.2$  Hz, 6H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  182.2, 175.6, 47.9, 47.1, 44.7, 40.7, 40.5, 20.8, 14.1

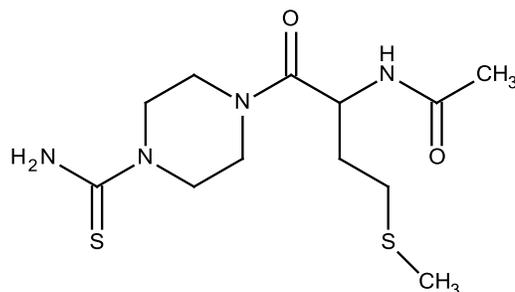
MS (APCI) 272.2 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]

$R_f$  0.33 (EtAc)

$M_r = 271.42$  g/mol

$\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{OS}$

### 7.1.2.46 N-[1-(4-Carbamothioylpiperazin-1-yl)-4-(methylsulfanyl)-1-oxobutan-2-yl]acetamid (AR152)



Die Herstellung von **AR152** erfolgt nach der allgemeinen Methode 2, unter Verwendung von N-[4-(Methylsulfanyl)-1-oxo-1-(piperazin-1-yl)butan-2-yl]acetamid (**AR148**) (0.159 g, 0.61 mmol, 1.0 Äq.) und Thiocarbonyldiimidazol (0.126 g, 0.71 mmol, 1.15 Äq.). Die Reinigung erfolgt durch Umkristallisation aus DCM/Hexan 1:1.

weißer Feststoff

Ausbeute 116 mg (60 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  4.98 (m, CO-CH-NH, 1H), 4.03 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 1H), 3.94 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 1H), 3.86 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 2H), 3.75 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 3H), 3.55 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 1H), 2.53 (m,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$ , 2H), 2.10 (s,  $-\text{CH}_3$ , 3H), 1.99 (m,  $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2$ , 1H), 1.97 (s,  $-\text{CH}_3$ , 3H), 1.90 (m,  $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2$ , 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  181.8, 171.7, 171.1, 46.6, 44.4, 41.3, 30.9, 29.8, 20.8, 13.9

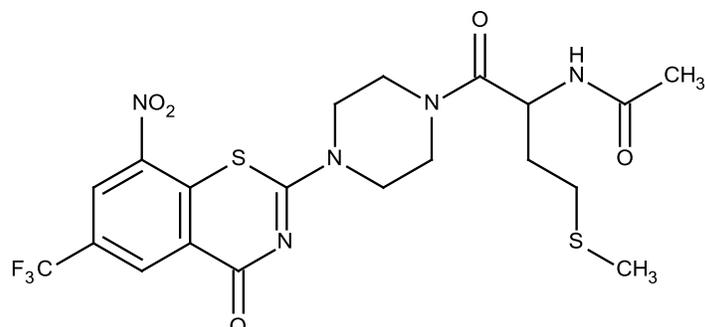
MS (ESI) 341.50 [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ]

$R_f$  0.51 (Chloroform/MeOH 9:1)

$M_r = 318.46$  g/mol

$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}_2$

**7.1.2.47 N-[4-(Methylsulfanyl)-1-{4-[8-nitro-4-oxo-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-2-yl]piperazin-1-yl}-1-oxobutan-2-yl]acetamid (AR153)**



2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäurechlorid wird aus 2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR96**) (0.093 g, 0.35 mmol, 1.1 Äq.) nach der allgemeinen Methode 1 hergestellt.

Die Synthese von **AR153** erfolgt nach der allgemeinen Methode 3, unter Verwendung von N-[1-(4-Carbamothioylpiperazin-1-yl)-4-(methylsulfanyl)-1-oxobutan-2-yl]acetamid (**AR152**) (0.100 g, 0.31 mmol, 1.0 Äq.).

Die Aufreinigung erfolgt mit Hilfe der MPLC (PuriFlash System, EtAc/MeOH Gradient).

gelber glasiger Feststoff

Ausbeute 73 mg (44 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.04 (s, Ar-H, 1H), 8.74 (s, Ar-H, 1H), 6.66 (d, NH,  $^3J = 7.2$  Hz, 1H), 5.10 (m, CO-CH-NH, 1H), 4.18 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 2H), 3.98 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 4H), 3.76 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 1H), 3.61 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 1H), 2.51 (m,  $\text{CH}_2\text{-S}$ , 2H), 2.07 (s, - $\text{CH}_3$ , 3H), 1.99 (s, - $\text{CH}_3$ , 3H), 1.98 (m, CH- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ , 1H), 1.87 (m,  $\text{CH}_2\text{-S}$ , 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  175.1, 166.2, 162.7, 143.9, 133.6, 133.4 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.1$  Hz), 130.0 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 35.1$  Hz), 126.6, 126.1 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.1$  Hz), 122.3 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 273.1$  Hz), 46.4, 46.2, 44.8, 42.7, 41.0, 32.8, 29.8, 25.8, 22.8, 13.9, 12.0

MS (APCI) 534.2 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]

HR MS 534.1062 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ], berechnet für  $[\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_5\text{S}_2]^+$  534.1093, 556.0881 [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ],

berechnet für  $[\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_5\text{S}_2\text{Na}]^+$  556.09122

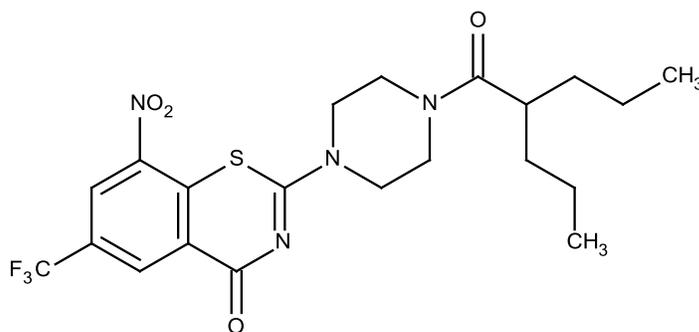
$R_f$  0.21 (LM EtAc/MeOH 95:5)

Smp.: 80-90 °C

$M_r = 533.54$  g/mol

$C_{20}H_{22}F_3N_5O_5S_2$

### **7.1.2.48 8-Nitro-2-[4-(2-propylpentanoyl)piperazin-1-yl]-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR154)**



2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäurechlorid wird aus 2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR96**) (0.055 g, 0.20 mmol, 1.1 Äq.) nach der allgemeinen Methode 1 hergestellt.

Die Synthese von **AR154** erfolgt nach der allgemeinen Methode 3, unter Verwendung von 4-(2-Propylpentanoyl)piperazin-1-thioharnstoff (**AR151**) (0.050 g, 0.19 mmol, 1.0 Äq.).

Die Aufreinigung erfolgt mit Hilfe der MPLC (PuriFlash System, EtAc/Heptan Gradient).

gelb oranger glasiger Feststoff

Ausbeute 84 mg (91 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.09 (d, Ar-H,  $^4J = 2.2$  Hz, 1H), 8.77 (d, Ar-H,  $^4J = 2.2$  Hz, 1H), 4.07 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 2H), 3.98 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 2H), 3.86 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 2H), 3.74 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 2H), 2.67 (m,  $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2$ , 1H), 1.65 (m,  $\text{CH-CH}_2$ , 2H), 1.43 (m,  $\text{CH-CH}_2$ , 2H), 1.27 (m,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ , 4H), 0.89 (t,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ,  $^3J = 7.2$  Hz, 6H)

$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  175.2, 166.2, 162.7, 143.9, 133.6, 133.5 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 130.0 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 35.1$  Hz), 126.6, 126.1 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 122.3 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 273.1$  Hz), 46.4, 46.2, 44.8, 41.0, 40.7, 35.2, 20.8, 14.2

MS (APCI) 487.2  $[\text{M}+\text{H}^+]$

HR MS 509.1450  $[\text{M}+\text{Na}^+]$ , berechnet für  $[\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_4\text{SNa}]^+$  509.1445

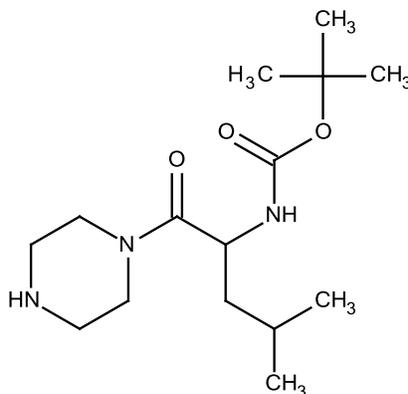
$R_f$  0.16 (EtAc/Heptan 1:1)

Smp.: 90-95 °C

$M_r = 486.51$  g/mol

$\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$

### **7.1.2.49 tert-Butyl-N-[4-methyl-1-oxo-1-(piperazin-1-yl)pentan-2-yl]carbamat (AR155)**



Die Synthese von **AR155** erfolgt nach der allgemeinen Methode 4. Dazu werden t-Boc-Leucin (0.233 g, 1.01 mmol, 1.0 Äq.) und PyBOP® (0.604 g, 1.16 mmol, 1.15 Äq.) in DMF (15 ml) gelöst. Anschließend wird eine Lösung von Piperazin (0.260 g, 3.02 mmol, 3.0 Äq.) in DMF (5 ml) zu getropft. Nach 16 h bei RT, wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt säulenchromatographisch gereinigt (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 90:10:1).

farbloses Öl

Ausbeute 251 mg (84 %)

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.31 (d, NH,  $^3J = 9.0$  Hz, 1H), 4.60 (m, CO-CH-NH, 1H), 4.33 (bs, NH/ $\text{H}_2\text{O}$ , 2H), 3.75 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 1H), 3.62 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 1H), 3.52 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 2H), 2.95

(m, CH<sub>2</sub>-N-CH<sub>2</sub>, 2H), 2.90 (m, CH<sub>2</sub>-N-CH<sub>2</sub>, 2H), 1.68 (m, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>, 1H), 1.43 (m, CH-CH<sub>2</sub>-CH, 2H), 1.40 (s, C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, 9H), 0.94 (d, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz, 3H), 0.89 (d, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz, 3H)

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 171.4, 155.6, 79.5, 48.3, 45.7, 45.5, 45.1, 42.7, 42.2, 28.3, 24.6, 23.3, 21.9

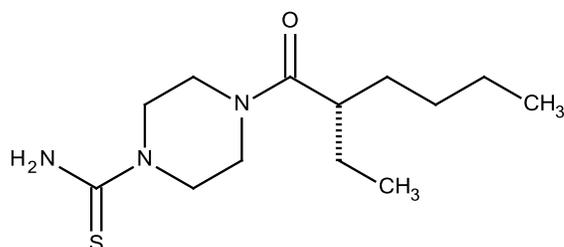
MS (APCI) 300.3 [M+H<sup>+</sup>]

R<sub>f</sub> 0.35 (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 90:10:1)

M<sub>r</sub> = 299.41 g/mol

C<sub>15</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

### **7.1.2.50 4-(2-Ethylhexanoyl)piperazin-1-thioharnstoff (AR156)**



Die Herstellung von **AR156** erfolgt nach der allgemeinen Methode 2, unter Verwendung von N2-Ethyl-1-(piperazin-1-yl)hexan-1-on (**AR150**) (0.170 g, 0.80 mmol, 1.0 Äq.) und Thiocarbonyldiimidazol (0.164 g, 0.92 mmol, 1.15 Äq.). Die Reinigung erfolgt mit Hilfe der MPLC (PuriFlash System, EtAc/Heptan Gradient).

weißer Feststoff

Ausbeute 132 mg (61 %)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 3.95 (bs, CH<sub>2</sub>-N-CH<sub>2</sub>, 2H), 3.81 (bs, CH<sub>2</sub>-N-CH<sub>2</sub>, 2H), 3.74 (m, CH<sub>2</sub>-N-CH<sub>2</sub>, 2H), 3.71 (m, CH<sub>2</sub>-N-CH<sub>2</sub>, 2H), 2.76 (m, CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>2</sub>, 1H), 1.60 (m, CH-CH<sub>2</sub>, 2H), 1.48 (m, CH-CH<sub>2</sub>, 2H), 1.27 (m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, 4H), 0.90 (t, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 3H), 0.88 (t, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 3H),

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 181.76, 176.1, 47.5, 46.7, 44.5, 42.3, 40.8, 32.2, 29.4, 25.7, 22.5, 12.9, 10.7

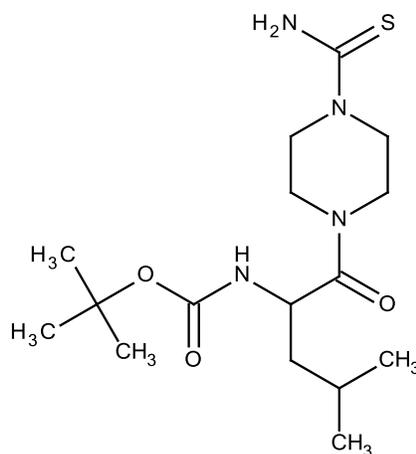
MS (APCI) 272.3 [M+H<sup>+</sup>]

$R_f$  0.11 (EtAc/Heptan 1:1)

$M_r = 271.42$  g/mol

$C_{13}H_{25}N_3OS$

### 7.1.2.51 tert-Butyl N-[1-(4-carbamothioylpiperazin-1-yl)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl]carbamate (AR157)



Die Herstellung von **AR157** erfolgt nach der allgemeinen Methode 2, unter Verwendung von tert-Butyl-N-[4-methyl-1-oxo-1-(piperazin-1-yl)pentan-2-yl]carbamate (**AR155**) (0.202 g, 0.68 mmol, 1.0 Äq.) und Thiocarbonyldiimidazol (0.138 g, 0.78 mmol, 1.15 Äq.). Das Produkt wird säulenchromatographisch gereinigt (Chloroform/MeOH 95:5).

weißer Feststoff

Ausbeute 142 mg (58 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.25 (m,  $\text{NH}_2$ , 2H), 5.25 (m,  $\text{NH}$ , 1H), 4.57 (m,  $\text{CO-CH-NH}$ , 1H), 4.07 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 1H), 3.80 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 5H), 3.55 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 1H), 1.68 (m,  $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$ , 1H), 1.45 (m,  $\text{CH-CH}_2\text{-CH}$ , 2H), 1.39 (s,  $\text{C-(CH}_3)_3$ , 9H), 0.94 (d,  $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$ ,  $^3J = 6.5$  Hz, 3H), 0.90 (d,  $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$ ,  $^3J = 6.6$  Hz, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  182.4, 172.1, 155.6, 79.9, 48.5, 47.5, 46.9, 44.3, 42.4, 41.0, 28.3, 24.7, 23.2, 21.9

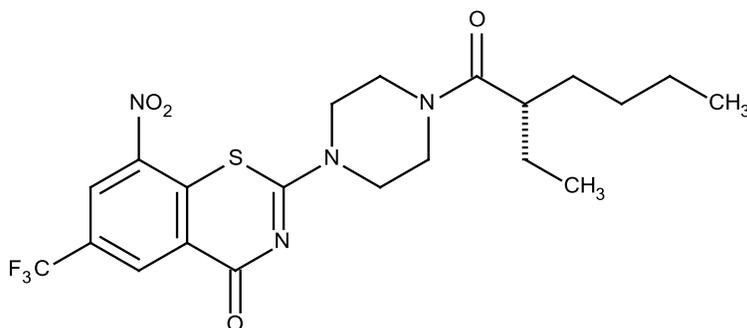
MS (ESI) 381.53 [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ]

$R_f$  0.24 (Chloroform/MeOH 95:5)

$M_r = 358.50 \text{ g/mol}$

$C_{16}H_{30}N_4O_3S$

### **7.1.2.52 2-[4-(2-Ethylhexanoyl)piperazin-1-yl]-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR158)**



2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäurechlorid wird aus 2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR96**) (0.109 g, 0.41 mmol, 1.1 Äq.) nach der allgemeinen Methode 1 hergestellt.

Die Synthese von **AR158** erfolgt nach der allgemeinen Methode 3, unter Verwendung von 4-(2-Ethylhexanoyl)piperazin-1-thioharnstoff (**AR156**) (0.100 g, 0.37 mmol, 1.0 Äq.).

Die Reinigung erfolgt mit Hilfe der MPLC (PuriFlash System, EtAc/Heptan Gradient).

gelber Feststoff

Ausbeute 175 mg (97 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.06 (d, Ar-H,  $^4J = 1.8 \text{ Hz}$ , 1H), 8.75 (d, Ar-H,  $^4J = 1.8 \text{ Hz}$ , 1H), 4.07 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 2H), 3.97 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 2H), 3.86 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 2H), 3.73 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 2H), 2.56 (m,  $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2$ , 1H), 1.65 (m,  $\text{CH-CH}_2$ , 2H), 1.47 (m,  $\text{CH-CH}_2$ , 2H), 1.23 (m,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ , 4H), 0.87 (m,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ , 6H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  175.1, 166.2, 162.7, 143.9, 133.6, 133.4 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.1 \text{ Hz}$ ), 130.0 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 35.1 \text{ Hz}$ ), 126.6, 126.1 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.1 \text{ Hz}$ ), 122.3 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 273.1 \text{ Hz}$ ), 46.4, 46.2, 44.8, 42.7, 41.0, 32.8, 29.8, 25.8, 22.8, 13.9, 12.0

MS (APCI) 487.3 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]

HR MS 487.1603 [M+H<sup>+</sup>], berechnet für [C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S]<sup>+</sup> 487.1627, 509.1420 [M+Na<sup>+</sup>],  
berechnet für [C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>SNa]<sup>+</sup> 509.1446

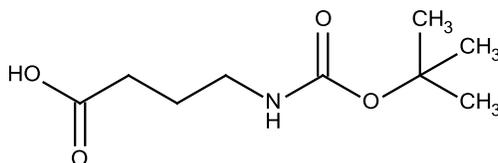
R<sub>f</sub> 0.24 (LM EtAc/Heptan 1:1)

Smp.: 90-100 °C

M<sub>r</sub> = 486.51 g/mol

C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S

### 7.1.2.53 4-[[tert-Butoxy]carbonylamino]butansäure (AR159)



Zur Synthese von **AR159** wird  $\gamma$ -Aminobuttersäure (1000 mg, 9.70 mmol, 1.0 Äq.) und Di-tert-butylidicarbonat (2538 mg, 11.64 mmol, 1.2 Äq.) in THF (10 ml) gelöst. Zu dieser Lösung wird eine Lösung von NaHCO<sub>3</sub> (1076 mg, 12.80 mmol, 1.32 Äq.) in Wasser (10 ml) unter Eiskühlung zugegeben. Anschließend wird das Reaktionsgemisch bei RT über Nacht belassen.

Zu Aufarbeitung wird der pH-Wert des Ansatzes mit 1 N HCl auf 2 eingestellt und das Produkt mit DCM (zweimal) extrahiert. Die organischen Phasen werden gesammelt und nach trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> im Vakuum eingengt. Das erhaltene Produkt wird ohne weitere Reinigung verwendet.

farbloses Öl

Ausbeute 1453 mg (94 %)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  4.68 (bs, COOH, 1H), 3.75 (m, NH, 1H), 3.18 (bs, NH-CH<sub>2</sub>H), 2.39 (t, CO-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 2H), 1.82 (m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, 2H), 1.52 (s, CH<sub>3</sub>, 9H)

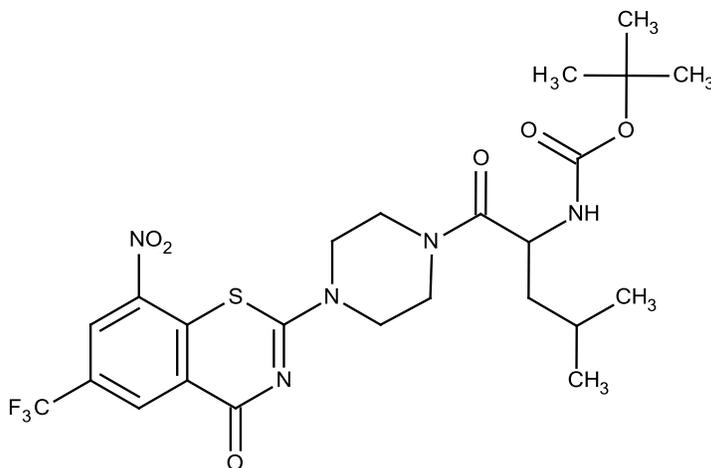
<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  177.8, 146.7, 85.2, 39.7, 31.2, 28.3, 27.4

MS (ESI) 202.30 [M-H<sup>+</sup>]

M<sub>r</sub> = 203.24 g/mol

C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub>

**7.1.2.54 N-(4-Methyl-1-{4-[8-nitro-4-oxo-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-2-yl]piperazin-1-yl}-1-oxopentan-2-yl)carbamat (AR160)**



2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäurechlorid wird aus 2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR96**) (0.114 g, 0.42 mmol, 1.1 Äq.) nach der allgemeinen Methode 1 hergestellt.

Die Synthese von **AR160** erfolgt nach der allgemeinen Methode 3, unter Verwendung von tert-Butyl N-[1-(4-carbamothioylpiperazin-1-yl)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl]carbamate (**AR157**) (0.138 g, 0.39 mmol, 1.0 Äq.).

Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch (Chloroform/MeOH 98:2).

gelber Feststoff

Ausbeute 170 mg (76 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.08 (d, Ar-H,  $^4J = 2.2$  Hz, 1H), 8.76 (d, Ar-H,  $^4J = 2.2$  Hz, 1H), 5.15 (d, NH,  $^3J = 9.0$  Hz, 1H), 4.64 (m, CO-CH-NH, 1H), 4.25 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 2H), 4.04 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 1H), 3.94 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 2H), 3.85 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 1H), 3.59 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 2H), 1.70 (m,  $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$ , 1H), 1.51 (m, CH- $\text{CH}_2\text{-CH}$ , 1H), 1.42 (s, C-( $\text{CH}_3$ ) $_3$ , 9H), 1.39 (m, CH- $\text{CH}_2\text{-CH}$ , 1H), 0.97 (d,  $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$ ,  $^3J = 6.5$  Hz, 3H), 0.93 (d,  $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$ ,  $^3J = 6.5$  Hz, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.0, 166.2, 162.7, 155.6, 143.9, 133.6, 133.5 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 130.0 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 35.9$  Hz), 126.6, 126.1 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 122.3 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 273.1$  Hz), 80.0, 48.4, 46.0, 44.8, 42.4, 41.5, 28.3, 24.7, 23.2, 22.0

MS (APCI) 574.0 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]

HR MS 596.1735 [M+Na<sup>+</sup>], berechnet für [C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>SNa]<sup>+</sup> 596.1767

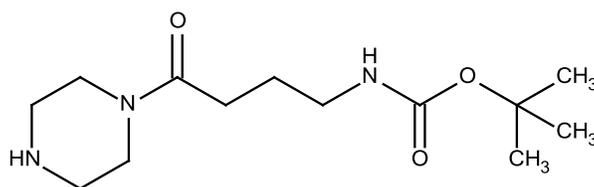
R<sub>f</sub> 0.48 (Chloroform/MeOH 98:2)

Smp.: 120-122°C

M<sub>r</sub> = 573.59 g/mol

C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>S

### **7.1.2.55 tert-Butyl N-[4-oxo-4-(piperazin-1-yl)butyl]carbamat (AR161)**



Die Synthese von **AR161** erfolgt nach der allgemeinen Methode 4. Dazu werden 4-[[tert-Butoxy]carbonyl]amino}butansäure (**AR159**) (1.453 g, 7.16 mmol, 1.0 Äq.) und PyBOP® (4.282 g, 8.23 mmol, 1.15 Äq.) in DMF (25 ml) gelöst. Anschließend wird eine Lösung von Piperazin (1.850 g, 21.47 mmol, 3.0 Äq.) in DMF (10 ml) zu getropft. Nach 16 h bei RT wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt säulenchromatographisch gereinigt (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 90:10:1).

farbloses Öl

Ausbeute 450 mg (23 %)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.90 (bs, NH, 1H), 3.56 (m, CH<sub>2</sub>-N-CH<sub>2</sub>, 2H), 3.41 (m, CH<sub>2</sub>-N-CH<sub>2</sub>, 4H), 3.12 (q, NH-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, 2H), 2.83 (m, CH<sub>2</sub>-N-CH<sub>2</sub>, 4H), 2.77 (bs, NH, 1H), 2.32 (t, CO-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 2H), 1.78 (qi, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 2H), 1.39 (s, CH<sub>3</sub>, 9H)

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 171.1, 156.1, 79.1, 46.3, 46.0, 45.6, 42.3, 40.2, 30.4, 28.4, 25.4

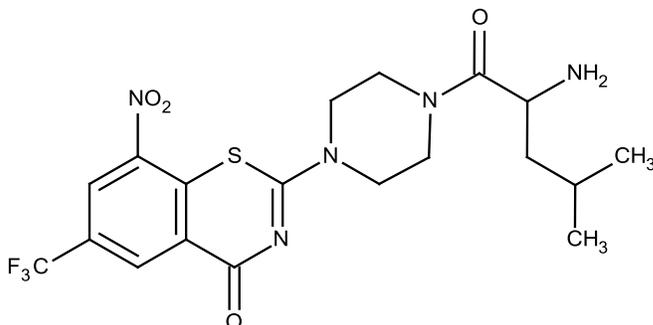
MS (ESI) 294.18 [M+Na<sup>+</sup>]

R<sub>f</sub> 0.27 (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 90:10:1)

M<sub>r</sub> = 271.36 g/mol

C<sub>13</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

**7.1.2.56 N-(4-Methyl-1-{4-[8-nitro-4-oxo-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-2-yl]piperazin-1-yl}-1-oxopentan-2-yl)carbammat (AR162)**



N-(4-Methyl-1-{4-[8-nitro-4-oxo-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-2-yl]piperazin-1-yl}-1-oxopentan-2-yl)carbammat (**AR160**) (47 mg, 0.08 mmol, 1.0 Äq.) wird in einer Mischung aus 1 ml DCM und 1 ml TFA gelöst und für 1 h bei RT belassen.

Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt und der Reaktionsansatz je dreimal mit Toluol und Chloroform co-evaporiert.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 95:5:1).

gelber glasiger Feststoff

Ausbeute 31 mg (80 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 9.09 (d, Ar-H,  $^4J$  = 2.0 Hz, 1H), 8.77 (d, Ar-H,  $^4J$  = 2.2 Hz, 1H), 4.04 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 5H), 3.76 (m, CH-NH<sub>2</sub>, 1H), 3.73 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 2H), 3.64 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 1H), 1.86 (m,  $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$ , 1H), 1.40 (m, CH-CH<sub>2</sub>, 2H), 0.96 (dd,  $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$ ,  $^3J$  = 6.7 Hz, 6H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 174.6, 166.2, 162.8, 143.9, 133.6, 133.5 (q,  $^3J_{\text{C,F}}$  = 3.8 Hz), 129.1 (q,  $^2J_{\text{C,F}}$  = 35.1 Hz), 126.6, 126.2 (q,  $^3J_{\text{C,F}}$  = 3.8 Hz), 122.3 (q,  $^1J_{\text{C,F}}$  = 273.1 Hz), 49.7, 46.0, 44.8, 44.4, 41.4, 24.7, 23.5, 21.6

MS (APCI)  $m/z$  474.3 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]

HR MS 474.1413 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ], berechnet für  $[\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_4\text{S}]^+$  474.1423

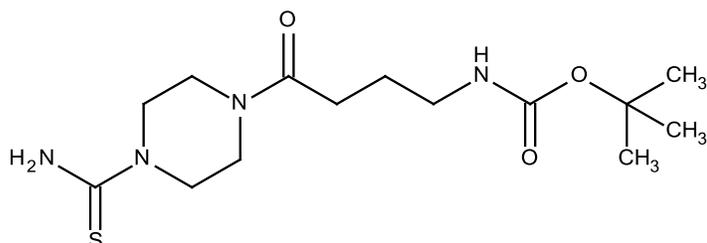
$R_f$  0.28 (Chloroform/MeOH 9:1)

Smp.: 110-113 °C

$M_r$  = 473.47 g/mol

C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>S

### **7.1.2.57 tert-Butyl N-[4-(4-carbamothioylpiperazin-1-yl)-4-oxobutyl]carbamate (AR163)**



Die Herstellung von **AR162** erfolgt nach der allgemeinen Methode 2, unter Verwendung von tert-Butyl N-[4-oxo-4-(piperazin-1-yl)butyl]carbamate (**AR161**) (0.420 g, 1.55 mmol, 1.0 Äq.) und Thiocarbonyldiimidazol (0.318 g, 1.78 mmol, 1.15 Äq.). Das Produkt wird säulenchromatographisch gereinigt (Chloroform/MeOH 9:1).

weißlicher Feststoff

Ausbeute 359 mg (70 %)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.85 (bs, NH<sub>2</sub>, 2H), 4.72 (bs, NH, 1H), 4.05 (bs, CH<sub>2</sub>-N-CH<sub>2</sub>, 2H), 3.75 (bs, CH<sub>2</sub>-N-CH<sub>2</sub>, 4H), 3.61 (bs, CH<sub>2</sub>-N-CH<sub>2</sub>, 2H), 3.18 (t, NH-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 2H), 2.38 (t, CO-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 2H), 1.85 (qi, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 2H), 1.43, (s, CH<sub>3</sub>, 9H)

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 181.7, 172.5, 157.2, 78.5, 47.1, 46.6, 44.4, 40.6, 39.4, 29.8, 27.4, 25.1

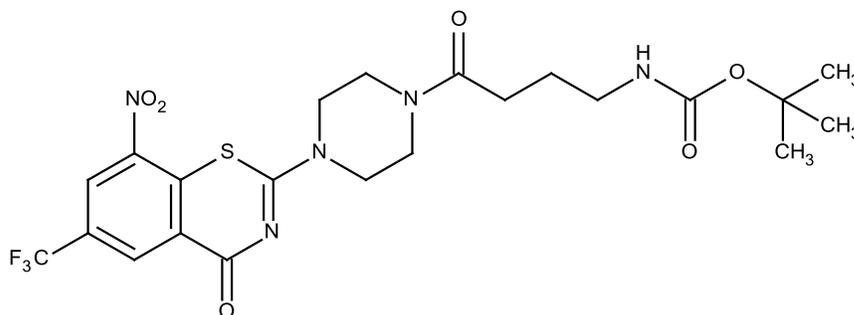
MS (ESI) 353.66 [M+Na<sup>+</sup>]

R<sub>f</sub> 0.32 (Chloroform/MeOH 9:1)

M<sub>r</sub> = 330.45 g/mol

C<sub>14</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S

**7.1.2.58 tert-Butyl N-(4-{4-[8-nitro-4-oxo-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-2-yl]piperazin-1-yl}-4-oxobutyl)carbamate (AR164)**



2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäurechlorid wird aus 2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR96**) (0.436 g, 1.62 mmol, 1.1 Äq.) nach der allgemeinen Methode 1 hergestellt.

Die Synthese von **AR164** erfolgt nach der allgemeinen Methode 3, unter Verwendung von tert-Butyl N-[4-(4-carbamothioylpiperazin-1-yl)-4-oxobutyl]carbamate (**AR163**) (0.138 g, 0.39 mmol, 1.0 Äq.). Die Reinigung erfolgt mit Hilfe der MPLC (PuriFlash System, Chloroform/MeOH Gradient).

gelber, glasiger Feststoff

Ausbeute 195 mg (24 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.08 (d, Ar-H,  $^4J = 2.2$  Hz, 1H), 8.76 (d, Ar-H,  $^4J = 2.2$  Hz, 1H), 4.73 (bs, NH, 1H), 4.04 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 4H), 3.82 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 2H), 3.65 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 2H), 3.18 (q,  $\text{NH-CH}_2$ ,  $^3J = 6.5$  Hz, 2H), 2.41 (t,  $\text{CO-CH}_2$ ,  $^3J = 7.1$  Hz, 2H), 1.83 (qi,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ ,  $^3J = 6.8$  Hz, 2H), 1.42, (s,  $\text{CH}_3$ , 9H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.3, 166.1, 162.7, 156.1, 143.9, 133.6, 133.6 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.1$  Hz), 129.9 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 35.9$  Hz), 126.5, 126.1 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 122.3 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 273.1$  Hz), 79.2, 46.1, 45.9, 44.6, 40.9, 40.1, 30.2, 28.4, 25.3

MS (APCI) 546.2  $[\text{M}+\text{H}^+]$

HR MS 568.1442  $[\text{M}+\text{Na}^+]$ , berechnet für  $[\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_6\text{SNa}]^+$  568.1453

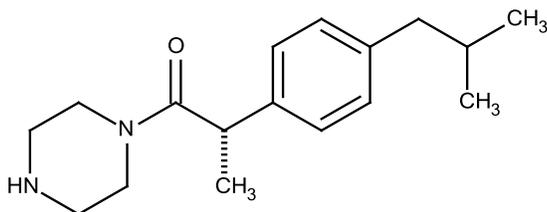
$R_f$  0.06 (Chloroform/MeOH 98:2)

Smp.: 130-145 °C

$M_r = 545.53 \text{ g/mol}$

$C_{22}H_{26}F_3N_5O_6S$

### **7.1.2.59 2-[4-(2-Methylpropyl)phenyl]-1-(piperazin-1-yl)propan-1-on (AR165)**



Die Synthese von **AR165** erfolgt nach der allgemeinen Methode 4. Dazu werden 2-[4-(2-Methylpropyl)phenyl]propansäure (0.500 g, 2.42 mmol, 1.0 Äq.) und PyBOP® (1.450 g, 2.79 mmol, 1.15 Äq.) in DMF (10 ml) gelöst. Anschließend wird eine Lösung von Piperazin (0.626 g, 7.27 mmol, 3.0 Äq.) in DMF (10 ml) zu getropft. Nach 16 h bei RT wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt säulenchromatographisch gereinigt (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 90:10:1).

farbloses Öl

Ausbeute 534 mg (80 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.06 (m, Ar-H, 4H), 6.88 (bs, NH, 1H), 3.94 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 1H) 3.76 (q, CO-CH,  $^3J = 6.8 \text{ Hz}$ , 1H), 3.47 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 3H), 3.04 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 1H), 2.85 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 2H), 2.40 (d,  $\text{CH}_2$ ,  $^3J = 7.2 \text{ Hz}$ , 2H), 2.34 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 1H), 1.80 (n,  $\text{CH}_2\text{-CH-(CH}_3)_2$ ,  $^3J = 6.8 \text{ Hz}$ , 1H), 1.38 (d,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ ,  $^3J = 6.8 \text{ Hz}$ , 3H), 0.85 (d,  $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$ ,  $^3J = 6.7 \text{ Hz}$ , 6H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.3, 140.5, 138.6, 129.8, 126.7, 44.9, 44.2, 43.9, 42.9, 40.5 30.1, 22.3, 20.5

MS (APCI) 275.2 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]

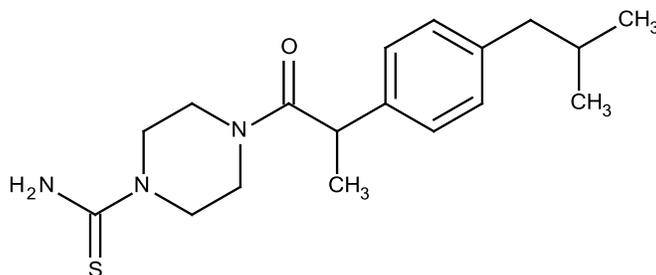
$R_f$  0.35 (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 90:10:1)

$M_r = 274.40 \text{ g/mol}$

$C_{17}H_{26}N_2O$

### 7.1.2.60 4-{2-[4-(2-Methylpropyl)phenyl]propanoyl}piperazin-1-thioharnstoff

#### (AR166)



Die Herstellung von **AR166** erfolgt nach der allgemeinen Methode 2, unter Verwendung von 2-[4-(2-Methylpropyl)phenyl]-1-(piperazin-1-yl)propan-1-on (**AR165**) (0.534 g, 1.94 mmol, 1.0 Äq.) und Thiocarbonyldiimidazol (0.397 g, 2.23 mmol, 1.15 Äq.). Das Produkt wird aus Isopropanol/Diisopropylether umkristallisiert (1:1).

weißlicher Feststoff

Ausbeute 407 mg (63 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.17 (d, Ar-H,  $^3J = 8.2$  Hz, 2H), 7.12 (d, Ar-H,  $^3J = 8.2$  Hz, 2H), 4.04 (q, CO-CH,  $^3J = 6.8$  Hz, 1H), 3.85 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 3H), 3.52 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 2H), 3.16 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 1H), 2.45 (d,  $\text{CH}_2$ ,  $^3J = 7.2$  Hz, 2H), 1.83 (n,  $\text{CH}_2\text{-CH-(CH}_3)_2$ ,  $^3J = 6.8$  Hz, 1H), 1.38 (d,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ ,  $^3J = 6.8$  Hz, 3H), 0.88 (d,  $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$ ,  $^3J = 6.7$  Hz, 6H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  181.6, 173.7, 140.3, 138.9, 129.4, 126.6, 46.8, 46.5, 44.6, 44.4, 42.4, 41.1, 30.0, 21.3, 19.4

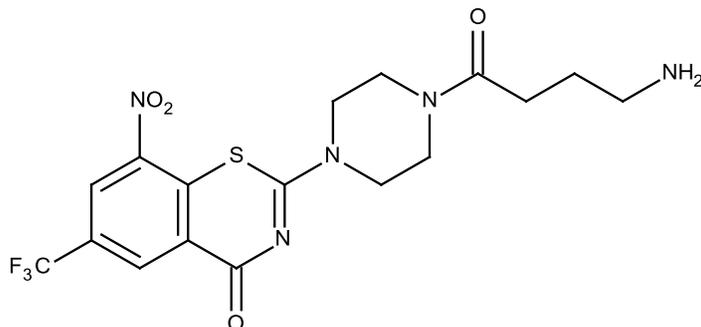
MS (ESI) 356.86  $[\text{M}+\text{H}^+]$

$R_f$  0.39 (Chloroform/MeOH 9:1)

$M_r = 333.49$  g/mol

$\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{OS}$

### 7.1.2.61 2-[4-(4-Aminobutanoyl)piperazin-1-yl]-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR167)



tert-Butyl N-(4-{4-[8-Nitro-4-oxo-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-2-yl]piperazin-1-yl}-4-oxobutyl)carbamate (**AR164**) (100 mg, 0.18 mmol, 1.0 Äq.) wird in einer Mischung aus 1 ml DCM und 1 ml TFA gelöst und für 1 h bei RT belassen.

Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt und der Reaktionsansatz je dreimal mit Toluol und Chloroform co-evaporiert.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 90:10:1).

gelblicher Feststoff

Ausbeute 71 mg (87 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.94 (bs, Ar-H, 1H), 8.87 (bs, Ar-H, 1H), 4.08 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 4H), 3.79 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 4H), 3.02 (t, N- $\text{CH}_2$ ,  $^3J = 7.4$  Hz, 2H), 2.63 (t, CO- $\text{CH}_2$ ,  $^3J = 7.0$  Hz, 2H), 1.98 (qi,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ ,  $^3J = 7.2$  Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  171.5, 167.2, 163.8, 144.4, 134.3, 131.8 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 129.0 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 35.3$  Hz), 126.0 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 125.9, 122.6 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 272.8$  Hz), 48.4, 45.4, 43.9, 40.5, 39.0, 29.5, 22.3

MS (ESI) 446.0  $[\text{M}+\text{H}^+]$

HR MS 446.1101  $[\text{M}+\text{H}^+]$ , berechnet für  $[\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_4\text{S}]^+$  446.1109

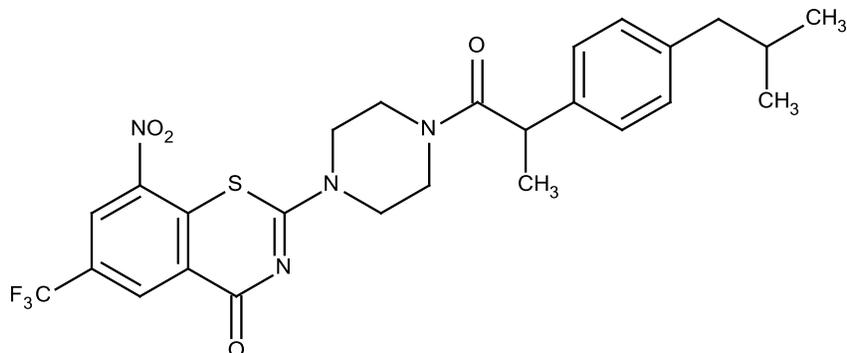
$R_f$  0.08 (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 90:10:1)

Smp.: 90 °C

$M_r = 445.53$  g/mol

$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_4\text{S}$

**7.1.2.62 2-(4-{2-[4-(2-Methylpropyl)phenyl]propanoyl}piperazin-1-yl)-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR168)**



2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäurechlorid wird aus 2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR96**) (0.133 g, 0.50 mmol, 1.1 Äq.) nach der allgemeinen Methode 1 hergestellt.

Die Synthese von **AR168** erfolgt nach der allgemeinen Methode 3, unter Verwendung von 4-{2-[4-(2-Methylpropyl)phenyl]propanoyl}piperazin-1-thioharnstoff (**AR166**) (0.138 g, 0.39 mmol, 1.0 Äq.). Die Reinigung erfolgt mit Hilfe der MPLC (PuriFlash System, EtAc/Heptan Gradient).

gelber Feststoff

Ausbeute 207 mg (84 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.07 (d, Ar-H,  $^4J = 2.0$  Hz, 1H), 8.76 (d, Ar-H,  $^4J = 2.0$  Hz, 1H), 7.14 (d, Ar-H,  $^3J = 8.4$  Hz, 2H), 7.11 (d, Ar-H,  $^3J = 8.4$  Hz, 2H), 4.15 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 3H), 3.84 (q, CO-CH,  $^3J = 6.8$  Hz, 1H), 3.60 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 2H), 3.48 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 2H), 3.06 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 1H), 2.44 (d,  $\text{CH}_2$ ,  $^3J = 7.2$  Hz, 2H), 1.84 (n,  $\text{CH}_2\text{-CH-(CH}_3)_2$ ,  $^3J = 6.8$  Hz, 1H), 1.47 (d,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ ,  $^3J = 6.8$  Hz, 3H), 0.88 (dd,  $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$ ,  $^3J = 6.5$  Hz, 6H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.5, 166.1, 162.5, 143.9, 140.8, 138.5, 133.6, 133.4 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 130.0, 129.9 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 35.1$  Hz), 126.8, 126.6, 126.1 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 122.3 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 273.1$  Hz), 46.1, 45.6, 44.9, 44.8, 43.4, 41.4, 30.1, 22.3, 20.5

MS (APCI) 549.2  $[\text{M}+\text{H}^+]$

HR MS 549.1764  $[\text{M}+\text{H}^+]$ , berechnet für  $[\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_4\text{S}]^+$  549.1783, 571.1583  $[\text{M}+\text{Na}^+]$ , berechnet für  $[\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_4\text{SNa}]^+$  571.1602

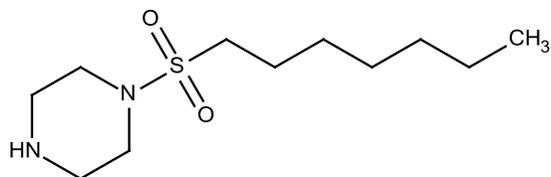
$R_f$  0.11 (EtAc/Heptan 1:1)

Smp.: 105-110 °C

$M_r$  = 548.58 g/mol

$C_{26}H_{27}F_3N_4O_4S$

### **7.1.2.63 1-(Heptan-1-sulfonyl)piperazin (AR169)**



Natrium-1-heptansulfonat (1.50 g, 6.81 mmol, 1.0 Äq.) wird in einem Rundkolben mit  $POCl_3$  (4.66 ml, 51.19 mol, 7.5 Äq.) versetzt und für 1 h unter kräftigen rühren auf 100 °C erhitzt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf 0 °C gekühlt, mit 10 ml Toluol und 25 ml Wasser versetzt. Die organische Phase wird abgetrennt, zweimal mit Wasser gewaschen und nach trockenen über  $NaSO_4$  im Vakuum eingeeengt.

Das Säurechlorid wird ohne weitere Reinigung in DMF (15 ml) aufgenommen, zu einer Lösung von Piperazin (4.05 g, 34.05 mmol, 5.0 Äq.) in DMF (35 ml) zugegeben und über Nacht gerührt (Schutzgas).

Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgearbeitet (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 90:10:1).

farbloses Öl, erstarrt im Kühlschrank

Ausbeute 880 mg (65 %)

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  3.23 (m,  $CH_2$ -N- $CH_2$ , 4H), 2.91 (m,  $CH_2$ -N- $CH_2$ , 4H), 2.86 (m,  $SO_2$ - $CH_2$ , 2H), 2.34 (bs, NH, 1H), 1.78 (m,  $CH_2$ , 2H), 1.38 (m,  $CH_2$ , 2H), 1.26 (m,  $CH_2$ , 6H), 0.86 (m,  $CH_3$ , 3H)

$^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  49.0, 46.5, 45.8, 31.4, 28.7, 28.4, 23.0, 22.5, 14.0

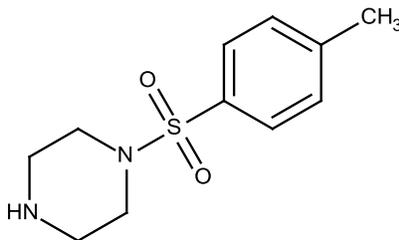
MS (APCI) 249.2 [ $M+H^+$ ]

$R_f$  0.21 (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 90:10:1)

$M_r$  = 248.39 g/mol

$C_{11}H_{24}N_2O_2S$

### **7.1.2.64 1-(4-Methylbensulfonyl)piperazin (AR170)**



p-Toluolsulfonsäurechlorid (0.500 g, 2.62 mmol, 1.0 Äq.) wird in DMF (10 ml) aufgenommen, zu einer Lösung von Piperazin (1.552 g, 13.05 mmol, 5.0 Äq.) in DMF (20 ml) zugegeben und über Nacht gerührt (Schutzgas).

Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgearbeitet (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 90:10:1).

farbloses Öl, erstarrt im Kühlschrank

Ausbeute 458 mg (73 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.55 (dd, Ar-H,  $^3J = 8.4$  Hz,  $^4J = 2.0$  Hz 2H), 7.25 (d, Ar-H,  $^3J = 8.4$  Hz, 2H), 2.87 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 8H), 2.36 (s,  $\text{CH}_3$ , 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  143.7, 132.4, 129.6, 127.8, 46.7, 45.1, 21.5

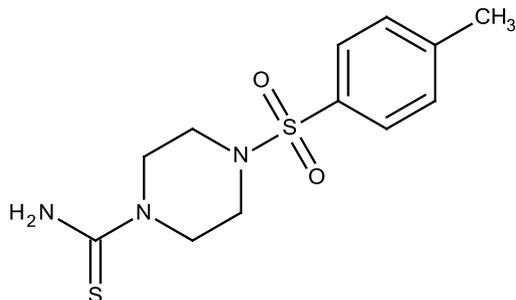
MS (APCI) 241.1 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]

$R_f$  0.60 (LM Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 90:10:1)

$M_r = 240.32$  g/mol

$\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$

### 7.1.2.65 4-(4-Methylbensulfonyl)piperazin-1-thioharnstoff (AR171)



Die Herstellung von **AR171** erfolgt nach der allgemeinen Methode 2, unter Verwendung von 1-(4-Methylbensulfonyl)piperazin (**AR170**) (0.400 g, 1.66 mmol, 1.0 Äq.) und Thiocarbonyldiimidazol (0.341 g, 1.19 mmol, 1.15 Äq.). Das Produkt wird aus Isopropanol/Diisopropylether umkristallisiert (1:1).

weißlicher Feststoff

Ausbeute 172 mg (35 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $\text{D}_6$ )  $\delta$  7.63 (d, Ar-H,  $^3J = 8.2$  Hz, 2H) 7.49 (bs,  $\text{NH}_2$ , 2H) 7.46 (d, Ar-H,  $^3J = 8.0$  Hz, 2H), 3.84 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 4H), 2.84 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 4H), 2.41 (s,  $\text{CH}_3$ , 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, DMSO- $\text{D}_6$ )  $\delta$  182.5, 145.3, 132.7, 131.2, 128.9, 47.6, 46.8, 22.3

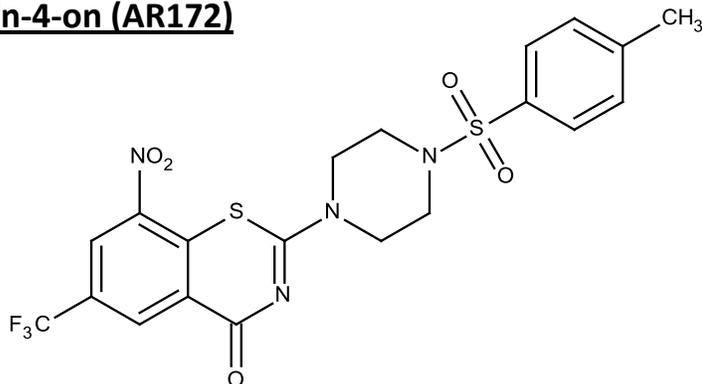
MS (ESI) 322.70 [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ]

$R_f$  0.55 (Chloroform/MeOH 9:1)

$M_r = 299.41$  g/mol

$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2$

**7.1.2.66 2-[4-(4-Methylbenzensulfonyl)piperazin-1-yl]-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR172)**



2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäurechlorid wird aus 2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR96**) (0.149 g, 0.55 mmol, 1.1 Äq.) nach der allgemeinen Methode 1 hergestellt.

Die Synthese von **AR172** erfolgt nach der allgemeinen Methode 3, unter Verwendung von 4-{24-(4-Methylbenzensulfonyl)piperazin-1-thioharnstoff (**AR171**) (0.150 g, 0.50 mmol, 1.0 Äq.). Die Reinigung erfolgt mit Hilfe der MPLC (PuriFlash System, EtAc/Heptan Gradient).

gelber Feststoff

Ausbeute 213 mg (86 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.04 (d, Ar-H,  $^4J = 2.2$  Hz, 1H), 8.74 (d, Ar-H,  $^4J = 2.2$  Hz, 1H), 7.64 (d, Ar-H,  $^3J = 8.4$  Hz, 2H), 7.34 (d, Ar-H,  $^3J = 8.4$  Hz, 2H), 4.11 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 4H), 3.17 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 4H), 2.42 (s,  $\text{CH}_3$ , 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  165.7, 162.5, 144.8, 144.4, 134.6, 132.3, 131.8 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 130.4, 128.0, 127.9 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 34.3$  Hz), 126.7 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 126.5, 123.0 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 273.7$  Hz), 45.8, 45.6, 21.4

MS (APCI) 515.2  $[\text{M}+\text{H}^+]$

HR MS 515.0665  $[\text{M}+\text{H}^+]$ , berechnet für  $[\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_5\text{S}_2]^+$  515.0671, 537.0483  $[\text{M}+\text{Na}^+]$ , berechnet für  $[\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_5\text{S}_2\text{Na}]^+$  537.0490

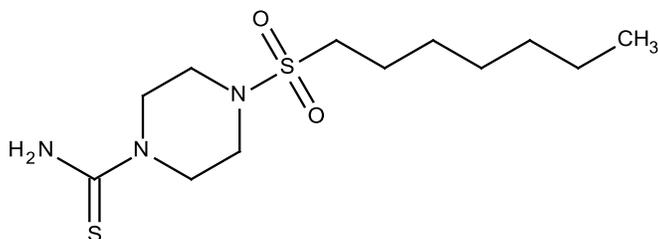
$R_f$  0.31 (EtAc/Heptan 1:1)

Smp.: 251-254 °C

$M_r = 514.50$  g/mol

$\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_5\text{S}_2$

### 7.1.2.67 4-(Heptan-1-sulfonyl)piperazin-1-thioharnstoff (AR173)



Die Herstellung von **AR173** erfolgt nach der allgemeinen Methode 2, unter Verwendung von 1-(Heptan-1-sulfonyl)piperazin (**AR169**) (0.300 g, 1.21 mmol, 1.0 Äq.) und Thiocarbonyldiimidazol (0.248 g, 1.39 mmol, 1.15 Äq.). Die Reinigung erfolgt mit Hilfe der MPLC (Puriflash System, Chloroform /MeOH Gradient).

weißer Feststoff

Ausbeute 311 mg (84 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.92 (bs,  $\text{NH}_2$ , 1H) 3.93 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 4H), 3.37 (t,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ ,  $^3J = 5.1$  Hz, 4H), 2.92 (m,  $\text{SO}_2\text{-CH}_2$ , 2H), 1.79 (m,  $\text{CH}_2$ , 2H), 1.41 (m,  $\text{CH}_2$ , 2H), 1.29 (m,  $\text{CH}_2$ , 6H), 0.88 (m,  $\text{CH}_3$ , 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  49.8, 47.9, 45.1, 31.4, 28.7, 28.4, 23.0, 22.5, 14.0

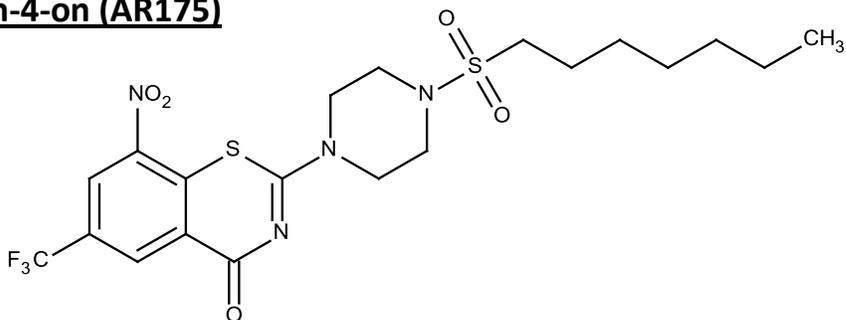
MS (ESI) 330.85 [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ]

$R_f$  0.42 (Chloroform/MeOH 9:1)

$M_r = 307.48$  g/mol

$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2$

**7.1.2.68 2-[4-(Heptan-1-sulfonyl)piperazin-1-yl]-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR175)**



2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäurechlorid wird aus 2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR96**) (0.145 g, 0.54 mmol, 1.1 Äq.) nach der allgemeinen Methode 1 hergestellt.

Die Synthese von **AR175** erfolgt nach der allgemeinen Methode 3, unter Verwendung von 4-(Heptan-1-sulfonyl)piperazin-1-thioharnstoff (**AR173**) (0.150 g, 0.49 mmol, 1.0 Äq.). Die Reinigung erfolgt mit Hilfe der MPLC (Puriflash System, EtAc/Heptan Gradient).

hellgelber Feststoff

Ausbeute 234 mg (91 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.09 (d, Ar-H,  $^4J = 2.2$  Hz, 1H), 8.78 (d, Ar-H,  $^4J = 2.2$  Hz, 1H), 4.12 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 4H), 3.47 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 4H), 2.95 (m,  $\text{SO}_2\text{-CH}_2$ , 2H), 1.81 (m,  $\text{CH}_2$ , 2H), 1.42 (m,  $\text{CH}_2$ , 2H), 1.29 (m,  $\text{CH}_2$ , 6H), 0.88 (m,  $\text{CH}_3$ , 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.3, 162.7, 143.9, 133.5 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 133.4, 130.1 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 35.9$  Hz), 126.6, 126.2 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 122.3 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 273.1$  Hz), 50.4, 46.5, 45.4, 31.4, 28.7, 28.3, 23.1, 22.5, 14.0

MS (APCI) 523.2  $[\text{M}+\text{H}^+]$

HR MS 523.1279  $[\text{M}+\text{H}^+]$ , berechnet für  $[\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_5\text{S}_2]^+$  523.1296, 545.1098  $[\text{M}+\text{Na}^+]$ , berechnet für  $[\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_5\text{SNa}]^+$  545.1116

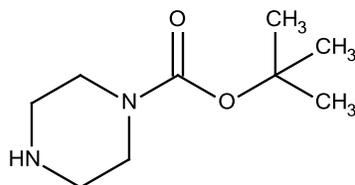
$R_f$  0.42 (Chloroform/MeOH 98:2)

Smp.: 105 °C

$M_r = 522.56$  g/mol

$\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_5\text{S}_2$

### 7.1.2.69 tert-Butylpiperazin-1-carboxylat (AR179)



Zur Synthese von **AR179** werden Piperazin (2000 mg, 23.26 mmol, 1.0 Äq.) und Triethylamin (4.837 ml, 34.90 mmol, 1.5 Äq.) in MeOH (20 ml) gelöst, dazu wird Di-tert-butylcarbonat (2028 mg, 9.30 mmol, 0.4 Äq.) langsam zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird anschließend bei RT über Nacht gerührt.

Nach abgeschlossener Reaktion wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Chloroform/MeOH 9:1).

farbloses Öl

Ausbeute 1486 mg (86 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.36 (t,  $\text{CH}_2\text{-N(CO)-CH}_2$ ,  $^2J = 5.1$  Hz, 4H), 2.78 (t,  $\text{CH}_2\text{-NH-CH}_2$ ,  $^2J = 5.1$  Hz, 4H), 1.74 (bs,  $\text{CH}_2\text{-NH-CH}_2$ , 1H), 1.44 (s, t-butyl, 9H)

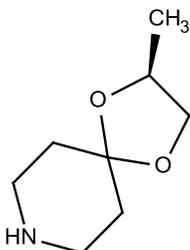
MS (ESI) 187.36 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]

$R_f$  0.25 (Chloroform/MeOH 9:1)

$M_r = 186.25$  g/mol

$\text{C}_9\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$

### **7.1.2.70 (2S)-2-Methyl-1,4-dioxaspiro[4.5]decan (AR180)**



4-Piperidon Monohydrat (995 mg, 6.57 mmol, 1Äq.) und (2S)-Propan-1,2-diol (0.500 mg, 6.57 mmol, 1 Äq.) werden in Anisol (50 ml) gelöst. Nach Zugabe von p-Toluensulfonsäure Monohydrat (0.125 mg, 0.66 mmol, 0.1 Äq.) wird das Reaktionsgemisch für 4 h am Wasserabscheider gekocht. Anschließend wird das Anisol am Rotationsverdampfer entfernt und das erhaltene Rohprodukt in Lake suspendiert. Nach Zusatz von NaOH Lösung (2 N, pH 12) wird das Produkt mit Diethylether (sechsmal) aus der wässrigen Phase extrahiert. Die Etherphasen werden vereinigt, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

hellgelbes Öl

Ausbeute 186 mg (15 %)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.22 (m, CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>3</sub>, 1H), 4.05 (dd, CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>3</sub>, <sup>2</sup>J = 7.8 Hz, 1H), 3.44 (t, CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>3</sub>, <sup>2</sup>J = 7.8 Hz, 1H), 2.92 (m, CH<sub>2</sub>-N-CH<sub>2</sub>, 4H), 1.87 (bs, N-H, 1H), 1.67 (m, CH<sub>2</sub>-C-CH<sub>2</sub>, 4H), 1.27 (d, CH<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, 3H)

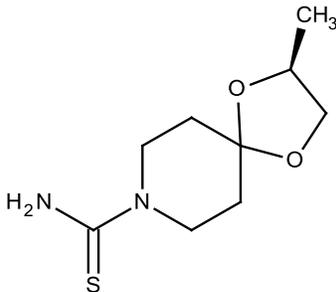
MS (APCI) 158.2 [M+H<sup>+</sup>]

R<sub>f</sub> 0.12 (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 98:2:1)

M<sub>r</sub> = 157,21 g/mol

C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>

### 7.1.2.71 (2S)-2-methyl-1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]decane-8-thioharnstoff (AR181)



Getrocknetes NaSCN (338 mg, 4.16 mmol, 1.0 Äq.) wird in Aceton (10 ml) suspendiert, unter Schutzgas gesetzt und auf 5 °C gekühlt. Benzoylchlorid (0.480 ml, 4.16 mmol, 1.0 Äq.) wird langsam zugegeben und das Reaktionsgemisch wird für 3.5 h bei 5 °C gerührt. Anschließend erfolgt die Zugabe von (2S)-2-Methyl-1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]decan (**AR180**) (186 mg, 4.16 mmol, 1.0 Äq.) gelöst in Aceton (5 ml) bei 12 °C, danach wird das Reaktionsgemisch bei RT über Nacht gerührt. Nach der Reaktion wird das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und der Rückstand in 19 ml MeOH/Wasser Gemisch (3:1) gelöst und mit K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1152 mg, 8.34 mmol, 1.0 Äq.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird für 24 h unter Rückfluss erhitzt. Nach abgeschlossener Reaktion wird der Feststoff durch Filtration entfernt und das Lösungsmittel im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wird in Lake suspendiert und die wässrige Phase wird mit EtAc extrahiert (dreimal). Die organischen Phasen werden gesammelt, getrocknet (MgSO<sub>4</sub>) und eingengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (TBME).

weißer Feststoff

Ausbeute 111 mg (43 %)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.07 (bs, N-H, 2H), 4.23 (m; CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>3</sub>, 1H), 4.06 (dd, CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>3</sub>, <sup>2</sup>J = 8.0 Hz, 1H), 3.88 (m, CH<sub>2</sub>-N-CH<sub>2</sub>, 4H), 3.44 (t, CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>3</sub>, <sup>2</sup>J = 7.8 Hz, 1H), 1.76 (m, CH<sub>2</sub>-C-CH<sub>2</sub>, 4H), 1.26 (d, CH<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 6.1 Hz, 3H)

<sup>13</sup>C-NMR (125 Hz, CD<sub>3</sub>OD) δ 181.5, 106.4, 72.3, 70.7, 46.3, 36.0, 34.8, 18.4

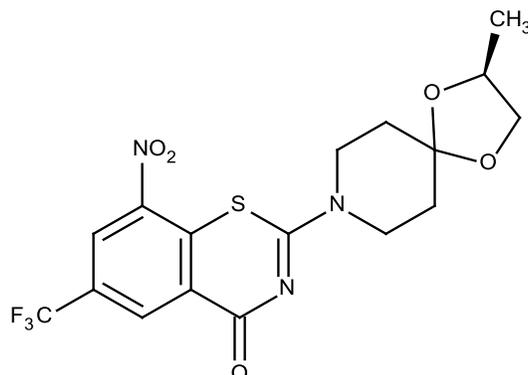
MS (APCI) 217.1 [M+H<sup>+</sup>]

R<sub>f</sub> 0.13 (TBME)

M<sub>r</sub> = 216.30 g/mol

C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S

**7.1.2.72 2-[(2S)-2-methyl-1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]decan-8-yl]-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR182)**



2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäurechlorid wird aus 2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR96**) (0.57 g, 0.21 mmol, 1.0 Äq.) nach der allgemeinen Methode 1 hergestellt, wobei Toluol durch Anisol ersetzt wird.

Die Synthese von **AR182** erfolgt nach der allgemeinen Methode 3 in Anisol an Stelle von Toluol, unter Verwendung von (2S)-2-Methyl-1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]decane-8-thioharnstoff (**AR181**) (0.47 g, 0.21 mmol, 1.0 Äq.). Das Rohprodukt wird chromatographisch aufgearbeitet (LM TBME).

Gelber Feststoff

Ausbeute 66 mg (73 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.08 (d, Ar-H,  $^3J = 1.6$  Hz, 1H), 8.74 (d, Ar-H,  $^3J = 1.8$  Hz, 1H), 4.29 (m,  $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_3$ , 1H), 4.11 (dd,  $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_3$ ,  $^2J = 8.0$  Hz, 1H), 4.05 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 4H), 3.50 (t,  $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_3$ ,  $^2J = 8.0$  Hz, 1H), 1.85 (m,  $\text{CH}_2\text{-C-CH}_2$ , 4H), 1.31 (d,  $\text{CH}_3$ ,  $^3J = 6.1$  Hz, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 Hz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.5, 161.8, 143.9, 134.1, 133.3, 129.6 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 35.1$  Hz), 126.6, 125.9, 122.4 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 273.1$  Hz), 106.3, 72.5, 70.9, 44.6, 36.4, 35.2, 18.3

MS (APCI) 432.2 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]

HR MS 432.0829 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ], berechnet für  $[\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_5\text{S}]^+$  432.0841, 454.0646 [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ],

berechnet für  $[\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_5\text{SNa}]^+$  454.0660

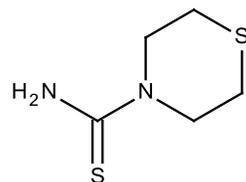
$R_f$  0.43 (TBME)

Smp.: 190-192 °C

$M_r = 431.39$  g/mol

$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$

### 7.1.2.73 Thiomorpholin-4-thioharnstoff (AR183)



Getrocknetes NaSCN (389 mg, 4.80 mmol, 1.0 Äq.) wird in Aceton (10 ml) suspendiert, unter Argon gesetzt und auf 5 °C gekühlt. Benzoylchlorid (0.675 ml, 4.80 mmol, 1.0 Äq.) wird langsam zugegeben und das Reaktionsgemisch wird für 3 h bei 5 °C gerührt. Anschließend erfolgt die Zugabe von Thiomorpholin (500 mg, 4.80 mmol, 1.0 Äq.) gelöst in Aceton (5 ml) bei 12 °C, anschließend wird das Reaktionsgemisch bei RT über 4 h gerührt.

Nach der Reaktion wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in 36 % HCl (7.0 ml) gelöst und für 1.5 h auf 95 °C erhitzt. Anschließend wird die wässrige Lösung mit Ammoniak Lsg. 36 % neutralisiert und dreimal mit DCM extrahiert. Die organischen Phasen werden gesammelt, mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (EtAc/Heptan 1:1).

weißer Feststoff

Ausbeute 270 mg (35 %)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.48 (bs, NH<sub>2</sub>, 2H), 4.11 (s, CH<sub>2</sub>-N-CH<sub>2</sub>, 4H), 2.74 (m, CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>, 4H)

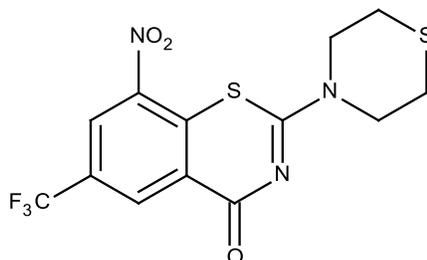
MS (APCI) 163.0 [M+H<sup>+</sup>]

R<sub>f</sub> 0.26 (TBME)

M<sub>r</sub> = 162.28 g/mol

C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>

**7.1.2.74 8-Nitro-2-(thiomorpholin-4-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR184)**



2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäurechlorid wird aus 2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR96**) (0.332 g, 1.23 mmol, 1.0 Äq.) nach der allgemeinen Methode 1 hergestellt.

Die Synthese von **AR184** erfolgt nach der allgemeinen Methode 3, unter Verwendung von Thiomorpholin-4-thioharnstoff (**AR183**) (0.200 g, 1.23 mmol, 1.0 Äq.). Das Rohprodukt wird durch Umkristallisation aus Aceton aufgearbeitet.

gelber Feststoff

Ausbeute 260 mg (56 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.10 (d, Ar-H,  $^4J = 1.6$  Hz, 1H), 8.77 (d, Ar-H,  $^4J = 1.6$  Hz, 1H), 4.31 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 4H), 2.81 (m,  $\text{CH}_2\text{-S-CH}_2$ , 4H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.3, 162.1, 143.9, 133.8, 133.4, 129.9 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 35.9$  Hz), 126.6, 126.1 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 122.3 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 273.1$  Hz), 49.7, 27.6

MS (APCI) 378.1 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]

HR MS 400.0000 [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ], berechnet für [ $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{S}_2\text{Na}$ ] $^+$  400.0013

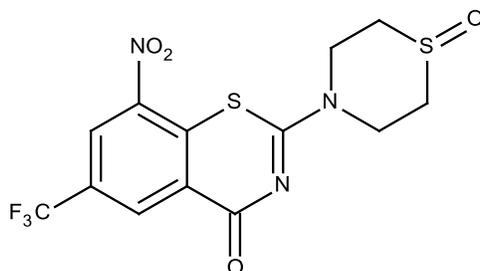
$R_f$  0.84 (Chloroform/MeOH 98:2)

Smp.: 158 - 160 °C

$M_r = 377.36$  g/mol

$\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{S}_2$

**7.1.2.75 8-Nitro-2-(1-oxo-1λ<sup>4</sup>,4-thiomorpholin-4-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR185)**



In 15 ml Wasser wird NaIO<sub>4</sub> (0.06 mg, 0.28 mmol, 1.05 Äq.) gelöst und mit Hilfe eines Eisbades auf 0 °C gekühlt. Nun erfolgt die Zugabe von 8-Nitro-2-(thiomorpholin-4-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (**AR184**) gelöst in 5 ml MeOH, das Reaktionsgemisch wird für 4 h bei 0 °C belassen und anschließend 65 h im Kühlschrank aufbewahrt.

Die wässrige Phase wird dreimal mit Chloroform extrahiert, die organischen Phasen gesammelt, mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (Chloroform/MeOH 95:5).

hellgelber Feststoff

Ausbeute 67 mg (64 %)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.11 (d, Ar-H, <sup>4</sup>J = 2.2 Hz, 1H), 8.80 (d, Ar-H, <sup>4</sup>J = 2.2 Hz, 1H), 4.59 (bs, CH<sub>2</sub>-N-CH<sub>2</sub>, 4H), 3.04 (m, CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>, 2H), 2.81 (m, CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>, 2H)

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 166.3, 162.4, 144.0, 133.6 (q, <sup>2</sup>J<sub>C,F</sub> = 3.8 Hz), 133.3, 130.3 (q, <sup>2</sup>J<sub>C,F</sub> = 35.3 Hz), 126.8, 126.4 (q, <sup>3</sup>J<sub>C,F</sub> = 3.8 Hz), 121.4 (q, <sup>1</sup>J<sub>C,F</sub> = 273.7 Hz), 45.4, 37.4

MS (APCI) 394.1 [M+H<sup>+</sup>]

HR MS 394.0138 [M+H<sup>+</sup>], berechnet für [C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 394.0143, 415.9958 [M+Na<sup>+</sup>], berechnet für [C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>Na]<sup>+</sup> 415.9962

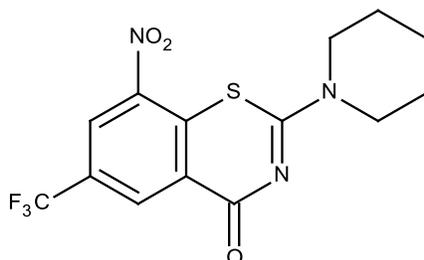
R<sub>f</sub> 0.55 (Chloroform/MeOH 98:2)

Smp.: 288 - 291 °C

M<sub>r</sub> = 393.36 g/mol

C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>

**7.1.2.76 8-Nitro-2-(piperidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on**  
**(AR187)**



2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäurechlorid wird aus 2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR96**) (1.116 g, 4.14 mmol, 1.0 Äq.) nach der allgemeinen Methode 1 hergestellt.

Die Synthese von **AR187** erfolgt nach der allgemeinen Methode 3, unter Verwendung von Piperidin-1-thioharnstoff (**AR116**) (0.597 g, 4.14 mmol, 1.0 Äq.).

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (Chloroform).

gelber Feststoff

Ausbeute 1105 mg (74 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.09 (d, Ar-H,  $^4J = 2.5$  Hz, 1H), 8.74 (d, Ar-H,  $^4J = 2.5$  Hz, 1H), 3.97 (bs, N- $\text{CH}_2$ , 4H), 1.77 (m,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ , 6H)

MS (APCI) 360.2 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]

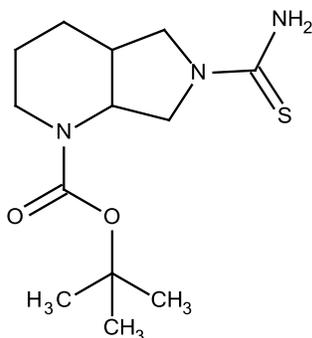
$R_f$  0.42 (Chloroform)

Smp.: 138 - 142 °C

$M_r = 359.32$  g/mol

$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$

### 7.1.2.77 tert-Butyl 6-Thioharnstoff-octahydro-1H-pyrrolo[3,4-b]pyridin-1-carboxylat (AR188)



Die Herstellung von **AR188** erfolgt nach der allgemeinen Methode 2, unter Verwendung von tert-Butyloctahydro-1H-pyrrolo[3,4-b]pyridin-1-carboxylat (0.500 g, 2.21 mmol, 1.0 Äq.) und Thiocarbonyldiimidazol (0.453 g, 2.54 mmol, 1.15 Äq.). Zu besseren Löslichkeit von tert-Butyloctahydro-1H-pyrrolo[3,4-b]pyridin-1-carboxylat werden den Reaktionsgemisch 3 ml MeOH zugesetzt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (EtAc).

weißlicher Feststoff

Ausbeute 397 mg (63 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  4.69 (bs, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 1H), 3.90 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 2H), 3.56 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 2H), 3.35 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 1H), 2.81 (bs, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 1H), 2.26 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 1H), 1.75 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 2H), 1.47 (s, t-Boc, 9H), 1.36 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 2H)

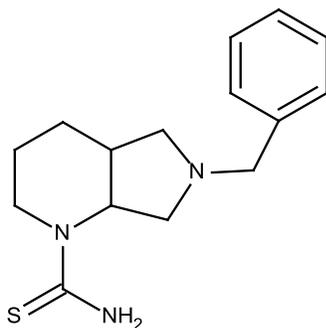
MS (ESI) 285.99  $[\text{M}+\text{H}^+]$ , 303.03  $[\text{M}+\text{Na}^+]$

$R_f$  0.39 (EtAc)

$M_r = 285.41$  g/mol

$\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$

### 7.1.2.78 6-Benzyl-octahydro-1H-pyrrolo[3,4-b]pyridin-1-thioharnstoff (AR189)



Die Herstellung von **AR189** erfolgt nach der allgemeinen Methode 2, unter Verwendung von 6-Benzyl-octahydro-1H-pyrrolo[3,4-b]pyridin (0.140 g, 0.64 mmol, 1.0 Äq.) und Thiocarbonyldiimidazol (0.131 g, 0.73 mmol, 1.15 Äq.). Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 90:10:1).

weißlicher Feststoff

Ausbeute 95 mg (54 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.26 (m, Ar-H, 5H), 5.97 (bs,  $\text{NH}_2$ , 2H), 5.15 (bs, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 1H), 4.19 (bs, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 1H), 3.68 (d, N- $\text{CH}_2$ -Ar,  $^2J = 13.1$  Hz, 1H), 3.60 (d, N- $\text{CH}_2$ -Ar,  $^2J = 13.1$  Hz, 1H), 3.12 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 1H), 2.98 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 1H), 2.78 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 1H), 2.58 (t, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane,  $^3J = 6.8$  Hz, 1H), 2.52 (dd, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane,  $^3J = 9.2$  Hz,  $^4J = 2.0$  Hz, 1H), 2.36 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 1H), 1.86 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 1H), 1.70 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 1H), 1.57 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 2H),

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  182.4, 138.6, 128.6, 128.3, 127.1, 60.3, 59.0, 56.6, 54.7, 44.7, 35.5, 25.6, 22.2

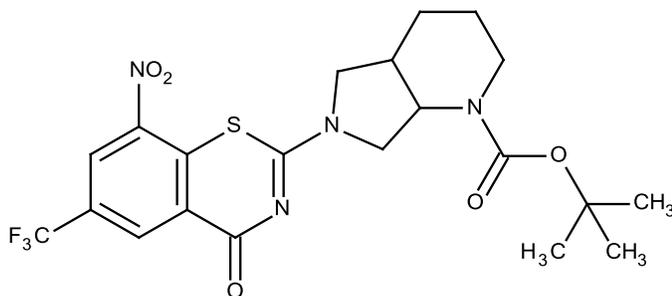
MS (ESI) 276.10 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]

$R_f$  0.67 (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 90:10:1)

$M_r = 275.41$  g/mol

$\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{S}$

**7.1.2.79 tert-Butyl 6-[8-nitro-4-oxo-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-2-yl]-octahydro-1H-pyrrolo[3,4-b]pyridine-1-carboxylate (AR190)**



2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäurechlorid wird aus 2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR96**) (0.215 g, 0.80 mmol, 1.1 Äq.) nach der allgemeinen Methode 1 hergestellt.

Die Synthese von **AR190** erfolgt nach der allgemeinen Methode 3, unter Verwendung von tert-Butyl-6-Thioharnstoff-octahydro-1H-pyrrolo[3,4-b]pyridin-1-carboxylat (**AR188**) (0.205 g, 0.72 mmol, 1.0 Äq.).

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (EtAc/Heptan 1:1).

gelber Feststoff

Ausbeute 180 mg (50 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.06 (m, Ar-H, 1H), 8.69 (d, Ar-H,  $^4J = 1.7$  Hz, 1H), 4.83 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 1H), 4.02 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 2H), 3.77 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 0.5H), 3.72 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 1H), 3.58 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 1H), 3.48 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 0.5H), 2.71 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 1H), 2.34 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 1H), 1.83 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 1H), 1.70 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 1H), 1.44 (s, t-Boc, 5H), 1.42 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 2H), 1.41 (s, t-Boc, 4H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165.9, 161.6, 154.8, 143.6, 134.2, 133.8 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.1$  Hz), 129.7, 126.8, 125.9 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.1$  Hz), 122.4 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 273.1$  Hz), 80.7, 54.7, 52.3, 50.9, 47.0, 44.1, 38.7, 35.3, 33.9, 28.3, 25.3, 23.8

MS (ESI) 522.98  $[\text{M}+\text{Na}^+]$

HR MS 501.1411  $[\text{M}+\text{H}^+]$ , berechnet für  $[\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_5\text{S}]^+$  501.1419

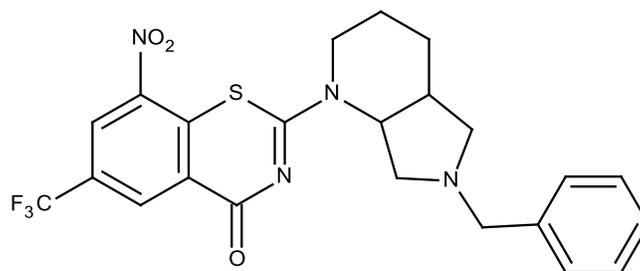
$R_f$  0.18 (EtAc/Heptan 1:1)

Smp.: 113 - 115 °C

$M_r = 500.49$  g/mol

$C_{21}H_{23}F_3N_4O_5S$

**7.1.2.80 2-{6-Benzyl-octahydro-1H-pyrrolo[3,4-b]pyridin-1-yl}-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR191)**



2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäurechlorid wird aus 2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR96**) (0.102 g, 0.38 mmol, 1.1 Äq.) nach der allgemeinen Methode 1 hergestellt.

Die Synthese von **AR191** erfolgt nach der allgemeinen Methode 3, unter Verwendung von tert-6-Benzyl-octahydro-1H-pyrrolo[3,4-b]pyridin-1-thioharnstoff (**AR189**) (0.095 g, 0.34 mmol, 1.0 Äq.). Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (Chloroform/Ammoniak Lsg. 36 % 99:1).

gelber Feststoff

Ausbeute 54 mg (32 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.07 (d, Ar-H,  $^4J = 1.6$  Hz, 1H), 8.72 (m, Ar-H,  $^4J = 1.6$  Hz, 1H), 7.28 (m, Ar-H, 5H), 5.66 (bs, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 0.5H), 5.02 (bs, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 0.5H), 4.80 (bs, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 0.5H), 4.12 (bs, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 0.5H), 3.74 (bs,  $\text{CH}_2\text{-Ar}$ , 1H) 3.65 (m,  $\text{CH}_2\text{-Ar}$ , 1H), 3.41 (bs, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 0.5H), 3.09 (bs, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 0.5H), 3.02 (t, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane,  $^4J = 9.5$  Hz, 1H), 2.69 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 3H) 2.42 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 1H), 1.94 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 4H)

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.2, 162.9, 143.9, 138.6, 134.3, 133.3 (q,  $^3J_{\text{C,F}}=3.8$  Hz), 129.6 (q,  $^2J_{\text{C,F}}=35.3$  Hz), 128.5, 128.3, 127.1, 126.8, 125.9 (q,  $^3J_{\text{C,F}}=3.8$  Hz), 122.4 (q,  $^1J_{\text{C,F}}=272.8$  Hz), 60.0, 58.7, 56.1, 55.0, 54.4, 43.4, 36.4, 35.9, 26.4, 25.7, 22.9, 22.1

MS (ESI) 491.11  $[\text{M}+\text{H}^+]$

HR MS 491.1354  $[\text{M}+\text{H}^+]$ , berechnet für  $[\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{S}]^+$  491.1364

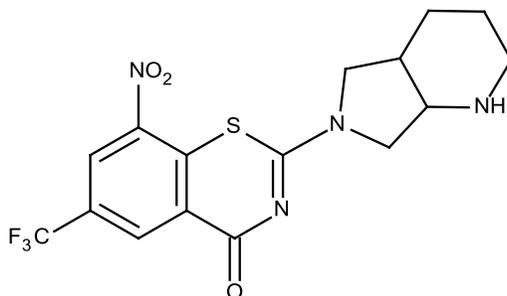
$R_f$  0.05 (Chloroform/Ammoniak Lsg. 36 % 99:1)

Smp.: 147 - 150 °C

$M_r = 490.50$  g/mol

$\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$

### 7.1.2.81 8-Nitro-2-{octahydro-1H-pyrrolo[3,4-b]pyridin-6-yl}-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR192)



tert-Butyl 6-[8-nitro-4-oxo-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-2-yl]-octahydro-1H-pyrrolo[3,4-b]pyridine-1-carboxylate (**AR190**) (0.273 g, 0.55 mmol, 1.0 Äq.) wird in einer Mischung aus 2 ml DCM und 2 ml TFA gelöst und für 1.5 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt und der Reaktionsansatz je dreimal mit Toluol und Chloroform co-evaporiert.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 95:5:1).

gelber glasiger Feststoff

Ausbeute 164 mg (75 %)

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.05 (m, Ar-H, 1H), 8.66 (m, Ar-H, 1H), 3.71 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 4H), 3.40 (m, NH, 1H), 2.94 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 1H),

2.62 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 1H), 2.52 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 1H), 2.39 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 1H), 1.68 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 4H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165.7, 161.0, 143.4, 134.1, 133.5, 129.4, 126.8, 125.7, 122.4 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 273.1$  Hz), 57.9, 56.1, 54.9, 54.6, 51.4, 48.1, 45.2, 44.9, 37.3, 35.5, 22.8, 22.7, 21.1, 20.8

MS (ESI) 401.19  $[\text{M}+\text{H}^+]$

HR MS 401.0879  $[\text{M}+\text{H}^+]$ , berechnet für  $[\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{S}]^+$  401.0895

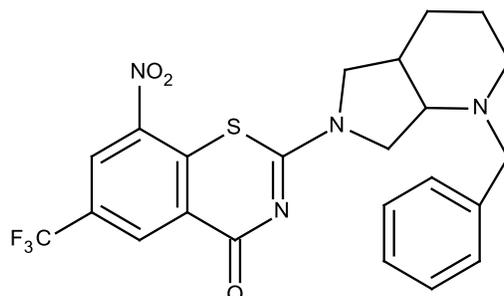
$R_f$  0.32 (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 95:5:1)

Smp.: 85 - 86 °C

$M_r = 400.38$  g/mol

$\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$

### **7.1.2.82 2-{1-Benzyl-octahydro-1H-pyrrolo[3,4-b]pyridin-6-yl}-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR194)**



8-Nitro-2-{octahydro-1H-pyrrolo[3,4-b]pyridin-6-yl}-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (**AR192**) (0.020 g, 0.05 mmol, 1.0 Äq.) wird in einer Mischung aus gleichen Teilen DCM und gesättigter wässriger  $\text{NaCO}_3$  Lösung gelöst.

Zu dieser Lösung wird Benzylbromid (0.011 g, 0.06 mmol, 1.24 Äq.) gegeben und das Reaktionsgemisch für 12 h bei RT belassen. Die wässrige Phase wird anschließend dreimal mit DCM extrahiert. Die organischen Phasen werden gesammelt, mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Die weitere Reinigung erfolgt säulenchromatographisch (Chloroform/Ammoniak Lsg. 36 % 99:1).

gelber glasiger Feststoff

Ausbeute 18 mg (72 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.17 (m, Ar-H, 1H), 8.76 (m, Ar-H, 1H), 7.25 (m, Ar-H, 5H), 3.82 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, N- $\text{CH}_2$ -Ar, 4H), 3.51 (m, N- $\text{CH}_2$ -Ar, 1H), 3.34 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 1H), 2.72 (bs, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 1H), 2.52 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 1H), 2.31 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 1H), 1.66 (m, 2,8-diazabicyclo[4.3.0]nonane, 5H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165.9, 161.0, 143.6, 138.6, 134.5, 133.7, 129.5 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 35.9$  Hz), 128.8, 128.4, 128.3, 128.2, 127.1, 126.9, 125.8, 122.4 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 273.1$  Hz), 61.9, 60.2, 59.6, 59.5, 52.6, 51.6, 50.4, 50.0, 49.7, 48.4, 37.7, 36.1, 23.6, 22.1

MS (ESI) 491.10  $[\text{M}+\text{H}^+]$ , 513.06  $[\text{M}+\text{Na}^+]$

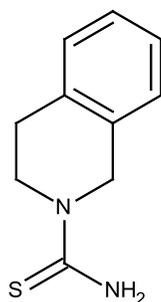
HR MS 491.1346  $[\text{M}+\text{H}^+]$ , berechnet für  $[\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{S}]^+$  491.1365

$R_f$  0.14 (Chloroform/Ammoniak Lsg. 36 % 99:1)

$M_r = 490.50$  g/mol

$\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$

### 7.1.2.83 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-2-thioharnstoff (AR195)



Die Herstellung von **AR195** erfolgt nach der allgemeinen Methode 2, unter Verwendung von 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin (0.750 g, 5.63 mmol, 1.0 Äq.) und Thiocarbonyldimidazol (1.154 g, 6.48 mmol, 1.15 Äq.). Das Rohprodukt wird aus Diisopropylether/Isopropanol 1:1 umkristallisiert.

weißlicher Feststoff

Ausbeute 610 mg (56 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.18 (m, Ar-H, 4H), 4.89 (bs, N- $\text{CH}_2$ , 2H), 3.95 (bs, N- $\text{CH}_2$ , 2H), 2.91 (t,  $\text{CH}_2$ ,  $^3J = 5.9$  Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  180.7, 134.8, 127.7, 126.7, 126.2, 125.8, 49.2, 45.7, 28.2

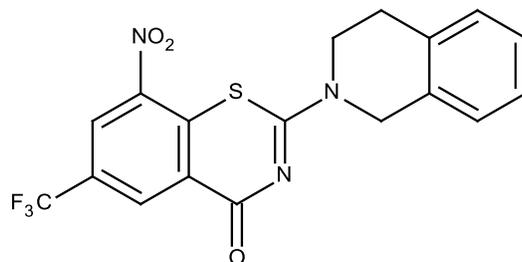
MS (ESI) 191.21 [ $\text{M-H}^+$ ]

$R_f$  0.20 (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 98:2:1).

$M_r = 192.28$  g/mol

$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{S}$

### **7.1.2.84 8-Nitro-2-(1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR196)**



2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäurechlorid wird aus 2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR96**) (0.463 g, 1.72 mmol, 1.1 Äq.) nach der allgemeinen Methode 1 hergestellt.

Die Synthese von **AR196** erfolgt nach der allgemeinen Methode 3, unter Verwendung von 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-2-thioharnstoff (**AR195**) (0.300 g, 1.56 mmol, 1.0 Äq.).

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (Chloroform).

hellgelber Feststoff

Ausbeute 438 mg (69 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.13 (d, Ar-H,  $^4J = 2.0$  Hz, 1H), 8.77 (d, Ar-H,  $^4J = 2.0$  Hz, 1H), 7.25 (m, Ar-H, 4H), 5.08 (m, N- $\text{CH}_2$ , 2H), 4.17 (m, N- $\text{CH}_2$ , 2H), 3.07 (m,  $\text{CH}_2$ , 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.1, 162.3, 143.9, 134.6, 134.1, 133.7, 133.5 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 131.8, 129.7 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 35.8$  Hz), 128.7, 128.0, 127.7, 127.2, 126.6, 126.8, 126.0 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 122.4 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 273.1$  Hz), 48.2, 44.6, 28.7

MS (ESI) 408.09 [M+H<sup>+</sup>]

HR MS 430.0438 [M+Na<sup>+</sup>], berechnet für [C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>SNa]<sup>+</sup> 430.0449

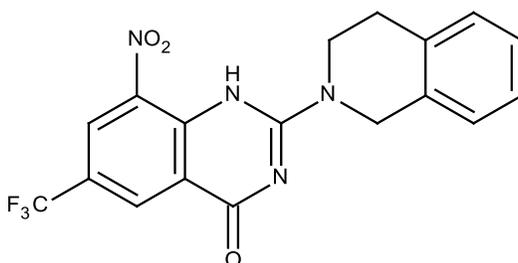
R<sub>f</sub> 0.46 (Chloroform)

Smp.: 221 - 222 °C

M<sub>r</sub> = 407.37 g/mol

C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S

**7.1.2.85 8-Nitro-2-(1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)-6-(trifluormethyl)-1,4-dihydrochinazolin-4-on (AR199)**



2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäurechlorid wird aus 2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR96**) (0.098 g, 0.36 mmol, 1.1 Äq.) nach der allgemeinen Methode 1 hergestellt.

Die Synthese von **AR199** erfolgt nach der allgemeinen Methode 3, unter Verwendung von 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-2-guanidin hydroiodid (0.100 g, 0.33 mmol, 1.0 Äq.). Für eine vollständige Reaktion wird Diazabicycloundecen (DBU) (0.039 g, 0.27 mmol, 0.82 Äq.) als Hilfsbase zugesetzt und 3 h in Toluol unter Rückfluss gekocht.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (Chloroform/MeOH 99:1).

leuchtend gelber Feststoff

Ausbeute: 10 mg (8 %)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.55 (s, Ar-H, 1H), 8.29(s, Ar-H, 1H), 7.26 (m, Ar-H, 4H), 4.99 (bs, N-CH<sub>2</sub>, 2H), 4.07 (t, N-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 5.7 Hz, 2H), 3.08 (t, CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 5.7 Hz, 2H)

$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  163.4, 151.3, 134.2, 131.7 (q,  $^3J_{\text{C,F}}=3.1$  Hz), 128.7, 128.4, 127.6, 127.0, 126.6 (q,  $^3J_{\text{C,F}}=3.8$  Hz), 126.4, 123.4, 122.9 (q,  $^1J_{\text{C,F}}=271.6$  Hz), 122.8, 118.6, 46.6, 42.9, 28.5

MS (ESI) 389.40  $[\text{M}-\text{H}^+]$

HR MS 391.1002  $[\text{M}+\text{H}^+]$ , berechnet für  $[\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3]^+$  391.1017, 413.0821  $[\text{M}+\text{Na}^+]$ , berechnet für  $[\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{Na}]^+$  413.0837

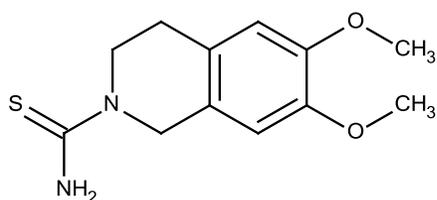
$R_f$  0.27 (Chloroform/MeOH 99:1)

Smp.: 256 - 258 °C

$M_r = 390.32$  g/mol

$\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3$

### **7.1.2.86 6,7-Dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-thioharnstoff (AR201)**



Die Herstellung von **AR201** erfolgt nach der allgemeinen Methode 2, unter Verwendung von 6,7-Dimethoxy-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin (0.721 g, 3.73 mmol, 1.0 Äq.) und Thiocarbonyldiimidazol (0.765 g, 4.29 mmol, 1.15 Äq.). Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 98:2:1).

bräunlicher Feststoff

Ausbeute 218 mg (23 %)

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  6.78 (s, Ar-H, 1H), 6.74 (s, Ar-H, 1H), 4.84 (bs, N- $\text{CH}_2$ , 2H, Wasser Signal), 3.95 (m, N- $\text{CH}_2$ , 2H), 3.80 (s, O- $\text{CH}_3$ , 3H), 3.79 (s, O- $\text{CH}_3$ , 3H), 2.84 (t,  $\text{CH}_2$ ,  $^3J = 5.9$  Hz, 2H)

$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  180.6, 148.1, 148.0, 127.0, 111.4, 109.6, 55.2, 55.1, 48.9, 45.7, 27.7

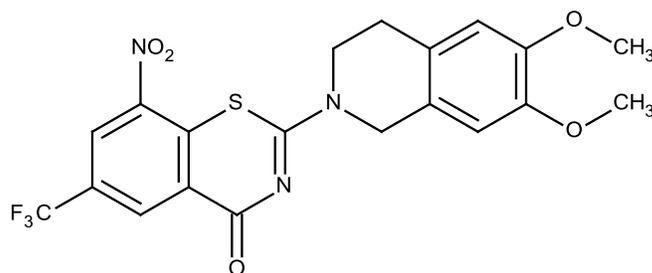
MS (APCI) 253.1  $[\text{M}+\text{H}^+]$

$R_f$  0.26 (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 98:2:1)

$M_r = 252.33$  g/mol

$C_{12}H_{16}N_2O_2S$

**7.1.2.87 2-(6,7-Dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR204)**



2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäurechlorid wird aus 2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR96**) (0.229 g, 0.85 mmol, 1.1 Äq.) nach der allgemeinen Methode 1 hergestellt.

Die Synthese von **AR204** erfolgt nach der allgemeinen Methode 3, unter Verwendung von 6,7-Dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-thioharnstoff (**AR201**) (0.194 g, 0.77 mmol, 1.0 Äq.). Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (Chloroform) und aus EtOH unkristallisiert.

gelber Feststoff

Ausbeute 137 mg (38 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.13 (d, Ar-H,  $^4J = 1.6$  Hz, 1H), 8.77 (d, Ar-H,  $^4J = 1.6$  Hz, 1H), 6.71 (s, Ar-H, 1H), 6.68 (s, Ar-H, 1H), 5.02 (m, N- $\text{CH}_2$ , 2H), 4.19 (m, N- $\text{CH}_2$ , 2H), 3.87 (s, O- $\text{CH}_3$ , 6H), 2.98 (m,  $\text{CH}_2$ , 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.2, 162.2, 148.3, 143.9, 134.2, 133.5 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 129.8 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 35.8$  Hz), 126.9, 126.0 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 125.3, 123.8, 122.4 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 273.1$  Hz), 111.2, 109.4, 56.2, 56.0, 48.0, 44.7, 28.1

MS (APCI) 468.2 [ $\text{M} + \text{H}^+$ ]

HR MS 468.0841 [M+H<sup>+</sup>], berechnet für [C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S]<sup>+</sup> 468.0841, 490.0660, berechnet für [C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>SNa]<sup>+</sup> 490.0661

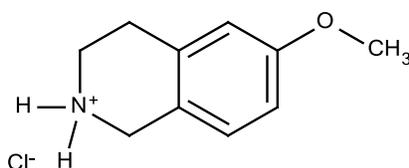
R<sub>f</sub> 0.46 (TBME)

Smp.: 199 - 202 °C

M<sub>r</sub> = 467.42 g/mol

C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S

### **7.1.2.88 6-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolinhydrochlorid (AR205)**



2-(3-Methoxyphenyl)ethan-1-amin (1.410 mg, 9.32 mmol, 1.0 Äq.) wird in 45 ml MeOH gelöst, mit 3 ml 36 %iger HCl versetzt und 30 Minuten bei RT belassen. Anschließend erfolgt die tropfenweise Zugabe von 45 ml Formaldehyd Lösung 37 % und das Reaktionsgemisch wird für 3 h unter Rückfluss erhitzt.

Anschließend wird das Reaktionsgemisch mit 5 N NaOH Lösung auf pH = 14 eingestellt und dreimal mit Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen werden gesammelt, mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das erhaltene Zwischenprodukt wird in Isopropanol (6 ml) gelöst, mit 0.72 ml 36 %iger HCl versetzt und für 68 h bei RT belassen.

Anschließend werden den Reaktionsgemisch 3 ml TBME zugesetzt und nach 4 h bei RT wird das ausgefallene Produkt abfiltriert, welches noch mit 10 ml TBME/Isopropanol 1:1 Mischung gewaschen wird.

weißer Feststoff

Ausbeute 1059 mg (57 %)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.66 (bs, NH<sub>2</sub>, 2H), 7.12 (d, Ar-H, <sup>3</sup>J = 8.6 Hz, 1H), 6.82 (dd, Ar-H, <sup>3</sup>J = 8.6 Hz, <sup>4</sup>J = 2.2 Hz, 1H), 6.79 (s, Ar-H, 1H), 4.13 (bs, N-CH<sub>2</sub>, 2H), 3.73 (s, CH<sub>3</sub>, 3H), 3.29 (bs, CH<sub>2</sub>-N, 2H), 2.98 (t, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 6.4 Hz, 2H)

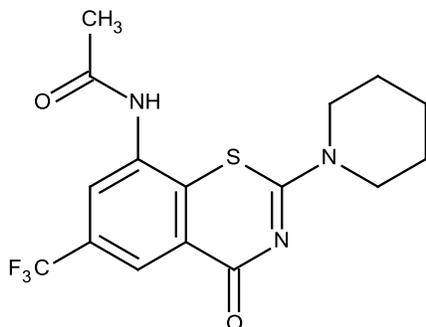
MS (ESI) 164.22 [M+H<sup>+</sup>]

$R_f$  0.40 (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 90:10:1)

$M_r$  = 198,52 g/mol (als Hydrochlorid), 163.22 g/mol (als freie Base)

$C_{10}H_{14}NOCl$

### 7.1.2.89 N-[4-Oxo-2-(piperidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-8-yl]acetamid (AR207)



Zu Synthese von **AR207** wird 8-Amino-2-(piperidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (**AR81**) (0.150 g, 0.46 mmol, 1.0 Äq.) in THF (2 ml) gelöst und mit Acetylchlorid (0.121 g, 1.54 mmol, 3.3 Äq.) versetzt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch für 1 h unter Rückfluss erhitzt. Nachdem das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt wurde, kann das Produkt mit Hilfe von Säulenchromatographie (LM Chloroform/MeOH 98:2) gereinigt werden.

weißer Feststoff

Ausbeute 121 mg (72 %)

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.64 (bs, NH, 1H), 8.48 (s, Ar-H, 1H), 7.91 (s, Ar-H, 1H), 3.71 (bs,  $CH_2$ -N- $CH_2$ , 4H), 2.28 (s,  $CH_3$ , 3H), 1.69 (m,  $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ , 2H), 1.59 (bs,  $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ , 4H)

$^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  169.9, 168.8, 160.9, 134.1, 133.1, 129.4 (q,  $^2J_{C,F}$  = 33.6 Hz), 126.1, 124.4, 124.0, 123.2 (q,  $^1J_{C,F}$  = 272.4 Hz), 47.5, 25.6, 24.1, 23.5

MS (APCI) 372.3  $[M+H]^+$

HR MS 372.0977  $[M+H]^+$ , berechnet für  $[C_{16}H_{17}F_3N_3O_2S]^+$  372.0993

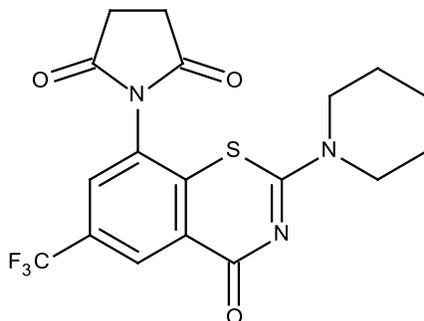
$R_f$  0.24 (Chloroform/MeOH 98:2)

Smp.: 185-187 °C

$M_r$  = 371.38 g/mol

$C_{16}H_{16}F_3N_3O_2S$

**7.1.2.90 1-[4-Oxo-2-(piperidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-8-yl]pyrrolidin-2,5-dion (AR208)**



Zu Synthese von **AR208** wird 8-Amino-2-(piperidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (**AR81**) (0.219 g, 0.66 mmol, 1.0 Äq.) in Essigsäure 5 ml gelöst und eine Lösung von Bernsteinsäureanhydrid (0.066 g, 0.66 mmol, 1.0 Äq.) in Essigsäure (5 ml) tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird anschließend für 5 h unter Rückfluss erhitzt. Die Reinigung erfolgt mit Hilfe der MPLC (Puriflash System, EtAc/Heptan Gradient).

weißer Feststoff

Ausbeute 35 mg (13 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.82 (s, Ar-H, 1H), 7.59 (d, Ar-H,  $^4J = 2.0$  Hz, 1H), 3.82 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 4H), 3.08 (m,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ , 4H), 1.72 (m,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ , 6H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174.6, 167.4, 159.3, 135.9, 130.2, (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 34.3$  Hz), 129.0, 128.8 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 128.4 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 125.2, 122.9 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 272.8$  Hz), 47.8, 28.8, 25.8, 24.3

MS (APCI) 412.3  $[\text{M}+\text{H}^+]$

HR MS 412.0917  $[\text{M}+\text{H}^+]$ , berechnet für  $[\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{S}]^+$  412.0942

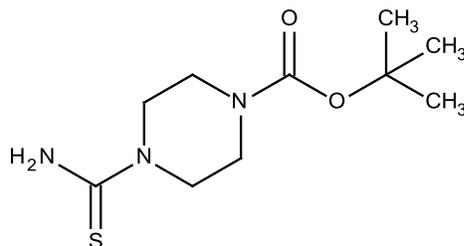
$R_f$  0.27 (EtAc/Heptan 1:1)

Smp.: 307-309 °C

$M_r = 411.4$  g/mol

$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$

### 7.1.2.91 4-Carbamothioylpiperazin-1-carboxylat (AR209)



Die Herstellung von **AR209** erfolgt nach der allgemeinen Methode 2, unter Verwendung von tert-Butylpiperazin-1-carboxylat (**AR179**) (0.341 g, 1.83 mmol, 1.0 Äq.) und Thiocarbonyldiimidazol (0.376 g, 2.11 mmol, 1.15 Äq.). Die Reinigung erfolgt mit Hilfe der MPLC (Puriflash System, Chloroform/MeOH Gradient).

weißer Feststoff

Ausbeute 310 mg (69 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  3.83 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 4H), 3.48 (m,  $\text{CH}_2\text{-NH-CH}_2$ , 4H), 1.47 (s, t-butyl, 9H)

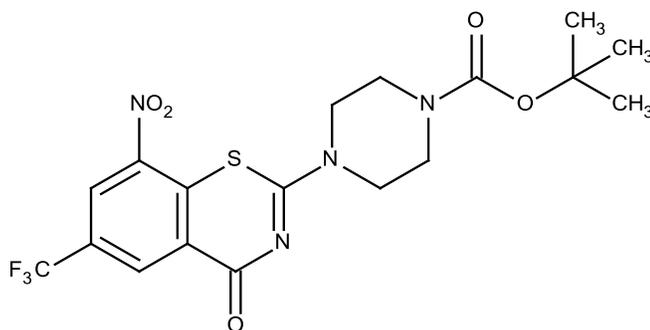
MS (ESI) 268.41 [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ]

$R_f$  0.33 (Chloroform/MeOH 95:5)

$M_r = 245.34$  g/mol

$\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$

### 7.1.2.92 tert-Butyl 4-[8-nitro-4-oxo-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-2-yl]piperazin-1-carboxylat (AR210)



2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäurechlorid wird aus 2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR96**) (2.250 g, 8.4 mmol, 1.1 Äq.) nach der allgemeinen Methode 1 hergestellt.

Die Synthese von **AR210** erfolgt nach der allgemeinen Methode 3, unter Verwendung von 4-Carbamothioylpiperazin-1-carboxylat (**AR209**) (1.863 g, 7.6 mmol, 1.0 Äq.) und unter Zusatz von Hünig Base (3.878 ml, 22.8 mmol, 3.0 Äq.). Die Reinigung erfolgt mit Hilfe der MPLC (Puriflash System, EtAc/Heptan Gradient).

orange-gelber Feststoff

Ausbeute 3000 mg (86 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.09 (d, Ar-H,  $^4J = 2.2$  Hz, 1H), 8.76 (d, Ar-H,  $^4J = 2.2$  Hz, 1H), 4.01 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 4H), 3.61 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 4H), 1.49 (s, t-butyl, 9H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.1, 162.5, 154.2, 143.8, 133.7, 133.3 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 129.7 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 35.9$  Hz), 126.6, 126.0 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 122.1 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 273.1$  Hz), 80.9, 46.1, 43.0, 28.5

MS (APCI) 461.4 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]

HR MS 461.1079 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ], berechnet für  $[\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_5\text{S}]^+$  461.1107, 483.0896 [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ], berechnet für  $[\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_5\text{SNa}]^+$  483.0925

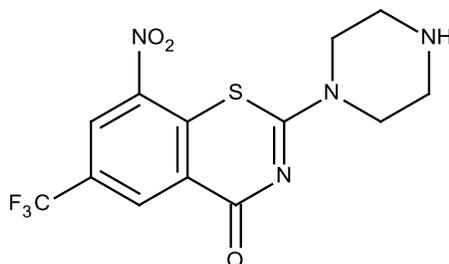
$R_f$  0.66 (EtAc)

Smp.: 218-225 °C

$M_r = 460.43$  g/mol

$\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$

**7.1.2.93 8-Nitro-2-(piperazin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on**  
**(AR211)**



tert-Butyl-4-[8-nitro-4-oxo-6-(trifluormethyl)-4H-thiochromen-2-yl]piperazin-1-carboxylat  
(AR210) (150 mg, 0.33 mmol, 1.0 Äq.) wird in einer Mischung aus 0.5 ml DCM und 0.5 ml TFA  
gelöst und für 1 h bei RT belassen.

Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt und der Reaktionsansatz je dreimal mit Toluol  
und Chloroform co-evaporiert. Die Verbindung **AR211** wird ohne weitere Reinigung für den  
nächsten Reaktionsschritt verwendet.

hellgelber Feststoff

Ausbeute 106 mg (91 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.88 (s, Ar-H, 1H), 8.84 (s, Ar-H, 1H), 4.29 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 4H), 3.49  
(t,  $\text{CH}_2\text{-NH}_2^+\text{-CH}_2$ ,  $^3J = 5.3$  Hz, 4H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  167.3, 164.3, 144.5, 134.0, 131.9 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 129.2 (q,  
 $^2J_{\text{C,F}} = 35.1$  Hz), 126.1 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 125.8, 122.6 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 272.4$  Hz), 42.5

MS (ESI) 361.63 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]

HR MS 361.0560 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ], berechnet für  $[\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{S}]^+$  361.0582

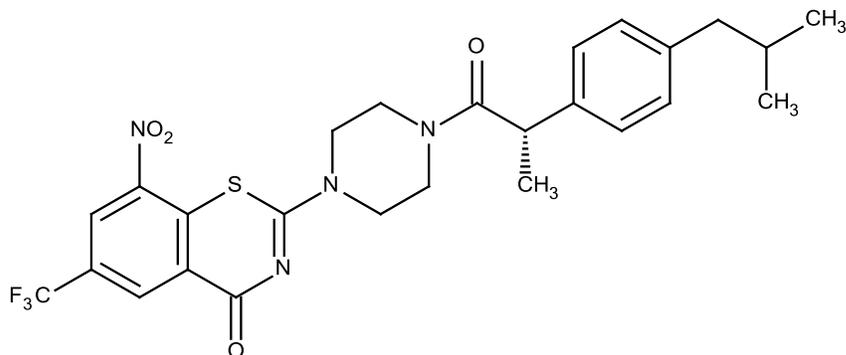
$R_f$  0.63 (Chloroform/MeOH/Ammoniak Lsg. 36 % 90:10:1)

Smp.: 140-141 °C

$M_r = 360.31$  g/mol

$\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$

**7.1.2.94 2-{4-[(2S)-2-[4-(2-Methylpropyl)phenyl]propanoyl]piperazin-1-yl}-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR212)**



Zur Synthese von **AR212** wird (2S)-2-[4-(2-Methylpropyl)phenyl]propansäure (0.068 g, 0.33 mmol, 1.0 Äq.) in 10 ml DCM gelöst. Hünig-Base (0.166 ml, 0.98 mmol, 3.0 Äq.), PyBOP® (0.198 g, 0.38 mmol, 1.15 Äq.) und 8-Nitro-2-(piperazin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (**AR211**) (0.117 g, 0.33 mmol, 1.0 Äq.), gelöst in 5 ml DCM, werden zum Reaktionsgemisch gegeben. Anschließend wird der Ansatz über Nacht bei RT belassen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgt mit Hilfe der MPLC (Puriflash System, EtAc/Heptan Gradient).

gelber Feststoff

Ausbeute 164 mg (91 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.06 (d, Ar-H,  $^4J = 2.0$  Hz, 1H), 8.75 (d, Ar-H,  $^4J = 2.0$  Hz, 1H), 7.14 (d, Ar-H,  $^3J = 8.2$  Hz, 2H), 7.11 (d, Ar-H,  $^3J = 8.2$  Hz, 2H), 4.15 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 3H), 3.84 (q, CO-CH,  $^3J = 6.8$  Hz, 1H), 3.61 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 2H), 3.48 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 2H), 3.06 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 1H), 2.43 (d,  $\text{CH}_2$ ,  $^3J = 7.2$  Hz, 2H), 1.84 (n,  $\text{CH}_2\text{-CH-(CH}_3)_2$ ,  $^3J = 6.8$  Hz, 1H), 1.46 (d,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ ,  $^3J = 6.8$  Hz, 3H), 0.87 (d,  $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$ ,  $^3J = 6.7$  Hz, 6H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.5, 166.1, 162.5, 143.9, 140.8, 138.5, 133.6, 133.4 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 130.0, 129.9 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 35.1$  Hz), 126.8, 126.6, 126.1 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 122.2 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 273.1$  Hz), 46.0, 45.6, 44.9, 44.8, 43.4, 41.4, 30.1, 22.3, 20.5

MS (APCI) 549.1 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]

HR MS 549.1783 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ], berechnet für  $[\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_4\text{S}]^+$  549.1783, 571.1600 [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ], berechnet für  $[\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_4\text{SNa}]^+$  571.1603

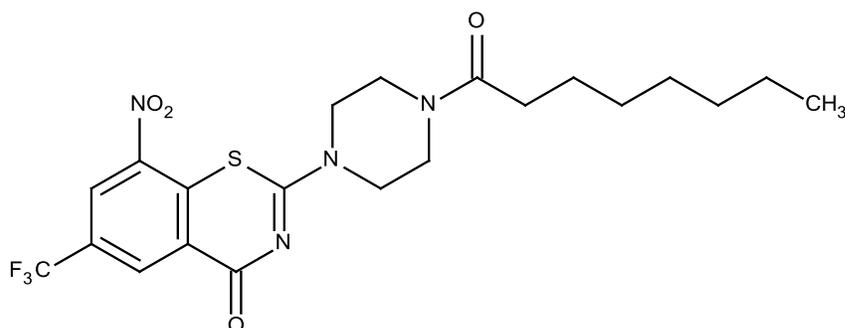
$R_f$  0.43 (EtAc)

Smp.: 80-85 °C

$M_r = 548.58$  g/mol

$C_{26}H_{27}F_3N_4O_4S$

### **7.1.2.95 8-Nitro-2-(4-octanoylpiperazin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR213)**



Zur Synthese von **AR213** wird Caprylsäure (0.048 g, 0.33 mmol, 1.0 Äq.) in 10 ml DCM gelöst. Hünig Base (0.166 ml, 0.98 mmol, 3.0 Äq.), PyBOP® (0.198 g, 0.38 mmol, 1.15 Äq.) und 8-Nitro-2-(piperazin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (**AR211**) (0.117 g, 0.33 mmol, 1.0 Äq.), gelöst in 5 ml DCM, werden zum Reaktionsgemisch gegeben. Anschließend wird der Ansatz über Nacht bei RT belassen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgt mit Hilfe der MPLC (Puriflash System, EtAc/Heptan Gradient).

gelber Feststoff

Ausbeute 106 mg (59 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.08 (d, Ar-H,  $^4J = 2.0$  Hz, 1H), 8.76 (d, Ar-H,  $^4J = 2.0$  Hz, 1H), 4.03 (m,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 4H), 3.81 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 2H), 3.65 (bs,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ , 2H), 2.36 (t,  $\text{CO-CH}_2$ ,  $^3J = 7.6$  Hz, 2H), 1.64 (m,  $\text{CH}_2$ , 2H), 1.30 (m,  $\text{CH}_2$ , 8H), 0.88 (m,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ , 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.0, 166.2, 162.7, 143.9, 133.6, 133.5 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 130.0 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 35.1$  Hz), 126.6, 126.1 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 122.2 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 273.1$  Hz), 46.2, 46.0, 44.7, 40.8, 33.2, 31.7, 29.3, 29.0, 25.1, 22.6, 14.0

MS (APCI) 487.1 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]

HR MS 487.1594 [M+H<sup>+</sup>], berechnet für [C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S]<sup>+</sup> 487.1626

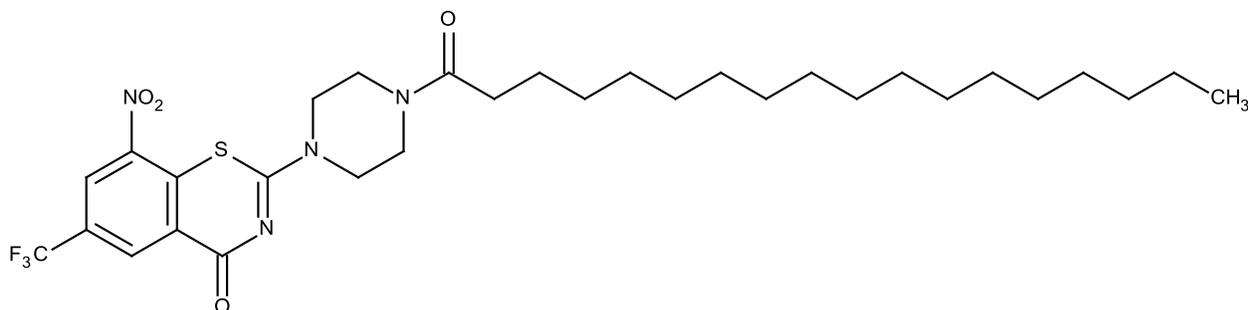
R<sub>f</sub> 0.28 (Chloroform/MeOH 99:1)

Smp.: 140-14 °C

M<sub>r</sub> = 486.51 g/mol

C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S

### **7.1.2.96 8-(Nitro-2-(4-octadecanoylpiperazin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (AR214)**



Zur Synthese von **AR213** wird Stearinsäure (0.062 g, 0.22 mmol, 1.0 Äq.) in 10 ml DCM gelöst. Hünig Base (0.110 ml, 0.65 mmol, 3.0 Äq.), PyBOP® (0.130 g, 0.25 mmol, 1.15 Äq.) und 8-Nitro-2-(piperazin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (**AR211**) (0.078 g, 0.22 mmol, 1.0 Äq.), gelöst in 5 ml DCM, werden zum Reaktionsgemisch gegeben. Anschließend wird der Ansatz über Nacht bei RT belassen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgt mit Hilfe der MPLC (Puriflash System, EtAc/Heptan Gradient).

gelber Feststoff

Ausbeute 71 mg (52 %)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.10 (d, Ar-H, <sup>4</sup>J = 2.0 Hz, 1H), 8.78 (d, Ar-H, <sup>4</sup>J = 2.0 Hz, 1H), 4.05 (m, CH<sub>2</sub>-N-CH<sub>2</sub>, 4H), 3.82 (bs, CH<sub>2</sub>-N-CH<sub>2</sub>, 2H), 3.66 (bs, CH<sub>2</sub>-N-CH<sub>2</sub>, 2H), 2.37 (t, CO-CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 2H), 1.65 (m, CH<sub>2</sub>, 2H), 1.29 (m, CH<sub>2</sub>, 28H), 0.87 (m, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, 3H)

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.2, 166.3, 162.8, 143.9, 133.6, 133.5 (q, <sup>3</sup>J<sub>C,F</sub> = 3.8 Hz), 130.0 (q, <sup>2</sup>J<sub>C,F</sub> = 35.1 Hz), 126.5, 126.2 (q, <sup>3</sup>J<sub>C,F</sub> = 3.8 Hz), 122.2 (q, <sup>1</sup>J<sub>C,F</sub> = 273.1 Hz), 46.2, 46.0, 44.7, 40.8, 33.2, 31.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 25.1, 22.6, 14.1

MS (APCI) 627.3 [M+H<sup>+</sup>]

HR MS 627.3177 [M+H<sup>+</sup>], berechnet für [C<sub>31</sub>H<sub>46</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S]<sup>+</sup> 627.3191, 649.2996 [M+Na<sup>+</sup>],  
berechnet für [C<sub>31</sub>H<sub>45</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>SNa]<sup>+</sup> 649.3011

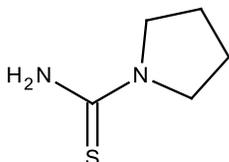
R<sub>f</sub> 0.11 (EtAc/Heptan 1:1)

Smp.: 105-109 °C

M<sub>r</sub> = 626.77 g/mol

C<sub>31</sub>H<sub>45</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S

### 7.1.2.97 Pyrrolidin-1-thioharnstoff (AR215)



Die Herstellung von **AR215** erfolgt nach der allgemeinen Methode 2, unter Verwendung von Pyrrolidin (0.450 g, 6.33 mmol, 1.0 Äq.) und Thiocarbonyldiimidazol (1.300 g, 7.28 mmol, 1.15 Äq.). Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (Chloroform/MeOH 98:2).

weißer Feststoff

Ausbeute 187 mg (21 %)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.71 (bs, NH<sub>2</sub>, 2H), 3.82 (bs, N-CH<sub>2</sub>, 2H), 3.38 (bs, N-CH<sub>2</sub>, 2H), 2.07 (bs, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, 2H), 1.95 (bs, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, 2H)

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 178.5, 52.3, 47.8, 26.5, 25.1

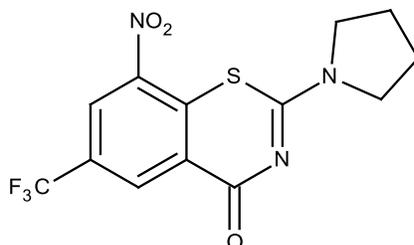
MS (APCI) 131.1 [M+H<sup>+</sup>]

R<sub>f</sub> 0.33 (Chloroform/MeOH 98:2)

M<sub>r</sub> = 130.21 g/mol

C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>S

**7.1.2.98 8-Nitro-2-(pyrrolidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on**  
**(AR216)**



2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäurechlorid wird aus 2-Chlor-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**AR96**) (0.210 g, 0.77 mmol, 1.1 Äq.) nach der allgemeinen Methode 1 hergestellt.

Die Synthese von **AR216** erfolgt nach der allgemeinen Methode 3, unter Verwendung von Pyrrolidin-1-thioharnstoff (**AR215**) (0.100 g, 0.70 mmol, 1.0 Äq.).

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (LM Chloroform) und mit Diisopropylether gewaschen.

gelber Feststoff

Ausbeute 85 mg (34 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.17 (d, Ar-H,  $^4J = 2.2$  Hz, 1H), 8.77 (d, Ar-H,  $^4J = 2.2$  Hz, 1H), 3.93 (t, N- $\text{CH}_2$ ,  $^3J = 6.9$  Hz, 2H), 3.70 (t, N- $\text{CH}_2$ ,  $^3J = 6.9$  Hz, 2H), 2.19 (qi,  $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ,  $^3J = 6.9$  Hz, 2H), 2.06 (bs,  $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ,  $^3J = 6.9$  Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165.9, 160.3, 143.5, 134.6, 133.7 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 129.5 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 35.9$  Hz), 126.9, 125.8 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 122.4 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 273.1$  Hz), 50.4, 47.4, 25.5, 24.1

MS (APCI) 346.2 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]

HR MS 346.0461 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ], berechnet für  $[\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{S}]^+$  346.0473

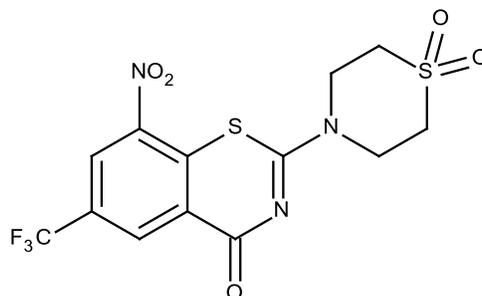
$R_f$  0.44 (Chloroform)

Smp.: 190-195 °C

$M_r = 345.30$  g/mol

$\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$

**7.1.2.99 4-[8-nitro-4-oxo-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-2-yl]-1 $\lambda^6$ ,4-thiomorpholin-1,1-dion (AR217)**



8-Nitro-2-(1-oxo-1 $\lambda^4$ ,4-thiomorpholin-4-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (**AR185**) (0.100 mg, 0.265 mmol, 1.0 Äq.) wird in 5 ml DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Eine Lösung von meta-Chlorperbenzoesäure (m-CPBA) 65 % (0.165 mg, 0.624 mmol, 2.4 Äq.) in 5 ml DCM wird langsam dazu getropft, das Reaktionsgemisch langsam auf RT erwärmt und über Nacht bei RT belassen.

Anschließend wird Lösungsmittel unter Vakuum entfernt, der Rückstand in EtAc aufgenommen und zweimal mit NaHCO<sub>3</sub> Lösung gewaschen. Die organische Phase wird getrocknet (MgSO<sub>4</sub>) und eingeeengt.

Die Aufreinigung erfolgt durch Umkristallisation aus Diisopropylether.

weißlicher Feststoff

Ausbeute 55 mg (51 %)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.12 (d, Ar-H, <sup>4</sup>J = 2.0 Hz, 1H), 8.83 (d, Ar-H, <sup>4</sup>J = 2.0 Hz, 1H), 4.52 (bs, CH<sub>2</sub>-N-CH<sub>2</sub>, 4H), 3.23 (m, CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>, 4H)

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, Aceton D<sub>6</sub>)  $\delta$  165.4, 163.1, 144.7, 134.2, 131.9 (q, <sup>2</sup>J<sub>C,F</sub> = 3.8 Hz), 128.7 (q, <sup>2</sup>J<sub>C,F</sub> = 35.3 Hz), 126.7, 126.1 (q, <sup>3</sup>J<sub>C,F</sub> = 3.8 Hz), 122.7 (q, <sup>1</sup>J<sub>C,F</sub> = 271.8 Hz), 51.1, 44.6

MS (APCI) 410.1 [M+H<sup>+</sup>]

HR MS 431.9906 [M+H<sup>+</sup>], berechnet für [C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>Na]<sup>+</sup> 431.9912

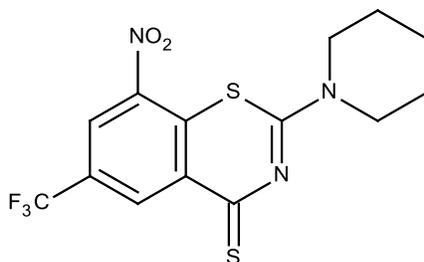
R<sub>f</sub> 0.58 (Chloroform/MeOH 98:2)

Smp.: 270-276 °C

M<sub>r</sub> = 409.36 g/mol

C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>

**7.1.2.100 8-Nitro-2-(piperidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazine-4-thion (AR218)**



Die Synthese von **AR218** erfolgt aus 8-Nitro-2-(piperidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (**AR187**) (0.152 g, 0.42 mmol, 1.0 Äq.) durch Umsetzung mit Lawessons Reagenz (0.342 g, 0.85, 2.0 Äq.). Dafür werden die beiden Ausgangsverbindungen in trockenes Toluol gegeben und 2 h unter Rückfluss erhitzt (Schutzgas).

Die Reinigung erfolgt mit Hilfe der MPLC (Puriflash System, EtAc/Heptan Gradient).

brauner, glasiger Feststoff

Ausbeute 115 mg (73 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.46 (d, Ar-H,  $^4J = 2.5$  Hz, 1H), 8.67 (d, Ar-H,  $^4J = 2.5$  Hz, 1H), 4.16 (bs, N-CH<sub>2</sub>, 2H), 3.83 (bs, N-CH<sub>2</sub>, 2H), 1.79 (bs, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, 6H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  198.9, 154.2, 144.3, 135.8 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 133.0, 129.1 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 35.3$  Hz), 128.8, 124.8 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 122.3 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 273.1$  Hz), 49.1, 48.0, 26.0, 24.2

MS (APCI) 376.0 [M+H<sup>+</sup>]

HR MS 376.0385 [M+H<sup>+</sup>], berechnet für [C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 376.0401, 398.0201 [M+Na<sup>+</sup>], berechnet für [C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>Na]<sup>+</sup> 398.0221

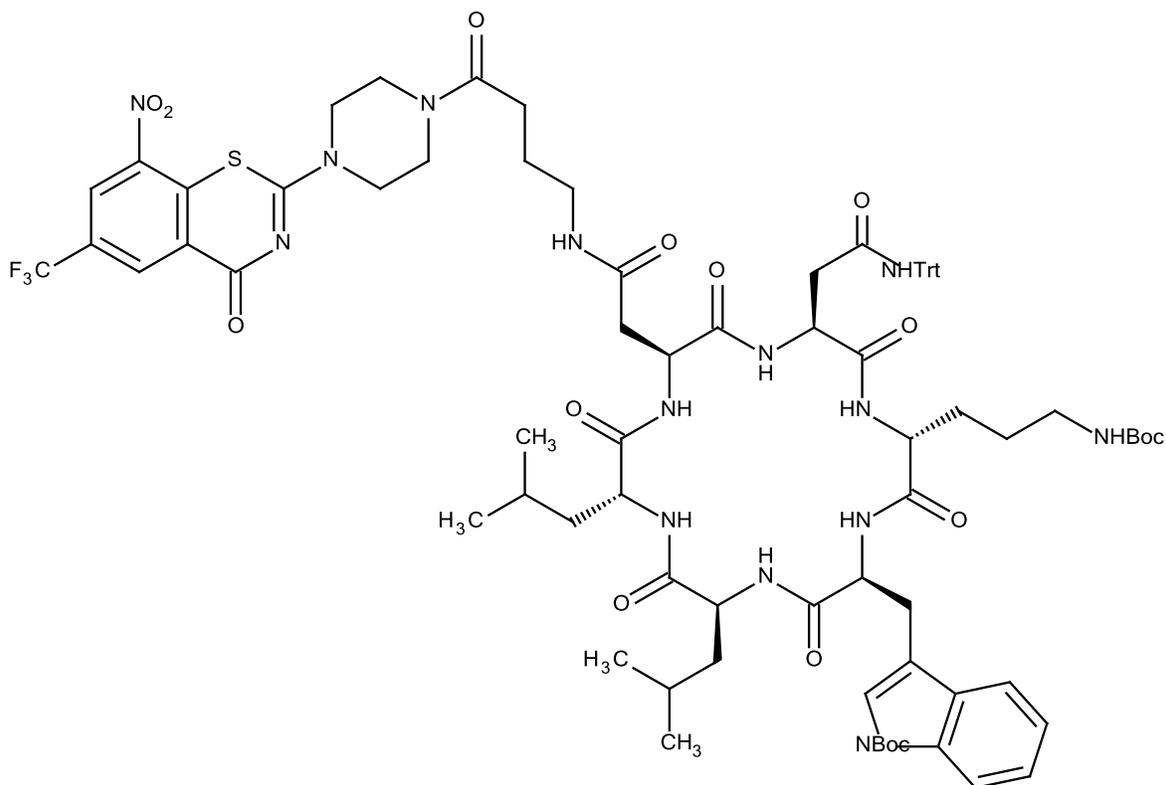
$R_f$  0.45 (EtAc/Heptan 1:1)

Smp.: 98-103 °C

$M_r = 375.39$  g/mol

C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>

**7.1.2.101 tert-Butyl 3-(((2S,5S,8R,11S,14S,17R)-17-(3-((tert-butoxy)carbonyl)amino)propyl)-5,8-bis(2-methylpropyl)-11-((4-(4-[8-nitro-4-oxo-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-2-yl]piperazin-1-yl)-4-oxobutyl)carbamoyl)methyl)-3,6,9,12,15,18-hexaoxo-14-((triphenylmethyl)carbamoyl)methyl)-1,4,7,10,13,16-hexaazacyclooctadecan-2-yl)methyl)-1H-indole-1-carboxylate (AR219)**



Die Synthese von **AR219** erfolgt durch die Synthese einer Peptidbindung zwischen 2-[(2S,5S,8R,11S,14S,17R)-11-({1-[(tert-Butoxy)carbonyl]-1H-indol-3-yl)methyl}-8-(3-(((tert-butoxy)carbonyl)amino)propyl)-14,17-bis(2-methylpropyl)-3,6,9,12,15,18-hexaoxo-5-((triphenylmethyl)carbamoyl)methyl)-1,4,7,10,13,16-hexaazacyclooctadecan-2-yl]essigsäure (**HA-3-29**) (0.045 g, 0.038 mmol, 1 Äq.) und 2-[4-(4-Aminobutanoyl)piperazin-1-yl]-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (**AR167**) (0.021 g, 0.038 mmol, 1 Äq.) mittels HATU (0.043 g, 0.114 mmol, 3.33 Äq.). Die beschriebene Reaktion erfolgt in DMF (7 ml) unter Zusatz von Hünig-Base (0.066 ml, 0.38 mmol, 10.0 Äq.). Nach einer Reaktionsdauer von 20 h wird das

Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mit Hilfe von Säulenchromatographie gereinigt (Laufmittel: Chloroform/MeOH (9:1)).

glasiger Feststoff

Ausbeute 55 mg (89 %)

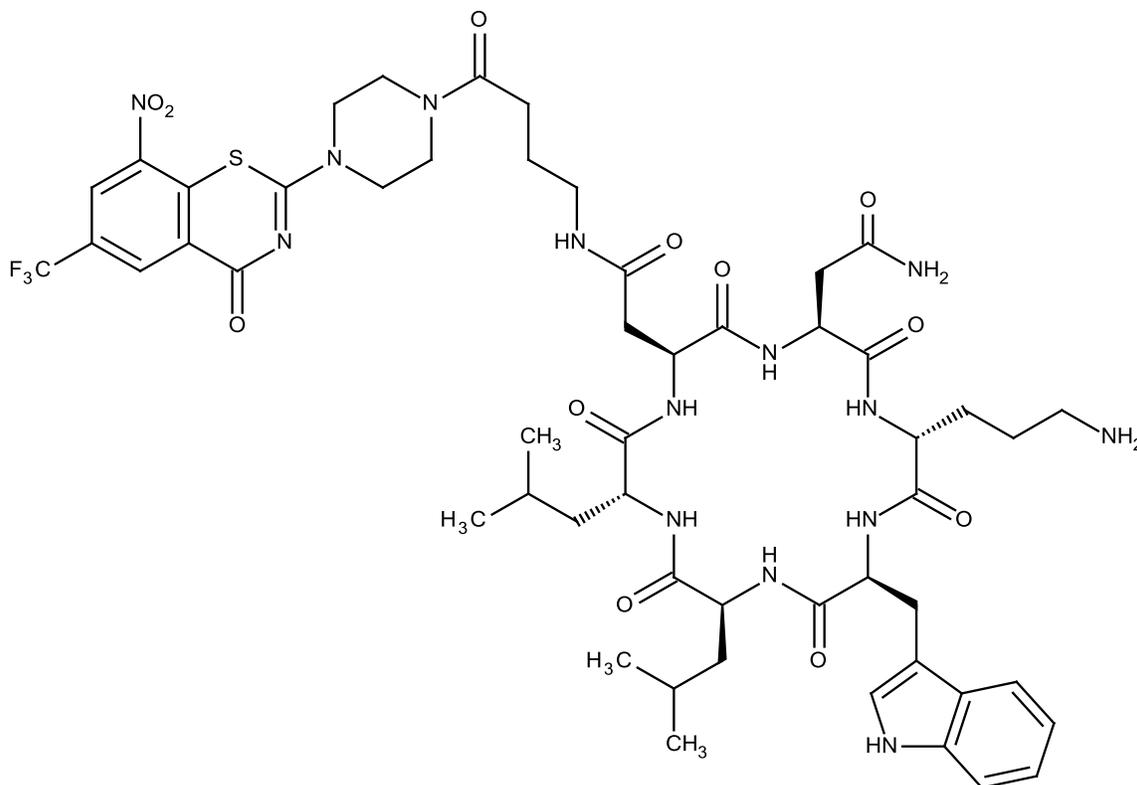
MS (ESI) 1623.46 [M-H<sup>+</sup>]

$R_f$  0.24 (Chloroform/MeOH 9:1)

$M_r = 1624.70$  g/mol

$C_{82}H_{99}F_3N_{14}O_{16}S$

**7.1.2.102 2-[(2S,5S,8R,11S,14S,17R)-8-(3-Aminopropyl)-5-(carbamoylmethyl)-11-(1H-indol-3-ylmethyl)-14,17-bis(2-methylpropyl)-3,6,9,12,15,18-hexaoxo-1,4,7,10,13,16-hexaazacyclooctadecan-2-yl]-N-(4-{4-[8-nitro-4-oxo-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-2-yl]piperazin-1-yl}-4-oxobutyl)acetamid (AR220)**



Zur Synthese von **AR220** wird tert-Butyl 3-[[[(2S,5S,8R,11S,14S,17R)-17-(3-[[[tert-butoxy]carbonyl]amino]propyl)-5,8-bis(2-methylpropyl)-11-[[[4-(4-[8-nitro-4-oxo-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-2-yl]piperazin-1-yl)-4-oxobutyl]carbamoyl]methyl)-3,6,9,12,15,18-hexaoxo-14-[[[triphenyl-methyl]carbamoyl]methyl]-1,4,7,10,13,16-hexaazacyclooctadecan-2-yl]methyl]-1H-indole-1-carboxylate (**AR219**) (0.055 g, 0.033 mmol, 1 Äq.) in 2.0 ml TFA/TIPS/Wasser (95:2.5:2.5) Gemisch gegeben und für 3 h bei RT belassen. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der erhaltene Feststoff mit kaltem Diethylether gewaschen.

amorpher Feststoff

Ausbeute mg (85 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.96 (dd,  $J = 2.1, 0.7$  Hz, 1H), 8.87 (dd,  $J = 2.1, 0.8$  Hz, 1H), 7.55 (dt,  $J = 7.8, 1.0$  Hz, 1H), 7.31-7.26 (m, 1H), 7.09 (s, 1H), 7.05 (ddd,  $J = 8.1, 7.0, 1.2$  Hz, 1H), 6.98 (ddd,  $J = 8.0, 7.1, 1.1$  Hz, 1H), 4.68 (t,  $J = 5.3$  Hz, 1H), 4.65-4.55 (m, 2H), 4.47 (td,  $J = 7.2, 5.2$  Hz, 1H), 4.36 (dd,  $J = 9.9, 4.9$  Hz, 1H), 4.24 (dd,  $J = 8.3, 6.5$  Hz, 1H), 4.06 (s, 3H), 3.77 (dd,  $J = 12.2, 6.7$  Hz, 3H), 3.29-3.17 (m, 3H), 3.15-3.01 (m, 2H), 2.88-2.70 (m, 4H), 2.64 (dd,  $J = 15.4, 7.8$  Hz, 1H), 2.49 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 1.83 (p,  $J = 6.7$  Hz, 3H), 1.74-1.41 (m, 9H), 1.00-0.83 (m, 12H)

MS (ESI) 1181.35  $[\text{M-H}^+]$

$R_f$  0.18 (LM form/MeOH 9:1)

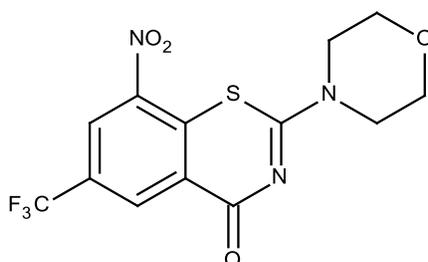
$M_r = 1182.49$  g/mol

$\text{C}_{53}\text{H}_{69}\text{F}_3\text{N}_{14}\text{O}_{12}\text{S}$

### 7.1.3 Testverbindungen aus der Arbeit von Dr. Rudolph (Rudolph, 2013)

Die folgenden Substanzen wurden in Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. Rudolph (Rudolph, 2013) hergestellt. Da sie für verschiedene Assays genutzt wurden deren Ergebnisse in dieser veröffentlicht sind, sollen sie im Folgenden anhand ihrer experimentellen Daten charakterisiert werden. Für Synthesen und weiter gehende Information sei auf die Dissertationsarbeit von Dr. Rudolph verwiesen.

#### 7.1.3.1 2-(Morpholin-4-yl)-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (IR58)



gelber Feststoff

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.08 (d, 1H, Ar-H,  $^4J = 1.5$  Hz), 8.75 (d, 1H, Ar-H,  $^4J = 1.5$  Hz), 4.01 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ ), 3.82 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$ )

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.3, 162.6, 143.9, 133.7, 133.5 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.7$  Hz), 129.9 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 35.9$  Hz), 126.8, 126.1 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.7$  Hz), 122.3 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 272.5$  Hz), 66.3 (bs, 2  $\text{CH}_2$ ), 46.7 (bs, 2  $\text{CH}_2$ )

MS (EI) 361 (M)

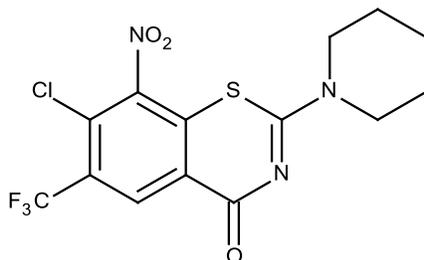
Elementaranalyse	berechnet	C 43.22	H 2.79	N 11.63	S 8.87
	gemessen	C 43.72	H 2.69	N 11.57	S 8.66

$R_f$  0.22 (Toluol:EtOH 9:1)

$M_r$  361.30 g/mol

$\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$

**7.1.3.2 7-Chloro-8-nitro-2-(piperidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-on (IR74)**



gelber Feststoff

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.91 (s, 1H, Ar-H), 4.07 (bs, 2H, N- $\text{CH}_2$ ), 3.70 (bs, 2H, N- $\text{CH}_2$ ), 1.77 (m, 6H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ )

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165.7, 158.3, 146.9, 131.4, 130.5 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 5.3$  Hz), 128.7 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 33.2$  Hz), 128.4, 122.8, 121.6 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 274.3$  Hz), 48.2 (bs, 2  $\text{CH}_2$ ), 26.0 (bs, 2  $\text{CH}_2$ ), 24.2

MS (EI) 393 (M)

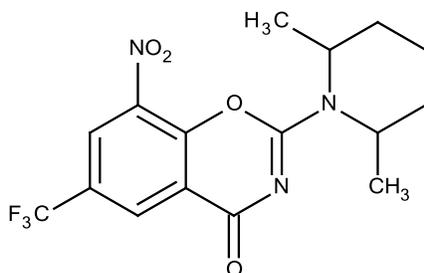
Elementaranalyse	berechnet	C 42.70	H 2.82	N 10.67	S 8.14
	gemessen	C 43.04	H 2.69	N 10.70	S 7.71

$R_f$  0.40 (TBME:EtOH 20:1)

$M_r$  393.77 g/mol

$\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{ClF}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$

### 7.1.3.3 2-(2,6-Dimethylpiperidin-1-yl)-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzoxazin-4-on (IR95)



hell gelber Feststoff

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.72 (d, 1H, Ar-H,  $^4J = 2.2$  Hz), 8.55 (d, 1H, Ar-H,  $^4J = 2.3$  Hz), 4.97 (bs, 1H, N-CH- $\text{CH}_3$ ), 4.80 (bs, 1H, N-CH- $\text{CH}_3$ ), 1.89 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ), 1.75 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ), 1.60 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ), 1.39 (m, 6H, 2  $\text{CH}_3$ )

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  163.2, 155.5, 148.9, 136.3, 131.0 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.4$  Hz), 127.3 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 35.5$  Hz), 126.8 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.4$  Hz), 122.3 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 273.5$  Hz), 120.5, 48.4, 48.2, 30.0, 29.6, 21.1, 19.9, 13.4

MS (EI) 371 (M)

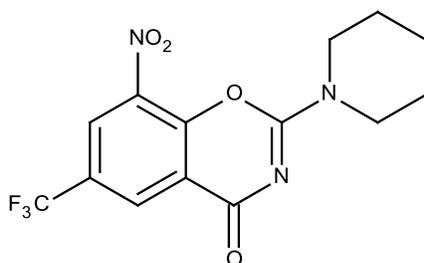
Elementaranalyse	berechnet	C51.75	H 4.34	N 11.32
	gemessen	C51.78	H 4.08	N 11.11

$R_f$  0.44 (Chloroform)

$M_r$  371.31 g/mol

$\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}$

**7.1.3.4 8-Nitro-2-(piperidin-1-yl)-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzoxazin-4-on**  
**(IR112)**



hell gelber Feststoff

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.72 (d, 1H, Ar-H,  $^4J = 1.5$  Hz), 8.57 (d, 1H, Ar-H,  $^4J = 1.5$  Hz), 3.90 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ ), 1.75 (m, 6H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ )

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  163.2, 155.1, 148.7, 136.2, 131.9, (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 127.4 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 35.5$  Hz), 126.9 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$  Hz), 122.2 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 273.5$  Hz), 120.3, 46.7, 46.0, 25.9, 25.3, 24.0

MS (EI) 343 (M)

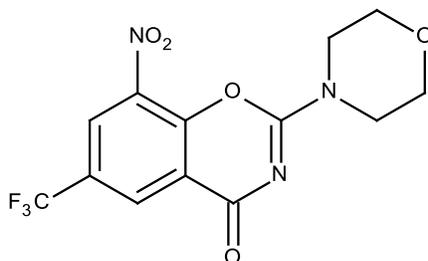
Elementaranalyse	berechnet.	C 48.99	H 3.52	N 12.24
	gemessen	C 49.00	H 3.40	N 12.28

$R_f$  0.37 (TBME)

$M_r$  343.26 g/mol

$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4$

**7.1.3.5 2-(Morpholin-4-yl)-8-nitro-6-(trifluormethyl)-4H-1,3-benzoxazin-4-on**  
**(IR113)**



hell gelber Feststoff

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.71 (d, 1H, Ar-H,  $^4J = 2.3$  Hz), 8.59 (d, 1H, Ar-H,  $^4J = 2.3$  Hz), 3.93 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$ ), 3.83 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$ )

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  162.9, 155.4, 148.5, 136.3, 131.1 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.4$  Hz), 127.8 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 35.9$  Hz), 127.1 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.4$  Hz), 122.1 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 273.1$  Hz), 120.3, 66.2, 66.1, 45.4, 45.0

MS (EI) 345 (M)

Elementaranalyse	berechnet	C 45.23	H 2.92	N 12.17
	gemessen	C 44.87	H 2.64	N 11.79

$R_f$  0.24 (TBME)

$M_r$  345.23 g/mol

$\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_5$

**7.1.3.6 Antimykobakterielle Aktivität der Testverbindungen aus der Arbeit von Dr. Rudolph (Rudolph, 2013)**

Tabelle E1. MHKs der Testverbindungen aus der Arbeit von Dr. Rudolph (Rudolph, 2013)

Testverbindung	MHK			
	<i>M. vaccae</i> 10670 (n=1)		<i>M. tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv (n=3)	
	[µg/ml]	[µmol/l]	[µg/ml]	[µmol/l]
<b>IR58</b>	3.12	8.64	2.13	5.9
<b>IR74</b>	0.20	0.51	0.63	1.6
<b>IR95</b>	0.20	0.54	2.41	6.5
<b>IR112</b>	1.56	4.55	5.35	15.6
<b>IR113</b>	6.24	18.10	1.35	3.9

## 7.2 Biologische Charakterisierung

### 7.2.1 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen (MHKs)

#### 7.2.1.1 Agardiffusionstest und Bestimmung der MHKs gegen *M. vaccae* (HKI Jena)

##### Agardiffusionstest

Der Agardiffusionstest wird als einfacher Vortest auf antibakterielle bzw.: antimykotische Aktivität in Zusammenarbeit mit dem Hans-Knöll-Institut Jena unter Leitung von Frau Dr. Voigt durchgeführt (DIN-Norm 58940-8, 2002, Deutsches Arzneibuch, 1990). Für diese Untersuchung werden die folgenden Mikroorganismen genutzt: *M. vaccae* IMET 10670 (200 µl), *M. aurum* SB66 (100 µl), *B. subtilis* ATCC 6633 (100 µl), *E. coli* SG 458 (100 µl) *Sp. salmonicolor* 549 (400 µl). Die genannten Testorganismen werden auf Schrägagar kultiviert und zur Herstellung der Stammsuspension für die Testung aus dieser Schrägagarkultur entnommen. Die *M. vaccae* IMET 10670 Kultur wird auf Glasperlen gehalten und Klumpenbildung zu vermeiden. Die Mikroorganismen werden mit einem flüssigen Gemisch aus Agar und NaCl Lösung suspendiert, diese Suspension wird bis zu einer optischen Dichte von 0.5 nach McFarland Standard (Fa. bioMérieux) verdünnt, dies entspricht einer Keimzahl von  $10^8$  CFU/ml. Die so eingestellte Bakterienstammsuspension wird in 34 ml geschmolzenes Nährmedium (Müller-Hinton-Bouillon, 30 min bei 50 °C im Wasserbad) gegeben. Dieses Gemisch wird in Petrischalen gegossen und nach Erkalten werden 12 gleichgroße Löcher (Durchmesser 9 mm) in die Agarplatten gestanzt. Die Testsubstanzen werden mit einer Konzentration 1 mg/ml in DMSO gelöst, diese Stammlösungen werden mit MeOH auf eine Endkonzentration von 100 µg/ml verdünnt. Als Referenzsubstanzen finden **BTZ043** (0.1 µg/ml), Ciprofloxacin (5 µg/ml) und Amphotericin B (10 µg/ml) Anwendung. In die ausgestanzten Löcher der Agarplatten werden je 50 µl der Lösung von Test- bzw. Referenzsubstanz pipettiert. Die so präparierten Agarplatten werden für 14 h bei 37 °C (Bakterienkulturen) bzw. 30 °C (*Sp. salmonicolor*) inkubiert.

Zu Auswertung wird der Durchmesser der Zone in der kein Bakterienwachstum nachweisbar ist (Hemmhof) ausgemessen und in mm angegeben. Die Auswertung erfolgt makroskopisch und als Einmalbestimmung.

### **MHKs gegen *M. vaccae***

Die Bestimmung der MHKs gegen *M. vaccae* IMET 10670 erfolgt mit Hilfe der Mikrobouillon Verdünnungsmethode in Müller-Hinton Bouillon entsprechend des NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) Leitfadens in Zusammenarbeit mit dem Hans-Knöll-Institut Jena (Wikler et al., 2006) unter Leitung von Frau Dr. Voigt.

Zu Durchführung des Assays werden 20 ml Nährmedium für Mykobakterien (Glycerol 1 %, Fleischextrakt 0.5 %, Pepton (pankreatischer Verdau von Casein), NaCl 0.3 %, in destillierten Wasser pH 7.0) mit 0.5 ml vorbereiteter Bakterienkultur (*M. vaccae* IMET 10670) versetzt und für 48 h bei 32 °C inkubiert. Mittels McFarland Standard 0.5 (Biomerieux) wird das Inokulum auf  $10^6$  CFU/ml eingestellt.

Die Stammlösungen der Testverbindungen (1 mg in 1 ml DMSO) werden mit MeOH zu einer Ausgangskonzentration von 400 µg/ml verdünnt. 50 µl dieser Wirkstofflösungen werden in Spalte 1 der Zeilen A-E von 96well Microtiterplatten gegeben und mit 50 µl Müller-Hinton Bouillon versetzt. In Zeile F werden 50 µl Lösung der Referenzverbindung (Ciprofloxacin od. **BTZ043**) geben, wobei in Spalte 1 eine Konzentration von 100 µg/ml vorliegt. Zeile G und H sind als Lösungsmittel- und Wachstumskontrolle vorgesehen. Von Spalte 1 bis 12 werden jeweils zwölf Verdünnungsschritte vorgenommen, welche die Konzentration jeweils halbieren. Dadurch reicht der Konzentrationsbereich von 100 µg/ml in Spalte 1 bis 0.05 µg/ml in Spalte 12 der Microtiterplatten. Um geringere MHK Werte zu bestimmen wird der Wirkstoff in einer anschließenden Bestimmung entsprechend weiter verdünnt.

Anschließend werden den vorbereiteten Proben jeweils 50 µl der Inokulums zugesetzt, wobei die endgültige Konzentration der Testorganismen  $5 \cdot 10^5$  CFU/ml beträgt. Nach einer Inkubation von 48 h bei 37 °C, werden den Proben jeweils 30 µl einer Resazurin Lösung (0.01 % in destilliertem Wasser) zugesetzt und die Platten für weitere 24 h bei 37°C inkubiert.

Die MHK wird als die Konzentration einer Testverbindung bestimmt bei der keine lebensfähigen Zellen nachweisbar sind (Farbwechsel des Indikators Resazurin von rosa zu blau). Nach 72 h wird eine Fluoreszenzmessung durch einen automatischen Plattenreader bei  $\lambda = 630 \text{ nm}$  durchgeführt (Nephelocan Ascent 1.4, Labsystems, Vantaa, Finnland).

### **7.2.1.2 Bestimmung der MHKs gegen *M. tuberculosis* (GSK, Tres Cantos)**

Die MHK Bestimmung erfolgte in Zusammenarbeit mit GSK Tres Cantos. Die MHK Messung werden für jede Testverbindung als Dreifachbestimmung in 96-well Polystyrol Microtiterplatten durchgeführt. Es werden 10 zweifache Verdünnungen in DMSO beginnend bei einer Konzentration von  $200 \mu\text{M}$  durchgeführt. Den Arzneistofflösungen (jeweils  $5 \mu\text{l}$ ) werden  $95 \mu\text{l}$  Middlebrook 7H9 Medium (Difco Kat. Nr. 271310) zugesetzt. Als Positivkontrolle wird Isoniazid verwendet, wofür acht zweifache Verdünnungen ausgehend von  $160 \text{ mg/ml}$  angefertigt werden. Zu jeweils  $5 \mu\text{l}$  der Isoniazid Lösung werden  $95 \mu\text{l}$  Middlebrook 7H9 Medium (Difco Kat. Nr. 271310) zugesetzt. Einer weiteren Testreihe wird reines DMSO als Lösungsmittelvergleich zugesetzt. Das Inokulum, welches auf ca.  $1 \times 10^7 \text{ CFU/ml}$  standardisiert ist, wird in Middlebrook 7H9 Medium (Middlebrook ADC Becton-Dickinson cat. no. 211887) 1:100 (V/V) verdünnt, davon werden  $100 \mu\text{l}$  in jede Vertiefung der 96-well Platte gegeben. Den Vertiefungen G12 und H12 wird kein Inokulum zugegeben (Blindkontrolle). Die Platten werden zum Schutz vor Austrocknung in einem verschlossenen Behältnis für 6 Tage bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert.

Eine Resazurin Lösung wird durch Auflösen einer Resazurin Tablette (Resazurin Tablets for Milk Testing; VWR International Ltd. Kat. Nr. 330884Y) in  $30 \text{ ml}$  sterilen Phosphat-Puffer (PBS) hergestellt und von dieser Lösung werden  $25 \mu\text{l}$  in jede Vertiefung der Testplatte gegeben. Zur Bestimmung des MHK Wertes werden die Platten nach  $48 \text{ h}$  fuoreszenzspektroskopisch vermessen (Spectramax M5, Molecular Devices,  $\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$ ).

### **7.2.1.3 Bestimmung der MHKs gegen *M. tuberculosis* (UIC ,Chicago)**

#### **MABA (Microplate alamar blue assay)**

Die Bestimmung der MHKs im MABA konnte unter Leitung von Scott Franzblau an der UIC Chicago durchgeführt werden (Parish et al., 2015, Cho et al., 2015). Zur Vorbereitung des Assays werden in alle äußeren Wells einer 96well Platte 200 µl 7H12 Medium pipettiert, um die Verdunstung aus den Testwells möglichst gering zu halten. Im Anschluss werden in alle Wells von Spalte 3 200 µl 7H12 Medium gefüllt und in die restlichen Wells der Platten werden 100 µl 7H12 Medium pipettiert. Anschließend werden 2 µl der Stammlösung von Test- bzw. Referenzverbindung in den Spalten 1 bis 3 in die Zeilen B bis F gefüllt. Die Stammlösungen der Testverbindung besitzen eine Konzentration von 100 µg/ml in DMSO. Im folgendem werden die Test- bzw. Referenzverbindungen in Spalten 3-10 jeweils auf die Hälfte der Ausgangsverbindung verdünnt, wodurch eine Verdünnungsreihe entsteht. Die Zellkulturstammlösung von *M. tuberculosis* H37Rv wird aufgetaut und auf eine Konzentration von  $5 \times 10^4$  und  $1 \times 10^5$  CFU/ml mit 7H12 Medium verdünnt. Nun werden je 100 µl der Bakteriensuspension in die Zeilen B bis G der Spalten 2 bis 11 gefüllt. Die 96well Platten werden für 7 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>/95 % Luftfeuchte inkubiert.

Almar blue und 20 %ige Tween 80 Lösung in gereinigtem Wasser werden im Verhältnis 8:5 gemischt und je 32.5 µl dieses Gemisches werden in alle Vertiefungen der 96well Platten gegeben. Im folgendem werden die Platten 18-24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>/95 % Luftfeuchte inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubation werden die 96well Platten fluoreszenzspektroskopisch vermessen ( $\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$ ).

Die so ermittelte MIC<sub>90</sub> ist definiert als die geringste Substanzkonzentration bei der eine 90 %ige Fluoreszenzminderung nachweisbar ist.

## **LORA (Low oxygen recovery assay)**

Die Bestimmung der MHKs im LORA konnte unter Leitung von Dr. Scott Franzblau an der UIC Chicago durchgeführt werden (Parish et al., 2015, Cho et al., 2015). Zur Vorbereitung des Assays werden in alle äußeren Wells einer 96well Platte 200 µl 7H12 Medium pipettiert, um die Verdunstung aus den Testwells möglichst gering zu halten. Im Anschluss werden in alle Wells von Spalte 3 200 µl 7H12 Medium gefüllt und in die restlichen Wells der Platten werden 100 µl 7H12 Medium pipettiert. Anschließend werden 2 µl der Stammlösung von Test- bzw. Referenzverbindung in den Spalten 1 bis 3 in die Zeilen B bis F gefüllt. Die Stammlösung der Testverbindungen besitzen eine Konzentration von 100 µg/ml in DMSO. Im folgendem werden die Test- bzw. Referenzverbindungen in den Spalten 3-10 jeweils auf die Hälfte der Ausgangsverbindung verdünnt, wodurch eine Verdünnungsreihe entsteht. Die Zellkulturstammlösung von *M. tuberculosis* H37Rv wird aufgetaut und auf eine Konzentration von  $5 \times 10^5$  und  $1 \times 10^6$  CFU/ml mit 7H12 Medium verdünnt. Nun werden je 100 µl der Bakteriensuspension in die Zeilen B bis G der Spalten 2 bis 11 gefüllt. Die 96well Platten werden mit einem Indikatorstreifen für anaerobe Bedingungen in ein anaerobes Behältnis überführt, dort werden mit Hilfe eines Anoxomaten eine sauerstoffarme Bedingungen erzeugt. Dazu wird das anaerobe Behältnis dreimal evakuiert und mit einem Gasgemisch aus 10 % H<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> und 85 % N<sub>2</sub> gefüllt. Unter diesen anaeroben Bedingungen werden die 96well Platen für 10 Tage bei 37 °C inkubiert und im Anschluss für 28 h in einem CO<sub>2</sub> Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>/95 % Luftfeuchte belassen. Nun erfolgt die Zugabe von 100 µl einer 1 %igen n-Decanallösung (hergestellt aus einer 10 %igen Decanallösung in EtOH durch verdünnen in PBS) in jede Vertiefung der 96well Platte mit Hilfe der Pumpe am Luminometer. Durch Bestimmung der Lumineszenzsignale werden die MHKs bestimmt.

### **7.2.2 Testung auf Zytotoxizität bzw. auf antiproliferative Wirksamkeit**

Die Testverbindungen werden am Hans-Knöll-Institut Jena unter Leitung von Herrn Dr. Hans-Martin Dahse zytotoxische bzw. antiproliferative Wirksamkeit getestet. Dafür werden die Substanzen in DMSO ( $c = 100 \mu\text{g/ml}$ ) gelöst und anschließend mit DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) auf eine Konzentration von  $5 \mu\text{g/ml}$  verdünnt.

Zur Untersuchung der antiproliferativen Wirkung werden die Zelllinien HUVEC (ATCC CRL-1730) und K-562 (DSM ACC 10) genutzt. Die Zellen werden mit den Testverbindungen für 72 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und im folgendem wird der  $\text{GI}_{50}$ -Wert bestimmt. Der  $\text{GI}_{50}$ -Wert bezeichnet die Konzentration eines Stoffes bei der 50 % der Zellen im Wachstum gehemmt werden. Die Bestimmung des Anteils der proliferierenden K-562 Zellen erfolgt mit einem CellTiter-Blue1-Assays unter Verwendung von Resazurin. Adhärenz HUVEC Zellen werden mit Glutaraldehyd fixiert und mit 0.05 % Methylenblau angefärbt (für 15 min.). Anschließend wird der Farbstoff ausgewaschen (0.2 ml einer 0.33 M HCl-Lösung) und die optische Dichte bei  $\lambda = 660 \text{ nm}$  ermittelt (SUNRISE Microplate reader, TECAN, Schweiz).

Zur Bestimmung der Zytotoxizität werden HeLa-Zellen (DSM ACC 57) verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 72 h bei  $37^\circ\text{C}$  in einer befeuchteten Atmosphäre bei 5 %  $\text{CO}_2$  Gehalt wird der  $\text{CC}_{50}$ -Wert (cytotoxische Konzentration) bestimmt. Adhärenz HELA Zellen werden mit Glutaraldehyd fixiert und mit 0.05 % Methylenblau angefärbt (für 15 min.). Anschließend wird der Farbstoff ausgewaschen (0.2 ml einer 0.33 M HCl-Lösung) und die optische Dichte bei  $\lambda = 660 \text{ nm}$  ermittelt (SUNRISE Microplate reader, TECAN, Schweiz).

## **7.3 Biochemische und physikalische Charakterisierung**

### **7.3.1 Enzym assays**

Der DprE1 Enzymassay wurde unter Leitung und Anleitung von Dr. Argyrides Argyrou bei GSK Stevenage durchgeführt und ist bereits beschrieben und veröffentlicht von Batt et al. (Batt et al., 2015). Unter Verwendung eines Hewlett Packard HP D300 Digital Dispensers (Tecan Group Ltd.) werden die Testverbindung in schwarze kleinvolumige 384well Mikroplatten (Greiner Bio-One, Stonehouse, UK; Katalog Nr. 784076) gegeben und eine entsprechende Verdünnungsreihe erstellt. Das Substratgemisch (5 µL) bestehend aus 1 mM Farnesylphosphoryl-β-D-ribose (FPR) und 50 µM Resazurin in Assaypuffer (50 mM Hepes pH 7.5, 100 mM NaCl, 100 µM Tween 20 und 2 µM Flavinadeninucleotid (FAD)) wird anschließend hinzu gegeben (beide Konzentrationsangaben beziehen sich auf die tatsächlich Verdünnung im Enzym Assay). Die enzymatische Reaktion wird durch die Zugabe des Enzyms gestartet (5 µL, beinhalten 150 nM Mtb-DprE1 in Assaypuffer). Die fluorimetrische Bestimmung des entstandenen Resorufins ( $\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 595 \text{ nm}$ ) wird ein Tecan Safire2 (Tecan Group Ltd.) genutzt.

Mit Hilfe von Gleichung 1 wird aus den gemessenen Hemmkurven (Abbildung E1 und E2)  $k_{\text{obs}}$  berechnet (observed rate of inactivation), dabei stehen  $F_t$  und  $F_0$  für die Fluoreszenz zum Zeitpunkt  $t$  bzw. 0 und  $A$  bezeichnet die Differenz der Fluoreszenzwerte von Zeitpunkt 0 zu Unendlich.

$$F_t = A \times (1 - e^{-k_{\text{obs}}t}) + F_0 \quad (1)$$

Wenn  $k_{\text{obs}}$  eine lineare Abhängigkeit von der Hemmstoffkonzentration aufweist, ergibt der Anstieg eines solchen Graphen eine Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung ( $k_{\text{inact}}/K_i$ )

Wenn  $k_{\text{obs}}$  eine hyperbolische Abhängigkeit von der Hemmstoffkonzentration aufweist, wird mittels Gleichung 2  $k_{\text{inact}}$  (rate constant of inactivation) bestimmt, wobei  $K_i$  die Dissoziationskonstante zwischen Ligand und Enzym ist.  $k_{\text{inact}}/K_i$  wird durch Division von  $k_{\text{inact}}$  durch  $K_i$  berechnet.

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{inact}}[I]}{K_i + [I]} \quad (2)$$

Die IC<sub>50</sub> Werte können mit Hilfe von Gleichung 3 aus den Dosis-Hemmkurven berechnet werden, wobei  $v$  die enzymatische Reaktionskonstante in 10 min Inkrementen bezeichnet,  $a$  ist der Wert ohne Hemmung,  $d$  ist der Wert nach vollständiger Hemmung,  $[I]$  ist die Hemmstoffkonzentration, IC<sub>50</sub> steht für  $[I]$ , welches  $1/2 \times (a-d)$  ergibt und  $h$  ist der Hill Koeffizient.

$$v = \frac{(a-d)}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^h} + d \quad (3)$$

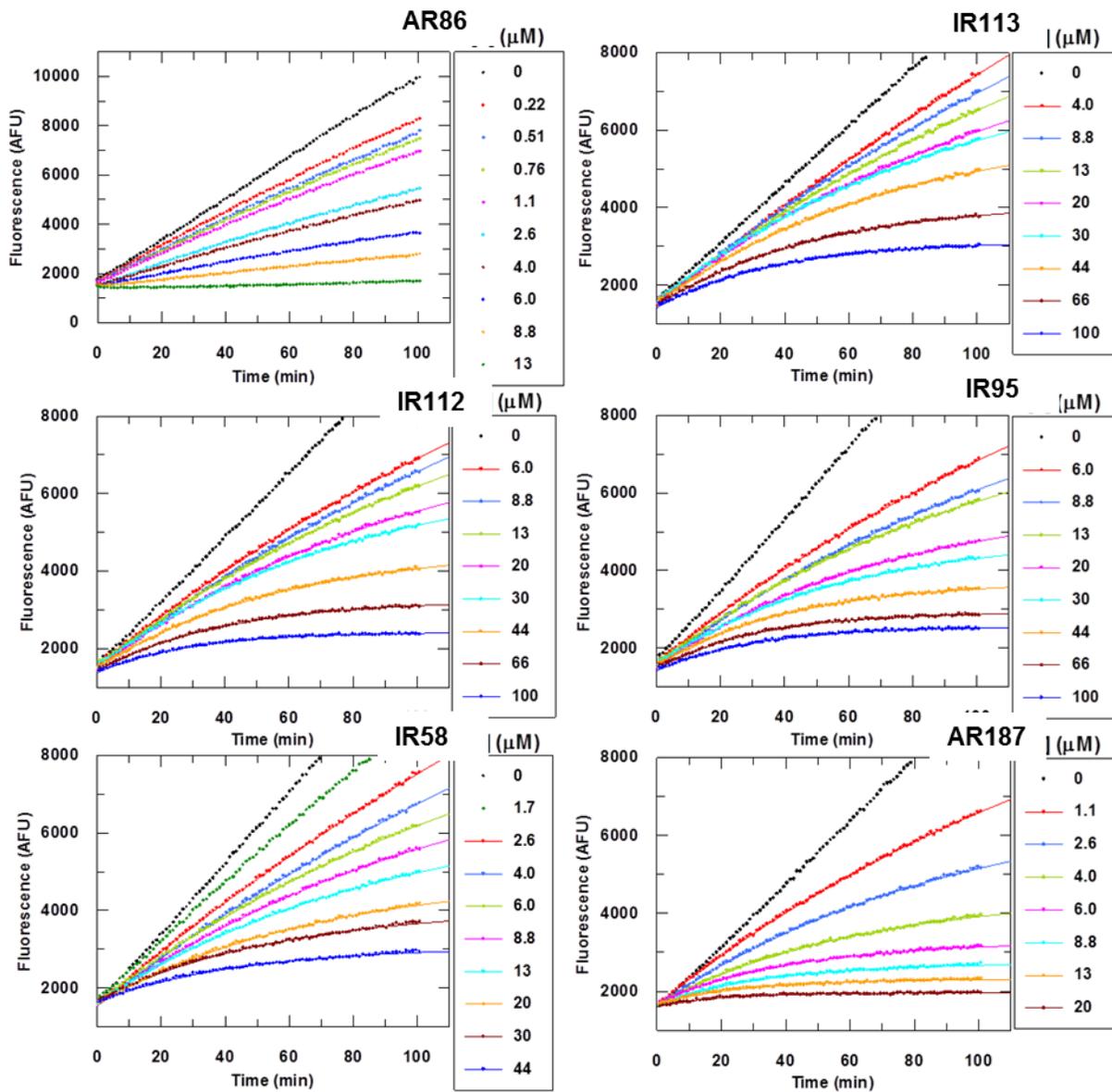


Abbildung E1. Hemmkurven Enzymassay

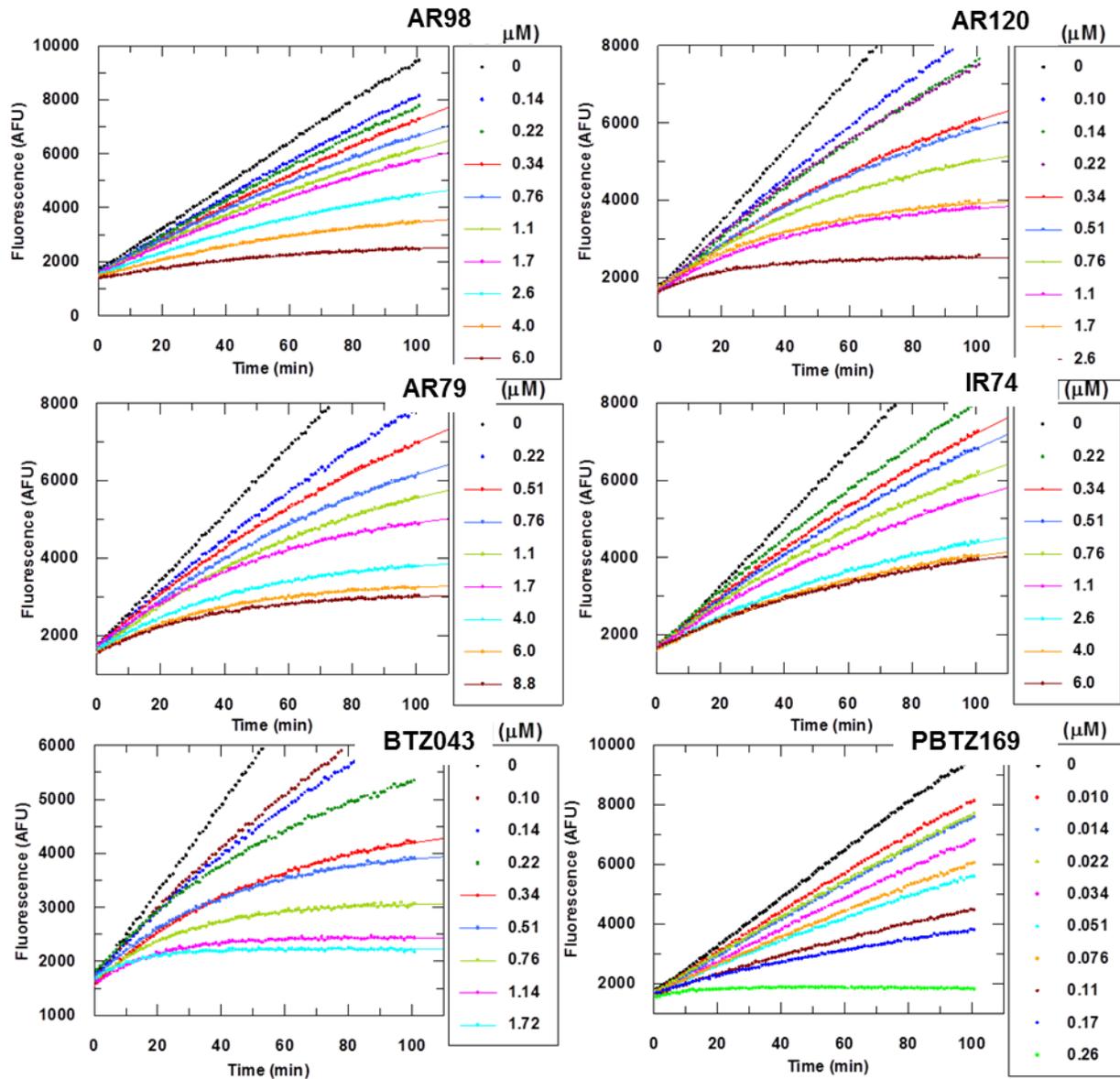


Abbildung E2. Hemmkurven Enzymassay

### **7.3.2 Massenspektrometrische Experimente**

Die Massenspektrometrischen Experimente wurden unter Leitung von Dr. Onkar Singh und Dr. Argyrides Argyrou bei GSK Stevenage durchgeführt.

#### Protein Inkubation

Zu DprE1 (*M. tuberculosis*) Lösung (35 mg/ml) in 20 mM Tris-HCl Puffer (pH 8.4) mit 10 % Glycerol, werden FPR Substrat und der Ligand in einer Konzentration von 5 mM zugegeben (Bedingung A). für Bedingung B werden zusätzlich 5 mM FAD zugesetzt. Nach mindestens einer Stunde bei RT, werden die Proben über das Wochenende bei 4 °C aufbewahrt. Zu Entsalzung werden die Proben wieder auf RT erwärmt und über Spincolumns filtriert (äquilibriert mit Puffer + 5 mM Ligand). Die Proben werden von 4 µl auf 40 µl mit Wasser verdünnt.

Die Protein Massenspektren werden mit zwei unterschiedlichen Instrumenten aufgenommen.

#### Agilent 6224 ToF

Für die Messung der Massenspektren wird ein Agilent 6224 ToF mit 1200 Flüssigchromatographie System genutzt. Es werden 5 µl Probe mit einer Konzentration von 0.1 mg/ml Protein, auf eine 5 µm PLRP-S (Polymer Labs) 1 x 50mm Säule injiziert.

#### LC Inlet Bedingungen:

Puffer A 0.2 % Ameisensäure in Wasser.

Puffer B 0.2 % Ameisensäure in Acetonitril

Tabelle E2. Inlet Bedingungen für Agilent 6224 ToF

Zeit	Flussrate	Druck	Anteil B [%]
0	0.5	350	10
0.5	0.5	350	30
5	0.5	350	55
5.7	0.5	350	60
5.71	0.5	350	100
6.2	0.5	350	100
6.21	0.5	350	10
8	0.5	350	10
8.1	0.5	350	10

MS Bedingungen:

Ionen Polarität Positiv.

Gastemperatur 340 °C

Gasfluss 8 l/min

Zerstäuber (Druck) 60psi

Zu Datenauswertung und Bearbeitung wird Masshunter Software verwendet. Zur Ermittlung der Proteinmasse werden die gemessenen Rohdaten dekonvolutiert.

Waters Q-ToF Ultima MS

Die Proben (4 µl) werden in ein Waters Q-ToF Ultima MS injiziert, diesem Massenspektrometer ist ein Agilent 1100 Flüssigchromatographie System mit einer Zorbax Poroshell 300SB-C8 Säule (2.1mm x 12.5mm) vorgeschaltet.

LC Bedingungen:

Flussrate 0.5 ml/min

Säulentemperatur 25 °C.

Puffer A, Wasser 0.1 % Ameisensäure v/v.

Puffer B, Acetonitril 0.1 % Ameisensäure v/v.

Tabelle E3. Inlet Bedingungen für Waters Q-ToF Ultima MS

<b>Zeit [min]</b>	<b>Puffer A %</b>	<b>Puffer B %</b>	<b>Flussrate [ml/min]</b>
0	95	5	0.5
0.5	95	5	0.5
2	10	90	0.5
3	10	90	0.5
3.1	95	5	0.5
4	95	5	0.5
5	95	5	0.5
5.1	50	50	0.5

MS Bedingungen:

ESI positiv

Kapillarspannung 3.0kV

Quellentemperatur 100 °C

Lösungstemperatur 200 °C

Kegelgasfluss 100 l/h

Auflösungsgasfluss 600 l/h

Die Daten werden mit Masslynx Software (v4.1) ausgewertet und mit Maxent dekonvolutiert.

## Massenspektren:

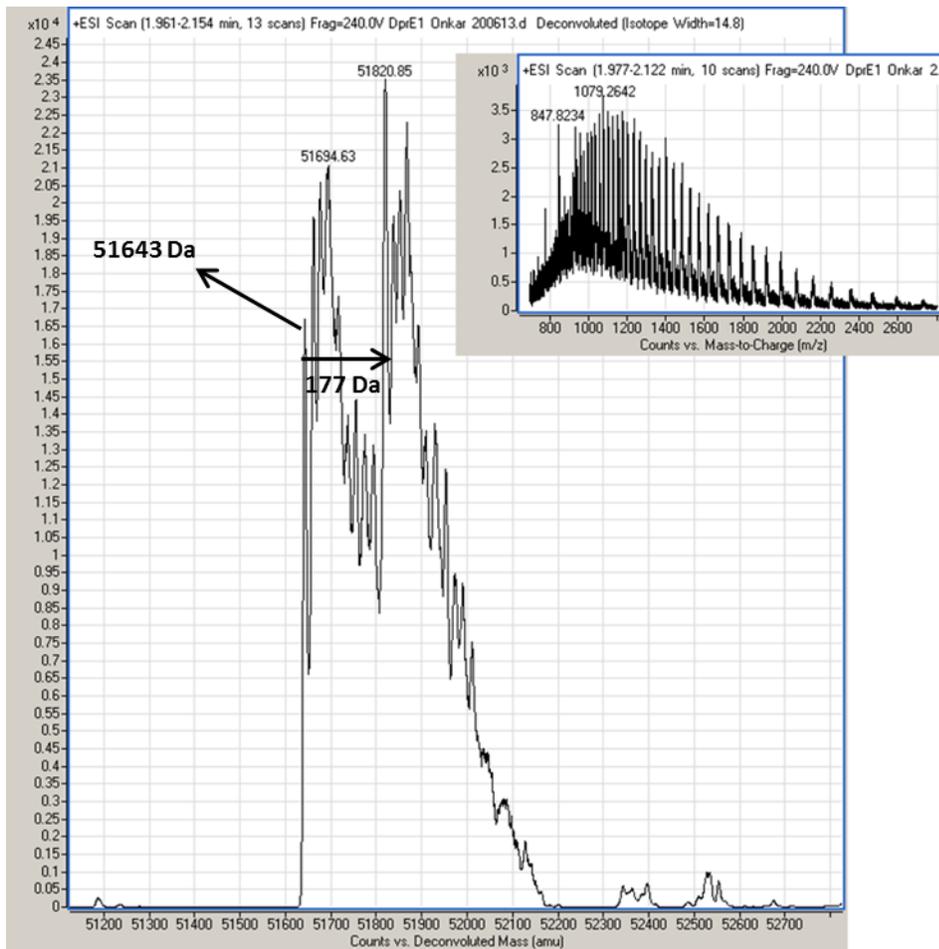
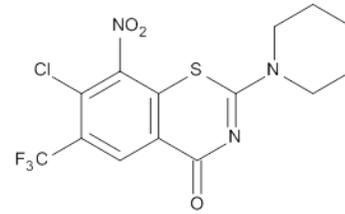
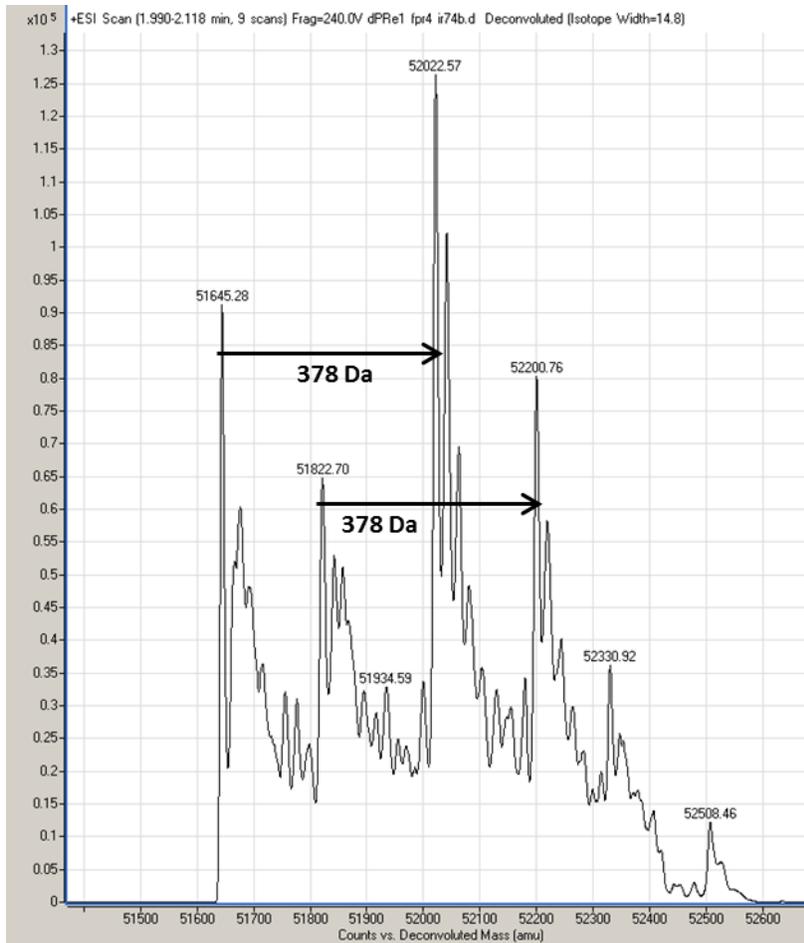
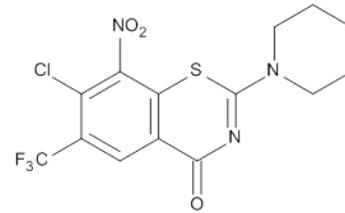


Abbildung E3. Massenspektrum von DprE1 ohne Hemmstoff



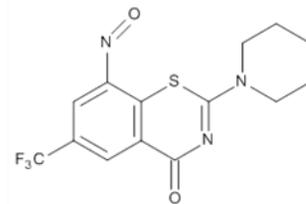
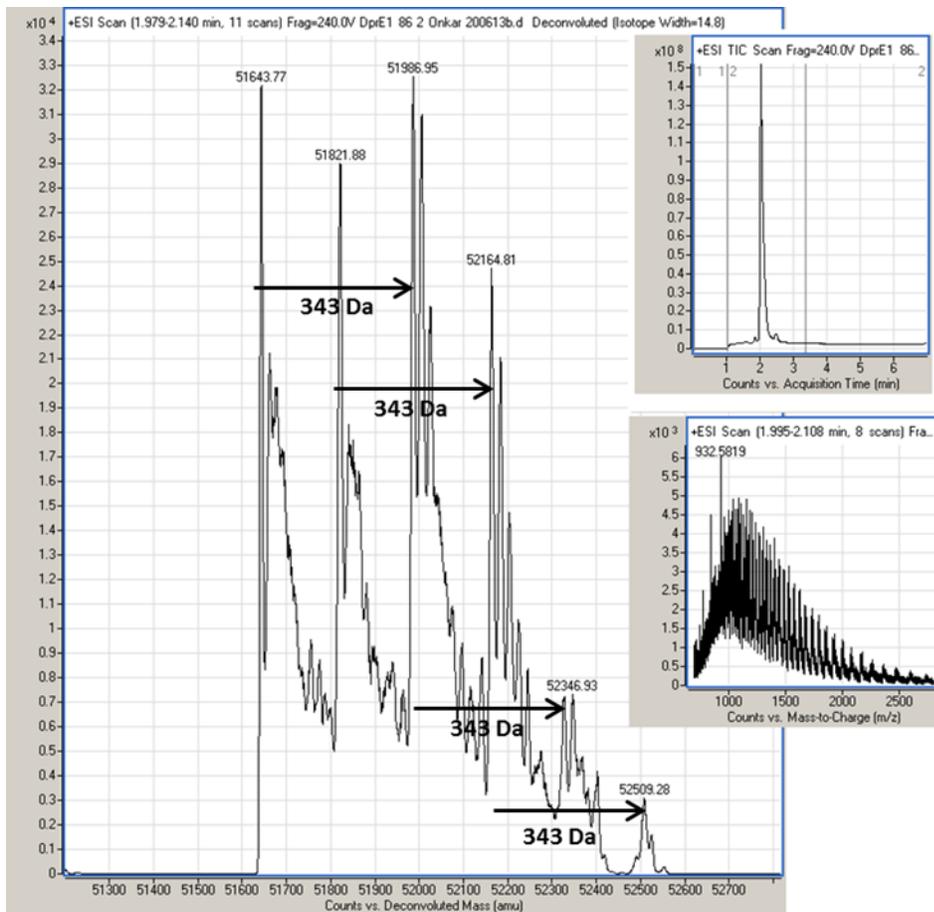
**IR58**  
**M = 394 Da**

Abbildung E4. Massenspektrum von DprE1 nach Inkubation mit **IR58** (Bedingung A)



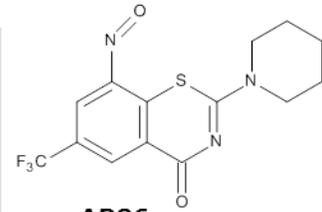
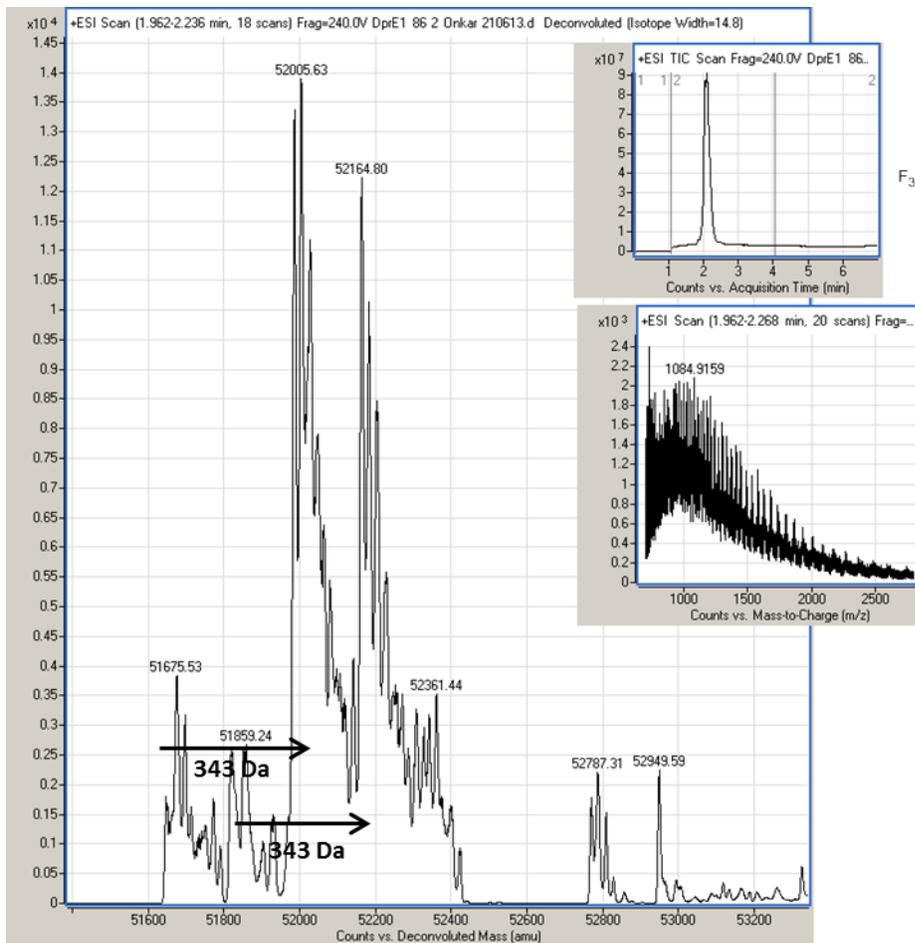
**IR58**  
**M = 394 Da**

Abbildung E5. Massenspektrum von DprE1 nach Inkubation mit **IR58** (Bedingung B)



**AR86**  
**M = 343 Da**

Abbildung E6. Massenspektrum von DprE1 nach Inkubation mit **AR86** (Bedingung A)



**AR86**  
**M = 343 Da**

Abbildung E7. Massenspektrum von DprE1 nach Inkubation mit **AR86** (Bedingung B)

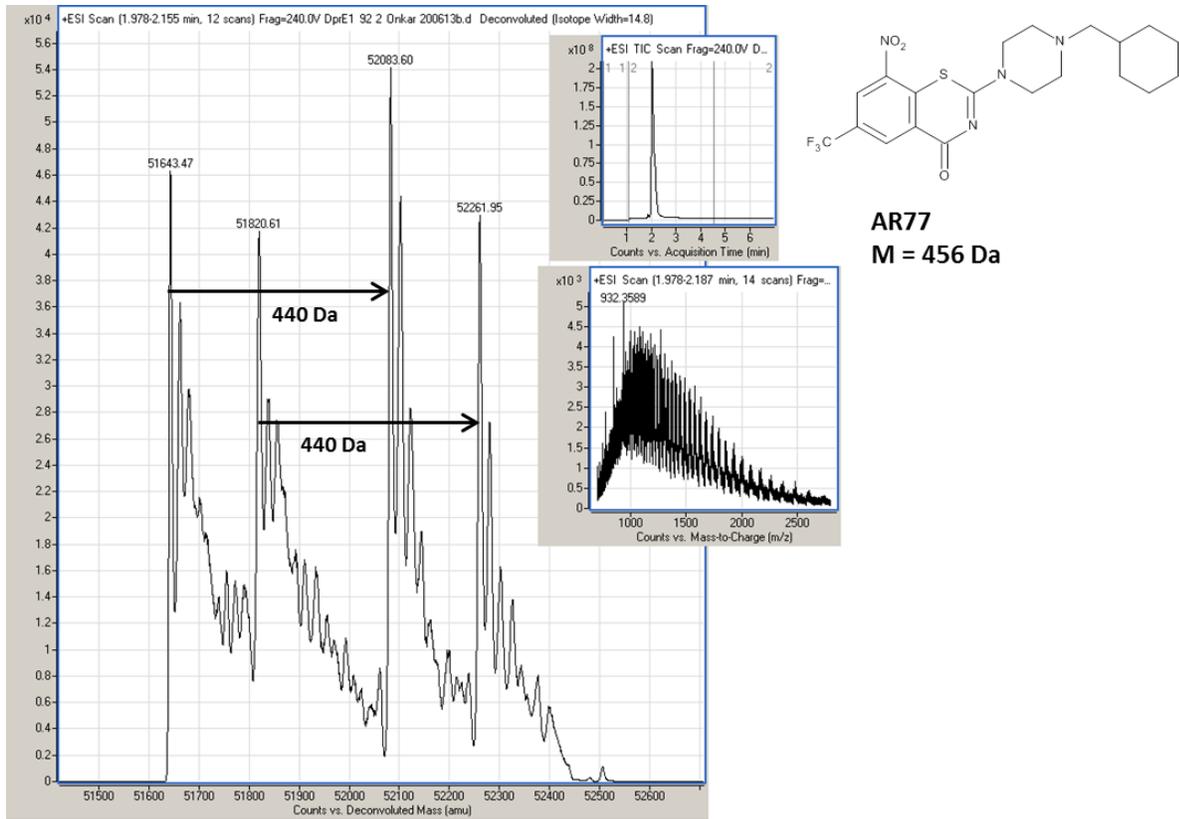
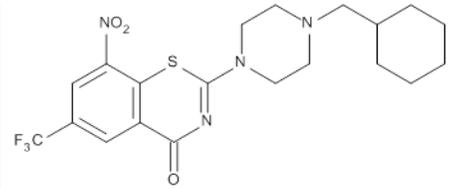
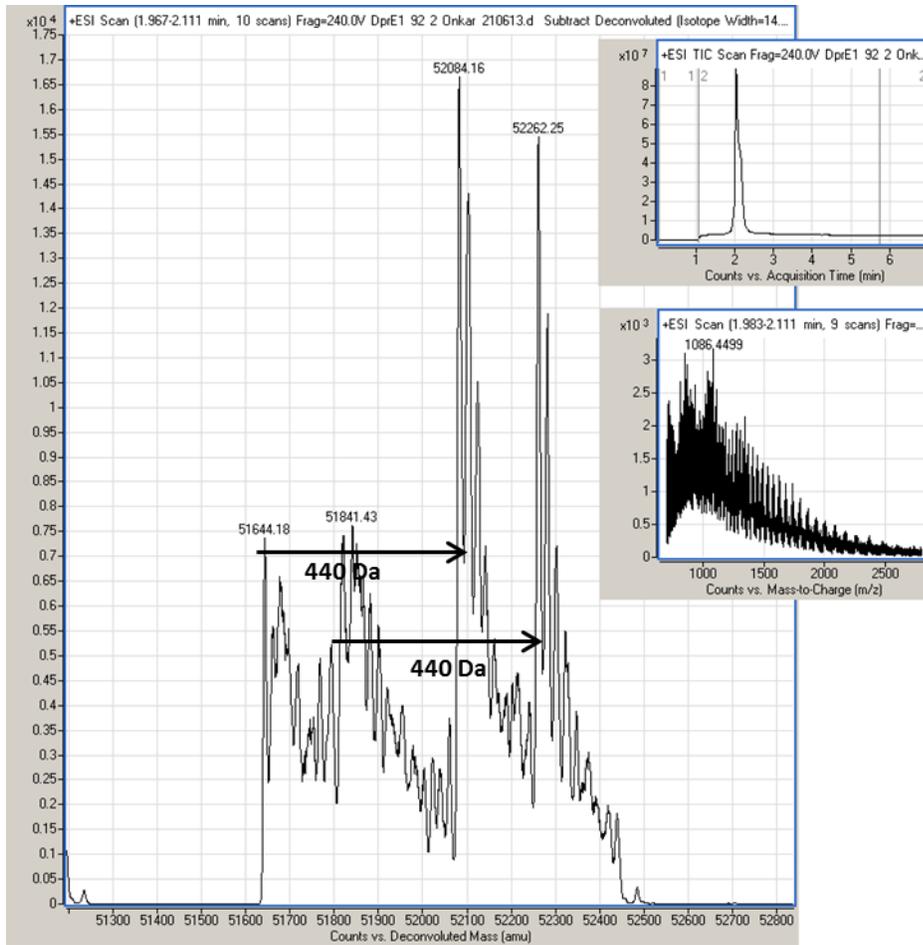


Abbildung E8. Massenspektrum von DprE1 nach Inkubation mit **AR77** (Bedingung A)



**AR77**  
**M = 456 Da**

Abbildung E9. Massenspektrum von DprE1 nach Inkubation mit **AR77** (Bedingung B)

### 7.3.3 Protein-Kristallographie

Die Proteinkristallstrukturen von AR85 und AR86 wurden unter Leitung von Dr. Chun-wa Chun und Dr. Onkar Singh bei GSK Stevenage erstellt. Die Kristallstrukturen von **IR85**, **IR95** und **BTZ043 (AR182)** von Dr. Klaus Fütterer an der University of Birmingham durchgeführt.

#### Kristallisation

Zu dem Protein DprE1 (*M. tuberculosis*) (35 mg/ml) in 20 mM Tris-HCl (pH 8.4) Puffer + 10 % Glycerol werden FPR Substrat, FAD und der Ligand in einer Konzentration von 5 mM zugegeben. Nachdem das Proteingemisch bei RT für 1 h inkubiert wurde, werden die Proben über das Wochenende bei 4 °C belassen. Zum Entsalzen werden die Proben wieder auf RT erwärmt und über Spincolumns filtriert (äquilibriert mit Puffer +5 mM Ligand). Für die Verbindungen **AR86** und **AR85** wird das Protein mit der 1+1 µl "sitting microbatch drop" Methode kristallisiert, wobei sich im Reservoir der Kristallisationsplatte ein Gemisch aus PPG400 und 100 mM Imidazol Puffer befindet (pH 7.4, PPG Konzentrationen von 24 % bis 34 %, dreifache Wiederholung aller Ansätze). Die 1+1 µl Tropfen werden mit Siliconöl bedeckt und bei RT inkubiert. Nach Zusatz eines Kryoprotektors werden die Kristalle von der Kristallisationsplatte entnommen und gefroren.

Bei den Verbindungen **IR85**, **IR95** und **BTZ043** wird gereinigtes DprE1 (*M. tuberculosis*) mit Inhibitor (50 µM), FPR (100 µM) und 1 mM MgCl<sub>2</sub> bei 37 °C für 2 h inkubiert. Die Kristallisationsexperimente werden in 96-well Platten unter Verwendung eines TTP Labtech liquid handling Systems, welches 150 nl Proteinlösung (~ 35 mg/ml) + 150 nl Reservoirolösung in die Kristallisationsansätze pipettiert, durchgeführt. Die Reservoirolösung besteht aus 50 mM Imidazol pH 7.0-7.5 Puffer und 28 %-31 % v/v PPG 400. Die Proteinkristalle werden direkt mit einer Nylonschleife entnommen und in flüssigen Stickstoff gefroren.

#### Vermessung und Datenauswertung

Die gefrorenen Kristalle werden mit dem ID29 an der European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, F), bzw. mit dem Beamline I03 am Diamond Light Source (Didcot, UK) vermessen. Zur Bearbeitung bzw. Skalierung der Daten werden XDS und SCALA (CCP4) oder XSCALE (Kabsch,

2010) verwendet. Alle Kristalle weisen eine  $P2_1$  Raumgruppe mit DprE1 als Homodimer auf, welches den Liganden gebunden hat. Zur Auswertung der Strukturdaten wird ein vorher bestimmtes internes Strukturmodell von DprE1 bzw. PDB Eintrag 4FDP (Batt et al., 2012) verwendet. Die Modellbildung und Verfeinerung wird mit Hilfe von Coot, REFMAC und Phenix.refine Software (Adams et al., 2010) durchgeführt. Das Vorhandensein der kovalenten Bindung des Liganden an Cys387 wird mit Fo-Fc Elektronendichtekarten belegt. Die kovalente Bindung der BTZs ist anhand der zusammenhängenden Elektronendichte zwischen Cys387 und dem Stickstoff an Position 8 der Liganden ersichtlich. Die Daten aus Vermessung und Auswertung der Kristallstrukturen sind in Tabelle E3 zusammengefasst.

Tabelle E4. Röntgenstrukturdaten

X-ray diffraction data	<i>DprE1:AR86-2</i>	<i>DprE1:AR85</i>	<i>DprE1:IR95</i>	<i>DprE1:IR85</i>	<i>DprE1:BTZ043</i>
<b>Compound</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>9</b>	<b>12</b>
<b>Crystal</b>			SB343	SB407	SB341
<b>Beamline</b>	ESRF, ID29	ESRF, ID29	Diamond I03	Diamond I03	Diamond I03
<b>Wavelength</b>	1.0725	1.0725	0.97631	0.97631	0.97631
<b>Space group</b>	$P2_1$	$P2_1$	$P2_1$	$P2_1$	$P2_1$
<b>Cell parameters a,b,c (Å)</b>	78.3, 84.7, 80.9, $\beta=103.2^\circ$	78.1, 84.4, 80.5, $\beta=103.0^\circ$	78.6, 85.4, 80.4, $\beta=103.2^\circ$	78.2, 84.1, 80.8, $\beta=103.4^\circ$	78.5, 85.0, 80.5, $\beta=103.4^\circ$
<b>Molecules per asymmetric unit</b>	2	2	2	2	2
<b>Resolution (Å)</b>	56.69 - 2.47	57.4 - 2.05	78.3 - 2.38	84.1 - 2.2	29.6 - 2.28
<b>High resolution shell (Å)</b>	2.60 - 2.47	2.16 - 2.05	2.45 - 2.38	2.26 - 2.20	2.34 - 2.28
<b><math>R_{merge}</math> (%)<sup>1)</sup></b>	6.0 (59.2)	4.2 (51.4)	4.8 (51.3)	3.9 (61.0)	4.2 (46.3)
<b>Total observations</b>	103,392	214,517	212,901	193,532	174,538
<b>Unique reflections</b>	35,677	63,093	40,283	51,086	46,680
<b><math>I/\sigma(I)</math><sup>1)</sup></b>	11.3(2.4)	14.3 (2.6)	16.3 (2.1)	14.7 (2.4)	14.5 (2.3)
<b>Completeness (%)<sup>1)</sup></b>	96.8 (96.9)	98.8 (98.5)	97.1 (80.7)	98.6 (97.0)	99.0 (98.6)
<b>Multiplicity<sup>1)</sup></b>	2.9(2.9)	3.4 (3.5)	5.3 (3.6)	3.8 (3.9)	3.7 (3.8)
<b>Refinement</b>					
<b>Resolution range</b>	56.69 - 2.47	57.0 - 2.05	78.3 - 2.38	76.1 - 2.2	29.6 - 2.30
<b>Unique reflections</b>	33,896	59,902	40,251	51,061	43,167
<b><math>R_{cryst}, R_{free}</math> (%)</b>	17.0, 22.0	17.6, 20.8	21.2, 24.1	20.6, 23.8	19.8, 24.8
<b>No of non-hydrogen atoms</b>	6,863	7,019	6,511	6,562	6,627
<b>Protein + FAD</b>	6,589	6,574	6,396	6,463	6,490
<b>Ligand</b>	46	46	42	38	56

<b>Solvent</b>	228	399	73	61	81
<b>RMSD bonds (Å)</b>	0.008	0.007	0.008	0.009	0.01
<b>RMSD angles (°)</b>	1.19	1.15	1.18	1.18	1.45
<b>B-factors</b>					
<b>Wilson (Å<sup>2</sup>)</b>	66.8	41.3	53.0	47.3	45.6
<b>Average (Å<sup>2</sup>)</b>	64.2	72.2	67.8	62.4	62.6
<b>Protein + FAD (Å<sup>2</sup>)</b>	64.3	72.6	67.9	62.3	62.7
<b>Ligand (Å<sup>2</sup>)</b>	94.0	70.4	75.1	89.1	68.6
<b>Solvent (Å<sup>2</sup>)</b>	54.9	65.0	57.2	48.2	44.1
<b>RMSD B-factors (Å<sup>2</sup>)</b>	3.0	3.0	4.1	1.0	2.1
<b>Ramachandran plot<sup>2)</sup></b>					
<b>Favoured region (%)</b>	98.4	98.9	97.6	98.2	97.6
<b>Allowed regions (%)</b>	1.6	1.1	2.4	1.4	2.3
<b>Disallowed (%)</b>	0.0	0.0	0	0.4	0.1

<sup>1)</sup> Values in parenthesis refer to high resolution shell. <sup>2)</sup> Ramachandran plot statistics were calculated using Molprobity (Vincent B. Chen, W. Bryan Arendall III, Jeffrey J. Headd, Daniel A. Keedy, Robert M. Immormino, Gary J. Kapral, Laura W. Murray, Jane S. Richardson and David C. Richardson (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. Acta Crystallogr **D66**, 12-21)

### **7.3.4 Bestimmung der Löslichkeit mittels CLND**

Chemi-Luminescent Nitrogen Detection (CLND) Löslichkeitsbestimmung: 5 ml einer 10 mM DMSO Stammlösung werden mit Phosphat Puffer (pH 7.4) auf 100 ml verdünnt, eine Stunde lang bei RT äquilibriert und durch Millipore Multiscreen HTS-PCF (MSSL BPC) filtriert. Die Menge des gelösten Stoffes im Filtrat wird mit Hilfe der Stickstoff Chemilumineszenz Methode bestimmt.

## **8 Literaturverzeichnis**

Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V. B. et al. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Cryst D66*, 213-221

Asfaw, H. (2016). Synthese von Depsipeptid- und Cyclopeptidderivaten. Dissertationsschrift, Martin Luther Universität Halle Wittenberg, Haale (Saale), in Arbeit

Bala, V., Jangir, S., Mandalapu, D., Gupta, S. et al. (2015). Dithiocarbamate-thiourea hybrids useful as vaginal microbicides also show reverse transcriptase inhibition: design, synthesis, docking and pharmacokinetic studies. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25, 881-886

Barry, J. E. et al. (1983). Hydrogen bonded complexes IV: Urea-phenol complexes. *Tetrahedron* 39, 2151-2156

Batt, S. M., Jabeen, T., Bhowruth, V., Quill, L., et al. (2012). Structural basis of inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* DprE1 by benzothiazinone inhibitors. *PNAS* 109, 11354 - 11359

Batt, S. M., Izquierdo, M. C., Pichel, J. C., Stubbs, C. J., et al. (2015). Whole Cell Target Engagement Identifies Novel Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* Decaprenylphosphoryl- $\beta$ -d-ribose Oxidase. *ACS Infectious Diseases* 1, 615-626

Bhattachar, S. N.; Wesley, J. A.; Seadeek, C, (2006). Evaluation of the chemiluminescent nitrogen detector for solubility determinations to support drug discovery. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41, 152-157

Bhutani, I., Loharch, S., Gupta, P., Madathil R., Parkesh, R. (2015). Structure, Dynamics, and Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) DprE1 and DprE2 examined by Molecular Modeling, Simulation and electrostatic Studies. *PLoS ONE* 10

Bloch, H., Segal, W. (1956). Biochemical differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* grown in vivo and in vitro. *J. Bacteriol.* 72, 132–141

Bloom, J. D. et al. (2000). Aryl- and Heteroaryl-substituted thiourea derivatives useful as inhibitors of herpes viruses. 2000034268

Bolognesi, M. L., Budriesi, R., Chiarini, A., Poggesi E. et al. (1998). Design, Synthesis, and Biological Activity of Prazosin-Related Antagonists. Role of the Piperazine and Furan Units of Prazosin on the Selectivity for  $\alpha_1$ -Adrenoreceptor Subtypes. *J. Med. Chem.* *41*, 4844-4853

Brecik, M., Centárová, I., Mukherjee, R., Gaëlle, S., et al. (2014). DprE1 is a vulnerable tuberculosis drug target due to its cell wall localization. *ACS Chem. Biol.* *10*, 1631-1636

Briken, V., Porcelli, S.A., Besra, G., Kremer, L. (2004). Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Mol. Microbiol.* *53*, 391–403

Cesarz, W. K, Pritzkow, C. U., Voerckel, V. (1989). Gaschromatographic Analysis of Aromatic Sulphonic Acids. The Sulphonation of Aromatic Hydrocarbons and Related Compounds. *Journal f. prakt. Chemie* *331*, 1011-1013

Chatterji, M., Shandil, R., Manjunatha, M. R., Solapure, et al. (2014). 1,4-Azaindole, a potential drug candidate for treatment of tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother* *58*, 5325–5331.

Cho, S. H., Warit, S., Wan, B. et al. (2007). Low-Oxygen-Recovery Assay for High-Throughput Screening of Compounds against Nonreplicating Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* *51*, 1380-1385

Cho, S., Lee, H. S., Franzblau, S. (2015). Microplate Alamar Blue Assay (MABA) and Low Oxygen Recovery Assay (LORA) for Mycobacterium tuberculosis. *Mycobacteria Protocols, Methods in Molecular Biology* *1285*, 281-291

Christophe, T., et al. (2009). High content screening identifies decaprenyl-phosphoribose 2' epimerase as a target for intracellular antimycobacterial inhibitors. *PLoS Pathog* *5*, :e1000645.

Cooper, M., et al. (2012). Benzothiazinone compounds and their use as anti-tuberculosis agents. Australia, EP2468746A1

Clarke, H. T., Read, R. R. (1941). o-Tolunitrile and p-Tolunitrile. *Organic Syntheses 1*, 514-517

Collins, J. L., Blanchard, S. G., Boswell, G. E., Charifson, P. S. et al. (1998). N-(2-Benzoylphenyl)-L-tyrosine PPAR $\gamma$  Agonists. 2. Structure-Activity Relationship and Optimization of the Phenyl Alkyl Ether Moiety. *J. Med. Chem.* *41*, 5037-5054

Copeland, R. A. (2013). Evaluation of enzyme inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists, Second Edition, John Wiley & Sons Inc.

Coste, J., Nguyen, D L., Castro, B. (1990). PyBOP<sup>®</sup> A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-products. *Tetrahedron Letters* *31*, 205-208

Crellin, P. K., Brammananth, R., Coppel, R. L. (2011). Decaprenylphosphoryl- $\beta$ -D-ribose 2'-epimerase, the target of benzothiazinones and dinitrobenzamides, is an essential enzyme in *Mycobacterium smegmatis*. *PLoS One* *6*

Crick, D. C., Mahapatra, S., Brannan, P. J. (2001). Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glycobiology* *11*, 107R-118R

Davey, M. H., Lee, V. Y., Miller, R. D., Marks, T. J., et al. (1999). Synthesis of Aryl Nitroso Derivatives by tert-Butyl Hypochlorite Oxidation in Homogeneous Media Intermediates for the Preparation of High-Hyperpolarizability Chromophore Skeletons. *J. Org. Chem.* *64*, 4976-4979

De Jesus Lopes Ribeiro, A. L., et al. (2011). Analogous Mechanisms of Resistance to Benzothiazinones and Dinitrobenzamides in *Mycobacterium smegmatis*. *PLoS ONE* *6*, e26675

Delves, P. J., Martin, S. J., Burton, D. R., Roitt, I. M. (2006). *Roitt's Essential Immunology* (11<sup>th</sup> Edition). Malden, Blackwell Publishing

Deretic, V., Singh, S., Master, S., et al. (2006). *Mycobacterium* inhibition of phagolysosome biogenesis and autophagy as a host defence mechanism. *Cell. Microbiol.* *8*, 719-727

Deutsches Arzneibuch (1990). Deutscher Apotheker Verlag: Stuttgart. 9. Auflage, 47-48 und 424-430.

Devulder, G., et al. (2005). A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 55, 293-302

Diacon, A.H., Pym, A., Grobusch, M., et al. (2009). The diarylquinoline TMC207 for multidrug-resistant tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* 360, 2397-2405

Dijk, M. v., Nollet, M. L., Weijers, P., Dechesne, A. C., et al. (2008). Synthesis and Characterization of Biodegradable Peptide-Based Polymers Prepared by Microwave-Assisted Click Chemistry. *Biomacromolecules* 9, 2834–2843

DIN-Norm 58940-8 (2002). Medizinische Mikrobiologie - Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika - Teil 8: Mikrodilution; Allgemeine methodenspezifische Anforderungen

Ford, C. B., Lin, P. L., et al. (2011). Use of whole genome sequencing to estimate the mutation rate of *Mycobacterium tuberculosis* during latent infection. *Nat. Genet.* 43, 482-486

Forneris, F., Heuts, D. P., Delvecchio, M., Rovida, S., Fraaije, M. W., Mattevi, A. (2008). Structural analysis of the catalytic mechanism and stereoselectivity in *Streptomyces coelicolor* alditol oxidase. *Biochemistry* 47, 978-985

Franzblau, S. G. et al. (2012). Comprehensive analysis of methods used for the evaluation of compounds against *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 92, 453-488

Gaëlle, S., Kolly, Boldrin, F., Sala, C., Dhar, N., Hartkoorn, R. C. et al. (2014). Assessing the essentiality of the decaprenyl-phospho-D-arabinofuranose pathway in *Mycobacterium tuberculosis* using conditional mutants. *Molecular Microbiology* 92, 194–211

Gallego, M. T., Brunet, E., Ruano, J. L. G. (1993). Conformational Analysis of Methylthiazanes: The Problem of the Me-N-Me *Gauche* Interaction. *J. Org. Chem.* 58, 3905-3911

Gao, C., Ye, T. H., Wang N. Y., Zeng X. X., Zhang L. D. et al. (2013). Synthesis and structure-activity relationships evaluation of benzothiazinone derivatives as potential anti-tubercular agents. *Bioorg Med Chem Lett.* *23*, 4919-4922

Gao, C., Peng, C., Shi, Y., You, X., Ran, K. et al. (2016). Benzothiazinethione is a potent preclinical candidate for the treatment of drug-resistant tuberculosis. *Sci Rep.* *6*, 29717

González-Martínes, N. A., Lozano-Garza, H. G., Castro-Garza, J., et al. (2015). In Vivo Activity of the Benzothiazinones PBTZ169 and BTZ043 against *Nocardia brasiliensis*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* *9*, 1-11

Hansen, J. M. et al. (2014). N-glycolylated peptidoglycan contributes to the immunogenicity but not pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.* *209*, 1045-1054

Hartmann, H., Reuther, I.: Verfahren zur Herstellung von 1,1-disubstituierten Thioharnstoffen. German Democratic Republic, DD100467A1, 1973

Houben-Weyl (1983). Methoden der organischen Chemie.: Aldehyde. E3, G. Thieme Verlag, S. 479

Impurities: guideline for residual solvents Q3C(R5), ICH harmonised tripartite guideline, 2002, 1-25

Jensberger, M., Davis, T. P., Barner, L. (2003). Applications of Lawesson's Reagent in Organic and Organometallic Syntheses. *Synthesis* *13*, 1929-1958

Kabsch, W. (2010). XDS. *Acta Cryst.* *66*, 125-132

Karoli, T., Becker, B., Zuegg, J., Möllmann, U., Ramu, S. et al. (2012). Identification of Antitubercular Benzothiazinone Compounds by Ligand-Based Design. *J. Med. Chem.* *55*, 7940-7944

Kieser, K. J., Rubin, E. J. (2014). How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. *Nature Reviews Microbiology* *12*, 550-562

Koch, O., Selzer, P.M. (2012) Biologie der Mykobakterien und neue molekulare Targets: Einen widerstandsfähigen Organismus mit modernen Waffen bekämpfen. *Pharmazie in unserer Zeit* 41, 19-26

Koscik, D., et al. (1983). New synthesis of 2-amino-4-oxopyrido[3,2-e]-1,3-thiazines and 1-alkyl(aryl)pyrido[3,2-e]-2-thiouracils. *Collect. Czech. Chem.* 48, 3315-3328.

Landge, S., Ramachandran, V., Kumar, A., Neres, J., Murugan, K. et al. (2016). Nitroarenes as antitubercular Agents - Stereoelectronic modulation to mitigate Mutagenicity. *ChemMedChem.* 11, 331-339

Magnet, S., Hartkoorn, R. C., Székely, R. et al. (2010). Leads for antitubercular compounds from kinase inhibitor library screens. *Tuberculosis* 90, 354-360

Makarov, V., Cole, S.T., Möllmann, U., International Patent Application, WO 2007/134625 A1

Makarov, V., Manina, G., Mikušová, K., Möllmann, U., et al. (2009). Benzothiazinones Kill *Mycobacterium tuberculosis* by Blocking Arabinan Synthesis. *Science* 324, 801-804

Makarov, V. (2011). Process for the preparation of 2-amino substituted 1,3-benzothiazine-4-ones. WO 2011132070

Makarov, V., Cole, S., (2012). 2-Piperazin-1-yl-4H-1,3-benzothiazin-4-one derivatives and their use for treatment of mammalian infections. WO2012/066518A1

Makarov, V., Lechatier, B., Ming, Z., Neres, J., et al. (2014). Towards a new combination therapy for tuberculosis with next generation benzothiazinones. *EMBO Mol. Med.* 6, 372-383

Makarov, V., Neres, J., Hartkoorn, R. C., Ryabova, O. B., Kazakova, E. et al. (2015). 8-Pyrrole-benzothiazinones non-covalent inhibitors of DprE1 from *Mycobacterium tuberculosis* Antimicrob. Agents Chemother. 59, 4446-4452

Matsumoto, M., Hashizume, H., Tomishige, T., et al. (2006). OPC-67683, a nitro-dihydroimidazooxazole derivative with promising action against tuberculosis in vitro and in mice. *PLoS Med.* 3, 2131-2144

- McGrath, M, Gey van Pittius, N. C., van Helden, P. D., Warren, R. M., Warner, D. F. (2013). Mutation rate and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* *69*, 292-302
- Mikušová, K., Huang, H., Yagi, T., Holsters, M., Vereecke, D., et al. (2005) Decaprenylphosphoryl arabinofuranose, the donor of the D-arabinofuranosyl residues of mycobacterial arabinan, is formed via a two-step epimerization of decaprenylphosphoryl ribose. *J. Bacteriol.* *187*, 8020-8025
- Mikušová, K., Makarov, V. and Neres, J. (2014). DprE1 – from the Discovery to the Promising Tuberculosis Drug Target. *Curr. Pharm. Design* *20*, 4249-4273
- Möllmann, U., Makarov, V., Cole, S. T. (2009). New antimicrobial compounds, their synthesis and their use for treatment of mammalian infection. Germany, WO2009010163A1
- Narumi, T., Arai, H., Yoshimura, K., Harada S. et al. (2011). Small molecular CD4 mimics as HIV entry inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* *19*, 6735-6742
- Neres, J., Pojer, F., Molteni, E., Chiarelli, L. R., et al. (2012). Structural Basis for Benzothiazinone-Mediated Killing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci. Transl. Med.* *4*, 150ra-121
- Neres, J., Hartkoorn, R. C., Chiarelli, L. R., Gadupudi, R., et al. (2015). 2-Carboxyquinoxalines kill *Mycobacterium tuberculosis* through noncovalent inhibition of DprE1. *ACS Chem. Biol.* *10*, 705-714
- Nielsen, M. A., Nielsen M. K., Pittelkow, T. (2004). Scale-Up and Safety Evaluation of a Sandmeyer Reaction. *Organic Process Research & Development* *8*, 1059-1064
- Palomino, J. C. et al. (2002). Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* *46*, 2720-2722
- Pandey, A., Sasseti, C. (2008). Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 4376-4380

Parish, T., Roberts, D. M., (2015). *Mycobacteria Protocols* Third Edition. Springer New York Heidelberg Dordrecht London

Peng, C. T., Gao, C., Wang N. Y., You, X. Y., Zhang, L. D. et al. (2015). Synthesis and antitubercular evaluation of 4-carbonyl piperazine substituted 1,3-benzothiazin-4-one derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25, 1373-1376

Pham, V. P., Jossang, A., Grellier, P., Sévenent T. et al. (2008). Structure and Total Synthesis of (-)-Myrionidine and (-)-Schoberine, Antimalarial Alkaloids from *Myrioneuron nutans*. *J. Org. Chem.* 73, 7565–7573

Raap, J., Nieuwenhuis, S., Creemers, A. Hexspoor, S. et al. (1999). Synthesis of Isotopically Labelled L-Phenylalanine and L-Tyrosine. *Eur. J. Org. Chem.*, 2609-2621

Riccardi, G., Pasca, M. R., Chiarelli, L. R., Manina, G., Mattevi, A., Binda, C. (2013). The DprE1 enzyme, one of the most vulnerable targets of *Mycobacterium tuberculosis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 8841-8848

Richter, A. (2013). Synthese von Strukturabwandlungen des Naturstoffes Pyridomycin und deren Testung auf antibakterielle Eigenschaften. Diplomarbeit, MLU Halle Wittenberg

von Richter, V. (1871). Untersuchungen über die Constitution der Benzolderivate. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft.* 4, 459-468

Robert Koch Institut, Epidemiologisches Bulletin 03/16, 2016

Rowland, K. (2012). Totally drug-resistant TB emerges in India. *Nature News and Comment*

Rudolph, I. (2013). Synthesis of benzothiazinones and derivatives as novel antitubercular agents. Dissertationsschrift

Rudolph, I., Richter, A., Imming, P. German Patent Application (2014). Antimycobakteriell wirksame Substanzen, Verfahren zu ihrer Herstellung und deren Verwendung. AKZ 10 2014 012 546.7

Rullas, J., et al. (2010). Fast standardized therapeutic-efficacy assay for drug discovery against tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother* 54, 2262-2264

Seybold, G., Dimmler, M., Stange, A.: Verfahren zur Herstellung von 1,1-disubstituierten Thioharnstoffen. Germany, DE3314435A1, 1984

Shi-Yan Foo, C., Lechartier, B., Kolly, G. S. et al. (2016). Characterization of DprE1-mediated benzothiazinone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* Accepted Manuscript Posted Online

Shikhaliev, K. S., Zolotykh, K. V., Cherkasova, N. D., Solovev, A. S. (2003). New Synthetic Approaches to 6(7)-R-4-methyl-2-sulfanylquinazolines and their Transformations. *Russian Journal of General Chemistry* 74, 1591-1596

Shirude, P. S., Shandil, R., Sadler, C., Naik, M., Hosagrahara V. et al. (2013) Azaindoles: Noncovalent DprE1 Inhibitors from Scaffold Morphing Efforts, kill *Mycobacterium tuberculosis* and are Efficacious in vivo. *J Med Chem.* 56, 9701-9708

Shirude, P. S., Shandil, R. K., Manjunatha, M. R., Sadler, C., et al. (2014). Lead optimization of 1,4-azaindoles as antimycobacterial agents. *J. Med. Chem.* 57, 5728–5737

Robert Koch Institut, Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2014

Sall, D. J., Grunewald, G. L. (1987). Inhibition of Phenylethanolamine N-Methyltransferase (PNMT) by AromaticHydroxy-Substituted 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolines: Further Studies on the Hydrophilic Pocket of the Aromatic Ring Binding Region of the Active Site. *J. Med. Chem.* 30, 2208-2216

Schaberg, T., Bauer, T., Castell, S., et al. (2012). Empfehlungen zur Therapie, Chemoprävention und Chemoprophylaxe der Tuberkulose im Erwachsenen- und Kindesalter. *Pneumologie* 66, 133–171

Tiwari, R., et al. (2013). Thiolates Chemically Induce Redox Activation of BTZ043 and Related Potent Nitroaromatic Anti-Tuberculosis Agents. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 3539-3549

Tiwari, R., et al. (2013). Thiolates Chemically Induce Redox Activation of BTZ043 and Related Potent Nitroaromatic Anti-Tuberculosis Agents. *J. Am. Chem. Soc.* *135*, (supp. Information)

Tiwari, R., Miller, P. A, Cho, S., Franzblau, S. G., Miller, M. J. (2014). Syntheses and Antituberculosis Activity of 1,3-Benzothiazinone Sulfoxide and Sulfone Derived from BTZ043. *ACS Med. Chem. Lett.* *6*, 128–133

Tolstoj, L. (1878/2010). *Anna Karenina*. (Übersetzung Hermann Asemissen) Aufbau Verlag Berlin,

Trefzer, C., Rengifo-Gonzalez, M., Hinner, M. J., Schneider, P., et al. (2010). Benzothiazinones: Prodrugs That Covalently Modify the Decaprenylphosphoryl--D-ribose 2'-epimerase DprE1 of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Am. Chem. Soc.* *132*, 13663 - 13665

Trefzer, C., Škovierová, H., Buroni, S., Bobovská, A., et al. (2012) Benzothiazinones Are Suicide Inhibitors of Mycobacterial Decaprenylphosphoryl- $\beta$ -D-ribofuranose 2'-Oxidase DprE1. *J. Am. Chem. Soc.* *134*, 912 - 915

Tuberculosis in London: Annual review (2014), Public Health England

Upadhyaya, K., Gude, V., Mohiuddin, G., Nandiraju, R. V. S. (2013). A new family of four-ring bent-core nematic liquid crystals with highly polar transverse and end groups. *Beilstein J. Org. Chem.* *9*, 26-35.

Vamecq, J., Bac, P., Herrenknecht, C., Maurois, P. et al. (2000). Synthesis and Anticonvulsant and Neurotoxic Properties of Substituted N-Phenyl Derivatives of the Phthalimide Pharmacophore. *J. Med. Chem.* *43*, 1311-1319

Wang, K., Guengerich, P. F. (2012). Bioactivation of Fluorinated 2-Aryl-benzothiazole Antitumor Molecules by Human Cytochrome P450s 1A1 and 2W1 and Deactivation by Cytochrome P450 2S1. *Chem. Res. Toxicol.* *25*, 1740-1751

Wang, F., Sambandan, D., Halder, R., Wang, J., Batt, S. M., et. al. (2013) Identification of a small molecule with activity against drug-resistant and persistent tuberculosis. *PNAS* *110*, 2510 - 2517WHO, Global tuberculosis Report 2013

Welch, D. E., Baron, R. R., Burton, B. A. (1969) *a,a,a*-Trifluorotoluamides as Anticoccidial Agents. *J. Med. Chem.* *12*, 299-303

WHO Global Tuberculosis Report (2016)

WHO Surveillance Report: Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe (2016)

Wikler, M. A., et al. (2006) *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Seventh Edition*. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)

Xiao, X., Antony, S., Pommier, Y., Cushman, M. (2006). Total Synthesis and Biological Evaluation of 22-Hydroxyacuminatine. *J. Med. Chem.* *49*, 1408-1412

Yan, Y., Krishnakumar, S., Yu, H., Ramishetti, S. et al. (2013). Nickel(II) Dithiocarbamate Complexes Containing Sulforhodamine B as Fluorescent Probes for Selective Detection of Nitrogen Dioxide. *J. Am. Chem. Soc.* *135*, 5312-5315

Yu, L., Wei, Y. (2011). Benzothiazinethione derivatives as antitubercular drugs and their preparation, pharmaceutical compositions and use in the treatment of tuberculosis. CN102276598A

Yu, L., Wei, Y. (2012). Benzothiazinethione derivatives as mycobacterium tuberculosis inhibitors and their preparation, pharmaceutical compositions and use in the treatment of TB. WO2012162912A1

Yu, L., Wei, Y. (2013). Benzothiazine-4-one derivatives, preparation method therefor and use thereof. WO2013/185507A1

Zhong, H. M., Villani, F. J., Marzouq, R. (2007). Improved and Practical Synthesis of 6-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline Hydrochloride. *Organic Process Research & Development* *11*, 463-465

Zumla, A., Gillespie, S. H., Hoelscher, M., Philips, P. P. J, et al. (2014). New antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: needs, advances, and future prospects. *The Lancet* *14*, 327-340



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Menschen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen bzw. diese erst ermöglicht haben. Mein Doktorvater Prof. Peter Imming war in den vergangenen vier Jahren ein unverzichtbarer Ratgeber. Durch wissenschaftliche Diskussion und die Vermittlung von Kooperationspartnern hat er zum Gelingen dieser Dissertation maßgeblich beigetragen. Die gewissenhafte Verkostung japanischer Grüntees verschiedener Beschattungsgrade und die damit verbundenen Gespräche haben meine Zeit am Institut für Pharmazie in jeder Hinsicht bereichert.

Ausdrücklich gedankt sein soll Ines, als meine Vorgängerin in der Arbeitsgruppe von Prof. Imming hat sie ebenfalls über das BTZ Thema promoviert und auf diesem Gebiet synthetisch Neuland erschlossen, worauf diese Arbeit aufbaut. Zu Beginn meiner Promotion (und auch schon im Wahlpflichtfach!) hat Ines mir auf beispielhafte Art das Arbeiten im Syntheselabor vermittelt.

Für das kritische Lektorat meiner Arbeit möchte ich Katja danken. Die Anmerkungen und Vorschläge waren manchmal unbequem und immer hilfreich.

Zahlreiche Kooperationspartner haben großen Anteil am Umfang dieser Arbeit. Durch Archie, Chun-wa und Onkar von GSK Stevenage wurden zahlreiche Experimente an DprE1 erst möglich. Mein besonderer Dank gilt Onkar, der einen zweiwöchigen Aufenthalt bei GSK Stevenage ermöglichte und seine große Laborerfahrung mit mir geteilt hat. Die Zusammenarbeit mit Kerstin Voigt, Christiane Weigel (HKI Jena) und Scott Franzblau (University of Illinois, Chicago) ist ebenfalls hervorzuheben.

Großen Dank gilt meinen Eltern, die mich während Studium und Promotion stets unterstützt haben und ein wichtiger Rückhalt sind.

Auch möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe danken, die so manche Eigenheit zu ertragen verstand: Die angenehme Arbeitsatmosphäre trug ihren Teil zum Gelingen der wissenschaftlichen Arbeit bei. Marcel war dazu bereit, neben den Laboren, auch die Wohnung mit mir zu teilen, dabei beugte er Unfällen vor und schaffte es den Balkon in Ordnung zu halten. Ihm sei für eine sehr gelungene gemeinsame Zeit in der Ernst-Abbe-Straße 16 gedankt.

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Adrian Richter

Martin Luther Universität Halle-Wittenberg

Wolfgang-Langenbeck-Straße 4, Halle (Saale), 06120

Tel.: +49-3455525186

e-Mail: adrian.richter@pharmazie.uni-halle.de

### **Lebenslauf**

seit dem 01.01.2013 Promotionsstudent in der Arbeitsgruppe von Prof. Peter Imming, Martin Luther Universität Halle-Wittenberg (Synthese von Benzothiazinonen und Derivaten als DprE1 Hemmstoffe mit antimykobakterieller Aktivität)

12/2013 3. Staatsexamen (Approbation als Apotheker)

01.05.2012 - 31.12.2013 Praktische Ausbildung in der Löwen-Apotheke Naumburg/Saale und in der Apotheke Zur Goldenen Aue Roßleben

01.11.2011 - 30.04.2012 Diplomstudent in der Arbeitsgruppe von Prof. Peter Imming, Martin Luther Universität Halle-Wittenberg (Synthese von Cyclodepsipeptiden)

09/2011 2. Staatsexamen

08/2009 1. Staatsexamen

2007-2011 Studium der Pharmazie - Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

2007 Allgemeine Hochschulreife - Abitur

1999-2007 staatl. Gymnasium Klosterschule Roßleben

## **Publikationen**

### **2016**

Poster: Drug Delivery to the Lungs 27 conference (Edinburgh): Drug loading of Human Albumin Nanocarriers for inhaled Anti-Tuberculosis Therapy (A. Patel, A. Woods, P. Imming, A. Richter, N. Childerhouse, L. A. Dailey, B. Forbes)

Poster: EMBO Conference Tuberculosis 2016 (Paris): Synthesis and evaluation of new benzothiazinones with diverse chemical modifications (A. Richter, T. Wetzlar, K. Voigt, U. Möllmann, F. Kloss, S. Franzblau, P. Imming)

### **2015**

Publikation in Vorbereitung: Synthesis, antimycobacterial activity and influence on mycobacterial InhA and PknB of 12-membered cyclodepsipeptides (K. Laqua, M. Klemm, M. Richard-Greenblatt, A. Richter, L. Liebe, T. Huang, S. Lin, A. Guardia, E. Pérez-Herran, L. Ballell-Pages, Y. Av-Gay, P. Imming)

Vortrag: 1st Lung Infection Research Symposium PHE (London): Benzothiazinones (BTZs) with potent anti-mycobacterial activity: Opportunities and challenges for tuberculosis treatment

Poster: Drug Delivery to the Lungs 26 conference (Edinburgh): Formulation of Benzothiazinones in Bovine Serum Albumin Nanoparticles (A. Patel, A. Woods, P. Imming, A. Richter, L. A. Dailey, B. Forbes)

Poster: GRC Tuberculosis Drug Discovery & Development (Girona): Molecular details of the reaction of nitro, nitroso and amino benzothiazinones with Mycobacterium tuberculosis DprE1 (A. Richter, I. Rudolph, C. Chung, O.M.P. Singh, A. Argyrou, L. Ballell, K. Voigt, U. Möllmann, P. Imming)

### **2014**

Poster: DPhG Jahrestagung 2014 (Frankfurt am Main): Molecular details of the reaction of nitro, nitroso and amino benzothiazinones with Mycobacterium tuberculosis DprE1 (A. Richter, I. Rudolph, C. Chung, O.M.P. Singh, A. Argyrou, L. Ballell, K. Voigt, U. Möllmann, P. Imming)

German Patent Application: Antimykobakteriell wirksame Substanzen, Verfahren zu ihrer Herstellung und deren Verwendung. AKZ 10 2014 012 546.7 (I. Rudolph, A. Richter, P. Imming)

## **2013**

Poster: GRC Tuberculosis Drug Discovery & Development (Girona) 2013 Nitroso benzothiazinones – synthesis, properties, and interaction with DprE1 (A. Richter, O. Singh, P. Imming)

Poster: ACS regional meeting: Synthesis and Characterization of an Anti-tubercular Benzothiazinone Derivative (W. Sweis, M. Bond, N. Osei-Agyekum, A. Richter, P. Imming)

Diplomarbeit: Synthese von Strukturabwandlungen des Naturstoffes Pyridomycin und deren Testung auf antibakterielle Eigenschaften (A. Richter)

## **2012**

Poster: International Congress on Natural Products Research (New York): Pyridomycin: Evaluating it's antimycobacterial potential through the synthesis and testing of new analogues (K. Laqua, A. Richter, M. Ramm, U. Moellmann, P. Imming)

## **Eigenständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift gemäß der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät I (Biowissenschaften) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe.

Weiterhin habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Die daraus wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde ausschließlich der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt und an keiner anderen universitären Einrichtung, weder im In- noch im Ausland, zur Erlangung des Doktorgrades eingereicht.

---

Adrian Richter