

Design, Synthese und Charakterisierung von Inhibitoren für die Deubiquitinasen STAMBPL1 und USP48

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

von M. Sc., Kevin Böhm

geb. am 03.02.1991 in Rüsselsheim

genehmigt durch die Fakultät für Verfahrens- und Systemtechnik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Gutachter/innen:

Prof. Dr. rer. nat. Michael Naumann

Prof. Dr. Daniel Ramsbeck

Prof. Dr. Matthias Stein

Promotionskolloquium am 08.05.2025

Zusammenfassung

Ubiquitinierung ist eine häufig vorkommende posttranslationale Modifikation. Diese kann als Mono- oder Polyubiquitinierung vorliegen. Eine Ubiquitinierung kann eine Markierung von Proteinen für den Abbau durch das Proteasom bedeuten oder aber komplexere Vorgänge, wie bspw. Protein-Interaktionen, -Lokalisation oder enzymatische Aktivität regulieren. Durch Deubiquitinasen (DUBs) kann die Ubiquitinierung umgekehrt werden. Dabei sind DUBs an vielen wichtigen Signalpfaden beteiligt, weshalb sie ein interessantes Ziel für die Entwicklung niedermolekularer Inhibitoren sind. Aufgrund der stark konservierten aktiven Zentren innerhalb der einzelnen DUB-Klassen gilt es als schwierig, selektive DUB-Inhibitoren zu entwickeln. Aus diesem Grund sind bislang vergleichsweise wenige spezifische DUB-Inhibitoren beschrieben. Für die DUBs STAMBPL1 und USP48, konnte die Beteiligung an wichtigen Signalpfaden nachgewiesen werden, jedoch sind für beide bislang noch keine niedermolekularen Inhibitoren beschrieben. Ausgehend von *Screenings* kommerziell verfügbarer Substanzbibliotheken, die im Vorfeld zu dieser Arbeit am Institut für Experimentelle Innere Medizin (IEIM) der Otto-von-Guericke Universität unter Leitung von Prof. Dr. Michael Naumann durchgeführt wurden, wurde in dieser Arbeit versucht, Inhibitoren für die DUBs STAMBPL1 und USP48 zu entwickeln.

Für STAMBPL1 wurden dabei fünf Grundstrukturen identifiziert, die hinsichtlich der Struktur-Wirkungsbeziehung (SAR) untersucht werden sollten. Zu allen fünf dieser *scaffolds* wurden retrosynthetische Untersuchungen angestellt, um mögliche Syntheserouten zu finden und die entsprechenden Synthesen zu etablieren. Es wurde jeweils eine kleine Reihe von Derivaten synthetisiert. Unter den synthetisierten Inhibitorkandidaten wies jedoch keiner eine nennenswerte inhibitorische Aktivität auf, sodass die Ergebnisse des *Screenings* nicht bestätigt werden konnten.

Im Falle von USP48 konnte der Literaturbekannte USP2-Inhibitor ML-364 (ebenfalls am IEIM) als vielversprechender Ausgangspunkt für die Inhibitorentwicklung identifiziert werden. Die SAR des auf ML-364 basierenden Scaffolds wurde mittels eines ligandenbasierten Ansatzes untersucht. Zu diesem Zweck wurden mehrere Reihen von Analoga zu ML-364 synthetisiert und am IEIM auf ihre inhibitorische Aktivität hin untersucht. Einige dieser Analoga wiesen eine höhere inhibitorische Aktivität als ML-364 auf. Am IEIM wurde das aktivste der synthetisierten Derivate und ML-364 hinsichtlich der Selektivität gegenüber einer Reihe von anderen DUBs untersucht. Hierbei zeigte sich, dass beide keine Selektivität aufwiesen. Somit konnte die ursprünglich beschriebene Selektivität von ML-364 für USP2 bzw. USP8 nicht bestätigt werden. Mittels *in silico* Methoden konnte zudem gezeigt werden, dass ML-364 und die in dieser Arbeit synthetisierten Inhibitoren vermutlich an eine in USPs konservierte Bindetasche binden, wodurch sich die mangelnde Selektivität erklären ließe.

Summary

Ubiquitinylation is a common posttranslational modification, which can occur as mono- or polyubiquitinylation. It affects many cellular processes like degradation of proteins, protein-interactions and -localization or enzymatic activity. Deubiquitinylases (DUBs) are capable of reversing ubiquitinylation. DUBs are involved in many important signal-pathways, making them an interesting target for the development of small molecule inhibitors. Due to the highly conserved active sites within the individual DUB classes, it is considered difficult to develop selective DUB inhibitors. For this reason, comparatively few specific DUB inhibitors have been described so far. The involvement of the DUBs STAMBPL1 and USP48 in important signaling pathways has been demonstrated. However, no small molecule inhibitors have yet been described for either of them. Based on screenings of commercially available substance libraries that were carried out prior to this work at the Institute of Experimental Internal Medicine (IEIM) of the Otto-von-Guericke-University under the direction of Prof. Dr. Michael Naumann, this work attempted to develop inhibitors for the DUBs STAMBPL1 and USP48.

For STAMBPL1, five scaffolds were identified that were investigated with regard to the structure-activity relationship (SAR). Retrosynthetic studies were carried out on all the five scaffolds to find possible synthesis routes, to establish the corresponding syntheses. A small series of derivatives were synthesized for each. However, none of the synthesized inhibitor candidates showed any significant inhibitory activity, so the results of the screening could not be confirmed.

In the case of USP48, the literature-known USP2 inhibitor ML-364 was identified as a promising starting point for inhibitor development by the IEIM. The SAR of the ML-364-based scaffold was investigated using a ligand-based approach. For this purpose, several series of analogues to ML-364 were synthesized and tested for their inhibitory activity at the IEIM. Some of these analogues showed higher inhibitory activity than ML-364. At the IEIM, the most active of the synthesized derivatives and ML-364 were investigated for selectivity over a number of other DUBs. It was shown that both showed no selectivity. Thus, the originally described selectivity of ML-364 for USP2 and USP8 could not be confirmed. Using *in silico* methods, it was also shown that ML-364 and the inhibitors synthesized in this work most likely bind to a binding pocket conserved in USPs, which could explain the lack of selectivity.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Ubiquitinierung als posttranslationale Modifikation	1
1.2.	Deubiquitinasen.....	3
1.3.	<i>STAM-binding protein like 1</i> (STAMBPL1).....	7
1.4.	Ubiquitin spezifische Protease 48 (USP48).....	10
2.	Computerchemische Vorarbeiten	11
3.	Aufgabenstellung	15
4.	Synthetische Arbeiten	16
4.1.	Synthese von Inhibitoren für STAMBPL1.....	16
4.1.1.	Retrosynthese der Verbindungen mit Isatin- <i>Scaffold</i>	16
4.1.2.	Synthese der Verbindungen mit Isatin- <i>Scaffold</i>	16
4.1.3.	Retrosynthese der Verbindungen mit Hydroxypiperidin <i>Scaffold</i>	20
4.1.4.	Synthese der Verbindungen mit Hydroxypiperidin <i>Scaffold</i>	21
4.1.5.	Retrosynthese der Verbindungen mit Sulfonylethanol <i>Scaffold</i>	25
4.1.6.	Synthese der Verbindungen mit Sulfonylethanol <i>Scaffold</i>	26
4.1.7.	Retrosynthese des Aminoalkohol <i>Scaffolds</i>	28
4.1.8.	Retrosynthese der Verbindungen mit Sulfonamid <i>Scaffold</i>	28
4.1.9.	Synthese der Verbindungen mit Sulfonamid <i>Scaffold</i>	29
4.2.	Synthese von Inhibitoren für USP48.....	31
4.2.1.	Retrosynthese der STK593195 Analoga.....	31
4.2.2.	Synthese der STK593195 Analoga	32
4.2.3.	Synthese der ML-364 Analoga	34
5.	Ergebnisse und Diskussion	47
5.1.	Struktur-Wirkungsbeziehungen der synthetisierten Inhibitoren für STAMBPL1	47
5.2.	Struktur-Wirkungsbeziehungen der synthetisierten Inhibitoren für USP48.....	52
5.3.	<i>In silico</i> Experimente zur Untersuchung des möglichen Bindungsmodus der USP48-Inhibitoren	60
6.	Zusammenfassung und Ausblick	70
7.	Experimentalteil	72
7.1.	Allgemeine experimentelle Angaben	72
7.1.1.	Chemikalien und Lösungsmittel.....	72
7.1.2.	Chromatographie.....	72
7.2.	Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV).....	75
7.2.1.	AAV1 – Aldol Reaktion Isatin	75

7.2.2.	AAV2 – GRIGNARD-Reaktion	75
7.2.3.	AAV3 – N-Alkylierung von Isatin	76
7.2.4.	AAV4 – Oxidation der Thioether	76
7.2.5.	AAV5 – Thioethersynthese	76
7.2.6.	AAV6 – SCHOTTEN-BAUMANN-Reaktion	77
7.2.7.	AAV7 – Methylesterabspaltung	77
7.2.8.	AAV8 – Methylesterabspaltung 2	77
7.2.9.	AAV9 – Synthese von Harnstoff-Derivaten.....	78
7.2.10.	AAV10 – Synthese von Harnstoff-Derivaten 2.....	78
7.2.11.	AAV11 – Tosylierung.....	78
7.2.12.	AAV11b – Tosylierung 2.....	79
7.2.13.	AAV12 – Amidkupplung.....	79
7.2.14.	AAV13 – Suzuki-Kupplung.....	79
7.3.	Synthesevorschriften.....	80
7.3.1.	3-Hydroxy-3-phenacylindolin-2-on (1a).....	80
7.3.2.	3-Acetyl-5-chlor-3-hydroxyindolin-2-on (1b).....	80
7.3.3.	5-Chlor-3-hydroxy-3-phenacylindolin-2-on (1c)	80
7.3.4.	3-[2-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-2-oxoethyl]-5-chlor-3-hydroxyindolin-2-on (1d).....	81
7.3.5.	3-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-oxoethyl]-5-chlor-3-hydroxy-1-methylindolin-2-on (1e).....	81
7.3.6.	3-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-oxoethyl]-5-chloro-1-ethyl-3-hydroxyindolin-2-on (1f).....	82
7.3.7.	3-[2-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-2-oxoethyl]-5-chlor-3-hydroxy-1-phenylindolin-2-on (1g).....	82
7.3.8.	3-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-oxoethyl]-1-benzyl-5-chlor-3-hydroxyindolin-2-on (1h)	83
7.3.9.	3-[2-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-2-oxoethyl]-5-chloro-3-hydroxy-1-(2-phenylethyl)indolin-2-on (1i).....	83
7.3.10.	5-Chlor-3-hydroxy-3-phenylindolin-2-on (1j)	84
7.3.11.	3-Benzyl-5-chlor-3-hydroxyindolin-2-on (1k)	84
7.3.12.	5-Chlor-3-hydroxy-3-(2-phenylethyl)indolin-2-on (1l).....	84
7.3.13.	5-Chlor-1-methylindoline-2,3,-dion (2a).....	85
7.3.14.	5-Chlor-1-ethylindolin-2,3-dion (2b).....	85
7.3.15.	1-Benzyl-5-chlorindolin-2,3-dion (2c)	86
7.3.16.	5-Chlor-1-(2-phenylethyl)indolin-2,3-dion (2d)	86
7.3.17.	5-Chlor-1-phenylindolin-2,3-dion (2e).....	86
7.3.18.	1-[4-[(4-chlorophenyl)methylsulfonylmethyl]-4-hydroxy-1-piperidyl]-2,2-dimethylpropan-1-one (8a).....	87
7.3.19.	1-[4-(Phenylsulfonylmethyl)-4-hydroxy-1-piperidyl]-2,2-dimethylpropan-1-on (8b)	87

7.3.20.	1-[4-(Benzylsulfonylmethyl)-4-hydroxy-1-piperidyl]-2,2-dimethylpropan-1-on (8c)	88
7.3.21.	1-[4-Hydroxy-4-(2-phenylethylsulfonylmethyl)-1-piperidyl]-2,2-dimethylpropan-1-on (8d).....	88
7.3.22.	1-[4-[(2,4-Dichlorophenyl)methylsulfonylmethyl]-4-hydroxy-1-piperidyl]-2,2-dimethylpropan-1-on (8e)	89
7.3.23.	1-[4-(Ethylsulfonylmethyl)-4-hydroxy-1-piperidyl]-2,2-dimethylpropan-1-on (8f)	89
7.3.24.	1-(2,2-Dimethylpropanoyl)piperidin-4-on (10).....	89
7.3.25.	1-[4-[(4-chlorophenyl)methylsulfanylmethyl]-4-hydroxy-1-piperidyl]-2,2-dimethylpropan-1-one (16a).....	90
7.3.26.	1-[4-Hydroxy-4-(phenylsulfanylmethyl)-1-piperidyl]-2,2-dimethylpropan-1-on (16b) ...	90
7.3.27.	1-[4-(Benzylsulfanylmethyl)-4-hydroxy-1-piperidyl]-2,2-dimethylpropan-1-on (16c)	91
7.3.28.	1-[4-Hydroxy-4-(2-phenylethylsulfanylmethyl)-1-piperidyl]-2,2-dimethylpropan-1-on (16d).....	91
7.3.29.	1-[4-[(2,4-Dichlorophenyl)methylsulfanylmethyl]-4-hydroxy-1-piperidyl]-2,2-dimethylpropan-1-on (16e)	91
7.3.30.	1-[4-(Ethylsulfanylmethyl)-4-hydroxy-1-piperidyl]-2,2-dimethylpropan-1-on (16f)	92
7.3.31.	2,2-Dimethyl-1-(1-oxa-6-azaspiro[2,5]octan-6-yl)propan-1-on (20)	92
7.3.32.	<i>tert</i> -Butyl-1-oxa-6-azaspiro[2,5]octan-6-carboxylat (22)	92
7.3.33.	<i>tert</i> -Butyl-4-[(4-chlorophenyl)methylsulfanylmethyl]-4-hydroxypiperidin-1-carboxylat (23)	93
7.3.34.	<i>tert</i> -Butyl-4-[(4-chlorophenyl)methylsulfonylmethyl]-4-hydroxypiperidin-1-carboxylat (24)	93
7.3.35.	4-[(4-Chlorophenyl)methylsulfonylmethyl]piperidin-4-ol hydrochlorid (25)	94
7.3.36.	1-[4-[(4-Chlorophenyl)methylsulfonylmethyl]-4-hydroxy-1-piperidyl]ethanon (26a)	94
7.3.37.	1-[4-[(4-Chlorophenyl)methylsulfonylmethyl]-4-hydroxy-1-piperidyl]propan-1-one (26b).....	94
7.3.38.	[4-[(4-Chlorophenyl)methylsulfonylmethyl]-4-hydroxy-1-piperidyl]-phenylmethanon (26c)	95
7.3.39.	1-[4-[(4-Chlorophenyl)methylsulfonylmethyl]-4-hydroxy-1-piperidyl]-2-phenylethanon (26d)	95
7.3.40.	1-[4-[(4-Chlorophenyl)methylsulfonylmethyl]-4-hydroxy-1-piperidyl]-3-phenylpropan-1-on (26e).....	96
7.3.41.	1-(3-Benzylsulfonyl-2-hydroxy-propyl)pyrrolidin-2-on (27)	96
7.3.42.	1-(3-Benzylsulfanyl-2-hydroxy-propyl)pyrrolidin-2-on (28).....	96
7.3.43.	1-(Oxiran-2-ylmethyl)pyrrolidin-2-on (29).....	97
7.3.44.	1-(3-Bromo-2-hydroxy-propyl)pyrrolidin-2-on (34).....	97
7.3.45.	Methyl-2-(4-chlorsulfonylphenoxy)acetat (42a)	98
7.3.46.	Methyl-2-(4-aminophenoxy)acetat (43a)	98
7.3.47.	Methyl-2-(4-nitrophenoxy)acetat (44a)	99
7.3.48.	Methyl-2-[4-(propylsulfamoyl)phenoxy]acetat (47a).....	99

7.3.49.	Methyl-2-[4-(isobutylsulfamoyl)phenoxy]acetat (47b)	99
7.3.50.	Methyl-2-[4-(benzylsulfamoyl)phenoxy]acetat (47c)	100
7.3.51.	2-[4-(Propylsulfamoyl)phenoxy]essigsäure (48a)	100
7.3.52.	2-[4-(Isobutylsulfamoyl)phenoxy]essigsäure (48b)	100
7.3.53.	2-[4-(Benzylsulfamoyl)phenoxy]essigsäure (48c)	101
7.3.54.	(2S)-4-Methylsulfanyl-2-[(4-sulfamoylphenyl)carbamoylamino]buttersäure (49a).....	101
7.3.55.	2-[(4-Sulfamoylphenyl)carbamoylamino]essigsäure (49b).....	101
7.3.56.	(2S)-2-[(4-Sulfamoylphenyl)carbamoylamino]capronsäure (49c)	102
7.3.57.	Methyl-(2S)-2-(ethylcarbamoylamino)-4-methylsulfanyl-butanoat (50a)	102
7.3.58.	Methyl-(2S)-2-(tert-butylcarbamoylamino)-4-methylsulfanyl-butanoat (50b)	102
7.3.59.	Methyl-(2S)-2-(cyclohexylcarbamoylamino)-4-methylsulfanyl-butanoat (50c)	103
7.3.60.	Methyl-(2S)-2-(phenylcarbamoylamino)-4-methylsulfanyl-butanoat (50d)	103
7.3.61.	Methyl-(2S)-2-(benzylcarbamoylamino)-4-methylsulfanyl-butanoat (50e)	103
7.3.62.	Methyl-(2S)-2-(Phenylethylcarbamoylamino)-4-methylsulfanyl-butanoat (50f)	103
7.3.63.	Methyl-(2S)-2-[(4-methoxyphenyl)carbamoylamino]-4-methylsulfanyl-butanoat (50g)	104
7.3.64.	Methyl-(2S)-2-[(3-methoxyphenyl)carbamoylamino]-4-methylsulfanyl-butanoat (50h)	104
7.3.65.	Methyl-(2S)-2-(1-naphtylcarbamoylamino)-4-methylsulfanyl-butanoat (50i)	104
7.3.66.	Methyl-(2S)-2-(isoindoline-2-carbonylamino)-4-methylsulfanyl-butanoat (50j)	105
7.3.67.	Methyl (2S)-4-methylsulfanyl-2-[(4-sulfamoylphenyl)carbamoylamino]butanoat (51a)	105
7.3.68.	Methyl 2-[(4-sulfamoylphenyl)carbamoylamino]acetat (51b)	105
7.3.69.	Methyl (2S)-2-[(4-sulfamoylphenyl)carbamoylamino]hexanoat (51c)	106
7.3.70.	(2S)-2-(Ethylcarbamoylamino)-4-methylsulfanyl-buttersäure (55a)	106
7.3.71.	(2S)-2-(tert-Butylcarbamoylamino)-4-methylsulfanyl-buttersäure (55b)	106
7.3.72.	(2S)-2-(Cyclohexylcarbamoylamino)-4-methylsulfanyl-buttersäure (55c)	107
7.3.73.	(2S)-2-(Phenylcarbamoylamino)-4-methylsulfanyl-buttersäure (55d)	107
7.3.74.	(2S)-2-(Benzylcarbamoylamino)-4-methylsulfanyl-buttersäure (55e)	107
7.3.75.	(2S)-2-(Phenylethylcarbamoylamino)-4-methylsulfanyl-buttersäure (55f)	108
7.3.76.	(2S)-2-[(4-Methoxyphenyl)carbamoylamino]-4-methylsulfanyl-buttersäure (55g)	108
7.3.77.	(2S)-2-[(3-Methoxyphenyl)carbamoylamino]-4-methylsulfanyl-buttersäure (55h).....	109
7.3.78.	(2S)-2-(1-Naphtylcarbamoylamino)-4-methylsulfanyl-buttersäure (55i)	109
7.3.79.	(2S)-2-(Isoindolin-2-carbonylamino)-4-methylsulfanylbuttersäure (55j)	109
7.3.80.	2-(<i>p</i> -Tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzoesäure (58)	110
7.3.81.	2-(<i>p</i> -Tolylsulfonylamino)- <i>N</i> -(4-pyridyl)-4-(trifluormethyl)benzamid (59a)	110
7.3.82.	<i>N</i> -Ethyl-2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (59b)	110
7.3.83.	<i>N</i> -Phenyl-2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (59c)	111

7.3.84.	<i>N</i> -Benzyl-2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (59d)	111
7.3.85.	<i>N</i> -(2-Phenylethyl)-2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (59e)	111
7.3.86.	<i>N</i> -(4-Phenylphenyl)-2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (59f).....	112
7.3.87.	<i>N</i> -(3-Phenylphenyl)-2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (59g)	112
7.3.88.	<i>N</i> -(2-naphthyl)-2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (59h).....	113
7.3.89.	2-Amino- <i>N</i> -(4-phenylthiazol-2-yl)-4-(trifluormethyl)benzamid (60)	113
7.3.90.	2-(Benzolsulfonamido)- <i>N</i> -(4-phenylthiazol-2-yl)-4-(trifluormethyl)benzamid (61a)	113
7.3.91.	2-[Bis(methylsulfonyl)amino]- <i>N</i> -(4-phenylthiazol-2-yl)-4-(trifluormethyl)benzamide (61b).....	114
7.3.92.	2-(Cyclohexylsulfonylamino)- <i>N</i> -(4-phenylthiazol-2-yl)-4-(trifluormethyl)benzamid (61c)	114
7.3.93.	2-(Benzylsulfonylamino)- <i>N</i> -(4-phenylthiazol-2-yl)-4-(trifluormethyl)benzamid (61d)..	115
7.3.94.	2-(2-Naphtylsulfonylamino)- <i>N</i> -(4-phenylthiazol-2-yl)-4-(trifluormethyl)benzamid (61e).....	115
7.3.95.	2-(Isopropylsulfonylamino)- <i>N</i> -(4-phenylthiazol-2-yl)-4-(trifluormethyl)benzamid (61f).....	115
7.3.96.	2-(Phenylethylsulfonylamino)- <i>N</i> -(4-phenylthiazol-2-yl)-4-(trifluormethyl)benzamid (61g).....	116
7.3.97.	2-Phenyl-3-(4-phenylthiazol-2-yl)-7-(trifluormethyl)-1,2-dihydroquinazolin-4-on (62).....	116
7.3.98.	2-(<i>p</i> -Tolylsulfonylamino)benzoesäure (64a).....	117
7.3.99.	4-Methyl-2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)benzoesäure (64b)	117
7.3.100.	4-Chlor-2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)benzoesäure (64c).....	117
7.3.101.	4-Fluor-2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)benzoesäure (64d)	117
7.3.102.	4-Methoxy-2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)benzoesäure (64e)	118
7.3.103.	4,5-Diemethoxy-2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)benzoesäure (64f)	118
7.3.104.	3-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)propionsäure (64g)	118
7.3.105.	3-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)pyridin-4-carbonsäure (64h)	119
7.3.106.	<i>N</i> -(4-Phenylthiazol-2-yl)-2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)benzamid (65a).....	119
7.3.107.	4-Methyl- <i>N</i> -(4-phenylthiazol-2-yl)-2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)benzamid (65b)	119
7.3.108.	4-Chlor- <i>N</i> -(4-phenylthiazol-2-yl)-2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)benzamid (65c).....	120
7.3.109.	4-Fluor- <i>N</i> -(4-phenylthiazol-2-yl)-2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)benzamid (65d).....	120
7.3.110.	4-Methoxy- <i>N</i> -(4-phenylthiazol-2-yl)-2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)benzamid (65e).....	120
7.3.111.	4,5-Dimethoxy- <i>N</i> -(4-phenylthiazol-2-yl)-2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)benzamid (65f)	121
7.3.112.	<i>N</i> -(4-Phenylthiazol-2-yl)-3-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)propanamid (65g).....	121
7.3.113.	<i>N</i> -(4-Phenylthiazol-2-yl)-3-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)pyridin-4-carboxamid (65h).....	122
7.3.114.	<i>N</i> -(4-Phenylthiazol-2-yl)-4-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)pyridin-3-carboxamid (65i).....	122
7.3.115.	4-Amino- <i>N</i> -(4-phenylthiazol-2-yl)pyridin-3-carboxamid (66).....	122

7.3.116.	Methyl (2S)-4- <i>tert</i> -Butoxycarbonyl-1-(<i>p</i> -tolylsulfonyl)piperazin-2-carboxylat (68)	123
7.3.117.	(2R)-4- <i>tert</i> -butoxycarbonyl-1-(<i>p</i> -tolylsulfonyl)piperazin-2-carbonsäure (69 _a).....	123
7.3.118.	(2S)-4- <i>tert</i> -Butoxycarbonyl-1-(<i>p</i> -tolylsulfonyl)piperazin-2-carbonsäure (69 _b)	123
7.3.119.	<i>tert</i> -Butyl (3R)-3-[(4-phenylthiazol-2-yl)carbamoyl]-4-(<i>p</i> -tolylsulfonyl)-piperazin-1-carboxylat (70a)	124
7.3.120.	<i>tert</i> -Butyl (3S)-3-[(4-phenylthiazol-2-yl)carbamoyl]-4-(<i>p</i> -tolylsulfonyl)-piperazin-1-carboxylat (70b)	124
7.3.121.	(2R)- <i>N</i> -(4-Phenylthiazol-2-yl)-1-(<i>p</i> -tolylsulfonyl)piperazin-2-carboxamid (71a)	124
7.3.122.	(2S)- <i>N</i> -(4-Phenylthiazol-2-yl)-1-(<i>p</i> -tolylsulfonyl)piperazin-2-carboxamid (71b).....	125
7.3.123.	<i>N</i> -(4-Bromthiazol-2-yl)-2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (72)	125
7.3.124.	<i>N</i> -[4-(1 <i>H</i> -Indol-5-yl)thiazol-2-yl]-2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (73a)	126
7.3.125.	2-(<i>p</i> -Tolylsulfonylamino)- <i>N</i> -[4-(1 <i>H</i> -pyrazol-3-yl)thiazol-2-yl]-4-(trifluormethyl)benzamid (73b)	126
7.3.126.	<i>N</i> -[4-(4-Methoxyphenyl)thiazol-2-yl]-2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (73c)	126
7.3.127.	<i>N</i> -[4-(3,4-Dimethoxyphenyl)thiazol-2-yl]-2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (73d)	127
7.3.128.	<i>N</i> -[4-(4-Cyanoxyphenyl)thiazol-2-yl]-2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (73e)	127
7.3.129.	Methyl-4-[2-[[2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzoyl]amino]thiazol-4-yl]benzoat (73f).....	128
7.3.130.	4-[2-[[2-(<i>p</i> -Tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzoyl]amino]thiazol-4-yl]benzoesäure (73g)	128
7.3.131.	2-(<i>p</i> -Tolylsulfonylamino)- <i>N</i> -[4-[4-(1 <i>H</i> -tetrazol-5-yl)phenyl]thiazol-2-yl]-4-(trifluormethyl)benzamid (73h)	128
7.3.132.	<i>N</i> -[4-(4-Carbamoylphenyl)thiazol-2-yl]-2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamide (73i)	129
7.3.133.	<i>N</i> -[4-[4-(Diethylamino)phenyl]thiazol-2-yl]-2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamide (73j)	129
7.3.134.	2-(<i>p</i> -Tolylsulfonylamino)- <i>N</i> -[4-(<i>p</i> -tolyl)thiazol-2-yl]-4-(trifluormethyl)benzamid (73k)	130
7.3.135.	<i>N</i> -[4-(4-Morpholinphenyl)thiazol-2-yl]-2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (73l)	130
7.3.136.	<i>N</i> -[4-(2-Aminopyrimidin-5-yl)thiazol-2-yl]-2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (73m).....	131
7.3.137.	<i>N</i> -[4-(2-Aminopyrimidin-5-yl)thiazol-2-yl]-2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (73n)	131
7.3.138.	<i>N</i> -[4-(4-Fluorphenyl)thiazol-2-yl]-2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamide (73o)	132
7.3.139.	<i>N</i> -[4-(4-Chlorphenyl)thiazol-2-yl]-2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamide (73p)	132

7.3.140.	<i>N</i> -[4-(3-Chlorphenyl)thiazol-2-yl]-2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamide (73q).....	132
7.3.141.	<i>N</i> -[4-(2-Chlorphenyl)thiazol-2-yl]-2-(<i>p</i> -tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamide (73r).....	133
7.3.142.	2-(<i>p</i> -Tolylsulfonylamino)- <i>N</i> -[4-(4-pyridyl)thiazol-2-yl]-4-(trifluormethyl)benzamid (73s).....	133
7.3.143.	2-(<i>p</i> -Tolylsulfonylamino)- <i>N</i> -[4-(3-pyridyl)thiazol-2-yl]-4-(trifluormethyl)benzamid (73t).....	134
7.4.	Inhibitortestung.....	134
7.4.1.	Bestimmung der inhibitorischen Aktivität der Inhibitoren für STAMBPL1.....	134
7.4.2.	Bestimmung der inhibitorischen Aktivität der Inhibitoren für verschiedene USPs und PLPro.....	135
7.4.3.	Im <i>Screening</i> verwendete Verbindungen	136
7.5.	Computergestützte Methoden.....	137
8.	Verzeichnisse.....	138
8.1.	Abkürzungsverzeichnis	138
8.2.	Abbildungsverzeichnis	140
8.3.	Schemaverzeichnis	142
8.4.	Tabellenverzeichnis	143
8.5.	Literaturverzeichnis	144
9.	Anhang.....	i
9.1.	Screeningergebnisse bekannter USP-Inhibitoren.....	i
9.2.	¹ H-NMR Spektren ausgewählter STAMBPL1 Inhibitoren	iii
9.3.	¹ H- und ¹³ C-NMR-Spektren ausgewählter USP48 Inhibitoren	v
9.4.	Ehrenerklärung	x
9.5.	Vorabveröffentlichungen	xi

1. Einleitung

1.1. Ubiquitinierung als posttranslationale Modifikation

Ubiquitin ist ein hochkonserviertes 76 Aminosäuren langes globuläres Protein, das als posttranslationale Modifikation an ein Zielprotein geknüpft werden kann. Diese Verknüpfung wird durch eine Kaskade bestehend aus drei Enzymklassen katalysiert: Ubiquitin-Aktivierungsenzyme (E1), Ubiquitin-konjugierende Enzyme (E2) und Ubiquitin-Ligasen (E3).^[1-3] Hierbei wird das Ubiquitin zunächst von E1 unter ATP-Verbrauch aktiviert und es entsteht eine kovalente Thioester-Bindung zwischen Ubiquitin und E1. Im nächsten Schritt wird das Ubiquitin auf das katalytische Cystein von E2 übertragen. Schließlich hilft die E3-Ligase dabei das Ubiquitin an einen Lysinrest des Zielmoleküls zu übertragen oder katalysiert diesen Vorgang direkt (Abbildung 1).^[4,5]

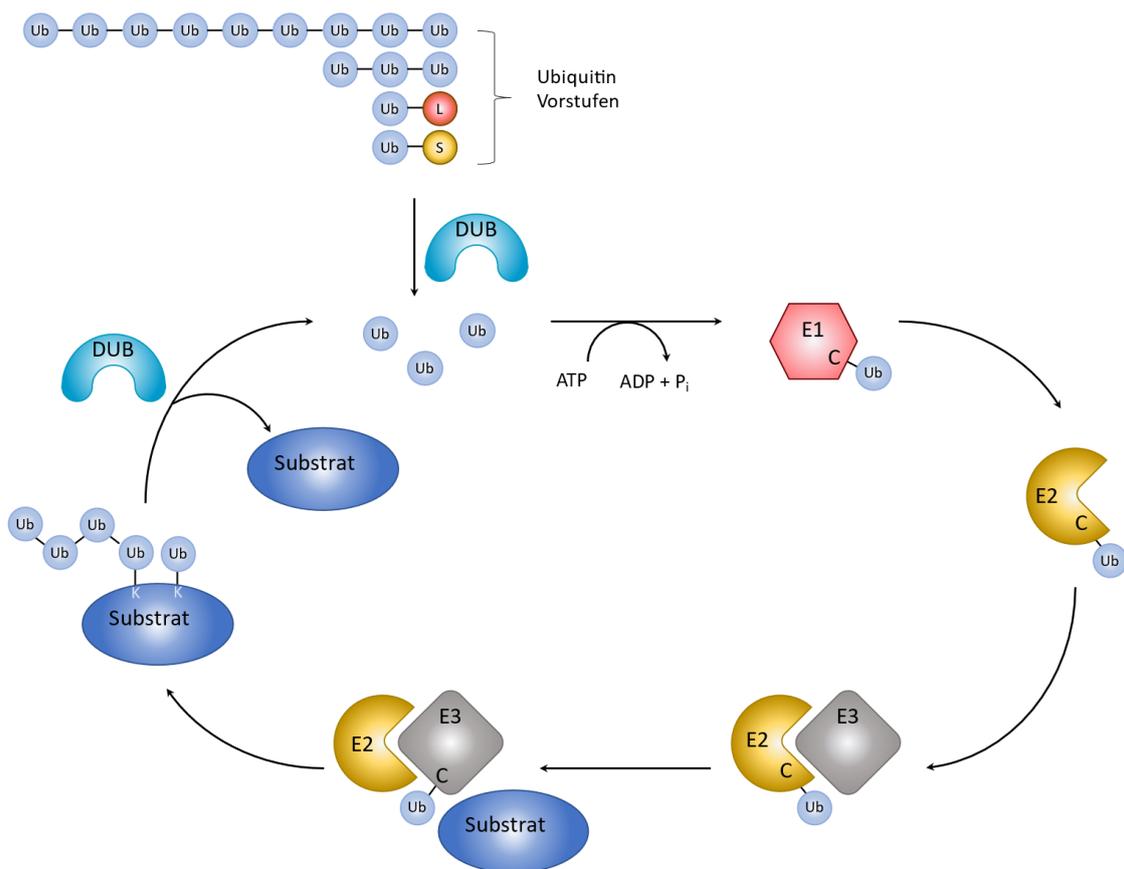


Abbildung 1: Mechanismus der Ubiquitinierung. Ubiquitin Vorstufen werden von Deubiquitinasen (DUBs) zu Ubiquitin gespalten. Dieses wird unter ATP-Verbrauch auf E1 übertragen und von diesem an E2 weitergegeben. Schließlich bildet sich ein Komplex mit der Ligase E3. Im hier gezeigten Beispiel wird das Ubiquitin zuerst von E2 auf E3 und dann von E3 auf einen Lysinrest des Substrats übertragen. Es gibt aber auch E3-Ligasen, die nicht an Ubiquitin binden. In diesem Fall dient der Komplex aus E2 und E3 zur Substraterkennung und Ubiquitin wird direkt von E2 auf das Substrat übertragen.^[6] DUBs können diesen Prozess ganz oder teilweise rückgängig machen. Abbildung nach Harrigan et. al.^[4]

Eine häufige Funktion von Ubiquitinierung ist die Markierung von Proteinen für den Abbau durch das Proteasom. Folglich werden viele Proteine nur einmal während ihres Bestehens ubiquitiniert.^[7] Es werden jedoch auch komplexere Informationen, wie bspw. Protein-Interaktionen, -Lokalisation oder enzymatische Aktivität, durch Ubiquitinierung reguliert.^[4,8] Dies ist möglich, da Ubiquitin selbst an sieben verschiedenen Lysinresten über eine Isopeptidbindung — also einer Verknüpfung über die Seitenkette des Lysins — ubiquitiniert werden kann. Eine weitere Ubiquitinierungsstelle ist das N-Terminale Methionin.^[9] Dies ermöglicht die Bildung von Ubiquitin-Ketten, die entweder homotypisch, über immer den gleichen Rest, oder heterotypisch, über verschiedene Reste, verknüpft werden können. In letzterem Fall können diese Ketten entweder gerade verknüpft oder auch verzweigt sein.^[7,10] Zusätzliche Komplexität wird durch den Einbau von weiteren ubiquitinähnlichen Modifikationen, wie bspw. SUMO (*small ubiquitin-related modifier*) oder NEDD8 (*neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 8*), sowie Phosphorylierung oder Acetylierung des Ubiquitins, ermöglicht (Abbildung 2).^[7,11] So kann Monoubiquitinierung eine Rolle bei der Proteinerkennung, Komplexbildung oder allosterischer Regulierung spielen, während homotypische Lys48-verknüpfte Ketten eine Markierung für den Abbau durch das Proteasom darstellen. Alle anderen Lysin-verknüpften Ketten wiederum spielen Rollen, die nicht mit dem Proteinabbau zusammenhängen, u.a. bei der zellulären Signalübertragung, dem intrazellulären Transport und der DNA-Schadensantwort.^[7] Ubiquitinierung ist demzufolge ein Vorgang, der die Regulierung komplexer Vorgänge in der Zelle ermöglicht.

Die Ubiquitinierung selbst ist reversibel und wird durch eine Vielzahl von Deubiquitinasen (DUBs) reguliert, die die Ubiquitinierung ganz oder teilweise umkehren können.^[4]

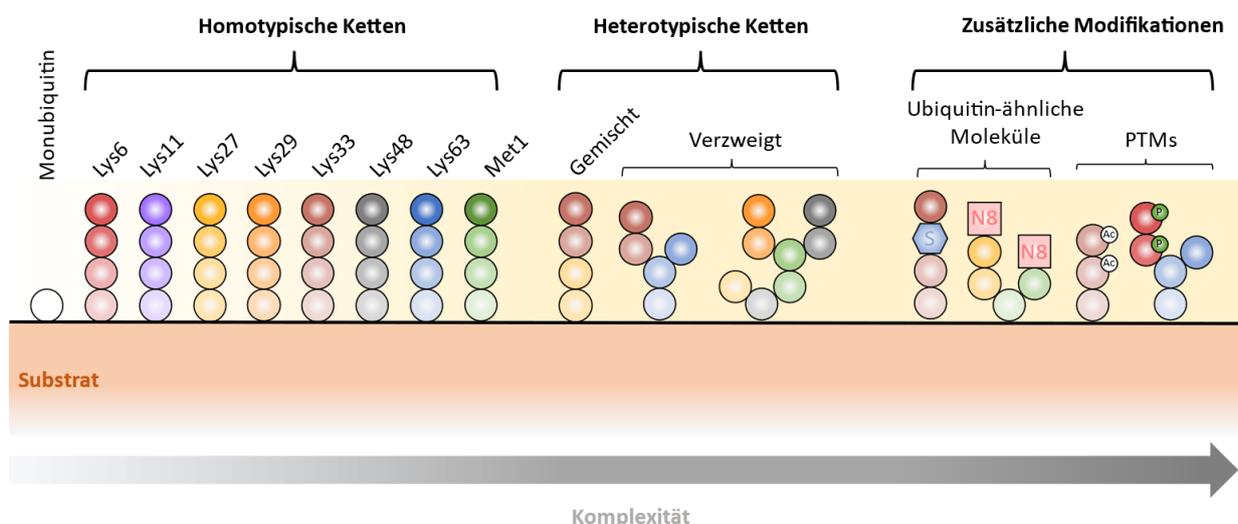


Abbildung 2: Verschiedene Formen der Ubiquitinierung sortiert nach aufsteigender Komplexität. Abbildung nach MEVISSSEN et al.^[7]

1.2. Deubiquitinasen

DUBs sind Peptidasen, die spezifisch Ubiquitinierungen umkehren. Dabei können sie entweder Ubiquitin vom Substrat trennen, Ubiquitinketten an einer spezifischen Position schneiden oder Ubiquitinvorstufen prozessieren.^[4] Aufgrund der Komplexität der verschiedenen Ubiquitinketten, gibt es eine Vielzahl an verschiedenen DUBs. Im Menschen sind ca. 100 DUBs bekannt, die sich in sieben Familien gliedern. Die größte und vielseitigste Gruppe bilden die Ubiquitin spezifischen Proteasen (USPs). Weiterhin gibt es *ubiquitin carboxyl-terminal hydrolases* (UCHs), *otubain/ovarian tumor-domain containing proteins* (OTUs), *Machado-Joseph disease domain superfamily* (MJDs), *JAB1/MPN/MOV34 proteases* (JAMMs), *novel motif interacting with ubiquitin-containing DUB family* (MINDY) und *Zn-finger and UFP domain proteins* (ZUFSPs).^[12,13] Manche Autoren zählen zusätzlich noch *monocyte chemotactic protein-induced proteins* (MCPIPs) und *permuted papain fold peptidases of dsDNA viruses and eukaryotes* (PPPDE) als eigene DUB-Familien.^[14–16] Mit Ausnahme der JAMM-Familie, welche eine Zn²⁺-Metalloprotease-Familie ist, sind alle DUBs Cysteinproteasen.^[14] Die verschiedenen DUB Familien unterscheiden sich vor allem durch ihre Faltung und in ihrer Substrat- und Bindungsspezifität. So sind USPs meist substratspezifisch und entfernen unspezifisch alle Ubiquitinierungen vom Substrat. OTUs spalten hingegen spezifische Ubiquitinverknüpfungen, sind dabei aber substratunspezifisch. Weiterhin können verschiedene DUB Familien, eine oder mehrere Substrat- oder Ubiquitinbindedomänen (UBDs) besitzen. So enthalten die DUBs der MINDY-Familie drei UBDs, wodurch sie zusätzliche Ubiquitinbindestellen aufweisen.^[17]

DUBs, die ein proximales Ubiquitin vom Zielprotein trennen, erkennen das Zielprotein oftmals über Protein-Protein-Interaktionsdomänen inner- oder außerhalb des aktiven Zentrums. Sie sind also substratspezifisch und spalten Ubiquitin ungeachtet der Verknüpfungsstelle. Dabei entsteht freies Ubiquitin und das unmodifizierte Substrat. DUBs, die spezifische Polyubiquitinketten spalten, sind in der Regel spezifisch gegenüber dem Verknüpfungstyp (z.B. nur Lys63). Sie spalten die Bindung zwischen proximalem und distalem Ubiquitin und generieren somit monoubiquitiniertes Produkt. Meist können sie nicht die Isopeptidbindung zwischen Substrat und dem proximalen Ubiquitin spalten. Oftmals sind diese DUBs nur wenig substratspezifisch.^[7]

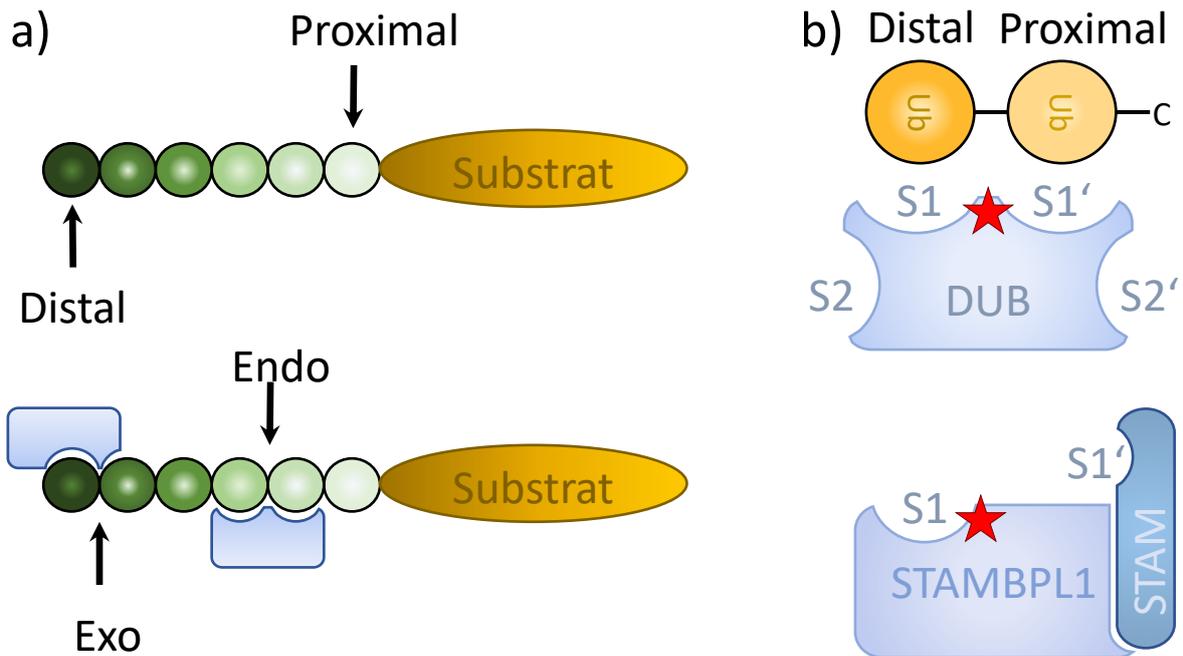


Abbildung 3: a) Oben: Nomenklatur des distalen und proximalen Ubiquitins. Unten: Exo- und Endo-Aktivität. b) Oben: Nomenklatur der Ubiquitinbindungsstellen. Das aktive Zentrum ist als Stern dargestellt. Unten: STAMBPL1 bindet STAM, welches die S1'-Bindestelle besitzt. Dies ermöglicht eine höhere DUB-Aktivität. Abbildung nach MEVISSSEN et al.^[7]

Weiterhin wird zwischen Exo- und Endo-Aktivität der DUBs unterschieden. DUBs mit Exo-Aktivität spalten das endständige Ubiquitin einer Ubiquitinkette ab, sodass Monoubiquitin entsteht. Wohingegen DUBs mit Endo-Aktivität die Bindung zwischen zwei Ubiquitinmolekülen innerhalb der Ubiquitinkette spalten, sodass eine kürzere ungebundene Ubiquitinkette entsteht (Abb. 3a). Im Falle der Exo-Aktivität sind mehrere Schritte nötig, um die Ubiquitinkette vollständig abzuspalten. Ob DUBs Ubiquitinketten mit Endo- oder Exo-Aktivität spalten, hängt sowohl von der DUB-Familie als auch von der Verknüpfung der Ubiquitinkette ab. So spaltet USP21 bspw. Lys63-verknüpfte Ubiquitinketten mittels Endo-Aktivität, da das an Lys63 gebundene Ubiquitin sich außerhalb der Bindetasche von USP21 befindet. Ist die Polyubiquitinkette hingegen Lys6-verknüpft, wird diese von USP21 mittels Exo-Aktivität gespalten, da Lys6 zur Enzymoberfläche von USP21 hin orientiert ist. Somit kann USP21 ausschließlich am Ende der Polyubiquitinkette binden. Ein Beispiel für die Abhängigkeit der Exo-/Endo-Aktivität von der DUB-Familie ist die OTU-Familie. So spalten die meisten DUBs der OTU-Familie Ubiquitinketten mittels Endo-Aktivität. ^[7,18]

Alle DUBs besitzen mindestens eine Ubiquitinbindestelle, die, gemäß der Nomenklatur für Peptidasen von SCHECHTER und BERGER, S1-Stelle genannt wird (Abb. 3b).^[19] Diese Stelle führt den Ubiquitin C-Terminus und die spaltbare Bindung in das aktive Zentrum, wo diese hydrolysiert wird. DUBs, die nur eine S1-Bindestelle besitzen, entfernen Ubiquitin meist unspezifisch gegenüber des Verknüpfungstyps vom Substrat. Weiterhin kann eine S1'-Bindestelle vorhanden sein, an die das proximale Ubiquitin oder Substrat gebunden ist. Dies ermöglicht bspw. Bindungs- bzw. Substratspezifität, indem die

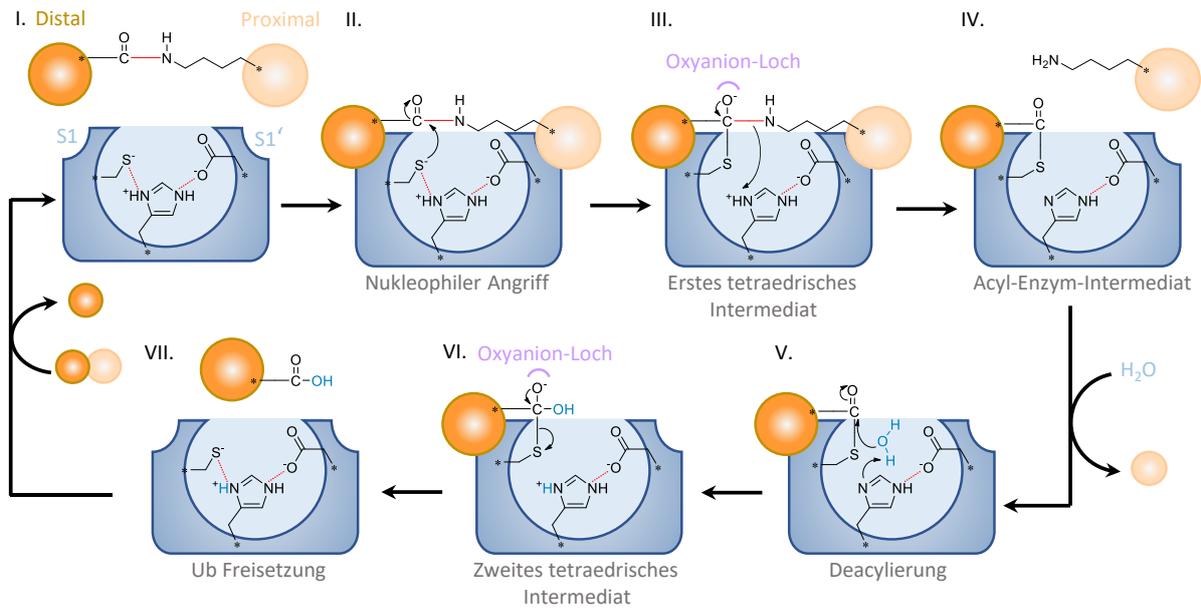
Positionierung des proximalen Ubiquitins bestimmt, welcher Lysinrest zum aktiven Zentrum hin orientiert wird. In wenigen bekannten Fällen kann die S1'-Bindestelle auch auf einer Ubiquitinbindedomäne (UBD) liegen, die von der DUB rekrutiert wird. Dies ist bei STAMBPL1 (*STAM binding protein like 1*) und STAMBMP der Fall. Isoliert ist die DUB Aktivität von STAMBMP sehr niedrig, die Zugabe von STAM (*signal transducing adaptor molecule*) erhöht die Aktivität enorm. Dies liegt daran, dass das Ubiquitin-Interaktionsmotiv von STAM die S1'-Bindestelle von STAMBMP vergrößert und somit den Enzym-Substrat-Komplex stabilisiert. Dennoch spaltet STAMBMP auch ohne STAM spezifisch Lys63-verknüpfte Ubiquitinketten.^[7,20]

DUBs, die längere Ubiquitinketten spalten, können zusätzlich noch eine S2-Ubiquitinbindestelle besitzen. Beispiele hierfür sind OTUD2 und OTUD3.^[7] MINDY1 und MINDY2 haben sogar mindestens fünf Ubiquitinbindestellen (S1 und S1' – S4').^[21]

Die Spaltung von Ubiquitinketten erfolgt bei Cysteinprotease DUBs durch eine katalytische Triade bestehend aus Cystein, Histidin und einem Säurerest (Abb. 4a I.). Diese kann in manchen USPs, wie bspw. USP7, in einer inaktiven Konfiguration vorliegen und erst durch eine Konformationsänderung infolge der Ubiquitinbindung aktiviert werden.^[22] Nach der Bindung von Diubiquitin an das aktive Zentrum greift der deprotonierte Cysteinrest nukleophil am Carbonyl der Isopeptidbindung an (Abb. 4a II.). Dadurch entsteht ein negativ geladenes tetraedrisches Intermediat, welches durch das Oxyanion-Loch des aktiven Zentrums stabilisiert wird (Abb. 4a III.). Durch die anschließende Bildung eines Acylintermediates, wird das proximale Ubiquitin freigesetzt, während das distale Ubiquitin am Cysteinrest des Enzyms gebunden bleibt (Abb. 4a IV.). Die Deacylierung des Cysteins erfolgt durch einen nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls am Carbonyl unter erneuter Ausbildung eines tetraedrischen Intermediates (Abb. 4a V.). Unter Regenerierung des negativ geladenen Cysteinrests erfolgt schließlich die Abspaltung des distalen Ubiquitins (Abb. 4a VI.).

Im Falle der Zinkabhängigen JAMM-DUBs befindet sich ein Zink-Atom im aktiven Zentrum. Dieses wird von einem Asparaginsäurerest, zwei Histidinresten und einem Wassermolekül koordiniert. Das Wassermolekül bildet wiederum eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem negativ geladenen Glutaminsäurerest aus (Abb. 4b I.). Bindet ein Diubiquitin an das aktive Zentrum, greift das aktivierte Wassermolekül nukleophil am Carbonyl der Isopeptidbindung an (Abb. 4b II.) und es wird ein tetraedrisches Intermediat gebildet, welches durch das Zink-Atom und einen Serinrest stabilisiert wird (Abb. 4b III.). Die Isopeptidbindung wird daraufhin gespalten und beide Ubiquitine freigesetzt (Abb. 4b IV.).^[7,23,2]

a Cysteinprotease DUBs



b Metalloprotease DUBs

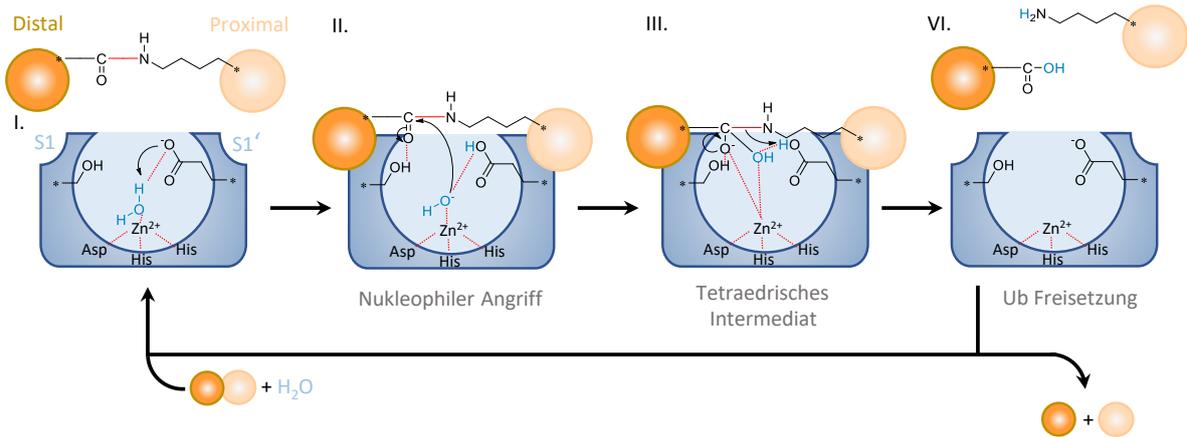


Abbildung 4: Mechanismus von Cysteinprotease DUBs (a) und Metalloprotease DUBs (b). Wasserstoffbrückenbindungen sind als rot-gestrichelte Linien dargestellt. Abbildung nach MEVISSEN et. al.^[7]

1.3. STAM-binding protein like 1 (STAMBPL1)

Aufgrund der stark konservierten aktiven Zentren innerhalb der einzelnen DUB-Klassen, gilt es als schwierig selektive DUB-Inhibitoren zu entwickeln.^[24] Aus diesem Grund sind bislang vergleichsweise wenige DUB-Inhibitoren beschrieben, obwohl DUBs an vielen wichtigen Signalpfaden beteiligt sind.^[25] Für die DUBs STAMBPL1 und USP48, konnte die Beteiligung an eben solchen wichtigen Signalpfaden nachgewiesen werden. Jedoch ist für beide bislang noch kein selektiver niedermolekularer Inhibitor beschrieben.^[26-28]

STAMBPL1 (Abbildung 6), auch bezeichnet als *associated molecule with the SH3 Domain of STAM like protease* (AMSH-LP), gehört zur JAMM-Metalloprotease Familie und spaltet spezifisch K63-Ubiquitinverknüpfungen. Strukturell ist es nah verwandt mit AMSH. Beide besitzen eine sogenannte *N-terminal microtubule-interacting and transport* (MIT)-Domäne, eine vermutliche Kernlokalisierungssequenz (engl. *nuclear localisation sequence*, kurz: NLS) und eine C-terminale Mpr1p und Pad1p N-terminale (MPN)-Domäne, die ein JAMM-Motiv enthält (Abbildung 5).^[27,29] Zusätzlich dazu besitzen AMSH und STAMBPL1 die Insertationen Ins-1 und Ins-2, die für die Erkennung des distalen (Ins-1) bzw. proximalen (Ins-2) Ubiquitins zuständig sind.^[23] Im aktiven Zentrum befindet sich ein Zn^{2+} -Ion das von zwei Histidinresten (His347 und His349), einem Asparaginsäurerest (Asp360) und einem Wassermolekül koordiniert wird (Abbildung 6). Das Wassermolekül bildet wiederum eine Wasserstoffbrückenbindung zum Glutaminsäurerest (Glu292) aus. Weiterhin koordinieren die Reste Cys402, His408 und His410 der Ins-2 zusammen mit His362 des JAMM-Motifs ein zweites Zn^{2+} -Ion.^[23]



Abbildung 5: Schematische Darstellung der Domänen von STAMBPL1

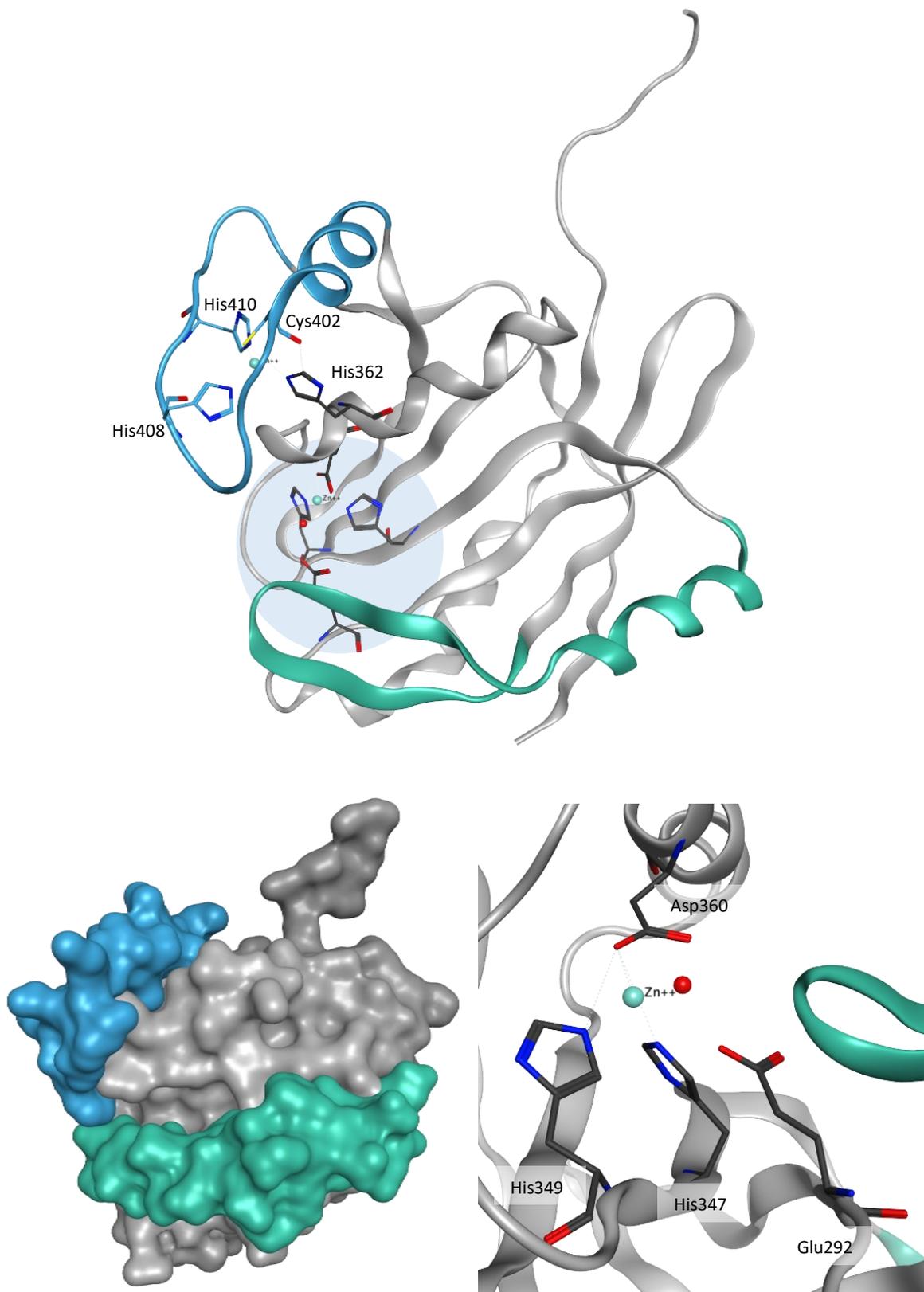


Abbildung 6: Oben: Schematische Kristallstruktur der JAMM-Domäne von STAMBPL1 (Struktur aus der *Protein Data Bank* PDB: 2ZNR)^[23,30,31] mit Ins-1 (grün) und Ins-2 (blau). Das aktive Zentrum ist blau hinterlegt. Unten links: Oberfläche der JAMM-Domäne mit Ins-1 (grün) und Ins-2 (blau). Unten rechts: Aktives Zentrum von STAMBPL1

STAMBPL1 wurde ursprünglich als ein Protein der AMSH-Familie beschrieben, das in der Lage war, die Interleukin-2-vermittelte Induktion des Onkogens c-myc zu verstärken. Die genaue zelluläre Funktion von STAMBPL1 ist weiterhin unklar, da die direkten Substrate von STAMBPL1 bislang nicht charakterisiert wurden.^[32] Es konnte jedoch gezeigt werden, dass STAMBPL1 in verschiedenen zellulären Prozessen eine Rolle spielt. So führt die Deubiquitinierung und die damit einhergehende Stabilisierung von MKP-1 (*mitogen-activated protein kinase phosphatase*) durch STAMBPL1 zu einer erhöhten Cisplatinresistenz in Brustkrebszellen.^[33] Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte STAMBPL1 Konzentration in Prostatakrebszellen zu einer Unterdrückung der Apoptose führt. Eine Abschaltung des STAMBPL1 Gens durch RNAi löste eine Caspase-3/-7-abhängige Apoptose in den Prostatakrebszellen aus.^[26] Außerdem stabilisiert STAMBPL1 das Protein Survivin und trägt somit zu einem besseren Überleben der Zelle bei.^[27] All dies macht STAMBPL1 zu einem interessanten Ziel für die Entwicklung neuer Inhibitoren zur Behandlung von Brust- und Prostatakrebs. Bislang wurden jedoch keine selektiven niedermolekularen Inhibitoren für STAMBPL1 beschrieben. Lediglich einige unselektive JAMM-Inhibitoren und die rekombinante Ubiquitinvariante UbV^{SP.1}, welche auch AMSH inhibiert, sind als Inhibitoren bekannt. Bei den unselektiven niedermolekularen JAMM-Inhibitoren handelt es sich ausschließlich um Chelatoren mit einer hohen Affinität zu zweiwertigen Metallionen, wie bspw. 1,10-Phenanthrolin, Thiolutin und Capzimin (Abbildung 7), die das Zn²⁺-Ion im aktiven Zentrum komplexieren.^[34-36] Unter den genannten Inhibitoren, zeigt lediglich Capzimin mit einem IC₅₀ von 0,34 μM eine sechs- bis 80-fache Selektivität für die JAMM-Protease Rpn11 (*proteasome 26S subunit, non-ATPase 14* auch bekannt als PSMD14) gegenüber anderen JAMM-Metalloproteasen.^[37]

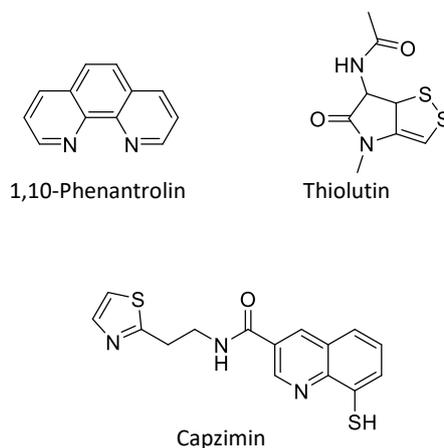


Abbildung 7: Strukturen der JAMM-Inhibitoren 1,10-Phenanthrolin, Thiolutin und Capzimin

1.4. Ubiquitin spezifische Protease 48 (USP48)

USP48 ist wie alle USPs eine Cysteinpeptidase und spaltet spezifisch K48-verknüpftes Ubiquitin. Die Sequenz von USP48 ist 1035 Aminosäuren lang und besteht aus einer USP-Domäne, drei DUSP (*domain present in ubiquitin-specific proteases*)-Domänen und einer UBL-Domäne (*ubiquitin-like*, Abbildung 8). In der USP-Domäne liegt das aktive Zentrum, das eine Cys-His-Asp Triade beinhaltet.^[38] USP48 ist die einzige USP, die drei DUSP Domänen besitzt.^[38]

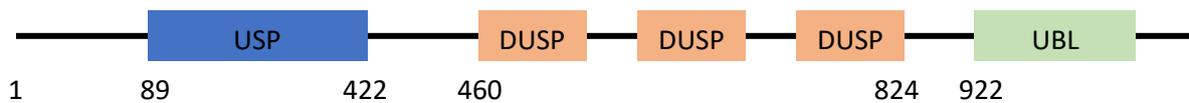


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Domänen von USP48 nach GHANEM et al.^[39]

Für USP48 gibt es keine bekannte Kristallstruktur.^[38,28] Es konnte jedoch in den letzten Jahren gezeigt werden, dass USP48 eine regulatorische Rolle in verschiedenen zellulären Signalwegen spielt. So ist COP9 Signalosom (CSN)-assoziiertes USP48 in der Lage den *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) Transkriptionsfaktor RelA im Zellkern zu stabilisieren, indem es an RelA gebundene K48-verknüpfte Ubiquitinketten entfernt. Dies ermöglicht eine verstärkte Aktivierung der NF- κ B Zielgene.^[28] Eine weitere Rolle nimmt USP48 bei Infektionen mit dem Bakterium *Helicobacter pylori* ein. Dieses verursacht Magengeschwüre und ist der Hauptrisikofaktor für eine chronische Gastritis, welche wiederum zur Entstehung von Magenkrebs führen kann. In *H. pylori* infizierten Zellen führt die Stabilisierung von RelA durch USP48 zu einer verlängerten *de novo* Synthese der OTU-DUB A20, welche die Apoptose unterdrückt. Ferner führt die Stabilisierung von RelA durch USP48 zu einem erhöhten Zellüberleben bei Tumorzellen. Hier könnte eine Inhibierung von USP48 ein Therapieansatz sein.^[39]

Weiterhin spielt USP48 im *Hedgehog* (Hh) Signalweg eine Rolle.^[40] Dieser nimmt eine Schlüsselposition bei der embryonalen Entwicklung von Wirbeltieren ein und steht im Zusammenhang mit der Entstehung von Radio- und Chemoresistenz bei einigen Tumorarten.^[41] Im Hh-Signalweg deubiquitiniert USP48 das Glioma assoziierte Oncoprotein *Gli1*, das somit stabilisiert wird. *Gli1* induziert wiederum die Expression von USP48, sodass sich eine Rückkopplungsschleife ergibt. In humanen Glioblastomen sind *Gli1* und USP48 überexprimiert und tragen zum Wachstum des Tumors bei. Ein *Knockout* von USP48 führt bei Glioblastomen zum Rückgang des Tumorwachstums.^[40]

Abgesehen von diesen onkogenen Funktionen, hat USP48 aber auch tumorsuppressive Funktionen. So ist USP48 ein Antagonist der BRCA1 E3-Ligase, wodurch das Genom stabilisiert wird und im Leberzellkarzinom wirkt USP48 der Tumorgenese entgegen.^[42,43]

2. Computerchemische Vorarbeiten

Mit dem Ziel geeignete Verbindungen für ein *in vitro Screening* zu finden, wurde in Vorarbeiten am *Institut für Experimentelle Innere Medizin* (IEIM) der *Otto-von-Guericke Universität* in Kooperation mit dem *Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie* jeweils ein Pharmakophor für STAMBPL1 und USP48 erstellt. Anschließend wurden mittels der Pharmakophore Verbindungen in einer Datenbank (*MOE lead-like library*)^[44] gesucht. Die so gefundenen Moleküle wurden nochmals nach *drug-likeness*, struktureller Diversität und der Verteilung im chemischen Raum selektiert und somit eine Auswahl an Inhibitorkandidaten für die Testung im Assay getroffen.

Für STAMBPL1 wurde die Kristallstruktur (PDB: 2ZNR)^[23,30] intensiv untersucht, um anhand der gewonnenen Erkenntnisse das in Abbildung 9 gezeigte Pharmakophor zu identifizieren. Von ca. 650.000 Verbindungen in der Datenbank, wurden nach den oben genannten Filter-Schritten 193 Verbindungen für das *in vitro Screening* ausgewählt.

Da wie erwähnt keine Kristallstruktur von USP48 bekannt ist, wurde zunächst ein auf USP7 basierendes Homologiemodell erstellt und ausgiebig auf Plausibilität geprüft. Anschließend wurde auch hier ein Pharmakophor erstellt, wobei als wichtige Eigenschaft Interaktionen außerhalb des aktiven Zentrums definiert wurden. Dies ist von Bedeutung, da die aktiven Zentren innerhalb der USPs stark konserviert sind. Anschließend wurde die *MOE lead-like library*^[44] anhand des Pharmakophors nach potenziellen Inhibitorkandidaten durchsucht (Abbildung 10). Somit konnten in mehreren Schritten aus ca. 650.000 Verbindungen in der Datenbank 41 Verbindungen für das *in vitro Screening* ausgewählt werden.

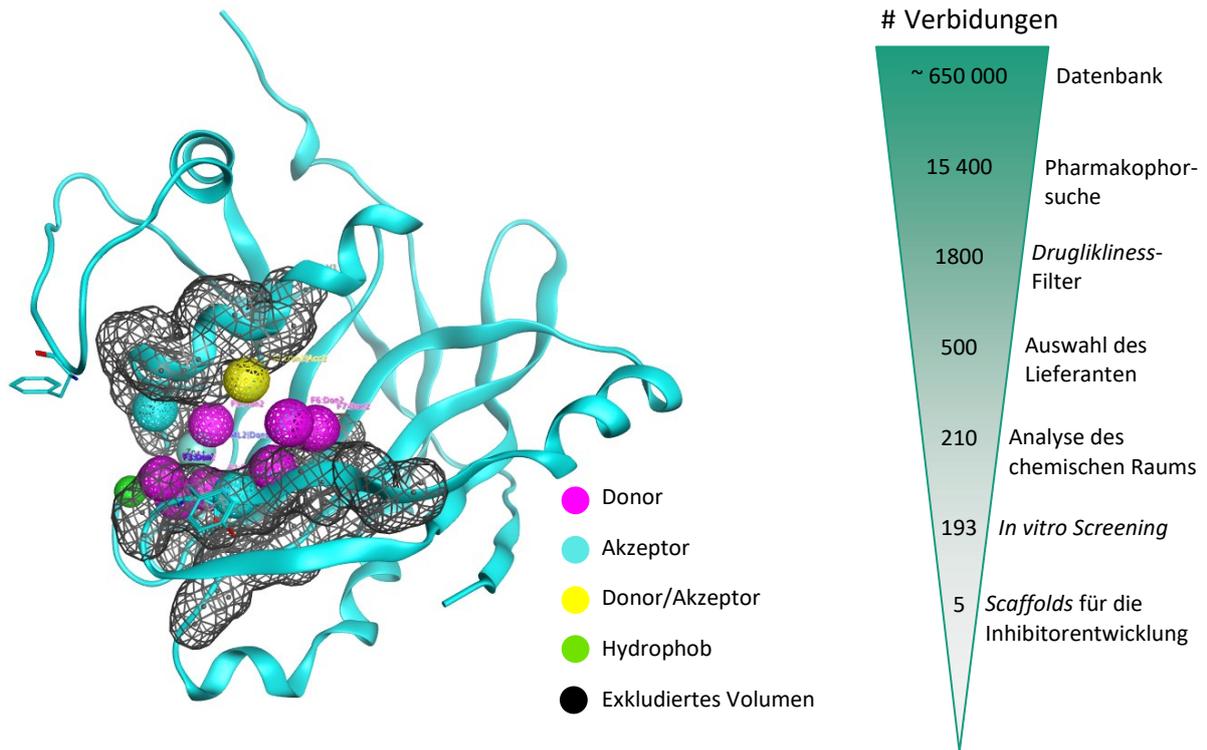


Abbildung 9: Links: Pharmakophor zu STAMBPL1 für die Suche nach geeigneten Inhibitor-kandidaten. Rechts: Anzahl der Verbindungen nach jedem Schritt. Überarbeitete Abbildung aus unveröffentlichter Arbeit von Sebastian Wussow

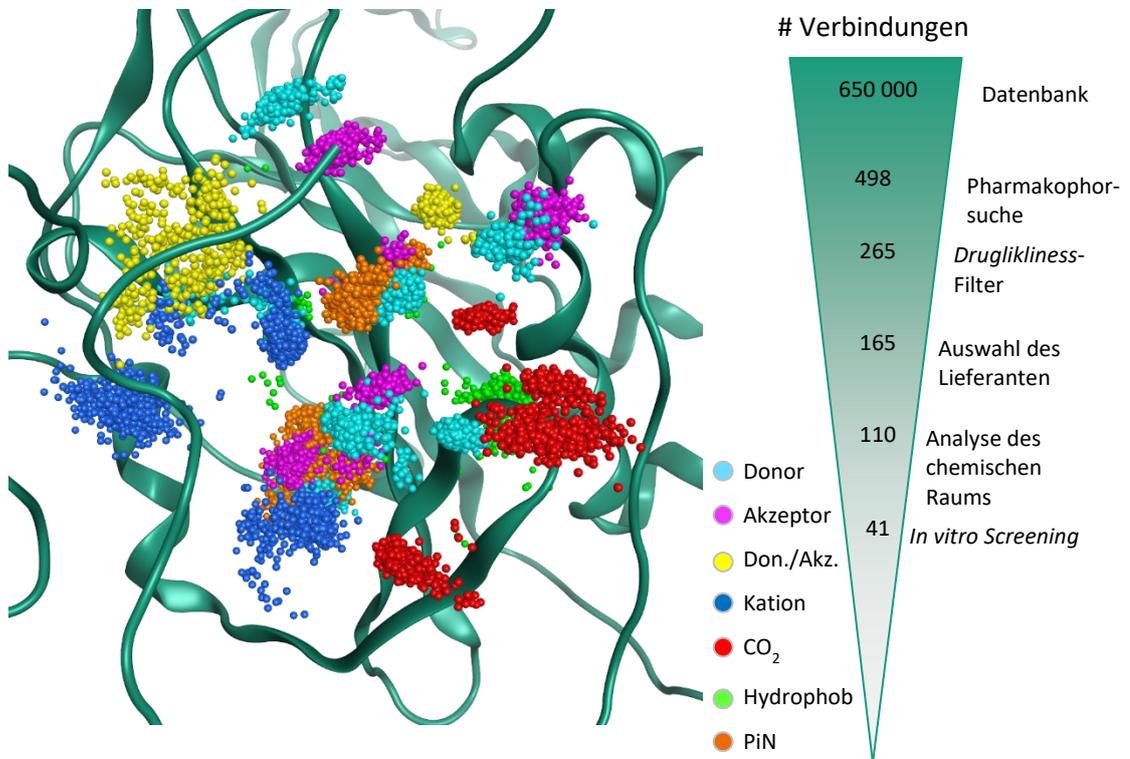
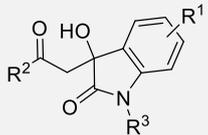
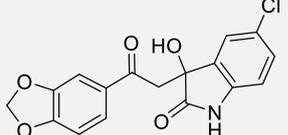
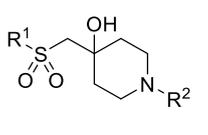
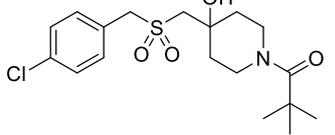
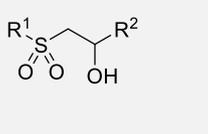
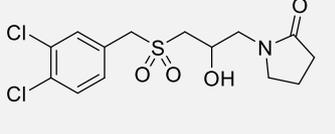
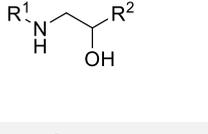
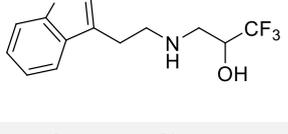
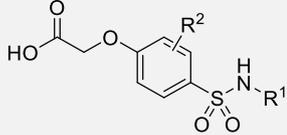
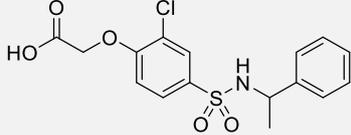


Abbildung 10: Links: Pharmakophor für USP48. Rechts: Anzahl der Verbindungen nach jedem Schritt. Abbildung aus unveröffentlichter Arbeit von Sebastian Wussow

Die *in silico* gefundenen Verbindungen wurden am IEIM der Otto-von-Guericke-Universität in *in vitro* assays auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber STAMBPL1 bzw. USP48 untersucht.

Für STAMBPL1 wurden 193 Verbindungen aus zwei kommerziell erworbenen Substanzbibliotheken untersucht, aus denen sich fünf *Scaffolds* (Tabelle 1) ergaben, die als Startpunkte für eine ligandenbasierte Inhibitorentwicklung dienen sollten. Die *Scaffolds* wurden so gewählt, dass jeweils mehrere Analoga eines *Scaffolds* inhibitorische Aktivität im *Screening* zeigten und die fünf *Scaffolds* sich voneinander chemisch deutlich unterscheiden.

Tabelle 1: *Scaffolds*, die im *in vitro screening* inhibitorische Aktivität gegenüber STAMBPL1 zeigten

Name	<i>Scaffold</i>	Aktivste Verbindung im Screening	Restaktivität*
Isatin <i>Scaffold</i>			44 %
Hydroxypiperidin <i>Scaffold</i>			4 %
Sulfonylethanol <i>Scaffold</i>			30 %
Aminoalkohol <i>Scaffold</i>			8 %
Sulfonamid <i>Scaffold</i>			27 %

*bei einer Inhibitorkonzentration von 500 μ M

Ausgehend von den virtuellen Ergebnissen wurde eine kommerziell erworbene Substanzbibliothek bestehend aus 30 Verbindungen im *in vitro Screening* auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber USP48 getestet.

Hierbei zeigte die Verbindung STK593195 (Abbildung 11) inhibitorische Aktivität mit einer Restaktivität von 47 % bei einer Inhibitorkonzentration von 100 μM .

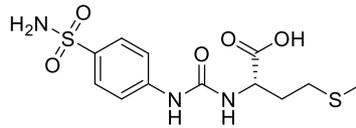


Abbildung 11: Struktur von STK593195

3. Aufgabenstellung

Aufgrund der Wechselwirkungen mit vielen zentralen Signalwegen und ihrer Beteiligung an zahlreichen Erkrankungen, sind DUBs interessante Zielenzyme für die Entwicklung neuer Wirkstoffe.^[25] Jedoch wird die Entwicklung selektiver DUB-Inhibitoren dadurch erschwert, dass die aktiven Zentren innerhalb der DUB-Familien stark konserviert sind und Unterschiede nur in bestimmten Regionen zu finden sind, die nicht zwangsläufig in der Nähe des aktiven Zentrums sein müssen.^[45–47] Entsprechend gibt es bislang nur wenige selektive DUB Inhibitoren, von denen die meisten nur gegen eine kleine Zahl anderer DUBs getestet wurden.^[4,24]

Ausgehend von den in Kapitel 2 beschriebenen Ergebnissen, war das Ziel dieser Arbeit neue Inhibitoren für STAMBPL1 und USP48 zu entwickeln. Für einen großen Teil der kommerziell verfügbaren *Screening*-Verbindungen war keine Syntheseroute beschrieben. Deshalb soll zunächst eine retrosynthetische Analyse¹ der *Scaffolds* durchgeführt werden. Ausgehend davon sollen Syntheserouten entwickelt werden, die eine Abwandlung der jeweiligen *Scaffolds* in möglichst wenigen Syntheseschritten ermöglichen. Die einzelnen funktionellen Gruppen der Ausgangsverbindungen sollen dann modifiziert und hinsichtlich der Struktur-Wirkungsbeziehung (SAR)² im *in vitro Assay* am IEIM untersucht werden. Die Erkenntnisse aus der SAR sollen dann genutzt werden, um die Struktur der Inhibitoren hinsichtlich ihrer Aktivität und Löslichkeit zu optimieren. Abschließend sollen mögliche Bindungsmodi der synthetisierten Inhibitoren *in silico* mittels *Docking* untersucht und interpretiert werden.

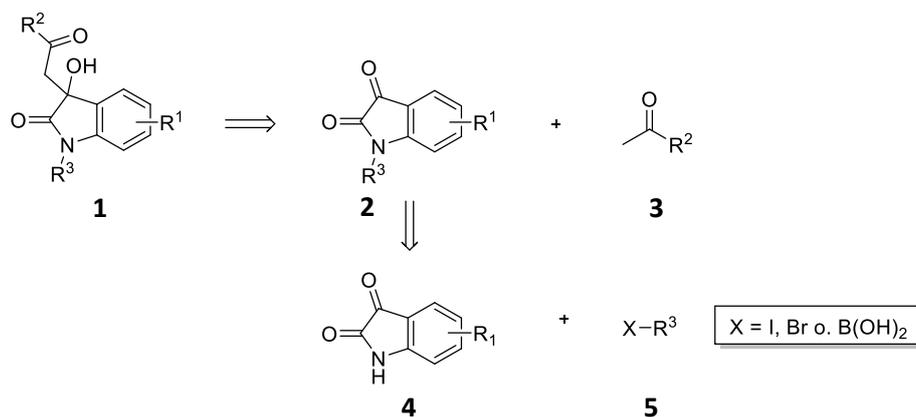
¹ Bei einer retrosynthetischen Analyse wird das Zielmolekül betrachtet und die Bindungen des Zielmoleküls gedanklich so gespalten, dass einfachere Bausteine entstehen, die sich mittels einer bekannten Reaktion oder einer Reihe von bekannten Reaktionen zum Zielmolekül verknüpfen lassen^[48].

² Die gängige Abkürzung SAR ergibt sich aus der englischen Bezeichnung *structure-activity relationship*.

4. Synthetische Arbeiten

4.1. Synthese von Inhibitoren für STAMBPL1

4.1.1. Retrosynthese der Verbindungen mit Isatin-Scaffold

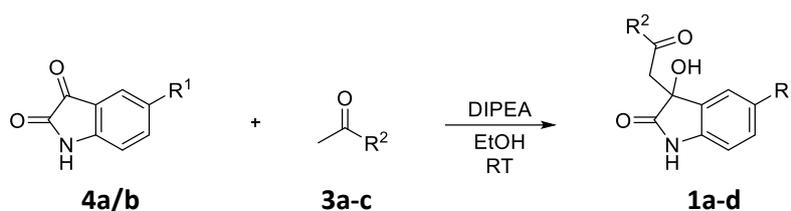


Schema 1: Retrosynthese des Isatin-Scaffolds

Betrachtet man die Struktur des Isatin-Scaffold (**1**), fällt auf, dass sich dieser retrosynthetisch über eine Aldolreaktion (Schema 1) in das substituierte Isatin (**2**) und ein Keton (**3**) zerlegen lässt. Die Ketone (**3**) sind hier bereits kommerziell erhältlich. Für die *N*-Substituierten Derivate ist eine weitere Zerlegung in die Isatine (**4**) und die entsprechenden Halogenide bzw. Boronsäuren (**5**) nötig.

4.1.2. Synthese der Verbindungen mit Isatin-Scaffold

Die Synthese der Isatin-Derivate **1a-d** erfolgte nach einer in der Arbeitsgruppe etablierten Vorgehensweise für Aldolreaktionen. Hierzu wurden die entsprechenden Ketone (**3a-c**) und Isatine (**4a-b**) mit Diisopropylethylamin (DIPEA) bei Raumtemperatur in Ethanol umgesetzt (Schema 2). Die Reaktionen liefen jedoch allesamt in schlechten Ausbeuten ab (Tabelle 2). Im Falle des Derivats **1d** lief die Reaktion, mit einer Reaktionszeit von 38 h, zudem sehr langsam ab. In Anbetracht dessen, dass es sich um eine Ein-Schritt-Synthese handelte, erfolgte keine Optimierung der Reaktionsbedingungen, da genügend Substanz für die initiale *in vitro* Charakterisierung dargestellt werden konnte.



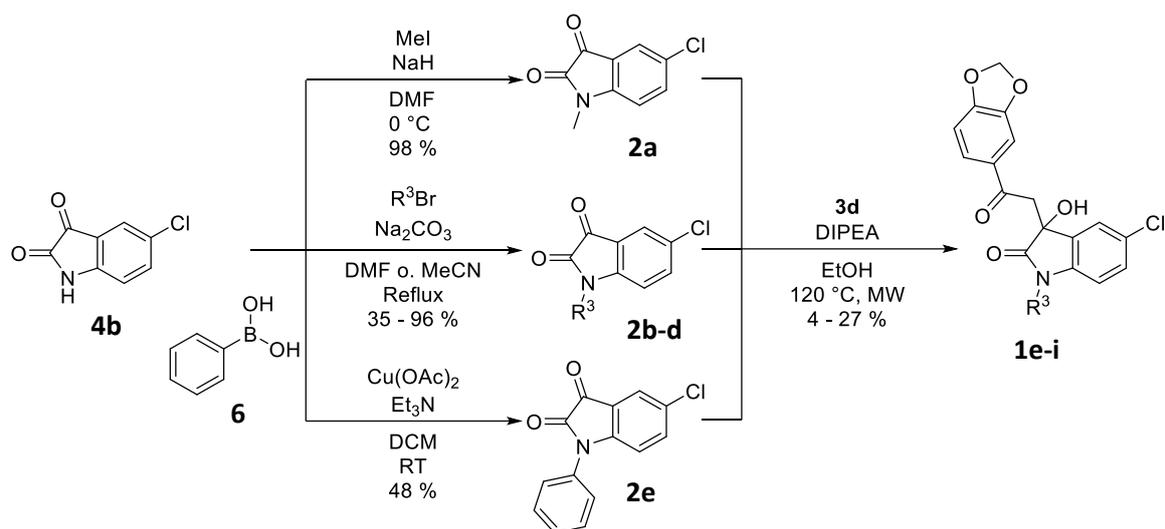
Schema 2: Synthese der Isatin-Derivate **1a-d** mittels Aldolreaktion

Tabelle 2: Via Aldol-Reaktion synthetisierte Verbindungen mit Isatinscaffold und verwendete Ketone

Nr.	R ¹	R ²	Keton	R ²	Ausbeute
1a	H		3a		18 %
1b	Cl		3b		17 %
1c	Cl		3a		30 %
1d	Cl		3c		5 %

Für die Isatin-Derivate **1e-i** wurde zunächst der jeweilige Rest am Stickstoffatom eingeführt. Dies erfolgte über drei unterschiedliche Wege (Schema 3). Im Falle des *N*-Methyl-Derivats, wurde 5-Chlorisatin (**4b**) bei 0 °C mit Methyljodid und Natriumhydrid in Dimethylformamid (DMF) nach einer Vorschrift von MOLINA et al.^[49] umgesetzt, um das methylierte Zwischenprodukt (**2a**) zu erhalten. Dies erfolgte in quantitativer Ausbeute. Der Versuch die Derivate **2b-d** unter den gleichen Bedingungen aus den entsprechenden Bromiden (**5b-d**) darzustellen scheiterte, da ausschließlich Nebenprodukte entstanden. Deshalb wurden die entsprechenden Bromide (**5b-d**) nach einer Vorschrift von BUXTON et al.^[50] mit 5-Chlorisatin (**4b**) und Natriumcarbonat in DMF oder Acetonitril unter Rückfluss synthetisiert. Die Produkte konnten in schlechten bis quantitativen Ausbeuten isoliert werden (Tabelle 3). Dabei bildete die Synthese des *N*-Phenyl-Derivats einen Spezialfall, da es nur schwer über ein Halogenid synthetisiert werden kann.^[48] Eine Möglichkeit zur Synthese des *N*-Phenylisatin-Derivats (**2e**) bietet hier die CHAN-LAM-Kupplung mit Phenylboronsäure (**6**). Die Einführung der *N*-Phenyl-Gruppe erfolgte somit auf diesem Weg nach einer Vorschrift von RAMBABU et al.^[51] Hierzu wurde 5-Chlorisatin (**4b**) mit Phenylboronsäure (**6**), Kupfer(II)acetat und Triethylamin bei Raumtemperatur in Dichlormethan (DCM) zum Zwischenprodukt (**2e**) umgesetzt, welches mit schlechter Ausbeute, aber in ausreichender Menge, isoliert werden konnte. Im nächsten Schritt wurden die *N*-substituierten Isatine (**2a-e**) über eine Aldolreaktion mit 3,4-(Methylenedioxy)-acetophenon (**3a**) zu den Isatin-Derivaten (**1e-i**) umgesetzt.

Die Reaktion wurde diesmal bei 120 °C in der Mikrowelle durchgeführt, da die Reaktionsgeschwindigkeit bei der vorangegangenen gleichartigen Synthese des Isatin-Derivats (**1d**) bei Raumtemperatur sehr langsam war. Die Reaktionszeit konnte somit von 38 Stunden auf 45 min verkürzt werden.



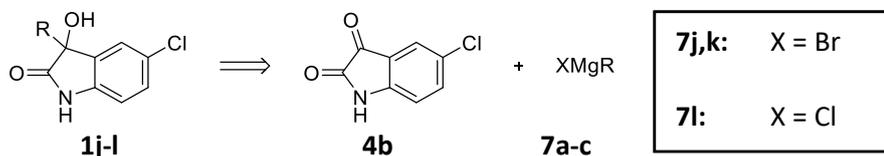
Schema 3: Synthese der *N*-substituierten Isatin-Derivate

Tabelle 3: *N*-Substituierte Verbindungen mit Isatin-Scaffold und zugehörige Halogenide

Nr.	R ¹	R ³	Ausbeute		Nr.	R ³
			1. Schritt	2. Schritt		
1e	Cl		98 %	4 %	5a	
1f	Cl		96 %	27 %	5b	
1g	Cl		48 %	11 %	5c	
1h	Cl		35 %	19 %	5d	
1i	Cl		68 %	27 %		

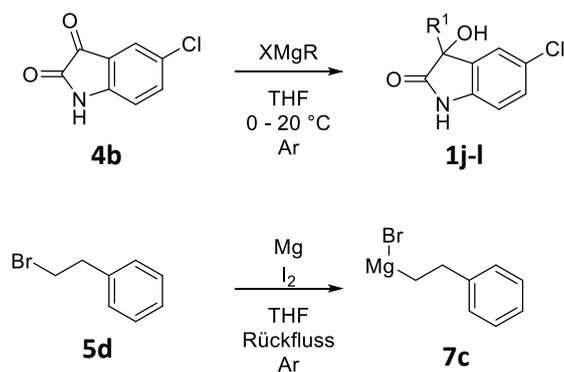
Für die SAR des Isatinscaffolds, sollten außer den in zuvor gezeigten Verbindungen noch die Verbindungen (**1j-l**) (Schema 4), die kein Keton in der Seitenkette enthalten, synthetisiert werden.

Diese lassen sich retrosynthetisch über eine GRIGNARD-Reaktion in 5-Chlorisatin (**4b**) und die entsprechenden GRIGNARD-Verbindungen (**7a-c**) zerlegen.



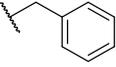
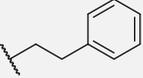
Schema 4: Retrosynthetische Betrachtung der Isatin-Derivate **1j-l**

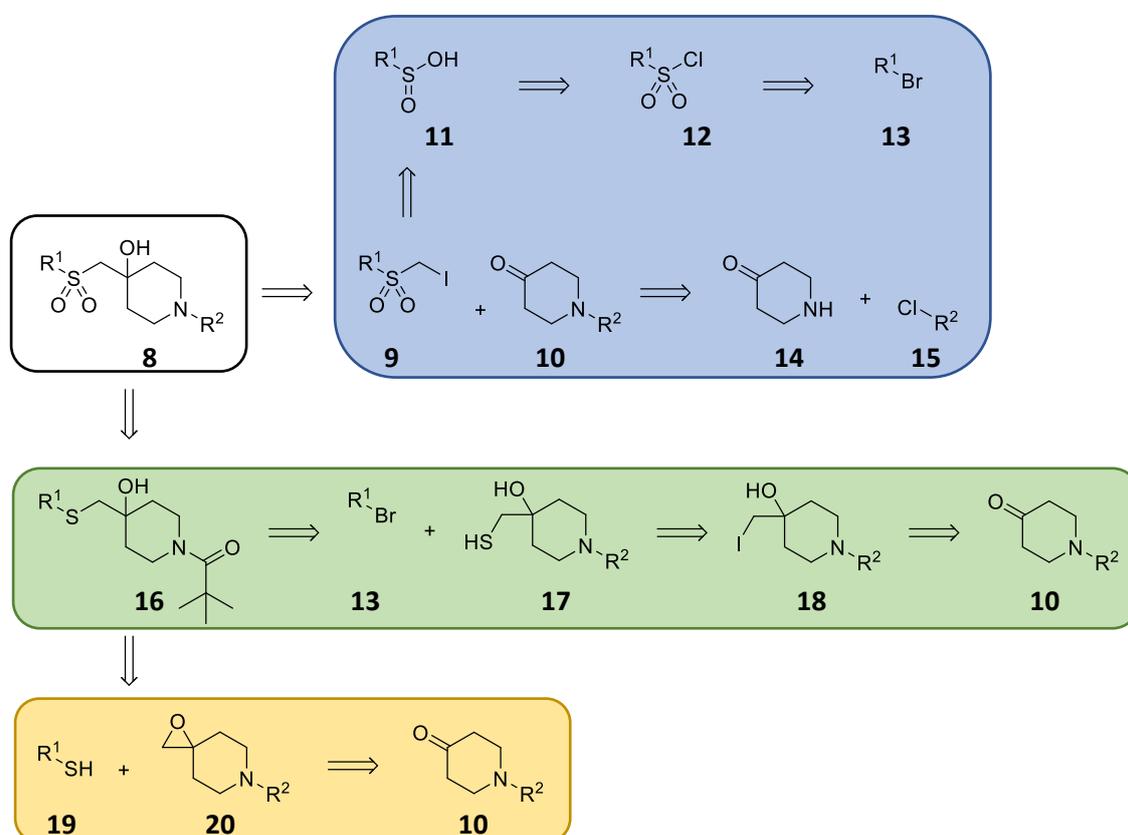
Die Synthese der Isatin-Derivate (**1j-l**, Tabelle 4) erfolgte entsprechend über eine GRIGNARD-Reaktion nach einer Vorschrift von NARESH BABU et al.^[52] (Schema 5). Im Falle der Verbindungen **1j** und **1k** erfolgte die Synthese ausgehend von den kommerziell erhältlichen GRIGNARD-Verbindungen (**7a,b**) bei 0 – 20 °C in Tetrahydrofuran (THF) unter Argonatmosphäre. Da es für die Synthese des Isatin-Derivats **1l** die GRIGNARD-Verbindung (**7c**) nicht kommerziell verfügbar war, wurde diese *in situ* aus Magnesium, Phenylethylbromid (**5d**) und Iod in THF unter Rückfluss synthetisiert (Schema 5). Alle Synthesen verliefen in schlechten Ausbeuten, jedoch konnte in allen Fällen genügend Produkt für die weitere Charakterisierung gewonnen werden. Die geringen Ausbeuten sind vermutlich auf die Luft- und Wasseranfälligkeit der GRIGNARD-Reaktion zurückzuführen.^[53,54]



Schema 5: Synthese der Isatin-Derivate **1j-l** mittels GRIGNARD-Reaktion. **j,l**: X = Br; **k**: X = Cl

Tabelle 4: Via GRIGNARD-Reaktion synthetisierte Isatin-Derivate

Nr.	R ¹	Ausbeute
1j/7a		34 %
1k/7b		30 %
1l/7c		18 %

4.1.3. Retrosynthese der Verbindungen mit Hydroxypiperidin *Scaffold*Schema 6: Retrosynthese des Sulfon *Scaffolds*

Die retrosynthetische Analyse des Hydroxypiperidin *Scaffolds* (**8**) ergab drei unterschiedliche Syntheserouten (Schema 6). Eine Möglichkeit besteht darin, den *Scaffold* in eine Iodmethylsulfonylverbindung **9** und das Piperidin-4-on-Derivat **10** zu zerlegen (Schema 6, blau unterlegt). Die Verbindung **9** lässt sich wiederum aus der entsprechenden Sulfinsäure **11** darstellen. Diese lässt sich aus dem Sulfonylchlorid **12** synthetisieren, welches durch eine Chlorsulfonylierung aus

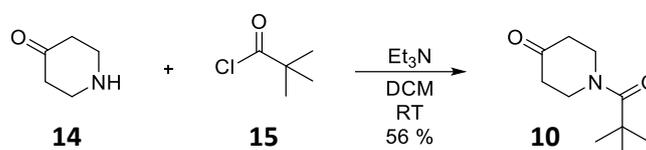
dem Bromid **13** dargestellt werden kann. Das Piperidin-4-on-Derivat **10** lässt sich aus Piperidin-4-on (**14**) und dem Chlorid **15** synthetisieren.

Die zweite Synthesemöglichkeit (Schema 6, grün unterlegt), die sich aus der retrosynthetischen Betrachtung des *Scaffolds* **8** ergibt, besteht darin, die Sulfonyl-Gruppe durch Oxidation des entsprechenden Thioethers **16** zu generieren. Der Thioether **16** lässt sich dann in das Bromid **13** und das 4-(Mercaptomethyl)piperidin-Derivat **17** zerlegen. Letzteres kann aus dem entsprechenden 4-(Iodmethyl)piperidin-Derivat **18** dargestellt werden, welches wiederum durch Iodmethylierung des Piperidin-4-on-Derivats **10** dargestellt werden kann.

Die dritte Möglichkeit (Schema 6, gelb unterlegt) ergibt sich ebenfalls durch die Oxidation des Thioethers **16**. In diesem Fall wird der Thioether **16** jedoch in das Mercaptan **19** und das Epoxid **20** zerlegt. Das Epoxid **20** lässt sich dann durch eine Epoxidierung des Piperidin-4-on-Derivats **10** darstellen.

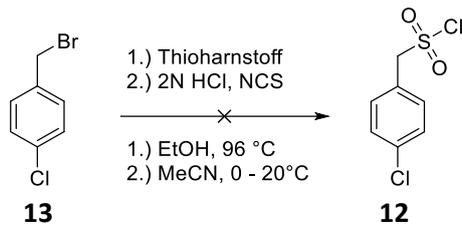
4.1.4. Synthese der Verbindungen mit Hydroxypiperidin *Scaffold*

Die Syntheserouten, die sich aus der retrosynthetischen Analyse in Kapitel 4.1.3 ergeben, beginnen alle mit der Synthese von 1-Pivaloylpiperidin-4-on (**10**). Entsprechend wurden im ersten Syntheseschritt Piperidin-4-on (**14**) und Pivaloylchlorid (**15**) zusammen mit Triethylamin für 48 h bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre nach einer Vorschrift von LARSEN et al.^[55] umgesetzt (Schema 7), wobei das erwartete Produkt **10** in befriedigender Ausbeute erhalten wurde.



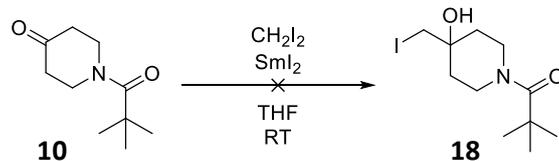
Schema 7: Synthese von 1-Pivaloylpiperidin-4-on (**10**)

Zunächst wurde die Syntheseroute ausgehend von 4-Chlorbenzylbromid (**13**) über das entsprechende Sulfonylchlorid (**12**) untersucht. Hierzu wurde 4-Chlorbenzylbromid (**13**) nach einer Vorschrift von BAG et al.^[56] in einer zweistufigen Synthese zunächst mit Thioharnstoff für 4,5 h bei 96 °C in absolutem Ethanol und anschließend mit *N*-Chlorsuccinimid (NCS) und 2 N Salzsäure in Acetonitril für 1 h bei 0 – 20 °C umgesetzt (Schema 8). Hierbei wurde jedoch nicht das gewünschte Produkt gebildet.



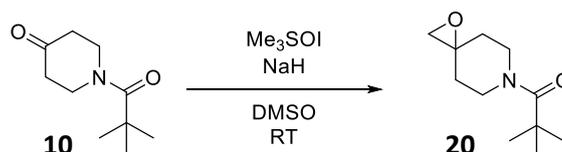
Schema 8: Versuch der Synthese des Sulfonylchlorids (**12**)

Da diese Synthese nicht auf Anhieb erfolgreich war und der Syntheseweg zudem keine Möglichkeit zur Derivatisierung auf einer späten Synthesestufe bot, wurde der in Kapitel 4.1.3 beschriebene Syntheseweg über 4-Chlorbenzylbromid (**13**) und den Thioether (**16**) gewählt. Dieser ermöglicht eine Derivatisierung auf der vorletzten Stufe durch den Einsatz verschiedener Bromide. Zunächst musste hierzu das 4-Iodmethylpiperidin-Derivat (**18**) synthetisiert werden. Zu diesem Zweck wurde, nach einer Vorschrift von TABUCHI et al.,^[57] 1-Pivaloylpiperidin-4-on (**10**) mit Diiodmethan und Samarium(II)iodid in THF bei Raumtemperatur umgesetzt (Schema 9). Das entstandene Produkt **18** ließ sich jedoch nicht mittels herkömmlicher Aufreinigungsverfahren vom Nebenprodukt isolieren.



Schema 9: Versuch der Synthese des Iodmethylpiperidin-Derivats (**18**)

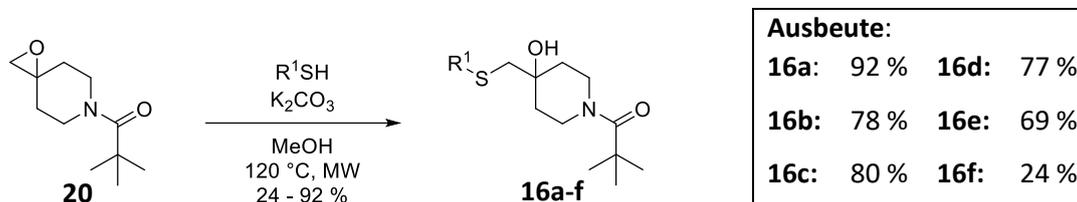
Da also auch die zweite aufgezeigte Synthesestrategie somit nicht gangbar war, wurde der letzte, in Kapitel 4.1.3 aufgezeigte, Syntheseweg untersucht. Im ersten Schritt dieses Synthesewegs musste 1-Pivaloylpiperidin-4-on (**10**) epoxidiert werden. Die Darstellung des Epoxids (**20**) erfolgte nach einer Vorschrift von NIROGI et al.^[58] durch die Umsetzung von 1-Pivaloylpiperidin-4-on (**10**) zusammen mit Trimethylsulfoxoniumiodid und Natriumhydrid in DMSO (Dimethylsulfoxid).



Schema 10: Epoxidierung von 1-Pivaloylpiperidin-4-on (**10**)

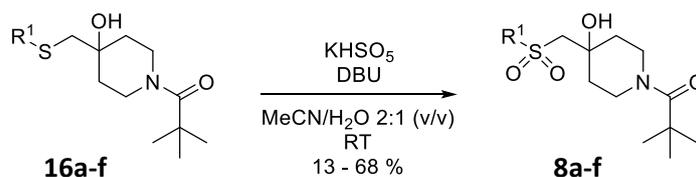
Im nächsten Schritt wurde dann das Epoxid (**20**) nach einer abgewandelten Vorschrift von NODE et al.^[59] mit den entsprechenden Thiolen (**19a-f**) und Kaliumcarbonat in Methanol für 15 min bei 120 °C in der Mikrowelle umgesetzt (Schema 10). In der ursprünglichen Vorschrift kam mit *n*-Buthyllithium bei

0 – 20 °C eine deutlich stärkere Base bei relativ niedrigen Temperaturen zum Einsatz, was in ersten Versuchen zu überwiegender Bildung von nicht weiter identifizierten Nebenprodukten führte. Deshalb wurde mit Kaliumcarbonat eine mildere Base gewählt und gleichzeitig die Temperatur und somit auch die Reaktionsgeschwindigkeit deutlich erhöht. Dies führte zu einer deutlich besseren Produktbildung mit schlechten bis ausgezeichneten Ausbeuten bei gleichzeitig sehr kurzer Reaktionszeit (Schema 11). Die deutlich schlechtere Ausbeute bei der Synthese des Derivats **16f** geht möglicherweise auf eine geringere Reaktivität des Thiols durch die Abwesenheit eines aromatischen Rests zurück. So weist Ethanthiol (**16f**, $pK_a = 10,61$)^[60] einen deutlich höheren pK_a -Wert aus als 4-Chlorbenzylthiol (**16a**, $pK_a = 6,14$)^[60], was zu einer schlechteren Deprotonierung und somit geringeren Reaktivität führt.^[61]



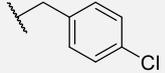
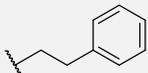
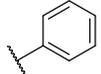
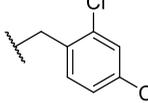
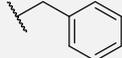
Schema 11: Synthese der Thioether **16a-f**

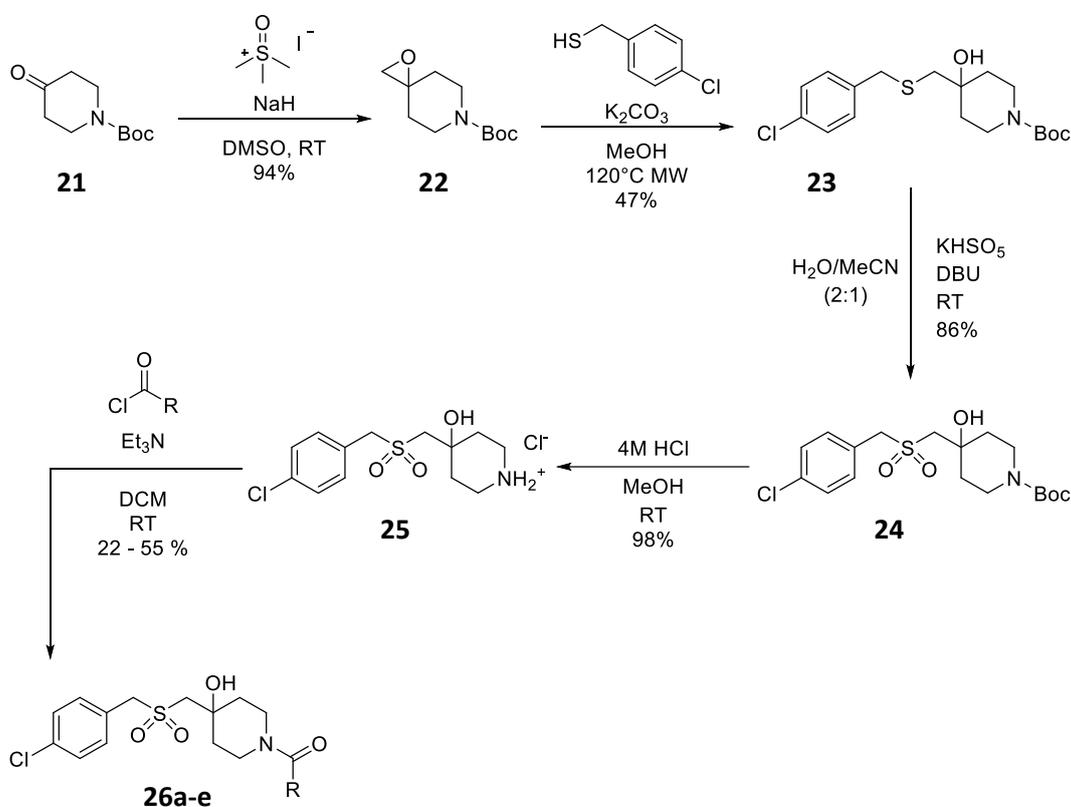
Im letzten Syntheseschritt wurde der Thioether dann nach einer abgewandelten Vorschrift von EVANS et al.^[62] zum Sulfon oxidiert (Schema 12). Dabei wurden die jeweiligen Thioether (**16a-f**) mit Kaliumperoxomonosulfat und 1,8-Diazabicyclo(5.4.0)undec-7-en (DBU) in Acetonitril/Wasser (1:2 v/v) bei Raumtemperatur zu den, an der Sulfon-Gruppe substituierten, Verbindungen mit Hydroxypiperidin *Scaffold* (**8a-f** Tabelle 5) umgesetzt. Die Reaktion lief hierbei mit schlechten bis befriedigenden Ausbeuten ab. Eine für das Derivat **16e** ebenfalls durchgeführte Oxidation mit Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel, ergab das Produkt in ähnlicher Ausbeute, jedoch war die Reaktionszeit im Vergleich zur Reaktion mit Kaliumperoxomonosulfat 30-mal länger. Die deutlich schlechtere Ausbeute des Derivats **16f** ergab sich durch Verluste bei der Aufreinigung, da ein nicht näher charakterisiertes Nebenprodukt gebildet wurde. Dieses ließ sich, aufgrund von ähnlichem Elutionsverhalten, säulenchromatographisch nur schwer vom Produkt trennen.



Schema 12: Oxidation der Thioether (**16a-f**)

Tabelle 5: Substituenten der Derivate mit Hydroxypiperidin *Scaffold*

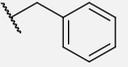
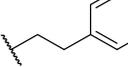
Nr.	R	Ausbeute	Nr.	R	Ausbeute
8,16a		39 %	8,16d		48 %
8,16b		68 %	8,16e		40 %
8,16c		43%	8,16f		13 %

Schema 13: Synthese *N*-substituierter Derivate mit Hydroxypiperidin *Scaffold*

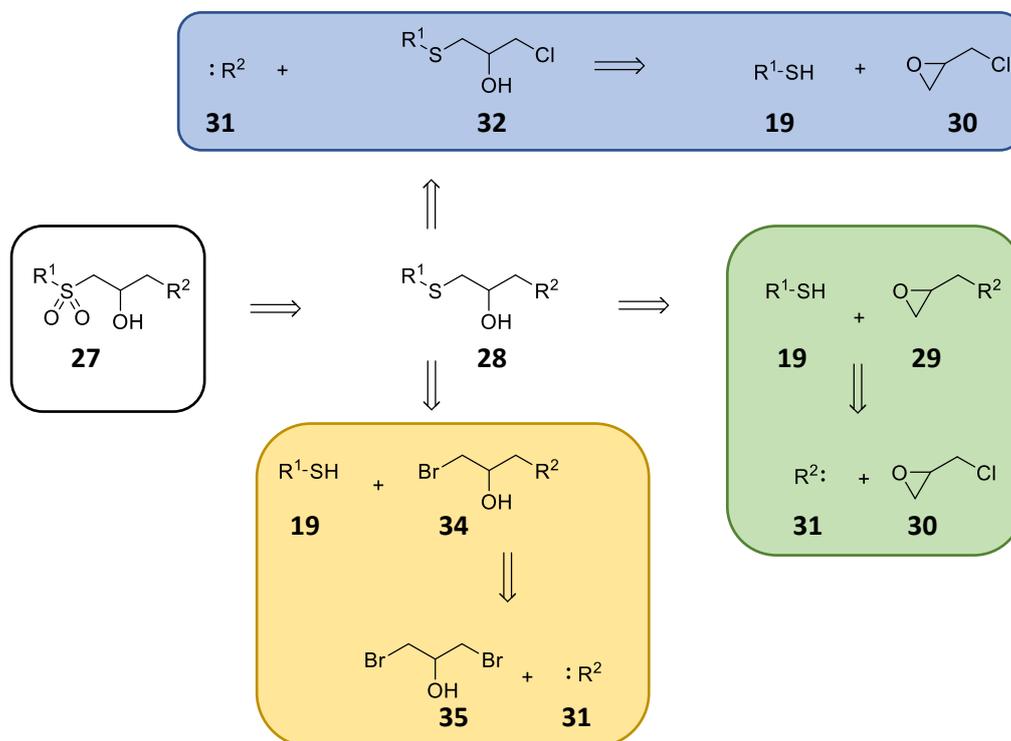
Um eine Substitution auf einer späten Stufe der Syntheseroute am Stickstoff der Piperidin-Gruppe zu erreichen, wurde ausgehend von Boc-geschützten Piperidin-4-on **21** das Boc-geschützte Derivat mit Hydroxypiperidin *Scaffold* **24** synthetisiert (Schema 13). Die Synthese verlief dabei analog zur Synthese der Derivate **8a-f** über das entsprechende Epoxid **22** und den entsprechenden Thioether **23** zum Sulfon **24**. Im Anschluss wurde die Boc-Gruppe gemäß einer im Labor etablierten Methode mit 4 N Salzsäure in Methanol bei Raumtemperatur abgespalten und somit das Piperidiniumsalz **25** in quantitativer Ausbeute erhalten. Dieses wurde dann analog zur Synthese von 1-Pivaloylpiperidin-4-on (**10**) mit den entsprechenden Säurechloriden zu den *N*-substituierten Derivaten mit Hydroxypiperidin *Scaffold*

26a-e (Tabelle 6) umgesetzt. Die Produkte wurden dabei in schlechten bis befriedigenden Ausbeuten erhalten, was durch die hohe Reaktivität der Säurechloride gegenüber Wasser und der somit einhergehenden konkurrierenden Reaktion zur Carbonsäure bedingt wird.^[63,64]

Tabelle 6: Substituenten der *N*-substituierten Derivate mit Hydroxypiperidin *Scaffold*

Nr.	R	Ausbeute	Nr.	R	Ausbeute
26a		33 %	26d		55 %
26b		34 %	26e		52 %
26c		22 %			

4.1.5. Retrosynthese der Verbindungen mit Sulfonylethanol *Scaffold*



Schema 14: Retrosynthese des Sulfonylethanol *Scaffolds*

Die retrosynthetische Analyse des Sulfonylethanol *Scaffolds* (**27**, Schema 14) ergab drei Synthesewege, deren erster retrosynthetischer Schritt die Reduktion zum Thioether **28** ist. Analog zur Retrosynthese des Hydroxypiperidin *Scaffolds* (**8**) ließe sich dieser dann in ein Thiol (**19**) und ein Epoxid (**29**) spalten.

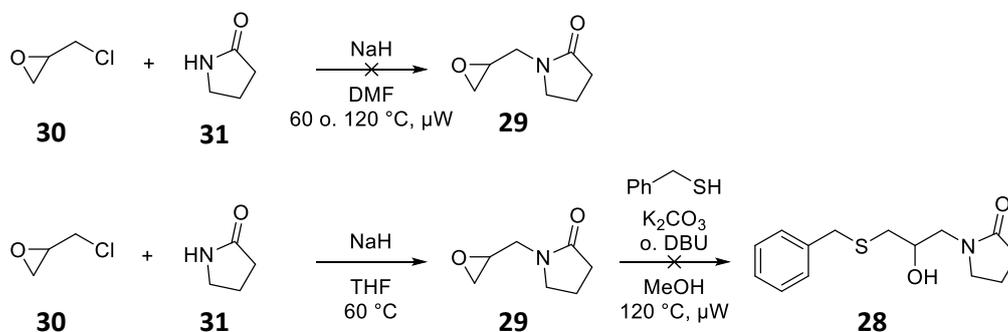
Das Epoxid (**29**) lässt sich wiederum retrosynthetisch in Epichlorhydrin (**30**) und einen nukleophilen Substituenten (**31**) zerlegen.

Alternativ kann auch die Bindung zwischen dem nukleophilen Rest R² und dem Schwefel des Thioethers (**28**) retrosynthetisch gespalten werden. Somit ergeben sich ein Nukleophil (**31**) und das 1-Chlorpropan-2-ol-Derivat **32** als Vorstufen. Das 1-Chlorpropan-2-ol-Derivat **33** kann wiederum retrosynthetisch in ein Thiol (**19**) und Epichlorhydrin (**30**) zerlegt werden.

Als dritte Option kann der Thioether (**28**) retrosynthetisch in ein Thiol (**19**) und das 1-Brompropan-2-ol-Derivat **34** gespalten werden. Das 1-Brompropan-2-ol-Derivat **34** lässt sich retrosynthetisch in 1,3-Dibrompropan-2-ol (**35**) und das Nukleophil **31** spalten.

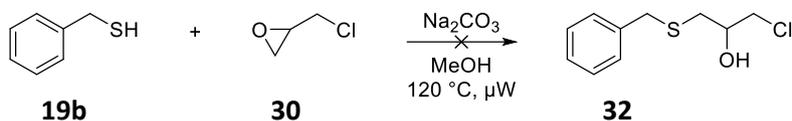
4.1.6. Synthese der Verbindungen mit Sulfonylethanol *Scaffold*

Für die Synthese der Verbindungen mit Sulfonylethanol *Scaffold* wurde zunächst der Syntheseweg über das Epoxid **29** gewählt (Schema 14, grün). Dieses sollte aus Epichlorhydrin (**30**) und 2-Pyrrolidinon (**31**) nach einer abgewandelten Vorschrift aus einem Patent von DENG et al.^[65] synthetisiert werden (Schema 15). Hierzu wurden die Edukte mit Natriumhydrid in Dimethylformamid (DMF) bei 120 °C in der Mikrowelle umgesetzt. Dies führte jedoch nicht zum gewünschten Produkt. Die Reaktion wurde deshalb nochmals bei 60 °C in THF wiederholt, wobei das gewünschte Epoxid **29** entstand. Die Weiterreaktion, die analog zur Synthese des Thioethers (**16**, Kapitel 4.1.4) durchgeführt wurde, lieferte jedoch hauptsächlich ein nicht näher identifiziertes Nebenprodukt. Auch die Wahl einer stärkeren Base (DBU) und eine Verlängerung der Reaktionsdauer führte zu keiner Bildung des Thioethers **28**.



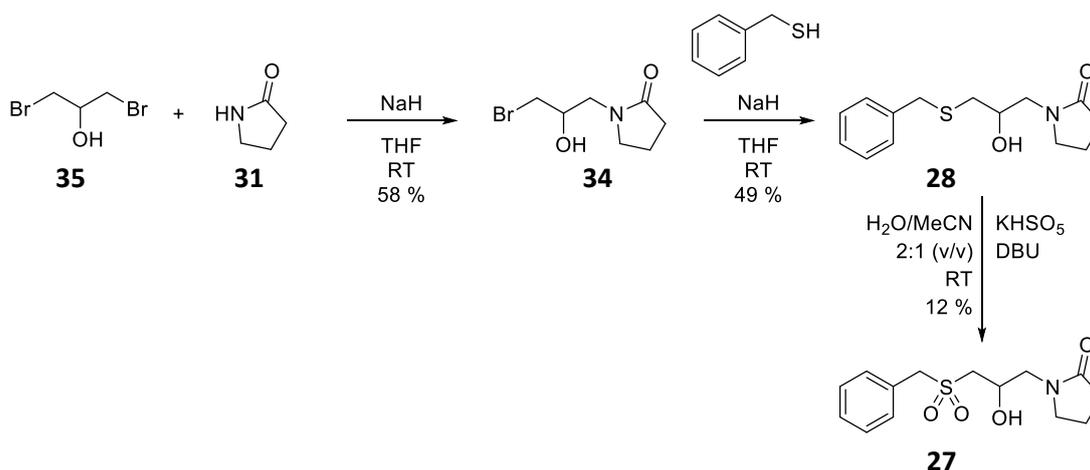
Schema 15: Versuch der Synthese des Thioethers **28** über das Epoxid **29**

Deshalb wurde der in Kapitel 4.1.5 gezeigt Syntheseweg (Schema 14, blau) über 1-(Benzylthio)-3-chlorpropan-2-ol (**32**) gewählt. Hierzu wurde Epichlorhydrin (**30**) mit Benzylmercaptan (**19b**) und Natriumcarbonat in Methanol bei 120 °C in der Mikrowelle umgesetzt (Schema 16).



Schema 16: Versuch der Synthese von 1-(Benzylthio)-3-chlorpropan-2-ol (**32**)

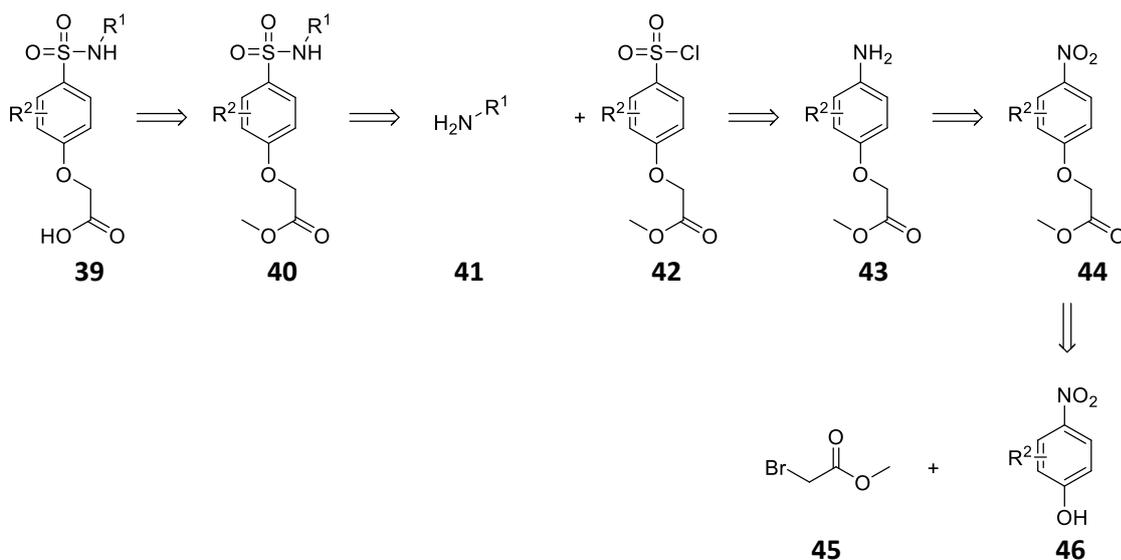
Da auch hierbei das gewünschte Produkt nicht entstand, sondern nur ein nicht weiter identifiziertes Nebenprodukt, wurde der Syntheseweg (Schema 14, gelb) über 1,3-Dibrompropan-2-ol (**35**) eingeschlagen. Im ersten Schritt wurde hierzu 1,3-Dibrompropan-2-ol (**35**) mit 2-Pyrrolidinon (**31**) und Natriumhydrid bei Raumtemperatur im THF umgesetzt (Schema 17). Das in befriedigender Ausbeute entstandene 1-Brompropan-2-ol-Derivat **34** wurde dann unter den gleichen Bedingungen mit Benzylmercaptan (**19b**) zum Thioether **28** umgesetzt, wobei das Produkt in schlechter, aber für die weitere Umsetzung ausreichender, Ausbeute erhalten wurde. Der Thioether **28** wurde schließlich analog zu den Verbindungen mit Hydroxypiperidin *Scaffold* mit Kaliumperoxomonosulfat zum Sulfonylethanol *Scaffold* Derivat **27** oxidiert. Auch hierbei war die Ausbeute schlecht aber ausreichend für die anschließende Charakterisierung des Produkts.



Schema 17: Synthese der Verbindungen mit Sulfonylethanol *Scaffold* (**27**)

4.1.7. Retrosynthese des Aminoalkohol *Scaffolds*Schema 18: Retrosynthese des Aminoalkohol *Scaffold* (**36**)

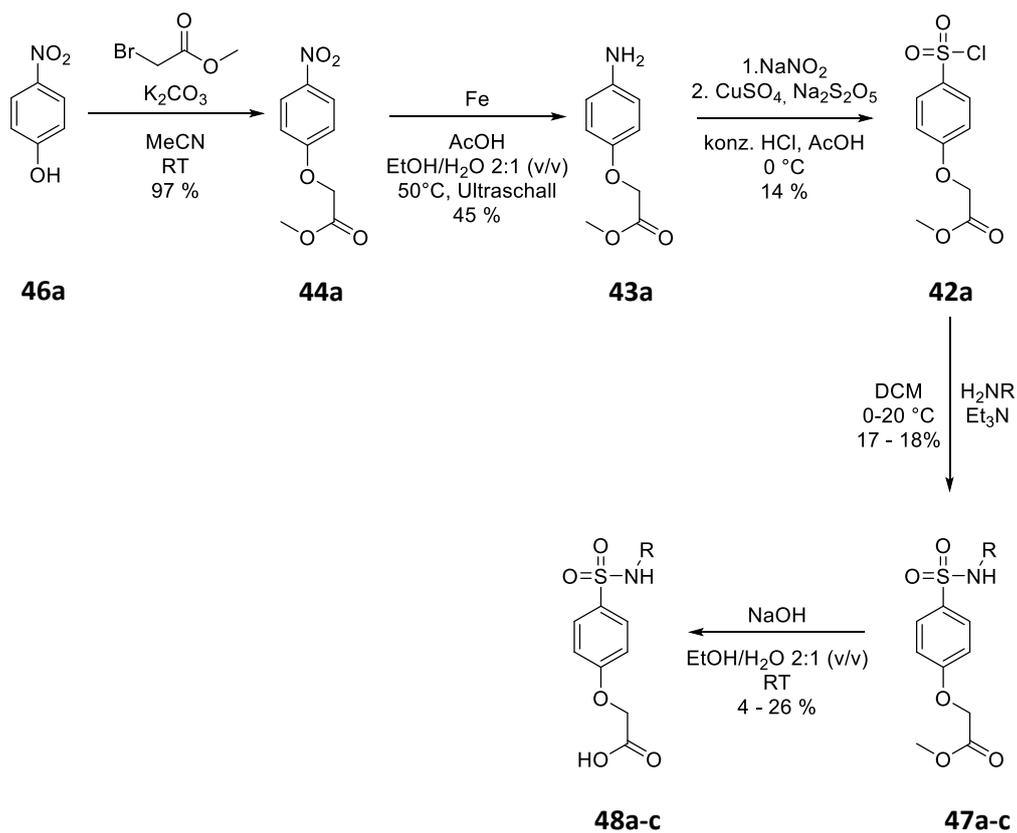
Bei Betrachtung des Aminoalkohol *Scaffolds* (**36**, Schema 18), fällt auf, dass dieser einen Substituenten am Stickstoff und einen Substituenten α -ständig zur Hydroxy-Gruppe aufweist. Somit lässt sich der *Scaffold* retrosynthetisch in ein Amin (**37**) und ein Epoxid (**38**) zerlegen. Da dieser *Scaffold* in der Wiederholung des initialen *Screenings* (Kapitel 5.1) keine Aktivität zeigte, wurden keine Derivate synthetisiert.

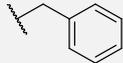
4.1.8. Retrosynthese der Verbindungen mit Sulfonamid *Scaffold*Schema 19: Retrosynthese der Verbindungen mit Sulfonamid *Scaffold*

Der Sulfonamid *Scaffold* (**39**) lässt sich über eine Methyllester geschützte Verbindung (**40**) retrosynthetisch in das Amin **41** und das Sulfonylchlorid **42** zerlegen (Schema 19). Das Sulfonylchlorid **42** lässt sich wiederum durch Chlorsulfonylierung aus dem Anilin-Derivat **43** darstellen. Dieses kann durch die Reduktion der Nitroverbindung **44** gewonnen werden. Die Nitroverbindung **44** lässt sich schließlich in Bromessigsäuremethylester (**45**) und das Nitrophenol-Derivat **46** zerlegen.

4.1.9. Synthese der Verbindungen mit Sulfonamid *Scaffold*

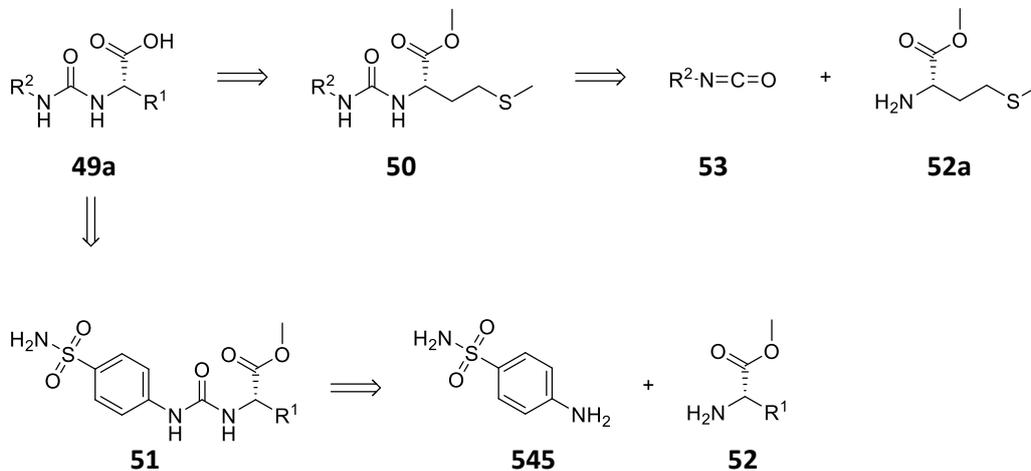
Die Synthese startete mit der Darstellung des Ethers **44a** durch die Umsetzung von Bromessigsäuremethylester (**45**) und *p*-Nitrophenol (**46a**) mit Kaliumcarbonat in Acetonitril bei Raumtemperatur (Schema 20) nach einer Vorschrift von ZIDAR et al.^[66], wobei eine nahezu quantitative Ausbeute erzielt wurde. Anschließend wurde die Nitro-Gruppe nach einer abgewandelten Vorschrift von GAMBLE et al.^[67] mit Eisen und Essigsäure in Ethanol/Wasser (2:1 v/v) im Ultraschallbad bei 50 °C reduziert und das Produkt **43a** konnte mit schlechter, aber ausreichender, Ausbeute isoliert werden. Das entstandene Anilin-Derivat **43a** wurde dann in Anlehnung an ein Patent von KAJINO et al.^[68] chloresulfonyliert. Hierbei wurde das Anilin **43a** zunächst in konz. Salzsäure und Eisessig mit Natriumnitrit bei 0 °C diazotiert und anschließend mit Kupfer(II)sulfat und Natriumdisulfit bei 0 °C chloresulfonyliert. Das hierzu notwendige Schwefeldioxid entsteht dabei *in situ* aus Natriumdisulfit, welches in wässriger Lösung zu zwei Molekülen Natriumhydrogensulfit zerfällt, die wiederum unter sauren Bedingungen zu Schwefeldioxid und Wasser zerfallen. Alternativ könnte Schwefeldioxid auch gasförmig in die Lösung eingeleitet werden, was zu einer höheren Sättigung der Lösung und damit vermutlich zu höheren Ausbeuten als die erzielten 14 % (Schema 20) führen würde. Die Handhabung von gasförmigem Schwefeldioxid ist aufgrund der Giftigkeit des Gases allerdings schwierig. Somit ist im Labormaßstab die *in situ* Erzeugung von Schwefeldioxid die geeignetere Variante. Das entstandene Sulfonylchlorid **42a** wurde dann analog zur Synthese von 1-Pivaloylpiperidin-4-on (**10**) (vgl. Kapitel 4.1.4) mit den entsprechenden Aminien **41a-c** und Triethylamin bei Raumtemperatur in DCM zu den Sulfonamiden **47a-c** umgesetzt. Hierbei kam es verstärkt zur Bildung von Sulfonsäure, was sich in schlechten Ausbeuten für die jeweiligen Produkte äußerte. Die Nebenreaktion ließe sich möglicherweise durch den Einsatz von trockenem Lösungsmittel und einer Argonatmosphäre unterbinden. Da aber in allen Fällen genügend Produkt entstanden war, wurden keine weiteren Anpassungen vorgenommen. Im letzten Schritt ergab die Hydrolyse des Methylesters nach einer Vorschrift von SUN et al.^[69] mit Natriumhydroxid in Ethanol/Wasser (2:1 v/v) bei Raumtemperatur schließlich die Sulfonamid Derivate **48a-c** in ebenfalls schlechten, aber für die weitere Charakterisierung, ausreichenden Ausbeuten (Tabelle 7).

Schema 20: Synthese der Derivate **48a-c**Tabelle 7: Substituenten der Derivate mit Sulfonamid *Scaffold*

Nr.	R	Ausbeute
48a		4 %
48b		26 %
48c		23 %

4.2. Synthese von Inhibitoren für USP48

4.2.1. Retrosynthese der STK593195 Analoga

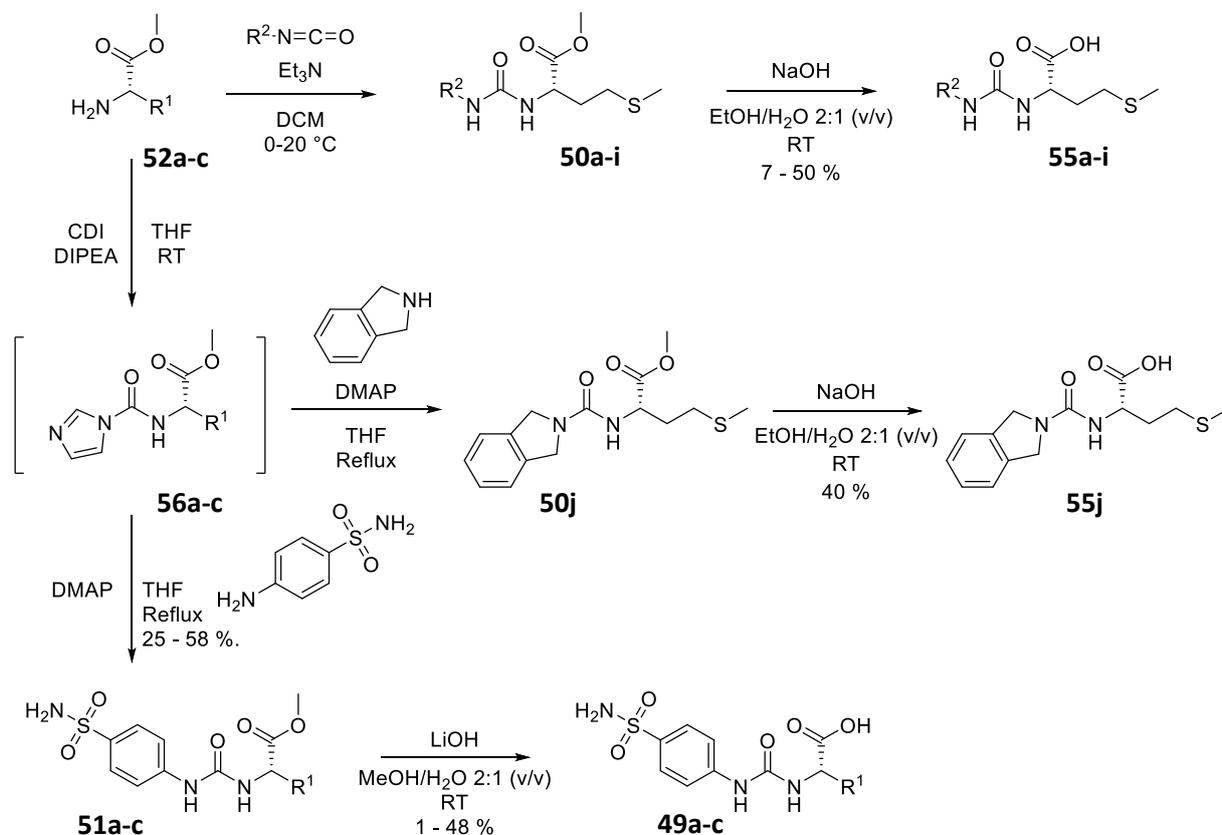


Schema 21: Retrosynthese der STK593195 Analoga

Die Struktur von STK593195 besteht aus Sulfanilamid, das über einen Harnstoff mit der Aminosäure L-Methionin verbunden ist. Für die SAR sollten sowohl der Aminosäurerest (R^1), als auch das Sulfanilamid-Moivt (R^2) abgewandelt werden.

Je nachdem welcher Teil der Struktur von STK593195 (**49a**) variiert werden soll, lässt sich die Zielverbindung über die jeweiligen Methylester **50** bzw. **51** retrosynthetisch entweder in L-Methioninmethylester (**52a**) und ein Isocyanat **53** oder in Sulfanilamid (**54a**) und den entsprechenden Aminosäuremethylester **52** zerlegen (Schema 21).

4.2.2. Synthese der STK593195 Analoga



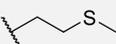
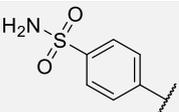
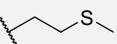
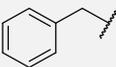
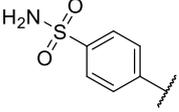
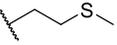
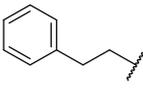
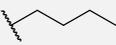
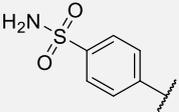
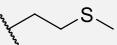
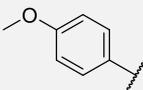
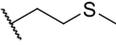
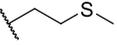
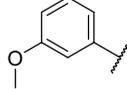
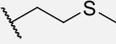
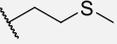
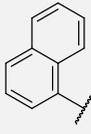
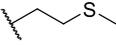
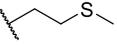
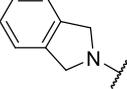
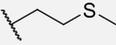
Schema 22: Synthese der STK593195 Analoga

Wie im vorangegangenen Kapitel (4.2.1) besprochen, erfolgt die Variation der Struktur von STK593195 über zwei unterschiedliche Synthesewege. Um die Sulfanilamid-Gruppe (R^2) zu ersetzen wurde Methioninmethylester (**52a**) nach einer Vorschrift von Su et al.^[70] mit den jeweiligen Isocyanaten **53a-i** und Triethylamin bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ bis $20\text{ }^\circ\text{C}$ zu den Harnstoff-Verbindungen **50a-i** umgesetzt (Schema 22). Hierbei wurden die erhaltenen Verbindungen aufgrund schwer zu trennenden, nicht identifizierten Nebenprodukten nicht weiter aufgereinigt. Im nächsten Schritt wurde dann der Methylester nach einer Vorschrift von SUN et al.^[69] mit Natriumhydroxid in Ethanol/Wasser (2:1 v/v) bei Raumtemperatur hydrolysiert, um die Zielverbindungen **55a-i** (Tabelle 8) zu erhalten. Die Ausbeuten waren hierbei allesamt schlecht, da im vorangegangenen Reaktionsschritt, das Produkt nicht aufgereinigt wurde und somit die Ausbeute vom verunreinigten Rohprodukt ausgehend bestimmt wurde. Im Falle des Isoindolin-Derivats **55j** musste die Aminosäure zunächst mit 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) und DIPEA bei Raumtemperatur in THF zum Zwischenprodukt **56a** umgesetzt werden. Anschließend wurde nach Zugabe von Isoindolin (**54b**) und die Reaktionsmischung in THF am Rückfluss erhitzt, um das Harnstoff-Derivat **50j** zu ergeben. Im nächsten Schritt wurde dann der Methylester unter den gleichen Bedingungen wie bei den Derivaten zuvor hydrolysiert und das

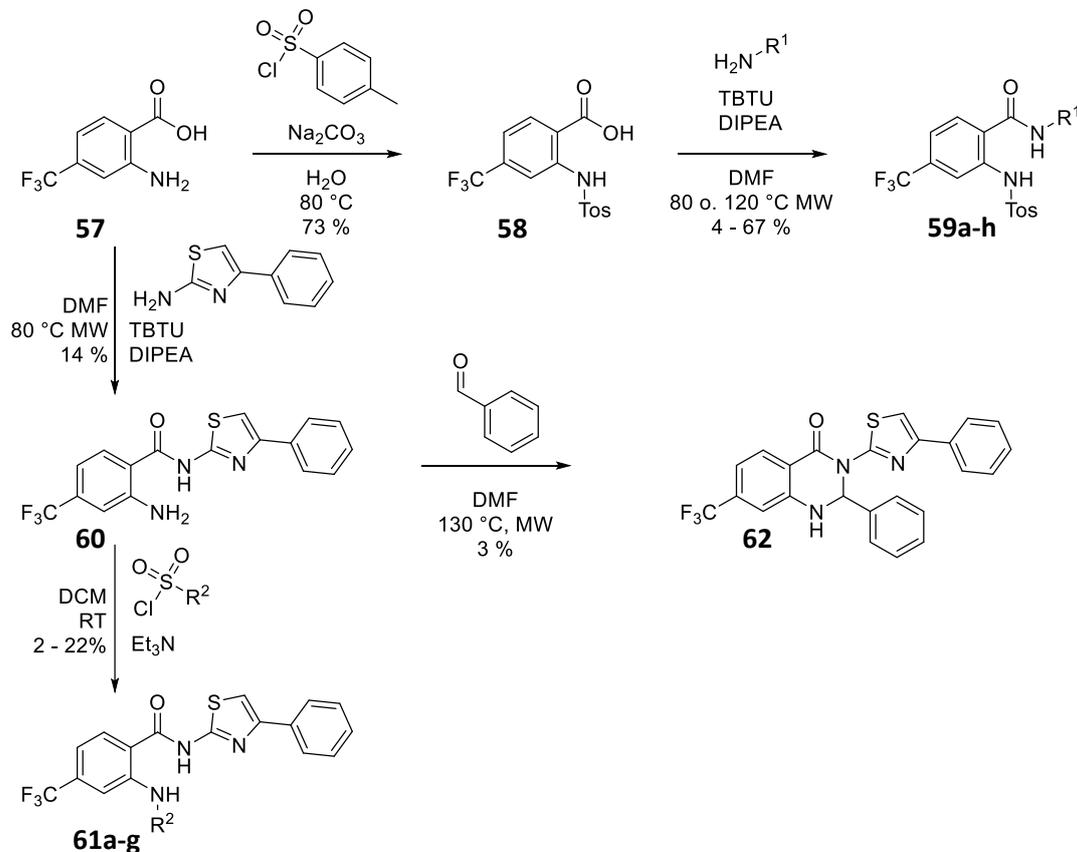
Isindolin-Derivat **55j** in schlechter, aber für die weitere Charakterisierung ausreichender, Ausbeute erhalten. Auch hier geht die schlechte Ausbeute darauf zurück, dass das Harnstoff-Derivat **50j** nicht aufgereinigt wurde.

Die Variation der Methionin-Gruppe erfolgte ebenfalls über die Umsetzung der jeweiligen Aminosäuremethylester **52a-c** mit CDI zu den Zwischenprodukten **56a-c** und der anschließenden Zugabe von Sulfanilamid. Die entstandenen Produkte **51a-c** konnten in schlechten bis befriedigenden Ausbeuten erhalten werden, wobei alle Derivate aufgereinigt wurden. Im Falle des Derivats **51a**, konnte trotz Aufreinigung ein nicht näher identifiziertes Nebenprodukt nicht abgetrennt werden. Die Hydrolyse der erhaltenen Methylester **51a-c** erfolgte mit Lithiumhydroxid in Methanol/Wasser (2:1 v/v) bei Raumtemperatur. Diese Methode ist etwas milder als die Methode mit Natriumhydroxid. Die Zielverbindungen **49a-c** wurden so in schlechten Ausbeuten erhalten. Das Derivat **49a** konnte mit lediglich 1 % Ausbeute isoliert werden, was vermutlich an der Verunreinigung des Methylesters **51a** lag. Da dennoch alle Produkte in ausreichender Menge und Reinheit erhalten wurden, wurde die Synthese nicht weiter angepasst.

Tabelle 8: Synthetisierte STK593195-Analoga

Nr.	R ¹	R ²	Nr.	R ¹	R ²
49a			55e		
49b			55f		
49c			55g		
55a			55h		
55b			55i		
55c			55j		
55d					

4.2.3. Synthese der ML-364 Analoga

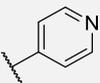
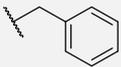
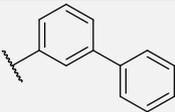
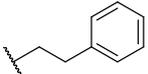
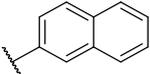
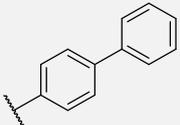


Schema 23: Synthese von ML-364 Analoga mit verschiedenen Amid- und Sulfonyl-Gruppen

Der USP2/8-Inhibitor ML-364 konnte als ein weiterer Startpunkt für die Entwicklung eines USP48-Inhibitors identifiziert werden (s. Kapitel 5.2). ML-364 besteht aus drei Untereinheiten: Einer Phenylthiazol-Gruppe, einer Tosyl-Gruppe und einer Anthranilsäure-Gruppe, welche die beiden anderen Gruppen miteinander verbindet (s. Abbildung 12). Zur Untersuchung der SAR wurden verschiedene ML-364-Analoga synthetisiert, bei denen jeweils eine der Gruppen variiert wurde. Eine vorangestellte retrosynthetische Analyse war in diesem Fall nicht nötig, da die Synthese von ML-364 in der Literatur beschrieben ist.^[71] Zunächst wurde eine Reihe an Verbindungen mit substituierter Phenylthiazol-Gruppe synthetisiert. Die Synthese verlief dabei analog zur von DAVIES et al. beschriebenen Synthese von ML-364.^[71] Im ersten Schritt wurde hierbei 4-Trifluormethyl-anthranilsäure (**57**) mit Tosylchlorid und Natriumcarbonat bei 80 °C in Wasser zur *N*-tosylierten Anthranilsäure (**58**) umgesetzt, wobei die Ausbeute sogar etwas über der in der Literatur beschriebenen Ausbeute von 57 %^[71] lag (Schema 23). Anschließend wurden die entsprechenden Amine mit TBTU (2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylammoniumtetrafluorborat) und DIPEA in DMF an den Carbonsäurerest gekuppelt, um die Amide **59a-h** zu erhalten. Das in der ursprünglichen Vorschrift genutzte Kupplungsreagenz HATU (*O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyl-

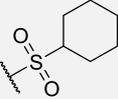
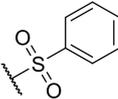
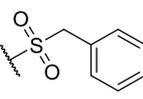
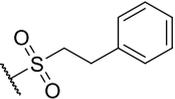
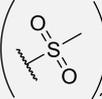
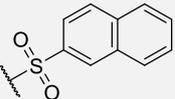
uronium-hexafluorosphat) wurde durch TBTU ersetzt, da HATU explosionsgefährlich ist. Die meisten Amidkupplungen wurden bei 80 °C durchgeführt. Im Falle von Benzylamin und Phenylethylamin fand unter diesen Bedingungen jedoch kein Umsatz statt. Die Temperatur wurde deshalb auf 120 °C erhöht und die Reaktion in der Mikrowelle durchgeführt. Hierdurch konnte die nötige Aktivierungsenergie überschritten werden und die Reaktionszeit gleichzeitig von mehreren Stunden auf 30 min verkürzt werden. Alle Produkte wurden nur in schlechten bis befriedigenden Ausbeuten erhalten (Tabelle 9), wobei die in der Literatur beschriebene Ausbeute von ML-364 ebenfalls nur bei 31 %^[71] liegt. Für die Derivate **59a,c,f-h**, in denen das Amin an einen Aromaten gebunden war, konnte die in der Literatur beschriebene Ausbeute sogar übertroffen werden. In den Fällen, in denen das Amin an eine Methylengruppe gebunden war, wurde die erwartete Ausbeute jedoch deutlich unterschritten.

Tabelle 9: Substituenten der ML-364 Analoga mit substituierter Phenylthiazol-Gruppe und Ausbeuten des letzten Reaktionsschrittes

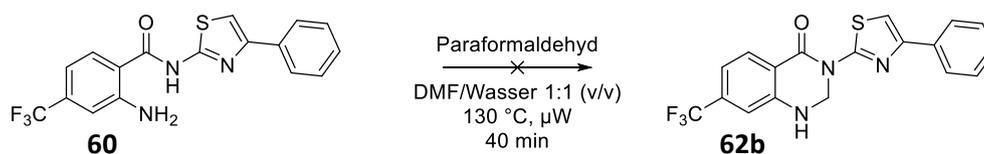
Nr.	R ¹	Ausb.	Nr.	R ¹	Ausb.	Nr.	R ¹	Ausb.
59a		67 %	59d		17 %	59g		46 %
59b		4 %	59e		4 %	59h		40 %
59c		46 %	59f		31 %			

Für die Synthese der Verbindungen mit substituierter Tosyl-Gruppe wurde die Reihenfolge der Syntheseschritte umgekehrt und zuerst 4-Phenylthiazolamin an 4-Fluormethylantranilsäure (**57**) gekuppelt und die so entstandene Vorstufe (**60**) anschließend zu den Derivaten **61a-g** sulfonyliert. Da die Vorstufe **60** nur schlecht in Wasser löslich war, mussten die Reaktionsbedingungen für die Sulfonylierung angepasst werden (Schema 23). Anstatt Wasser wurde Dichlormethan als Lösungsmittel gewählt und als Base kam Triethylamin zum Einsatz. Unter diesen Bedingungen lief die Reaktion bereits bei Raumtemperatur, jedoch bei schlechteren Ausbeuten, ab (Tabelle 10). Interessanterweise ergab die Reaktion mit Methylsulfonylchlorid ausschließlich das doppelt sulfonylierte Produkt (**61b**), anstatt wie erwartet das einfach sulfonylierte Produkt. Dies lässt sich vermutlich mit dem geringen sterischen Anspruch des Methylrestes im Vergleich zu den anderen eingesetzten Sulfonylchloriden erklären.

Tabelle 10: Substituenten der ML-364 Analoga mit substituierter Tosyl-Gruppe und Ausbeuten des letzten Reaktionsschrittes

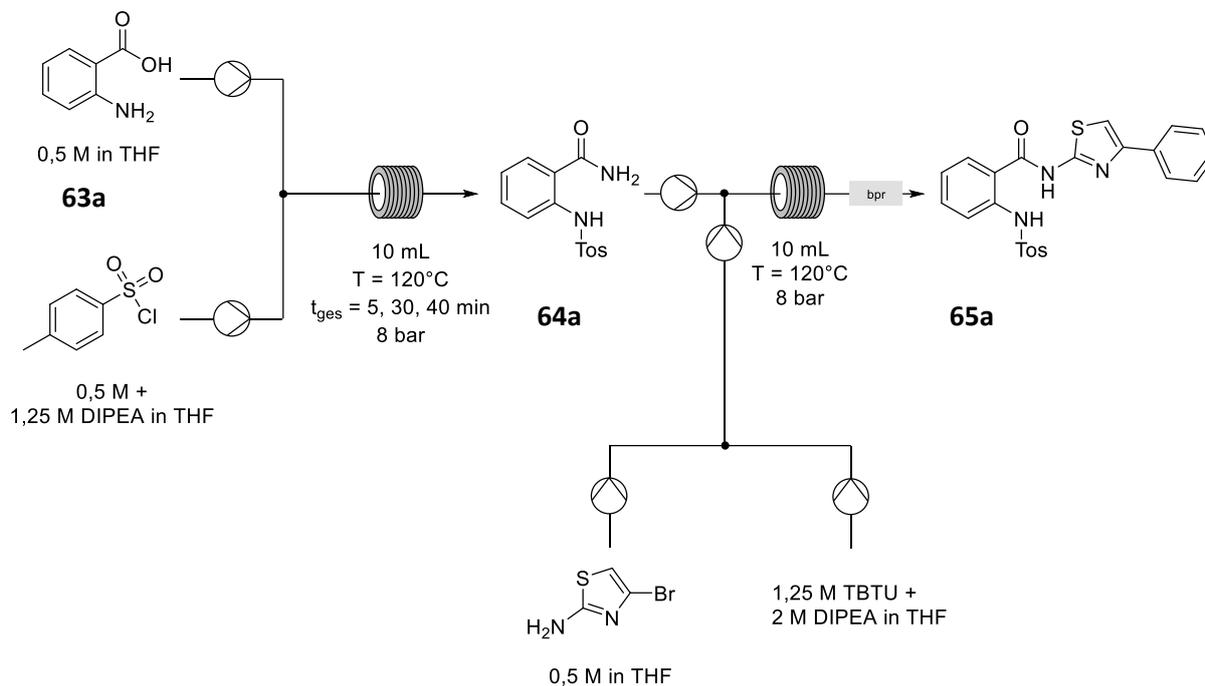
Nr.	R ¹	Ausb.	Nr.	R ¹	Ausb.	Nr.	R ¹	Ausb.
60	H	14 %	61c		2 %	61f		3 %
61a		4 %	61d		22 %	61g		11 %
61b		6 %	61e		14 %			

Zusätzlich zu den Sulfonyl-Derivaten **61a-g** wurde noch das zyklisierte Dihydrochinazolinon (**62**, Schema 23) synthetisiert. Hierzu wurde, analog zu einer Vorschrift von KUMAR et al.^[72], die Vorstufe **60** zusammen mit Benzaldehyd in DMF bei 130 °C in der Mikrowelle umgesetzt und das Produkt wurde in schlechter Ausbeute (3 %) erhalten. Der Versuch der Synthese des unsubstituierten Dihydrochinalizons (**62b**) aus Paraformaldehyd, nach einer Vorschrift von KAKUTA et al.^[73], gelang hingegen nicht (Schema 24). Anstatt dem in der ursprünglichen Vorschrift verwendeten Formalin, wurde Paraformaldehyd verwendet, welches beim Erhitzen in Wasser *in situ* Formalin erzeugt. Vermutlich führte jedoch das überschüssige Wasser zur Bildung von unerwünschten Nebenprodukten.

Schema 24: Versuch der Synthese eines unsubstituierten Dihydrochinazolinons **62b**

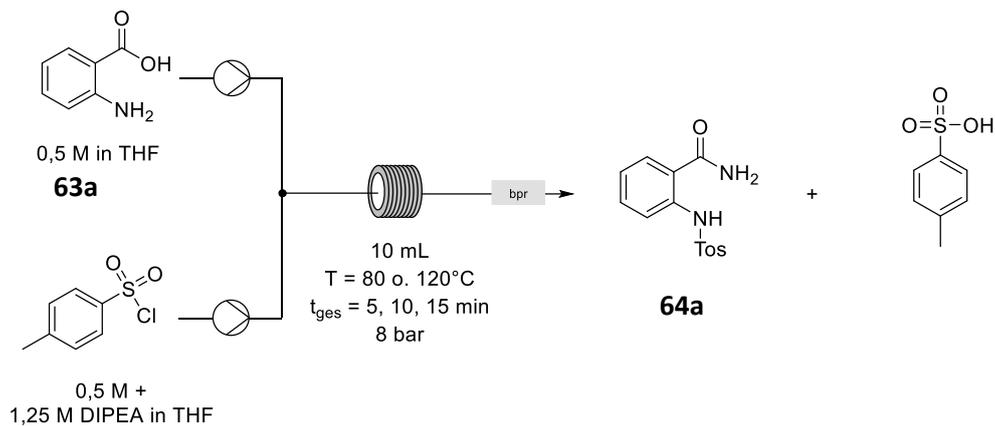
Im Falle der Substitution der Anthranilsäure-Gruppe, lassen sich die einzelnen Analoga nicht aus einer gemeinsamen Vorstufe synthetisieren. Somit ist für jede Verbindung eine zweistufige Synthese nötig. Um trotzdem viele Derivate in kurzer Zeit synthetisieren zu können, wurde versucht, die Synthese mittels *Flow*-Chemie zu automatisieren. Hierzu wurde zunächst in einer Testreaktion im ersten Schritt Anthranilsäure (0,5 M, **63a**) in THF über eine Injektionsschleife in den *Flow*-Reaktor geladen und Tosylchlorid (0,5 M) mit DIPEA (1,25 M) in THF aus einer Flasche eingeleitet (Schema 25). Die Reagenzien wurden dann bei 120 °C und 8 bar durch einen 10 ml Reaktor geführt, um das Zwischenprodukt **64a** zu ergeben. Anschließend wurden 4-Phenyl-1,3-thiazolamin in THF und eine Mischung aus TBTU und DIPEA in THF zusammen mit der Reaktionslösung des ersten Reaktors in einen zweiten 10 ml Reaktor bei 120 °C eingeleitet. Die Verweilzeiten wurden dabei variiert ($\tau = 5$ min,

30 min, 40 min). Mit HPLC und ESI-MS konnte allerdings bei keiner der Verweilzeiten das gewünschte Produkt **65a** nachgewiesen werden.



Schema 25: Flussschema des *Flow*-Reaktors für die zweistufige Synthese von einem auf Anthranilsäure basierendem ML-364 Analog

Um geeignete Reaktionsbedingungen zu finden, wurde deshalb zunächst versucht, den ersten Reaktionsschritt zu optimieren. Der Reaktionsaufbau wurde also auf einen Reaktor verkürzt und erneut Anthranilsäure (0,5 M, **63a**) in THF und Tosylchlorid (0,5 M) mit DIPEA (1,25 M) in THF durch einen 10 ml Reaktor geleitet (Schema 26). Die Reaktortemperatur betrug dabei entweder 80°C oder 120°C , bei jeweils 5 min, 10 min oder 15 min Verweilzeit und 8 bar Druck. Hierbei entstand unter allen getesteten Verbindungen hauptsächlich *p*-Toluolsulfonsäure (Tabelle 11). Das gewünschte Produkt **64a** zeigte in der HPLC nur einen Anteil von unter 15 %. Eine niedrigere Temperatur und kürzere Verweilzeit ergaben dabei mehr Produkt als höhere Temperaturen und längere Verweilzeiten. Ein weiterer Versuch, bei dem DIPEA zur Anthranilsäurelösung gegeben wurde anstatt zur Tosylchloridlösung, führte zu keiner Verbesserung.



Schema 26: Flussschema des *Flow*-Reaktors für die Synthese tosylierter Anthranilsäure

Tabelle 11: HPLC-Umsatz von *p*-Toluolsulfonsäurechlorid und dem gewünschten Produkt **64a** bei verschiedenen Temperaturen und Verweilzeiten im *Flow*-Reaktor

τ	80 °C		120 °C	
	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure	Produkt	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure	Produkt
5 min	31,8 %	13,7 %	40,5 %	6,3 %
10 min	31,0 %	13,3 %	41,8 %	5,0 %
15 min	54,4 %	11,7 %	40,4 %	3,0 %

Da die Bildung von *p*-Toluolsulfonsäure stark vom pH-Wert während der Reaktion abhängt, wurden die Reaktionsbedingungen entsprechend angepasst und die Synthese nach einer Vorschrift von GIOIELLO et al.^[74] wiederholt. Hierbei wurde die Anthranilsäure (0,55 M) in gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung und PEG400 (1:1 v/v) gelöst und Tosylchlorid (0,5 M) in Aceton gelöst. Die beiden Lösungen wurden dann im gleichen Aufbau wie zuvor im *Flow*-Reaktor umgesetzt. Wieder wurden verschiedene Temperaturen und Verweilzeiten getestet. Außerdem wurde die Reaktion noch einmal mit einem 5 ml Reaktor wiederholt. Im ersten Schritt wurde die Reaktion bei einer Verweilzeit von 20 min mit verschiedenen Temperaturen durchgeführt (Tabelle 12). Hierbei zeigte sich eine deutlich verbesserte Bildung des Produkts. Bei 120 °C entstand nahezu keine *p*-Toluolsulfonsäure mehr.

Tabelle 12: HPLC-Umsatz von *p*-Toluolsulfonsäurechlorid und dem gewünschten Produkt **64a** bei einer Verweilzeit von 20 min und verschiedenen Reaktortemperaturen nach der Vorschrift von GIOIELLO et al.^[74]

T [°C]	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure [%]	Produkt [%]
25	38,1	35,3
50	56,1	27,2
80	18,8	41,0
120	1,5	65,1

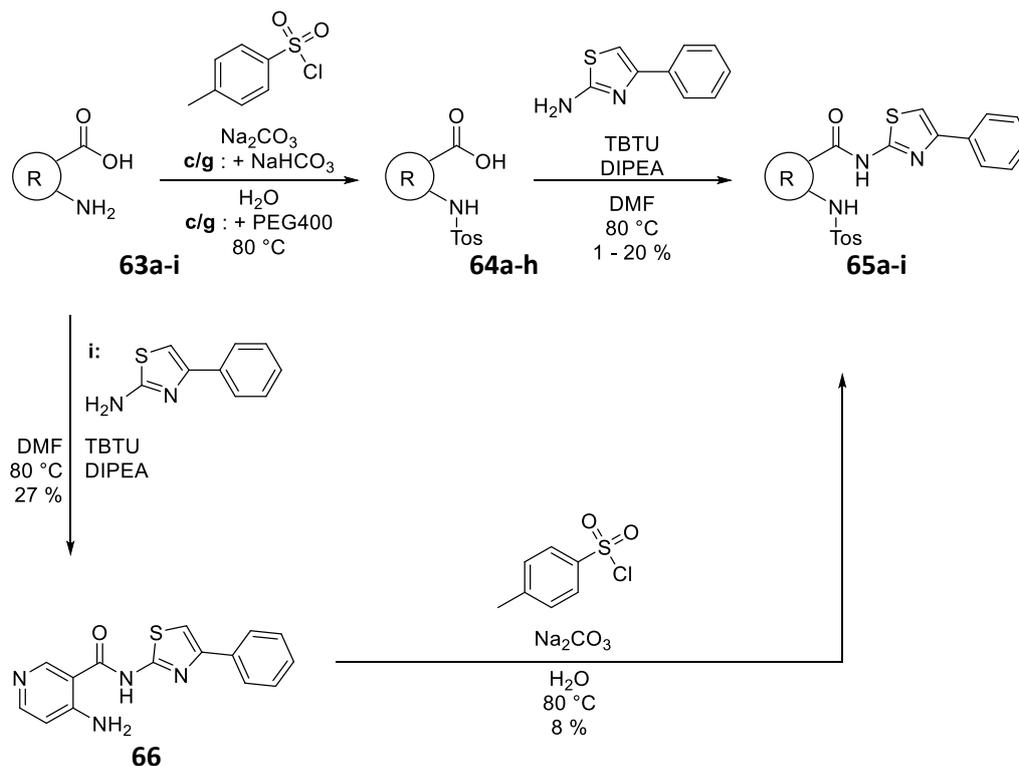
Im nächsten Schritt wurde deshalb die Verweilzeit bei 120 °C untersucht (Tabelle 13). Hierbei ergab sich bei einer Verweilzeit von 5 min der größte Anteil an Produkt. Die Menge der gebildeten *p*-Toluolsulfonsäure war in allen Versuchen deutlich höher als bei 120 °C und 20 min Verweilzeit, was vermutlich auf eine Ungenauigkeit in der Messung zurückzuführen ist. Dennoch entstand bei allen Versuchen eine zufriedenstellende Menge an Produkt. Die Wahl eines 5 ml Reaktors verbesserte noch einmal das Verhältnis von Produkt zu Nebenprodukt bei gleichbleibender Ausbeute. Im Vergleich zur in der Literatur beschriebenen Ausbeute von 80 %, fällt die Ausbeute jedoch in allen Versuchen geringer aus. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass in der Synthese von GIOIELLO et al.^[74] mit niedrigeren Konzentrationen gearbeitet wurde. Die Erhöhung der Konzentration von 0,1 M auf 0,5 M führte dazu, dass für die NaHCO₃-Lösung die Sättigungsgrenze erreicht wurde. Somit war in der Reaktion im Verhältnis weniger NaHCO₃ anwesend, als in der ursprünglichen Vorschrift. Der Versuch wurde deshalb bei 120 °C und einem 5 ml Reaktor nochmals mit Na₂CO₃ wiederholt, was allerdings zu einer Ausbeute von nur 35 % bei gleich viel Sulfonsäure ergab. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen von GIOIELLO et al.^[74]

Tabelle 13: HPLC-Umsatz von *p*-Toluolsulfonsäurechlorid und dem gewünschten Produkt bei verschiedenen Verweilzeiten und Reaktorgrößen bei einer Temperatur von 120 °C

τ [min]	10 ml Reaktor		5 ml Reaktor	
	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure [%]	Produkt [%]	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure [%]	Produkt [%]
5	20,4	66,7	11,3	54,5
10	33,1	57,0	4,6	66,3
15	30,4	59,9	-	-
30	29,9	44,6	-	-

Somit wurden die Ausbeute und das Produkt/Nebenprodukt-Verhältnis der Reaktion mit NaHCO₃ als ausreichend für weitere Reaktionen betrachtet. Für eine automatisierte Synthese mehrerer Derivate ausgehend von verschiedenen Aminosäuren, wurden somit als Bedingungen ein 5 ml Reaktor bei 120 °C und 10 min Verweilzeit gewählt. Als Edukte kamen 4-Methoxyanthranilsäure,

3-Aminoisonicotinsäure, 4-Aminonicotinsäure, 2-Amino-4-chlorbenzoesäure, Beta-Alaninmethylester und Methyl-(*R*)-4-boc-piperazin-2-carboxylat zum Einsatz. Die Rohausbeuten lagen bei allen Reaktionen zwischen 3 – 17 % und alle Rohprodukte waren noch stark verunreinigt. Deshalb wurden alle Synthesen noch einmal unter konventionellen Bedingungen wiederholt (Schema 27).



Schema 27: Synthese von ML-364 Analoga mit substituierter Anthranilsäure-Gruppe

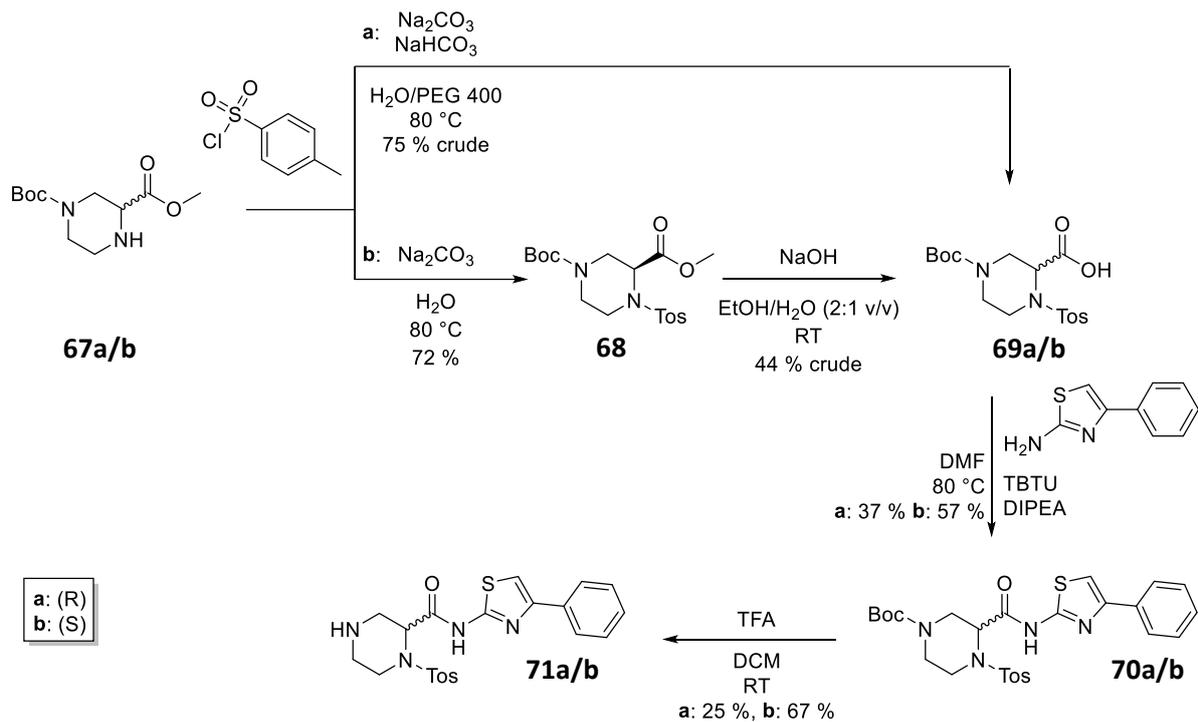
Dabei wurden, wie schon bei der Synthese der vorangegangenen ML-364 Analoga, die jeweiligen Aminosäuren **63a-h** mit Tosylchlorid und Natriumcarbonat bei $80\text{ }^\circ\text{C}$ in Wasser zu den tosylierten Aminosäuren **64a-h** umgesetzt. Die bereits im *Flow*-Reaktor verwendeten Aminosäuren (**63c/g**) wurden dabei aus der vorhandenen Lösung für die *Flow*-Reaktion unter Zugabe von Natriumcarbonat und Tosylchlorid bei $80\text{ }^\circ\text{C}$ umgesetzt. Auf eine Aufreinigung wurde bei diesem Reaktionsschritt verzichtet, da sich die entstandenen Nebenprodukte auch nach dem darauffolgenden Reaktionsschritt noch gut abtrennen ließen. Somit konnte der Zeitaufwand für die Synthese etwas verkürzt werden. Im zweiten Schritt wurde dann 4-Phenyl-1,3-thiazolamin mit TBTU und DIPEA bei $80\text{ }^\circ\text{C}$ in DMF an den Carbonsäurerest gekuppelt, um die ML-364 Analoga **65a-h** (Tabelle 14) zu erhalten. Die schlechten Ausbeuten ergeben sich aus der Anwesenheit von Verunreinigungen bei den eingesetzten Aminosäuren **63a-h**. Im Falle der 4-Aminonicotinsäure (**63i**) mussten die Reihenfolge der Reaktionsschritte umgekehrt werden, da die entsprechende tosylierte Aminosäure amphoter war und

sich somit beim Aufarbeiten nicht aus der wässrigen Phase in die organische Phase extrahieren ließ. Durch die Synthese über das Amid **66** konnte diese Problematik umgangen werden.

Tabelle 14: Synthetisierte Verbindungen mit substituierter Anthranilsäure-Einheit und Ausbeuten des letzten Reaktionsschritts

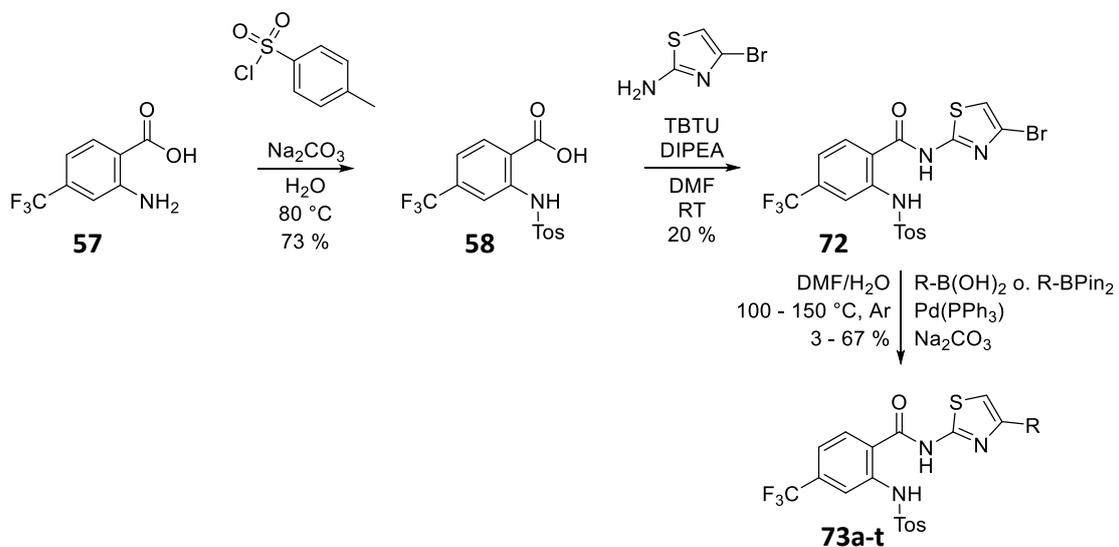
Struktur	Nr.	R ³	Ausb.	Nr.	R ³	Ausb.
	65a		1 %	65f		4 %
	65b		11 %	65g		5 %
	65c		2 %	65h		6 %
	65d		20 %	65i		8 %
	65e		< 1 %			

Weiterhin wurden für die SAR der Anthranilsäure-Gruppe die enantiomeren ML-364 Analoga **71a/b** synthetisiert (Schema 28). Die Synthese ging hierbei von den Boc-geschützten Methyl Piperazin-2-carboxylaten **67a/b** aus. Diese wurden im ersten Schritt unter den gleichen Bedingungen wie zuvor die Aminosäuren tosyliert. Das (R)-Enantiomer **67a** wurde hierbei direkt aus der Lösung für die *Flow*-Reaktion umgesetzt. Unter diesen Bedingungen kam es zur Abspaltung des Methylesters, sodass unmittelbar das Derivat **69a** entstand. Im Falle des (S)-Enantiomers **67b** entstand hingegen zunächst der tosylierte Methylester **68**. Dieser wurde dann in einem weiteren Schritt mit Natriumhydroxid in Ethanol/Wasser bei Raumtemperatur zur Carbonsäure **69b** gespalten. Beide Enantiomere wurden dann mit 4-Phenyl-1,3-thiazol-2-amin, TBTU und DIPEA bei 80 °C in DMF zu den Amiden **70a/b** umgesetzt. Im letzten Schritt wurde dann die Boc-Gruppe mit Trifluoressigsäure (TFA) in DCM bei Raumtemperatur abgespalten, um die enantiomeren ML-364 Analoga **71a/b** zu erhalten. Die unterschiedlichen Ausbeuten im letzten Schritt sind auf Überführungsverluste zurückzuführen, da mit relativ kleinen Mengen gearbeitet wurde.



Schema 28: Synthese der enantiomeren Piperazin Derivate **71a/b**

Nachdem die erste Runde an SAR Untersuchungen abgeschlossen war, zeigte sich, dass besonders die Phenylthiazol-Gruppe genauer untersucht werden sollte (s. Kapitel 5.2). Diesmal sollte der Thiazolrest erhalten bleiben, aber der Phenylrest durch verschiedene aromatische Reste ersetzt werden. Um dies zu erreichen wurde 4-Trifluormethylantranilsäure (**57**) zunächst unter den bereits etablierten Bedingungen zum Zwischenprodukt **58** tosyliert und im nächsten Schritt mit 4-Brom-1,3-thiazol-2-amin zu dem Bromthiazolamid **72** umgesetzt (Schema 29).



Schema 29: Funktionalisierung der Thiazolamin-Gruppe

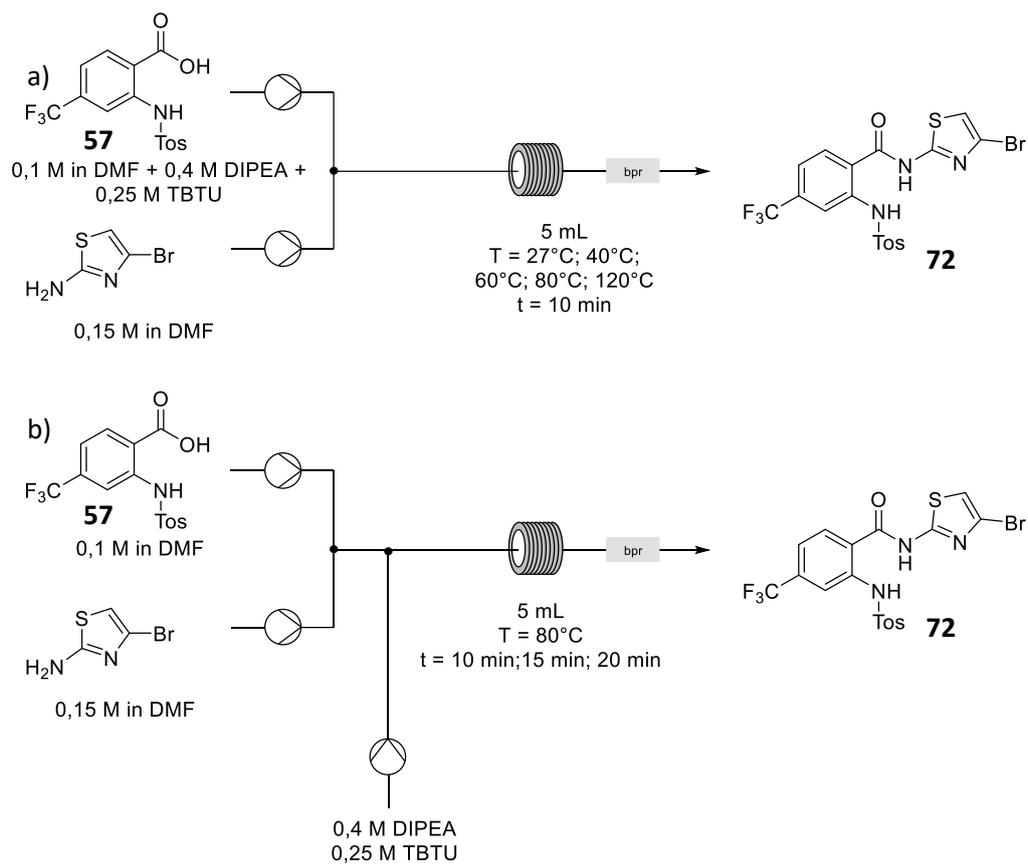
Da sich unter den etablierten Bedingungen für die Amidkupplung jedoch zunächst nur eine Ausbeute von 7 bis 16 % ergab, wurden für diese verschiedene Reaktionsbedingungen getestet. Eine Erhöhung der Temperatur auf 120 °C in der Mikrowelle bei 5 und 10 Minuten Reaktionszeit führte zu einer verstärkten Bildung von Nebenprodukten, während kaum Hauptprodukt entstand. Eine Absenkung der Temperatur auf Raumtemperatur und Verlängerung der Reaktionszeit auf 24 h ergab schließlich eine leichte Erhöhung der Ausbeute auf 20 %. Ein weiterer Versuch mit PyBop (Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat) statt TBTU als Kupplungsreagenz bei Raumtemperatur ergab keine Erhöhung der Ausbeute. Weiterhin wurde versucht die Amidkupplung nach einer Vorschrift von GABRIEL et al.^[75] in Wasser/Aceton (1:1 (v/v)) mit [(1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)dimethylamino-morpholino-carbenium-hexafluorophosphat] (COMU) als Kupplungsreagenz und 2,6-Lutidin über Nacht bei Raumtemperatur durchzuführen. Unter diesen deutlich veränderten Reaktionsbedingungen wurde jedoch kein Produkt gebildet. Ebenso führte die Umsetzung nach einer Vorschrift von SHARMA et al.^[76] mit *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid (EDC) als Kupplungsreagenz und Pyridin als Base für 22 h bei 60 °C in Wasser/Aceton (1:1 (v:v)) nicht zum gewünschten Produkt (Tabelle 15).

Tabelle 15: Getestete Reaktionsbedingungen für die Amidkupplung zum Zwischenprodukt **72**. Reaktionsbedingungen bei denen keine Ausbeute bestimmt wurde, führten entweder nicht zum Produkt oder zu schwer abtrennbaren Nebenprodukten

Kupplungsreagenz	Temperatur	Reaktionszeit	Ausbeute
TBTU	RT	24 h	20 %
TBTU	RT	42 h	-
TBTU	80 °C	5 h	16 %
TBTU	120 °C, MW	5, 10 min	-
PyBOP	RT	3 h	10 %
PyBOP	RT	24 h	15 %
PyBOP	80 °C	2 h	-
COMU	RT	22 h	-
EDC	60 °C	22 h	-

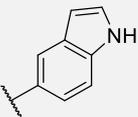
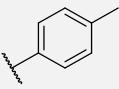
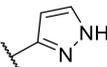
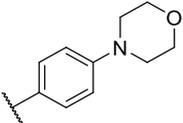
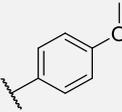
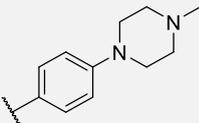
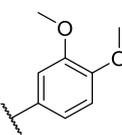
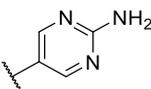
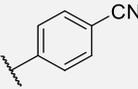
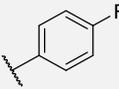
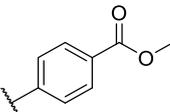
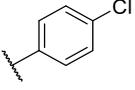
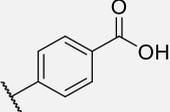
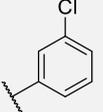
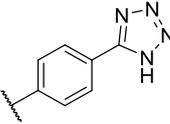
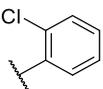
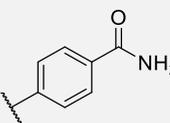
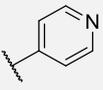
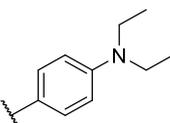
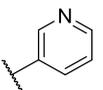
Da andere Kupplungsreagenzien entweder zu keiner Bildung des Produkts oder zu einer geringeren Ausbeute führten, wurde TBTU als Kupplungsreagenz beibehalten. Schlussendlich wurde noch untersucht, ob eine Umsetzung im *Flow*-Reaktor bei 10 min Verweilzeit und verschiedenen Temperaturen zu einer Erhöhung der Ausbeute führte (Schema 30 a). Bei 27 °C und 40 °C wurde jedoch kein Produkt gebildet und bei höheren Temperaturen entstanden hauptsächlich unerwünschte Nebenprodukte. Um zu untersuchen, ob die Bildung von Nebenprodukten durch Reaktionen in den vorgelegten Reaktionslösungen verursacht wurde, wurde in einer neuen Versuchsanordnung die Lösung von TBTU und DIPEA erst nach Vermischung der beiden Edukte zugeführt (Schema 30 b). Als Reaktortemperatur wurde dabei 80 °C gewählt, da bei dieser Temperatur im vorangegangenen Versuch das beste Ergebnis erzielt wurde. Die Verweilzeit betrug 10, 15 und 20 min. Im Ergebnis lieferte dieser Versuchsaufbau noch schlechtere Ergebnisse als der vorangegangene. Dies ist vermutlich auf die fehlende Aktivierung der Carbonsäure durch TBTU zurückzuführen. Insgesamt lässt sich die schlechtere Reaktivität von 4-Brom-1,3-thiazol-2-amin im Vergleich zu 4-Phenyl-1,3-thiazol-2-amin vermutlich mit dem, vom Bromsubstituenten ausgehenden, -I-Effekt erklären, der die Elektronendichte an der Amino-Gruppe verringert und somit den nukleophilen Angriff erschwert.

Da die Reaktion mit TBTU bei Raumtemperatur über Nacht die besten Ergebnisse lieferte, wurde diese als Methode zur Synthese des Bromthiazolamids **72** gewählt. Von diesem ausgehend wurden dann über eine SUZUKI-Reaktion verschiedene Reste mittels der entsprechenden Boronsäuren bzw. Boronsäureester eingeführt, sodass die am Thiazol substituierten Derivate **73a-t** (Tabelle 16) erhalten wurden (Schema 29). Als Reaktionsbedingungen wurden hierbei bereits etablierte Bedingungen für die SUZUKI-Reaktion angewendet, mit Pd(PPh₃)₄ als Katalysator und Natriumcarbonat als Base in DMF/Wasser (6.7:1 v/v) bei 100 - 140 °C für 3 - 4 h oder für 15 min bei 150 °C in der Mikrowelle. Die Ausbeuten schwankten hierbei zwischen 3 % für das 4-Cyanophenyl-Derivat **73e** und 62 % für das 3,4-Methoxyphenyl-Derivat **73d** bzw. das 2-Chlorphenyl-Derivat **73r**. Die deutlich unterschiedlichen Ausbeuten hängen hier vermutlich von der Reaktivität der unterschiedlichen Boronsäuren, als auch von möglichen unerwünschten Wechselwirkungen der funktionalen Gruppen mit dem Katalysator ab. Weiterhin sind manche Boronsäuren anfällig für Protodeboronierung, wobei die Stärke der Anfälligkeit nur schwer vorhersagbar sein kann.^[77,78] Dennoch konnten alle Derivate in ausreichenden Mengen synthetisiert werden.



Schema 30: Versuch der Synthese des Bromthiazolamids **72** im *Flow-Reaktor* mit zwei unterschiedlichen Versuchsaufbauten

Tabelle 16: Substituenten am Thiazolrest der Derivate **73a-t** und Ausbeuten des letzten Reaktionsschritts. Im Falle des Derivats **73g** bezieht sich die Ausbeute auf die Abspaltung der Methyl-Gruppe von **73f**

Nr.	R ¹	Ausbeute	Nr.	R ¹	Ausbeute
73a		11 %	73k		50 %
73b		13 %	73l		3 %
73c		19 %	73m		14 %
73d		62 %	73n		56 %
73e		3 %	73o		52 %
73f		9 %	73p		36 %
73g		55 %	73q		51 %
73h		17 %	73r		62 %
73i		4 %	73s		22 %
73j		22 %	73t		15 %

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1. Struktur-Wirkungsbeziehungen der synthetisierten Inhibitoren für STAMBPL1

Die Verbindungen, deren Synthesen in Kapitel 4.1 beschrieben sind, wurden am IEIM auf ihre inhibitorische Aktivität untersucht. Dabei zeigte ein erster Assay der Verbindungen mit Isatin *Scaffold*, dass einige der Verbindungen eine Restaktivität von unter 50 % bei 100 μM InhibitorKonzentration aufwiesen (Tabelle 17). Da jedoch während des Assays, der Verdacht aufkam, dass einige der Verbindungen unter den Assaybedingungen möglicherweise nicht löslich seien, wurde die Löslichkeit der Verbindungen noch einmal überprüft. Hierbei stellte sich heraus, dass die meisten der Verbindungen in der eingesetzten Konzentration von 100 μM nicht löslich waren. Der Assay wurde am IEIM nochmals mit den vier löslichen Verbindungen wiederholt, wobei keine der Verbindungen eine nennenswerte inhibitorische Aktivität zeigte.

Die Verbindungen mit Hydroxypiperidin *Scaffold* zeigten ebenfalls im Assay keine Aktivität oder waren nicht löslich (Tabelle 18). Da diese im initialen *Screening* gute Aktivitäten zeigten, jedoch die leicht abgewandelten Analoga keinerlei Aktivität aufwiesen, wurde das *Screening* am IEIM nochmals wiederholt. Hierbei war erneut ein Großteil der Substanzen nicht löslich und alle weiteren zeigten keinerlei Aktivität, darunter auch Verbindungen, die im initialen Screening eine vielversprechende Aktivität aufwiesen. Dies lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass unlösliche Verbindungen Aggregate bilden können, die an das Enzym adsorbieren und es somit inhibieren. In der Folge entstehen falsch positive Signale.^[79]

Die Verbindungen des Sulfonamid *Scaffolds* entstammten einer anderen Substanzbibliothek als die restlichen Scaffolds und wurden deshalb in der Wiederholung des Screenings nicht mitgetestet. Daher wurde von diesem *Scaffold* eine kleine Serie an Verbindungen synthetisiert (s. Kapitel 4.1.9) und am IEIM im Assay untersucht. Hier waren die Benzyl-Derivate **47c** und **48c** nicht löslich, die anderen beiden Derivate zeigten keinerlei Aktivität (Tabelle 19).

Tabelle 17: Assay-Ergebnisse zur Inhibition von STAMBPL1 durch Verbindungen mit Isatin *Scaffold* bei 100 μ M Inhibitorkonzentration

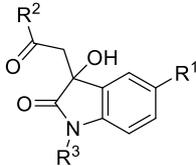
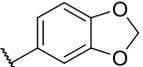
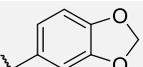
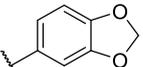
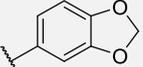
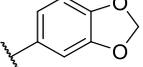
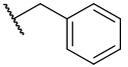
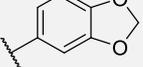
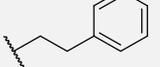
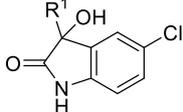
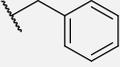
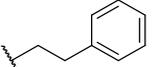
Struktur	Nr.	R ¹	R ²	R ³	Restaktivität
	1a	H		H	86 %
	1b	Cl		H	88 %
	1c	Cl		H	-
	1d	Cl		H	-
	1e	Cl			-
	1f	Cl			71 %
	1g	Cl			-
	1h	Cl			101 %
	1i	Cl			-
		1j			
1k					-
1l					-

Tabelle 18: Assay-Ergebnisse zur Inhibition von STAMBPL1 durch Verbindungen mit Hydroxypiperidin *Scaffold* bei 100 μ M Inhibitorkonzentration

Struktur	Nr.	R ¹	R ²	Restaktivität [%]
	8a			-
	8b			86
	8c			-
	8d			96
	8e			-
	8f			92
	26a			73
	26b			84
	26c			-
	26d			-
	26e			-

Tabelle 19: Assay-Ergebnisse zur Inhibition von STAMBPL1 durch Verbindungen mit Sulfonamid *Scaffold* bei 100 μ M Inhibitorkonzentration

Struktur	Nr.	R ¹	R ²	Restaktivität [%]
	48a		H	101
	48b		H	98
	48c		H	-
	47c			-

Somit ergab sich für keine der synthetisierten Verbindungen eine nennenswerte Aktivität gegenüber STAMBPL1. Auch in der Wiederholung des *Screenings* war keine der untersuchten Verbindungen aktiv. Folglich konnten die *in silico* generierten *Screening* Ergebnisse nicht bestätigt werden.

Um einen neuen möglichen Ansatzpunkt zu finden, wurde eine kleine Serie an Hydroxamsäureverbindungen aus der Institutseigenen Substanzbibliothek am IEIM auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber STAMBPL1 untersucht (Tabelle 20). Bei der Hydroxamsäure-Gruppe, handelt es sich um eine Metallbindegruppe, die in der Lage ist das Zink-Ion im aktiven Zentrum von Metalloproteasen zu binden.^[80] Jedoch wies keine der Verbindungen eine nennenswerte inhibitorische Aktivität auf. Zwar zeigte die Verbindung **74f** mit 61 % Restaktivität die größte inhibitorische Aktivität unter allen untersuchten Verbindungen, jedoch liegt auch dieser Wert zu hoch, als dass man von einem vielversprechenden Startpunkt sprechen könnte. Hierzu sollte die Restaktivität bei 100 μM Inhibitorkonzentration deutlich unter 50 % liegen. Weiterhin zeigte sich auch, dass Acetohydroxamsäure (**75**, Tabelle 21) keinerlei inhibitorische Aktivität aufweist, was darauf hindeutet, dass es zu keiner oder nur zu einer sehr schwachen Bindung des Zn^{2+} -Ions durch die Hydroxamsäure im aktiven Zentrum von STAMBPL1 kommt.

In Ermangelung eines Startpunktes für die Entwicklung neuer Inhibitorkandidaten, wurde von der Synthese weiterer Verbindungen abgesehen. Eine Möglichkeit einen neuen Startpunkt für die Inhibitorentwicklung zu finden, wäre die Durchführung eines *High-Throughput Screenings* (HTS). Bei diesem wird eine große Substanzbibliothek im Assay auf aktive Verbindungen hin untersucht. Dies geht allerdings mit hohem materiellem Aufwand einher und benötigt spezielle Ausrüstung. Da ein HTS zudem keine Garantie liefert neue *Scaffolds* für die Inhibitorentwicklung zu finden, wurde der Fokus auf die Entwicklung eines Inhibitorkandidaten für die zweite, in dieser Arbeit untersuchte DUB, USP48, gelegt.

Tabelle 20: Strukturen und Ergebnisse zur Inhibition von STAMBPL1 durch die untersuchten Hydroxamsäureverbindungen bei 100 µM Inhibitorkonzentration

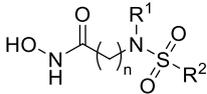
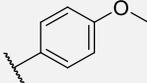
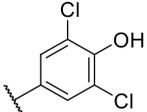
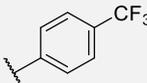
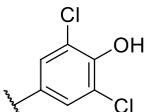
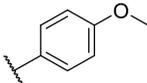
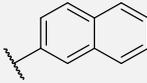
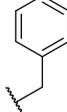
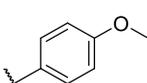
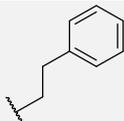
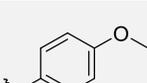
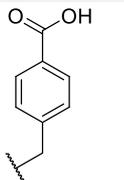
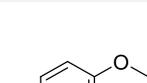
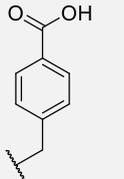
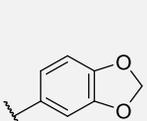
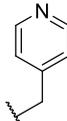
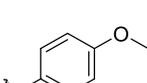
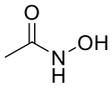
Struktur	Nr.	n	R ¹	R ²	Restaktivität [%]
	74a	1	H		72
	74b	1	H		94
	74c	1	H		79
	74d	2	H		89
	74e	1			80
	74f	1			61
	74g	1			87
	74h	1			84
	74i	1			85
	74j	1			98
	74k	1			106
	74l	1			93

Tabelle 21: Ergebnis der Inhibition von STAMBPL1 durch Acetohydroxamsäure bei 100 μ M Inhibitorkonzentration

Struktur	Nr.	Restaktivität [%]
	75	91

5.2. Struktur-Wirkungsbeziehungen der synthetisierten Inhibitoren für USP48

Zur Entwicklung eines Inhibitors für USP48 wurde zunächst eine Reihe von STK593195-Analoga synthetisiert. Hierbei wurde, mittels der in Kapitel 4.2.2 beschriebenen Synthesen, sowohl der Aminosäurerest (R^1) als auch der Sulfanilamidrest (R^2) variiert. Zur SAR des Aminosäurerests (R^1) wurde dieser durch Glycin (**49b**) und Norleucin (**49c**) getauscht. Hierdurch sollte herausgefunden werden, ob der Aminosäurerest einen Einfluss auf die Inhibierung hat und ob das Schwefelatom in der Seitenkette nötig ist. Der Sulfanilamidrest wurde hingegen durch eine Reihe aliphatischer und aromatischer Reste ersetzt. Das Ziel war herauszufinden, ob die Sulfanilamid-Gruppe selbst nötig ist, oder ob ein aromatischer Rest an dieser Stelle genügt. Weiterhin sollte gezeigt werden, welchen Einfluss der Abstand und das Substitutionsmuster der aromatischen Reste auf die inhibitorische Aktivität hat. Hierzu wurden die synthetisierten Verbindungen am IEIM im *in vitro* Assay untersucht. Dabei zeigte jedoch keine der synthetisierten Verbindungen inhibitorische Aktivität. Im initialen *Screening* inhibierte STK593195 (**49a**) USP48 mit einer Restaktivität von 47 %. Im Assay konnte dieses Ergebnis nicht bestätigt werden (Tabelle 22). Somit ist davon auszugehen, dass es sich bei dem Screeningergebnis von STK593195 um ein falsch positives Ergebnis handelte.

Da anhand der Ergebnisse der SAR der STK593195-Analoga nicht zu erwarten war, dass weitere Modifikation des *Scaffolds* zur Entwicklung eines USP48 Inhibitors führen würde, wurden daher keine weiteren Verbindungen dieses Typs synthetisiert.

Tabelle 22: Restaktivitäten (RA) von USP48 bei Inhibition durch die STK593195-Analoga bei 100 μ M Inhibitorkonzentration

Struktur	Nr.	R ¹	R ²	RA [%]	Nr.	R ¹	R ²	RA [%]
	49a			121	55e			123
	49b	H		109	55f			111
	49c			118	55g			114
	55a			111	55h			117
	55b			127	55i			110
	55c			115	55j			116
	55d			105				

Um einen neuen Startpunkt für die Entwicklung eines USP48-Inhibitors zu finden, wurde eine zweite Substanzbibliothek zusammengestellt und am IEIM auf ihre inhibitorische Aktivität untersucht. Zu diesem Zweck wurde diesmal ein literaturbasierter Ansatz gewählt und zwölf kommerziell verfügbare chemisch diverse USP-Inhibitoren am IEIM im *in vitro* Assay getestet. In diesem Assay hemmte der von *Davies et al.*^[71] entwickelte USP2 bzw. USP8 Inhibitor ML-364 (Abbildung 12) USP48 mit einer Restaktivität von 5 % bei 100 μ M Inhibitor Konzentration (Tabelle 28, s. Anhang). Somit wurden STK593195 und ML-364 als Startpunkt für ein ligandenbasiertes Inhibitor-Design gewählt.

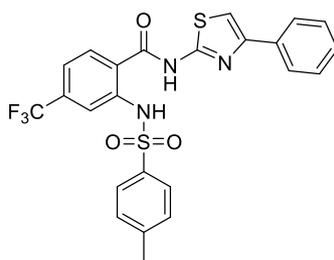


Abbildung 12: Struktur von ML-364.

Zur Untersuchung der SAR wurden hierzu die einzelnen Substituenten von ML-364 mittels der in Kapitel 4.2.3 beschriebenen Synthesen variiert. Anschließend wurden die synthetisierten Derivate am IEIM hinsichtlich ihrer inhibitorischen Aktivität unter den in BÖHM et al.^[81] beschriebenen Bedingungen untersucht. Hierbei zeigte die Substitution der Phenylthiazol-Gruppe, dass eine Bi(hetero)aryl-Gruppe an dieser Stelle zur Aufrechterhaltung der Aktivität nötig ist. Monozyklische aromatische oder aliphatische Substituenten an dieser Position führten zum Verlust der Aktivität, während die Aktivität der Biphenyl-Derivate **59f,g** und die des Naphtyl-Derivats **59h** in der Größenordnung der Aktivität von ML-364 lagen (Tabelle 23). Die Substitution der Sulfonyl-Gruppe zeigte, dass diese Position eine größere Toleranz gegenüber verschiedenen Substituenten aufweist (Tabelle 24). So führte nur das Weglassen der Sulfonyl-Gruppe im Falle des unsubstituierten Amins **60**, die Zyklisierung zum Dihydrochinazolinon **62** und eine doppelte Sulfonylierung, im Falle des Bis(methylsulfonyl)-Derivats **61b**, zu einem Verlust der Aktivität. Die IC_{50} -Werte der restlichen Verbindungen lagen zwischen 15 μ M für das Naphtyl-Derivat **61e** und 75 μ M für das Isopropyl-Derivat **61f**. Somit war mit dem Naphtyl-Derivat **61e** eine Verbindung aktiver als ML-364. Insgesamt zeigte sich der Trend, dass größere Substituenten an dieser Position zu einer höheren Aktivität führen.

Tabelle 23: Inhibitorische Aktivitäten der Phenylthiazol-Analoga gegenüber USP48

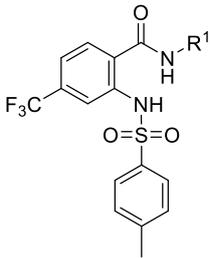
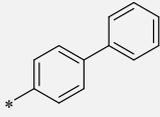
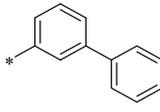
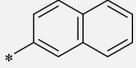
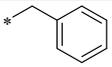
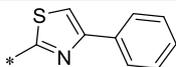
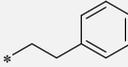
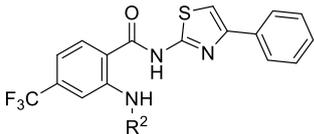
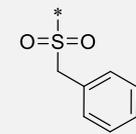
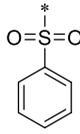
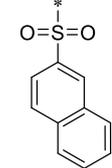
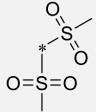
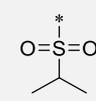
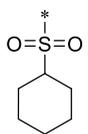
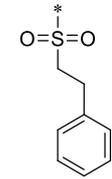
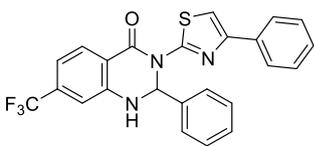
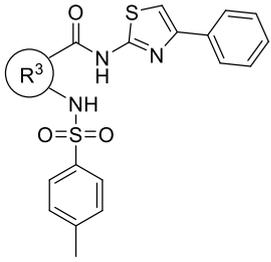
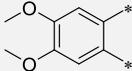
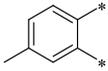
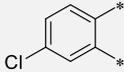
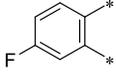
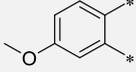
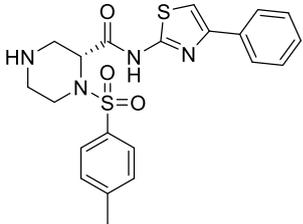
Struktur	R ¹	Nr.	IC ₅₀ [μM]	R ¹	Nr.	IC ₅₀ [μM]
		59a	>100		59f	31,5 (1,12)
		59b	>100		59g	33,5 (1,07)
		59c	>100		59h	37,1 (1,06)
		59d	>100		ML-364	34,6 (1,30)
		59e	>100			

Tabelle 24: Inhibitorische Aktivitäten der Sulfonamid-Analoga gegenüber USP48

Struktur	R ²	Nr.	IC ₅₀ [μM]	R ²	Nr.	IC ₅₀ [μM]
	H	60	>100		61d	37,8 (1,52)
		61a	31,9 (1,04)		61e	15,0 (1,56)
		61b	>100		61f	75,0 (1,21)
		61c	26,3 (1,21)		61g	22,8 (1,49)
			62	>100		

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss des Anthranilsäurerests auf die Aktivität untersucht. Hier zeigte sich zunächst, dass ein Aromat an dieser Stelle wichtig ist um die Aktivität zu erhalten, da die Derivate **65g** und **71a/b** keine Aktivität gegenüber USP48 aufwiesen (Tabelle 25). Ein elektronenziehender Substituent an der 4-Position des Sechsrings scheint die inhibitorische Aktivität zu erhöhen. Die Verbindungen **65c** und **65d**, sowie ML-364 besitzen allesamt einen elektronenziehenden Rest an dieser Stelle und weisen ähnliche Aktivitäten auf. Ein elektronenschiebender Rest, wie bei dem 4-Methyl-Analog **65b** und den Methoxy-Analoga **65e,f** verringert hingegen die Aktivität. Auch die Substitution eines aromatischen Kohlenstoffs durch Stickstoff führt im Falle der Derivate **65h** und **65i** zu einer Verringerung bzw. zum Verlust der Aktivität.

Tabelle 25: Inhibitorische Aktivitäten der Verbindungen mit substituierter Anthranilsäure-Einheit gegenüber USP48

Struktur	R ³	Nr.	IC ₅₀ [μM]	R ³	Nr.	IC ₅₀ [μM]
		65a	>100		65f	>100
		65b	92,2 (1,18)		65g	>100
		65c	21,3 (1,26)		65h	60,9 (1,07)
		65d	35,16 (1,09)		65i	>100
		65e	66,4 (1,10)			
		71a	>100			
		71b	>100			

Anhand der Ergebnisse aus den Untersuchungen der SAR, konnte also gezeigt werden, dass ein Bis(hetero)aromat an der Stelle der Phenylthiazol-Einheit essenziell ist. Weiterhin wird an der Stelle des Anthranilsäurerests ein elektronenarmer Sechsring mit einer Substitution an der 4-Position zur Aufrechterhaltung der inhibitorischen Aktivität benötigt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Sulfonyl-Gruppe, des Sulfonamidrests für die Aktivität notwendig ist und, dass größere Substituenten an dieser Stelle zu einer Erhöhung der Aktivität führen. Da die Variation des Anthranilsäurerests synthetisch aufwendiger ist als die Variation der anderen beiden Reste und keines der synthetisierten Derivate deutlich bessere inhibitorische Aktivität als ML-364 zeigte, wurde diese zunächst nicht weiter untersucht. Deshalb wurde im nächsten Schritt die Phenylthiazol-Gruppe erneut untersucht. Hierbei wurde das Thiazol beibehalten und die Phenyl-Gruppe ausgetauscht bzw. verschiedene Substituenten am Phenyl eingeführt. Aus dieser Serie zeigten alle Derivate, bis auf das Indol-Derivat **73a** und das 1H-Pyrazol-Derivat **73b**, inhibitorische Aktivität gegenüber USP48 (Tabelle 26). Die IC_{50} -Werte lagen zwischen 11,7 μM für das Methylester-Derivat **73f** und 68,0 μM für das Methylpiperazin-Derivat **73m**. Unter den synthetisierten Verbindungen wiesen die Verbindungen **73l**, **73n** und **73s** eine ähnliche Aktivität zu ML-364 auf. Interessanterweise zeigte das Piperazin-Derivat **73m** eine geringere Aktivität als das Morpholin-Derivat **73l**, obwohl diese Strukturell sehr ähnlich sind. Möglicherweise ist der Grund hierfür, die höhere Basizität des Piperazins. Bei der Betrachtung der Pyridyl-Derivate **73s** und **73t** fällt auf, dass das 3-Pyridyl-Derivat **73t** gegenüber dem 4-Pyridyl-Derivat **73s** leicht bevorzugt ist. Mit Blick auf die Chlorphenyl-Derivate **73p-r** konnte gezeigt werden, dass alle drei Derivate aktiver sind als ML-364, wobei das Derivat mit der Chlorierung an der 2-Position **73r** das aktivste Derivat ist. Die Derivate **73c-k** sind ebenfalls allesamt aktiver als ML-364. Bei diesen Derivaten lässt sich erkennen, dass solche mit einem H-Brücken-Donor an der 4-Position des Phenyls etwas aktiver sind als solche ohne. Dies lässt vermuten, dass an dieser Stelle eine Wasserstoffbrücken-Interaktion mit USP48 ausgebildet wird. Da jedoch keine Kristallstruktur von USP48 bekannt ist, bleibt dies Spekulation. Die beiden aktivsten Inhibitoren dieser Serie waren der Carbonsäuremethylester **73f** ($IC_{50} = 11,7 \mu\text{M}$) und die entsprechende Carbonsäure **73g** ($IC_{50} = 12,6 \mu\text{M}$). Vergleicht man die Aktivität dieser beiden Inhibitoren mit der Aktivität anderer bekannter USP-Inhibitoren (Tabelle 28, s. Anhang), ist die Aktivität der Inhibitoren etwa 10- bis 100-mal niedriger als die der aktivsten USP-Inhibitoren. Jedoch weisen auch einige der bekannten USP-Inhibitoren vergleichbare oder niedrigere Aktivitäten auf, wie z.B. die USP7-Inhibitoren USP-7-IN-1 mit einem IC_{50} -Wert von 77 μM gegenüber USP7 und HBX19818 mit einem IC_{50} -Wert von 28,1 μM gegenüber USP7.

Tabelle 26: Inhibitorische Aktivitäten der Verbindungen mit substituiertem Phenylrest der Phenylthiazol-Einheit gegenüber USP48

Struktur	R ⁴	Nr.	IC ₅₀ [μM]	R ⁴	Nr.	IC ₅₀ [μM]
		73a	>100		73k	21,2 (1,10)
		73b	>100		73l	38,9 (1,09)
		73c	14,2 (1,29)		73m	68,0 (1,04)
		73d	20,0 (1,38)		73n	30,9 (1,47)
		73e	13,6 (1,25)		73o	18,2 (1,36)
		73f	11,7 (1,22)		73p	17,3 (1,04)
		73g	12,6 (1,20)		73q	16,9 (1,05)
		73h	12,9 (1,04)		73r	13,0 (1,19)
		73i	18,2 (1,26)		73s	39,6 (1,06)
		73j	25,9 (1,10)		73t	27,2 (1,04)

Zur Überprüfung der Selektivität der neu entwickelten Inhibitoren wurde am IEIM die zweitaktivste und am besten lösliche Verbindung **73g** und ML-364 gegen eine kleine Auswahl von Cysteinproteasen, die mit USP48 verwandt sind, getestet (Tabelle 27). Es zeigte sich, dass der Inhibitor **73g** unselektiv gegenüber USP2, USP7, USP15 und *Papain like protease* (PLPro) ist, wobei der IC₅₀-Wert gegenüber USP7 im Vergleich zu den anderen DUBs etwa doppelt so hoch ausfällt. Interessanterweise zeigte auch ML-364 keine Selektivität gegenüber den anderen DUBs, obwohl es von DAVIES et al.^[71] als selektiver

USP2/8 Inhibitor veröffentlicht wurde. Auch fällt der IC_{50} -Wert mit $48,5 \mu\text{M}$ gegenüber USP2 deutlich schlechter aus als von DAVIES et al.^[71] beschrieben.

Der optimierte Inhibitor **73g** zeigte bei allen untersuchten DUBs außer USP7 eine höhere Aktivität als ML-364 (Tabelle 27). Jedoch ist es nicht gelungen eine Selektivität gegenüber USP48 zu erreichen, was auch auf die bisher unbekannte Promiskuität von ML-364 zurückzuführen ist.

Tabelle 27: Inhibitorische Aktivität von ML-364 und **73g** gegenüber USP48 und verwandten Cysteinproteasen

	IC_{50} [μM]				
	USP48	USP2	USP7	USP15	PLPro
ML-364	34,6 (1,30)	48,5 (1,33)	20,0 (1,07)	36,2 (1,02)	32,3 (1,05)
73g	12,6 (1,20)	13,9 (1,02)	27,5 (1,10)	18,6 (1,09)	18,4 (1,07)

5.3. *In silico* Experimente zur Untersuchung des möglichen Bindungsmodus der USP48-Inhibitoren

Um Hinweise auf den Bindungsmodus von ML-364 an USP48 zu finden und eine mögliche Bindestelle der Inhibitoren zu identifizieren, wurde mittels computerchemischer Methoden eine Struktur von USP48 generiert und die Bindestelle mittels *docking* ermittelt. Da keine Kristallstruktur von USP48 bekannt ist, wurde die USP Domäne von USP48 über das KI gestützte *open source* Programm *ColabFold*^[82] generiert. Weiterhin ist es, um plausible Dockingergebnisse zu generieren, nötig zu wissen, wo die Bindetasche des Inhibitors liegt. Da hierzu Kristallstrukturen von USP48 mit anderen Inhibitoren fehlen, musste ein anderer Weg gefunden werden, um die ungefähre Bindestelle zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurde ein weiteres *open source* Programm namens *DiffDock* verwendet. Dieses benutzt ein generatives Diffusionsmodell, um die Bindungsposition eines Liganden an der Proteinstruktur zu finden.^[83]

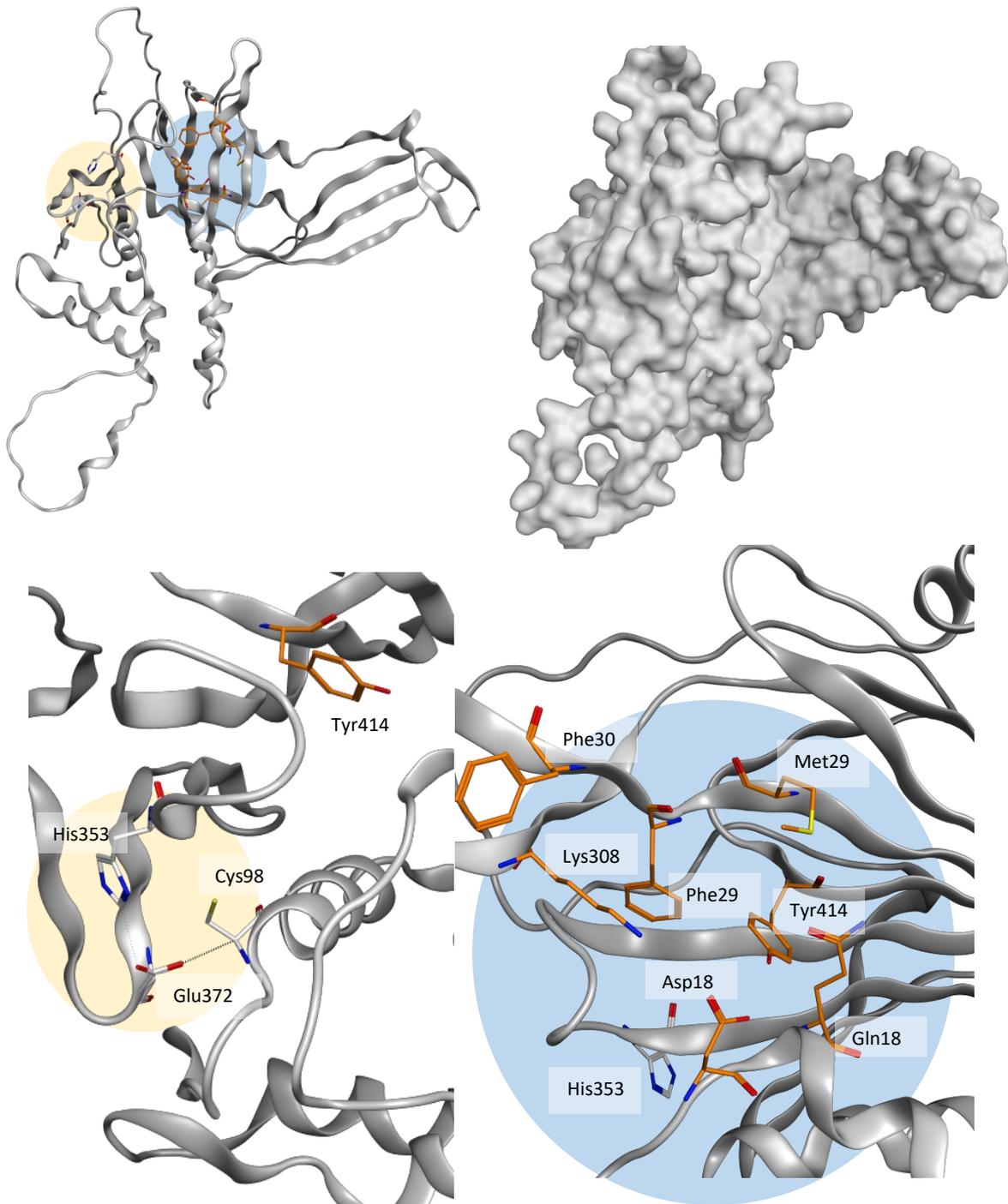


Abbildung 13: Oben: Struktur von USP48 generiert mit *ColabFold*. Unten: Aktives Zentrum (gelb unterlegt) und Bindetasche (blau unterlegt) von USP48

Auf Basis der Dockinglösungen lässt sich vermuten, dass alle synthetisierten Inhibitoren in der gleichen Bindetasche binden. Diese befindet sich ungefähr 12 Å vom Cystein des aktiven Zentrums entfernt und wird durch die Reste Tyr414, Phe299, Phe301 Met 297, Lys308, Gln183 und Asp181 gebildet (Abbildung 13). Da die Inhibitoren in den von *DiffDock* generierten Posen jedoch mit der Proteinstruktur kollidierten (Abbildung 14), wurden die besten Inhibitoren aus jeder Serie (**59f**, **61e**, **65c**, **73g** und ML-364) nochmals in *GOLD*^[84] gedockt. Zu diesem Zweck wurden die Ergebnisse aus *DiffDock* betrachtet und die Bindestelle 10 Å um den Tyrosinrest 414 herum definiert. Der Tyrosinrest 414 wurde ausgewählt, weil die meisten Dockinglösungen in der Nähe dieses Rests platziert wurden. Zudem bildet Tyr414 im *in silico* Modell den tiefsten Punkt der Bindetasche. Die so erhaltenen Dockingergebnisse sind in Abbildung 15 – 17 gezeigt. Auffällig ist hier, dass alle Inhibitoren, bis auf das *p*-Carbonsäure-Derivat **73g**, mit dem Biarylrest in die Tasche hineinzeigen, während der Sulfonamidrest außerhalb der Tasche liegt. Im Falle des *p*-Carbonsäure-Derivats **73g** ist es genau umgekehrt. Hier zeigt die Sulfonamid-Gruppe in die Tasche hinein und die Phenylthiazol-Gruppe in Richtung Lösungsmittel. In der gezeigten Dockinglösung (Position 1/20) bildet ML-364 eine Wasserstoffbrückenbindung zu Phe299 und Phe301 aus. Bei der Wasserstoffbrückenbindung zu Phe299 handelt es sich um eine CH- π -Bindung. Diese ist schwächer als normale Wasserstoffbrückenbindungen, da die C-H-Bindung nicht stark polarisiert ist. Dennoch können diese Bindungen einen entscheidenden Beitrag zur Bindungsstärke leisten. Dies ist z.B. bei der Bindung von Biotin zu Streptavidin der Fall, bei der sechs CH- π -Wasserstoffbrückenbindungen und zwei CH-O-Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind.^[85] Die Inhibitoren **59f** und **65c** bilden im Docking ebenfalls jeweils eine Wasserstoffbrückenbindung zu Phe301 aus, jedoch handelt es sich in diesem Fall um eine schwächere CH-O-Wasserstoffbrückenbindung. Zudem fehlt bei beiden Inhibitoren die zweite Wasserstoffbrückenbindung. Die Inhibitoren **61e** und **73g** bilden hingegen gar keine Wasserstoffbrückenbindungen aus. Dies ist insofern bemerkenswert, als es sich bei diesen beiden Inhibitoren um die zwei aktivsten Inhibitoren unter den fünf verglichenen handelt. Somit wäre eigentlich zu erwarten, dass diese eher mehr Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden würden, als die weniger aktiven Inhibitoren.

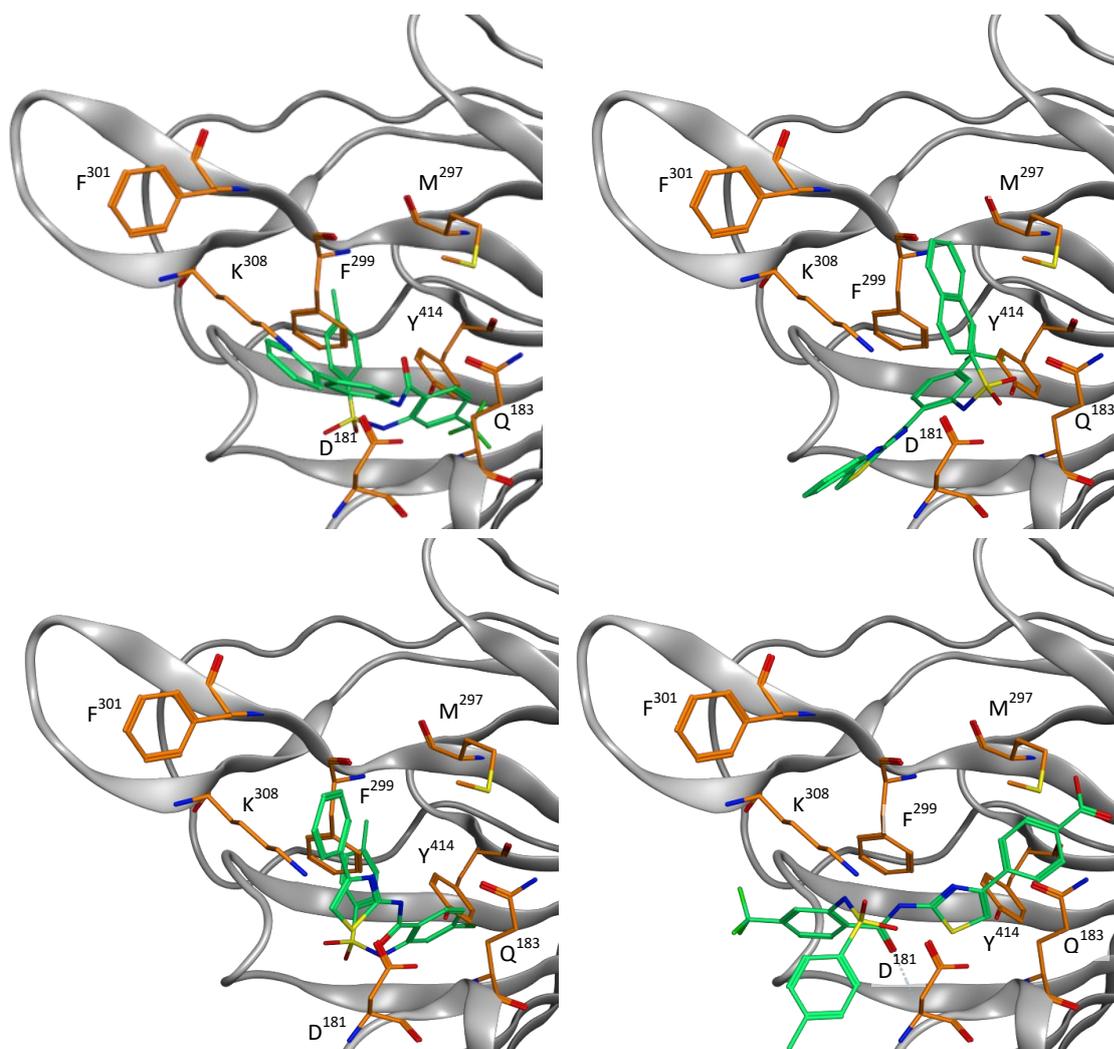


Abbildung 14: Dockinglösungen aus DiffDock für die Inhibitoren **59f** (links oben), **61e** (rechts oben), **65c** (links unten), **73g** (rechts unten). Gezeigt ist jeweils die Position 1/40

Betrachtet man die Dockinglösung des Inhibitors **73g** (Abbildung 17), lässt sich die gedrehte Bindeposition dadurch erklären, dass die Carbonsäure geladen ist und diese somit nicht in Richtung der hydrophoben Bindetasche positioniert werden kann. Somit zeigt diese in Richtung des Lösemittels, also aus der Bindetasche hinaus. Der unpolare 4-Methylphenylrest der Sulfonamid-Gruppe wird hingegen in die Bindetasche positioniert, wo dieser vermutlich durch den hydrophoben Effekt stabilisiert wird.

Vergleicht man die quantenmechanisch berechneten (*TmoleX* 4.4.0^[86,87], BP86/def-SV(P), DFT-D3 (BJ)^[88]) elektrostatischen Potentiale von ML-364 und dem Inhibitor (Abbildung 18), kann man sehen, dass bei ML-364 nur die Sulfon-Gruppe polar ist, während der Rest des Moleküls eher unpolar ist. Beim Inhibitor **73g** ist zusätzlich die Carbonsäure geladen, weshalb vermutlich die Dockingposition, in der der Phenylthiazolrest nach außen ragt, bevorzugt wird. Ein Rückschluss auf die höhere Aktivität des Inhibitors **73g** im Vergleich zu ML-364 lässt sich hieraus jedoch nicht ziehen.

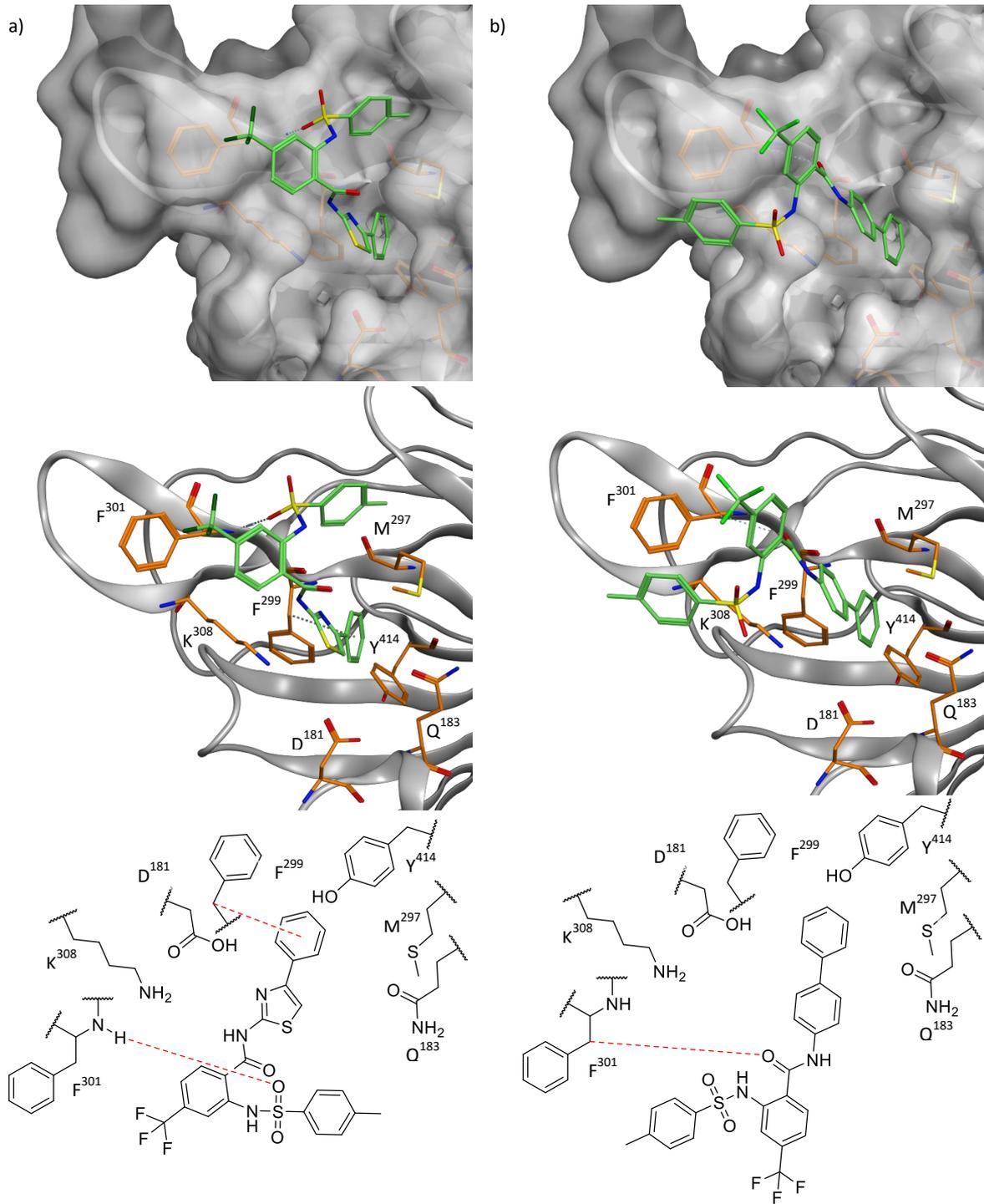


Abbildung 15: Die jeweils besten Dockingergebnisse (Position 1/20) der Inhibitoren: (a) ML-364, (b) **59f**. Oben: Dockingposition in Bindetasche mit Darstellung der Proteinoberfläche. Mitte: Dockingposition in Bindetasche ohne Darstellung der Proteinoberfläche. Unten: Schematische 2D-Darstellung der Bindetasche

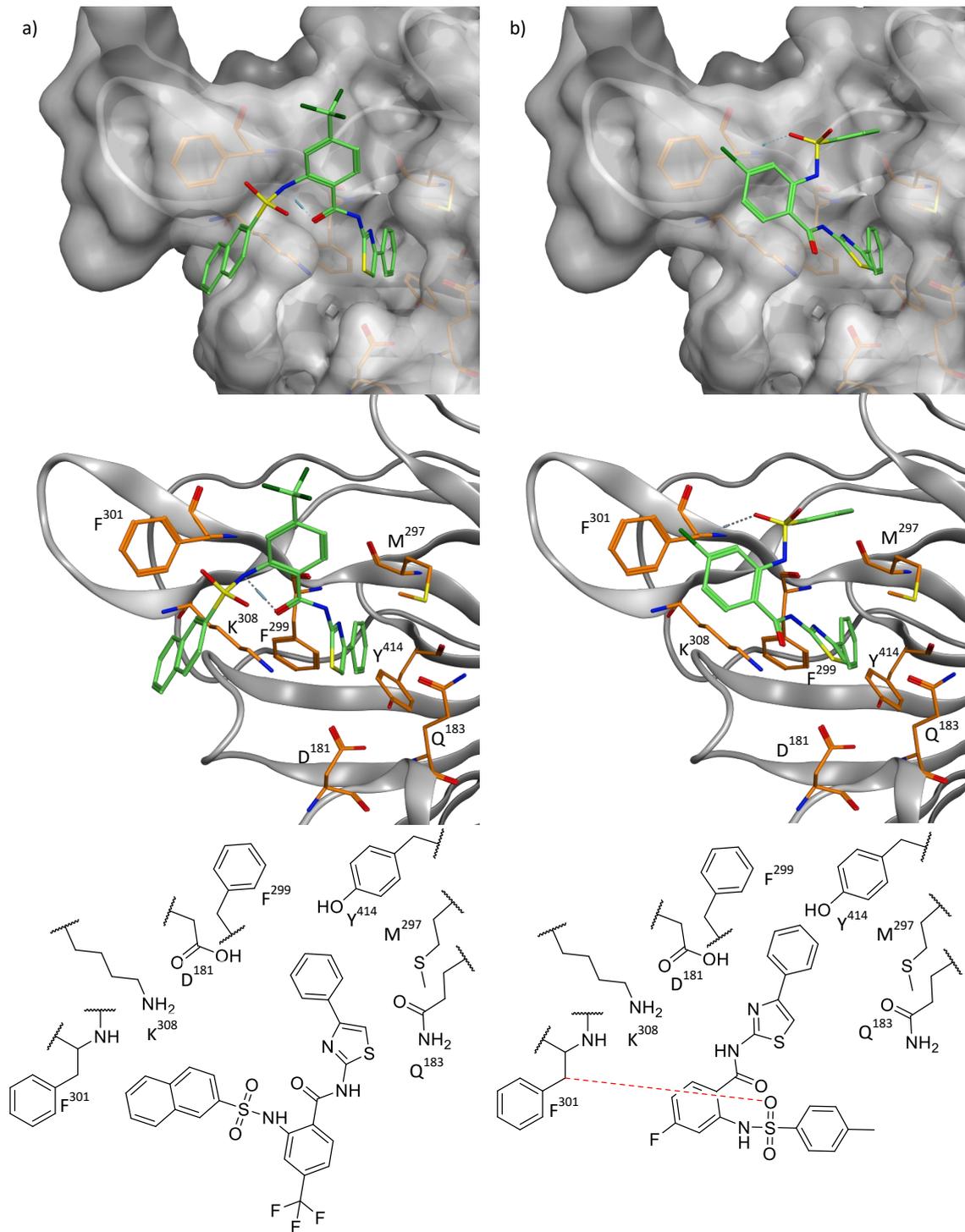


Abbildung 16: Die jeweils besten Dockingergebnisse (Position 1/20) der Inhibitoren. (a) **61e**, (b) **65c**. Oben: Dockingposition in Bindetasche mit Darstellung der Proteinoberfläche. Mitte: Dockingposition in Bindetasche ohne Darstellung der Proteinoberfläche. Unten: Schematische 2D-Darstellung der Bindetasche

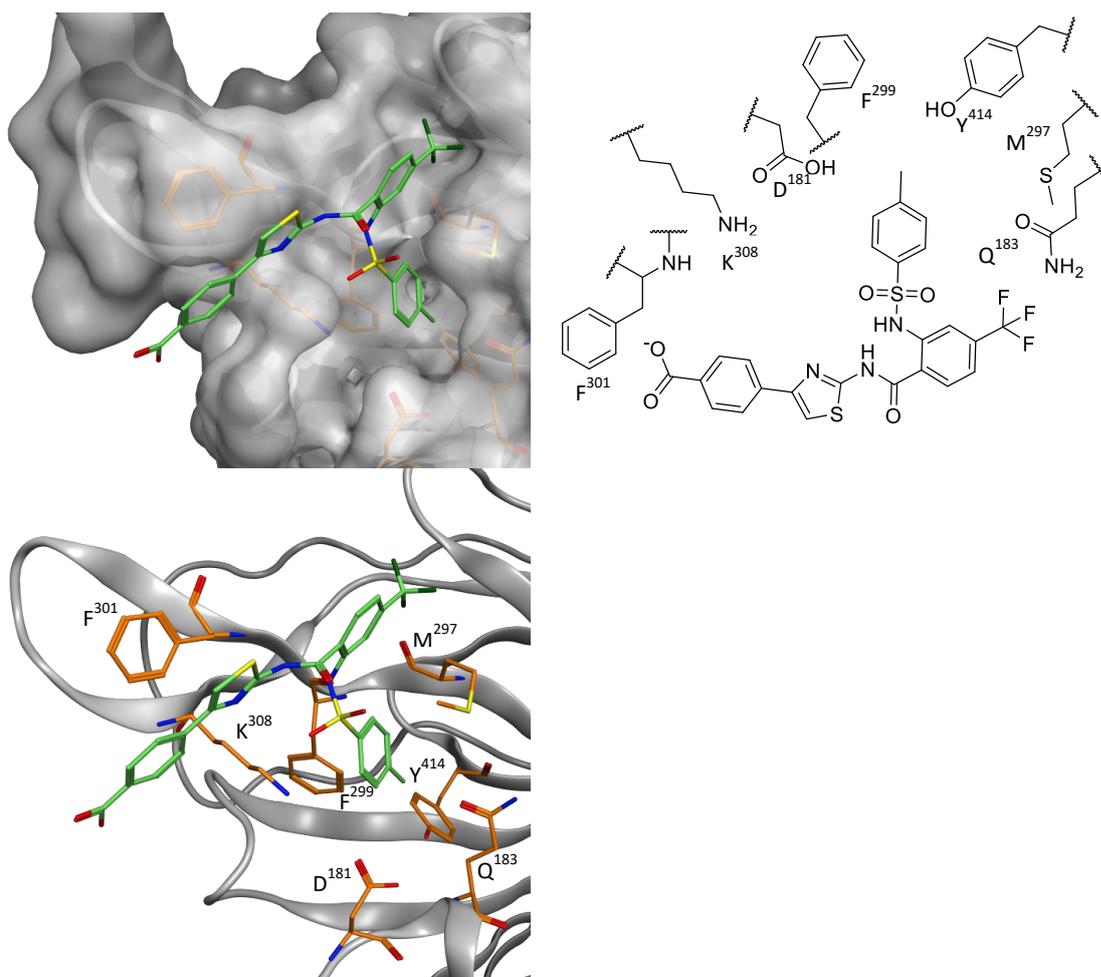


Abbildung 17: Dockingergebnis (Position 1/20) des Inhibitors **73g**. Oben links: Dockingposition in Bindetasche mit Darstellung der Proteinoberfläche. Unten: Dockingposition in Bindetasche ohne Darstellung der Proteinoberfläche. Oben rechts: Schematische 2D-Darstellung der Bindetasche

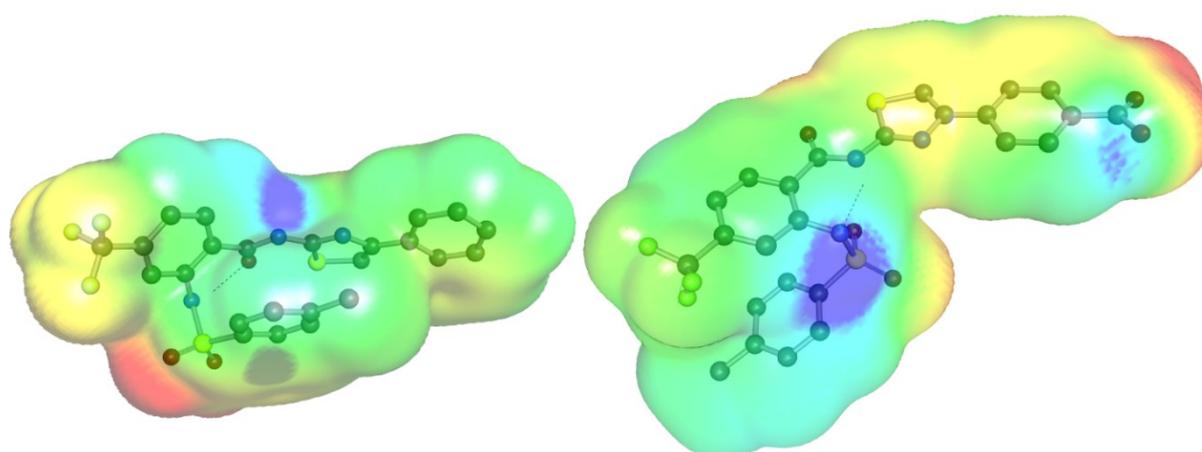


Abbildung 18: Elektrostatikpotentiale von ML-364 (links) und dem Inhibitor **73g** (rechts) dargestellt über die Einfärbung der Isooberfläche der Elektronendichte (Isowert=0,001); rot: negatives elektrostatisches Potential (Elektronenüberschuss); blau: positives elektrostatisches Potential (Elektronendefizit)

Um herauszufinden, ob die im *Docking* gefundene Bindetasche auch in anderen USPs existiert, wurde eine Kristallstruktur von USP7 (PDB 5N9R)^[89,90] mit der *in silico* generierten Struktur von USP48 superpositioniert (Abbildung 19). Bei der Kristallstruktur von USP7 handelt es sich um einen Komplex mit dem selektiven allosterischen Inhibitor **76** ($IC_{50} = 0,3 \mu\text{M}$; Abbildung 19, rechts oben).^[90] Bei der Superposition beider fällt auf, dass die Bindetasche auch bei USP7 existiert und sich nur um zwei Aminosäuren unterscheidet. So liegt bei USP7 an der Stelle von Lys308 der Rest Asn418 und anstelle von Phe301 der Rest Tyr411. Weiterhin ist auffällig, dass bei USP7 der Rest Phe409 aus der Bindetasche herausragt, während bei *in silico* generierten Struktur von USP48 der entsprechende Rest Phe299 in die Bindetasche hineinzeigt. Gleichzeitig ist auch der Tyrosinrest 514 so gedreht, dass dieser weniger stark in die Bindetasche hineinzeigt, als Tyr414 bei USP48. Somit öffnet sich die Bindetasche stärker in Richtung des aktiven Zentrums von USP7. Auffällig ist auch, dass der an USP7 gebundene Inhibitor in genau dieser Bindetasche liegt. Die Bindetasche ist also nicht nur ebenfalls bei USP7 vorhanden, sondern kann auch dort zur Inhibierung der Enzymfunktion genutzt werden. Die Vermutung liegt also nahe, dass dies auch bei anderen USPs der Fall ist, was die nicht vorhandene Selektivität der ML-364 Derivate erklären würde. Eine multiple Sequenzalignierung, bei der die Sequenzen von neun USPs und von PLPro verglichen wurde, bestätigte diese Vermutung. So ist sowohl der Phenylalaninrest (Phe299) in neun von zehn Sequenzen, als auch der Tyrosinrest (Tyr414) in allen Sequenzen konserviert (Abbildung 20).

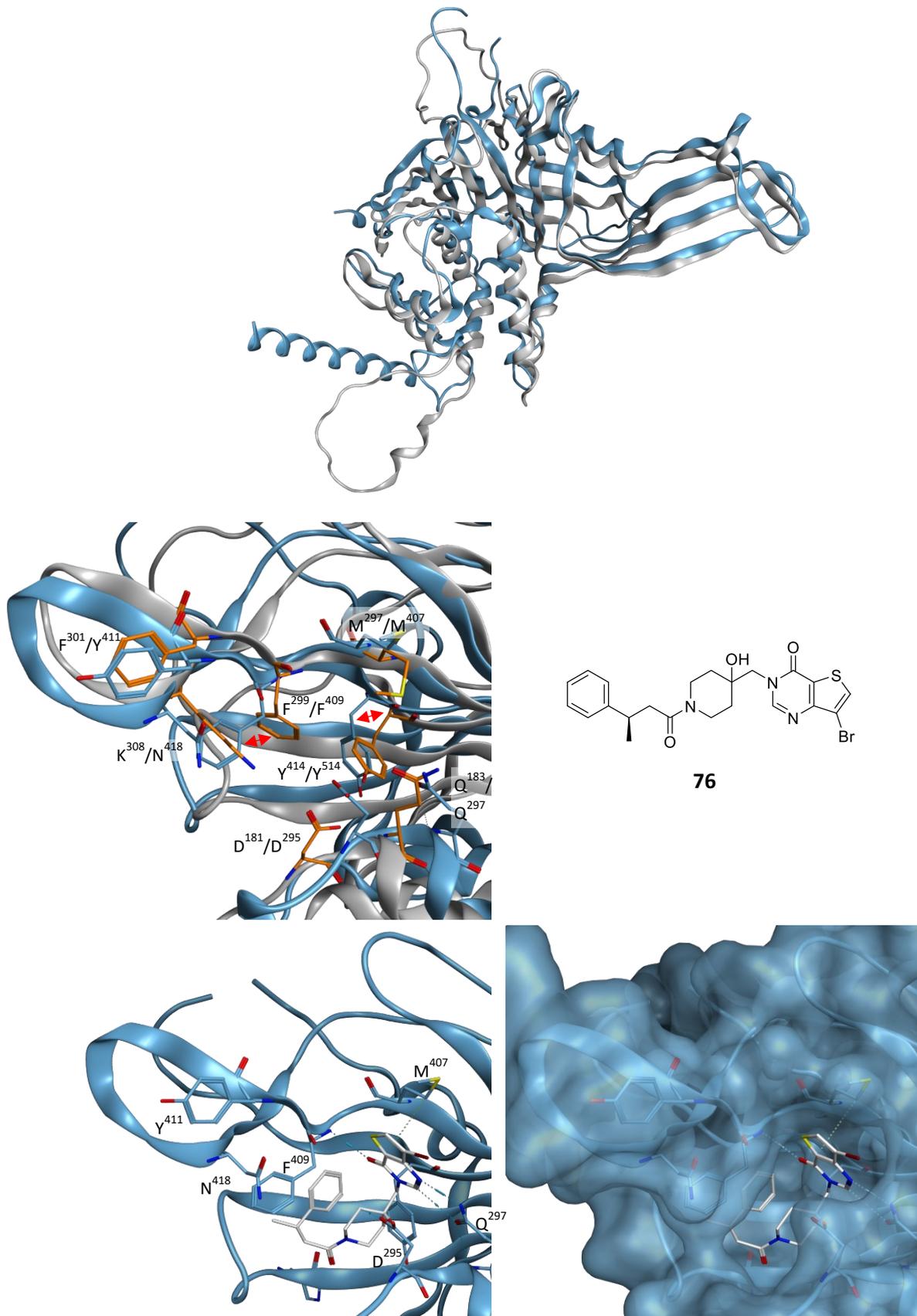


Abbildung 19: Oben: Superposition von USP7 (blau, PDB 59NR)^[89,90] und USP48 (grau). Unten links: Bindetasche von USP7 (blau, PDB 59NR)^[89,90] und USP48 (grau) im Vergleich. Mitte rechts: Struktur des kokristallisierten USP7 Inhibitors **76**. Unten: Bindetasche von USP7 (PDB 59NR)^[89,90] mit dem Inhibitor **76** (weiß)

Weiterhin wird von GAVORY et al. beschrieben, dass der Phenylrest Phe409 in der inhibitorgebundenen Kristallstruktur von USP7 anders orientiert ist, als in der apo oder ubiquitingebundenen Form. Dies führt dazu, dass der *loop* links davon eine andere Konformation einnimmt und sich somit eine Bindetasche öffnet, die der Inhibitor letztendlich besetzt. Hierdurch wird die Ubiquitinbindung verhindert, was schließlich zur beobachteten Inhibierung führt.^[90] Da dieser Rest in allen untersuchten USPs konserviert ist (Abbildung 20), und in USP48 auch der benachbarte *loop* existiert (Abbildung 19), ist ein gleichartiger Mechanismus für USP48 denkbar. In diesem Fall würden die Inhibitoren näher in Richtung des aktiven Zentrums binden. Ob die in dieser Arbeit synthetisierten Inhibitoren dazu in der Lage sind, lässt sich jedoch ohne eine inhibitorgebundene Kristallstruktur von USP48 nur schwer voraussagen.

sp P45974 USP5	L ERAVDWIFS-----HIDDLDAEAAMDIS--EGRS-----AADSISESVPVGPK---	793
sp Q9Y2K6 USP20	VKYCKVLR LPEILCIHLKRF RHEVMYSFK--INSH-----VSFPLEGLDLRPF LAKE---	619
sp P40818 USP8	LKKIEIWKLPVLLVHLKRF SYDGRWKQK--LQTS-----VDFPLENLDLSQYVIGP---	1044
sp 075604 USP2	IKKFSIQRFPKILVLHLKRF SESRIRTSK--LTF-----VNFPLRDLDLREFASE----	534
sp Q9Y4E8 USP15	TKKLDLWSLPPVLVHLKRF SYSRMRDK--LDTL-----VDFPINDLDMSEFLINP---	868
sp P0C6U4 PLPro	YTSVVVINVIWVCINFLMLFVFQVYPICACVYACFYFVVTLYFPS-EISVIMHLQWI---	3173
sp Q86UV5 USP48	TRKIRLLSLPCTLNLQLMRFVFD RQTGHKKLNTY----IGFSE-ILDMEPYVEHK---	330
sp Q93009 USP7	EKGVKFLTLPVHLHLQLMRFMYDPQTDQNIKINDR----FEFPE-QLPLDEF LQKT---	440
sp Q93008 USP9X	VKRLLIKKLPPVLAIQKRF DYDWERECAIKFNDY----FEFPR-ELDMEPYTVAGVAK	1834
sp Q9UPU5 USP24	VKRTC IKSLSVLVIHLMRF GFDWESGRS I KYDEQ-----IRFPW-MLNMEPYTVSGMAR	1922

sp P45974 USP5	LG YIYF YQRVAS-----	858
sp Q9Y2K6 USP20	EGYVLFYRKSSEEAMRERQQVVSLA-AMREPSL-----	707
sp P40818 USP8	AAYILFYTSLGPRVTDVAT-----	1118
sp 075604 USP2	DAYLLFYELASPPSRM-----	605
sp Q9Y4E8 USP15	AAYVLFYQRQDTFSGTGFFPLDRET KGASAATG-----	956
sp P0C6U4 PLPro	NRYSLSYNKYRYYSKMDTAAYREAACSQLAKAMETFNHNNGNDVLYQPPTASVSTSF LQ	3304
sp Q86UV5 USP48	NAYMLVYRLQTQEK-----PN-TTVQ-----VPAFLQ	437
sp Q93009 USP7	NAYMLVYIRESKLS-----EV---LQAVTDHDIPQQLV	541
sp Q93008 USP9X	NAYILFYERMDTID-----QDELIRYISE-----	1971
sp Q9UPU5 USP24	NAYMLFYQRVSDQN-----SP--VLPKKSRSVSVVRQEA	2063

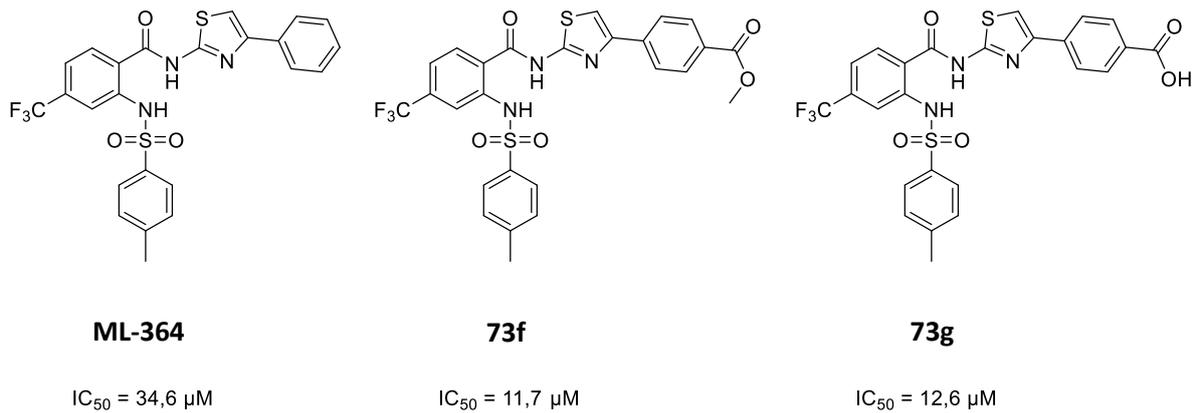
Abbildung 20: Vergleich der Sequenzen von verschiedenen USPs und PLPro. Die Sequenzen wurden der UniProt Datenbank^[91] entnommen und mit *Clustal Omega*^[92] aligniert. Rot markiert sind die Reste, die F²⁹⁹ bzw. Y⁴¹⁴ in USP48 entsprechen

6. Zusammenfassung und Ausblick

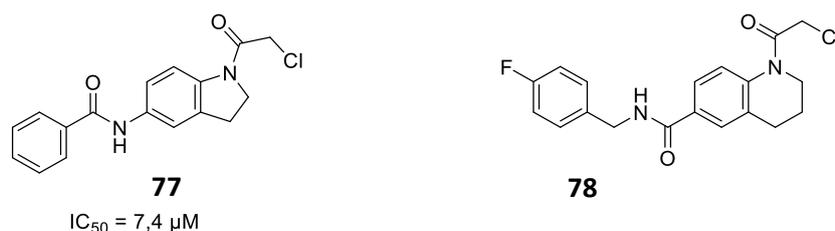
DUBs sind trotz ihrer Beteiligung an zahlreichen biologischen Prozessen und pathogenen Signalpfaden eine bislang stark untererforschte Enzymklasse.^[93] Sowohl STAMBPL1 als auch USP48 sind aufgrund ihrer Beteiligung an onkogenen Mechanismen interessante Zielverbindungen für die Entwicklung von Inhibitoren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb zahlreiche neue Verbindungen synthetisiert und die Synthesen von chemisch diversen Verbindungsklassen etabliert. Anschließend wurden die Verbindungen auf ihre Aktivität gegenüber STAMBPL1 bzw. USP48 untersucht. Im Falle von STAMBPL1 basierte die Auswahl der Verbindungen auf einem vorangegangenen *in silico* und *in vitro* Screening. Wie sich jedoch herausstellte, war keine der neu synthetisierten Verbindungen aktiv und viele der Verbindungen unter den Assaybedingungen unlöslich. In einer daraufhin durchgeführten Wiederholung des STAMBPL1 Screenings konnten die Screeningergebnisse nicht reproduziert werden. Somit konnten auch die *in silico* generierten Screeningergebnisse nicht bestätigt werden. Eine Möglichkeit einen neuen Startpunkt für die Entwicklung eines STAMBPL1 Inhibitors zu finden, ist die Durchführung eines HTS. Weiterhin wäre auch die Durchführung eines neuen *in silico* Screenings unter Verwendung einer anderen Datenbank und Beachtung der Löslichkeiten möglich. Beides wäre jedoch über den Rahmen dieser Arbeit hinausgegangen, weshalb der Fokus auf die Entwicklung eines Inhibitors für USP48 gelegt wurde.

Im Falle von USP48 konnten ebenfalls die vorangegangenen *in silico* und *in vitro* Assayergebnisse nicht bestätigt werden. Jedoch konnte durch ein weiteres *in vitro* Screening von bekannten USP-Inhibitoren der USP2/8-Inhibitor ML-364 als Startpunkt für die Inhibitorentwicklung identifiziert werden. Aufgrund der nicht bekannten Kristallstruktur von USP48 wurde für die Inhibitorentwicklung ein ligandenbasierter Ansatz gewählt und jeweils eine Gruppe der Struktur variiert, während die anderen beiden Gruppen konstant gehalten wurden. So konnte gezeigt werden, dass an der Stelle der Phenylthiazol-Gruppe eine Bi(hetero)aryl-Gruppe für die Aufrechterhaltung der inhibitorischen Aktivität essenziell ist. Für die Sulfonyl-Gruppe zeigte sich, dass an dieser Stelle größere Reste wie bspw. Naphtyl zu einer leichten Erhöhung der Aktivität führen. Für die SAR der Anthranilsäure-Gruppe ergab sich, dass ein elektronenarmer Sechsring mit einer Substitution an der 4-Position nötig ist. Durch die Substitution des Phenylrings der Phenylthiazol-Gruppe konnte schließlich eine Serie von Inhibitoren mit einer verbesserten Aktivität gegenüber ML-364 synthetisiert werden. Als aktivste Inhibitoren ergaben sich der Carbonsäuremethylester **73f** und die entsprechende Carbonsäure **73g** mit einem IC₅₀ von 11,7 µM, respektive 12,6 µM (Abbildung 21).

Abbildung 21: ML-364 und die beiden aktivsten Inhibitoren **73f** und **73g**

Die Untersuchung von ML-364 und dem Derivat **73g** bezüglich der Selektivität gegenüber einer kleinen Gruppe von Cysteinproteasen zeigte jedoch, dass weder ML-364 noch das Derivat **73g** selektiv sind. Da bereits die Ausgangsverbindung, anders als angenommen, unselektiv gegenüber anderen USPs zu sein scheint, dürfte es sich schwierig gestalten, selektive Inhibitoren, die auf ML-364 basieren, zu entwickeln. Die durchgeführten *in silico Docking*-Untersuchungen unterstützen diese These, da die synthetisierten Verbindungen an eine in USPs konservierte Bindetasche nahe dem aktiven Zentrum zu binden scheinen. Zwar ließe sich die Aktivität und die Löslichkeit der Inhibitoren durch Modifikationen bspw. an der Sulfonyl-Gruppe möglicherweise noch deutlich verbessern, jedoch ist ein Wechsel des *Scaffolds* vermutlich die bessere Option für die zukünftige Inhibitorentwicklung. So dürfte vor allem eine vor kurzem veröffentlichte Arbeit von CHAN et al.^[94] von Interesse sein. In dieser wurden in einem *Screening* eine Substanzbibliothek mit rational entworfenen Inhibitoren gegen verschiedene DUBs getestet und 45 *Hits* gefunden, von denen 23 Selektivität für ihr jeweiliges *Target* gegenüber 41 DUBs aufwiesen. Unter anderem fanden sich zwei strukturell ähnliche *Hits* (**77/78** Abbildung 22) für USP48, wobei für den selektiveren *Hit* **77** ein IC₅₀-Wert von 7,4 μM bestimmt wurde.^[94] Die so gefundenen Inhibitoren sind also ähnlich potent wie die aktivsten Inhibitoren aus dieser Arbeit, scheinen jedoch ein deutlich verbessertes Selektivitätsprofil aufzuweisen. Für eine weitere Inhibitorentwicklung für USP48 bietet es sich also an, diese beiden Strukturen als Ausgangspunkt zu wählen.

Abbildung 22: *Screening Hits* für USP48 gefunden von CHAN et al.^[94]

7. Experimentalteil

7.1. Allgemeine experimentelle Angaben

7.1.1. Chemikalien und Lösungsmittel

Im Zuge dieser Arbeit kamen kommerziell erhältliche Chemikalien der Firmen *Acros Organics*, *Alfa Aesar*, *abcr*, *Merck*, *Sigma-Aldrich*, *Carl Roth*, *TCI*, *Th. Geyer* und *Activate Scientific* zum Einsatz. Die Lösungsmittel wurden in der Regel wie erworben verwendet. Bei Bedarf wurden die Lösungsmittel nach literaturbekannten Verfahren getrocknet und vor Gebrauch destilliert. Reinstwasser vom Typ 1 für die Chromatographie wurde mittels *Milli-Q Gradient System* aus demineralisiertem Wasser der Firma *Merck Millipore* erzeugt.

7.1.2. Chromatographie

Dünnschichtchromatographie

Der Reaktionsverlauf und die Reinheit der Verbindungen wurde unter anderem mit Dünnschichtchromatographie überprüft. Hierzu wurden Kieselgelplatten aus Kieselgel 60 F254 auf Aluminiumträgerfolie mit einer Schichtdicke von 0,2 mm der Firma *Macherey-Nagel* und *Merck* verwendet. Als mobile Phasen wurden Gemische aus Dichlormethan/Methanol und Heptan/Ethylacetat verwendet. Die Detektion erfolgte über Fluoreszenzlöschung bei einer Wellenlänge von 254 nm. Zudem wurden zusätzlich Tauch- und Sprühreagenzien zur Charakterisierung der Substanzflecke verwendet (Phosphormolybdänsäure-Lösung; Kaliumpermanganat-Lösung und Ninhydrin-Lösung).

Säulenchromatographie

Rohprodukte wurden entweder mittels manueller oder automatisierter Silica-Flash-Chromatographie aufgereinigt. Im Falle der manuellen Chromatographie wurde Kieselgel der Firma *Macherey-Nagel* verwendet. Die Länge der Säulen und die Menge an Kieselgel wurde an das jeweilige Trennproblem angepasst. Auch der Lösungsmittelgradient wurde je nach Trennproblem variiert. Die Polarität der mobilen Phase wurde dabei sukzessive erhöht. Als Lösungsmittelsysteme kamen dabei entweder Dichlormethan/Methanol, Chloroform/Methanol, Heptan/Essigester oder Hexan/Essigester zum Einsatz.

Im Falle der automatisierten Silica-Flash-Chromatographie kam das Trennsystem *puriFlash*[®] 5.250 der Firma *Interchim* zum Einsatz. Je nach Probenmenge und Trennproblem standen Trennsäulen mit 4 g, 15 g, 25 g und 40 g Kieselgel zur Auswahl. Als mobile Phase wurden Lösungsmittelgradienten aus Dichlormethan/Methanol und Heptan/Ethylacetat verwendet. Dabei wurde die Polarität der mobilen Phase durch eine kontinuierliche Zunahme des Anteils des polaren Lösungsmittels (Methanol: 0 – 10 %, Ethylacetat: 0 – 100 %) erhöht.

Semi-präparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und C₁₈ Flash-Chromatographie

Die Endprodukte wurden mittels semi-präparativen HPLC-Systemen der Firmen *Varian* und *Interchim* oder mittels C₁₈-Flash-Chromatographie aufgereinigt. Die Ausstattung war dabei folgende:

HPLC:

Varian: Fraktionssammler *Varian Pro Star*, Detektor *Varian Pro Star*, Pumpe *Varian Prep Star*, ausgestattet mit einer C₁₈-Säule der Firma *Phenomenex* (Luna 10 µM; 250 x 21,2 mm).

Interchim: *Interchim puriFlash* 5.520 ausgestattet mit einer C₁₈-Säule der Firma *Interchim* (US10C18HQ-250/212 10 µM; 250 mm×21.2 mm).

C₁₈-Flash:

Interchim puriFlash 5.520 ausgestattet mit einer *Interchim* PF-15C18AQ-F0040 Säule.

Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 214 nm.

Zur Elution wurden Gradienten von Acetonitril/Wasser mit 0,04 % TFA genutzt.

Analytische HPLC

Die Reinheit der synthetisierten Verbindungen wurde mittels HPLC überprüft. Für Endprodukte musste die Reinheit ≥ 95 % betragen. Als analytisches HPLC-System kam ein *Merck-Hitachi LaChrom*-System mit einer *Phenomenex* Luna 5 µM C18(2) (125 mm x 4 mm) Säule zum Einsatz. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 214$ nm und die Reinheit ergab sich aus der Fläche der detektierten *Peaks*. Zur Elution diente ein Gradient aus Acetonitril/Wasser mit 0,04 % TFA bei einer Flussrate von 1 ml/min. Dabei kamen folgende Gradienten zum Einsatz:

Gradient A: 0 – 5 min: 5 % MeCN, 5 – 15 min: 5 → 60 % MeCN, 15 – 20 min: 60 → 95 %
MeCN, 20 – 30 min: 95 % MeCN

Gradient B: 0 – 25 min: 5 → 95 % MeCN, 25 – 29 min: 95 % MeCN

Massenspektrometrie

ESI (Electrospray-Ionisation) - und APCI (chemische Ionisation bei Atmosphärendruck)-Massenspektren wurden mit einem Expression LCMS Massenspektrometer der Firma *Advion* aufgenommen. Die hochauflösenden Massenspektren wurden mit einem *LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific)* Massenspektrometer aufgenommen. Die Arbeiten zur hochauflösenden Massenspektrometrie wurden von Mitarbeitern des IEIM unter Leitung von Prof. Dr. Michael Naumann durchgeführt.

¹H-NMR (Kernspinresonanz)-Spektroskopie

Die ¹H-NMR-Spektren wurden von Dr. Andrea Porzel in der Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie des Leibniz-Instituts in Halle mit dem NMR-Spektrometer DD2 400 der Firma *Agilent Technologies* und von der Arbeitsgruppe Bordusa (Universität Halle) mit einem *Bruker Avance III-System* aufgenommen. Die Messfrequenz beträgt ca. 400 MHz bzw. 700 MHz. Als Lösungsmittel wurden DMSO-d₆, MeCN-d₃ und CD₃OD verwendet, die zeitgleich auch als interner Standard dienten. Die Signallage wird als chemische Verschiebung δ in ppm angegeben, die Kopplungskonstanten ⁿJ über n Bindungen in Hz. Folgende Abkürzungen sind für die Multiplizitäten geltend: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), m (Multiplet), br s (breites Signal), dd (Dublett vom Dublett). Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software MestReNova (Version v14.1.0).

Mikrowellenchemie

Die Reaktionen mit Mikrowellen wurden mit der Mikrowelle *Initiator+* der Firma *Biotage* durchgeführt.

Flow-Chemie

Die Reaktionen im *Continuous-Flow-Reaktor* wurden an einem R-System der Firma *Vapourtech* mit zwei R2-C^{Plus} HPLC-Pumpen, zwei R2-S^{Plus} peristaltischen Pumpen und einem R-4 Heiz-/Kühlmodul, sowie einem GX-271 *liquid handler* der Firma *Gilson* durchgeführt. Zum Einsatz kamen hierbei Reaktoren mit 5 und 10 ml Reaktionsvolumen.

7.2. Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

7.2.1. AAV1 – Aldol Reaktion Isatin

Zu einer je 0,5 M Lösung von 1 Äq. Isatin (**2**) und 1 Äq. des Ketons (**3a-d**) in Ethanol wird 1 Äq. DIPEA zugegeben. Die Reaktionsmischung wird bis zum vollständigen Umsatz bei Raumtemperatur oder bei 120 °C in der Mikrowelle gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Essigester oder DCM aufgenommen, zweimal mit 1 N HCl und einmal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Die Aufreinigung erfolgt über Silica-Säulenchromatographie und präparative HPLC.

7.2.2. AAV2 – GRIGNARD-Reaktion

In einem, im Trockenofen ausgeheiztem, Rundkolben wird 1 Äq. 5-Chlorisatin (**2b**) gegeben und dreimal entgast. Anschließend werden unter Argon zunächst 4,5 ml/mmol absolutes THF und dann 2,2 Äq. des Alkylmagnesiumbromids (1 M in THF) (**7a-c**) bei 0 °C über 10 min zugegeben.

Die Reaktionsmischung wird bis zum vollständigen Umsatz bei Raumtemperatur gerührt und anschließend durch Zugabe von gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung abgebrochen. Die wässrige Phase wird dreimal mit 5 ml Essigester extrahiert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Die Aufreinigung erfolgt durch präparative HPLC.

7.2.3. AAV3 – N-Alkylierung von Isatin

Zu einer 0,1 M Lösung von 1 Äq. 5-Chlorisatin (**2b**) in Acetonitril oder DMF werden 0,5 – 1,5 Äq. eines Bromides (**5b-d**) und 3 Äq. Natriumcarbonat gegeben und die Reaktionsmischung bis zum vollen Umsatz am Rückfluss gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionsmischung wird diese filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt.

Die Aufreinigung erfolgt durch Umkristallisation aus Toluol oder über Silica-Säulenchromatographie.

7.2.4. AAV4 – Oxidation der Thioether

1 Äq. des Thioethers (**16a-f/23/28**) werden 0,5 M in Acetonitril gelöst und 0,2 Äq. DBU zugegeben. Anschließend wird unter Rühren eine Lösung von 3 Äq. Kaliumperoxomonosulfat 0,75 M in Wasser zugegeben und die Reaktionsmischung bis zum vollständigen Umsatz bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird die Reaktionsmischung mit Wasser verdünnt und mit 10 ml Essigester extrahiert. Die organische Phase wird zweimal mit 10 ml Wasser gewaschen und die wässrige Phase einmal mit 10 ml Essigester reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Die Aufreinigung erfolgt mittels präparativer HPLC.

7.2.5. AAV5 – Thioethersynthese

1 Äq. des Epoxids (**20**) wird zusammen mit 1,1 Äq. Kaliumcarbonat und 1,1 Äq. des Thiols (**19a-f**) in Methanol gelöst und bis zum vollständigen Umsatz bei 120 °C in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit dem zehnfachen Volumen Wasser verdünnt und dreimal 10 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Die Aufreinigung erfolgt über eine Silica-Säule.

7.2.6. AAV6 – SCHOTTEN-BAUMANN-Reaktion

1 Äq. des Amins (**25**) wird 0,15 M in DCM suspendiert und bei 0 °C 2,5 – 3 Äq. Triethylamin sowie 1 – 1,5 Äq. Säurechlorid langsam zugegeben. Die Reaktionsmischung wird bei Raumtemperatur bis zum vollen Umsatz gerührt. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von Wasser abgebrochen, die organische Phase zweimal mit 10 ml gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung und einmal mit 10 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Die Aufreinigung erfolgt über präparative HPLC.

7.2.7. AAV7 – Methylesterabspaltung

1 Äq. des Methylesters (**47a-c**) wird 0,3 M in Ethanol/Wasser (2:1) gelöst und 4 Äq. Natriumhydroxid zugegeben. Die Reaktionsmischung wird für 1,5 – 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Ethanol wird am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird anschließend mit 10 ml Wasser verdünnt, angesäuert und dreimal mit 10 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Die Aufreinigung erfolgt mittels präparativer HPLC.

7.2.8. AAV8 – Methylesterabspaltung 2

Zu einer 0,4 M Lösung von 1 Äq. des Methylesters (**52a-c**) in Methanol/Wasser (2:1) werden 4 Äq. Lithiumhydroxid-Monohydrat zugegeben und die RM für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Methanol wird am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand mit 10 ml Wasser verdünnt, angesäuert und dreimal mit 10 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Die Aufreinigung erfolgt mittels präparativer HPLC.

7.2.9. AAV9 – Synthese von Harnstoff-Derivaten

1 Äq. des Isocyanats (**53a-i**) wird 0,5 M in DCM gelöst und bei 0 °C 1 Äq. des Methioninmethylesters (**52a**) sowie 1 Äq. Triethylamin zugegeben. Die Reaktionsmischung wird bei Raumtemperatur für 1,5 h gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in 20 ml Essigester aufgenommen und mit 20 ml 1N HCl, sowie 20 ml ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

7.2.10. AAV10 – Synthese von Harnstoff-Derivaten 2

1 Äq. des Aminosäuremethylethers (**52a-c**) wird 0,125 M in THF gelöst und 3 Äq. *N*-Ethyl-diisopropylamin zusammen mit 1,5 Äq. 1,1'-Carbonyldiimidazol zugegeben. Die Reaktionsmischung wird für 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 2 Äq. des entsprechenden Amins (**54a/b**) und 0,5 Äq. 4-Dimethylaminopyridin zugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 23 h am Rückfluss gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Silica-Flash-Chromatographie aufgereinigt.

7.2.11. AAV11 – Tosylierung

1 Äq. des Amins (**57/63a/b/d-f/h**) werden 0,5 M in Wasser gelöst und 2,5 Äq. Natriumcarbonat, sowie 1 – 2 Äq. Tosylchlorid zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 2 – 4 h bei 80 °C gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit 10 ml Wasser verdünnt, angesäuert und dreimal mit 20 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Die Aufreinigung erfolgt über Silica-Flashchromatographie (puriFlash Heptan/Essigester +3 % AcOH).

7.2.12. AAV11b – Tosylierung 2

Zu einer Lösung von 1,1 mmol (1,1 Äq.) der Carbonsäure (**63c/g**) in 1 ml PEG 400 und 1 ml wässriger 2 M NaHCO₃-Lösung werden 191 mg (1 mmol; 1 Äq.) *p*-Toluolsulfonsäurechlorid und 212 mg (2 mmol; 2 Äq.) Natriumcarbonat zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 2 – 4 h bei 80 °C gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit Wasser verdünnt, angesäuert und dreimal mit 10 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

7.2.13. AAV12 – Amidkupplung

1 Äq. der Carbonsäure (**57/58/64a-h/69a/b**) wird zusammen mit 1 Äq. des Amins 0,4 M in DMF gelöst und 4 Äq. DIPEA, sowie 1,2 – 2,5 Äq. TBTU zugegeben. Die Reaktionsmischung wird entweder 3 – 72 h bei 80 °C oder 15 – 30 min bei 120 °C in der Mikrowelle erhitzt und unter Zugabe von Wasser abgebrochen. Anschließend wird die Reaktionsmischung zweimal mit 10 ml Essigester extrahiert und die organische Phase zweimal mit je 10 ml ges. NH₄Cl-Lösung, ges. NaHCO₃-Lösung und ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Die Aufreinigung erfolgt mittels präparativer HPLC.

7.2.14. AAV13 – Suzuki-Kupplung

1 Äq. des Bromthiazole-Derivats **72** wird unter Argon-Atmosphäre zusammen mit 1 – 1,5 Äq. der jeweiligen Boronsäure und 0,1 Äq. Pd(PPh₃)₄ in 3,45 ml einer Mischung (6.7:1 v/v) aus entgastem DMF und gesättigter NaHCO₃-Lösung gelöst. Die Reaktionsmischung wird für 3 - 4 h bei 100 - 140 °C gerührt oder für 15 min bei 150 °C in der Mikrowelle umgesetzt. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit 10 ml Essigester verdünnt und über Celite® filtriert. Das Filtrat wird fünfmal mit 15 ml ges. NaCl-Lsg. gewaschen und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt mit Silica-Flash-Chromatographie und/oder präparativer HPLC aufgereinigt.

7.3. Synthesevorschriften

7.3.1. 3-Hydroxy-3-phenacylindolin-2-on (1a)

Nach AAV1 wird Isatin (**2a**; 147 mg; 1 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Acetophenon (**3a**; 120 mg; 1 mmol; 1 Äq.) und DIPEA (174 μ l; 1 mmol; 1 Äq.) in 2 ml Ethanol bei Raumtemperatur umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 20 h. Die Aufreinigung erfolgt zunächst über eine Silica-Säule (n-Heptan/Essigester 1:1) und anschließend über präparative HPLC.

Es werden 47 mg (0,18 mmol; 18 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 290,1 [M+Na]⁺; HPLC: 11,68 min (>99 %); ¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆): δ 3,57 (1H, d, ²J = 17,6 Hz), 4,06 (1H, d, ²J = 17,6 Hz), 6,05 (1H, s), 6,79 – 6,86 (1H, m), 7,14 – 7,17 (1H, m), 7,26 (1H, d, ³J = 7,2 Hz), 7,49 – 7,51 (1H, m), 7,60 – 7,64 (1H, m), 7,88 (1H, d, ³J = 7,5 Hz), 10,25 (1H, s); HR-MS: m/z 268,0944 [M+H]⁺, berechnet für C₁₆H₁₄NO₃⁺: 268,0968.

7.3.2. 3-Acetyl-5-chlor-3-hydroxyindolin-2-on (1b)

Nach AAV1 wird 5-Chlorisatin (**2b**; 363 mg; 2 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Aceton (**3b**; 147 μ l; 2 mmol; 1 Äq.) und DIPEA (348 μ l; 2 mmol; 1 Äq.) in 5 ml Ethanol bei Raumtemperatur umgesetzt. Nach 20 h wird nochmals Aceton (**3b**; 1 ml; 13,7 mmol; 6,8 Äq.) zugegeben, die Reaktionsmischung für 3 h gerührt und nochmals 1 ml Aceton zugegeben. Die Reaktionszeit beträgt insgesamt 26 h. Die Aufreinigung erfolgt zunächst über eine Silica-Säule (CH₃Cl + 4% MeOH) und anschließend über präparative HPLC.

Es werde 81 mg (17 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 262,1 [M+Na]⁺; HPLC: 9,57 (>99 %); ¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆): δ 2,01 (1H, 2), 3,06 (1H, d, ²J = 17,3 Hz), 6,09 (1H, s), 6,78 (1H, d, ³J = 8,2 Hz), 7,22 (1H, dd, ³J = 8,3 Hz, ⁴J = 2,2 Hz), 7,31 (1H, d, ⁴J = 2,2), 10,35 (1H, s); HR-MS: m/z 240,0403 [M+H]⁺, berechnet für C₁₁H₁₁ClNO₃⁺: 240,0422.

7.3.3. 5-Chlor-3-hydroxy-3-phenacylindolin-2-on (1c)

Nach AAV1 wird 5-Chlorisatin (**2b**; 363 mg; 2 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Acetophenon (**3a**; 233 μ l; 2 mmol; 1 Äq.) und DIPEA (348 μ l; 2 mmol; 1 Äq.) in 5 ml Ethanol bei Raumtemperatur umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 45 h. Die Aufreinigung erfolgt über präparative HPLC.

Es werden 182 mg (30 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 324,2 [M+Na]⁺; HPLC: 13,71 min (>99 %); ¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆): δ 3,63 (1H, d, ²J = 17,9 Hz), 4,15 (1H, d, ²J = 17,9 Hz), 6,20 (1H, s), 6,82 (1H, d, ³J = 8,2 Hz), 7,21 (1H, dd, ³J = 8,4 Hz, ⁴J =

2,2 Hz), 7,39 (1H, d, $^4J = 2,2$ Hz), 7,49 – 7,53 (2H, m), 7,61 – 7,66 (1H, m), 7,87 – 7,90 (2H, m), 10,41 (1H, s); HR-MS: m/z 302,0547 $[M+H]^+$, berechnet für $C_{16}H_{13}ClNO_3^+$: 302,0578.

7.3.4. 3-[2-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-2-oxoethyl]-5-chlor-3-hydroxyindolin-2-on (1d)

Nach AAV1 wird 5-Chlorisatin (**4b**; 726 mg; 4 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 3,4-(Methylenedioxy)-acetophenon (**3d**; 985 mg; 6 mmol; 1 Äq.) und DIPEA (697 μ l; 4 mmol; 1 Äq.) in 10 ml Ethanol für 33 h bei Raumtemperatur umgesetzt. Anschließend wird die Reaktionsmischung 5 h am Rückfluss gerührt.

Die Aufreinigung erfolgt zunächst über eine Silica-Säule (n-Heptan/Essigester 1:2 \rightarrow 1:4) und anschließend über präparative HPLC.

Es werden 74 mg (5 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 368,2 $[M+Na]^+$; HPLC: 13,57 min (>99 %); 1H -NMR (400 MHz; DMSO- d_6): δ 3,53 (1H, d, $^2J = 17,8$ Hz), 4,06 (1H, d, $^2J = 17,8$ Hz), 6,12 – 6,16 (3H, m), 6,80 (1H, d, $^3J = 8,2$ Hz), 7,02 (1H, d, $^3J = 8,2$ Hz), 7,21 (1H, dd, $^3J = 8,2$ Hz, $^4J = 2,2$ Hz), 7,32 (1H, d, $^4J = 1,6$ Hz), 7,36 (1H, d, $^4J = 2,2$ Hz), 7,55 (1H, dd, $^3J = 8,2$ Hz, $^4J = 1,7$ Hz), 10,37 (1H, s); HR-MS: m/z 346,0444 $[M+H]^+$, berechnet für $C_{17}H_{13}ClNO_5^+$: 346,0477.

7.3.5. 3-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-oxoethyl]-5-chlor-3-hydroxy-1-methylindolin-2-on (1e)

Nach AAV1 wird 5-Chlor-1-methylisatin (**2a**; 391 mg; 2 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 3,4-(Methylenedioxy)acetophenon (**3d**; 328 mg; 2 mmol; 1 Äq.) und DIPEA (348 μ l; 258,5 mg; 2 mmol; 1 Äq.) in 5 ml Ethanol bei 120 °C in der Mikrowelle umgesetzt. Nach 30 min werden nochmals 348 μ l DIPEA zugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 45 min bei 120 °C in der Mikrowelle umgesetzt.

Das Rohprodukt wird mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Es werden 30 mg (4 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 382,1 $[M+Na]^+$; HPLC: 14,69 min (>99 %); 1H -NMR (400 MHz; DMSO- d_6): δ 3,14 (3H, s), 3,59 (1H, d, $^2J = 17,8$ Hz), 6,11 (2H, s), 7,00 – 7,02 (2H, m), 7,30 – 7,33 (2H, m), 7,30-7,33 (2H, m), 7,42 (1H, d, $^4J = 2,1$ Hz), 7,55 (1H, dd, $^3J = 8,2$ Hz, $^4J = 1,6$ Hz); HR-MS: m/z 360,0599 $[M+H]^+$, berechnet für $C_{18}H_{15}ClNO_5^+$: 360,0633.

7.3.6. 3-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-oxoethyl]-5-chloro-1-ethyl-3-hydroxyindolin-2-on (1f)

Nach AAV1 wird 5-Chlor-1-ethylisatin (**2b**; 200 mg; 0,95 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 3,4-(Methylenedioxy)acetophenon (**3d**; 156,62 mg; 0,95 mmol; 1 Äq.) und DIPEA (166 µl; 123,31 mg; 0,95 mmol; 1 Äq.) in 5 ml Ethanol bei 120 °C in der Mikrowelle umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 75 min.

Das Rohprodukt wird zunächst über eine Silica-Säule (n-Heptan/Essigester 2:1 → 1:2) und anschließend über präparative HPLC aufgereinigt.

Es werden 96 mg (27 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 396,1 [M+Na]⁺; HPLC: 15,63 min (>99 %); ¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆): δ 1,18 (3H, t, ³J = 7,11), 3,59 (1H, d, ²J = 17,73), 3,70 (2H, m), 4,11 (1H, d, ²J = 17,80 Hz), 6,12 (2H, s), 6,96 – 7,09 (2H, m), 7,24 – 7,34 (2H, m), 7,43 (1H, d, ⁴J = 2,20 Hz), 7,54 (1H, dd, ³J = 8,20 Hz, ⁴J = 1,75 Hz); HR-MS: m/z 374,0754 [M+H]⁺, berechnet für C₁₉H₁₇ClNO₅⁺: 374,0790.

7.3.7. 3-[2-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-2-oxoethyl]-5-chlor-3-hydroxy-1-phenylindolin-2-on (1g)

Nach AAV1 wird 5-Chlor-1-phenylisatin (**2e**; 249 mg; 0,97 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 3,4-(Methylenedioxy)acetophenon (**3d**; 159 mg; 0,97 mmol; 1 Äq.) und DIPEA (168 µl; 125 mg; 0,97 mmol; 1 Äq.) in 5 ml bei 120 °C in der Mikrowelle umgesetzt.

Die Aufreinigung erfolgt über präparative HPLC.

Es werden 44 mg (11 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 444,0 [M+Na]⁺; HPLC: 18,11 min (>99 %); ¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆): δ = 3,70 (1H, d, ²J = 17,9 Hz), 4,29 (1H, d, ²J = 18,0 Hz), 6,13 (2H, m), 6,73 (1H, d, ³J = 8,4 Hz), 7,03 (1H, d, ³J = 8,2 Hz), 7,26 (1H, dd, ³J = 8,4 Hz, ⁴J = 2,24 Hz), 7,37 (1H, d, ²J = 1,7 Hz), 7,47 (3H, m), 7,59 (4H, m); HR-MS: m/z 422,0781 [M+H]⁺, berechnet für C₂₃H₁₇ClNO₅⁺: 422,0790.

7.3.8. 3-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-oxoethyl]-1-benzyl-5-chlor-3-hydroxyindolin-2-on (1h)

Nach AAV1 wird 1-Benzyl-5-chlorisatin (**2c**; 192 mg; 0,71 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 3,4-(Methylenedioxy)acetophenon (**3d**; 116 mg; 0,71 mmol; 1 Äq.) und DIPEA (123 µl; 91,33 mg; 0,71 mmol; 1 Äq.) in 5 ml Ethanol bei 120 °C in der Mikrowelle umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 45 min.

Das Rohprodukt wird über präparative HPLC und eine Silica-Säule (n-Heptan/Essigester 3:1 → 1:1) aufgereinigt.

Es werden 60 mg (19 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 458,1 [M+Na]⁺; HPLC: 18,21 min (98,4 %); ¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆): δ 3,69 (1H, d, ²J = 17,8 Hz), 4,20 (1H, d, ²J = 17,8 Hz), 2,90 (2H, s), 6,13 (2H, s), 6,38 (1H, s), 6,77 (1H, d, ³J = 8,3 Hz), 7,03 (1H, d, ³J = 8,1 Hz), 7,22 – 7,24 (1H, m), 7,26 – 7,29 (1H, m), 7,35 – 7,37 (3H, m), 7,43 – 7,47 (3H, m), 7,58 (1H, d, ³J = 8,0 Hz); HR-MS: m/z 436,0905 [M+H]⁺, berechnet für C₂₄H₁₉ClNO₅⁺: 436,0946.

7.3.9. 3-[2-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-2-oxoethyl]-5-chloro-3-hydroxy-1-(2-phenylethyl)indolin-2-on (1i)

Nach AAV1 wird 5-Chlor-1-phenylethylisatin (**2d**; 388 mg; 1,36 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 3,4-(Methylenedioxy)acetophenon (**3d**; 223 mg, 1,36 mmol; 1 Äq.) und DIPEA (237 µl; 1,36 mmol; 1 ml) umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 45 min.

Die Aufreinigung erfolgt zunächst über eine Silica-Säule (n-Heptan/Essigester 2:1→1:2) und anschließend über präparative HPLC.

Es werden 165 mg (27 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 450,0 [M+H]⁺; HPLC: 18,8 min (>99 %); ¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆): δ = 2,88 – 2,92 (2H, m), 3,58 (1H, d, ²J = 17,7 Hz), 3,79 – 3,92 (2H, m), 4,12 (1H, d, ²J = 17,7 Hz), 6,12 (2H, 2), 7,01 – 7,04 (2H, m), 7,21 – 7,36 (7H, m), 7,44 (1H, d, ⁴J = 2,2 Hz), 7,55 (1H, dd, ³J = 8,2 Hz, ⁴J = 2,2 Hz); HR-MS: m/z 450,1056 [M+H]⁺, berechnet für C₂₅H₂₁ClNO₅⁺: 450,1103.

7.3.10. 5-Chlor-3-hydroxy-3-phenylindolin-2-on (1j)

Nach AAV2 wird 5-Chlorisatin (**4b**; 182 mg; 1 mmol; 1 Äq.) mit Phenylmagnesiumbromid (**7a**; 2,2 ml; 2,2 mmol; 2,2 Äq.) in 4,5 ml THF umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 4 h.

Das Rohprodukt wird über präparative HPLC aufgereinigt.

Es werden 87 mg (34 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 242,0 $[M-H_2O+H]^+$; HPLC: 14,13 min (>99 %; 1H -NMR (400 MHz; DMSO- d_6): δ 6,78 (1H, s), 6,92 (1H, d, $^3J = 8,3$ Hz), 7,10 (1H, d, $^4J = 1,8$ Hz), 7,29 – 7,35 (6H, m), 10,55 (1H, s); HR-MS: m/z 282,0268 $[M+Na]^+$, berechnet für $C_{14}H_{10}ClNNO_2^+$: 282,0298.

7.3.11. 3-Benzyl-5-chlor-3-hydroxyindolin-2-on (1k)

Nach AAV2 werden 5-Chlorisatin (**4b**; 182 mg; 1 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Benzylmagnesiumchlorid (2M in THF) (**7b**; 1,1 ml; 2,2 mmol; 2,2 Äq.) umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 3,5 h.

Die Aufreinigung erfolgt über präparative HPLC.

Es werden 82 mg (30 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 296,0 $[M+Na]^+$; HPLC: 14,21 min (98,4 %); 1H -NMR (400 MHz; DMSO- d_6): δ 2,99 (1H, d, $^2J = 12,7$ Hz), 3,18 (1H, d, $^2J = 12,7$), 6,26 (1H, s), 6,60 (1H, d, $^3J = 8,2$ Hz), 6,92 (1H, m), 7,13 (1H, m), 10,18 (1H, s); HR-MS: m/z 296,0422 $[M+H]^+$, berechnet für $C_{15}H_{12}ClNNO_2^+$: 296,0454.

7.3.12. 5-Chlor-3-hydroxy-3-(2-phenylethyl)indolin-2-on (1l)

Magnesium (97 mg, 4 mmol; 4 Äq.) wird mit einer Spatelspitze Iod in einem Mikrowellengefäß angeätzt und das Gefäß verschlossen. Es werden 4 ml trockenes THF zugegeben und bis zum Rückfluss erhitzt. Dann wird (2-Bromethyl)benzol (**5b**; 550 μ l; 741 mg; 4 mmol; 4 Äq.) zugegeben und die Reaktionsmischung für 2 h am Rückfluss gerührt. Anschließend wird mit 5-Chlorisatin (**4b**; 182 mg; 1 mmol; 1 Äq.) und der entstandenen Grignard-Reagenzlösung (**7c**; 2,2 ml; 2,2 mmol; 2,2 Äq.) gemäß AAV2 verfahren. Die Reaktionsmischung wird über Nacht gerührt.

Die Aufreinigung erfolgt über präparative HPLC.

Es werden 51 mg (18 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 310,0 $[M+Na]^+$; HPLC: 15,63 min (98,3 %); 1H -NMR (400 MHz; DMSO- d_6): δ 2,06 (2H, m), 2,38 (2H, m), 6,12 (1H, s), 6,84 (1H, d, $^3J = 8,3$ Hz), 7,12 (3H, m), 7,25 (3H, m), 7,36 (1H, d, $^4J = 2,2$ Hz), 10,43 (1H, s); HR-MS: m/z 288,0760 $[M+H]^+$, berechnet für $C_{16}H_{15}ClNO_2^+$: 288,0786.

7.3.13. 5-Chlor-1-methylindoline-2,3,-dion (2a)

5-Chlorisatin (**4b**; 907 mg; 5 mmol; 1 Äq.) wird in 10 ml DMF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wird Natriumhydrid (300 mg; 7,5 mmol; 1,5 Äq.) zugegeben, die Reaktionsmischung für 5 min gerührt und Methyljodid (**5a**; 470 μ l; 7,5 mmol; 1,5 Äq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wird für weitere 1,25 h bei 0 °C gerührt und dann nochmals 300 mg Natriumhydrid zugegeben und die Reaktionsmischung bei 0 °C weitergerührt. Nach 1,25 h werden erneut 300 mg Natriumhydrid zugegeben und die Reaktionsmischung weitere 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit 25 ml DCM verdünnt und in 10 ml gesättigte NH_4Cl -Lösung gegeben, die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase noch zweimal mit 10 ml DCM extrahiert. Die organische Phase wird dreimal mit 10 ml Wasser und einmal mit 15 ml ges. NaCl-Lsg. gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand erneut in DCM gelöst und fünfmal mit 30 ml ges. NaCl-Lsg. gewaschen, um das restliche DMF zu entfernen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Es werden 957 mg (98 %) eines roten Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 213,1 $[M+NH_4]^+$; HPLC: 12,85 min (>99 %).

7.3.14. 5-Chlor-1-ethylindolin-2,3-dion (2b)

5-Chlorisatin (**4b**; 363,16 mg; 2 mmol; 1 Äq.) wird zusammen mit Ethylbromid (**5b**; 109 mg; 1 mmol; 0,5 Äq.) und Natriumcarbonat (636 mg; 6 mmol; 3 Äq.) in 20 ml DMF für 45 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 40 ml Wasser zugegeben und die wässrige Phase dreimal mit 20 ml DCM extrahiert. Die organische Phase wird viermal mit 40 ml ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Die Aufreinigung erfolgt über eine Silica-Säule (n-Heptan/Essigester 3:1 \rightarrow 1:1).

Es werden 210 mg (50 %) eines roten Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 242,2 $[M+CH_3OH+H]^+$; HPLC: 14,59 min (96,1 %).

7.3.15. 1-Benzyl-5-chlorindolin-2,3-dion (2c)

Nach AAV3 wird 5-Chlorisatin (**4b**; 364 mg; 2 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Benzylbromid (**5c**; 360 μ l; 518,4 mg; 3 mmol; 1,5 Äq.) und Natriumcarbonat (636 mg; 6 mmol; 3 Äq.) in 20 ml Acetonitril umgesetzt. Nach 23,5 h wird nochmals Benzylbromid (**5c**; 120 μ l; 1 mmol; 0,5 Äq.) zugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 5 h am Rückfluss gerührt. Anschließend werden erneut 120 μ l Benzylbromid (**5c**) zugegeben und die Reaktion für weitere 17 h am Rückfluss gerührt.

Es werden 192 mg (35 %) eines roten Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 184,1 $[M+H]^+$; HPLC: 8,59 min.

7.3.16. 5-Chlor-1-(2-phenylethyl)indolin-2,3-dion (2d)

Nach AAV3 wird 5-Chlorisatin (**4b**; 364 mg; 2 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Phenylethylbromid (**5d**; 410 μ l; 556 mg; 3 mmol; 1,5 Äq.) und Natriumcarbonat (636 mg; 6 mmol; 3 Äq.) in 20 ml Acetonitril umgesetzt. Nach 19 h und 25,5 h wird jeweils nochmals Phenylethylbromid (**5d**; 136 μ l; 184 mg; 1 mmol) und nach 43 h erneut Phenylethylbromid (**5d**; 272 μ l; 369 mg; 2 mmol; 1 Äq.) zugegeben. Die Reaktionszeit beträgt 49 h.

Es werden 388 mg (68 %) eines roten Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 340,0 $[M+Na+CH_3OH]^+$; HPLC: 18,75 min (93,6 %).

7.3.17. 5-Chlor-1-phenylindolin-2,3-dion (2e)

5-Chlorisatin (**4b**; 364 mg; 2 mmol; 1 Äq.) wird zusammen mit Phenylboronsäure (**6**; 365 mg; 1 mmol; 1,5 Äq.) und Kupfer(II)-acetat (363 mg; 2 mmol; 1 Äq.) in 30 ml DCM gelöst und Triethylamin (560 μ l; 405 mg; 4 mmol; 2 Äq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wird für 4,5 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird nochmals Phenylborsäure (**6**; 121 mg; 1 mmol; 0,5 Äq.) zugegeben und die

Reaktionsmischung weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung über Celite filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingedunstet.

Das Rohprodukt wird über eine Silica-Säule (n-Heptan/Essigester) aufgereinigt.

Es werden 249 mg (48 %) eines orangen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 290,2 $[M+CH_3OH+H]^+$; HPLC: 17,68 min (95,3 %).

7.3.18. 1-[4-[(4-chlorophenyl)methylsulfonylmethyl]-4-hydroxy-1-piperidyl]-2,2-dimethylpropan-1-one (8a)

Nach AAV4 wird 1-[4-[(4-chlorophenyl)methylsulfonylmethyl]-4-hydroxy-1-piperidyl]-2,2-dimethylpropan-1-one (**16a**; 230 mg; 0,65 mmol; 1 Äq.) zusammen mit DBU (19 μ l; 20 mg; 0,13 mmol; 0,2 Äq.) und Oxone[®] (595 mg; 1,9 mmol; 3 Äq.) in 1,5 ml Acetonitril und 3 ml Wasser umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 3 h.

Die Aufreinigung erfolgt über präparative HPLC.

Es werden 96,8 mg (39 %) eines gelblichen Öls erhalten.

ESI-MS: m/z 388,4 $[M+H]^+$; HPLC: 14,67 min (>99 %); ¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃): δ 1.26 (s, 9H), 1.61 (td, ^{2,3}J = 12.9, 4.3 Hz, 2H), 1.99 – 1.85 (m, 2H), 3.01 (s, 2H), 3.27 (t, ^{2,3}J = 12.7 Hz, 2H), 4.22 – 4.08 (m, 2H), 4.26 (s, 2H), 7.43 – 7.32 (m, 4H); HR-MS: m/z 388,1325 $[M+H]^+$, berechnet für C₁₈H₂₇ClNO₄S⁺: 388,1344.

7.3.19. 1-[4-(Phenylsulfonylmethyl)-4-hydroxy-1-piperidyl]-2,2-dimethylpropan-1-on (8b)

Nach AAV4 werden 1-[4-Hydroxy-4-(phenylsulfonylmethyl)-1-piperidyl]-2,2-dimethylpropan-1-on (**16b**; 240 mg; 0,78 mmol; 1 Äq.) zusammen mit DBU (24 μ l; 23,77 mg; 0,16 mmol; 0,2 Äq.) und Oxone[®] (719 mg; 2,34 mmol; 3 Äq.) in 1,5 ml Acetonitril und 3 ml Wasser umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 2,5 h.

Die Aufreinigung erfolgt über präparative HPLC.

Es werden 179 mg (68 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 340,2 $[M+H]^+$; HPLC: 12,64 min (>99 %); ¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃): δ 1,27 (9H, s), 1,64 (2H, td, ²J = 13,0 Hz, ³J = 4,4 Hz), 1,97 (2H, d, ²J = 13,4 Hz), 3,25 – 3,37 (4H, m), 4,17 (2H, d, ²J = 13,5 Hz),

7,60 (1H, t, $^3J = 7,6$ Hz), 7,69 (2H, t, $^3J = 7,4$ Hz), 7,93 (2H, d, $^3J = 7,2$ Hz) ; HR-MS: m/z 340,1530 [M+H]⁺, berechnet für C₁₇H₂₆NO₄S⁺: 340,1577.

7.3.20. 1-[4-(Benzylsufonylmethyl)-4-hydroxy-1-piperidyl]-2,2-dimethylpropan-1-on (8c)

Nach AAV4 wird 1-[4-(Benzylsufanylmethyl)-4-hydroxy-1-piperidyl]-2,2-dimethylpropan-1-on (**16c**; 257 mg; 0,8 mmol; 1 Äq.) zusammen mit DBU (24 µl; 0,16 mmol; 0,2 Äq.) und Oxone® (737,18 mg; 2,4 mmol; 3 Äq.) in 1,5 ml Acetonitril und 3 ml Wasser umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 1,75 h.

Die Aufreinigung erfolgt über präparative HPLC.

Es werden 121,5 mg (43 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 376,1 [M+Na]⁺; HPLC: 13,2 min (>99 %); ¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃): δ 1,25 (9H, s), 1,53 – 1,65 (2H, m), 1,92 (2H, dq, $^2J = 14,1$ Hz, $^4J = 2,9$ Hz), 3,00 (2H, s), 3,26 (2H, t, $^2J = 12,8$ Hz), 3,50 (1H, s), 4,14 (2H, d, $^2J = 13,0$ Hz), 4,29 (2H, s), 7,36 – 7,46 (5H, m) ; HR-MS: m/z 354,1687 [M+H]⁺, berechnet für C₁₈H₂₈NO₄S⁺: 354,1734.

7.3.21. 1-[4-Hydroxy-4-(2-phenylethylsufonylmethyl)-1-piperidyl]-2,2-dimethylpropan-1-on (8d)

Nach AAV4 wird 1-[4-Hydroxy-4-(2-phenylethylsufanylmethyl)-1-piperidyl]-2,2-dimethylpropan-1-on (**16d**; 258 mg; 0,77 mmol; 1 Äq.) zusammen mit DBU (23 µl; 23,41 mg; 0,15 mmol; 0,2 Äq.) und Oxone® (709 mg; 2,31 mmol; 3 Äq.) in 1,5 ml Acetonitril und 3 ml Wasser umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 2,5 h.

Die Aufreinigung erfolgt über präparative HPLC.

Es werden 135 mg (48 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 390,3 [M+Na]⁺; HPLC: 14,24 min (>99 %); ¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃): δ 1,26 (9H,s), 1,60 (2H, td $^2J = 12,9$ Hz; $^3J = 4,3$ Hz), 1,83 – 1,99 (2H, m), 3,01 (2H, s), 3,10 – 3,21 (2H, m), 3,21 – 3,40 (4H, m), 4,08 – 4,22 (2H, m), 7,15 – 7,41 (6H, m) ; HR-MS: m/z 368,1840 [M+H]⁺, berechnet für C₁₉H₃₀NO₄S⁺: 368,1890.

7.3.22. 1-[4-[(2,4-Dichlorophenyl)methylsulfonylmethyl]-4-hydroxy-1-piperidyl]-2,2-dimethylpropan-1-on (8e)

Nach AAV4 wird 1-[4-[(2,4-Dichlorophenyl)methylsulfonylmethyl]-4-hydroxy-1-piperidyl]-2,2-dimethylpropan-1-on (**16e**; 58 mg; 0,15 mmol; 1 Äq.) zusammen mit DBU (4 µl; 4,52 mg; 0,03 mmol; 0,2 Äq.) und Oxone® (91 mg; 0,3 mmol; 2 Äq.) in 300 µl Acetonitril und 600 µl Wasser umgesetzt. Nach 1,5 h wird nochmals Oxone® (45 mg; 0,15 mmol; 1 Äq.) zugegeben. Die Reaktionszeit beträgt 3,5 h.

Die Aufreinigung erfolgt über präparative HPLC.

Es werden 25 mg (40 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 422,0 [M+H]⁺; HPLC: 16,0 min (>99 %); ¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃): δ 1,26 (9H, 2), 1,56 – 1,69 (2H, m), 1,90 – 2,00 (2H, m), 3,11 (2H, s), 3,27 (2H, t, ²J = 12,8 Hz), 4,16 (2H, d, ²J = 13,5 Hz), 4,47 (2H, s), 7,34 (1H, dd, ³J = 8,4 Hz, ⁴J = 2,1 Hz), 7,47 – 7,54 (2H, m); HR-MS: m/z 422,0908 [M+H]⁺, berechnet für C₁₈H₂₆Cl₂NO₄S⁺: 422,0954.

7.3.23. 1-[4-(Ethylsulfonylmethyl)-4-hydroxy-1-piperidyl]-2,2-dimethylpropan-1-on (8f)

Nach AAV4 wird 1-[4-(Ethylsulfonylmethyl)-4-hydroxy-1-piperidyl]-2,2-dimethylpropan-1-on (**16f**; 62 mg; 0,24 mmol; 1 Äq.) zusammen mit DBU (7 µl; 7,27 mg; 0,05 mmol; 0,2 Äq.) und Oxone® (220 mg; 0,72 mmol; 3 Äq.) in 0,5 ml Acetonitril und 1,5 ml Wasser umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 2,5 h.

Die Aufreinigung erfolgt über präparative HPLC.

Es werden 9 mg (13 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 314,1 [M+Na]⁺; HPLC: 9,47 min (92,5 %); ¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃): δ 1.27 (s, 9H), 1.42 (t, ³J = 7.4 Hz, 3H), 1.67 (td, ^{2,3}J = 12.9, 4.4 Hz, 2H), 1.97 (d, ²J = 13.4 Hz, 2H), 3.07 (q, ³J = 7.5 Hz, 2H), 3.13 (s, 2H), 3.66 (s, br, 1H), 4.18 (d, ²J = 13.5 Hz, 2H).

7.3.24. 1-(2,2-Dimethylpropanoyl)piperidin-4-on (10)

4-Piperidon-Monohydrat-Hydrochlorid (**14**; 3,072 g; 20 mmol; 1 Äq.) wird in 90 ml DCM suspendiert und mit Argon überschichtet. Anschließend wird erst Triethylamin (8,4 ml; 6,1 g; 60 mmol; 3 Äq.) und

dann Pivaloylchlorid (**15**; 2,9 ml; 2,89 g; 24 mmol; 1,2 Äq.) zugegeben und die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur gerührt. Nach 24 h werden weitere 1,5 Äq. Triethylamin zugegeben. Nach 48 h wird die Reaktionsmischung mit Wasser neutral gewaschen und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Es werden 2,05 g (11,19 mmol; 56 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 184,1 $[M+H]^+$; HPLC: 8,59 min (>99 %).

7.3.25. 1-[4-[(4-chlorophenyl)methylsulfanylmethyl]-4-hydroxy-1-piperidyl]-2,2-dimethylpropan-1-one (16a)

Nach AAV5 wird 2,2-Dimethyl-1-(1-oxa-6-azaspiro[2.5]octan-6-yl)propan-1-one (**20**; 197 mg; 1 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Kaliumcarbonat (152 mg; 1,1 mmol; 1,1 Äq.) und 4-Chlorbenzylmercaptan (**19a**; 120 μ l; 174 mg; 1,1 mmol; 1,1 Äq.) in 2 ml Methanol umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 7 min.

Die Aufreinigung erfolgt über eine Silica-Säule (n-Heptan/Essigester 2:1→1:4).

Es werden 330 mg (92 %) eines farblosen Öls erhalten.

ESI-MS: m/z 356,4 $[M+H]^+$; HPLC: 17,55 min (88,8 %).

7.3.26. 1-[4-Hydroxy-4-(phenylsulfanylmethyl)-1-piperidyl]-2,2-dimethylpropan-1-on (16b)

Nach AAV5 wird 2,2-Dimethyl-1-(1-oxa-6-azaspiro[2,5]octan-6-yl)propan-1-on (**20**; 197 mg; 1 mmol; 1 Äq.) mit Kaliumcarbonat (152 mg; 1,1 mmol; 1,1 Äq.) und Thiophenol (**19b**; 113 μ l; 121 mg; 1,1 mmol; 1,1 Äq.) in 2 ml Methanol umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 10 min.

Die Aufreinigung erfolgt über eine Silica-Säule (n-Heptan/Essigester 1:1→1:4).

Es werden 240 mg (78 %) eines farblosen Öls erhalten.

ESI-MS: m/z 290,1 $[M-H_2O+H]^+$; HPLC: 16,05 min (70,7 %).

7.3.27. 1-[4-(Benzylsulfanylmethyl)-4-hydroxy-1-piperidyl]-2,2-dimethylpropan-1-on (16c)

Nach AAV5 wird 2,2-Dimethyl-1-(1-oxa-6-azaspiro[2,5]octan-6-yl)propan-1-on (**20**; 197 mg; 1 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Kaliumcarbonat (152 mg; 1,1 mmol; 1,1 Äq.) und Benzylmercaptan (**19c**; 130 µl; 136 mg; 1,1 mmol; 1,1 Äq.) in 2 ml Methanol umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 20 min.

Die Aufreinigung erfolgt über eine Silica-Säule (n-Heptan/Essigester 1:1 → 1:4).

Es werden 257 mg (80 %) eines gelben Öls erhalten.

ESI-MS: m/z 322,1 [M+H]⁺; HPLC: 16,21 min (81,2 %).

7.3.28. 1-[4-Hydroxy-4-(2-phenylethylsulfanylmethyl)-1-piperidyl]-2,2-dimethylpropan-1-on (16d)

Nach AAV5 wird 2,2-Dimethyl-1-(1-oxa-6-azaspiro[2,5]octan-6-yl)propan-1-on (**20**; 197 mg; 1 mmol; 1 Äq.) mit Kaliumcarbonat (152 mg; 1,1 mmol; 1,1 Äq.) und 2-Phenylethanthiol (**19d**; 147 µl; 152 mg; 1,1 mmol; 1,1 Äq.) in 2 ml Methanol umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 10 min.

Die Aufreinigung erfolgt über eine Silica-Säule (n-Heptan/Essigester 1:1 → 1:4).

Es werden 258 mg (77 %) eines gelben Öls erhalten.

ESI-MS: m/z 358,3 [M+Na]⁺; HPLC: 17,25 min (69,0 %).

7.3.29. 1-[4-[(2,4-Dichlorophenyl)methylsulfanylmethyl]-4-hydroxy-1-piperidyl]-2,2-dimethylpropan-1-on (16e)

Nach AAV5 wird 2,2-Dimethyl-1-(1-oxa-6-azaspiro[2,5]octan-6-yl)propan-1-on (**20**; 98 mg; 0,5 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Kaliumcarbonat (76 mg; 0,55 mmol; 1,1 Äq.) und 2,4-Dichlormethylmercaptan (**19e**; 75 µl; 106 mg; 0,55 mmol; 1,1 Äq.) in 1 ml Methanol gelöst. Die Reaktionszeit beträgt 15 min.

Die Aufreinigung erfolgt über eine Silica-Säule (n-Heptan/Essigester 1:1 → 1:4).

Es werden 134 mg (69 %) eines gelben Öls erhalten.

ESI-MS: m/z 390,0 [M+H]⁺; HPLC: 19,07 min (79,4 %)

7.3.30. 1-[4-(Ethylsulfanylmethyl)-4-hydroxy-1-piperidyl]-2,2-dimethylpropan-1-on (16f)

Nach AAV5 wird 2,2-Dimethyl-1-(1-oxa-6-azaspiro[2,5]octan-6-yl)propan-1-on (**20**; 197 mg; 1 mmol; 1 Äq.) mit Kaliumcarbonat (152 mg; 1,1 mmol; 1,1 Äq.) und Ethylmercaptan (**19f**; 81 µl; 68 mg; 1,1 mmol; 1,1 Äq.) in 2 ml Methanol umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 20 min.

Die Aufreinigung erfolgt über eine Silica-Säule (n-Heptan/Essigester 1:1→1:4).

Es werden 62 mg (24 %) eines gelben Öls erhalten.

ESI-MS: m/z 260,1 [M+H]⁺; HPLC: 12,77 min (70,8 %).

7.3.31. 2,2-Dimethyl-1-(1-oxa-6-azaspiro[2,5]octan-6-yl)propan-1-on (20)

Natriumhydrid (60 % in Mineralöl) (421 mg; 10,54 mmol; 1,2 Äq.) wird mit n-Hexan gewaschen und in 16 ml DMSO suspendiert. Anschließend wird Trimethylsulfoxoniumiodid (2,32 g; 10,54 mmol; 1,2 Äq.) zugegeben und die Reaktionsmischung für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird 1-(2,2-Dimethylpropanoyl)piperidin-4-on (**10**; 1,61 g; 8,79 mmol; 1 Äq.) zugegeben und die Reaktionsmischung für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von Eiswasser abgebrochen und die wässrige Phase dreimal mit Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit 50 ml ges. NaCl-Lsg. gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt.

Es werden 1,57 g (91 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 198,1 [M+H]⁺; HPLC: 10,27 min (73,0 %).

7.3.32. *tert*-Butyl-1-oxa-6-azaspiro[2,5]octan-6-carboxylat (22)

Natriumhydrid (60 % in Mineralöl) (480 mg; 12 mmol; 1,2 Äq.) wird mit n-Hexan gewaschen und in 20 ml DMSO suspendiert. Anschließend wird Trimethylsulfoxoniumiodid (2,64 g; 12 mmol; 1,2 Äq.) zugegeben und die Reaktionsmischung für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird *tert*-Butyl-4-oxopiperidin-1-carboxylat (**21**; 1,99 g; 10 mmol; 1 Äq.) zugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von Eiswasser abgebrochen und die wässrige Phase dreimal mit Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden

dreimal mit 200 ml ges. NaCl-Lsg. gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt.

Es werden 2,15 g (99 %) eines gelben Feststoffs erhalten.

HPLC: 13,33 min (47,3 %).

7.3.33. *tert*-Butyl-4-[(4-chlorphenyl)methylsulfanylmethyl]-4-hydroxypiperidin-1-carboxylat (23)

Nach AAV5 wird *tert*-Butyl-1-oxa-6-azaspiro[2,5]octan-6-carboxylat (**22**; 2,13 g; 10 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Kaliumcarbonat (1,52 g; 11 mmol; 1,1 Äq.) und 4-Chlorbenzylmercaptan (**19a**; 1,45 ml; 1,74 g; 11 mmol; 1,1 Äq.) in 20 ml Methanol umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 7 min.

Die Aufreinigung erfolgt über eine Silica-Säule (n-Heptan/Essigester 3:1→2:1).

Es werden 2,96 g (80 %) eines farblosen Öls erhalten.

ESI-MS: m/z 394,2 [M+Na]⁺; HPLC: 19,6 min (92,7 %).

7.3.34. *tert*-Butyl-4-[(4-chlorphenyl)methylsulfonylmethyl]-4-hydroxypiperidin-1-carboxylat (24)

Nach AAV4 wird *tert*-Butyl-4-[(4-chlorphenyl)methylsulfonylmethyl]-9-4-hydroxypiperidin-1-carboxylat (**23**; 147 mg; 0,4 mmol; 1 Äq.) zusammen mit DBU (12 µl; 0,08 mmol; 0,2 Äq.) und Oxone® (364 mg; 1,2 mmol; 3 Äq.) in 0,75 ml Acetonitril und 1,5 ml Wasser umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 3 h.

Es werden 138 mg (86 %) eines gelblichen Öls erhalten.

ESI-MS: m/z 304,2 [M-Boc+2H]⁺; HPLC: 16,8 min (>99 %).

7.3.35. 4-[(4-Chlorphenyl)methylsulfonylmethyl]piperidin-4-ol hydrochlorid (25)

tert-Butyl-4-[(4-chlorphenyl)methylsulfonylmethyl-4-hydroxypiperidin-1-carboxylat (138 mg; 0,34 mmol; 1 Äq.) wird in 2 ml 4 M methanolischer Salzsäure gelöst und die Lösung für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Es werden 102 mg (98 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 304,2 [M+H]⁺; HPLC: 9,01 min (>99 %).

7.3.36. 1-[4-[(4-Chlorphenyl)methylsulfonylmethyl]-4-hydroxy-1-piperidyl]ethanon (26a)

Nach AAV6 wird 4-[(4-Chlorphenyl)methylsulfonylmethyl]piperidin-4-ol hydrochlorid (**25**; 50 mg; 0,16 mmol; 1 Äq) in 1 ml DCM suspendiert und zusammen mit Acetylchlorid (14 µl; 15,5 mg; 0,2 mmol; 1,2 Äq) und Triethylamin (69 µl; 50 mg; 0,49 mmol; 3 Äq.) umgesetzt. Nach 30 min werden nochmals 14 µl Acetylchlorid zugegeben. Die Reaktionszeit beträgt 1,5 h.

Die Aufreinigung erfolgt mittels präparativer HPLC.

Es werden 19 mg (33 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 346,6 [M+H]⁺; HPLC: 11,36 min (>99 %); ¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃): δ 1,62 (dtd, ^{2,3}J = 43,7, 12,9, 4,7 Hz, 2H), 1,80 – 1,95 (m, 1H), 2,01 (m, 2H), 2,11 (s, 3H), 2,90 – 3,13 (m, 3H), 3,50 (t, ²J = 12,3 Hz, 1H), 3,61 (d, ²J = 13,8 Hz, 1H), 4,27 (s, 2H), 4,36 (d, ²J = 13,5 Hz, 1H), 7,30 – 7,47 (m, 4H); HR-MS: m/z 346,0834 [M+H]⁺, berechnet für C₁₅H₂₁ClNO₄S⁺: 346,0874.

7.3.37. 1-[4-[(4-Chlorphenyl)methylsulfonylmethyl]-4-hydroxy-1-piperidyl]propan-1-one (26b)

Nach AAV6 wird 4-[(4-Chlorphenyl)methylsulfonylmethyl]piperidin-4-ol hydrochlorid (**25**; 200 mg; 0,59 mmol; 1 Äq) in 4 ml DCM suspendiert und zusammen mit Propionsäurechlorid (69 µl; 73 mg; 0,79 mmol; 1,3 Äq) und Triethylamin (275 µl; 200 mg; 1,97 mmol; 3 Äq.) umgesetzt. Nach 30 min werden nochmals 46 µl Propionsäurechlorid zugegeben. Die Reaktionszeit beträgt 1,5 h.

Die Aufreinigung erfolgt mittels präparativer HPLC.

Es werden 73 mg (34 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 360,3 $[M+H]^+$; HPLC: 12,27 min (>99 %); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3): δ 1.16 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 3H), 1.74 – 1.52 (m, 2H), , 2.09 – 1.92 (m, 2H), 2.44 (q, $^3J = 7.5$ Hz, 2H), 3.04 (s, 2H), 3.31 (s, 2H), 4.00 (s, 2H), 4.28 (s, 2H), 4.50 (s,br, 1H), 7.52 – 7.30 (m, 4H); HR-MS: m/z 360,0988 $[M+H]^+$, berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{ClNO}_4\text{S}^+$: 360,1031.

7.3.38. [4-[(4-Chlorphenyl)methylsulfonylmethyl]-4-hydroxy-1-piperidyl]-phenyl-methanon (26c)

Nach AAV6 werden 4-[(4-Chlorphenyl)methylsulfonylmethyl]piperidin-4-ol hydrochlorid (**25**; 200 mg; 0,59 mmol; 1 Äq) in 4 ml DCM suspendiert und zusammen mit Benzoylchlorid (137 μl ; 165 mg; 1,17 mmol; 2 Äq) und Triethylamin (246 μl ; 178 mg; 1,76 mmol; 3 Äq.) umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 1,5 h.

Die Aufreinigung erfolgt mittels präparativer HPLC.

Es werden 52 mg (22 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 408,5 $[M+H]^+$; HPLC: 14,48 min (>99 %); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3): δ 1.61 – 1.92 (m, 4H), 3.04 – 3.31 (m, 3H), 4.10 – 4.27 (m, 1H), 4.53 (s, 2H), 5.37 (s, 1H), 7.29 – 7.54 (m, 9H); HR-MS: m/z 408,0990 $[M+H]^+$, berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{ClNO}_4\text{S}^+$: 408,1031.

7.3.39. 1-[4-[(4-Chlorphenyl)methylsulfonylmethyl]-4-hydroxy-1-piperidyl]-2-phenyl-ethanon (26d)

Nach AAV6 wird 4-[(4-Chlorphenyl)methylsulfonylmethyl]piperidin-4-ol hydrochlorid (**25**; 200 mg; 0,59 mmol; 1 Äq) in 4 ml DCM suspendiert und zusammen mit Phenylacetylchlorid (156 μl , 182 mg; 1,18 mmol; 2 Äq) und Triethylamin (246 μl ; 178 mg; 1,76 mmol; 3 Äq.) umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 1 h.

Die Aufreinigung erfolgt mittels präparativer HPLC.

Es werden 137,5 mg (55 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 422,5 $[M+H]^+$; HPLC: 15,01 min (>99 %); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3): δ 1.55 – 1.78 (m, 4H), 2.94 – 3.09 (m, 1H), 3.22 (s, 2H), 3.25 – 3.35 (m, 1H), 3.62 – 3.79 (m, 3H), 3.95 – 4.09 (m, 1H), 4.51 (s, 2H), 5.29 (s, 1H), 7.16 – 7.25 (m, 3H), 7.25 – 7.35 (m, 2H), 7.35 – 7.57 (m, 4H); HR-MS: m/z 422,1143 $[M+H]^+$, berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{ClNO}_4\text{S}^+$: 422,1187.

7.3.40. 1-[4-[(4-Chlorphenyl)methylsulfonylmethyl]-4-hydroxy-1-piperidyl]-3-phenyl-propan-1-on (26e)

Nach AAV6 wird 4-[(4-Chlorphenyl)methylsulfonylmethyl]piperidin-4-ol hydrochlorid (**25**; 200 mg; 0,59 mmol; 1 Äq) in 4 ml DCM suspendiert und zusammen mit Hydrocinnamylchlorid (175 µl; 198 mg; 1,18 mmol; 2 Äq) und Triethylamin (246 µl; 178 mg; 1,76 mmol; 3 Äq.) umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 1 h.

Die Aufreinigung erfolgt mittels präparativer HPLC.

Es werden 133 mg (52 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 436,3 [M+H]⁺; HPLC: 15,76 min (99 %); ¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃): δ 1.46 – 1.84 (m, 4H), 2.55 – 2.66 (m, 2H), 2.79 (t, ³J = 7.7 Hz, 2H), 2.90 – 3.03 (m, 1H), 3.14 – 3.33 (m, 3H), 3.55 – 3.69 (m, 1H), 4.04 (dt, ^{3,4}J = 13.7, 4.3 Hz, 1H), 4.52 (s, 2H), 5.27 (s, 1H), 7.12 – 7.20 (m, 1H), 7.20 – 7.30 (m, 4H), 7.39 – 7.51 (m, 4H); HR-MS: m/z 436,1291 [M+H]⁺, berechnet für C₂₂H₂₇ClNO₄S⁺: 436,1344.

7.3.41. 1-(3-Benzylsulfonyl-2-hydroxy-propyl)pyrrolidin-2-on (27)

Nach AAV4 werden 1-(3-Benzylsulfonyl-2-hydroxy-propyl)pyrrolidin-2-on (**28**; 75 mg; 0,28 mmol; 1 Äq.) zusammen mit DBU (8 µl; 0,06 mmol; 0,2 Äq.) und Oxone® (261 mg; 0,84 mmol; 3 Äq.) in 0,75 ml Acetonitril und 1,5 ml Wasser umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 2 h.

Die Aufreinigung erfolgt über präparative HPLC.

Es werden 10 mg (12 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 298,0 [M+Na]⁺; HPLC: 9,12 min (>99 %); ¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃): δ 2.04 – 2.13 (m, 2H), 2.38 – 2.49 (m, 2H), 2.91 (dd, ^{2,3}J = 14.5, 3.0 Hz, 1H), 3.13 (dd, ³J = 14.5, 9.0 Hz, 1H), 3.39 (dd, ^{2,3}J = 14.3, 3.2 Hz, 1H), 3.44 – 3.52 (m, 2H), 3.53 – 3.59 (m, 1H), 4.31 – 4.36 (m, 1H), 4.43 – 4.49 (m, 2H), 7.36 – 7.55 (m, 5H).

7.3.42. 1-(3-Benzylsulfonyl-2-hydroxy-propyl)pyrrolidin-2-on (28)

Natriumhydrid (60% in Mineralöl) (69 mg; 1,7 mmol) wird in THF suspendiert und Benzylmercaptan (**19c**; 79 mg; 0,63 mmol) zugegeben. Die Reaktionsmischung wird für 20 min bei Raumtemperatur

gerührt. Anschließend wird 1-(3-Bromo-2-hydroxy-propyl)pyrrolidin-2-on (**34**; 128 mg; 0,58 mmol) zugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird die Reaktionsmischung abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Reaktionszeit beträgt 21 h.

Die Aufreinigung erfolgt über eine Silica-Säule.

Es werden 75 mg (49 %) eines gelben Öls erhalten.

ESI-MS: m/z 266,1 $[M+H]^+$; HPLC: 11,63 min (49,2 %).

7.3.43. 1-(Oxiran-2-ylmethyl)pyrrolidin-2-on (29)

Natriumhydrid (60 % in Mineralöl) (5 g; 125 mmol; 5 Äq.) wird in 100 ml THF suspendiert und 2-Pyrrolidinon (**31**; 1,92 ml; 2,1 g; 25 mmol; 1 Äq.) zugegeben. Die RM wird bei Raumtemperatur für 1,5 h gerührt. Anschließend wird Epichlorhydrin (**30**; 2,15 ml; 2,5 g; 27,5 mmol; 1,1 Äq.) zugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 18 h bei 60 °C gerührt. Danach wird die Reaktionsmischung abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt. Es werden 2,22 g (63 %) eines gelb-farblösen zweiphasigen Öls erhalten. Das Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung zur Weiterreaktion verwendet.

ESI-MS: m/z 305,3 $[2M+Na]^+$.

7.3.44. 1-(3-Bromo-2-hydroxy-propyl)pyrrolidin-2-on (34)

Natriumhydrid (60% in Mineralöl) (120 mg; 3 mmol; 3 Äq.) wird in 4 ml trockenem THF suspendiert und 2-Pyrrolidinon (**31**; 77 μ l; 85 mg; 1 mmol; 1 Äq.) zugegeben. Die RM wird bei Raumtemperatur für 1,5 h gerührt. Anschließend wird 1,3-Dibromo-2-propanol (**35**; 112 μ l; 240 mg; 1,1 mmol; 1,1 Äq.) zugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 22 h bei 60 °C gerührt. Danach wird die Reaktionsmischung filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt.

Es werden 128 mg (58 %) eines farblosen Öls erhalten.

Das Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.

7.3.45. Methyl-2-(4-chlorsulfonylphenoxy)acetat (42a)

Methyl-2-(4-aminophenoxy)acetat (**43a**; 3,06 g; 16,9 mmol; 1 Äq.) wird in 18 ml konz. Salzsäure und 18 ml Essigsäure gelöst und bei 0 °C Natriumnitrit (3,54 g; 50,6 mmol; 3 Äq.), gelöst in 9 ml Wasser, zugegeben. Die Reaktionsmischung wird bei 0 °C für 1 h gerührt und anschließend eine Lösung von Natriumdisulfit (4,21 g; 19,2 mmol; 6 Äq.) in 27 ml Wasser zugegeben. Die Reaktionsmischung wird für weitere 3,5 h bei 0 °C gerührt. Danach wird die Reaktionsmischung dreimal mit 200 ml Essigester extrahiert und die vereinigten organischen Phasen dreimal mit 100 ml Wasser, viermal mit 100 ml ges. NaHCO₃-Lsg., sowie dreimal mit 100 ml ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wird nicht weiter aufgereinigt.

Es werden 763 mg (17 %) eines roten Öls erhalten.

ESI-MS: m/z 182,0 [M+H]⁺; HPLC: 16,45 min (21,2 %).

7.3.46. Methyl-2-(4-aminophenoxy)acetat (43a)

Methyl-2-(4-nitrophenoxy)acetat (**44a**; 7,96 g; 38 mmol; 1 Äq.) wird zusammen mit Eisen (10,5 g; 188 mmol; 5 Äq.) in 80 ml Ethanol und 40 ml Wasser suspendiert und 80 ml Eisessig zugegeben. Die Reaktionsmischung wird für 1 h bei 50 °C im Ultraschallbad umgesetzt. Anschließend wird die Reaktionsmischung über Celite filtriert, mit Essigester verdünnt und zweimal mit 100 ml 2N KOH-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird einmal mit 100 ml Essigester reextrahiert und die vereinigten organischen Phasen dreimal mit 100 ml Wasser und zweimal mit 100 ml ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wird über eine Silica-Säule (n-Heptan Essigester 1:1 -> 1:4) aufgereinigt und dann nochmals über Silica-Flash-Chromatographie (puriFlash n-Heptan/Essigester) aufgereinigt.

Es werden 3,09 g (45 %) eines roten Öls erhalten.

ESI-MS: m/z 182,0 [M+H]⁺; HPLC: 4,05 min (53 %).

7.3.47. Methyl-2-(4-nitrophenoxy)acetat (44a)

4-Nitrophenol (**46a**; 2,78 g; 20 mmol; 1 Äq.) wird zusammen mit Kaliumcarbonat (5,53 g; 40 mmol; 2 Äq.) in 100 ml Acetonitril gelöst und Bromessigsäuremethylester (2 ml; 3,36 g; 22 mmol; 1,1 Äq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wird für 20 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird in 300 ml Essigester aufgenommen und zweimal mit 100 ml Wasser und zweimal mit 100 ml ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Es werden 4,09 g (97 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 211,9 $[M+H]^+$; HPLC: 14,13 min (>99 %).

7.3.48. Methyl-2-[4-(propylsulfamoyl)phenoxy]acetat (47a)

Nach AAV6 wird Methyl-2-(4-chlorsulfonylphenoxy)acetat (**42a**; 340 mg; 1,28 mmol; 1 Äq.) zusammen mit n-Propylamin (**41a**; 91 mg; 1,54 mmol; 1,2 Äq.) und Triethylamin (389 mg; 3,85 mmol; 3 Äq.) umgesetzt. Das Rohprodukt wird nicht weiter aufgereinigt.

Es werden 62 mg (17 %) eines roten Öls erhalten.

ESI-MS: m/z 341,8 $[M+Na+MeOH]^+$; HPLC: 13,81 min (39,8 %).

7.3.49. Methyl-2-[4-(isobutylsulfamoyl)phenoxy]acetat (47b)

Nach AAV6 wird Methyl-2-(4-chlorsulfonylphenoxy)acetat (**42a**; 300 mg; 1,13 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Isobutylamin (**41b**; 99 mg; 1,36 mmol; 1,2 Äq.) und Triethylamin (344 mg; 3,4 mmol; 3 Äq.) umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels Silica-Flash-Chromatographie (puriFlash n-Heptan/Essigester) aufgereinigt.

Es werden 64 mg (18 %) eines roten Öls erhalten.

ESI-MS: m/z 302,0 $[M+H]^+$; HPLC: 15,17 min (78,1 %).

7.3.50. Methyl-2-[4-(benzylsulfamoyl)phenoxy]acetat (47c)

Nach AAV6 wird Methyl-2-(4-chlorsulfonylphenoxy)acetat (**42a**; 403 mg; 1,5 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Benzylamin (**41c**; 196 mg; 1,8 mmol; 1,2 Äq.) und Triethylamin (462 mg; 4,6 mmol; 3 Äq.) umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels Silica-Flash-Chromatographie (puriFlash n-Heptan/Essigester) aufgereinigt. Ein Teil des Produkts wird nochmals mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

ESI-MS: m/z 358,1 $[M+Na]^+$; HPLC: 15,65 min (>99 %); 1H -NMR (701 MHz; DMSO- d_6): δ 3.72 (s, 3H), 3.94 (d, $^3J = 6.3$ Hz, 2H), 4.92 (s, 2H), 7.05 – 7.15 (m, 2H), 7.19 – 7.26 (m, 3H), 7.26 – 7.32 (m, 2H), 7.68 – 7.77 (m, 2H), 8.02 (t, $^3J = 6.4$ Hz, 1H); HR-MS: m/z 336,0897 $[M+H]^+$, berechnet für $C_{16}H_{18}NO_5S^+$: 336,0900.

7.3.51. 2-[4-(Propylsulfamoyl)phenoxy]essigsäure (48a)

Nach AAV7 wird Methyl-2-[4-(propylsulfamoyl)phenoxy]acetat (**47a**; 62 mg; 0,21 mmol) umgesetzt.

Es werden 2,4 mg (4 %) eines rötlichen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 273,8 $[M+H]^+$; HPLC: 11,23 min (94,1 %); 1H -NMR (701 MHz; DMSO- d_6): δ 0.79 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 3H), 1.37 (h, $^3J = 7.3$ Hz, 2H), 2.65 (q, $^3J = 6.7$ Hz, 2H), 4.79 (s, 2H), 7.04 – 7.13 (m, 2H), 7.44 (t, $^3J = 5.9$ Hz, 1H), 7.62 – 7.78 (m, 2H), 13.15 (s, 1H); HR-MS: m/z 274,0743 $[M+H]^+$, berechnet für $C_{11}H_{16}NO_5S^+$: 274,0744.

7.3.52. 2-[4-(Isobutylsulfamoyl)phenoxy]essigsäure (48b)

Nach AAV7 wird Methyl-2-[4-(isobutanylsulfamoyl)phenoxy]acetat (**47b**; 64 mg; 0,21 mmol) umgesetzt.

Es werden 15,6 mg (26 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 288,1 $[M+H]^+$; HPLC: 12,67 min (>99 %); 1H -NMR (701 MHz; DMSO- d_6): δ 0.80 (d, $^3J = 6.7$ Hz, 6H), 1.57 – 1.64 (m, 1H), 2.49 (d, $^3J = 6.4$ Hz, 2H), 4.79 (s, 2H), 6.90 – 7.17 (m, 2H), 7.46 (t, $^3J = 6.2$ Hz, 1H), 7.70 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 2H), 13.16 (s, 1H); HR-MS: m/z 288,0896 $[M+H]^+$, berechnet für $C_{12}H_{18}NO_5S^+$: 288,0900.

7.3.53. 2-[4-(Benzylsulfamoyl)phenoxy]essigsäure (48c)

Nach AAV7 wird Methyl-2-[4-(benzylsulfamoyl)phenoxy]acetat (**47c**; 80 mg; 0,24 mmol) umgesetzt.

Es werden 17,4 mg (23 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 344,1 [M+Na]⁺; HPLC: 13,33 min (95,8 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-d₆): δ 3.94 (d, ³J = 6.3 Hz, 2H), 4.80 (s, 2H), 7.05 – 7.13 (m, 2H), 7.20 – 7.25 (m, 3H), 7.26 – 7.31 (m, 2H), 7.70 – 7.76 (m, 2H), 8.01 (t, ³J = 6.4 Hz, 1H), 13.16 (s, 1H); HR-MS: m/z 322,0740 [M+H]⁺, berechnet für C₁₅H₁₆NO₅S⁺: 322,0744.

7.3.54. (2S)-4-Methylsulfanyl-2-[(4-sulfamoylphenyl)carbamoylamino]buttersäure (49a)

Nach AAV8 wird Methyl-(2S)-4-methylsulfanyl-2-[(4-sulfamoylphenyl)-carbamoylamino]-butanoat (**51a**; 230 mg; 0,6 mmol) umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Es werden 3 mg (1 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 347,8 [M+H]⁺; HPLC: 9,25 min (92,0 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-d₆): δ 1.85 – 1.92 (m, 1H), 1.97 – 2.04 (m, 1H), 2.06 (s, 3H), 4.27 – 4.32 (m, 1H), 6.68 (d, ³J = 7.9 Hz, 1H), 7.18 (s, 2H), 7.51 – 7.55 (m, 2H), 7.65 – 7.69 (m, 2H), 9.01 (s, 1H), 12.84 (s, 1H); HR-MS: m/z 348,0649 [M+H]⁺, berechnet für C₁₂H₁₈N₃O₅S₂⁺: 348,0682.

7.3.55. 2-[(4-Sulfamoylphenyl)carbamoylamino]essigsäure (49b)

Nach AAV8 wird Methyl-2-[(4-sulfamoylphenyl)carbamoylamino]acetat (**51b**; 167 mg; 0,6 mmol) umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels präparativer HPCL (puriFlash Gradient 5-5-50-95) aufgereinigt.

Es werden 49 mg (31 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 274,0 [M+H]⁺; HPLC: 5,47 min (97,8 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-d₆): δ 3.80 (d, ³J = 5.7 Hz, 2H), 6.52 (t, ³J = 5.7 Hz, 1H), 7.17 (s, 2H), 7.47 – 7.61 (m, 2H), 7.62 – 7.87 (m, 2H), 9.19 (s, 1H), 12.62 (s, 1H); HR-MS: m/z 274,0469 [M+H]⁺, berechnet für C₉H₁₂N₃O₅S⁺: 274,0492.

7.3.56. (2S)-2-[(4-Sulfamoylphenyl)carbamoylamino]capronsäure (49c)

Nach AAV8 wird Methyl-rac-(2S)-2-[(4-sulfamoylphenyl)carbamoylamino]-hexanoat (**51c**; 87 mg; 0,25 mmol) umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels C₁₈-Flashchromatographie aufgereinigt.

Es werden 40 mg (48 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 330,3 [M+H]⁺; HPLC: 10,96 min (>99 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-d₆): δ 0.88 (t, ³J = 6.9 Hz, 3H), 1.23 – 1.38 (m, 4H), 1.58 – 1.66 (m, 1H), 1.70 – 1.78 (m, 1H), 4.05 – 4.27 (m, 1H), 6.62 (d, ³J = 7.9 Hz, 1H), 7.18 (s, 2H), 7.53 (d, ³J = 8.7 Hz, 2H), 7.68 (d, ³J = 8.7 Hz, 2H), 9.01 (s, 1H), 12.72 (s, 1H); HR-MS: m/z 330,1087 [M+H]⁺, berechnet für C₁₃H₂₀N₃O₅S⁺: 330,1118.

7.3.57. Methyl-(2S)-2-(ethylcarbamoylamino)-4-methylsulfanyl-butanoat (50a)

Nach AAV9 wird L-Methionin-methylester-hydrochlorid (**52a**; 100 mg; 0,5 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Ethylisocyanat (**53a**; 36 mg; 0,5 mmol; 1 Äq.) und Triethylamin (51 mg; 0,5 mmol; 1 Äq.) umgesetzt. Das Rohprodukt wird nicht weiter aufgereinigt.

Es werden 75 mg (64 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 235,1 [M+H]⁺; HPLC: 8,88 min (41,0 %).

7.3.58. Methyl-(2S)-2-(tert-butylcarbamoylamino)-4-methylsulfanyl-butanoat (50b)

Nach AAV9 wird L-Methionin-methylester-hydrochlorid (**52a**; 200 mg; 1,0 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 2-Isocyanato-2-methylpropan (**53b**; 99 mg; 1,0 mmol; 1 Äq.) und Triethylamin (101 mg; 1,0 mmol; 1 Äq.) umgesetzt. Das Rohprodukt wird nicht weiter aufgereinigt.

Es werden 188 mg (71 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 285,1 [M+Na]⁺; HPLC: 12,61 min (>99 %).

7.3.59. Methyl-(2S)-2-(cyclohexylcarbamoylamino)-4-methylsulfanyl-butanoat (50c)

Nach AAV9 wird L-Methionin-methylester-hydrochlorid (**52a**; 200 mg; 1,0 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Isocyanatocyclohexan (**53c**; 125 mg; 1,0 mmol; 1 Äq.) und Triethylamin (101 mg; 1,0 mmol; 1 Äq.) umgesetzt. Das Rohprodukt wird nicht weiter aufgereinigt.

Es werden 210 mg (72 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 311,2 $[M+Na]^+$; HPLC: 13,92 min (>99 %).

7.3.60. Methyl-(2S)-2-(phenylcarbamoylamino)-4-methylsulfanyl-butanoat (50d)

Nach AAV9 wird L-Methionin-methylester-hydrochlorid (**52a**; 200 mg; 1,0 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 1-Isocyanatobenzol (**53d**; 119 mg; 1,0 mmol; 1 Äq.) und Triethylamin (101 mg; 1,0 mmol; 1 Äq.) umgesetzt. Das Rohprodukt wird nicht weiter aufgereinigt.

Es werden 277 mg (98 %) eines farblosen Öls erhalten.

ESI-MS: m/z 305,2 $[M+Na]^+$; HPLC: 14,03 min (73,1 %).

7.3.61. Methyl-(2S)-2-(benzylcarbamoylamino)-4-methylsulfanyl-butanoat (50e)

Nach AAV9 wird L-Methionin-methylester-hydrochlorid (**52a**; 200 mg; 1 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Benzylisocyanat (**53e**; 133 mg; 1,0 mmol; 1 Äq.) und Triethylamin (101 mg; 1,0 mmol; 1 Äq.) umgesetzt. Das Rohprodukt wird nicht weiter aufgereinigt.

Es werden 267 mg (90 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 318,9 $[M+Na]^+$; HPLC: 13,36 min (>99 %).

7.3.62. Methyl-(2S)-2-(Phenylethylcarbamoylamino)-4-methylsulfanyl-butanoat (50f)

Nach AAV9 wird L-Methionin-methylester-hydrochlorid (**52a**; 200 mg; 1 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Phenylethylisocyanat (**53f**; 147 mg; 1,0 mmol; 1 Äq.) und Triethylamin (101 mg; 1,0 mmol; 1 Äq.) umgesetzt. Das Rohprodukt wird nicht weiter aufgereinigt.

Es werden 259 mg (83 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 332,8 $[M+Na]^+$; HPLC: 14,29 min (96,2 %).

7.3.63. Methyl-(2S)-2-[(4-methoxyphenyl)carbamoylamino]-4-methylsulfanyl-butanoat (50g)

Nach AAV9 wird L-Methionin-methylester-hydrochlorid (**52a**; 200 mg; 1 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 1-Isocyanato-4-methoxybenzol (**53g**; 149 mg; 1,0 mmol; 1 Äq.) und Triethylamin (101 mg; 1,0 mmol; 1 Äq.) umgesetzt. Das Rohprodukt wird nicht weiter aufgereinigt.

Es werden 279 mg (89 %) eines gelben Festoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 313,1 $[M+H]^+$; HPLC: 13,55 min (91,5 %).

7.3.64. Methyl-(2S)-2-[(3-methoxyphenyl)carbamoylamino]-4-methylsulfanyl-butanoat (50h)

Nach AAV9 wird L-Methionin-methylester-hydrochlorid (**52a**; 200 mg; 1 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 1-Isocyanato-3-methoxybenzol (**53h**; 149 mg; 1,0 mmol; 1 Äq.) und Triethylamin (101 mg; 1,0 mmol; 1 Äq.) umgesetzt. Das Rohprodukt wird nicht weiter aufgereinigt.

Es werden 275 mg (88 %) eines gelben Öls erhalten.

ESI-MS: m/z 335,0 $[M+Na]^+$; HPLC: 14,29 min (91,8 %).

7.3.65. Methyl-(2S)-2-(1-naphtylcarbamoylamino)-4-methylsulfanyl-butanoat (50i)

Nach AAV9 wird L-Methionin-methylester-hydrochlorid (**52a**; 200 mg; 1 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 1-Isocyanatonaphtalen (**53i**; 169 mg; 1,0 mmol) und Triethylamin (101 mg; 1,0 mmol; 1 Äq.) umgesetzt. Das Rohprodukt wird nicht weiter aufgereinigt.

Es werden 228 mg (69 %) eines gelben Festoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 333,3 $[M+H]^+$; HPLC: 15,71 min (93,3 %).

7.3.66. Methyl-(2S)-2-(isoindoline-2-carboxylamino)-4-methylsulfanyl-butanoat (50j)

Nach AAV10 wird L-Methionin-methylester-hydrochlorid (**52a**; 200 mg; 1 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Isoindolin **54b**; 238 mg; 2 mmol) umgesetzt. Das Rohprodukt wird nicht weiter aufgereinigt.

Es werden 277 mg (90 %) eines roten Öls erhalten.

ESI-MS: m/z 309,1 [M+H]⁺; HPLC: 14,03 min (70,2 %).

7.3.67. Methyl (2S)-4-methylsulfanyl-2-[(4-sulfamoylphenyl)carbamoylamino]butanoat (51a)

Nach AAV10 wird L-Methionin-methylester-hydrochlorid (**52a**; 399 mg; 2,0 mmol; 1 Äq.) mit Sulfanilamid **54a**; 344 mg; 2,0 mmol; 1 Äq.) umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels Silica-Flash-Chromatographie (puriFlash DCM/MeOH) aufgereinigt.

Es werden 809 mg (112 %) eines gelben Öls erhalten.

ESI-MS: m/z 384,2 [M+Na]⁺; HPLC: 9,52 min (32,7 %).

7.3.68. Methyl 2-[(4-sulfamoylphenyl)carbamoylamino]acetat (51b)

Nach AAV10 wird Glycin-methylester-hydrochlorid (**52b**; 126 mg; 1,0 mmol; 1 Äq.) mit Sulfanilamid **54a**; 344 mg; 2,0 mmol; 2 Äq.) umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels Silica-Flash-Chromatographie (puriFlash DCM/MeOH) aufgereinigt.

Es werden 167 mg (58 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 385,9 [M-H]⁻; HPLC: 6,91 min (27,3 %).

7.3.69. Methyl (2S)-2-[(4-sulfamoylphenyl)carbamoylamino]hexanoat (51c)

Nach AAV10 werden L-Norleucin-methylester-hydrochlorid (**52c**; 182 mg; 1,0 mmol; 1 Äq.) und **54a**; 344 mg; 2,0 mmol; 2 Äq.) umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels Silica-Flash-Chromatographie (puriFlash DCM/MeOH) aufgereinigt.

Es werden 87 mg (25 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 344,2 $[M+H]^+$; HPLC: 13,01 min (71,8 %).

7.3.70. (2S)-2-(Ethylcarbamoylamino)-4-methylsulfanyl-buttersäure (55a)

Nach AAV7 wird Methyl-(2S)-2-(ethylcarbamoylamino)-4-methylsulfanyl-butanoat (**50a**; 75 mg; 0,3 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Natriumhydroxid (51 mg; 1,28 mmol; 4 Äq.) umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Es werden 8 mg (12 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 243,1 $[M+Na]^+$; HPLC: 7,36 min (88,7 %); 1H -NMR (701 MHz; DMSO- d_6): δ 0.97 (t, $^3J = 7.2$ Hz, 3H), 1.71 – 1.82 (m, 1H), 1.85 – 1.96 (m, 1H), 2.03 (s, 3H), 2.45 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 2H), 2.94 – 3.05 (m, 2H), 4.15 – 4.20 (m, 1H), 5.94 (t, $^3J = 5.6$ Hz, 1H), 6.14 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 1H), 12.56 (s, 1H); HR-MS: m/z 221,0939 $[M+H]^+$ $[M+H]^+$, berechnet für $C_8H_{17}N_2O_3S^+$: 221,0954.

7.3.71. (2S)-2-(tert-Butylcarbamoylamino)-4-methylsulfanyl-buttersäure (55b)

Nach AAV7 wird Methyl-(2S)-2-(tert-butylcarbamoylamino)-4-methylsulfanyl-butanoat (**50b**; 188 mg; 0,7 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Natriumhydroxid (115 mg; 2,87 mmol; 4 Äq.) umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels C_{18} -Flash-Chromatographie aufgereinigt.

Es werden 31 mg (18 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 271,2 $[M+Na]^+$; HPLC: 10,67 min (91,2 %); 1H -NMR (701 MHz; DMSO- d_6): δ 1.20 (s, 9H), 1.68 – 1.77 (m, 1H), 1.85 – 1.92 (m, 1H), 2.03 (s, 3H), 2.41 – 2.46 (m, 2H), 4.07 – 4.22 (m, 1H), 5.84 (s, 1H), 5.98 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 1H), 12.54 (s, 1H); HR-MS: m/z 249,1250 $[M+H]^+$, berechnet für $C_{10}H_{21}N_2O_3S^+$: 249,1267.

7.3.72. (2S)-2-(Cyclohexylcarbamoylamino)-4-methylsulfanyl-buttersäure (55c)

Nach AAV7 wird Methyl-(2S)-2-(cyclohexylcarbamoylamino)-4-methylsulfanylbutanoat (**50c**; 210 mg; 0,73 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Natriumhydroxid (116 mg; 2,91 mmol; 4 Äq.) umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels C₁₈-Flash-Chromatographie aufgereinigt.

Es werden 88 mg (44 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 297,2 [M+Na]⁺; HPLC: 12,08 min (>99 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-d₆): δ 1.01 – 1.17 (m, 3H), 1.20 – 1.29 (m, 2H), 1.46 – 1.55 (m, 1H), 1.59 – 1.66 (m, 2H), 1.69 – 1.80 (m, 3H), 1.86 – 1.94 (m, 1H), 2.03 (s, 3H), 2.44 (t, ³J = 7.6 Hz, 2H), 3.26 – 3.38 (m, 1H), 4.10 – 4.24 (m, 1H), 5.92 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H), 6.04 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H), 12.58 (s, 1H); HR-MS: m/z 275,1404 [M+H]⁺, berechnet für C₁₂H₂₃N₂O₃S⁺: 275,1424.

7.3.73. (2S)-2-(Phenylcarbamoylamino)-4-methylsulfanyl-buttersäure (55d)

Nach AAV7 wird Methyl-(2S)-2-(phenylcarbamoylamino)-4-methylsulfanylbutanoat (**50d**; 277 mg; 0,99 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Natriumhydroxid (156 mg; 3,92 mmol; 4 Äq.) umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels C₁₈-Flash-Chromatographie aufgereinigt.

Es werden 133 mg (50 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 291,1 [M+Na]⁺; HPLC: 11,87 min (>99 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-d₆): δ 1.82 – 1.90 (m, 1H), 1.96 – 2.03 (m, 1H), 2.06 (s, 3H), 2.50 – 2.53 (m, 2H), 4.25 – 4.31 (m, 1H), 6.49 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H), 6.90 (t, ³J = 7.3 Hz, 1H), 7.18 – 7.25 (m, 2H), 7.35 – 7.40 (m, 2H), 8.59 (s, 1H), 12.78 (s, 1H); HR-MS: m/z 269,0936 [M+H]⁺, berechnet für C₁₂H₁₇N₂O₃S⁺: 269,0954.

7.3.74. (2S)-2-(Benzylcarbamoylamino)-4-methylsulfanyl-buttersäure (55e)

Nach AAV7 wird Methyl-(2S)-2-(benzylcarbamoylamino)-4-methylsulfanylbutanoat (**50e**; 267 mg; 0,9 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Natriumhydroxid (144 mg; 3,6 mmol; 1 Äq.) umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Es werden 73 mg (28 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 305,1 [M+Na]⁺; HPLC: 11,55 min (>99 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-d₆): δ 1.74 – 1.84 (m, 1H), 1.89 – 1.98 (m, 1H), 2.04 (s, 3H), 2.46 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H), 4.13 – 4.30 (m, 3H), 6.31 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H), 6.48 (t, ³J = 6.1 Hz, 1H), 7.20 – 7.33 (m, 5H), 12.62 (s, 1H); HR-MS: m/z 283,1112 [M+H]⁺, berechnet für C₁₃H₁₉N₂O₃S⁺: 283,1111.

7.3.75. (2S)-2-(Phenylethylcarbamoylamino)-4-methylsulfanyl-buttersäure (55f)

Nach AAV7 wird Methyl-(2S)-2-(phenylethylcarbamoylamino)-4-methylsulfanyl-butanoat (**50f**; 259 mg; 0,8 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Natriumhydroxid (133 mg; 3,34 mmol; 4 Äq.) umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels C₁₈-Flash-Chromatographie aufgereinigt.

Es werden 91 mg (37 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 319,0 [M+Na]⁺; HPLC: 12,48 min (97,5 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-d₆): δ 1.72 – 1.80 (m, 1H), 1.87 – 1.94 (m, 1H), 2.03 (s, 3H), 2.44 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H), 2.67 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H), 3.17 – 3.25 (m, 2H), 4.16 – 4.22 (m, 1H), 5.98 (t, ³J = 5.8 Hz, 1H), 6.25 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H), 7.17 – 7.23 (m, 3H), 7.26 – 7.33 (m, 2H), 12.58 (s, 1H); HR-MS: m/z 297,1241 [M+H]⁺, berechnet für C₁₄H₂₁N₂O₃S⁺: 297,1267.

7.3.76. (2S)-2-[(4-Methoxyphenyl)carbamoylamino]-4-methylsulfanyl-buttersäure (55g)

Nach AAV7 werden Methyl-(2S)-2-[(4-methoxyphenyl)carbamoylamino]-4-methylsulfanyl-butanoat (**50h**; 279 mg; 0,89 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Natriumhydroxid (143 mg; 3,57 mmol; 4 Äq.) umgesetzt. Das Rohprodukt wird zweimal mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Es werden 74 mg (28 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 299,1 [M+H]⁺; HPLC: 11,55 min (>99 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-d₆): δ 1.78 – 1.90 (m, 1H), 1.93 – 2.02 (m, 1H), 2.05 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 4.13 – 4.36 (m, 1H), 6.38 (d, ³J = 8.1 Hz, 1H), 6.77 – 6.85 (m, 2H), 7.22 – 7.31 (m, 2H), 8.40 (s, 1H), 12.74 (s, 1H); HR-MS: m/z 299,1030 [M+H]⁺, berechnet für C₁₃H₁₉N₂O₄S⁺: 299,1060.

7.3.77. (2S)-2-[(3-Methoxyphenyl)carbamoylamino]-4-methylsulfanyl-buttersäure (55h)

Nach AAV7 wird Methyl-(2S)-2-[(3-methoxyphenyl)carbamoylamino]-4-methylsulfanyl-butanoat (**50h**; 275 mg; 0,88 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Natriumhydroxid (141 mg; 3,52 mmol; 4 Äq.) umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels C₁₈-Flash-Chromatographie aufgereinigt.

Es werden 119 mg (45 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 299,2 [M+H]⁺; HPLC: 12,24 min (>99 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-d₆): δ 1.82 – 1.89 (m, 1H), 1.96 – 2.03 (m, 1H), 2.05 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 4.20 – 4.39 (m, 1H), 6.34 – 6.56 (m, 2H), 6.73 – 6.90 (m, 1H), 6.97 – 7.21 (m, 2H), 8.61 (s, 1H), 12.78 (s, 1H); HR-MS: m/z 299,1032 [M+H]⁺, berechnet für C₁₃H₁₉N₂O₄S⁺: 299,1060.

7.3.78. (2S)-2-(1-Naphtylcarbamoylamino)-4-methylsulfanyl-buttersäure (55i)

Nach AAV7 wird Methyl-(2S)-2-(1-naphtylcarbamoylamino)-4-methylsulfanylbutanoat (**50i**; 228 mg; 0,68 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Natriumhydroxid (109 mg; 2,74 mmol; 4 Äq.) umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels C₁₈-Flash-Chromatographie aufgereinigt.

Es werden 15 mg (7 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 319,2 [M+H]⁺; HPLC: 13,73 min (>99 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-d₆): δ 1.87 – 1.95 (m, 1H), 2.01 – 2.07 (m, 1H), 2.08 (s, 3H), 2.53 – 2.58 (m, 2H), 4.34 – 4.38 (m, 1H), 7.01 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H), 7.42 (t, ³J = 7.9 Hz, 1H), 7.52 (t, ³J = 7.4 Hz, 1H), 7.56 (t, ³J = 7.3 Hz, 2H), 7.90 (d, ³J = 8.1 Hz, 1H), 8.01 (d, ³J = 7.6 Hz, 1H), 8.11 (d, ³J = 8.4 Hz, 1H), 8.69 (s, 1H), 12.83 (s, 1H); HR-MS: m/z 319,1082 [M+H]⁺, berechnet für C₁₆H₁₉N₂O₃S⁺: 319,1111.

7.3.79. (2S)-2-(Isoindolin-2-carbonylamino)-4-methylsulfanylbuttersäure (55j)

Nach AAV8 wird Methyl-(2S)-2-(isoindoline-2-carbonylamino)-4-methylsulfanylbutanoat (**50j**; 277 mg; 0,25 mmol) umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels C₁₈-Flashchromatographie aufgereinigt.

Es werden 106 mg (40 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 295,1 [M+H]⁺; HPLC: 12,32 min (>99 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-d₆): δ 1.92 – 2.04 (m, 2H), 2.06 (s, 3H), 2.52 – 2.65 (m, 2H), 4.20 – 4.29 (m, 1H), 4.52 – 4.75 (m, 4H), 6.52 (d, ³J = 8.1 Hz, 1H), 7.20 – 7.43 (m, 4H), 12.50 (s, 1H); HR-MS: m/z 295,1082 [M+H]⁺, berechnet für C₁₄H₁₉N₂O₃S⁺: 295,1111.

7.3.80. 2-(*p*-Tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzoesäure (58)

Nach AAV11 wird 2-Amino-4-(trifluormethyl)benzoesäure (**57**; 2,05 g; 10 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Natriumcarbonat (2,64 g; 25 mmol; 2,5 Äq.) und *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (1,91 g; 10 mmol; 1 Äq.) umgesetzt.

Es werden 2,6 g (73 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 382,1 [M+Na]⁺; HPLC: 18,67 min (94,0 %).

7.3.81. 2-(*p*-Tolylsulfonylamino)-*N*-(4-pyridyl)-4-(trifluormethyl)benzamid (59a)

Nach AAV12 wird 2-(*p*-Tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzoesäure (**57**; 107 mg; 0,3 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Aminopyridin (28 mg; 0,3 mmol; 1 Äq.), TBTU (144 mg; 0,45 mmol; 1,5 Äq.) und DIPEA (205 µL; 152 mg; 1,2 mmol; 4 Äq.) bei 80 °C umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 17 h.

Es werden 87 mg (67 %) eines roten Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 436,2 [M+H]⁺; HPLC: 12,85 min (> 99%); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-d₆): δ 2.30 (s, 3H), 7.28 – 7.34 (m, 2H), 7.34 – 7.39 (m, 1H), 7.54 – 7.61 (m, 2H), 7.64 – 7.73 (m, 1H), 7.86 – 7.93 (m, 1H), 8.08 – 8.17 (m, 2H), 8.74 – 8.83 (m, 2H), 11.85 (s, 1H)); HR-MS: m/z 436.0904 [M+H]⁺, berechnet für C₂₀H₁₇F₃N₃O₃S⁺: 436.0937.

7.3.82. *N*-Ethyl-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (59b)

Nach AAV12 wird 2-(*p*-Tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzoesäure (**57**; 190 mg; 0,53 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Ethylaminhydrochlorid (43 mg; 0,53 mmol; 1 Äq.), TBTU (203 mg; 0,63 mmol; 1,2 Äq.) und DIPEA (362 µL; 269 mg; 2,1 mmol; 4 Äq.) bei 80 °C umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 72 h.

Es werden 8 mg (4 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 387,1 [M+H]⁺; HPLC: 19,12 min (96,0 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-*d*₆): δ 1.12 – 1.29 (m, 3H), 2.30 – 2.44 (m, 3H), 3.31 – 3.50 (m, 2H), 6.05 (s, 1H), 7.20 – 7.25 (m, 2H), 7.27 – 7.29 (m, 1H), 7.34 – 7.58 (m, 1H), 7.56 – 7.85 (m, 2H), 7.81 – 8.13 (m, 1H), 10.79 (s, 1H); HR-MS: m/z 387.0958 [M+H]⁺, berechnet für C₁₇H₁₈F₃N₂O₃S⁺: 387.0985.

7.3.83. *N*-Phenyl-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (59c)

Nach AAV12 wird 2-(*p*-Tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzoesäure (**57**; 180 mg; 0,5 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Anilin (93 mg; 0,5 mmol; 1 Äq.), TBTU (193 mg; 0,6 mmol; 1,2 Äq.) und DIPEA (342 µL; 253 mg; 2 mmol; 4 Äq.) bei 80 °C umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 72 h.

Es werden 100 mg (46 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 435,1 [M+H]⁺; HPLC: 20,51 min (>99 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-*d*₆): δ 2.28 (s, 3H), 7.13 – 7.19 (m, 1H), 7.26 – 7.32 (m, 2H), 7.35 – 7.42 (m, 2H), 7.57 – 7.70 (m, 6H), 7.89 – 7.96 (m, 1H), 10.48 (s, 1H), 10.57 (s, 1H); HR-MS: m/z 435.0971 [M+H]⁺, berechnet für C₂₁H₁₈F₃N₂O₃S⁺ 435.0985.

7.3.84. *N*-Benzyl-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (59d)

Nach AAV12 werden 2-(*p*-Tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzoesäure (**57**; 180 mg; 0,5 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Benzylamin (53 mg; 0,5 mmol; 1 Äq.), TBTU (193 mg; 0,6 mmol; 1,2 Äq.) und DIPEA (342 µL; 253 mg; 2 mmol; 4 Äq.) umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 30 min.

Es werden 37 mg (17 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 471,4 [M+Na]⁺; HPLC: 20,53 min (97,7 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-*d*₆): δ 2.32 (s, 3H), 4.45 (d, ³J = 5.8 Hz, 2H), 7.27 – 7.33 (m, 5H), 7.37 (t, ³J = 7.6 Hz, 2H), 7.56 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H), 7.58 – 7.62 (m, 2H), 7.74 (s, 1H), 7.95 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H), 9.54 (t, ³J = 5.9 Hz, 1H), 11.53 (s, 1H); HR-MS: m/z 449.1114 [M+H]⁺, berechnet für C₂₂H₂₀F₃N₂O₃S⁺: 449.1141.

7.3.85. *N*-(2-Phenylethyl)-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (59e)

Nach AAV12 wird 2-(*p*-Tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzoesäure (**57**; 180 mg; 0,5 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Phenylethylamin (121 mg; 1 mmol; 2 Äq.), TBTU (193 mg; 0,6 mmol; 1,2 Äq.) und

DIPEA (342 μL ; 253 mg; 2 mmol; 4 Äq.) bei 120 °C in der Mikrowelle umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 30 min.

Es werden 9 mg (4 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 485,5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HPLC: 20,88 min (>99 %); $^1\text{H-NMR}$ (701 MHz; DMSO-d_6): δ 2.32 (s, 3H), 2.80 (t, $^3\text{J} = 7.4$ Hz, 2H), 3.43 – 3.48 (m, 2H), 7.20 – 7.24 (m, 3H), 7.30 (t, $^3\text{J} = 7.5$ Hz, 2H), 7.36 (d, $^3\text{J} = 8.0$ Hz, 2H), 7.55 (d, $^3\text{J} = 8.4$ Hz, 1H), 7.63 (d, $^3\text{J} = 8.1$ Hz, 2H), 7.72 (s, 1H), 7.83 (d, $^3\text{J} = 8.2$ Hz, 1H), 9.03 – 9.13 (m, 1H), 11.56 (s, 1H), berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3\text{S}^+$: 463.1298.

7.3.86. *N*-(4-Phenylphenyl)-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (59f)

Nach AAV12 wird 2-(*p*-Tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzoesäure (**57**; 180 mg; 0,5 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 4-Aminobiphenyl (169 mg; 0,5 mmol; 1 Äq.), TBTU (401 mg; 1,25 mmol; 2,5 Äq.) und DIPEA (342 μL ; 253 mg; 2 mmol; 4 Äq.) bei 120 °C in der Mikrowelle umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 30 min.

Es werden 79 mg (31 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 509,6 $[\text{M-H}]^-$; HPLC: 22,03 min (>99 %); $^1\text{H-NMR}$ (701 MHz; DMSO-d_6): δ 2.29 (s, 3H), 7.30 (d, $^3\text{J} = 8.1$ Hz, 2H), 7.36 (t, $^3\text{J} = 7.4$ Hz, 1H), 7.47 (t, $^3\text{J} = 7.7$ Hz, 2H), 7.59 – 7.62 (m, 1H), 7.65 (d, $^3\text{J} = 8.2$ Hz, 3H), 7.68 – 7.73 (m, 4H), 7.75 – 7.79 (m, 2H), 7.94 (d, $^3\text{J} = 8.0$ Hz, 1H), 10.55 – 10.59 (m, 2H); HR-MS: m/z 509.2498 $[\text{M-H}]^-$, berechnet für $\text{C}_{27}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$: 509.1152.

7.3.87. *N*-(3-Phenylphenyl)-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (59g)

Nach AAV12 wird 2-(*p*-Tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzoesäure (**57**; 207 mg; 0,58 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 3-Aminobiphenyl (97 mg; 0,58 mmol; 1 Äq.), TBTU (462 mg; 1,44 mmol; 2,5 Äq.) und DIPEA (394 μL ; 298 mg; 2,3 mmol; 4 Äq.) bei 120 °C in der Mikrowelle umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 30 min.

Es werden 137 mg (46 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 509,4 $[\text{M-H}]^-$; HPLC: 22,0 min (>99 %); $^1\text{H-NMR}$ (701 MHz; DMSO-d_6): δ 2.10 – 2.28 (m, 3H), 7.21 – 7.33 (m, 2H), 7.37 – 7.43 (m, 1H), 7.44 – 7.55 (m, 4H), 7.55 – 7.72 (m, 7H), 8.89 – 7.03 (m, 2H), 10.42 – 10.75 (m, 2H); HR-MS: m/z 509.2493 $[\text{M-H}]^-$, berechnet für $\text{C}_{27}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$: 509.1152.

7.3.88. *N*-(2-naphthyl)-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (59h)

Nach AAV12 werden 2-(*p*-Tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzoesäure (**57**; 180 mg; 0,5 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 2-Naphtylamin (72 mg; 0,5 mmol; 1 Äq.), TBTU (401 mg; 1,25 mmol; 2,5 Äq.) und DIPEA (342 μ L; 253 mg; 2 mmol; 4 Äq.) bei 120 °C in der Mikrowelle umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 30 min.

Es werden 96 mg (40 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 483,4 [M-H]⁻; HPLC: 21,55 min (>99 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-*d*₆): δ 2.26 (s, 3H), 7.28 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H), 7.44 – 7.49 (m, 1H), 7.50 – 7.55 (m, 1H), 7.59 – 7.63 (m, 1H), 7.66 (d, ³J = 8.1 Hz, 3H), 7.67 – 7.71 (m, 1H), 7.86 – 7.96 (m, 3H), 7.98 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H), 8.34 – 8.39 (m, 1H), 10.59 (s, 1H), 10.69 (s, 1H); HR-MS: m/z 483.2470 [M-H]⁻, berechnet für C₂₅H₁₈F₃N₂O₃S: 483.0996.

7.3.89. 2-Amino-*N*-(4-phenylthiazol-2-yl)-4-(trifluormethyl)benzamid (60)

Nach AAV12 wird 2-Amino-4-(trifluormethyl)benzoesäure (**57**; 103 mg; 0,5 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 4-Phenylthiazol-2-amin (176 mg; 0,5 mmol; 1 Äq.), TBTU (193 mg; 0,6 mmol; 1,2 Äq.) und DIPEA (342 μ L; 253 mg; 2 mmol; 4 Äq.) bei 80 °C umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 3 h.

Es werden 25 mg (14 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 362,6 [M-H]⁻; HPLC: 20,21 min (97,9 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-*d*₆): δ 6.83 (dd, ³J = 8.4, 1.9 Hz, 1H), 7.15 (d, ³J = 1.9 Hz, 1H), 7.34 (t, ³J = 7.4 Hz, 1H), 7.45 (t, ³J = 7.6 Hz, 2H), 7.70 (s, 1H), 7.95 (d, ³J = 7.7 Hz, 2H), 8.05 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H), 12.68 (s, 1H); HR-MS: m/z 362.2473 [M-H]⁻, berechnet für C₁₇H₁₃F₃N₃OS⁺: 364.0726.

7.3.90. 2-(Benzolsulfonamido)-*N*-(4-phenylthiazol-2-yl)-4-(trifluormethyl)benzamid (61a)

Nach AAV6 wird 2-Amino-*N*-(4-phenylthiazol-2-yl)-4-(trifluormethyl)benzamid (**60**; 182 mg; 0,5 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Benzolsulfonsäurechlorid (64 μ L; 88 mg; 0,5 mmol; 1 Äq.) und Triethylamin (174 μ L; 1,25 mmol; 2,5 Äq.) über Nacht umgesetzt.

Es werden 10 mg (4 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 504,1 [M+H]⁺; HPLC: 21,12 min (96,7 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-d₆): δ 7.41 – 7.32 (m, 2H) 7.46 (d, ³J = 7.6 Hz, 2H), 7.53 (t, ³J = 7.7 Hz, 2H), 7.61 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H), 7.75 (d, ³J = 8.0 Hz, 3H), 7.95 (d, ³J = 7.8 Hz, 3H), 10.43 (s, 1H), 12.88 (s, 1H); HR-MS: 504.0641 [M+H]⁺, berechnet für C₂₃H₁₇F₃N₃O₃S₂⁺: 504.0658.

7.3.91. 2-[Bis(methylsulfonyl)amino]-*N*-(4-phenylthiazol-2-yl)-4-(trifluormethyl)benzamide (61b)

Nach AAV6 wird 2-Amino-*N*-(4-phenylthiazol-2-yl)-4-(trifluormethyl)benzamid (**60**; 182 mg; 0,5 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Methansulfonsäurechlorid (39 µl; 57 mg; 0,5 mmol; 1 Äq.) und 174 µl Triethylamin (174 µl; 1,25 mmol; 2,5 Äq.) über Nacht umgesetzt.

Es werden 15 mg (6 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 520,3 [M+H]⁺; HPLC: 20,96 min (>99 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-d₆): δ 3.48 (s, 6H), 7.20 (s, 1H), 7.29 – 7.34 (m, 1H), 7.36 – 7.42 (m, 2H), 7.57 – 7.65 (m, 3H), 7.77 (d, ³J = 7.7 Hz, 2H), 10.45 (s, 1H).

7.3.92. 2-(Cyclohexylsulfonylamino)-*N*-(4-phenylthiazol-2-yl)-4-(trifluormethyl)benzamid (61c)

Nach AAV6 wird 2-Amino-*N*-(4-phenylthiazol-2-yl)-4-(trifluormethyl)benzamid (**60**; 182 mg; 0,5 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Cyclohexansulfonsäurechlorid (73 µl; 91 mg; 0,5 mmol; 1 Äq.) und Triethylamin (174 µl; 1,25 mmol; 2,5 Äq.) über Nacht umgesetzt.

Es werden 4 mg (2 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 508,4 [M-H]⁻; HPLC: 26,85 min (>99 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-d₆): δ 1.05 – 1.14 (m, 1H), 1.16 – 1.26 (m, 2H), 1.35 – 1.45 (m, 2H), 1.51 – 1.60 (m, 1H), 1.67 – 1.76 (m, 2H), 2.01 – 2.09 (m, 2H), 3.16 – 3.26 (m, 1H), 7.31 – 7.38 (m, 1H), 7.42 – 7.48 (m, 2H), 7.64 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.91 – 7.98 (m, 2H), 8.04 (s, 1H), 10.05 (s, 1H), 13.06 (s, 1H); HR-MS: m/z 510.1106 [M+H]⁺, berechnet für C₂₃H₂₃F₃N₃O₃S₂⁺: 510.1127.

7.3.93. 2-(Benzylsulfonylamino)-*N*-(4-phenylthiazol-2-yl)-4-(trifluormethyl)benzamid (61d)

Nach AAV6 wird 2-Amino-*N*-(4-phenylthiazol-2-yl)-4-(trifluormethyl)benzamid (**60**; 182 mg; 0,5 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Phenylmethansulfonsäurechlorid (143 mg; 0,75 mmol; 1,5 Äq.) und Triethylamin (174 µl; 1,25 mmol; 2,5 Äq.) über Nacht umgesetzt.

Es werden 57 mg (22 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 518,2 [M+H]⁺; HPLC: 21,04 min (>99 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-*d*₆): δ 4.73 (s, 2H), 7.20 – 7.26 (m, 3H), 7.29 – 7.33 (m, 2H), 7.34 – 7.39 (m, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.44 – 7.49 (m, 2H), 7.53 (d, ³J = 8.1 Hz, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.98 – 7.93 (m, 2H), 8.07 (s, 1H), 10.12 (s, 1H), 13.12 (s, 1H); HR-MS: m/z 518.0794 [M+H]⁺, berechnet für C₂₄H₁₉F₃N₃O₃S₂⁺: 518.0814.

7.3.94. 2-(2-Naphtylsulfonylamino)-*N*-(4-phenylthiazol-2-yl)-4-(trifluormethyl)benzamid (61e)

Nach AAV6 wird 2-Amino-*N*-(4-phenylthiazol-2-yl)-4-(trifluormethyl)benzamid (**60**; 182 mg; 0,5 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Naphtyl-2-sulfonsäurechlorid (170 mg; 0,75 mmol; 1,5 Äq.) und Triethylamin (174 µl; 1,25 mmol; 2,5 Äq.) über Nacht umgesetzt.

Es werden 39 mg (14 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 554,2 [M+H]⁺; HPLC: 21,95 min (98,5 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-*d*₆): δ 7.32 – 7.39 (m, 1H), 7.44 – 7.51 (m, 3H), 7.57 – 7.63 (m, 2H), 7.65 (t, ³J = 7.4 Hz, 1H), 7.72 – 7.76 (m, 2H), 7.90 – 8.04 (m, 5H), 8.07 (d, ³J = 8.1 Hz, 1H), 8.43 (s, 1H), 10.52 (s, 1H), 12.85 (s, 1H); HR-MS: m/z 554.0792 [M+H]⁺, berechnet für C₂₇H₁₉F₃N₃O₃S₂⁺: 554.0814.

7.3.95. 2-(Isopropylsulfonylamino)-*N*-(4-phenylthiazol-2-yl)-4-(trifluormethyl)benzamid (61f)

Nach AAV6 wird 2-Amino-*N*-(4-phenylthiazol-2-yl)-4-(trifluormethyl)benzamid (**60**; 182 mg; 0,5 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 2-Propansulfonsäurechlorid (84 µl; 107 mg; 0,75 mmol; 1,5 Äq.) und Triethylamin (174 µl; 1,25 mmol; 2,5 Äq.) über Nacht umgesetzt.

Es werden 7 mg (3 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 470,1 [M+H]⁺; HPLC: 24,16 min (>99 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-*d*₆): δ 1.25 – 1.31 (m, 6H), 3.43 – 3.52 (m, 1H), 7.30 – 7.39 (m, 1H), 7.43 – 7.49 (m, 2H), 7.60 – 7.68 (m, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.88

(s, 1H), 7.92 – 7.98 (m, 2H), 8.04 – 8.12 (m, 1H), 10.13 (s, 1H), 13.07 (s, 1H); HR-MS: m/z 470.0787 [M+H]⁺, berechnet für C₂₀H₁₉F₃N₃O₃S₂⁺: 470.0814.

7.3.96. 2-(Phenylethylsulfonylamino)-*N*-(4-phenylthiazol-2-yl)-4-(trifluormethyl)benzamid (61g)

Nach AAV6 wird 2-Amino-*N*-(4-phenylthiazol-2-yl)-4-(trifluormethyl)benzamid (**60**; 182 mg; 0,5 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 2-Propansulfonsäurechlorid (153 mg; 0,75 mmol; 1,5 Äq.) und Triethylamin (174 µl; 1,25 mmol; 2,5 Äq.) über Nacht umgesetzt.

Es werden 29 mg (11 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 532,3 [M+H]⁺; HPLC: 25,89 min (>99 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-*d*₆): δ 3.00 – 3.07 (m, 2H), 3.54 – 3.61 (m, 2H), 7.14 – 7.19 (m, 1H), 7.20 – 7.27 (m, 4H), 7.32 – 7.38 (m, 1H), 7.46 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H), 7.67 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.95 (d, ³J = 7.7 Hz, 2H), 8.04 (s, 1H), 10.19 (s, 1H), 13.04 (s, 1H); HR-MS: m/z 532.0950 [M+H]⁺, berechnet für C₂₅H₂₁F₃N₃O₃S₂⁺: 532.0971.

7.3.97. 2-Phenyl-3-(4-phenylthiazol-2-yl)-7-(trifluormethyl)-1,2-dihydroquinazolin-4-on (62)

2-Amino-*N*-(4-phenylthiazol-2-yl)-4-(trifluormethyl)benzamid (**60**; 182 mg; 0,5 mmol; 1 Äq.) wird in 1 ml DMF gelöst und Benzaldehyd (51 µl; 53 mg; 0,5 mmol; 1 Äq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wird für 30 min bei 130 °C in der Mikrowelle umgesetzt. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit 10 ml Essigester verdünnt und dreimal mit 10 ml ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Silica-Flash-Chromatographie und präparativer HPLC aufgereinigt.

Es werden 7 mg (3 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 452,2 [M+H]⁺; HPLC: 27,17 min (95,4 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-*d*₆): δ 7.08 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H), 7.24 – 7.30 (m, 2H), 7.30 – 7.35 (m, 5H), 7.42 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H), 7.67 (d, ⁴J = 3.8 Hz, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.92 (d, ³J = 7.7 Hz, 2H), 8.00 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H), 8.56 (d, ⁴J = 3.9 Hz, 1H); HR-MS: m/z 452.1021 [M+H]⁺, berechnet für C₂₄H₁₇F₃N₃O₃⁺: 452.1039.

7.3.98. 2-(*p*-Tolylsulfonylamino)benzoesäure (64a)

Nach AAV11 wird Anthranilsäure (**63a**; 137 mg; 1 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Natriumcarbonat (265 mg; 2,5 mmol; 2,5 Äq.) und *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (191 mg; 1 mmol; 1 Äq.) umgesetzt. Das Produkt wird nicht weiter aufgereinigt.

Es werden 324 mg (111 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 314,0 [M+Na]⁺; HPLC: 16,37 min (86,2 %).

7.3.99. 4-Methyl-2-(*p*-tolylsulfonylamino)benzoesäure (64b)

Nach AAV11 wird 2-Amino-4-methylbenzoesäure (**63b**; 151 mg; 1 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Natriumcarbonat (265 mg; 2,5 mmol; 2,5 Äq.) und *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (191 mg; 1 mmol; 1 Äq.) umgesetzt.

Es werden 100 mg (33 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 304,2 [M-H]⁻; HPLC: 17,2 min (87,1 %).

7.3.100. 4-Chlor-2-(*p*-tolylsulfonylamino)benzoesäure (64c)

Nach AAV11b wird 2-Amino-4-chlorbenzoesäure (**63c**; 189 mg; 1,1 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Natriumcarbonat (212 mg; 2 mmol; 1,8 Äq.) und *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (191 mg; 1 mmol; 0,9 Äq.) umgesetzt.

Es werden 282 mg (79 %) eines braunen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 323,9 [M-H]⁻; HPLC: 18,27 min (40,4 %).

7.3.101. 4-Fluor-2-(*p*-tolylsulfonylamino)benzoesäure (64d)

Nach AAV11 wird 2-Amino-4-fluorbenzoesäure (**63c**; 155 mg; 1 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Natriumcarbonat (265 mg; 2,5 mmol; 2,5 Äq.) und *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (191 mg; 1 mmol; 1 Äq.) umgesetzt.

Es werden 164 mg (53 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 332,0 [M+Na]⁺; HPLC: 17,33 min (81,5 %).

7.3.102. 4-Methoxy-2-(*p*-tolylsulfonylamino)benzoesäure (64e)

Nach AAV11 wird 2-Amino-4-methoxybenzoesäure (**63e**; 334 mg; 2 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Natriumcarbonat (530 mg; 5 mmol; 2,5 Äq.) und *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (763 mg; 4 mmol; 2 Äq.) umgesetzt.

Es werden 606 mg (94 %) eines braunen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 344,1 [M+Na]⁺; HPLC: 16,67 min (87,9 %).

7.3.103. 4,5-Dimethoxy-2-(*p*-tolylsulfonylamino)benzoesäure (64f)

Nach AAV11 wird 2-Amino-4,5-dimethoxybenzoesäure (**63f**; 197 mg; 1 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Natriumcarbonat (265 mg; 2,5 mmol; 2,5 Äq.) und *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (191 mg; 1 mmol; 1 Äq.) umgesetzt. Das Produkt wird nicht weiter aufgereinigt.

Es werden 296 mg (84 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 350,1 [M-H]⁻; HPLC: 15,39 min (50,8 %).

7.3.104. 3-(*p*-tolylsulfonylamino)propionsäure (64g)

Nach AAV11b wird β -Alaninmethylester hydrochlorid (**63g**; 154 mg; 1,1 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Natriumcarbonat (212 mg; 2 mmol; 1,8 Äq.) und *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (191 mg; 1 mmol; 0,9 Äq.) umgesetzt.

Es werden 183 mg (68 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 244,1 [M+H]⁺; HPLC: 10,96 min (90,6 %).

7.3.105. 3-(*p*-tolylsulfonylamino)pyridin-4-carbonsäure (64h)

Nach AAV11b wird 3-Aminoisonikotinsäure (**63h**; 152 mg; 1,1 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Natriumcarbonat (212 mg; 2 mmol; 1,8 Äq.) und *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (191 mg; 1 mmol; 0,9 Äq.) umgesetzt. Vor dem Extrahieren wird die Reaktionsmischung neutralisiert statt angesäuert.

Es werden 223 mg (70 %) eines braunen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 290,9 [M-H]⁻; HPLC: 9,95 min (90,3 %).

7.3.106. *N*-(4-Phenylthiazol-2-yl)-2-(*p*-tolylsulfonylamino)benzamid (65a)

Nach AAV12 wird 2-(*p*-Tolylsulfonylamino)benzoesäure (**64a**; 135 mg; 0,46 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 4-Phenylthiazol-2-amin (83 mg; 0,46 mmol; 1 Äq.), TBTU (372 mg; 1,16 mmol; 2,5 Äq.) und DIPEA (317 μ L; 240 mg; 1,8 mmol; 4 Äq.) bei 80 °C umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 2,3 h.

Es werden 3 mg (1 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 448,2 [M-H]⁻; HPLC: 22,96 min (96,6 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-*d*₆): δ 2.24 (s, 3H), 7.22 – 7.27 (m, 3H), 7.32 – 7.37 (m, 2H), 7.44 – 7.48 (m, 2H), 7.48 – 7.54 (m, 1H), 7.58 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H), 7.76 (s, 1H), 7.82 – 7.86 (m, 1H), 7.93 – 7.98 (m, 2H), 10.20 (s, 1H), 12.66 (s, 1H); HR-MS: m/z 450.0925 [M+H]⁺, berechnet für C₂₃H₂₀N₃O₃S₂⁺: 450.0941.

7.3.107. 4-Methyl-*N*-(4-phenylthiazol-2-yl)-2-(*p*-tolylsulfonylamino)benzamid (65b)

Nach AAV12 wird 4-Methyl-2-(*p*-tolylsulfonylamino)benzoesäure (**64b**; 100 mg; 0,32 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 4-Phenylthiazol-2-amin (57 mg; 0,32 mmol; 1 Äq.), TBTU (263 mg; 0,8 mmol; 2,5 Äq.) und DIPEA (224 μ L; 166 mg; 1,3 mmol; 4 Äq.) bei 80 °C umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 3,5 h.

Es werden 16 mg (11 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 464,1 [M+H]⁺; HPLC: 20,99 min (>99 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-*d*₆): δ 2.23 (s, 3H), 2.31 (s, 3H), 7.06 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H), 7.20 – 7.25 (m, 3H), 7.35 (t, ³J = 7.3 Hz, 1H), 7.45 (t, ³J = 7.6 Hz, 2H), 7.59 (d, ³J = 7.9 Hz, 2H), 7.75 (s, 1H), 7.79 – 7.84 (m, 1H), 7.95 (d, ³J = 7.7 Hz, 2H), 10.28 – 10.35 (m, 1H), 12.62 (s, 1H); HR-MS: m/z 464.1074 [M+H]⁺, berechnet für C₂₄H₂₂N₃O₃S₂⁺: 464.1097.

7.3.108. 4-Chlor-*N*-(4-phenylthiazol-2-yl)-2-(*p*-tolylsulfonylamino)benzamid (65c)

Nach AAV12 wird 4-Chlor-2-(*p*-tolylsulfonylamino)benzoesäure (**64c**; 282 mg; 0,87 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 4-Phenylthiazol-2-amin (152 mg; 0,86 mmol; 1 Äq.), TBTU (694 mg; 2,2 mmol; 2,5 Äq.) und DIPEA (592 µL; 439 mg; 3,5 mmol; 4 Äq.) bei 80 °C umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 3 h.

Es werden 7 mg (2 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 482,1 [M-H]⁻; HPLC: 25,3 min (97,9 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-*d*₆): δ 2.26 (s, 3H), 7.28 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H), 7.30 – 7.38 (m, 3H), 7.46 (t, ³J = 7.6 Hz, 2H), 7.63 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H), 7.76 (s, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.94 (d, 2H), 10.35 (s, 1H), 12.76 (s, 1H); HR-MS: m/z 484.0532 [M+H]⁺, berechnet für C₂₃H₁₉ClN₃O₃S₂⁺: 484.0551.

7.3.109. 4-Fluor-*N*-(4-phenylthiazol-2-yl)-2-(*p*-tolylsulfonylamino)benzamid (65d)

Nach AAV12 werden 4-Fluor-2-(*p*-tolylsulfonylamino)benzoesäure (**64d**; 212 mg; 0,69 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 4-Phenylthiazol-2-amin (121 mg; 0,69 mmol; 1 Äq.), TBTU (550 mg, 1,71 mmol; 2,5 Äq.) und DIPEA (478 µL; 354 mg; 2,74 mmol; 4 Äq.) bei 80 °C umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 5 h.

Es werden 63 mg (20 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 468,0 [M+H]⁺; HPLC: 24,27 min (>99 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-*d*₆): δ 2.27 (s, 3H), 7.06 – 7.17 (m, 2H), 7.30 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H), 7.35 (t, ³J = 7.4 Hz, 1H), 7.46 (t, ³J = 7.6 Hz, 2H), 7.68 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H), 7.76 (s, 1H), 7.91 – 8.02 (m, 3H), 10.56 (s, 1H), 12.75 (s, 1H); HR-MS: m/z 468.0821 [M+H]⁺, berechnet für C₂₃H₁₉FN₃O₃S₂⁺: 468.0846.

7.3.110. 4-Methoxy-*N*-(4-phenylthiazol-2-yl)-2-(*p*-tolylsulfonylamino)benzamid (65e)

Nach AAV12 wird 4-Methoxy-2-(*p*-tolylsulfonylamino)benzoesäure (**64e**; 600 mg; 1,87 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 4-Phenylthiazol-2-amin (165 mg; 0,93 mmol; 0,5 Äq.), TBTU (749 mg, 2,33 mmol; 1,25 Äq.) und DIPEA (650 µL; 483 mg; 3,73 mmol; 2 Äq.) bei 80 °C umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 3,5 h.

Es werden 2 mg (0,2 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 480,0 $[M+H]^+$; HPLC: 20,85 min (>99 %); $^1\text{H-NMR}$ (701 MHz; DMSO- d_6): δ 2.28 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 6.78 (dd, $^3J = 8.8, 2.6$ Hz, 1H), 6.92 – 6.94 (m, 1H), 7.31 (d, $^3J = 8.1$ Hz, 2H), 7.35 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 1H), 7.45 (t, $^3J = 7.7$ Hz, 2H), 7.68 (d, 2H), 7.75 (s, 1H), 7.95 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 2H), 8.02 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 1H), 10.87 (s, 1H), 12.63 (s, 1H); HR-MS: m/z 480.1029 $[M+H]^+$, berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2^+$: 480.1046.

7.3.111. 4,5-Dimethoxy-*N*-(4-phenylthiazol-2-yl)-2-(*p*-tolylsulfonylamino)benzamid (65f)

Nach AAV12 wird 4,5-Dimethoxy-2-(*p*-tolylsulfonylamino)benzoesäure (**64f**; 296 mg; 0,84 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 4-Phenylthiazol-2-amin (148 mg; 0,84 mmol; 1 Äq.), TBTU (676 mg; 2,1 mmol; 2,5 Äq.) und DIPEA (577 μL ; 428 mg; 3,3 mmol; 4 Äq.) bei 80 °C umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 2,5 h.

Es werden 19 mg (4 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 510,1 $[M+H]^+$; HPLC: 22,85 min (>99 %); $^1\text{H-NMR}$ (701 MHz; DMSO- d_6): δ 2.20 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 7.01 (s, 1H), 7.20 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 2H), 7.31 – 7.37 (m, 1H), 7.43 – 7.47 (m, 2H), 7.48 (s, 1H), 7.53 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 2H), 7.75 (s, 1H), 7.96 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 2H), 10.39 (s, 1H), 12.54 (s, 1H); HR-MS: m/z 510.1128 $[M+H]^+$, berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}_2^+$: 510.1152.

7.3.112. *N*-(4-Phenylthiazol-2-yl)-3-(*p*-tolylsulfonylamino)propanamid (65g)

Nach AAV12 wird 3-(*p*-Tolylsulfonylamino)propansäure (**64g**; 183 mg; 0,75 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 4-Phenylthiazol-2-amin (132 mg; 0,75 mmol; 1 Äq.), TBTU (603 mg; 1,9 mmol; 2,5 Äq.) und DIPEA (515 μL ; 382 mg; 3,0 mmol; 4 Äq.) bei 80 °C umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 3 h.

Es werden 16 mg (5 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 402,0 $[M+H]^+$; HPLC: 17,65 min (>99 %); $^1\text{H-NMR}$ (701 MHz; DMSO- d_6): δ 2.37 (s, 3H), 2.63 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 2H), 3.04 (q, $^3J = 6.6$ Hz, 2H), 7.32 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 1H), 7.39 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 2H), 7.43 (t, $^3J = 7.6$ Hz, 2H), 7.61 (s, 1H), 7.66 – 7.73 (m, 3H), 7.89 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 2H), 12.28 (s, 1H); HR-MS: m/z 402.0924 $[M+H]^+$, berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}_2^+$: 402.0941.

7.3.113. *N*-(4-Phenylthiazol-2-yl)-3-(*p*-tolylsulfonylamino)pyridin-4-carboxamid (65h)

Nach AAV12 wird 3-(*p*-Tolylsulfonylamino)pyridin-4-carbonsäure (**64h**; 100 mg; 0,34 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 4-Phenylthiazol-2-amin (60 mg; 0,34 mmol; 1 Äq.), TBTU (274 mg; 0,86 mmol; 2,5 Äq.) und DIPEA (238 μ L; 177 mg; 1,4 mmol; 4 Äq.) bei 80 °C umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 20 h.

Es werden 10 mg (6 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 451,0 [M+H]⁺; HPLC: (>99 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-*d*₆): δ 2.24 (s, 3H), 7.25 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H), 7.35 (t, ³J = 7.4 Hz, 1H), 7.46 (t, ³J = 7.6 Hz, 2H), 7.53 – 7.59 (m, 2H), 7.64 – 7.71 (m, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.94 (d, ³J = 7.7 Hz, 2H), 8.36 (s, 1H), 8.50 (s, 1H), 10.07 (s, 1H), 12.80 (s, 1H); HR-MS: m/z 451.0876 [M+H]⁺, berechnet für C₂₂H₁₉N₄O₃S₂⁺: 451.0893.

7.3.114. *N*-(4-Phenylthiazol-2-yl)-4-(*p*-tolylsulfonylamino)pyridin-3-carboxamid (65i)

4-Amino-*N*-(4-phenylthiazol-2-yl)pyridin-3-carboxamid (**66**; 80 mg; 0,27 mmol; 1 Äq.) wird zusammen mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (51 mg; 0,27 mmol; 1 Äq.) und Natriumcarbonat (72 mg; 0,67 mmol; 2,5 Äq.) in 2 ml Wasser und 2 ml Dichlormethan bei 80 °C für 3 h umgesetzt. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit 1 N HCl angesäuert und dreimal mit 20 ml Essigester extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Aufreinigung erfolgt mittels präparativer HPLC.

Es werden 9 mg (8 %) eines gelben Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 451,0 [M+H]⁺; HPLC: 17,68 min (98 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-*d*₆): δ 2.39 (s, 3H), 7.35 (t, ³J = 7.4 Hz, 1H), 7.41 (d, ³J = 7.9 Hz, 2H), 7.46 (t, ³J = 7.6 Hz, 2H), 7.57 (d, ³J = 7.2 Hz, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.86 (t, ³J = 7.7 Hz, 4H), 8.17 (d, ³J = 7.3 Hz, 1H), 8.90 (s, 1H), 13.47 (s, 1H), 13.85 (s, 1H); HR-MS: m/z 451.0874 [M+H]⁺, berechnet für C₂₂H₁₉N₄O₃S₂⁺: 451.0893.

7.3.115. 4-Amino-*N*-(4-phenylthiazol-2-yl)pyridin-3-carboxamid (66)

Nach AAV12 wird 4-Aminonikotinsäure (**64i**; 138 mg; 1 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 4-Phenylthiazol-2-amin (176 mg; 1 mmol; 1 Äq.), TBTU (802 mg; 2,5 mmol; 2,5 Äq.) und DIPEA (685 μ L; 508 mg; 3,5 mmol; 4 Äq.) bei 80 °C umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 5 h.

Die Aufreinigung erfolgt mittels Silica-Flash-Chromatographie.

Es werden 80 mg (27 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 296,8 $[M+H]^+$; HPLC: 10,56 min (55,7 %).

7.3.116. Methyl (2S)-4-*tert*-Butoxycarbonyl-1-(*p*-tolylsulfonyl)piperazin-2-carboxylat (68)

Nach AAV6 wird Methyl (*S*)-1-*N*-Boc-piperazine-3-carboxylat (**67b**; 244 mg; 1 mmol; 1 Äq.) zusammen mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (191 mg; 1 mmol; 1 Äq) und Triethylamin (384 μ l; 2,5 mmol; 2,5 Äq.) umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 3 h.

Die Aufreinigung erfolgt über Silica-Flash-Chromatographie.

Es werden 287 mg (72 %) eines farblosen Öls erhalten.

ESI-MS: m/z 421,1 $[M+Na]^+$; HPLC: 18,16 min (>99 %).

7.3.117. (2R)-4-*tert*-butoxycarbonyl-1-(*p*-tolylsulfonyl)piperazin-2-carbonsäure (69_a)

Nach AAV11b wird Methyl-(*R*)-4-Boc-piperazine-2-carboxylat (**67a**; 269 mg; 1,1 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Natriumcarbonat (212 mg; 2 mmol; 1,8 Äq.) und *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (191 mg; 1 mmol; 0,9 Äq.) umgesetzt.

Es werden 317 mg (75 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 383,1 $[M-H]^-$; HPLC: 15,97 min (68,1 %).

7.3.118. (2S)-4-*tert*-Butoxycarbonyl-1-(*p*-tolylsulfonyl)piperazin-2-carbonsäure (69b)

Nach AAV7 wird Methyl (2S)-4-*tert*-Butoxycarbonyl-1-(*p*-tolylsulfonyl)piperazin-2-carboxylat (**68**; 333 mg; 0,84 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Natriumhydroxid (133 mg; 3,34 mmol; 4 Äq) umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 1,5 h.

Es werden 140 mg (44 %) eines gelben Öls erhalten.

ESI-MS: m/z 284,9 $[M-Boc+H]^+$; HPLC: 16,00 min (80,9 %).

7.3.119. *tert*-Butyl (3*R*)-3-[(4-phenylthiazol-2-yl)carbamoyl]-4-(*p*-tolylsulfonyl)-piperazin-1-carboxylat (70a)

Nach AAV12 wird (2*R*)-4-*tert*-butoxycarbonyl-1-(*p*-tolylsulfonyl)piperazine-2-carbonsäure (69a; 154 mg; 0,40 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 4-Phenylthiazol-2-amin (71 mg; 0,40 mmol; 1 Äq.), TBTU (321 mg; 1,0 mmol; 2,5 Äq.) und DIPEA (274 μ L; 203 mg; 1,6 mmol; 4 Äq.) bei 80 °C umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 19 h. Die Aufreinigung erfolgt mittels Silica-Flash-Chromatographie.

Es werden 80 mg (37 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 543,2 [M+H]⁺; HPLC: 20,21 min (97,2 %).

7.3.120. *tert*-Butyl (3*S*)-3-[(4-phenylthiazol-2-yl)carbamoyl]-4-(*p*-tolylsulfonyl)-piperazin-1-carboxylat (70b)

Nach AAV12 wird (2*S*)-4-*tert*-butoxycarbonyl-1-(*p*-tolylsulfonyl)piperazine-2-carbonsäure (69b; 140 mg; 0,36 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 4-Phenylthiazol-2-amin (64 mg; 0,36 mmol; 1 Äq.), TBTU (292 mg; 0,91 mmol; 2,5 Äq.) und DIPEA (253 μ L; 188 mg; 1,5 mmol; 4 Äq.) bei 80 °C umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 4 h. Die Aufreinigung erfolgt mittels Silica-Flash-Chromatographie.

Es werden 112 mg (57 %) eines braunen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 541,0 [M-H]⁻; HPLC: 20,21 min (74,1 %).

7.3.121. (2*R*)-*N*-(4-Phenylthiazol-2-yl)-1-(*p*-tolylsulfonyl)piperazin-2-carboxamid (71a)

tert-Butyl (3*R*)-3-[(4-Phenylthiazol-2-yl)carbamoyl]-4-(*p*-tolylsulfonyl)piperazin-1-carboxylat (70a; 80 mg; 0,14 mmol) wird in 0,5 ml DCM gelöst und 0,5 ml TFA zugegeben. Anschließend wird die Reaktionsmischung für 5 h gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird die Reaktionsmischung mit 10 ml DCM verdünnt und mit zweimal 10 ml ges. NaHCO₃-Lsg. gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wird mittels C₁₈-Flash-Chromatographie aufgereinigt.

Es werden 65 mg (25 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 443,0 $[M+H]^+$; HPLC: 12,75 min (>99 %); 1H -NMR (701 MHz; DMSO- d_6): δ 2.33 (s, 3H), 2.93 – 3.00 (m, 1H), 3.28 – 3.41 (m, 2H), 3.56 – 4.10 (m, 3H), 4.86 (d, $^3J = 5.1$ Hz, 1H), 7.30 – 7.38 (m, 3H), 7.45 (t, $^3J = 7.6$ Hz, 2H), 7.66 – 7.73 (m, 3H), 7.92 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 2H), 8.33 (s, 1H), 9.46 (s, 1H), 12.65 (s, 1H); HR-MS: m/z 443.1179 $[M+H]^+$, berechnet für $C_{21}H_{23}N_4O_3S_2^+$: 443.1206.

7.3.122. (2S)-N-(4-Phenylthiazol-2-yl)-1-(*p*-tolylsulfonyl)piperazin-2-carboxamid (71b)

tert-Butyl (3S)-3-[(4-phenylthiazol-2-yl)carbamoyl]-4-(*p*-tolylsulfonyl)-piperazin-1-carboxylat (**70b**; 112 mg; 0,21 mmol) wird in 1,4 ml DCM/TFA (1:1) gelöst und 4,5 h bei RT gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit DCM verdünnt und zweimal mit ges. $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Aufreinigung erfolgt mittels C_{18} -Flash Chromatographie.

Es werden 59 mg (67 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 442,8 $[M+H]^+$; HPLC: 12,75 min (>99 %); 1H -NMR (701 MHz; $CDCl_3$): δ 2.42 (s, 3H), 2.71 – 2.79 (m, 1H), 2.94 – 3.02 (m, 1H), 3.06 – 3.19 (m, 1H), 3.23 – 3.43 (m, 1H), 3.66 – 3.80 (m, 1H), 3.91 – 4.02 (m, 1H), 4.83 – 4.92 (m, 1H), 7.01 – 7.04 (m, 1H), 7.28 – 7.32 (m, 2H), 7.42 – 7.46 (m, 1H), 7.46 – 7.51 (m, 2H), 7.58 – 7.65 (m, 2H), 7.64 – 7.70 (m, 2H); HR-MS: m/z 443.1177 $[M+H]^+$, berechnet für $C_{21}H_{23}N_4O_3S_2^+$: 443.1206.

7.3.123. N-(4-Bromthiazol-2-yl)-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (72)

Nach AAV12 wird 2-(*p*-Tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzoesäure (**58**; 1,99 g; 5,54 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 4-Brom-1,3-thiazol-2-amin (992 mg; 5,54 mmol; 1 Äq.), TBTU (4,45 g, 13,8 mmol; 2,5 Äq.) und DIPEA (3,85 mL; 2,86 g; 22,15 mmol; 4 Äq.) bei Raumtemperatur umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 24 h. Die Aufreinigung erfolgt mittels Silica-Flash-Chromatographie.

Es werden 562 mg (20 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 518,0 $[M-H]$; HPLC: 21,55 min (>99 %).

7.3.124. *N*-[4-(1*H*-Indol-5-yl)thiazol-2-yl]-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (73a)

Nach AAV13 wird *N*-(4-Bromthiazol-2-yl)-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (**72**; 78 mg; 0,15 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Indol-5-boronsäure (36 mg; 0,23 mmol; 1,5 Äq.) und Pd(PPh₃)₄ (17 mg; 0,015 mmol; 0,1 Äq.) bei 100 °C umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 5 h. Die Aufreinigung erfolgt mittels Silica-Flash-Chromatographie und präparativer HPLC.

Es werden 9 mg (11 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: *m/z* 557,1 [M+H]⁺; HPLC: 20,99 min (>99 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-*d*₆): δ 2.26 (s, 3H), 6.44 – 6.54 (m, 1H), 7.23 – 7.32 (m, 2H), 7.39 (s, 1H), 7.43 – 7.47 (m, 1H), 7.48 – 7.59 (m, 2H), 7.59 – 7.66 (m, 3H), 7.65 – 7.73 (m, 1H), 8.00 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 10.33 (s, 1H), 11.21 (s, 1H), 12.80 (s, 1H); HR-MS: *m/z* 557.0895 [M+H]⁺, berechnet für C₂₆H₂₀F₃N₄O₃S₂⁺: 557.0923.

7.3.125. 2-(*p*-Tolylsulfonylamino)-*N*-[4-(1*H*-pyrazol-3-yl)thiazol-2-yl]-4-(trifluormethyl)benzamid (73b)

Nach AAV13 wird *N*-(4-Bromthiazol-2-yl)-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (**72**; 78 mg; 0,15 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 1*H*-Pyrazol-4-boronsäure (25 mg; 0,225 mmol; 1,5 Äq.) und Pd(PPh₃)₄ (17 mg; 0,015 mmol; 0,1 Äq.) für 3 h bei 100 °C und anschließend für weitere 2 h bei 120 °C umgesetzt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Silica-Flash-Chromatographie und präparativer HPLC.

Es werden 10 mg (13 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: *m/z* 508,2 [M+H]⁺; HPLC: 18,37 min (96,9 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-*d*₆): δ 2.26 (s, 3H), 7.22 – 7.41 (m, 3H), 7.39 – 7.72 (m, 4H), 7.81 – 8.28 (m, 3H), 10.28 (s, 1H), 12.81 (s, 1H); HR-MS: *m/z* 508.0694 [M+H]⁺, berechnet für C₂₁H₁₇F₃N₅O₃S₂⁺: 508.0719.

7.3.126. *N*-[4-(4-Methoxyphenyl)thiazol-2-yl]-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (73c)

Nach AAV13 wird *N*-(4-Bromthiazol-2-yl)-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (**72**; 78 mg; 0,15 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 4-Methoxyphenylboronsäure (34 mg; 0,23 mmol; 1,5 Äq.) und Pd(PPh₃)₄ (17 mg; 0,015 mmol; 0,1 Äq.) bei 100 °C umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 3 h. Die Aufreinigung erfolgt mittels präparativer HPLC.

Es werden 15 mg (19 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 548,1 [M+H]⁺; HPLC: 21,47 min (>99 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-d₆): δ 2.27 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 7.03 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.28 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H), 7.49 (s, 1H), 7.57 – 7.66 (m, 4H), 7.88 (d, ³J = 8.42, 2H), 7.96 (s, 1H), 10.29 (s, 1H), 12.81 (s, 1H); HR-MS: m/z 548.0895 [M+H]⁺, berechnet für C₂₅H₂₁F₃N₃O₄S₂⁺: 548.0920.

7.3.127. *N*-[4-(3,4-Dimethoxyphenyl)thiazol-2-yl]-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (73d)

Nach AAV13 wird *N*-(4-Bromthiazol-2-yl)-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (**72**; 78 mg; 0,15 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 3,4-Dimethoxyphenylboronsäure (41 mg; 0,23 mmol; 1,5 Äq.) und Pd(PPh₃)₄ (17 mg; 0,015 mmol; 0,1 Äq.) bei 100 °C umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 5 h. Die Aufreinigung erfolgt mittels präparativer HPLC.

Es werden 55 mg (62 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 577,9 [M+H]⁺; HPLC: 20,91 min (95,5 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-d₆): δ 2.27 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 7.03 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H), 7.28 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H), 7.44 – 7.53 (m, 3H), 7.57 – 7.69 (m, 4H), 7.96 (s, 1H), 10.29 (s, 1H), 12.82 (s, 1H); HR-MS: m/z 578.0998 [M+H]⁺, berechnet für C₂₆H₂₃F₃N₃O₅S₂⁺: 578.1026.

7.3.128. *N*-[4-(4-Cyanoxyphenyl)thiazol-2-yl]-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (73e)

Nach AAV13 wird *N*-(4-Bromthiazol-2-yl)-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (**72**; 78 mg; 0,15 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 4-Cyanophenylboronsäure (33 mg; 0,23 mmol; 1,5 Äq.) und Pd(PPh₃)₄ (17 mg; 0,015 mmol; 0,1 Äq.) bei 100 °C umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 5 h. Die Aufreinigung erfolgt mittels Silica-Flash-Chromatographie. Das isolierte Produkt wird in Wasser/Acetonitril+0,04 % TFA aufgenommen und lyophilisiert.

Es werden 3 mg (3 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 543,0 [M+H]⁺; HPLC: 21,01 min (>99 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-d₆): δ 2.26 (s, 3H), 7.28 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H), 7.46 (s, 1H), 7.57 – 7.70 (m, 3H), 7.88 – 7.99 (m, 3H), 8.07 (s, 1H), 8.14 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 10.27 (s, 1H), 12.90 (s, 1H); HR-MS: m/z 543.0744 [M+H]⁺, berechnet für C₂₅H₁₈F₃N₄O₃S₂⁺: 543.0767.

7.3.129. Methyl-4-[2-[[2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzoyl]amino]thiazol-4-yl]benzoat (73f)

Nach AAV13 wird *N*-(4-Bromthiazol-2-yl)-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (**72**; 130 mg; 0,25 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 4-Methoxycarbonylphenylboronsäure (67 mg; 0,38 mmol; 1,5 Äq.) und Pd(PPh₃)₄ (29 mg; 0,025 mmol; 0,1 Äq.) bei 100 °C umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 5 h. Die Aufreinigung erfolgt mittels Silica-Flash-Chromatographie (puriFlash n-Heptan/Essigester) und präparativer HPLC.

Es werden 12 mg (9 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: *m/z* 576,1 [M+H]⁺; HPLC: 21,44 min (>99 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-d₆): δ 2.25 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 7.28 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H), 7.47 (s, 1H), 7.55 – 7.70 (m, 3H), 7.90 – 8.02 (m, 2H), 8.05 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H), 8.10 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H), 10.27 (s, 1H), 12.91 (s, 1H); HR-MS: *m/z* 576.0842 [M+H]⁺, berechnet für C₂₆H₂₁F₃N₃O₅S₂⁺: 576.0869.

7.3.130. 4-[2-[[2-(*p*-Tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzoyl]amino]thiazol-4-yl]benzoesäure (73g)

Nach AAV7 wird Methyl-4-[2-[[2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzoyl]amino]thiazol-4-yl]benzoat (**73f**; 58 mg; 0,1 mmol; 1 Äq.) zusammen mit Natriumhydroxid (16 mg; 0,4 mmol; 4 Äq.) umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 3 h. Die Aufreinigung erfolgt mittels präparativer HPLC.

Es werden 31 mg (55 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: *m/z* 562,1 [M+H]⁺; HPLC: 19,79 min (98,1 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-d₆): δ 2.26 (s, 3H), 7.28 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H), 7.47 (s, 1H), 7.55 – 7.70 (m, 3H), 7.96 (s, 2H), 8.03 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H), 8.07 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H), 10.28 (s, 1H), 12.65 – 13.17 (m, 2H); HR-MS: *m/z* 562.0689 [M+H]⁺, berechnet für C₂₅H₁₉F₃N₃O₅S₂⁺: 562.0713.

7.3.131. 2-(*p*-Tolylsulfonylamino)-*N*-[4-[4-(1*H*-tetrazol-5-yl)phenyl]thiazol-2-yl]-4-(trifluormethyl)benzamid (73h)

Nach AAV13 wird *N*-(4-Bromthiazol-2-yl)-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (**72**; 78 mg; 0,15 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 4-(1*H*-Tetrazol-5-yl)phenylboronsäure (43 mg; 0,15 mmol;

1,0 Äq.) und Pd(PPh₃)₄ (17 mg; 0,015 mmol; 0,1 Äq.) für 15 min bei 150 °C in der Mikrowelle umgesetzt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Silica-Flash-Chromatographie und präparativer HPLC.

Es werden 15 mg (17 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: *m/z* 584,4 [M-H]⁻; HPLC: 21,39 min (>99 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-d₆): δ 2.26 (s, 3H), 7.28 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H), 7.47 (s, 1H), 7.60 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H), 7.62 – 7.67 (m, 1H), 7.92 – 8.00 (m, 2H), 8.11 – 8.22 (m, 4H), 10.29 (s, 1H), 12.91 (s, 1H); HR-MS: *m/z* 586.0925 [M+H]⁺, berechnet für C₂₅H₁₉F₃N₇O₃S₂⁺: 586.0937.

7.3.132. *N*-[4-(4-Carbamoylphenyl)thiazol-2-yl]-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamide (73i)

Nach AAV13 wird *N*-(4-Bromthiazol-2-yl)-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (**72**; 78 mg; 0,15 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 4-Aminocarbonylphenylboronsäure (25 mg; 0,15 mmol; 1,0 Äq.) und Pd(PPh₃)₄ (17 mg; 0,015 mmol; 0,1 Äq.) für 2,5 h bei 100 °C umgesetzt. Anschließend wird die Temperatur auf 120 °C erhöht und die Reaktionsmischung für eine weitere Stunde umgesetzt. Die Aufreinigung erfolgt mittels präparativer HPLC.

Es werden 3,4 mg (4 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: *m/z* 561,3 [M+H]⁺; HPLC: 19,04 min (>99 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-d₆): δ 2.26 (s, 3H), 7.28 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H), 7.38 – 7.48 (m, 2H), 7.55 – 7.67 (m, 3H), 7.86 – 7.99 (m, 4H), 7.99 – 8.05 (m, 3H), 10.28 (s, 1H), 12.87 (s, 1H); HR-MS: *m/z* 561.0854 [M+H]⁺, berechnet für C₂₅H₂₀F₃N₄O₄S₂⁺: 561.0873.

7.3.133. *N*-[4-[4-(Diethylamino)phenyl]thiazol-2-yl]-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamide (73j)

Nach AAV13 wird *N*-(4-Bromthiazol-2-yl)-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (**72**; 78 mg; 0,15 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 4-(Diethylamino)phenylboronsäure (29 mg; 0,15 mmol; 1,0 Äq.) und Pd(PPh₃)₄ (17 mg; 0,015 mmol; 0,1 Äq.) für 2 h bei 100 °C umgesetzt. Anschließend wird die Temperatur auf 120 °C erhöht und die Reaktionsmischung für weitere 2,5 h Stunden umgesetzt. Die Aufreinigung erfolgt mittels präparativer HPLC.

Es werden 19 mg (22 %) eines grünen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 589,4 [M+H]⁺; HPLC: 16,85 min (>99 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-d₆): δ 1.09 (t, ³J = 7.4 Hz, 6H), 2.27 (s, 3H), 3.41 (s, 4H), 6.73 (s, 1H), 6.99 – 8.22 (m, 11H), 10.29 (s, 1H), 12.79 (s, 1H); HR-MS: m/z 589.1503 [M+H]⁺, berechnet für C₂₈H₂₈F₃N₄O₃S₂⁺: 589.1549.

7.3.134. 2-(*p*-Tolylsulfonylamino)-*N*-[4-(*p*-tolyl)thiazol-2-yl]-4-(trifluormethyl)benzamid (73k)

Nach AAV13 wird *N*-(4-Bromthiazol-2-yl)-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (**72**; 78 mg; 0,15 mmol; 1 Äq.) zusammen mit *p*-Tolylboronsäure (20 mg; 0,15 mmol; 1,0 Äq.) und Pd(PPh₃)₄ (17 mg; 0,015 mmol; 0,1 Äq.) für 2 h bei 100 °C und für eine weitere Stunde bei 120 °C umgesetzt. Die Aufreinigung erfolgt mittels präparativer HPLC.

Es werden 40 mg (50 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 532,3 [M+H]⁺; HPLC: 22,03 min (>99 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-d₆): δ 2.25 (s, 3H), 2.34 (s, 3H), 7.24 – 7.30 (m, 4H), 7.48 (s, 1H), 7.56 – 7.64 (m, 3H), 7.68 (s, 1H), 7.83 (d, ³J = 7.8 Hz, 2H), 7.95 (s, 1H), 10.28 (s, 1H), 12.82 (s, 1H); HR-MS: m/z 532.0944 [M+H]⁺, berechnet für C₂₅H₂₁F₃N₃O₃S₂⁺: 532.0971.

7.3.135. *N*-[4-(4-Morpholinphenyl)thiazol-2-yl]-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (73l)

Nach AAV13 wird *N*-(4-Bromthiazol-2-yl)-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (**72**; 78 mg; 0,15 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 4-Morpholinphenylboronsäure (47 mg; 0,23 mmol; 1,5 Äq.) und Pd(PPh₃)₄ (17 mg; 0,015 mmol; 0,1 Äq.) bei 100 °C umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 4 h. Die Aufreinigung erfolgt mittels präparativer HPLC.

Es werden 3 mg (3 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 602,9 [M+H]⁺; HPLC: 20,77 min (96,6 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-d₆): δ 2.25 (s, 3H); 3.21 (t, ³J = 4.8 Hz, 4H), 3.79 (t, ³J = 4.8 Hz, 4H), 7.04 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H), 7.23 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H), 7.41 (s, 1H), 7.59 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H), 7.64 (d, ³J = 7.9 Hz, 2H), 7.82 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H), 7.96 (s, 1H), 8.26 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H); HR-MS: m/z 603.1317 [M+H]⁺, berechnet für C₂₈H₂₆F₃N₄O₄S₂⁺: 603.1342.

7.3.136. *N*-[4-(2-Aminopyrimidin-5-yl)thiazol-2-yl]-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (73m)

Nach AAV13 wird *N*-(4-Bromthiazol-2-yl)-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (**72**; 52 mg; 0,1 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 4-(4-Methyl-1-piperazinyl)benzolboronsäurepinacolester (45 mg; 0,1 mmol; 1 Äq.) und Pd(PPh₃)₄ (12 mg; 0,01 mmol; 0,1 Äq.) bei 100 °C umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 3 h. Die Aufreinigung erfolgt mittels Silica-Flash-Chromatographie und präparativer HPLC.

Es werden 9 mg (14 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: *m/z* 616,4 [M+H]⁺; HPLC: 15,84 min (97,4 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-d₆): δ 2.26 (s, 3H), 2.87 (s, 3H), 3.00 (t, ³J = 12.9 Hz, 2H), 3.11 – 3.21 (m, 2H), 3.49 – 3.56 (m, 2H), 3.87 – 3.98 (m, 2H), 7.09 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H), 7.27 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H), 7.44 – 7.53 (m, 1H), 7.53 – 7.65 (m, 4H), 7.84 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.97 (s, 1H), 9.70 (s, 1H), 10.28 (s, 1H), 12.78 (s, 1H); HR-MS: *m/z* 616.1613 [M+H]⁺, berechnet für C₂₉H₂₉F₃N₅O₃S₂⁺: 616.1658.

7.3.137. *N*-[4-(2-Aminopyrimidin-5-yl)thiazol-2-yl]-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (73n)

Nach AAV13 wird *N*-(4-Bromthiazol-2-yl)-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (**72**; 75 mg; 0,144 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 2-Aminopyrimidin-5-boronsäure (30 mg; 0,144 mmol; 1 Äq.) und Pd(PPh₃)₄ (16 mg; 0,014 mmol; 0,1 Äq.) bei 100 °C umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 5 h. Die Aufreinigung erfolgt mittels präparativer HPLC.

Es werden 43 mg (56 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: *m/z* 535,0 [M+H]⁺; HPLC: 16,61 min (>99 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-d₆): δ 2.27 (s, 3H), 7.07 (s, 2H), 7.28 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H), 7.47 (s, 1H), 7.55 – 7.70 (m, 4H), 7.95 (s, 1H), 8.80 (s, 2H), 10.28 (s, 1H), 12.84 (s, 1H); HR-MS: *m/z* 535.0796 [M+H]⁺, berechnet für C₂₂H₁₈F₃N₆O₃S₂⁺: 535.0828.

7.3.138. *N*-[4-(4-Fluorphenyl)thiazol-2-yl]-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamide (73o)

Nach AAV13 wird *N*-(4-Bromthiazol-2-yl)-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (**72**; 78 mg; 0,15 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 4-Fluorphenylboronsäure (21 mg; 0,15 mmol; 1,0 Äq.) und Pd(PPh₃)₄ (17 mg; 0,015 mmol; 0,1 Äq.) bei 100 °C umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 3 h. Die Aufreinigung erfolgt mittels präparativer HPLC.

Es werden 42 mg (52 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: *m/z* 536,2 [M+H]⁺; HPLC: 23,57 min (97,9 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-d₆): δ 2.26 (s, 3H), 7.25 – 7.33 (m, 4H), 7.47 (s, 1H), 7.57 – 7.66 (m, 3H), 7.75 (s, 1H), 7.90 – 8.02 (m, 3H), 10.28 (s, 1H), 12.84 (s, 1H); HR-MS: *m/z* 536.0692 [M+H]⁺, berechnet für C₂₄H₁₈F₄N₃O₃S₂⁺: 536.0720.

7.3.139. *N*-[4-(4-Chlorphenyl)thiazol-2-yl]-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamide (73p)

Nach AAV13 wird *N*-(4-Bromthiazol-2-yl)-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (**72**; 78 mg; 0,15 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 4-Chlorphenylboronsäure (23 mg; 0,15 mmol; 1,0 Äq.) und Pd(PPh₃)₄ (17 mg; 0,015 mmol; 0,1 Äq.) bei 100 °C umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 3 h. Die Aufreinigung erfolgt mittels präparativer HPLC.

Es werden 30 mg (36 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: *m/z* 552,3 [M+H]⁺; HPLC: 22,16 min (>99 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-d₆): δ 2.26 (s, 3H), 7.28 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H), 7.47 (s, 1H), 7.53 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H), 7.57 – 7.66 (m, 3H), 7.84 (s, 1H), 7.91 – 8.00 (m, 3H), 10.28 (s, 1H), 12.85 (s, 1H); HR-MS: *m/z* 552.0400 [M+H]⁺, berechnet für C₂₄H₁₈ClF₃N₃O₃S₂⁺: 552.0425.

7.3.140. *N*-[4-(3-Chlorphenyl)thiazol-2-yl]-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamide (73q)

Nach AAV13 wird *N*-(4-Bromthiazol-2-yl)-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (**72**; 78 mg; 0,15 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 3-Chlorphenylboronsäure (23 mg; 0,15 mmol; 1,0 Äq.) und Pd(PPh₃)₄ (17 mg; 0,015 mmol; 0,1 Äq.) für 3 h bei 100 °C umgesetzt. Anschließend wird die Temperatur auf 120 °C erhöht und die Reaktionsmischung für weitere 45 min umgesetzt. Die Aufreinigung erfolgt mittels präparativer HPLC.

Es werden 42 mg (51 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 552,2 $[M+H]^+$; HPLC: 24,64 min (95,1 %); $^1\text{H-NMR}$ (701 MHz; DMSO- d_6): δ = 2.26 (s, 3H), 7.28 (d, 3J = 8.1 Hz, 2H), 7.42 (d, 3J = 8.2 Hz, 1H), 7.45 – 7.52 (m, 2H), 7.59 (d, 3J = 8.1 Hz, 2H), 7.62 – 7.66 (m, 1H), 7.90 – 7.98 (m, 3H), 8.00 – 8.03 (m, 1H), 10.27 (s, 1H), 12.85 (s, 1H); HR-MS: m/z 552.0405 $[M+H]^+$, berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{ClF}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{S}_2^+$: 552.0425.

7.3.141. *N*-[4-(2-Chlorphenyl)thiazol-2-yl]-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamide (73r)

Nach AAV13 wird *N*-(4-Bromthiazol-2-yl)-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (**72**; 78 mg; 0,15 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 4-Chlorphenylboronsäure (23 mg; 0,15 mmol; 1,0 Äq.) und $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (17 mg; 0,015 mmol; 0,1 Äq.) bei 100 °C umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 4 h. Die Aufreinigung erfolgt mittels präparativer HPLC.

Es werden 52 mg (62 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 552,2 $[M+H]^+$; HPLC: 24,43 min (>99 %); $^1\text{H-NMR}$ (701 MHz; DMSO- d_6): δ 2.27 (s, 3H), 7.29 (d, 3J = 8.0 Hz, 2H), 7.38 – 7.44 (m, 1H), 7.44 – 7.49 (m, 2H), 7.57 – 7.66 (m, 4H), 7.74 (s, 1H), 7.82 – 7.89 (m, 1H), 7.94 (s, 1H), 10.29 (s, 1H), 12.89 (s, 1H); HR-MS: m/z 552.0400 $[M+H]^+$, berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{ClF}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{S}_2^+$: 552.0425.

7.3.142. 2-(*p*-Tolylsulfonylamino)-*N*-[4-(4-pyridyl)thiazol-2-yl]-4-(trifluormethyl)benzamid (73s)

Nach AAV13 wird *N*-(4-Bromthiazol-2-yl)-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (**72**; 78 mg; 0,15 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 4-Pyridinboronsäure (28 mg; 0,225 mmol; 1,5 Äq.) und $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (17 mg; 0,015 mmol; 0,1 Äq.) bei 100 °C umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 4 h. Die Aufreinigung erfolgt mittels Silica-Flash-Chromatographie (1. Lauf DCM/MeOH; 2. Lauf *n*-Heptan/Essigester) und das erhaltene Produkt wird mit TFA lyophilisiert.

Es werden 17 mg (22 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: m/z 519,2 $[M+H]^+$; HPLC: 14,35 min (97,2 %); $^1\text{H-NMR}$ (701 MHz; DMSO- d_6): δ 2.27 (s, 3H), 7.29 (d, 3J = 7.9 Hz, 2H), 7.44 (s, 1H), 7.57 – 7.65 (m, 3H), 7.95 (d, 3J = 7.9 Hz, 1H), 8.26 (d, 3J = 5.7 Hz, 2H), 8.47 (s, 1H), 8.85 (d, 3J = 5.7 Hz, 2H), 10.22 (s, 1H), 12.93 (s, 1H); HR-MS: m/z 519.0730 $[M+H]^+$, berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{S}_2^+$: 519.0767.

7.3.143. 2-(*p*-Tolylsulfonylamino)-*N*-[4-(3-pyridyl)thiazol-2-yl]-4-(trifluormethyl)benzamid (73t)

Nach AAV13 wird *N*-(4-Bromthiazol-2-yl)-2-(*p*-tolylsulfonylamino)-4-(trifluormethyl)benzamid (**72**; 78 mg; 0,15 mmol; 1 Äq.) zusammen mit 3-Pyridinboronsäure (18 mg; 0,15 mmol; 1 Äq.) und Pd(PPh₃)₄ (17 mg; 0,015 mmol; 0,1 Äq.) bei 100 °C umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 4 h. Die Aufreinigung erfolgt mittels Silica-Flash-Chromatographie (n-Heptan/Essigester) und C₁₈-Flash-Chromatographie.

Es werden 12 mg (15 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

ESI-MS: *m/z* 519,3 [M+H]⁺; HPLC: 15,12 min (>99 %); ¹H-NMR (701 MHz; DMSO-*d*₆): δ 2.26 (s, 3H), 7.29 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H), 7.45 (s, 1H), 7.60 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H), 7.63 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H), 7.68 – 7.72 (m, 1H), 7.95 (d, ³J = 8.1 Hz, 1H), 8.05 (s, 1H), 8.50 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H), 8.62 – 8.69 (m, 1H), 9.22 (s, 1H), 10.29 (s, 1H), 12.98 (s, 1H); HR-MS: *m/z* 519.0732 [M+H]⁺, berechnet für C₂₃H₁₈F₃N₄O₃S₂⁺: 519.0767.

7.4. Inhibitortestung

Alle Arbeiten in diesem Kapitel wurden von Mitarbeitern des IEIM unter Leitung von Prof. Dr. Michael Naumann durchgeführt.

7.4.1. Bestimmung der inhibitorischen Aktivität der Inhibitoren für STAMBPL1

Die inhibitorische Aktivität der Verbindungen wurde anhand der enzymatischen Restaktivität der Verbindungen ermittelt. Hierbei wurde am IEIM die Fluoreszenzintensität durch die enzymatische Spaltung von Ubiquitinsubstraten gemessen. Als Substrat kam hierbei K63-verknüpftes Tetraubiquitin-Rhodamin110 (Ub4K63, *Boston Biochem*) zum Einsatz und die Bestimmungen wurden in einer Pufferlösung bestehend aus 100 mM Hepes (pH 8), 300 mM NaCl, 0.2 % Prionex, 2 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP), 2 mM 4-(2-Aminoethyl)benzolsulfonylfluorid (AEBSF) bei einem Volumen von 25 µl durchgeführt. Zur Bestimmung der Restaktivität wurde die Stammlösung mit destilliertem Wasser auf 500 µM verdünnt, sodass sich eine finale Konzentration von 100 µM ergab. 5 µl der verdünnten Stammlösung wurden jeweils mit 500 nM Substrat und 500 nM STAMBPL1 (*Boston Biochem*) versetzt und der Anstieg der Fluoreszenzintensität mit einem 485 nm (Excitation) / 520 nm (Emission) optischen Modul (*SpectraMax M5, Molecular Devices*) gemessen. Die Intensität wurde über einen Zeitraum von 10 min alle 10 s aufgezeichnet. Die initiale Reaktionsgeschwindigkeit entspricht der Steigung des linearen Teils der jeweiligen Fluoreszenzintensitätskurve. Die jeweiligen Steigungen

(bzw. initialen Reaktionsgeschwindigkeiten) wurden durch lineare Regression bestimmt. Die Restaktivität wurde durch das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeit der inhibierten Reaktion (v_i) zur Reaktionsgeschwindigkeit zur nicht inhibierten Reaktion (v_0) berechnet:

$$\text{Restaktivität (\%)} = 100 \times \frac{v_i}{v_0}$$

7.4.2. Bestimmung der inhibitorischen Aktivität der Inhibitoren für verschiedene USPs und PLPro

Die inhibitorische Aktivität der synthetisierten Verbindungen wurde am IEIM mittels Fluoreszenzintensitätsmessungen bestimmt. Hierbei wurde die Fluoreszenzintensität durch die enzymatische Spaltung von Ubiquitinsubstraten gemessen. Im Falle von PLPro kam Monoubiquitin-Rhodamin110 (UbM, *Boston*) als Substrat zum Einsatz und, im Falle der USPs, Ub4K63 (*Boston, Life Sensors*).

Alle Aktivitätsmessungen wurden in schwarzen 384-well Platten (*Corning*) in 100 nM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure), pH 8,0, 300 nM NaCl, 2 mM DTT (Dithiothreitol) und 0,2 % (v/v) Prionex bei einem Volumen von 25 μ l durchgeführt. Zur Bestimmung der IC_{50} -Werte wurde die Stammlösung mit destilliertem Wasser auf 100, 30, 10, 3 und 1 μ M verdünnt. 5 μ l der verdünnten Stammlösungen wurden mit der jeweiligen rekombinanten DUB (USP48 (*Boston*): 50 nM, USP2 katalytische Domäne (*Boston*): 10 nM, USP7 (*Boston*): 10 nM oder PLPro (*Boston*): 50 nM) auf die Platten gegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Substrat (300 nM Ub4K63 bzw. 500 nM UbM) gestartet und der Anstieg der Fluoreszenzintensität mit einem 485 nm (Excitation) / 520 nm (Emission) optischen Modul (*SpectraMax M5, Molecular Devices*) gemessen. Die Intensität wurde über einen Zeitraum von 10 min alle 10 s aufgezeichnet.

Die initiale Reaktionsgeschwindigkeit entspricht der Steigung des linearen Teils der jeweiligen Fluoreszenzintensitätskurve. Die jeweiligen Steigungen (bzw. initialen Reaktionsgeschwindigkeiten) wurden durch lineare Regression bestimmt. Zur Bestimmung der IC_{50} -Werte wurden die initialen Reaktionsgeschwindigkeiten über die Inhibitorkonzentration aufgetragen und die IC_{50} -Werte wurden dabei als Drei-Parameter-Sigmoid nach folgender Formel angepasst:

$$Y = \frac{Max}{1 + \left(\frac{X}{IC_{50}}\right)^n}$$

Hierbei ist X die Inhibitorkonzentration, Y die initiale Reaktionsgeschwindigkeit, Max die initiale Reaktionsgeschwindigkeit der nicht inhibierten Reaktion, IC_{50} die Inhibitorkonzentration bei

halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit und n der Hill-Koeffizient. Es wird davon ausgegangen, dass das Enzym bei hohen Inhibitorkonzentrationen komplett inaktiviert wird. Die Parameter Max , IC_{50} und n wurden durch die Methode der kleinsten Quadrate mithilfe von *Python library SciPy 1.7.3* bestimmt.

Die IC_{50} -Werte wurden in einem bis fünf unabhängigen Experimenten, jeweils in technischen Duplikaten, bestimmt. Für die Verbindungen **59f-h**, **65b,h**, **73d,i-m,o,p,s,t**, wurde jeweils ein einzelnes Experiment durchgeführt, während für die Verbindungen **61a,c,d,f,g**, **65c-e**, **73e,h,g,q** jeweils zwei Experimente durchgeführt wurden. Für die Verbindungen **73c,f,n** und ML-364 wurden jeweils drei Experimente durchgeführt und für die Verbindung **61e** wurden fünf Experimente durchgeführt. Die Anzahl der durchgeführten Experimente richtete sich dabei nach der Magnitude und der Varianz des initialen Experiments.

7.4.3. Im *Screening* verwendete Verbindungen

Für das STAMBPL1 *Screening* wurden zwei verschiedene chemisch diverse Substanzbibliotheken verwendet. Hierbei handelte es sich um die *BIONet* Substanzbibliothek von *Key Organics* und die *ChemBridge* Substanzbibliothek. Die Aktivität der Verbindungen wurde am IEIM unter den gleichen Bedingungen wie in Kapitel 7.4.1 beschrieben bestimmt, jedoch mit einer Inhibitorkonzentration von 500 μM .

Für das ML-364 *Screening* wurden einerseits Verbindungen der STK-Substanzbibliothek des *Vitas-M Laboratory* untersucht und zum anderen bekannte USP-Inhibitoren. Für das STK-*Screening* wurden die Verbindungen mit einer Konzentration 100 μM bei 20 nM USP48 und 100 nM Ub4K63 eingesetzt. Beim *Screening* der USP-Inhibitoren kamen folgende Verbindungen zum Einsatz (s. auch Tabelle 28): 6-Thiogunain (AdooQ A4882), IU1 (AdooQ A13209), ML-364 (AdooQ A20371), NSC632839 (Selleck S4922), HBX41108 (AdooQ A13352), P005091 (AdooQ A13227), WP1130 (AdooQ A10988), SJB2-043 (AdooQ A15238), GSK2643943 (MedChemExpress HY-111458), HBX19818 (MedChemExpress HY-17540), USP7-IN-1 (MedChemExpress HY-16709), EOAI3402143 (MedChemExpress HY-111408), DUB-IN-3 (MedChemExpress HY-507373) und BAY11-7082 (Selleck S2913). Die Bestimmung der Aktivität wurde am IEIM bei 50 nM USP48, 250 nM Ub4K63 (*Boston*) und mit einer Inhibitorkonzentration von 100 μM in Duplikaten durchgeführt.

7.5. Computergestützte Methoden

Für die verschiedenen computergestützten Berechnungen wurden als *Software Molecular Operating Environment* (MOE, Version 2022.02, *CCDC Software Ltd.*)^[44], *Genetic Optimization for Ligand Docking* (GOLD, Version 2020.2.0 *CCDC Software Ltd.*)^[84], *TmoleX* 4.4.0 (*COSMOlogic GmbH & Co. KG*)^[86,87], sowie die *open source* Programme *DiffDock*^[83] und *ColabFold*^[82] verwendet. MOE^[44] wurde für die Superposition der Proteine und zur Visualisierung der Dockingergebnisse verwendet. Die quantenmechanischen Berechnungen zur Generierung der elektrostatischen Potentiale wurde in *TmoleX*^[86,87] vorgenommen. Hierzu wurde als DFT-Funktional BP86 und als Basissatz def-SV (P), sowie zusätzlich die DFT-D3 (BJ)-Korrektur verwendet.^[88] Die elektrostatischen Potentiale wurden anschließend auf der Isooberfläche (Isowert = 0,001) der Elektronendichte visualisiert.

Für die Dockinguntersuchungen wurde zunächst die Sequenz der USP-Domäne der *UniProt* Datenbank (Q86UV5)^[91] entnommen und anhand dieser in *ColabFold*^[82] ohne Template eine Proteinstruktur generiert. Um die Bindetasche dieser Struktur zu identifizieren, wurden die Strukturen der synthetisierten Inhibitoren per *Simplified Molecular Input Line Entry Specification* (SMILES) zusammen mit der .pdb Datei aus *ColabFold*^[82] in *DiffDock*^[83] geladen und für jede Verbindung Dockingpositionen mit folgenden Parametern generiert: *Interference steps*: 20; *Number of actual inference steps*: 18; *Number of samples*: 40.

Die Verbindungen wurden anschließend erneut gedockt, wobei diesmal das Programm GOLD^[84] zum Einsatz kam. Hierzu wurde die Proteinstruktur aus *ColabFold*^[82] als .pdb in GOLD^[84] geladen. Die Bindetasche des Proteins wurde im Radius von 10 Å um den Tyrosinrest 414 herum definiert. Die Struktur der Liganden wurde in MOE^[44] generiert und energieminiert. Anschließend wurden diese als .mol2 Dateien in GOLD^[84] geladen. Für jeden Liganden wurden 20 Dockingläufe durchgeführt, dabei wurde kein vorzeitiger Abbruch (*early termination*) zugelassen. Als Scoringfunktion wurde *ChemScore*^[95] verwendet und als *template gold_serine-protease VS*. Die Dockingexperimente wurden mit rigiden Seitenketten durchgeführt.

 8. Verzeichnisse

8.1. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Å	Ångström
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschriften
Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzolsulfonylfluorid
AMSH-LP	<i>Associated molecule with the SH3 Domain of STAM like protease</i>
APCI	Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck
Äq.	Äquivalent
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
br s	Breites Signal
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
COMU	[(1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)dimethylamino-morpholino-carbenium-hexafluorophosphat]
CSN	COP9 Signalosom
Cys	Cystein
d	Dublett
DBU	1,8-Diazabicyclo(5.4.0)undec-7-en
DCM	Dichlormethan
dd	Dublett vom Dublett
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
DUB	Deubiquitinasen
DUSP	<i>Domain present in ubiquitin-specific proteases</i>
E1	Ubiquitin-Aktivierungsenzyme
E2	Ubiquitin-konjugierende Enzyme
E3	Ubiquitin-Ligasen
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid
ESI	Elektrospray Ionisation
Et	Ethyl
ges.	Gesättigt
<i>Gli1</i>	Glioma assoziiertes Oncoprotein
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
h	Stunden
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

Hh	<i>Hedgehog</i>
His	Histidin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR-MS	Hochauflösende Massenspektrometrie
HTS	<i>High-Throughput Screenings</i>
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
IEIM	Institut für experimentelle innere Medizin
Ins	Insertation
JAMM	<i>JAB1/MPN/MOV34 proteases</i>
l	Liter
Lsg.	Lösung
Lys	Lysin
M	Molar entspricht mol/l
m	Multipllett
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
MCPIP	<i>Monocyte chemotactic protein-induced proteins</i>
Me	Methyl
Met	<i>Methionin</i>
MINDY	<i>Novel motif interacting with ubiquitin-containing DUB family</i>
MIT	<i>N-Terminal microtubule-interacting and transport</i>
MJD	<i>Machado-Joseph disease domain superfamily</i>
MKP-1	<i>Mitogen-activated protein kinase phosphatase</i>
MPN	C-Terminale Mpr1p und Pad1p N-terminale Domäne
MS	<i>Massenspektrometrie</i>
MW	Mikrowelle
NCS	<i>N-Chlorsuccinimid</i>
NEDD8	<i>Neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 8</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NLS	<i>Nuclear localisation sequence</i>
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
OTU	<i>Otubain/ovarian tumor-domain containing proteins</i>
PEG	<i>Polyethylenglykol</i>
Ph	Phenyl
Phe	Phenylalanin
pKa	Logarithmischer Wert der Säurekonstante Ka
PLPro	<i>Papain like protease</i>
PPPDE	<i>Permuted papain fold peptidases of dsDNA viruses and eukaryotes</i>
PyBop	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
q	Quartett
R	Rest
RA	Restaktivität
Rho110	Rhodamin110
Rpn11	<i>Proteasome 26S subunit, non-ATPase 14</i>
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SAR	Struktur-Wirkungsbeziehung
SMILES	<i>Simplified Molecular Input Line Entry Specification</i>

STAM	<i>Signal transducing adaptor molecule</i>
STAMBPL1	<i>STAM binding protein like 1</i>
SUMO	<i>Small ubiquitin-related modifier</i>
T	Temperatur
t	Triplett
TBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminiumtetrafluorborat
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Tos	Tosyl
Tyr	Tyrosin
Ub	Ubiquitin
UBD	Ubiquitinbindedomäne
UBL	<i>Ubiquitin-like</i>
UbM	Monoubiquitin-Rhodamin110
UCH	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase</i>
USP	Ubiquitin spezifischen Protease
v_0	Reaktionsgeschwindigkeit zur nicht inhibierten Reaktion
v_i	Reaktionsgeschwindigkeit der inhibierten Reaktion
ZUFSP	<i>Zn-finger and UFSP domain proteins</i>
τ	Verweilzeit

8.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Mechanismus der Ubiquitinierung. Ubiquitin Vorstufen werden von Deubiquitinasen (DUBs) zu Ubiquitin gespalten. Dieses wird unter ATP-Verbrauch auf E1 übertragen und von diesem an E2 weitergegeben. Schließlich bildet sich ein Komplex mit der Ligase E3. Im hier gezeigten Beispiel wird das Ubiquitin zuerst von E2 auf E3 und dann von E3 auf einen Lysinrest des Substrats übertragen. Es gibt aber auch E3-Ligasen, die nicht an Ubiquitin binden. In diesem Fall dient der Komplex aus E2 und E3 zur Substraterkennung und Ubiquitin wird direkt von E2 auf das Substrat übertragen. DUBs können diesen Prozess ganz oder teilweise rückgängig machen. Abbildung nach Harrigan et. al. ^[4,6] 1
Abbildung 2:	Verschiedene Formen der Ubiquitinierung sortiert nach aufsteigender Komplexität. Abbildung nach MEVISSSEN et al. ^[7] 2
Abbildung 3:	a) Oben: Nomenklatur des distalen und proximalen Ubiquitins. Unten: Exo- und Endo-Aktivität. b) Oben: Nomenklatur der Ubiquitinbindungsstellen. Das aktive Zentrum ist als Stern dargestellt. Unten: STAMBPL1 bindet STAM, welches die S1' Bindestelle besitzt. Dies ermöglicht eine höhere DUB-Aktivität. Abbildung nach MEVISSSEN et al. ^[7] 4
Abbildung 4:	Mechanismus von Cysteinprotease DUBs (a) und Metalloprotease DUBs (b). Wasserstoffbrückenbindungen sind als rot-gestrichelte Linien dargestellt. Abbildung nach MEVISSSEN et. al. ^[7] 6
Abbildung 5:	Schematische Darstellung der Domänen von STAMBPL1 7

Abbildung 6:	Oben: Schematische Kristallstruktur der JAMM-Domäne von STAMBPL1 (Struktur aus der <i>Protein Data Bank</i> PDB: 2ZNR) ^[23,30,31] mit Ins-1 (grün) und Ins-2 (blau). Das aktive Zentrum ist blau hinterlegt. Unten links: Oberfläche der JAMM-Domäne mit Ins-1 (grün) und Ins-2 (blau). Unten rechts: Aktives Zentrum von STAMBPL1	8
Abbildung 7:	Strukturen der JAMM-Inhibitoren 1,10-Phenanthrolin, Thiolutin und Capzimin	9
Abbildung 8:	Schematische Darstellung der Domänen von USP48 nach GHANEM et al. ^[39]	10
Abbildung 9:	Links: Pharmakophor zu STAMBPL1 für die Suche nach geeigneten Inhibitorkandidaten. Rechts: Anzahl der Verbindungen nach jedem Schritt. Überarbeitete Abbildung aus unveröffentlichter Arbeit von Sebastian Wussow	12
Abbildung 10:	Links: Pharmakophor für USP48. Rechts: Anzahl der Verbindungen nach jedem Schritt. Abbildung aus unveröffentlichter Arbeit von Sebastian Wussow	12
Abbildung 11:	Struktur von STK593195	14
Abbildung 12:	Struktur von ML-364	54
Abbildung 13:	Oben: Struktur von USP48 generiert mit <i>ColabFold</i> . Unten: Aktives Zentrum (gelb unterlegt) und Bindetasche (blau unterlegt) von USP48	61
Abbildung 14:	Dockinglösungen aus DiffDock für die Inhibitoren 59f (links oben), 61e (rechts oben), 65c (links unten), 73g (rechts unten). Gezeigt ist jeweils die Position 1/40	63
Abbildung 15:	Die jeweils besten Dockingergebnisse (Position 1/20) der Inhibitoren: (a) ML-364, (b) 59f . Oben: Dockingposition in Bindetasche mit Darstellung der Proteinoberfläche. Mitte: Dockingposition in Bindetasche ohne Darstellung der Proteinoberfläche. Unten: Schematische 2D-Darstellung der Bindetasche	64
Abbildung 16:	Die jeweils besten Dockingergebnisse (Position 1/20) der Inhibitoren. (a) 61e , (b) 65c . Oben: Dockingposition in Bindetasche mit Darstellung der Proteinoberfläche. Mitte: Dockingposition in Bindetasche ohne Darstellung der Proteinoberfläche. Unten: Schematische 2D-Darstellung der Bindetasche	65
Abbildung 17:	Dockingergebnis (Position 1/20) des Inhibitors 73g . Oben links: Dockingposition in Bindetasche mit Darstellung der Proteinoberfläche. Unten: Dockingposition in Bindetasche ohne Darstellung der Proteinoberfläche. Oben rechts: Schematische 2D-Darstellung der Bindetasche	66
Abbildung 18:	Elektrostatische Potentiale von ML-364 (links) und dem Inhibitor 73g (rechts) dargestellt über die Einfärbung der Isooberfläche der Elektronendichte (Isowert=0,001); rot: negatives elektrostatisches Potential (Elektronenüberschuss); blau: positives elektrostatisches Potential (Elektronendefizit)	66
Abbildung 19:	Oben: Superposition von USP7 (blau, PDB 59NR) ^[89,90] und USP48 (grau). Unten links: Bindetasche von USP7 (blau, PDB 59NR) ^[89,90] und USP48 (grau) im Vergleich. Mitte rechts: Struktur des kokristallisierten USP7 Inhibitors 76 . Unten: Bindetasche von USP7 (PDB 59NR) ^[89,90] mit dem Inhibitor 76 (weiß)	68
Abbildung 20:	Vergleich der Sequenzen von verschiedenen USPs und PLPro. Die Sequenzen wurden der UniProt Datenbank ^[91] entnommen und mit <i>Clustal Omega</i> ^[92] aligniert. Rot markiert sind die Reste, die F ²⁹⁹ bzw. Y ⁴¹⁴ in USP48 entsprechen	69
Abbildung 21:	ML-364 und die beiden aktivsten Inhibitoren 73f und 73g	71
Abbildung 22:	<i>Screening Hits</i> für USP48 gefunden von CHAN et al. ^[94]	71

8.3. Schemaverzeichnis

Schema 1:	Retrosynthese des Isatin- <i>Scaffolds</i>	16
Schema 2:	Synthese der Isatin-Derivate 1a-d mittels Aldolreaktion	17
Schema 3:	Synthese der <i>N</i> -substituierten Isatin-Derivate	18
Schema 4:	Retrosynthetische Betrachtung der Isatin-Derivate 1j-l	19
Schema 5:	Synthese der Isatin-Derivate 1j-l mittels GRIGNARD-Reaktion. j,l : X = Br; k : X = Cl.....	19
Schema 6:	Retrosynthese des Sulfon <i>Scaffolds</i>	20
Schema 7:	Synthese von 1-Pivaloylpiperidin-4-on (10).....	21
Schema 8:	Versuch der Synthese des Sulfonylchlorids (12).....	22
Schema 9:	Versuch der Synthese des Iodmethylpiperidin-Derivats (18).....	22
Schema 10:	Epoxidierung von 1-Pivaloylpiperidin-4-on (10).....	22
Schema 11:	Synthese der Thioether 16a-f	23
Schema 12:	Oxidation der Thioether (16a-f).....	23
Schema 13:	Synthese <i>N</i> -substituierter Derivate mit Hydroxypiperidin <i>Scaffold</i>	24
Schema 14:	Retrosynthese des Sulfonylethanol <i>Scaffolds</i>	25
Schema 15:	Versuch der Synthese des Thioethers 28 über das Epoxid 29	26
Schema 16:	Versuch der Synthese von 1-(Benzylthio)-3-chlorpropan-2-ol (32).....	27
Schema 17:	Synthese der Verbindungen mit Sulfonylethanol <i>Scaffold</i> (27)	27
Schema 18:	Retrosynthese des Aminoalkohol <i>Scaffold</i> (36).....	28
Schema 19:	Retrosynthese der Verbindungen mit Sulfonamid <i>Scaffold</i>	28
Schema 20:	Synthese der Derivate 48a-c	30
Schema 21:	Retrosynthese der STK593195 Analoga.....	31
Schema 22:	Synthese der STK593195 Analoga	32
Schema 23:	Synthese von ML-364 Analoga mit verschiedenen Amid- und Sulfonyl-Gruppen	34
Schema 24:	Versuch der Synthese eines unsubstituierten Dihydrochinazolinons 62b	36
Schema 25:	Flussschema des <i>Flow</i> -Reaktors für die zweistufige Synthese von einem auf Anthranilsäure basierendem ML-364 Analog.....	37
Schema 26:	Flussschema des <i>Flow</i> -Reaktors für die Synthese tosylierter Anthranilsäure.....	38
Schema 27:	Synthese von ML-364 Analoga mit substituierter Anthranilsäure-Gruppe.....	40
Schema 28:	Synthese der enantiomeren Piperazin Derivate 71a/b	42
Schema 29:	Funktionalisierung der Thiazolamin-Gruppe	42
Schema 30:	Versuch der Synthese des Bromthiazolamids 72 im <i>Flow</i> -Reaktor mit zwei unterschiedlichen Versuchsaufbauten	45

8.4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	<i>Scaffolds</i> , die im <i>in vitro screening</i> inhibitorische Aktivität gegenüber STAMBPL1 zeigten	13
Tabelle 2:	Via Aldol-Reaktion synthetisierte Verbindungen mit Isatinscaffold und verwendete Ketone	17
Tabelle 3:	<i>N</i> -Substituierte Verbindungen mit Isatin- <i>Scaffold</i> und zugehörige Halogenide	18
Tabelle 4:	Via GRIGNARD-Reaktion synthetisierte Isatin-Derivate	20
Tabelle 5:	Substituenten der Derivate mit Hydroxypiperidin <i>Scaffold</i>	24
Tabelle 6:	Substituenten der <i>N</i> -substituierten Derivate mit Hydroxypiperidin <i>Scaffold</i>	25
Tabelle 7:	Substituenten der Derivate mit Sulfonamid <i>Scaffold</i>	30
Tabelle 8:	Synthetisierte STK593195-Analoga	33
Tabelle 9:	Substituenten der ML-364 Analoga mit substituierter Phenylthiazol-Gruppe und Ausbeuten des letzten Reaktionsschrittes	35
Tabelle 10:	Substituenten der ML-364 Analoga mit substituierter Tosyl-Gruppe und Ausbeuten des letzten Reaktionsschrittes	36
Tabelle 11:	HPLC-Umsatz von <i>p</i> -Toluolsulfonsäurechlorid und dem gewünschten Produkt 64a bei verschiedenen Temperaturen und Verweilzeiten im <i>Flow</i> -Reaktor.....	38
Tabelle 12:	HPLC-Umsatz von <i>p</i> -Toluolsulfonsäurechlorid und dem gewünschten Produkt 64a bei einer Verweilzeit von 20 min und verschiedenen Reaktortemperaturen nach der Vorschrift von GIOIELLO et al. ^[73]	39
Tabelle 13:	HPLC-Umsatz von <i>p</i> -Toluolsulfonsäurechlorid und dem gewünschten Produkt bei verschiedenen Verweilzeiten und Reaktorgrößen bei einer Temperatur von 120 °C.....	39
Tabelle 14:	Synthetisierte Verbindungen mit substituierter Anthranilsäure-Einheit und Ausbeuten des letzten Reaktionsschrittes	41
Tabelle 15:	Getestete Reaktionsbedingungen für die Amidkupplung zum Zwischenprodukt 72 . Reaktionsbedingungen bei denen keine Ausbeute bestimmt wurde, führten entweder nicht zum Produkt oder zu schwer abtrennbaren Nebenprodukten.....	43
Tabelle 16:	Substituenten am Thiazolrest der Derivate 73a-t und Ausbeuten des letzten Reaktionsschrittes. Im Falle des Derivats 73g bezieht sich die Ausbeute auf die Abspaltung der Methyl-Gruppe von 73f	46
Tabelle 17:	Assay-Ergebnisse zur Inhibition von STAMBPL1 durch Verbindungen mit Isatin <i>Scaffold</i> bei 100 µM Inhibitorkonzentration	48
Tabelle 18:	Assay-Ergebnisse zur Inhibition von STAMBPL1 durch Verbindungen mit Hydroxypiperidin <i>Scaffold</i> bei 100 µM Inhibitorkonzentration	49
Tabelle 19:	Assay-Ergebnisse zur Inhibition von STAMBPL1 durch Verbindungen mit Sulfonamid <i>Scaffold</i> bei 100 µM Inhibitorkonzentration	49
Tabelle 20:	Strukturen und Ergebnisse zur Inhibition von STAMBPL1 durch die untersuchten Hydroxamsäureverbindungen bei 100 µM Inhibitorkonzentration	51
Tabelle 21:	Ergebnis der Inhibition von STAMBPL1 durch Acetohydroxamsäure bei 100 µM Inhibitorkonzentration	52

Tabelle 22:	Restaktivitäten (RA) von USP48 bei Inhibition durch die STK593195-Analoga bei 100 µM Inhibitorkonzentration	53
Tabelle 23:	Inhibitorische Aktivitäten der Phenylthiazol-Analoga gegenüber USP48	55
Tabelle 24:	Inhibitorische Aktivitäten der Sulfonamid-Analoga gegenüber USP48.....	56
Tabelle 25:	Inhibitorische Aktivitäten der Verbindungen mit substituierter Anthranilsäure-Einheit gegenüber USP48	57
Tabelle 26:	Inhibitorische Aktivitäten der Verbindungen mit substituiertem Phenylrest der Phenylthiazol-Einheit gegenüber USP48	59
Tabelle 27:	Inhibitorische Aktivität von ML-364 und 73g gegenüber USP48 und verwandten Cysteinproteasen.....	60
Tabelle 28:	Strukturen und Screeningergebnisse der untersuchten USP-Inhibitoren bei 100 µM Inhibitorkonzentration	i

8.5. Literaturverzeichnis

- [1] K. Sasaki, K. Iwai, *Immunol. Rev.* **2015**, 266, 175.
- [2] R. K. Shrestha, J. A. Ronau, C. W. Davies, R. G. Guenette, E. R. Strieter, L. N. Paul, C. Das, *Biochemistry* **2014**, 53, 3199.
- [3] A. Hershko, A. Ciechanover, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 425.
- [4] J. A. Harrigan, X. Jacq, N. M. Martin, S. P. Jackson, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2018**, 17, 57.
- [5] A. Ciechanover, *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, 31, 474.
- [6] Q. Yang, J. Zhao, D. Chen, Y. Wang, *Mol. Biomed.* **2021**, 2, 23.
- [7] T. E. T. Mevissen, D. Komander, *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, 86, 159.
- [8] V. Jesenberger, S. Jentsch, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, 3, 112.
- [9] S. P. Jackson, D. Durocher, *Mol. Cell* **2013**, 49, 795.
- [10] K. Husnjak, I. Dikic, *Annu. Rev. Biochem.* **2012**, 81, 291.
- [11] L. Herhaus, I. Dikic, *EMBO Rep.* **2015**, 16, 1071.
- [12] T. Hermanns, C. Pichlo, I. Woiwode, K. Klopffleisch, K. F. Witting, H. Ovaa, U. Baumann, K. Hofmann, *Nat. Commun.* **2018**, 9, 799.
- [13] T. Hermanns, C. Pichlo, U. Baumann, K. Hofmann, *Nat. Commun.* **2022**, 13, 401.
- [14] D. Mennerich, K. Kubaichuk, T. Kietzmann, *Trends Cancer* **2019**, 5, 632.
- [15] H.-S. Choi, K.-H. Baek, *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2022**, 79, 117.
- [16] H.-B. Park, K.-H. Baek, *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Cancer* **2023**, 1878, 188992.
- [17] G. Dewson, P. J. A. Eichhorn, D. Komander, *Nat. Rev. Cancer* **2023**, 23, 842.
- [18] M. J. Clague, S. Urbé, D. Komander, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, 20, 338.
- [19] I. Schechter, A. Berger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, 27, 157.

- [20] J. McCullough, P. E. Row, O. Lorenzo, M. Doherty, R. Beynon, M. J. Clague, S. Urbé, *Curr. Biol.* **2006**, *16*, 160.
- [21] S. M. Lange, L. A. Armstrong, Y. Kulathu, *Mol. Cell* **2022**, *82*, 15.
- [22] D. Komander, M. J. Clague, S. Urbé, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 550.
- [23] Y. Sato, A. Yoshikawa, A. Yamagata, H. Mimura, M. Yamashita, K. Ookata, O. Nureki, K. Iwai, M. Komada, S. Fukai, *Nature* **2008**, *455*, 358.
- [24] N. J. Schauer, R. S. Magin, X. Liu, L. M. Doherty, S. J. Buhrlage, *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 2731.
- [25] P. D'Arcy, X. Wang, S. Linder, *Pharmacol. Ther.* **2015**, *147*, 32.
- [26] X. Chen, H. Shi, X. Bi, Y. Li, Z. Huang, *Cancer Lett.* **2019**, *456*, 49.
- [27] S. Chaithongyot, M. Naumann, *Cell. Mol. Life Sci.* **2022**, *79*, 86.
- [28] W. Dubiel, S. Chaithongyot, D. Dubiel, M. Naumann, *Biomolecules* **2020**, *10*.
- [29] K. Kikuchi, N. Ishii, H. Asao, K. Sugamura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *306*, 637.
- [30] Y. Sato, Y. Azusa, A. Yamagata, H. Mimura, X. Wang, M. Yamashita, K. Ookata, O. Nureki, K. Iwai, M. Komada et al., *Crystal structure of the DUB domain of human AMSH-LP*, **2008**.
- [31] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235.
- [32] G. Ambroise, T.-T. Yu, B. Zhang, M. Kacal, Y. Hao, A. L. Queiroz, A. T. Ouchida, C. Lindskog, E. Norberg, H. Vakifahmetoglu-Norberg, *Br. J. Cancer* **2020**, *123*, 1164.
- [33] R. Liu, G. Yang, M. Bao, Z. Zhou, X. Mao, W. Liu, X. Jiang, Di Zhu, X. Ren, J. Huang et al., *Oncogene* **2022**, *41*, 2265.
- [34] Y. Guo, Q. Liu, E. Mallette, C. Caba, F. Hou, J. Fux, G. LaPlante, A. Dong, Q. Zhang, H. Zheng et al., *J. Biol. Chem.* **2021**, *297*, 101107.
- [35] E. M. Cooper, C. Cutcliffe, T. Z. Kristiansen, A. Pandey, C. M. Pickart, R. E. Cohen, *EMBO J.* **2009**, *28*, 621.
- [36] L. Lauinger, J. Li, A. Shostak, I. A. Cemel, N. Ha, Y. Zhang, P. E. Merkl, S. Obermeyer, N. Stankovic-Valentin, T. Schafmeier et al., *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 709.
- [37] J. Li, T. Yakushi, F. Parlati, A. L. Mackinnon, C. Perez, Y. Ma, K. P. Carter, S. Colayco, G. Magnuson, B. Brown et al., *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 486.
- [38] K. Schweitzer, M. Naumann, *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1853*, 453.
- [39] A. Ghanem, K. Schweitzer, M. Naumann, *Mol. Biol. Rep.* **2019**, *46*, 1369.
- [40] A. Zhou, K. Lin, S. Zhang, L. Ma, J. Xue, S.-A. Morris, K. D. Aldape, S. Huang, *EMBO Rep.* **2017**, *18*, 1318.
- [41] G. B. Carballo, J. R. Honorato, G. P. F. de Lopes, T. C. L. d. S. E. Spohr, *Cell Commun. Signal.* **2018**, *16*, 11.

- [42] L. Du, Y. Li, M. Kang, M. Feng, Y. Ren, H. Dai, Y. Wang, Y. Wang, B. Tang, *Cancer Res.* **2021**, *81*, 3822.
- [43] M. Uckelmann, R. M. Densham, R. Baas, H. H. K. Winterwerp, A. Fish, T. K. Sixma, J. R. Morris, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 229.
- [44] *Molecular Operating Environment (MOE)*, 2022.02 Chemical Computing Group ULC, 910-1010 Sherbrooke St. W., Montreal, QC H3A 2R7, Canada, **2023**.
- [45] Y. Ye, H. Scheel, K. Hofmann, D. Komander, *Mol. Biosyst.* **2009**, *5*, 1797.
- [46] M. E. Morrow, M. T. Morgan, M. Clerici, K. Growkova, M. Yan, D. Komander, T. K. Sixma, M. Simicek, C. Wolberger, *EMBO Rep.* **2018**, *19*.
- [47] S. Cao, S. Engilberge, E. Girard, F. Gabel, B. Franzetti, J. A. Maupin-Furlow, *Structure (London, England : 1993)* **2017**, *25*, 823-833.e6.
- [48] J. Clayden, N. Greeves, S. G. Warren, *Organic chemistry*, Oxford University Press, Oxford, **2012**.
- [49] C. Molina, A. Ortega-Martínez, J. M. Sansano, C. Nájera, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 482.
- [50] C. S. Buxton, D. C. Blakemore, J. F. Bower, *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 14012.
- [51] D. Rambabu, S. Kiran Kumar, B. Yogi Sreenivas, S. Sandra, A. Kandale, P. Misra, M. V. Basaveswara Rao, M. Pal, *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 495.
- [52] K. Naresh Babu, N. R. Kariyandi, S. Saheeda M K, L. K. Kinthada, A. Bisai, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 12664.
- [53] S. Yagi, A. Tanaka, Y. Ichikawa, T. Ichitsubo, E. Matsubara, *Res. Chem. Intermed.* **2014**, *40*, 3.
- [54] G. R. M. Dowson, J. Cooper, P. Styring, *Faraday Discuss.* **2021**, *230*, 292.
- [55] M. A. Larsen, S. H. Cho, J. Hartwig, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 762.
- [56] S. Bag, R. Jayarajan, R. Mondal, D. Maiti, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 3182.
- [57] T. Tabuchi, J. Inanaga, M. Yamaguchi, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 3891.
- [58] R. Nirogi, A. R. Mohammed, A. K. Shinde, N. Bogaraju, S. R. Gagginapalli, S. R. Ravella, L. Kota, G. Bhyrapuneni, N. R. Muddana, V. Benade et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *103*, 289.
- [59] M. Node, K. Nishide, Y. Shigeta, K. Obata, H. Shiraki, H. Kunishige, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 12883.
- [60] I. Ugur, A. Marion, S. Parant, J. H. Jensen, G. Monard, *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54*, 2200.
- [61] D. H. Bianchi, *MARBLE* **2016**, *2*.
- [62] P. Evans, P. Johnson, R. J. K. Taylor, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *2006*, 1740.
- [63] L. Zhang, X. Wang, J. Wang, N. Grinberg, D. Krishnamurthy, C. H. Senanayake, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 2964.
- [64] A. Dedvukaj, S. Raemdonck, I. F. Vankelecom, *J. Membr. Sci.* **2023**, *685*, 121905.
- [65] Y. Deng, Y. Li, Q. Xiao, Y. Qiu, M. Wu, 邓勇, 李岩, 肖柑媛, 邱玥珩, 武梅, CN104860904 (A), **2014**.
- [66] N. Zidar, H. Macut, T. Tomašič, M. Brvar, S. Montalvão, P. Tammela, T. Solmajer, L. Peterlin Mašič, J. Ilaš, D. Kikelj, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 6179.

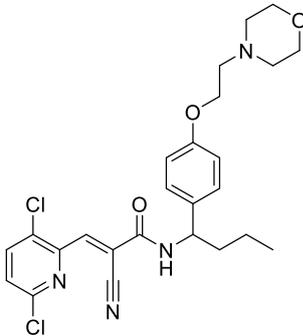
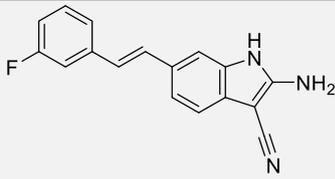
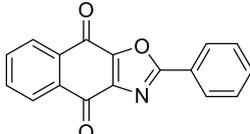
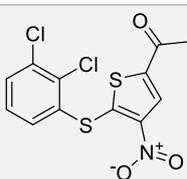
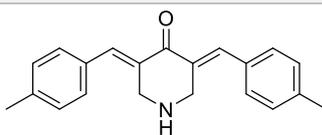
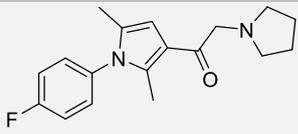
- [67] A. B. Gamble, J. Garner, C. P. Gordon, S. M. J. O'Conner, P. A. Keller, *Synth. Commun.* **2007**, *37*, 2777.
- [68] M. Kajino, A. Hasuoka, N. Tarui, T. Takagi, T. Takagai, EP2336107 (A2), **2005**.
- [69] N. Sun, Y. Huang, M. Yu, Y. Zhao, J.-A. Chen, C. Zhu, M. Song, H. Guo, Q. Xie, Y. Wang, *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *202*, 112536.
- [70] L. Su, Y. Jia, L. Zhang, Y. Xu, H. Fang, W. Xu, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 3807.
- [71] M. I. Davis, R. Pragani, J. T. Fox, M. Shen, K. Parmar, E. F. Gaudiano, L. Liu, C. Tanega, L. McGee, M. D. Hall et al., *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 24628.
- [72] P. Kumar, A. Matta, S. Singh, J. van der Eycken, C. Len, V. S. Parmar, E. V. van der Eycken, B. K. Singh, *Synth. Commun.* **2017**, *47*, 756.
- [73] H. Kakuta, A. Tanatani, K. Nagasawa, Y. Hashimoto, *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 1273.
- [74] A. Gioiello, E. Rosatelli, M. Teofrasti, P. Filipponi, R. Pellicciari, *ACS Comb. Sci.* **2013**, *15*, 235.
- [75] C. M. Gabriel, M. Keener, F. Gallou, B. H. Lipshutz, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 3968.
- [76] S. Sharma, N. W. Buchbinder, W. M. Braje, S. Handa, *Org. Lett.* **2020**, *22*, 5737.
- [77] P. A. Cox, A. G. Leach, A. D. Campbell, G. C. Lloyd-Jones, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 9145.
- [78] P. A. Cox, M. Reid, A. G. Leach, A. D. Campbell, E. J. King, G. C. Lloyd-Jones, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 13156.
- [79] L. Di, E. H. Kerns, *Drug Discov. Today (Drug Discovery Today)* **2006**, *11*, 446.
- [80] A. Citarella, D. Moi, L. Pinzi, D. Bonanni, G. Rastelli, *ACS Omega* **2021**, *6*, 21843.
- [81] K. Böhm, E. Schulze-Niemand, T. Kähne, E. Siddiqui, C. Täger, D. Ramsbeck, M. Buchholz, M. Naumann, *Arch. Pharm.* **2023**, *356*, e2200661.
- [82] M. Mirdita, K. Schütze, Y. Moriwaki, L. Heo, S. Ovchinnikov, M. Steinegger, *Nat. Methods* **2022**, *19*, 679.
- [83] Gabriele Corso, Hannes Stärk, Bowen Jing, Regina Barzilay, Tommi S. Jaakkola in *The Eleventh International Conference on Learning Representations*, **2023**.
- [84] G. Jones, P. Willett, R. C. Glen, A. R. Leach, R. Taylor, *Journal of molecular biology* **1997**, *267*, 727.
- [85] D. B. McConnell, *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 16319.
- [86] *TURBOMOLE*, a development of University of Karlsruhe and Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, 1989–2007, *TURBOMOLE GmbH*, since 2007; available from <http://www.turbomole.com>.
- [87] C. Steffen, K. Thomas, U. Huniar, A. Hellweg, O. Rubner, A. Schroer, *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 2967.
- [88] S. Grimme, S. Ehrlich, L. Goerigk, *J. Comput. Chem.* **2011**, *32*, 1456.

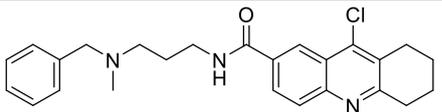
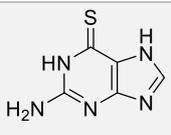
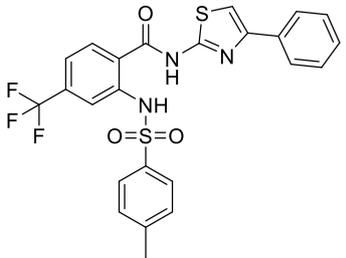
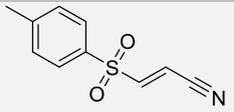
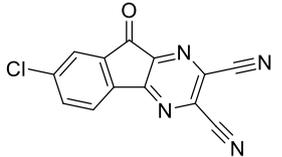
- [89] T. Harrison, G. Gavory, C. O'Dowd, M. Helm, I. Flasz, E. Arkoudis, A. Dossang, C. Hughes, E. Cassidy, K. McClelland et al., *Crystal structure of USP7 in complex with a potent, selective and reversible small-molecule inhibitor*, **2017**.
- [90] G. Gavory, C. R. O'Dowd, M. D. Helm, J. Flasz, E. Arkoudis, A. Dossang, C. Hughes, E. Cassidy, K. McClelland, E. Odrzywol et al., *Nat. Chem. Biol.* **2018**, *14*, 118.
- [91] *Nucleic Acids Res.* **2023**, *51*, D523-D531.
- [92] F. Madeira, M. Pearce, A. R. N. Tivey, P. Basutkar, J. Lee, O. Edbali, N. Madhusoodanan, A. Kolesnikov, R. Lopez, *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, W276-W279.
- [93] F. Göricke, V. Vu, L. Smith, U. Scheib, R. Böhm, N. Akkilic, G. Wohlfahrt, J. Weiske, U. Bömer, K. Brzezinka et al., *J. Med. Chem.* **2023**, *66*, 3431.
- [94] W. C. Chan, X. Liu, R. S. Magin, N. M. Girardi, S. B. Ficarro, W. Hu, M. I. Tarazona Guzman, C. A. Starnbach, A. Felix, G. Adelmant et al., *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 686.
- [95] M. D. Eldridge, C. W. Murray, T. R. Auton, G. V. Paolini, R. P. Mee, *Journal of computer-aided molecular design* **1997**, *11*, 425.
- [96] F. Colland, M. E. Gourdel, WO2013030218 (A1), **2012**.
- [97] L. F. Peterson, H. Sun, Y. Liu, H. Potu, M. Kandarpa, M. Ermann, S. M. Courtney, M. Young, H. D. Showalter, D. Sun et al., *Blood* **2015**, *125*, 3588.
- [98] R. Lu, G. Wu, M. Chen, D. Ji, Y. Liu, G. G. Zhou, W. Fu, *Mol. Ther. Oncolytics* **2021**, *23*, 477.
- [99] N. Kumari, K. K. Lee, S. Jha in *Neoplasm* (Hrsg.: H. N. Shahzad), InTech, **2018**.
- [100] H. Mistry, G. Hsieh, S. J. Buhrlage, M. Huang, E. Park, G. D. Cuny, I. Galinsky, R. M. Stone, N. S. Gray, A. D. D'Andrea et al., *Mol. Cancer Ther.* **2013**, *12*, 2651.
- [101] D. Chauhan, Z. Tian, B. Nicholson, K. G. S. Kumar, B. Zhou, R. Carrasco, J. L. McDermott, C. A. Leach, M. Fulciniti, M. P. Kodrasov et al., *Cancer cell* **2012**, *22*, 345.
- [102] B. Nicholson, C. A. Leach, S. J. Goldenberg, D. M. Francis, M. P. Kodrasov, X. Tian, J. Shanks, D. E. Sterner, A. Bernal, M. R. Mattern et al., *Protein Sci.* **2008**, *17*, 1035.
- [103] B.-H. Lee, M. J. Lee, S. Park, D.-C. Oh, S. Elsasser, P.-C. Chen, C. Gartner, N. Dimova, J. Hanna, S. P. Gygi et al., *Nature* **2010**, *467*, 179.
- [104] C. Reverdy, S. Conrath, R. Lopez, C. Planquette, C. Atmanene, V. Collura, J. Harpon, V. Battaglia, V. Vivat, W. Sippl et al., *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 467.
- [105] S.-J. Chuang, S.-C. Cheng, H.-C. Tang, C.-Y. Sun, C.-Y. Chou, *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 3102.
- [106] M. S. Ritorto, R. Ewan, A. B. Perez-Oliva, A. Knebel, S. J. Buhrlage, M. Wightman, S. M. Kelly, N. T. Wood, S. Virdee, N. S. Gray et al., *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4763.
- [107] M. Colombo, S. Vallese, I. Peretto, X. Jacq, J.-C. Rain, F. Colland, P. Guedat, *ChemMedChem* **2010**, *5*, 552.

9. Anhang

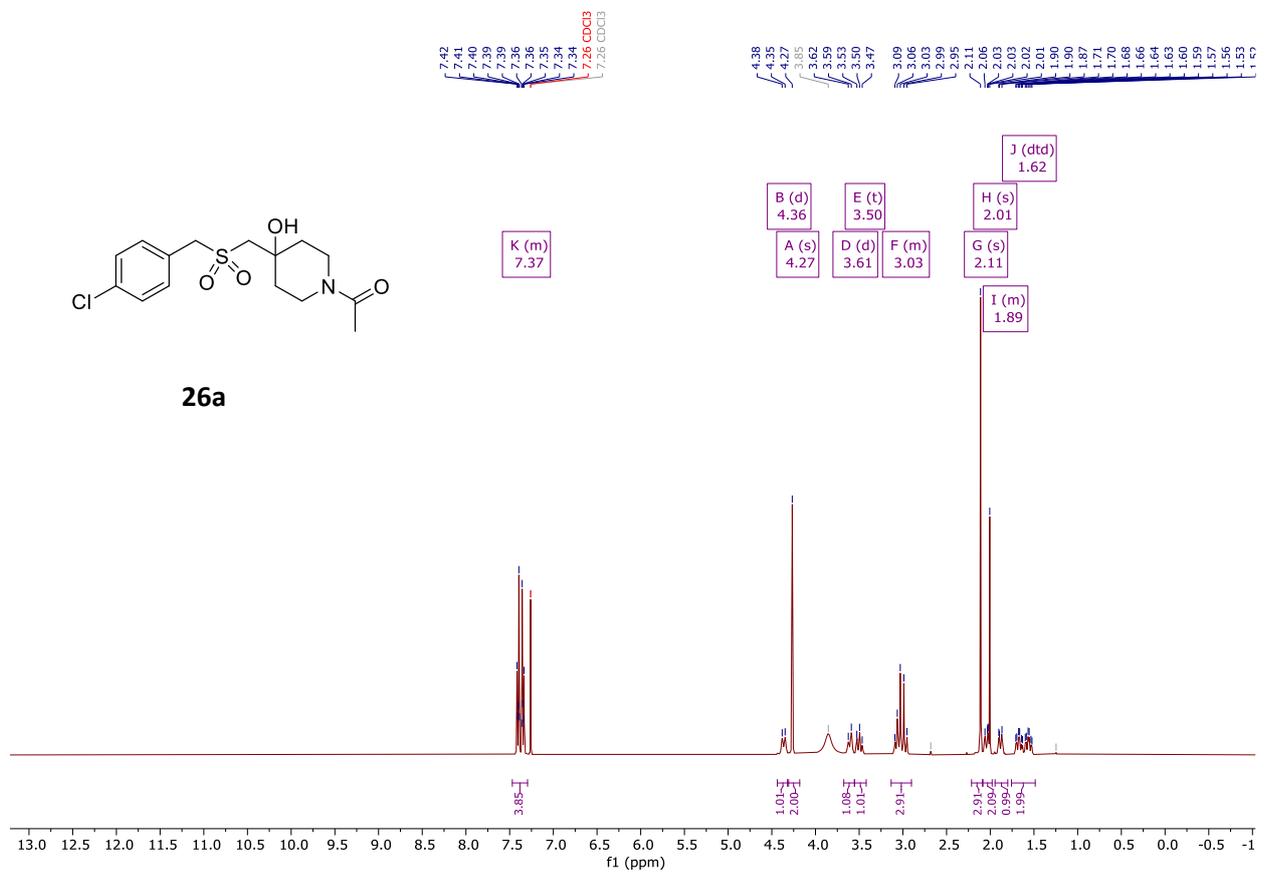
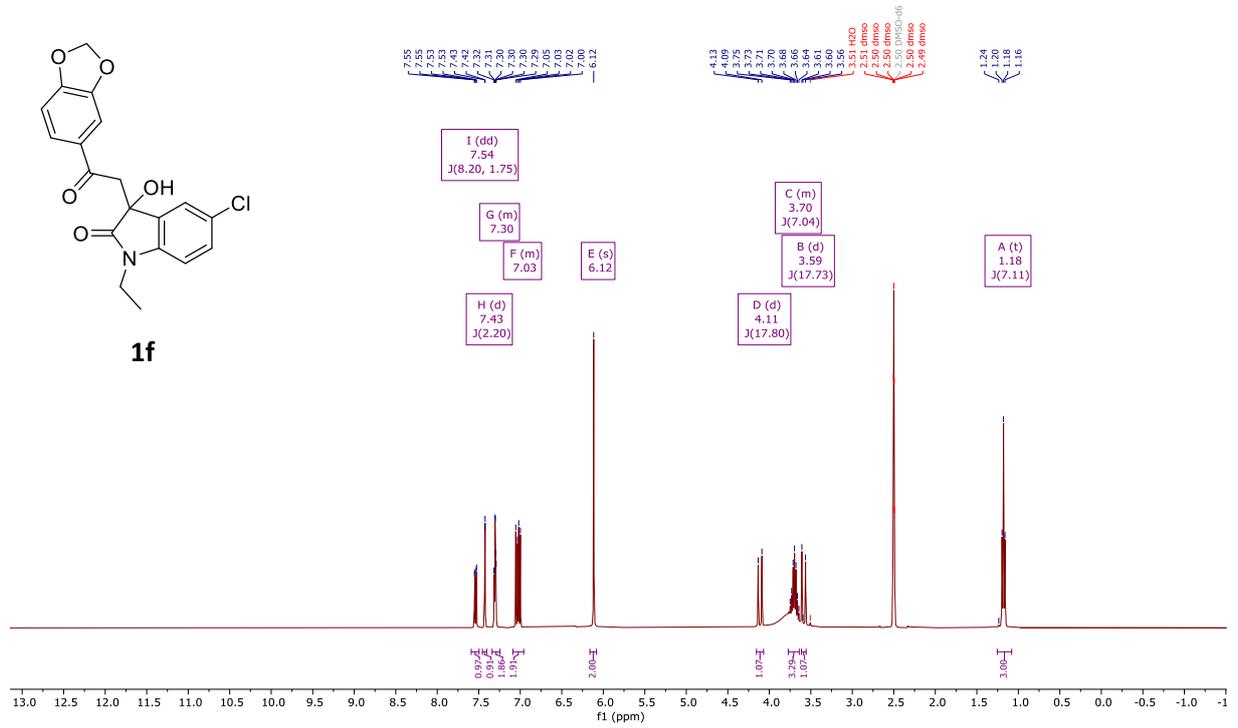
9.1. Screeningergebnisse bekannter USP-Inhibitoren

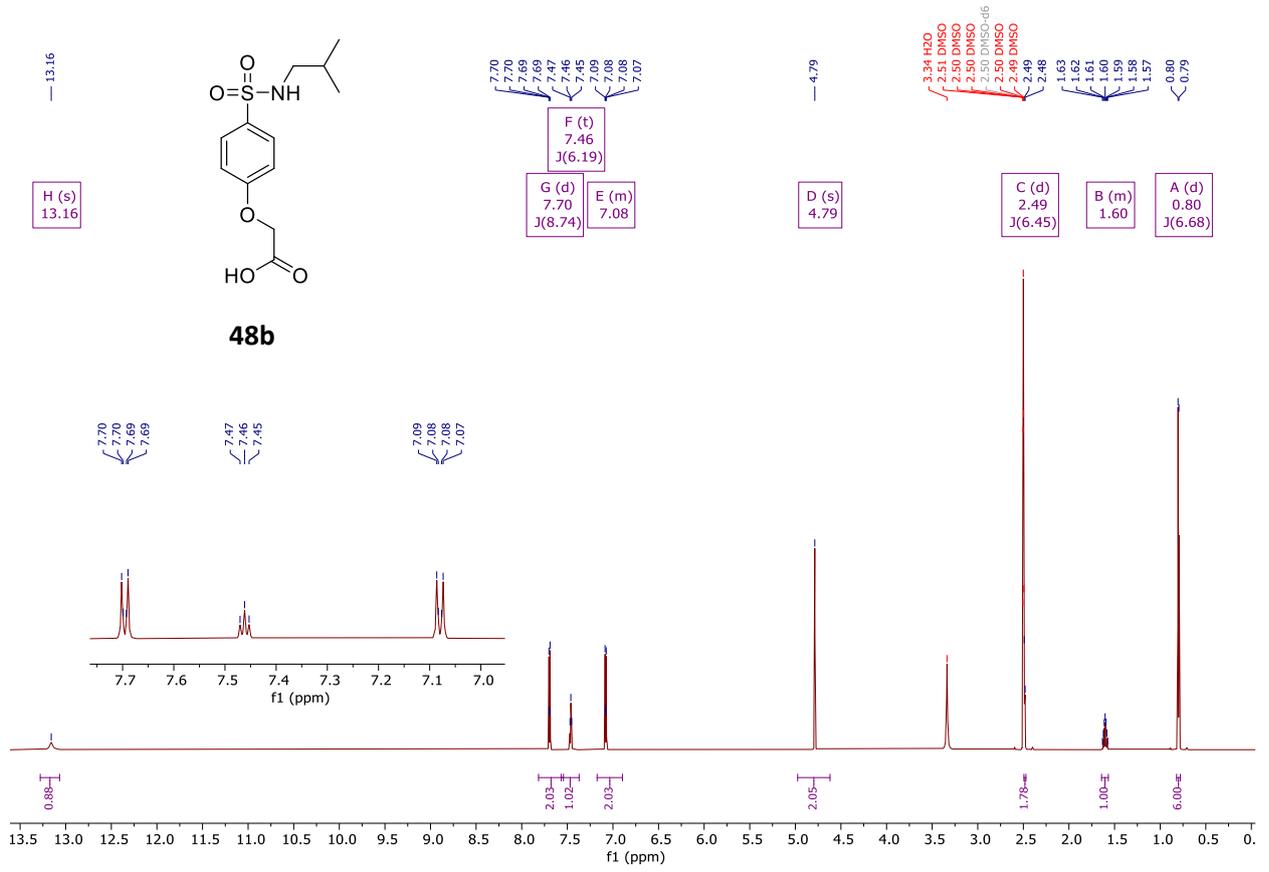
Tabelle 28: Strukturen und Screeningergebnisse der untersuchten USP-Inhibitoren bei 100 μM Inhibitorkonzentration

Struktur	Name	Target	IC ₅₀ für Target [μM]	RA USP48 [%]
	USP7-IN-1	USP7 ^[96]	77 ^[96]	123
	EOAI3402143	USP9X/USP24/USP5 ^[97]	1,6 ^[97]	113
	GSK2643943A	USP20 ^[98,99]	0,16 ^[99]	107
	SJB2-043	USP1 ^[100]	0,544 ^[100]	129
	P005091	USP7 ^[101]	4,2 (EC ₅₀) ^[101]	106
	NSC632839	USP2/USP7/SEN2 ^[102]	45/37/9,8 ^[102] (EC ₅₀)	112
	IU1	USP14 ^[103]	4,7 ^[103]	117

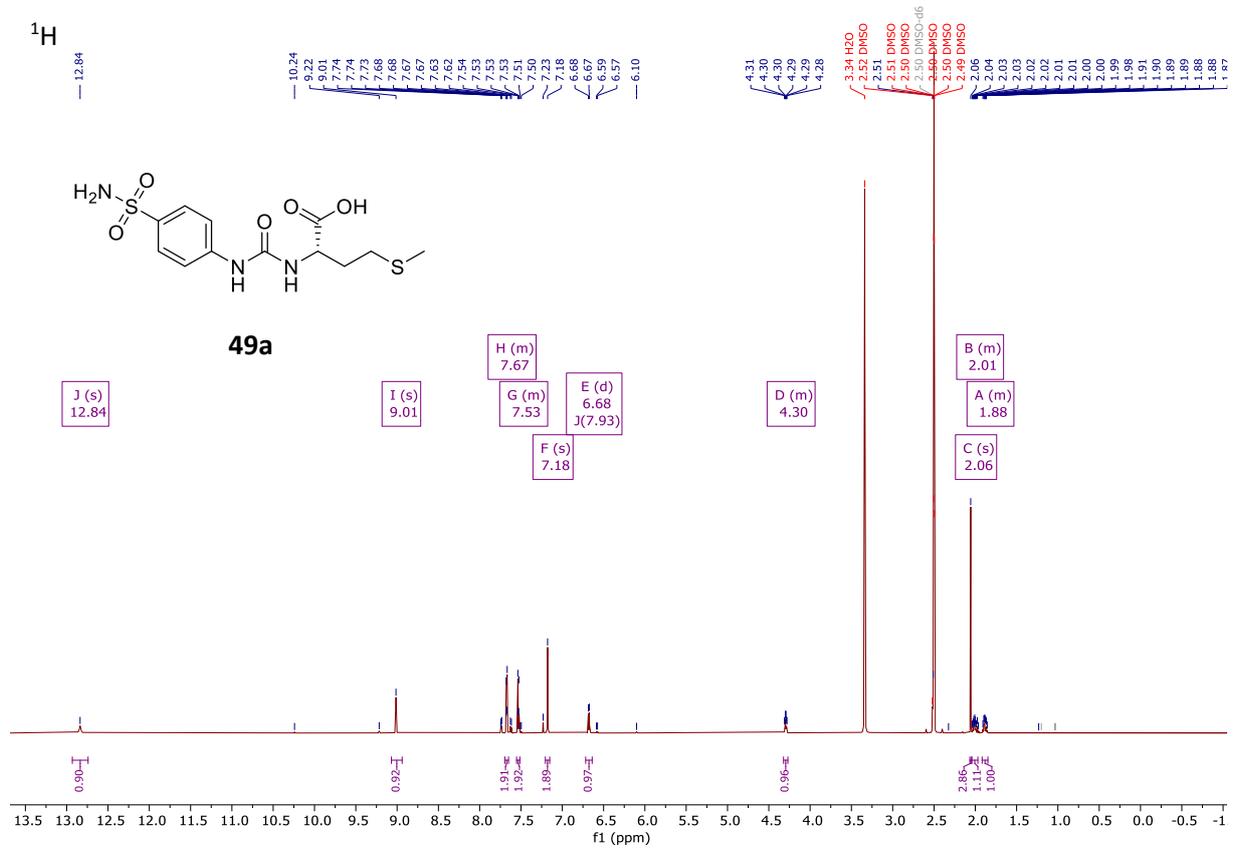
	HBX 19818	USP7 ^[104]	28,1	107
	6-Thioguanine	USP2/PLpro ^[105]	40/25 ^[105]	99
	ML-364	USP2 ^[71]	1,1 ^[71]	5
	BAY 11-7082	USP7/USP21 ^[106]	0,19/0,96 ^[106]	84
	HBX 41108	USP7/USP8 ^[107]	0,4/0,096 ^[107]	137

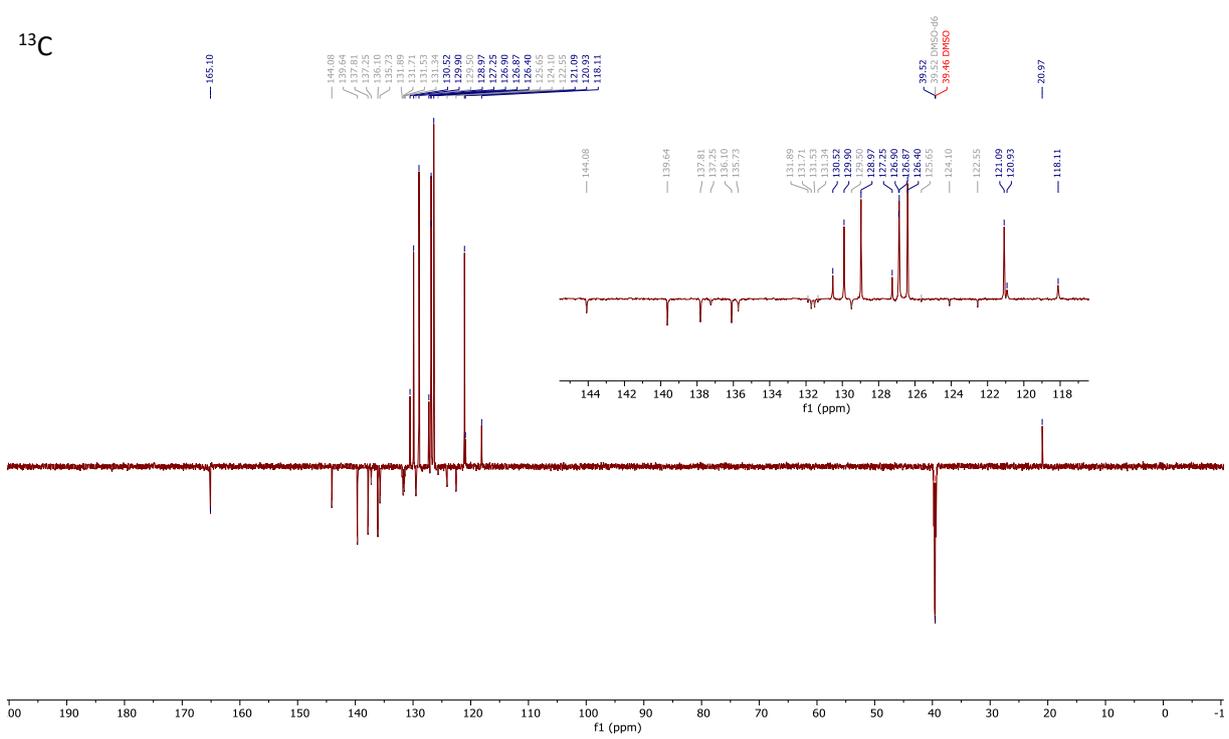
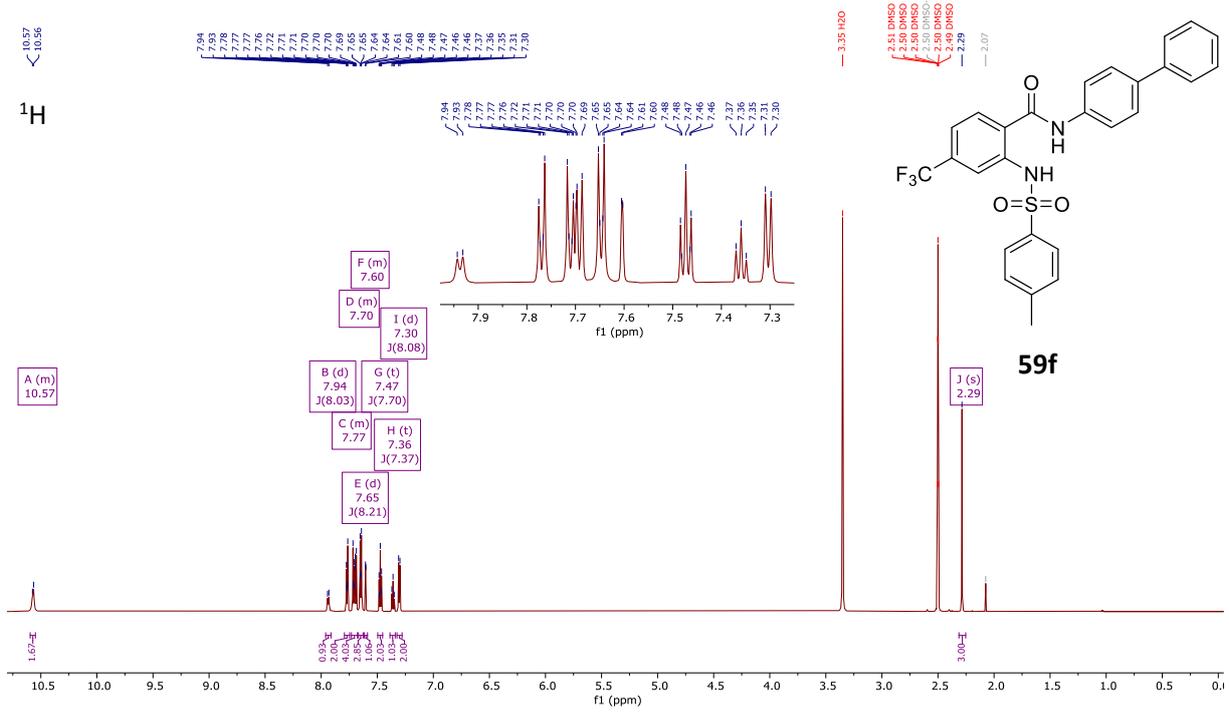
9.2. ¹H-NMR Spektren ausgewählter STAMBPL1 Inhibitoren

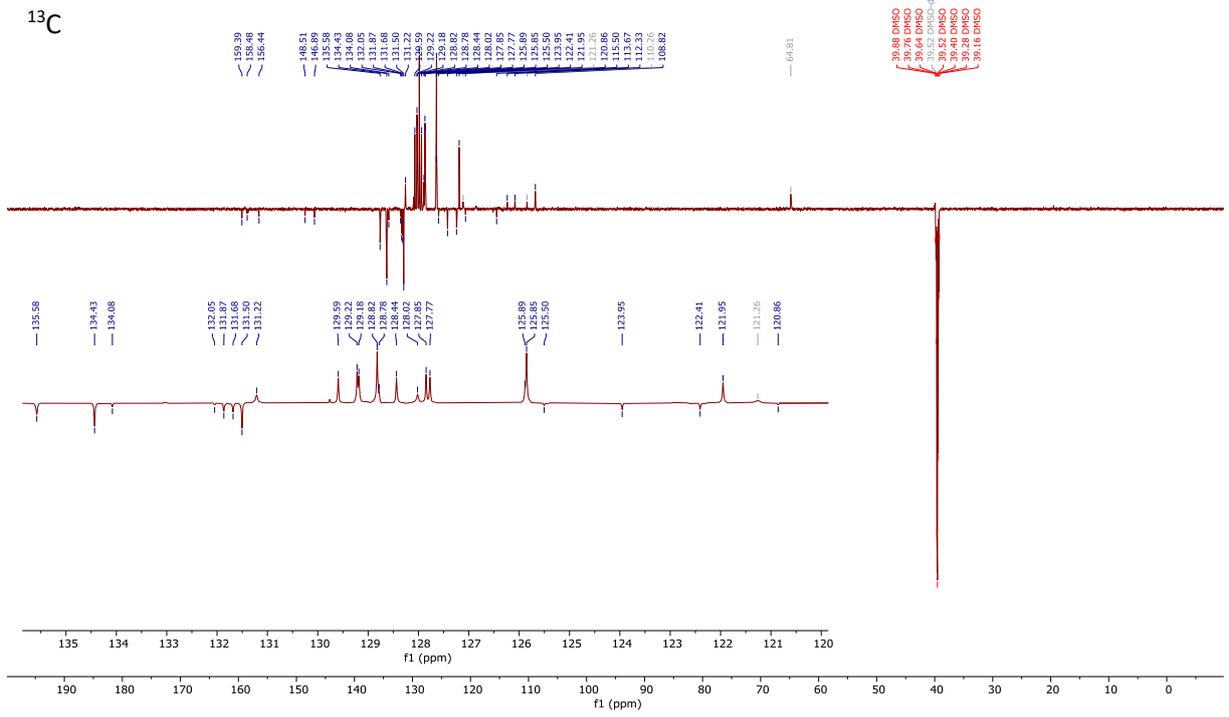
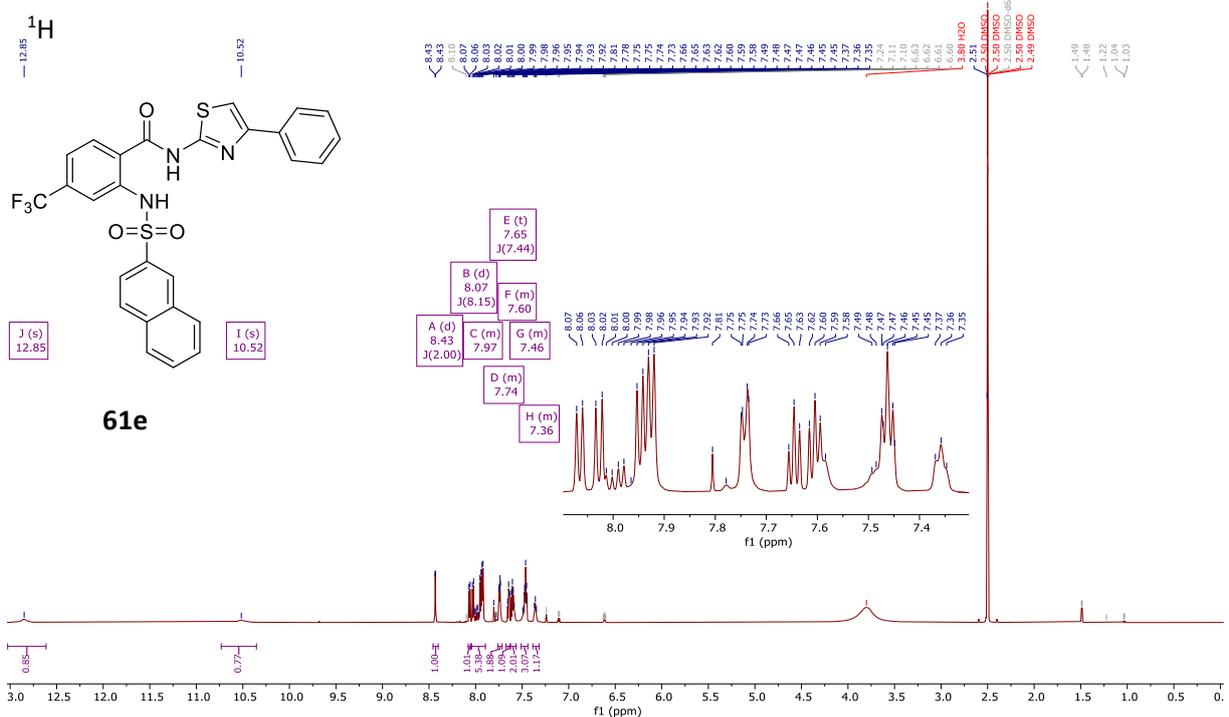


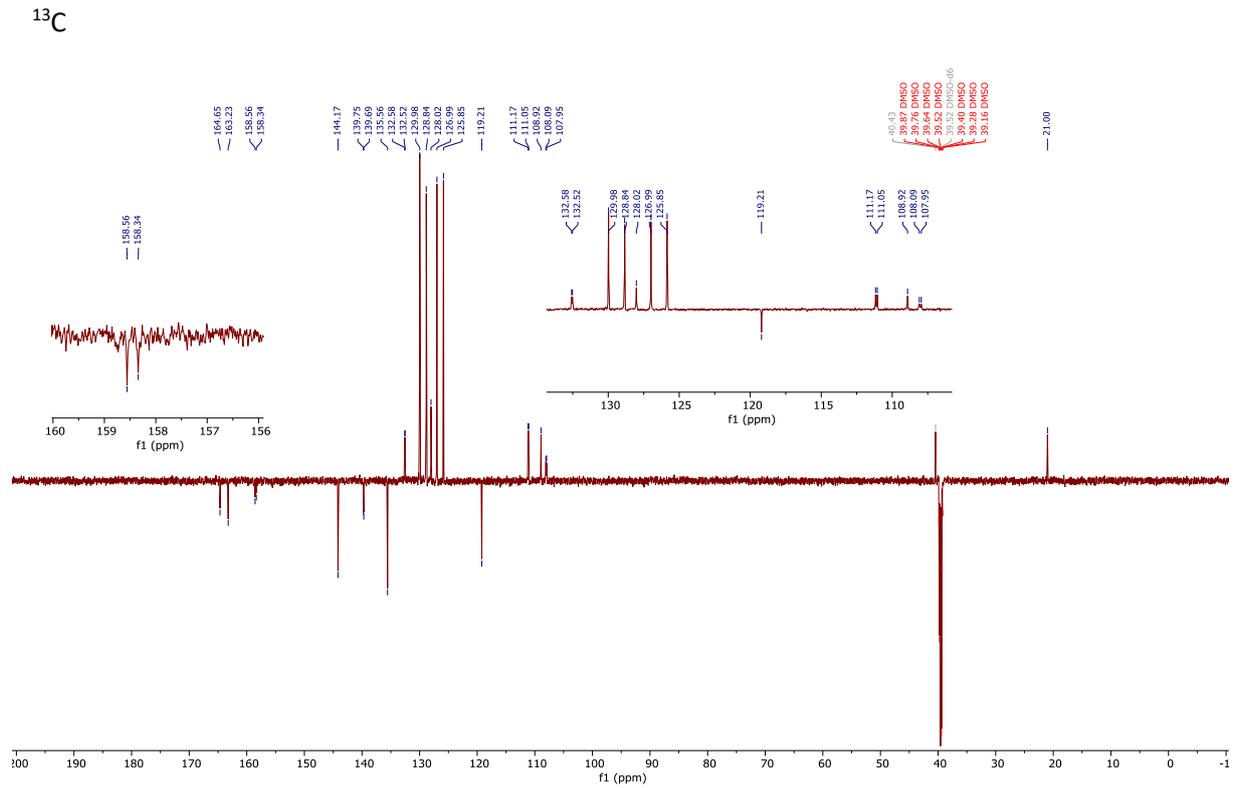
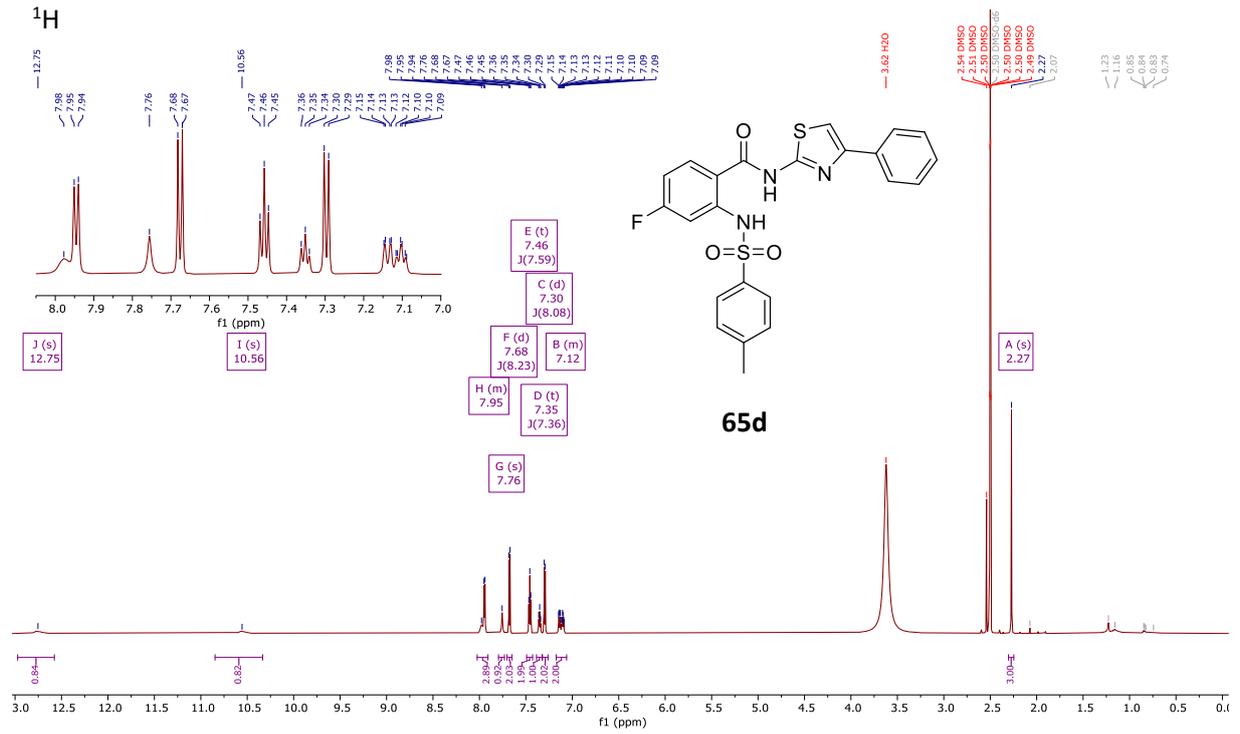


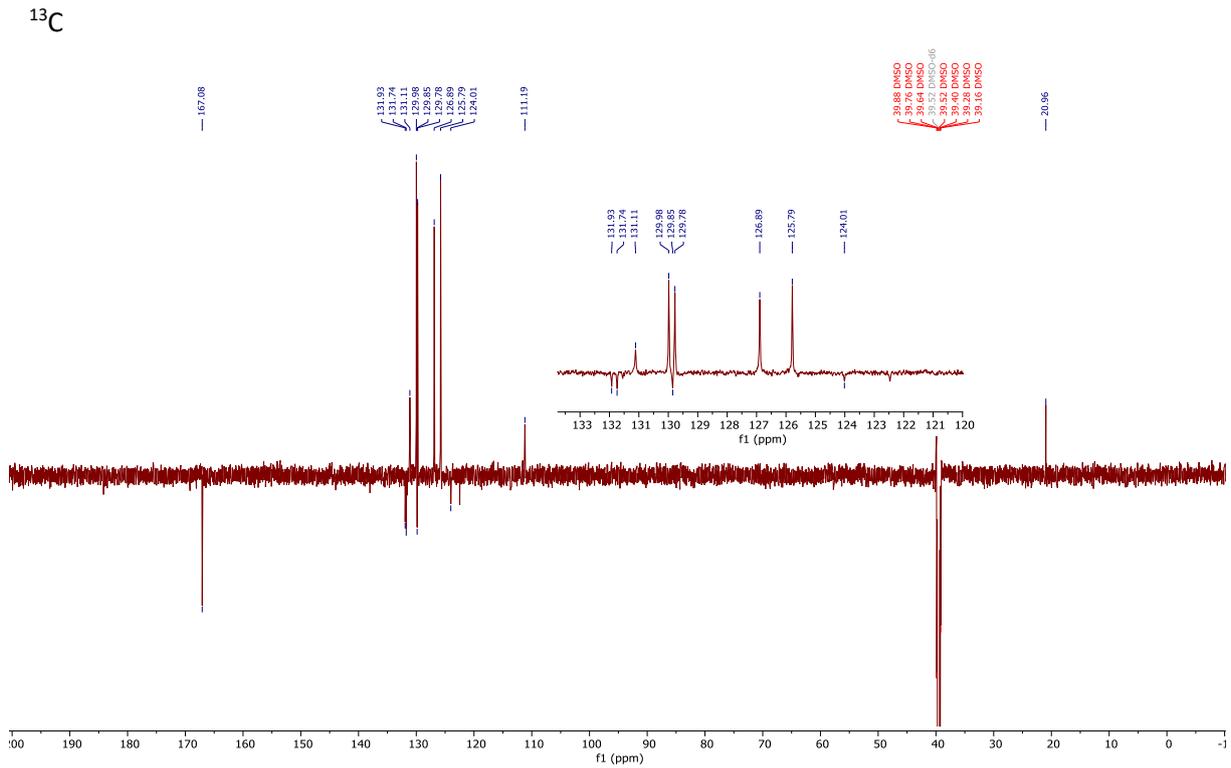
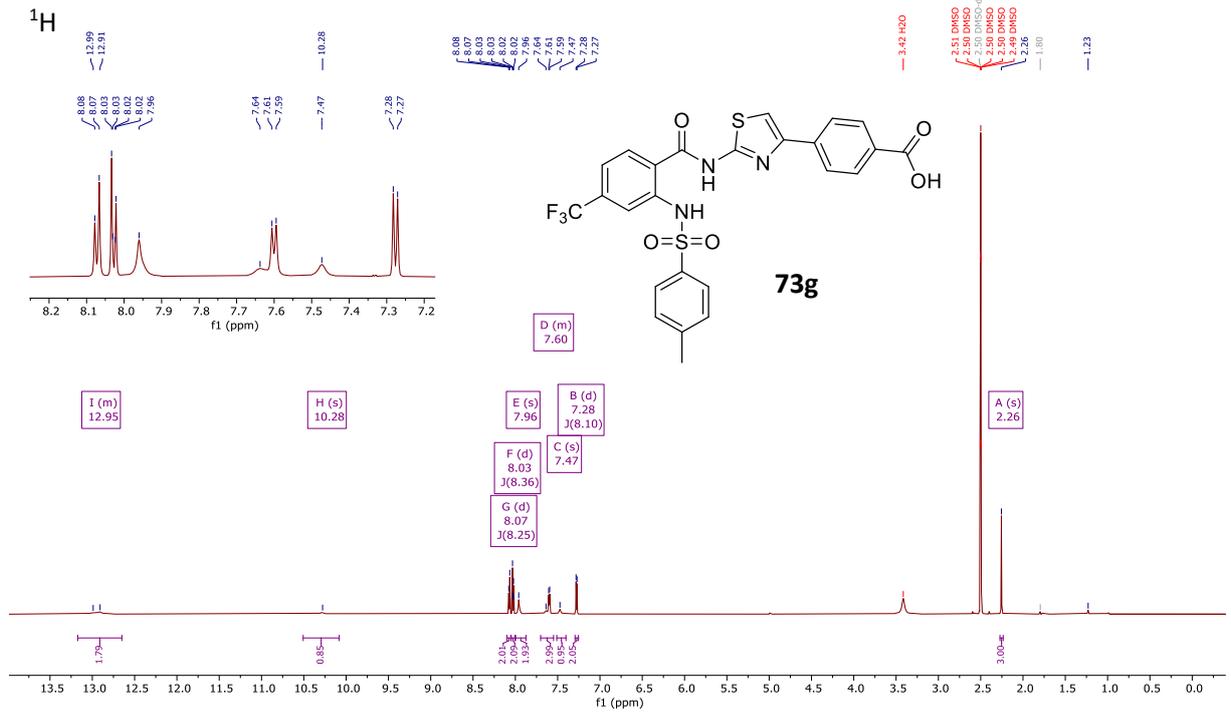
9.3. ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren ausgewählter USP48 Inhibitoren











9.4. Ehrenerklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit vollständig ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle verwendeten fremden und eigenen Quellen sind als solche kenntlich gemacht und im Falle einer Ko-Autorenschaft, insbesondere im Rahmen einer kumulativen Dissertation, ist der Eigenanteil richtig und vollständig ausgewiesen. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsberaterin / eines kommerziellen Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich habe insbesondere nicht wissentlich:

- Ergebnisse erfunden oder widersprüchliche Ergebnisse verschwiegen,
- statistische Verfahren absichtlich missbraucht, um Daten in ungerechtfertigter Weise zu interpretieren,
- fremde Ergebnisse oder Veröffentlichungen plagiiert,
- fremde Forschungsergebnisse verzerrt wiedergegeben.

Mir ist bekannt, dass Verstöße gegen das Urheberrecht Unterlassungs- und Schadensersatzansprüche der Urheberin / des Urhebers sowie eine strafrechtliche Ahndung durch die Strafverfolgungsbehörden begründen können. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die Dissertation ggf. mit Mitteln der elektronischen Datenverarbeitung auf Plagiate überprüft werden kann. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form als Dissertation eingereicht und ist als Ganzes auch noch nicht veröffentlicht.

Halle (Saale), den _____

Kevin Böhm

9.5. Vorabveröffentlichungen

Teilergebnisse der vorgelegten Dissertation wurden bereits veröffentlicht in:

Böhm, K.; Schulze-Niemand, E.; Kähne, T.; Siddiqui, E.; Täger, C.; Ramsbeck, D.; Buchholz, M.; Naumann, M.

Synthesis and structure–activity relationships of USP48 deubiquitinylase inhibitors

Arch. Pharm. **2023**, *356*, e2200661

DOI: <https://doi.org/10.1002/ardp.202200661>