

**Entwicklung, Synthese und Charakterisierung
niedermolekularer Liganden G-Protein gekoppelter
Rezeptoren**

Dissertation

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

dem Fachbereich Pharmazie der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Sebastian Neumann, M. Sc.
aus Bad Nauheim

Marburg (Lahn), 2024

Erstgutachter: Prof. Dr. Torsten Steinmetzer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Martin Schlitzer

Eingereicht am: 17.04.2024

Tag der mündlichen Prüfung am: 29.05.2024

Hochschulkennziffer: 1180

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1 GLUE-Projekt.....	1
1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	2
1.3 Aktivierung und Signalweiterleitung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.....	3
1.4 Desensibilisierung und Internalisierung der GPCRs	6
1.5 Allosterische Modulation	8
1.6 Endothelin-Rezeptoren	10
1.6.1 Endothelin-Rezeptor A	10
1.6.2 Endothelin-Rezeptor B	11
1.6.3 Struktur der Endothelin-Rezeptoren	11
1.6.4 Pathophysiologie.....	13
1.6.5 Liganden der Endothelin-Rezeptoren	13
1.6.5.1 Endothelin-Familie und peptidische Analoga.....	13
1.6.5.2 Niedermolekulare Endothelin-Rezeptor-Liganden	17
1.6.5.3 Allosterische Modulation des Endothelin-Rezeptors.....	21
1.7 Freie-Fettsäure-Rezeptoren	21
1.7.1 FFAR2 und FFAR3	22
1.7.2 FFAR1 und FFAR4	22
1.7.3 Struktur der FFARs.....	23
1.7.4 Pathophysiologie der FFARs	24
1.7.5 Liganden der FFARs.....	25
1.7.5.1 Endogene Fettsäureliganden	25
1.7.5.2 Synthetische FFAR-Liganden.....	26
1.7.5.2.1 Synthetische FFAR1-Liganden	27
1.7.5.2.2 Synthetische FFAR2-Liganden	30
1.7.5.2.3 Synthetische FFAR3-Liganden	31
1.7.5.2.4 Synthetische FFAR4-Liganden	31
1.8 GPRC5b.....	32
2. Zielsetzung	34
3. Ergebnisse und Diskussion.....	36
3.1 Peptidische ET _B R-Liganden	36
3.2 Niedermolekulare FFAR2-Liganden.....	41
3.3 Dockingstudien an den GLUE-Rezeptoren	45

3.3.1 Erste Dockingstudie an der G-Protein-Bindetasche des ET _B R.....	46
3.3.1.1 Synthese der Derivate des Docking-Hits 76	47
3.3.1.2 Synthese der Derivate des Docking-Hits 77	50
3.3.1.3 Biologische Charakterisierung.....	52
3.3.2 Zweite Dockingstudie an der G-Protein-Bindetasche des ET _B R.....	54
3.3.2.1 Synthese und Derivatisierung des Docking-Hits 105	55
3.3.2.2 Synthese und Derivatisierung des Docking-Hits 106	60
3.3.2.3 Synthese und Derivatisierung des Docking-Hits 107	63
3.3.2.4 Biologische Charakterisierung.....	66
3.3.3 Bekannte allosterische GPCR-Liganden	70
3.3.3.1 Synthese und Derivatisierung des allosterischen Modulators 202	71
3.3.3.2 Synthese und Derivatisierung des allosterischen Modulators 203	74
3.3.3.3 Biologische Charakterisierung.....	75
3.3.4 Dockingstudie an der <i>known site 5</i> des ET _B R	77
3.3.4.1 Synthese der Docking-Hits 228 und 229	77
3.3.4.2 Biologische Charakterisierung.....	78
3.3.5 Dockingstudie am GPRC5b.....	78
3.3.5.1 Synthese und Derivatisierung des Docking-Hits 235	80
3.3.5.2 Synthese und Derivatisierung des Docking-Hits 236	85
3.3.5.3 Biologische Charakterisierung.....	88
3.3.6 Fazit	91
4. Zusammenfassung	93
5. Experimenteller Teil.....	98
5.1 Material und Methoden	98
5.1.1 Allgemeine Informationen.....	98
5.1.2 Dünnschicht- und Säulenchromatographie.....	98
5.1.3 Analytische HPLC	99
5.1.4 Präparative HPLC.....	99
5.1.5 Massenspektrometrie	100
5.1.6 NMR-Spektroskopie	100
5.1.7 Mikrowellensynthese	101
5.1.8 Biologische Charakterisierung.....	101
5.1.8.1 G-Protein-Bindungs-Assay	101
5.1.8.2 Rezeptorsensor-Assay	102
5.1.9 Festphasenpeptidsynthese.....	104
5.2 Synthesevorschriften	108

5.2.1 Synthese der peptidischen ET _B R-Liganden.....	108
5.2.2 Synthese der niedermolekularen FFAR2-Liganden	116
5.2.3 Synthese der Verbindungen aus der ersten Dockingstudie an der G-Protein-Bindetasche des ET _B R.....	130
5.2.4 Synthese der Verbindungen aus der zweiten Dockingstudie an der G-Protein-Bindetasche des ET _B R.....	148
5.2.5 Synthese der bekannten allosterischen GPCR-Liganden	203
5.2.6 Synthese der Verbindungen aus der Dockingstudie an der <i>known site 5</i> des ET _B R.....	217
5.2.7 Synthese der GPRC5b Zielverbindungen.....	219
6. Literaturverzeichnis.....	268
Summary	289
Eidesstattliche Erklärung.....	291
MI-Nummern der Zielverbindungen.....	292
Lebenslauf.....	294
Wissenschaftliche Beiträge	295
Danksagung.....	296

Abkürzungsverzeichnis

2-CTC	2-Chlortritylchlorid
4Ala-ET-1	[Ala ^{1,3,11,15}]Endothelin-1
7TMR	Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptor
Å	Ångström
AcOH	Essigsäure
Akt	Proteinkinase B
AlCl ₃	Aluminiumchlorid
AS	Aminosäure
AT ₁ R	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1
ATP	Adenosintriphosphat
ber.	Berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Boc ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
BRET	Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer
CaM	Calmodulin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CH	Cyclohexan
COX-2	Cyclooxygenase-2
Cs ₂ CO ₃	Caesiumcarbonat
d	Dublett
DAG	Diacylglycerol
DBU	1,8-Diazabicycloundec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
dd	Dublett von Dubletts
DHA	Docosahexaensäure
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid

EA	Ethylacetat
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration
ECE	<i>endothelin-converting-enzyme</i>
ECL	Extrazelluläre Schleife
EDC•HCl	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid
EDNRA	ET _A R-Gen
EDNRB	ET _B R-Gen
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N,N'</i> , <i>-tetraessigsäure</i>
EM	Elektronenmikroskopie
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
eNOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
eq	Äquivalente
ESI	Elektrospray-Ionisierung
<i>et al.</i>	<i>et alia</i>
ET-1	Endothelin 1
ET ₂ O	Diethylether
ET ₃ N	Triethylamin
Et ₃ SiH	Triethylsilan
ET _A R	Endothelin-Rezeptor A
ET _B R	Endothelin-Rezeptor B
EtOH	Ethanol
ETR	Endothelin-Rezeptor
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FFAR	Freier-Fettsäure-Rezeptor
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GDP	G-Protein Guanosin-5'-diphosphat
gef.	Gefunden
GIP	Glucoseabhängiges insulinotropes Peptid
GIRKs	<i>G-Protein-coupled inwardly rectifying potassium channels</i>
GLP-1	<i>glucagon-like peptide 1</i>
GLUE	<i>G-Protein-coupled receptor Ligands of Underexplored Epitopes</i>

GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GPCRdb	GPCR-Datenbank
GRK	GPCR-Kinasen
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTP γ S	Guanosin-5'-O-(3-thiotriphosphat)
H ₂ O	Wasser
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorphosphat
HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HBr	Bromwasserstoff
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hept	Heptett
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRMS	hochauflösende Massenspektrometrie
HTS	<i>high-throughput screening</i>
i.A.	in Arbeit
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
ICL	intrazelluläre Schleife
IP ₃	Inositoltrisphosphat
K ₂ CO ₃	Kaliumcarbonat
K ₃ PO ₄	Kaliumphosphat
KCl	Kaliumchlorid
KHMDS	Kaliumhexamethyldisilazid
KS	<i>known site</i>
LiAlH ₄	Lithiumaluminiumhydrid
LiOH	Lithiumhydroxid
M	Molekulargewicht
M	Molar [mol/L]
m	Multipllett
MAP	Mitogen-aktivierten Proteinkinasen
MeCN	Acetonitril

MeOH	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MLCK	Myosin-leichte-Ketten-Kinase
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
MW	Mikrowelle
n.b.	nicht bestimmbar
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaBH(OAc) ₃	Natriumtriacetoxyborhydrid
NaBH ₄	Natriumborhydrid
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NAM	Negativer allosterischer Modulator
NaOH	Natriumhydroxid
NBD-Cl	4-Chlor-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NF-κB	<i>nuclear factor kappa B</i>
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	<i>nuclear magnetic resonance (spectroscopy)</i>
NO	Stickstoffmonoxid
OS	<i>Orphan Site</i>
PAM	Positiver allosterischer Modulator
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBr ₃	Phosphortribromid
Pd(dppf)Cl ₂	[1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]dichlorpalladium (II)
Pd(OAc) ₂	Palladium(II)acetat
Pd(PPh ₃) ₄	Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (0)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PGI ₂	Prostacyclin; Prostaglandin I ₂
PHB	4-Hydroxybenzylalkohol
PI-3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase

PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PLC β	β -Isoformen der Phospholipase C
PMDA	<i>Pharmaceuticals and Medical Devices Agency</i> , japanische Behörde für Arzneimittel und Medizinprodukte
ppm	<i>parts per million</i>
PTFE	Polytetrafluorethen
PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acids</i>
q	Quartett
quin	Quintett
RhoGEFs	<i>Rho guanine nucleotide exchange factor</i>
ROCKs	Rho-Kinasen
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SAM	Stiller allosterischer Modulator
SAR	Struktur-Wirkungsbeziehung; <i>structure-activity relationship</i>
S _N 2	Nukleophile Substitution zweiter Ordnung
SOCl ₂	Thionylchlorid
SPPS	<i>solid-phase peptide synthesis</i>
SRTX	Sarafotoxin
t	Triplett
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
td	Triplett von Doublets
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TM	membrandurchspannende α -Helix
TOTA	4,7,10-Trioxatridecan-1,13-diamin
tr.	Trocken
Trt	Trityl
TTDS	1-Amino-15-oxo-4,7,10-trioxa-14-azaoctadecan-18-säure

1. Einleitung

1.1 GLUE-Projekt

Als eine der größten Proteinsuperfamilien ist die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) bekannt, die als Target für $\approx 30\%$ der zugelassenen Arzneistoffe gilt und somit eine hohe therapeutische Relevanz aufweist.¹⁻³ GPCRs besitzen eine Sieben-Transmembrandomänen-Struktur mit orthosterischer Bindetasche im extrazellulären Bereich und einer intrazellulären G-Protein-Bindestelle.⁴ Die GPCR-vermittelte Signalweiterleitung wird durch ein extrazelluläres Signal an der orthosterischen Bindestelle ausgelöst und nachfolgend ins Zellinnere weitergeleitet, was zur Rekrutierung der G-Proteine führt.⁵ Der Aufbau der orthosterischen Bindetasche ist häufig über verschiedene Rezeptorsubtypen konserviert, daher ist die Entwicklung selektiver Wirkstoffe oftmals herausfordernd.⁶⁻⁸ Eine mögliche Strategie zur Entwicklung von Wirkstoffen mit erhöhter Rezeptorselektivität und somit geringerem Nebenwirkungspotenzial ist die Identifizierung und Adressierung alternativer Bindestellen.⁹ Dieses Vorhaben wird durch die neuesten Erfolge in der Strukturbiologie und Aufklärung zahlreicher GPCR-Kristallstrukturen erleichtert, wodurch mittels *molecular modelling* und computerbasierten Analysen alternative Bindetaschen charakterisiert werden können.^{10,11}

Mit dieser Aufgabe beschäftigt sich das GLUE-Projekt (*G-Protein-coupled receptor Ligands of Underexplored Epitopes*), bei dem 13 verschiedene Arbeitsgruppen an der Identifizierung und Charakterisierung neuer Bindestellen an GPCRs beteiligt sind. Im ersten Schritt wurden durch die Arbeitsgruppe KOLB dreidimensionale Rezeptorstrukturen bzw. Homologiemodelle der pharmakologisch relevanten Rezeptorfamilien der Endothelin-Rezeptoren (ETRs), der Freie-Fettsäure-Rezeptoren (*Free fatty acid receptors*, FFARs) und des GPRC5b untersucht, die als GLUE-Targets ausgewählt wurden. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden Dockingstudien an bekannten und unbekannt Bindestellen durchgeführt und dadurch potentielle Liganden identifiziert und bewertet. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde eine Auswahl an gedockten Liganden synthetisiert und analytisch charakterisiert. Zur Validierung der Dockingergebnisse wurden die Verbindungen anschließend in der Arbeitsgruppe BÜNEMANN *in vitro* an den Zielrezeptoren untersucht. Darüber hinaus waren zwei weitere Arbeitsgruppen an der Synthese der gedockten Liganden beteiligt. Die verbleibenden acht Arbeitsgruppen befassten sich mit der pharmakologischen und biochemischen Untersuchung der GLUE-Rezeptoren.

1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), ebenso bekannt als Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren (7TMRs), bilden eine der größten Proteinsuperfamilien im menschlichen Genom.^{2,3} GPCRs werden durch eine Vielzahl unterschiedlicher extrazellulärer Signale wie Photonen, Ionen, kleinen Molekülen, Peptiden und Proteinen aktiviert.¹² Die Weiterleitung der extrazellulären Signale ins Zellinnere spielt bei neurologischen und kardiovaskulären Funktionen, Geschmack, Sehen, Geruch und bei weiteren physiologischen Prozessen eine zentrale Rolle.^{13,14} Aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen sind GPCRs wichtige Wirkstofftargets zur Therapie vieler Erkrankungen wie beispielsweise Krebs, Entzündungen, Immunerkrankungen und dem metabolischen Syndrom.^{13,15} Die mehr als 800 GPCRs besitzen eine große strukturelle Diversität.³ Anhand ihrer Sequenzhomologie wurden sie erstmals von KOLAKOWSKI für die mittlerweile nicht mehr verfügbare Datenbank GCRDb in die Familien A-F gruppiert.^{3,16} Auf Basis der GCRDb wurde die GPCRdb mit den Familien A (Rhodopsin-ähnliche-Rezeptoren), B (Sekretin-Rezeptoren), C (metabotrope Glutamat-Rezeptoren), D (*fungaal mating pheromone receptors*), E (cyclische AMP-Rezeptoren) und F (*frizzled/smoothened*) entwickelt, wobei die Familien D und E nicht in Wirbeltieren vorkommen.¹⁷⁻¹⁹ Alternativ wurden die GPCRs auf Grundlage der phylogenetischen Studie von FREDRIKSSON *et al.* in das sog. „GRAFS“ System eingeteilt, das aus fünf Familien besteht, den Glutamat- (G), Rhodopsin- (R), Adhäsion- (A), *Frizzled/Taste2*- (F) und Sekretin-Rezeptoren (S).³ Der Hauptunterschied der beiden Klassifizierungen ist die weitere Differenzierung der Familie B in die Adhäsion und Sekretin Familie des GRAFS-Systems.²⁰

Strukturell besitzen GPCRs trotz ihrer geringen Sequenzidentität und unterschiedlichen Funktionen einen konservierten Grundaufbau (**Abbildung 1**).^{3,21} Dieser besteht aus sieben membrandurchspannenden α -Helices (TM1-TM7), die alternierend mit drei extrazellulären Schleifen (ECL1-3) und drei intrazellulären Schleifen (ICL1-3) verknüpft sind.^{22,23} Die 7TM-Domäne der Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren beinhaltet mehrere konservierte Sequenzen, wie das D(E)RY-Motiv in dem intrazellulären Bereich der TM3, das CWxP-Motiv in TM6 oder auch das NPxxY-Motiv in TM7, die für die GPCR Aktivierung mitverantwortlich sind (in **Kapitel 1.6.3** dargestellt).²⁴⁻²⁶ Auf der extrazellulären Seite befinden sich der N-Terminus und die orthosterische Ligandenbindungsstelle innerhalb des oberen Bereichs der 7TM-Domäne.²⁶ Zudem befindet sich auf der extrazellulären Seite eine konservierte Disulfidbrücke zwischen der TM3 und dem ECL2, die für die Stabilisierung der extrazellulären Seite sowie der Ligandenbindungsstelle wichtig ist.^{25,26} Der C-Terminus, der gewöhnlich eine parallel zur

Zellmembran liegende Helix 8 enthält, liegt auf der intrazellulären Seite und bildet mit dem unteren Bereich der 7TM-Domäne und den ICL1-3 die G-Protein-Bindetasche.²⁶ Über diese Bindetasche interagieren die GPCRs unter anderem mit G-Proteinen, Arrestinen und GPCR-Kinasen (GRKs).²⁶

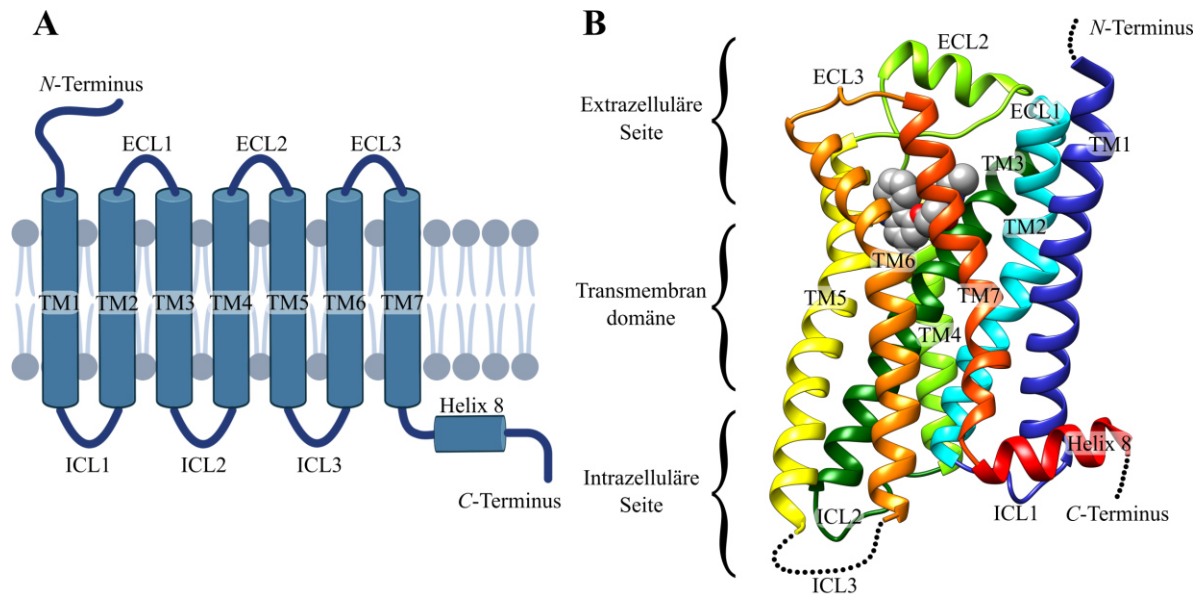


Abbildung 1: Aufbau der GPCRs. (A) Schematische Darstellung der GPCR-Grundstruktur mit den 7 Transmembranhelices (TM1-7) und Helix 8 parallel zur Zellmembran. Der N-Terminus und die drei extrazellulären Schleifen (ECL1-3) liegen im extrazellulären Bereich. Auf der intrazellulären Seite befinden sich der C-Terminus und die drei intrazellulären Schleifen (ICL1-3). Abbildung wurde auf BioRender.com erstellt. (B) Erste humane GPCR-Kristallstruktur des β_2 -Adrenozeptor von CHEREZOV et al. mit dem Liganden Carazolol (dargestellt als graue Sphären) in der orthosterischen Bindetasche.²⁷ Die ICL3, sowie der C- und N-Terminus sind als gepunktete Linie dargestellt. Die Abbildung wurde in Anlehnung an ERLANDSON et al. erstellt (PDB: 4RH1).

1.3 Aktivierung und Signalweiterleitung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Bei Aktivierung der GPCRs durch extrazelluläre Signale kommt es zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen der inaktiven und aktiven Rezeptorstruktur verbunden mit einer Konformationsänderung der dreidimensionalen GPCR-Struktur, wodurch G-Proteine, Arrestine und GRKs an der intrazellulären Bindetasche interagieren können.^{25,28} Bei dieser Umlagerung wird abhängig vom Liganden die aktive bzw. inaktive Rezeptorstruktur stabilisiert und somit die basale Rezeptoraktivität erhöht bzw. verringert (**Abbildung 2A**). Dabei zeigen Vollagonisten eine starke Aktivierung und erreichen eine 100 %-ige biologische Antwort. Hingegen führen Partialagonisten zu einer submaximalen biologischen Antwort und stabilisieren ebenfalls die aktive Rezeptorstruktur.²⁵ Neutrale Antagonisten haben keinen Einfluss auf das Gleichgewicht zwischen aktiver und inaktiver Rezeptorstruktur bzw. auf die basale Aktivität.²⁵ Dennoch konkurrieren neutrale Antagonisten mit Agonisten und inversen Agonisten um die gleiche Bindungsstelle.²⁵ Die inaktive Rezeptorstruktur wird durch inverse

1.3 Aktivierung und Signalweiterleitung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Agonisten stabilisiert, die die Grundaktivität verringern und somit verglichen zur Basalaktivität auch die biologische Antwort senken.²⁵ Des Weiteren gibt es sog. *biased*-Agonisten, die sowohl den G-Protein- als auch den Arrestin-Signalweg stimulieren und dabei einen der beiden Signalwege bevorzugt aktivieren (**Abbildung 2B**).²⁵ Die Aktivierung beider Signalwege könnte für unerwünschte Nebenwirkungen von GPCR-Wirkstoffen verantwortlich sein.^{25,28}

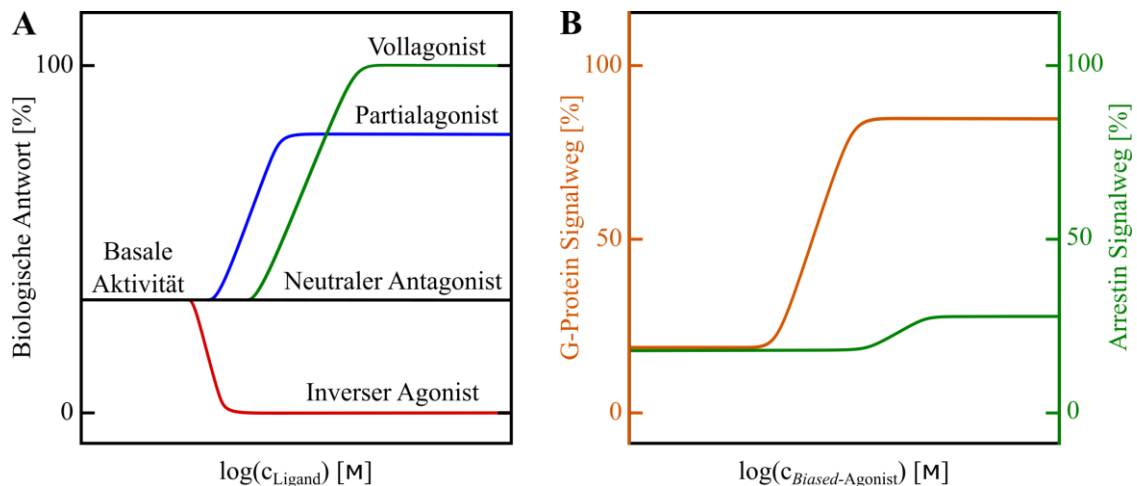


Abbildung 2: (A) Wirkksamkeit der beschriebenen Liganden. (B) *Biased*-Agonisten aktivieren bevorzugt einen Signalweg über einen weiteren, in diesem Fall den G-Protein- über den Arrestin-Signalweg. Die Abbildung wurde in Anlehnung an WEIS *et al.* erstellt.²⁵

Durch die Aktivierung der GPCRs kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, bei der häufig eine Auswärtsbewegung der TM6 festgestellt wird.^{28,29} Zudem werden im intrazellulären Bereich des Rezeptors weitere Helices umgelagert, was zur Exponierung der G-Protein-Bindetasche führt.^{28,29} An der Stabilisierung dieser intrazellulären Bindetasche sind unter anderem die konservierten Motive D(E)RY in TM3 und NPxxY in TM7 beteiligt.²⁵ Das D(E)RY-Motiv kann neben der Stabilisierung der Rezeptorstruktur ebenfalls durch direkte Interaktion mit dem G-Protein zu dessen Bindung beitragen.²⁵

Die G-Proteine, die neben Arrestinen und GRKs (siehe **Kapitel 1.4**) in der intrazellulären Bindetasche binden, bestehen aus den drei Untereinheiten: $G\alpha$, $G\beta$ und $G\gamma$. Im inaktiven Zustand ist an dem heterotrimeren G-Protein Guanosin-5'-diphosphat (GDP) gebunden.³⁰ Bei Aktivierung des GPCR durch einen Agonisten kann in Folge der strukturellen Umlagerung des Rezeptors das G-Protein an die aktive Rezeptorstruktur binden.³¹ Durch die Bildung des G-Protein-GPCR-Komplexes wird das gebundene GDP freigesetzt und stattdessen ein Guanosin-5'-triphosphat (GTP) gebunden.^{32,33} Die Bindung des GTP an das heterotrimere G-Protein löst eine strukturelle Umlagerung aus, die zur Dissoziation der $G\alpha$ -Untereinheit von der $G\beta\gamma$ -Untereinheit führt.³⁰ Die abgespaltenen Untereinheiten interagieren mit unterschiedlichen

Effektorproteinen, wie der Adenylatcyclase und Phospholipase C.²⁸ Durch die intrinsische GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit wird das GTP wieder zu GDP hydrolysiert, woraufhin die $G\alpha$ -Untereinheit mit der $G\beta\gamma$ -Untereinheit zu dem inaktiven, heterotrimeren G-Protein-Komplex reassoziert, der erneut an GPCRs binden kann (**Abbildung 3**).^{28,30}

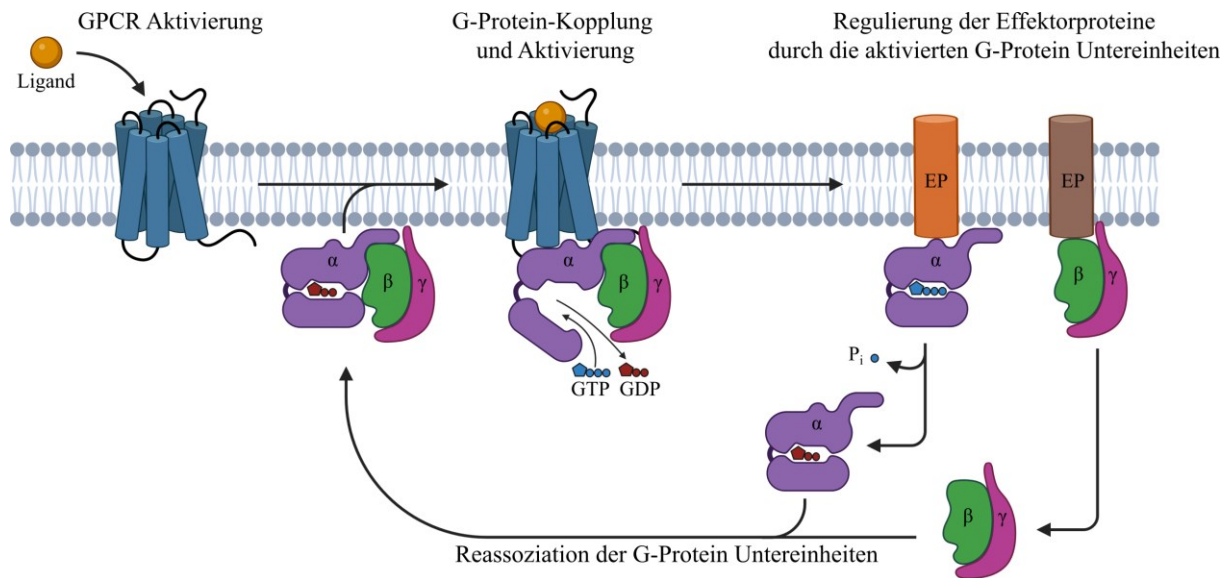


Abbildung 3: Der G-Protein-Aktivierungsmechanismus: Durch die ligandeninduzierte Aktivierung des GPCR kommt es zur strukturellen Umlagerung des Rezeptors, woraufhin das G-Protein an dem GPCR bindet. Bei der Ausbildung des G-Protein-GPCR-Komplexes kommt es zu einem GDP/GTP Austausch und zur anschließenden Dissoziation der $G\alpha$ - von der $G\beta\gamma$ -Untereinheit. Die $G\alpha$ - und $G\beta\gamma$ -Untereinheit binden an unterschiedliche Effektorproteine (EP), die weitere Signalkaskaden aktivieren. Durch die Hydrolyse des GTP zu GDP reassoziieren die $G\alpha$ - und $G\beta\gamma$ -Untereinheit zum inaktiven, heterotrimeren G-Protein-Komplex. Die Abbildung wurde in Anlehnung an BAI *et al.* auf BioRender.com erstellt.³⁴

Die Signalkaskade der GPCRs ist nicht nur von den Liganden abhängig, sondern auch von der jeweiligen G-Protein-Familie. In Säugetieren kommen 21 verschiedene $G\alpha$ -Untereinheiten, 6 $G\beta$ -Untereinheiten und 12 $G\gamma$ -Untereinheiten vor, die spezifisch wirkende heterotrimere G-Protein-Komplexe bilden.^{30,35–37} Die G-Proteine sind anhand der Sequenzhomologie der 21 verschiedenen $G\alpha$ -Untereinheiten in die vier großen Familien $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ und $G\alpha_{12/13}$ eingeteilt.³⁸

Die $G\alpha_s$ -Familie stimuliert die Adenylatcyclase, wodurch eine Steigerung der Produktion von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP) resultiert. Erhöhte cAMP-Konzentrationen führen zur Aktivierung von cAMP-abhängigen Proteinen, wie der Proteinkinase A (PKA).^{37,39–41} Im Gegensatz dazu kommt es bei der $G\alpha_{i/o}$ -Familie zu einer Inhibition der Adenylatcyclase und folgend zu einer Senkung der intrazellulären cAMP-Konzentration.^{37,39–41} Die G-Proteine der $G\alpha_{q/11}$ -Familie aktivieren die β -Isoformen der Phospholipase C (PLC β), welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in die *second*

1.4 Desensibilisierung und Internalisierung der GPCRs

messenger Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) spalten.^{37,39,40} Durch die Bildung von IP₃ kommt es zur Aktivierung des IP₃-Rezeptors, einem Calciumkanal, der zu einer Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum führt und somit die cytoplasmatische Ca²⁺-Konzentration erhöht. Der *second messenger* DAG hingegen aktiviert die Proteinkinase C, die für die Phosphorylierung diverser Zielproteine zuständig ist.^{37,39,40} Die Gα_{12/13}-Familie reguliert die Aktivität der RhoGEFs (*Rho guanine nucleotide exchange factor*), die für die Aktivierung der GTPase RhoA verantwortlich sind. Die GTPase RhoA wiederum reguliert weitere Effektoren, darunter die Rho-Kinasen (ROCKs), die wichtige Aufgaben bei der Regulation des Zytoskeletts besitzen.^{40,42,43} Zusätzlich zu den Gα-Familien interagiert die bei dem Aktivierungszyklus gebildete Gβγ-Untereinheit ebenfalls mit verschiedenen Effektorproteinen, wie den GIRKs (*G-Protein-coupled inwardly rectifying potassium channels*), der Adenylatcyclase, PLCβ und Calciumkanälen (**Abbildung 4**).^{39,44–48}

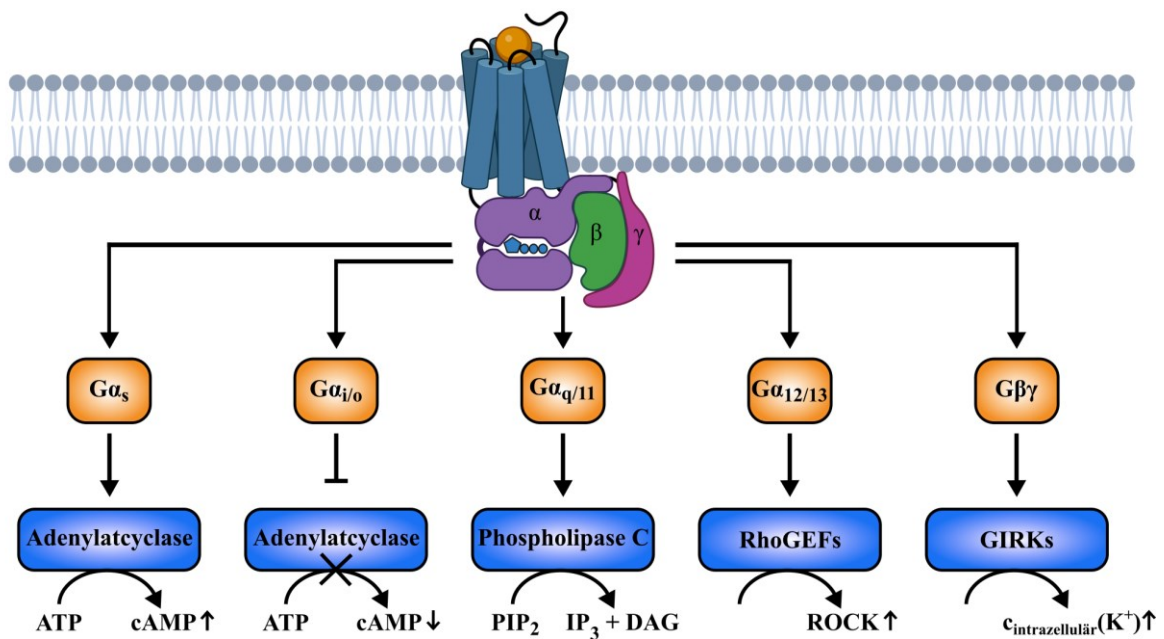


Abbildung 4: Übersicht der G-Proteine mit ihren wichtigsten Effektorproteinen. Die verwendeten Abkürzungen sind im Text beschrieben. Die Abbildung wurde auf BioRender.com erstellt.

1.4 Desensibilisierung und Internalisierung der GPCRs

Neben der Aktivierung ist die Abschaltung der GPCRs ein wichtiger Prozess zur Regulierung der Rezeptoraktivität, der aus einem konservierten zweistufigen Mechanismus besteht: (1) Phosphorylierung der GPCRs durch GRKs und (2) Bindung von Arrestin (**Abbildung 5**).⁴⁹ Im Menschen bilden 7 verschiedene Serin/Threonin-Proteinkinasen (GRK1-7) die GRK-Familie, die aktivierte GPCRs im Bereich der intrazellulären Bindetasche phosphorylieren.^{50–52} GRK1 und GRK7 kommen hauptsächlich in der Netzhaut vor, GRK4 vorwiegend im Gehirn, der Niere

und in den Hoden, wohingegen GRK2, 3, 5 und 6 ubiquitär exprimiert sind.^{51,53} Zu der Arrestin-Familie gehören zwei visuelle Arrestine (Arrestin 1 und 4), die nur im Auge exprimiert sind, und zwei nicht-visuelle Arrestine (Arrestin 2 und 3, auch β -Arrestin 1 und β -Arrestin 2 genannt), die ubiquitär vorkommen.^{50,54-57} Nach Aktivierung der Rezeptoren können GRKs Serine und Threonine im Bereich des C-Terminus und der ICLs der GPCRs, besonders des ICL3, phosphorylieren.⁵⁸ Daraufhin wird Arrestin mit hoher Affinität an phosphorylierte GPCRs gebunden, wodurch die G-Protein-Kopplung sterisch behindert und der Rezeptor desensibilisiert wird.^{58,59} Darüber hinaus kommt es zu einer Arrestin-vermittelten Aktivierung weiterer Effektorproteine wie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen), die wiederum weitere Signalkaskaden aktivieren.^{28,58,60-62} Zusätzlich werden durch die Bindung des Arrestins Proteine wie Clathrin rekrutiert, wodurch es zur Clathrin-vermittelten Endozytose kommt, bei der die Rezeptoren in Endosomen internalisiert werden.⁶³ Dieser Prozess wird von vielen GPCRs durchlaufen und führt entweder zur Dephosphorylierung des Rezeptors und Rückführung zur Zellmembran oder zum lysosomalen Abbau.⁵⁸

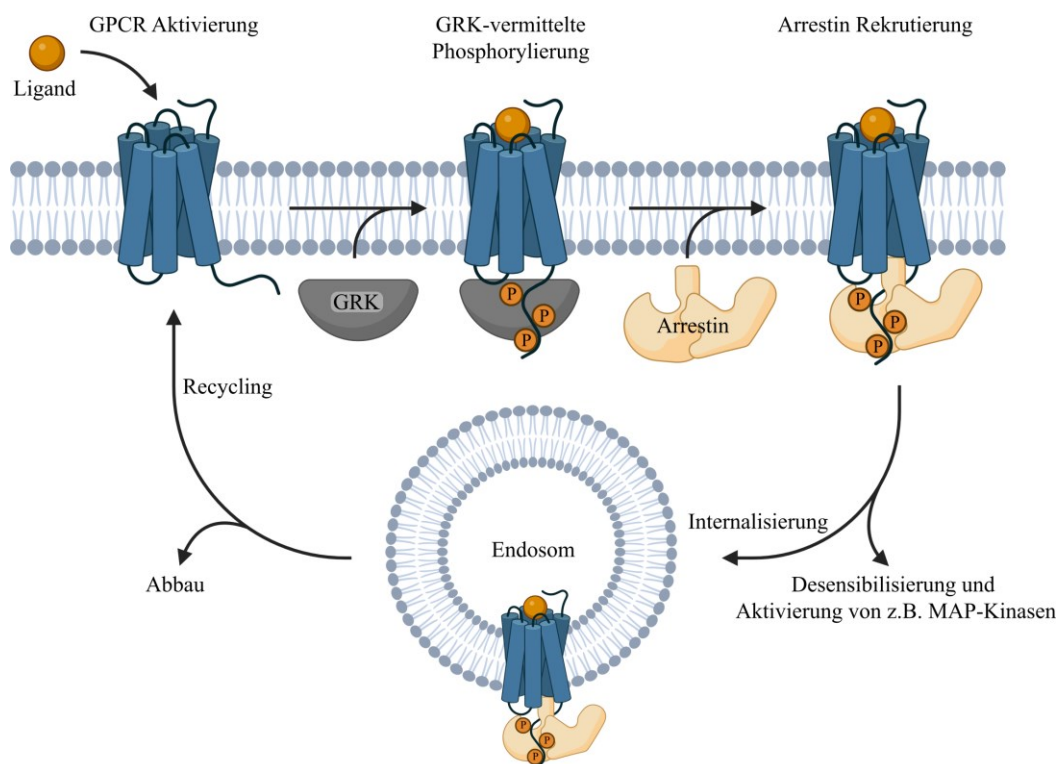


Abbildung 5: GPCR-Abschaltungsmechanismus: Nach Aktivierung der GPCRs können GRKs an den Rezeptoren binden und diese an den ICLs und am C-Terminus phosphorylieren. Durch die Phosphorylierung kommt es zur Rekrutierung von Arrestinen, was zur Desensibilisierung der GPCRs und zur Arrestin-vermittelten Aktivierung weiterer Effektorproteine wie den MAP-Kinasen führt. Darüber hinaus kann die Arrestin Rekrutierung zu einer Internalisierung des Rezeptors führen, die entweder dessen Abbau oder die Dephosphorylierung und Rückführung in die Zellmembran zur Folge hat. Die Abbildung wurde in Anlehnung an KARNAM *et al.* mit BioRender.com erstellt.⁶⁴

1.5 Allosterische Modulation

Bei einer allosterischen Modulation binden sog. allosterische Liganden an Bindungsstellen, die sich von der orthosterischen Bindungsstelle unterscheiden.⁶⁵ So können allosterische Liganden als Agonisten bzw. Antagonisten agieren (allosterische Agonisten/Antagonisten), aber auch als stiller allosterischer Modulator (SAM) an einem Rezeptor binden, ohne einen detektierbaren Effekt auszulösen (**Abbildung 6**).^{7,9}

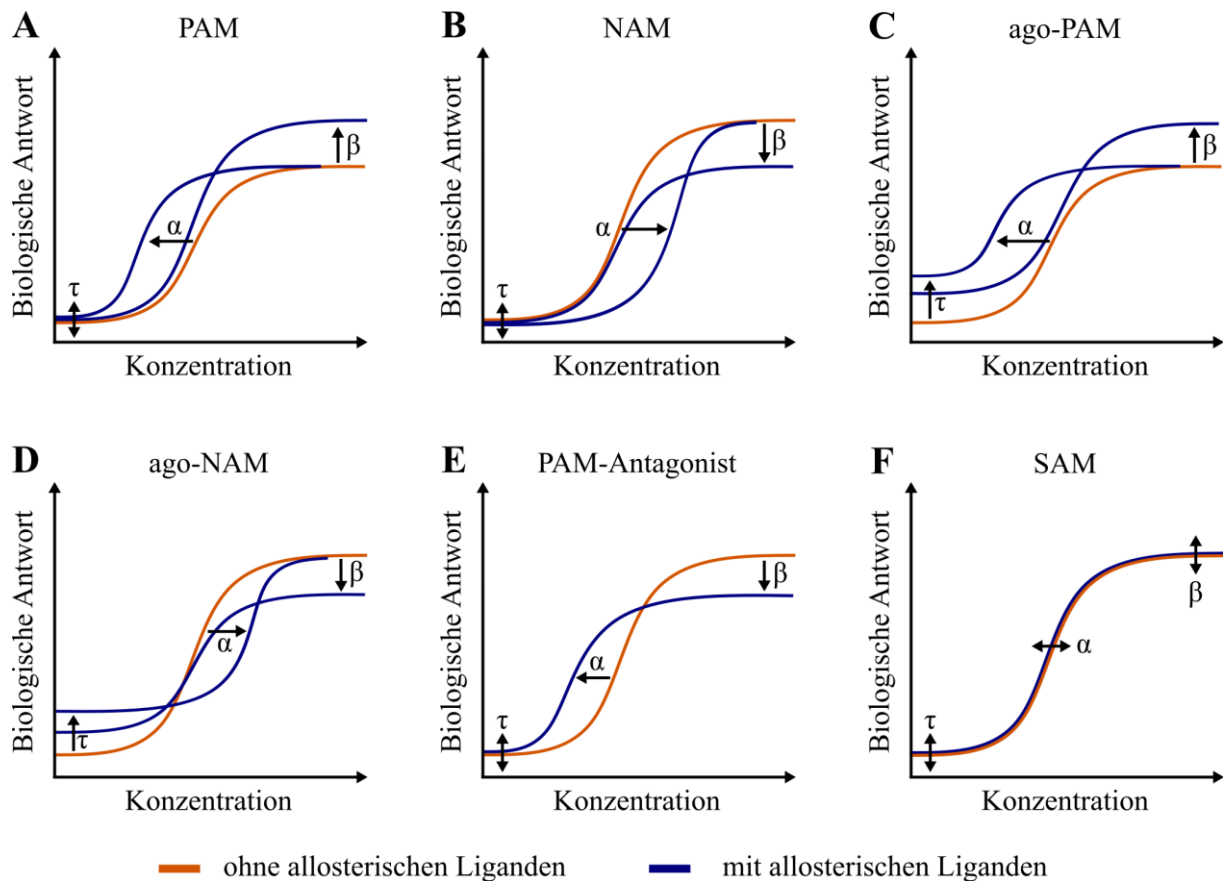


Abbildung 6: Übersicht der verschiedenen Arten der allosterischen Modulation. In Orange sind die Dosis-Wirkungs-Kurven der Agonisten ohne allosterischen Liganden dargestellt; in Blau mit allosterischen Liganden. Der α -Faktor steht für die Modulation der Affinität, der β -Faktor für die Modulation der Wirksamkeit und τ beschreibt die intrinsische Wirksamkeit.⁹ (A) Die positiven allosterischen Modulatoren (PAMs) erhöhen die Affinität und/oder Wirksamkeit der orthosterischen Liganden und weisen somit einen positiven α - und β -Faktor auf ($\alpha, \beta > 0$). (B) Negative allosterische Modulatoren (NAMs) verringern die Affinität und/oder Wirksamkeit der orthosterischen Liganden ($\alpha, \beta < 0$). (C) Ago-PAMs besitzen im Vergleich zu PAMs zusätzlich eine erhöhte intrinsische Wirksamkeit ($\alpha, \beta > 0; \tau > 0$). (D) Ago-NAMs weisen eine erhöhte intrinsische Wirksamkeit τ auf und verringern die Affinität und/oder Wirksamkeit ($\alpha, \beta < 0; \tau > 0$). (E) PAM-Antagonisten erhöhen die Affinität und verringern die Wirksamkeit ($\alpha > 0; \beta < 0$). (F) Stille allosterische Modulatoren (SAM) haben keinen Effekt auf die Affinität, Wirksamkeit und intrinsische Wirksamkeit ($\alpha, \beta, \tau = 0$). Die Abbildung wurde in Anlehnung an GRUNDMANN *et al.* erstellt.⁹

Darüber hinaus können allosterische Liganden die Affinität und/oder die Wirksamkeit der orthosterischen Liganden modulieren (allosterischer Modulator).^{7,9} Demzufolge erhöhen die positiven allosterischen Modulatoren (PAM) die Affinität und/oder Wirksamkeit der

orthosterischen Liganden, während die negativen allosterischen Modulatoren (NAM) die Affinität und/oder Wirksamkeit senken.^{7,9} Zusätzlich gibt es Liganden, die sowohl als allosterische Agonisten bzw. Antagonisten und als allosterische Modulatoren fungieren (ago-PAM, ago-NAM, PAM-Antagonist), wodurch diese sowohl die Affinität und Wirksamkeit als auch die intrinsische Wirksamkeit modulieren.^{7,9,66}

Die Entwicklung allosterischer Liganden kann viele Vorteile bieten.⁶ In einigen Fällen kann eine Rezeptorfamilie, bestehend aus verschiedenen Rezeptorsubtypen, durch ihre konservierten Bindetaschen die gleichen orthosterischen Liganden binden.⁶⁻⁸ Dadurch ist die Entwicklung selektiver orthosterischer Liganden relativ schwierig. Das Adressieren allosterischer Bindestellen kann in solchen Fällen die Entwicklung selektiver Liganden für die einzelnen Rezeptorsubtypen ermöglichen.^{6,7} Dieses Prinzip wurde durch die Zulassung von bislang sechs allosterischen GPCR-Modulatoren bestätigt.^{9,67} Zusätzlich befinden sich ≈ 360 allosterische Liganden für 30 verschiedene GPCRs in klinischen Studien.⁶⁷

Im Laufe der Entwicklung allosterischer Liganden wurden diverse Bindungstaschen identifiziert, die rezeptorübergreifend von HEDDERICH *et al.* beschrieben wurden.¹¹ In dieser Veröffentlichung wurden die bekannten allosterischen Bindestellen als *known sites* (KS) und mögliche unbekannte allosterische Bindestellen als *orphan sites* (OS) benannt und fortlaufend nummeriert (**Abbildung 7**).¹¹

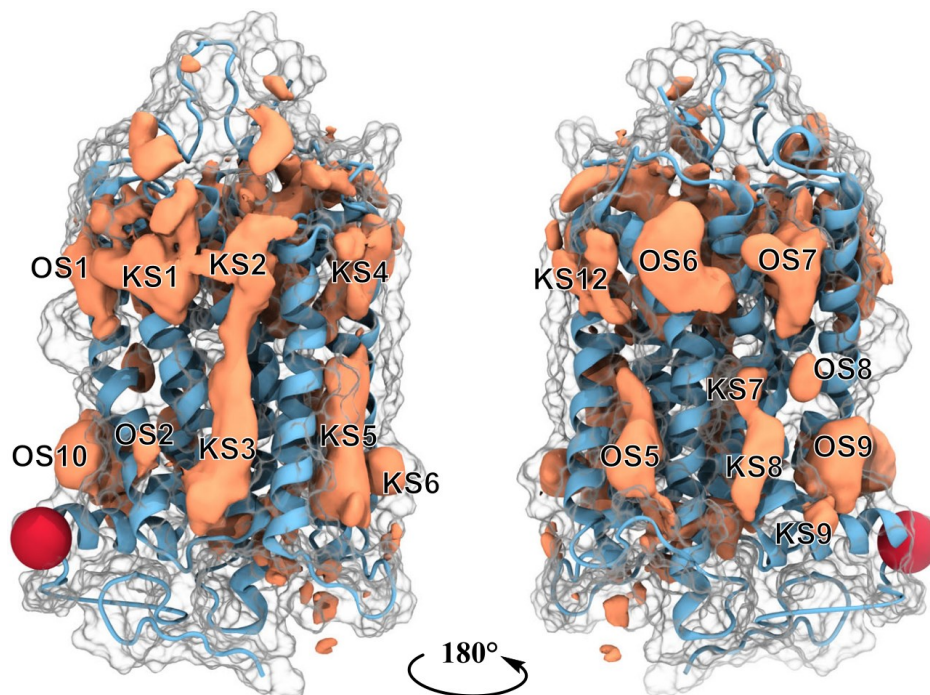


Abbildung 7: Eine Übersicht der bekannten (KS) und unbekannt (OS) allosterischen Bindestellen der Familie A Rezeptoren wurde in der bovinen Rhodopsin Kristallstruktur (hellblau, PDB: 1F88) dargestellt.²² In Orange ist das Volumen der möglichen Bindestellen gezeigt. Zur Orientierung wurde eine rote Sphäre am Ende der Helix 8 eingefügt. Die Abbildung wurde aus der Arbeit von HEDDERICH *et al.* entnommen und leicht modifiziert.¹¹

1.6 Endothelin-Rezeptoren

Im Jahr 1988 wurde der Vasokonstriktor Endothelin-1 (ET-1) erstmals von YANAGISAWA *et al.* aus Aortenendothelzellen eines Schweines isoliert und beschrieben.⁶⁸ Ein Jahr später wurden die beiden eng verwandten Strukturen Endothelin-2 (ET-2) und Endothelin-3 (ET-3) identifiziert, die ebenfalls starke vasokonstriktive Eigenschaften aufweisen und somit die Familie der endogenen Endothelin-Agonisten komplementieren.⁶⁹ Daraufhin wurden im Jahr 1990 die beiden zugehörigen Rezeptoren der Endothelin-Familie entdeckt, der Endothelin-Rezeptor A (ET_AR) und der Endothelin-Rezeptor B (ET_BR).^{70,71} Der ET_AR und ET_BR gehören zur Familie Rhodopsin-ähnlicher GPCRs (Familie A) mit einer typischen Sieben-Transmembrandomänen-Struktur.⁷²⁻⁷⁴ Die Endothelin-Rezeptoren übernehmen eine entscheidende Rolle bei der Regulierung des Herz-Kreislaufsystems, wodurch der ET_BR und besonders der ET_AR als mögliche Targets für die Therapie der pulmonalen Hypertonie, Atherosklerose, Nierenerkrankungen, Herzinsuffizienz und Krebs gelten.⁷⁵⁻⁷⁸

1.6.1 Endothelin-Rezeptor A

Das ET_AR-Gen (EDNRA) codiert den aus 427 Aminosäuren aufgebauten humanen ET_AR, der eine etwa 60 %-ige Sequenzidentität zum humanen ET_BR besitzt.^{79,80} Der ET_AR ist ubiquitär in der glatten Gefäßmuskulatur exprimiert.^{76,81} Besonders hoch ist die Expression in der Lunge und dem Herzen.^{76,81} Der ET_AR ist der fünfthäufigste GPCR in den Herzvorhöfen, was die Relevanz dieses Rezeptors in der Regulierung des Herz-Kreislaufsystems verdeutlicht.^{76,81} Im Jahr 2023 wurde die erste Kristallstruktur vom ET_AR mittels Cryo-EM von YUJIE *et al.* bestimmt, wodurch neue Erkenntnisse über die ET_AR-Struktur und den Aktivierungsmechanismus erhalten werden konnten.⁷²

Bei der Aktivierung des Rezeptors kann der ET_AR mit mehreren G-Proteinen, darunter G α_s , G $\alpha_{i/o}$, G $\alpha_{q/11}$ und G $\alpha_{12/13}$ koppeln, wobei der Rezeptor hauptsächlich über die G $\alpha_{q/11}$ -Proteine Signale weiterleitet.⁸²⁻⁸⁴ So wird durch die ET-1 vermittelte Aktivierung des ET_AR der Tonus der glatten Gefäßmuskulatur über die Signalwege der G $\alpha_{q/11}$ -Proteine und G $\alpha_{12/13}$ -Proteine erhöht.⁸⁵ Dabei stimulieren die G $\alpha_{q/11}$ -Proteine die PLC β , die über die IP₃-Bildung die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration erhöht.⁸⁵⁻⁸⁷ Aufgrund der erhöhten Ca²⁺-Konzentration kommt es zu einer Ca²⁺/Calmodulin (CaM)-abhängigen Aktivierung der Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK), die durch Phosphorylierung der leichten Kette des Myosins zur Muskelkontraktion führt.⁸⁵⁻⁸⁷ Zusätzlich induziert der G $\alpha_{12/13}$ -Signalweg eine Phosphorylierung der Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase über den Ca²⁺-unabhängigen Rho-

Kinase-Signalweg, wodurch die Dephosphorylierung des Myosins inhibiert wird und es somit ebenfalls zur Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur kommt.^{85–87}

1.6.2 Endothelin-Rezeptor B

Der zweite Subtyp der Endothelin-Rezeptoren, der humane ET_BR, wird durch das ET_BR-Gen (EDNRB) codiert und besteht aus 442 Aminosäuren. Der ET_BR ist ubiquitär in Endothelzellen exprimiert, wobei im Gehirn und der Lunge eine besonders hohe Dichte festgestellt wurde.^{76,81} Die erste Kristallstruktur des ET_BR mit dem endogenen Agonisten ET-1 wurde im Jahr 2016 von SHIHOYA *et al.* veröffentlicht.⁷³ Darüber hinaus wurden 11 weitere Kristallstrukturen mit unterschiedlichen Liganden (Agonist, Antagonist, Partialagonist, inverser Agonist) und auch in ligandfreier Form bestimmt.^{88,89}

Der aktivierte ET_BR kann an G α_s , G $\alpha_{i/o}$ und G $\alpha_{q/11}$ koppeln und besitzt zwei Hauptaufgaben in Endothelzellen: 1.) Freisetzung der Vasodilatoren NO und Prostacyclin (Prostaglandin I₂; PGI₂) 2.) ET-1 Abbau in Lunge und Niere.^{82,84,85} Durch die ET-1-vermittelte Aktivierung des ET_BR kommt es über den G $\alpha_{q/11}$ -verknüpften PLC β -Signalweg zu einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration.^{85,90} Diese führt ihrerseits zu einer Aktivierung der Ca²⁺/CaM-abhängigen endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) und zur Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2), was wiederum zur Produktion von NO bzw. PGI₂ führt und eine Relaxation der glatten Gefäßmuskeln bewirkt.^{85,90} Zusätzlich wird die eNOS durch die abgespaltene G $\beta\gamma$ -Untereinheit über den Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B/eNOS-(PI-3-Kinase/Akt/eNOS) Signalweg aktiviert.⁹¹ Darüber hinaus übernimmt der ET_BR eine wichtige Aufgabe beim Abbau des ET-1.⁸⁵ In Folge der ET-1-vermittelten Aktivierung kommt es zu einer schnellen Internalisierung des ET_BR und zum anschließenden lysosomalen Abbau, was einen wichtigen Eliminierungsmechanismus des ET-1 darstellt und die Endothelin-Rezeptoren vor einer Überstimulation schützt.^{85,90,92–94}

1.6.3 Struktur der Endothelin-Rezeptoren

Der ET_AR und ET_BR weisen in den jeweiligen Kristallstrukturen die typische Sieben-Transmembrandomänen-Struktur mit einer intrazellulären Helix 8 auf.^{72,73,95} Beide Rezeptoren beinhalten einen unter den GPCRs der Familie A seltenen langen N-Terminus.⁷⁵ Die ECL2 besteht aus zwei antiparallelen β -Faltblättern mit einer kurzen Schleife, die ein bekanntes Strukturmotiv (*hairpin*-Motiv) der Peptid-bindenden GPCRs der Familie A darstellt (**Abbildung 8**).^{4,73,88} Außerdem befindet sich im extrazellulären Bereich neben der konservierten Disulfidbrücke zwischen TM3-ECL2 eine weitere Disulfidbrücke zwischen

C69^{N-ter} und C341^{7.25} im ET_AR bzw. zwischen C90^{N-ter} und C358^{7.25} im ET_BR, die das Ende des *N*-Terminus mit dem extrazellulären Bereich der TM7 verknüpft (hochgestellt: Ballesteros-Weinstein-Nummerierung⁹⁶).⁷² Die große orthosterische Bindetasche beider Rezeptoren besteht aus dem *N*-terminalen Schwanz, ECL1-3 und TM2-7.^{72,73,88} Zusätzlich bilden der *N*-terminale Schwanz und die ECL2 eine deckelartige Struktur, die die orthosterische Bindetasche abdeckt.⁷³ Bei dem ET_BR kommt es durch die ET-1-induzierte Aktivierung zu einer Einwärtsbewegung im extrazellulären Bereich der TM2, TM6, und TM7, wodurch die Bindetasche komprimiert wird und kompakte Wechselwirkungen zwischen ET-1 und dem ET_BR ausgebildet werden.^{72,73} Bei der Bindung kommt ET-1 in direkten Kontakt mit dem *toggle switch* W336^{6.48}, das zum konservierten C^{6.47}W^{6.48}xP^{6.50}-Motiv gehört und ein essentielles Motiv für die Signalweiterleitung der GPCRs der Familie A darstellt.^{72,73,88} Darüber hinaus löst der aktivierte Rezeptor eine Umlagerung der konservierten Motive P^{5.50}V^{3.40}F^{6.44}, D^{3.49}R^{3.50}Y^{3.51} und N^{7.49}P^{7.50}xxY^{7.53} aus, wobei das Y^{7.53} im ET_AR und ET_BR durch ein Leucin ersetzt ist.⁷² In Folge dieser Umlagerung kommt es im intrazellulären Bereich der TM6 zu einer Auswärtsbewegung, wodurch die intrazelluläre Bindetasche für die Rekrutierung der G-Proteine, Arrestine und GRKs geöffnet wird.^{72,73,88}

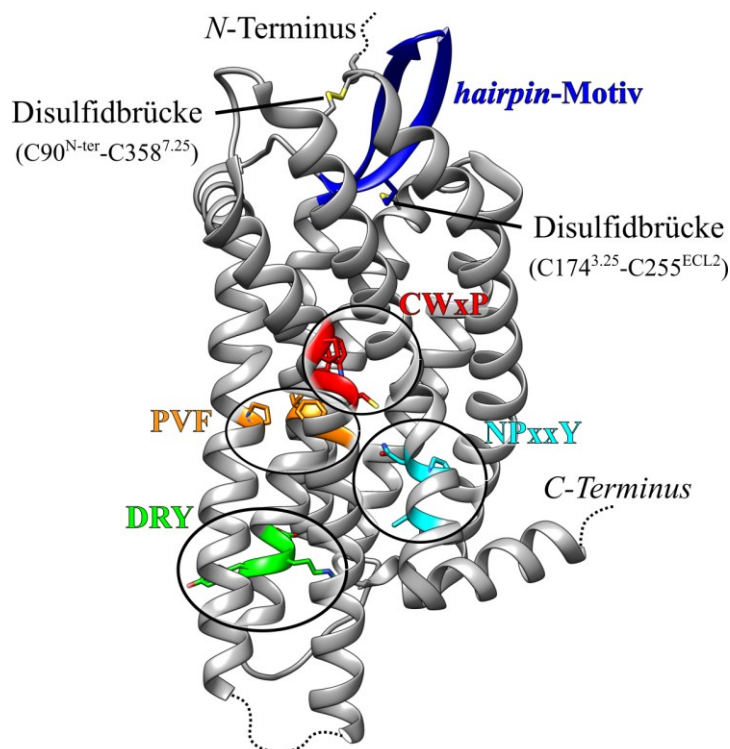


Abbildung 8: Die ligandfreie Kristallstruktur des ET_BR (PDB: 5GLI).⁷³ Im extrazellulären Bereich befindet sich das *hairpin*-Motiv innerhalb des ECL2 (blau) und die beiden Disulfidbrücken zwischen C174^{3.25} und C255^{ECL2} bzw. zwischen C90^{N-ter} und C358^{7.25}. Die konservierten Motive C^{6.47}W^{6.48}xP^{6.50} (rot), P^{5.50}V^{3.40}F^{6.44} (orange), D^{3.49}R^{3.50}Y^{3.51} (grün) und N^{7.49}P^{7.50}xxY^{7.53} (cyan) sind farbig markiert. Der in der Kristallstruktur nicht sichtbare ICL3, sowie der C- und N-Terminus sind als gestrichelte Linie dargestellt. Abbildungen dieser Art wurden mit UCSF Chimera und Inkscape erstellt.

1.6.4 Pathophysiologie

Das Endothelin-System spielt eine große Rolle bei der Gefäßregulierung und damit verbundenen Erkrankungen wie der pulmonalen Hypertonie.⁹⁷ Darüber hinaus wird die Fehlregulation des Endothelin-Systems mit weiteren Krankheiten wie Herz-, Nierenerkrankungen, Atherosklerose, neurologischen Erkrankungen und Krebs assoziiert.^{76,78,98–100} Die vermeintlich wichtigste Aufgabe der Endothelin-Rezeptoren ist jedoch die Regulierung der Gefäße, bei der der ET_AR und ET_BR gegensätzliche Funktionen erfüllen.⁸⁵ Der ET_AR hat primär eine vasokonstriktive Funktion und induziert durch die lang andauernde Bindung von ET-1 eine verlängerte Vasokonstriktion.⁸⁵ Dagegen bewirkt der ET_BR hauptsächlich eine NO-vermittelte Vasodilatation und fungiert als „*Clearance-Receptor*“, der zum Abbau des zirkulierenden ET-1 über den lysosomalen Weg beiträgt.⁸⁵ Bei erhöhten ET-1 Konzentrationen, wie sie bei pulmonaler Hypertonie festgestellt werden, kommt es zu einer Blutdruckerhöhung in der Lunge, Zellwachstum und vaskulären Obstruktionen, die unbehandelt innerhalb weniger Jahre zum Tod führen können.^{97,101,102} Im Rahmen klinischer Studien mit Endothelin-Rezeptor-Antagonisten wurde gezeigt, dass die Inhibition der Bindung von ET-1 eine mögliche Therapieoption zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie darstellt, da diese eine Vasodilatation stimulieren und somit der Hypertonie entgegenwirken.^{97,103–105}

1.6.5 Liganden der Endothelin-Rezeptoren

1.6.5.1 Endothelin-Familie und peptidische Analoga

Peptidische Endothelin-Rezeptor Agonisten

Der erste identifizierte Ligand der Endothelin-Rezeptoren ist der endogene Vasokonstriktor ET-1 (**1**), der zusammen mit den endogenen Peptiden ET-2 (**2**) und ET-3 (**3**) die Endothelin-Familie bildet (**Abbildung 9**).^{68,69} Bei den Verbindungen **1**, **2** und **3** handelt es sich um strukturell-ähnliche Peptide, die aus 21 Aminosäuren aufgebaut sind und zwei intramolekulare Disulfidbrücken zwischen Cys1-Cys15 und Cys3-Cys11 besitzen.⁶⁹ Die Biosynthese der Peptide **1**, **2** und **3** erfolgt in drei Schritten.⁷⁸ Zunächst werden aus den Prä-Pro-Endothelin mRNAs die Prä-Pro-Endotheline gebildet, die im nächsten Schritt durch die Protease Furin gespalten werden.^{76,106} Die daraus entstandenen nahezu inaktiven Big-Endotheline werden im letzten Schritt durch die Zink-Metalloproteasen ECE-1 oder ECE-2 (*endothelin-converting-enzyme* 1 bzw. 2) zu den aktiven Liganden **1**, **2** und **3** gespalten.^{69,106} In Mäusen mit fehlendem ECE-1 und ECE-2 wurden die Endotheline **1** und **2** ebenfalls nachgewiesen, was auf eine Beteiligung weiterer Enzyme, wie der Chymase, an der finalen Spaltung der Big-Endotheline

1.6.5 Liganden der Endothelin-Rezeptoren

hinweist.^{78,107} Die Big-Endotheline werden für die Isoformen **1** und **2** zwischen Trp-Val und für die Isoform **3** zwischen Trp-Ile gespalten.^{69,78,106} Am ET_BR wurde für die aktiven Endothelin-Isoformen die gleiche Aktivität festgestellt (**1** = **2** = **3**), wohingegen die Peptide **1** und **2** an dem ET_AR aktiver sind als das Peptid **3** (**1** = **2** > **3**).^{70,71} In humanen Blutgefäßen liegt der EC₅₀-Wert von Verbindung **1** und **2** im niedrigen nanomolaren Bereich (3-18 nM), wohingegen Verbindung **3** einen EC₅₀-Wert von > 100 nM aufweist.¹⁰⁸ Zur weiteren Aktivitätsuntersuchung wurden in einer Punktmutationsstudie sequentiell Ala-Mutationen in die Verbindung **1** eingeführt und die Aktivität der Derivate getestet.^{109,110} Dabei wurde gezeigt, dass die Substitution der Aminosäuren 2, 4, 5, 6, 7, 9, 16 und 19 nur zu einem geringen oder gar keinen Aktivitätsverlust führt.^{109,110} Im Gegensatz dazu ist besonders das Trp21 essentiell für die Aktivität der Verbindung **1**, da die Abspaltung dieser Aminosäure einen kompletten Aktivitätsverlust bewirkt.¹¹¹

Zusätzlich zur Endothelin-Familie wurde die Familie der Sarafotoxine im Gift der Erdviper *Atractaspis engaddensis* identifiziert.^{112,113} Die Sarafotoxine (SRTXa (**4**), SRTXb (**5**) und SRTXc (**6**)) weisen neben der starken vasokonstriktiven Eigenschaft eine hohe Sequenzidentität zur Endothelin-Familie auf.¹¹²⁻¹¹⁴ In der Aorta von Ratten zeigte sich eine Abstufung der kontraktiven Aktivität von **5** > **4** > **6**.¹¹⁵ Darüber hinaus wurde gezeigt, dass **6** ein selektiver ET_BR-Agonist ist, wohingegen die Agonisten **4** und **5** unselektiv am ET_AR und ET_BR binden.^{114,116,117}

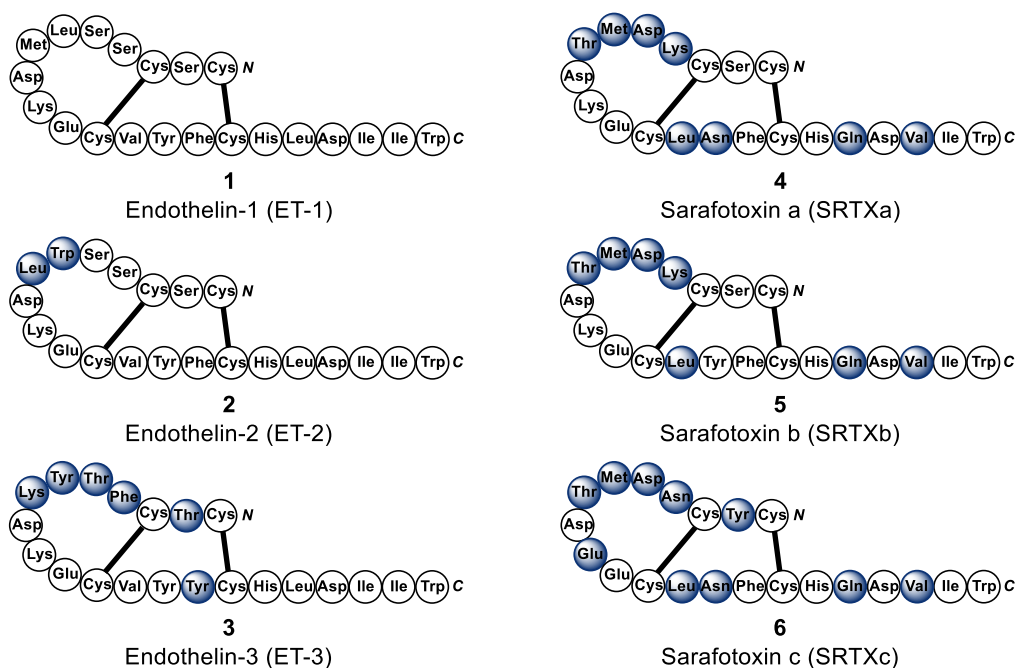


Abbildung 9: Die aus 21 Aminosäuren bestehenden Peptide der Endothelin- und Sarafotoxin-Familie besitzen zwei identische Disulfidbrücken (schwarze Striche) zwischen Cys1-Cys15 und Cys3-Cys11. Alle von ET-1 (**1**) abweichenden Aminosäuren sind in Blau dargestellt.

Neben den endogenen Endothelinen und Sarafotoxinen wurden weitere synthetische Analoga hergestellt, die eine erhöhte ET_BR-Selektivität aufweisen.^{117–119} Mit [Ala^{1,3,11,15}]Endothelin-1 (4Ala-ET-1, **7**) wurde ein linearer, unverbrückter ET_BR-Agonist identifiziert, bei dem die in Verbindung **1** befindlichen Cysteine (Cys1, Cys3, Cys11 und Cys15) durch Alanine substituiert wurden (**Abbildung 10**).^{117,120} Dieser Agonist zeigte in der Arbeit von SAEKI *et al.* mit einem IC₅₀-Wert von 0.33 nM eine ähnliche Aktivität am ET_BR wie das ET-1 (**1**) mit einem IC₅₀-Wert von 0.11 nM.¹¹⁷ Außerdem besitzt die Verbindung **7** eine erhöhte ET_BR-Selektivität mit einem Faktor von 1700 im Vergleich zu Verbindung **1** mit 1.5.¹¹⁷ Bei einer weiteren Untersuchung zu Struktur-Wirkungsbeziehungen (SAR; *structure-activity relationship*) wurde der Ligand IRL-1620 (**8**, Sovateltid; TycamzziTM) entdeckt.¹¹⁸ Dieser ist ein N^α-Succinyl-ET-1-Derivat, das eine zur Ausgangsverbindung **1** vergleichbare Wirksamkeit im subnanomolaren Bereich und eine weiter verbesserte ET_BR-Selektivität um den Faktor 120000 besitzt und somit ein hochselektiver ET_BR-Agonist ist.¹¹⁸ Weiterführend wurden positive Effekte von Verbindung **8** auf neurologische Krankheiten festgestellt.¹⁰⁰ Insbesondere bei Morbus Alzheimer und ischämischen Schlaganfällen wurden diese Ergebnisse in klinischen Studien bestätigt, woraufhin Verbindung **8** im Jahr 2023 in Indien zur Therapie ischämischer Schlaganfälle zugelassen wurde.^{121–123} Des Weiteren ist das verkürzte ET-1-Derivat BQ-3020 (**9**) zu nennen, das eine zu Verbindung **1** vergleichbare agonistische Wirkung am ET_BR besitzt. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren Cys1 bis Ser5 des ET-1 (**1**) nicht essentiell für die Wirkung am ET_BR sind.¹¹⁹

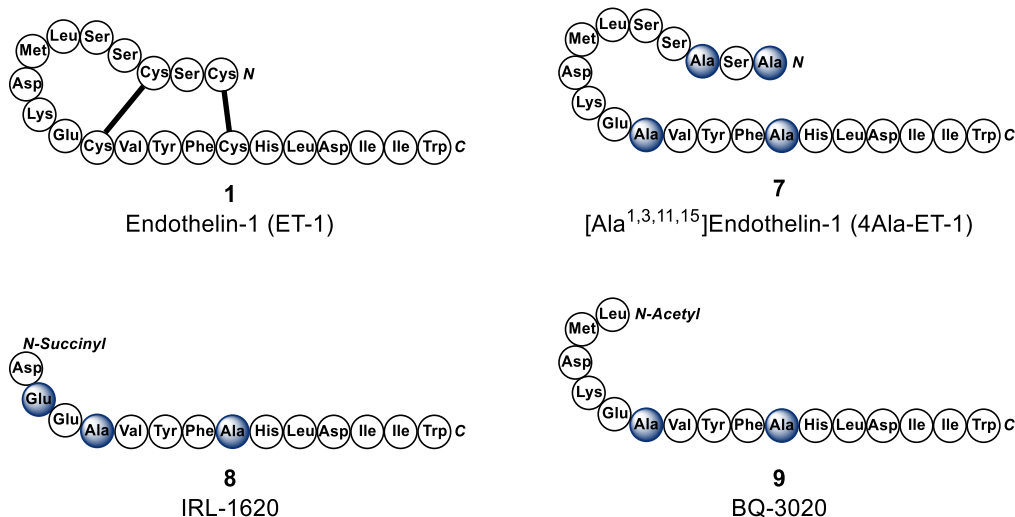


Abbildung 10: Strukturen des unselektiven endogenen ET_AR/ET_BR-Agonisten ET-1 (**1**) und der selektiven synthetischen ET_BR-Agonisten 4Ala-ET-1 (**7**), IRL-1620 (**8**) und BQ-3020 (**9**). Alle von Verbindung **1** abweichenden Aminosäuren sind in Blau dargestellt.

Peptidische Endothelin-Rezeptor-Antagonisten

Mit BQ-123 (**10**) wurde von IHARA *et al.* der erste aktive und selektive ET_AR-Antagonist identifiziert (**Abbildung 11**).¹²⁴ Dieser wurde von den cyclischen Pentapeptiden BE-18257A und BE-18257B abgeleitet, die aus dem Bakterium *Streptomyces misakiensis* isoliert wurden und schwach, aber selektiv am ET_AR binden.^{124–126} Der Antagonist **10** zeigte in Radioligand-Bindungsassays, *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen eine Hemmung der durch ET-1 induzierten Kontraktion.^{124,127} Darüber hinaus wurde neben diesem cyclischen Liganden der lineare ET_AR-Antagonist FR139317 (**11**) von ARAMORI *et al.* identifiziert.¹²⁸ Dieser zeigte in *in vitro*-Untersuchungen eine zum Antagonisten **10** vergleichbare Inhibition der ET-1-induzierten Kontraktion im einstellig nanomolaren Bereich und wird als selektiver ET_AR-Referenzantagonist verwendet.^{108,129} Von der Verbindung **11** wurde der ET_AR-Antagonist [¹²⁵I]-PD151242 abgeleitet, der anstelle des 3-(2-Pyridyl)-D-alanin-Restes ein Tyrosin enthält und in iodierter Form als Radioligand eingesetzt wird.¹³⁰ Neben diesem Radioliganden werden auch viele weitere Liganden wie die Verbindungen **1**, **2**, **3**, **8** und **9** für Untersuchungen mit Iod-125 (¹²⁵I) markiert, die in dieser Arbeit nicht separat erwähnt werden.^{131–133}

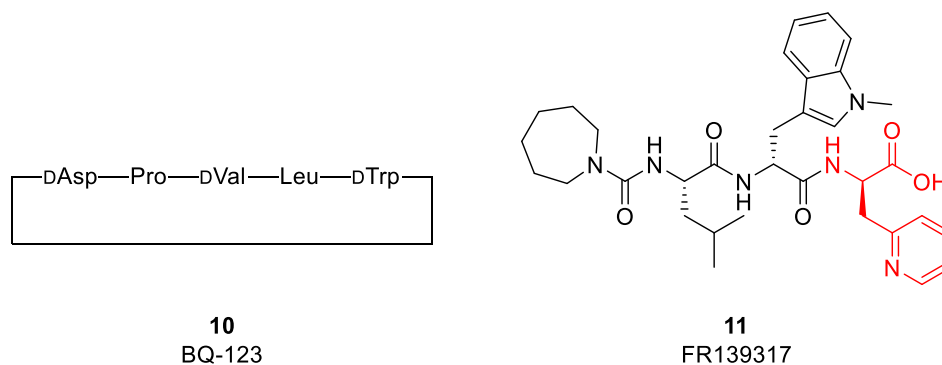


Abbildung 11: Strukturen der peptidischen, selektiven ET_AR-Antagonisten BQ-123 (**10**) und FR139317 (**11**). Der rot dargestellte 3-(2-Pyridyl)-D-alanin-Rest wurde bei der Verbindung [¹²⁵I]-PD151242 durch ein iodiertes Tyrosin substituiert.

Als peptidische, selektive ET_BR-Antagonisten sind die Liganden IRL-2500 (**12**) und RES-701-1 (**13**) zu nennen (**Abbildung 12**).^{134,135} Beide besitzen eine erhöhte Selektivität für den ET_BR und werden daher zur Untersuchung der physiologischen und pathophysiologischen Rolle dieses Rezeptorsubtyps verwendet.^{134–136}

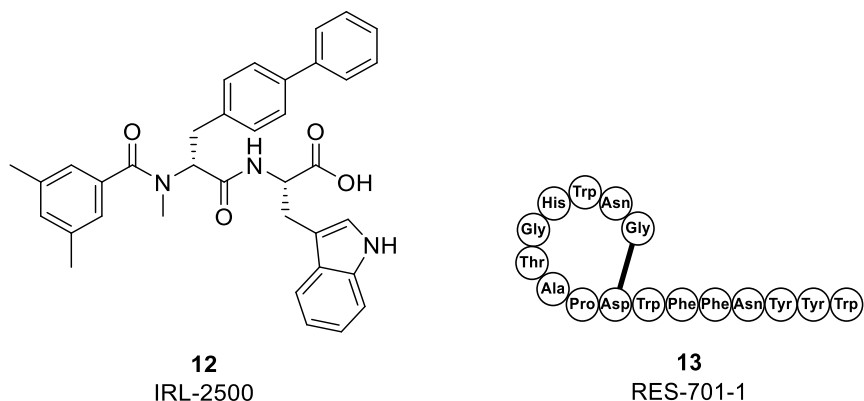


Abbildung 12: Strukturen der peptidischen, selektiven ET_B R-Antagonisten IRL-2500 (**12**) und RES-701-1 (**13**), letzterer enthält eine Lactambindung zwischen der α -Aminogruppe des Gly1 und der Seitenkette des Asp9.

Neben den peptidischen, selektiven Antagonisten wurde ausgehend von einem BQ-123-Derivat in einer SAR-Studie die Verbindung TAK-044 (**14**) entwickelt (**Abbildung 13**).¹³⁷ Das cyclische Hexapeptid bindet als Antagonist im subnanomolaren Bereich am ET_A R und im submikromolaren Bereich am ET_B R.¹³⁷ Demzufolge zeigt dieser unselektive ET_A R/ ET_B R-Antagonist eine verbesserte Affinität am ET_A R im Vergleich zur Vorläuferverbindung **10**.¹³⁷ Zusätzlich konnte **14** die durch ET-1-induzierten Kontraktionen inhibieren und zeigte *in vivo* positive Wirkungen bei Herzinfarkten, Hypertonie und bei akutem Nierenversagen.^{138,139}

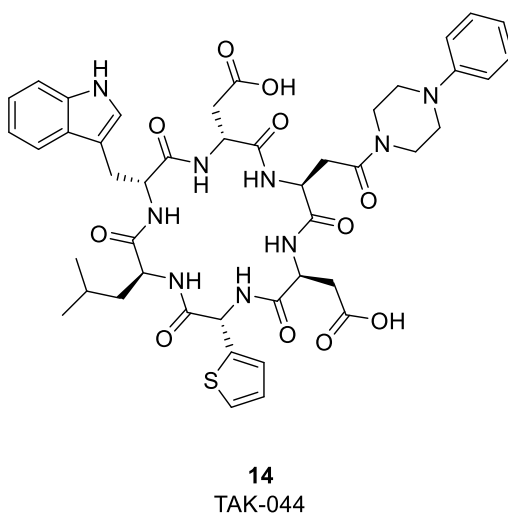


Abbildung 13: Struktur des dualen ET_A R/ ET_B R-Antagonisten TAK-044 (**14**).

1.6.5.2 Niedermolekulare Endothelin-Rezeptor-Liganden

Aufgrund der schlechten oralen Bioverfügbarkeit der peptidischen Liganden rückte die Entwicklung eines oral bioverfügbaren niedermolekularen Endothelin-Rezeptor-Antagonisten in den Fokus der Wirkstoffentwicklung.^{76,140} Der erste identifizierte niedermolekulare Ligand, der oral aktiv und eine antagonistische Aktivität am ET_A R und ET_B R gezeigt hat, war das

Pyrimidinylsulfonamid-Derivat Ro 46-2005.¹⁴¹ Ausgehend von diesem Liganden wurde in einer SAR-Studie der wirksamere Nachfolger Bosentan (**15**, Tracleer[®]) identifiziert (**Abbildung 14**).¹⁴² Dieser duale ET_AR/ET_BR-Antagonist wurde in zahlreichen klinischen Studien auf Wirksamkeit und Sicherheit geprüft und 2002 von der EMA zur Therapie der pulmonalen Hypertonie zugelassen.^{104,143,144} In einigen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die pulmonale Vasokonstriktion nicht nur durch den ET_AR allein, sondern durch beide Endothelin-Rezeptoren ausgelöst wird.¹⁴⁵ Dies bestätigte die Annahme, dass die parallele Hemmung beider Rezeptorsubtypen eine geeignete Strategie für eine Vasodilatation ist.¹⁴⁵ Darüber hinaus wurden ebenfalls die Endothelin-Rezeptor-Antagonisten Ambrisentan (**16**, Volibris[®]) im Jahr 2008 und Macitentan (**18**, Opsumit[®]) im Jahr 2013 von der EMA zur Therapie der pulmonalen Hypertonie zugelassen.¹⁴³

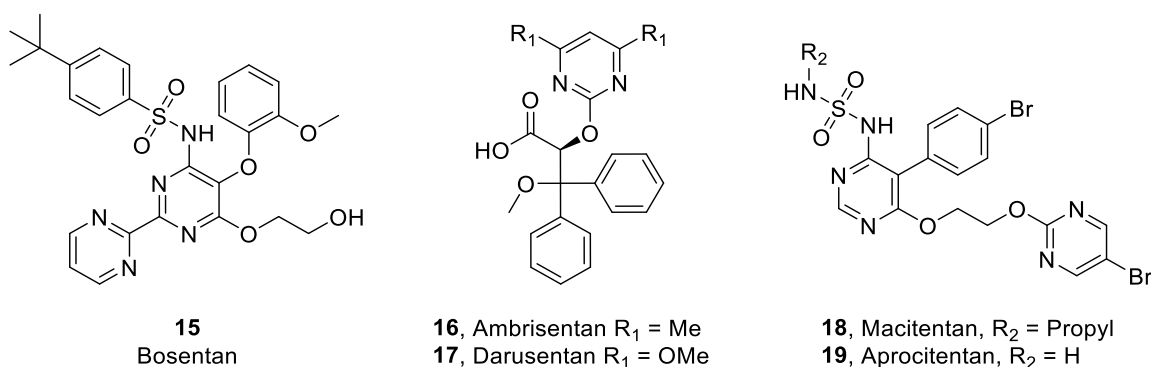


Abbildung 14: Strukturen der zugelassenen Arzneistoffe Bosentan (**15**), Ambrisentan (**16**) und Macitentan (**18**), sowie des Antagonisten Darusentan (**17**) und des aktiven Metaboliten Aprocitantan (**19**).

Bei dem Antagonisten **16** handelt es sich um ein Propansäure-Derivat mit hoher ET_AR-Selektivität und damit einhergehender Inhibition der ET_AR-vermittelten Vasokonstriktion in der glatten Gefäßmuskulatur, während gleichzeitig die vasodilatatorische Funktion des ET_BR erhalten bleibt.^{103,146} Aufgrund dieser Eigenschaften wurde das strukturell-ähnliche Darusentan (**17**) in klinischen Studien bei Patienten mit resistenter Hypertonie untersucht, das in Phase-III den Wirksamkeitsendpunkt nicht erreichen konnte, weswegen diese Studie abgebrochen wurde.¹⁴⁷ Mit Macitentan (**18**) wurde ein weiteres Pyrimidinyl-Derivat zur Therapie der pulmonalen Hypertonie zugelassen, das als dualer Antagonist die Bindung des ET-1 an ET_AR und ET_BR inhibiert.¹⁴⁸ Die Verbindung **18** zeigt im Vergleich zum Antagonisten **15** eine höhere antagonistische Aktivität in glatten Muskelzellen der Lunge.¹⁰⁵ Darüber hinaus wurde eine längere Wirkdauer des Antagonisten **18** im Vergleich zu den Verbindungen **15** und **16** festgestellt, sowie eine verbesserte Pharmakodynamik, die auf dessen aktiven Metaboliten

Aprocitentan (**19**) zurückzuführen ist.¹⁰⁵ In **Tabelle 1** wurden die therapeutisch relevanten Endothelin-Rezeptor-Antagonisten zusammengefasst.

Tabelle 1: Übersicht der bekannten Endothelin-Rezeptor-Antagonisten mit ihren Bindungsaffinitäten, Rezeptorselektivitäten und dem aktuellen Zulassungsstatus, einschließlich des Jahrs der Zulassung. Bei einer ET_{BR}/ET_{AR} Selektivität < 100 wurden die Antagonisten als unselektiv für ET_{AR} und ET_{BR} gekennzeichnet.

ET_{AR}/ET_{BR} Antagonist	Affinität	Rezeptorselektivität (ET_{BR}/ET_{AR})	Zulassungsstatus	Referenzen
Bosentan (15)	ET _{AR} : K _i = 4.7 nM ET _{BR} : K _i = 95 nM	20 unselektiv	EMA: 2002	142,143
Ambrisentan (16)	ET _{AR} : K _i = 1 nM ET _{BR} : K _i = 195 nM	195 selektiv (ET _{AR})	EMA: 2008	143,146,149,150
Darusentan (17)	ET _{AR} : K _i = 1.4 nM ET _{BR} : K _i = 184 nM	131 selektiv (ET _{AR})	Klinische Studien abgebrochen*	147,150
Macitentan (18)	ET _{AR} : IC ₅₀ = 0.5 nM ET _{BR} : IC ₅₀ = 391 nM	782 selektiv (ET _{AR}) [#]	EMA: 2013	143,148,151
Aprocitentan (19)	ET _{AR} : IC ₅₀ = 3.4 nM ET _{BR} : IC ₅₀ = 987 nM	290 selektiv (ET _{AR}) [#]	Klinische Studien*	148,152
Sitaxentan (20)	ET _{AR} : IC ₅₀ = 1.4 nM ET _{BR} : IC ₅₀ = 9800 nM	7000 selektiv (ET _{AR})	EMA: 2006 2010 widerrufen	143,153,154
Clazosentan (21)	ET _{AR} : K _i = 1.7 nM ET _{BR} : K _i = 1930 nM	1135 selektiv (ET _{AR})	PMDA: 2022	155–157
Sparsentan (22)	ET _{AR} : K _i = 9.3 nM ET _{BR} : K _i > 10000 nM AT ₁ R: K _i = 0.8 nM	> 1075 dualer ET _{AR} /AT ₁ R- Antagonist	FDA: 2023	158,159
Avosentan (23)	ET _{AR} : IC ₅₀ = 1.4 nM ET _{BR} : IC ₅₀ = 600 nM	429 selektiv (ET _{AR})	Klinische Studie abgebrochen*	160,161
Zibotentan (24)	ET _{AR} : IC ₅₀ = 21 nM ET _{BR} : IC ₅₀ > 10000 nM	> 476 selektiv (ET _{AR})	Klinische Studien*	162,163
Atrasentan (25)	ET _{AR} : K _i = 0.069 nM ET _{BR} : K _i = 139 nM	2014 selektiv (ET _{AR})	Klinische Studien*	164,165

*Die Informationen zu klinischen Studien wurden der Website www.clinicaltrials.gov entnommen.¹⁶⁶

[#]In der Veröffentlichung von IGLARZ *et al.* wurden Macitentan und Aprocitentan als duale (unselektive) ET_{AR}/ET_{BR} -Antagonisten beschrieben.¹⁴⁸

EMA = Europäische Arzneimittel-Agentur; FDA = *U.S. Food and Drug Administration*, US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel; PMDA = *Pharmaceuticals and Medical Devices Agency*, japanische Behörde für Arzneimittel und Medizinprodukte, AT₁R = Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1.

Das Sulfonamid Sitaxentan (**20**) wurde von der EMA im Jahr 2006 ebenfalls als selektiver ET_{AR} -Antagonist zur Therapie der pulmonalen Hypertonie zugelassen (**Abbildung 15**).^{143,153} Jedoch wurde die Zulassung im Jahr 2010 aufgrund akuter Lebertoxizität, die zu zwei Todesfällen geführt hatte, widerrufen.^{143,167}

Weitere Zulassungen erhielten die Endothelin-Rezeptor-Antagonisten Clazosentan (**21**, PivlazTM) in Japan und Sparsentan (**22**, FilspariTM) in den USA.^{155,159} Die Verbindung **21** ist ein

weiterer von Bosentan abgeleiteter ET_AR-Antagonist mit einer Pyrimidinylsulfonamid-Grundstruktur.¹⁵⁶ *In vivo* wurde gezeigt, dass der Antagonist **21** zur Prävention und Therapie zerebraler Gefäßspasmen einsetzbar ist, was in klinischen Studien bestätigt wurde.^{103,168,169} Daraufhin erhielt die Verbindung **21** im Jahr 2022 von der japanischen PMDA die Zulassung zur Therapie aneurysmatischer Subarachnoidalblutungen.¹⁵⁵ Mit dem Sulfonamid **22** wurde ein dualer ET_AR/AT₁R-Antagonist identifiziert, der in klinischen Studien die Proteinurie bei Immunglobulin A-Nephropathie, auch Morbus Berger genannt, reduzieren konnte.^{98,159,170} Infolgedessen wurde Verbindung **22** im Jahr 2023 von der FDA zur Therapie von Immunglobulin A-Nephropathie zugelassen.¹⁵⁹ Neben dem Derivat **22** bewirkt auch Avosentan (**23**) eine Verringerung der Proteinurie bei Patienten mit diabetischer Nephropathie.⁷⁸ Jedoch wurden in klinischen Phase-III Studien erhebliche Nebenwirkungen festgestellt, die zu Hypervolämie und Herzinsuffizienz führten.^{78,171} Daher wurde diese klinische Studie abgebrochen.^{78,171}

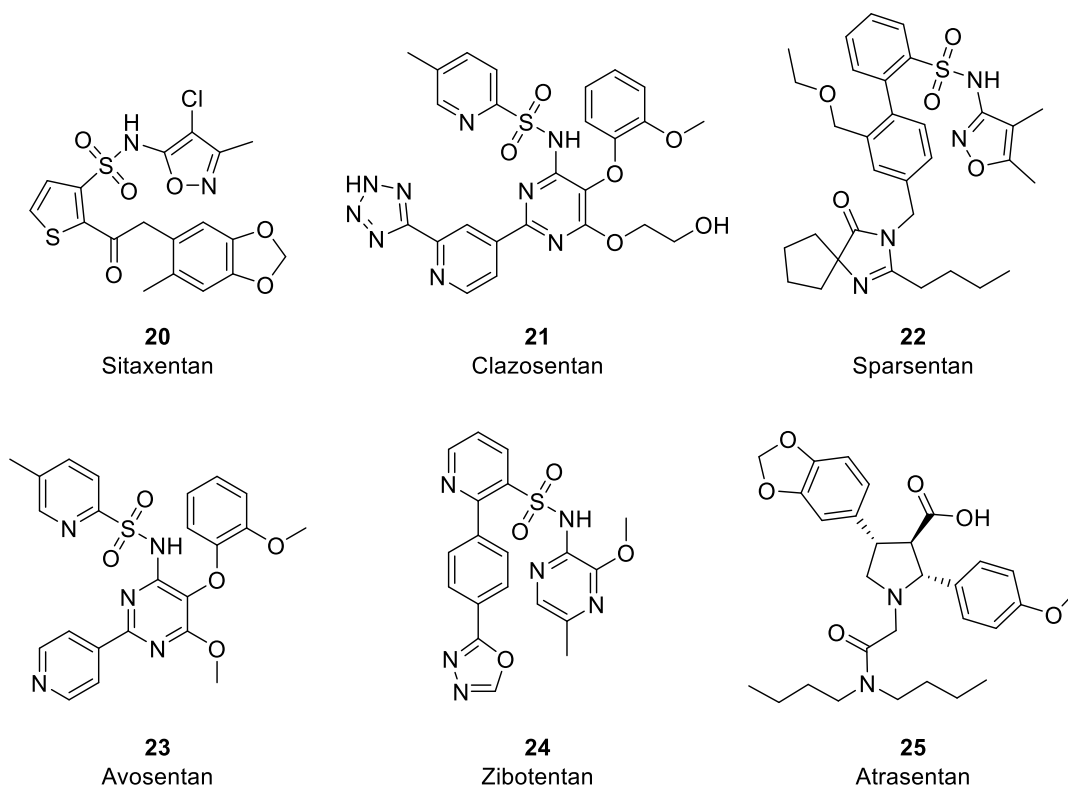


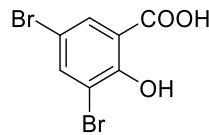
Abbildung 15: Strukturen der zugelassenen Arzneistoffe Clazosentan (**21**) und Sparsentan (**22**), sowie des Sitaxentan (**20**), dessen Zulassung widerrufen wurde. Zusätzlich sind die Strukturen der Antagonisten Avosentan (**23**), Zibotentan (**24**) und Atrasentan (**25**) dargestellt, die in klinischen Studien unerwünschte Nebenwirkungen oder eine unzureichende Wirksamkeit gezeigt haben.

Für die Endothelin-Rezeptor-Antagonisten Zibotentan (**24**) und Atrasentan (**25**) wurde eine antikarzinogene Wirkung in tierischen und menschlichen Zellen nachgewiesen.¹⁰³ Daher

wurden beide ET_AR-Antagonisten in klinischen Studien zur Therapie von Krebs in einer Mono- und in einer Kombinationstherapie mit Zytostatika untersucht.^{103,172–174} Jedoch konnte gegenüber der Placebogruppe trotz guter Verträglichkeit der Wirkstoffe keine signifikante Wirksamkeit festgestellt werden.^{103,172–174}

1.6.5.3 Allosterische Modulation des Endothelin-Rezeptors

Das Salicylsäure-Derivat Br2SA (**26**) wurde als allosterischer Modulator des ET_AR beschrieben (**Abbildung 16**).¹⁷⁵ Dieses wurde auf Grundlage der Acetylsalicylsäure und Salicylsäure synthetisiert, die ebenfalls als allosterische Modulatoren des ET_AR beschrieben wurden.^{175,176} Die Verbindung **26** hemmt laut BLANDIN *et al.* die [¹²⁵I]-ET-1-Bindung am ET_AR mit einem IC₅₀-Wert von 0.5 mM.¹⁷⁵ Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass die Verbindung **26** zum einen die Assoziation von [¹²⁵I]-ET-1 am ET_AR nicht verändert und zum anderen die Dissoziation des [¹²⁵I]-ET-1-Rezeptorkomplexes beschleunigt.¹⁷⁵ Zusätzlich ist die Dosis-Wirkungskurve für die Wirkung von **26** auf die Dissoziation des [¹²⁵I]-ET-1-Rezeptorkomplexes sättigbar.¹⁷⁵ Aufgrund dieser Ergebnisse wurde postuliert, dass es sich bei Verbindung **26** um einen allosterischen Modulator des ET_ARs handelt.¹⁷⁵



26
Br2SA

Abbildung 16: Struktur des vermutlich allosterischen ET_AR-Modulators Br2SA (**26**).

1.7 Freie-Fettsäure-Rezeptoren

Die Familie der Freien-Fettsäure-Rezeptoren (*Free fatty acid receptors*, FFARs) gehört den Rhodopsin-ähnlichen GPCRs (Familie A) an und besteht aus den Rezeptorsubtypen FFAR1 (GPR40), FFAR2 (GPR43), FFAR3 (GPR41) und FFAR4 (GPR120).^{74,177,178} Dabei zählen FFAR1 und FFAR4 zu den Rezeptoren, die von mittelkettigen (FFAR1, 7-12 C-Atome) bzw. langkettigen Fettsäuren (FFAR1 und FFAR4, > 12 C-Atome) aktiviert werden, wohingegen kurzkettige Fettsäuren (1-6 C-Atome) als Agonisten der Rezeptorsubtypen FFAR2 und FFAR3 fungieren (**Tabelle 2** und **Tabelle 3**).^{177–179} Die FFARs haben einen großen Einfluss auf verschiedene physiologische Prozesse, vor allem auf den Energiestoffwechsel, wodurch die FFARs als wichtige Targets für die Therapie von Diabetes mellitus Typ-2, Adipositas, Krebs, Lebererkrankungen und Entzündungen gelten.^{177,178,180}

1.7.1 FFAR2 und FFAR3

Die Freien-Fettsäure-Rezeptoren FFAR2 und FFAR3 wurden im Jahr 1997 identifiziert und anschließend durch die Entdeckung der endogenen kurzkettigen Fettsäureliganden im Jahr 2003 deorphanisiert.^{181,182} Der FFAR2 und FFAR3 besitzen aufgrund ihrer ≈ 40 %-igen Sequenzidentität eine hohe strukturelle Ähnlichkeit.¹⁸¹ Die beiden Rezeptorsubtypen sind in den Langerhans-Inseln und in enteroendokrinen Zellen exprimiert.^{177,182–185} Zusätzlich kommt der FFAR2 in den Adipozyten des weißen Fettgewebes und in verschiedenen Immunzellen wie Makrophagen und Neutrophilen vor und der FFAR3 im sympathischen Nervensystem.^{177,178,182,186} Für die beiden Subtypen FFAR2 und FFAR3 wurden im Jahr 2024 die ersten Kristallstrukturen mittels Cryo-EM bestimmt, womit neue Erkenntnisse über die Rezeptorstrukturen und den Aktivierungsmechanismus erhalten wurden.¹⁸⁷

Der FFAR2 kann mit der $G\alpha_{i/o}$ - und $G\alpha_{q/11}$ -G-Protein-Familie interagieren, wobei es bei einer Aktivierung der $G\alpha_{i/o}$ -Familie zu einer Inhibition der cAMP-Produktion kommt und dadurch weiterführend der ERK-Signalweg aktiviert wird.^{177,182,188} Bei der $G\alpha_{q/11}$ -Signalweiterleitung wird die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöht, wodurch es zur Aktivierung der MAPK-Kaskade kommt.^{177,182,188} Bei dem FFAR3 werden die Signale hauptsächlich über die $G\alpha_{i/o}$ -G-Protein-Familie analog weitergeleitet.^{177,182,188,189}

Durch diese unterschiedlichen Signalweiterleitungen sind der FFAR2 und FFAR3 an vielen physiologischen Vorgängen beteiligt.^{177,178} Dabei ist die Regulierung des Blutzuckerspiegels über die Sekretion von Hormonen eine wesentliche Aufgabe, bei der unter anderem durch das Hormon GLP-1 (*glucagon-like peptide 1*) die Freisetzung von Insulin verstärkt wird.^{190,191} Außerdem ist der FFAR2 am Fettstoffwechsel und an Entzündungsprozessen beteiligt und der FFAR3 an der Regulierung des sympathischen Nervensystems.^{178,186,192,193}

1.7.2 FFAR1 und FFAR4

Der durch mittel- und langkettige Fettsäuren aktivierbare Rezeptor FFAR1 wurde, wie der FFAR2 und der FFAR3, im Jahr 1997 entdeckt und ebenfalls im Jahr 2003 deorphanisiert.^{181,194} Als endogene Liganden des FFAR4 wurden im Jahr 2005 von HIRASAWA *et al.* wie im Fall des FFAR1 langkettige Fettsäuren identifiziert.¹⁹⁵ FFAR1 ist hauptsächlich in den β -Zellen des Pankreas vorhanden.¹⁹⁶ Zusätzlich wurde eine Expression des FFAR1 in enteroendokrinen Zellen, Immunzellen, Geschmacksknospen, Osteozyten und Zellen des zentralen Nervensystems festgestellt.^{197–201} Der FFAR4 ist ebenfalls in enteroendokrinen Zellen, Immunzellen und Geschmacksknospen exprimiert.^{195,197,202} Außerdem kommt der FFAR4 besonders im Darm, der Lunge sowie in Adipozyten vor.^{195,203} Im Vergleich zum FFAR2 und

FFAR3 wurden für den FFAR1 und FFAR4 bereits zahlreiche Kristallstrukturen bestimmt und dabei auch allosterische Ligandenbindungsstellen identifiziert.²⁰⁴⁻²⁰⁶

Die Signaltransduktion erfolgte bei FFAR1 hauptsächlich über $G\alpha_{q/11}$ - und $G\alpha_{i/o}$ -G-Proteine, wodurch es sowohl zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration als auch zur Hemmung der Adenylatcyclase und daraus folgend zur Aktivierung weiterer Signalkaskaden wie der MAPK-Kaskade kommt.^{178,179,194,196} Die Aktivierung des FFAR4 führt zu einer Bindung von $G\alpha_{q/11}$ -Proteinen und nachfolgend zur Rekrutierung von β -Arrestin 2, wodurch der Rezeptor internalisiert wird.^{178,195,207}

Zu den physiologischen Aufgaben des FFAR1 und FFAR4 gehört unter anderem die Sekretion von Hormonen wie GLP-1 und die Geschmackswahrnehmung.^{195,197,198,208} Der FFAR1 ist an der Glucose-stimulierten Insulinsekretion in den Langerhans-Inseln beteiligt, wohingegen der FFAR4 eine Rolle im Fettstoffwechsel und bei Immunreaktionen spielt.^{178,183,196,202,209}

1.7.3 Struktur der FFARs

In dem Jahr 2014 bzw. 2023 konnten die ersten Kristallstrukturen des FFAR1 und FFAR4 bestimmt werden.^{204,210} In diesen wurde die typische GPCR-Grundstruktur bestehend aus der Sieben-Transmembrandomäne für beide Rezeptorsubtypen bestätigt.^{204,210} Der FFAR1 besitzt analog zu den Peptid-bindenden GPCRs wie dem ET_A R und ET_B R eine ECL2, die über eine Schleife zwei antiparallele β -Faltblätter miteinander verknüpft (*hairpin*-Motiv) und als Deckel für die orthosterische Bindetasche fungiert.²⁰⁴ Die Ausrichtung dieses *hairpin*-Motivs wird durch die konservierte Disulfidbrücke zwischen der TM3 (C79^{3,25}) und dem C-terminalen Abschnitt des ECL2 (C170^{ECL2}) stabilisiert.²⁰⁴

Außerdem wurden in den FFAR1-Kristallstrukturen die allosterische Bindestelle (KS2) der Partialagonisten TAK-875 (**32**) und MK-8666 (**34**) und die allosterische Bindestelle (KS5) des Ago-PAM AP8 (**37**) beschrieben (**Abbildung 17A** und **Abbildung 19**).^{11,204,211} In KS2 bildet der Partialagonist **32** tief zwischen TM3-4 mit seiner Carboxylatfunktion Salzbrücken mit R183^{5,39} und R258^{7,35} aus, die zuvor im Rahmen von Mutationsstudien und Modelling-Experimenten als wichtige Aminosäuren für die Aktivierung des Rezeptors identifiziert wurden.^{204,212,213} Die Carboxylatfunktion von Verbindung **32** wird zusätzlich durch die Tyrosine Y91^{3,37} und Y240^{6,51} stabilisiert.²⁰⁴ Wohingegen die Sulfonat-Gruppe lediglich zur Reduktion der Lipophilie und Verbesserung der Pharmakokinetik, jedoch nicht für die agonistische Aktivität verantwortlich ist.²⁰⁴ In der Kristallstruktur von LU *et al.* wurde der FFAR1 in einem Komplex mit dem Partialagonisten **34** und dem Ago-PAM **37** bestimmt.²¹¹ In dieser bindet Verbindung **34** unter Ausbildung analoger Wechselwirkungen an der gleichen

allosterischen Bindestelle (KS2) wie Verbindung **32** (**Abbildung 17B**).^{11,211} Der Ago-PAM **37** hingegen bindet zwischen TM3-5 und der ICL2 des FFAR1 (KS5) und bildet hauptsächlich lipophile Wechselwirkungen mit dem Rezeptor aus.^{211,214} Darüber hinaus wird die Carboxylatfunktion von Verbindung **37** durch Wasserstoffbrückenbindungen mit Y44^{2,42} und S123^{4,42} stabilisiert (**Abbildung 17C**).²¹¹

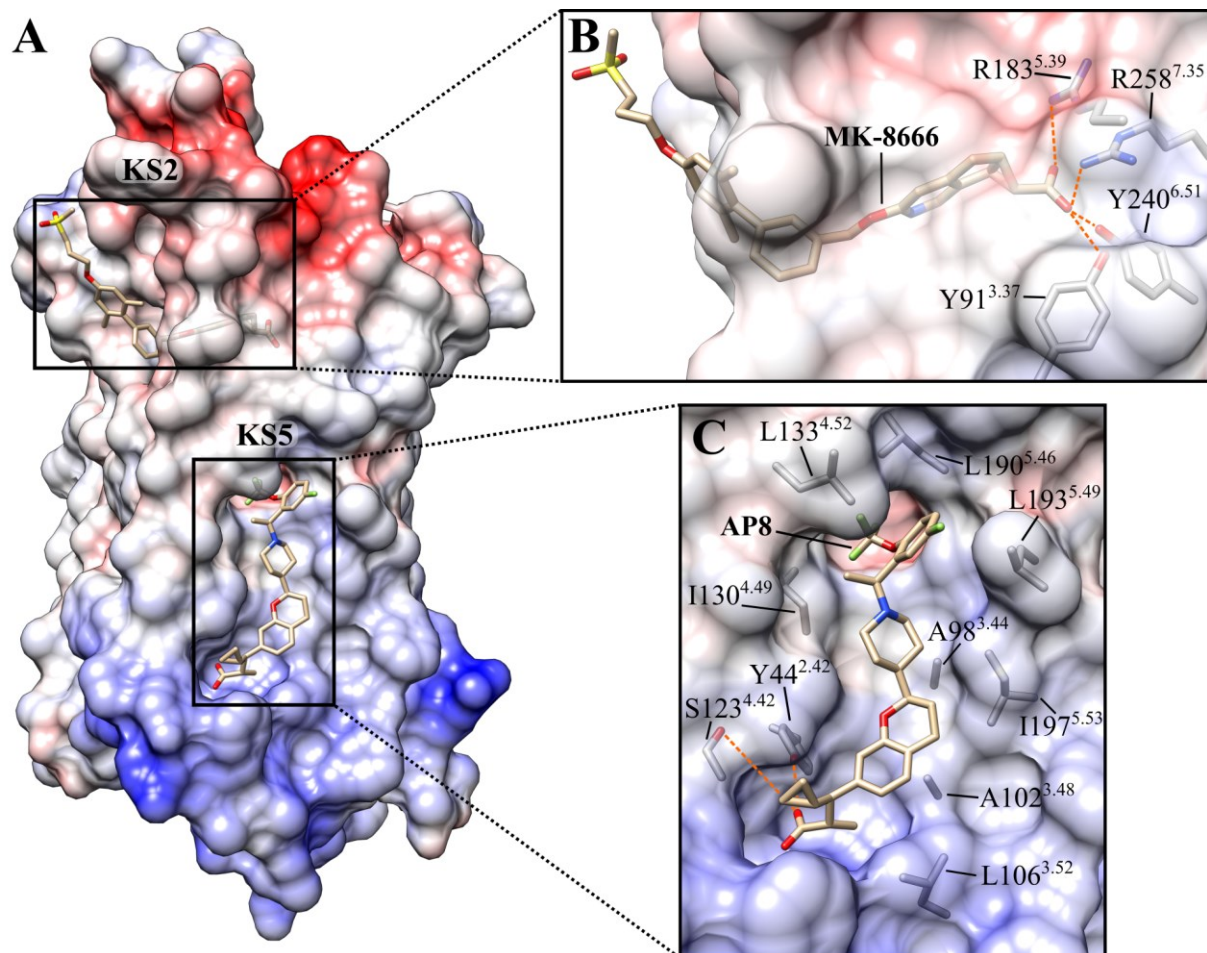


Abbildung 17: (A) FFAR1-Kristallstruktur (PDB: 5TZY) im Komplex mit den allosterischen Liganden MK-8666 (**34**) in KS2 und AP8 (**37**) in KS5.²¹¹ (B) MK-8666 bildet über seine Carboxylatfunktion innerhalb der 7TM-Domäne Salzbrücken mit R183^{5.39} und R258^{7.35} und Wasserstoffbrückenbindungen mit Y91^{3.37} und Y240^{6.51} aus. (C) Der allosterische Ligand AP8 (**37**) bindet hauptsächlich über hydrophobe Wechselwirkungen an die Oberfläche des FFAR1. Zusätzlich wird die Carboxylatfunktion durch Wasserstoffbrückenbindungen mit Y44^{2,42} und S123^{4,42} stabilisiert. Polare Wechselwirkungen sind als gestrichelte Linien in Orange dargestellt.

1.7.4 Pathophysiologie der FFARs

Durch die unterschiedlichen Signaltransduktionswege der vier FFAR-Subtypen ist die Rezeptorfamilie an zahlreichen physiologischen Prozessen beteiligt und mit verschiedenen Erkrankungen wie Diabetes, Adipositas, Krebs, Lebererkrankungen und Entzündungen assoziiert.^{7,177–179} Die größte therapeutische Relevanz weist die FFAR-Familie in Bezug auf Diabetes auf.^{7,179} In Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass FFAR-Liganden *in vitro* die

Glucose-stimulierte Insulinsekretion fördern und zur Therapie des Diabetes mellitus Typ-2 verwendbar sein könnten.^{215,216} Darüber hinaus wurde ebenfalls eine erhöhte Sekretion der Inkretine, des glucoseabhängigen insulinotropen Peptides (GIP) und GLP-1 festgestellt, wodurch es zu einer verstärkten Insulinsekretion der Langerhans-Inseln kommt.^{179,180} Daher ist die FFAR-Familie ein vielversprechendes Target für die Therapie des Diabetes mellitus Typ-2.^{7,179,180,208}

1.7.5 Liganden der FFARs

1.7.5.1 Endogene Fettsäureliganden

An die Familie der Freien-Fettsäure-Rezeptoren binden endogene Fettsäuren mit unterschiedlicher Kettenlänge.^{182,194,195} Die Subtypen FFAR2 und FFAR3 werden durch kurzkettige Fettsäuren aktiviert, wohingegen mittelkettige Fettsäuren als endogene Agonisten des FFAR1 und langkettige Fettsäuren als endogene Agonisten des FFAR1 und FFAR4 fungieren (**Tabelle 2** und **Tabelle 3**).^{182,194,195} In **Tabelle 2** sind die EC₅₀-Werte der kurzkettigen Fettsäuren am FFAR2 und FFAR3 zusammengefasst. Die beiden FFAR-Subtypen werden durch Propion- und Buttersäure im mikromolaren Bereich aktiviert.¹⁸² Die um ein bzw. zwei Kohlenstoffatome verlängerte Valerian- bzw. Capronsäure zeigen eine klare Selektivität für FFAR3, wohingegen Essigsäure lediglich FFAR2 aktiviert.^{182,188,217}

Tabelle 2: Übersicht der endogenen Agonisten des FFAR2 und FFAR3 mit den jeweiligen EC₅₀-Werten.^{178,179,182,188,217}

Fettsäure	EC ₅₀ [μM]		Referenzen
	FFAR2	FFAR3	
C2:0, Essigsäure	35-431	> 1000	182,188,217
C3:0, Propionsäure	14-290	6-127	182,188,217
C4:0, Buttersäure	28-371	42-158	182,188,217
C5:0, Valeriansäure	> 1000	42-142	182,188
C6:0, Capronsäure	-	102-134	188

In **Tabelle 3** ist ein Überblick der mittel- und langkettigen Fettsäuren und deren Potenzen an FFAR1 und FFAR4 gegeben. Die mittelkettigen Fettsäuren aktivieren selektiv FFAR1.^{178,179,194,195} Durch langkettige gesättigte und ungesättigte Fettsäuren werden FFAR1 und FFAR4 mit vergleichbaren Potenzen aktiviert, wobei ungesättigte Fettsäuren eine höhere Präferenz für FFAR4 und gesättigte Fettsäuren eine höhere Präferenz für den FFAR1

1.7.5 Liganden der FFARs

aufweisen.^{178,179} Die höchste Potenz an FFAR1 zeigt Docosahexaensäure (DHA), wohingegen FFAR4 bevorzugt von C18 PUFAs (*Polyunsaturated fatty acids*) aktiviert wird.¹⁷⁹

Tabelle 3: Endogene Agonisten des FFAR1 und FFAR4 mit den jeweiligen EC₅₀-Werten.^{178,179,194–196,218}

Fettsäure	EC ₅₀ [μM]		Referenzen
	FFAR1	FFAR4	
gesättigte Fettsäure			
C6:0, Capronsäure	46	-	194
C8:0, Caprylsäure	38	-	194
C10:0, Caprinsäure	14-43	-	194,196
C12:0, Laurinsäure	6-12	-	194,196
C14:0, Myristinsäure	8-14	30	194–196
C16:0, Palmitinsäure	5-7	52	194–196
C18:0, Stearinsäure	17	18	194,195
ungesättigte Fettsäure			
C16:1 Palmitoleinsäure	14	0,7-3	194,195,218
C18:1 Ölsäure	2-40	31	194–196
Omega-3 Fettsäure			
C18:3 α-Linolensäure	2-13	0,5	194–196,218
C20:3 Eicosatriensäure	11	1	194,195
C20:5 Eicosapentaensäure	2-7	2-3	194–196,218
C22:6 Docosahexaensäure	1-4	4	194–196
Omega-6 Fettsäure			
C18:2 Linolsäure	2-10	1	194,196,218
C18:3 γ-Linolensäure	5-9	1	194–196
C20:3 Dihomo-γ-Linolensäure	7	14	194,195
C20:4 Arachidonsäure	2-12	-	194,196
C22:4 Docosatetraensäure	13	16	194,195

1.7.5.2 Synthetische FFAR-Liganden

In den letzten 20 Jahren wurden eine Reihe synthetischer FFAR-Liganden identifiziert, die an unterschiedlichen Bindetaschen der verschiedenen FFAR-Subtypen aktivierend bzw. desaktivierend wirken.^{7,179} Eine Auswahl an orthosterischen FFAR-Liganden einschließlich bereits bekannter allosterischer Modulatoren wurde in **Tabelle 4** zusammengefasst.

Tabelle 4: Auswahl synthetischer FFAR-Liganden.^{7,178,179}

Ligand	Bindungsstelle	Potenz	Referenzen
FFAR1			
Rosiglitazon (27)	orthosterisch	EC ₅₀ = 2.8 µM	219
GW9508 (28)	orthosterisch	EC ₅₀ = 48 nM	218
GW1100 (29)	orthosterisch	IC ₅₀ = 1 µM	218
TUG-424 (30)	orthosterisch	EC ₅₀ = 32 nM	220
TUG-770 (31)	orthosterisch	EC ₅₀ = 6 nM	221
TAK-875 (32)	allosterisch (KS2)	EC ₅₀ = 14 nM	204,222
AMG837 (33)	allosterisch	EC ₅₀ = 120 nM	208
MK-8666 (34)	allosterisch (KS2)	EC ₅₀ = 0.9 nM	211,223
AM-1638 (35)	allosterisch	EC ₅₀ = 160 nM	208
AP8 (36)	allosterisch (KS5)	EC ₅₀ = 0.6 nM	211
Compound 1 (37)	allosterisch (KS5)	EC ₅₀ = 72 nM	205
FFAR2			
Cmp 1 (38)	orthosterisch	EC ₅₀ = 79 nM	224
GLPG0974 (39)	orthosterisch	IC ₅₀ = 9 nM	225
AMG-7703/ 4-CMTB (40)	allosterisch	EC ₅₀ = 660 nM	226,227
CFMB (41)	allosterisch	IC ₅₀ = 0.7 µM	228
AZ1729 (42)	allosterisch	EC ₅₀ = 125 nM	229
FFAR3			
AR420626 (43)	allosterisch	EC ₅₀ = 1.8 µM	230
FFAR4			
TUG-891 (44)	orthosterisch	EC ₅₀ = 44 nM	231
GSK137647A (45)	orthosterisch	EC ₅₀ = 0.5 µM	215
AH-7614 (46)	allosterisch	IC ₅₀ = 79 nM	215,232

1.7.5.2.1 Synthetische FFAR1-Liganden

Als einer der ersten synthetischen FFAR1-Liganden wurde das bekannte Thiazolidindion-Derivat Rosiglitazon (**27**) identifiziert (**Abbildung 18**).²¹⁹ Das ehemals zugelassene Antidiabetikum aktiviert den FFAR1 im mikromolaren Bereich und besitzt somit eine ähnliche Wirksamkeit wie die endogenen Fettsäureliganden.^{219,233} Zusätzlich zeigten auch weitere Derivate der Thiazolidindion-Familie wie Pioglitazon und Ciglitazon agonistische Aktivitäten am FFAR1.²³⁴ Darüber hinaus identifizierte BRISCOE *et al.* das Propansäure-Derivat GW9508 (**28**), das mit einem EC₅₀-Wert von 50 nM ein potenter FFAR1 Partialagonist ist und den FFAR4 mit einer 70-fach geringeren Affinität aktiviert.^{7,178,218} Dieser zeigte *in vitro* eine Stimulation der Ca²⁺-Freisetzung und eine damit einhergehende Förderung der Glucose-stimulierten Insulinsekretion.^{7,218} Der Ligand **28** und der in der gleichen Arbeit beschriebene Antagonist GW1100 (**29**) werden häufig zur physiologischen Untersuchung des FFAR1

verwendet.^{7,218} Folgend wurde auf Basis der GW9508-Grundstruktur eine Serie potenter und selektiver Propansäure-Derivate mit einer zentralen Alkinstruktur synthetisiert.²³⁵ In dieser Serie wurde das optimierte Derivat TUG-424 (**30**) dargestellt, das ebenfalls die Glucose-stimulierte Insulinsekretion erhöht.²²⁰ Aufgrund der unverändert schlechten Pharmakokinetik dieser Verbindungen wurden weitere SAR-Studien auf Basis der Phenylpropansäure-Grundstruktur durchgeführt, aus denen der hochpotente Agonist TUG-770 (**31**, $EC_{50} = 6$ nM) mit verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften hervorging.^{221,235}

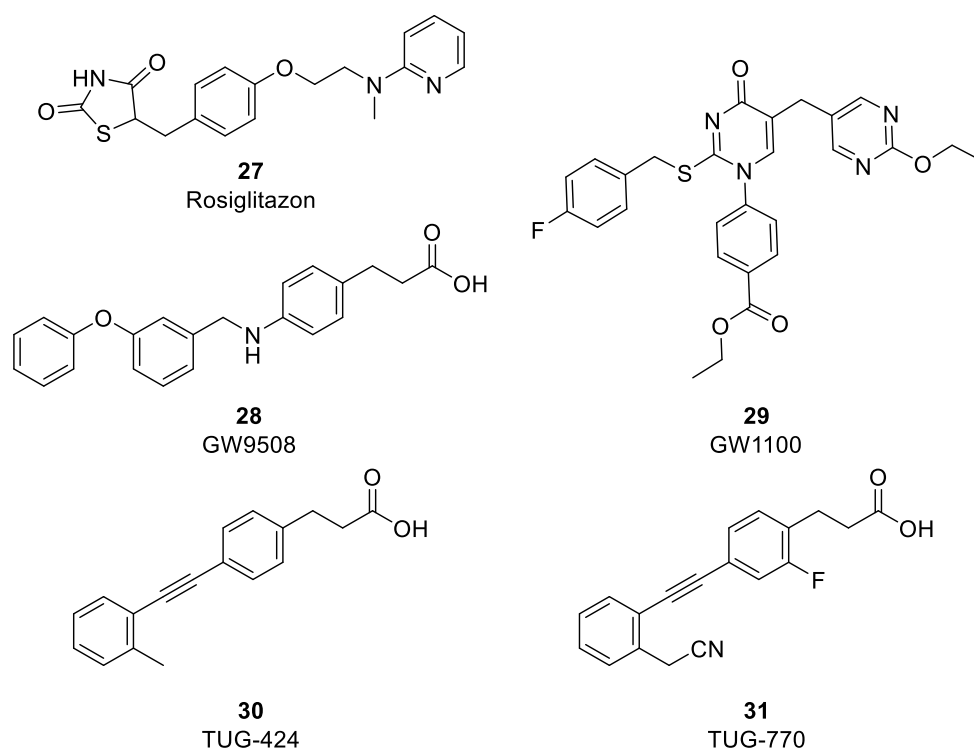


Abbildung 18: Strukturen ausgewählter synthetischer FFAR1-Liganden, die an der orthosterischen Tasche binden. Alle dargestellten Verbindungen besitzen eine agonistische Aktivität, außer der Antagonist GW1100 (**29**).

Zusätzlich zu den beschriebenen orthosterischen Liganden wurden weitere allosterische Modulatoren identifiziert und charakterisiert (**Abbildung 19**).⁹ Zu diesen gehört das potente und selektive Dihydrobenzofuran-Derivat TAK-875 (**32**, Fasiglifam).²²² Bei der Verbindung **32** handelt es sich um einen FFAR1-Ago-allosterischen Modulator, der sowohl als Partialagonist als auch als positiver allosterischer Modulator wirkt.²³⁶ Aufgrund der vielversprechenden *in vitro*- und *in vivo*-Experimente, in denen der Ligand **32** den Plasmaglucosespiegel senken konnte, wurde der allosterische Modulator im Rahmen klinischer Studien untersucht.²²² In klinischen Studien der Phase-III führte die Verbindung **32** bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ-2 zu einer verbesserten glykämischen Kontrolle.²¹⁶ Jedoch wurde auch eine Lebertoxizität festgestellt, woraufhin die Wirkstoffentwicklung abgebrochen wurde.²¹⁶

Als weitere allosterische Partialagonisten sind AMG837 (**33**) und MK-8666 (**34**) bekannt, die *in vitro* und *in vivo* ebenfalls positive Effekte auf den Zuckerstoffwechsel zeigten.^{208,223,237–239}

Die darauffolgenden klinischen Phase-I Studien wurden jedoch aufgrund von Sicherheitsbedenken eingestellt.^{240,241}

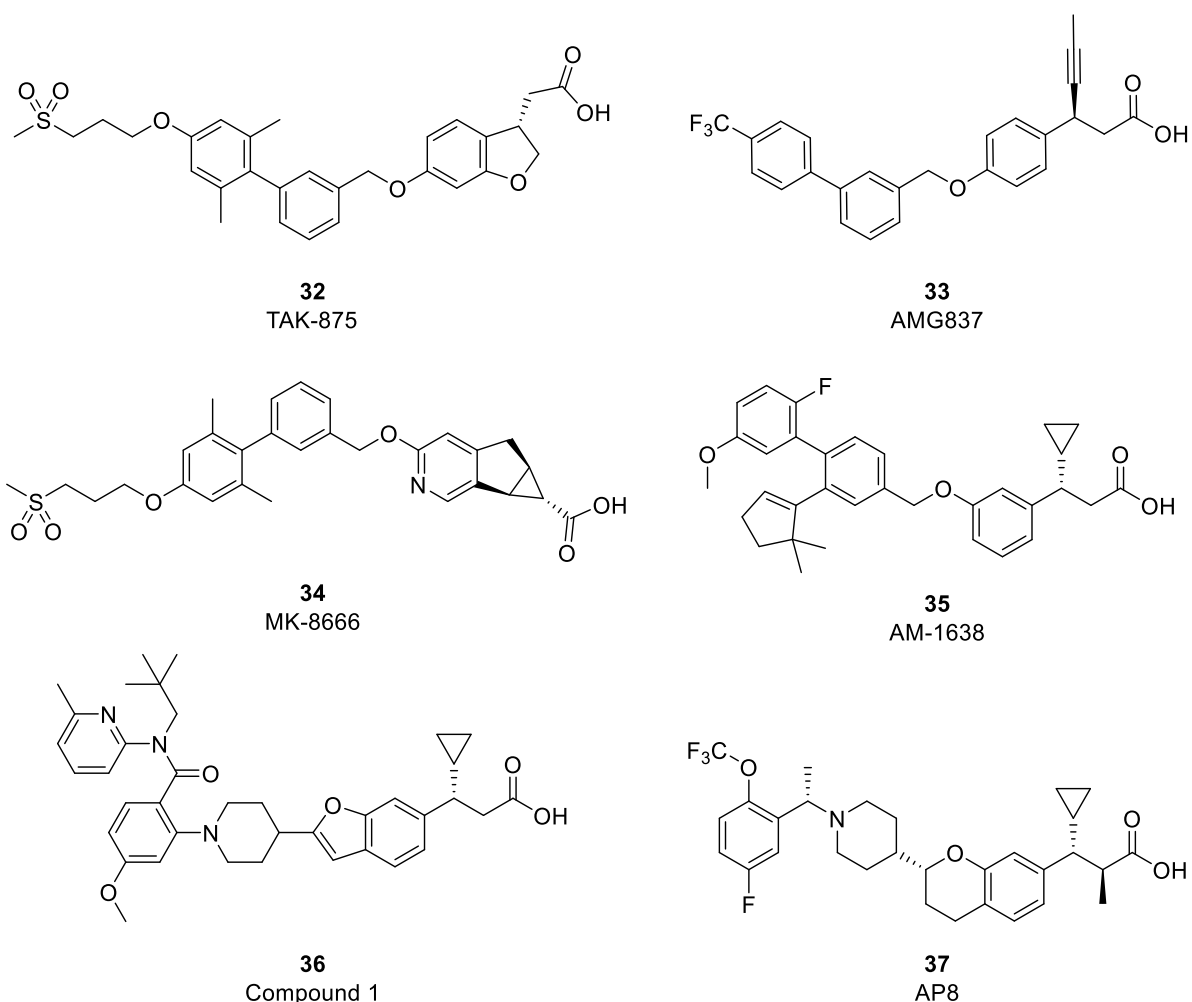


Abbildung 19: Übersicht der allosterischen Partialagonisten TAK-875 (**32**), AMG837 (**33**) und MK-8666 (**34**), sowie der allosterischen Vollagonisten AM1638 (**35**), Compound 1 (**36**) und AP8 (**37**). Die Kristallstruktur des FFAR1 im Komplex mit den Verbindungen **34** und **37** wurde in **Abbildung 17** gezeigt.

Anschließend wurde in einer weiteren SAR-Studie, basierend auf der Verbindung **33**, der allosterische Vollagonist AM-1638 (**35**) identifiziert.²⁴² Dieser zeigte *in vivo* im Vergleich zu dem Partialagonisten **33** eine verbesserte Regulierung des Blutzucker- und Insulinspiegels.^{7,242} Außerdem wurde in einer Studie von LUO *et al.* festgestellt, dass Vollagonisten wie die Verbindung **35** die Sekretion der Hormone GIP und GLP-1 aus enteroendokrinen Zellen sowie die Insulinsekretion aus den Langerhans-Inseln effektiver fördern als Partialagonisten, wodurch diese einen erhöhten therapeutischen Nutzen aufweisen.²⁰⁸

Zusätzlich zum Derivat **35** wurden mit Compound 1 (**36**) und AP8 (**37**) zwei weitere allosterische Vollagonisten beschrieben.^{205,211} Beide Verbindungen binden an den FFAR1 mit nanomolarer Affinität und besitzen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit, wodurch sie an die gleiche allosterische Tasche (KS5) des FFAR1 binden.^{9,205,211}

1.7.5.2.2 Synthetische FFAR2-Liganden

Aus einer Reihe von 4-Oxobutansäure-Derivaten wurde die Verbindung Cmp 1 (**38**) identifiziert, die als erster potenter, selektiver und orthosterischer Agonist des FFAR2 beschrieben wurde (**Abbildung 20**).^{224,243} In den darauffolgenden *in vitro*-Experimenten wurde mit dieser Verbindung eine Hemmung der Lipolyse sowie eine Stimulierung der GLP-1-Sekretion in enteroendokrinen Zellen festgestellt, wodurch der Einfluss des FFAR2 auf den Energiestoffwechsel bestätigt wurde.²²⁴ Als weiterer FFAR2-Antagonist wurde das Azetidin-Derivat GLPG0974 (**39**) identifiziert, welches *in vitro* entzündungshemmende Effekte aufwies.²²⁵ Demzufolge wurde die Wirkung des Liganden **39** im Rahmen einer klinischen Studie bei Patienten mit Colitis ulcerosa untersucht.²⁴⁴ Dabei wurde eine gute Verträglichkeit der Verbindung nachgewiesen, jedoch kein messbarer Nutzen im Vergleich zur Placebogruppe festgestellt.²⁴⁴

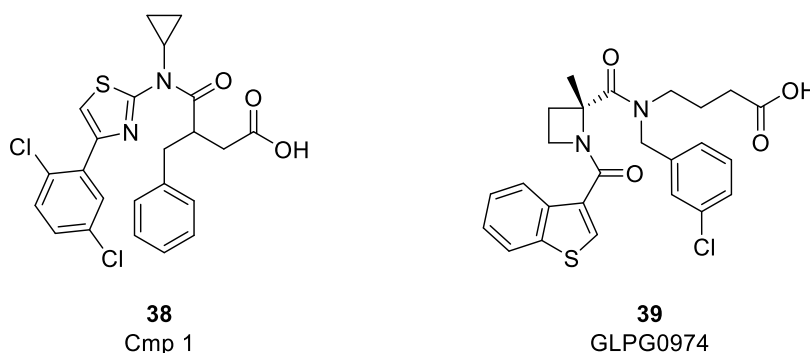


Abbildung 20: Strukturen des orthosterischen FFAR2-Agonistens Cmp 1 (**38**) und des orthosterischen FFAR2-Antagonistens GLPG0974 (**39**).

Als erster allosterischer FFAR2-Agonist wurde der in einem HTS (*high-throughput screening*) identifizierte Ligand AMG-7703 (**40**, 4-CMTB) von LEE *et al.* beschrieben, der den FFAR2 sowohl direkt aktivieren aber auch die Potenz der endogenen Fettsäuren erhöhen kann (**Abbildung 21**).²²⁶ In folgenden SARs wurden weitere allosterische Modulatoren wie CFMB (**41**, Compound 58) dargestellt, welcher keine signifikant verbesserte Potenz aufweisen konnte.^{226–228} *In vitro* zeigten die beiden allosterischen Liganden **40** und **41** eine Inhibition der Lipolyse und wurden für die weitere physiologische Charakterisierung des FFAR2

verwendet.^{9,226,228} Darüber hinaus ist das Guanidin-Derivat AZ1729 (**42**) als allosterischer Modulator beschrieben, der wie **40** als direkter Agonist und als PAM fungiert.²²⁹

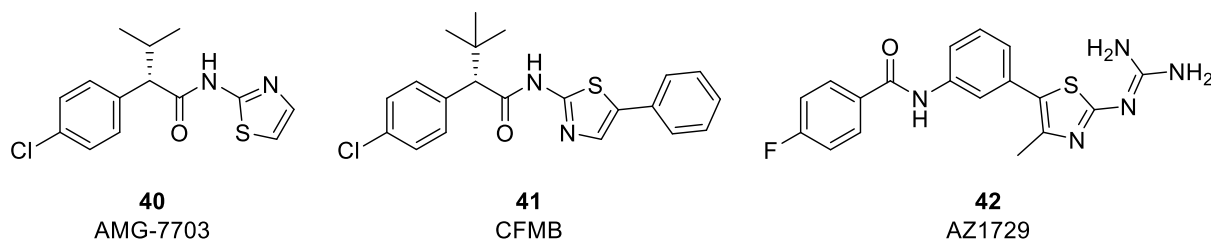


Abbildung 21: Strukturen der allosterischen FFAR2-Modulatoren AMG-7703 (**40**), CFMB (**41**) und AZ1729 (**42**).⁹

1.7.5.2.3 Synthetische FFAR3-Liganden

Die Identifizierung von FFAR3-Liganden ist im Vergleich zu den anderen FFAR-Subtypen deutlich weniger fortgeschritten. Bisher sind nur einige kurzkettige Fettsäuren als orthosterische Liganden des FFAR3 bekannt.^{7,245} Als allosterischer FFAR3-Ligand wurde in einer Serie von Hexahydrochinolonen der selektive PAM-Agonist AR420626 (**43**) identifiziert, der die GLP-1-Sekretion *in vitro* stimuliert (**Abbildung 22**).^{230,246} Darüber hinaus wurde in dieser SAR-Studie gezeigt, dass geringe strukturelle Veränderungen einen erheblichen Einfluss auf die Aktivität der entsprechenden Verbindung besitzen.²³⁰ Während einige AR420626-Derivate am FFAR3 inaktiv waren, bewirkten andere Derivate sogar eine negative allosterische Modulation.²³⁰ Dieses Phänomen ist in der Literatur bekannt und wurde bereits als *chemical switch* beschrieben.²⁴⁷

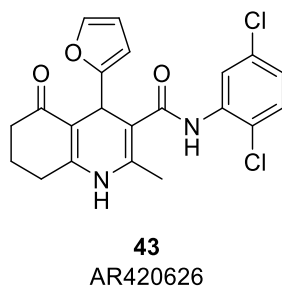


Abbildung 22: Struktur des Hexahydrochinolon-Derivates AR420626 (**43**).

1.7.5.2.4 Synthetische FFAR4-Liganden

Der therapeutische Fokus liegt beim FFAR4, wie auch bei FFAR1, auf der Entwicklung von Agonisten.⁷ In einer SAR-Studie, basierend auf Dihydrozimtsäure-Derivaten, wurde der erste selektive und hochpotente FFAR4-Ligand TUG-891 (**44**) identifiziert (**Abbildung 23**).²³¹ Die

Verbindung **44** besitzt einen EC₅₀-Wert von 44 nM und weist eine hohe Selektivität gegenüber den anderen FFAR-Subtypen auf.²³¹ Die Signaltransduktion nach Bindung dieses Agonisten erfolgt analog zu den endogenen Fettsäuren, bei der es unter anderem zu einer Ca²⁺-Freisetzung und β-Arrestin 2 Rekrutierung kommt.²⁴⁸ Außerdem wurde *in vitro* eine durch die Verbindung **44** vermittelte GLP-1-Sekretion festgestellt, weswegen der FFAR4 als mögliches therapeutisches Target für Diabetes beschrieben wurde.²⁴⁸

Des Weiteren wurde das Sulfonamid GSK137647A (**45**) entwickelt, das trotz fehlender Carbonsäurefunktion ein potenter und selektiver Agonist des FFAR4 ist.²¹⁵ In weiteren *in vitro*-Experimenten wurde durch GSK137647A eine Erhöhung der Glucose-stimulierten Insulin- und GLP-1-Sekretion festgestellt, die durch den in der gleichen Arbeit beschriebenen Antagonisten AH-7614 (**46**) inhibiert werden konnte.²¹⁵ Aufgrund der pharmakologischen Wirksamkeit wurde der Antagonist **46** in einer weiteren Arbeit von WATTERSON *et al.* untersucht und als negativer allosterischer Modulator (NAM) charakterisiert.^{7,232}

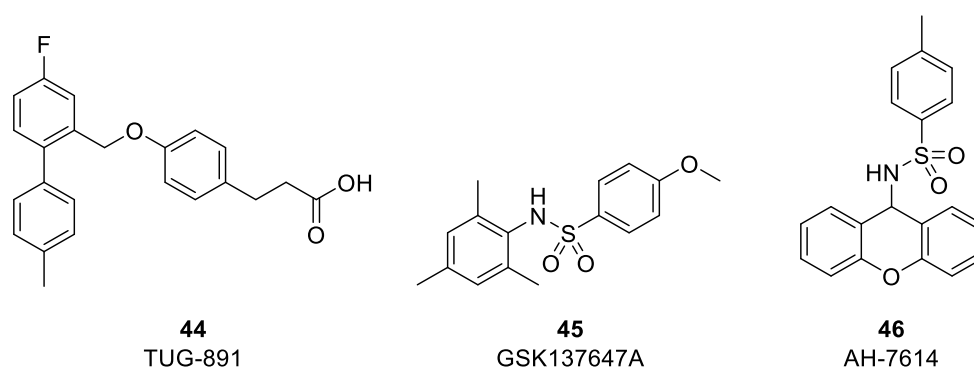


Abbildung 23: Strukturen der FFAR4-Agonisten TUG-891 (**44**) und GSK137647A (**45**), sowie des NAM AH-7614 (**46**).

1.8 GPRC5b

Der Waisenrezeptor (*orphan receptor*) GPRC5b wurde im Jahr 2000 von ROBBINS *et al.* entdeckt.^{249,250} Der Rezeptor gehört zur Familie C der GPCRs und besitzt ebenfalls die typische Sieben-Transmembrandomänen-Struktur.²⁵⁰ GPCRs der Familie C weisen in der Regel einen langen cysteinreichen *N*-Terminus mit einer charakteristischen Venus-Fliegenfallen-Domäne auf, die für eine Rezeptordimerisierung und die Ligandenbindung zuständig ist.²⁵¹ Im Gegensatz dazu weist der GPRC5b eine verhältnismäßig kurze *N*-terminale Domäne mit zwei konservierten Cysteinen auf.^{249,250} Zusätzlich beinhaltet die GPRC5b Struktur das in der Familie C hochkonservierte W247^{6,50} in TM6 und P290^{7,50} in TM7.²⁴⁹ Aufgrund des hohen Konservierungsgrads sind beide Reste vermutlich am Aktivierungsmechanismus und/oder der G-Protein-Signalweiterleitung beteiligt.²⁴⁹

Im Menschen ist der GPRC5b ubiquitär exprimiert, wobei eine erhöhte Expression im Gehirn festgestellt wurde.²⁵⁰ So zeigten GPRC5b-defiziente Mäuse diverse neurologische Phänotypen, wie Verhaltensanomalien und veränderte kortikale Neurogenese.^{252,253} An GPRC5b-*knockout* Mäusen wurde eine Verbesserung der ernährungsbedingten Insulinresistenz und Fettleibigkeit festgestellt, die auf eine Reduzierung der Entzündungen im weißen Fettgewebe zurückzuführen ist.²⁵⁴ Mechanistisch wurden die Entzündungen durch die Interaktion zwischen dem GPRC5b und der Tyrosinkinase Fyn und anschließender Aktivierung des NF- κ B-Signalweges initiiert und gefördert.²⁵⁴ Außerdem spielt der GPRC5b eine Rolle bei der Regulierung des Tonus der glatten Gefäßmuskulatur und deren Differenzierung über eine Interaktion mit dem Prostacyclin-Rezeptor.²⁵⁵ Zusätzlich wurde in weiteren *in vitro*-Studien gezeigt, dass eine erhöhte GPRC5b Expression zu verringerter Insulinsekretion und zu einer fibrotischen Aktivität in kardialen Fibroblasten führte, weswegen der Rezeptor als mögliches Target für Diabetes mellitus Typ-2 und Herzinsuffizienz beschrieben wurde.^{256,257}

2. Zielsetzung

Als Teil des GLUE-Projekts sollten im Rahmen dieser Arbeit diverse synthetische Arbeiten an möglichen Liganden der ausgewählten GLUE-Zielrezeptoren (ETRs, FFARs und GPRC5b) erfolgen.

Im ersten Teil der Arbeit sollte für die Arbeitsgruppe DÖTSCH/BERNHARD ein selektiver und hochaffiner ET_BR-Ligand zur Reinigung des Rezeptors mittels Affinitätschromatographie synthetisiert werden (**Kapitel 3.1**). Dafür wurde das ET-1 Derivat 4Ala-ET-1 **7** ausgewählt, das mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese synthetisiert werden sollte (**Abbildung 24**). Anschließend sollte dieses Derivat über ein Linker-Segment mit Biotin funktionalisiert werden. Zusätzlich sollte das Peptid **7** mit einem Fluorophor für Aktivitätsuntersuchungen des ET_BR modifiziert werden. Eine weitere Aufgabe bestand in der Synthese verkürzter 4Ala-ET-1-Derivaten, die als Referenzliganden für die biologische Testung der Arbeitsgruppe BÜNEMANN dienen sollten.

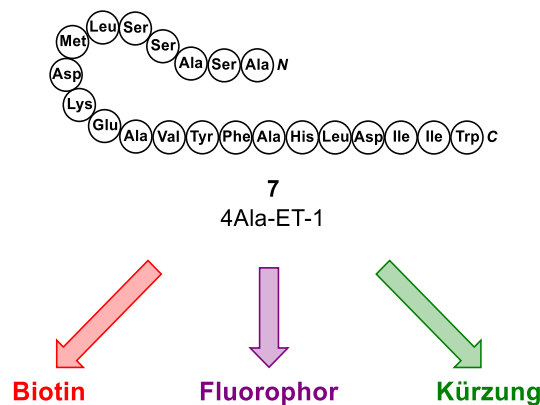


Abbildung 24: Geplante Modifizierungen des 4Ala-ET-1 Peptids **7**.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte für die Arbeitsgruppe DÖTSCH/BERNHARD ein fluoreszenzmarkierter FFAR2-Ligand als Referenzligand für *in vitro*-Untersuchungen synthetisiert werden (**Kapitel 3.2**). Als Grundlage dienten die Arbeiten von HANSEN *et al.* und PIZZONERO *et al.*, in denen der FFAR2-Ligand **47** und dessen Synthese beschrieben wurde (**Abbildung 25**).^{225,258} Darüber hinaus sollte das Grundgerüst der Verbindung **47** (rot markiert, **Abbildung 25**) zusätzlich mit einem Linker-Segment und Biotin zur Reinigung des FFAR2 mittels Affinitätschromatographie in der Arbeitsgruppe DÖTSCH/BERNHARD modifiziert werden.

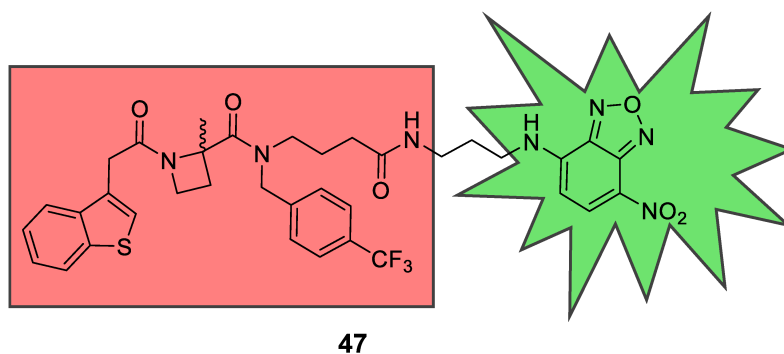


Abbildung 25: Struktur des fluoreszenzmarkierten FFAR2-Liganden **47**, der in der Arbeit von HANSEN *et al.* beschrieben wurde und im Rahmen dieser Arbeit nachsynthetisiert werden sollte.²⁵⁸ In Grün wurde der NBD-Fluorophor und in Rot der eigentliche Ligand markiert, der zusätzlich über einen Linker mit Biotin modifiziert werden sollte.

Im dritten Teil der Arbeit sollten die im Laufe dieser Dissertation mittels Dockingstudien der Arbeitsgruppe KOLB erhaltenen Vorhersagen für potentielle neuartige Liganden der GLUE-Rezeptoren als Grundlage für die Synthese allosterischer Modulatoren dienen. Dafür sollten die vorgeschlagenen Liganden aus den Dockingstudien in Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen KOLB, DIEDERICH und SCHLITZER bewertet und die vielversprechendsten Verbindungen für die Synthese ausgewählt werden. Anschließend sollte deren Synthese geplant und durchgeführt werden. Nach deren Reinigung und analytischer Charakterisierung sollten die Zielverbindungen an die Arbeitsgruppe BÜNEMANN zur Prüfung ihrer Wirksamkeit übergeben werden. Zusätzlich sollte eine Derivatisierung der ursprünglichen Liganden erfolgen, um ein größeres Spektrum ähnlicher Verbindungen zu erhalten. Im Falle einer biologisch aktiven Substanz war geplant, deren Affinität bzw. Wirksamkeit zu optimieren (**Kapitel 3.3**).

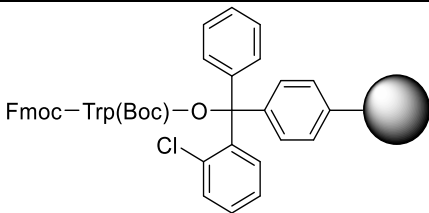
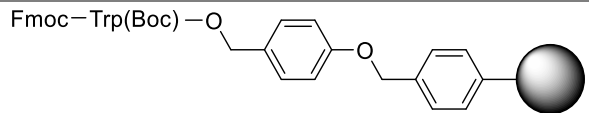
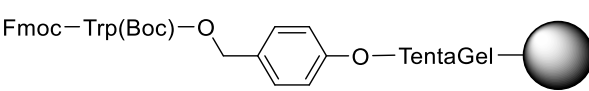
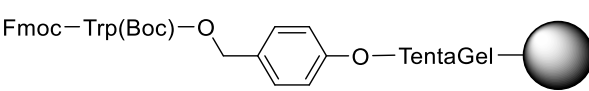
3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Peptidische ET_BR-Liganden

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte für die Arbeitsgruppe DÖTSCH/BERNHARD ein biotinylierter ET_BR-Ligand zur Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie synthetisiert werden. Dafür wurde der selektive und potente ET_BR-Ligand 4Ala-ET-1 **7** ausgewählt (**Abbildung 24**).¹¹⁷ Dieser weist im Vergleich zu dem endogenen ET-1 eine verbesserte ET_BR-Selektivität auf und ist aufgrund der fehlenden Disulfidbrücken mit geringerem Syntheseaufwand herzustellen.¹¹⁷ Im Anschluss an die Peptidsynthese sollte das 4Ala-ET-1 **7** mit einem geeigneten Linker und Biotin modifiziert werden.

Für die geplante Synthese am automatisierten Peptidsynthesizer Syro 2000 wurde zunächst das 2-Chlortritylchlorid-Harz (2-CTC-Harz) mit Fmoc-Trp(Boc)-OH beladen und die Harzbeladung gravimetrisch bestimmt (**Kapitel 5.1.9**). Darüber hinaus wurden drei weitere Fmoc-Trp(Boc)-beladene Harze kommerziell erworben, um die Reinheit der automatisierten 4Ala-ET1 Peptidsynthese in Abhängigkeit von der Beladung und der Eigenschaften des jeweiligen Harzes zu vergleichen (**Tabelle 5**).

Tabelle 5: Verwendeten Harze mit den jeweiligen Beladungen für die automatisierte Peptidsynthese. Das 2-CTC-Harz wurde mit Fmoc-Trp(Boc)-OH beladen, die weiteren mit Fmoc-Trp(Boc)-beladenen Wang-, TentaGel® R PHB- und TentaGel® S PHB-Harze wurden kommerziell erworben.

Harz	Struktur des beladenen Harzes	Beladung [mmol/g]
2-CTC-Harz		0.64
Wang-Harz		0.29
TentaGel® R PHB-Harz		0.24
TentaGel® S PHB-Harz		0.19

Da die erste Synthese am 2-CTC-Harz zu zahlreichen Nebenprodukten führte (**Abbildung 26**), wurden bewusst niedrig beladene Harze erworben, um eine saubere Peptidsynthese zu ermöglichen. Zusätzlich wurde mit dem TentaGel® R PHB-Harz ein spezielles Harz mit

erhöhtem Quellvolumen erworben, dass besonders für lange bzw. schwierige Peptidsequenzen geeignet sein soll. Ausgehend von den in **Tabelle 5** dargestellten Harzen wurde mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese mit dem Kupplungsreagenz HBTU, dem Additiv HOBt und der Base DIPEA das 4Ala-ET-1-Peptid aufgebaut. Nach Abschluss der automatisierten SPPS wurden die Harze mit DMF gewaschen und die Fmoc-Schutzgruppe mit 20 % Piperidin in DMF abgespalten. Daraufhin wurde simultan das Peptid vom Harz und die permanenten Schutzgruppen von den Seitenketten mit einer Lösung aus TFA/H₂O/TIS (95/2.5/2.5, v/v/v) sauer abgespalten. Das Reaktionsgemisch wurde in Diethylether getropft und das präzipitierte Rohpeptid mittels analytischer HPLC auf dessen Reinheit untersucht (**Abbildung 26**). Anschließend wurden die Rohpeptide mittels präparativer HPLC gereinigt und massenspektrometrisch analysiert. Dabei konnte die Verbindung, die bei einer Retentionszeit von 23.3 min eluierte, als das Produkt 4Ala-ET-1 identifiziert und in hoher Reinheit isoliert werden.

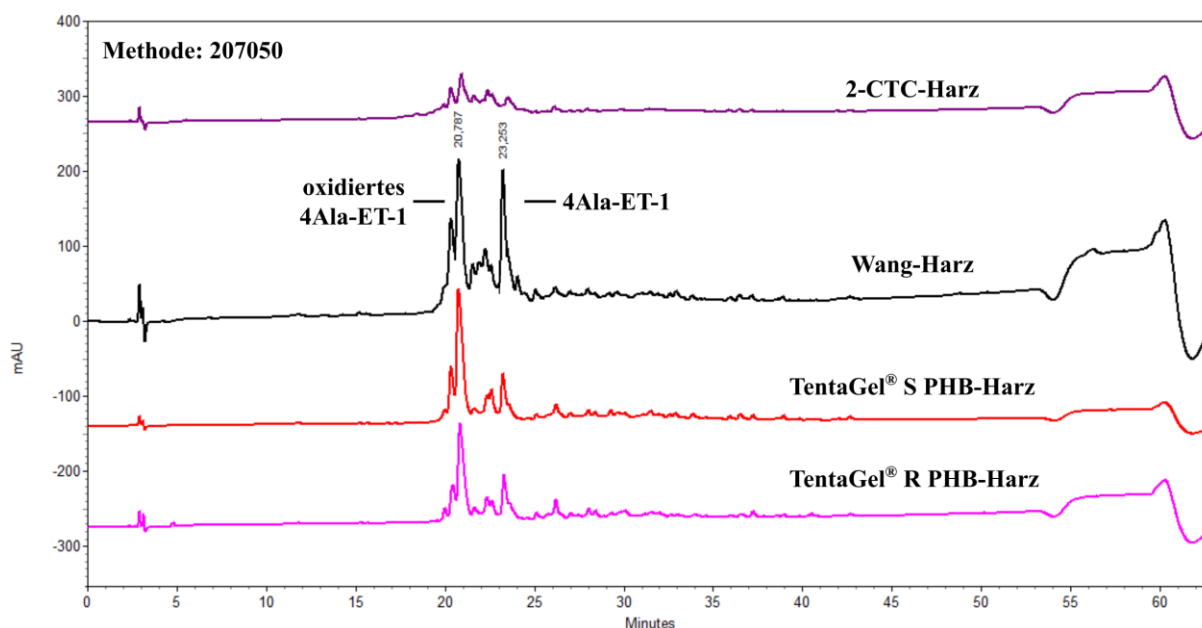


Abbildung 26: Analytische HPLC-Chromatogramme des 4Ala-ET-1-Rohpeptid nach saurer Abspaltung von den unterschiedlichen Harzen. Bei der Retentionszeit von 20.8 min eluiert das am Methionin oxidierte 4Ala-ET-1-Peptid und bei 23.3 min das gewünschte 4Ala-ET-1-Peptid. Methode: Start bei 20 % B; Ende bei 70 % B; Gradient: +1 % B/min, ab 50 min beginnt der Spüllauf; Fluss: 1 mL/min.

Weder das selbst beladene 2-CTC-Harz noch die kommerziell erworbenen TentaGel[®]-Harze lieferten zufriedenstellende Resultate. Im Vergleich wurde jedoch für das Wang-Harz der höchste Produktpeak festgestellt, daher wurde dieses Harz für weitere Synthesen verwendet. Neben dem Produkt wurde bei einer Retentionszeit von 20.8 min eine Verbindung mit einer Masse gefunden, die um $m/z = 16$ größer war als die Masse des 4Ala-ET-1, was auf eine

oxidierte Form des 4Ala-ET-1 hinweist. Eine solche Oxidation ist an der Thioetherstruktur des Methionins in Position 7 möglich und ein bekanntes Problem Met-haltiger Peptide. Daher wurde bei der Nachsynthese im Anschluss an die saure Abspaltung das Rohpeptid mit *N*-Methylmercaptoacetamid nach HOUGHTEN *et al.* reduziert.²⁵⁹ Der Reaktionsverlauf dieser Reduktion wurde nach 0 h, 18 h und 94 h mittels analytischer HPLC untersucht (**Abbildung 27**). Aus den HPLC-Chromatogrammen ist ersichtlich, dass das oxidierte Peptid bei 0 h die größte Peakfläche aufweist. Nach 18 h ist dessen Menge bereits deutlich reduziert und nach 94 h komplett umgesetzt. Parallel dazu nahm die Peakfläche des gewünschten 4Ala-ET-1-Peptids mit der Zeit zu. Im Anschluss an diese Reduktion wurde das Rohpeptid mittels präparativer HPLC gereinigt, wodurch das 4Ala-ET-1 (TFA-Salz, **48**) in 97.5 %-iger Reinheit (Bestimmung der Reinheit durch analytische HPLC bei 220 nm) isoliert werden konnte (**Abbildung 28**).

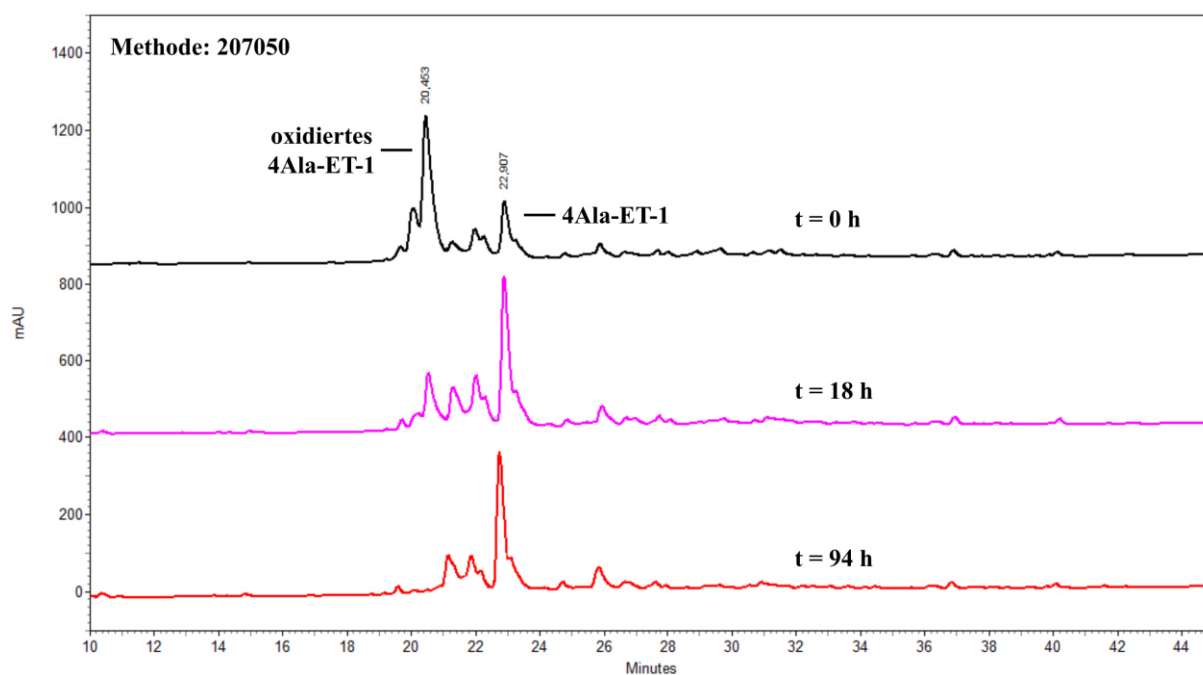


Abbildung 27: HPLC-Chromatogramme (Ausschnitt von 10 - 45 min) der Reduktion des 4Ala-ET-1-Rohpeptids mit *N*-Methylmercaptoacetamid bei 0 h, 18 h und 94 h. Bei 0 h ist die Peakfläche des oxidierten Peptids (20.453 min) höher als die des eigentlichen 4Ala-ET-1-Peptids (22.907 min). Nach 18 h konnte eine signifikante Abnahme festgestellt werden und bei 94 h war kein oxidiertes Peptid mehr sichtbar. Methode: Start bei 20 % B; Ende bei 70 % B; Gradient: +1 % B/min; Fluss: 1 mL/min.

Nach der erfolgreichen Synthese des 4Ala-ET-1 sollte dieses mit einem Linker und Biotin zur Affinitätsreinigung des ET_BR modifiziert werden. Dafür wurde das 4Ala-ET-1 erneut synthetisiert und nach der automatisierten Festphasenpeptidsynthese manuell mit dem Ethylenglykol-Derivat TTDS und danach mit Biotin gekuppelt (**Abbildung 28**). Als Kupplungsreagenz und Additiv wurden analog HBTU bzw. HOBt verwendet. Anschließend

wurde das Rohpeptid vollständig entschützt und reduziert. Bei der Reinigung mittels präparativer HPLC konnte aufgrund der geringen Löslichkeit des Rohpeptids **49** im verwendeten Laufmittelgemisch (H₂O/MeCN + 0.1 % TFA) lediglich eine Ausbeute von < 1 mg erhalten werden. Um die Löslichkeit der Verbindung **49** zu verbessern, wurden anstatt des TTDS-Linkers zwei Lysine über die Seitenkette an das 4Ala-ET-1 gekuppelt. Diese sollten aufgrund der freien α -Aminogruppen zu einer verbesserten Löslichkeit des Peptids führen. Anschließend wurde das Biotin an das Peptid gekuppelt und im Anschluss vollständig entschützt. Das Rohpeptid wurde wieder reduziert und konnte im Laufmittelgemisch (H₂O/MeCN + 0.1 % TFA) der präparativen HPLC problemlos gelöst und gereinigt werden. Auf diese Weise wurden ausgehend von 180 mg Fmoc-Trp(Boc)-Wang-Harz (Ausgangsbeladung: 0.29 mmol/g) 8 mg des Peptids **50** in einer Reinheit von 94.3 % erhalten. Das hergestellte 4Ala-ET-1 (TFA-Salz, **48**) und das Biotin-sLys-sLys-4Ala-ET-1 (TFA-Salz, **50**) wurden der Arbeitsgruppe DÖTSCH/BERNHARD für die Proteinreinigung des ET_BR zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurde eine weitere Charge der Verbindung **48** an die Arbeitsgruppe BÜNEMANN für die *in vitro*-Untersuchungen am ET_BR übergeben.

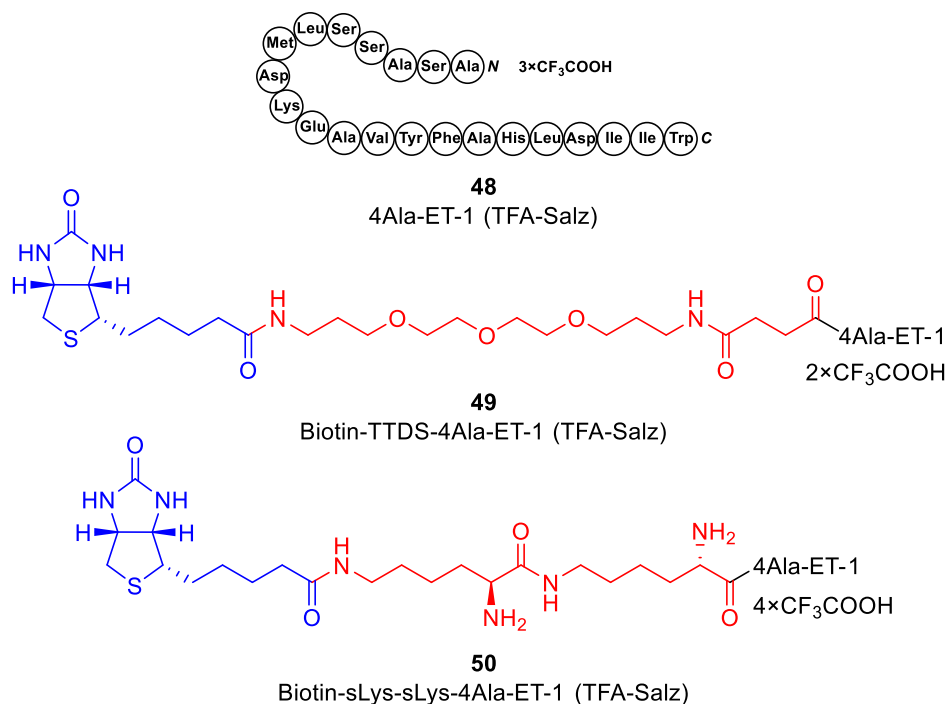


Abbildung 28: Strukturen des 4Ala-ET-1 (**48**) und der biotinylierten 4Ala-ET-1-Derivate **49** mit dem TTDS-Linker und **50**, welches zwei, über die Seitenkette verknüpfte, Lysine als Linker besitzt. Im Falle der Bezeichnung sLys wurde das Lysin über die ϵ -Aminogruppe im Peptid eingebaut. Das Biotin ist in Blau und die Linker in Rot dargestellt.

Da die starke Bindung des 4Ala-ET-1 **48** an den ET_BR in der biologischen Testung der Arbeitsgruppe BÜNEMANN das Auswaschen des Liganden erschwert hat, wurden verkürzte

3.1 Peptidische ET_BR-Liganden

4Ala-ET-1-Derivate synthetisiert, die weniger potent an den ET_BR binden. In der Arbeit von SAEKI *et al.* wurde bei einer *N*-terminalen Verkürzung des 4Ala-ET-1 um 7 Aminosäuren lediglich eine Verringerung der Potenz um den Faktor 4 und bei einer Verkürzung um 9 Aminosäuren bereits eine Verringerung um den Faktor 4000 festgestellt.¹¹⁷ Demzufolge wurden die *N*-terminal um 8, 10 bzw. 12 Reste verkürzten Peptide **51-53** analog mittels automatisierter SPPS dargestellt (**Abbildung 29**). Im Anschluss wurden die Rohpeptide vollständig entschützt. Aufgrund des fehlenden Methionins war in diesem Fall kein zusätzlicher Reduktionsschritt nötig. Die verkürzten 4Ala-ET-1-Rohpeptide **51**, **52** und **53** konnten direkt gereinigt und in ausreichenden Mengen erhalten werden.

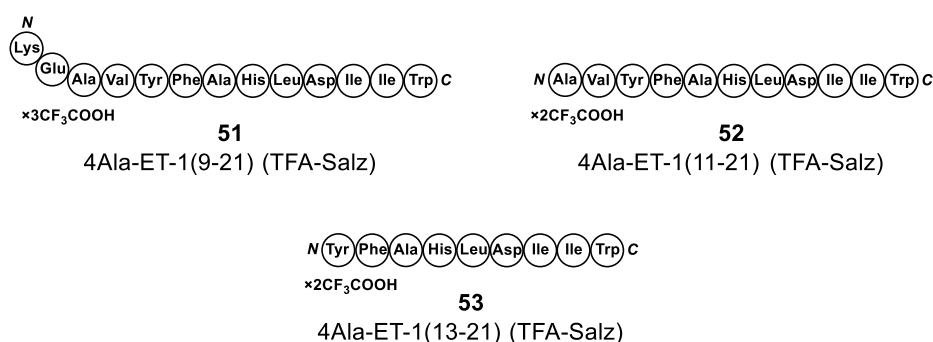
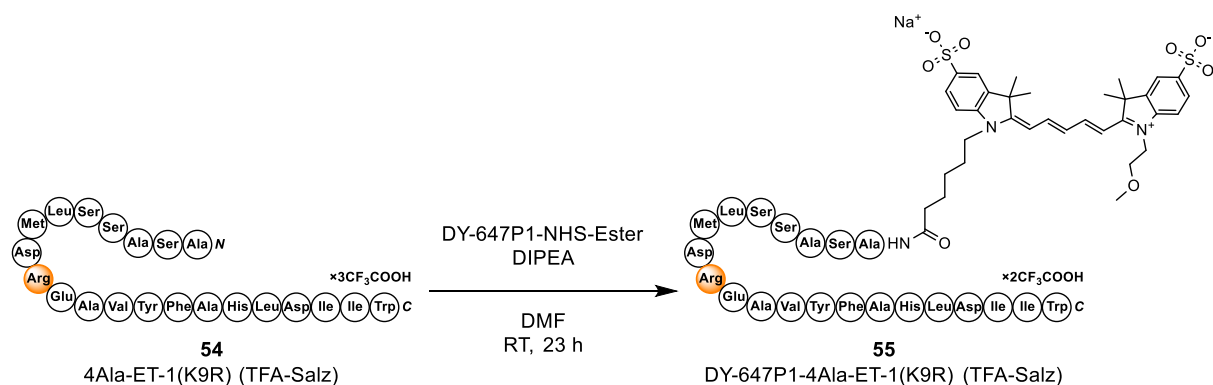


Abbildung 29: Verkürzte 4Ala-ET-1-Derivate **51**, **52** und **53**. In Klammern sind die Positionen der enthaltenen Aminosäuren in Bezug zu 4Ala-ET1 **48** angegeben.

Eine weitere Aufgabe bestand in der Synthese eines fluoreszenzmarkierten ET_BR-Liganden. Dafür wurde ebenfalls das 4Ala-ET-1-Peptid als Grundstruktur verwendet, wobei in der Synthese das Lysin in Position 9 durch Arginin (K9R) substituiert wurde. Auf diese Weise wurde die zweite freie Aminogruppe neben dem *N*-Terminus eliminiert, um eine selektive Reaktion des Fluorophors mit dem Peptid zu ermöglichen, ohne dass eine weitere orthogonale Schutzgruppe für die Seitenkette des Lys9 erforderlich ist. Nach der automatisierten SPPS wurde das Rohpeptid **54** vollständig entschützt, reduziert und gereinigt. Im nächsten Schritt wurde der kommerziell erworbene Fluorophor DY-647P1 (*Dyomics GmbH*; $\lambda_{\text{ex}} = 653$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 672$ nm in EtOH) als NHS-Ester mit DIPEA in DMF an das 4Ala-ET-1(K9R)-Derivat (TFA-Salz, **54**) gekuppelt und anschließend gereinigt, wodurch der fluoreszenzmarkierte ET_BR-Ligand **55** dargestellt werden konnte (**Schema 1**). Im Anschluss an die analytische Charakterisierung wurde der Ligand an die Arbeitsgruppe DÖTSCH/BERNHARD übergeben und in der Publikation von UMBACH *et al.* zur Funktionalitätsuntersuchung des ET_BR verwendet.²⁶⁰



Schema 1: Umsetzung des 4Ala-ET-1(K9R) (**54**), das in Position 9 ein Arginin anstatt Lysin enthält (orange unterlegt), mit DY-647P1-NHS-Ester zum fluoreszenzmarkierten Peptid DY-647P1-4Ala-ET-1(K9R) (**55**).

3.2 Niedermolekulare FFAR2-Liganden

Als FFAR2-Ligand sollte zum einen ein fluoreszenzmarkierter Referenzligand synthetisiert werden, der für die biologische Testung an dem FFAR2 von der Arbeitsgruppe DÖTSCH/BERNHARD benötigt wurde. Zum anderen sollte ein biotinylierter FFAR2-Ligand hergestellt werden, der wie der biotinylierte ET_BR-Ligand **50** zur Proteinreinigung verwendet werden sollte. In der Literatur wurde bereits basierend auf dem FFAR2-Antagonisten **39** (Kapitel 1.7.5.2.2) der fluoreszenzmarkierte FFAR2-Ligand **47** von HANSEN *et al.* beschrieben, der im Rahmen dieser Arbeit in einer leicht modifizierten Synthese dargestellt wurde (Abbildung 30).^{225,258}

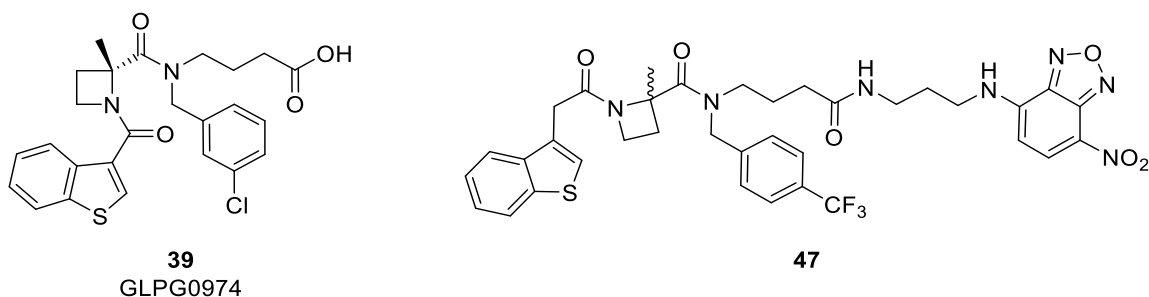
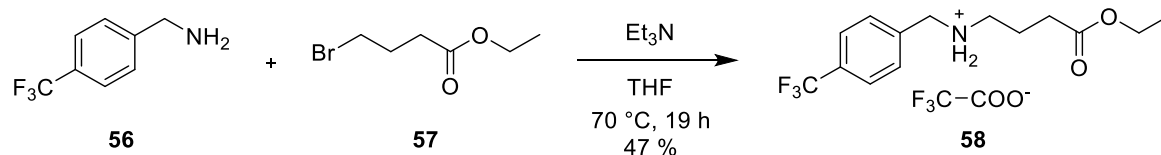


Abbildung 30: Struktur des bekannten FFAR2-Antagonist **39**, der zur Entwicklung des fluoreszenzmarkierten FFAR2-Liganden **47** diente.

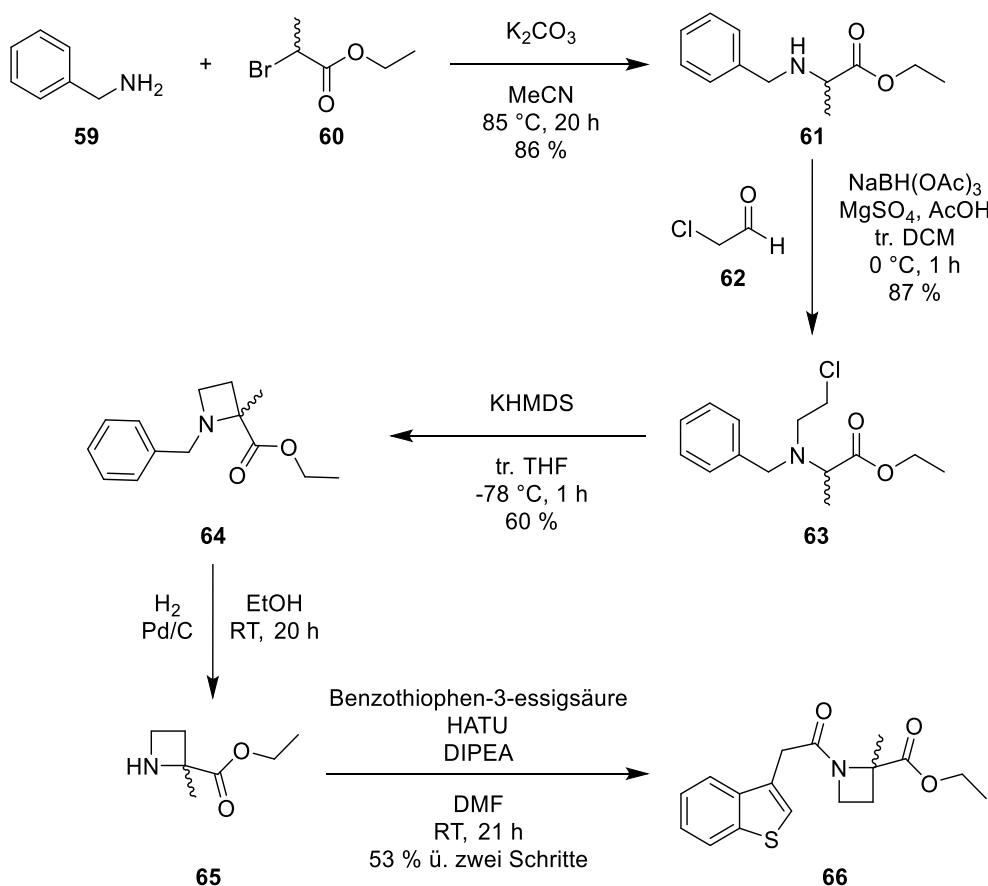
Die Totalsynthese des fluoreszenzmarkierten FFAR2-Liganden **47** umfasst 11 lineare Schritte, sowie die Synthese des dafür benötigten Edukts **58**. Dieses konnte in einer nukleophilen Substitution aus dem substituierten Benzylamin **56** und 4-Brombuttersäureethylester **57** erhalten werden (Schema 2).^{225,258}

3.2 Niedermolekulare FFAR2-Liganden



Schema 2: Darstellung der Verbindung **58** als Edukt zur Totalsynthese des fluoreszenzmarkierten FFAR2-Liganden **47**.

Im ersten Schritt der 11-stufigen Totalsynthese wurde Benzylamin **59** mit Ethyl-2-brompropionat **60**, das als Racemat erworben wurde, in einer nukleophilen Substitution umgesetzt (**Schema 3**). Das erhaltene sekundäre Amin **61** reagierte im nächsten Schritt in einer reduktiven Aminierung mit Chloracetaldehyd **62** zu dem tertiären Amin **63**.

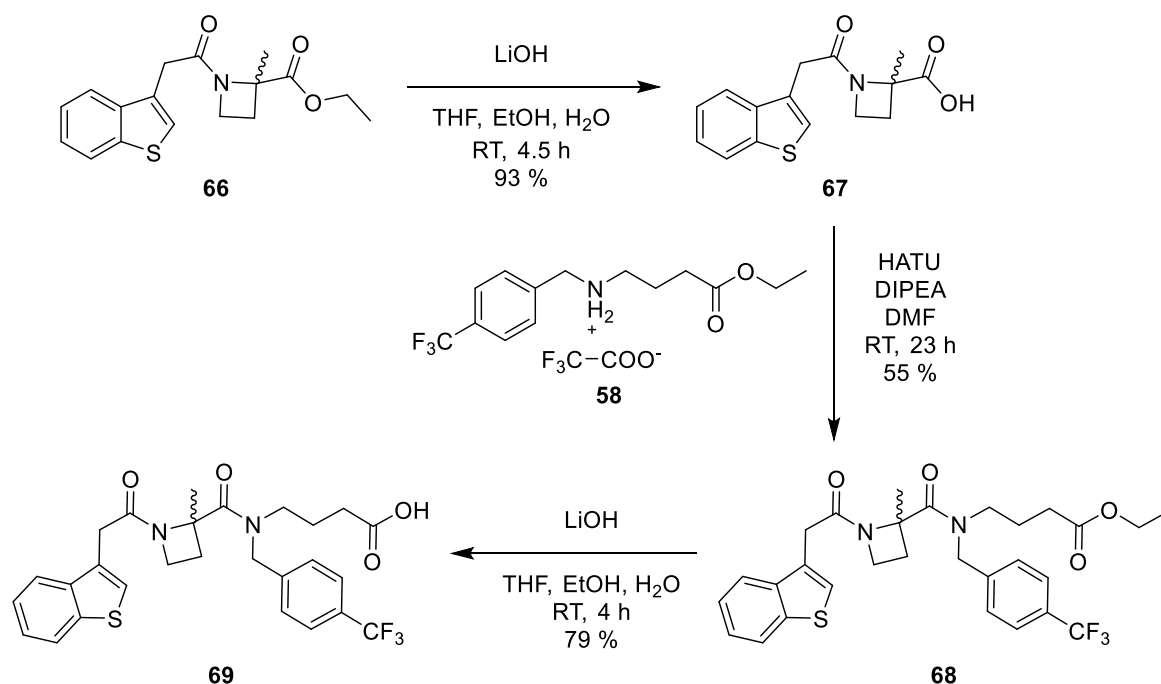


Schema 3: Reaktionsschritte 1 – 5 der Synthese des fluoreszenzmarkierten FFAR2-Liganden **47**.

Im nächsten Schritt wurde Verbindung **63** mithilfe der Base KHMDS in α -Position zum Ester deprotoniert, wodurch es zu einer intramolekularen Cyclisierung und dem Aufbau des Azetidin-Strukturmotivs kam. Anschließend wurde die Benzyl-Schutzgruppe hydrogenolytisch entfernt, um das ungeschützte Azetidin **65** zu erhalten. Dieses Zwischenprodukt wurde ohne Reinigung zunächst mit Benzothiophen-3-essigsäure und dem Kupplungsreagenz EDC•HCl analog der Arbeit von PIZZONERO *et al.* umgesetzt, was jedoch zu keiner Produktbildung führte.²²⁵

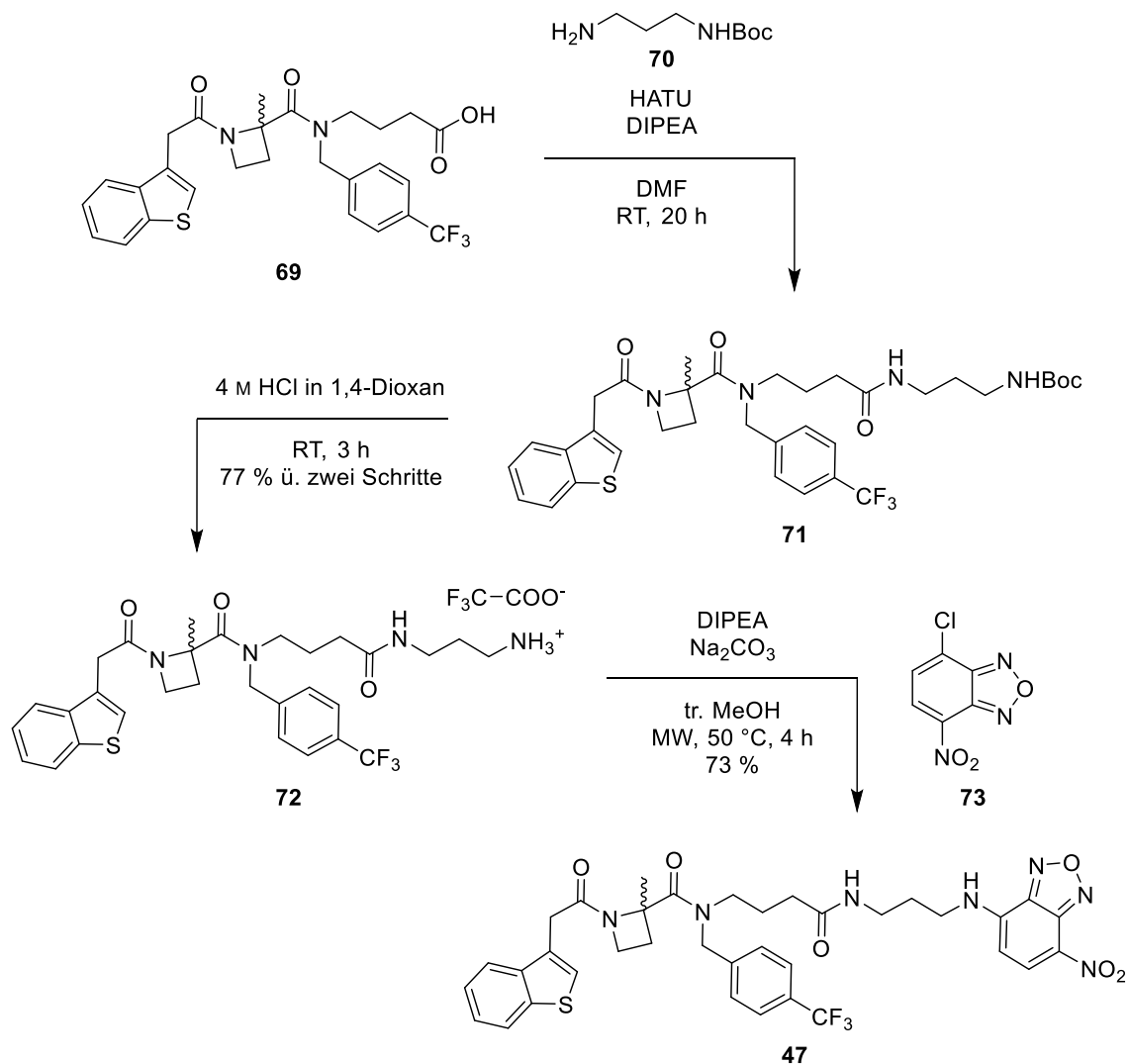
Daraufhin wurde die Amidkupplung erneut durchgeführt, wobei als Alternative das Kupplungsreagenz HATU verwendet wurde. Durch diese Substitution konnte das gewünschte Amid **66** in einer Ausbeute von 53 % nach Reinigung mittels präparativer HPLC erhalten werden.

Im nächsten Schritt wurde der Ethylester **66** unter Verwendung von LiOH basisch hydrolysiert (**Schema 4**).²⁶¹ Die entstandene Säure **67** wurde erneut mit dem Kupplungsreagenz HATU und dem zuvor dargestellten Edukt **58** (**Schema 2**) zum Amid **68** umgesetzt. Anschließend wurde der Ethylester **68** unter basischen Bedingungen entschützt und das Zwischenprodukt **69** isoliert.



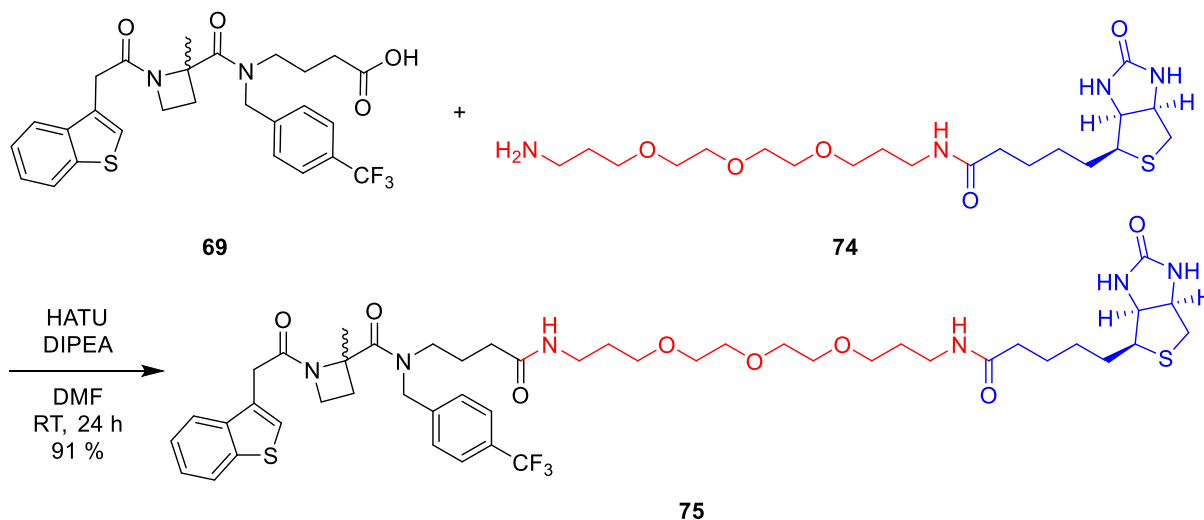
Schema 4: Reaktionsschritte 6 – 8 der Synthese des fluoreszenzmarkierten FFAR2-Liganden **47**.

Im Anschluss wurde die Carbonsäure **69** mit dem einfach Boc-geschützten Diaminopropan **70** mittels HATU verknüpft (**Schema 5**). Nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe vom Intermediat **71** mit 4 M HCl in 1,4-Dioxan wurde das freie Amin **72** erhalten, das mittels präparativer HPLC gereinigt wurde. Im letzten Schritt wurde das primäre Amin **72** in einer nukleophilen aromatischen Substitution mit NBD-Cl **73** in einer Mikrowellenreaktion unter basischen Bedingungen umgesetzt. Der daraus erhaltene fluoreszenzmarkierte FFAR2-Ligand **47** konnte nach Reinigung mittels präparativer HPLC mit einer Gesamtausbeute von etwa 5 % in der 11-stufigen Totalsynthese für die Arbeitsgruppe DÖTSCH/BERNHARD nachsynthetisiert werden.



Schema 5: Darstellung der finalen Reaktionsschritte 9 – 11 zur Synthese des fluoreszenzmarkierten FFAR2-Liganden 47.

Wie eingangs erwähnt, sollte neben dem Liganden 47 ein biotinylierter FFAR2-Ligand synthetisiert werden. Als Ausgangsverbindung diente das Zwischenprodukt 69, das mit einem IC₅₀-Wert von 57 nM ein wirksamer FFAR2-Antagonist ist.²²⁵ Dieses wurde direkt mit dem biotinylierten TOTA-Linker 74 in einer einstufigen Synthese zu Verbindung 75 gekuppelt (**Schema 6**). Nach Reinigung mittels präparativer HPLC wurde das biotinylierte Produkt 75 in einer Ausbeute von 91 % erhalten und der Arbeitsgruppe DÖTSCH/BERNHARD zur Proteinreinigung des FFAR2 zur Verfügung gestellt.



Schema 6: Synthese des FFAR2-Liganden **75** durch Kupplung des Intermediates **69** mit dem biotinylierten TOTA **74**. Der TOTA-Linker ist in Rot und Biotin in Blau dargestellt.

3.3 Dockingstudien an den GLUE-Rezeptoren

Zur Identifikation möglicher allosterischer Liganden wurden von MARGHERITA PERSECHINO und JANIK HEDDERICH aus der Arbeitsgruppe KOLB weitreichende computergestützte Untersuchungen an GPCRs und speziell an den ausgewählten Rezeptoren des GLUE-Projekts durchgeführt. Dabei wurden unter anderem neue mögliche allosterische Bindetaschen identifiziert, die bereits in **Kapitel 1.5** beschrieben wurden. Mithilfe von erstellten Homologiemodellen des ET_BR, FFAR2, FFAR3 und des GPRC5b wurden von MARGHERITA PERSECHINO Dockingstudien an unterschiedlichen Bindetaschen mit der ZINC- und SCUBIDOO-Moleküldatenbank erstellt, wobei bei Letzterer die Moleküle aus kommerziell erhältlichen Fragmenten mittels Standardreaktionen virtuell generiert wurden.^{262,263} Aus diesen Dockingstudien wurden potentielle allosterisch-bindende Strukturen zur Synthese ausgewählt. Die Auswahl der Moleküle beruhte auf der Bindungspose, den Wechselwirkungen zwischen Docking-Hit und Rezeptor und des daraus resultierenden *Energy Scores*. Darüber hinaus wurden der Zeitaufwand zur Synthese (“Synthetisierbarkeit“) der Docking-Hits und die Bewertung der Dockingpose (durch die Arbeitsgruppe KOLB) als Auswahlkriterien mit einbezogen. Im Anschluss an die Synthese und der analytischen Charakterisierung wurden die Verbindungen von KATHARINA BECKER und UURTUYA HOCHBAN aus der Arbeitsgruppe BÜNEMANN *in vitro* an den jeweiligen Zielrezeptoren untersucht. Dabei wurden Förster-Resonanzenergietransfer- (FRET) basierte G-Protein-Bindungs- und Rezeptorsensor-Assays zur Bestimmung der biologischen Aktivität durchgeführt (**Kapitel 5.1.8**).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden potentielle Liganden aus fünf unterschiedlichen Dockingstudien synthetisiert, die in den folgenden Kapiteln beschrieben werden. In diesen wird

3.3.1 Erste Dockingstudie an der G-Protein-Bindetasche des ET_BR

näher auf das Homologiemodell, die gedockten Moleküldatenbanken, Bindungsstellen, die Syntheseplanung sowie die eigentliche Synthese und biologische Charakterisierung eingegangen.

3.3.1 Erste Dockingstudie an der G-Protein-Bindetasche des ET_BR

Die erste Studie befasste sich mit Molekülen aus der computergenerierten SCUBIDOO-Datenbank, die in die G-Proteinbindetasche des Homologiemodells der aktiven ET_BR-Struktur gedockt wurden (**Abbildung 31A**).²⁶³ Aus den möglichen Docking-Hits wurden die vielversprechenden Verbindungen **76** und **77** für die Synthese ausgewählt (**Abbildung 31D**).

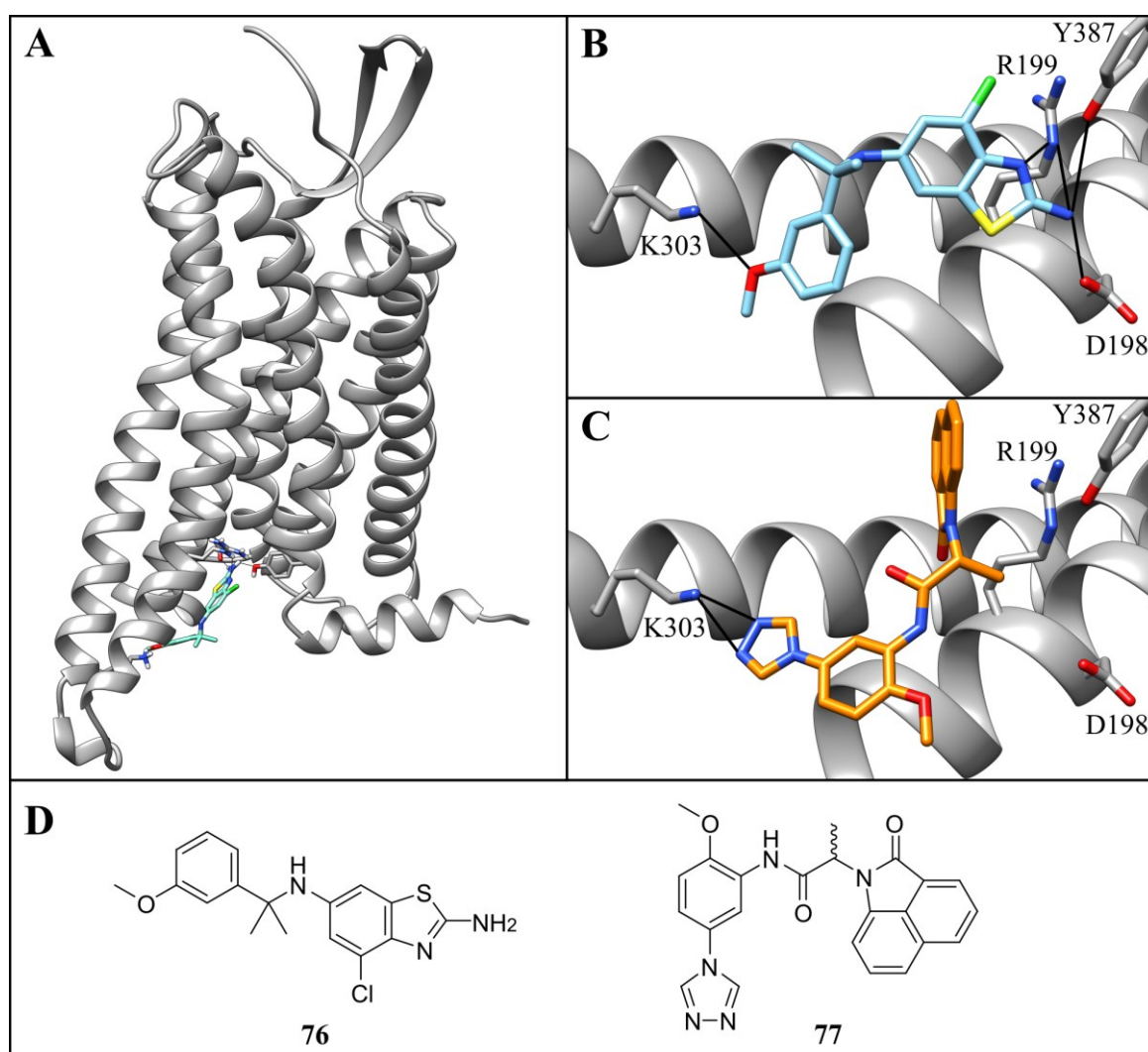


Abbildung 31: ET_BR-Homologiemodell und Strukturen der Verbindungen **76** und **77**, die in die G-Protein-Bindetasche gedockt wurden. In Bild **A** ist ein Überblick des ET_BR-Homologiemodells mit den wechselwirkenden Aminosäuren (graue Sticks) und der Verbindung **76** (hellblau) abgebildet. Die Dockingposen der Verbindungen **76** (hellblau) und **77** (orange) in der G-Protein-Bindetasche sind in Bild **B** bzw. **C** gezeigt, die Strukturformeln in Bild **D**. Die Wasserstoffbrückenbindungen sind als schwarze Striche dargestellt.

In der zugrundeliegenden Dockingpose bindet das Benzothiazol-Derivat **76** über fünf Wasserstoffbrückenbindungen an die G-Protein-Bindetasche des ET_BR (**Abbildung 31B**). Speziell das Aminobenzothiazol-Motiv ist an vier der fünf Wasserstoffbrückenbindungen mit D198, R199 und Y387 beteiligt. Darüber hinaus wurde eine weitere Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Methoxygruppe und der Seitenkette des K303 gefunden, wodurch sowohl die Aminobenzothiazol-Kopfgruppe des Liganden als auch der terminale Phenylring auf der anderen Seite des Moleküls die Bindung in der G-Protein-Bindetasche stabilisieren sollten. Im Falle des Docking-Hits **77** kommt es zur Ausbildung von zwei Wasserstoffbrückenbindungen zur Seitenkette des K303 und möglicherweise zusätzlich zu einer Kation- π -Wechselwirkung zwischen dem Naphtholactam-Motiv und der Guanidinogruppe des R199 (**Abbildung 31C**).

3.3.1.1 Synthese der Derivate des Docking-Hits **76**

Um ein synthetisch einfacher zugängliches Derivat der Verbindung **76** zu erhalten, wurden dessen Chloratom und die beiden Methylgruppen (rot markiert) durch Wasserstoff-Atome ersetzt (**Abbildung 32**). Dabei wurde darauf geachtet, dass für die substituierten Motive keine relevanten Wechselwirkungen mit dem Rezeptor in dem Docking bestimmt wurden.

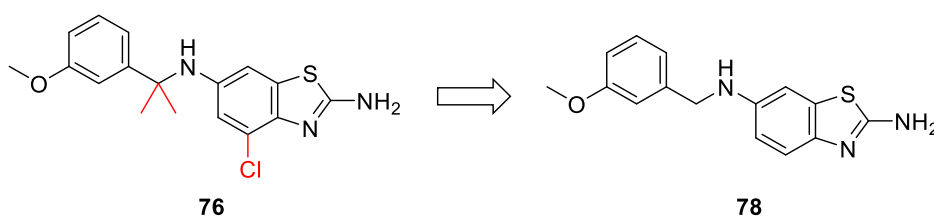


Abbildung 32: Die rot markierten Gruppen des Docking-Hits **76** wurden durch Wasserstoff-Atome substituiert, um somit die synthetisch einfacher zugänglichere Verbindung **78** zu erhalten.

Als Edukt für die Synthese der Verbindung **78** diente das kommerziell erworbene 2-Amino-6-nitrobenzothiazol **79**. Im ersten Schritt wurde die Aminogruppe mit Boc₂O geschützt, um im Folgenden nach der Reduktion der Nitrogruppe eine selektive reduktive Aminierung zu ermöglichen. Die Einführung der Boc-Schutzgruppe wurde im ersten Ansatz mit NaOH in 1,4-Dioxan/H₂O (2:1, v/v) versucht, was zu keiner Produktbildung führte (**Tabelle 6**, Eintrag 1). Auch der Austausch des Lösungsmittels gegen EtOH führte zu keinem Erfolg (**Tabelle 6**, Eintrag 2). Erst der Zusatz von 0.5 eq 4-DMAP als Katalysator und die Verwendung von DMF als Lösungsmittel führte zu einer erfolgreichen Darstellung der Boc-geschützten Verbindung **80** (**Tabelle 6**, Eintrag 3).

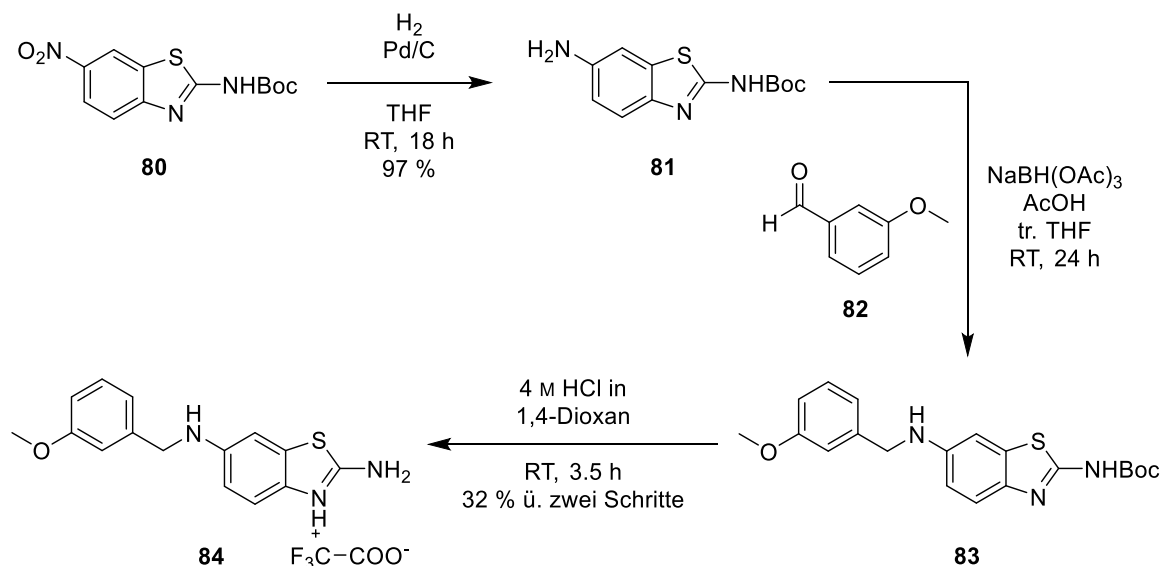
3.3.1 Erste Dockingstudie an der G-Protein-Bindetasche des ET_BR

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Reaktionsbedingungen zur Einführung der Boc-Schutzgruppe an das 2-Amino-6-nitrobenzothiazol **79**.

79 $\xrightarrow{\text{Reaktionsbedingungen}}$ 80

Eintrag	Edukte	Lösungsmittel	Bedingungen	Ausbeute
1	Boc ₂ O, NaOH	1,4-Dioxan/H ₂ O (2:1, v/v)	0 °C → RT, 4.5 h	-
2	Boc ₂ O	EtOH	RT, 22 h	-
3	Boc ₂ O, 4-DMAP	DMF	90 °C, 1 h	80 %

Anschließend wurde die Nitrogruppe unter H₂-Atmosphäre mit Pd/C als Katalysator zum Amin **81** reduziert (**Schema 7**). Durch das transiente Schützen der Aminogruppe in 2-Position wurde nun eine selektive Reaktion der Aminogruppe in 6-Position mit dem Benzaldehyd **82** ermöglicht. Dabei wurde das milde Reduktionsmittel NaBH(OAc)₃ verwendet, um das sekundäre Amin **83** in einer reduktiven Aminierung zu erhalten. Das Rohprodukt **83** wurde ohne vorherige Reinigung im letzten Schritt mit 4 M HCl in 1,4-Dioxan behandelt, um die Boc-Schutzgruppe zu entfernen. Nach Reinigung mittels präparativer HPLC konnte das gewünschte Produkt **84** als TFA-Salz in einer Ausbeute von 32 % über zwei Schritte erhalten werden.



Schema 7: Synthese der Verbindung **84** ausgehend von dem Boc-geschützten 2-Amino-6-nitrobenzothiazol **80**.

Außerdem wurden weitere Derivate des Produkts **84** dargestellt, um eine größere strukturelle Vielfalt zu erhalten und die Chance auf eine biologisch aktive Verbindung zu erhöhen. Dabei wurde die Aminobenzothiazol-Struktur aufgrund der zahlreichen Wechselwirkungen im

Docking beibehalten und das 3-Methoxyphenyl-Motiv durch Substitutionen variiert. Zur Synthese dieser Derivate wurden entsprechend substituierte Benzaldehyde genutzt und diese in gleicher Weise wie der 3-Methoxybenzaldehyd **82** in Form einer reduktiven Aminierung eingeführt und anschließend analog entschützt. Bei der Entschützung des Dimethoxy-Derivats **87** konnte nach einer erhöhten Reaktionszeit von 48 Stunden mit 4 M HCl in 1,4-Dioxan nur ein etwa 1:4 Produkt/Edukt-Verhältnis mittels analytischer HPLC bestimmt werden. Infolgedessen wurde die Entschützung mit 33% HBr in AcOH erneut durchgeführt, was zu einer vergleichbaren Ausbeute von 34 % in einer verkürzten Reaktionszeit von 1.5 Stunden führte. Aufgrund dieser Tatsache wurde die Boc-Entschützung für die folgenden Derivate (**85-89**) mit diesen optimierten Bedingungen durchgeführt (**Abbildung 33**).

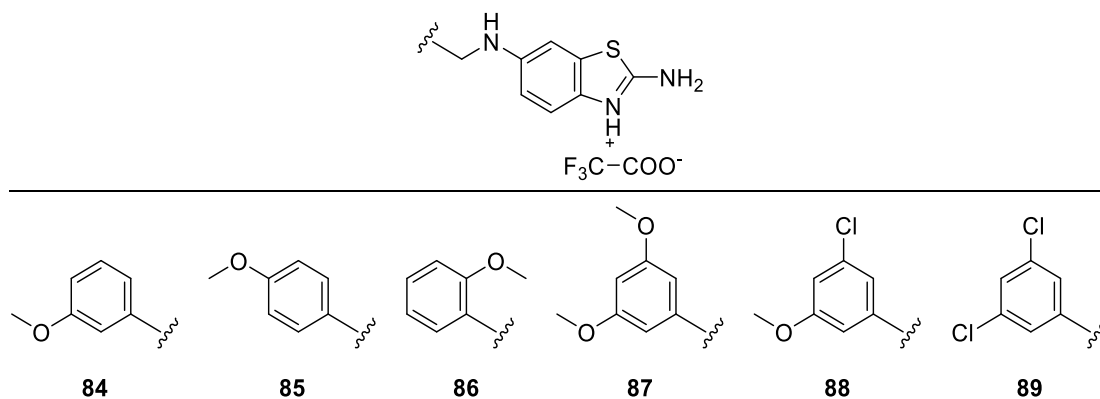
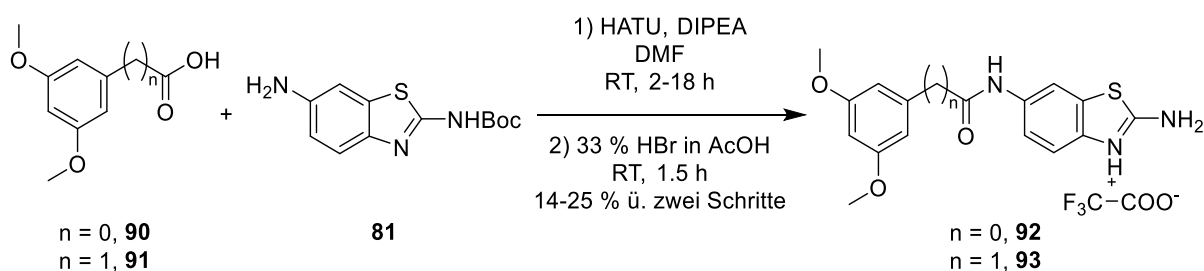


Abbildung 33: Struktur des Liganden **84** und der Derivate **85-89**.

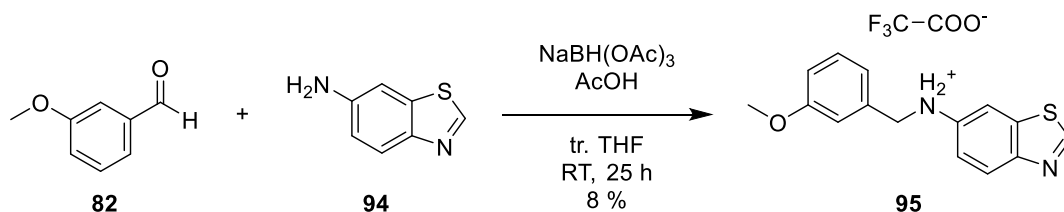
Darüber hinaus wurde das Linker-Segment zwischen den aromatischen Resten durch eine Amidbindung substituiert. Dafür wurde statt einer reduktiven Aminierung eine Amidkupplung mit dem Benzoesäure-Derivat **90** bzw. dem Phenyllessigsäure-Derivat **91** und dem Zwischenprodukt **81** unter Verwendung von HATU und DIPEA durchgeführt. Anschließend wurden die erhaltenen Amide mit 33 % HBr in AcOH entschützt und mittels präparativer HPLC gereinigt (**Schema 8**).



Schema 8: Synthese der Derivate **92** und **93**, die eine Amidbindung als Linker-Segment aufweisen.

3.3.1 Erste Dockingstudie an der G-Protein-Bindetasche des ET_BR

Zusätzlich sollte die Funktion der vermeintlich wichtigen Aminogruppe des Benzothiazols untersucht werden. Dafür wurde das Derivat **95** in einer einstufigen Synthese aus 6-Aminobenzothiazol **94** und dem Benzaldehyd **82** in einer reduktiven Aminierung dargestellt (**Schema 9**).

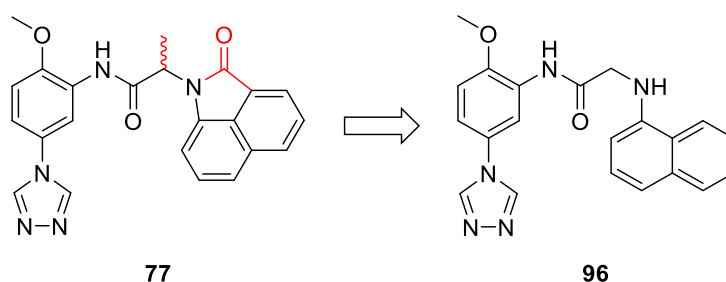


Schema 9: Reduktive Aminierung des Benzaldehyds **82** mit 6-Aminobenzothiazol **94** zum Produkt **95**, das keine Aminogruppe am Benzothiazol besitzt.

Somit konnten auf Grundlage des Docking-Hits **76** das leicht modifizierte Derivat **84** und davon ausgehend 8 weitere Derivate (**85-89**, **92**, **93** und **95**) synthetisiert werden, die anschließend von KATHARINA BECKER und UURTUYA HOCHBAN aus der Arbeitsgruppe BÜNEMANN *in vitro* an dem ET_BR und zusätzlich an dem FFAR3 getestet wurden (**Kapitel 3.3.1.3**).

3.3.1.2 Synthese der Derivate des Docking-Hits **77**

Bei dem Docking-Hit **77** wurde zur Vereinfachung der Synthese die Methylgruppe, die zur Chiralität der Verbindung **77** führt, entfernt und das Naphtholactam-Motiv durch einen 1-Naphthylamin-Rest ersetzt (**Schema 10**).

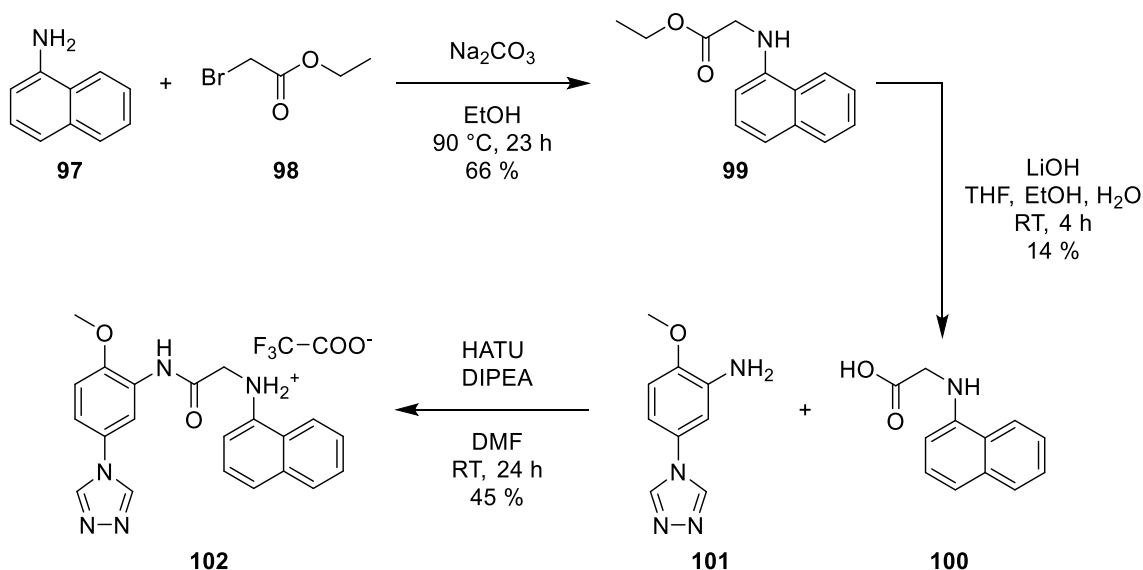


Schema 10: Struktur des Docking-Hits **77**, der an den rot markierten Gruppen verändert wurde, um eine für die Synthese leichter zugänglichere Verbindung **96** zu erhalten.

Im ersten Schritt der Synthese wurde 1-Naphthylamin **97** mit Bromessigsäureethylester **98** in einer nukleophilen Substitution zum Zwischenprodukt **99** umgesetzt (**Schema 11**).

Im folgenden Schritt wurde dieses mit LiOH hydrolysiert, wodurch die freie Carbonsäure **100** isoliert werden konnte. Im letzten Schritt wurde das Zwischenprodukt **100** mit dem kommerziell erworbenen Anilin-Derivat **101** unter Verwendung von HATU und DIPEA zur

Zielverbindung **102** gekuppelt, die mittels präparativer HPLC gereinigt und als TFA-Salz in einer Ausbeute von 45 % erhalten wurde.



Schema 11: Synthese der Verbindung **102**, die als TFA-Salz isoliert wurde.

Basierend auf der Zielverbindung **102** wurden die zwei weiteren Derivate **103** und **104** synthetisiert, um den aromatischen Naphthylamin-Rest zu modifizieren, der laut Dockingpose eine Kation- π -Wechselwirkung mit R199 des ET_BR ausbilden könnte (**Abbildung 31**, **Abbildung 34**). Für das Derivat **103** wurde das kommerziell erworbene *N*-Phenylglycin analog zum Naphthylamin-Derivat **100** in **Schema 11** umgesetzt. Das Derivat **104** wurde ebenfalls analog zu **Schema 11** erhalten, wobei 2-Chloranilin anstatt des 1-Naphthylamins **97** als Edukt diente.

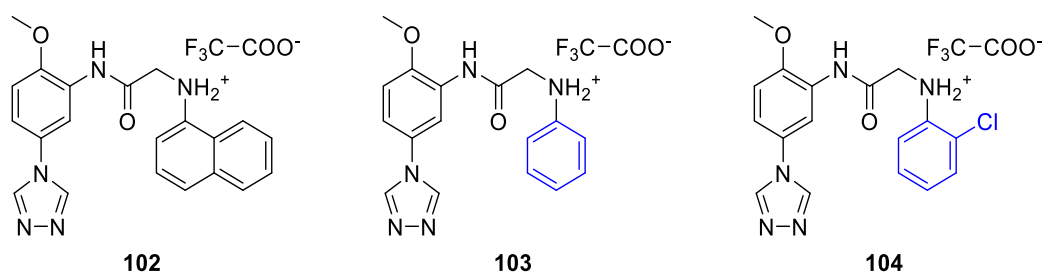


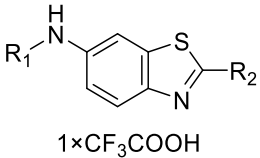
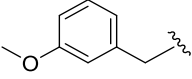
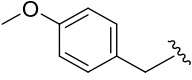
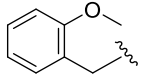
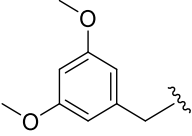
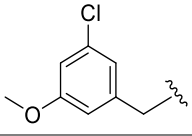
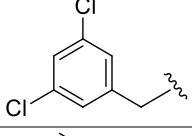
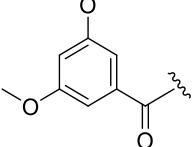
Abbildung 34: Strukturen der synthetisierten Verbindung **102** und deren Analoga **103** und **104**. In Blau sind die veränderten Strukturmodule dargestellt.

3.3.1.3 Biologische Charakterisierung

Im Anschluss wurde die biologische Aktivität der Derivate der Docking-Hits **76** und **77** durch KATHARINA BECKER und UURTUYA HOCHBAN aus der Arbeitsgruppe BÜNEMANN untersucht, die die Verbindungen in einer Konzentration von 100 µM am ET_BR mit einem FRET-basierten G-Protein-Bindungs- und Rezeptorsensor-Assay untersucht haben (**Kapitel 5.1.8**). Zusätzlich wurden die Verbindungen an dem zweiten GLUE-Target der Familie A, dem FFAR3, mit analogen Assays getestet. Dabei kam es zu gelegentlichen Artefakten durch Quenchingeffekte, wobei alle Verbindungen in den folgenden Tabellen bei nicht bestätigter Aktivität als inaktiv beschrieben wurden.

Ein Überblick der synthetisierten und *in vitro* getesteten Verbindungen ist in **Tabelle 7** und **Tabelle 8** gegeben.

Tabelle 7: Biologische Charakterisierung der Derivate des Docking-Hits **76** bei einer Konzentration von 100 µM.

				
Nr.	R ₁	R ₂	ET _B R	FFAR3
84		NH ₂	inaktiv ^{a,b}	inaktiv ^a
85		NH ₂	inaktiv ^{a,b}	i.A.
86		NH ₂	inaktiv ^{a,b}	i.A.
87		NH ₂	inaktiv ^{a,b}	inaktiv ^a
88		NH ₂	inaktiv ^{a,b}	i.A.
89		NH ₂	inaktiv ^{a,b}	i.A.
92		NH ₂	inaktiv ^{a,b}	i.A.

3.3.1 Erste Dockingstudie an der G-Protein-Bindetasche des ET_BR

93		NH ₂	inaktiv ^{a,b}	i.A.
95		H	inaktiv ^{a,b}	i.A.

^aG-Protein-Bindungs-Assay. ^bRezeptorsensor-Assay. i.A. = in Arbeit, biologische Testung ist geplant.

Für die Grundstruktur **84** konnte sowohl am ET_BR und am FFAR3 keine Aktivität festgestellt werden. Die Derivatisierung des 3-Methoxyphenyl-Motivs in den Verbindungen **85-89** führte ebenfalls zu inaktiven Strukturen. Gleiches gilt für die Amide **92** und **93** sowie für den Liganden **95** mit fehlender Aminogruppe. Daher wurden keine weiteren Analoga der Grundstruktur **84** synthetisiert.

Identische Ergebnisse wurden für die abgeleiteten Verbindungen **102**, **103** und **104** des Docking-Hits **77** festgestellt, die sich, sofern sie bestimmt wurden, an dem ET_BR und FFAR3 als inaktiv herausstellten (**Tabelle 8**). Demzufolge wurde der Fokus auf die nächste Dockingstudie gelegt.

Tabelle 8: Biologische Testung der Derivate des Docking-Hits **77** bei einer Konzentration von 100 µM.

Nr.	R	ET _B R	FFAR3
102		n.b.	inaktiv ^a
103		inaktiv ^{a,b}	i.A.
104		inaktiv ^{a,b}	i.A.

^aG-Protein-Bindungs-Assay. ^bRezeptorsensor-Assay. n.b. = nicht bestimmbar aufgrund schlechter Löslichkeit. i.A. = in Arbeit, biologische Testung ist geplant.

3.3.2 Zweite Dockingstudie an der G-Protein-Bindetasche des ET_BR

In der zweiten Studie wurden die Verbindungen der ZINC-Datenbank ebenfalls in die G-Protein-Bindetasche des Homologiemodells der aktiven ET_BR-Struktur gedockt.²⁶² Ausgehend von dieser Studie wurden die Verbindungen **105-107** zur Synthese ausgewählt, deren Strukturen in **Abbildung 35D** gezeigt sind.

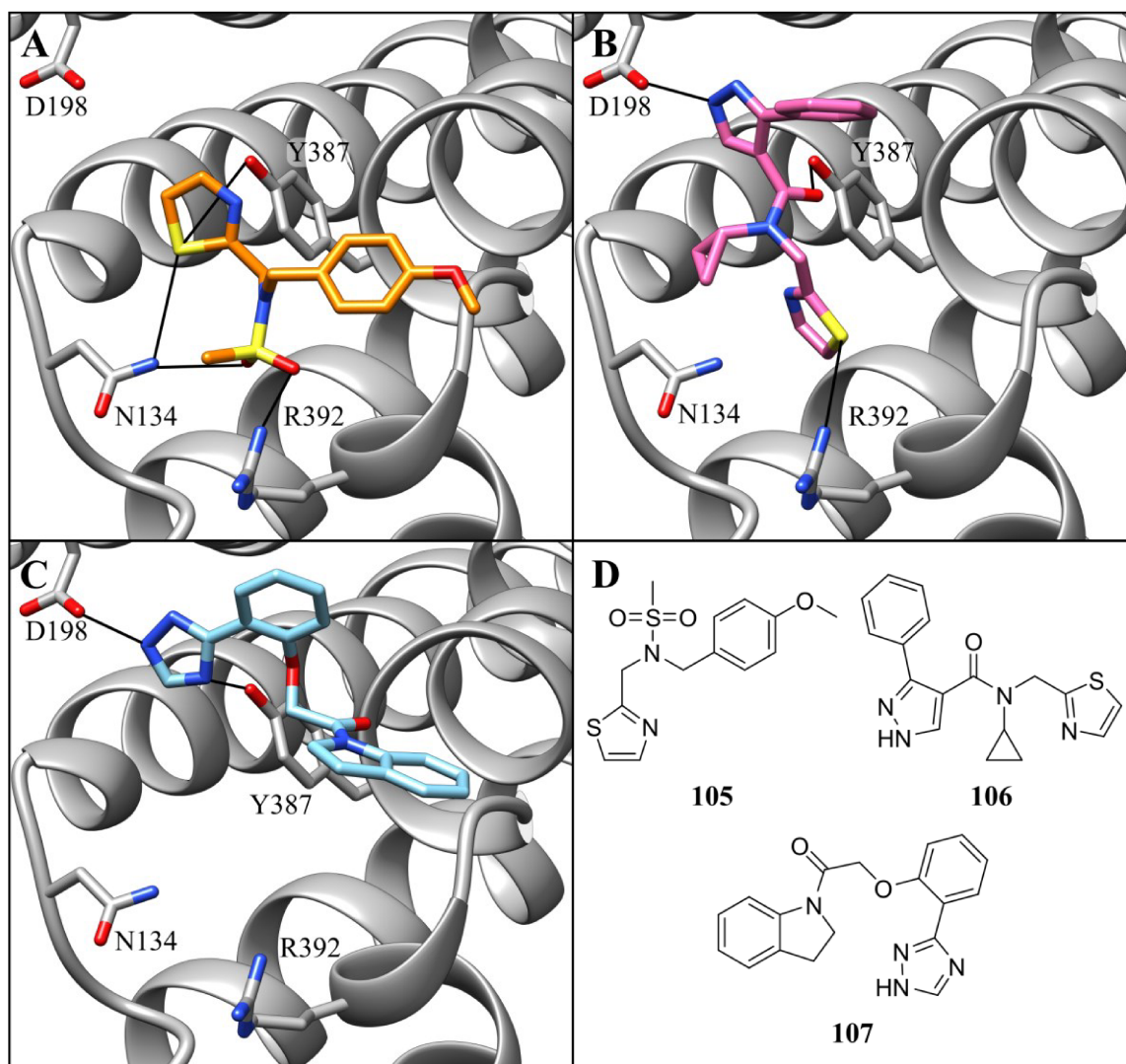


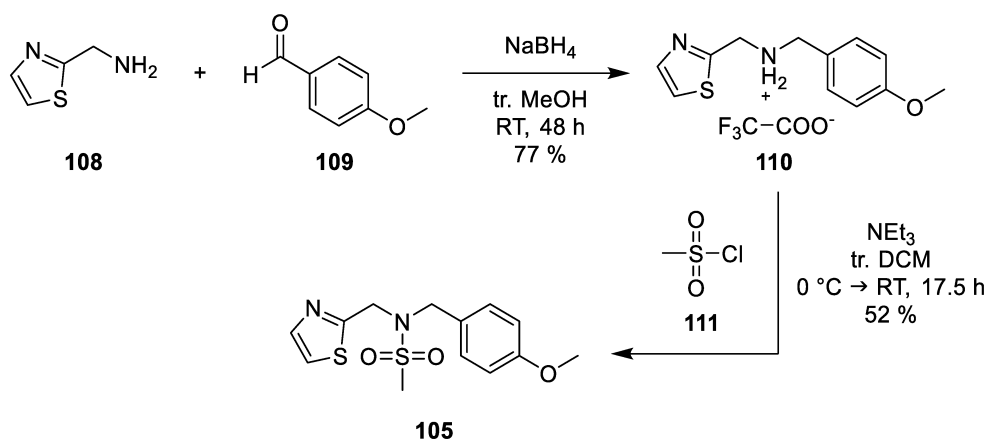
Abbildung 35: Dockingposen der Verbindungen **105** (A, orange), **106** (B, pink) und **107** (C, hellblau) in der G-Protein-Bindetasche des ET_BR-Homologiemodells. In Bild **D** sind die Strukturformeln der Verbindungen gezeigt. Die Wasserstoffbrückenbindungen sind als schwarze Striche dargestellt.

Bei dem Sulfonamid **105** wurden in der Dockingpose jeweils zwei Wasserstoffbrückenbindungen von dem Sulfonamid-Motiv zu N134 und R392 und vom Schwefel des Thiazols zu N134 und Y387 bestimmt (**Abbildung 35A**). Für Verbindung **106** wurden drei Wasserstoffbrückenbindungen von den Thiazol-, Amid- und Pyrazol-Strukturelementen zu den Aminosäuren R392, Y387 und D198 festgestellt, die das Molekül

beidseitig in der G-Proteinbindetasche stabilisieren (**Abbildung 35B**). Der dritte Docking-Hit **107** bildete zwei Wasserstoffbrückenbindungen über das Triazol-Motiv zu D198 und Y387 des ET_BR aus (**Abbildung 35C**).

3.3.2.1 Synthese und Derivatisierung des Docking-Hits **105**

Die Synthese des Docking-Hits **105** wurde ausgehend von Thiazol-2-ylmethanamin **108** gestartet (**Schema 12**). Dieses wurde in einer reduktiven Aminierung mit dem Benzaldehyd **109** zum sekundären Amin **110** umgesetzt. Dabei wurde als Reduktionsmittel NaBH₄ und tr. MeOH mit dem Zusatz von 4 Å Molsieb verwendet, um die Rückreaktion durch Feuchtigkeitsausschluss zu minimieren. Nach präparativer Reinigung konnte das sekundäre Amin **110** in einer Ausbeute von 77 % isoliert werden. Im Anschluss wurde das Zwischenprodukt **110** mit Mesylchlorid **111** in Gegenwart der Hilfsbase NEt₃ zu dem Docking-Hit **105** umgesetzt, der nach Reinigung mittels präparativer HPLC in einer Ausbeute von 52 % erhalten wurde.



Schema 12: Synthese des Docking-Hits **105** über eine reduktive Aminierung und anschließender Umsetzung mit Mesylchlorid **111**.

Um weitere Analoga dieser Verbindung zu erhalten, wurde die Grundstruktur **105** an den drei in **Abbildung 36** farbig markierten Motiven verändert, wobei das Sulfonamid und der Schwefel im Thiazol aufgrund der Wechselwirkungen in der Dockingpose beibehalten wurden.

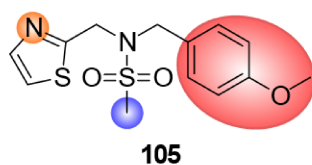
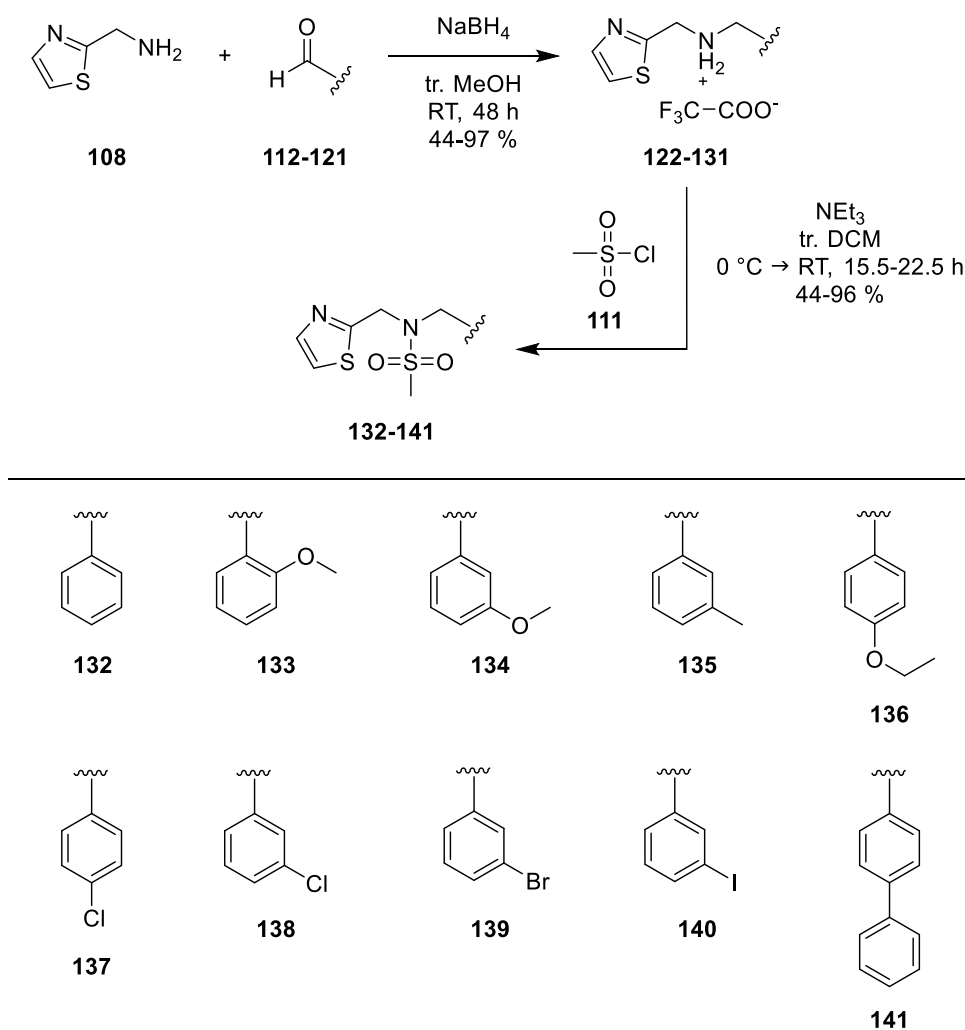


Abbildung 36: Durchgeführte Derivatisierungen des Docking-Hits **105** (farbig markiert).

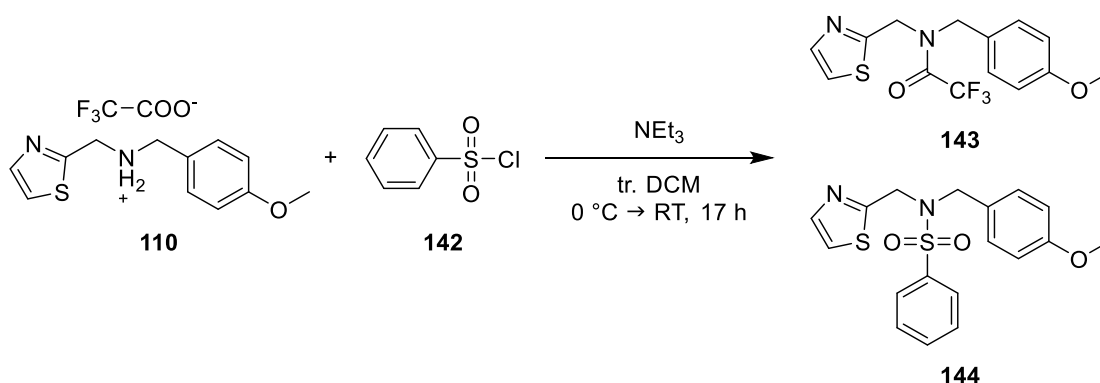
Für die Derivatisierung der 4-Methoxyphenyl-Gruppe wurde das Edukt **108** mit unterschiedlich substituierten Benzaldehyden (**112-121**) reaktiv alkyliert (**Schema 13**). Die erhaltenen Zwischenprodukte **122-131** wurden analog mit Mesylchlorid **111** zu den Sulfonamiden **132-141** umgesetzt. Dabei wurde das unsubstituierte Phenyl-Derivat **132** sowie das *ortho* und *meta*-Methoxy-Derivat (**133**, **134**) synthetisiert. Zusätzlich wurden Halogen-, Methyl-, Ethoxy- und Phenyl-substituierte Analoga (**135-141**) dargestellt, um ein breites Spektrum an Substituenten an der Phenylgruppe des Moleküls zu erhalten.



Schema 13: Allgemeiner Syntheseweg der Derivate **132-141**.

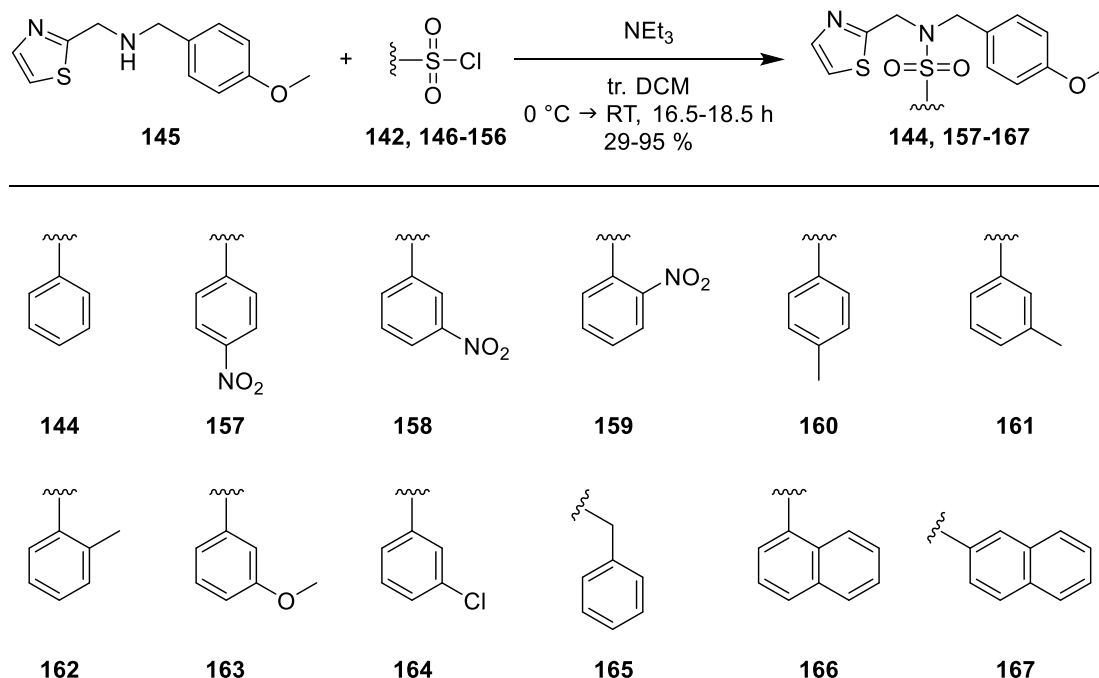
Im Anschluss wurde die Methylgruppe des Sulfonamids modifiziert. Dafür wurde das Zwischenprodukt **110** aus der Synthese der Grundstruktur **105** mit Benzensulfonylchlorid **142** umgesetzt (**Schema 14**). Dabei wurde neben dem Sulfonamid **144** das trifluoracetylierte Amid **143** als Nebenprodukt gebildet und massenspektrometrisch nachgewiesen, welches mittels gängiger Reinigungsmethoden nicht von dem gewünschten Produkt **144** getrennt werden konnte. Vermutlich wurde in der Reaktion ein gemischtes Anhydrid aus dem

Trifluoracetat-Anion der Verbindung **110** und Benzensulfonylchlorid **142** gebildet, das am Carbonylkohlenstoff nukleophil von dem sekundären Amin angegriffen wurde.



Schema 14: Darstellung des Sulfonamids **144**, bei der zusätzlich das trifluoracetylierte Nebenprodukt **143** gebildet wurde.

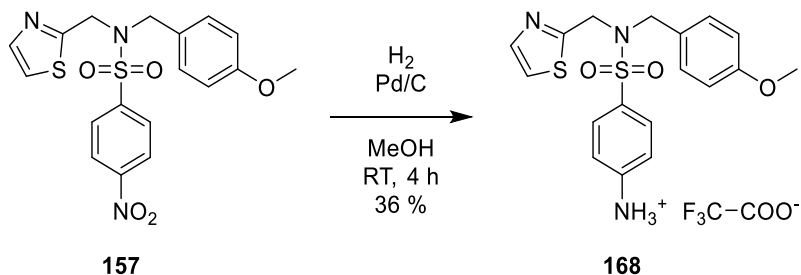
Aufgrund dieser Problematik wurde das Zwischenprodukt **110** in Ethylacetat gelöst und mit 1 M NaOH gewaschen, um die freie Base **145** zu erhalten. Diese wurde mit weiteren Sulfonylchloriden (**142**, **146-156**) umgesetzt, dabei wurden nur die gewünschten Produkte **144** und **157-167** erhalten und nicht das trifluoracetylierte Nebenprodukt **143** (**Schema 15**).



Schema 15: Darstellung der substituierten Sulfonamide **144** und **157-167**.

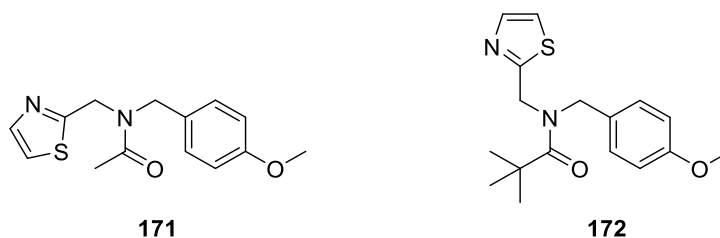
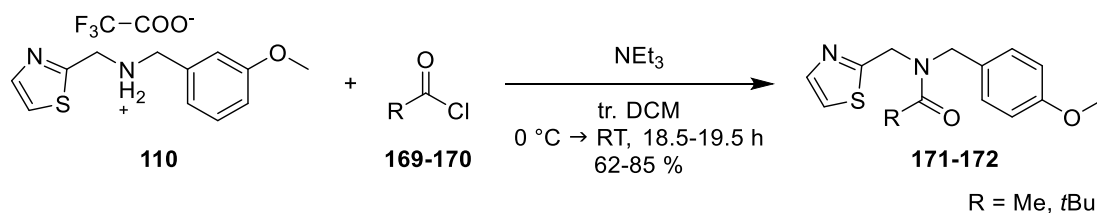
3.3.2 Zweite Dockingstudie an der G-Protein-Bindetasche des ET_BR

Für das Amin-Derivat **168** wurde das *para*-Nitro-substituierte Produkt **157** mit Pd/C als Katalysator in MeOH hydriert und nach Reinigung mittels präparativer HPLC in einer Ausbeute von 36 % isoliert (**Schema 16**).



Schema 16: Reduktion der Nitro-Verbindung **157** zum Amin **168**.

Als weitere Derivatisierung der Grundstruktur **105** wurde das Sulfonamid durch ein Carbonsäureamid ersetzt. Dabei wurden die zwei Carbonsäureamide (**171-172**) unter analogen Bedingungen aus dem Zwischenprodukt **110** und den Carbonsäurechloriden (**169-170**) dargestellt (**Schema 17**).



Schema 17: Darstellung der Carbonsäureamide **171** und **172**.

Bei der Reinigung der Verbindung **171** wurde in der ¹H- und ¹³C-NMR-Charakterisierung ein doppelter Datensatz an Signalen festgestellt, was auf eine Mischung aus Konformationsisomeren hindeuten könnte (**Abbildung 37**).

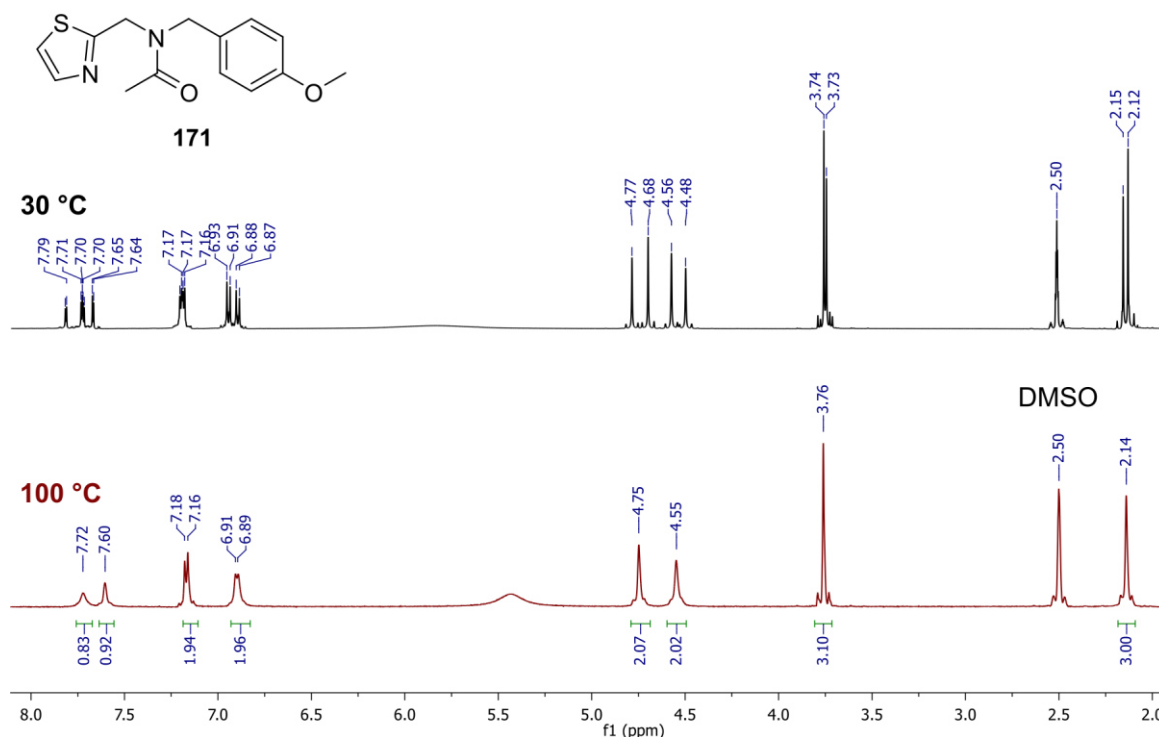
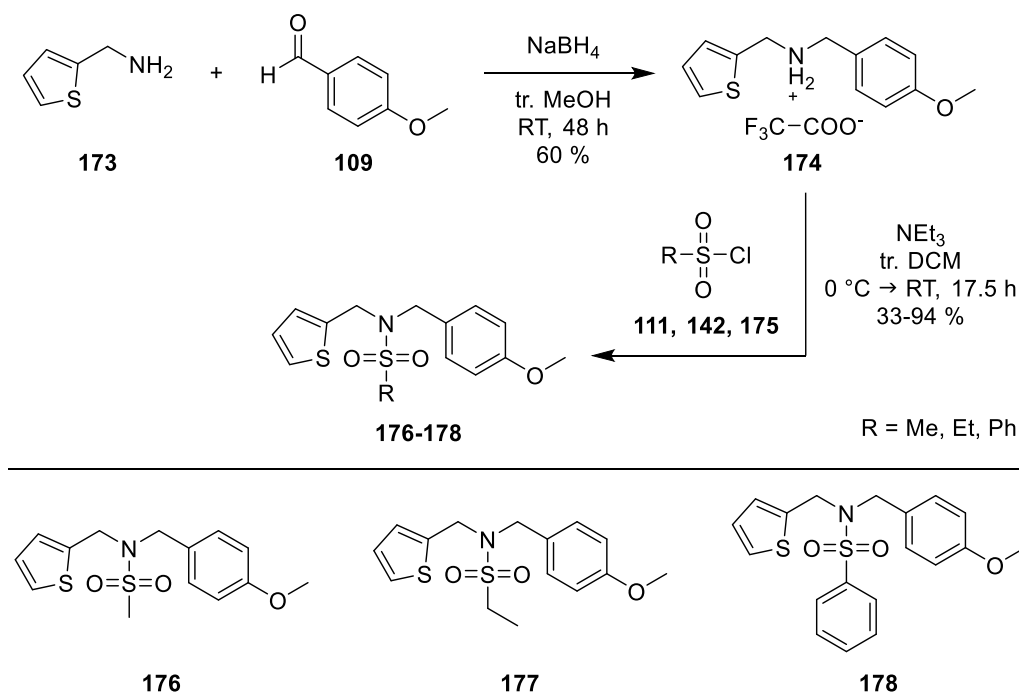


Abbildung 37: ¹H-NMR-Spektren der Verbindung **171**, die bei 30 °C (oben) und 100 °C (unten) gemessen wurde. Der doppelte Datensatz an Signalen aus dem NMR-Spektrum bei 30 °C vereint sich bei 100 °C zu einem einzelnen Datensatz.

Bei einer erneuten ¹H-NMR-Messung mit erhöhter Temperatur (standardmäßig bei DMSO 30 °C; erneut bei 100 °C) wurde eine Verschiebung der Signale festgestellt, aus der ein einzelner Datensatz an Signalen resultierte und somit die Vermutung der Konformationsisomere bestätigte. Es könnte sich dabei um ein Gemisch aus *cis*- und *trans*-Amid-Isomeren handeln, das man auch häufig im Falle prolinhaltiger Peptide beobachtet.²⁶⁴ Dieses Phänomen wurde lediglich für Verbindung **171** und nicht für das Pivaloyl-Derivat **172** beobachtet. Durch die sterisch anspruchsvolle Pivaloylgruppe bildet sich vermutlich nur die bevorzugte *trans*-Konformation der Verbindung **172**.

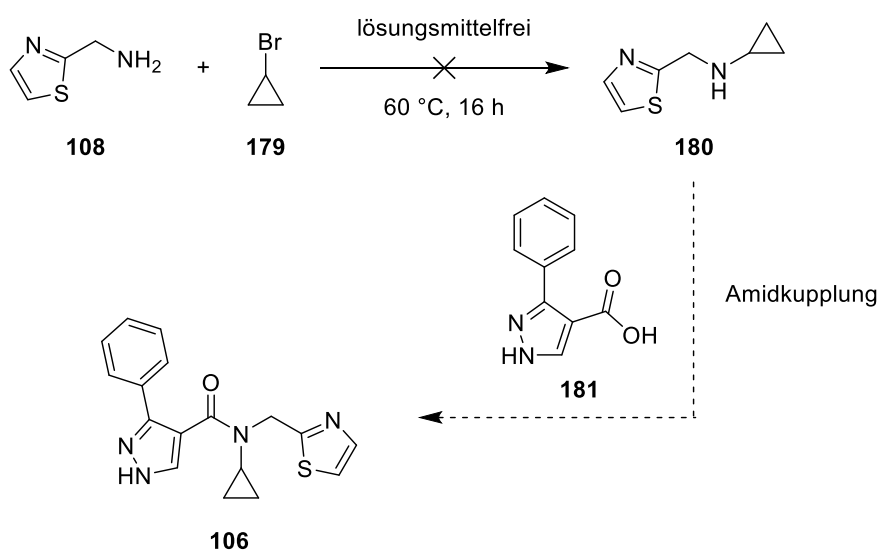
Für die dritte Modifizierung des Docking-Hits **105** wurde der Thiazol-Aromat durch ein Thiophen ersetzt, das in Form der Ausgangsverbindung **173** in analoger Weise eingeführt wurde, um das Derivat **176** zu erhalten (**Schema 18**). Darüber hinaus wurde das Zwischenprodukt **174** mit Ethan- und Benzensulfonylchlorid zu den Sulfonamiden **177** und **178** umgesetzt.



Schema 18: Synthese der Thiophen-Derivate 176-178.

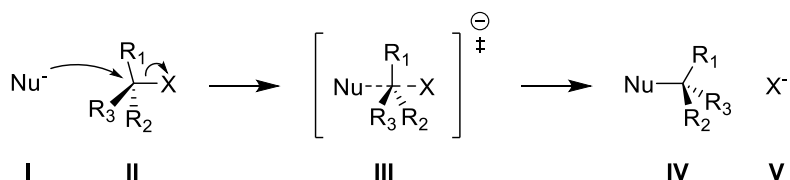
3.3.2.2 Synthese und Derivatisierung des Docking-Hits 106

Der Docking-Hit **106** sollte über eine nukleophile Substitution und anschließender Amidkupplung dargestellt werden (Schema 19). Dafür wurde das kommerziell erworbene Edukt **108** verwendet, das mit Cyclopropylbromid **179** in einer nukleophilen Substitution zu dem sekundären Amin **180** reagieren sollte.



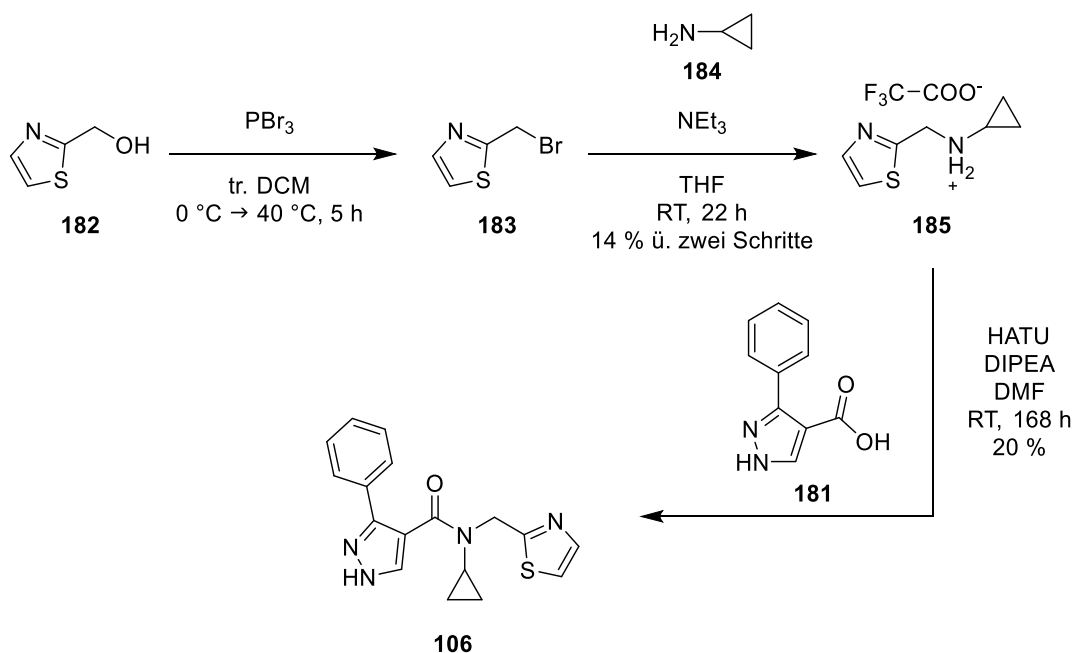
Schema 19: Ursprünglicher Synthesepfad der Verbindung **106**.

Jedoch konnte im 1. Reaktionsschritt nicht das gewünschte Intermediat **180** erhalten werden. Vermutlich scheiterte dieser Synthesepfad, da bei einer S_N2-Reaktion das sp³-Zentrum mit einem idealisierten Bindungswinkel von 109.5° in einen Übergangszustand mit einem trigonal-planaren sp²-Zentrum (Bindungswinkel von 120°) sowie dazu senkrecht stehender Abgangsgruppe und angreifendem Nukleophil überführt werden muss (**Schema 20**).^{265,266} Dies ist bei einem Cyclopropyl-Motiv aufgrund des Ringsystems bzw. der daraus resultierenden Ringspannung kaum möglich, da es zu einem enormen Anstieg der Aktivierungsenergie kommen würde.²⁶⁶ Dies führt zu einer stark verminderten Reaktionsgeschwindigkeit der nukleophilen Substitution des Cyclopropylbromids **179**, wodurch das Produkt **180** nicht nachgewiesen werden konnte.²⁶⁶



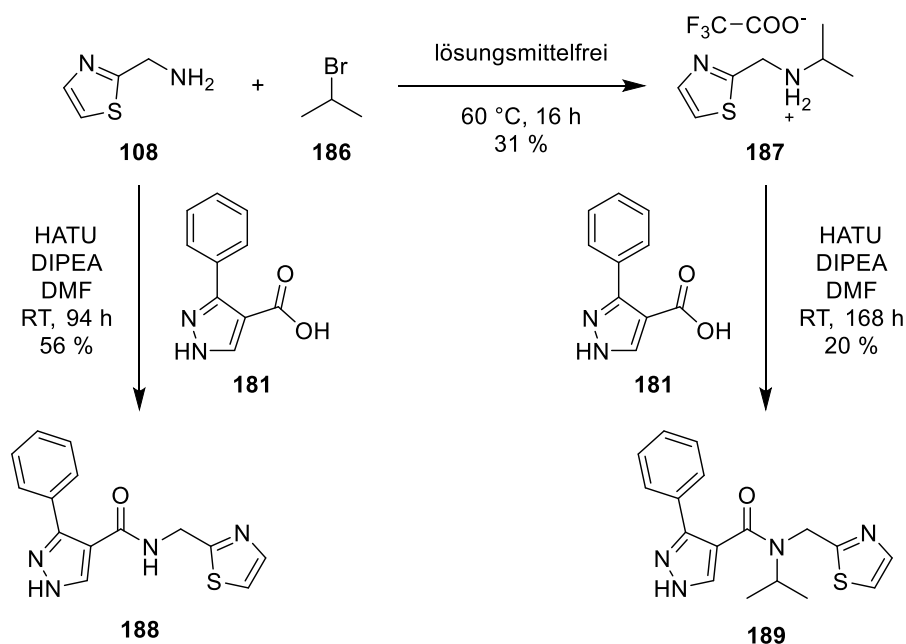
Schema 20: Allgemeiner Mechanismus der S_N2-Reaktion.^{265,266} Bei dem Übergangszustand **III** sollte ein Bindungswinkel von 120° zwischen R₁, R₂ und R₃ erreicht werden.

Aus diesem Grund wurde die Synthesestrategie umgestellt und das nukleophile und elektrophile Zentrum getauscht. Demzufolge sollte das Cyclopropylamin **184** als Nukleophil mit dem elektrophilen 2-(Brommethyl)thiazol **183** reagieren (**Schema 21**). Da Verbindung **183** nicht kommerziell erhältlich ist, wurde zuerst Thiazol-2-ylmethanol **182** mit PBr₃ in das Bromid überführt. Da sich das erhaltene Zwischenprodukt **183** in Lösung relativ rasch zersetzt, konnte diese Verbindung lediglich mittels Massenspektrometrie charakterisiert werden und musste direkt im Anschluss an diese Reaktion mit dem Cyclopropylamin **184** umgesetzt werden. Das dabei gebildete Zwischenprodukt **185** wurde nach Reinigung mittels präparativer HPLC in einer Ausbeute von 14 % über zwei Schritte isoliert. Für den Erhalt der Zielverbindung **106** wurde das sekundäre Amin **185** mittels HATU mit der kommerziell erworbenen 3-Phenyl-1*H*-pyrazol-4-carbonsäure **181** verknüpft.



Schema 21: Synthese des Docking-Hits **106**.

Da die Verbindung **106** in der Dockingpose über den Carbonyl-Sauerstoff der Amidbindung, das Thiazol und das Pyrazol Wasserstoffbrückenbindungen mit dem ET_BR ausbildet (**Abbildung 35B**), wurden diese Motive für die folgende Derivatisierung beibehalten und der Cyclopropyl-Substituent der Amidbindung modifiziert. Dabei wurden die zwei Derivate **188** und **189** hergestellt. Das unsubstituierte Derivat **188** konnte in einem Schritt aus den Edukten **108** und **181** unter analogen HATU-Bedingungen dargestellt werden (**Schema 22**). Die zweite Verbindung **189** wurde analog der ursprünglich geplanten Darstellung ausgehend von Thiazol-2-ylmethanamin **108** synthetisiert (**Schema 19** und **Schema 22**). Dabei wurden im ersten Schritt die flüssig vorliegenden Edukte **108** und **186** unter lösungsmittelfreien Bedingungen bei 60 °C für 16 Stunden gerührt (**Schema 22**).²⁶⁷ Im Anschluss an die Reinigung mittels präparativer HPLC wurde das Zwischenprodukt **187** im folgenden Schritt ebenfalls mit der Carbonsäure **181** gekuppelt, wodurch das Isopropyl-Derivat **189** erhalten wurde.



Schema 22: Darstellung des unsubstituierten Amids **188** und des Isopropyl-Derivats **189**.

3.3.2.3 Synthese und Derivatisierung des Docking-Hits **107**

Für die Synthese des dritten Docking-Hits **107** wurde im ersten Schritt Indolin **190** mit Bromacetylchlorid **191** umgesetzt (**Schema 23**). Nach einer Reaktionszeit von 3 Stunden wurde bei der Reaktionskontrolle mittels analytischer HPLC keine saubere Produktbildung, sondern ein Gemisch von zwei Verbindungen mit Retentionszeiten von 27.6 min und 28.8 min festgestellt (**Abbildung 38**).

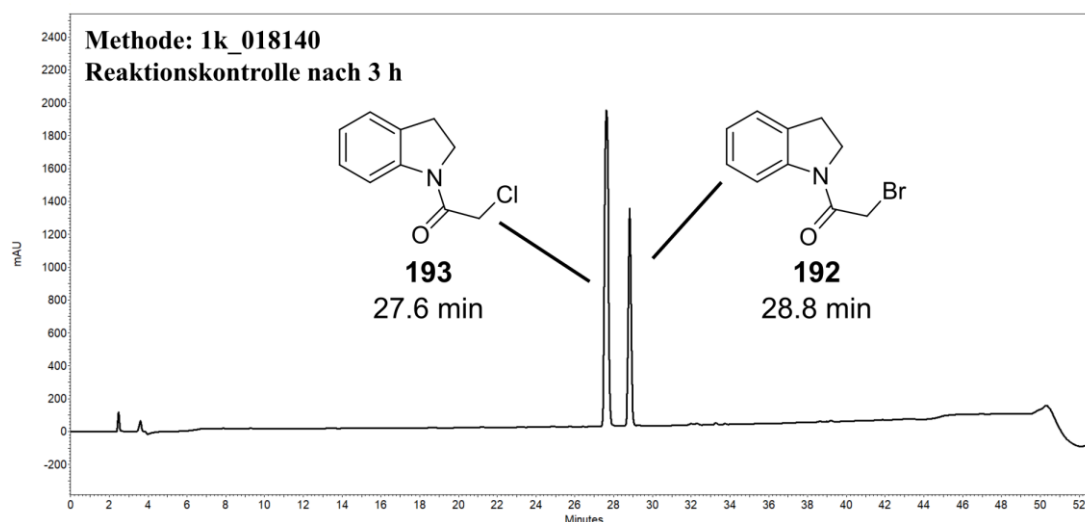
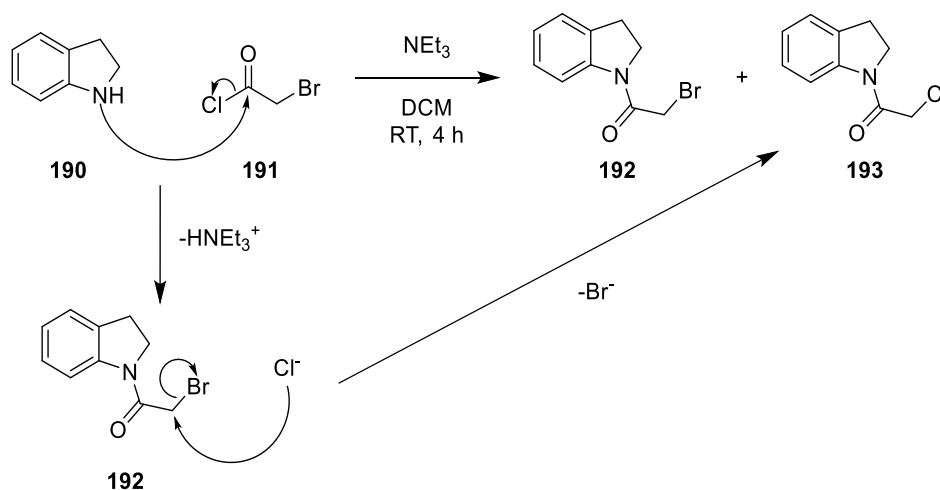


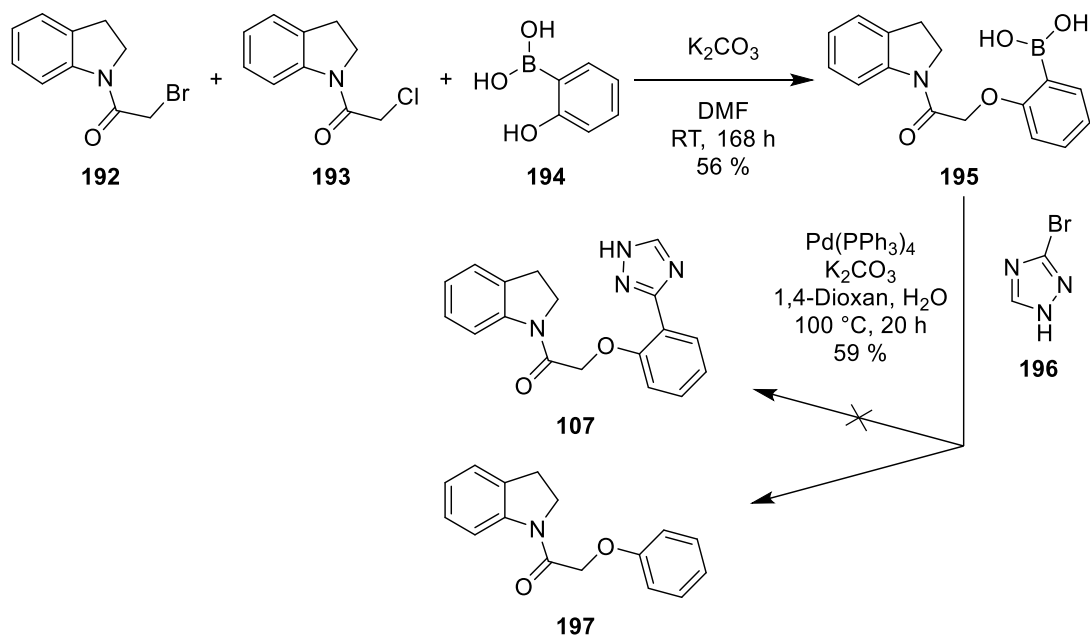
Abbildung 38: Reaktionskontrolle der Reaktion zwischen Indolin **190** und Bromoacetylchlorid **191** mittels analytischer HPLC nach einer Reaktionszeit von 3 h. Dabei wurde ein Gemisch der Verbindung **193** (Retentionszeit: 27.6 min) und des bromierten Derivats **192** (Retentionszeit: 28.8 min) beobachtet.

Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt, beide Peaks voneinander getrennt und charakterisiert. Dabei erwies sich die Verbindung mit einer Retentionszeit von 28.8 min als das gewünschte Produkt **192**. Das Nebenprodukt mit einer Retentionszeit von 27.6 min wurde ebenfalls charakterisiert, da dieses in ungefähr doppelter Stoffmenge im Vergleich zur Verbindung **192** gebildet wurde. Mittels Massenspektrometrie und NMR-Messungen wurde festgestellt, dass es sich um das Chlor-Derivat **193** handelt, bei dem das Brom durch Chlor substituiert wurde. Mechanistisch ist diese Substitution durch eine Bildung von HCl bzw. unter den vorliegenden basischen Bedingungen von Cl⁻ als Nebenprodukt zu erklären, wobei Letzteres das gebildete Produkt **192** nukleophil angreift und es zur beschriebenen Halogen-Substitution kommt (**Schema 23**).



Schema 23: Umsetzung des Indolins **190** mit Bromoacetylchlorid **191**. Dabei entsteht die gewünschte Verbindung **192** und entsprechend des gezeigten Mechanismus das Nebenprodukt **193**.

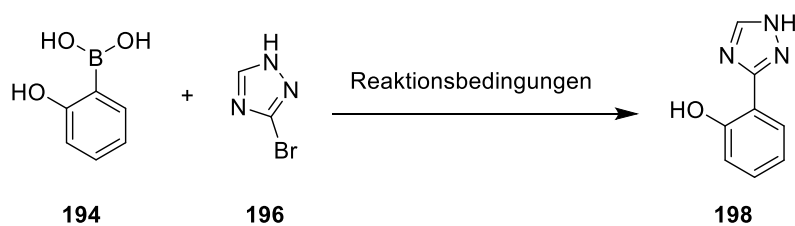
Trotz der unselektiven Reaktion konnte das Produktgemisch problemlos im nächsten Syntheseschritt verwendet werden, da in der folgenden nukleophilen Substitution sowohl das Brom- als auch das Chlor-Derivat mit dem Phenol **194** zu dem Zwischenprodukt **195** reagiert (**Schema 24**). Anschließend sollte die C-C-Bindung zwischen den Aromaten in einer SUZUKI-Kupplung mit der erhaltenen Boronsäure **195** und dem Bromtriazol **196** geknüpft werden. Jedoch konnte bei dieser Reaktion das Produkt **107** unter Verwendung der angegebenen Bedingungen nicht erhalten werden. Anstatt dessen wurde das deborylierte Produkt **197** erhalten, das häufig als Nebenprodukt bei SUZUKI-Kupplungen gebildet werden kann.²⁶⁸ Die Verbindung **197** dient als weiteres Analogon des Docking-Hits **107**, um den Einfluss des fehlenden Triazol-Rings zu untersuchen.



Schema 24: Darstellung des Zwischenprodukts **195** durch eine nukleophile Substitution und anschließender Versuch der SUZUKI-Kupplung mit dem Bromtriazol **196** zur Synthese des Docking-Hits **107**. Im zweiten Schritt konnte lediglich das deborylierte Produkt **197** isoliert werden.

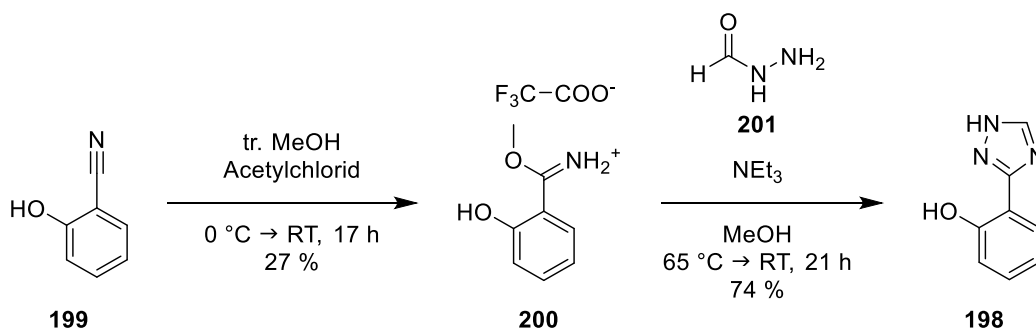
Im Folgenden wurde versucht, die Boronsäure **194** direkt mit dem Bromtriazol **196** mittels SUZUKI-Kupplung zu verknüpfen. Dabei wurde der Katalysator, die Base, das Lösungsmittel und die Reaktionstemperatur variiert. Eine Übersicht der verwendeten Reaktionsbedingungen ist in **Tabelle 9** gezeigt, allerdings konnte in keinem der Fälle das gewünschte Produkt **198** erhalten werden.

Tabelle 9: Untersuchte Reaktionsbedingungen der fehlgeschlagenen SUZUKI-Kupplung zwischen den Verbindungen **194** und **196**.



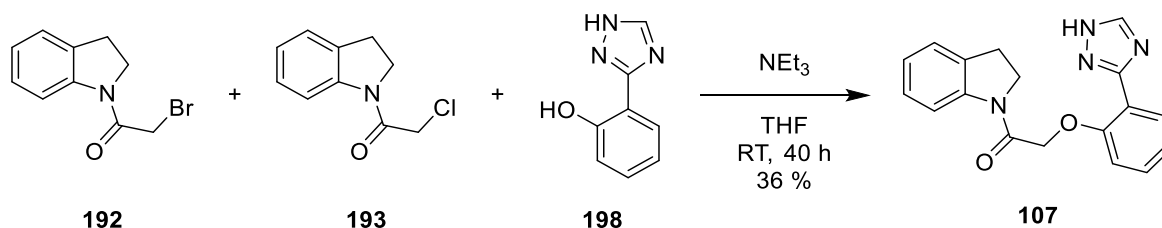
Eintrag	Katalysator	Base	Lösungsmittel	Bedingungen	Ausbeute
1	$Pd(OAc)_2$	K_3PO_4	EtOH /H ₂ O (2:1, v/v)	RT, 144 h	-
2	$Pd(OAc)_2$	Na_2CO_3	Aceton /H ₂ O (1:1, v/v)	RT, 144 h	-
3	$Pd(PPh_3)_4$	K_2CO_3	1,4-Dioxan/H ₂ O (10:1, v/v)	RT, 144 h	-
4	$Pd(dppf)Cl_2$	CS_2CO_3	DME/H ₂ O (14:1, v/v)	Reflux, 144 h	-

Aufgrund der fehlgeschlagenen SUZUKI-Kupplung wurde das Triazol-Motiv über einen alternativen Syntheseweg nach PAGACZ-KOSTRZEWA *et al.* aufgebaut (**Schema 25**).²⁶⁹ Dafür wurde im ersten Schritt das Nitril **199** mit tr. MeOH und Acetylchlorid in einer PINNER-Reaktion umgesetzt und nach präparativer HPLC der Imidsäureester **200** als TFA-Salz erhalten.²⁷⁰ Anschließend wurde dieser mit Formylhydrazid **201** und der Base NEt₃ zum Triazol **198** cyclisiert.²⁶⁹



Schema 25: Zweistufige Synthese des Triazols **198** über eine PINNER-Reaktion zum Imidsäureester **200** gefolgt von einer Cyclisierung mit Formylhydrazid **201**.

Durch die alternative Synthese des Triazols **198** konnte auf die SUZUKI-Kupplung zwischen der Boronsäure **195** und dem Bromtriazol **196** verzichtet werden. Stattdessen konnte im finalen Schritt eine nukleophile Substitution mit dem Produktgemisch aus dem Brom- und Chlor-Derivat (**192**, **193**) und dem Phenol **198** durchgeführt werden (**Schema 26**). Dabei wurde der gewünschte Docking-Hit **107** in einer Ausbeute von 36 % erhalten und gemeinsam mit dem Derivat **197** ohne Triazol-Rest für die Testung bereitgestellt.



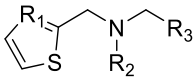
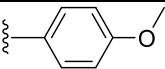
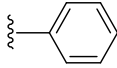
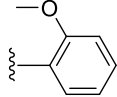
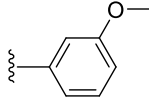
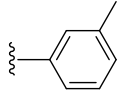
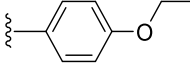
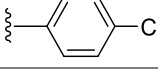
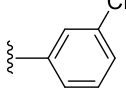
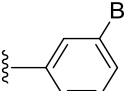
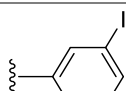
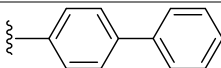
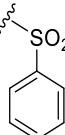
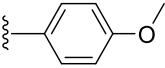
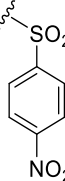
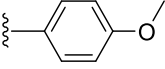
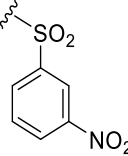
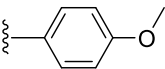
Schema 26: Finaler Schritt der Synthese des Docking-Hits **107**.

3.3.2.4 Biologische Charakterisierung

Die dargestellten Verbindungen der zweiten Dockingstudie wurden von KATHARINA BECKER und UURTUYA HOCHBAN aus der Arbeitsgruppe BÜNEMANN an dem ET_BR und FFAR3 untersucht (**Tabelle 10**, **Tabelle 11** und **Tabelle 12**).

3.3.2 Zweite Dockingstudie an der G-Protein-Bindetasche des ET_BR

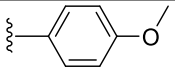
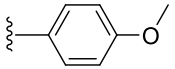
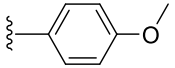
Tabelle 10: Biologische Charakterisierung des Docking-Hits **105** und aller dargestellten Derivate bei einer Konzentration von 100 μ M.

					
Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	ET _B R	FFAR3
105	N	SO ₂ Me		inaktiv ^{a,b}	inaktiv ^b
132	N	SO ₂ Me		inaktiv ^{a,b}	i.A.
133	N	SO ₂ Me		inaktiv ^{a,b}	i.A.
134	N	SO ₂ Me		inaktiv ^{a,b}	inaktiv ^b
135	N	SO ₂ Me		n.b.	inaktiv ^{a,b}
136	N	SO ₂ Me		inaktiv ^{a,b}	i.A.
137	N	SO ₂ Me		inaktiv ^{a,b}	inaktiv ^{a,b}
138	N	SO ₂ Me		inaktiv ^{a,b}	inaktiv ^{a,b}
139	N	SO ₂ Me		inaktiv ^{a,b}	inaktiv ^{a,b}
140	N	SO ₂ Me		inaktiv ^{a,b}	inaktiv ^{a,b}
141	N	SO ₂ Me		inaktiv ^{a,b}	i.A.
144	N			inaktiv ^{a,b}	inaktiv ^{a,b}
157	N			inaktiv ^{a,b}	inaktiv ^{a,b}
158	N			inaktiv ^{a,b}	inaktiv ^{a,b}

3.3.2 Zweite Dockingstudie an der G-Protein-Bindetasche des ET_BR

159	N			inaktiv ^{a,b}	i.A.
160	N			inaktiv ^{a,b}	i.A.
161	N			inaktiv ^{a,b}	i.A.
162	N			n.b.	i.A.
163	N			inaktiv ^{a,b}	inaktiv ^{a,b}
164	N			inaktiv ^{a,b}	inaktiv ^{a,b}
165	N			inaktiv ^{a,b}	inaktiv ^{a,b}
166	N			inaktiv ^{a,b}	i.A.
167	N			inaktiv ^{a,b}	i.A.
168	N			inaktiv ^{a,b}	i.A.
171	N	COMe		i.A.	i.A.
172	N	COtBu		i.A.	i.A.

3.3.2 Zweite Dockingstudie an der G-Protein-Bindetasche des ET_BR

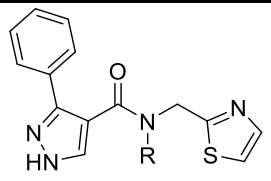


176	CH	SO ₂ Me		inaktiv ^{a,b}	i.A.
177	CH	SO ₂ Et		inaktiv ^{a,b}	inaktiv ^b
178	CH	SO ₂ Ph		inaktiv ^{a,b}	inaktiv ^b

^aG-Protein-Bindungs-Assay. ^bRezeptorsensor-Assay. n.b. = nicht bestimmbar aufgrund schlechter Löslichkeit. i.A. = in Arbeit, biologische Testung ist geplant.

Für den Docking-Hit **105** konnte *in vitro* sowohl am ET_BR als auch am FFAR3 keine Aktivität bestimmt werden (**Tabelle 10**). Die Derivatisierung der 4-Methoxyphenyl-Gruppe (R₃) im Falle der Verbindungen **132-141** führte ebenfalls zu inaktiven Verbindungen an den untersuchten Rezeptoren. Der Austausch der Mesyl-Gruppe (R₂) im Falle der Verbindungen **144, 157-168** durch unsubstituierte und substituierte aromatische Sulfonylreste führte auch nicht zu aktiven Derivaten. Die Untersuchung der Carbonsäureamide (**171, 172**), bei denen die Sulfonamidbindung ersetzt wurde, stehen noch aus. Für die zuletzt dargestellten Thiophen-Derivate **176-178** wurde bei der biologischen Charakterisierung ebenfalls keine Aktivität festgestellt. Da weder der ursprüngliche Docking-Hit **105**, noch dessen Derivate eine Wirkung am ET_BR und FFAR3 gezeigt haben, wurde auf die Synthese weiterer Derivate verzichtet.

Gleiches gilt für den zweiten Docking-Hit **106** und die davon abgeleiteten Verbindungen **188** und **189**, die sich in der Substitution der Amidbindung unterscheiden (**Tabelle 11**). Auch diese Derivate erwiesen sich an beiden Rezeptoren als inaktiv.

Tabelle 11: Biologische Charakterisierung des Docking-Hits **106** und der Derivate **188** und **189** bei einer Konzentration von 100 μM.

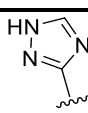
			
Nr.	R	ET _B R	FFAR3
106		inaktiv ^{a,b}	inaktiv ^{a,b}
188	H	inaktiv ^{a,b}	i.A.
189		inaktiv ^{a,b}	inaktiv ^{a,b}

^aG-Protein-Bindungs-Assay. ^bRezeptorsensor-Assay. i.A. = in Arbeit, biologische Testung ist geplant.

3.3.2 Zweite Dockingstudie an der G-Protein-Bindetasche des ET_BR

Der dritte Docking-Hit **107** konnte aufgrund von Löslichkeitsproblemen nicht an dem ET_BR untersucht werden (**Tabelle 12**). Das Derivat **197** ohne Triazol-Rest zeigte sowohl an dem ET_BR als auch an dem FFAR3 keine Aktivität. Infolge der Inaktivität der dargestellten Verbindungen der zweiten Dockingstudie wurden keine weiteren Derivate hergestellt und ein alternativer Ansatz verfolgt, der im folgenden Kapitel beschrieben wird.

Tabelle 12: Biologische Charakterisierung des Docking-Hits **107** und des Derivats **197** bei einer Konzentration von 100 μ M.

Nr.	R	ET _B R	FFAR3
107		n.b.	i.A.
197	H	inaktiv ^{a,b}	inaktiv ^{a,b}

^aG-Protein-Bindungs-Assay. ^bRezeptorsensor-Assay. n.b. = nicht bestimmbar aufgrund schlechter Löslichkeit. i.A. = in Arbeit, biologische Testung ist geplant.

3.3.3 Bekannte allosterische GPCR-Liganden

Neben den Dockingstudien wurde parallel eine weitere Strategie zur Identifizierung allosterischer Liganden der GLUE-Targets verfolgt. Dabei sollten bekannte allosterische Liganden der GPCRs aus der Familie A nachsynthetisiert oder kommerziell erworben werden. Aufgrund der im Arbeitskreis KOLB durchgeführten Analysen bekannter und potentieller allosterischer Bindetaschen innerhalb der GPCRs der Familie A wurde vermutet, dass diese Verbindungen nicht nur an das ursprüngliche Target, sondern auch an die GLUE-Rezeptoren (ET_BR und FFAR3) binden könnten.¹¹ Falls es auf diese Weise gelingen sollte, einen aktiven Liganden zu finden, sollte dieser weiter modifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Indol **202** und das Chinazolin **203** für die Synthese ausgewählt. Das Indol **202** wurde als NAM des Cannabinoid-Rezeptors 1 beschrieben, der in der KS3 hauptsächlich über hydrophobe Wechselwirkungen an den Rezeptor bindet (**Abbildung 39A**).²⁷¹ Das Chinazolin **203** ist ein NAM des β_2 -Adrenozeptors dessen Aminogruppe zwei Wasserstoffbrückenbindungen in der KS5 des Rezeptors ausbildet (**Abbildung 39B**).²⁷²

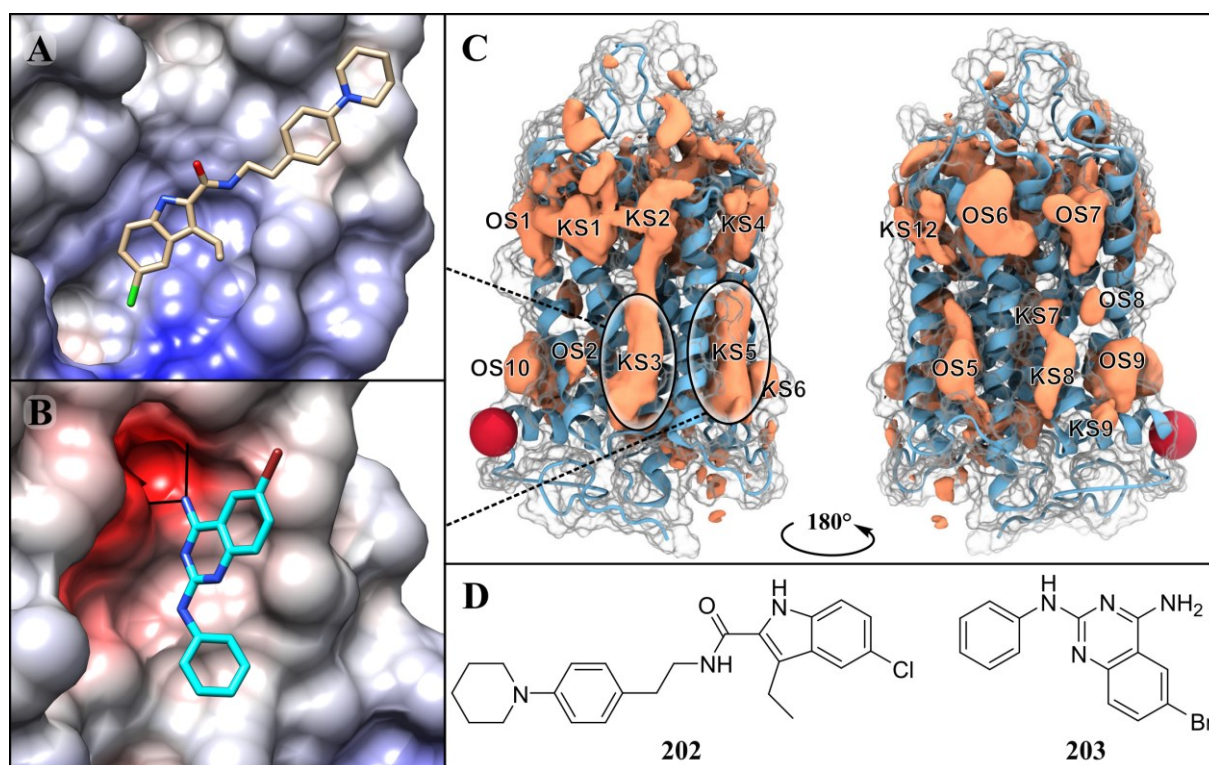
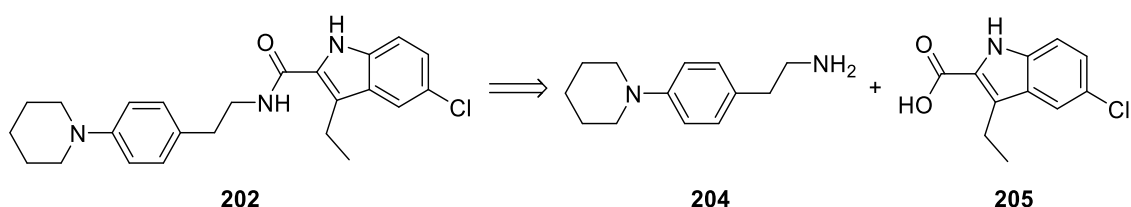


Abbildung 39: (A) Kristallstruktur des Cannabinoid-Rezeptors 1 im Komplex mit dem allosterischen Liganden **202** (PDB: 6KQI).²⁷¹ (B) Kristallstruktur des β_2 -Adrenozeptors mit dem allosterischen Liganden **203** (PDB: 6OBA).²⁷² Die Wasserstoffbrückenbindungen sind als schwarze Striche dargestellt. Eine allgemeine Übersicht der bekannten (KS) und unbekannt (OS) allosterischen Bindestellen ist in Bild C und die Strukturformeln der Liganden **202** und **203** in Bild D dargestellt. Das Bild C wurde aus der Arbeit von HEDDERICH *et al.* entnommen und leicht modifiziert.¹¹

3.3.3.1 Synthese und Derivatisierung des allosterischen Modulators **202**

Der bekannte allosterische Modulator **202** wurde in Anlehnung der beschriebenen Synthesen von ABDELRAHMAN *et al.* und NGUYEN *et al.* hergestellt.^{273,274} Dafür wurde das Amid **202** zunächst retrosynthetisch in das Amin **204** und die Carbonsäure **205** zerlegt, welche im Folgenden dargestellt und im letzten Schritt zum Amid **202** gekuppelt werden sollten (Schema 27).

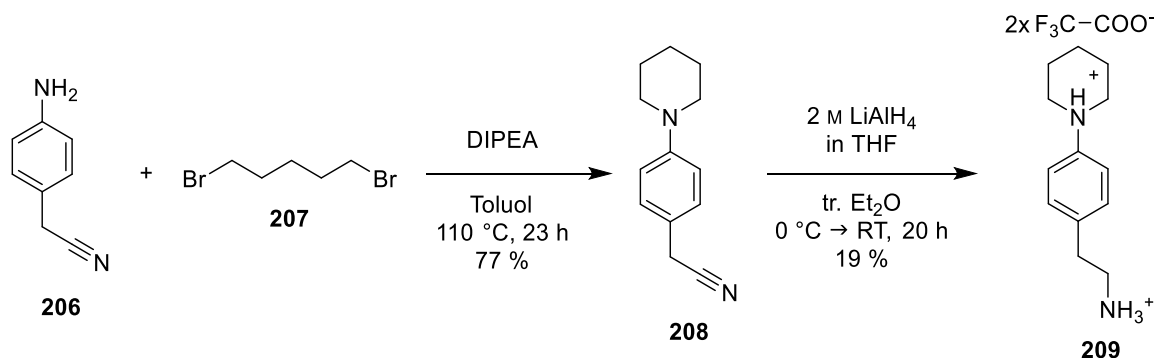


Schema 27: Retrosynthetische Analyse des allosterischen Modulators **202**.

Die Synthese desamins **204** ging von dem kommerziell erworbenen Anilin-Derivat **206** aus (Schema 28). Im ersten Schritt wurde die Aminofunktion mit 1,5-Dibrompentan **207** und der

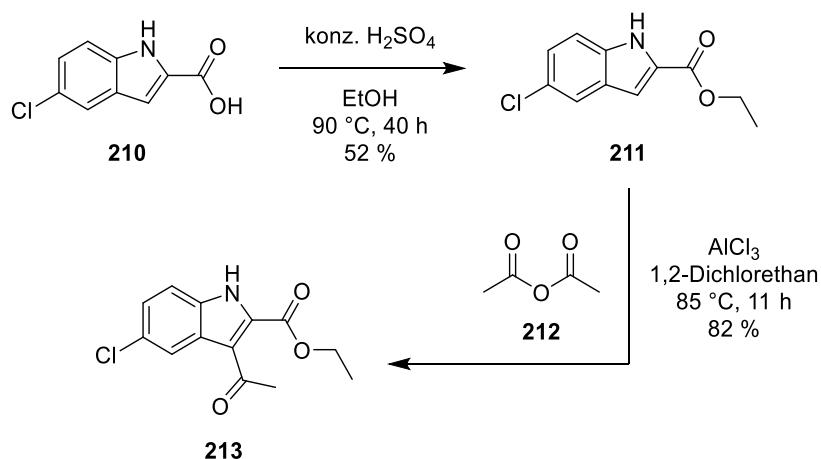
3.3.3 Bekannte allosterische GPCR-Liganden

Hilfsbase DIPEA zum Piperidin **208** cyclisiert. Danach wurde mittels 2 M LiAlH₄-Lösung in THF die Nitrilgruppe zum primären Amin reduziert und das Intermediat **209** mit präparativer HPLC gereinigt.



Schema 28: Zweistufige Synthese der Verbindung **209**.

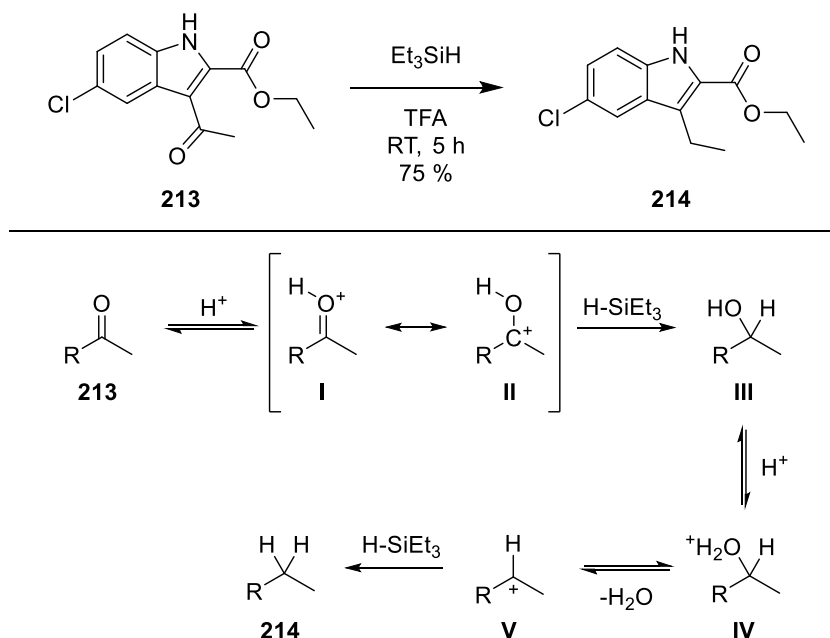
Zur Synthese der Carbonsäure **205** wurde das Indol **210** kommerziell erworben und im ersten Schritt säurekatalysiert verestert (**Schema 29**). Der erhaltene Ester **211** wurde anschließend in einer FRIEDEL-CRAFTS-ACYLIERUNG mit Essigsäureanhydrid **212** umgesetzt. Dies führte zu einer selektiven Acylierung des Indols in der gewünschten 3-Position, wie bereits in der Arbeit von NGUYEN *et al.* beschrieben.²⁷⁴



Schema 29: Darstellung des acetylierten Indols **213** über eine Veresterung der Ausgangsverbindung **210** und anschließender FRIEDEL-CRAFTS-ACYLIERUNG.

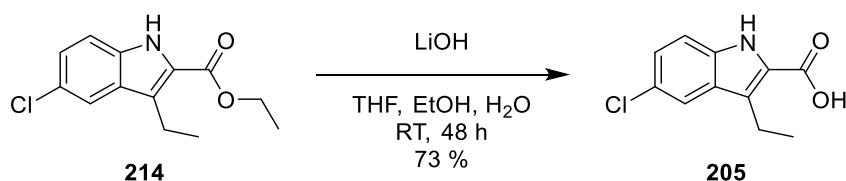
Im folgenden Schritt wurde die Acetylgruppe der Verbindung **213** in einer ionischen Hydrierung in Gegenwart des Ethylesters selektiv zur Ethylgruppe reduziert (**Schema 30**). Dafür wurde TFA als Lösungsmittel und Protonenquelle und Et₃SiH als Hydrierungsmittel verwendet. Mechanistisch wird zunächst die Ketogruppe protoniert, die mesomeriestabilisiert vorliegt. Danach greift das Hydrid-Ion des Et₃SiH das Carbenium-Ion an, wodurch intermediär

der Alkohol gebildet wird. Dieser wird erneut durch TFA protoniert und spaltet als Abgangsgruppe H_2O ab. Das intermediär entstandene Carbenium-Ion wird erneut durch ein Hydrid-Ion angegriffen, was zur Bildung des reduzierten Produkts **214** führt. Der beschriebene Mechanismus ist in **Schema 30** dargestellt.



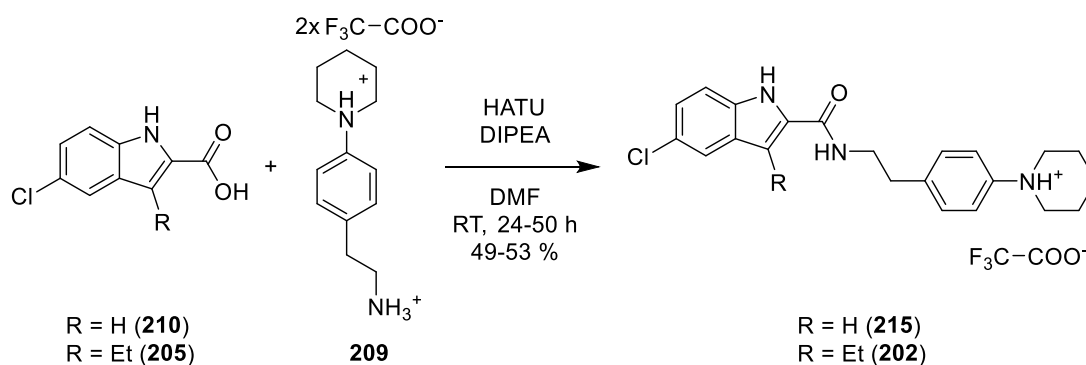
Schema 30: Ionische Hydrierung der Acetylgruppe der Verbindung **213** mittels Et_3SiH und TFA. Der literaturbekannte Mechanismus der ionischen Hydrierung ist unter der Reaktionsgleichung dargestellt.²⁷⁵

Im letzten Schritt zur Darstellung der Carbonsäure **205** wurde der Ester **214** mit LiOH hydrolysiert und das Produkt nach Reinigung mittels präparativer HPLC in einer Ausbeute von 73 % erhalten (**Schema 31**).



Schema 31: Basische Hydrolyse des Ethylesters **214** zur Carbonsäure **205**.

Final wurden das synthetisierte Ammonium-Salz **209** und die Carbonsäure **205** in einer HATU-Kupplung zum allosterischen Modulator **202** umgesetzt, der mittels präparativer HPLC gereinigt wurde (**Schema 32**). Als Derivat wurde lediglich die Verbindung **215** ohne Ethylrest am Indol hergestellt. Dafür wurde die kommerziell erworbene Ausgangsverbindung **210** mit dem Ammonium-Salz **209** unter analogen Bedingungen gekuppelt.

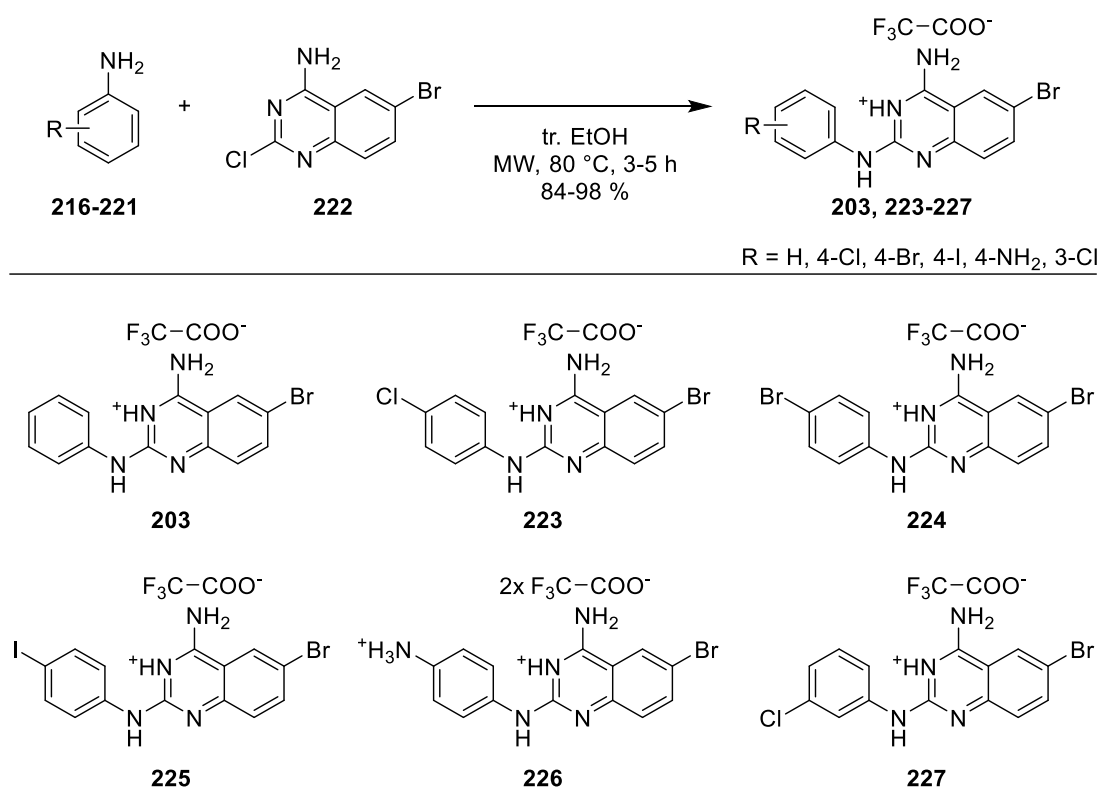


Schema 32: Die finale Amidkupplung der Carbonsäure **205** bzw. **210** mit dem Ammonium-Salz **209**.

3.3.3.2 Synthese und Derivatisierung des allosterischen Modulators **203**

Der allosterische Modulator **203** wurde nach der Vorschrift aus dem Patent von KOBILKA *et al.* synthetisiert.²⁷⁶ Dafür wurde in einer einstufigen Synthese das Anilin **216** mit dem Chinazolin **222** in einer nukleophilen aromatischen Substitution umgesetzt (**Schema 33**). Diese Reaktion wurde in der Mikrowelle unter Verwendung von tr. EtOH als Lösungsmittel durchgeführt. Der Reaktionsverlauf wurde mittels analytischer HPLC kontrolliert, wobei nach 5 Stunden die Ausgangsverbindung vollständig umgesetzt war. Somit konnte die im Patent beschriebene Reaktionszeit von 16 Stunden um 11 Stunden bei analog hohen Ausbeuten von 94 % reduziert werden.

Auf Basis einer Dockingstudie von MARGHERITA PERSECHINO, die eine Auswahl an möglichen Substitutionen der Anilin-Einheit der Verbindung **203** untersucht hat, wurden die fünf vielversprechendsten Derivate (**223-227**) ausgewählt und unter analogen Bedingungen mit den entsprechenden Anilinen **217-221** hergestellt (**Schema 33**). Dabei wurden in *para*-Position die Halogene Chlor (**223**), Brom (**224**) und Iod (**225**) sowie eine Aminogruppe (**226**) eingeführt. Mit der Verbindung **227** wurde ein in *meta*-Position substituiertes Chlor-Derivat dargestellt.



Schema 33: Nucleophile aromatische Substitution des Chinazolins **222** mit den Anilin-Derivaten **216-221** zum allosterischen Modulator **203** und den Derivaten **223-227**.

3.3.3.3 Biologische Charakterisierung

Die Aktivitätsbestimmung der dargestellten allosterischen Modulatoren **202** und **203** und deren Derivate am ET_BR und FFAR3 wurde von KATHARINA BECKER und UURTUYA HOCHBAN aus der Arbeitsgruppe BÜNEMANN durchgeführt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 13** und **Tabelle 14** zusammengefasst.

Tabelle 13: Biologische Charakterisierung des allosterischen Modulators **202** und des Derivats **215** bei einer Konzentration von 100 μM .

Nr.	R	ET _B R	FFAR3
202	Et	n.b.	i.A.
215	H	n.b.	inaktiv ^b

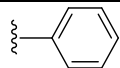
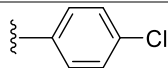
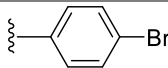
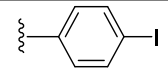
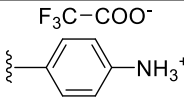
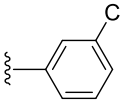
^aG-Protein-Bindungs-Assay. ^bRezeptorsensor-Assay. n.b. = nicht bestimmbar aufgrund schlechter Löslichkeit. i.A. = in Arbeit, biologische Testung ist geplant.

3.3.3 Bekannte allosterische GPCR-Liganden

Für den allosterischen Modulator **202** und des Derivats **215** konnte aufgrund des hydrophoben Charakters der Verbindungen keine Aktivitätsbestimmung in dem G-Protein-Bindungs- und Rezeptorsensor-Assay am ET_BR erfolgen, da die Verbindungen bei der Durchführung der Assays präzipitierten (**Tabelle 13**). Lediglich das Derivat **215** konnte in dem Rezeptorsensor-Assay am FFAR3 getestet werden, erwies sich jedoch als inaktiv.

Der zweite allosterische Modulator **203** zeigte an dem ET_BR und FFAR3 keine Aktivität (**Tabelle 14**). Analoge Ergebnisse erbrachte das *para*-Chlor- und *para*-Amino-Derivat (**223, 226**). Die Einführung von sterisch-anspruchsvolleren Halogeniden (**224, 225**) in *para*-Position und die Einführung der Chlor-Gruppe in *meta*-Position (**227**) führten zur Präzipitation bei den Untersuchungen am ET_BR bei einer Konzentration von 100 µM. An dem FFAR3 konnten bereits die Derivate **224-226** untersucht werden, die sich jedoch als inaktiv herausstellten. Aufgrund fehlender Aktivitäten der bekannten NAMs **202** und **203** sowie deren Derivate an den GLUE-Rezeptoren wurde auch dieser Ansatz nicht weiterverfolgt.

Tabelle 14: Biologische Charakterisierung des allosterischen Modulators **203** und der Derivate **223-227** bei einer Konzentration von 100 µM.

Nr.	R	ET _B R	FFAR3
203		inaktiv ^{a,b}	inaktiv ^b
223		inaktiv ^{a,b}	i.A.
224		n.b.	inaktiv ^b
225		n.b.	inaktiv ^b
226		inaktiv ^{a,b}	inaktiv ^b
227		n.b.	i.A.

^aG-Protein-Bindungs-Assay. ^bRezeptorsensor-Assay. n.b. = nicht bestimmbar aufgrund schlechter Löslichkeit. i.A. = in Arbeit, biologische Testung ist geplant.

3.3.4 Dockingstudie an der *known site 5* des ET_BR

Da basierend auf den zuvor beschriebenen Dockingstudien kein wirksamer allosterischer Ligand identifiziert werden konnte, wurde die KS5 des ET_BR als neue Bindestelle genutzt. An diese wurde erneut die computergenerierte SCUBIDOO-Datenbank gedockt (**Abbildung 40C**).²⁶³ Aus den potentiellen Liganden wurden die Verbindungen **228** und **229** zur Synthese ausgewählt (**Abbildung 40D**). In der Bindungspose des Indol-Derivats **228** bildet der Amidstickstoff eine Wasserstoffbrückenbindung mit E221 des ET_BR aus (**Abbildung 40A**). Für den Docking-Hit **229** wurden zwei Wasserstoffbrückenbindungen ausgehend von beiden Stickstoffen des Pyrazols zu E221 und R201 bestimmt (**Abbildung 40B**).

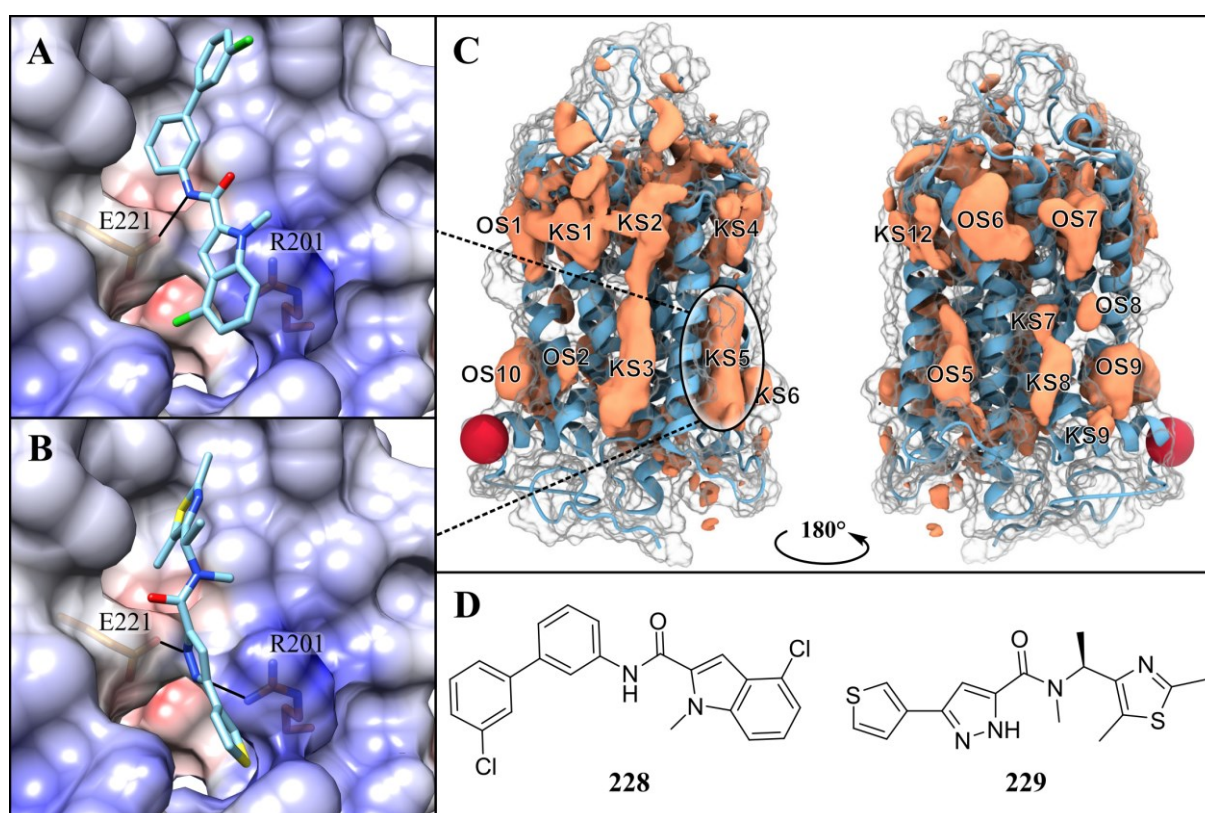
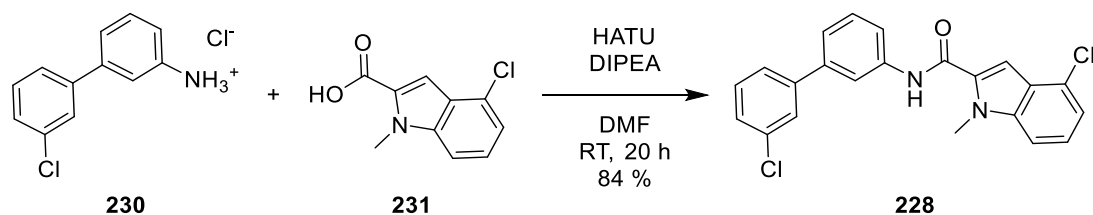


Abbildung 40: Dockingposen der Verbindungen **228** (Bild A) und **229** (Bild B) in der KS5 des ET_BR-Homologiemodells. Die Wasserstoffbrückenbindungen sind als schwarze Striche dargestellt. Eine Übersicht der bekannten (KS) und unbekannt (OS) allosterischen Bindestellen ist in Bild C und die Strukturformeln der Liganden **228** und **229** in Bild D gezeigt. Das Bild C wurde aus der Arbeit von HEDDERICH *et al.* entnommen und leicht modifiziert.¹¹

3.3.4.1 Synthese der Docking-Hits **228** und **229**

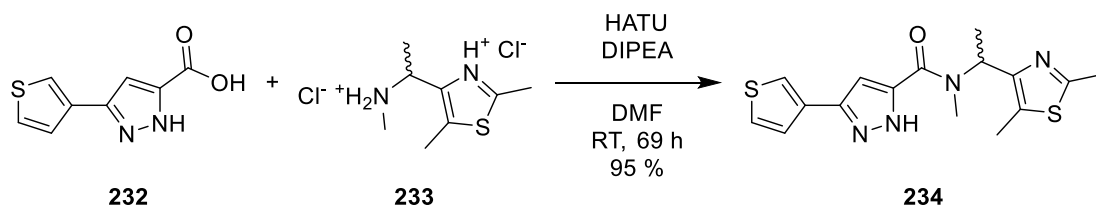
Für die Synthese der potentiellen Liganden **228** und **229** wurden die entsprechenden Ausgangsverbindungen **230-233** kommerziell erworben und in einer einstufigen Synthese über eine HATU-Kupplung umgesetzt. In der ersten Amidkupplung wurde das Biphenylammonium-Salz **230** mit der Indolcarbonsäure **231** zum Amid **228** gekuppelt

(**Schema 34**). Im Anschluss wurde das Produkt mittels präparativer HPLC gereinigt und in einer Ausbeute von 84 % isoliert.



Schema 34: Synthese der Verbindung **228** durch Kupplung des Biphenylammonium-Salzes **230** und der Carbonsäure **231**.

Zur Synthese des Docking-Hits **229** wurde die Carbonsäure **232** mit dem Racemat **233** umgesetzt, wodurch nicht der enantiomerenreine Docking-Hit **229**, sondern das Racemat **234** in einer Ausbeute von 95 % erhalten wurde (**Schema 35**). Erst bei einer bestätigten biologischen Aktivität sollten das (*R*)- und (*S*)-Enantiomer enantiomerenrein dargestellt und getrennt voneinander untersucht werden. Alternativ könnte das Racemat **234** über eine chirale präparative Säule aufgetrennt werden. Weitere Derivatisierungen der Docking-Hits **228** und **229** sollten erst im Falle einer bestätigten *in vitro* Aktivität erfolgen.



Schema 35: Synthese des Racemats **234** durch HATU-Kupplung der Carbonsäure **232** mit dem Racemat **233**.

3.3.4.2 Biologische Charakterisierung

Die dargestellten Verbindungen **228** und **234** wurden bislang nicht an dem ET_BR und FFAR3 getestet, weshalb keine Aussage bezüglich der biologischen Aktivität getroffen werden kann.

3.3.5 Dockingstudie am GPRC5b

Da der GPRC5b ein Orphan-Rezeptor ist, für den bisher keine Liganden bekannt sind, fokussierte sich das Docking auf die Identifizierung von Liganden, die in der extrazellulären Bindetasche der 7TM-Domäne des GPRC5b binden sollten (**Abbildung 41A**). Dafür wurden von MARGHERITA PERSECHINO zwei Homologiemodelle des Rezeptors erstellt, an denen die Moleküle der ZINC-Datenbank gedockt wurden.²⁶² Aus den potentiellen Liganden wurden das

Thiophen **235** und das Benzotriazinon **236** zur Synthese ausgewählt (**Abbildung 41D**). In der Dockingpose bildete Verbindung **235** über die Esterfunktion drei Wasserstoffbrückenbindungen mit R125, Y254 und N268 aus (**Abbildung 41B**). Darüber hinaus wurde eine weitere Wasserstoffbrückenbindung zwischen N268 und dem Schwefel des Thiophens, der als schwacher Wasserstoffbrückenbindungs-Akzeptor bekannt ist, bestimmt.²⁷⁷ Die Bindung des Docking-Hits **236** wird über zwei Wasserstoffbrücken der Stickstoffe des Benzotriazinons zum R125 vermittelt. Zusätzlich existiert ein polarer Kontakt zwischen dem Carbonylsauerstoff des Benzotriazinons und der Seitenkette des N268 (**Abbildung 41C**).

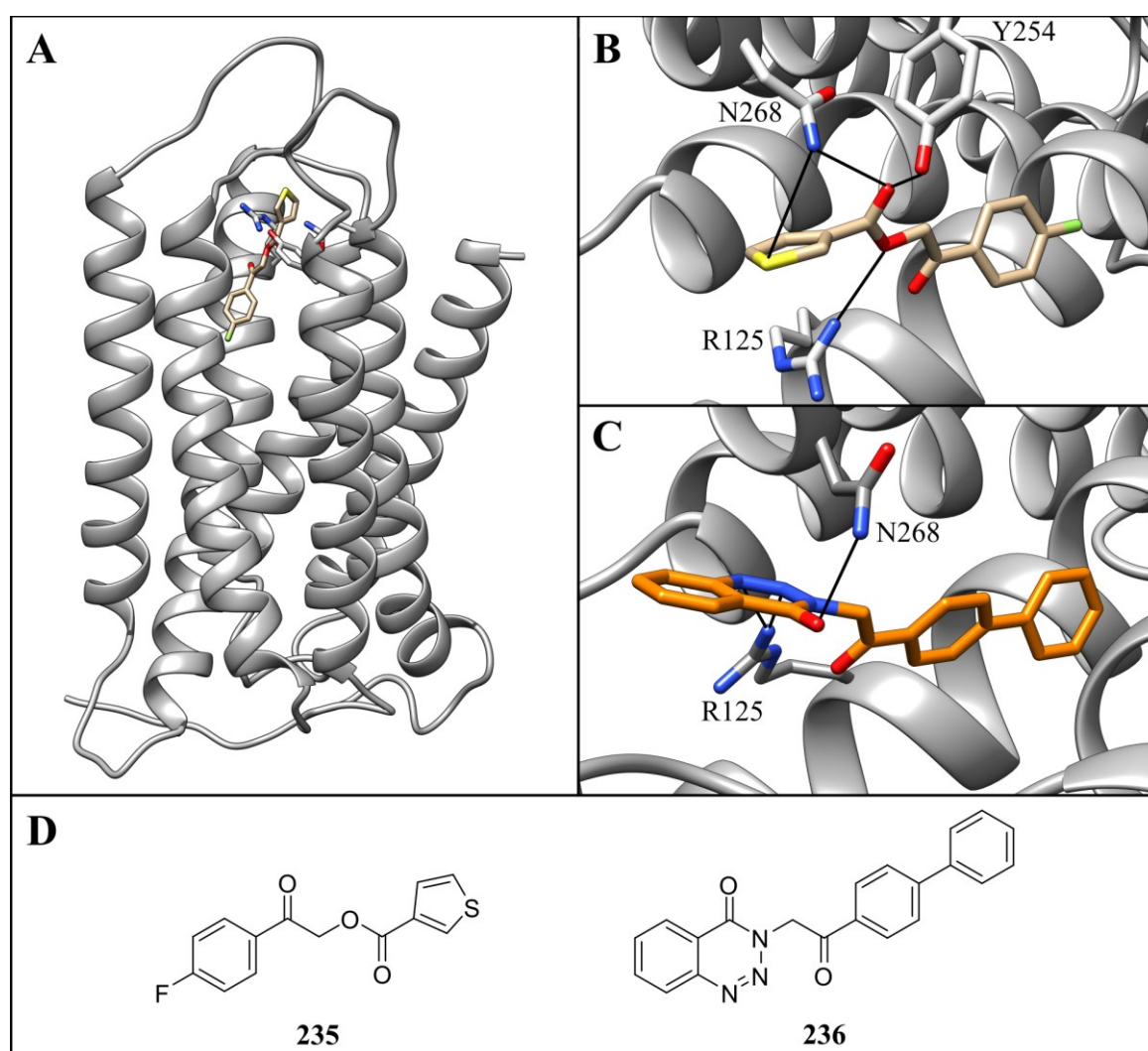
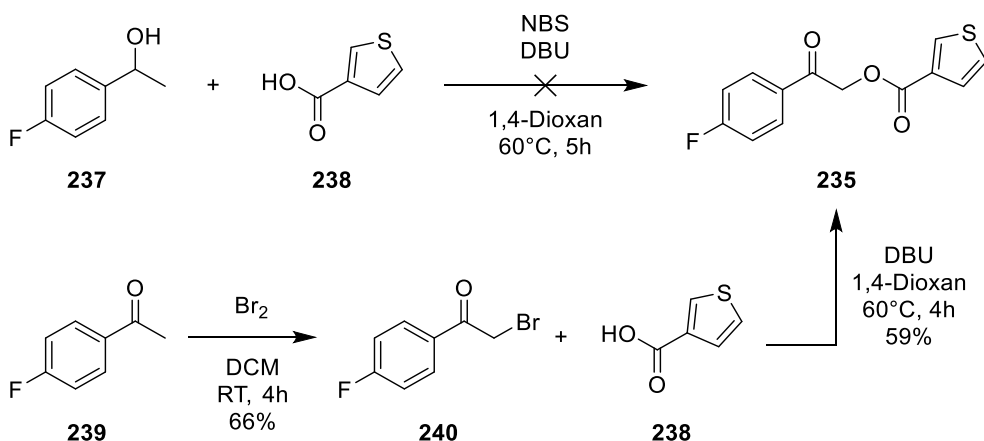


Abbildung 41: (A) Homologiemodell des GPRC5b im Komplex mit der Verbindung **235** in der extrazellulären Bindetasche. Die detaillierten Dockingposen der Verbindungen **235** (beige) und **236** (orange) mit den Wasserstoffbrückenbindungen (schwarze Striche) sind in Bild **B** bzw. **C** dargestellt, die Strukturformeln in Bild **D**.

3.3.5.1 Synthese und Derivatisierung des Docking-Hits 235

Die Synthese der Verbindung **235** wurde nach der Vorschrift von ZHU *et al.* durchgeführt, bei der das Produkt in einer *one-pot* Reaktion mit NBS und DBU erhalten werden sollte (**Schema 36**).²⁷⁸ Dabei sollte aus dem Alkohol **237** intermediär ein Keton gebildet werden, das in α -Position bromiert und anschließend von Verbindung **238** nukleophil angegriffen wird. Jedoch konnte unter diesen Reaktionsbedingungen mittels analytischer HPLC und Massenspektrometrie keine Produktbildung nachgewiesen werden, daher wurde eine alternative Methode zur Synthese der Verbindung **235** gewählt.

Als naheliegender Ansatz wurde die *one-pot* Reaktion in zwei Schritte aufgeteilt und anstelle des Alkohols **237** das Keton **239** verwendet. Dementsprechend wurde im ersten Schritt die α -Position des Ketons **239** mit Br_2 in DCM bromiert (**Schema 36**). Die bromierte Verbindung **240** wurde säulenchromatographisch gereinigt. Obwohl sich die Trennung des Rohprodukts bestehend aus dem Edukt, dem gewünschten Produkt und der zweifach-bromierten Spezies als schwierig erwiesen hat, konnte das Produkt **240** in einer zufriedenstellenden Ausbeute von 66 % isoliert werden. Im folgenden Schritt wurde das erhaltene Bromid **240** von der Thiophencarbonsäure **238** bzw. von dessen Carboxylat-Anion nukleophil angegriffen und der gewünschte Ester **235** erhalten.

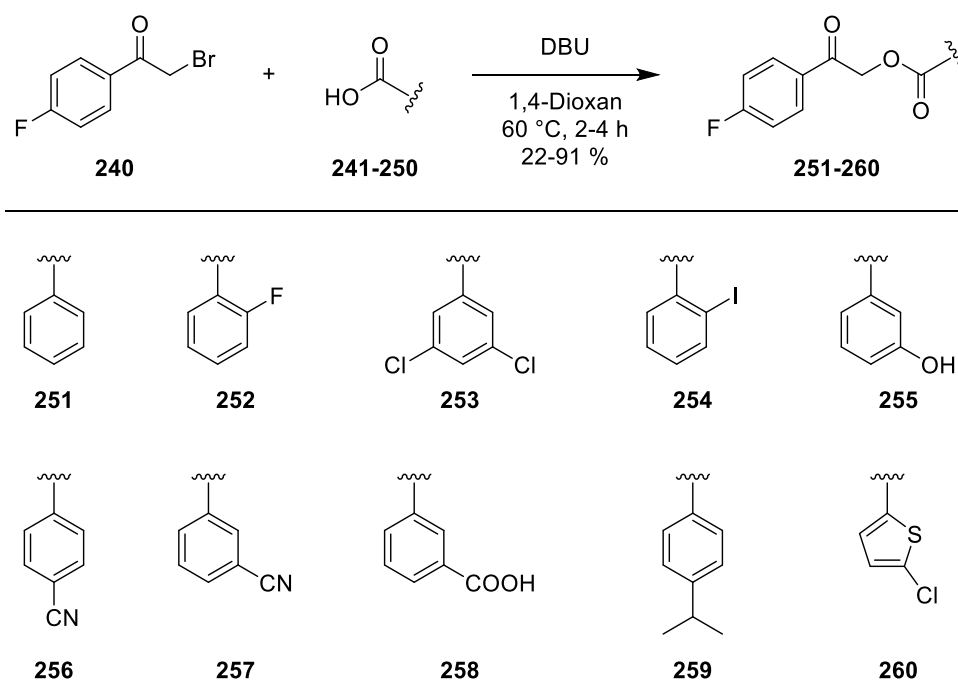


Schema 36: Fehlgeschlagene Synthese der Verbindung **235** über eine *one-pot* Reaktion, die in der Literatur beschrieben wurde.²⁷⁸ Die Zielverbindung **235** konnte durch eine alternative Synthese (unten) über eine Bromierung des Ketons **239** in α -Position und anschließende nukleophile Substitution durch die Carbonsäure **238** erhalten werden.

Im Anschluss an die Synthese des Docking-Hits **235** wurden weitere Derivate hergestellt. Dafür wurde das Thiophen durch eine bioisostere Phenylgruppe und substituierte Phenylreste ausgetauscht (**Schema 37**). Der Vorteil davon war, dass eine Vielzahl an substituierten Benzoesäuren synthetisch zugänglich und bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden waren,

wohingegen substituierte Thiophen-Derivate in der Darstellung bzw. Beschaffung limitierter sind. Durch den Einbau eines breiten Spektrums an substituierten Phenylresten sollte die extrazelluläre Bindetasche eingehender untersucht werden, auch wenn es dadurch zum Verlust der vorhergesagten Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Thiophen-Schwefel und N268 kommt, die jedoch als schwache Wechselwirkung einzustufen ist (**Abbildung 41B**). Dieser resultierende Affinitätsverlust könnte möglicherweise durch neue Interaktionen der substituierten Phenylreste kompensiert werden oder sogar zu Verbindungen mit verbesserter Wirksamkeit führen.

Daher wurde das α -bromierte Keton **240** aus der Synthese des Docking-Hits **235** mit den Carbonsäure-Derivaten (**241-250**) umgesetzt, um die Ester **251-260** zu erhalten, die eine hohe Diversität hinsichtlich ihrer elektrostatischen Eigenschaften und der Position des Substituenten aufweisen (**Schema 37**). Außerdem wurde mit Verbindung **260** ein weiteres Thiophen-Derivat dargestellt, das über die 3-Position anstatt der 2-Position verknüpft ist und einen zusätzlichen Chlor-Substituent in 5-Position trägt.

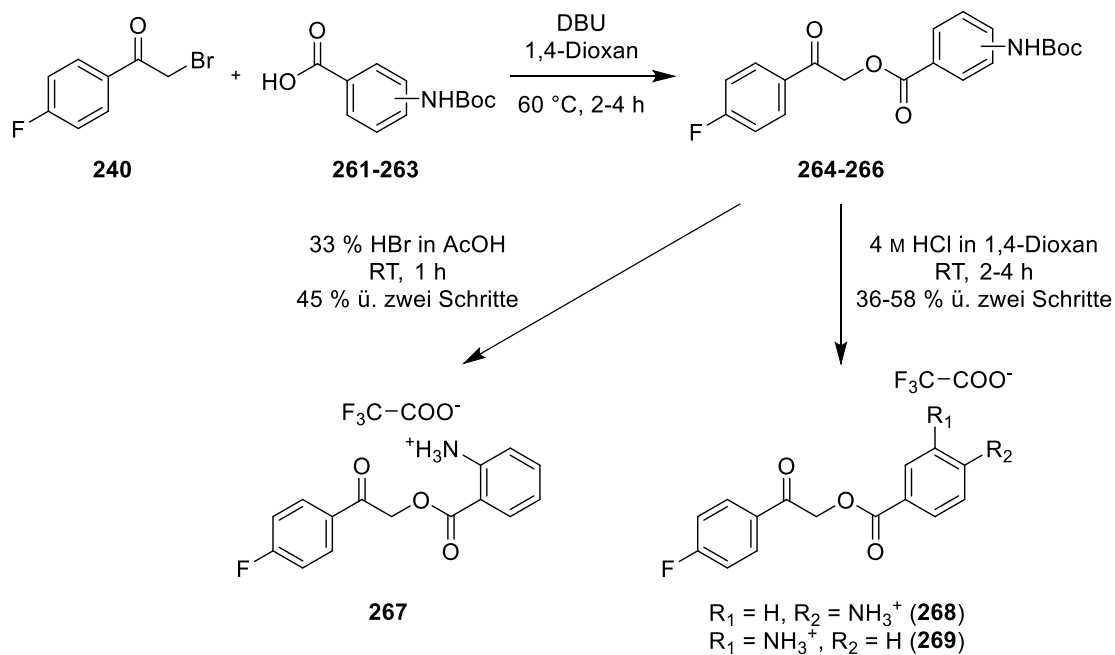


Schema 37: Synthese der Ester-Derivate **251-260** aus den Carbonsäuren **241-250** und dem α -bromierten Keton **240**.

Außerdem wurde eine Aminogruppe in *ortho*-, *meta*- und *para*-Position eingeführt. Für die Synthese dieser Derivate wurden nicht die entsprechenden Aminobenzoesäuren, sondern die Boc-geschützten Analoga eingesetzt, um eine Iminbildung zwischen dem Keton und dem Amin zu verhindern. Im ersten Schritt wurden die Boc-geschützten Aminobenzoesäuren **261-263**

3.3.5 Dockingstudie am GPRC5b

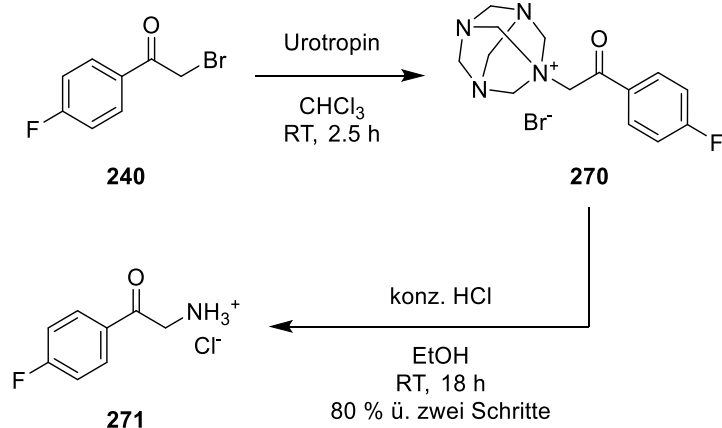
unter analogen Bedingungen mit dem α -bromierten Keton **240** zu den Estern **264-266** umgesetzt (**Schema 38**). Im Anschluss wurde ohne Reinigung der Zwischenstufen **264-266** die Boc-Schutzgruppe abgespalten und die ungeschützten Derivate **267-269** erhalten, die mittels präparativer HPLC gereinigt wurden. Die Entschützung der *para*- und *meta*-Amino-Derivate **268** und **269** wurde mit 4 M HCl in 1,4-Dioxan durchgeführt. Mit diesen Bedingungen konnte jedoch nicht das Produkt **267** erhalten werden, weshalb 33 % HBr in AcOH für die Entschützung des *ortho*-Derivats verwendet wurde.



Schema 38: Darstellung der Aminobenzoesäureester **267-269**.

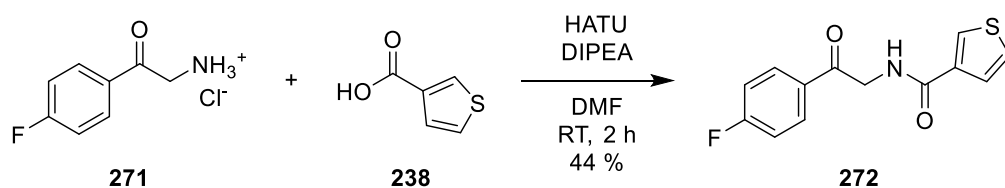
Im Anschluss an die Synthese der beschriebenen Ester-Derivate wurden weitere hydrolysestabilere Verbindungen hergestellt, da die Ester-Funktionalität in der Regel relativ rasch durch Esterasen spaltbar sind.^{279,280}

Daher wurde eine Serie von Amiden hergestellt, indem das α -bromierte Keton **240** zuerst mittels der DELÉPINE-Reaktion in ein α -Aminoketon überführt wurde.²⁸¹ Dabei greift das Urotropin selektiv in Gegenwart des Ketons an der α -bromierten Position an, ohne eine Nebenreaktion mit dem Keton einzugehen (**Schema 39**). So konnte in Anlehnung an die beschriebene Synthese von YANG *et al.* das tertiäre Ammonium-Salz **270** in Gegenwart der Ketofunktion gebildet werden, welches direkt im Anschluss mit konz. HCl-Lösung hydrolysiert wurde, wodurch das primäre Amin **271** als HCl-Salz erhalten wurde.²⁸¹



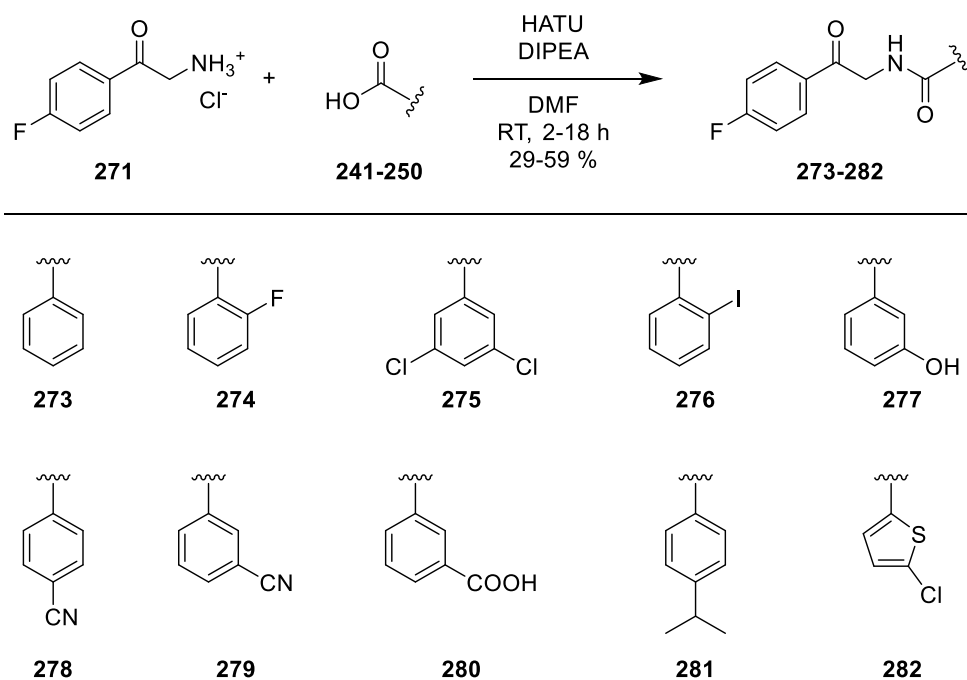
Schema 39: Darstellung des α -Aminoketons **271** über eine DELÉPINE-Reaktion.

Nach Erhalt des α -Aminoketons **271** wurde dieses mit der Thiophencarbonsäure **238** unter der Verwendung von HATU und DIPEA zum Amid-Derivat **272** umgesetzt, das sich von dem ursprünglichen Docking-Hit **235** nur durch die Amidbindung unterscheidet (**Schema 40**).



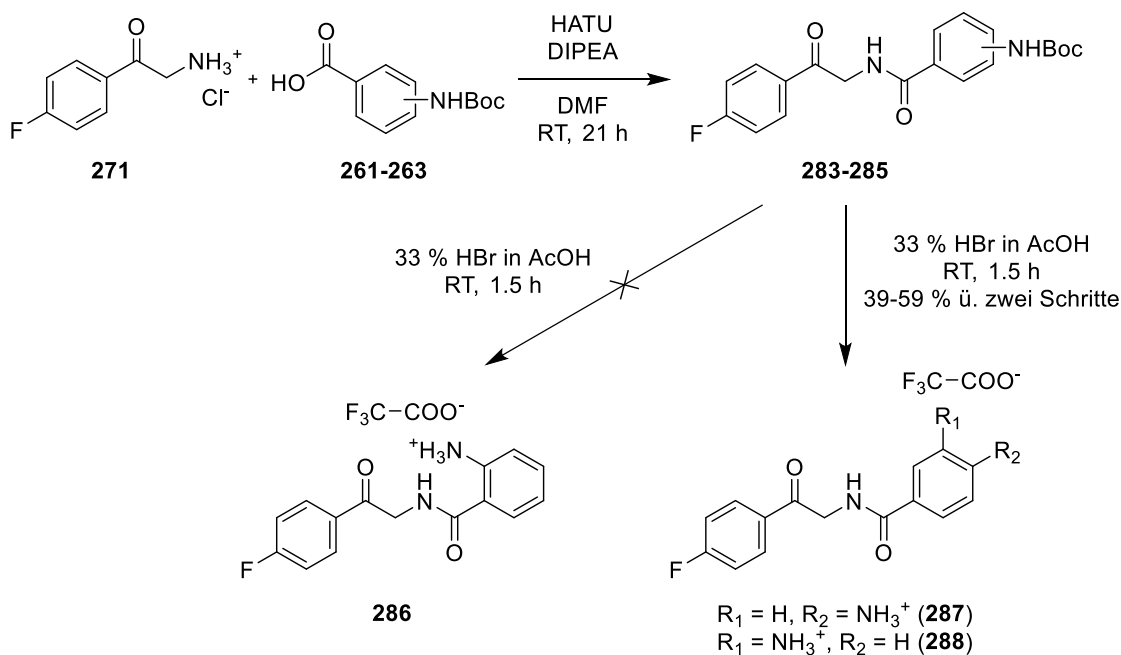
Schema 40: Darstellung des Amid-Derivats **272**.

Darüber hinaus wurde auch die Esterbindung der beschriebenen Derivate **251-260** und **267-269** durch eine Amidbindung ersetzt (**Schema 37** und **Schema 38**). Die Synthese der analogen Derivate **273-282** erfolgte ausgehend von dem α -Aminoketon **271** und den zuvor verwendeten Carbonsäuren **241-250** durch Kupplung mit HATU und der Hilfsbase DIPEA (**Schema 41**).



Schema 41: Synthese der Amid-Derivate **273-282** aus dem α -Aminoketon **271** und den Carbonsäuren **241-250**.

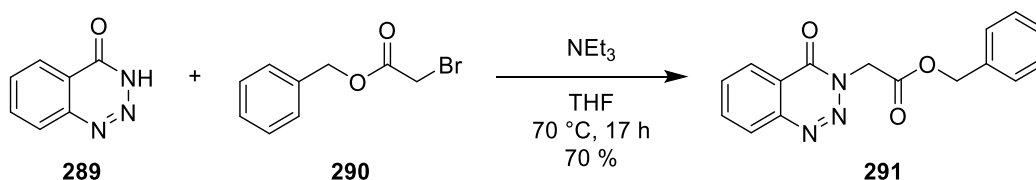
Anschließend wurden die Amino-substituierten Amid-Derivate **286-288** mittels der Boc-geschützten Aminobenzoesäuren **261-263** und dem α -Aminoketon **271** sowie anschließender Abspaltung der Schutzgruppe mit 33 % HBr in AcOH hergestellt (**Schema 42**). Die Darstellung des *para*- und *meta*-Amino-Derivats **287** und **288** gelang problemlos. Nach präparativer HPLC wurden beide Verbindungen in moderaten Ausbeuten erhalten. Bei der analogen Synthese des *ortho*-Amino-Derivats **242** wurde die Produktbildung lediglich mittels Massenspektrometrie und analytischer HPLC bestätigt, jedoch konnte das Produkt mithilfe gängiger Reinigungsmethoden nicht in ausreichender Reinheit erhalten werden.



Schema 42: Synthese der *para*- und *meta*-Amino-Derivate **287** und **288**. Das *ortho*-Amino-Derivat **286** konnte unter analogen Bedingungen nicht in ausreichender Reinheit isoliert werden.

3.3.5.2 Synthese und Derivatisierung des Docking-Hits **236**

Zur Synthese des Docking-Hits **236** wurde das kommerziell erworbene Benzotriazinon **289** im ersten Schritt mit Bromessigsäurebenzylester **290** unter Verwendung von NEt_3 und THF in einer nukleophilen Substitution umgesetzt (**Schema 43**).



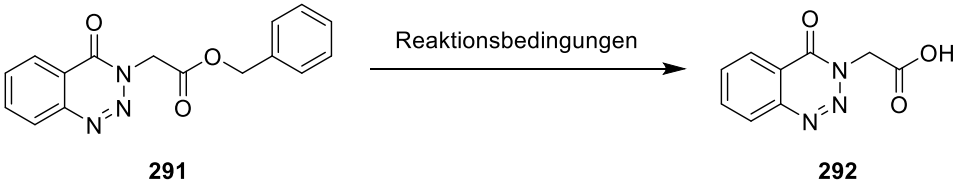
Schema 43: Synthese der Zwischenstufe **291** durch Alkylierung des Benzotriazinons **289**.

Zur Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppe wurde das Intermediat **291** initial mittels der klassischen Methode mit H_2 und Pd/C als Katalysator hydriert (**Tabelle 15**, Eintrag 1). Jedoch konnte dabei keine Produktbildung mittels analytischer HPLC und Massenspektrometrie nachgewiesen werden. Daraufhin wurde als alternativer Ansatz die Reaktionsvorschrift von MERCADER *et al.* verwendet, in der der Benzylester **291** in DCM gel\u00f6st und mit 33 % HBr in AcOH versetzt wurde, um die Benzyl-Schutzgruppe unter sauren Bedingungen abzuspalten (**Tabelle 15**, Eintrag 2).²⁸² Nach Aufarbeitung und Reinigung konnte das Produkt **292** nur in einer geringen Ausbeute von $< 1\%$ erhalten werden. Als dritte Variante wurde die Esterfunktion im Basischen mit LiOH hydrolysiert (**Tabelle 15**, Eintrag 3). Nach einer

3.3.5 Dockingstudie am GPRC5b

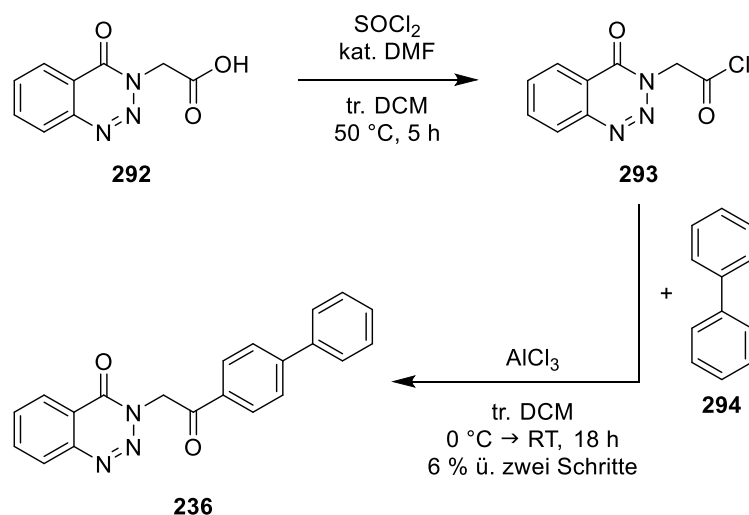
Reaktionszeit von 25 Minuten konnte die Reaktion gestoppt werden, da ein vollständiger Umsatz der Ausgangsverbindung **291** durch analytische HPLC ermittelt wurde. Nach der Entfernung des Lösungsmittels und Reinigung mittels präparativer HPLC wurde das Produkt **292** in einer Ausbeute von 76 % isoliert.

Tabelle 15: Variation der Reaktionsbedingung zur Entfernung der Benzyl-Schutzgruppe des Esters **291**.



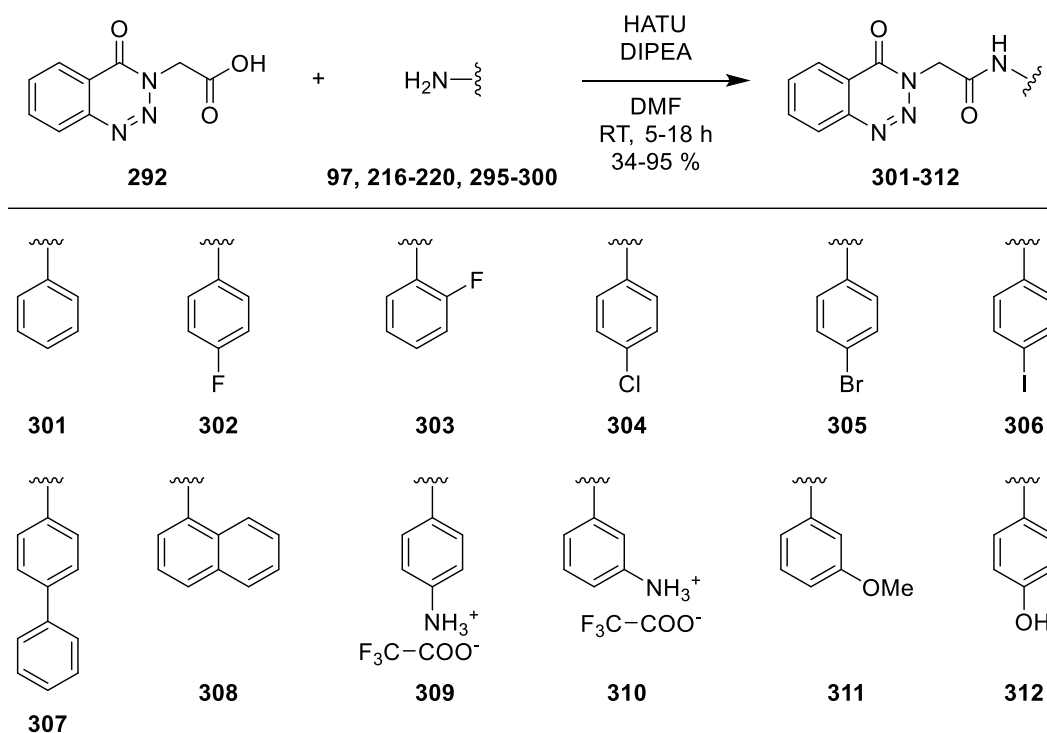
Eintrag	Reaktant	Lösungsmittel	Bedingungen	Ausbeute
1	H ₂ , Pd/C	AcOH /H ₂ O (9:1, v/v)	RT, 16 h	-
2	33 % HBr in AcOH	DCM	RT, 3 h	< 1 %
3	LiOH	THF, EtOH, H ₂ O	RT, 25 min	76 %

Im nächsten Schritt wurde die Carbonsäure **292** mit SOCl₂ und unter Zugabe einer katalytischen Menge an DMF in das Carbonsäurechlorid **293** überführt, um ein reaktives Elektrophil für die folgende FRIEDEL-CRAFTS-ACYLIERUNG zu erhalten (**Schema 44**). Im finalen Schritt wurde das erhaltene Carbonsäurechlorid **293** mit dem Biphenyl **294** und AlCl₃ als Katalysator in DCM umgesetzt. Dabei wurde durch den *ortho*- und *para*-dirigierenden Effekt des Biphenyls das *para*-Produkt **236** in einer Ausbeute von 6 % über zwei Schritte erhalten. Das *ortho*-Nebenprodukt konnte in der Analytik nicht nachgewiesen werden, da es vermutlich aufgrund der sterischen Hinderung dieser Position zur verminderten Bildung kam.



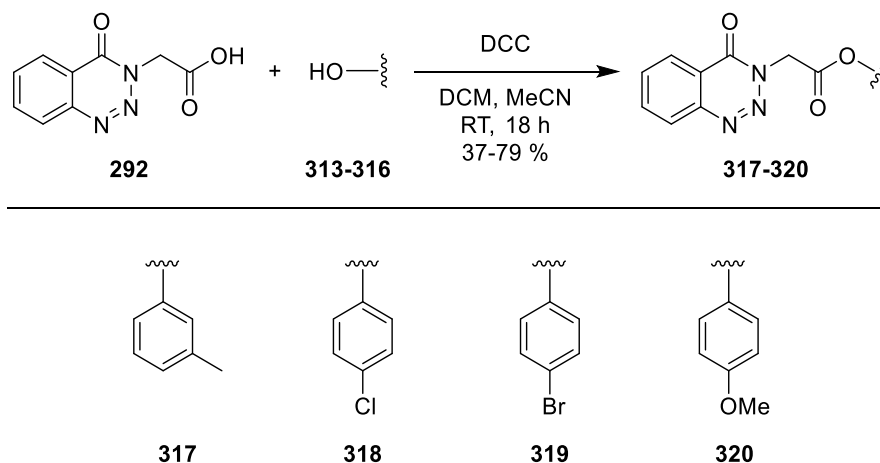
Schema 44: Synthese des Carbonsäurechlorids **293**, das im folgenden Schritt in einer FRIEDEL-CRAFTS-ACYLIERUNG zum Docking-Hit **236** umgesetzt wurde.

Nach dem Erhalt der eigentlichen Zielverbindung **236** wurden weitere Derivate dieser Grundstruktur hergestellt. Dafür sollte das Triazinon-Motiv beibehalten werden, da alle im Docking identifizierten Wasserstoffbrückenbindungen mit dem GPRC5b über dieses Strukturmotiv ausgebildet werden (**Abbildung 41C**). Daher wurden Modifikationen am Biphenyl-Rest vorgenommen. Für diese Derivatisierung konnte nicht die identische Synthese wie für Verbindung **236** verwendet werden, da die Position des elektrophilen Angriffs im letzten Schritt der Synthese durch die Einführung von Substituenten am Biphenyl-Motiv beeinflusst wird. Daher ist die gezielte Synthese spezifisch substituierter Biphenyl-Derivate auf diese Weise nicht möglich. Aus diesem Grund wurde die Carbonsäurefunktion der Zwischenstufe **292** mit Anilin- bzw. Benzoesäure-Derivaten gekuppelt, wodurch als Linker eine Amid- bzw. Esterbindung anstatt des Ketons erhalten wurde. In einem erneuten Docking der Arbeitsgruppe KOLB, in dem Phenyl-Amid- bzw. Phenyl-Ester-Derivate untersucht wurden, konnten die Amide **301-312** und die Ester **317-320** als geeignete Verbindungen identifiziert werden. Zur Synthese der Amide **301-312** wurde die Carbonsäure **292** in einer HATU-Kupplung mit den entsprechenden Anilin-Derivaten (**92, 216-220, 295-300**) umgesetzt (**Schema 45**).



Schema 45: Darstellung der Amid-Derivat **301-312** durch HATU-Kupplung der Carbonsäure **292** mit den entsprechenden Anilin-Derivaten (**92, 216-220, 295-300**).

Für den Erhalt der Ester-Derivate **317-320** wurde das Intermediat **292** mit den Phenolen **313-316** unter Verwendung der Kupplungsreagenz DCC gekuppelt (**Schema 46**).



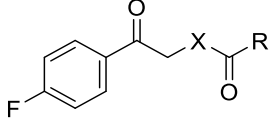
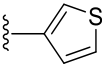
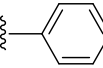
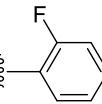
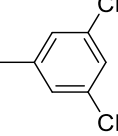
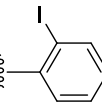
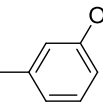
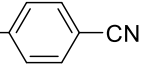
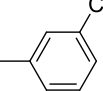
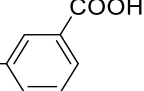
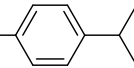
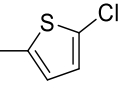
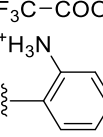
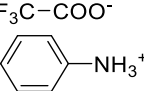
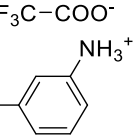
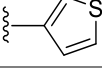
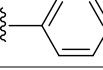
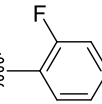
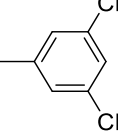
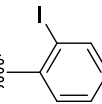
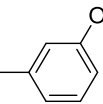
Schema 46: Synthese der Ester-Derivate **317-320** durch Kupplung mit DCC.

3.3.5.3 Biologische Charakterisierung

Im Verlauf der Synthese der GPRC5b-Docking-Hits (**235, 236**) und deren Derivate wurde von der Arbeitsgruppe BÜNEMANN ein Assay für den GPRC5b zur Testung der dargestellten Verbindungen geplant. Ein Überblick der synthetisierten Verbindungen ist in **Tabelle 16** und **Tabelle 17** gegeben. Jedoch konnte bislang kein funktionsfähiges Testsystem etabliert werden,

weswegen die Verbindungen noch nicht am Zielrezeptor untersucht werden konnten. Bisher wurden die dargestellten Verbindungen auch noch nicht an den etablierten Assay-Systemen des ET_BR und FFAR3 getestet, da die Verbindungen wie am Anfang des Kapitels beschrieben, in die extrazelluläre Bindetasche des GPRC5b gedockt wurden und diese sich stark von den orthosterischen Bindetaschen des ET_BR und FFAR3 unterscheidet. Folglich können diese Derivate lediglich als Screening-Verbindungen für den ET_BR und FFAR3 dienen.

Tabelle 16: Übersicht der synthetisierten Derivate des Docking-Hits **235**.

					
Nr.	X	R	Nr.	X	R
235	O		251	O	
252	O		253	O	
254	O		255	O	
256	O		257	O	
258	O		259	O	
260	O		267	O	
268	O		269	O	
272	NH		273	NH	
274	NH		275	NH	
276	NH		277	NH	

3.3.5 Dockingstudie am GPRC5b

278	NH		279	NH	
280	NH		281	NH	
282	NH		287	NH	
288	NH				

Tabelle 17: Überblick der synthetisierten Derivate des Docking-Hits **236**.

Nr.	R		Nr.	R	
236			301		
302			303		
304			305		
306			307		
308			309		
310			311		
312			317		
318			319		
320					

3.3.6 Fazit

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 48 Derivate auf Grundlage der drei ET_BR-Dockingstudien synthetisiert und analytisch charakterisiert. Darüber hinaus wurden die zwei bekannten allosterischen GPCR-Modulatoren **202** und **203** und sechs daraus abgeleitete Derivate hergestellt. In der biologischen Testung wurden alle Verbindungen, außer die KS5 Docking-Hits **228** und **235** sowie die Verbindungen, die während der Messung präzipitierten, in dem G-Protein-Bindungs- und Rezeptorsensor-Assay am ET_BR von KATHARINA BECKER auf ihre biologische Aktivität untersucht. Dabei konnte für keine Verbindung eine bestätigte Aktivität festgestellt werden. Die zusätzliche Testung ausgewählter Verbindungen am FFAR3 von UURTUYA HOCHBAN erbrachte vergleichbare Resultate. Außerdem wurden weitere 44 Derivate basierend auf der Dockingstudie am Orphan-Rezeptor GPRC5b synthetisiert, die mangels eines etablierten Assays bislang noch nicht auf ihre Wirksamkeit untersucht werden konnten. Demnach konnte im Verlauf dieser Arbeit trotz des großen synthetischen Aufwands bisher keine Verbindung identifiziert werden, die am ET_BR oder FFAR3 eine biologische Aktivität zeigt.

Ein mögliches Problem könnte im verwendeten Homologiemodell der aktiven ET_BR-Struktur liegen, das für die Dockingstudien verwendet wurde und Unterschiede zur kürzlich publizierten aktiven ET_BR-Kristallstruktur aufweist.⁷² Diese Unterschiede sind in der Überlagerung beider aktiven ET_BR-Strukturen aus dem Homologiemodell und der Kristallstruktur ersichtlich (**Abbildung 42A**), in der eine Verschiebung der TM6 und TM7 festgestellt wurde. Außerdem differiert die räumliche Lage verschiedener Aminosäuren in der G-Protein-Bindungsstelle wie Y387 und N134, die in den Dockingstudien an Wechselwirkungen mit potentiellen Liganden beteiligt sind. Speziell im Falle der Aminosäure Y387, die unter anderem in der zweiten Dockingstudie an der G-Protein-Bindestelle mit den drei Docking-Hits **105-107** wechselwirkt (**Kapitel 3.3.2, Abbildung 35**), ist die Seitenkette nicht nach innen in die Bindetasche, sondern entgegengesetzt nach außen gerichtet (**Abbildung 42B**). Des Weiteren sind ebenfalls kleinere räumliche Unterschiede der Aminosäuren-Seitenketten wie im Beispiel der Aminosäure N134 vorhanden (3.5 Å Entfernung der Amidstickstoffe der Seitenkette, **Abbildung 42C**), die im Docking eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Docking-Hit **105** ausbildet (**Abbildung 35A**).

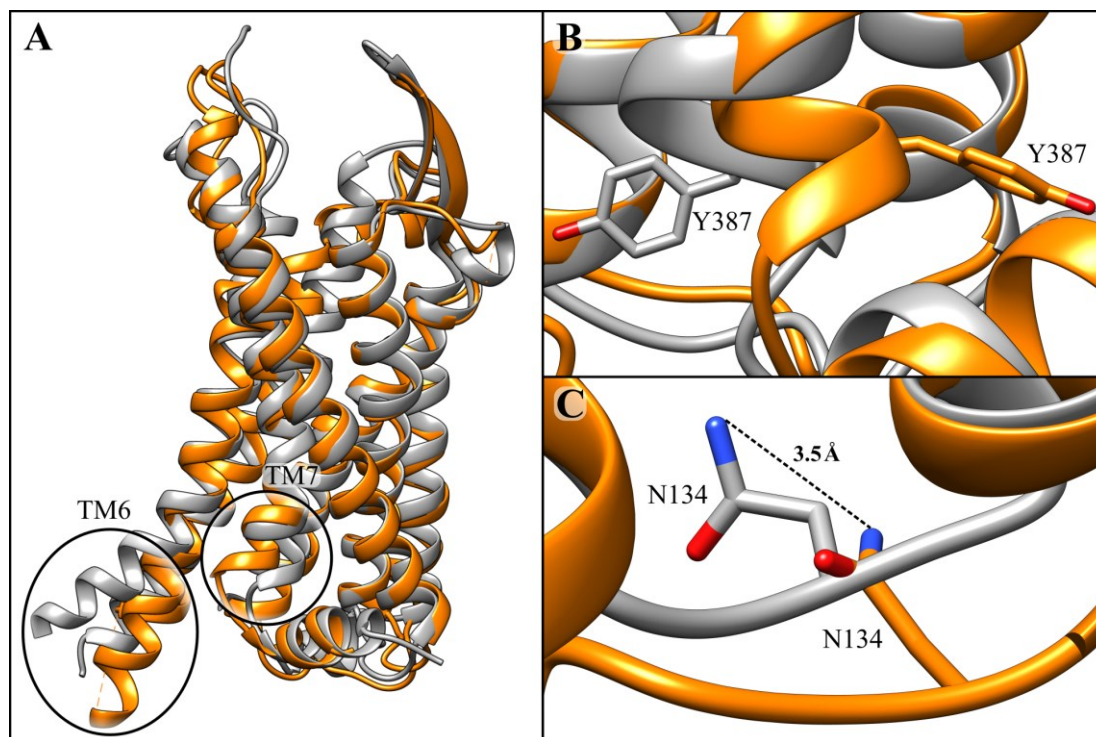


Abbildung 42: (A) Unterschiede zwischen dem überlagerten Homologiemodell der aktiven ET_BR-Struktur (grau), das zum Docking verwendet wurde, und der kürzlich publizierten aktiven ET_BR-Kristallstruktur (orange, PDB: 8HBD).⁷² Als Beispiel sind die unterschiedlichen Ausrichtungen der Aminosäuren Y387 (Bild B) und N134 (Bild C) in der G-Protein-Bindestelle gezeigt, die in den Dockingposen an der Bindung der potentielle Liganden beteiligt sein sollten (Y387 an der Bindung der Hits **76** und **105-107**, N134 an **105**).

Als weitere Ursache ist nicht auszuschließen, dass die Verbindungen eine zu geringe Affinität zum Target besitzen und in den Testungen bei einer Konzentration von 100 μ M keine biologische Aktivität zeigen. Zudem ist denkbar, dass die Verbindungen als stille allosterische Modulatoren fungieren, die trotz Bindung keinen biologischen Effekt am Rezeptor auslösen und dementsprechend in den durchgeführten Assays als unwirksam erscheinen. Ein weiterer Grund für die Probleme bei der strukturbasierten Entwicklung neuer allosterischer Liganden der GPCRs ist, dass auch heutzutage die Strukturbestimmung der Rezeptoren immer noch sehr aufwendig ist und bei weitem nicht routinemäßig gelingt. Zusammenfassend spiegelt diese Arbeit die Schwierigkeit des rationalen Designs neuer allosterischer Liganden für die GPCRs wider.

4. Zusammenfassung

Die Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) gehört zu den größten Proteinsuperfamilien im menschlichen Genom.^{2,3} Charakterisiert werden diese durch ihre Sieben-Transmembrandomänen-Struktur, die im extrazellulären Bereich die orthosterische Bindestelle und im intrazellulären Bereich die G-Protein-Bindestelle beinhaltet.⁴ Etwa 30 % der zugelassenen Arzneistoffe üben ihre pharmakologische Wirkung über GPCRs aus, was ihre hohe therapeutische Relevanz und ihre Beteiligung in einer Vielzahl physiologischer Prozesse begründet.¹ Aufgrund der meist konservierten orthosterischen Bindetasche der GPCR-Subtypen ist die Entwicklung selektiver Wirkstoffe jedoch oftmals herausfordernd.⁶⁻⁸ Demzufolge ist die Identifizierung und Adressierung allosterischer Bindestellen eine mögliche Strategie, um Wirkstoffe mit erhöhter Rezeptorselektivität und somit geringerem Nebenwirkungspotenzial zu erhalten.⁹ Als Teil des GLUE-Projekts (*G-Protein-coupled receptor Ligands of Underexplored Epitopes*) wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, für die zwei pharmakologisch relevanten Rezeptorfamilien der Endothelin-Rezeptoren (ETRs) und der Freie-Fettsäure-Rezeptoren (*Free fatty acid receptors*, FFARs) sowie des Orphan-Rezeptors GPRC5b neue allosterische Modulatoren durch einen rationalen strukturbasierten Ansatz zu entwickeln.

Zusätzlich wurde im ersten Teil der Arbeit für die Arbeitsgruppe DÖTSCH/BERNHARD der hochaffine ET_BR-Ligand 4Ala-ET-1 **48** über automatisierte Festphasenpeptidsynthese dargestellt (**Abbildung 43**). Dieser wurde im Folgenden *N*-terminal über das Ethylenglykol-Derivat TDDS mit Biotin modifiziert. Aufgrund der unzureichenden Löslichkeit dieser Verbindung wurde der TDDS-Linker durch zwei über die Seitenkette verknüpfte Lysine ersetzt, um einen geeigneten problemlos löslichen Liganden zur Proteinreinigung des ET_BR mittels Affinitätschromatographie zu erhalten. Darüber hinaus wurde ein fluoreszenzmarkiertes 4Ala-ET-1-Derivat synthetisiert, das in der Arbeit von UMBACH *et al.* zur Funktionalitätsuntersuchung des ET_BR verwendet wurde.²⁶⁰ Dafür wurde in der Synthese das Lysin in Position 9 des 4Ala-ET-1-Peptids **48** durch Arginin ersetzt (orange, **Abbildung 43**), um anschließend selektiv den DY-647P1-Fluorophor an den *N*-Terminus zu koppeln. Außerdem wurden für die Arbeitsgruppe BÜNEMANN drei *N*-terminal um 8, 10 bzw. 12 Aminosäuren verkürzte 4Ala-ET-1 Derivate hergestellt, die eine verringerte Affinität als das 4Ala-ET-1 **48** zum ET_BR aufweisen und als Referenzliganden in deren *in vitro*-Untersuchungen eingesetzt wurden.¹¹⁷

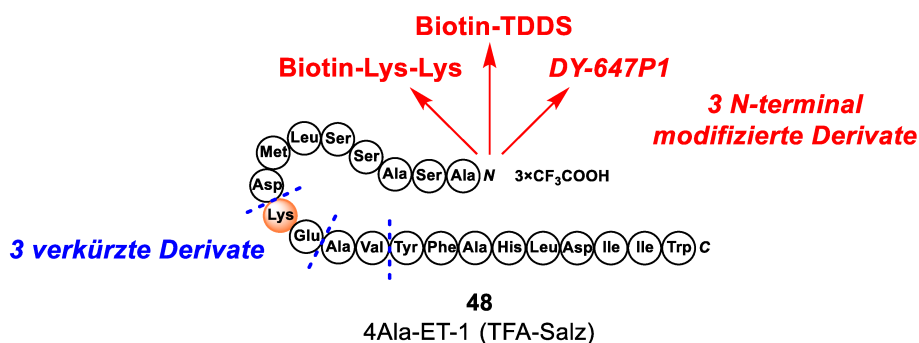


Abbildung 43: Struktur des ET_BR-Liganden 4Ala-ET-1 (TFA-Salz, **48**), der mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese hergestellt wurde. Ausgehend von dieser Grundstruktur wurden drei *N*-terminal modifizierte Derivate synthetisiert (in Rot gekennzeichnet). Zur Synthese des fluoreszenzmarkierten 4Ala-ET-1-Derivats wurde das Lysin in Position 9 (orange markiert) durch Arginin substituiert. Zusätzlich wurden drei *N*-terminal um 8, 10 bzw. 12 Aminosäuren verkürzte 4Ala-ET-1-Derivate dargestellt.

Des Weiteren wurde nach den Arbeiten von HANSEN *et al.* und PIZZONERO *et al.* der fluoreszenzmarkierte Ligand **47** in einer leicht modifizierten 11-stufigen Synthese dargestellt, der als FFAR2-Referenzligand für das GLUE-Projekt dienen sollte (**Abbildung 44**).^{225,258} Darüber hinaus wurde das blau markierte Grundgerüst der Verbindung **47**, das als Zwischenstufe im Verlauf der Totalsynthese erhalten wurde, mit dem Ethylenglykol-Derivat TOTA und Biotin modifiziert, um einen entsprechenden FFAR2-Liganden zur Proteinreinigung zu erhalten.

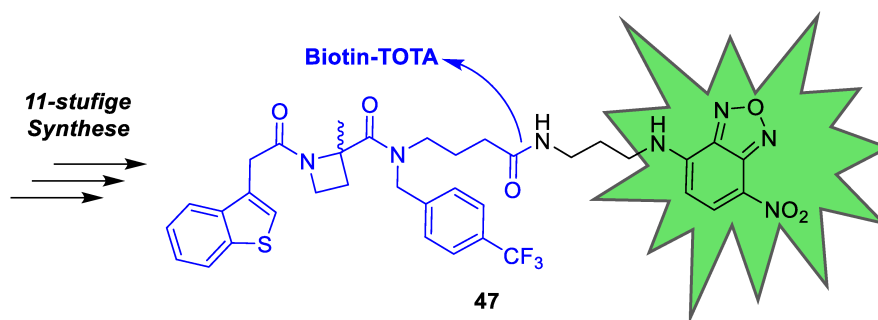


Abbildung 44: Struktur des fluoreszenzmarkierten FFAR2-Liganden **47** mit dem grün unterlegten NBD-Fluorophor. Die blau markierte Grundstruktur der Verbindung **47** wurde über das Ethylenglykol-Derivat TOTA mit Biotin modifiziert.

Im dritten und umfangreichsten Teil der Arbeit wurden auf Grundlage der computergestützten Docking-Untersuchungen von MARGHERITA PERSECHINO und JANIK HEDDERICH aus der Arbeitsgruppe KOLB mögliche allosterische Liganden ausgewählt, deren Synthese geplant und durchgeführt und die Verbindungen analytisch charakterisiert.

Basierend auf den Ergebnissen der Dockingstudien, die sich auf die G-Protein-Bindungstasche des ET_BR fokussierten, wurden die Zielverbindungen **84**, **102**, **105**, **106** und **107** synthetisiert (**Abbildung 45**). Ausgehend von diesen Verbindungen wurden insgesamt 41 weitere Derivate

hergestellt, die sich von der jeweiligen Grundstruktur in den rot markierten Strukturelementen unterscheiden. Darüber hinaus wurde in einer weiteren Dockingstudie die *known site* (KS) 5 des ET_BR als mögliche allosterische Bindungsstelle ausgewählt, die als Grundlage der synthetisierten Docking-Hits **228** und **234** diente. Im Anschluss wurden die Zielverbindungen durch KATHARINA BECKER und UURTUYA HOCHBAN in der Arbeitsgruppe BÜNEMANN auf ihre biologische Aktivität *in vitro* bei einer Konzentration von 100 μ M am ET_BR und am strukturverwandten FFAR3 untersucht. Dafür wurden Förster-Resonanzenergietransfer-(FRET) basierte G-Protein-Bindungs- und Rezeptorsensor-Assays verwendet. In dieser biologischen Charakterisierung konnte für keine der dargestellten Zielverbindungen der G-Protein-Bindetasche und der KS5 eine Aktivität am ET_BR und FFAR3 festgestellt werden.

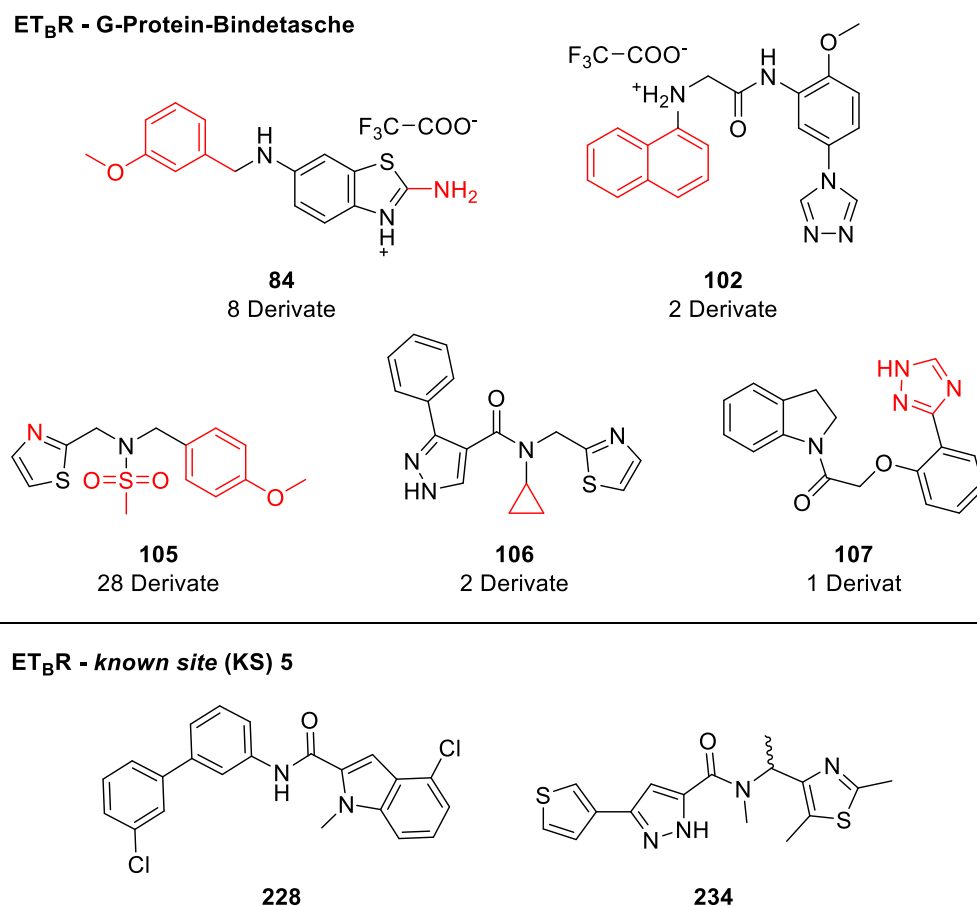


Abbildung 45: Strukturen der synthetisierten Zielverbindungen aus den Dockingstudien für die G-Proteinbindetasche (obere Strukturen) bzw. die *known site* (KS) 5 (untere Strukturen) des ET_BR. In Rot sind die Strukturelemente markiert, die zusätzlich derivatisiert wurden.

Im Zuge einer alternativen Strategie zur Identifizierung allosterischer Modulatoren der GLUE-Zielrezeptoren wurden die GPCR-Liganden **202** (allosterischer Modulator des Cannabinoid-Rezeptors 1) und **203** (allosterischer Modulator des β_2 -Adrenozeptors) nach den entsprechenden literaturbekannten Synthesen dargestellt (**Abbildung 46**).^{271–274,276} Diese

wurden als GPCR-Liganden der Familie A, der auch der ET_BR und FFAR3 angehören, hinsichtlich ihrer Aktivität an diesen beiden GLUE-Targets untersucht. Basierend auf der Verbindung **202** wurde ein weiteres Derivat synthetisiert, das anstelle der Ethyl-Gruppe nur einen Wasserstoff trägt. Bei der Derivatisierung der Verbindung **203** wurden fünf substituierte Phenyl-Derivate anstelle der unsubstituierten Phenylgruppe eingeführt. In der anschließenden *in vitro*-Untersuchung stellten sich die allosterischen GPCR-Liganden **202** und **203** sowie ihre Analoga jedoch am ET_BR und FFAR3 als inaktiv heraus.

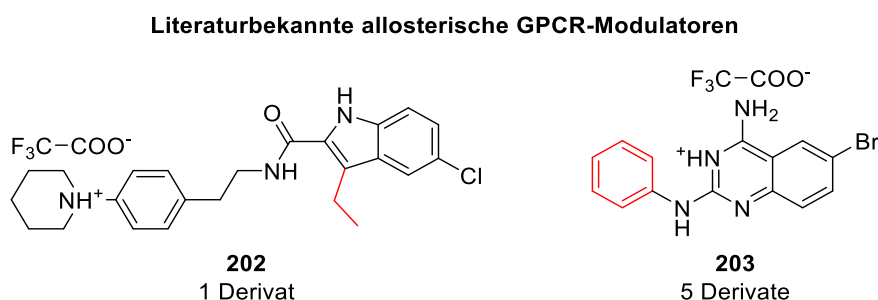


Abbildung 46: Strukturen der bekannten allosterischen Modulatoren **202** und **203**, die im Rahmen dieser Arbeit nachsynthetisiert wurden.^{271,272} In Rot sind die Strukturelemente markiert, die weiter variiert wurden.

Darüber hinaus wurde im Rahmen dieser Arbeit an einer Dockingstudie des Orphan-Rezeptors GPRC5b gearbeitet, bei der die extrazelluläre Bindetasche adressiert wurde. Aus diesem Docking wurden das Thiophen **235** und das Benzotriazinon **236** ausgewählt und synthetisiert (**Abbildung 47**). Bei der anschließenden Derivatisierung wurde der Thiophen-Rest der Verbindung **235** variiert und ein Carbonsäureamid anstelle des Esters eingeführt. Für den Docking-Hit **236** wurde das Biphenyl-Strukturelement substituiert. Insgesamt wurden 42 Derivate auf Grundlage dieser beiden Docking-Hits hergestellt und analytisch charakterisiert. Die geplante Etablierung eines GPRC5b-Testsystems in der Arbeitsgruppe BÜNEMANN ist bisher nicht gelungen, daher konnten die synthetisierten Verbindungen noch nicht *in vitro* untersucht werden.

GPCR5b - extrazelluläre Bindetasche

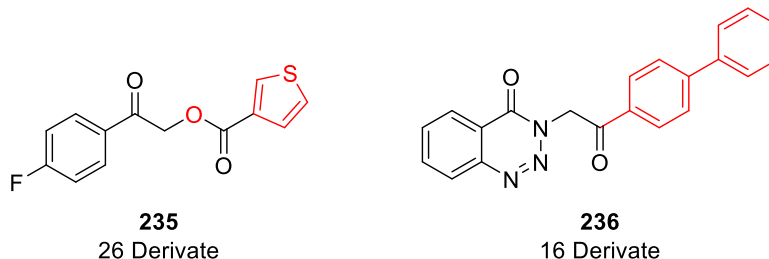


Abbildung 47: Strukturen der synthetisierten Docking-Hits **235** und **236**, die in die extrazelluläre Bindetasche des GPCR5b gedockt wurden. Basierend auf diesen Grundstrukturen wurden insgesamt 42 Derivate hergestellt, die sich in den rot markierten Strukturelementen unterscheiden.

Zusammenfassend wurden acht peptidische ET_BR-Liganden und zwei niedermolekulare FFAR2-Liganden synthetisiert und für die Untersuchung der GLUE-Zielrezeptoren zur Verfügung gestellt. Des Weiteren wurde basierend auf den computergestützten Arbeiten der Arbeitsgruppe KOLB die Synthese von 11 Grundstrukturen potentieller GPCR-Liganden und deren Derivate geplant und durchgeführt. Dabei konnten insgesamt 100 Zielverbindungen hergestellt und analytisch charakterisiert werden. Trotz des hohen synthetischen Aufwands konnte bislang keine Verbindung identifiziert werden, die *in vitro* eine biologische Aktivität an einem der GLUE-Targets zeigt. Unabhängig von einer Wirkung konnte bisher auch noch keine Bindung der Liganden an einem der GPCRs nachgewiesen werden. Allerdings steht die Etablierung des GPCR5b-Assays und damit die Testung einiger Verbindungen noch aus, die weitere Erkenntnisse für das GLUE-Projekt erbringen wird.

5. Experimenteller Teil

5.1 Material und Methoden

5.1.1 Allgemeine Informationen

Alle durchgeführten Schutzgasreaktionen wurden unter einer inerten Argon-Atmosphäre mittels gängiger Schlenk-Arbeitstechniken und mit ausgeheizten Glasgeräten durchgeführt. Für alle Reaktionen wurde eine magnetische Rührung verwendet. Flüssigkeiten wurden mit handelsüblichen Spritzen der Firma *B. Braun* oder Mikropipetten zugegeben. Bei Extraktionen wurde das Produkt dreimal aus der wässrigen Phase extrahiert, falls es nicht näher in der Versuchsdurchführung beschrieben wurde.

Sämtliche Chemikalien wurden von den Firmen *BLDpharm*, *Sigma Aldrich*, *Tokyo Chemical Industry*, *Alfa Aesar*, *Thermo Fisher Scientific*, *Rapp Polymere*, *Chembridge*, *Fluorochem*, *Acros*, *Iris Biotech*, *Nova Biochem*, *Enamine*, *Glentham Life Sciences* und *Fluka* bezogen. Alle Lösungsmittel wurden mit dem Reinheitsgrad *HPLC-grade* oder *pro analysis* erworben und ohne weitere Reinigung verwendet. Bei Reaktionen und Aufarbeitungen wurde demineralisiertes Wasser eingesetzt. Für die NMR-Analytik wurden die deuterierten Lösungsmittel DMSO- d_6 und $CDCl_3-d$ von den Firmen *Sigma Aldrich* und *deutero* erworben. Für alle Schutzgasreaktionen wurden trockene Lösungsmittel der Firmen *Acros* und *Sigma Aldrich* benutzt und in einem Gefäß mit Septum unter einer Argon-Atmosphäre (ggf. mit Molsieb) gelagert. Das verwendete Reinstwasser wurde mit einer NOWA pure select-Anlage (KSN Wassertechnik, Nistertal, Deutschland) gereinigt.

Zur Berechnung der Molekulargewichte der Peptide wurde nach der Reinigung mittels präparativer HPLC für jede basische Gruppe ein TFA als Gegenion hinzugerechnet. Bei nicht-peptidischen Verbindungen wurde mithilfe der NMR-Analytik und pK_s -Berechnungen mit MarvinSketch (ChemAxon Ltd., Version 22.22) die Ladung der basischen Gruppen bestimmt.

Bei allen Endstufen wurde eine Reinheit von $\geq 95\%$ bei 220 nm mittels analytischer HPLC bestimmt.

5.1.2 Dünnschicht- und Säulenchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Aluminium DC-Platten (Kieselgel 60 F₂₅₄) der Firma *Merck* verwendet. Die Detektion der Verbindungen erfolgte durch Fluoreszenzlöschung unter einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm. Für die säulenchromatographische

Trennung von Verbindungsgemischen wurde Kieselgel 60 (0.015-0.040 mm) der Firma *Merck* benutzt.

5.1.3 Analytische HPLC

Die analytischen HPLC-Analysen erfolgten an zwei verschiedenen Systemen:

1. HPLC-System 1A: Hitachi Primaide (Hitachi Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland) mit einem Primaide 1110 Pumpenmodul, einem 1210 Auto-Injektor, einem 1410 Diodenarray-Detektor und einem 1310 Säulenofen mit einer C₁₈-Säule (Nucleodur, 5 µm, 100 Å, 4.6 mm × 250 mm, *Macherey-Nagel GmbH & Co. KG*, Düren, Deutschland).

2. HPLC-System 2A: Shimadzu LC-10A (*Shimadzu Deutschland GmbH*; Duisburg, Deutschland) mit einem SCL-10AVP System Controller, einem SIL10AXL Auto-Injektor, einem SPD-M10AVP Diodenarray-Detektor, zwei LC-10ATVP Pumpen, einem DGU-14A Entgaser und einem CTO-10A Säulenofen mit einer C₁₈-Säule (Nucleodur, 5 µm, 100 Å, 4.6 mm × 250 mm, *Macherey-Nagel GmbH & Co. KG*, Düren, Deutschland).

Die erhaltenen Chromatogramme wurden beim HPLC-System 1A mit der EZChrom Elite und bei dem HPLC-System 2A mit der Shimadzu Class-VP 7.1 Software ausgewertet. Für die Messungen wurden als Laufmittel Reinstwasser mit 0.1 % TFA (Laufmittel A) und MeCN mit 0.1 % TFA (Laufmittel B) verwendet. Die Messungen wurden bei linearen Gradienten (Methode A: Anstieg 1 % Laufmittel B pro Minute; Methode B: 2 % Laufmittel B pro Minute) und einer Flussrate von 1 mL pro Minute durchgeführt. Die Detektion der Verbindungen erfolgte bei 220 - 450 nm. Die Startbedingungen (Laufmittel B in %) wurden an die jeweiligen Verbindungen angepasst. Die Reinheit der Zwischen- und Endverbindungen wurde aus der HPLC-Detektion bei 220 nm mittels Integration bestimmt.

5.1.4 Präparative HPLC

Die präparativen HPLC-Trennungen erfolgten an zwei verschiedenen Systemen:

1. HPLC-System 1P: HPLC-Anlage der Firma *Knauer*, ausgestattet mit einer *Knauer* P2.1L Pumpe, einem Foxy R1/R2 Fraktionskollektor, einem *Knauer* UVD2.1L Detektor und einer C₁₈-Säule (Nucleodur, 5 µm, 100 Å, 32 × 250 mm, *Macherey-Nagel GmbH & Co. KG*, Düren, Deutschland).

2. HPLC-System 2P: HPLC-Anlage der Firma *Varian* mit zwei *Varian* Prep Star Modell 218 Pumpen, einem *Varian* Pro Star Modell 320 Detektor, einem *Varian* Modell 701

Fraktionskollektor und einer C₁₈-Säule (Nucleodur, 5 µm, 100 Å, 32 × 250 mm, *Macherey-Nagel GmbH & Co. KG*, Düren, Deutschland).

Als Laufmittel wurde analog der analytischen HPLC ein Gemisch aus Laufmittel A und Laufmittel B verwendet. Für die präparative Trennung wurde bei beiden Systemen ein linearer Gradient mit einer Flussrate von 20 mL/min und einem Anstieg von 0.5 % Laufmittel B pro Minute genutzt. Die Startbedingungen (Laufmittel B in %) wurden von der mittels analytischen HPLC bestimmten Zusammensetzung des Gradienten (Laufmittel B in %) abgeleitet, bei der die Zielverbindung eluierte. In der Regel wurde die präparative Trennung mit einem Gradienten gestartet, dessen Anteil an Laufmittel B um 20 % erniedrigt ist. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 220 nm. Die Verbindungen wurden aus Reinstwasser oder Gemischen aus Reinstwasser und *tert*-BuOH (< 80 %) oder MeCN (< 25 %) an einer Alpha 2-4 LDplus Gefriertrocknungs-anlage (*Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH*, Osterode am Harz, Deutschland) lyophilisiert.

5.1.5 Massenspektrometrie

Die Elektrospray-Ionisationsspektren (ESI-Spektren) wurden an einem QTrap 2000 ESI-Massenspektrometer (*Life Technologies GmbH*, Darmstadt, Deutschland) aufgenommen. Die hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS) erfolgte an einem micrOTOF-Q III ESI Massenspektrometer (*Bruker Daltonics*, Billerica, Massachusetts, USA). Die ESI und HRMS-Messungen wurden von der massenspektrometrischen Abteilung des Fachbereichs Pharmazie der Phillips-Universität Marburg durchgeführt.

5.1.6 NMR-Spektroskopie

Die ¹H- und ¹³C-NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden an den ECX400 (Messfrequenz: ¹H: 400 MHz, ¹³C: 101 MHz) und ECA500 (Messfrequenz: ¹H: 500 MHz; ¹³C: 126 MHz) NMR-Spektrometern (*JEOL Mtd.*, Tokio, Japan) gemessen. Für die Messungen wurden die Proben in DMSO-d₆ oder CDCl₃-d gelöst. Bei der Auswertung wurde als Referenzsignal das jeweilige Lösungsmittel verwendet (DMSO-d₆ ¹H: 2.50 ppm ¹³C: 39.52 ppm; CDCl₃-d ¹H: 7.26 ppm ¹³C: 77.16 ppm). Die chemische Verschiebung δ ist in parts per million (ppm) und die Kopplungskonstante *J* in Hertz (Hz) angegeben. Folgende Abkürzungen wurden für die Multiplizitäten verwendet: s (Singulett), d (Dublett), dd (Dublett von Dubletts), t (Triplet), td (Triplet von Dubletts), q (Quartett), quin (Quintett), hept (Heptett) und m (Multipllett).

5.1.7 Mikrowellensynthese

Die Mikrowellensynthesen wurden in 10 mL Druckgefäßen in einer Discover SP Labormikrowelle (*CEM GmbH*, Kamp-Lintfort, Deutschland) durchgeführt.

5.1.8 Biologische Charakterisierung

Die biologische Charakterisierung der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen wurde von KATHARINA BECKER und UURTUYA HOCHBAN aus der Arbeitsgruppe BÜNEMANN durchgeführt. Für die Aktivitätsbestimmung wurden ein FRET-basierter G-Protein-Bindungs- und Rezeptorsensor-Assay verwendet, die nachfolgend erläutert werden. Detailliertere Beschreibungen der verwendeten Methoden wurden in der Dissertationen von KATHARINA BECKER und werden noch in der Arbeit von UURTUYA HOCHBAN beschrieben.²⁸³

5.1.8.1 G-Protein-Bindungs-Assay

Für den G-Protein-Bindungs-Assay in permeabilisierten Zellen wurde der entsprechende GPCR mit C-terminaler Fluoreszenzmarkierung (mCitrine am ET_BR und FFAR3) und die G-Proteine mit N-terminaler Fluoreszenzmarkierung (mTurquoise2 am ET_BR und FFAR3) der G_γ-Untereinheit verwendet. Die Durchführung sowie der zeitliche Ablauf des G-Protein-Bindungsassays ist in **Tabelle 18** dargestellt.

Tabelle 18: Protokoll der Durchführung des G-Protein-Bindungs-Assays.

Ablauf (Dauer)	ET _B R	FFAR3
1. Zugabe des Puffers	Puffer ¹ (60 Sekunden)	Puffer ¹ (30 Sekunden) GTPγS 1 μM (10 Sekunden) Puffer ¹ (20 Sekunden)
2. Applikation der Testverbindung	Testverbindung 100 μM (30 Sekunden)	Testverbindung 100 μM (30 Sekunden)
3. Applikation der Testverbindung und des Agonisten	Testverbindung 100 μM + ET-1 10 nM (30 Sekunden)	Testverbindung 100 μM + Propionsäure 300 μM (60 Sekunden)
4. Waschen	-	Puffer ¹ (60 Sekunden)
5. Applikation des Agonisten	ET-1 10 nM (30 Sekunden)	Propionsäure 300 μM (60 Sekunden)
6. Waschen	-	Puffer ¹ (60 Sekunden) GTPγS 1 μM (20 Sekunden)

¹Der Puffer beinhaltet: Kaliumaspartat 100 mM, KCl 30 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 10 mM und EGTA 5 mM in H₂O (pH = 7.3).

In dem Experiment kommt es bei Aktivierung des Rezeptors und daraus resultierender Bildung des GPCR-G-Protein-Komplexes zu einem Anstieg der FRET-Emissionsratio durch die räumliche Annäherung der Fluorophore. Der gebildete Komplex kann durch Zugabe von GTP γ S, das zur Dissoziation des G-Proteins führt, oder durch langsames Auswaschen des Agonisten mit Puffer gespalten werden, was wieder zur Abnahme der FRET-Emissionsratio führt. Zur Veranschaulichung ist der von UURTUYA HOCHBAN erstellte Graph der Testung der inaktiven Verbindung **139** im G-Protein-Bindungs-Assay am FFAR3 dargestellt (**Abbildung 48**).

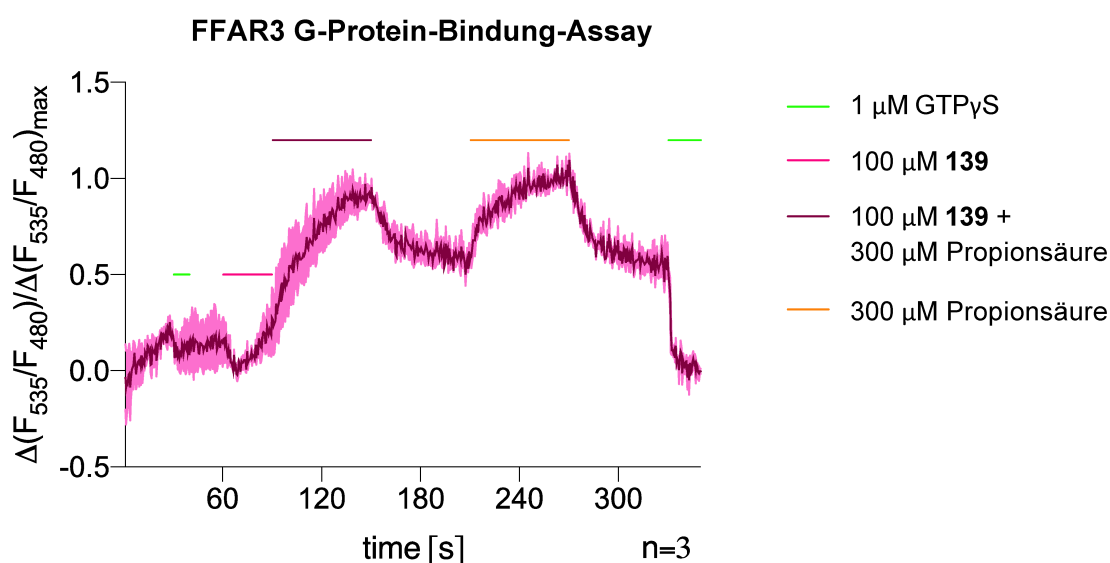


Abbildung 48: Verlauf des G-Protein-Bindungs-Assays der Verbindung **139**. Der Graph wurde von UURTUYA HOCHBAN erstellt und zur Verfügung gestellt. Propionsäure dient als FFAR3-Agonist.

5.1.8.2 Rezeptorsensor-Assay

Für den Rezeptorsensor-Assay in permeabilisierten Zellen wurden der ET_BR und FFAR3 mit Fluoreszenzmarkierungen am ICL3 (eYFP am ET_BR, mCitrine am FFAR) und am C-Terminus (mTurquoise2 am ET_BR und FFAR3) eingesetzt. Die Durchführung sowie der zeitliche Ablauf des Rezeptorsensor-Assays ist in **Tabelle 19** zusammengefasst.

Tabelle 19: Protokoll der Durchführung des Rezeptorsensor-Assays.

Ablauf (Dauer)	ET _B R	FFAR3
1. Zugabe des Puffers	Puffer ¹ (60 Sekunden)	Puffer ¹ (30 Sekunden)
2. Applikation der Testverbindung	Testverbindung 100 µM (30 Sekunden)	Testverbindung 100 µM (30 Sekunden)
3. Applikation der Testverbindung und des Agonisten	Testverbindung 100 µM + ET-1 10 nM (60 Sekunden)	Testverbindung 100 µM + Propionsäure 300 µM (30 Sekunden)
4. Waschen	-	Puffer ¹ (30 Sekunden)
5. Applikation des Agonisten	ET-1 10 nM (30 Sekunden)	Propionsäure 300 µM (30 Sekunden)
6. Waschen	-	Puffer ¹ (30 Sekunden)

¹Der Puffer beinhaltet: Kaliumaspartat 100 mM, KCl 30 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 10 mM und EGTA 5 mM in H₂O (pH = 7.3).

Innerhalb der Messung wurde durch eine Aktivierung des Rezeptors und der daraus resultierenden Auswärtsbewegung der TM6 eine Abnahme der FRET-Emissionsratio detektiert, da die Fluorophore durch diese Konformationsänderung räumlich voneinander entfernt wurden. Zur Veranschaulichung ist der von UURTUYA HOCHBAN erstellte Graph der inaktiven Verbindung **139** im Rezeptorsensor-Assay am FFAR3 gezeigt (**Abbildung 49**).

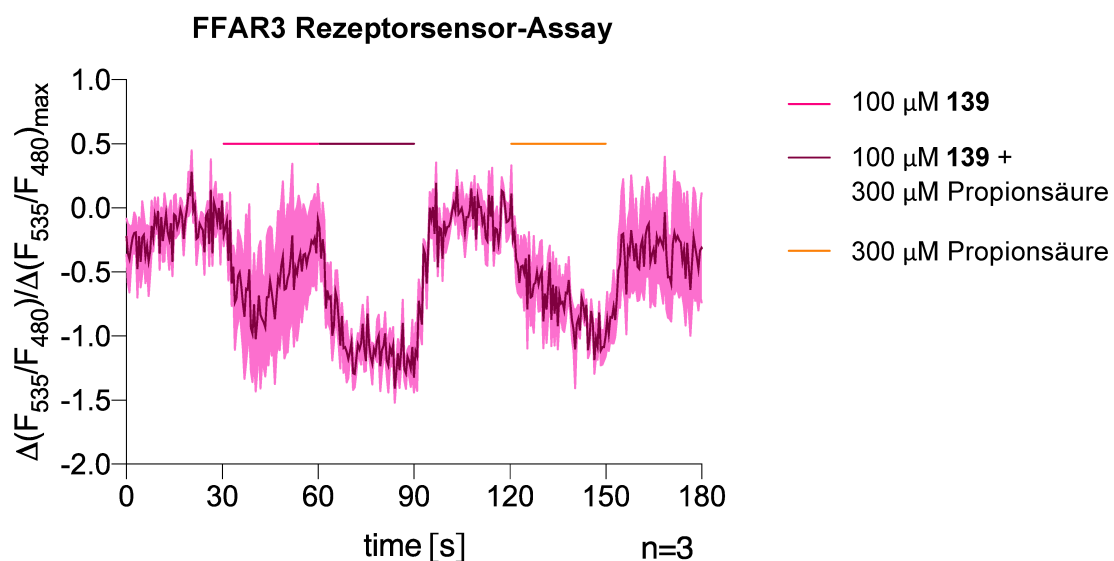


Abbildung 49: Verlauf des Rezeptorsensor-Assays der Verbindung **139**. Der Graph wurde von UURTUYA HOCHBAN erstellt und zur Verfügung gestellt. Propionsäure dient als FFAR3-Agonist.

5.1.9 Festphasenpeptidsynthese

Für die Festphasenpeptidsynthese wurde ein Standard-Fmoc-Protokoll verwendet. Dafür wurden Aminosäuren mit Fmoc-geschützter α -Aminogruppe und mit säurelabilen permanenten Schutzgruppen an der Seitenkette verwendet (**Tabelle 20**).

Tabelle 20: Verwendete Fmoc-Aminosäurederivate. Alle Aminosäurederivate liegen in der L-Konfiguration vor.

Amiosäurederivat	M (g/mol)	1-Buchstabencode
Fmoc-Ala-OH×H ₂ O	329.4	A
Fmoc-Asp(O ^t Bu)-OH	411.5	D
Fmoc-Phe-OH	387.4	F
Fmoc-His(Trt)-OH	619.7	H
Fmoc-Ile-OH	353.4	I
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468.5	K
Fmoc-Leu-OH	353.4	L
Fmoc-Met-OH	371.5	M
Fmoc-Glu(Trt)-OH	610.7	E
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	648.8	R
Fmoc-Ser(<i>t</i> Bu)-OH	383.4	S
Fmoc-Val-OH	339.4	V
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526.6	W
Fmoc-Tyr(<i>t</i> Bu)-OH	459.6	Y
Fmoc-TDDS-OH	542.6	-

Vorschrift A: Automatisierte Festphasenpeptidsynthese

Die automatisierte Festphasenpeptidsynthese wurde an einem Peptidsynthesizer (Syro 2000, MultiSyntech GmbH, Witten, Deutschland) in 2 mL-Spritzen aus Polypropylen mit PTFE-Fritten durchgeführt. In den 2 mL Spritzen wurden 80-100 mg des beladenen Harzes eingewogen und in dem Peptidsynthesizer platziert. Die automatische Synthese erfolgte nach einem vorprogrammierten Schema in mehreren Zyklen (**Tabelle 21**). Die Aminosäurederivate wurden in Doppelkupplungen an das Harz gekuppelt. Für die Doppelkupplungen wurden jeweils ca. 4 eq. der Fmoc-Aminosäurederivate, 4 eq. HOBt, 4 eq. HBTU und 8 eq. DIPEA

verwendet. Für die Berechnung der Stoffmengen wurden die vom Hersteller angegebenen Harzbeladungen verwendet.

Tabelle 21: Programmierung des Peptidsynthesizers für den ersten und die nachfolgenden Zyklen der automatisierten Festphasenpeptidsynthese.

Erster Zyklus

Schritt	Aktion	Reagenzien	Zyklen	Zeit (min)
1	Quellen	DMF	2	10
2	Fmoc-Abspaltung	Piperidin/DMF/NMP (1:1:1, v/v/v)	2	5+25
3	Waschen	DMF	7	1
4	Kupplung	(Fmoc-AS/HOBt/HBTU/DIPEA) ¹	2 ²	120
5	Waschen	DMF	2	1

Folgende Zyklen

Schritt	Aktion	Reagenzien	Zyklen	Zeit (min)
1	Waschen	DMF	2	1
2	Fmoc-Abspaltung	Piperidin/DMF/NMP (1:1:1, v/v/v)	2	5+15 ³
3	Waschen	DMF	7	1
4	Kupplung	(Fmoc-AS/HOBt/HBTU/DIPEA) ¹	2 ²	95
5	Waschen	DMF	2	1

¹ In der Regel im Stoffmengenverhältnis 4:4:4:8 (bezogen auf die vom Hersteller angegebene Harzbeladung) in DMF und NMP.

² Nach jedem Kupplungszyklus wurde 2× 1 min mit DMF gewaschen.

³ Ab dem 10. Zyklus: 20 Minuten bei der 2. Abspaltung.

Manuelle Festphasenpeptidsynthese

Für die manuelle Festphasenpeptidsynthese wurde das Harz aus der automatisierten Festphasenpeptidsynthese in 2, 5 oder 10 mL SPPS-Spritzen mit PTFE-Fritten überführt und 3× mit DMF gewaschen.

Vorschrift B: Fmoc-Schutzgruppen Abspaltung

Für die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen wurden folgende Schritte durchgeführt:

1. 3× waschen mit DMF
2. 20 % Piperidin in DMF (v/v) für 5 min
3. 20 % Piperidin in DMF (v/v) für 20 min
4. 9× waschen mit DMF

Vorschrift C: Kupplung der Aminosäurederivate und des Biotins

Für die Kupplung der Aminosäurederivate und Biotin wurden folgende Schritte durchgeführt:

1. Kupplung von Fmoc-TDDS-OH, Boc-Lys(Fmoc)-OH oder Biotin
2. 3× waschen mit DMF

Für die Kupplung wurde HBTU, HOBt als Additiv und DIPEA als Hilfsbase verwendet. Die verwendeten Äquivalente, Lösungsmittel und Reaktionszeiten der Kupplungen sind in der nachfolgenden Tabelle gezeigt (**Tabelle 22**).

Tabelle 22: Angabe der Stoffmengenverhältnisse der Aminosäurederivate und Biotin, des Lösungsmittels und der Reaktionszeit.

Carbonsäure	HBTU (eq)	HOBt (eq)	DIPEA (eq)	Lösungsmittel	Reaktionszeit (h)
Fmoc-TDDS-OH	2.5	2.5	5	DMF	3
Boc-Lys(Fmoc)-OH	3	3	6	DMF	2
Biotin	10	10	20	DMF/DMSO (1:1, v/v)	17

Vorschrift D: Simultane stark saure Abspaltung vom Harz und der permanenten Schutzgruppen

Im Anschluss an die letzte Kupplung wurde das Peptid 3× mit DMF und 3× mit DCM gewaschen und *in vacuo* getrocknet. Das trockene Harz wurde für 2.5 h mit einer Lösung aus TFA/H₂O/TIS (95/2.5/2.5, v/v/v) behandelt. Das dadurch vom Harz abgespaltene und entschützte Peptid wurde in kaltem Et₂O gefällt und zentrifugiert. Der Niederschlag wurde 2× mit Et₂O gewaschen und anschließend *in vacuo* getrocknet.

Vorschrift E: Reduktion des Methionin-Oxids zu Methionin²⁵⁹

Das Rohpeptid mit dem enthaltenen Methionin-Oxid wurde unter Argon-Atmosphäre in Reinstwasser gelöst (5 mg/mL). Zu der Lösung wurde 0.725 mmol *N*-Methylmercaptoacetamid pro mL Reinstwasser hinzugegeben und bei 37 °C für 72 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

Vorschrift F: Harzbeladung

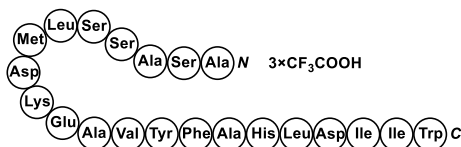
Für die Harzbeladung wurde das 2-Chlortritylchlorid-Harz (500 mg, 1.00 eq; Harzbeladung: 1.60 mmol/g) mit einer Lösung aus Fmoc-Trp(Boc)-OH (421 mg, 0.80 mmol, 1.00 eq) und DIPEA (0.56 mL, 3.20 mmol, 4.00 eq) in 5 mL tr. DCM bei Raumtemperatur für 2 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Lösung filtriert und der Feststoff mit DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1 v/v/v, 3×1 min) behandelt. Danach wurde das Harz mit DCM (2×), DMF (3×) und erneut mit DCM (4×) gewaschen und *in vacuo* getrocknet. Im Anschluss wurde die Harzbeladung mit folgender Gleichung (1) gravimetrisch bestimmt.

$$\text{Harzbeladung} = \frac{m(\text{beladenes Harz}) - m(\text{unbeladenes Harz})}{(M(\text{Fmoc-AS}) - M(\text{HCl})) * m(\text{beladenes Harz})} \quad (1)$$

5.2 Synthesevorschriften

5.2.1 Synthese der peptidischen ET_BR-Liganden

4Ala-ET-1 × 3 TFA (48)



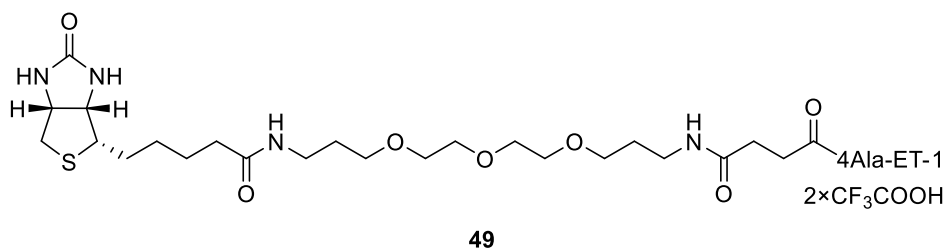
48

Das geschützte 4Ala-ET-1-Peptid wurde ausgehend von dem beladenen Fmoc-Trp(Boc)-Wang-Harz (177 mg, Beladung: 0.29 mmol/g) mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese synthetisiert (Vorschrift A). Anschließend wurde die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten (Vorschrift B) und danach das Peptid unter stark sauren Bedingungen vom Harz abgespalten und dabei vollständig entschützt (Vorschrift D). Anschließend wurde das enthaltene Methionin-Oxid des Rohpeptids zum Methionin reduziert (Vorschrift E). Das Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 9.8 mg weißer Feststoff

HPLC: 44.0 % B, Reinheit: 97.5 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₀₉H₁₆₃N₂₅O₃₂S 2366.16 (M), gef. 1184.59 (M+2H)²⁺

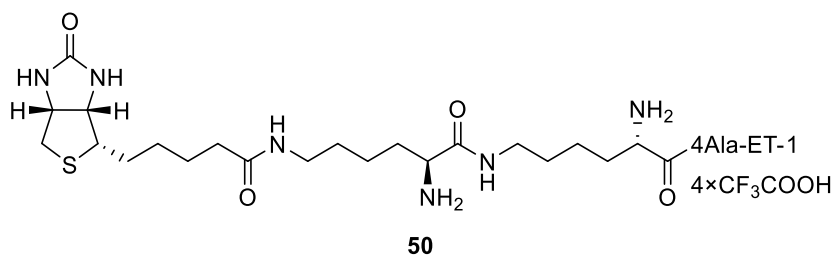
Biotin-TDDS-4Ala-ET-1 × 2 TFA (49)

Das vollständig geschützte 4Ala-ET-1-Peptid wurde ausgehend von dem beladenen Fmoc-Trp(Boc)-Wang-Harz (186 mg, Beladung: 0.29 mmol/g) mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese synthetisiert (Vorschrift A). Anschließend wurde die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und Fmoc-TDDS-OH und Biotin manuell gekuppelt (Vorschrift B und C). Das Peptid wurde unter stark sauren Bedingungen vom Harz abgespalten und vollständig entschützt (Vorschrift D). Anschließend wurde das enthaltene Methionin-Oxid des Rohpeptids zum Methionin reduziert (Vorschrift E). Wegen der schlechten Löslichkeit konnte nur ein geringer Teil des Rohpeptids mittels präparativer HPLC gereinigt werden. Die geringe Menge an Produkt konnte nur durch MS charakterisiert werden.

Ausbeute: ca. 0.1 mg weißer Feststoff

HPLC: 46.1 % B

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₃₃H₂₀₃N₂₉O₃₉S₂ 2894.42 (M), gef. 1448.55 (M+2H)²⁺

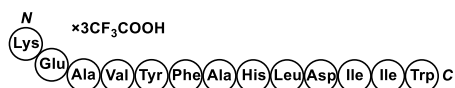
Biotin-sLys-sLys-4Ala-ET-1 × 4 TFA (50)

Das geschützte 4Ala-ET-1-Peptid wurde ausgehend von dem beladenen Fmoc-Trp(Boc)-Wang-Harz (180 mg, Beladung: 0.29 mmol/g) mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese synthetisiert (Vorschrift A). Anschließend wurde die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und Boc-Lys(Fmoc)-OH und Biotin manuell gekuppelt (Vorschrift B und C). Das Peptid wurde unter stark sauren Bedingungen vom Harz abgespalten und vollständig entschützt (Vorschrift D). Anschließend wurde das enthaltene Methionin-Oxid des Rohpeptids zum Methionin reduziert (Vorschrift E). Das Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 8.0 mg weißer Feststoff

HPLC: 43.8 % B, Reinheit: 94.3 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₃₁H₂₀₁N₃₁O₃₆S₂ 2848.43 (M), gef. 1425.82 (M+2H)²⁺

4Ala-ET-1(9-21) × 3 TFA (51)

51

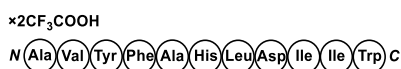
Das geschützte 4Ala-ET-1(9-21)-Peptid wurde ausgehend von dem beladenen Fmoc-Trp(Boc)-Wang-Harz (90 mg, Beladung: 0.29 mmol/g) mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese synthetisiert (Vorschrift A). Anschließend wurde die Fmoc-Schutzgruppe (Vorschrift B) und danach das Peptid unter stark sauren Bedingungen vom Harz abgespalten und dabei vollständig entschützt (Vorschrift D). Das Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 9.5 mg weißer Feststoff

HPLC: 41.1 % B, Reinheit: 92.3 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₇₉H₁₁₃N₁₇O₁₉ 1603.84 (M), gef. 1604.73 (M+H)⁺

4Ala-ET-1(11-21) × 2 TFA (52)



52

Das geschützte 4Ala-ET-1(11-21)-Peptid wurde ausgehend von dem beladenen Fmoc-Trp(Boc)-Wang-Harz (91 mg, Beladung: 0.29 mmol/g) mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese synthetisiert (Vorschrift A). Anschließend wurde die Fmoc-Schutzgruppe (Vorschrift B) und danach das Peptid unter stark sauren Bedingungen vom Harz abgespalten und dabei vollständig entschützt (Vorschrift D). Das Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 6.0 mg weißer Feststoff

HPLC: 42.9 % B, Reinheit: 99.9 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₆₈H₉₄N₁₄O₁₅ 1346.70 (M), gef. 1347.80 (M+H)⁺

4Ala-ET-1(13-21) × 2 TFA (53)

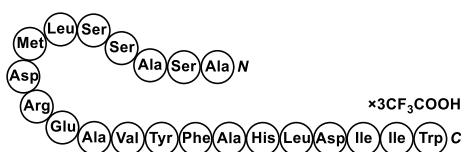
53

Das vollständig geschützte 4Ala-ET-1(13-21)-Peptid wurde ausgehend von dem beladenen Fmoc-Trp(Boc)-Wang-Harz (92 mg, Beladung: 0.29 mmol/g) mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese synthetisiert (Vorschrift A). Anschließend wurde die Fmoc-Schutzgruppe (Vorschrift B) und danach das Peptid unter stark sauren Bedingungen vom Harz abgespalten und dabei vollständig entschützt (Vorschrift D). Das Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 7.7 mg weißer Feststoff

HPLC: 41.9 % B, Reinheit: 99.9 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₆₀H₈₀N₁₂O₁₃ 1176.60 (M), gef. 1177.52 (M+H)⁺

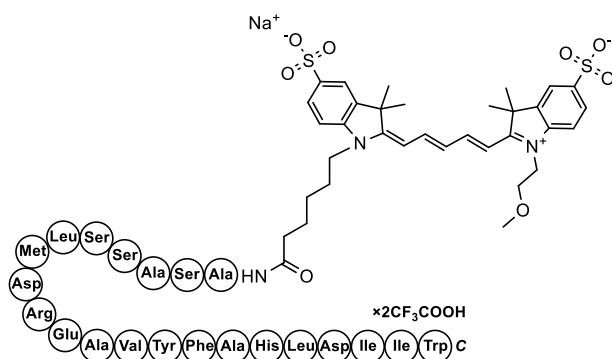
4Ala-ET-1(K9R) × 3 TFA (54)**54**

Das vollständig geschützte 4Ala-ET-1(K9R)-Peptid wurde ausgehend von dem beladenen Fmoc-Trp(Boc)-Wang-Harz (91 mg, Beladung: 0.29 mmol/g) mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese synthetisiert (Vorschrift A). Anschließend wurde die Fmoc-Schutzgruppe (Vorschrift B) und danach das Peptid unter stark sauren Bedingungen vom Harz abgespalten und dabei vollständig entschützt (Vorschrift D). Anschließend wurde das enthaltene Methionin-Oxid des Rohpeptids zum Methionin reduziert (Vorschrift E). Das Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 3.0 mg weißer Feststoff

HPLC: 44.5 % B, Reinheit: 95.0 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₀₉H₁₆₃N₂₇O₃₂S 2394.17 (M), gef. 1198.10 (M+2H)²⁺

DY647P1-4Ala-ET-1(K9R) × 2 TFA (55)**55**

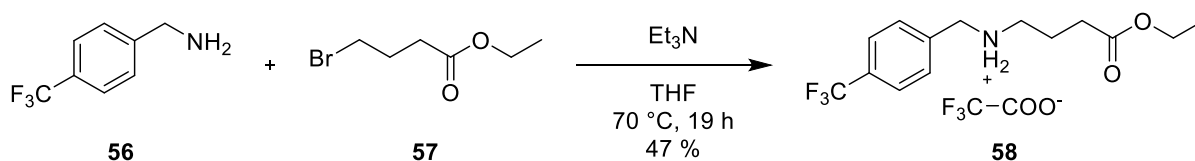
Das 4Ala-ET-1(K9R)-Peptid (**54**, 3.0 mg, 1.1 μmol , 1.0 eq) wurde in 600 μL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden DY-647P1 NHS-Ester (0.89 mg, 1.1 μmol , 1.0 eq) und DIPEA (0.93 μL , 5.5 μmol , 5.0 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 23 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Rohpeptid mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 0.3 mg blauer Feststoff

HPLC: 46.8 % B

MS (ESI⁺): m/z ber. für $\text{C}_{143}\text{H}_{202}\text{N}_{29}\text{NaO}_{40}\text{S}_3$ 3084.37 (M), gef. 1544.46 (M+2H)²⁺

5.2.2 Synthese der niedermolekularen FFAR2-Liganden

4-Ethoxy-4-oxo-N-(4-(trifluormethyl)benzyl)butan-1-ammonium-2,2,2-trifluoracetat (**58**)

4-(Trifluormethyl)benzylamin (**56**, 500 mg, 2.85 mmol, 1.00 eq) wurde in 15 mL THF gelöst. Zu der Lösung wurden Ethyl-4-brombutanoat (**57**, 491 μL , 3.43 mmol, 1.20 eq) und Et_3N (594 μL , 4.28 mmol, 1.50 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei $70\text{ }^\circ\text{C}$ für 19 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

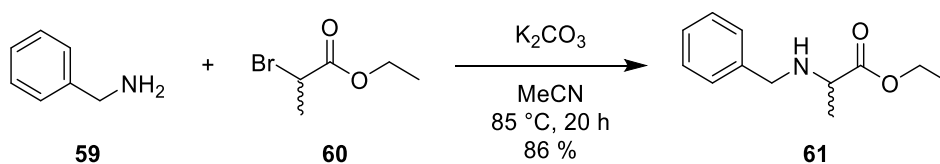
Ausbeute: 540 mg (1.34 mmol, 47 %) weißer Feststoff

HPLC: 47.6 % B, Reinheit: 81.8 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{NO}_2$ 289.13 (M), gef. 290.15 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 9.09 (s, 2H), 7.83 (d, $J = 8.1\text{ Hz}$, 2H), 7.73 (d, $J = 8.1\text{ Hz}$, 2H), 4.31 – 4.25 (m, 2H), 4.06 (q, $J = 7.1\text{ Hz}$, 2H), 3.04 – 2.95 (m, 2H), 2.43 (t, $J = 7.3\text{ Hz}$, 2H), 1.92 – 1.85 (m, 2H), 1.18 (t, $J = 7.1\text{ Hz}$, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 172.00, 158.32 (q, $J = 34.5\text{ Hz}$), 136.64 (q, $J = 1.3\text{ Hz}$), 130.67, 129.39 (q, $J = 31.9\text{ Hz}$), 125.49 (q, $J = 3.7\text{ Hz}$), 124.02 (q, $J = 272.3\text{ Hz}$), 116.22 (q, $J = 295.1\text{ Hz}$), 59.97, 49.34, 46.02, 30.29, 20.90, 14.00.

Ethyl-2-(benzylamino)propanoat (61)

Ethyl-2-bromopropanoat (**60**, 9.39 g, 51.9 mmol, 1.00 eq) wurde in 100 mL MeCN gelöst. Zu der Lösung wurden Benzylamin (**59**, 5.00 g, 46.7 mmol, 0.90 eq) und K_2CO_3 (10.8 g, 77.8 mmol, 1.50 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei 85 °C für 20 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit 50 mL EA versetzt und filtriert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (10:1 → 3:1 CH:EA) gereinigt.

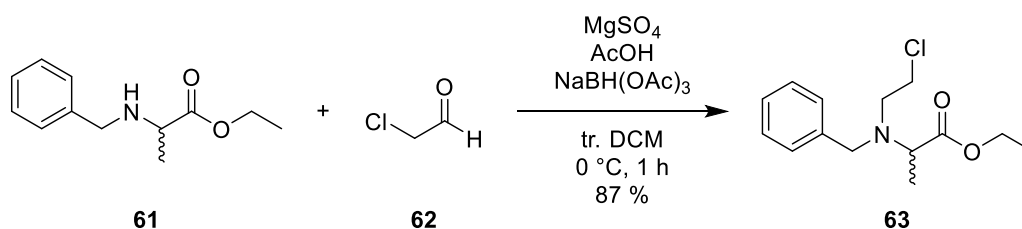
Ausbeute: 8.59 g (41.4 mmol, 86 %) gelbes Öl

HPLC: 34.6 % B, Reinheit: 93.5 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NO}_2$ 207.13 (M), gef. 208.00 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 7.36 – 7.26 (m, 4H), 7.26 – 7.18 (m, 1H), 4.09 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.72 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H), 3.58 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H), 3.24 (q, *J* = 6.9 Hz, 1H), 2.37 (s, 1H), 1.29 – 1.06 (m, 6H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 169.34, 131.78, 129.97, 129.03, 128.68, 61.97, 54.28, 48.67, 14.60, 13.80.

Ethyl-2-(benzyl(2-chlorethyl)amino)propanoat (63)

Die Chloroacetaldehyd-Lösung (**62**, 55 % in Wasser *w/w*; 2.01 mL, 14.5 mmol, 3.00 eq) wurde in 10 mL tr. DCM gegeben und mit MgSO₄ (2.90 g, 24.1 mmol, 5.00 eq) getrocknet. Die erhaltene Suspension wurde filtriert und der Rückstand mit 7 mL tr. DCM gewaschen. Das Filtrat wurde zu einer Lösung aus Ethyl-2-(benzylamino)propanoat (**61**, 1.00 g, 4.82 mmol, 1.00 eq) in 6 mL tr. DCM gegeben und auf 0 °C gekühlt. Zu der kombinierten Lösung wurden AcOH (276 µL, 4.82 mmol, 1.00 eq) und portionsweise NaBH(OAc)₃ (1.53 g, 7.24 mmol, 1.50 eq) gegeben und bei 0 °C für eine Stunde gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit ges. NaHCO₃-Lösung gequench und mit 1 M NaOH-Lösung versetzt. Das Produkt wurde aus der wässrigen Phase mit DCM extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde mit ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen und anschließend mit MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt.

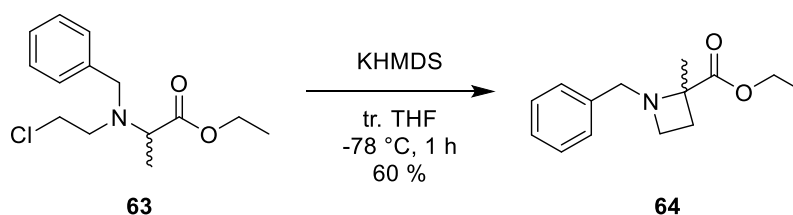
Ausbeute: 1.13 g (4.19 mmol, 87 %) gelbes Öl

HPLC: 57.8 % B, Reinheit: 90.8 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₄H₂₀ClNO₂ 269.12 (M), gef. 270.14 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.40 – 7.19 (m, 5H), 4.23 – 4.01 (m, 2H), 3.85 (d, *J* = 14.3 Hz, 1H), 3.68 (d, *J* = 14.3 Hz, 1H), 3.56 – 3.42 (m, 3H), 2.99 – 2.85 (m, 2H), 1.28 – 1.16 (m, 6H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 172.87, 139.69, 128.27, 128.13, 126.90, 59.83, 57.57, 55.38, 52.32, 42.94, 15.40, 14.18.

Ethyl-1-benzyl-2-methylazetidin-2-carboxylat (64)

Ethyl-2-(benzyl(2-chlorethyl)amino)propanoat (**63**, 1.13 g, 4.19 mmol, 1.00 eq) wurde unter Argon-Atmosphäre in 10 mL tr. THF gelöst und auf -78 °C gekühlt. Zu der Lösung wurde KHMDS (15 % in Toluol *w/w*; 9.50 mL, 6.28 mmol, 1.50 eq) über 10 Minuten hinzuge tropft und bei -78 °C für eine Stunde gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit AcOH (144 μ L, 2.51 mmol, 0.60 eq) gequenchet und das THF *in vacuo* entfernt. Zu der Lösung wurde ges. NaHCO₃-Lösung gegeben und das Produkt aus der wässrigen Phase mit DCM extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (20:1 CH:EA) gereinigt.

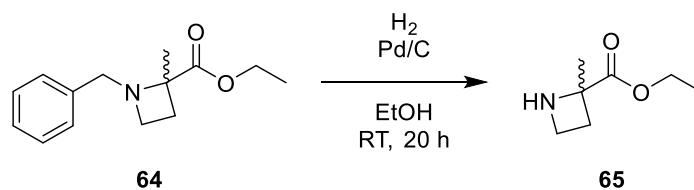
Ausbeute: 584 mg (2.59 mmol, 60 %) gelbes Öl

HPLC: 36.2 % B, Reinheit: 95.7 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₄H₁₉NO₂ 233.14 (M), gef. 234.21 (M+H)⁺

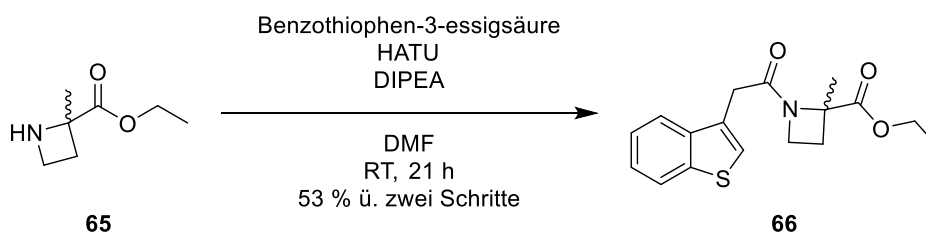
¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.34 – 7.16 (m, 5H), 4.20 – 4.03 (m, 2H), 3.69 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H), 3.54 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H), 3.13 – 2.98 (m, 2H), 2.48 – 2.36 (m, 1H), 1.91 – 1.80 (m, 1H), 1.40 (s, 3H), 1.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 173.76, 138.41, 128.27, 128.00, 126.62, 67.00, 59.85, 54.69, 48.46, 27.77, 18.43, 14.07.

Ethyl-2-methylazetidin-2-carboxylat (65)

Ethyl-1-benzyl-2-methylazetidin-2-carboxylat (**64**, 584 mg, 2.50 mmol, 1.00 eq) wurde in 50 mL EtOH gelöst. Zu der Lösung wurde Pd/C (10 % w/w; 133 mg, 125 µmol, 0.05 eq) gegeben und unter Wasserstoff-Atmosphäre bei Raumtemperatur für 20 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Suspension über Kieselgur filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt (307 mg, gelbes Öl) wurde ohne weitere Reinigung zur Synthese der Verbindung **66** verwendet.

MS (ESI⁺): m/z ber. für C₇H₁₃NO₂ 143.09 (M), gef. 144.15 (M+H)⁺

Ethyl-1-(2-(benzo[*b*]thiophen-3-yl)acetyl)-2-methylazetidin-2-carboxylat (66)

Das Rohprodukt Ethyl-2-methylazetidin-2-carboxylat (**65**, 307 mg) wurde in 21 mL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden Benzothiophen-3-essigsäure (412 mg, 2.14 mmol, 1.00 eq), HATU (815 mg, 2.14 mmol, 1.00 eq) und DIPEA (1.09 mL, 6.43 mmol, 3.00 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 21 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

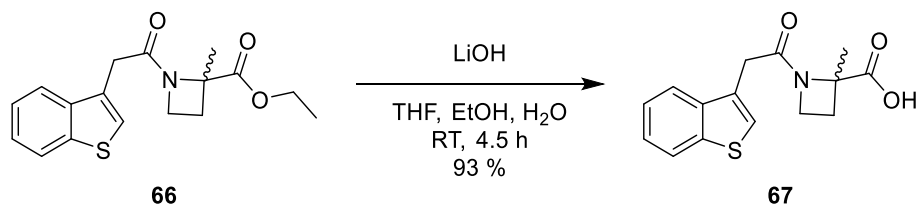
Ausbeute: 422 mg (1.33 mmol, 53 % über zwei Schritte) rosa Öl

HPLC: 67.1 % B, Reinheit: 71.0 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₇H₁₉NO₃S 317.11 (M), gef. 318.26 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.99 – 7.96 (m, 1H), 7.81 – 7.78 (m, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.41 – 7.36 (m, 2H), 4.18 – 4.14 (m, 2H), 4.11 – 4.03 (m, 2H), 3.67 (dd, *J* = 3.0, 1.0 Hz, 2H), 2.33 – 2.26 (m, 1H), 2.20 – 2.13 (m, 1H), 1.58 (s, 3H), 1.10 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 171.61, 168.53, 139.36, 138.72, 129.27, 124.30, 124.23, 123.88, 122.69, 122.13, 66.47, 60.63, 46.78, 31.75, 27.28, 21.46, 13.81.

1-(2-(Benzo[*b*]thiophen-3-yl)acetyl)-2-methylazetidin-2-carbonsäure (67)

Ethyl-1-(2-(benzo[*b*]thiophen-3-yl)acetyl)-2-methylazetidin-2-carboxylat (**66**, 243 mg, 766 μ mol, 1.00 eq) wurde in 20 mL THF und 7 mL EtOH gelöst. Zu der Lösung wurde eine Lösung aus LiOH (92 mg, 3.83 mmol, 5.00 eq) in 14 mL H₂O gegeben. Die vereinten Lösungen wurden bei Raumtemperatur für 4.5 Stunden gerührt. Anschließend wurden THF und EtOH *in vacuo* entfernt und die wässrige Phase mit 1 M Salzsäure auf einen pH-Wert ≤ 1 eingestellt. Das Produkt wurde mit EA aus der wässrigen Phase extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

Ausbeute: 205 mg (708 μ mol, 93 %) weißer Feststoff

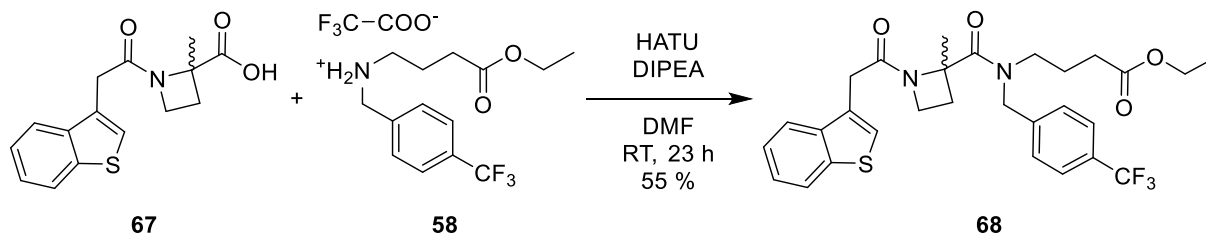
HPLC: 55.6 % B, Reinheit: 97.7 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₅NO₃S 289.08 (M), gef. 290.22 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 12.81 (s, 1H), 7.99 – 7.94 (m, 1H), 7.81 – 7.77 (m, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.40 – 7.36 (m, 2H), 4.21 – 4.11 (m, 2H), 3.66 (dd, *J* = 7.0, 1.0 Hz, 2H), 2.36 – 2.29 (m, 1H), 2.18 – 2.11 (m, 1H), 1.56 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 173.35, 168.66, 139.32, 138.76, 129.44, 124.22, 124.19, 123.92, 122.68, 122.16, 66.66, 46.67, 31.66, 27.37, 21.58.

Ethyl-4-(1-(2-(benzo[*b*]thiophen-3-yl)acetyl)-2-methyl-*N*-(4-(trifluormethyl)benzyl)azetidin-2-carboxamido)butanoat (68**)**



1-(2-(Benzo[*b*]thiophen-3-yl)acetyl)-2-methylazetidin-2-carbonsäure (**67**, 445 mg, 1.54 mmol, 1.00 eq) wurde in 35 mL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden 4-Ethoxy-4-oxo-*N*-(4-(trifluormethyl)benzyl)butan-1-ammonium-2,2,2-trifluoroacetat (**58**, 620 mg, 1.54 mmol, 1.00 eq), HATU (585 mg, 1.54 mmol, 1.00 eq) und DIPEA (1.05 mL, 6.15 mmol, 4.00 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 23 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 476 mg (849 μmol , 55 %) orangebrauner Feststoff

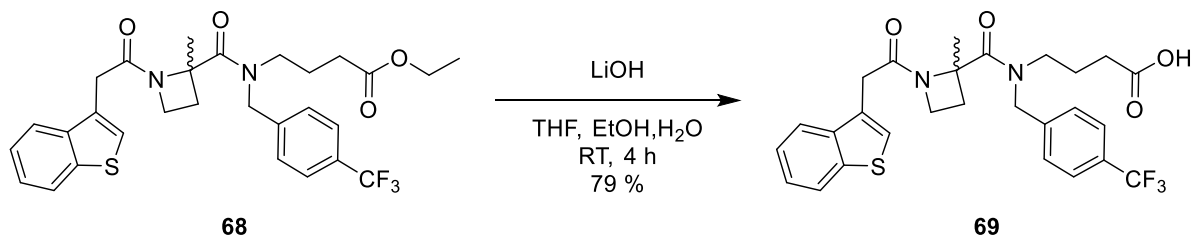
HPLC: 81.3 % B, Reinheit: 98.7 %

MS (ESI⁺): m/z ber. für $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ 560.20 (M), gef. 561.18 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 8.00 – 7.62 (m, 4H), 7.60 – 7.27 (m, 5H), 4.77 – 4.50 (m, 2H), 4.14 – 3.89 (m, 4H), 3.85 – 3.50 (m, 3H), 3.35 – 3.00 (m, 2H), 2.46 – 2.20 (m, 3H), 1.98 – 1.66 (m, 5H), 1.18 – 1.07 (m, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = nicht auswertbar wegen geringer Peakintensität, doppeltem Datensatz (vermutlich *cis/trans*-Amid) und zusätzlicher Aufspaltung durch die CF_3 Gruppe.

4-(1-(2-(Benzo[*b*]thiophen-3-yl)acetyl)-2-methyl-*N*-(4-(trifluormethyl)benzyl)azetidin-2-carboxamido)butansäure (69)



Ethyl-4-(1-(2-(benzo[*b*]thiophen-3-yl)acetyl)-2-methyl-*N*-(4-(trifluormethyl)benzyl)azetidin-2-carboxamido)butanoat (**68**, 272 mg, 485 μmol , 1.00 eq) wurde in 10 mL THF und 3.5 mL EtOH gelöst und mit einer Lösung aus LiOH (58 mg, 2.43 mmol, 5.00 eq) in 7 mL H₂O versetzt. Der Ansatz wurde für 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde THF und EtOH *in vacuo* entfernt, die wässrige Phase mit 1 M Salzsäure auf einen pH-Wert ≤ 1 eingestellt und das Produkt mit EA aus der wässrigen Phase extrahiert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 203 mg (381 μmol , 79 %) weißer Feststoff

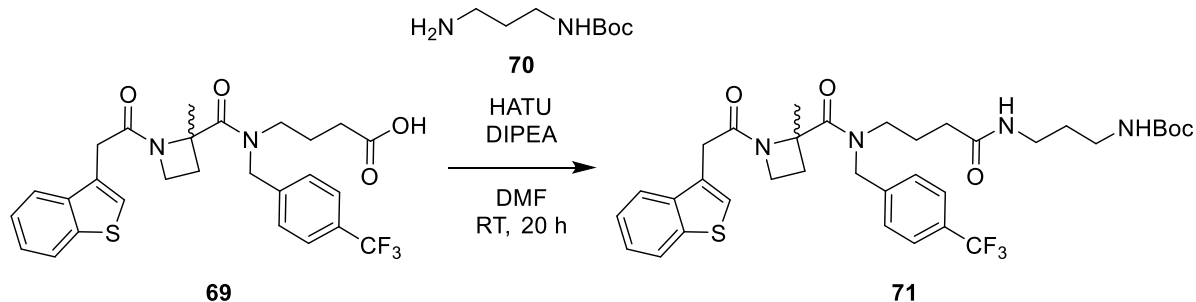
HPLC: 70.2 % B, Reinheit: 98.5 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₂₇H₂₇F₃N₂O₄S 532.16 (M), gef. 533.17 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 12.08 (s, 1H), 7.99 – 7.63 (m, 4H), 7.61 – 7.29 (m, 5H), 4.76 – 4.51 (m, 2H), 4.22 – 3.90 (m, 2H), 3.79 – 3.56 (m, 3H), 3.36 – 3.05 (m, 2H), 2.46 – 2.14 (m, 3H), 1.97 – 1.65 (m, 5H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = nicht auswertbar wegen geringer Peakintensität, doppeltem Datensatz (vermutlich *cis/trans*-Amid) und zusätzlicher Aufspaltung durch die CF₃ Gruppe.

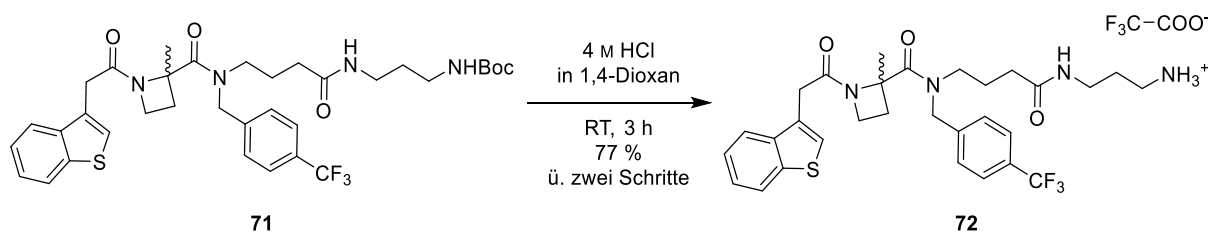
***tert*-Butyl-(3-(4-(1-(2-(benzo[*b*]thiophen-3-yl)acetyl)-2-methyl-*N*-(4-(trifluormethyl)benzyl) azetidin-2-carboxamido)butanamido)propyl)carbamate (71)**



4-(1-(2-(Benzo[*b*]thiophen-3-yl)acetyl)-2-methyl-*N*-(4-(trifluormethyl)benzyl)azetidin-2-carboxamido)butansäure (**69**, 190 mg, 357 μmol , 1.00 eq) wurde in 8 mL DMF gelöst und mit *tert*-Butyl-(3-aminopropyl)carbamate (**70**, 62 μL , 357 μmol , 1.00 eq), HATU (136 mg, 357 μmol , 1.00 eq) und DIPEA (243 μL , 1.43 mmol, 4.00 eq) versetzt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 20 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt (242 mg, gelber Feststoff) ohne weitere Reinigung zur Synthese der Verbindung **72** verwendet.

HPLC: 76.8 % B

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₃₅H₄₃F₃N₄O₅S 688.29 (M), gef. 689.25 (M+H)⁺

3-(4-(1-(2-(Benzo[*b*]thiophen-3-yl)acetyl)-2-methyl-*N*-(4-(trifluormethyl)benzyl)azetidin-2-carboxamido)butanamido)propan-1-ammonium-2,2,2-trifluoracetat (72)

Das Rohprodukt *tert*-Butyl-(3-(4-(1-(2-(benzo[*b*]thiophen-3-yl)acetyl)-2-methyl-*N*-(4-(trifluormethyl)benzyl)azetidin-2-carboxamido)butanamido)propyl)carbammat (**71**, 242 mg) wurde in 6 mL 4 M HCl in 1,4-Dioxan gelöst. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 3 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Lösung in kalten Et₂O getropft. Der ausgefallene Feststoff wurde abzentrifugiert und im Exikkator getrocknet. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 192 mg (273 μmol, 77 % über zwei Schritte) weißer Feststoff

HPLC: 57.6 % B, Reinheit: 99.4 %

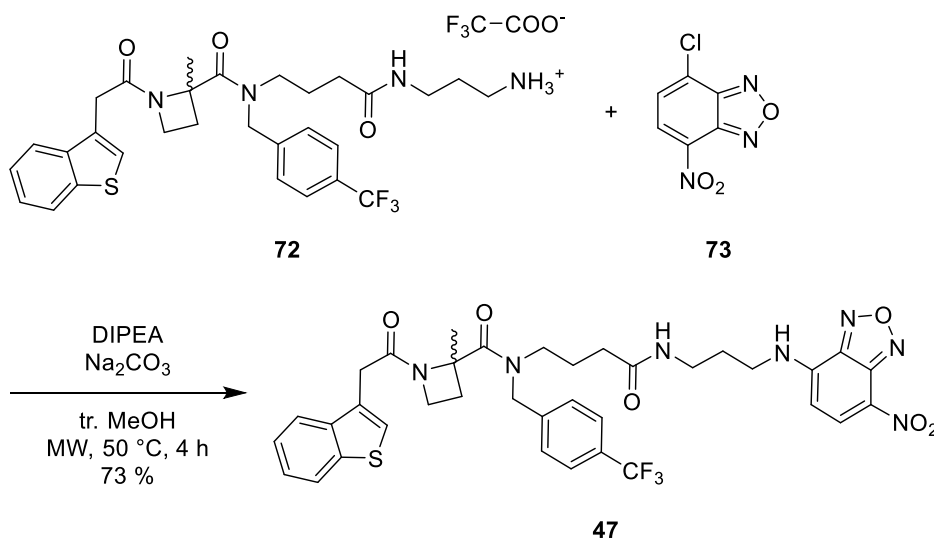
MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₃₀H₃₅F₃N₄O₃S 588.24 (M), gef. 589.22 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.02 – 7.84 (m, 2H), 7.80 – 7.65 (m, 4H), 7.54 – 7.29 (m, 4H), 4.83 – 4.47 (m, 2H), 4.26 – 3.51 (m, 4H), 3.43 – 2.98 (m, 4H), 2.88 – 2.66 (m, 2H), 2.47 – 2.21 (m, 2H), 2.19 – 1.52 (m, 9H).

Das protonierte Amin zeigt ein breites Signal bei ca. 4.3-6.5 ppm.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = nicht auswertbar wegen geringer Peakintensität, doppeltem Datensatz (vermutlich *cis/trans*-Amid) und zusätzlicher Aufspaltung durch die CF₃ Gruppe.

1-(2-(Benzo[*b*]thiophen-3-yl)acetyl)-2-methyl-*N*-(4-((3-((7-nitrobenzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-4-yl)amino)propyl)amino)-4-oxobutyl)-*N*-(4-(trifluormethyl)benzyl)azetidin-2-carboxamid (47)



3-(4-(1-(2-(Benzo[*b*]thiophen-3-yl)acetyl)-2-methyl-*N*-(4-(trifluormethyl)benzyl)azetidin-2-carboxamido)butanamido)propan-1-ammonium-2,2,2-trifluoracetat (**72**, 170 mg, 242 μmol , 1.00 eq) wurde in 5 mL tr. MeOH gelöst und mit NBD-Cl (**73**, 121 mg, 605 μmol , 2.50 eq), DIPEA (41 μL , 242 μmol , 1.00 eq) und Na_2CO_3 (90.0 mg, 847 μmol , 3.50 eq) versetzt. Die Lösung wurde in der Mikrowelle bei 50 °C für 4 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 132 mg (176 μmol , 73 %) rotbrauner Feststoff

HPLC: 76.3 % B, Reinheit: 96.3 %

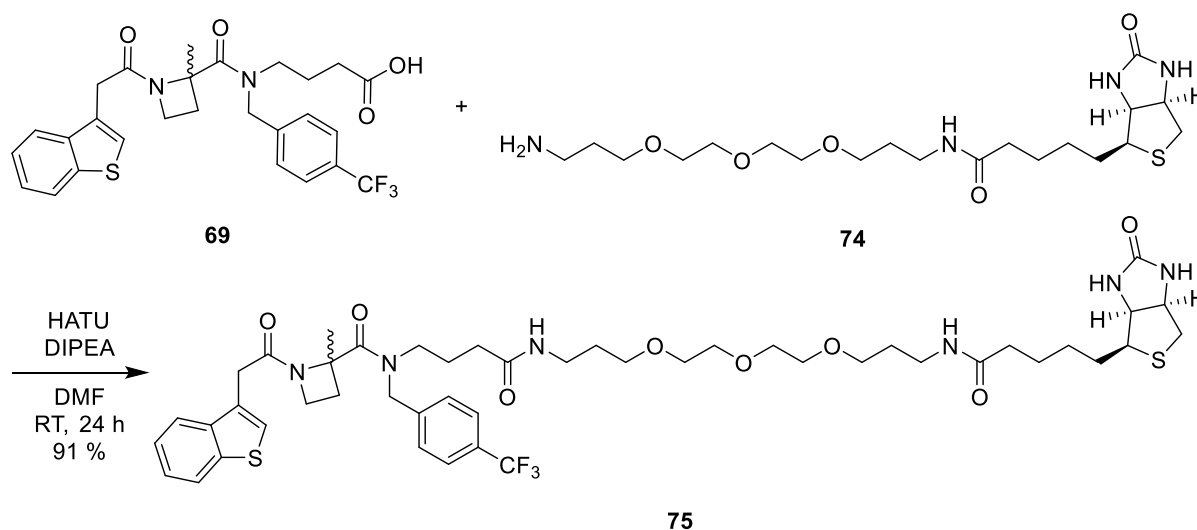
MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{36}\text{H}_{36}\text{F}_3\text{N}_7\text{O}_6\text{S}$ 751.24 (M), gef. 752.19 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{36}\text{H}_{36}\text{F}_3\text{N}_7\text{NaO}_6\text{S}$ 774.2292, gef. 774.2295

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 9.38 (s, 1H), 8.56 – 8.37 (m, 1H), 7.97 – 7.75 (m, 3H), 7.73 – 7.54 (m, 2H), 7.54 – 7.39 (m, 2H), 7.37 – 7.24 (m, 3H), 6.46 – 6.22 (m, 1H), 4.75 – 4.52 (m, 2H), 4.26 – 3.81 (m, 2H), 3.74 – 3.57 (m, 2H), 3.41 (s, 2H), 3.30 – 3.00 (m, 4H), 2.43 – 2.19 (m, 2H), 2.11 – 1.98 (m, 2H), 1.96 – 1.85 (m, 1H), 1.82 – 1.61 (m, 6H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = nicht auswertbar wegen geringer Peakintensität, doppeltem Datensatz (vermutlich *cis/trans*-Amid) und zusätzlicher Aufspaltung durch die CF₃ Gruppe.

1-(2-(Benzo[*b*]thiophen-3-yl)acetyl)-*N*-(4,20-dioxo-24-((3*aS*,4*S*,6*aR*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)-9,12,15-trioxa-5,19-diazatetracosyl)-2-methyl-*N*-(4-(trifluormethyl)benzyl)azetidin-2-carboxamid (75)



4-(1-(2-(Benzo[*b*]thiophen-3-yl)acetyl)-2-methyl-*N*-(4-(trifluormethyl)benzyl)azetidin-2-carboxamido)butansäure (**69**, 50.0 mg, 93.9 μmol , 1.00 eq) wurde in 3 mL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden *N*-(3-(2-(2-(3-Aminopropoxy)ethoxy)ethoxy)propyl)-5-((3*aS*,4*S*,6*aR*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamid (**74**, 41.9 mg, 93.9 μmol , 1.00 eq), HATU (35.7 mg, 93.9 μmol , 1.00 eq) und DIPEA (48 μL , 282 μmol , 3.00 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 82 mg (85.3 μmol , 91 %) weißer Feststoff

HPLC: 65.4 % B, Reinheit: 97.6 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₄₇H₆₃F₃N₆O₈S₂ 960.41 (M), gef. 961.29 (M+H)⁺

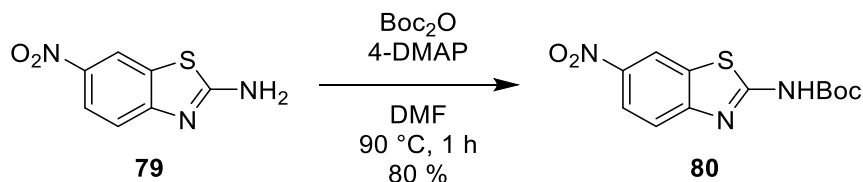
HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₄₇H₆₃F₃N₆O₈S₂ 481.2123, gef. 481.2130

¹H-NMR: (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.99 – 7.90 (m, 1H), 7.89 – 7.64 (m, 5H), 7.55 – 7.30 (m, 5H), 6.39 (s, 1H), 5.42 (s, 1H), 4.74 – 4.52 (m, 2H), 4.36 – 4.26 (m, 1H), 4.21 – 3.91 (m, 2H), 3.80 – 3.58 (m, 2H), 3.54 – 3.42 (m, 8H), 3.41 – 3.16 (m, 5H), 3.15 – 2.98 (m, 6H), 2.85 – 2.78 (m, 1H), 2.57 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H), 2.46 – 2.25 (m, 2H), 2.13 – 1.97 (m, 4H), 1.94 (s, 1H), 1.85 – 1.66 (m, 4H), 1.64 – 1.39 (m, 9H), 1.35 – 1.22 (m, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = nicht auswertbar wegen geringer Peakintensität, doppeltem Datensatz (vermutlich *cis/trans*-Amid) und zusätzlicher Aufspaltung durch die CF₃ Gruppe.

5.2.3 Synthese der Verbindungen aus der ersten Dockingstudie an der G-Protein-Bindetasche des ET_BR

tert-Butyl-(6-nitrobenzo[*d*]thiazol-2-yl)carbammat (80)



6-Nitrobenzo[*d*]thiazol-2-amin (**79**, 1.00 g, 5.12 mmol, 1.00 eq) wurde in 20 mL DMF gelöst und mit 4-DMAP (313 mg, 2.56 mmol, 0.50 eq) und Boc₂O (1.64 mL, 7.68 mmol, 1.50 eq) versetzt. Die Lösung wurde bei 90 °C für eine Stunde gerührt. Anschließend wurde der Feststoff abfiltriert, auf der Fritte mit H₂O gewaschen und *in vacuo* getrocknet.

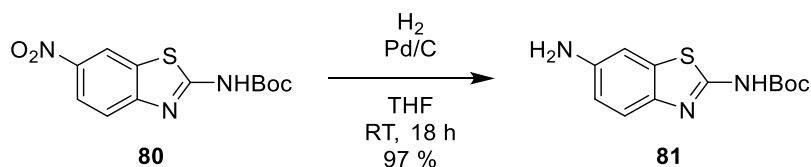
Ausbeute: 1.21 g (4.10 mmol, 80 %) gelber Feststoff

HPLC: 61.4 % B, Reinheit: 99.5 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₂H₁₃N₃O₄S 295.06 (M), gef. 296.06 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 12.21 (s, 1H), 9.00 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.24 (dd, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 1.53 (s, 9H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 165.22, 154.26, 152.81, 142.62, 132.21, 121.64, 120.12, 118.63, 82.49, 27.75.

***tert*-Butyl-(6-aminobenzo[*d*]thiazol-2-yl)carbamate (**81**)**

tert-Butyl-(6-nitrobenzo[*d*]thiazol-2-yl)carbamate (**80**, 475 mg, 1.61 mmol, 1.00 eq) wurde in 100 mL THF gelöst. Zu der Lösung wurde Pd/C (10 % *w/w*; 85.7 mg, 80.5 μ mol, 0.05 eq) gegeben und unter Wasserstoff-Atmosphäre bei Raumtemperatur für 18 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Suspension über Kieselgur filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

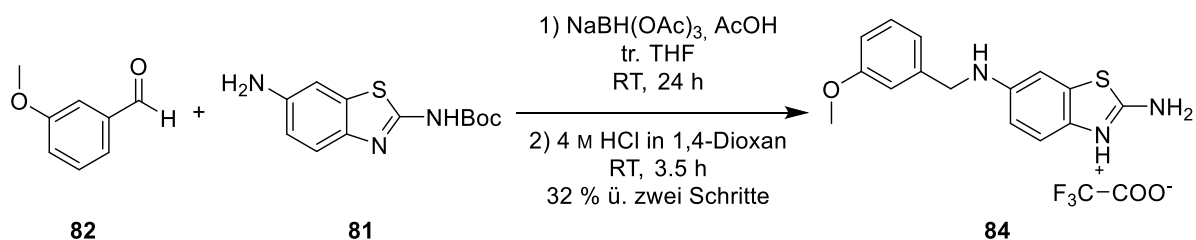
Ausbeute: 415 mg (1.56 mmol, 97 %) gelber Feststoff

HPLC: 30.3 % B, Reinheit: 92.5 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₂H₁₅N₃O₂S 265.09 (M), gef. 266.07 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 11.30 (s, 1H), 7.33 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.66 (dd, *J* = 8.6, 2.3 Hz, 1H), 5.06 (s, 2H), 1.49 (s, 9H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 168.02, 159.68, 153.45, 147.05, 133.17, 121.36, 119.73, 113.47, 82.31, 28.41.

2-Amino-6-((3-methoxybenzyl)amino)benzo[d]thiazol-3-ium-2,2,2-trifluoracetat (84)

3-Methoxybenzaldehyd (**82**, 100 mg, 734 μ mol, 1.00 eq) wurde unter Argon-Atmosphäre in 5 mL tr. THF gelöst. Zu der Lösung wurden *tert*-Butyl-(6-aminobenzo[d]thiazol-2-yl)carbamate (**81**, 214 mg, 808 μ mol, 1.10 eq), NaBH(OAc)₃ (234 mg, 1.10 mmol, 1.50 eq) und AcOH (42 μ L, 734 μ mol, 1.00 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt. Anschließend wurde der Ansatz mit ges. Na₂CO₃-Lösung versetzt und das Produkt aus der wässrigen Phase mit Et₂O extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

Das erhaltene Rohprodukt wurde in 4 mL 4 M HCl in 1,4-Dioxan gelöst. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 3.5 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Lösung in kalten Et₂O gegeben und der ausgefallene Feststoff abzentrifugiert. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 93 mg (233 μ mol, 32 % über zwei Schritte) gelber Feststoff

HPLC: 33.3 % B, Reinheit: 96.3 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₅N₃OS 285.09 (M), gef. 286.08 (M+H)⁺

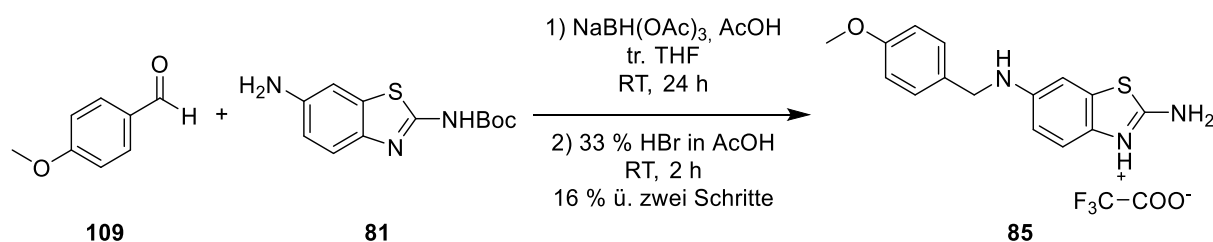
HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₆N₃OS 286.1009, gef. 286.1010

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 9.04 (s, 2H), 7.27 – 7.18 (m, 2H), 7.05 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.97 – 6.91 (m, 2H), 6.83 – 6.75 (m, 2H), 4.26 (s, 2H), 3.72 (s, 3H).

Das NH- und NH⁺-Signal gehen im Rauschen unter.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 193.48, 167.42, 159.92, 158.97 (q, J = 34.7 Hz), 130.89, 129.93, 126.55, 122.98, 121.49, 120.14, 115.60, 114.40, 113.72, 112.72, 55.50, 47.75.

Das CF₃-COOH-Signal geht im Rauschen unter.

2-Amino-6-((4-methoxybenzyl)amino)benzo[*d*]thiazol-3-ium-2,2,2-trifluoroacetat (85)

4-Methoxybenzaldehyd (**109**, 63.0 mg, 463 μ mol, 1.00 eq) wurde unter Argon-Atmosphäre in 5 mL tr. THF gelöst. Zu der Lösung wurden *tert*-Butyl-(6-aminobenzo[*d*]thiazol-2-yl)carbamate (**81**, 135 mg, 509 μ mol, 1.10 eq), NaBH(OAc)₃ (147 mg, 694 μ mol, 1.50 eq) und AcOH (27 μ L, 874 μ mol, 1.00 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt. Anschließend wurde zu der Lösung ges. Na₂CO₃-Lösung gegeben und das Produkt aus der wässrigen Phase mit Et₂O extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

Das erhaltene Rohprodukt wurde in 3.5 mL 33 % HBr in AcOH (*w/w*) gelöst. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 2 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Lösung in kalten Et₂O gegeben und der ausgefallene Feststoff abzentrifugiert. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 30 mg (75.1 μ mol, 16 % über zwei Schritte) gelber Feststoff

HPLC: 31.1 % B, Reinheit: 99.9 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₅N₃OS 285.09 (M), gef. 286.07 (M+H)⁺

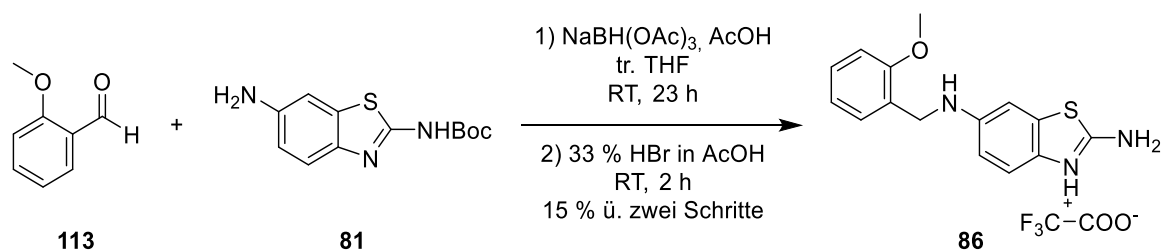
HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₆N₃OS 286.1009, gef. 286.1011

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.72 (s, 2H), 7.32 – 7.26 (m, 2H), 7.20 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.08 (s, 1H), 6.93 – 6.87 (m, 2H), 6.77 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 4.22 (s, 2H), 3.72 (s, 3H).

Das NH- und NH⁺-Signal gehen im Rauschen unter.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 191.82, 166.90, 158.96, 153.84, 132.62, 132.33, 129.49, 129.42, 116.17, 115.06, 114.31, 56.24, 55.61.

Die beiden TFA-Signale gehen im Rauschen unter.

2-Amino-6-((2-methoxybenzyl)amino)benzo[*d*]thiazol-3-ium-2,2,2-trifluoracetat (86)

2-Methoxybenzaldehyd (**113**, 119 mg, 874 μ mol, 1.00 eq) wurde unter Argon-Atmosphäre in 10 mL tr. THF gelöst. Zu der Lösung wurden *tert*-Butyl-(6-aminobenzo[*d*]thiazol-2-yl)carbamat (**81**, 255 mg, 961 μ mol, 1.10 eq), NaBH(OAc)₃ (278 mg, 1.31 mmol, 1.50 eq) und AcOH (50 μ L, 874 μ mol, 1.00 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 23 Stunden gerührt. Anschließend wurde zu der Lösung ges. Na₂CO₃-Lösung gegeben und das Produkt aus der wässrigen Phase mit Et₂O extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

Das erhaltene Rohprodukt wurde in 6 mL 33 % HBr in AcOH (*w/w*) gelöst. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 2 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Lösung in kalten Et₂O gegeben und der ausgefallene Feststoff abzentrifugiert. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 53 mg (133 μ mol, 15 % über zwei Schritte) hellbrauner Feststoff

HPLC: 29.6 % B, Reinheit: 99.9 %

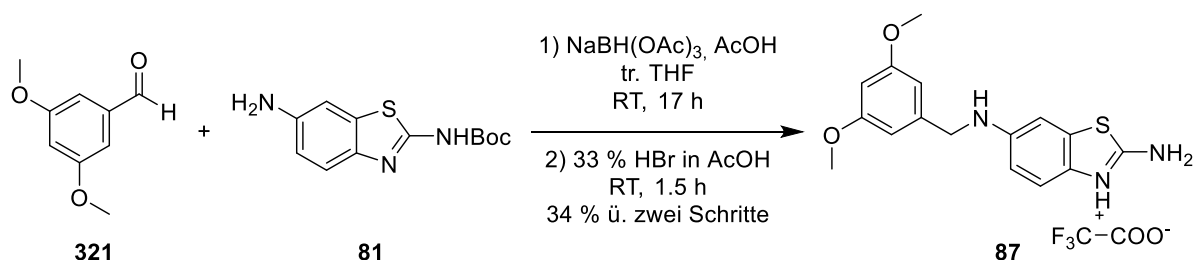
MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₅N₃OS 285.09 (M), gef. 286.08 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₆N₃OS 286.1009, gef. 286.1006

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 9.12 (s, 2H), 7.27 – 7.21 (m, 3H), 7.09 – 7.05 (m, 1H), 7.02 – 6.99 (m, 1H), 6.88 (td, *J* = 7.4, 1.0 Hz, 1H), 6.79 (dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 1H), 4.26 (s, 2H), 3.83 (s, 3H).

Das NH- und NH⁺-Signal gehen im Rauschen unter.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 194.21, 173.18, 167.02, 158.55 (q, *J* = 35.0 Hz), 157.06, 128.33, 128.20, 126.24, 125.88, 120.12, 116.08 (q, *J* = 293.6 Hz), 115.12, 114.11, 110.62, 105.40, 55.32, 42.73.

2-Amino-6-((3,5-dimethoxybenzyl)amino)benzo[d]thiazol-3-ium-2,2,2-trifluoracetat (87)

3,5-Dimethoxybenzaldehyd (**321**, 85.0 mg, 512 μ mol, 1.00 eq) wurde unter Argon-Atmosphäre in 5 mL tr. THF gelöst. Zu der Lösung wurden *tert*-Butyl-(6-aminobenzo[d]thiazol-2-yl)carbammat (**81**, 149 mg, 563 μ mol, 1.10 eq), NaBH(OAc)₃ (163 mg, 767 μ mol, 1.50 eq) und AcOH (29 μ L, 512 μ mol, 1.00 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 17 Stunden gerührt. Anschließend wurde zu der Lösung ges. Na₂CO₃-Lösung gegeben und das Produkt aus der wässrigen Phase mit Et₂O extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

Das erhaltene Rohprodukt wurde in 2.5 mL 33 % HBr in AcOH (*w/w*) gelöst. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 1.5 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Lösung in kalten Et₂O gegeben und der ausgefallene Feststoff abzentrifugiert. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 74 mg (172 μ mol, 34 % über zwei Schritte) gelbbrauner Feststoff

HPLC: 35.4 % B, Reinheit: 96.5 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₆H₁₇N₃O₂S 315.10 (M), gef. 316.21 (M+H)⁺

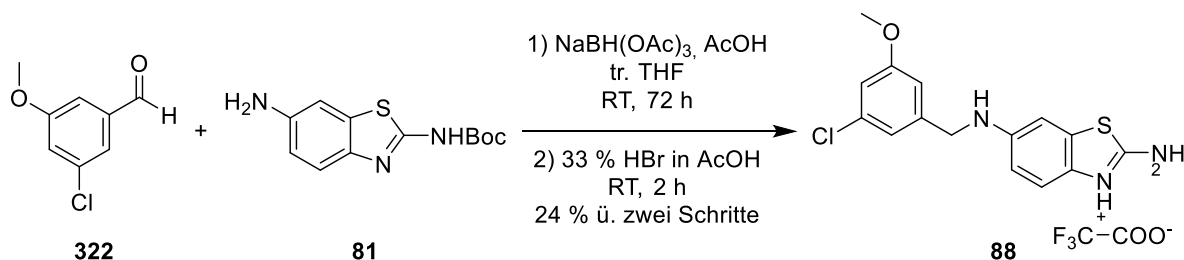
HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₆H₁₈N₃O₂S 316.1114, gef. 316.1111

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.71 (s, 2H), 7.19 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.73 (dd, *J* = 8.7, 2.2 Hz, 1H), 6.53 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 6.36 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H), 4.21 (s, 2H), 3.71 (s, 6H).

Das NH- und NH⁺-Signal gehen im Rauschen unter.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 193.27, 167.17, 161.07, 142.34, 126.87, 115.76, 114.21, 107.47, 105.94, 105.43, 98.97, 55.63, 47.81.

Die beiden TFA-Signale gehen im Rauschen unter.

2-Amino-6-((3-chlor-5-methoxybenzyl)amino)benzo[d]thiazol-3-ium-2,2,2-trifluoracetat (88)

3-Chlor-5-methoxybenzaldehyd (**322**, 85.0 mg, 498 µmol, 1.00 eq) wurde unter Argon-Atmosphäre in 5 mL tr. THF gelöst. Zu der Lösung wurden *tert*-Butyl-(6-aminobenzo[d]thiazol-2-yl)carbamat (**81**, 145 mg, 548 µmol, 1.10 eq), NaBH(OAc)₃ (158 mg, 747 µmol, 1.50 eq) und AcOH (29 µL, 498 µmol, 1.00 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 72 Stunden gerührt. Anschließend wurde ges. Na₂CO₃-Lösung zugegeben und das Produkt aus der wässrigen Phase mit Et₂O extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

Das erhaltene Rohprodukt wurde in 4 mL 33 % HBr in AcOH (*w/w*) gelöst. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 2 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Lösung in kalten Et₂O gegeben und der ausgefallene Feststoff abzentrifugiert. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 51 mg (118 µmol, 24 % über zwei Schritte) gelber Feststoff

HPLC: 42.9 % B, Reinheit: 99.1 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₄ClN₃OS 319.05 (M), gef. 320.11 (M+H)⁺

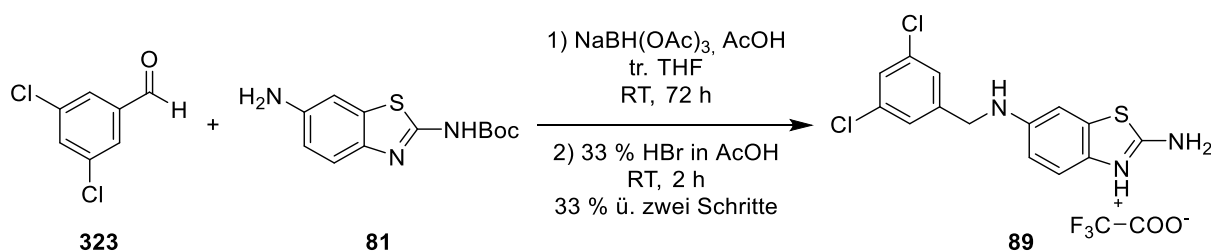
HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₅ClN₃OS 320.0619, gef. 320.0615

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 9.21 (s, 2H), 7.21 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.02 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.99 – 6.97 (m, 1H), 6.92 – 6.89 (m, 1H), 6.89 – 6.87 (m, 1H), 6.74 (dd, *J* = 8.8, 2.3 Hz, 1H), 4.26 (s, 2H), 3.75 (s, 3H).

Das NH- und NH⁺-Signal gehen im Rauschen unter.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 195.57, 166.81, 160.19, 143.30, 133.65, 125.81, 119.07, 114.99, 113.43, 112.19, 112.03, 109.82, 104.61, 55.47, 46.24.

Die beiden TFA-Signale gehen im Rauschen unter.

2-Amino-6-((3,5-dichlorbenzyl)amino)benzo[d]thiazol-3-ium-2,2,2-trifluoracetat (89)

3,5-Dichlorbenzaldehyd (**323**, 60.0 mg, 343 μ mol, 1.00 eq) wurde unter Argon-Atmosphäre in 5 mL tr. THF gelöst. Zu der Lösung wurden *tert*-Butyl-(6-aminobenzo[d]thiazol-2-yl)carbamat (**81**, 143 mg, 377 μ mol, 1.10 eq), NaBH(OAc)₃ (182 mg, 858 μ mol, 2.50 eq) und AcOH (20 μ L, 343 μ mol, 1.00 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 72 Stunden gerührt. Anschließend wurde zu der Lösung ges. Na₂CO₃-Lösung gegeben und das Produkt aus der wässrigen Phase mit Et₂O extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

Das erhaltene Rohprodukt wurde in 4 mL 33 % HBr in AcOH (*w/w*) gelöst. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 2 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Lösung in kalten Et₂O gegeben und der ausgefallene Feststoff abzentrifugiert. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 50 mg (114 μ mol, 33 % über zwei Schritte) weißer Feststoff

HPLC: 46.6 % B, Reinheit: 97.7 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₄H₁₁Cl₂N₃S 323.01 (M), gef. 324.03 (M+H)⁺

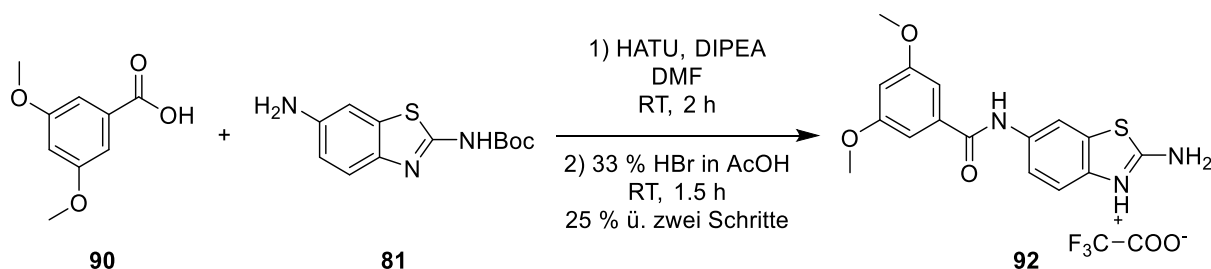
HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₄H₁₂Cl₂N₃S 324.0124, gef. 324.0123

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 8.88 (s, 2H), 7.45 (t, J = 1.9 Hz, 1H), 7.39 (d, J = 1.9 Hz, 2H), 7.19 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.02 – 6.97 (m, 1H), 6.75 – 6.67 (m, 1H), 4.31 (s, 2H).

Das NH- und NH⁺-Signal gehen im Rauschen unter.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 166.24, 144.91, 144.72, 133.95, 126.79, 126.31, 125.83, 115.50, 113.10, 104.36, 45.69.

Die beiden TFA-Signale und das NH₂-C₂_{Benzothiazol}-Signal gehen im Rauschen unter.

2-Amino-6-(3,5-dimethoxybenzamido)benzo[d]thiazol-3-ium-2,2,2-trifluoracetat (92)

3,5-Dimethoxybenzoesäure (**90**, 70.0 mg, 384 μ mol, 1.00 eq) wurde in 5 mL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden *tert*-Butyl-(6-aminobenzo[d]thiazol-2-yl)carbamate (**81**, 112 mg, 423 μ mol, 1.10 eq), HATU (146 mg, 384 μ mol, 1.00 eq) und DIPEA (215 μ L, 1.27 mmol, 3.30 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 2 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

Das erhaltene Rohprodukt wurde in 3 mL 33 % HBr in AcOH (*w/w*) gelöst. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 1.5 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Lösung in kaltem Et₂O gegeben und der ausgefallene Feststoff abzentrifugiert. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 42 mg (94.7 μ mol, 25 % über zwei Schritte) weißer Feststoff

HPLC: 36.1 % B, Reinheit: 97.3 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₆H₁₅N₃O₃S 329.05 (M), gef. 330.09 (M+H)⁺

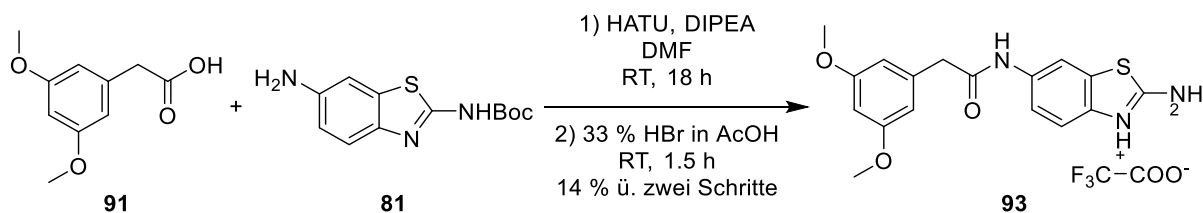
HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₆H₁₆N₃O₃S 330.0907, gef. 330.0906

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.23 (s, 1H), 8.37 (s, 2H), 8.23 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.58 (dd, *J* = 8.7, 2.1 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.10 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 6.71 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H), 3.82 (s, 6H).

Das NH⁺-Signal gehen im Rauschen unter.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 195.79, 167.81, 165.41, 160.94, 158.91 (q, *J* = 35.0 Hz), 137.45, 134.37, 128.70, 120.39, 116.49, 114.53, 106.17, 103.83, 56.05.

Das CF₃-COOH-Signal geht im Rauschen unter.

2-Amino-6-(2-(3,5-dimethoxyphenyl)acetamido)benzo[d]thiazol-3-ium-2,2,2-trifluoracetat (93)

2-(3,5-Dimethoxyphenyl)essigsäure (**91**, 70.0 mg, 357 μ mol, 1.00 eq) wurde in 5 mL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden *tert*-Butyl-(6-aminobenzo[d]thiazol-2-yl)carbamat (**81**, 104 mg, 392 μ mol, 1.10 eq), HATU (136 mg, 357 μ mol, 1.00 eq) und DIPEA (200 μ L, 1.18 mmol, 3.30 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 18 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

Das erhaltene Rohprodukt wurde in 3 mL 33 % HBr in AcOH (*w/w*) gelöst. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 1.5 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Lösung in kalten Et₂O gegeben und der ausgefallene Feststoff abzentrifugiert. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 23 mg (50.3 μ mol, 14 % über zwei Schritte) brauner Feststoff

HPLC: 34.8 % B, Reinheit: 95.6 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₇H₁₇N₃O₃S 343.10 (M), gef. 344.15 (M+H)⁺

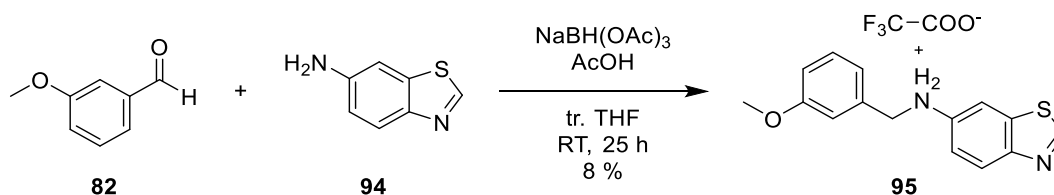
HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₇H₁₈N₃O₃S 344.1063, gef. 344.1069

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.18 (s, 1H), 8.41 (s, 2H), 8.13 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.39 (dd, *J* = 8.7, 2.1 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.51 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 6.39 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H), 3.73 (s, 6H), 3.55 (s, 2H).

Das NH⁺-Signal gehen im Rauschen unter.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 198.00, 168.59, 167.19, 160.31, 158.26 (q, *J* = 35.4 Hz), 138.02, 134.18, 127.96, 118.43, 115.89, 112.60, 107.18, 98.29, 55.07, 43.47.

Das CF₃-COOH-Signal geht im Rauschen unter.

***N*-(3-Methoxybenzyl)benzo[*d*]thiazol-6-ammonium-2,2,2-trifluoracetat (95)**

3-Methoxybenzaldehyd (**82**, 100 mg, 734 μ mol, 1.00 eq) wurde unter Argon-Atmosphäre in 5 mL tr. THF gelöst. Zu der Lösung wurden Benzo[*d*]thiazol-6-amin (**94**, 121 mg, 808 μ mol, 1.10 eq), NaBH(OAc)₃ (234 mg, 1.10 mmol, 1.50 eq) und AcOH (42 μ L, 734 μ mol, 1.00 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 25 Stunden gerührt. Anschließend wurde zu der Lösung ges. Na₂CO₃-Lösung gegeben und das Produkt aus der wässrigen Phase mit Et₂O extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 30 mg (111 μ mol, 8 %) gelber Feststoff

HPLC: 49.2 % B, Reinheit: 99.9 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₄N₂OS 270.08 (M), gef. 271.04 (M+H)⁺

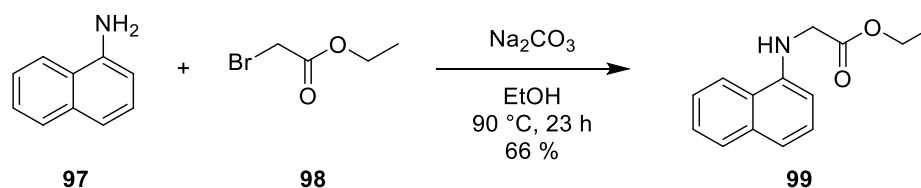
HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₅N₂OS 271.0900, gef. 271.0904

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.89 (s, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.24 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.11 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.98 – 6.95 (m, 2H), 6.91 (dd, *J* = 8.8, 2.3 Hz, 1H), 6.82 – 6.78 (m, 1H), 4.31 (s, 2H), 3.72 (s, 3H).

Das NH₂⁺-Signal geht im Rauschen unter.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 159.35, 158.16 (q, *J* = 37.3 Hz), 149.46, 144.85, 141.31, 135.33, 129.33, 122.96, 119.44, 114.53, 114.11, 112.98, 112.02, 101.63, 54.91, 46.66.

Das CF₃-COOH-Signal geht im Rauschen unter.

Ethyl-naphthalen-1-ylglycinat (99)

1-Naphthylamin (**97**, 500 mg, 3.49 mmol, 1.00 eq) wurde in 10 mL EtOH gelöst. Zu der Lösung wurden Ethyl-2-bromacetat (**98**, 465 µL, 4.19 mmol, 1.20 eq) und Na₂CO₃ (555 mg, 5.24 mmol, 1.50 eq) gegeben. Die Suspension wurde bei 90 °C für 23 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Suspension filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 533 mg (2.32 mmol, 66 %) rotviolettes Öl

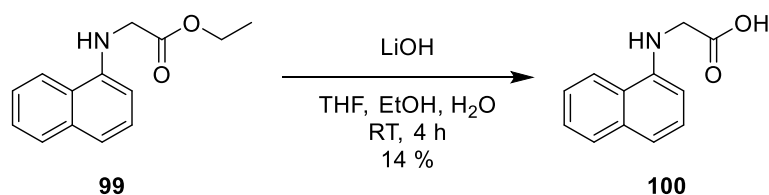
HPLC: 61.2 % B, Reinheit: 99.2 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₄H₁₅NO₂ 229.11 (M), gef. 230.10 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 8.15 – 8.10 (m, 1H), 7.77 (dd, J = 7.1, 2.3 Hz, 1H), 7.50 – 7.39 (m, 2H), 7.26 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.15 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.34 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 4.14 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 4.07 (s, 2H), 1.21 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

Das NH-Signal geht im Rauschen unter.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 171.13, 143.41, 133.95, 127.95, 126.54, 125.64, 124.17, 122.93, 121.38, 116.14, 103.08, 60.27, 44.97, 14.10.

N-Naphthylglycin (100)

Ethynaphthalen-1-ylglycinat (**99**, 533 mg, 2.32 mmol, 1.00 eq) wurde in 20 mL THF und 5 mL EtOH gelöst. Zu der Lösung wurde eine Lösung aus LiOH (278 mg, 11.6 mmol, 5.00 eq) in 10 mL H₂O gegeben. Die vereinten Lösungen wurden bei Raumtemperatur für 4 Stunden gerührt. Anschließend wurde THF und EtOH *in vacuo* entfernt und die wässrige Phase mit 1 M Salzsäure versetzt, bis das Produkt ausfiel. Der Feststoff wurde abfiltriert und *in vacuo* getrocknet.

Ausbeute: 65 mg (323 μ mol, 14 %) violetter Feststoff

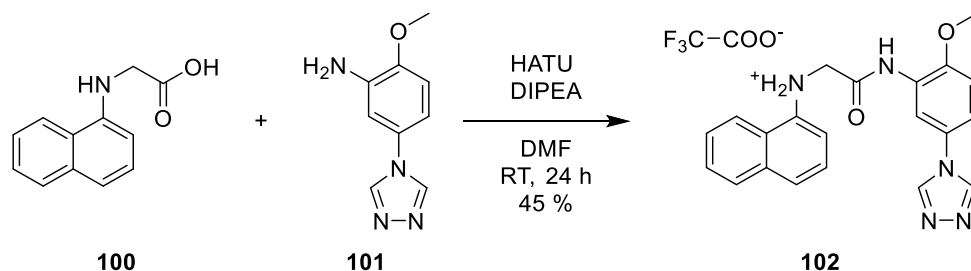
HPLC: 43.5 % B, Reinheit: 85.6 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₂H₁₁NO₂ 201.08 (M), gef. 202.04 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.13 – 8.08 (m, 1H), 7.79 – 7.75 (m, 1H), 7.47 – 7.39 (m, 2H), 7.29 – 7.24 (m, 1H), 7.14 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.35 (dd, *J* = 7.6, 0.9 Hz, 1H), 3.97 (s, 2H).

Das NH- und COOH-Signal gehen im Rauschen unter.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 172.51, 143.51, 133.94, 127.93, 126.58, 125.60, 124.12, 122.89, 121.32, 115.95, 103.05, 44.88.

***N*-2-((2-Methoxy-5-(4*H*-1,2,4-triazol-4-yl)phenyl)amino)-2-oxoethyl)naphthalen-1-ammonium -2,2,2-trifluoracetat (**102**)**

N-Naphthylglycine (**100**, 62.0 mg, 308 μmol , 1.00 eq) wurde in 5 mL DMF gelöst und mit 2-Methoxy-5-(4*H*-1,2,4-triazol-4-yl)anilin (**101**, 64.5 mg, 339 μmol , 1.10 eq), HATU (129 mg, 339 μmol , 1.10 eq) und DIPEA (115 μL , 678 μmol , 2.20 eq) versetzt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 68 mg (140 μmol , 45 %) hellbrauner Feststoff

HPLC: 51.2 % B, Reinheit: 98.6 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₂₁H₁₉N₅O₂ 373.15 (M), gef. 374.17 (M+H)⁺

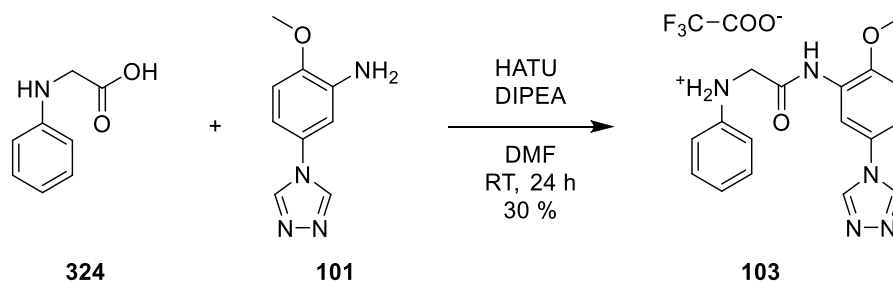
HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₂₁H₂₀N₅O₂ 374.1612, gef. 374.1615

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 9.47 (s, 1H), 9.00 (s, 2H), 8.39 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 8.26 – 8.17 (m, 1H), 7.86 – 7.76 (m, 2H), 7.55 – 7.46 (m, 2H), 7.32 (dd, *J* = 8.7, 2.7 Hz, 1H), 7.31 – 7.27 (m, 1H), 7.21 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.54 – 6.44 (m, 1H), 4.14 (s, 2H), 3.70 (s, 3H).

Das NH₂⁺-Signal geht im Rauschen unter.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 170.25, 143.74, 142.43, 134.54, 128.64, 128.51, 127.26, 127.15, 126.40, 125.06, 123.80, 121.87, 120.01, 118.26, 117.54, 114.31, 112.51, 104.45, 56.86, 48.42.

Die beiden TFA-Signale gehen im Rauschen unter.

***N*-2-((2-Methoxy-5-(4*H*-1,2,4-triazol-4-yl)phenyl)amino)-2-oxoethyl)benzolammonium-2,2,2-trifluoacetat (**103**)**

N-Phenylglycin (**324**, 100 mg, 662 μmol , 1.00 eq) wurde in 10 mL DMF gelöst und mit 2-Methoxy-5-(4*H*-1,2,4-triazol-4-yl)anilin (**101**, 138 mg, 728 μmol , 1.10 eq), HATU (277 mg, 728 μmol , 1.10 eq) und DIPEA (248 μL , 1.46 mmol, 2.20 eq) versetzt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 86 mg (197 μmol , 30 %) hellbrauner Feststoff

HPLC: 38.6 % B, Reinheit: 95.1 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₇H₁₇N₅O₂ 323.14 (M), gef. 324.22 (M+H)⁺

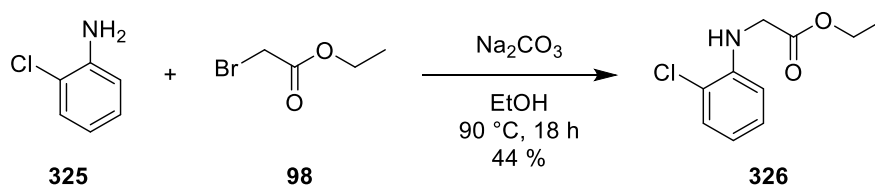
HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₇H₁₈N₅O₂ 324.1455, gef. 324.1453

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 9.38 (s, 1H), 8.98 (s, 2H), 8.40 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.34 (dd, *J* = 8.7, 2.7 Hz, 1H), 7.20 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.15 – 7.10 (m, 2H), 6.66 – 6.61 (m, 3H), 3.91 (s, 2H), 3.82 (s, 3H).

Das NH₂⁺-Signal geht im Rauschen unter.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 169.83, 147.95, 141.83, 128.98, 127.89, 126.71, 125.17, 117.64, 117.15, 113.69, 112.57, 111.92, 56.39, 47.94.

Die beiden TFA-Signale gehen im Rauschen unter.

Ethyl-(2-chlorphenyl)glycinat (326)

2-Chloranilin (**325**, 500 mg, 3.92 mmol, 1.00 eq) wurde in 10 mL EtOH gelöst. Zu der Lösung wurden Ethyl-2-bromacetat (**98**, 522 μL , 4.70 mmol, 1.20 eq) und Na_2CO_3 (623 mg, 5.88 mmol, 1.50 eq) gegeben. Der Ansatz wurde bei 90 °C für 18 Stunden gerührt. Anschließend wurde der Feststoff abfiltriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

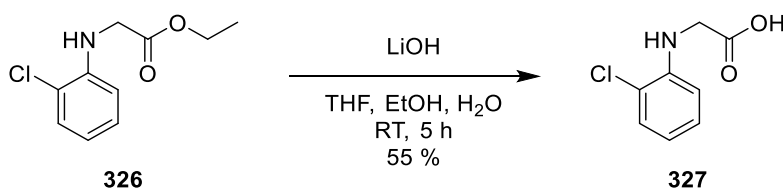
Ausbeute: 365 mg (1.71 mmol, 44 %) farbloses Öl

HPLC: 63.0 % B, Reinheit: 98.2 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{ClNO}_2$ 213.06 (M), gef. 214.04 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.26 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H), 7.14 – 7.09 (m, 1H), 6.65 – 6.60 (m, 1H), 6.57 (dd, *J* = 8.2, 1.4 Hz, 1H), 5.66 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 4.13 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.00 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 1.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 170.69, 143.52, 128.90, 127.87, 117.86, 117.10, 111.36, 60.40, 44.43, 14.04.

N-(2-Chlorphenyl)glycin (327)

Ethyl-(2-chlorphenyl)glycinat (**326**, 365 mg, 1.71 mmol, 1.00 eq) wurde in 20 mL THF und 5 mL EtOH gelöst. Zu der Lösung wurde eine Lösung aus LiOH (205 mg, 8.54 mmol, 5.00 eq) in 10 mL H₂O gegeben. Die vereinten Lösungen wurden bei Raumtemperatur für 5 Stunden gerührt. Anschließend wurde THF und EtOH *in vacuo* entfernt und die wässrige Phase mit 1 M Salzsäure versetzt, bis das Produkt ausfiel. Der Feststoff wurde abfiltriert und *in vacuo* getrocknet.

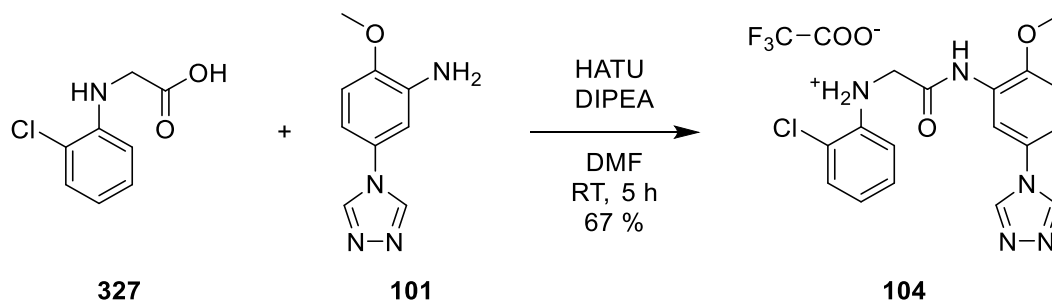
Ausbeute: 173 mg (932 μmol, 55 %) violetter Feststoff

HPLC: 40.9 % B, Reinheit: 99.8 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₂H₁₁NO₂ 185.02 (M), gef. 186.00 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 12.70 (s, 1H), 7.26 (dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 1H), 7.15 – 7.10 (m, 1H), 6.64 – 6.56 (m, 2H), 5.52 (s, 1H), 3.91 (s, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 172.01, 143.53, 128.84, 127.90, 117.78, 116.95, 111.37, 44.36.

2-Chlor-N-(2-((2-methoxy-5-(4H-1,2,4-triazol-4-yl)phenyl)amino)-2-oxoethyl)benzol ammonium-2,2,2-trifluoroacetat (104)

N-(2-Chlorphenyl)glycin (**327**, 174 mg, 937 μ mol, 1.00 eq) wurde in 10 mL DMF gelöst und mit 2-Methoxy-5-(4*H*-1,2,4-triazol-4-yl)anilin (**101**, 196 mg, 1.03 mmol, 1.10 eq), HATU (392 mg, 1.03 mmol, 1.10 eq) und DIPEA (360 μ L, 2.06 mmol, 2.20 eq) versetzt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 5 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 298 mg (632 μ mol, 67 %) hellbrauner Feststoff

HPLC: 46.4 % B, Reinheit: 98.4 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₇H₁₆ClN₅O₂ 357.10 (M), gef. 358.16 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₇H₁₇ClN₅O₂ 358.1065, gef. 358.1069

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 9.49 (s, 1H), 9.03 (s, 2H), 8.36 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.36 (dd, *J* = 8.7, 2.7 Hz, 1H), 7.31 (dd, *J* = 7.9, 1.4 Hz, 1H), 7.22 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.17 – 7.13 (m, 1H), 6.68 – 6.62 (m, 2H), 5.96 (s, 2H), 4.07 (s, 2H), 3.87 (s, 3H).

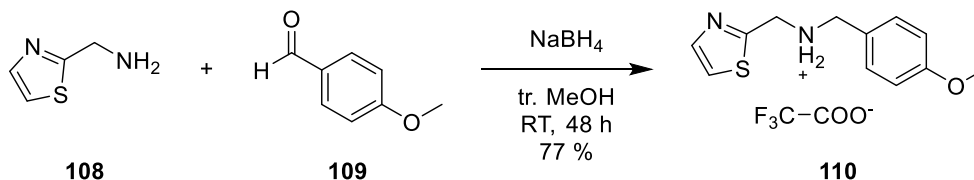
Das NH₂⁺-Signal geht im Rauschen unter.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 169.11, 158.10 (q, *J* = 36.3 Hz), 148.54, 143.42, 141.83, 130.04, 129.02, 128.07, 127.88, 126.60, 118.23, 117.54, 114.16, 111.98, 111.55, 56.35, 47.02.

Das CF₃-COOH-Signal geht im Rauschen unter.

5.2.4 Synthese der Verbindungen aus der zweiten Dockingstudie an der G-Protein-Bindetasche des ET_BR

N-(4-Methoxybenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methan ammonium-2,2,2-trifluoracetat (**110**)



Thiazol-2-ylmethanamin (**108**, 150 mg, 1.31 mmol, 1.00 eq) wurde in 6 mL tr. MeOH gelöst. Zu der Lösung wurden 4 Å Molekularsieb (100 mg) und 4-Methoxybenzaldehyd (**109**, 176 μ L, 1.45 mmol, 1.10 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt. Anschließend wurde NaBH₄ (74.6 mg, 1.97 mmol, 1.50 eq) hinzugegeben und für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Lösung filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 353 mg (1.01 mmol, 77 %) gelber Feststoff

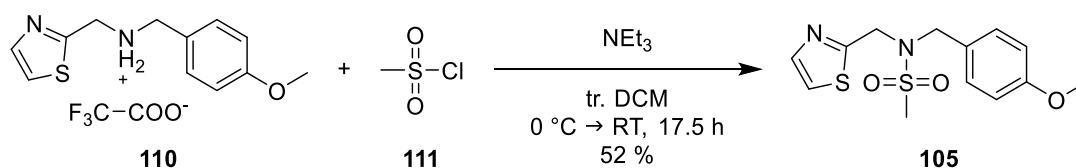
HPLC: 33.5 % B, Reinheit: 98.2 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₂H₁₄N₂OS 234.08 (M), gef. 235.04 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 9.62 (s, 2H), 7.94 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.45 – 7.41 (m, 2H), 7.02 – 6.98 (m, 2H), 4.55 (s, 2H), 4.20 (s, 2H), 3.78 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 159.88, 159.82, 157.96 (q, *J* = 32.8 Hz), 142.67, 131.73, 123.18, 122.63, 114.03, 55.18, 49.59, 45.54.

Das CF₃-COOH-Signal geht im Rauschen unter.

***N*-(4-Methoxybenzyl)-*N*-(thiazol-2-ylmethyl)methansulfonamid (105)**

N-(4-Methoxybenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methan ammonium-2,2,2-trifluoroacetat (**110**, 34.0 mg, 97.6 μmol , 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden NEt₃ (28 μL , 205 μmol , 2.10 eq) und Methansulfonylchlorid (**111**, 8 μL , 107 μmol , 1.10 eq) gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und für weitere 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit DCM verdünnt und mit H₂O gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 16 mg (51.2 μmol , 52 %) gelber Feststoff

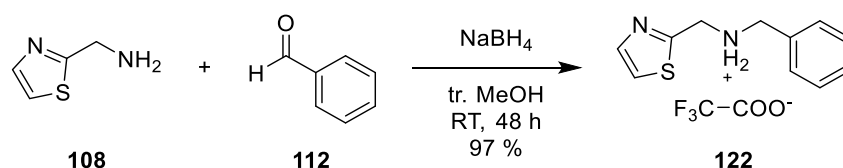
HPLC: 56.2 % B, Reinheit: 99.2 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₃H₁₆N₂O₃S₂ 312.06 (M), gef. 335.07 (M+Na)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₃H₁₆N₂NaO₃S₂ 335.0495, gef. 335.0500

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 7.75 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.34 – 7.18 (m, 2H), 6.97 – 6.83 (m, 2H), 4.58 (s, 2H), 4.33 (s, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.02 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 166.35, 158.86, 142.41, 129.98, 127.56, 121.01, 113.88, 55.04, 50.27, 47.18, 38.66.

N-Benzyl-1-(thiazol-2-yl)methan ammonium-2,2,2-trifluoracetat (122)

Thiazol-2-ylmethanamin (**108**, 50.0 mg, 438 μ mol, 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. MeOH gelöst. Zu der Lösung wurden 4 Å Molekularsieb (100 mg) und Benzaldehyd (**112**, 49 μ L, 482 μ mol, 1.10 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt. Anschließend wurde NaBH₄ (24.9 mg, 657 μ mol, 1.50 eq) hinzugegeben und für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Lösung filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 136 mg (427 μ mol, 97 %) gelber Feststoff

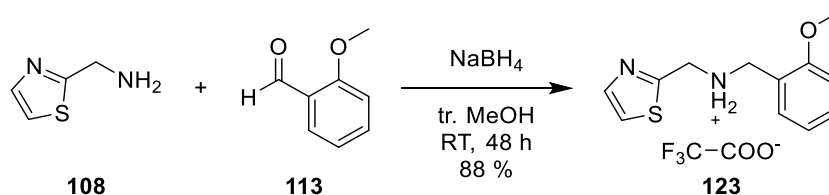
HPLC: 30.6 % B, Reinheit: 95.0 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₁H₁₂N₂S 204.07 (M), gef. 205.00 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 9.76 (s, 2H), 7.94 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.53 – 7.50 (m, 2H), 7.45 – 7.43 (m, 3H), 4.59 (s, 2H), 4.28 (s, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 159.80, 158.11 (q, *J* = 34.5 Hz), 142.69, 131.47, 130.12, 129.07, 128.67, 122.67, 50.10, 45.85.

Das CF₃-COOH-Signal geht im Rauschen unter.

***N*-(2-Methoxybenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methan ammonium-2,2,2-trifluoracetat (123)**

Thiazol-2-ylmethanamin (**108**, 50.0 mg, 438 μmol , 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. MeOH gelöst. Zu der Lösung wurden 4 Å Molekularsieb (100 mg) und 2-Methoxybenzaldehyd (**113**, 58 μL , 482 μmol , 1.10 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt. Anschließend wurde NaBH₄ (24.9 mg, 657 μmol , 1.50 eq) hinzugegeben und für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Lösung filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 134 mg (385 μmol , 88 %) brauner Feststoff

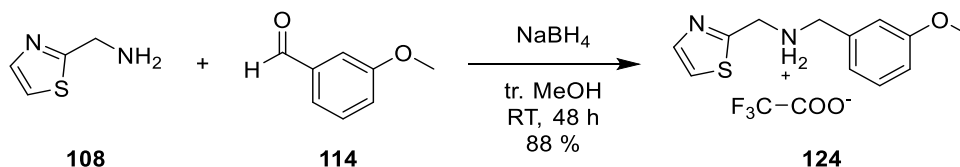
HPLC: 34.5 % B, Reinheit: 99.9 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₂H₁₄N₂OS 234.08 (M), gef. 235.05 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 9.49 (s, 2H), 7.95 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.46 – 7.37 (m, 2H), 7.09 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.00 (td, *J* = 7.4, 0.9 Hz, 1H), 4.58 (s, 2H), 4.22 (s, 2H), 3.81 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 159.79, 157.56, 142.68, 131.41, 130.94, 122.71, 120.34, 119.32, 111.10, 55.52, 46.02, 45.09.

Die TFA-Signale gehen im Rauschen unter.

***N*-(3-Methoxybenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methan ammonium-2,2,2-trifluoracetat (124)**

Thiazol-2-ylmethanamin (**108**, 50.0 mg, 438 μ mol, 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. MeOH gelöst. Zu der Lösung wurden 4 Å Molekularsieb (100 mg) und 3-Methoxybenzaldehyd (**114**, 59 μ L, 482 μ mol, 1.10 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt. Anschließend wurde NaBH₄ (24.9 mg, 657 μ mol, 1.50 eq) hinzugegeben und für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Lösung filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 134 mg (385 μ mol, 88 %) gelber Feststoff

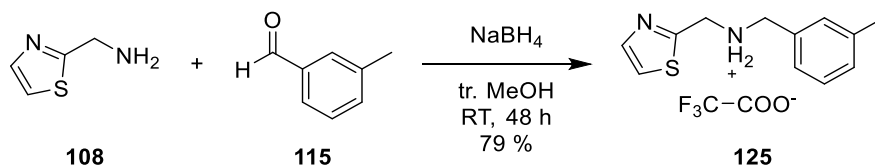
HPLC: 33.9 % B, Reinheit: 99.0 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₂H₁₄N₂OS 234.08 (M), gef. 235.03 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 9.77 (s, 2H), 7.94 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.38 – 7.33 (m, 1H), 7.14 – 7.11 (m, 1H), 7.08 – 7.05 (m, 1H), 7.01 – 6.98 (m, 1H), 4.57 (s, 2H), 4.25 (s, 2H), 3.78 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 159.83, 159.31, 142.69, 132.85, 129.80, 122.66, 122.11, 115.49, 114.68, 55.12, 50.01, 45.81.

Die TFA-Signale gehen im Rauschen unter.

***N*-(3-Methylbenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methan ammonium-2,2,2-trifluoracetat (125)**

Thiazol-2-ylmethanamin (**108**, 50.0 mg, 438 μmol , 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. MeOH gelöst. Zu der Lösung wurden 4 Å Molekularsieb (100 mg) und 3-Methylbenzaldehyd (**115**, 57 μL , 482 μmol , 1.10 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt. Anschließend wurde NaBH₄ (24.9 mg, 657 μmol , 1.50 eq) hinzugegeben und für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Lösung filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 115 mg (346 μmol , 79 %) gelber Feststoff

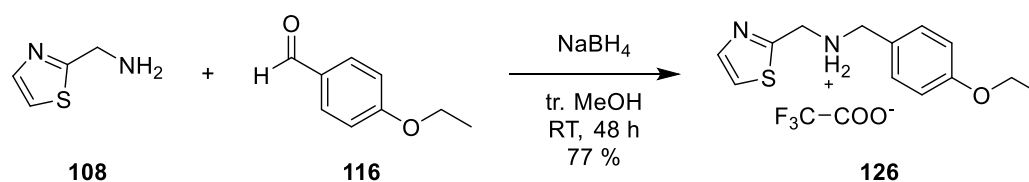
HPLC: 37.1 % B, Reinheit: 97.0 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₂H₁₄N₂S 218.09 (M), gef. 219.12 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 9.73 (s, 2H), 7.94 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.35 – 7.28 (m, 3H), 7.26 – 7.23 (m, 1H), 4.58 (s, 2H), 4.23 (s, 2H), 2.33 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 159.81, 158.07 (q, *J* = 33.0 Hz), 142.68, 137.87, 131.34, 130.68, 129.64, 128.58, 127.12, 122.66, 50.08, 45.83, 20.84.

Das CF₃-COOH-Signal geht im Rauschen unter.

***N*-(4-Ethoxybenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methan ammonium-2,2,2-trifluoracetat (126)**

Thiazol-2-ylmethanamin (**108**, 50.0 mg, 438 μ mol, 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. MeOH gelöst. Zu der Lösung wurden 4 Å Molekularsieb (100 mg) und 4-Ethoxybenzaldehyd (**116**, 67 μ L, 482 μ mol, 1.10 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt. Anschließend wurde NaBH₄ (24.9 mg, 657 μ mol, 1.50 eq) hinzugegeben und für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Lösung filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 122 mg (337 μ mol, 77 %) gelber Feststoff

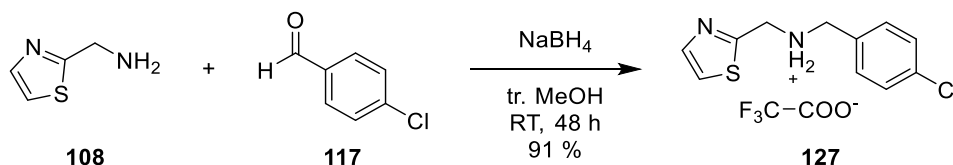
HPLC: 39.0 % B, Reinheit: 95.4 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₃H₁₆N₂OS 248.10 (M), gef. 249.10 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 9.56 (s, 2H), 7.93 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.43 – 7.39 (m, 2H), 6.99 – 6.95 (m, 2H), 4.53 (s, 2H), 4.19 (s, 2H), 4.04 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.33 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 160.19, 159.03, 157.81 (q, *J* = 30.9 Hz), 142.65, 131.66, 123.24, 122.55, 114.46, 63.09, 49.64, 45.61, 14.52.

Das CF₃-COOH-Signal geht im Rauschen unter.

***N*-(4-Chlorbenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methan ammonium-2,2,2-trifluoracetat (127)**

Thiazol-2-ylmethanamin (**108**, 50.0 mg, 438 μmol , 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. MeOH gelöst. Zu der Lösung wurden 4 Å Molekularsieb (100 mg) und 4-Chlorbenzaldehyd (**117**, 67.7 mg, 482 μmol , 1.10 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt. Anschließend wurde NaBH₄ (24.9 mg, 657 μmol , 1.50 eq) hinzugegeben und für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Lösung filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 141 mg (400 μmol , 91 %) weißer Feststoff

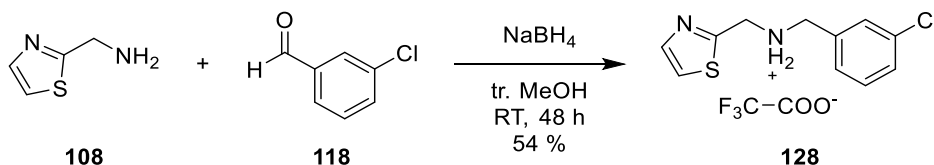
HPLC: 38.2 % B, Reinheit: 98.5 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₁H₁₁ClN₂S 238.03 (M), gef. 238.91 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 9.69 (s, 2H), 7.93 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.56 – 7.48 (m, 4H), 4.56 (s, 2H), 4.26 (s, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 160.31, 157.98 (d, *J* = 31.0 Hz), 142.66, 133.75, 132.02, 130.84, 128.60, 122.55, 49.35, 45.96.

Das CF₃-COOH-Signal geht im Rauschen unter.

***N*-(3-Chlorbenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methanaminium-2,2,2-trifluoracetat (128)**

Thiazol-2-ylmethanamin (**108**, 60.0 mg, 526 μmol , 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. MeOH gelöst. Zu der Lösung wurden 4 Å Molekularsieb (100 mg) und 3-Chlorbenzaldehyd (**118**, 66 μL , 578 μmol , 1.10 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt. Anschließend wurde NaBH₄ (29.8 mg, 788 μmol , 1.50 eq) hinzugegeben und für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Lösung filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 101 mg (286 μmol , 54 %) gelber Feststoff

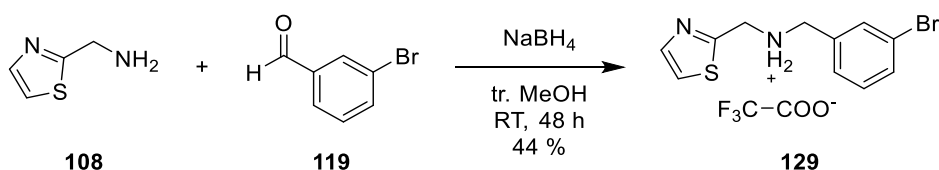
HPLC: 37.8 % B, Reinheit: 99.0 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₁H₁₁ClN₂S 238.03 (M), gef. 239.14 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 9.69 (s, 2H), 7.93 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.63 – 7.60 (m, 1H), 7.51 – 7.46 (m, 3H), 4.57 (s, 2H), 4.28 (s, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 160.33, 142.67, 134.28, 133.09, 130.47, 129.95, 128.88, 128.78, 122.56, 49.48, 46.12.

Die TFA-Signale gehen im Rauschen unter.

***N*-(3-Brombenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methan ammonium-2,2,2-trifluoacetat (129)**

Thiazol-2-ylmethanamin (**108**, 50.0 mg, 438 μmol , 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. MeOH gelöst. Zu der Lösung wurden 4 Å Molekularsieb (100 mg) und 3-Brombenzaldehyd (**119**, 56 μL , 482 μmol , 1.10 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt. Anschließend wurde NaBH_4 (24.9 mg, 657 μmol , 1.50 eq) hinzugegeben und für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Lösung filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 76 mg (191 μmol , 44 %) gelber Feststoff

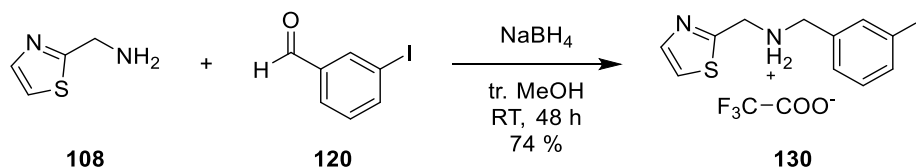
HPLC: 39.4 % B, Reinheit: 98.2 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{BrN}_2\text{S}$ 281.98 (M), gef. 283.07 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 9.79 (s, 2H), 7.94 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.76 (t, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.63 (ddd, *J* = 8.0, 2.0, 1.0 Hz, 1H), 7.52 – 7.50 (m, 1H), 7.41 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.60 (s, 2H), 4.29 (s, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 159.82, 142.69, 134.17, 132.91, 131.85, 130.73, 129.25, 122.67, 121.63, 49.37, 46.02.

Die TFA-Signale gehen im Rauschen unter.

***N*-(3-Iodbenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methan ammonium-2,2,2-trifluoracetat (130)**

Thiazol-2-ylmethanamin (**108**, 50.0 mg, 438 μmol , 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. MeOH gelöst. Zu der Lösung wurden 4 Å Molekularsieb (100 mg) und 3-Iodbenzaldehyd (**120**, 112 mg, 482 μmol , 1.10 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt. Anschließend wurde NaBH₄ (24.9 mg, 657 μmol , 1.50 eq) hinzugegeben und für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Lösung filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 144 mg (324 μmol , 74 %) gelber Feststoff

HPLC: 41.4 % B, Reinheit: 99.5 %

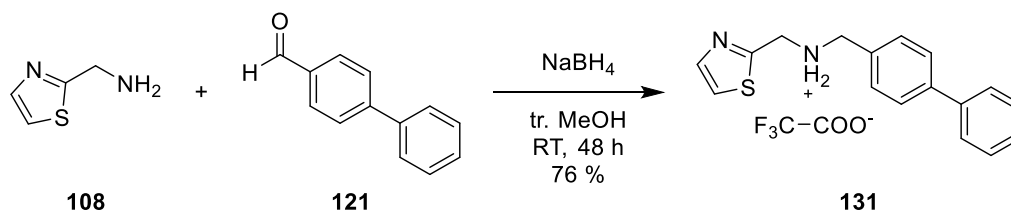
MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₁H₁₁IN₂S 329.97 (M), gef. 331.07 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 9.76 (s, 2H), 7.94 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.92 (t, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.79 (ddd, *J* = 7.9, 1.7, 1.0 Hz, 1H), 7.52 (ddd, *J* = 7.7, 1.6, 1.1 Hz, 1H), 7.24 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.59 (s, 2H), 4.25 (s, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 159.78, 142.69, 138.68, 137.65, 134.03, 130.66, 129.59, 122.67, 94.79, 49.29, 46.02.

Die TFA-Signale gehen im Rauschen unter.

1-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)-N-(thiazol-2-ylmethyl)methan ammonium-2,2,2-trifluoracetat (131)



Thiazol-2-ylmethanamin (**108**, 50.0 mg, 438 μ mol, 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. MeOH gelöst. Zu der Lösung wurden 4 Å Molekularsieb (100 mg) und [1,1'-Biphenyl]-4-carbaldehyd (**121**, 87.8 mg, 482 μ mol, 1.10 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt. Anschließend wurde NaBH₄ (24.9 mg, 657 μ mol, 1.50 eq) hinzugegeben und für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Lösung filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 131 mg (332 μ mol, 76 %) gelber Feststoff

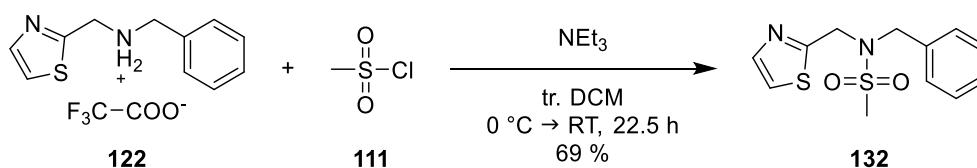
HPLC: 48.5 % B, Reinheit: 99.5 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₇H₁₆N₂S 280.10 (M), gef. 281.06 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 9.70 (s, 2H), 7.95 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.77 – 7.74 (m, 2H), 7.72 – 7.68 (m, 2H), 7.62 – 7.59 (m, 2H), 7.51 – 7.47 (m, 2H), 7.42 – 7.37 (m, 1H), 4.60 (s, 2H), 4.31 (s, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 160.26, 142.68, 140.73, 139.34, 130.86, 130.69, 128.95, 127.75, 126.84, 126.67, 122.57, 49.82, 45.96.

Die TFA-Signale gehen im Rauschen unter.

N-Benzyl-N-(thiazol-2-ylmethyl)methansulfonamid (132)

N-Benzyl-1-(thiazol-2-yl)methan ammonium-2,2,2-trifluoroacetat (**122**, 70.0 mg, 221 μmol, 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden NEt₃ (123 μL, 882 μmol, 4.00 eq) und Methansulfonylchlorid (**111**, 51 μL, 662 μmol, 3.00 eq) gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und für weitere 22 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit DCM verdünnt und mit H₂O gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 43 mg (152 μmol, 69 %) weißer Feststoff

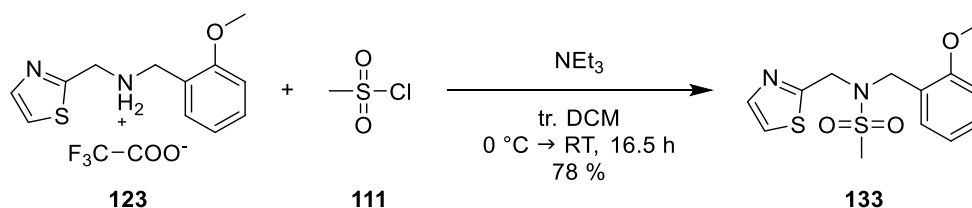
HPLC: 57.6 % B, Reinheit: 95.1 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₂H₁₄N₂O₂S₂ 282.05 (M), gef. 283.00 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₂H₁₄N₂NaO₂S₂ 305.0389, gef. 305.0391

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.75 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.37 – 7.29 (m, 5H), 4.62 (s, 2H), 4.41 (s, 2H), 3.05 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, CDCl₃-*d*) δ [ppm] = 172.10, 136.14, 134.56, 129.49, 129.15, 128.78, 122.32, 53.13, 46.86, 38.91.

***N*-(2-Methoxybenzyl)-*N*-(thiazol-2-yl)methansulfonamid (**133**)**

N-(2-Methoxybenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methan ammonium-2,2,2-trifluoroacetat (**123**, 70.0 mg, 201 μmol , 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden NEt₃ (112 μL , 804 μmol , 4.00 eq) und Methansulfonylchlorid (**111**, 47 μL , 603 μmol , 3.00 eq) gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und für weitere 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit DCM verdünnt und mit H₂O gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 49 mg (157 μmol , 78 %) weißer Feststoff

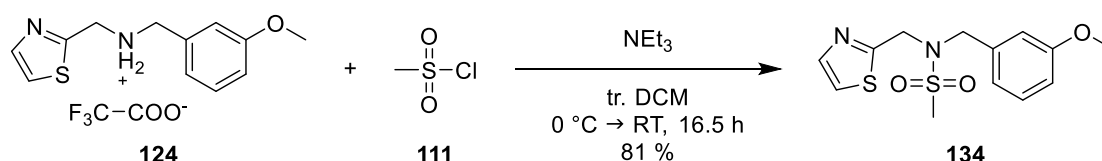
HPLC: 57.7 % B, Reinheit: 99.5 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₃H₁₆N₂O₃S₂ 312.06 (M), gef. 313.13 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₃H₁₆N₂NaO₃S₂ 335.0495, gef. 335.0498

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.73 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.65 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.31 – 7.26 (m, 2H), 6.99 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.93 (td, *J* = 7.4, 1.0 Hz, 1H), 4.63 (s, 2H), 4.42 (s, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.01 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 166.83, 157.16, 142.33, 130.00, 129.24, 123.53, 120.85, 120.25, 110.85, 55.21, 47.84, 45.78, 38.74.

N-(3-Methoxybenzyl)-N-(thiazol-2-ylmethyl)methansulfonamid (134)

N-(3-Methoxybenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methan ammonium-2,2,2-trifluoroacetat (**124**, 70.0 mg, 201 μmol , 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden NEt₃ (112 μL , 804 μmol , 4.00 eq) und Methansulfonylchlorid (**111**, 47 μL , 603 μmol , 3.00 eq) gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und für weitere 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit DCM verdünnt und mit H₂O gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 51 mg (163 μmol , 81 %) weißer Feststoff

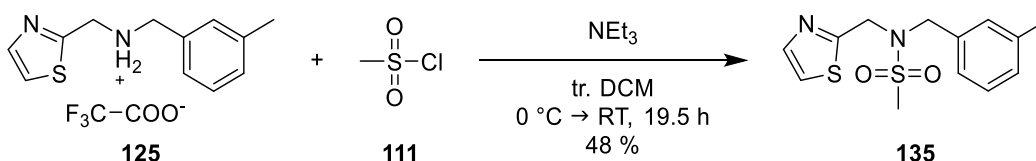
HPLC: 56.9 % B, Reinheit: 97.0 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₃H₁₆N₂O₃S₂ 312.06 (M), gef. 313.12 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₃H₁₆N₂NaO₃S₂ 335.0495, gef. 335.0491

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.75 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.26 (td, *J* = 7.7, 0.7 Hz, 1H), 6.91 – 6.84 (m, 3H), 4.63 (s, 2H), 4.38 (s, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.05 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 166.17, 159.29, 142.39, 137.50, 129.53, 121.08, 120.55, 113.94, 113.17, 54.95, 50.88, 47.62, 38.60.

***N*-(3-Methylbenzyl)-*N*-(thiazol-2-ylmethyl)methansulfonamid (135)**

N-(3-Methylbenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methanaminium-2,2,2-trifluoroacetat (**125**, 95.0 mg, 286 μmol , 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden NEt₃ (159 μL , 1.14 mmol, 4.00 eq) und Methansulfonylchlorid (**111**, 66 μL , 858 μmol , 3.00 eq) gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und danach für weitere 19 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit DCM verdünnt und mit H₂O gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 41 mg (138 μmol , 48 %) gelbes Öl

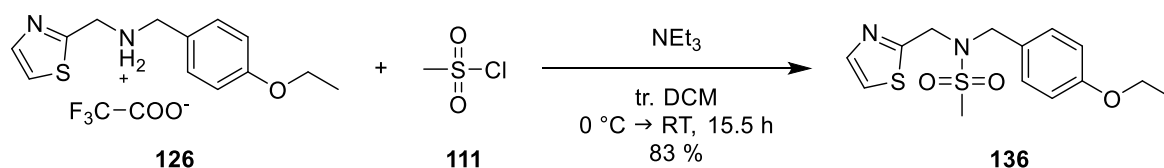
HPLC: 62.0 % B, Reinheit: 97.2 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₃H₁₆N₂O₂S₂ 296.07 (M), gef. 297.19 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₃H₁₆N₂NaO₂S₂ 319.0545, gef. 319.0536

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.75 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.25 – 7.20 (m, 1H), 7.13 – 7.08 (m, 3H), 4.60 (s, 2H), 4.37 (s, 2H), 3.04 (s, 3H), 2.28 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 166.09, 142.39, 137.58, 135.77, 128.99, 128.33, 125.53, 121.05, 119.40, 50.81, 47.44, 38.65, 20.91.

***N*-(4-Ethoxybenzyl)-*N*-(thiazol-2-ylmethyl)methansulfonamid (136)**

N-(4-Ethoxybenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methan ammonium-2,2,2-trifluoroacetat (**126**, 60.0 mg, 166 μ mol, 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden NEt₃ (92 μ L, 662 μ mol, 4.00 eq) und Methansulfonylchlorid (**111**, 38 μ L, 497 μ mol, 3.00 eq) gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und für weitere 15 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit DCM verdünnt und mit H₂O gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 45 mg (138 μ mol, 83 %) weißer Feststoff

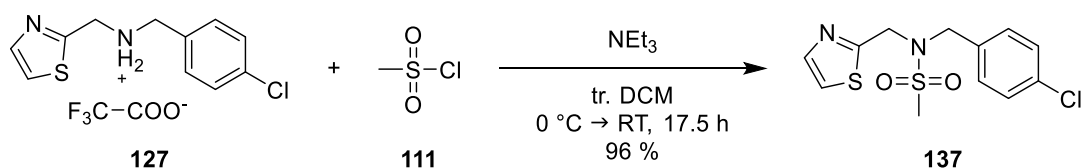
HPLC: 61.7 % B, Reinheit: 98.7 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₄H₁₈N₂O₃S₂ 326.08 (M), gef. 327.13 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₄H₁₈N₂NaO₃S₂ 349.0651, gef. 349.0652

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 7.75 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.25 – 7.22 (m, 2H), 6.90 – 6.87 (m, 2H), 4.58 (s, 2H), 4.32 (s, 2H), 4.00 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.01 (s, 3H), 1.31 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 166.37, 158.12, 142.39, 129.98, 127.41, 121.00, 114.35, 62.95, 50.29, 47.18, 38.66, 14.56.

***N*-(4-Chlorbenzyl)-*N*-(thiazol-2-ylmethyl)methansulfonamid (137)**

N-(4-Chlorbenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methanaminium-2,2,2-trifluoroacetat (**127**, 60.0 mg, 170 μ mol, 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden NEt₃ (95 μ L, 680 μ mol, 4.00 eq) und Methansulfonylchlorid (**111**, 40 μ L, 510 μ mol, 3.00 eq) gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und für weitere 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit DCM verdünnt und mit H₂O gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 52 mg (164 μ mol, 96 %) weißer Feststoff

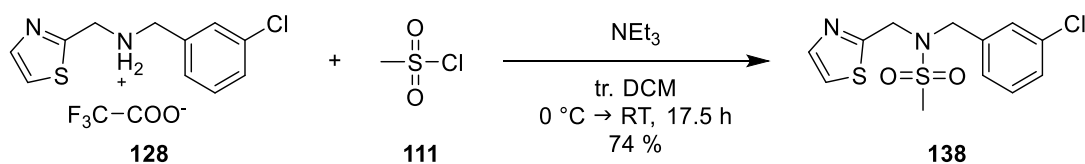
HPLC: 63.4 % B, Reinheit: 95.1 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₂H₁₃ClN₂O₂S₂ 316.01 (M), gef. 317.14 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₂H₁₃ClN₂NaO₂S₂ 338.9999, gef. 338.9994

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 7.73 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.40 – 7.37 (m, 2H), 7.35 – 7.32 (m, 2H), 4.64 (s, 2H), 4.41 (s, 2H), 3.07 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 166.02, 142.38, 135.23, 132.24, 130.22, 128.35, 121.14, 50.39, 47.85, 38.49.

***N*-(3-Chlorbenzyl)-*N*-(thiazol-2-ylmethyl)methansulfonamid (138)**

N-(3-Chlorbenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methanaminium-2,2,2-trifluoroacetat (**128**, 60.0 mg, 170 μmol , 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden NEt₃ (95 μL , 680 μmol , 4.00 eq) und Methansulfonylchlorid (**111**, 40 μL , 510 μmol , 3.00 eq) gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und für weitere 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit DCM verdünnt und mit H₂O gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 40 mg (126 μmol , 74 %) farbloses Öl

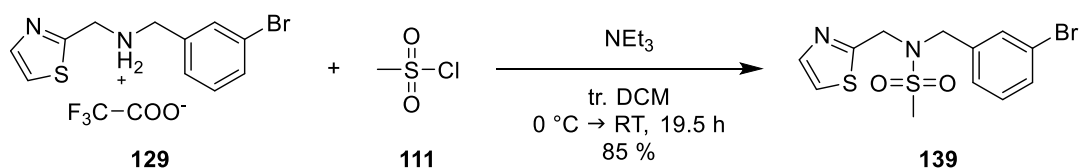
HPLC: 63.5 % B, Reinheit: 95.3 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₂H₁₃ClN₂O₂S₂ 316.01 (M), gef. 317.15 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₂H₁₃ClN₂NaO₂S₂ 338.9999, gef. 339.0001

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.73 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.38 – 7.30 (m, 3H), 7.28 – 7.26 (m, 1H), 4.67 (s, 2H), 4.43 (s, 2H), 3.09 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 166.01, 142.35, 138.93, 133.00, 130.21, 128.03, 127.51, 126.90, 121.16, 50.66, 48.18, 38.39.

***N*-(3-Brombenzyl)-*N*-(thiazol-2-ylmethyl)methansulfonamid (139)**

N-(3-Brombenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methanaminium-2,2,2-trifluoracetat (**129**, 62.0 mg, 156 μmol , 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden NEt₃ (87 μL , 624 μmol , 4.00 eq) und Methansulfonylchlorid (**111**, 36 μL , 468 μmol , 3.00 eq) gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und für weitere 19 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit DCM verdünnt und mit H₂O gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 48 mg (133 μmol , 85 %) gelbes Öl

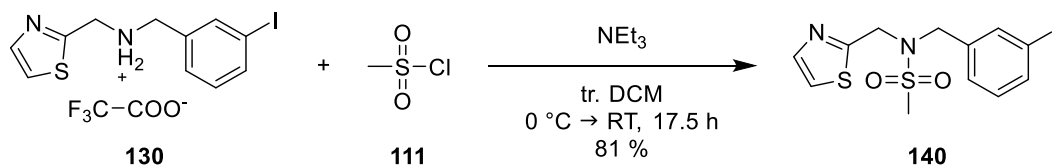
HPLC: 64.6 % B, Reinheit: 97.5 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₂H₁₃BrN₂O₂S₂ 359.96 (M), gef. 361.06 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₂H₁₃BrN₂NaO₂S₂ 382.9494, gef. 382.9487

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 7.73 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.49 – 7.45 (m, 2H), 7.33 – 7.26 (m, 2H), 4.66 (s, 2H), 4.43 (s, 2H), 3.08 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 166.01, 142.34, 139.18, 130.92, 130.49, 130.41, 127.29, 121.59, 121.17, 50.64, 48.21, 38.37.

***N*-(3-Iodbenzyl)-*N*-(thiazol-2-ylmethyl)methansulfonamid (**140**)**

N-(3-Iodbenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methan ammonium-2,2,2-trifluoroacetat (**130**, 60.0 mg, 135 μmol , 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden NEt₃ (75 μL , 540 μmol , 4.00 eq) und Methansulfonylchlorid (**111**, 31 μL , 405 μmol , 3.00 eq) gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und für weitere 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit DCM verdünnt und mit H₂O gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 45 mg (110 μmol , 81 %) farbloses Öl

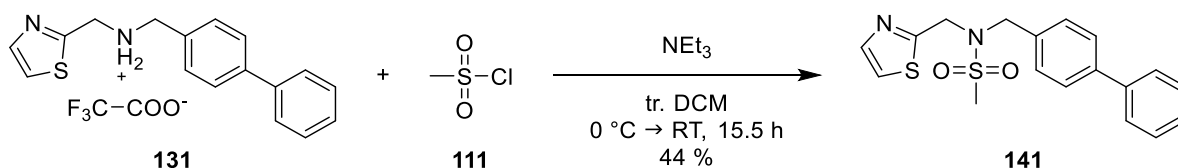
HPLC: 66.7 % B, Reinheit: 98.6 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₂H₁₃IN₂O₂S₂ 407.95 (M), gef. 409.03 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₂H₁₃IN₂NaO₂S₂ 430.9355, gef. 430.9347

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 7.73 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.66 – 7.62 (m, 2H), 7.32 (ddd, *J* = 7.7, 1.6, 1.1 Hz, 1H), 7.13 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.65 (s, 2H), 4.39 (s, 2H), 3.07 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 166.02, 142.34, 138.95, 136.81, 136.26, 130.48, 127.68, 121.15, 94.71, 50.54, 48.17, 38.35.

N-([1,1'-Biphenyl]-4-ylmethyl)-N-(thiazol-2-ylmethyl)methansulfonamid (141)

Die Verbindung 1-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)-N-(thiazol-2-ylmethyl)methan ammonium-2,2,2-trifluoracetat (**141**, 60.0 mg, 152 μ mol, 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden NEt₃ (85 μ L, 609 μ mol, 4.00 eq) und Methansulfonylchlorid (**111**, 35 μ L, 456 μ mol, 3.00 eq) gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und für weitere 15 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit DCM verdünnt und mit H₂O gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 24 mg (67.0 μ mol, 44 %) weißer Feststoff

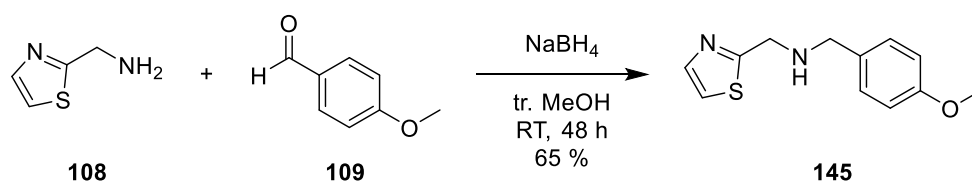
HPLC: 72.0 % B, Reinheit: 98.7 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₈H₁₈N₂O₂S₂ 358.08 (M), gef. 359.11 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₈H₁₈N₂NaO₂S₂ 381.0702, gef. 381.0696

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 7.77 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 7.69 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 7.67 – 7.64 (m, 4H), 7.49 – 7.44 (m, 2H), 7.43 – 7.40 (m, 2H), 7.39 – 7.35 (m, 1H), 4.66 (s, 2H), 4.46 (s, 2H), 3.08 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 166.00, 142.45, 139.63, 139.51, 135.16, 129.02, 128.88, 127.44, 126.71, 126.56, 121.11, 50.48, 47.48, 38.74.

N-(4-Methoxybenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methanamin (145)

Thiazol-2-ylmethanamin (**108**, 150 mg, 1.31 mmol, 1.00 eq) wurde in 6 mL tr. MeOH gelöst. Zu der Lösung wurden 4 Å Molekularsieb (100 mg) und 4-Methoxybenzaldehyd (**109**, 176 μ L, 1.45 mmol, 1.10 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt. Anschließend wurde NaBH₄ (74.6 mg, 1.97 mmol, 1.50 eq) hinzugegeben und für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Lösung filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach der Lyophilisation wurde der Rückstand in EA aufgenommen und mit 1 M NaOH-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

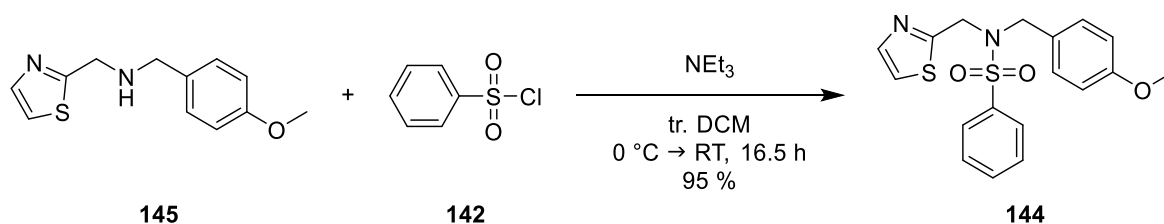
Ausbeute: 198 mg (845 μ mol, 65 %) gelbes Öl

HPLC: 33.5 % B, Reinheit: 96.9 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₂H₁₄N₂OS 234.08 (M), gef. 235.04 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 7.70 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 7.59 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 7.28 – 7.25 (m, 2H), 6.90 – 6.87 (m, 2H), 3.94 (s, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.69 (s, 2H), 3.21 (s, 1H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 172.87, 158.14, 142.16, 132.07, 129.13, 119.54, 113.54, 54.97, 51.65, 49.31.

***N*-(4-Methoxybenzyl)-*N*-(thiazol-2-ylmethyl)benzensulfonamid (**144**)**

N-(4-Methoxybenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methanamin (**145**, 40.0 mg, 171 μ mol, 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden NEt₃ (95 μ L, 683 μ mol, 4.00 eq) und Benzensulfonylchlorid (**142**, 66 μ L, 512 μ mol, 3.00 eq) gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und für weitere 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit DCM verdünnt und mit H₂O gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 61 mg (163 μ mol, 95 %) gelber Feststoff

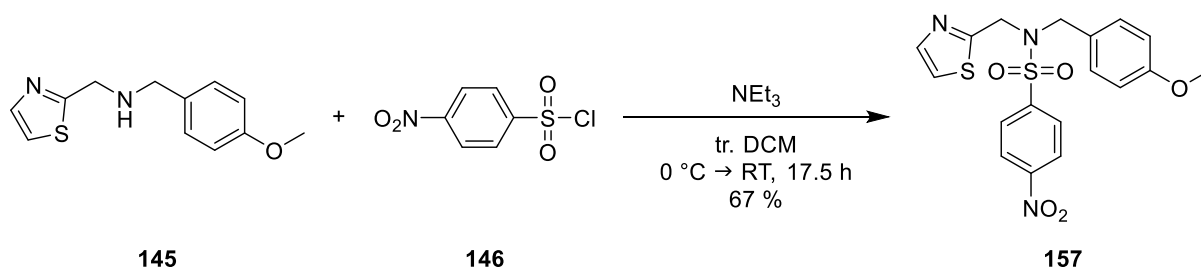
HPLC: 71.3 % B, Reinheit: 95.2 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₈H₁₈N₂O₃S₂ 374.08 (M), gef. 375.05 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₈H₁₈N₂NaO₃S₂ 397.0651, gef. 397.0646

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.88 – 7.85 (m, 2H), 7.72 – 7.68 (m, 1H), 7.63 – 7.58 (m, 4H), 7.13 – 7.10 (m, 2H), 6.85 – 6.81 (m, 2H), 4.59 (s, 2H), 4.35 (s, 2H), 3.71 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 166.04, 158.83, 142.02, 139.18, 133.01, 129.97, 129.36, 127.21, 126.96, 121.12, 113.77, 55.03, 50.92, 47.67.

***N*--(4-Methoxybenzyl)-4-nitro-*N*-(thiazol-2-ylmethyl)benzoesulfonamid (157)**

N-(4-Methoxybenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methanamin (**145**, 60.0 mg, 256 μmol , 1.00 eq) wurde in 3 mL tr. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden NEt₃ (143 μL , 1.02 mmol, 4.00 eq) und 4-Nitrobenzoesulfonylchlorid (**146**, 170 mg, 768 μmol , 3.00 eq) gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und für weitere 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit DCM verdünnt und mit H₂O gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 72 mg (172 μmol , 67 %) weißer Feststoff

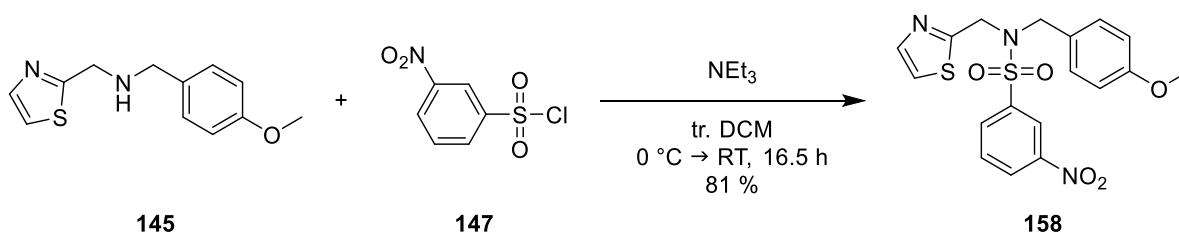
HPLC: 73.3 % B, Reinheit: 99.6 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₈H₁₇N₃O₅S₂ 419.06 (M), gef. 420.07 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₈H₁₇N₃NaO₅S₂ 442.0502, gef. 442.0505

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.38 – 8.35 (m, 2H), 8.12 – 8.09 (m, 2H), 7.62 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.60 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.16 – 7.13 (m, 2H), 6.87 – 6.83 (m, 2H), 4.67 (s, 2H), 4.44 (s, 2H), 3.71 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 165.27, 158.95, 149.72, 144.77, 142.16, 130.01, 128.62, 126.83, 124.46, 121.25, 113.87, 55.05, 51.04, 47.62.

***N*-(4-Methoxybenzyl)-3-nitro-*N*-(thiazol-2-ylmethyl)benzoesulfonamid (158)**

N-(4-Methoxybenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methanamin (**145**, 60.0 mg, 256 μ mol, 1.00 eq) wurde in 3 mL tr. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden NEt₃ (143 μ L, 1.02 mmol, 4.00 eq) und 3-Nitrobenzoesulfonylchlorid (**147**, 170 mg, 768 μ mol, 3.00 eq) gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und danach für weitere 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit DCM verdünnt und mit H₂O gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 87 mg (207 μ mol, 81 %) weißer Feststoff

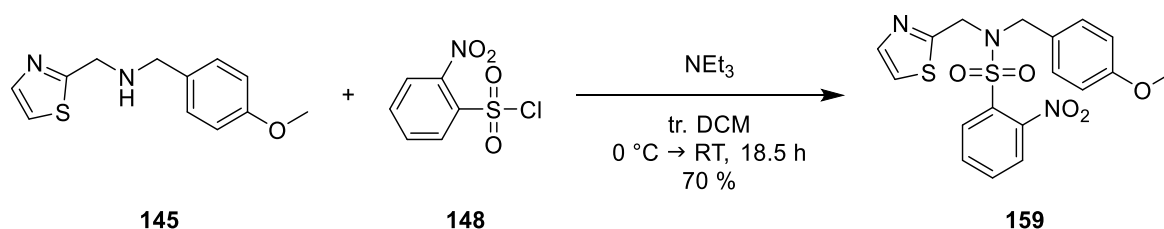
HPLC: 72.8 % B, Reinheit: 99.0 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₈H₁₇N₃O₅S₂ 419.06 (M), gef. 420.06 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₈H₁₇N₃NaO₅S₂ 442.0502, gef. 442.0501

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.47 (ddd, *J* = 8.2, 2.3, 1.0 Hz, 1H), 8.36 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 8.28 (ddd, *J* = 7.9, 1.8, 1.0 Hz, 1H), 7.86 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.62 – 7.60 (m, 2H), 7.18 – 7.15 (m, 2H), 6.85 – 6.83 (m, 2H), 4.72 (s, 2H), 4.46 (s, 2H), 3.71 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 165.12, 158.92, 147.72, 142.20, 141.01, 132.96, 131.32, 130.02, 127.36, 126.81, 121.73, 121.17, 113.83, 55.02, 51.03, 47.62.

***N*-(4-Methoxybenzyl)-2-nitro-*N*-(thiazol-2-ylmethyl)benzoesulfonamid (159)**

N-(4-Methoxybenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methanamin (**145**, 60.0 mg, 256 μmol , 1.00 eq) wurde in 4 mL tr. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden NEt₃ (143 μL , 1.02 mmol, 4.00 eq) und 2-Nitrobenzoesulfonylchlorid (**148**, 170 mg, 768 μmol , 3.00 eq) gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und für weitere 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit DCM verdünnt und mit H₂O gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 75 mg (179 μmol , 70 %) gelber Feststoff

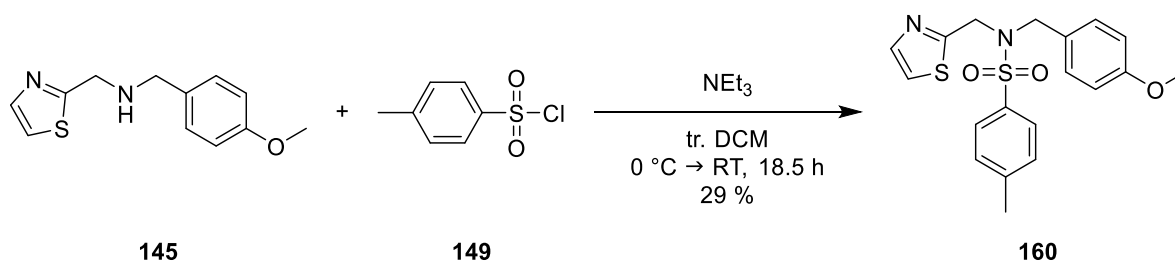
HPLC: 71.4 % B, Reinheit: 99.9 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₈H₁₇N₃O₅S₂ 419.06 (M), gef. 420.08 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₈H₁₇N₃NaO₅S₂ 442.0502, gef. 442.0505

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.07 (dd, *J* = 8.0, 1.3 Hz, 1H), 8.02 (dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 1H), 7.91 (td, *J* = 7.8, 1.3 Hz, 1H), 7.81 (td, *J* = 7.8, 1.3 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.63 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.13 – 7.09 (m, 2H), 6.88 – 6.83 (m, 2H), 4.72 (s, 2H), 4.49 (s, 2H), 3.72 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 165.02, 158.96, 147.37, 142.22, 134.75, 132.49, 131.90, 130.15, 129.86, 126.68, 124.36, 121.47, 113.93, 55.06, 50.54, 47.19.

N-(4-Methoxybenzyl)-4-methyl-N-(thiazol-2-ylmethyl)benzonsulfonamid (160)

N-(4-Methoxybenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methanamin (**145**, 35.0 mg, 149 μmol , 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden NEt₃ (83 μL , 597 μmol , 4.00 eq) und 4-Methylbenzenesulfonylchlorid (**149**, 85.4 mg, 448 μmol , 3.00 eq) gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und für weitere 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit DCM verdünnt und mit H₂O gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 17 mg (43.8 μmol , 29 %) weißer Feststoff

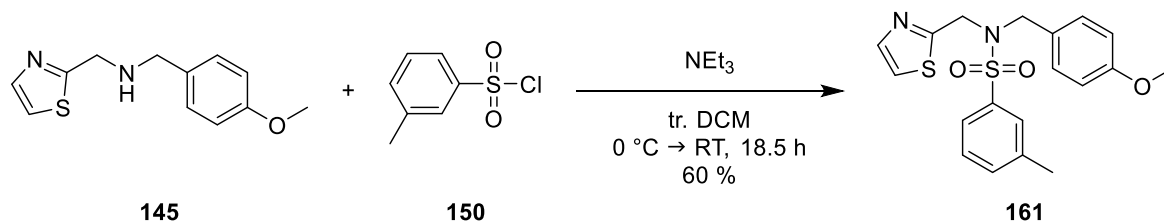
HPLC: 73.9 % B, Reinheit: 95.9 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₉H₂₀N₂O₃S₂ 388.09 (M), gef. 389.07 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₉H₂₀N₂NaO₃S₂ 411.0808, gef. 411.0813

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.74 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.62 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.59 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.13 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.83 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.56 (s, 2H), 4.31 (s, 2H), 3.71 (s, 3H), 2.41 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 166.30, 158.80, 143.43, 141.97, 136.16, 129.99, 129.79, 127.30, 127.06, 121.08, 113.74, 55.02, 51.03, 47.82, 20.95.

***N*-(4-Methoxybenzyl)-3-methyl-*N*-(thiazol-2-ylmethyl)benzensulfonamid (161)**

N-(4-Methoxybenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methanamin (**145**, 35.0 mg, 149 μmol , 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden NEt₃ (83 μL , 597 μmol , 4.00 eq) und 3-Methylbenzenesulfonylchlorid (**150**, 85.4 mg, 448 μmol , 3.00 eq) gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und für weitere 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit DCM verdünnt und mit H₂O gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 35 mg (90.0 μmol , 60 %) weißer Feststoff

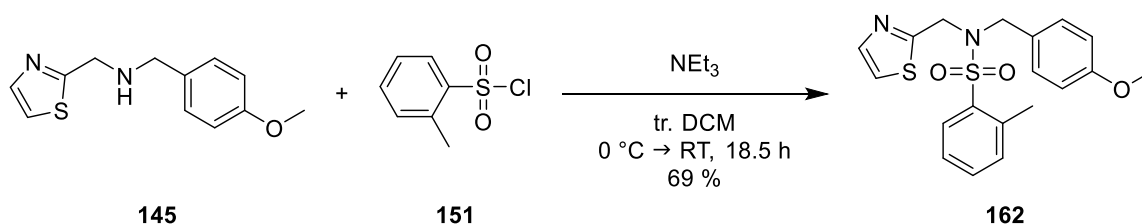
HPLC: 74.3 % B, Reinheit: 96.0 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₉H₂₀N₂O₃S₂ 388.09 (M), gef. 389.15 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₉H₂₀N₂NaO₃S₂ 411.0808, gef. 411.0809

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 7.66 – 7.59 (m, 4H), 7.51 – 7.45 (m, 2H), 7.16 – 7.12 (m, 2H), 6.85 – 6.82 (m, 2H), 4.59 (s, 2H), 4.35 (s, 2H), 3.71 (s, 3H), 2.38 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 166.09, 158.81, 142.01, 139.16, 139.04, 133.56, 130.00, 129.15, 127.28, 127.16, 124.11, 121.08, 113.74, 55.02, 50.95, 47.72, 20.72.

***N*-(4-Methoxybenzyl)-2-methyl-*N*-(thiazol-2-ylmethyl)benz磺onamid (162)**

N-(4-Methoxybenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methanamin (**145**, 35.0 mg, 149 μmol , 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden NEt₃ (83 μL , 597 μmol , 4.00 eq) und 2-Methylbenzenesulfonylchlorid (**151**, 85.4 mg, 448 μmol , 3.00 eq) gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und für weitere 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit DCM verdünnt und mit H₂O gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 40 mg (103 μmol , 69 %) grauer Feststoff

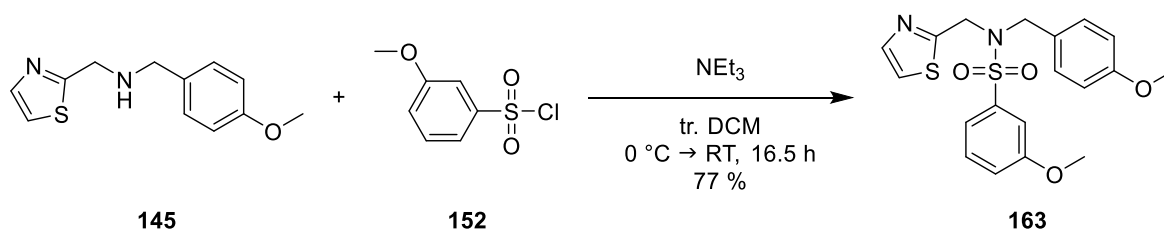
HPLC: 75.7 % B, Reinheit: 98.3 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₉H₂₀N₂O₃S₂ 388.09 (M), gef. 389.14 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₉H₂₀N₂NaO₃S₂ 411.0808, gef. 411.0809

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.88 (dd, *J* = 7.9, 1.2 Hz, 1H), 7.70 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.58 (td, *J* = 7.5, 1.3 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.40 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.08 – 7.05 (m, 2H), 6.87 – 6.84 (m, 2H), 4.59 (s, 2H), 4.39 (s, 2H), 3.72 (s, 3H), 2.53 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 165.27, 158.89, 142.19, 137.70, 137.07, 133.16, 132.80, 130.00, 129.13, 127.07, 126.46, 121.47, 113.85, 55.05, 49.74, 46.26, 19.85.

3-Methoxy-N-(4-methoxybenzyl)-N-(thiazol-2-ylmethyl)benzensulfonamid (163)

N-(4-Methoxybenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methanamin (**145**, 40.0 mg, 171 μmol , 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden NEt₃ (95 μL , 683 μmol , 4.00 eq) und 3-Methoxybenzenesulfonylchlorid (**152**, 106 mg, 512 μmol , 3.00 eq) gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und für weitere 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit DCM verdünnt und mit H₂O gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 53 mg (131 μmol , 77 %) gelber Feststoff

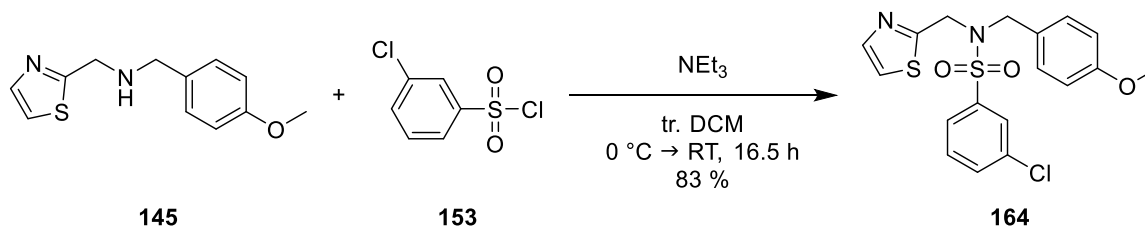
HPLC: 72.4 % B, Reinheit: 99.7 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₉H₂₀N₂O₄S₂ 404.09 (M), gef. 405.07 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₉H₂₀N₂NaO₄S₂ 427.0757, gef. 427.0759

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 7.63 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.60 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.52 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.43 (ddd, *J* = 7.7, 1.7, 1.0 Hz, 1H), 7.30 – 7.29 (m, 1H), 7.25 (ddd, *J* = 8.3, 2.6, 0.9 Hz, 1H), 7.15 – 7.12 (m, 2H), 6.85 – 6.82 (m, 2H), 4.61 (s, 2H), 4.36 (s, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.71 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 166.04, 159.55, 158.82, 142.01, 140.40, 130.56, 129.98, 127.26, 121.14, 119.13, 119.11, 113.75, 111.67, 55.63, 55.03, 50.93, 47.69.

3-Chlor-N-(4-methoxybenzyl)-N-(thiazol-2-ylmethyl)benzensulfonamid (164)

N-(4-Methoxybenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methanamin (**145**, 40.0 mg, 171 μmol , 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden NEt₃ (95 μL , 683 μmol , 4.00 eq) und 3-Chlorbenzoylchlorid (**153**, 72 μL , 512 μmol , 3.00 eq) gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und für weitere 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit DCM verdünnt und mit H₂O gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 58 mg (142 μmol , 83 %) gelber Feststoff

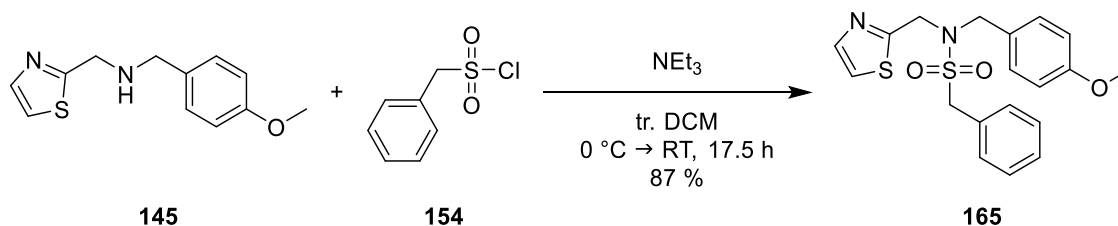
HPLC: 78.0 % B, Reinheit: 98.7 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₈H₁₇ClN₂O₃S₂ 408.04 (M), gef. 408.99 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₈H₁₇ClN₂NaO₃S₂ 431.0261, gef. 431.0263

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 7.81 (ddd, *J* = 7.8, 1.8, 1.0 Hz, 1H), 7.79 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.76 – 7.73 (m, 1H), 7.64 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.62 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.61 – 7.59 (m, 1H), 7.17 – 7.13 (m, 2H), 6.87 – 6.83 (m, 2H), 4.65 (s, 2H), 4.41 (s, 2H), 3.72 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 165.49, 158.89, 142.11, 141.20, 133.98, 132.87, 131.25, 129.99, 127.03, 126.53, 125.66, 121.17, 113.80, 55.03, 50.91, 47.58.

***N*-(4-Methoxybenzyl)-1-phenyl-*N*-(thiazol-2-ylmethyl)methansulfonamid (165)**

N-(4-Methoxybenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methanamin (**145**, 40.0 mg, 171 μmol , 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden NEt₃ (95 μL , 683 μmol , 4.00 eq) und Benzylsulfonylchlorid (**154**, 97.6 mg, 512 μmol , 3.00 eq) gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und für weitere 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit DCM verdünnt und mit H₂O gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 58 mg (149 μmol , 87 %) gelber Feststoff

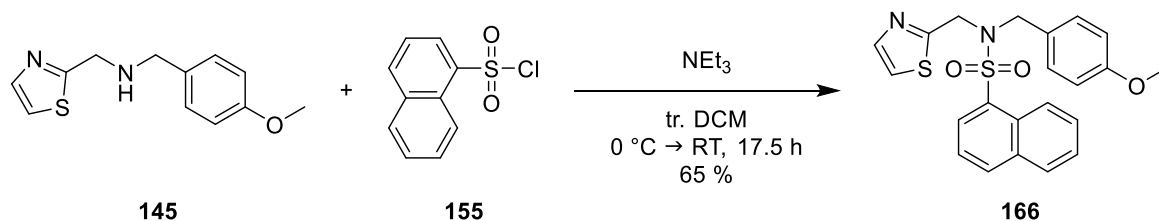
HPLC: 70.5 % B, Reinheit: 99.1 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₉H₂₀N₂O₃S₂ 388.09 (M), gef. 389.03 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₉H₂₀N₂NaO₃S₂ 411.0808, gef. 411.0809

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.73 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.65 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.39 – 7.37 (m, 3H), 7.35 – 7.32 (m, 2H), 7.22 – 7.19 (m, 2H), 6.88 – 6.86 (m, 2H), 4.54 (s, 2H), 4.50 (s, 2H), 4.23 (s, 2H), 3.72 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 166.52, 158.85, 142.25, 130.80, 130.08, 129.35, 128.41, 128.28, 127.68, 121.16, 113.81, 57.09, 55.03, 51.03, 47.84.

***N*-(4-Methoxybenzyl)-*N*-(thiazol-2-ylmethyl)naphthalen-1-sulfonamid (166)**

N-(4-Methoxybenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methanamin (**145**, 35.0 mg, 149 μ mol, 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden NEt₃ (83 μ L, 597 μ mol, 4.00 eq) und Naphthalen-1-sulfonylchlorid (**155**, 50.8 mg, 224 μ mol, 1.50 eq) gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und für weitere 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit DCM verdünnt und mit H₂O gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 41 mg (96.6 μ mol, 65 %) weißer Feststoff

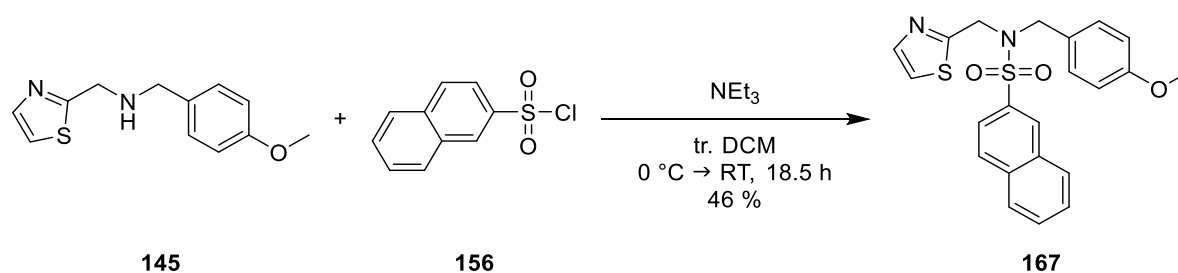
HPLC: 78.5 % B, Reinheit: 95.4 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₂₂H₂₀N₂O₃S₂ 424.09 (M), gef. 425.21 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₂₂H₂₀N₂NaO₃S₂ 447.0808, gef. 447.0801

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 8.60 – 8.57 (m, 1H), 8.29 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.19 (dd, *J* = 7.4, 1.2 Hz, 1H), 8.13 (dd, *J* = 8.3, 1.1 Hz, 1H), 7.75 – 7.62 (m, 4H), 7.56 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.05 – 7.01 (m, 2H), 6.80 – 6.76 (m, 2H), 4.68 (s, 2H), 4.47 (s, 2H), 3.70 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 165.26, 158.82, 142.02, 134.51, 134.31, 133.99, 130.00, 129.54, 129.10, 128.30, 127.74, 126.98, 126.95, 124.51, 124.38, 121.37, 113.74, 55.02, 50.02, 46.59.

***N*-(4-Methoxybenzyl)-*N*-(thiazol-2-ylmethyl)naphthalen-2-sulfonamid (167)**

N-(4-Methoxybenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methanamin (**145**, 35.0 mg, 149 μmol , 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden NEt₃ (83 μL , 597 μmol , 4.00 eq) und Naphthalen-2-sulfonylchlorid (**156**, 67.7 mg, 299 μmol , 2.00 eq) gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und für weitere 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit DCM verdünnt und mit H₂O gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 29 mg (68.3 μmol , 46 %) weißer Feststoff

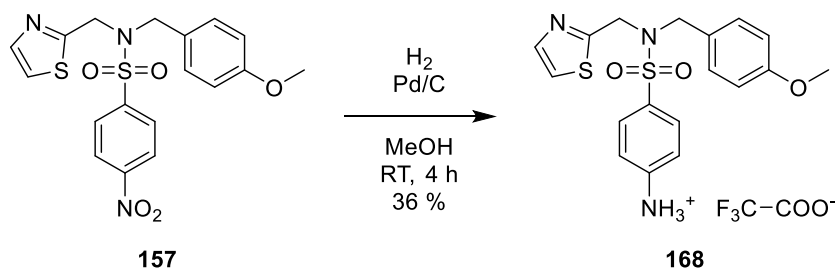
HPLC: 78.5 % B, Reinheit: 95.2 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₂₂H₂₀N₂O₃S₂ 424.09 (M), gef. 425.07 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₂₂H₂₀N₂NaO₃S₂ 447.0808, gef. 411.0816

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 8.53 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 8.18 – 8.11 (m, 2H), 8.09 – 8.06 (m, 1H), 7.86 (dd, *J* = 8.7, 2.0 Hz, 1H), 7.76 – 7.67 (m, 2H), 7.60 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.56 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.17 – 7.13 (m, 2H), 6.82 – 6.79 (m, 2H), 4.66 (s, 2H), 4.41 (s, 2H), 3.69 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 166.11, 158.80, 142.01, 136.19, 134.31, 131.76, 130.01, 129.41, 129.30, 128.93, 128.27, 127.76, 127.56, 127.23, 122.36, 121.11, 113.74, 54.99, 51.04, 47.83.

4-(*N*-(4-Methoxybenzyl)-*N*-(thiazol-2-ylmethyl)sulfamoyl)benzenammonium-2,2,2-trifluoracetat (**168**)

N-(4-Methoxybenzyl)-4-nitro-*N*-(thiazol-2-ylmethyl)benzenesulfonamid (**157**, 56.0 mg, 134 μ mol, 1.00 eq) wurde in 30 mL MeOH gelöst. Zu der Lösung wurde Pd/C (10 % *w/w*; 14.3 mg, 13.4 μ mol, 0.10 eq) gegeben und unter Wasserstoff-Atmosphäre bei Raumtemperatur für 4 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Suspension über Kieselgur filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 24 mg (47.7 μ mol, 36 %) weißer Feststoff

HPLC: 60.9 % B, Reinheit: 95.1 %

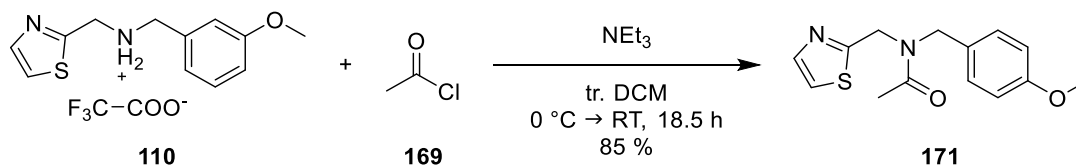
MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₈H₁₉N₃O₃S₂ 389.09 (M), gef. 390.05 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₈H₁₉N₃NaO₃S₂ 412.0760, gef. 412.0767

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.62 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.50 – 7.47 (m, 2H), 7.15 – 7.11 (m, 2H), 6.85 – 6.81 (m, 2H), 6.66 – 6.62 (m, 2H), 5.69 (s, 3H), 4.46 (s, 2H), 4.22 (s, 2H), 3.71 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 167.14, 158.71, 153.04, 141.85, 129.97, 129.13, 127.72, 123.43, 120.94, 113.67, 112.84, 55.00, 51.06, 47.94.

Die TFA-Signale gehen im Rauschen unter.

***N*-(4-Methoxybenzyl)-*N*-(thiazol-2-ylmethyl)acetamid (171)**

N-(3-Methoxybenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methan ammonium-2,2,2-trifluoroacetat (**110**, 70.0 mg, 201 μmol , 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden NEt₃ (112 μL , 804 μmol , 4.00 eq) und Acetylchlorid (**169**, 43 μL , 603 μmol , 3.00 eq) gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und für weitere 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit DCM verdünnt und mit H₂O gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 47 mg (170 μmol , 85 %) gelber Feststoff

HPLC: 50.1 % B, Reinheit: 98.7 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₄H₁₆N₂O₂S 276.09 (M), gef. 277.05 (M+H)⁺

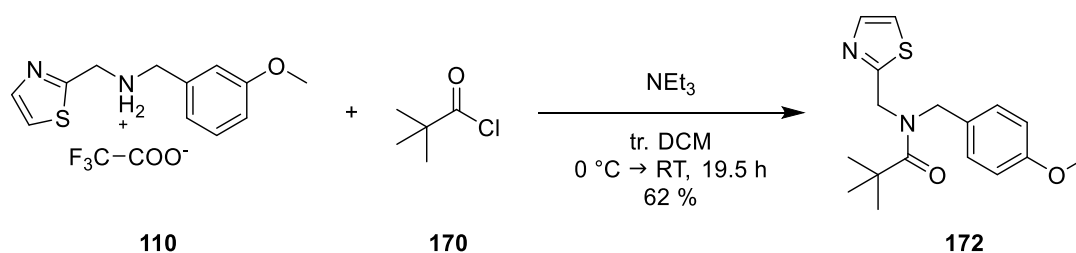
HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₄H₁₆N₂NaO₂S 299.0825, gef. 299.0832

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.77 – 7.68 (m, 1H), 7.65 – 7.57 (m, 1H), 7.17 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.90 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 4.75 (s, 2H), 4.55 (s, 2H), 3.76 (s, 3H), 2.14 (s, 3H).

Das ¹H-NMR-Spektrum wurde bei 100 °C gemessen, da die Verbindung bei 30 °C vermutlich wegen einer *cis/trans*-Isomerisierung der Amidbindung zwei Signaldatensätze zeigte. Bei 100 °C wurde nur ein Datensatz erhalten.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 170.16, 170.14, 167.11, 166.68, 158.60, 158.48, 142.73, 141.87, 129.33, 129.28, 128.63, 128.25, 120.69, 120.50, 114.10, 113.81, 55.06, 55.02, 50.90, 48.43, 47.51, 45.85, 21.48, 21.28.

Aufgrund der schlechten Auflösung der Signale bei 100 °C wurde das ¹³C-NMR bei 30 °C gemessen, weswegen zwei Datensätze für das *cis* bzw. *trans*-Amid Molekül angegeben sind.

***N*-(4-Methoxybenzyl)-*N*-(thiazol-2-ylmethyl)pivalamid (172)**

N-(3-Methoxybenzyl)-1-(thiazol-2-yl)methan ammonium-2,2,2-trifluoroacetat (**110**, 78.0 mg, 224 μ mol, 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden NEt₃ (125 μ L, 896 μ mol, 4.00 eq) und Pivaloylchlorid (**170**, 83 μ L, 672 μ mol, 3.00 eq) gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und für weitere 19 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit DCM verdünnt und mit H₂O gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 47 mg (138 μ mol, 62 %) farbloses Öl

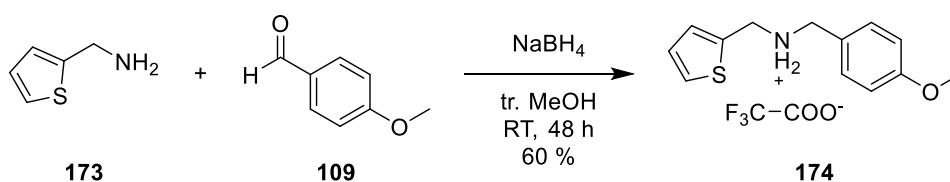
HPLC: 65.7 % B, Reinheit: 98.1 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₇H₂₂N₂O₂S 318.14 (M), gef. 319.21 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₇H₂₂N₂NaO₂S 341.1294, gef. 341.1303

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 7.72 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.66 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.93 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.65 (s, 4H), 3.75 (s, 3H), 1.25 (s, 9H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 176.76, 167.11, 158.46, 141.92, 128.66, 128.14, 120.53, 114.03, 55.03, 50.07, 47.64, 38.58, 28.13.

N-(4-Methoxybenzyl)-1-(thiophen-2-yl)methan ammonium-2,2,2-trifluoracetat (174)

Thiophen-2-ylmethanamin (**173**, 80.0 mg, 707 μ mol, 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. MeOH gelöst. Zu der Lösung wurden 4 Å Molekularsieb (100 mg) und 4-Methoxybenzaldehyd (**109**, 95 μ L, 778 μ mol, 1.10 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt. Anschließend wurde NaBH₄ (40.1 mg, 1.06 mmol, 1.50 eq) hinzugegeben und für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Lösung filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 148 mg (426 μ mol, 60 %) weißer Feststoff

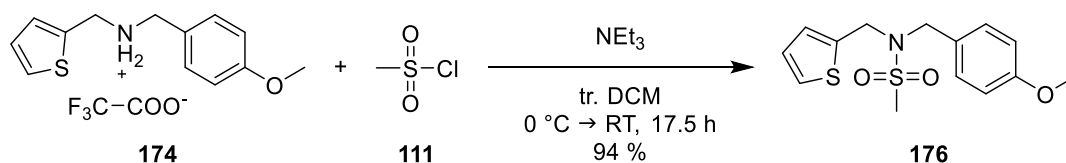
HPLC: 39.9 % B, Reinheit: 99.9 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₃H₁₅NOS 233.09 (M), gef. 234.07 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 9.33 (s, 2H), 7.64 (dd, *J* = 5.1, 1.3 Hz, 1H), 7.45 – 7.36 (m, 2H), 7.28 (dd, *J* = 3.5, 1.2 Hz, 1H), 7.11 (dd, *J* = 5.1, 3.5 Hz, 1H), 7.04 – 6.94 (m, 2H), 4.38 (s, 2H), 4.10 (s, 2H), 3.77 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 159.73, 158.02 (q, *J* = 30.9 Hz), 132.82, 131.51, 130.45, 128.20, 127.33, 123.48, 114.01, 55.17, 49.14, 43.75.

Das CF₃-COOH-Signal geht im Rauschen unter.

***N*-(4-Methoxybenzyl)-*N*-(thiophen-2-ylmethyl)methansulfonamid (176)**

N-(4-Methoxybenzyl)-1-(thiophen-2-yl)methan ammonium-2,2,2-trifluoroacetat (**174**, 50.0 mg, 144 μmol , 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden NEt₃ (62 μL , 446 μmol , 3.10 eq) und Methansulfonylchlorid (**111**, 23 μL , 302 μmol , 2.10 eq) gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und für weitere 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit DCM verdünnt und mit H₂O gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

Ausbeute: 42 mg (135 μmol , 94 %) gelber Feststoff

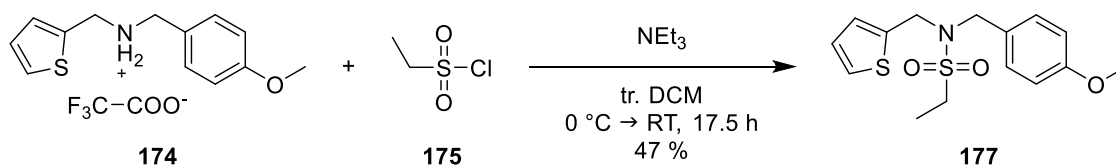
HPLC: 68.5 % B, Reinheit: 96.9 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₄H₁₇NO₃S₂ 311.06 (M), gef. 334.05 (M+Na)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₄H₁₇NNaO₃S₂ 334.0542, gef. 334.0539

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.49 (dd, *J* = 4.7, 1.6 Hz, 1H), 7.26 – 7.23 (m, 2H), 7.01 – 6.97 (m, 2H), 6.93 – 6.90 (m, 2H), 4.42 (s, 2H), 4.25 (s, 2H), 3.75 (s, 3H), 2.88 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 158.77, 138.61, 129.72, 127.87, 127.72, 126.80, 126.47, 113.88, 55.04, 49.23, 44.40, 38.92.

***N*-(4-Methoxybenzyl)-*N*-(thiophen-2-ylmethyl)ethansulfonamid (177)**

N-(4-Methoxybenzyl)-1-(thiophen-2-yl)methanaminium-2,2,2-trifluoroacetat (**174**, 50.0 mg, 144 μmol , 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden NEt₃ (42 μL , 302 μmol , 2.10 eq) und Ethansulfonylchlorid (**175**, 15 μL , 158 μmol , 1.10 eq) gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und für weitere 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit DCM verdünnt und mit H₂O gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 22 mg (67.8 μmol , 47 %) gelber Feststoff

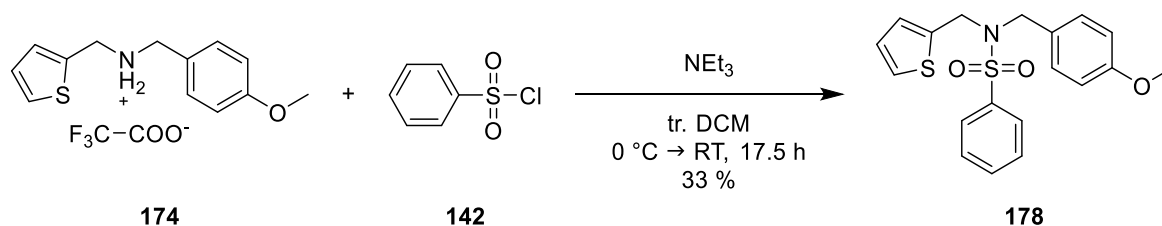
HPLC: 72.0 % B, Reinheit: 96.0 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₉NO₃S₂ 325.08 (M), gef. 348.08 (M+Na)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₉NNaO₃S₂ 348.0699, gef. 348.0706

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.54 – 7.43 (m, 1H), 7.30 – 7.17 (m, 2H), 7.03 – 6.95 (m, 2H), 6.95 – 6.86 (m, 2H), 4.44 (s, 2H), 4.27 (s, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.06 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.18 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 158.75, 138.96, 129.70, 128.01, 127.71, 126.77, 126.48, 113.86, 55.03, 49.20, 46.40, 44.29, 7.73.

***N*-(4-Methoxybenzyl)-*N*-(thiophen-2-ylmethyl)benzensulfonamid (178)**

N-(4-Methoxybenzyl)-1-(thiophen-2-yl)methan ammonium-2,2,2-trifluoroacetat (**174**, 50.0 mg, 144 μmol , 1.00 eq) wurde in 2 mL tr. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden NEt₃ (42 μL , 302 μmol , 2.10 eq) und Benzensulfonylchlorid (**142**, 20 μL , 158 μmol , 1.10 eq) gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und für weitere 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit DCM verdünnt und mit H₂O gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 18 mg (48.2 μmol , 33 %) gelber Feststoff

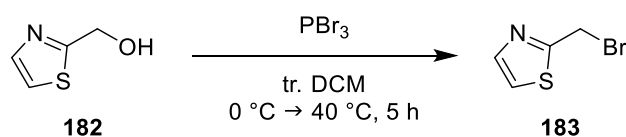
HPLC: 79.5 % B, Reinheit: 98.6 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₉H₁₉NO₃S₂ 373.08 (M), gef. 396.04 (M+Na)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₉H₁₉NNaO₃S₂ 396.0699, gef. 396.0706

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.93 – 7.78 (m, 2H), 7.76 – 7.66 (m, 1H), 7.65 – 7.54 (m, 2H), 7.39 (dd, *J* = 5.1, 1.2 Hz, 1H), 7.12 – 7.01 (m, 2H), 6.88 (dd, *J* = 5.1, 3.4 Hz, 1H), 6.86 – 6.80 (m, 2H), 6.78 (dd, *J* = 3.4, 1.1 Hz, 1H), 4.46 (s, 2H), 4.25 (s, 2H), 3.72 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 158.70, 139.80, 138.50, 132.85, 129.55, 129.33, 127.72, 127.61, 126.85, 126.56, 126.51, 113.75, 55.03, 49.64, 44.87.

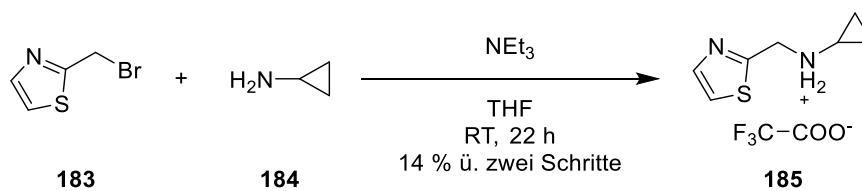
2-(Brommethyl)thiazol (183)

Thiazol-2-ylmethanol (**182**, 100 mg, 868 μ mol, 1.00 eq) wurde unter Argon-Atmosphäre in 10 mL tr. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurde Phosphortribromid (91 μ L, 955 μ mol, 1.10 eq) gegeben und bei 40 °C für 5 Stunden gerührt. Anschließend wurde zu der Lösung ges. Na₂CO₃-Lösung gegeben und das Produkt aus der wässrigen Phase mit CHCl₃ extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt (100 mg, braunes Öl) wurde ohne weitere Reinigung zur Synthese der Verbindung **185** verwendet.

HPLC: 44.6 % B

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₄H₄BrNS 176.92 (M), gef. 177.93 (M+H)⁺

Keine NMR-Analytik möglich, da das Produkt sich in Lösung zersetzt.

N-(Thiazol-2-ylmethyl)cyclopropanammonium-2,2,2-trifluoracetat (185)

2-(Bromomethyl)thiazol (**183**, 97.3 mg, 546 μmol , 1.20 eq) wurde in 2 mL THF gelöst. Zu der Lösung wurden Cyclopropanamin (**184**, 32 μL , 455 μmol , 1.00 eq) und NEt_3 (95 μL , 683 μmol , 1.50 eq) gegeben und bei Raumtemperatur für 22 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 32 mg (119 μmol , 14 %) braunes Öl

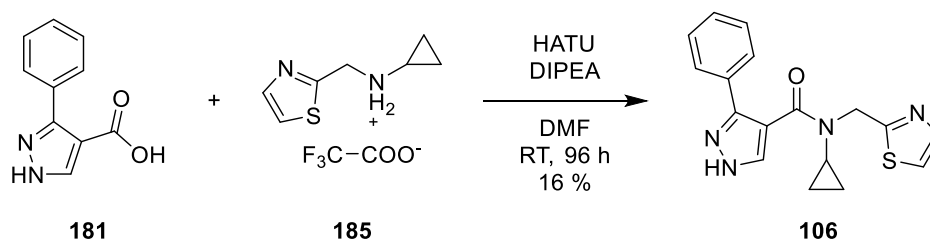
HPLC: 17.6 % B, Reinheit: 93.5 %

MS (ESI⁺): m/z ber. für $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{S}$ 154.06 (M), gef. 155.08 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 9.51 (s, 2H), 7.94 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 4.69 (s, 2H), 2.83 – 2.77 (m, 1H), 0.86 – 0.81 (m, 2H), 0.77 – 0.72 (m, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 159.85, 158.05 (q, $J = 33.5$ Hz), 142.72, 122.62, 46.96, 29.81, 3.27.

Das $\text{CF}_3\text{-COOH}$ -Signal geht im Rauschen unter.

***N*-Cyclopropyl-3-phenyl-*N*-(thiazol-2-ylmethyl)-1*H*-pyrazol-4-carboxamid (**106**)**

3-Phenyl-1*H*-pyrazol-4-carbonsäure (**181**, 60.0 mg, 319 μmol , 1.00 eq) wurde in 4 mL DMF gelöst. Zum Ansatz wurden *N*-(Thiazol-2-ylmethyl)cyclopropanammonium-2,2,2-trifluoroacetat (**185**, 94.1 mg, 351 μmol , 1.10 eq), HATU (133 mg, 351 μmol , 1.10 eq) und DIPEA (179 μL , 1.05 mmol, 3.30 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 96 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 14 mg (52.4 μmol , 16 %) weißer Feststoff

HPLC: 47.1 % B, Reinheit: 96.0 %

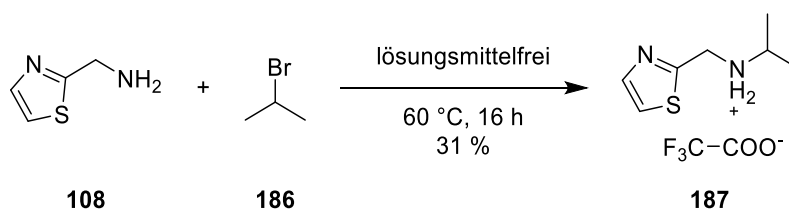
MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₇H₁₆N₄OS 324.10 (M), gef. 325.15 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₇H₁₆N₄NaOS 347.0937, gef. 347.0932

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.95 (s, 1H), 7.78 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.70 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.56 – 7.53 (m, 2H), 7.35 – 7.31 (m, 3H), 4.88 (s, 2H), 2.58 (p, *J* = 5.4 Hz, 1H), 0.53 (d, *J* = 4.6 Hz, 4H).

Das NH_{pyrazol}-Signal liegt unter den aromatischen Signalen im Bereich von 7.0 – 8.7 ppm.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 167.35, 166.95, 145.33, 141.85, 133.90, 131.52, 128.36, 127.90, 126.95, 120.70, 114.37, 48.29, 40.11, 9.09.

***N*-(Thiazol-2-ylmethyl)propan-2-ammonium-2,2,2-trifluoracetat (187)**

Thiazol-2-ylmethanamin (**108**, 100 mg, 876 μ mol, 1.00 eq) wurde mit 2-Brompropan (**186**, 82 μ L, 876 μ mol, 1.00 eq) bei 60 °C für 16 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Rohprodukt mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 74 mg (274 μ mol, 31 %) weißer Feststoff

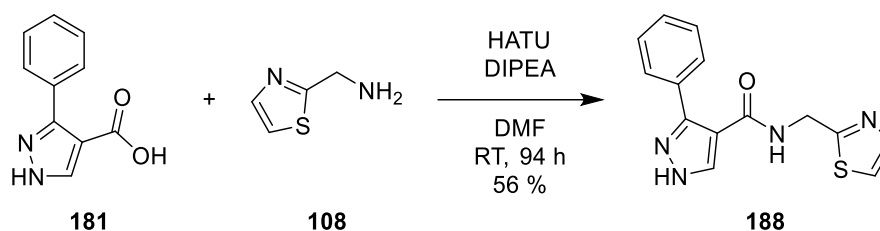
HPLC: 19.6 % B, Reinheit: 99.2 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₇H₁₂N₂S 156.07 (M), gef. 157.05 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 9.18 (s, 2H), 7.94 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 4.61 (s, 2H), 3.43 – 3.37 (m, 1H), 1.28 (d, *J* = 6.5 Hz, 6H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 160.34, 142.64, 122.47, 49.80, 43.64, 18.50.

Die TFA-Signale gehen im Rauschen unter.

3-Phenyl-N-(thiazol-2-ylmethyl)-1H-pyrazol-4-carboxamid (188)

3-Phenyl-1H-pyrazol-4-carbonsäure (**181**, 80.0 mg, 425 μmol , 1.00 eq) wurde in 5 mL DMF gelöst. Zum Ansatz wurden Thiazol-2-ylmethanamin (**108**, 53.4 mg, 468 μmol , 1.10 eq), HATU (178 mg, 468 μmol , 1.10 eq) und DIPEA (318 μL , 1.87 mmol, 4.40 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 94 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 68 mg (239 μmol , 56 %) weißer Feststoff

HPLC: 38.6 % B, Reinheit: 97.1 %

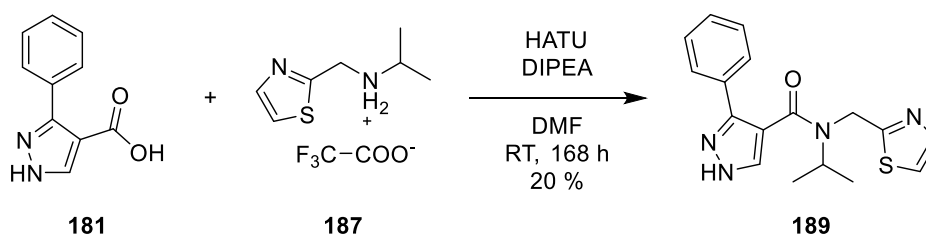
MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₄H₁₂N₄OS 284.07 (M), gef. 285.05 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₄H₁₃N₄OS 285.0805, gef. 285.0802

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 8.90 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.75 – 7.71 (m, 3H), 7.63 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 7.43 – 7.34 (m, 3H), 4.67 (d, J = 6.0 Hz, 2H).

Das NH_{pyrazol}-Signal liegt unter den aromatischen Signalen im Bereich von 6.5 – 8.0 ppm.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 169.83, 163.28, 146.07, 141.90, 135.58, 131.04, 128.51, 128.10, 127.88, 120.07, 113.73, 40.42.

***N*-Isopropyl-3-phenyl-*N*-(thiazol-2-ylmethyl)-1*H*-pyrazol-4-carboxamid (**189**)**

3-Phenyl-1*H*-pyrazol-4-carbonsäure (**181**, 40.0 mg, 213 μ mol, 1.00 eq) wurde in 4 mL DMF gelöst. Zum Ansatz wurden *N*-(Thiazol-2-ylmethyl)propan-2-ammonium-2,2,2-trifluoroacetat (**187**, 63.2 mg, 234 μ mol, 1.10 eq), HATU (88.9 mg, 234 μ mol, 1.10 eq) und DIPEA (119 μ L, 701 μ mol, 3.30 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 168 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 14 mg (42.9 μ mol, 20 %) weißer Feststoff

HPLC: 49.4 % B, Reinheit: 97.6 %

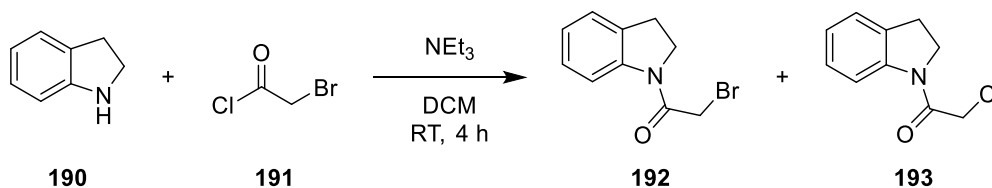
MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₇H₁₈N₄OS 326.12 (M), gef. 327.13 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₇H₁₉N₄OS 327.1274, gef. 327.1276

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.88 (s, 1H), 7.79 – 7.67 (m, 2H), 7.64 – 7.56 (m, 2H), 7.43 – 7.30 (m, 3H), 4.83 (s, 2H), 3.98 (brs, 1H), 0.94 (s, 6H).

Das NH_{Pyrazol}-Signal liegt unter den aromatischen Signalen im Bereich von 7.5 – 8.0 ppm.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 168.46, 166.26, 144.48, 140.77, 132.61, 131.11, 128.53, 128.11, 126.77, 121.05, 113.56, 50.39, 41.69, 20.57.

Gemisch aus 2-Brom-1-(indolin-1-yl)ethan-1-on (192) und 2-Chlor-1-(indolin-1-yl)ethan-1-on (193)

Indolin (**190**, 200 mg, 1.68 mmol, 1.00 eq) wurde in 10 mL DCM gelöst. Zu der Lösung wurden NEt₃ (246 μ L, 1.85 mmol, 1.10 eq) und portionsweise 2-Bromacetylchlorid (**191**, 175 μ L, 1.85 mmol, 1.10 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 4 Stunden gerührt. Anschließend wurde zu der Lösung 1 M Salzsäure gegeben und das Produkt aus der wässrigen Phase mit DCM extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Da für die nachfolgende Reaktion das Rohprodukt eingesetzt werden konnte, wurde für analytische Zwecke nur ein kleiner Teil mittels präparativer HPLC gereinigt, um das Brom-Derivat **192** von dem Chlor-Derivat **193** zu trennen und analytisch zu charakterisieren.

Ausbeute: 343 mg weißer Feststoff (Rohprodukt bestehend aus einem Gemisch aus dem Cl- und Brom-Derivat)

HPLC: Cl-Derivat **193**: 56.3 % B, Reinheit: 65.6 %

Br-Derivat **192**: 58.6 % B, Reinheit: 34.4 %

Bei Annahme von gleichen Absorptionskoeffizienten entspricht die Reinheit folgender Stoffmengenverteilung der Derivate: Cl-Derivat **193** (209 mg, 1.07 mmol) und Br-Derivat **192** (134 mg, 560 μ mol)

MS (ESI⁺): Cl-Derivat **193**: *m/z* ber. für C₁₀H₁₀ClNO 195.05 (M), gef. 196.00 (M+H)⁺

Br-Derivat **192**: *m/z* ber. für C₁₀H₁₀BrNO 238.99 (M), gef. 239.99 (M+H)⁺

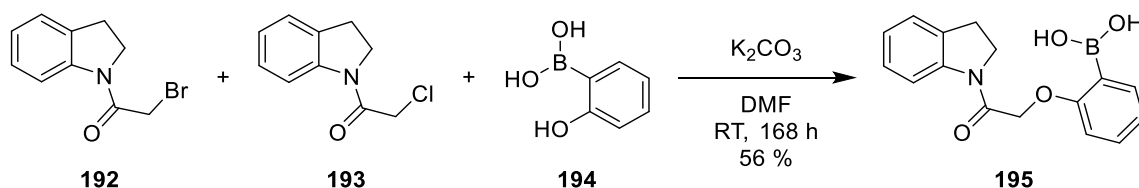
¹H-NMR: Cl-Derivat **193**: (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 8.04 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.26 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.18 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.03 (td, *J* = 7.4, 1.0 Hz, 1H), 4.52 (s, 2H), 4.13 (t, *J* = 8.5 Hz, 2H), 3.17 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H).

Br-Derivat **192**: (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 8.03 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.26 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.18 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.04 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.27 (s, 2H), 4.17 (t, *J* = 8.5 Hz, 2H), 3.17 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H).

5.2.4 Synthese der Verbindungen (zweite Dockingstudie, G-Protein-Bindetasche des ET_BR)

¹³C-NMR: Cl-Derivat **193**: (101 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 164.03, 142.50, 131.75, 127.03, 124.88, 123.78, 115.93, 46.94, 43.76, 27.47.

Br-Derivat **192**: (101 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 164.17, 142.49, 131.95, 127.02, 124.90, 123.88, 116.08, 47.64, 30.53, 27.44.

(2-(2-(Indolin-1-yl)-2-oxoethoxy)phenyl)boronsäure (195)

Das aus zwei Verbindungen bestehende Rohprodukt der vorherigen Synthese (2-Brom-1-(indolin-1-yl)ethan-1-on (**192**, 134 mg, 560 μmol , 0.86 eq) und 2-Chlor-1-(indolin-1-yl)ethan-1-on (**193**, 209 mg, 1.07 mmol, 1.64 eq)) wurde in 5 mL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden (2-Hydroxyphenyl)boronsäure (**194**, 89.9 mg, 652 μmol , 1.00 eq) und K_2CO_3 (361 mg, 2.61 mmol, 4.00 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 168 Stunden gerührt. Anschließend wurde zu dem Ansatz Ethylacetat gegeben und die organische Phase mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

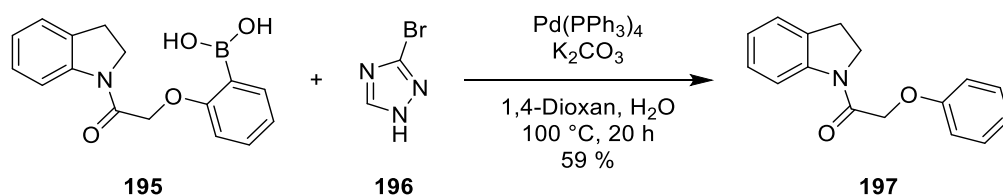
Ausbeute: 109 mg (367 μmol , 56 %) weißer Feststoff

HPLC: 61.1 % B, Reinheit: 83.8 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{BNO}_4$ 297.12 (M), gef. 320.11 (M+Na)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.17 (s, 2H), 8.08 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.69 (dd, *J* = 7.3, 1.8 Hz, 1H), 7.45 – 7.40 (m, 1H), 7.28 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.22 – 7.17 (m, 1H), 7.11 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.07 – 7.03 (m, 1H), 7.00 (td, *J* = 7.3, 0.8 Hz, 1H), 5.03 (s, 2H), 4.14 (t, *J* = 8.5 Hz, 2H), 3.20 (t, *J* = 8.3 Hz, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 166.69, 162.67, 142.34, 135.99, 131.91, 131.60, 127.06, 126.93, 124.90, 123.84, 121.16, 115.91, 112.56, 66.53, 45.54, 27.54.

1-(Indolin-1-yl)-2-phenoxyethan-1-on (197)

(2-(2-(Indolin-1-yl)-2-oxoethoxy)phenyl)boronsäure (**195**, 120 mg, 406 μmol , 1.50 eq) wurde unter Argon-Atmosphäre in 3 mL 1,4-Dioxan und 0.2 mL H₂O gelöst. Zu der Lösung wurden 3-Brom-1*H*-1,2,4-triazol (**196**, 40.0 mg, 270 μmol , 1.00 eq), K₂CO₃ (56.0 mg, 406 μmol , 1.50 eq) und Pd(PPh₃)₄ (31.2 mg, 27.0 μmol , 0.10 eq) gegeben. Der Ansatz wurde bei 100 °C für 20 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 40 mg (158 μmol , 59 %) weißer Feststoff

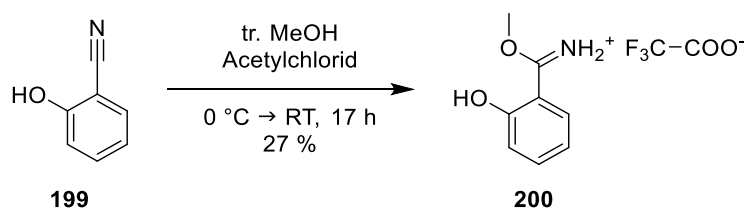
HPLC: 68.6 % B, Reinheit: 98.4 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₆H₁₅NO₂ 253.11 (M), gef. 254.10 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₆H₁₅NNaO₂ 276.0995, gef. 276.0997

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.03 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.31 – 7.25 (m, 3H), 7.16 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.02 (td, *J* = 7.4, 1.0 Hz, 1H), 7.00 – 6.97 (m, 2H), 6.95 (tt, *J* = 7.4, 1.0 Hz, 1H), 4.92 (s, 2H), 4.16 (t, *J* = 8.5 Hz, 2H), 3.19 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 165.86, 158.00, 142.69, 131.46, 129.29, 126.96, 124.81, 123.52, 120.80, 115.79, 114.56, 66.13, 45.84, 27.63.

Methyl-2-hydroxybenzimidat-2,2,2-trifluoracetat (200)

2-Hydroxybenzimidat (**199**, 300 mg, 2.52 mmol, 1.00 eq) wurde in tr. MeOH (1.22 mL, 30.2 mmol, 12.0 eq) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dem Ansatz wurde Acetylchlorid (1.44 mL, 20.2 mmol, 8.00 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 17 Stunden gerührt. Anschließend wurde der Feststoff abfiltriert, mit EA gewaschen. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 178 mg (671 µmol, 27 %) weißer Feststoff

HPLC: 29.4 % B, Reinheit: 91.3 %

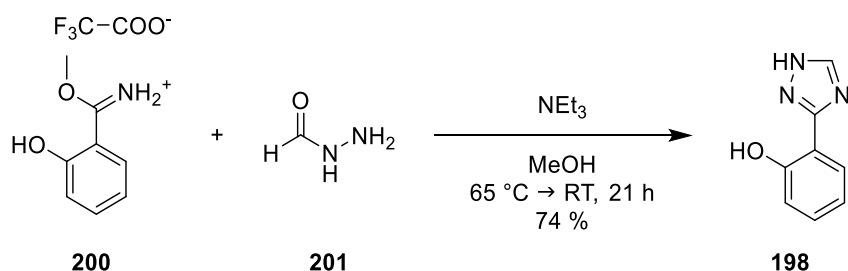
MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₈H₉NO₂ 151.06 (M), gef. 152.00 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 7.75 (dd, *J* = 8.0, 1.7 Hz, 1H), 7.52 (ddd, *J* = 8.5, 7.3, 1.8 Hz, 1H), 7.06 (dd, *J* = 8.3, 1.0 Hz, 1H), 6.96 (ddd, *J* = 8.1, 7.3, 1.1 Hz, 1H), 4.11 (s, 3H).

Das OH- und NH₂⁺-Signal gehen im Rauschen unter.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 168.47, 159.25, 158.06 (q, *J* = 33.3 Hz), 135.52, 129.34, 118.99, 117.13, 112.28, 57.06.

Das CF₃-COOH-Signal geht im Rauschen unter.

2-(1*H*-1,2,4-triazol-3-yl)phenol (198)

Methyl-2-hydroxybenzimidat-2,2,2-trifluoracetat (**200**, 292 mg, 1.10 mmol, 1.00 eq) wurde in 3 mL MeOH gelöst. Zu der Lösung wurden Formylhydrazid (**201**, 66.3 mg, 1.10 mmol, 1.00 eq) und NEt₃ (169 µL, 1.21 mmol, 1.10 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei 65 °C für 4 Stunden und danach für 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 132 mg (819 µmol, 74 %) weißer Feststoff

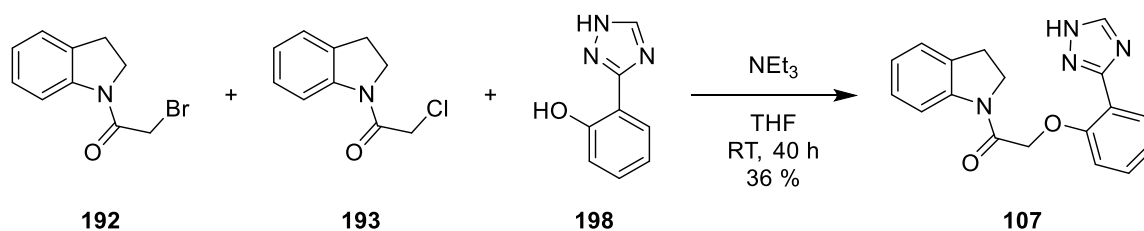
HPLC: 35.3 % B, Reinheit: 97.7 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₈H₇N₃O 161.06 (M), gef. 162.16 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.59 (s, 1H), 7.96 (ddd, *J* = 7.8, 1.7, 0.3 Hz, 1H), 7.34 (ddd, *J* = 8.3, 7.3, 1.7 Hz, 1H), 7.00 (dd, *J* = 8.3, 0.9 Hz, 1H), 6.97 (ddd, *J* = 7.8, 7.3, 1.2 Hz, 1H).

Das OH-Signal und das NH_{Triazol}-Signal liegt unter aromatischen Signalen im Bereich von 7.7-10.5 ppm.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 156.02, 146.02, 131.45, 126.82, 119.45, 119.42, 116.77, 112.58.

2-(2-(1*H*-1,2,4-triazol-3-yl)phenoxy)-1-(indolin-1-yl)ethan-1-on (107)

Das Rohprodukt bestehend aus 2-Brom-1-(indolin-1-yl)ethan-1-on (**192**, 61.5 mg, 256 μmol , 0.41 eq) und 2-Chlor-1-(indolin-1-yl)ethan-1-on (**193**, 95.5 mg, 488 μmol , 0.79 eq) wurde in 3 mL THF gelöst. Zu der Lösung wurden 2-(1*H*-1,2,4-triazol-3-yl)phenol (**198**, 100 mg, 620 μmol , 1.00 eq) und NEt_3 (130 μL , 931 μmol , 1.50 eq) gegeben. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 40 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 72 mg (225 μmol , 36 %) weißer Feststoff

HPLC: 67.8 % B, Reinheit: 96.8 %

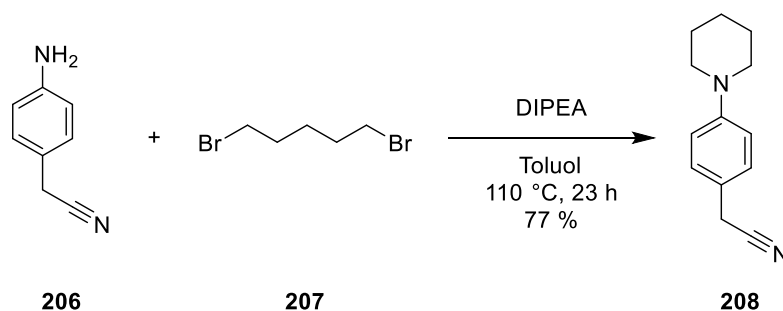
MS (ESI⁺): m/z ber. für $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2$ 320.13 (M), gef. 321.28 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): m/z ber. für $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_2$ 321.1346, gef. 321.1347

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 10.98 (s, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.02 – 7.93 (m, 2H), 7.36 – 7.28 (m, 2H), 7.17 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.05 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.00 – 6.94 (m, 2H), 5.53 (s, 2H), 4.25 (t, $J = 8.4$ Hz, 2H), 3.24 (t, $J = 8.4$ Hz, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 164.04, 159.72, 156.11, 145.58, 142.37, 131.70, 130.88, 127.07, 126.29, 124.95, 123.88, 119.44, 116.86, 115.79, 113.92, 51.88, 46.42, 27.54.

5.2.5 Synthese der bekannten allosterischen GPCR-Liganden

2-(4-(Piperidin-1-yl)phenyl)acetonitril (**206**)

2-(4-Aminophenyl)acetonitril (**206**, 500 mg, 3.78 mmol, 1.00 eq) wurde in 12 mL Toluol gelöst. Zu der Lösung wurde 1,5-Dibrompentan (**207**, 563 μL , 4.16 mmol, 1.10 eq) und DIPEA (1.32 mL, 7.57 mmol, 2.00 eq) gegeben. Die Lösung wurden bei 110 °C für 23 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (10:1 \rightarrow 6:1 CH:EA).

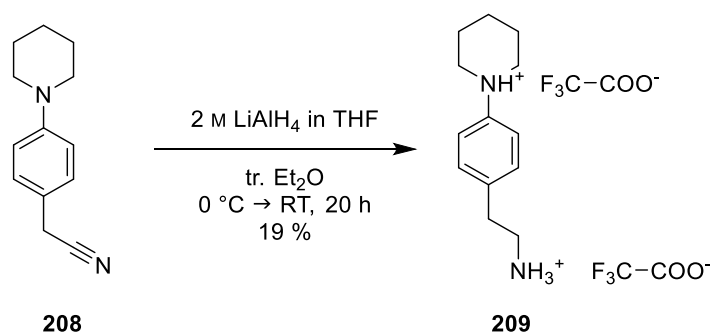
Ausbeute: 585 mg (2.92 mmol, 77 %) gelber Feststoff

HPLC: 29.4 % B, Reinheit: 93.1 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₃H₁₆N₂ 200.13 (M), gef. 201.19 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 7.16 – 7.14 (m, 2H), 6.93 – 6.91 (m, 2H), 3.86 (s, 2H), 3.14 – 3.10 (m, 4H), 1.63 – 1.57 (m, 4H), 1.56 – 1.49 (m, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 150.92, 128.63, 120.25, 119.57, 115.91, 49.34, 25.04, 23.82, 21.40.

1-(4-(2-Ammoniummethyl)phenyl)piperidin-1-ium-2,2,2-trifluoroacetat (209)

2-(4-(Piperidin-1-yl)phenyl)acetonitril (**208**, 738 mg, 3.69 mmol, 1.00 eq) wurde in 10 mL tr. Et₂O gelöst und zu einer auf 0 °C gekühlten LiAlH₄-Lösung (2 M in THF, 18.4 mL, 36.9 mmol, 10.0 eq) gegeben. Die Lösung wurden bei Raumtemperatur für 20 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Reaktion mit ges.-Na₂SO₄-Lösung gequenchet und bei Raumtemperatur für eine Stunde gerührt. Zu der Lösung wurde H₂O gegeben und das Produkt mit Et₂O aus der wässrigen Phase extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde mit ges.-NaCl-Lösung gewaschen und mit MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 302 mg (698 μmol, 19 %) oranges Öl

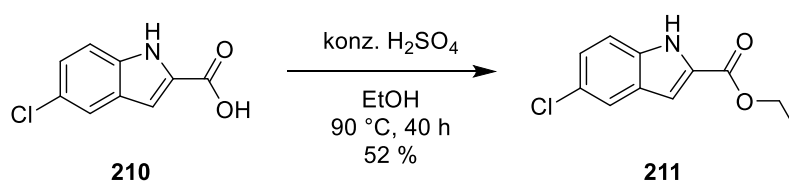
HPLC: 21.5 % B, Reinheit: 93.9 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₃H₂₀N₂ 204.16 (M), gef. 205.08 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 7.96 (s, 3H), 7.48 – 7.28 (m, 4H), 3.43 – 3.32 (m, 4H), 3.10 – 2.99 (m, 2H), 2.92 – 2.81 (m, 2H), 1.87 – 1.74 (m, 4H), 1.66 – 1.56 (m, 2H).

Das NH⁺_{Piperidin}-Signal geht im Rauschen unter.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 158.43 (q, J = 34.6 Hz), 144.61, 134.96, 129.92, 119.74, 116.30 (q, J = 291.6 Hz), 53.82, 40.11, 32.31, 23.91, 21.72.

Ethyl-5-chlor-1*H*-indol-2-carboxylat (211)

5-Chlor-1*H*-indol-2-carbonsäure (**210**, 500 mg, 2.56 mmol) wurde in 7 mL EtOH gelöst, mit 200 μL konz. H_2SO_4 versetzt und bei 90 $^\circ\text{C}$ für 40 Stunden gerührt. Anschließend wurde H_2O zu der Lösung gegeben und das Produkt aus der wässrigen Phase mit EA extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde mit MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

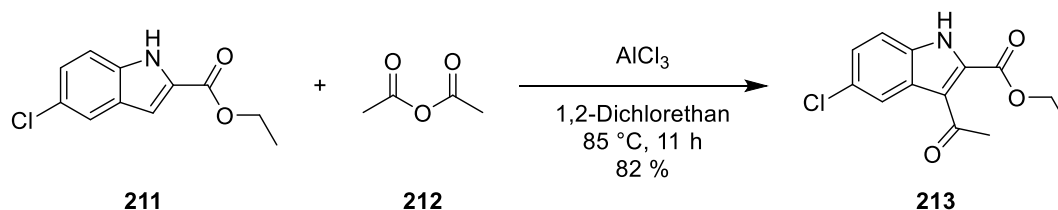
Ausbeute: 300 mg (1.34 mmol, 52 %) gelber Feststoff

HPLC: 74.5 % B, Reinheit: 99.4 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{ClNO}_2$ 223.04 (M), gef. 224.15 (M+H)⁺

¹H-NMR: (400 MHz, DMSO-d_6) δ [ppm] = 12.06 (s, 1H), 7.76 – 7.69 (m, 1H), 7.51 – 7.42 (m, 1H), 7.26 (dd, $J = 8.8, 2.1$ Hz, 1H), 7.14 – 7.10 (m, 1H), 4.35 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.34 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H).

¹³C-NMR: (101 MHz, DMSO-d_6) δ [ppm] = 160.95, 135.68, 128.79, 127.67, 124.69, 124.62, 121.02, 114.19, 107.12, 60.60, 14.20.

Ethyl-3-acetyl-5-chlor-1H-indol-2-carboxylat (213)

Ethyl-5-chlor-1H-indol-2-carboxylat (**211**, 150 mg, 671 μ mol, 1.00 eq) wurde unter Argon-Atmosphäre in 5 mL 1,2-Dichlorethan gelöst. Zu der Lösung wurden Essigsäureanhydrid (**212**, 761 μ L, 8.05 mmol, 12.0 eq) und AlCl₃ (1.07 g, 8.05 mmol, 12.0 eq) gegeben. Der Ansatz wurde bei 85 °C für 11 Stunden gerührt. Anschließend wurde Eiswasser zu der Lösung gegeben und das Produkt aus der wässrigen Phase mit EA extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

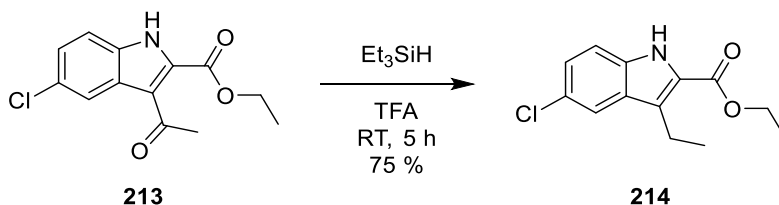
Ausbeute: 147 mg (553 μ mol, 82 %) hellbrauner Feststoff

HPLC: 69.0 % B, Reinheit: 90.4 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₃H₁₂ClNO₃ 265.05 (M), gef. 266.25 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 12.61 (s, 1H), 7.97 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.35 (dd, *J* = 8.8, 2.1 Hz, 1H), 4.43 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.60 (s, 3H), 1.38 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 195.94, 160.57, 133.67, 129.73, 126.98, 126.77, 125.35, 120.98, 118.71, 114.48, 61.80, 31.03, 13.90.

Ethyl-5-chlor-3-ethyl-1*H*-indol-2-carboxylat (214)

Ethyl-3-acetyl-5-chlor-1*H*-indol-2-carboxylat (**213**, 147 mg, 553 μmol , 1.00 eq) wurde in 2 mL TFA gelöst und mit Et_3SiH (353 μL , 2.21 mmol, 4.00 eq) versetzt. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 5 Stunden gerührt. Anschließend wurde Eiswasser zu der Lösung gegeben und das Produkt aus der wässrigen Phase mit EA extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde mit MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (6:1 CH:EA).

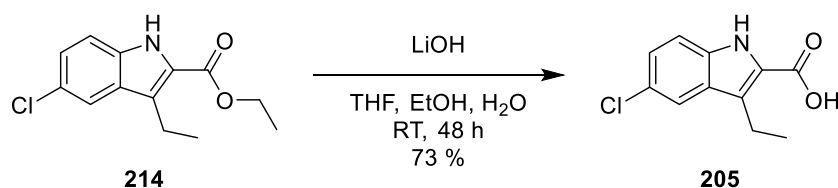
Ausbeute: 104 mg (413 μmol , 75 %) weißer Feststoff

HPLC: 83.6 % B, Reinheit: 94.1 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{ClNO}_2$ 251.07 (M), gef. 252.09 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 11.64 (s, 1H), 7.76 – 7.68 (m, 1H), 7.42 (dd, $J = 8.7, 0.7$ Hz, 1H), 7.25 (dd, $J = 8.7, 2.0$ Hz, 1H), 4.35 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.03 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.35 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.17 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 161.40, 134.61, 127.66, 124.90, 124.64, 124.01, 123.95, 119.31, 114.10, 60.26, 17.29, 15.44, 14.18.

5-Chlor-3-ethyl-1H-indol-2-carbonsäure (205)

Ethyl-5-chlor-3-ethyl-1H-indol-2-carboxylat (**214**, 89.0 mg, 354 μmol , 1.00 eq) wurde in 7.5 mL THF und 2.5 mL EtOH gelöst. Zu der Lösung wurde eine Lösung aus LiOH (42.4 mg, 1.77 mmol, 5.00 eq) in 5 mL H₂O gegeben. Die vereinten Lösungen wurden bei Raumtemperatur für 48 Stunden gerührt. Anschließend wurde THF und EtOH *in vacuo* entfernt und die wässrige Phase mit 1 M Salzsäure auf einen pH-Wert ≤ 1 eingestellt. Das Produkt wurde mit EA aus der wässrigen Phase extrahiert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 58 mg (259 μmol , 73 %) weißer Feststoff

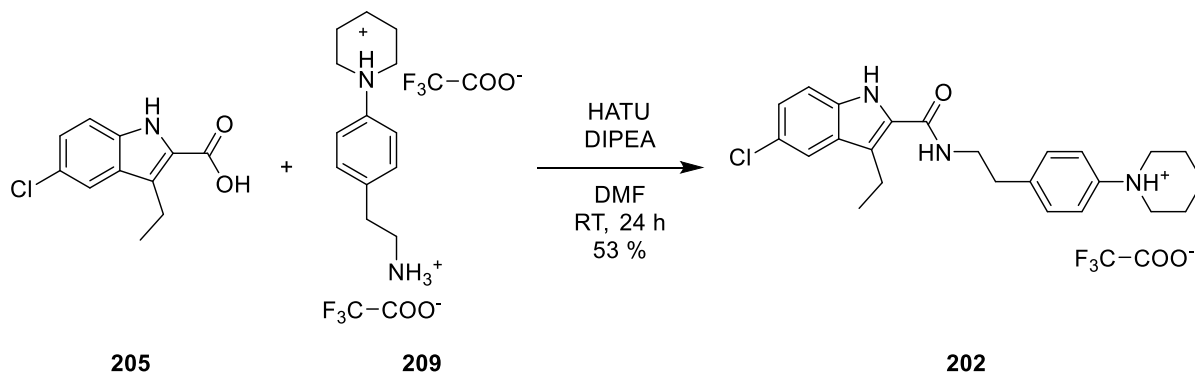
HPLC: 66.8 % B, Reinheit: 99.9 %

MS (ESI): m/z ber. für C₁₁H₁₀ClNO₂ 223.04 (M), gef. 222.07 (M-H)⁻

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 13.01 (s, 1H), 11.54 (s, 1H), 7.74 – 7.66 (m, 1H), 7.40 (dd, J = 8.7, 0.6 Hz, 1H), 7.22 (dd, J = 8.7, 2.1 Hz, 1H), 3.02 (q, J = 7.5 Hz, 2H), 1.17 (t, J = 7.4 Hz, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 162.99, 134.41, 127.80, 124.87, 124.52, 124.06, 123.77, 119.21, 113.98, 17.18, 15.61.

1-(4-(2-(5-Chlor-3-ethyl-1*H*-indol-2-carboxamido)ethyl)phenyl)piperidin-1-ium-2,2,2-trifluoracetat (202**)**



5-Chlor-3-ethyl-1*H*-indol-2-carbonsäure (**205**, 48.0 mg, 215 μmol , 1.00 eq) wurde in 5 mL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden 1-(4-(2-Ammoniummethyl)phenyl)piperidin-1-ium-2,2,2-trifluoroacetat (**209**, 93.0 mg, 215 μmol , 1.00 eq), HATU (81.6 mg, 215 μmol , 1.00 eq) und DIPEA (150 μL , 858 μmol , 4.00 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 59 mg (113 μmol , 53 %) weißer helloranger Feststoff

HPLC: 58.5 % B, Reinheit: 96.4 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{ClN}_3\text{O}$ 409.19 (M), gef. 410.21 (M+H)⁺

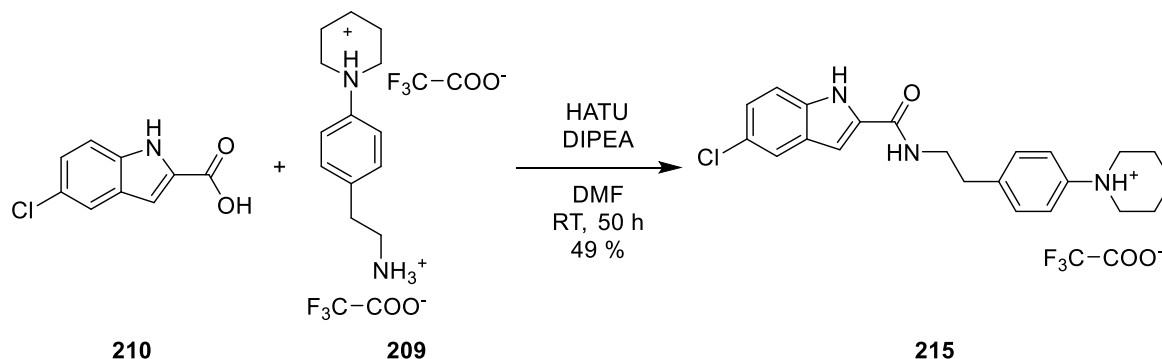
HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{ClN}_3\text{O}$ 410.1994, gef. 410.1997

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 11.35 (s, 1H), 8.01 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.50 – 7.21 (m, 5H), 7.18 (dd, *J* = 8.7, 2.0 Hz, 1H), 3.53 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.44 – 3.24 (m, 4H), 2.95 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.87 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.85 – 1.69 (m, 4H), 1.68 – 1.49 (m, 2H), 1.11 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H).

Das NH⁺_{Piperidin}-Signal geht im Rauschen unter.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 161.49, 158.35 (q, *J* = 34.0 Hz), 133.67, 129.77, 128.51, 128.13, 123.65, 123.50, 120.11, 119.25, 118.74, 117.60, 115.29, 113.55, 53.42, 40.24, 34.26, 24.06, 21.85, 17.01, 15.56.

Das CF₃-COOH-Signal geht im Rauschen unter.

1-(4-(2-(5-Chlor-1*H*-indol-2-carboxamido)ethyl)phenyl)piperidin-1-ium-2,2,2-trifluoacetat (215)


5-Chlor-1*H*-indol-2-carbonsäure (**210**, 40.0 mg, 205 μmol , 1.00 eq) wurde in 5 mL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden 1-(4-(2-Ammoniummethyl)phenyl)piperidin-1-ium-2,2,2-trifluoroacetat (**209**, 88.6 mg, 205 μmol , 1.00 eq), HATU (77.8 mg, 205 μmol , 1.00 eq) und DIPEA (142 μL , 818 μmol , 4.00 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 50 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 50 mg (101 μmol , 49 %) weißer Feststoff

HPLC: 53.6 % B, Reinheit: 95.4 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₂₂H₂₄ClN₃O 381.16 (M), gef. 382.11 (M+H)⁺

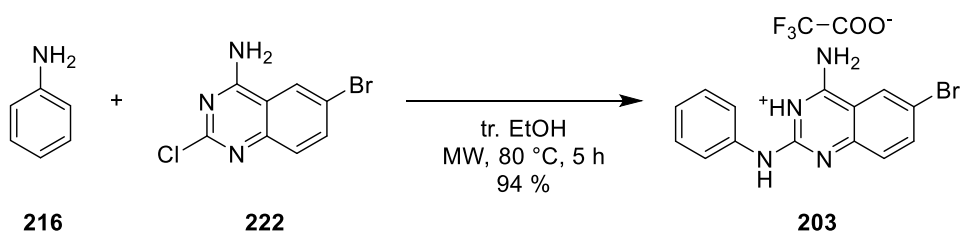
HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₂₂H₂₅ClN₃O 382.1681, gef. 382.1681

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 11.73 (s, 1H), 8.62 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.69 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.44 – 7.41 (m, 1H), 7.40 – 7.19 (m, 4H), 7.17 (dd, *J* = 8.7, 2.1 Hz, 1H), 7.07 (dd, *J* = 2.2, 0.9 Hz, 1H), 3.51 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.43 – 3.19 (m, 4H), 2.86 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.85 – 1.68 (m, 4H), 1.68 – 1.51 (m, 2H).

Das NH⁺_{Piperidin}-Signal geht im Rauschen unter.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 160.65, 158.25 (q, *J* = 33.7 Hz), 134.75, 133.28, 129.80, 128.11, 124.18, 123.28, 120.47, 119.24, 117.80, 115.40, 113.83, 101.91, 53.59, 40.25, 34.31, 24.06, 21.85.

Das CF₃-COOH-Signal geht im Rauschen unter.

4-Amino-6-brom-2-(phenylamino)quinazolin-3-ium-2,2,2-trifluoracetat (203)

Anilin (**216**, 71 μL , 784 μmol , 4.00 eq) wurde in 4 mL tr. EtOH gelöst. Zu der Lösung wurde 6-Brom-2-chlorquinazolin-4-amin (**222**, 50.7 mg, 196 μmol , 1.00 eq) gegeben. Der Ansatz wurde in der Mikrowelle bei 80 $^\circ\text{C}$ für 5 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 79 mg (184 μmol , 94 %) weißer Feststoff

HPLC: 49.2 % B, Reinheit: 97.4 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{BrN}_4$ 314.02 (M), gef. 315.20 (M+H)⁺

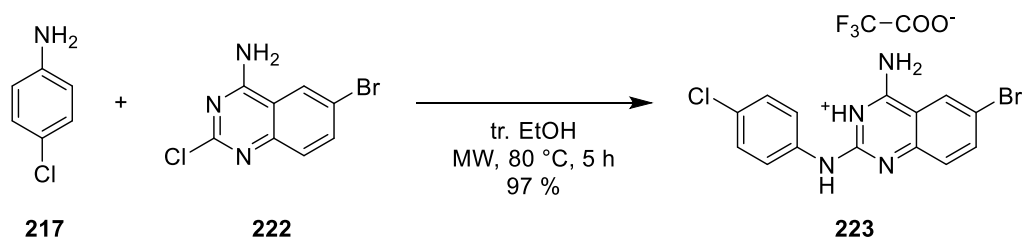
HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{BrN}_4$ 315.0240, gef. 315.0236

¹H-NMR: (400 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 10.62 (s, 1H), 9.07 (s, 2H), 8.52 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.97 (dd, *J* = 8.8, 2.1 Hz, 1H), 7.66 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.48 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.45 – 7.37 (m, 2H), 7.19 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H).

Das NH^+ Quinazolin-Signal geht im Rauschen unter.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 162.05, 159.89 (q, *J* = 33.0 Hz), 152.16, 139.76, 138.04, 137.35, 128.92, 127.10, 124.53, 121.92, 120.00, 115.95, 111.39.

Das $\text{CF}_3\text{-COOH}$ -Signal geht im Rauschen unter.

4-Amino-6-brom-2-((4-chlorphenyl)amino)quinazolin-3-ium-2,2,2-trifluoracetat (223)

4-Chloranilin (**217**, 73.0 mg, 572 μmol , 4.00 eq) wurde in 4 mL tr. EtOH gelöst. Zu der Lösung wurde 6-Brom-2-chlorquinazolin-4-amin (**222**, 37.0 mg, 143 μmol , 1.00 eq) gegeben. Der Ansatz wurde in der Mikrowelle bei 80 °C für 5 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 64 mg (138 μmol , 97 %) hellgelber Feststoff

HPLC: 56.0 % B, Reinheit: 98.1 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{BrClN}_4$ 347.98 (M), gef. 349.03 (M+H)⁺

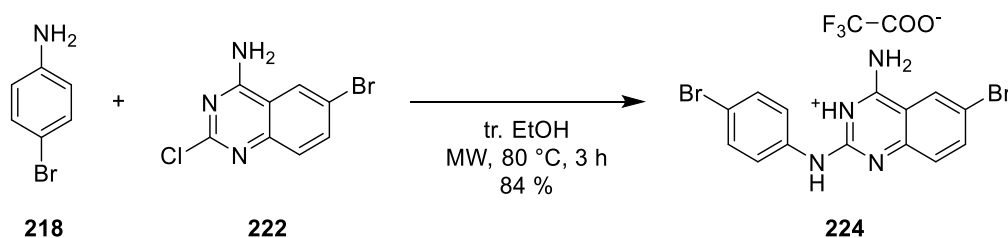
HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{BrClN}_4$ 348.9850, gef. 348.9849

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.69 (s, 1H), 9.05 (s, 2H), 8.52 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.96 (dd, *J* = 8.9, 2.1 Hz, 1H), 7.76 – 7.67 (m, 2H), 7.51 – 7.39 (m, 3H).

Das NH⁺Quinazolin-Signal geht im Rauschen unter.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 162.04, 159.89 (q, *J* = 33.6 Hz), 152.24, 138.02, 136.64, 128.75, 128.12, 127.08, 123.26, 120.42, 117.77, 115.98, 111.48.

Das CF₃-COOH-Signal geht im Rauschen unter.

4-Amino-6-brom-2-((4-bromphenyl)amino)quinazolin-3-ium-2,2,2-trifluoracetat (224)

4-Bromanilin (**218**, 93.2 mg, 542 μmol , 4.00 eq) wurde in 4 mL tr. EtOH gelöst. Zu der Lösung wurde 6-Brom-2-chlorquinazolin-4-amin (**222**, 35.0 mg, 135 μmol , 1.00 eq) gegeben. Der Ansatz wurde in der Mikrowelle bei 80 °C für 3 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 58 mg (114 μmol , 84 %) hellgelber Feststoff

HPLC: 57.0 % B, Reinheit: 97.7 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{Br}_2\text{N}_4$ 391.93 (M), gef. 392.95 (M+H)⁺

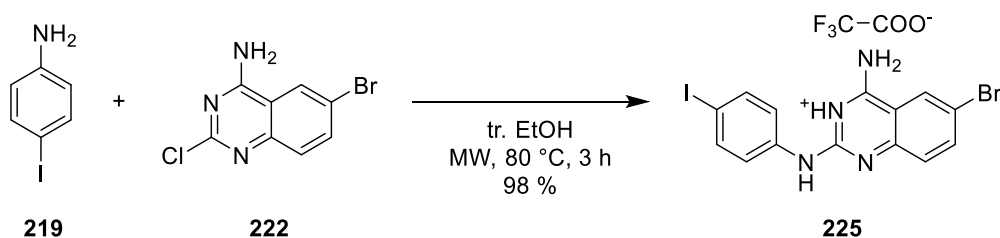
HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{Br}_2\text{N}_4$ 392.9345, gef. 392.9350

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.82 (s, 1H), 9.08 (s, 2H), 8.52 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.96 (dd, *J* = 8.9, 2.0 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.56 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.45 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H).

Das NH⁺_{Quinazolin}-Signal geht im Rauschen unter.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 162.03, 160.09 (q, *J* = 33.6 Hz), 152.15, 140.11, 138.04, 137.09, 131.63, 127.08, 123.52, 120.30, 116.17, 116.01, 111.43.

Das CF₃-COOH-Signal geht im Rauschen unter.

4-Amino-6-brom-2-((4-iodphenyl)amino)quinazolin-3-ium-2,2,2-trifluoracetat (225)

4-Iodanilin (**219**, 119 mg, 542 μmol , 4.00 eq) wurde in 4 mL tr. EtOH gelöst. Zu der Lösung wurde 6-Brom-2-chlorquinazolin-4-amin (**222**, 35.0 mg, 135 μmol , 1.00 eq) gegeben. Der Ansatz wurde in der Mikrowelle bei 80 °C für 3 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 73 mg (132 μmol , 98 %) hellgelber Feststoff

HPLC: 59.3 % B, Reinheit: 96.0 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₄H₁₀BrIN₄ 439.91 (M), gef. 440.90 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₄H₁₁BrIN₄ 440.9206, gef. 440.9203

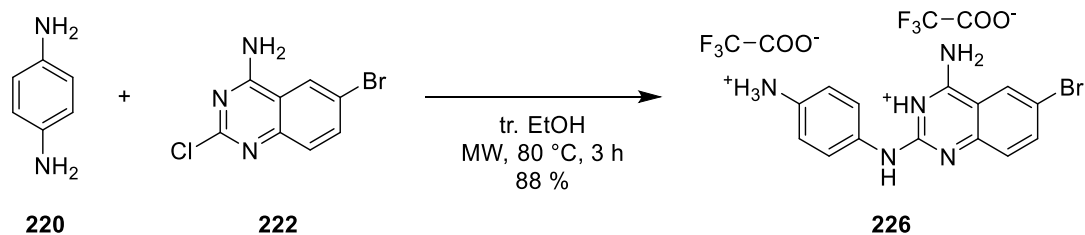
¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 10.82 (s, 1H), 9.08 (s, 2H), 8.52 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.96 (dd, *J* = 8.9, 2.0 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.56 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.45 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H).

Das NH⁺_{Quinazolin}-Signal geht im Rauschen unter.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 161.99, 159.71 (q, *J* = 34.1 Hz), 152.22, 137.97, 137.49, 127.04, 123.88, 120.58, 119.88, 117.83, 115.96, 111.48, 88.26.

Das CF₃-COOH-Signal geht im Rauschen unter.

4-Amino-2-((4-ammoniophenyl)amino)-6-bromquinazolin-3-ium-2,2,2-trifluoroacetat (226)



1,4-Diaminobenzen (**220**, 73.0 mg, 675 μmol , 4.00 eq) wurde in 4 mL tr. EtOH gelöst. Zu der Lösung wurde 6-Brom-2-chlorquinazolin-4-amin (**222**, 43.6 mg, 168 μmol , 1.00 eq) gegeben. Der Ansatz wurde in der Mikrowelle bei 80 °C für 3 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 82 mg (147 μmol , 88 %) hellbrauner Feststoff

HPLC: 35.5 % B, Reinheit: 97.9 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{BrN}_5$ 329.03 (M), gef. 330.07 (M+H)⁺

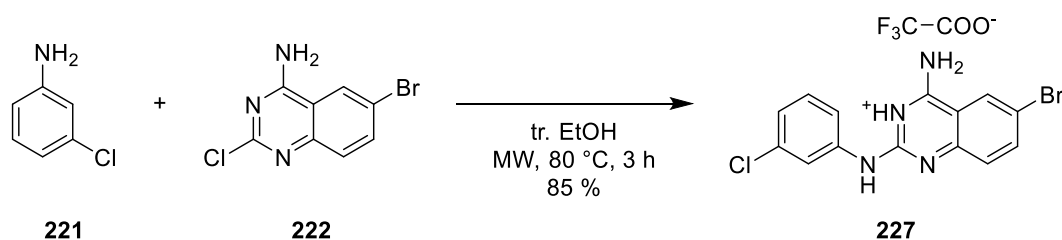
HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{BrN}_5$ 330.0349, gef. 330.0342

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.77 (s, 1H), 9.08 (s, 2H), 8.52 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.96 (dd, *J* = 8.9, 2.1 Hz, 1H), 7.72 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.52 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.45 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H).

Das NH⁺_{Quinazolin}-Signal und das NH₃⁺-Signal gehen im Rauschen unter.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 162.07, 159.27 (q, *J* = 34.2 Hz), 152.01, 139.21, 138.21, 127.20, 123.65, 120.13, 119.52, 117.54, 116.14, 115.20, 111.33.

Das CF₃-COOH-Signal geht im Rauschen unter.

4-Amino-6-brom-2-((3-chlorphenyl)amino)quinazolin-3-ium-2,2,2-trifluoracetat (227)

3-Chloranilin (**221**, 60 μL , 572 μmol , 4.00 eq) wurde in 4 mL tr. EtOH gelöst. Zu der Lösung wurde 6-Brom-2-chlorquinazolin-4-amin (**222**, 37.0 mg, 143 μmol , 1.00 eq) gegeben. Der Ansatz wurde in der Mikrowelle bei 80 $^\circ\text{C}$ für 3 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 56 mg (121 μmol , 85 %) hellgelber Feststoff

HPLC: 56.5 % B, Reinheit: 99.0 %

MS (ESI⁺): m/z ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{BrClN}_4$ 347.98 (M), gef. 349.01 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): m/z ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{BrClN}_4$ 348.9850, gef. 348.9850

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 10.70 (s, 1H), 9.15 (s, 2H), 8.55 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.97 (dd, J = 8.9, 2.1 Hz, 1H), 7.84 (t, J = 2.1 Hz, 1H), 7.64 – 7.57 (m, 1H), 7.48 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.42 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 7.26 – 7.18 (m, 1H).

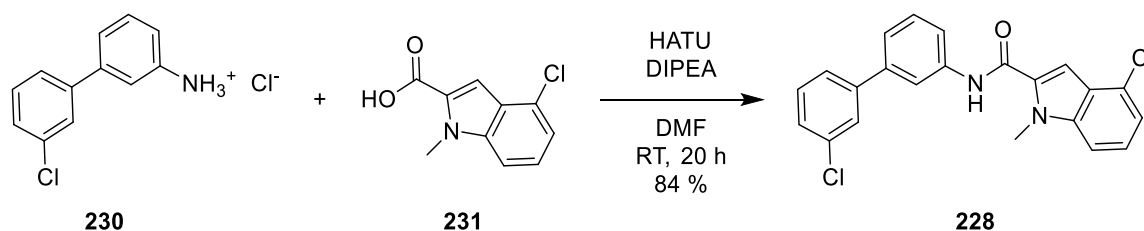
Das NH^+ _{Quinazolin}-Signal geht im Rauschen unter.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 162.10, 159.73 (q, J = 34.1 Hz), 152.11, 139.08, 138.12, 133.26, 130.48, 127.17, 124.05, 121.10, 120.04, 117.55, 116.18, 115.20, 111.52.

Das $\text{CF}_3\text{-COOH}$ -Signal geht im Rauschen unter.

5.2.6 Synthese der Verbindungen aus der Dockingstudie an der *known site 5* des ET_BR

4-Chlor-N-(3'-chlor-[1,1'-biphenyl]-3-yl)-1-methyl-1*H*-indol-2-carboxamid (**228**)



4-Chlor-1-methyl-1*H*-indol-2-carbonsäure (**231**, 100 mg, 479 μ mol, 1.00 eq) wurde in 10 mL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden 3'-Chlor-[1,1'-biphenyl]-3-ammoniumchlorid (**230**, 115 mg, 479 μ mol, 1.00 eq), HATU (182 mg, 479 μ mol, 1.00 eq) und DIPEA (326 μ L, 1.92 mmol, 4.00 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 20 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 159 mg (402 μ mol, 84 %) weißer Feststoff

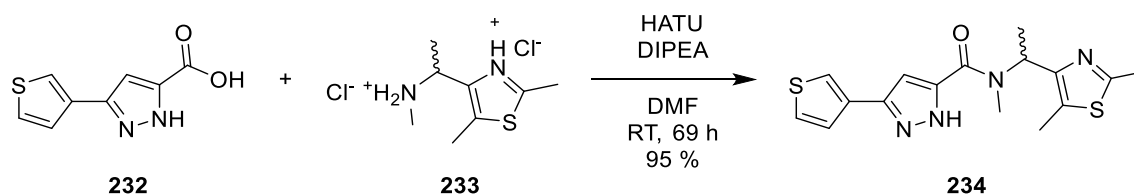
HPLC: 87.2 % B, Reinheit: 97.3 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₂₂H₁₆Cl₂N₂O 394.06 (M), gef. 394.97 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₂₂H₁₇Cl₂N₂O 395.0704, gef. 395.0712

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.50 (s, 1H), 8.13 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.90 – 7.87 (m, 1H), 7.70 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.64 (ddd, *J* = 7.8, 1.8, 1.1 Hz, 1H), 7.60 (dt, *J* = 8.4, 0.7 Hz, 1H), 7.53 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.48 – 7.44 (m, 3H), 7.32 (dd, *J* = 8.4, 7.6 Hz, 1H), 7.23 (dd, *J* = 7.6, 0.7 Hz, 1H), 4.07 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 159.97, 142.20, 139.49, 139.38, 139.02, 133.72, 132.59, 130.82, 129.41, 127.40, 126.28, 125.68, 125.31, 124.70, 124.05, 122.15, 119.85, 119.75, 118.57, 109.97, 103.58, 32.05.

N-(1-(2,5-Dimethylthiazol-4-yl)ethyl)-N-methyl-3-(thiophen-3-yl)-1H-pyrazol-5-carboxamid (234)

3-(Thiophen-3-yl)-1H-pyrazol-5-carbonsäure (**232**, 60.0 mg, 309 μ mol, 1.00 eq) wurde in 6 mL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden 2,5-Dimethyl-4-(1-(methylammonio)ethyl)thiazol-3-iumchlorid (**233**, 75.1 mg, 309 μ mol, 1.00 eq), HATU (117 mg, 309 μ mol, 1.00 eq) und DIPEA (263 μ L, 1.54 mmol, 5.00 eq) gegeben. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 69 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 102 mg (294 μ mol, 95 %) weißer Feststoff

HPLC: 54.0 % B, Reinheit: 97.2 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₆H₁₈N₄OS₂ 346.09 (M), gef. 347.07 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₆H₁₈N₄OS₂ 347.0994, gef. 347.0995

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 11.23 (s, 1H), 7.97 – 7.81 (m, 1H), 7.71 – 7.47 (m, 2H), 6.99 – 6.88 (m, 1H), 6.09 – 5.87 (m, 1H), 3.14 – 2.75 (m, 3H), 2.62 – 2.54 (m, 3H), 2.40 – 2.04 (m, 3H), 1.66 – 1.46 (m, 3H).

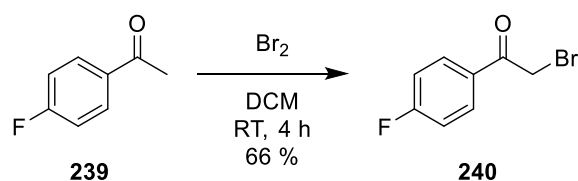
In dem ¹H-NMR-Experiment zeigte das Produkt zwei Signaldatensätze (vermutlich *cis/trans*-Isomere). Bei der Auswertung wurden die jeweiligen Peaks beider Signaldatensätze zusammen integriert und als Multipllett angegeben.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 161.81, 161.15, 150.07, 128.78, 127.38, 127.12, 125.74, 121.56, 121.17, 104.44, 104.13, 45.58, 31.15, 18.73, 17.07, 10.42.

Bei der Auswertung des ¹³C-NMR-Experiments konnte lediglich der Signaldatensatz eines Isomers angegeben werden, da der zweite Signaldatensatz im Rauschen unter geht.

5.2.7 Synthese der GPRC5b Zielverbindungen

2-Brom-1-(4-fluorphenyl)ethan-1-on (240)



1-(4-Fluorphenyl)ethan-1-on (**239**, 300 mg, 2.17 mmol, 1.00 eq) wurde in 20 mL DCM gelöst. Zu der Lösung wurde Br₂ (122 µL, 2.39 mmol, 1.10 eq) zugetropft. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 4 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (15:1 CH:EA).

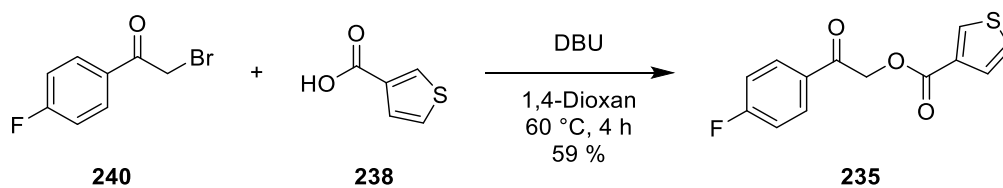
Ausbeute: 313 mg (1.44 mmol, 66 %) gelboranger Feststoff

HPLC: 62.4 % B, Reinheit: 92.6 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₈H₆BrFO 215.96 (M), gef. 216.95 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃-d) δ [ppm] = 8.08 – 7.98 (m, 2H), 7.22 – 7.11 (m, 2H), 4.42 (s, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, CDCl₃-d) δ [ppm] = 189.99, 166.30 (d, J = 256.7 Hz), 131.89 (d, J = 9.6 Hz), 130.46 (d, J = 3.0 Hz), 116.26 (d, J = 22.1 Hz), 30.59.

2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethyl-thiophen-3-carboxylat (235)

2-Brom-1-(4-fluorphenyl)ethan-1-on (**240**, 50.0 mg, 230 μmol , 1.00 eq) wurde in 2 mL 1,4-Dioxan gelöst. Zu der Lösung wurden Thiophen-3-carbonsäure (**238**, 59.0 mg, 461 μmol , 2.00 eq) und DBU (69 μL , 461 μmol , 2.00 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei 60 °C für 4 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (15:1 CH:EA).

Ausbeute: 36 mg (136 μmol , 59 %) gelber Feststoff

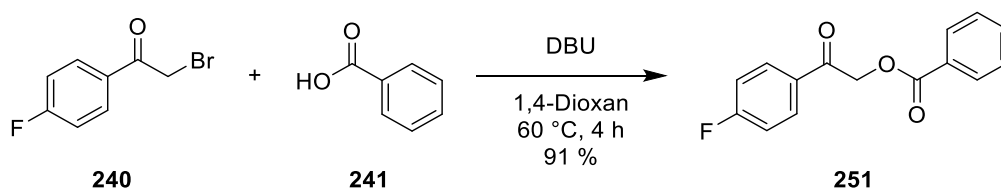
HPLC: 68.1 % B, Reinheit: 97.6 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₃H₉FO₃S 264.03 (M), gef. 265.04 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₃H₉FNaO₃S 287.0149, gef. 287.0149

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃-d) δ [ppm] = 8.24 (dd, *J* = 3.1, 1.2 Hz, 1H), 8.05 – 7.95 (m, 2H), 7.60 (dd, *J* = 5.1, 1.2 Hz, 1H), 7.35 (dd, *J* = 5.1, 3.1 Hz, 1H), 7.24 – 7.14 (m, 2H), 5.49 (s, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, CDCl₃-d) δ [ppm] = 190.80, 166.29 (d, *J* = 256.1 Hz), 162.12, 133.91, 132.63, 130.85 (d, *J* = 3.3 Hz), 130.70 (d, *J* = 9.4 Hz), 128.21, 126.38, 116.30 (d, *J* = 22.1 Hz), 66.12.

2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethyl-benzoat (251)

2-Brom-1-(4-fluorphenyl)ethan-1-on (**240**, 50.0 mg, 230 μmol , 1.00 eq) wurde in 2 mL 1,4-Dioxan gelöst. Zu der Lösung wurden Benzoesäure (**241**, 56.3 mg, 461 μmol , 2.00 eq) und DBU (69 μL , 461 μmol , 2.00 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei 60 °C für 4 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (15:1 CH:EA).

Ausbeute: 54 mg (209 μmol , 91 %) gelber Feststoff

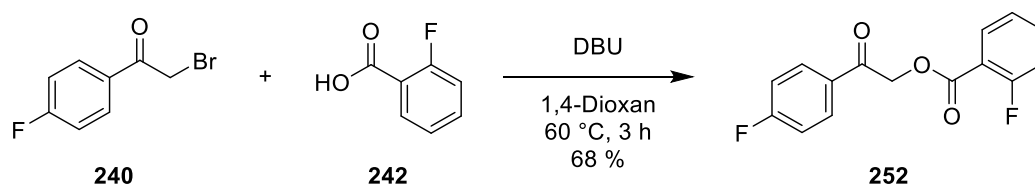
HPLC: 71.4 % B, Reinheit: 99.9 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{FO}_3$ 258.07 (M), gef. 259.10 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{FNaO}_3$ 281.0584, gef. 281.0584

¹H-NMR: (500 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}$) δ [ppm] = 8.19 – 8.08 (m, 2H), 8.06 – 7.96 (m, 2H), 7.64 – 7.56 (m, 1H), 7.53 – 7.43 (m, 2H), 7.24 – 7.15 (m, 2H), 5.54 (s, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}$) δ [ppm] = 190.78, 166.30 (d, $J = 256.1$ Hz), 166.18, 133.59, 130.87 (d, $J = 3.2$ Hz), 130.71 (d, $J = 9.4$ Hz), 130.13, 129.41, 128.63, 116.31 (d, $J = 22.1$ Hz), 66.41.

2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethyl 2-fluorbenzoat (252)

2-Brom-1-(4-fluorphenyl)ethan-1-on (**240**, 100 mg, 461 μmol , 1.00 eq) wurde in 4 mL 1,4-Dioxan gelöst. Zu der Lösung wurden 2-Fluorbenzoesäure (**242**, 129 mg, 922 μmol , 2.00 eq) und DBU (138 μL , 922 μmol , 2.00 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei 60 °C für 3 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (15:1 CH:EA).

Ausbeute: 87 mg (315 μmol , 68 %) weißer Feststoff

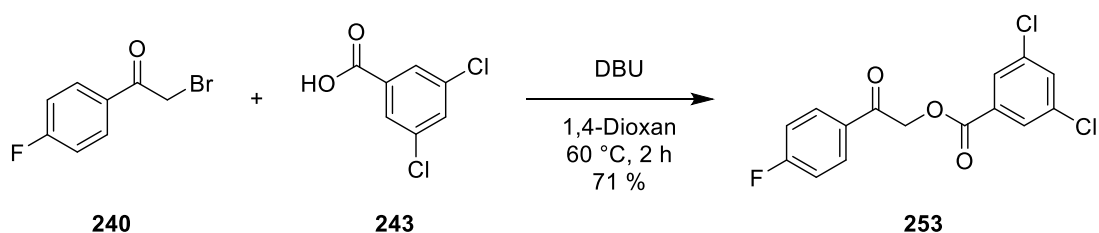
HPLC: 71.7 % B, Reinheit: 95.8 %

MS (ESI⁺): m/z ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{F}_2\text{O}_3$ 276.06 (M), gef. 277.02 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): m/z ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{F}_2\text{NaO}_3$ 299.0490, gef. 299.0494

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 8.14 – 8.08 (m, 2H), 7.99 (td, $J = 7.7, 1.8$ Hz, 1H), 7.78 – 7.71 (m, 1H), 7.45 – 7.37 (m, 4H), 5.76 (s, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 191.12, 165.40 (d, $J = 252.8$ Hz), 162.86 (d, $J = 3.5$ Hz), 161.10 (d, $J = 258.2$ Hz), 135.63 (d, $J = 9.2$ Hz), 131.86, 130.91 (d, $J = 9.6$ Hz), 130.57 (d, $J = 2.9$ Hz), 124.73 (d, $J = 3.8$ Hz), 117.56 (d, $J = 9.8$ Hz), 117.14 (d, $J = 21.9$ Hz), 116.02 (d, $J = 22.0$ Hz), 67.19.

2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethyl 3,5-dichlorbenzoat (253)

2-Brom-1-(4-fluorphenyl)ethan-1-on (**240**, 100 mg, 461 μmol , 1.00 eq) wurde in 4 mL 1,4-Dioxan gelöst. Zu der Lösung wurden 3,5-Dichlorbenzoesäure (**243**, 176 mg, 922 μmol , 2.00 eq) und DBU (138 μL , 922 μmol , 2.00 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei 60 °C für 2 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (15:1 CH:EA).

Ausbeute: 107 mg (327 μmol , 71 %) weißer Feststoff

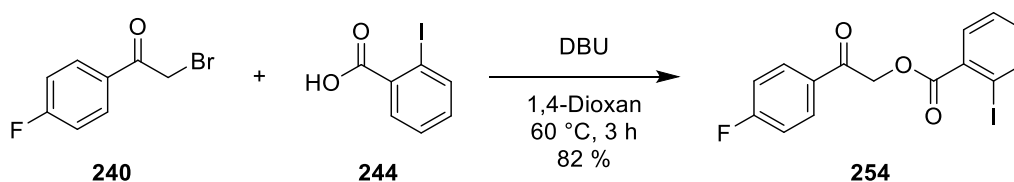
HPLC: 84.6 % B, Reinheit: 99.5 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{FO}_3$ 325.99 (M), gef. 327.12 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{FNaO}_3$ 348.9805, gef. 348.9809

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.13 – 8.09 (m, 2H), 8.03 – 8.01 (m, 1H), 7.97 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 7.45 – 7.40 (m, 2H), 5.79 (s, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 190.86, 165.45 (d, *J* = 253.0 Hz), 162.99, 134.80, 133.08, 132.38, 130.96 (d, *J* = 9.7 Hz), 130.44 (d, *J* = 2.9 Hz), 127.78, 116.05 (d, *J* = 22.1 Hz), 67.70.

2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethyl 2-iodbenzoat (254)

2-Brom-1-(4-fluorphenyl)ethan-1-on (**240**, 100 mg, 461 μmol , 1.00 eq) wurde in 4 mL 1,4-Dioxan gelöst. Zu der Lösung wurden 2-Iodbenzoesäure (**244**, 229 mg, 922 μmol , 2.00 eq) und DBU (138 μL , 922 μmol , 2.00 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei 60 °C für 3 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (15:1 CH:EA).

Ausbeute: 145 mg (377 μmol , 82 %) weißer Feststoff

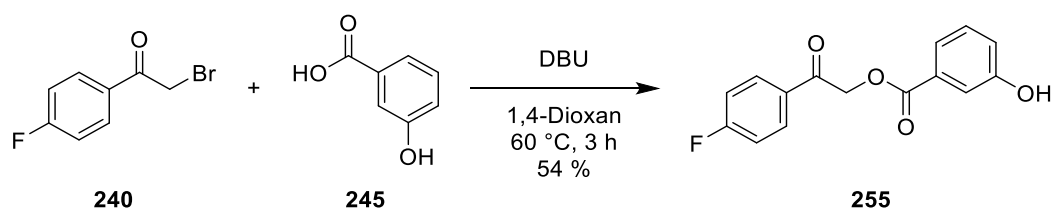
HPLC: 78.1 % B, Reinheit: 96.3 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₀FIO₃ 383.97 (M), gef. 384.95 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₀FINaO₃ 406.9551, gef. 406.9565

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 8.17 – 8.09 (m, 2H), 8.09 – 8.05 (m, 1H), 7.95 – 7.89 (m, 1H), 7.58 (td, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 1H), 7.46 – 7.39 (m, 2H), 7.38 – 7.30 (m, 1H), 5.75 (s, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 191.15, 165.58, 165.42 (d, *J* = 252.8 Hz), 140.94, 134.42, 133.39, 130.95 (d, *J* = 9.7 Hz), 130.82, 130.56 (d, *J* = 2.9 Hz), 128.31, 116.02 (d, *J* = 22.1 Hz), 94.62, 67.27.

2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethyl 3-hydroxybenzoat (255)

2-Brom-1-(4-fluorphenyl)ethan-1-on (**240**, 100 mg, 461 μmol , 1.00 eq) wurde in 4 mL 1,4-Dioxan gelöst. Zu der Lösung wurden 3-Hydroxybenzoesäure (**245**, 127 mg, 922 μmol , 2.00 eq) und DBU (138 μL , 922 μmol , 2.00 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei 60 °C für 3 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 68 mg (247 μmol , 54 %) weißer Feststoff

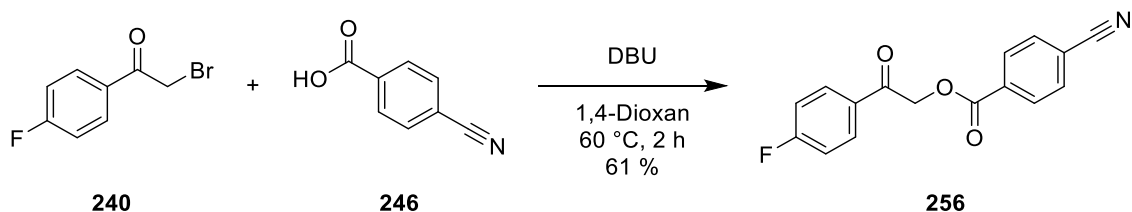
HPLC: 61.8 % B, Reinheit: 99.9 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₁FO₄ 274.06 (M), gef. 297.07 (M+Na)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₁FNaO₄ 297.0534, gef. 297.0540

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 9.85 (s, 1H), 8.13 – 8.08 (m, 2H), 7.49 – 7.45 (m, 1H), 7.44 – 7.39 (m, 3H), 7.36 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.08 (ddd, *J* = 8.1, 2.6, 1.0 Hz, 1H), 5.71 (s, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 191.43, 165.37 (d, *J* = 252.9 Hz), 165.21, 157.54, 130.87 (d, *J* = 9.7 Hz), 130.68 (d, *J* = 2.9 Hz), 130.31, 129.88, 120.63, 119.99, 116.00 (d, *J* = 22.1 Hz), 115.74, 66.90.

2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethyl-4-cyanobenzoat (256)

2-Brom-1-(4-fluorphenyl)ethan-1-on (**240**, 100 mg, 461 μmol , 1.00 eq) wurde in 4 mL 1,4-Dioxan gelöst. Zu der Lösung wurden 4-Cyanobenzoesäure (**246**, 136 mg, 922 μmol , 2.00 eq) und DBU (138 μL , 922 μmol , 2.00 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei 60 °C für 2 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (15:1 CH:EA \rightarrow EA).

Ausbeute: 80 mg (282 μmol , 61 %) gelber Feststoff

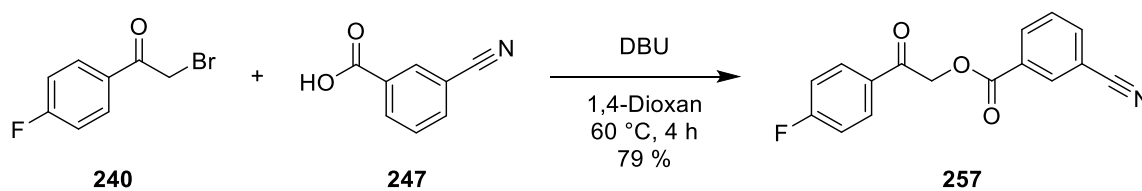
HPLC: 69.2 % B, Reinheit: 99.0 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₆H₁₀FNO₃ 283.06 (M), gef. 284.01 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₆H₁₀FNNaO₃ 306.0537, gef. 306.0534

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 8.20 – 8.17 (m, 2H), 8.13 – 8.09 (m, 2H), 8.08 – 8.05 (m, 2H), 7.45 – 7.40 (m, 2H), 5.80 (s, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 190.99, 165.44 (d, J = 252.9 Hz), 164.07, 132.97, 132.93, 130.94 (d, J = 9.6 Hz), 130.50 (d, J = 2.9 Hz), 129.96, 117.94, 116.05 (d, J = 22.0 Hz), 115.80, 67.57.

2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethyl-3-cyanobenzoat (257)

2-Brom-1-(4-fluorphenyl)ethan-1-on (**240**, 100 mg, 461 μmol , 1.00 eq) wurde in 4 mL 1,4-Dioxan gelöst. Zu der Lösung wurden 3-Cyanobenzoesäure (**247**, 136 mg, 922 μmol , 2.00 eq) und DBU (138 μL , 922 μmol , 2.00 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei 60 °C für 4 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (15:1 CH:EA \rightarrow EA).

Ausbeute: 103 mg (364 μmol , 79 %) gelber Feststoff

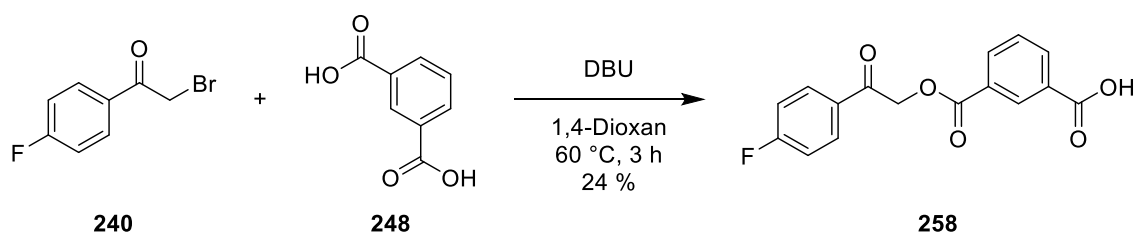
HPLC: 68.6 % B, Reinheit: 99.9 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{FNO}_3$ 283.06 (M), gef. 284.06 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{FNNaO}_3$ 306.0537, gef. 306.0539

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 8.40 (td, *J* = 1.7, 0.6 Hz, 1H), 8.33 (ddd, *J* = 7.9, 1.7, 1.2 Hz, 1H), 8.19 (ddd, *J* = 7.8, 1.7, 1.2 Hz, 1H), 8.13 – 8.10 (m, 2H), 7.81 (td, *J* = 7.9, 0.6 Hz, 1H), 7.45 – 7.40 (m, 2H), 5.80 (s, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 191.00, 165.44 (d, *J* = 253.0 Hz), 163.71, 137.00, 133.73, 132.80, 130.99, 130.91, 130.49 (d, *J* = 2.8 Hz), 130.32 (d, *J* = 12.4 Hz), 117.77, 116.04 (d, *J* = 22.1 Hz), 112.26, 67.52.

3-((2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethoxy)carbonyl)benzoesäure (258)

2-Brom-1-(4-fluorphenyl)ethan-1-on (**240**, 70.0 mg, 323 μmol , 1.00 eq) wurde in 3 mL 1,4-Dioxan gelöst. Zu der Lösung wurden Isophthalsäure (**248**, 107 mg, 645 μmol , 2.00 eq) und DBU (96 μL , 645 μmol , 2.00 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei 60 °C für 3 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 23 mg (76.1 μmol , 24 %) weißer Feststoff

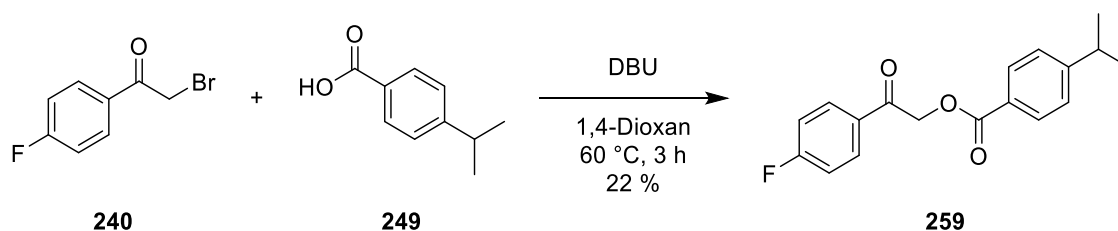
HPLC: 61.4 % B, Reinheit: 97.9 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₆H₁₁FO₅ 302.06 (M), gef. 303.05 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₆H₁₁FNaO₅ 325.0483, gef. 325.0487

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 13.34 (s, 1H), 8.57 (td, *J* = 1.7, 0.5 Hz, 1H), 8.27 – 8.24 (m, 2H), 8.14 – 8.09 (m, 2H), 7.73 (td, *J* = 7.8, 0.4 Hz, 1H), 7.45 – 7.40 (m, 2H), 5.79 (s, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 191.21, 166.33, 165.41 (d, *J* = 253.0 Hz), 164.57, 134.07, 133.36, 131.46, 130.91 (d, *J* = 9.7 Hz), 130.58 (d, *J* = 2.9 Hz), 129.90, 129.54, 129.48, 116.04 (d, *J* = 22.1 Hz), 67.26.

2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethyl 4-isopropylbenzoat (259)

2-Brom-1-(4-fluorphenyl)ethan-1-on (**240**, 100 mg, 461 μmol , 1.00 eq) wurde in 4 mL 1,4-Dioxan gelöst. Zu der Lösung wurden 4-Isopropylbenzoesäure (**249**, 151 mg, 922 μmol , 2.00 eq) und DBU (138 μL , 922 μmol , 2.00 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei 60 °C für 3 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (15:1 CH:EA).

Ausbeute: 30 mg (100 μmol , 22 %) weißer Feststoff

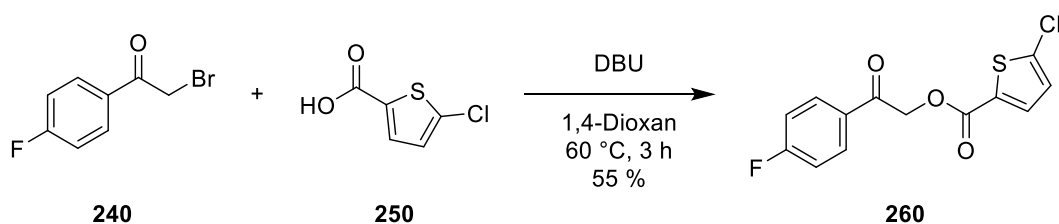
HPLC: 82.8 % B, Reinheit: 97.5 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{FO}_3$ 300.12 (M), gef. 301.08 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{FNaO}_3$ 323.1054, gef. 323.1066

¹H-NMR: (500 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}$) δ [ppm] = 8.07 – 8.04 (m, 2H), 8.03 – 7.98 (m, 2H), 7.34 – 7.31 (m, 2H), 7.20 – 7.16 (m, 2H), 5.52 (s, 2H), 2.98 (hept, $J = 6.9$ Hz, 1H), 1.28 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H).

¹³C-NMR: (126 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}$) δ [ppm] = 190.97, 166.25 (d, $J = 256.0$ Hz), 166.19, 155.09, 130.93 (d, $J = 3.0$ Hz), 130.71 (d, $J = 9.4$ Hz), 130.29, 126.98, 126.76, 116.26 (d, $J = 22.0$ Hz), 66.30, 34.46, 23.84.

2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethyl 5-chlorthiophen-2-carboxylat (260)

2-Brom-1-(4-fluorphenyl)ethan-1-on (**240**, 50.0 mg, 230 μmol , 1.00 eq) wurde in 2 mL 1,4-Dioxan gelöst. Zu der Lösung wurden 5-Chlorthiophen-2-carbonsäure (**250**, 74.9 mg, 461 μmol , 2.00 eq) und DBU (69 μL , 461 μmol , 2.00 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei 60 $^\circ\text{C}$ für 3 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (6:1 CH:EA).

Ausbeute: 38 mg (127 μmol , 55 %) gelber Feststoff

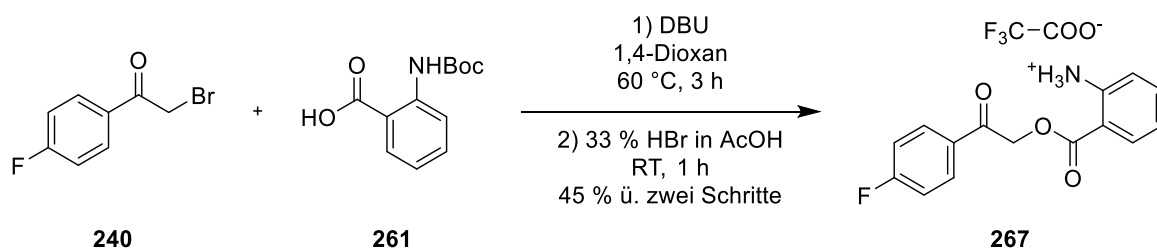
HPLC: 76.7 % B, Reinheit: 99.9 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{ClFO}_3\text{S}$ 297.99 (M), gef. 298.87 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{ClFNaO}_3\text{S}$ 320.9759, gef. 320.9763

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.11 – 8.06 (m, 2H), 7.80 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 7.45 – 7.40 (m, 2H), 7.33 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 5.72 (s, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 191.00, 165.42 (d, *J* = 253.0 Hz), 159.76, 136.20, 134.46, 130.91 (d, *J* = 9.6 Hz), 130.59, 130.45 (d, *J* = 2.9 Hz), 128.78, 116.03 (d, *J* = 22.1 Hz), 67.33.

2-((2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethoxy)carbonyl)benzylammonium-2,2,2-trifluoracetat (**267**)

2-Brom-1-(4-fluorphenyl)ethan-1-on (**240**, 100 mg, 461 μmol , 1.00 eq) wurde in 4 mL 1,4-Dioxan gelöst. Zu der Lösung wurden 2-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)benzoesäure (**261**, 219 mg, 922 μmol , 2.00 eq) und DBU (138 μL , 922 μmol , 2.00 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei 60 °C für 3 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

Das erhaltene Rohprodukt wurde in 3 mL 33 % HBr in AcOH (*w/w*) gelöst. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 1 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Lösung in kaltem Et₂O gegeben und der ausgefallene Feststoff abzentrifugiert. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 81 mg (209 μmol , 45 %) gelber Feststoff

HPLC: 68.0 % B, Reinheit: 99.9 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₂FNO₃ 273.08 (M), gef. 274.08 (M+H)⁺

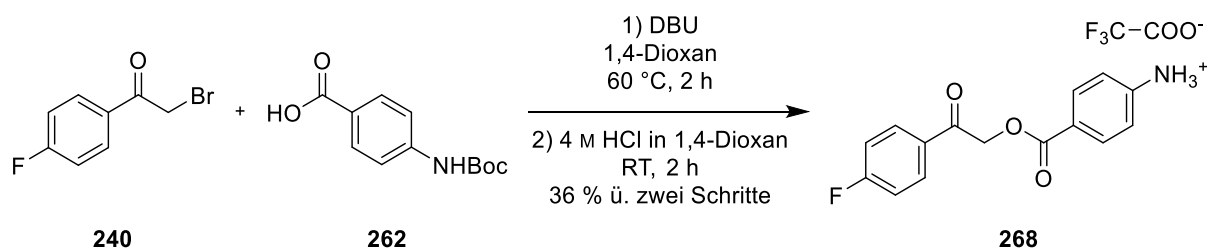
HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₂FNNaO₃ 296.0693, gef. 296.0701

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.13 – 8.07 (m, 2H), 7.81 (ddd, *J* = 8.1, 1.7, 0.4 Hz, 1H), 7.44 – 7.39 (m, 2H), 7.31 – 7.27 (m, 1H), 6.82 – 6.78 (m, 1H), 6.59 – 6.55 (m, 1H), 5.65 (s, 2H).

Das NH₃⁺-Signal liegt unter den Aromatischen-Signalen im Bereich von 6.4 – 6.8 ppm.

¹³C-NMR: (126 MHz, CDCl₃-*d*) δ [ppm] = 191.24, 167.40, 166.26 (d, *J* = 256.1 Hz), 150.70, 134.77, 131.70, 130.88 (d, *J* = 3.1 Hz), 130.73 (d, *J* = 9.5 Hz), 116.93, 116.69, 116.27 (d, *J* = 22.0 Hz), 110.09, 65.99.

Die TFA-Signale gehen im Rauschen unter.

4-((2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethoxy)carbonyl)benzylammonium-2,2,2-trifluoracetat (**268**)

2-Brom-1-(4-fluorphenyl)ethan-1-on (**240**, 100 mg, 461 μmol , 1.00 eq) wurde in 4 mL 1,4-Dioxan gelöst. Zu der Lösung wurden 4-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)benzoesäure (**262**, 219 mg, 922 μmol , 2.00 eq) und DBU (138 μL , 922 μmol , 2.00 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei 60 °C für 2 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

Das erhaltene Rohprodukt wurde in 3 mL 4 M HCl in 1,4-Dioxan gelöst. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 2 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Lösung in kalten Et₂O gegeben und der ausgefallene Feststoff abzentrifugiert. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 64 mg (165 μmol , 36 %) gelber Feststoff

HPLC: 58.3 % B, Reinheit: 99.1 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₂FNO₃ 273.08 (M), gef. 274.07 (M+H)⁺

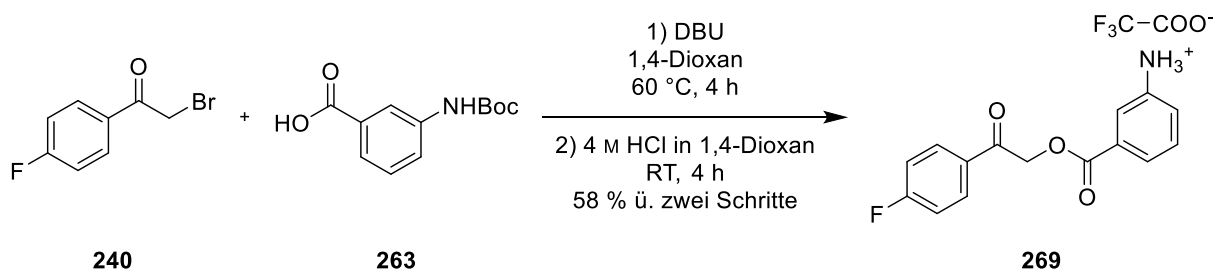
HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₃FNO₃ 274.0874, gef. 274.0875

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 8.12 – 8.06 (m, 2H), 7.72 – 7.68 (m, 2H), 7.44 – 7.37 (m, 2H), 6.65 – 6.55 (m, 2H), 5.57 (s, 2H).

Das NH₃⁺-Signal liegt unter den Aromatischen-Signalen im Bereich von 6.1 – 6.8 ppm.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 192.09, 165.27 (d, J = 252.5 Hz), 165.23, 153.77, 131.34, 130.88 (d, J = 2.9 Hz), 130.79 (d, J = 9.6 Hz), 115.93 (d, J = 21.9 Hz), 115.04, 112.64, 66.03.

Die TFA-Signale gehen im Rauschen unter.

3-((2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethoxy)carbonyl)benzolanmonium-2,2,2-trifluoracetat (269)

2-Brom-1-(4-fluorphenyl)ethan-1-on (**240**, 100 mg, 461 μmol , 1.00 eq) wurde in 4 mL 1,4-Dioxan gelöst. Zu der Lösung wurden 3-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)benzoesäure (**263**, 219 mg, 922 μmol , 2.00 eq) und DBU (138 μL , 922 μmol , 2.00 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei 60 °C für 4 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

Das erhaltene Rohprodukt wurde in 3 mL 4 M HCl in 1,4-Dioxan gelöst. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 4 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Lösung in kalten Et₂O gegeben und der ausgefallene Feststoff abzentrifugiert. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 104 mg (268 μmol , 58 %) weißer Feststoff

HPLC: 37.6 % B, Reinheit: 99.9 %

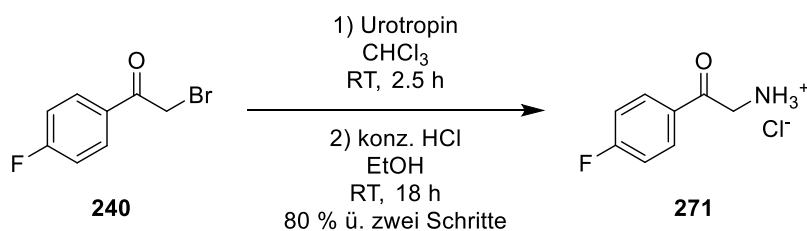
MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₂FNO₃ 273.08 (M), gef. 274.07 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₃FNO₃ 274.0874, gef. 274.0882

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.13 – 8.07 (m, 2H), 7.45 – 7.37 (m, 4H), 7.31 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.07 – 7.03 (m, 1H), 5.70 (s, 2H).

Das NH₃⁺-Signal liegt unter den Aromatischen-Signalen im Bereich von 7.2 – 7.8 ppm.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 191.46, 165.39, 165.38 (d, *J* = 252.9 Hz), 158.20 (q, *J* = 36.6 Hz), 130.88 (d, *J* = 9.6 Hz), 145.14, 130.69 (d, *J* = 2.9 Hz), 129.89, 129.47, 120.93, 119.49, 116.55, 116.01 (d, *J* = 22.0 Hz), 115.56 (q, *J* = 291.3 Hz), 66.85.

2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethan-1-ammoniumchlorid (271)

2-Brom-1-(4-fluorphenyl)ethan-1-on (**240**, 400 mg, 1.84 mmol, 1.00 eq) wurde in 10 mL CHCl₃ gelöst und mit Urotropin (284 mg, 2.03 mmol, 1.10 eq) versetzt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 2.5 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Suspension filtriert und der Feststoff mit CHCl₃ gewaschen.

Der erhaltene Feststoff wurde in 4 mL EtOH und 2 mL konz. HCl gelöst und der Ansatz bei Raumtemperatur für 18 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

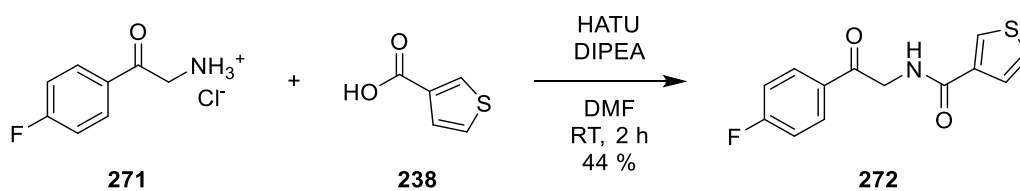
Ausbeute: 280 mg (1.48 mmol, 80 %) weißer Feststoff

HPLC: 18.2 % B, Reinheit: 95.2 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₈H₈FNO 153.06 (M), gef. 154.02 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 8.33 (s, 3H), 8.13 – 8.10 (m, 2H), 7.46 – 7.41 (m, 2H), 4.60 (s, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 191.64, 165.68 (d, J = 253.6 Hz), 131.29 (d, J = 9.9 Hz), 130.49 (d, J = 2.8 Hz), 116.09 (d, J = 22.2 Hz), 44.80.

***N*-2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethylthiophen-3-carboxamid (272)**

2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethan-1-ammoniumchlorid (**271**, 65.1 mg, 343 μmol , 1.10 eq) wurde in 5 mL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden Thiophen-3-carbonsäure (**238**, 40.0 mg, 312 μmol , 1.00 eq), HATU (131 mg, 343 μmol , 1.10 eq) und DIPEA (175 μL , 1.03 mmol, 3.30 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 2 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (2:1 CH:EA).

Ausbeute: 36 mg (137 μmol , 44 %) weißer Feststoff

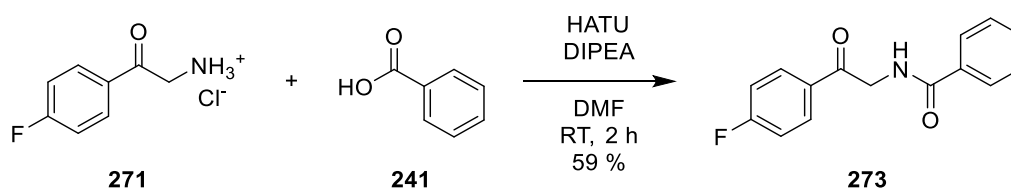
HPLC: 54.9 % B, Reinheit: 99.9 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{FNO}_2\text{S}$ 263.04 (M), gef. 264.05 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{FNNaO}_2\text{S}$ 286.0308, gef. 286.0312

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.68 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.19 (dd, *J* = 3.0, 1.3 Hz, 1H), 8.15 – 8.10 (m, 2H), 7.61 (dd, *J* = 5.0, 3.0 Hz, 1H), 7.53 (dd, *J* = 5.0, 1.3 Hz, 1H), 7.41 – 7.36 (m, 2H), 4.73 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 194.02, 165.13 (d, *J* = 252.2 Hz), 162.29, 137.24, 131.82 (d, *J* = 2.9 Hz), 130.85 (d, *J* = 9.5 Hz), 129.00, 126.78, 126.73, 115.81 (d, *J* = 21.8 Hz), 46.00.

N-(2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethyl)benzamid (273)

2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethan-1-ammoniumchlorid (**271**, 68.3 mg, 360 μmol , 1.10 eq) wurde in 5 mL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden Benzoesäure (**241**, 40.0 mg, 328 μmol , 1.00 eq), HATU (137 mg, 360 μmol , 1.10 eq) und DIPEA (184 μL , 1.08 mmol, 3.30 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 2 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (2:1 CH:EA).

Ausbeute: 50 mg (194 μmol , 59 %) weißer Feststoff

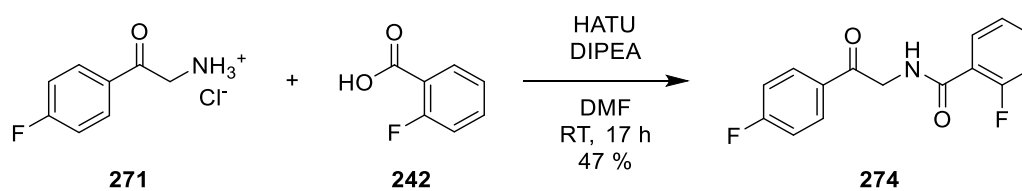
HPLC: 57.8 % B, Reinheit: 95.7 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{FNO}_2$ 257.09 (M), gef. 258.13 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{FNNaO}_2$ 280.0744, gef. 280.0747

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.84 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.16 – 8.11 (m, 2H), 7.92 – 7.88 (m, 2H), 7.58 – 7.54 (m, 1H), 7.52 – 7.48 (m, 2H), 7.42 – 7.37 (m, 2H), 4.77 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 193.96, 166.49, 165.13 (d, *J* = 252.1 Hz), 133.88, 131.84 (d, *J* = 2.9 Hz), 131.34, 130.85 (d, *J* = 9.5 Hz), 128.31, 127.20, 115.82 (d, *J* = 21.9 Hz), 46.35.

2-Fluor-N-(2-(4-fluorphenyl)-2-oxoethyl)benzamid (274)

2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethan-1-ammoniumchlorid (**271**, 88.0 mg, 464 μmol , 1.10 eq) wurde in 7 mL DMF gelöst. Zu dem Ansatz wurden 2-Fluorbenzoesäure (**242**, 59.1 mg, 422 μmol , 1.00 eq), HATU (176 mg, 464 μmol , 1.10 eq) und DIPEA (237 μL , 1.39 mmol, 3.30 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 17 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (3:1 CH:EA).

Ausbeute: 55 mg (200 μmol , 47 %) weißer Feststoff

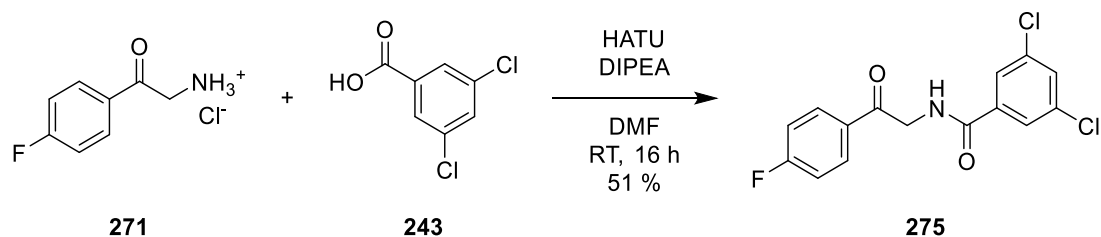
HPLC: 62.7 % B, Reinheit: 95.9 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{F}_2\text{NO}_2$ 275.08 (M), gef. 276.08 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{F}_2\text{NNaO}_2$ 298.0650, gef. 298.0655

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.59 – 8.52 (m, 1H), 8.16 – 8.10 (m, 2H), 7.73 (td, *J* = 7.6, 1.8 Hz, 1H), 7.60 – 7.54 (m, 1H), 7.42 – 7.37 (m, 2H), 7.35 – 7.30 (m, 2H), 4.80 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 193.43, 165.17 (d, *J* = 252.2 Hz), 163.68, 159.40 (d, *J* = 249.1 Hz), 132.84 (d, *J* = 8.7 Hz), 131.68 (d, *J* = 2.9 Hz), 130.88 (d, *J* = 9.6 Hz), 130.35 (d, *J* = 2.9 Hz), 124.54 (d, *J* = 3.4 Hz), 122.89 (d, *J* = 13.8 Hz), 116.18 (d, *J* = 22.7 Hz), 115.83 (d, *J* = 21.9 Hz), 46.52.

3,5-Dichlor-N-(2-(4-fluorphenyl)-2-oxoethyl)benzamid (275)

2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethan-1-ammoniumchlorid (**271**, 88.0 mg, 464 μmol , 1.10 eq) wurde in 7 mL DMF gelöst und mit 3,5-Dichlorbenzoesäure (**243**, 80.6 mg, 422 μmol , 1.00 eq), HATU (176 mg, 464 μmol , 1.10 eq) sowie DIPEA (237 μL , 1.39 mmol, 3.30 eq) versetzt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 16 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (2:1 CH:EA).

Ausbeute: 70 mg (215 μmol , 51 %) gelber Feststoff

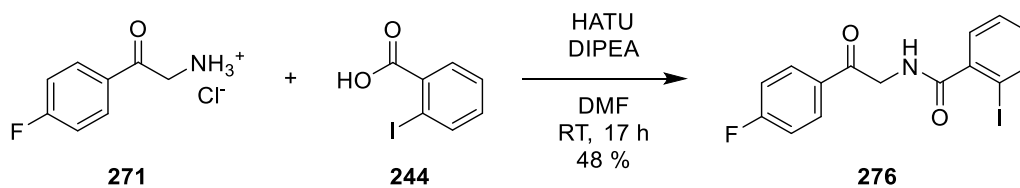
HPLC: 72.4 % B, Reinheit: 96.3 %

MS (ESI⁺): m/z ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{FNO}_2$ 325.01 (M), gef. 326.09 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): m/z ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{FNNaO}_2$ 347.9965, gef. 347.9968

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 9.12 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 8.15 – 8.10 (m, 2H), 7.92 (d, J = 1.9 Hz, 2H), 7.84 (t, J = 1.9 Hz, 1H), 7.42 – 7.37 (m, 2H), 4.80 (d, J = 5.7 Hz, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 193.42, 165.20 (d, J = 252.2 Hz), 163.87, 137.01, 134.35, 131.67 (d, J = 2.9 Hz), 130.91 (d, J = 9.6 Hz), 130.82, 126.11, 115.85 (d, J = 21.9 Hz), 46.44.

2-Iod-N-(2-(4-fluorphenyl)-2-oxoethyl)benzamid (276)

2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethan-1-ammoniumchlorid (**271**, 88.0 mg, 464 μmol , 1.10 eq) wurde in 7 mL DMF gelöst. Zu dem Ansatz wurden 2-Iodbenzoesäure (**244**, 105 mg, 422 μmol , 1.00 eq), HATU (176 mg, 464 μmol , 1.10 eq) und DIPEA (237 μL , 1.39 mmol, 3.30 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 17 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 55 mg (201 μmol , 48 %) weißer Feststoff

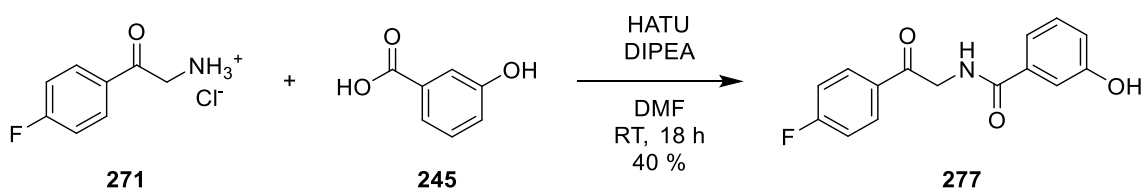
HPLC: 63.1 % B, Reinheit: 99.9 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{FINO}_2$ 382.98 (M), gef. 383.95 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{FINNaO}_2$ 405.9711, gef. 405.9711

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.73 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.16 – 8.11 (m, 2H), 7.90 (ddd, *J* = 7.9, 1.1, 0.3 Hz, 1H), 7.49 (td, *J* = 7.4, 1.1 Hz, 1H), 7.44 – 7.42 (m, 1H), 7.41 – 7.37 (m, 2H), 7.20 (ddd, *J* = 7.9, 7.3, 1.8 Hz, 1H), 4.74 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 193.61, 169.07, 165.16 (d, *J* = 252.1 Hz), 142.18, 139.28, 131.72 (d, *J* = 3.0 Hz), 130.96, 130.93 (d, *J* = 9.5 Hz), 128.32, 127.94, 115.82 (d, *J* = 22.0 Hz), 93.28, 46.16.

***N*-2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethyl)-3-hydroxybenzamid (277)**

2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethan-1-ammoniumchlorid (**271**, 75.5 mg, 398 μ mol, 1.10 eq) wurde in 5 mL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden 3-Hydroxybenzoesäure (**245**, 50.0 mg, 362 μ mol, 1.00 eq), HATU (151 mg, 398 μ mol, 1.10 eq) und DIPEA (203 μ L, 1.19 mmol, 3.30 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 18 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 40 mg (146 μ mol, 40 %) weißer Feststoff

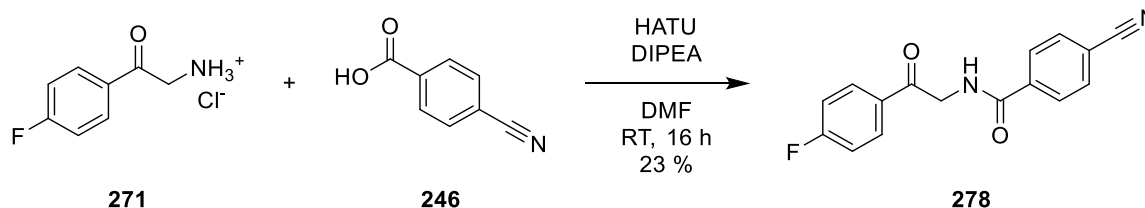
HPLC: 50.0 % B, Reinheit: 99.9 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₂FNO₃ 273.08 (M), gef. 274.07 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₂FNNaO₃ 296.0693, gef. 296.0695

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 9.64 (s, 1H), 8.71 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.16 – 8.09 (m, 2H), 7.43 – 7.35 (m, 2H), 7.33 – 7.24 (m, 3H), 6.94 (ddd, *J* = 7.8, 2.5, 1.2 Hz, 1H), 4.73 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 193.99, 166.55, 165.13 (d, *J* = 252.0 Hz), 157.32, 135.39, 131.85 (d, *J* = 2.8 Hz), 130.84 (d, *J* = 9.5 Hz), 129.31, 118.25, 117.69, 115.81 (d, *J* = 21.8 Hz), 114.25, 46.35.

4-Cyano-N-(2-(4-fluorphenyl)-2-oxoethyl)benzamid (278)

2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethan-1-ammoniumchlorid (**271**, 88.0 mg, 464 μmol , 1.10 eq) wurde in 7 mL DMF gelöst. Zu dem Ansatz wurden 4-Cyanobenzoesäure (**246**, 62.1 mg, 422 μmol , 1.00 eq), HATU (176 mg, 464 μmol , 1.10 eq) und DIPEA (237 μL , 1.39 mmol, 3.30 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 16 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 27 mg (95.7 μmol , 23 %) weißer Feststoff

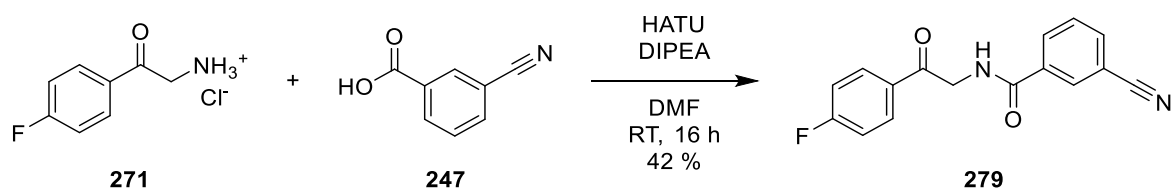
HPLC: 57.0 % B, Reinheit: 99.9 %

MS (ESI⁺): m/z ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{FN}_2\text{O}_2$ 282.08 (M), gef. 283.02 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): m/z ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{FN}_2\text{NaO}_2$ 305.0697, gef. 305.0701

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 9.13 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 8.16 – 8.11 (m, 2H), 8.07 – 8.04 (m, 2H), 8.01 – 7.98 (m, 2H), 7.42 – 7.37 (m, 2H), 4.81 (d, J = 5.7 Hz, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 193.55, 165.20, 165.19 (d, J = 252.1 Hz), 137.81, 132.49, 131.71 (d, J = 2.9 Hz), 130.90 (d, J = 9.5 Hz), 128.08, 118.25, 115.85 (d, J = 22.0 Hz), 113.79, 46.44.

3-Cyano-N-(2-(4-fluorphenyl)-2-oxoethyl)benzamid (279)

2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethan-1-ammoniumchlorid (**271**, 88.0 mg, 464 μmol , 1.10 eq) wurde in 7 mL DMF gelöst. Zu dem Ansatz wurden 3-Cyanobenzoesäure (**247**, 62.1 mg, 422 μmol , 1.00 eq), HATU (176 mg, 464 μmol , 1.10 eq) und DIPEA (237 μL , 1.39 mmol, 3.30 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 16 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (2:1 CH:EA).

Ausbeute: 50 mg (177 μmol , 42 %) weißer Feststoff

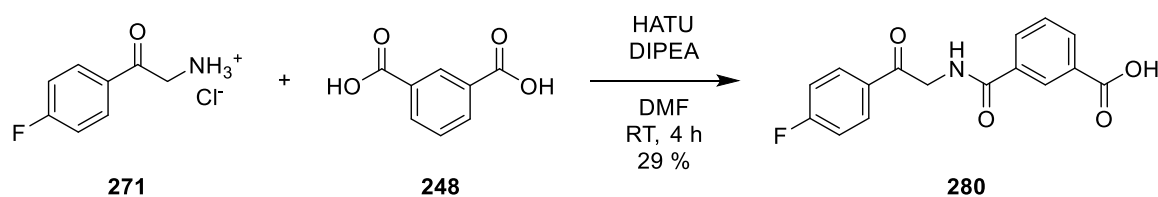
HPLC: 57.2 % B, Reinheit: 95.5 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{FN}_2\text{O}_2$ 282.08 (M), gef. 283.08 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{FN}_2\text{NaO}_2$ 305.0697, gef. 305.0702

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 9.10 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 8.32 (t, *J* = 1.4 Hz, 1H), 8.21 (dt, *J* = 7.9, 1.2 Hz, 1H), 8.15 – 8.12 (m, 2H), 8.04 (dt, *J* = 7.7, 1.3 Hz, 1H), 7.73 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.43 – 7.37 (m, 2H), 4.81 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 193.55, 165.19 (d, *J* = 252.3 Hz), 164.75, 134.84, 132.00, 131.71 (d, *J* = 2.9 Hz), 130.90 (d, *J* = 9.5 Hz), 130.88, 129.84, 119.41, 118.22, 115.85 (d, *J* = 22.0 Hz), 111.58, 46.42.

3-((2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethyl)carbamoyl)benzoesäure (280)

2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethan-1-ammoniumchlorid (**271**, 50.2 mg, 265 μmol , 1.10 eq) wurde in 5 mL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden Isophthalsäure (**248**, 40.0 mg, 241 μmol , 1.00 eq), HATU (101 mg, 265 μmol , 1.10 eq) und DIPEA (135 μL , 795 μmol , 3.30 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 4 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 21 mg (69.7 μmol , 29 %) weißer Feststoff

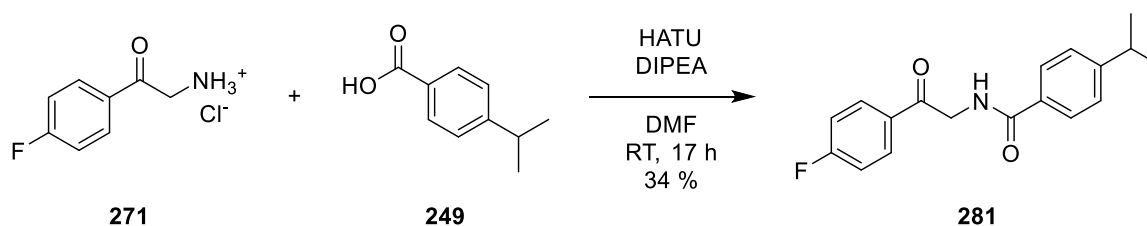
HPLC: 50.4 % B, Reinheit: 98.9 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{FNO}_4$ 301.08 (M), gef. 302.13 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{FNO}_4$ 302.0823, gef. 302.0822

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 13.19 (s, 1H), 9.06 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.49 (t, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.16 – 8.09 (m, 4H), 7.64 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.42 – 7.36 (m, 2H), 4.79 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 193.80, 166.79, 165.80, 165.17 (d, *J* = 252.1 Hz), 134.27, 132.00, 131.80 (d, *J* = 2.9 Hz), 131.51, 131.03, 130.89 (d, *J* = 9.5 Hz), 128.82, 128.09, 115.85 (d, *J* = 21.9 Hz), 46.42.

***N*-2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethyl-4-isopropylbenzamid (281)**

2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethan-1-ammoniumchlorid (**271**, 88.0 mg, 464 μmol , 1.10 eq) wurde in 7 mL DMF gelöst. Zu dem Ansatz wurden 4-Isopropylbenzoesäure (**249**, 69.3 mg, 422 μmol , 1.00 eq), HATU (176 mg, 464 μmol , 1.10 eq) und DIPEA (237 μL , 1.39 mmol, 3.30 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 17 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 43 mg (144 μmol , 34 %) weißer Feststoff

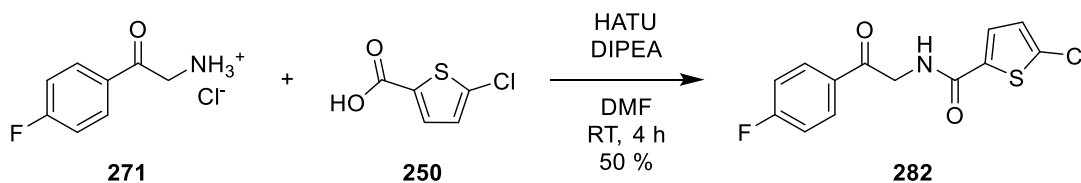
HPLC: 71.1 % B, Reinheit: 99.9 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{FNO}_2$ 299.13 (M), gef. 300.16 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{FNNaO}_2$ 322.1214, gef. 322.1219

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 8.75 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 8.16 – 8.10 (m, 2H), 7.83 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.41 – 7.34 (m, 4H), 4.75 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.95 (hept, *J* = 6.8 Hz, 1H), 1.23 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 194.06, 166.40, 165.12 (d, *J* = 252.1 Hz), 151.96, 131.86 (d, *J* = 2.7 Hz), 131.55, 130.84 (d, *J* = 9.5 Hz), 127.34, 126.20, 115.80 (d, *J* = 22.0 Hz), 46.32, 33.30, 23.57.

5-Chlor-N-(2-(4-fluorphenyl)-2-oxoethyl)thiophen-2-carboxamid (282)

2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethan-1-ammoniumchlorid (**271**, 51.3 mg, 271 μmol , 1.10 eq) wurde in 5 mL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden 5-Chlorthiophen-2-carbonsäure (**250**, 40.0 mg, 246 μmol , 1.00 eq), HATU (103 mg, 271 μmol , 1.10 eq) und DIPEA (142 μL , 812 μmol , 3.30 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 4 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (3:1 CH:EA).

Ausbeute: 37 mg (124 μmol , 50 %) gelber Feststoff

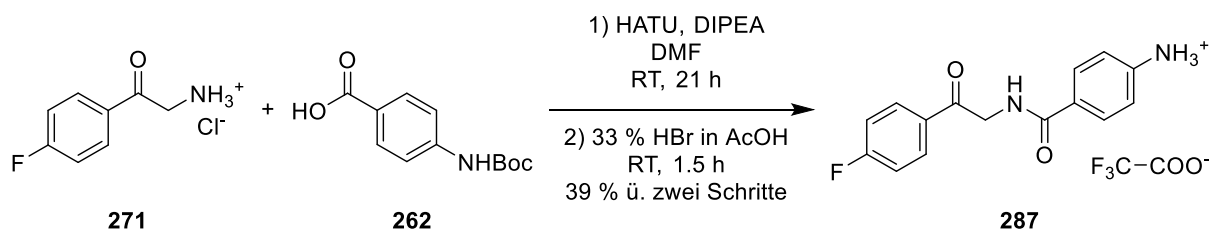
HPLC: 65.1 % B, Reinheit: 95.2 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₃H₉ClFNO₂S 297.00 (M), gef. 298.00 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₃H₉ClFNNaO₂S 319.9919, gef. 319.9917

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 8.97 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.14 – 8.09 (m, 2H), 7.73 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 7.41 – 7.37 (m, 2H), 7.22 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 4.75 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 193.61, 165.20 (d, *J* = 252.1 Hz), 160.49, 138.42, 133.13, 131.67 (d, *J* = 2.9 Hz), 130.90 (d, *J* = 9.6 Hz), 128.39, 128.13, 115.86 (d, *J* = 22.0 Hz), 46.10.

4-((2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethyl)carbamoyl)benzenammonium-2,2,2-trifluoacetat (**287**)

2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethan-1-ammoniumchlorid (**271**, 79.1 mg, 417 μmol , 1.10 eq) wurde in 5 mL DMF gelöst und mit 4-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)benzoesäure (**262**, 90.0 mg, 379 μmol , 1.00 eq), HATU (159 mg, 417 μmol , 1.10 eq) sowie DIPEA (213 μL , 1.25 mmol, 3.30 eq) versetzt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 21 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

Das erhaltene Rohprodukt wurde in 2.5 mL 33 % HBr in AcOH (*w/w*) gelöst. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 1.5 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Lösung in kalten Et₂O gegeben und der ausgefallene Feststoff abzentrifugiert. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 57 mg (148 μmol , 39 %) beiger Feststoff

HPLC: 39.8 % B, Reinheit: 99.9 %

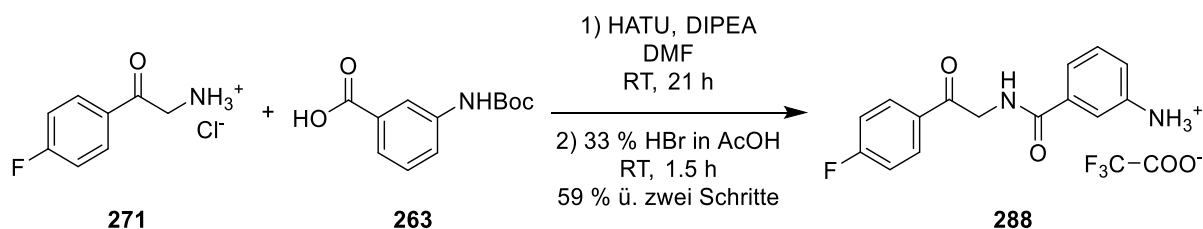
MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₃FN₂O₂ 272.10 (M), gef. 273.09 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₄FN₂O₂ 273.1034, gef. 273.1034

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.36 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.15 – 8.07 (m, 2H), 7.64 – 7.60 (m, 2H), 7.40 – 7.35 (m, 2H), 6.62 – 6.56 (m, 2H), 5.57 (s, 3H), 4.68 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 194.54, 166.41, 165.06 (d, *J* = 251.9 Hz), 151.23, 131.98 (d, *J* = 2.9 Hz), 130.79 (d, *J* = 9.5 Hz), 128.79, 120.98, 115.76 (d, *J* = 22.0 Hz), 112.85, 46.23.

Die TFA-Signale gehen im Rauschen unter.

3-((2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethyl)carbamoyl)benzenammonium-2,2,2-trifluoracetat (288)

2-(4-Fluorphenyl)-2-oxoethan-1-ammoniumchlorid (**271**, 79.1 mg, 417 μmol , 1.10 eq) wurde in 5 mL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden 3-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)benzoesäure (**263**, 90.0 mg, 379 μmol , 1.00 eq), HATU (159 mg, 417 μmol , 1.10 eq) und DIPEA (213 μL , 1.25 mmol, 3.30 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 21 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

Das erhaltene Rohprodukt wurde in 2.5 mL 33 % HBr in AcOH (*w/w*) gelöst. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 1.5 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Lösung in kalten Et₂O gegeben und der ausgefallene Feststoff abzentrifugiert. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 86 mg (223 μmol , 59 %) gelber Feststoff

HPLC: 36.9 % B, Reinheit: 99.9 %

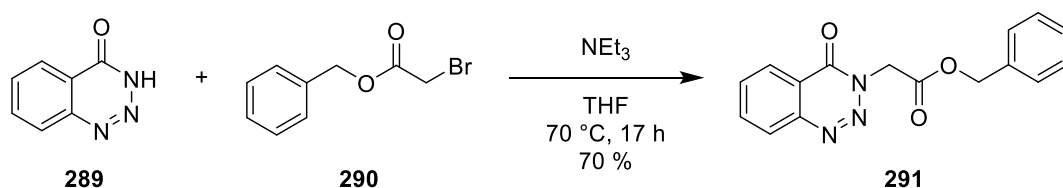
MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₃FN₂O₂ 272.10 (M), gef. 273.10 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₄FN₂O₂ 273.1034, gef. 273.1025

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 8.78 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.16 – 8.10 (m, 2H), 7.48 – 7.34 (m, 5H), 7.11 (dd, *J* = 7.6, 1.7 Hz, 1H), 4.75 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H).

Das NH₃⁺-Signal liegt unter den Aromatischen-Signalen im Bereich von 7.4 – 8.7 ppm.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 193.91, 166.31, 165.16 (d, *J* = 252.0 Hz), 158.24 (q, *J* = 35.9 Hz), 140.80, 135.12, 131.82 (d, *J* = 2.9 Hz), 130.86 (d, *J* = 9.5 Hz), 129.29, 121.11, 120.13, 117.44, 115.83 (d, *J* = 22.0 Hz), 115.77 (q, *J* = 292.6 Hz), 46.39.

Benzyl 2-(4-oxobenzo[1,2,3]triazin-3-yl)acetat (291)

Benzo[1,2,3]triazin-4-on (**289**, 1.00 g, 6.80 mmol, 1.00 eq) wurde in 30 mL THF gelöst. Zu der Lösung wurden Benzyl-2-bromacetat (**290**, 2.34 g, 10.2 mmol, 1.50 eq) und NEt_3 (1.42 mL, 10.2 mmol, 1.50 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei 70 °C für 17 Stunden gerührt. Anschließend wurde die entstandene Suspension filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Zu dem Rückstand wurde 1 M Salzsäure gegeben und das Produkt aus der wässrigen Phase mit DCM extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde mit MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (5:1 CH:EA).

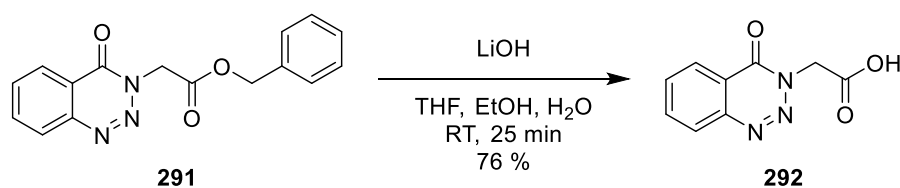
Ausbeute: 1.41 g (4.77 mmol, 70 %) gelber Feststoff

HPLC: 67.1 % B, Reinheit: 98.4 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$ 295.10 (M), gef. 296.08 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl_3 -d) δ [ppm] = 8.40 – 8.35 (m, 1H), 8.22 – 8.16 (m, 1H), 8.01 – 7.96 (m, 1H), 7.86 – 7.81 (m, 1H), 7.40 – 7.32 (m, 5H), 5.25 (s, 4H).

¹³C-NMR: (126 MHz, CDCl_3 -d) δ [ppm] = 167.16, 155.71, 144.48, 135.32, 135.04, 132.84, 128.80, 128.75, 128.72, 128.53, 125.34, 119.89, 67.84, 50.96.

2-(4-Oxobenzo[1,2,3]triazin-3-yl)essigsäure (**292**)

Benzyl-2-(4-oxobenzo[1,2,3]triazin-3-yl)acetat (**291**, 600 mg, 2.03 mmol, 1.00 eq) wurde in 28 mL THF und 12 mL EtOH gelöst und mit einer Lösung aus LiOH (243 mg, 10.2 mmol, 5.00 eq) in 20 mL H₂O versetzt. Die vereinten Lösungen wurden bei Raumtemperatur für 25 Minuten gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit 1 M Salzsäure auf einen pH-Wert ≤ 1 eingestellt. Danach wurde THF und EtOH *in vacuo* entfernt und das Produkt mit EA aus der wässrigen Phase extrahiert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

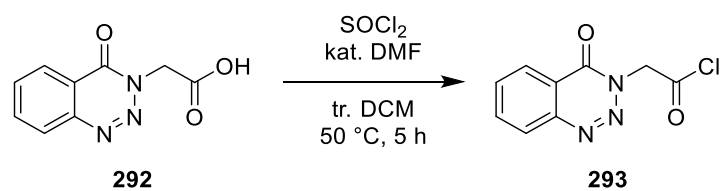
Ausbeute: 316 mg (1.54 mmol, 76 %) weißer Feststoff

HPLC: 36.7 % B, Reinheit: 99.9 %

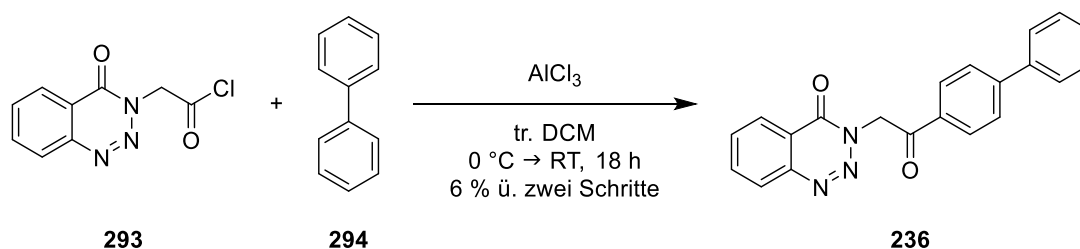
MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₉H₇N₃O₃ 205.05 (M), gef. 206.03 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 13.33 (s, 1H), 8.29 – 8.24 (m, 2H), 8.16 – 8.11 (m, 1H), 8.00 – 7.95 (m, 1H), 5.14 (s, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 168.74, 154.70, 143.71, 135.74, 133.25, 128.18, 124.52, 119.06, 50.78.

2-(4-Oxobenzo[1,2,3]triazin-3-yl)acetylchlorid (293)

2-(4-Oxobenzo[1,2,3]triazin-3-yl)essigsäure (**292**, 50.0 mg, 244 μ mol, 1.00 eq) wurde unter Argon-Atmosphäre in 4 mL tr. DCM gelöst und mit Thionylchlorid (53 μ L, 731 μ mol, 3.00 eq) und zwei Tropfen DMF versetzt. Die Lösung wurde bei 50 °C für 5 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der violette Feststoff (55 mg) ohne weitere Reinigung zur Synthese der Verbindung **236** verwendet.

3-(2-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)-2-oxoethyl)benzo[1,2,3]triazin-4-on (236)

1,1'-Biphenyl (**294**, 75.1 mg, 487 μmol , 1.00 eq) und AlCl_3 (260 mg, 1.95 mmol, 4.00 eq) wurden unter Argon-Atmosphäre in 5 mL tr. DCM gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit 2-(4-Oxobenzo[1,2,3]triazin-3-yl)acetylchlorid (**293**, 55 mg des Rohprodukts) versetzt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 18 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Lösung in Eiswasser gegeben und das Produkt aus der wässrigen Phase mit DCM extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde mit ges. NaHCO_3 -Lösung gewaschen und mit MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

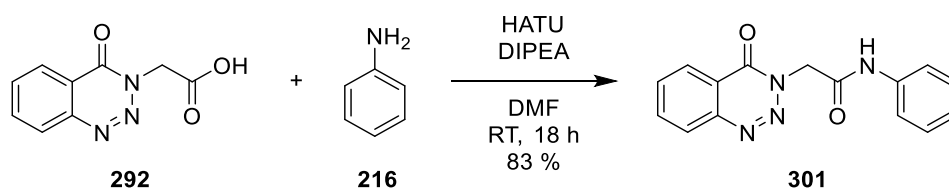
Ausbeute: 5 mg (15 μmol , 6 % über zwei Schritte) brauner Feststoff

HPLC: 77.3 % B, Reinheit: 98.5 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$ 341.12 (M), gef. 342.30 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl_3 -d) δ [ppm] = 8.39 (ddd, $J = 7.9, 1.4, 0.6$ Hz, 1H), 8.23 (ddd, $J = 8.2, 1.2, 0.6$ Hz, 1H), 8f.16 – 8.12 (m, 2H), 8.02 – 7.98 (m, 1H), 7.87 – 7.82 (m, 1H), 7.79 – 7.75 (m, 2H), 7.68 – 7.64 (m, 2H), 7.52 – 7.47 (m, 2H), 7.46 – 7.40 (m, 1H), 5.95 (s, 2H).

¹³C-NMR: Aufgrund der geringen Ausbeute konnte keine ¹³C-NMR-Analytik erfolgen.

2-(4-Oxobenzo[1,2,3]triazin-3-yl)-N-phenylacetamid (301)

2-(4-Oxobenzo[1,2,3]triazin-3-yl)essigsäure (**292**, 70.0 mg, 341 μmol , 1.00 eq) wurde in 5 mL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden Anilin (**216**, 34 μL , 375 μmol , 1.10 eq), HATU (143 mg, 375 μmol , 1.10 eq) und DIPEA (191 μL , 1.13 mmol, 3.30 eq) gegeben und der Ansatz für 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (1:1 CH:EA).

Ausbeute: 79 mg (282 μmol , 83 %) beiger Feststoff

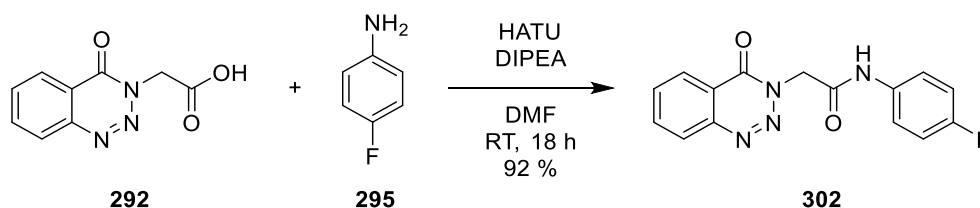
HPLC: 55.0 % B, Reinheit: 99.9 %

MS (ESI⁺): m/z ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2$ 280.10 (M), gef. 281.09 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): m/z ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{NaO}_2$ 303.0852, gef. 303.0856

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 10.44 (s, 1H), 8.29 – 8.25 (m, 2H), 8.16 – 8.12 (m, 1H), 7.99 – 7.95 (m, 1H), 7.60 – 7.57 (m, 2H), 7.35 – 7.30 (m, 2H), 7.10 – 7.06 (m, 1H), 5.27 (s, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 164.80, 154.87, 143.77, 138.49, 135.62, 133.10, 128.79, 128.09, 124.50, 123.58, 119.20, 119.18, 52.46.

***N*-(4-Fluorphenyl)-2-(4-oxobenzo[1,2,3]triazin-3-yl)acetamid (302)**

2-(4-Oxobenzo[1,2,3]triazin-3-yl)essigsäure (**292**, 60.0 mg, 292 μmol , 1.00 eq) wurde in 7 mL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden 4-Fluoranilin (**295**, 35.7 mg, 322 μmol , 1.10 eq), HATU (122 mg, 322 μmol , 1.10 eq) und DIPEA (164 μL , 965 μmol , 3.30 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 18 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (1:1 CH:EA).

Ausbeute: 80 mg (268 μmol , 92 %) gelber Feststoff

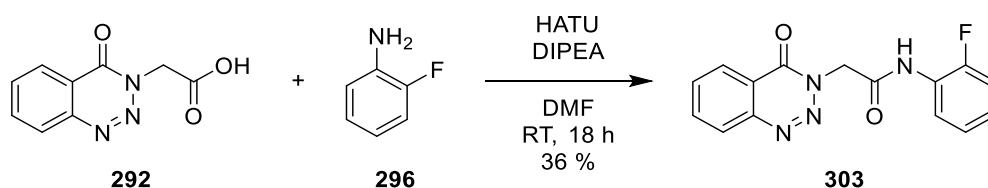
HPLC: 56.8 % B, Reinheit: 99.9 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{FN}_4\text{O}_2$ 298.09 (M), gef. 298.94 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{FN}_4\text{NaO}_2$ 321.0758, gef. 321.0762

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.50 (s, 1H), 8.29 – 8.25 (m, 2H), 8.16 – 8.11 (m, 1H), 7.99 – 7.95 (m, 1H), 7.62 – 7.57 (m, 2H), 7.19 – 7.14 (m, 2H), 5.25 (s, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 165.36, 158.74 (d, *J* = 240.1 Hz), 155.47, 144.36, 136.22, 135.46 (d, *J* = 2.6 Hz), 133.71, 128.69, 125.10, 121.59 (d, *J* = 7.9 Hz), 119.79, 115.98 (d, *J* = 22.3 Hz), 53.01.

***N*-(2-Fluorphenyl)-2-(4-oxobenzo[1,2,3]triazin-3-yl)acetamid (303)**

2-(4-Oxobenzo[1,2,3]triazin-3-yl)essigsäure (**292**, 60.0 mg, 292 μmol , 1.00 eq) wurde in 7 mL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden 2-Fluoranilin (**296**, 35.7 mg, 322 μmol , 1.10 eq), HATU (122 mg, 322 μmol , 1.10 eq) und DIPEA (164 μL , 965 μmol , 3.30 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 18 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (1:1 CH:EA).

Ausbeute: 31 mg (104 μmol , 36 %) gelber Feststoff

HPLC: 55.7 % B, Reinheit: 97.5 %

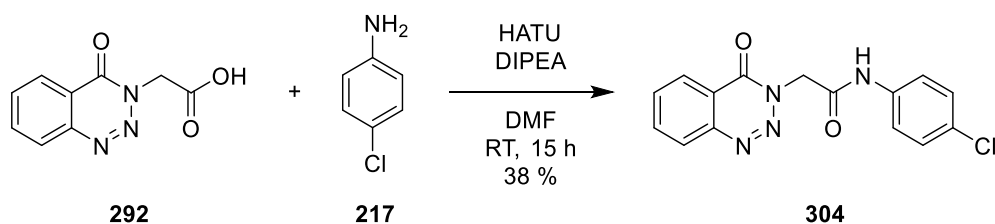
MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₁FN₄O₂ 298.09 (M), gef. 298.98 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₁FN₄NaO₂ 321.0758, gef. 321.0762

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.30 (s, 1H), 8.29 – 8.24 (m, 2H), 8.16 – 8.11 (m, 1H), 8.00 – 7.95 (m, 1H), 7.90 – 7.85 (m, 1H), 7.32 – 7.26 (m, 1H), 7.20 – 7.14 (m, 2H), 5.34 (s, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 165.42, 154.85, 153.47 (d, *J* = 245.5 Hz), 143.77, 135.62, 133.11, 128.10, 125.54 (d, *J* = 11.6 Hz), 125.51 (d, *J* = 4.2 Hz), 124.52, 124.39 (d, *J* = 3.6 Hz), 123.87, 119.21, 115.54 (d, *J* = 19.3 Hz), 52.23.

Die ⁴J_{C-F} Aufspaltung konnte nicht aufgelöst werden (123.87 ppm, br. Singulett).

***N*-(4-Chlorphenyl)-2-(4-oxobenzo[1,2,3]triazin-3-yl)acetamid (304)**

2-(4-Oxobenzo[1,2,3]triazin-3-yl)essigsäure (**292**, 60.0 mg, 292 μmol , 1.00 eq) wurde in 7 mL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden 4-Chloranilin (**217**, 41.0 mg, 322 μmol , 1.10 eq), HATU (122 mg, 322 μmol , 1.10 eq) und DIPEA (164 μL , 965 μmol , 3.30 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 15 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (1:1 CH:EA).

Ausbeute: 35 mg (111 μmol , 38 %) gelber Feststoff

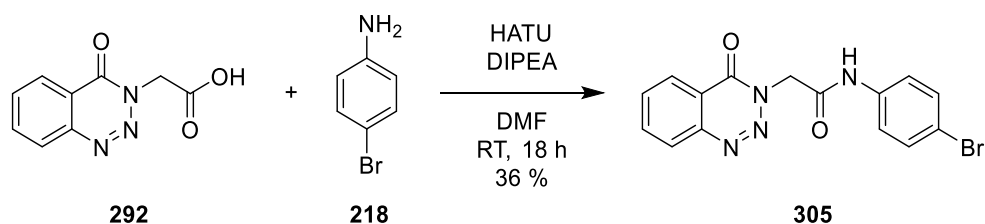
HPLC: 62.6 % B, Reinheit: 99.8 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₁ClN₄O₂ 314.06 (M), gef. 315.05 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₁ClN₄NaO₂ 337.0463, gef. 337.0458

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.59 (s, 1H), 8.29 – 8.25 (m, 2H), 8.16 – 8.12 (m, 1H), 7.99 – 7.96 (m, 1H), 7.66 – 7.56 (m, 2H), 7.40 – 7.37 (m, 2H), 5.27 (s, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 165.02, 154.87, 143.77, 137.43, 135.66, 133.15, 128.73, 128.12, 127.21, 124.51, 120.77, 119.19, 52.50.

***N*-(4-Bromphenyl)-2-(4-oxobenzo[1,2,3]triazin-3-yl)acetamid (305)**

2-(4-Oxobenzo[1,2,3]triazin-3-yl)essigsäure (**292**, 60.0 mg, 292 μmol , 1.00 eq) wurde in 7 mL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden 4-Bromanilin (**218**, 55.3 mg, 322 μmol , 1.10 eq), HATU (122 mg, 322 μmol , 1.10 eq) und DIPEA (164 μL , 965 μmol , 3.30 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 18 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 38 mg (106 μmol , 36 %) weißer Feststoff

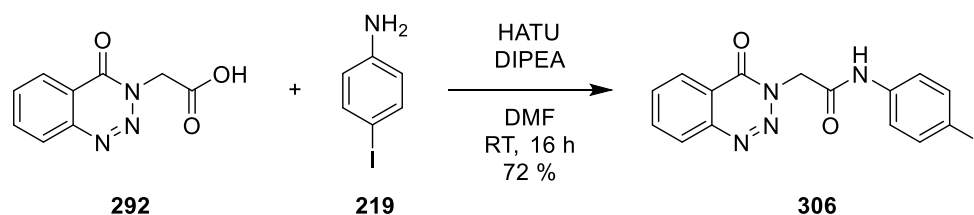
HPLC: 64.2 % B, Reinheit: 99.9 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{BrN}_4\text{O}_2$ 358.01 (M), gef. 359.06 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{BrN}_4\text{NaO}_2$ 380.9958, gef. 380.9961

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.59 (s, 1H), 8.29 – 8.24 (m, 2H), 8.16 – 8.12 (m, 1H), 8.00 – 7.95 (m, 1H), 7.57 – 7.54 (m, 2H), 7.53 – 7.50 (m, 2H), 5.27 (s, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 165.03, 154.86, 143.76, 137.85, 135.65, 133.13, 131.63, 128.11, 124.51, 121.14, 119.18, 115.22, 52.52.

***N*-(4-Iodphenyl)-2-(4-oxobenzo[1,2,3]triazin-3-yl)acetamid (306)**

2-(4-Oxobenzo[1,2,3]triazin-3-yl)essigsäure (**292**, 60.0 mg, 292 μmol , 1.00 eq) wurde in 7 mL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden 4-Iodanilin (**219**, 70.5 mg, 322 μmol , 1.10 eq), HATU (122 mg, 322 μmol , 1.10 eq) und DIPEA (164 μL , 965 μmol , 3.30 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 16 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (1:1 CH:EA).

Ausbeute: 85 mg (209 μmol , 72 %) gelber Feststoff

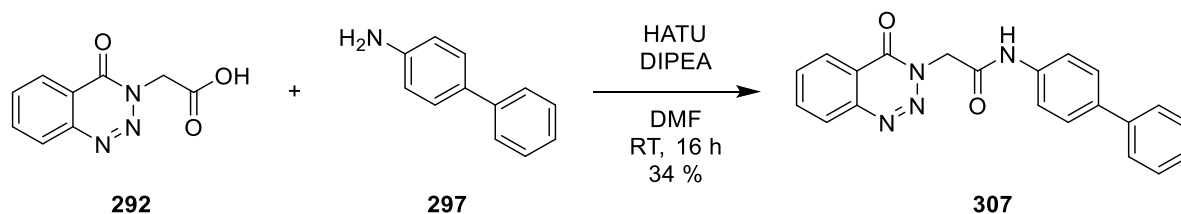
HPLC: 66.5 % B, Reinheit: 95.4 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₁IN₄O₂ 405.99 (M), gef. 407.00 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₁IN₄NaO₂ 428.9819, gef. 428.9814

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 10.55 (s, 1H), 8.28 – 8.25 (m, 2H), 8.16 – 8.12 (m, 1H), 7.99 – 7.95 (m, 1H), 7.68 – 7.65 (m, 2H), 7.44 – 7.41 (m, 2H), 5.26 (s, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 165.02, 154.86, 143.76, 138.31, 137.47, 135.65, 133.14, 128.11, 124.51, 121.39, 119.18, 87.15, 52.55.

***N*-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)-2-(4-oxobenzo[1,2,3]triazin-3-yl)acetamid (307)**

2-(4-Oxobenzo[1,2,3]triazin-3-yl)essigsäure (**292**, 60.0 mg, 292 μmol , 1.00 eq) wurde in 7 mL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden [1,1'-Biphenyl]-4-amin (**297**, 54.4 mg, 322 μmol , 1.10 eq), HATU (122 mg, 322 μmol , 1.10 eq) und DIPEA (164 μL , 965 μmol , 3.30 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 16 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (1:1 CH:EA).

Ausbeute: 35 mg (98 μmol , 34 %) gelber Feststoff

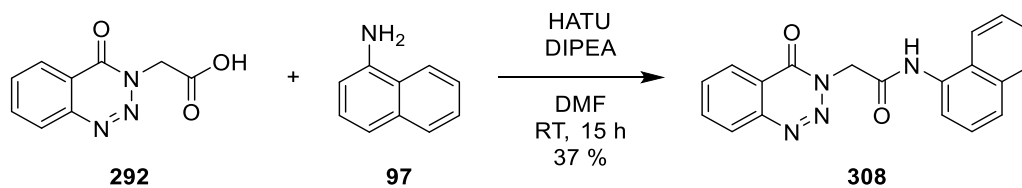
HPLC: 70.0 % B, Reinheit: 96.7 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2$ 356.13 (M), gef. 357.10 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{NaO}_2$ 379.1165, gef. 379.1172

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.56 (s, 1H), 8.31 – 8.26 (m, 2H), 8.17 – 8.12 (m, 1H), 8.00 – 7.96 (m, 1H), 7.70 – 7.63 (m, 6H), 7.46 – 7.42 (m, 2H), 7.35 – 7.31 (m, 1H), 5.30 (s, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 164.87, 154.88, 143.78, 139.52, 137.95, 135.64, 135.26, 133.12, 128.84, 128.11, 127.03, 126.98, 126.21, 124.52, 119.57, 119.21, 52.51.

***N*-(Naphthalen-1-yl)-2-(4-oxobenzotriazin-3-yl)acetamid (308)**

2-(4-Oxobenzotriazin-3-yl)essigsäure (**292**, 60.0 mg, 292 μmol , 1.00 eq) wurde in 7 mL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden 1-Naphthylamin (**97**, 46.1 mg, 322 μmol , 1.10 eq), HATU (122 mg, 322 μmol , 1.10 eq) und DIPEA (164 μL , 965 μmol , 3.30 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 15 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (1:1 CH:EA).

Ausbeute: 36 mg (109 μmol , 37 %) rosa Feststoff

HPLC: 60.4 % B, Reinheit: 95.1 %

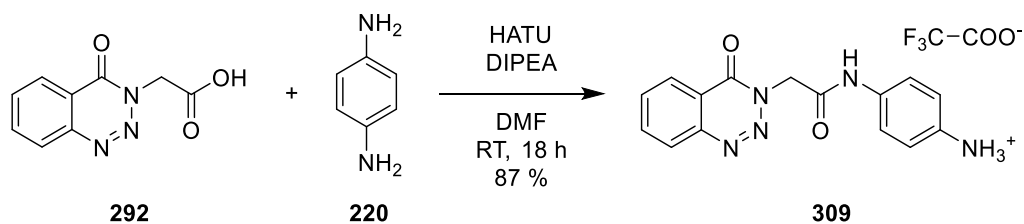
MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₉H₁₄N₄O₂ 330.11 (M), gef. 331.25 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₉H₁₄N₄NaO₂ 353.1009, gef. 353.1008

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 10.41 (s, 1H), 8.31 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.27 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.18 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.14 (td, *J* = 8.3, 7.8, 1.4 Hz, 1H), 8.01 – 7.93 (m, 2H), 7.80 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.63 – 7.54 (m, 2H), 7.50 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.45 (s, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 165.81, 155.00, 143.83, 135.58, 133.68, 133.07, 132.91, 128.09, 127.84, 126.09, 125.94, 125.71, 125.51, 124.53, 122.75, 121.84, 119.41, 119.33, 52.46.

4-(2-(4-Oxobenzo[1,2,3]triazin-3-yl)acetamido)benzolammonium-2,2,2-trifluoracetat (309)



2-(4-Oxobenzo[1,2,3]triazin-3-yl)essigsäure (**292**, 70.0 mg, 341 μmol , 1.00 eq) wurde in 5 mL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden 1,4-Diaminobenzen (**220**, 40.6 mg, 375 μmol , 1.10 eq), HATU (143 mg, 375 μmol , 1.10 eq) und DIPEA (255 μL , 1.50 mmol, 4.40 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 18 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 122 mg (298 μmol , 87 %) gelber Feststoff

HPLC: 33.0 % B, Reinheit: 99.9 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₃N₅O₂ 295.11 (M), gef. 296.11 (M+H)⁺

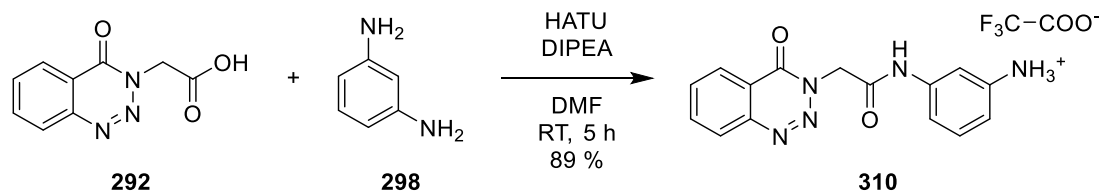
HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₄N₅O₂ 296.1142, gef. 296.1145

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 10.54 (s, 1H), 8.29 – 8.25 (m, 2H), 8.16 – 8.11 (m, 1H), 7.99 – 7.95 (m, 1H), 7.59 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.14 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 5.26 (s, 2H).

Das NH₃⁺-Signal geht im Rauschen unter.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 164.82, 158.23 (q, *J* = 33.0 Hz), 154.89, 143.78, 135.76, 135.65, 133.13, 131.19, 128.11, 124.50, 121.34, 120.39, 119.21, 52.44.

Das CF₃-COOH-Signal geht im Rauschen unter.

3-(2-(4-Oxobenzo[1,2,3]triazin-3-yl)acetamido)benzolammonium-2,2,2-trifluoracetat (310)


2-(4-Oxobenzo[1,2,3]triazin-3-yl)essigsäure (**292**, 60.0 mg, 292 μmol , 1.00 eq) wurde in 7 mL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden 1,3-Diaminobenzen (**298**, 34.8 mg, 322 μmol , 1.10 eq), HATU (122 mg, 322 μmol , 1.10 eq) und DIPEA (164 μL , 965 μmol , 3.30 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 5 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 106 mg (260 μmol , 89 %) rosa Feststoff

HPLC: 33.7 % B, Reinheit: 99.9 %

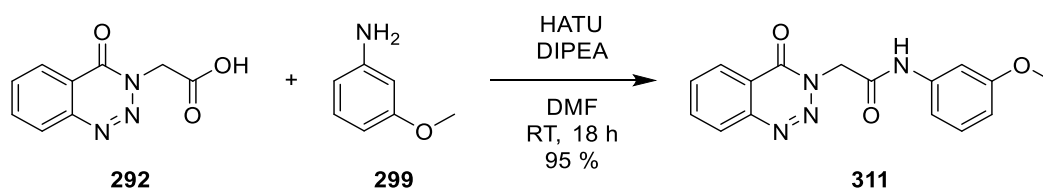
MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_2$ 295.11 (M), gef. 296.11 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{NaO}_2$ 318.0961, gef. 318.0957

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 10.51 (s, 1H), 8.29 – 8.25 (m, 2H), 8.17 – 8.11 (m, 1H), 8.00 – 7.95 (m, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.24 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.17 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.77 – 6.73 (m, 1H), 5.26 (s, 2H).

Das NH_3^+ -Signal geht im Rauschen unter.

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 164.96, 154.88, 143.78, 139.42, 139.19, 135.66, 133.14, 129.74, 128.12, 124.50, 119.20, 114.54, 113.77, 110.03, 52.54.

***N*-(3-Methoxyphenyl)-2-(4-oxobenzo[1,2,3]triazin-3-yl)acetamid (311)**

2-(4-Oxobenzo[1,2,3]triazin-3-yl)essigsäure (**292**, 70.0 mg, 341 μmol , 1.00 eq) wurde in 5 mL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden 3-Methoxyanilin (**299**, 46.2 mg, 375 μmol , 1.10 eq), HATU (143 mg, 375 μmol , 1.10 eq) und DIPEA (191 μL , 1.13 mmol, 3.30 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 18 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (1:1 CH:EA).

Ausbeute: 101 mg (325 μmol , 95 %) beiger Feststoff

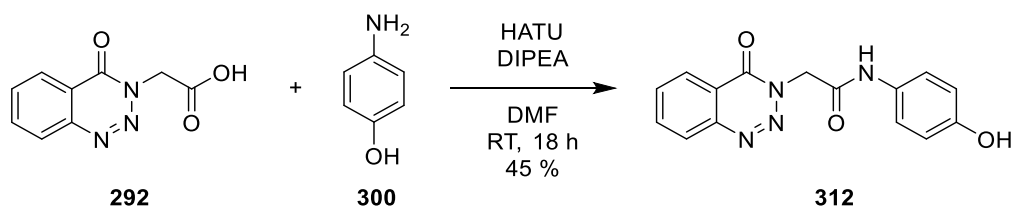
HPLC: 56.4 % B, Reinheit: 99.9 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₆H₁₄N₄O₃ 310.11 (M), gef. 311.07 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₆H₁₄N₄NaO₃ 333.0958, gef. 333.0963

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 10.45 (s, 1H), 8.29 – 8.25 (m, 2H), 8.16 – 8.12 (m, 1H), 8.00 – 7.96 (m, 1H), 7.29 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.23 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.12 – 7.09 (m, 1H), 6.69 – 6.64 (m, 1H), 5.26 (s, 2H), 3.72 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 164.86, 159.53, 154.86, 143.77, 139.67, 135.64, 133.11, 129.60, 128.10, 124.51, 119.19, 111.39, 109.17, 104.90, 54.93, 52.48.

***N*-(4-Hydroxyphenyl)-2-(4-oxobenzotriazin-3-yl)acetamid (312)**

2-(4-Oxobenzotriazin-3-yl)essigsäure (**292**, 70.0 mg, 341 μmol , 1.00 eq) wurde in 5 mL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden 4-Aminophenol (**300**, 41.0 mg, 375 μmol , 1.10 eq), HATU (143 mg, 375 μmol , 1.10 eq) und DIPEA (191 μL , 1.13 mmol, 3.30 eq) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 18 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (1:1.5 CH:EA).

Ausbeute: 46 mg (155 μmol , 45 %) weißer Feststoff

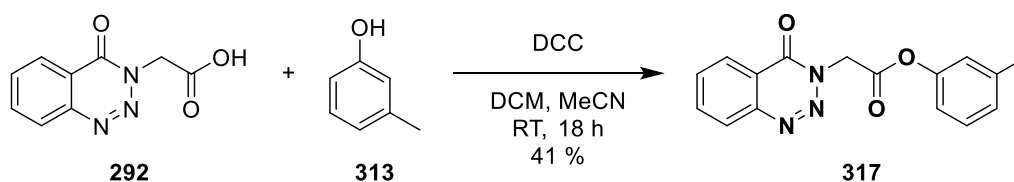
HPLC: 42.8 % B, Reinheit: 99.9 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₂N₄O₃ 296.09 (M), gef. 297.11 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₅H₁₂N₄NaO₃ 319.0802, gef. 319.0803

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 10.17 (s, 1H), 9.21 (s, 1H), 8.30 – 8.23 (m, 2H), 8.16 – 8.11 (m, 1H), 7.99 – 7.94 (m, 1H), 7.38 – 7.33 (m, 2H), 6.73 – 6.68 (m, 2H), 5.20 (s, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 164.06, 154.86, 153.56, 143.78, 135.58, 133.06, 130.12, 128.06, 124.50, 120.97, 119.24, 115.12, 52.32.

3-Methylphenyl-2-(4-oxobenzo[1,2,3]triazin-3-yl)acetate (317)

2-(4-Oxobenzotriazin-3-yl)essigsäure (**292**, 100 mg, 487 μmol , 1.00 eq) wurde in 2 mL DCM gelöst. Zu der Lösung wurden 3-Methylphenol (**313**, 51 μL , 487 μmol , 1.00 eq), DCC (210 mg, 1.02 mmol, 2.10 eq) und 1 mL MeCN gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 18 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Suspension filtriert und zu dem Filtrat H_2O gegeben. Das Produkt wurde aus der wässrigen Phase mit DCM extrahiert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (2:1 CH:EA).

Ausbeute: 59 mg (200 μmol , 41 %) weißer Feststoff

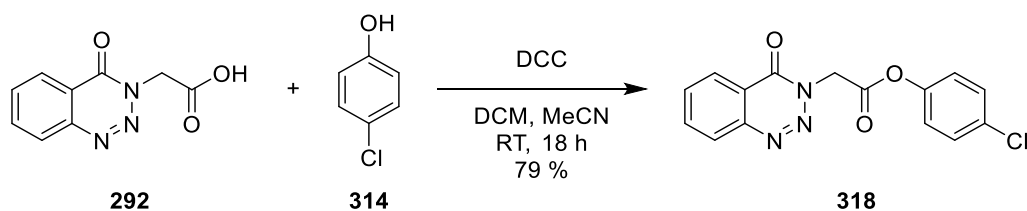
HPLC: 69.4 % B, Reinheit: 99.5 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$ 295.10 (M), gef. 296.10 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{NaO}_3$ 318.0849, gef. 318.0852

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 8.34 – 8.27 (m, 2H), 8.19 – 8.13 (m, 1H), 8.03 – 7.97 (m, 1H), 7.32 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.13 – 7.09 (m, 1H), 7.01 – 6.96 (m, 2H), 5.54 (s, 2H), 2.32 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 166.44, 154.81, 149.95, 143.69, 139.44, 135.94, 133.48, 129.33, 128.33, 126.90, 124.56, 121.77, 118.98, 118.36, 51.09, 20.68.

4-Chlorphenyl-2-(4-oxobenzo[1,2,3]triazin-3-yl)acetat (318)

2-(4-Oxobenzo[1,2,3]triazin-3-yl)essigsäure (**292**, 60.0 mg, 292 μmol , 1.00 eq) wurde in 2 mL DCM gelöst. Zu der Lösung wurden 4-Chlorphenol (**314**, 37 μL , 292 μmol , 1.00 eq), DCC (127 mg, 614 μmol , 2.10 eq) und 1 mL MeCN gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 18 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Suspension filtriert und zu dem Filtrat H_2O gegeben. Das Produkt wurde aus der wässrigen Phase mit DCM extrahiert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (3:1 CH:EA).

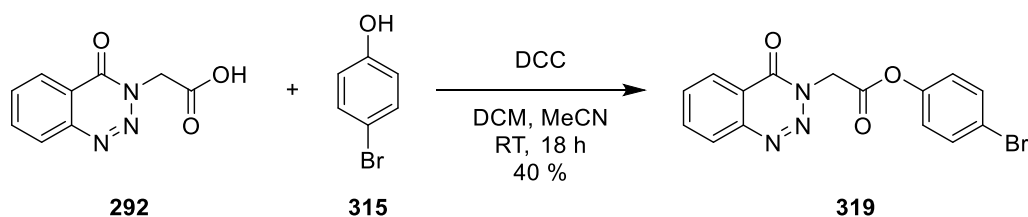
Ausbeute: 73 mg (231 μmol , 79 %) weißer Feststoff

HPLC: 71.0 % B, Reinheit: 96.2 %

MS (ESI⁺): m/z ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{ClN}_3\text{O}_3$ 315.04 (M), gef. 316.05 (M+H)⁺

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 8.33 – 8.27 (m, 2H), 8.19 – 8.14 (m, 1H), 8.03 – 7.97 (m, 1H), 7.53 – 7.49 (m, 2H), 7.27 – 7.23 (m, 2H), 5.56 (s, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 166.34, 154.83, 148.72, 143.68, 135.96, 133.49, 130.43, 129.59, 128.35, 124.56, 123.38, 118.97, 51.09.

4-Bromphenyl-2-(4-oxobenzo[1,2,3]triazin-3-yl)acetat (319)

2-(4-Oxobenzo[1,2,3]triazin-3-yl)essigsäure (**292**, 60.0 mg, 292 μmol , 1.00 eq) wurde in 2 mL DCM gelöst. Zu der Lösung wurden 4-Bromphenol (**315**, 50.6 mg, 292 μmol , 1.00 eq), DCC (127 mg, 614 μmol , 2.10 eq) und 1 mL MeCN gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 18 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Suspension filtriert, das Filtrat mit H_2O versetzt und das Produkt aus der wässrigen Phase mit DCM extrahiert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 42 mg (117 μmol , 40 %) weißer Feststoff

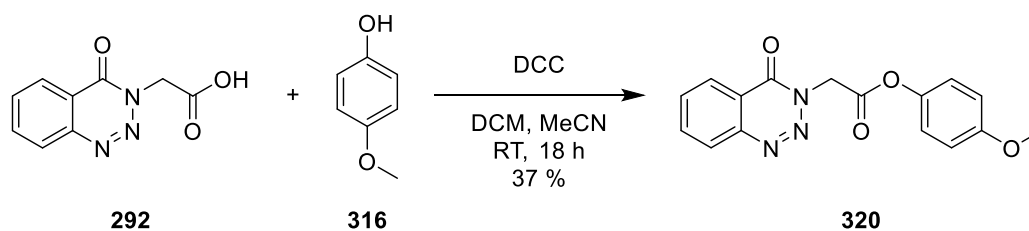
HPLC: 72.2 % B, Reinheit: 99.9 %

MS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{BrN}_3\text{O}_3$ 358.99 (M), gef. 360.01 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{BrN}_3\text{NaO}_3$ 381.9798, gef. 381.9791

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d_6) δ [ppm] = 8.33 – 8.30 (m, 1H), 8.30 – 8.27 (m, 1H), 8.18 – 8.14 (m, 1H), 8.02 – 7.98 (m, 1H), 7.66 – 7.62 (m, 2H), 7.20 – 7.17 (m, 2H), 5.56 (s, 2H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO-d_6) δ [ppm] = 166.28, 154.83, 149.21, 143.68, 135.96, 133.50, 132.55, 128.35, 124.56, 123.78, 118.97, 118.59, 51.10.

4-Methoxyphenyl-2-(4-oxobenzotriazin-3-yl)acetat (320)

2-(4-Oxobenzotriazin-3-yl)essigsäure (**292**, 60.0 mg, 292 μmol , 1.00 eq) wurde in 2 mL DCM gelöst. Zu der Lösung wurden 4-Methoxyphenol (**316**, 36.3 mg, 292 μmol , 1.00 eq), DCC (127 mg, 614 μmol , 2.10 eq) und 1 mL MeCN gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 18 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Suspension filtriert, das Filtrat mit H_2O versetzt und das Produkt aus der wässrigen Phase mit DCM extrahiert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 34 mg (109 μmol , 37 %) weißer Feststoff

HPLC: 64.9 % B, Reinheit: 97.5 %

MS (ESI⁺): m/z ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4$ 311.09 (M), gef. 312.14 (M+H)⁺

HRMS (ESI⁺): m/z ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{NaO}_4$ 334.0798, gef. 334.0798

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 8.33 – 8.26 (m, 2H), 8.18 – 8.14 (m, 1H), 8.02 – 7.97 (m, 1H), 7.13 – 7.09 (m, 2H), 6.99 – 6.96 (m, 2H), 5.53 (s, 2H), 3.75 (s, 3H).

¹³C-NMR: (126 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 166.71, 157.13, 154.81, 143.69, 143.36, 135.93, 133.46, 128.33, 124.56, 122.22, 118.98, 114.55, 55.39, 51.04.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Hauser, A. S.; Attwood, M. M.; Rask-Andersen, M.; Schiöth, H. B.; Gloriam, D. E. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2017**, *16*, 829–842.
- (2) Lander, E. S.; Linton, L. M.; Birren, B.; Nusbaum, C.; Zody, M. C.; Baldwin, J.; Devon, K.; Dewar, K.; Doyle, M.; FitzHugh, W.; *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **2001**, *409*, 860–921.
- (3) Fredriksson, R.; Lagerström, M. C.; Lundin, L.-G.; Schiöth, H. B. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 1256–1272.
- (4) Venkatakrisnan, A. J.; Deupi, X.; Lebon, G.; Tate, C. G.; Schertler, G. F.; Babu, M. M. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* **2013**, *494*, 185–194.
- (5) Erlandson, S. C.; McMahon, C.; Kruse, A. C. Structural Basis for G Protein–Coupled Receptor Signaling. *Annu. Rev. Biophys.* **2018**, *47*, 1–18.
- (6) Müller, C. E.; Schiedel, A. C.; Baqi, Y. Allosteric modulators of rhodopsin-like G protein-coupled receptors: opportunities in drug development. *Pharmacol. Ther.* **2012**, *135*, 292–315.
- (7) Milligan, G.; Shimpukade, B.; Ulven, T.; Hudson, B. D. Complex Pharmacology of Free Fatty Acid Receptors. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 67–110.
- (8) Shen, S.; Zhao, C.; Wu, C.; Sun, S.; Li, Z.; Yan, W.; Shao, Z. Allosteric modulation of G protein-coupled receptor signaling. *Front. Endocrinol.* **2023**, *14*, 1137604.
- (9) Grundmann, M.; Bender, E.; Schamberger, J.; Eitner, F. Pharmacology of Free Fatty Acid Receptors and Their Allosteric Modulators. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1763.
- (10) Lee, Y.; Basith, S.; Choi, S. Recent Advances in Structure-Based Drug Design Targeting Class A G Protein-Coupled Receptors Utilizing Crystal Structures and Computational Simulations. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 1–46.
- (11) Hedderich, J. B.; Persechino, M.; Becker, K.; Heydenreich, F. M.; Gutermuth, T.; Bouvier, M.; Bünemann, M.; Kolb, P. The pocketome of G-protein-coupled receptors reveals previously untargeted allosteric sites. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 2567.
- (12) Ji, T. H.; Grossmann, M.; Ji, I. G protein-coupled receptors. Diversity of receptor-ligand interactions. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 17299–17302.
- (13) Stauch, B.; Cherezov, V. Serial Femtosecond Crystallography of G Protein-Coupled Receptors. *Annu. Rev. Biophys.* **2018**, *47*, 377–397.
- (14) Gilman, A. G. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, *56*, 615–649.
- (15) Sun, L.; Ye, R. D. Role of G protein-coupled receptors in inflammation. *Acta Pharmacol. Sin.* **2012**, *33*, 342–350.
- (16) Kolakowski, L. F. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Recept. Channels* **1994**, *2*, 1–7.

- (17) Odoemelam, C. S.; Percival, B.; Wallis, H.; Chang, M.-W.; Ahmad, Z.; Scholey, D.; Burton, E.; Williams, I. H.; Kamerlin, C. L.; Wilson, P. B. G-Protein coupled receptors: structure and function in drug discovery. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 36337–36348.
- (18) Alexander, S. P.; Christopoulos, A.; Davenport, A. P.; Kelly, E.; Mathie, A.; Peters, J. A.; Veale, E. L.; Armstrong, J. F.; Faccenda, E.; Harding, S. D.; *et al.* The Concise Guide to Pharmacology 2021/22: G protein-coupled receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2021**, *178*, S27-S156.
- (19) Isberg, V.; Mordalski, S.; Munk, C.; Rataj, K.; Harpsøe, K.; Hauser, A. S.; Vroiling, B.; Bojarski, A. J.; Vriend, G.; Gloriam, D. E. GPCRdb: an information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, D356-64.
- (20) Schiöth, H. B.; Fredriksson, R. The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2005**, *142*, 94–101.
- (21) Bockaert, J.; Pin, J. P. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* **1999**, *18*, 1723–1729.
- (22) Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C. A.; Motoshima, H.; Fox, B. A.; Le Trong, I.; Teller, D. C.; Okada, T.; Stenkamp, R. E.; *et al.* Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **2000**, *289*, 739–745.
- (23) Baldwin, J. M. The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J.* **1993**, *12*, 1693–1703.
- (24) Costanzi, S. Homology modeling of class a G protein-coupled receptors. *Methods Mol. Biol.* **2012**, *857*, 259–279.
- (25) Weis, W. I.; Kobilka, B. K. The Molecular Basis of G Protein–Coupled Receptor Activation. *Annu. Rev. Biochem.* **2018**, *87*, 897–919.
- (26) Zhang, D.; Zhao, Q.; Wu, B. Structural Studies of G Protein-Coupled Receptors. *Mol. Cells* **2015**, *38*, 836–842.
- (27) Cherezov, V.; Rosenbaum, D. M.; Hanson, M. A.; Rasmussen, S. G. F.; Thian, F. S.; Kobilka, T. S.; Choi, H.-J.; Kuhn, P.; Weis, W. I.; Kobilka, B. K.; *et al.* High-resolution crystal structure of an engineered human β_2 -adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **2007**, *318*, 1258–1265.
- (28) Hilger, D.; Masureel, M.; Kobilka, B. K. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2018**, *25*, 4–12.
- (29) Rasmussen, S. G. F.; DeVree, B. T.; Zou, Y.; Kruse, A. C.; Chung, K. Y.; Kobilka, T. S.; Thian, F. S.; Chae, P. S.; Pardon, E.; Calinski, D.; *et al.* Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* **2011**, *477*, 549–555.
- (30) Oldham, W. M.; Hamm, H. E. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 60–71.
- (31) Duc, N. M.; Kim, H. R.; Chung, K. Y. Structural mechanism of G protein activation by G protein-coupled receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *763*, 214–222.
- (32) Bornancin, F.; Pfister, C.; Chabre, M. The transitory complex between photoexcited rhodopsin and transducin. Reciprocal interaction between the retinal site in rhodopsin and the nucleotide site in transducin. *Eur. J. Biochem.* **1989**, *184*, 687–698.

- (33) Oldham, W. M.; van Eps, N.; Preininger, A. M.; Hubbell, W. L.; Hamm, H. E. Mechanism of the receptor-catalyzed activation of heterotrimeric G proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 772–777.
- (34) Bai, C.; Wang, J.; Mondal, D.; Du, Y.; Ye, R. D.; Warshel, A. Exploring the Activation Process of the β_2 AR-G_s Complex. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 11044–11051.
- (35) Baltoumas, F. A.; Theodoropoulou, M. C.; Hamodrakas, S. J. Interactions of the α -subunits of heterotrimeric G-proteins with GPCRs, effectors and RGS proteins: a critical review and analysis of interacting surfaces, conformational shifts, structural diversity and electrostatic potentials. *J. Struct. Biol.* **2013**, *182*, 209–218.
- (36) Downes, G. B.; Gautam, N. The G protein subunit gene families. *Genomics* **1999**, *62*, 544–552.
- (37) Simon, M. I.; Strathmann, M. P.; Gautam, N. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **1991**, *252*, 802–808.
- (38) Cabrera-Vera, T. M.; Vanhauwe, J.; Thomas, T. O.; Medkova, M.; Preininger, A.; Mazzoni, M. R.; Hamm, H. E. Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr. Rev.* **2003**, *24*, 765–781.
- (39) Syrovatkina, V.; Alegre, K. O.; Dey, R.; Huang, X.-Y. Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *J. Mol. Biol.* **2016**, *428*, 3850–3868.
- (40) Wettschureck, N.; Offermanns, S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol. Rev.* **2005**, *85*, 1159–1204.
- (41) Sunahara, R. K.; Dessauer, C. W.; Gilman, A. G. Complexity and Diversity of Mammalian Adenylyl Cyclases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1996**, *36*, 461–480.
- (42) Siehler, S. G_{12/13}-dependent signaling of G-protein-coupled receptors: disease context and impact on drug discovery. *Expert Opin. Drug Discovery* **2007**, *2*, 1591–1604.
- (43) Siehler, S. Regulation of RhoGEF proteins by G_{12/13}-coupled receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *158*, 41–49.
- (44) Dupré, D. J.; Robitaille, M.; Rebois, R. V.; Hébert, T. E. The role of Gbetagamma subunits in the organization, assembly, and function of GPCR signaling complexes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2009**, *49*, 31–56.
- (45) Taussig, R.; Tang, W. J.; Hepler, J. R.; Gilman, A. G. Distinct patterns of bidirectional regulation of mammalian adenylyl cyclases. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 6093–6100.
- (46) Zamponi, G. W.; Bourinet, E.; Nelson, D.; Nargeot, J.; Snutch, T. P. Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel α_1 subunit. *Nature* **1997**, *385*, 442–446.
- (47) Zhang, S.; Coso, O. A.; Collins, R.; Gutkind, J. S.; Simonds, W. F. A C-terminal mutant of the G protein β subunit deficient in the activation of phospholipase C- β . *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 20208–20212.
- (48) Zhao, Q.; Kawano, T.; Nakata, H.; Nakajima, Y.; Nakajima, S.; Kozasa, T. Interaction of G protein β subunit with inward rectifier K⁺ channel Kir3. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *64*, 1085–1091.

- (49) Carman, C. V.; Benovic, J. L. G-protein-coupled receptors: turn-ons and turn-offs. *Curr. Opin. Neurobiol.* **1998**, *8*, 335–344.
- (50) Gurevich, V. V.; Gurevich, E. V. GPCR Signaling Regulation: The Role of GRKs and Arrestins. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 125.
- (51) Jean-Charles, P.-Y.; Kaur, S.; Shenoy, S. K. G Protein-Coupled Receptor Signaling Through β -Arrestin-Dependent Mechanisms. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2017**, *70*, 142–158.
- (52) Ribas, C.; Penela, P.; Murga, C.; Salcedo, A.; García-Hoz, C.; Jurado-Pueyo, M.; Aymerich, I.; Mayor, F. The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 913–922.
- (53) Gainetdinov, R. R.; Premont, R. T.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. Reply: receptor specificity of G-protein-coupled receptor kinases. *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 366–367.
- (54) Attramadal, H.; Arriza, J. L.; Aoki, C.; Dawson, T. M.; Codina, J.; Kwatra, M. M.; Snyder, S. H.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. β -arrestin2, a novel member of the arrestin/ β -arrestin gene family. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 17882–17890.
- (55) Murakami, A.; Yajima, T.; Sakuma, H.; McLaren, M. J.; Inana, G. X-arrestin: a new retinal arrestin mapping to the X chromosome. *FEBS Lett.* **1993**, *334*, 203–209.
- (56) Wilden, U.; Hall, S. W.; Kühn, H. Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, *83*, 1174–1178.
- (57) Lohse, M. J.; Benovic, J. L.; Codina, J.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. β -Arrestin: a protein that regulates β -adrenergic receptor function. *Science* **1990**, *248*, 1547–1550.
- (58) Reiter, E.; Lefkowitz, R. J. GRKs and β -arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol. Metab.* **2006**, *17*, 159–165.
- (59) Kohout, T. A.; Lefkowitz, R. J. Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 9–18.
- (60) McDonald, P. H.; Chow, C. W.; Miller, W. E.; Laporte, S. A.; Field, M. E.; Lin, F. T.; Davis, R. J.; Lefkowitz, R. J. β -arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* **2000**, *290*, 1574–1577.
- (61) Luttrell, L. M.; Roudabush, F. L.; Choy, E. W.; Miller, W. E.; Field, M. E.; Pierce, K. L.; Lefkowitz, R. J. Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by β -arrestin scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 2449–2454.
- (62) DeFea, K. A.; Vaughn, Z. D.; O'Bryan, E. M.; Nishijima, D.; Déry, O.; Bunnett, N. W. The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a β -arrestin-dependent scaffolding complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 11086–11091.
- (63) Goodman, O. B.; Krupnick, J. G.; Santini, F.; Gurevich, V. V.; Penn, R. B.; Gagnon, A. W.; Keen, J. H.; Benovic, J. L. β -arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the β_2 -adrenergic receptor. *Nature* **1996**, *383*, 447–450.
- (64) Karnam, P. C.; Vishnivetskiy, S. A.; Gurevich, V. V. Structural Basis of Arrestin Selectivity for Active Phosphorylated G Protein-Coupled Receptors. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 12481.

- (65) May, L. T.; Leach, K.; Sexton, P. M.; Christopoulos, A. Allosteric modulation of G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2007**, *47*, 1–51.
- (66) Kenakin, T.; Strachan, R. T. PAM-Antagonists: A Better Way to Block Pathological Receptor Signaling? *Trends Pharmacol. Sci.* **2018**, *39*, 748–765.
- (67) Casadó, V.; Casadó-Anguera, V. What are the current trends in G protein-coupled receptor targeted drug discovery? *Expert Opin. Drug Discovery* **2023**, *18*, 815–820.
- (68) Yanagisawa, M.; Kurihara, H.; Kimura, S.; Tomobe, Y.; Kobayashi, M.; Mitsui, Y.; Yazaki, Y.; Goto, K.; Masaki, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **1988**, *332*, 411–415.
- (69) Inoue, A.; Yanagisawa, M.; Kimura, S.; Kasuya, Y.; Miyauchi, T.; Goto, K.; Masaki, T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, *86*, 2863–2867.
- (70) Arai, H.; Hori, S.; Aramori, I.; Ohkubo, H.; Nakanishi, S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* **1990**, *348*, 730–732.
- (71) Sakurai, T.; Yanagisawa, M.; Takuwa, Y.; Miyazaki, H.; Kimura, S.; Goto, K.; Masaki, T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* **1990**, *348*, 732–735.
- (72) Ji, Y.; Duan, J.; Yuan, Q.; He, X.; Yang, G.; Zhu, S.; Wu, K.; Hu, W.; Gao, T.; Cheng, X.; *et al.* Structural basis of peptide recognition and activation of endothelin receptors. *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 1268.
- (73) Shihoya, W.; Nishizawa, T.; Okuta, A.; Tani, K.; Dohmae, N.; Fujiiyoshi, Y.; Nureki, O.; Doi, T. Activation mechanism of endothelin ET_B receptor by endothelin-1. *Nature* **2016**, *537*, 363–368.
- (74) Isberg, V.; Vroiling, B.; van der Kant, R.; Li, K.; Vriend, G.; Gloriam, D. GPCRDB: an information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D422–5.
- (75) Davenport, A. P. International Union of Pharmacology. XXIX. Update on endothelin receptor nomenclature. *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 219–226.
- (76) Davenport, A. P.; Hyndman, K. A.; Dhaun, N.; Southan, C.; Kohan, D. E.; Pollock, J. S.; Pollock, D. M.; Webb, D. J.; Maguire, J. J. Endothelin. *Pharmacol. Rev.* **2016**, *68*, 357–418.
- (77) Rubanyi, G. M.; Polokoff, M. A. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol. Rev.* **1994**, *46*, 325–415.
- (78) Barton, M.; Yanagisawa, M. Endothelin: 30 Years From Discovery to Therapy. *Hypertension* **2019**, *74*, 1232–1265.
- (79) Adachi, M.; Yang, Y. Y.; Furuichi, Y.; Miyamoto, C. Cloning and characterization of cDNA encoding human A-type endothelin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *180*, 1265–1272.
- (80) Hosoda, K.; Nakao, K.; Tamura, N.; Arai, H.; Ogawa, Y.; Suga, S.; Nakanishi, S.; Imura, H. Organization, structure, chromosomal assignment, and expression of the gene encoding the human endothelin-A receptor. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 18797–18804.

- (81) Regard, J. B.; Sato, I. T.; Coughlin, S. R. Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression. *Cell* **2008**, *135*, 561–571.
- (82) Takigawa, M.; Sakurai, T.; Kasuya, Y.; Abe, Y.; Masaki, T.; Goto, K. Molecular Identification of Guanine-Nucleotide-Binding Regulatory Proteins which Couple to Endothelin Receptors. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *228*, 102–108.
- (83) Avet, C.; Mancini, A.; Breton, B.; Le Gouill, C.; Hauser, A. S.; Normand, C.; Kobayashi, H.; Gross, F.; Hogue, M.; Lukasheva, V.; *et al.* Effector membrane translocation biosensors reveal G protein and β arrestin coupling profiles of 100 therapeutically relevant GPCRs. *eLife* **2022**, *11*.
- (84) Pándy-Szekeres, G.; Esguerra, M.; Hauser, A. S.; Caroli, J.; Munk, C.; Pilger, S.; Keserű, G. M.; Kooistra, A. J.; Gloriam, D. E. The G protein database, GproteinDb. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, D518-D525.
- (85) Horinouchi, T.; Terada, K.; Higashi, T.; Miwa, S. Endothelin receptor signaling: new insight into its regulatory mechanisms. *J. Pharmacol. Sci.* **2013**, *123*, 85–101.
- (86) Schoner, W. Salt abuse: the path to hypertension. *Nat. Med.* **2008**, *14*, 16–17.
- (87) Wirth, A.; Benyó, Z.; Lukasova, M.; Leutgeb, B.; Wettschureck, N.; Gorbey, S.; Orsy, P.; Horváth, B.; Maser-Gluth, C.; Greiner, E.; *et al.* G₁₂-G₁₃-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. *Nat. Med.* **2008**, *14*, 64–68.
- (88) Shihoya, W.; Sano, F. K.; Nureki, O. Structural insights into endothelin receptor signalling. *J. Biochem.* **2023**, *174*, 317–325.
- (89) Sano, F. K.; Akasaka, H.; Shihoya, W.; Nureki, O. Cryo-EM structure of the endothelin-1-ET_B-G_i complex. *eLife* **2023**, *12*.
- (90) Mazzuca, M. Q.; Khalil, R. A. Vascular endothelin receptor type B: structure, function and dysregulation in vascular disease. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *84*, 147–162.
- (91) Liu, S.; Premont, R. T.; Kontos, C. D.; Zhu, S.; Rockey, D. C. A crucial role for GRK2 in regulation of endothelial cell nitric oxide synthase function in portal hypertension. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 952–958.
- (92) Ohkita, M.; Tawa, M.; Kitada, K.; Matsumura, Y. Pathophysiological roles of endothelin receptors in cardiovascular diseases. *J. Pharmacol. Sci.* **2012**, *119*, 302–313.
- (93) Fukuroda, T.; Fujikawa, T.; Ozaki, S.; Ishikawa, K.; Yano, M.; Nishikibe, M. Clearance of circulating endothelin-1 by ET_B receptors in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *199*, 1461–1465.
- (94) Dupuis, J.; Goresky, C. A.; Fournier, A. Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ET_B receptors. *J. Appl. Physiol.* **1996**, *81*, 1510–1515.
- (95) Shihoya, W.; Nishizawa, T.; Yamashita, K.; Inoue, A.; Hirata, K.; Kadji, F. M. N.; Okuta, A.; Tani, K.; Aoki, J.; Fujiyoshi, Y.; *et al.* X-ray structures of endothelin ET_B receptor bound to clinical antagonist bosentan and its analog. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2017**, *24*, 758–764.
- (96) Ballesteros, J. A.; Weinstein, H. [19] Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-

coupled receptors. In *Receptor molecular biology*; Sealfon, S. C., Ed.; Methods in Neurosciences v. 25; Academic Press: San Diego, 1995; pp 366–428.

(97) Shao, D.; Park, J. E. S.; Wort, S. J. The role of endothelin-1 in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Pharmacol. Res.* **2011**, *63*, 504–511.

(98) Martínez-Díaz, I.; Martos, N.; Llorens-Cebrià, C.; Álvarez, F. J.; Bedard, P. W.; Vergara, A.; Jacobs-Cachá, C.; Soler, M. J. Endothelin Receptor Antagonists in Kidney Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*.

(99) Rosanò, L.; Spinella, F.; Bagnato, A. Endothelin 1 in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 637–651.

(100) Ranjan, A. K.; Gulati, A. Sovateltide Mediated Endothelin B Receptors Agonism and Curbing Neurological Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*.

(101) Raja, S. G. Endothelin receptor antagonists for pulmonary arterial hypertension: an overview. *Cardiovasc. Ther.* **2010**, *28*, e65-71.

(102) Correale, M.; Ferraretti, A.; Monaco, I.; Grazioli, D.; Di Biase, M.; Brunetti, N. D. Endothelin-receptor antagonists in the management of pulmonary arterial hypertension: where do we stand? *Vasc. Health Risk Manage.* **2018**, *14*, 253–264.

(103) Enevoldsen, F. C.; Sahana, J.; Wehland, M.; Grimm, D.; Infanger, M.; Krüger, M. Endothelin Receptor Antagonists: Status Quo and Future Perspectives for Targeted Therapy. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*.

(104) Channick, R. N.; Simonneau, G.; Sitbon, O.; Robbins, I. M.; Frost, A.; Tapson, V. F.; Badesch, D. B.; Roux, S.; Rainisio, M.; Bodin, F.; *et al.* Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet* **2001**, *358*, 1119–1123.

(105) Bedan, M.; Grimm, D.; Wehland, M.; Simonsen, U.; Infanger, M.; Krüger, M. A Focus on Macitentan in the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2018**, *123*, 103–113.

(106) Kedzierski, R. M.; Yanagisawa, M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2001**, *41*, 851–876.

(107) Yanagisawa, H.; Hammer, R. E.; Richardson, J. A.; Emoto, N.; Williams, S. C.; Takeda, S. i.; Clouthier, D. E.; Yanagisawa, M. Disruption of ECE-1 and ECE-2 reveals a role for endothelin-converting enzyme-2 in murine cardiac development. *J. Clin. Invest.* **2000**, *105*, 1373–1382.

(108) Maguire, J. J.; Davenport, A. P. ETA receptor-mediated constrictor responses to endothelin peptides in human blood vessels in vitro. *Br. J. Pharmacol.* **1995**, *115*, 191–197.

(109) Huggins, J. P.; Pelton, J. T.; Miller, R. C. The structure and specificity of endothelin receptors: their importance in physiology and medicine. *Pharmacol. Ther.* **1993**, *59*, 55–123.

(110) Castiglione, R. de; Tam, J. P.; Liu, W.; Zhang, J.-W.; Galantino, M.; Bertolero, F.; Vaghi, F. Alanine scan of endothelin. *Peptides*; Springer Netherlands: Dordrecht, **1992**; pp 402–403.

(111) Nakajima, K.; Kumagaye, S.; Nishio, H.; Kuroda, H.; Watanabe, T. X.; Kobayashi, Y.; Tamaoki, H.; Kimura, T.; Sakakibara, S. Synthesis of endothelin-1 analogues, endothelin-3,

and sarafotoxin S6b: structure-activity relationships. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1989**, *13* (Suppl. 5), S8-12.

(112) Takasaki, C.; Yanagisawa, M.; Kimura, S.; Goto, K.; Masaki, T. Similarity of endothelin to snake venom toxin. *Nature* **1988**, *335*, 303.

(113) Kloog, Y.; Ambar, I.; Sokolovsky, M.; Kochva, E.; Wollberg, Z.; Bdolah, A. Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain. *Science* **1988**, *242*, 268–270.

(114) Kloog, Y.; Bousso-Mittler, D.; Bdolah, A.; Sokolovsky, M. Three apparent receptor subtypes for the endothelin/sarafotoxin family. *FEBS Lett.* **1989**, *253*, 199–202.

(115) Kitazumi, K.; Shiba, T.; Nishiki, K.; Furukawa, Y.; Takasaki, C.; Tasaka, K. Structure-activity relationship in vasoconstrictor effects of sarafotoxins and endothelin-1. *FEBS Lett.* **1990**, *260*, 269–272.

(116) Williams, D. L.; Jones, K. L.; Pettibone, D. J.; Lis, E. V.; Clineschmidt, B. V. Sarafotoxin S6c: an agonist which distinguishes between endothelin receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *175*, 556–561.

(117) Saeki, T.; Ihara, M.; Fukuroda, T.; Yamagiwa, M.; Yano, M. Ala^[1,3,11,15]endothelin-1 analogs with ET_B agonistic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *179*, 286–292.

(118) Takai, M.; Umemura, I.; Yamasaki, K.; Watakabe, T.; Fujitani, Y.; Oda, K.; Urade, Y.; Inui, T.; Yamamura, T.; Okada, T. A potent and specific agonist, Suc-[Glu⁹,Ala^{11,15}]-endothelin-1(8-21), IRL 1620, for the ET_B receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *184*, 953–959.

(119) Ihara, M.; Saeki, T.; Fukuroda, T.; Kimura, S.; Ozaki, S.; Patel, A. C.; Yano, M. A novel radioligand [¹²⁵I]BQ-3020 selective for endothelin (ET_B) receptors. *Life Sci.* **1992**, *51*, PL47-52.

(120) Hiley, C. R.; Jones, C. R.; Pelton, J. T.; Miller, R. C. Binding of [¹²⁵I]-endothelin-1 to rat cerebellar homogenates and its interactions with some analogues. *Br. J. Pharmacol.* **1990**, *101*, 319–324.

(121) Keam, S. J. Sovateltide: First Approval. *Drugs* **2023**, *83*, 1239–1244.

(122) Gulati, A.; Agrawal, N.; Vibha, D.; Misra, U. K.; Paul, B.; Jain, D.; Pandian, J.; Borgohain, R. Safety and Efficacy of Sovateltide (IRL-1620) in a Multicenter Randomized Controlled Clinical Trial in Patients with Acute Cerebral Ischemic Stroke. *CNS drugs* **2021**, *35*, 85–104.

(123) Ranjan, A. K.; Briyal, S.; Khandekar, D.; Gulati, A. Sovateltide (IRL-1620) affects neuronal progenitors and prevents cerebral tissue damage after ischemic stroke. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2020**, *98*, 659–666.

(124) Ihara, M.; Noguchi, K.; Saeki, T.; Fukuroda, T.; Tsuchida, S.; Kimura, S.; Fukami, T.; Ishikawa, K.; Nishikibe, M.; Yano, M. Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ET_A receptor. *Life Sci.* **1992**, *50*, 247–255.

(125) Kojiri, K.; Ihara, M.; Nakajima, S.; Kawamura, K.; Funaishi, K.; Yano, M.; Suda, H. Endothelin-binding inhibitors, BE-18257A and BE-18257B. I. Taxonomy, fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 1342–1347.

- (126) Ihara, M.; Fukuroda, T.; Saeki, T.; Nishikibe, M.; Kojiri, K.; Suda, H.; Yano, M. An endothelin receptor (ET_A) antagonist isolated from *Streptomyces misakiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *178*, 132–137.
- (127) Ihara, M.; Ishikawa, K.; Fukuroda, T.; Saeki, T.; Funabashi, K.; Fukami, T.; Suda, H.; Yano, M. In vitro biological profile of a highly potent novel endothelin (ET) antagonist BQ-123 selective for the ET_A receptor. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1992**, *20 Suppl 12*, S11-4.
- (128) Aramori, I.; Nirei, H.; Shoubo, M.; Sogabe, K.; Nakamura, K.; Kojo, H.; Notsu, Y.; Ono, T.; Nakanishi, S. Subtype selectivity of a novel endothelin antagonist, FR139317, for the two endothelin receptors in transfected Chinese hamster ovary cells. *Mol. Pharmacol.* **1993**, *43*, 127–131.
- (129) Cardell, L. O.; Uddman, R.; Edvinsson, L. A novel ET_A-receptor antagonist, FR 139317, inhibits endothelin-induced contractions of guinea-pig pulmonary arteries, but not trachea. *Br. J. Pharmacol.* **1993**, *108*, 448–452.
- (130) Davenport, A. P.; Kuc, R. E.; Fitzgerald, F.; Maguire, J. J.; Berryman, K.; Doherty, A. M. [¹²⁵I]-PD151242: a selective radioligand for human ET_A receptors. *Br. J. Pharmacol.* **1994**, *111*, 4–6.
- (131) Davenport, A. P.; O'Reilly, G.; Kuc, R. E. Endothelin ET_A and ET_B mRNA and receptors expressed by smooth muscle in the human vasculature: majority of the ET_A sub-type. *Br. J. Pharmacol.* **1995**, *114*, 1110–1116.
- (132) Watakabe, T.; Urade, Y.; Takai, M.; Umemura, I.; Okada, T. A reversible radioligand specific for the ET_B receptor: [¹²⁵I]Tyr¹³-Suc-[Glu⁹,Ala^{11,15}]-endothelin-1(8- 21), [¹²⁵I]IRL 1620. *Res. Commun.* **1992**, *185*, 867–873.
- (133) Bacon, C. R.; Davenport, A. P. Endothelin receptors in human coronary artery and aorta. *Br. J. Pharmacol.* **1996**, *117*, 986–992.
- (134) Tanaka, T.; Tsukuda, E.; Nozawa, M.; Nonaka, H.; Ohno, T.; Kase, H.; Yamada, K.; Matsuda, Y. RES-701-1, a novel, potent, endothelin type B receptor-selective antagonist of microbial origin. *Mol. Pharmacol.* **1994**, *45*, 724–730.
- (135) Früh, T.; Saika, H.; Svensson, L.; Pitterna, T.; Sakaki, J.; Okada, T.; Urade, Y.; Oda, K.; Fujitani, Y.; Takimoto, M.; *et al.* IRL 2500: A potent ET_B selective endothelin antagonist. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2323–2328.
- (136) Balwierczak, J. L.; Bruseo, C. W.; DelGrande, D.; Jeng, A. Y.; Savage, P.; Shetty, S. S. Characterization of a potent and selective endothelin-B receptor antagonist, IRL 2500. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1995**, *26 Suppl 3*, S393-6.
- (137) Kikuchi, T.; Ohtaki, T.; Kawata, A.; Imada, T.; Asami, T.; Masuda, Y.; Sugo, T.; Kusumoto, K.; Kubo, K.; Watanabe, T. Cyclic hexapeptide endothelin receptor antagonists highly potent for both receptor subtypes ET_A and ET_B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *200*, 1708–1712.
- (138) Kusumoto, K.; Kubo, K.; Kandori, H.; Kitayoshi, T.; Sato, S.; Wakimasu, M.; Watanabe, T.; Fujino, M. Effects of a new endothelin antagonist, TAK-044, on post-ischemic acute renal failure in rats. *Life Sci.* **1994**, *55*, 301–310.

- (139) Watanabe, T.; Awane, Y.; Ikeda, S.; Fujiwara, S.; Kubo, K.; Kikuchi, T.; Kusumoto, K.; Wakimasu, M.; Fujino, M. Pharmacology of a non-selective ET_A and ET_B receptor antagonist, TAK-044 and the inhibition of myocardial infarct size in rats. *Br. J. Pharmacol.* **1995**, *114*, 949–954.
- (140) Renukuntla, J.; Vadlapudi, A. D.; Patel, A.; Boddu, S. H. S.; Mitra, A. K. Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins. *Int. J. Pharm.* **2013**, *447*, 75–93.
- (141) Clozel, M.; Breu, V.; Burri, K.; Cassal, J. M.; Fischli, W.; Gray, G. A.; Hirth, G.; Löffler, B. M.; Müller, M.; Neidhart, W. Pathophysiological role of endothelin revealed by the first orally active endothelin receptor antagonist. *Nature* **1993**, *365*, 759–761.
- (142) Clozel, M.; Breu, V.; Gray, G. A.; Kalina, B.; Löffler, B. M.; Burri, K.; Cassal, J. M.; Hirth, G.; Müller, M.; Neidhart, W. Pharmacological characterization of bosentan, a new potent orally active nonpeptide endothelin receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1994**, *270*, 228–235.
- (143) EMA-Zulassung. <https://www.ema.europa.eu/en> (accessed April 14, 2024).
- (144) Rubin, L. J.; Badesch, D. B.; Barst, R. J.; Galie, N.; Black, C. M.; Keogh, A.; Pulido, T.; Frost, A.; Roux, S.; Leconte, I.; *et al.* Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *346*, 896–903.
- (145) Sauvageau, S.; Thorin, E.; Caron, A.; Dupuis, J. Endothelin-1-induced pulmonary vasoreactivity is regulated by ET_A and ET_B receptor interactions. *J. Vasc. Res.* **2007**, *44*, 375–381.
- (146) Buckley, M. S.; Wicks, L. M.; Staib, R. L.; Kirejczyk, A. K.; Varker, A. S.; Gibson, J. J.; Feldman, J. P. Pharmacokinetic evaluation of ambrisentan. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2011**, *7*, 371–380.
- (147) Enseleit, F.; Lüscher, T. F.; Ruschitzka, F. Darusentan, a selective endothelin A receptor antagonist, for the oral treatment of resistant hypertension. *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.* **2010**, *4*, 231–240.
- (148) Iglarz, M.; Binkert, C.; Morrison, K.; Fischli, W.; Gatfield, J.; Treiber, A.; Weller, T.; Bolli, M. H.; Boss, C.; Buchmann, S.; *et al.* Pharmacology of macitentan, an orally active tissue-targeting dual endothelin receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *327*, 736–745.
- (149) Houde, M.; Labonté, J.; D'Orléans-Juste, P. Peptide and non-peptide antagonists targeting endothelin receptors in physiology and pathology. *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*, 2613–2625.
- (150) Casserly, B.; Klinger, J. R. Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Drug Des., Dev. Ther.* **2009**, *2*, 265–280.
- (151) Clozel, M.; Maresta, A.; Humbert, M. Endothelin receptor antagonists. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2013**, *218*, 199–227.
- (152) Sidharta, P. N.; Melchior, M.; Kankam, M. K.; Dingemanse, J. Single- and multiple-dose tolerability, safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of the dual endothelin receptor

antagonist aprocintan in healthy adult and elderly subjects. *Drug Des., Dev. Ther.* **2019**, *13*, 949–964.

(153) Benedict, N. J. Sitaxsentan in the management of pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* **2007**, *64*, 363–368.

(154) Wu, C.; Chan, M. F.; Stavros, F.; Raju, B.; Okun, I.; Mong, S.; Keller, K. M.; Brock, T.; Kogan, T. P.; Dixon, R. A. Discovery of TBC11251, a potent, long acting, orally active endothelin receptor-A selective antagonist. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1690–1697.

(155) Clazosentan Approval. <https://www.idorsia.com/media/news-details?newsId=2672197> (accessed April 14, 2024).

(156) Roux, S.; Breu, V.; Giller, T.; Neidhart, W.; Ramuz, H.; Coassolo, P.; Clozel, J. P.; Clozel, M. Ro 61-1790, a new hydrosoluble endothelin antagonist: general pharmacology and effects on experimental cerebral vasospasm. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**, *283*, 1110–1118.

(157) van Giersbergen, P. L. M.; Dingemans, J. Tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of clazosentan, a parenteral endothelin receptor antagonist. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2007**, *63*, 151–158.

(158) Murugesan, N.; Gu, Z.; Fadnis, L.; Tellew, J. E.; Baska, R. A. F.; Yang, Y.; Beyer, S. M.; Monshizadegan, H.; Dickinson, K. E.; Valentine, M. T.; *et al.* Dual angiotensin II and endothelin A receptor antagonists: synthesis of 2'-substituted N-3-isoxazolyl biphenylsulfonamides with improved potency and pharmacokinetics. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 171–179.

(159) Syed, Y. Y. Sparsentan: First Approval. *Drugs* **2023**, *83*, 563–568.

(160) Boss, C.; Bolli, M. H.; Gatfield, J. From bosentan (Tracleer®) to macitentan (Opsumit®): The medicinal chemistry perspective. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 3381–3394.

(161) Dutzler, R.; Ernst, B.; Hediger, M. A.; Keppler, D.; Mohr, P.; Neidhart, W.; Märki, H. P. Channels and transporters. Mini-symposium of the Division of Medicinal Chemistry (DMC) of the Swiss Chemical Society (SCS) at the Department of Chemistry, University of Basel, May 27, 2010. *Chimia* **2010**, *64*, 662–666.

(162) Morris, C. D.; Rose, A.; Curwen, J.; Hughes, A. M.; Wilson, D. J.; Webb, D. J. Specific inhibition of the endothelin A receptor with ZD4054: clinical and pre-clinical evidence. *Br. J. Cancer* **2005**, *92*, 2148–2152.

(163) Clarkson-Jones, J. A.; Kenyon, A. S. J.; Kemp, J.; Lenz, E. M.; Oliver, S. D.; Swaisland, H. Disposition and metabolism of the specific endothelin A receptor antagonist zibotentan (ZD4054) in healthy volunteers. *Xenobiotica* **2012**, *42*, 363–371.

(164) Carducci, M. A.; Nelson, J. B.; Bowling, M. K.; Rogers, T.; Eisenberger, M. A.; Sinibaldi, V.; Donehower, R.; Leahy, T. L.; Carr, R. A.; Isaacson, J. D.; *et al.* Atrasentan, an endothelin-receptor antagonist for refractory adenocarcinomas: safety and pharmacokinetics. *J. Clin. Oncol.* **2002**, *20*, 2171–2180.

(165) Opgenorth, T. J.; Adler, A. L.; Calzadilla, S. V.; Chiou, W. J.; Dayton, B. D.; Dixon, D. B.; Gehrke, L. J.; Hernandez, L.; Magnuson, S. R.; Marsh, K. C.; *et al.* Pharmacological

characterization of A-127722: an orally active and highly potent ET_A-selective receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *276*, 473–481.

(166) Klinische Studien. www.clinicaltrials.gov (accessed April 14, 2024).

(167) Lavelle, A.; Sugrue, R.; Lawler, G.; Mulligan, N.; Kelleher, B.; Murphy, D. M.; Gaine, S. P. Sitaxentan-induced hepatic failure in two patients with pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* **2009**, *34*, 770–771.

(168) Chow, M.; Dumont, A. S.; Kassell, N. F. Endothelin receptor antagonists and cerebral vasospasm: an update. *Neurosurgery* **2002**, *51*, 1333–42.

(169) Macdonald, R. L.; Kassell, N. F.; Mayer, S.; Ruefenacht, D.; Schmiedek, P.; Weidauer, S.; Frey, A.; Roux, S.; Pasqualin, A. Clazosentan to overcome neurological ischemia and infarction occurring after subarachnoid hemorrhage (CONSCIOUS-1): randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 dose-finding trial. *Stroke* **2008**, *39*, 3015–3021.

(170) Heerspink, H. J. L.; Radhakrishnan, J.; Alpers, C. E.; Barratt, J.; Bieler, S.; Diva, U.; Inrig, J.; Komers, R.; Mercer, A.; Noronha, I. L.; *et al.* Sparsentan in patients with IgA nephropathy: a prespecified interim analysis from a randomised, double-blind, active-controlled clinical trial. *Lancet* **2023**, *401*, 1584–1594.

(171) Mann, J. F. E.; Green, D.; Jamerson, K.; Ruilope, L. M.; Kuranoff, S. J.; Littke, T.; Viberti, G. Avosentan for overt diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2010**, *21*, 527–535.

(172) Nelson, J. B.; Fizazi, K.; Miller, K.; Higano, C.; Moul, J. W.; Akaza, H.; Morris, T.; McIntosh, S.; Pemberton, K.; Gleave, M. Phase 3, randomized, placebo-controlled study of zibotentan (ZD4054) in patients with castration-resistant prostate cancer metastatic to bone. *Cancer* **2012**, *118*, 5709–5718.

(173) Nelson, J. B.; Love, W.; Chin, J. L.; Saad, F.; Schulman, C. C.; Sleep, D. J.; Qian, J.; Steinberg, J.; Carducci, M. Phase 3, randomized, controlled trial of atrasentan in patients with nonmetastatic, hormone-refractory prostate cancer. *Cancer* **2008**, *113*, 2478–2487.

(174) Rosanò, L.; Bagnato, A. Endothelin therapeutics in cancer: Where are we? *Am. J. Physiol.* **2016**, *310*, R469–75.

(175) Blandin, V.; Vigne, P.; Breittmayer, J. P.; Frelin, C. Allosteric inhibition of endothelin ET_A receptors by 3, 5-dibromosalicylic acid. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58*, 1461–1469.

(176) Talbodec, A.; Berkane, N.; Blandin, V.; Breittmayer, J. P.; Ferrari, E.; Frelin, C.; Vigne, P. Aspirin and sodium salicylate inhibit endothelin ET_A receptors by an allosteric type of mechanism. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *57*, 797–804.

(177) Secor, J. D.; Fligor, S. C.; Tsikis, S. T.; Yu, L. J.; Puder, M. Free Fatty Acid Receptors as Mediators and Therapeutic Targets in Liver Disease. *Front. Physiol.* **2021**, *12*, 656441.

(178) Offermanns, S. Free fatty acid (FFA) and hydroxy carboxylic acid (HCA) receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2014**, *54*, 407–434.

(179) Kimura, I.; Ichimura, A.; Ohue-Kitano, R.; Igarashi, M. Free Fatty Acid Receptors in Health and Disease. *Physiol. Rev.* **2020**, *100*, 171–210.

- (180) Hara, T.; Kashihara, D.; Ichimura, A.; Kimura, I.; Tsujimoto, G.; Hirasawa, A. Role of free fatty acid receptors in the regulation of energy metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1841*, 1292–1300.
- (181) Sawzdargo, M.; George, S. R.; Nguyen, T.; Xu, S.; Kolakowski, L. F.; O'Dowd, B. F. A cluster of four novel human G protein-coupled receptor genes occurring in close proximity to CD22 gene on chromosome 19q13.1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *239*, 543–547.
- (182) Brown, A. J.; Goldsworthy, S. M.; Barnes, A. A.; Eilert, M. M.; Tcheang, L.; Daniels, D.; Muir, A. I.; Wigglesworth, M. J.; Kinghorn, I.; Fraser, N. J.; *et al.* The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 11312–11319.
- (183) Kebede, M. A.; Alquier, T.; Latour, M. G.; Poitout, V. Lipid receptors and islet function: therapeutic implications? *Diabetes, Obes. Metab.* **2009**, *11 Suppl 4*, 10–20.
- (184) Karaki, S.; Mitsui, R.; Hayashi, H.; Kato, I.; Sugiya, H.; Iwanaga, T.; Furness, J. B.; Kuwahara, A. Short-chain fatty acid receptor, GPR43, is expressed by enteroendocrine cells and mucosal mast cells in rat intestine. *Cell Tissue Res.* **2006**, *324*, 353–360.
- (185) Tazoe, H.; Otomo, Y.; Karaki, S.; Kato, I.; Fukami, Y.; Terasaki, M.; Kuwahara, A. Expression of short-chain fatty acid receptor GPR41 in the human colon. *Biomed. Res.* **2009**, *30*, 149–156.
- (186) Kimura, I.; Inoue, D.; Maeda, T.; Hara, T.; Ichimura, A.; Miyauchi, S.; Kobayashi, M.; Hirasawa, A.; Tsujimoto, G. Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 8030–8035.
- (187) Li, F.; Tai, L.; Sun, X.; Lv, Z.; Tang, W.; Wang, T.; Zhao, Z.; Gong, D.; Ma, S.; Tang, S.; *et al.* Molecular recognition and activation mechanism of short-chain fatty acid receptors FFAR2/3. *Cell Res.* [Online early access]. DOI: 10.1038/s41422-023-00914-z. Published Online: Jan. 9, 2024.
- (188) Le Poul, E.; Loison, C.; Struyf, S.; Springael, J.-Y.; Lannoy, V.; Decobecq, M.-E.; Brezillon, S.; Dupriez, V.; Vassart, G.; van Damme, J.; *et al.* Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 25481–25489.
- (189) Ang, Z.; Ding, J. L. GPR41 and GPR43 in Obesity and Inflammation - Protective or Causative? *Front. Immunol.* **2016**, *7*, 28.
- (190) Lin, H. V.; Frassetto, A.; Kowalik, E. J.; Nawrocki, A. R.; Lu, M. M.; Kosinski, J. R.; Hubert, J. A.; Szeto, D.; Yao, X.; Forrest, G.; *et al.* Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. *PloS one* **2012**, *7*, e35240.
- (191) Tolhurst, G.; Heffron, H.; Lam, Y. S.; Parker, H. E.; Habib, A. M.; Diakogiannaki, E.; Cameron, J.; Grosse, J.; Reimann, F.; Gribble, F. M. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes* **2012**, *61*, 364–371.

- (192) Ge, H.; Li, X.; Weiszmann, J.; Wang, P.; Baribault, H.; Chen, J.-L.; Tian, H.; Li, Y. Activation of G protein-coupled receptor 43 in adipocytes leads to inhibition of lipolysis and suppression of plasma free fatty acids. *Endocrinology* **2008**, *149*, 4519–4526.
- (193) Smith, P. M.; Howitt, M. R.; Panikov, N.; Michaud, M.; Gallini, C. A.; Bohlooly-Y, M.; Glickman, J. N.; Garrett, W. S. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* **2013**, *341*, 569–573.
- (194) Briscoe, C. P.; Tadayyon, M.; Andrews, J. L.; Benson, W. G.; Chambers, J. K.; Eilert, M. M.; Ellis, C.; Elshourbagy, N. A.; Goetz, A. S.; Minnick, D. T.; *et al.* The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 11303–11311.
- (195) Hirasawa, A.; Tsumaya, K.; Awaji, T.; Katsuma, S.; Adachi, T.; Yamada, M.; Sugimoto, Y.; Miyazaki, S.; Tsujimoto, G. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 90–94.
- (196) Itoh, Y.; Kawamata, Y.; Harada, M.; Kobayashi, M.; Fujii, R.; Fukusumi, S.; Ogi, K.; Hosoya, M.; Tanaka, Y.; Uejima, H.; *et al.* Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature* **2003**, *422*, 173–176.
- (197) Cartoni, C.; Yasumatsu, K.; Ohkuri, T.; Shigemura, N.; Yoshida, R.; Godinot, N.; Le Coutre, J.; Ninomiya, Y.; Damak, S. Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120. *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 8376–8382.
- (198) Edfalk, S.; Steneberg, P.; Edlund, H. Gpr40 is expressed in enteroendocrine cells and mediates free fatty acid stimulation of incretin secretion. *Diabetes* **2008**, *57*, 2280–2287.
- (199) Hirasawa, A.; Itsubo, C.; Sadakane, K.; Hara, T.; Shinagawa, S.; Koga, H.; Nose, H.; Koshimizu, T.; Tsujimoto, G. Production and characterization of a monoclonal antibody against GPR40 (FFAR1; free fatty acid receptor 1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *365*, 22–28.
- (200) Ma, D.; Tao, B.; Warashina, S.; Kotani, S.; Lu, L.; Kaplamadzhiev, D. B.; Mori, Y.; Tonchev, A. B.; Yamashima, T. Expression of free fatty acid receptor GPR40 in the central nervous system of adult monkeys. *Neurosci. Res.* **2007**, *58*, 394–401.
- (201) Mieczkowska, A.; Baslé, M. F.; Chappard, D.; Mabileau, G. Thiazolidinediones induce osteocyte apoptosis by a G protein-coupled receptor 40-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 23517–23526.
- (202) Da Oh, Y.; Talukdar, S.; Bae, E. J.; Imamura, T.; Morinaga, H.; Fan, W.; Li, P.; Lu, W. J.; Watkins, S. M.; Olefsky, J. M. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* **2010**, *142*, 687–698.
- (203) Gotoh, C.; Hong, Y.-H.; Iga, T.; Hishikawa, D.; Suzuki, Y.; Song, S.-H.; Choi, K.-C.; Adachi, T.; Hirasawa, A.; Tsujimoto, G.; *et al.* The regulation of adipogenesis through GPR120. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *354*, 591–597.
- (204) Srivastava, A.; Yano, J.; Hirozane, Y.; Kefala, G.; Gruswitz, F.; Snell, G.; Lane, W.; Ivetac, A.; Aertgeerts, K.; Nguyen, J.; *et al.* High-resolution structure of the human GPR40 receptor bound to allosteric agonist TAK-875. *Nature* **2014**, *513*, 124–127.

- (205) Ho, J. D.; Chau, B.; Rodgers, L.; Lu, F.; Wilbur, K. L.; Otto, K. A.; Chen, Y.; Song, M.; Riley, J. P.; Yang, H.-C.; *et al.* Structural basis for GPR40 allosteric agonism and incretin stimulation. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1645.
- (206) Yin, H.; Inoue, A.; Ma, Z.; Zhu, X.; Xia, R.; Xu, Z.; Wang, N.; Duan, Y.; Zhang, A.; Guo, C.; *et al.* Structural basis of omega-3 fatty acid receptor FFAR4 activation and G protein coupling selectivity. *Cell Res.* **2023**, *33*, 644–647.
- (207) Watson, S.-J.; Brown, A. J. H.; Holliday, N. D. Differential signaling by splice variants of the human free fatty acid receptor GPR120. *Mol. Pharmacol.* **2012**, *81*, 631–642.
- (208) Luo, J.; Swaminath, G.; Brown, S. P.; Zhang, J.; Guo, Q.; Chen, M.; Nguyen, K.; Tran, T.; Miao, L.; Dransfield, P. J.; *et al.* A potent class of GPR40 full agonists engages the enteroinsular axis to promote glucose control in rodents. *PLoS one* **2012**, *7*, e46300.
- (209) Ichimura, A.; Hirasawa, A.; Poulain-Godefroy, O.; Bonnefond, A.; Hara, T.; Yengo, L.; Kimura, I.; Leloire, A.; Liu, N.; Iida, K.; *et al.* Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature* **2012**, *483*, 350–354.
- (210) Mao, C.; Xiao, P.; Tao, X.-N.; Qin, J.; He, Q.-T.; Zhang, C.; Guo, S.-C.; Du, Y.-Q.; Chen, L.-N.; Shen, D.-D.; *et al.* Unsaturated bond recognition leads to biased signal in a fatty acid receptor. *Science* **2023**, *380*, eadd6220.
- (211) Lu, J.; Byrne, N.; Wang, J.; Bricogne, G.; Brown, F. K.; Chobanian, H. R.; Colletti, S. L.; Di Salvo, J.; Thomas-Fowlkes, B.; Guo, Y.; *et al.* Structural basis for the cooperative allosteric activation of the free fatty acid receptor GPR40. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2017**, *24*, 570–577.
- (212) Sum, C. S.; Tikhonova, I. G.; Costanzi, S.; Gershengorn, M. C. Two arginine-glutamate ionic locks near the extracellular surface of FFAR1 gate receptor activation. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 3529–3536.
- (213) Sum, C. S.; Tikhonova, I. G.; Neumann, S.; Engel, S.; Raaka, B. M.; Costanzi, S.; Gershengorn, M. C. Identification of residues important for agonist recognition and activation in GPR40. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 29248–29255.
- (214) Persechino, M.; Hedderich, J. B.; Kolb, P.; Hilger, D. Allosteric modulation of GPCRs: From structural insights to in silico drug discovery. *Pharmacol. Ther.* **2022**, *237*, 108242.
- (215) Sparks, S. M.; Chen, G.; Collins, J. L.; Danger, D.; Dock, S. T.; Jayawickreme, C.; Jenkinson, S.; Laudeman, C.; Leesnitzer, M. A.; Liang, X.; *et al.* Identification of diarylsulfonamides as agonists of the free fatty acid receptor 4 (FFA4/GPR120). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 3100–3103.
- (216) Kaku, K.; Enya, K.; Nakaya, R.; Ohira, T.; Matsuno, R. Efficacy and safety of fasiglifam (TAK-875), a G protein-coupled receptor 40 agonist, in Japanese patients with type 2 diabetes inadequately controlled by diet and exercise: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial. *Diabetes, Obes. Metab.* **2015**, *17*, 675–681.
- (217) Hudson, B. D.; Tikhonova, I. G.; Pandey, S. K.; Ulven, T.; Milligan, G. Extracellular ionic locks determine variation in constitutive activity and ligand potency between species

orthologs of the free fatty acid receptors FFA2 and FFA3. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 41195–41209.

(218) Briscoe, C. P.; Peat, A. J.; McKeown, S. C.; Corbett, D. F.; Goetz, A. S.; Littleton, T. R.; McCoy, D. C.; Kenakin, T. P.; Andrews, J. L.; Ammala, C.; *et al.* Pharmacological regulation of insulin secretion in MIN6 cells through the fatty acid receptor GPR40: identification of agonist and antagonist small molecules. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *148*, 619–628.

(219) Kotarsky, K.; Nilsson, N. E.; Flodgren, E.; Owman, C.; Olde, B. A human cell surface receptor activated by free fatty acids and thiazolidinedione drugs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *301*, 406–410.

(220) Christiansen, E.; Urban, C.; Merten, N.; Liebscher, K.; Karlsen, K. K.; Hamacher, A.; Spinrath, A.; Bond, A. D.; Drewke, C.; Ullrich, S.; *et al.* Discovery of potent and selective agonists for the free fatty acid receptor 1 (FFA(1)/GPR40), a potential target for the treatment of type II diabetes. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 7061–7064.

(221) Christiansen, E.; Hansen, S. V. F.; Urban, C.; Hudson, B. D.; Wargent, E. T.; Grundmann, M.; Jenkins, L.; Zaibi, M.; Stocker, C. J.; Ullrich, S.; *et al.* Discovery of TUG-770: A Highly Potent Free Fatty Acid Receptor 1 (FFA1/GPR40) Agonist for Treatment of Type 2 Diabetes. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 441–445.

(222) Negoro, N.; Sasaki, S.; Mikami, S.; Ito, M.; Suzuki, M.; Tsujihata, Y.; Ito, R.; Harada, A.; Takeuchi, K.; Suzuki, N.; *et al.* Discovery of TAK-875: A Potent, Selective, and Orally Bioavailable GPR40 Agonist. *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 290–294.

(223) Hagmann, W. K.; Nargund, R. P.; Blizzard, T. A.; Josien, H.; Biju, P.; Plummer, C. W.; Dang, Q.; Li, B.; Lin, L. S.; Cui, M. Antidiabetic tricyclic compounds. WO2014022528A1, **2014**.

(224) Hudson, B. D.; Due-Hansen, M. E.; Christiansen, E.; Hansen, A. M.; Mackenzie, A. E.; Murdoch, H.; Pandey, S. K.; Ward, R. J.; Marquez, R.; Tikhonova, I. G.; *et al.* Defining the molecular basis for the first potent and selective orthosteric agonists of the FFA2 free fatty acid receptor. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 17296–17312.

(225) Pizzonero, M.; Dupont, S.; Babel, M.; Beaumont, S.; Bienvenu, N.; Blanqué, R.; Cherel, L.; Christophe, T.; Crescenzi, B.; Lemos, E. de; *et al.* Discovery and optimization of an azetidine chemical series as a free fatty acid receptor 2 (FFA2) antagonist: from hit to clinic. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 10044–10057.

(226) Lee, T.; Schwandner, R.; Swaminath, G.; Weiszmann, J.; Cardozo, M.; Greenberg, J.; Jaeckel, P.; Ge, H.; Wang, Y.; Jiao, X.; *et al.* Identification and functional characterization of allosteric agonists for the G protein-coupled receptor FFA2. *Mol. Pharmacol.* **2008**, *74*, 1599–1609.

(227) Smith, N. J.; Ward, R. J.; Stoddart, L. A.; Hudson, B. D.; Kostenis, E.; Ulven, T.; Morris, J. C.; Tränkle, C.; Tikhonova, I. G.; Adams, D. R.; *et al.* Extracellular loop 2 of the free fatty acid receptor 2 mediates allosterism of a phenylacetamide ago-allosteric modulator. *Mol. Pharmacol.* **2011**, *80*, 163–173.

- (228) Wang, Y.; Jiao, X.; Kayser, F.; Liu, J.; Wang, Z.; Wanska, M.; Greenberg, J.; Weiszmann, J.; Ge, H.; Tian, H.; *et al.* The first synthetic agonists of FFA2: Discovery and SAR of phenylacetamides as allosteric modulators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 493–498.
- (229) Bolognini, D.; Moss, C. E.; Nilsson, K.; Petersson, A. U.; Donnelly, I.; Sergeev, E.; König, G. M.; Kostenis, E.; Kurowska-Stolarska, M.; Miller, A.; *et al.* A Novel Allosteric Activator of Free Fatty Acid 2 Receptor Displays Unique G_i-functional Bias. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 18915–18931.
- (230) Hudson, B. D.; Christiansen, E.; Murdoch, H.; Jenkins, L.; Hansen, A. H.; Madsen, O.; Ulven, T.; Milligan, G. Complex pharmacology of novel allosteric free fatty acid 3 receptor ligands. *Mol. Pharmacol.* **2014**, *86*, 200–210.
- (231) Shimpukade, B.; Hudson, B. D.; Hovgaard, C. K.; Milligan, G.; Ulven, T. Discovery of a potent and selective GPR120 agonist. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4511–4515.
- (232) Watterson, K. R.; Hansen, S. V. F.; Hudson, B. D.; Alvarez-Curto, E.; Raihan, S. Z.; Azevedo, C. M. G.; Martin, G.; Dunlop, J.; Yarwood, S. J.; Ulven, T.; *et al.* Probe-Dependent Negative Allosteric Modulators of the Long-Chain Free Fatty Acid Receptor FFA4. *Mol. Pharmacol.* **2017**, *91*, 630–641.
- (233) Nissen, S. E.; Wolski, K. Rosiglitazone revisited: an updated meta-analysis of risk for myocardial infarction and cardiovascular mortality. *Arch. Intern. Med.* **2010**, *170*, 1191–1201.
- (234) Smith, N. J.; Stoddart, L. A.; Devine, N. M.; Jenkins, L.; Milligan, G. The action and mode of binding of thiazolidinedione ligands at free fatty acid receptor 1. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 17527–17539.
- (235) Christiansen, E.; Due-Hansen, M. E.; Urban, C.; Grundmann, M.; Schmidt, J.; Hansen, S. V. F.; Hudson, B. D.; Zaibi, M.; Markussen, S. B.; Hagesaether, E.; *et al.* Discovery of a potent and selective free fatty acid receptor 1 agonist with low lipophilicity and high oral bioavailability. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 982–992.
- (236) Yabuki, C.; Komatsu, H.; Tsujihata, Y.; Maeda, R.; Ito, R.; Matsuda-Nagasumi, K.; Sakuma, K.; Miyawaki, K.; Kikuchi, N.; Takeuchi, K.; *et al.* A novel antidiabetic drug, fasiglifam/TAK-875, acts as an ago-allosteric modulator of FFAR1. *PLoS one* **2013**, *8*, e76280.
- (237) Houze, J. B.; Zhu, L.; Sun, Y.; Akerman, M.; Qiu, W.; Zhang, A. J.; Sharma, R.; Schmitt, M.; Wang, Y.; Liu, J.; *et al.* AMG 837: a potent, orally bioavailable GPR40 agonist. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 1267–1270.
- (238) Lin, D. C.-H.; Zhang, J.; Zhuang, R.; Li, F.; Nguyen, K.; Chen, M.; Tran, T.; Lopez, E.; Lu, J. Y. L.; Li, X. N.; *et al.* AMG 837: a novel GPR40/FFA1 agonist that enhances insulin secretion and lowers glucose levels in rodents. *PLoS one* **2011**, *6*, e27270.
- (239) Hyde, A. M.; Liu, Z.; Kosjek, B.; Tan, L.; Klapars, A.; Ashley, E. R.; Zhong, Y.-L.; Alvizo, O.; Agard, N. J.; Liu, G.; *et al.* Synthesis of the GPR40 Partial Agonist MK-8666 through a Kinetically Controlled Dynamic Enzymatic Ketone Reduction. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 5888–5891.

- (240) Li, Z.; Qiu, Q.; Geng, X.; Yang, J.; Huang, W.; Qian, H. Free fatty acid receptor agonists for the treatment of type 2 diabetes: drugs in preclinical to phase II clinical development. *Expert Opin. Invest. Drugs* **2016**, *25*, 871–890.
- (241) Shang, J.; Tschirret-Guth, R.; Cancilla, M.; Samuel, K.; Chen, Q.; Chobanian, H. R.; Thomas, A.; Tong, W.; Josien, H.; Buevich, A. V.; *et al.* Bioactivation of GPR40 Agonist MK-8666: Formation of Protein Adducts in Vitro from Reactive Acyl Glucuronide and Acyl CoA Thioester. *Chem. Res. Toxicol.* **2020**, *33*, 191–201.
- (242) Brown, S. P.; Dransfield, P. J.; Vimolratana, M.; Jiao, X.; Zhu, L.; Pattaropong, V.; Sun, Y.; Liu, J.; Luo, J.; Zhang, J.; *et al.* Discovery of AM-1638: A Potent and Orally Bioavailable GPR40/FFA1 Full Agonist. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 726–730.
- (243) Brown, A. J.; Tsoulou, C.; Ward, E.; Gower, E.; Bhudia, N.; Chowdhury, F.; Dean, T. W.; Faucher, N.; Gangar, A.; Dowell, S. J. Pharmacological properties of acid N-thiazolylamide FFA2 agonists. *Pharmacol. Res. Perspect.* **2015**, *3*, e00141.
- (244) Vermeire, S.; Knoflíček, V.; Reinisch, W.; van Kaem, T.; Namour, F.; Beetens, J.; Vanhoutte, F. DOP030. GLPG0974, an FFA2 antagonist, in ulcerative colitis: efficacy and safety in a multicenter proof-of-concept study. *J. Crohns Colitis* **2015**, *9*, S39-S39.
- (245) Schmidt, J.; Smith, N. J.; Christiansen, E.; Tikhonova, I. G.; Grundmann, M.; Hudson, B. D.; Ward, R. J.; Drewke, C.; Milligan, G.; Kostenis, E.; *et al.* Selective orthosteric free fatty acid receptor 2 (FFA2) agonists: identification of the structural and chemical requirements for selective activation of FFA2 versus FFA3. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 10628–10640.
- (246) Nøhr, M. K.; Pedersen, M. H.; Gille, A.; Egerod, K. L.; Engelstoft, M. S.; Husted, A. S.; Sichlau, R. M.; Grunddal, K. V.; Poulsen, S. S.; Han, S.; *et al.* GPR41/FFAR3 and GPR43/FFAR2 as cosensors for short-chain fatty acids in enteroendocrine cells vs FFAR3 in enteric neurons and FFAR2 in enteric leukocytes. *Endocrinology* **2013**, *154*, 3552–3564.
- (247) Schann, S.; Mayer, S.; Franchet, C.; Frauli, M.; Steinberg, E.; Thomas, M.; Baron, L.; Neuville, P. Chemical switch of a metabotropic glutamate receptor 2 silent allosteric modulator into dual metabotropic glutamate receptor 2/3 negative/positive allosteric modulators. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 8775–8779.
- (248) Hudson, B. D.; Shimpukade, B.; Mackenzie, A. E.; Butcher, A. J.; Padiani, J. D.; Christiansen, E.; Heathcote, H.; Tobin, A. B.; Ulven, T.; Milligan, G. The pharmacology of TUG-891, a potent and selective agonist of the free fatty acid receptor 4 (FFA4/GPR120), demonstrates both potential opportunity and possible challenges to therapeutic agonism. *Mol. Pharmacol.* **2013**, *84*, 710–725.
- (249) Lagerström, M. C.; Schiöth, H. B. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2008**, *7*, 339–357.
- (250) Robbins, M. J.; Michalovich, D.; Hill, J.; Calver, A. R.; Medhurst, A. D.; Gloger, I.; Sims, M.; Middlemiss, D. N.; Pangalos, M. N. Molecular cloning and characterization of two novel retinoic acid-inducible orphan G-protein-coupled receptors (GPRC5B and GPRC5C). *Genomics* **2000**, *67*, 8–18.

- (251) Chun, L.; Zhang, W.; Liu, J. Structure and ligand recognition of class C GPCRs. *Acta Pharmacol. Sin.* **2012**, *33*, 312–323.
- (252) Sano, T.; Kim, Y.-J.; Oshima, E.; Shimizu, C.; Kiyonari, H.; Abe, T.; Higashi, H.; Yamada, K.; Hirabayashi, Y. Comparative characterization of GPRC5B and GPRC5CLacZ knockin mice; behavioral abnormalities in GPRC5B-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *412*, 460–465.
- (253) Kurabayashi, N.; Nguyen, M. D.; Sanada, K. The G protein-coupled receptor GPRC5B contributes to neurogenesis in the developing mouse neocortex. *Development* **2013**, *140*, 4335–4346.
- (254) Kim, Y.-J.; Sano, T.; Nabetani, T.; Asano, Y.; Hirabayashi, Y. GPRC5B activates obesity-associated inflammatory signaling in adipocytes. *Sci. Signal.* **2012**, *5*, ra85.
- (255) Carvalho, J.; Chennupati, R.; Li, R.; Günther, S.; Kaur, H.; Zhao, W.; Tonack, S.; Kurz, M.; Mößlein, N.; Bünemann, M.; *et al.* Orphan G Protein-Coupled Receptor GPRC5B Controls Smooth Muscle Contractility and Differentiation by Inhibiting Prostacyclin Receptor Signaling. *Circulation* **2020**, *141*, 1168–1183.
- (256) Soni, A.; Amisten, S.; Rorsman, P.; Salehi, A. GPRC5B a putative glutamate-receptor candidate is negative modulator of insulin secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *441*, 643–648.
- (257) Samson-Himmelstjerna, F. A. von; Freundt, G.; Nitz, J.-T.; Stelter, F.; Luedde, M.; Wieland, T.; Frey, N.; Hippe, H.-J. The orphan receptor GPRC5B modulates inflammatory and fibrotic pathways in cardiac fibroblasts and mice hearts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, *514*, 1198–1203.
- (258) Hansen, A. H.; Sergeev, E.; Pandey, S. K.; Hudson, B. D.; Christiansen, E.; Milligan, G.; Ulven, T. Development and Characterization of a Fluorescent Tracer for the Free Fatty Acid Receptor 2 (FFA2/GPR43). *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 5638–5645.
- (259) Houghten, R. A.; Li, C. H. Reduction of sulfoxides in peptides and proteins. *Anal. Biochem.* **1979**, *98*, 36–46.
- (260) Umbach, S.; Levin, R.; Neumann, S.; Steinmetzer, T.; Dötsch, V.; Bernhard, F. Transfer mechanism of cell-free synthesized membrane proteins into mammalian cells. *Front. bioeng. biotechnol.* **2022**, *10*, 906295.
- (261) Schierle, S.; Neumann, S.; Heitel, P.; Willems, S.; Kaiser, A.; Pollinger, J.; Merk, D. Design and Structural Optimization of Dual FXR/PPAR δ Activators. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 8369–8379.
- (262) Irwin, J. J.; Tang, K. G.; Young, J.; Dandarchuluun, C.; Wong, B. R.; Khurelbaatar, M.; Moroz, Y. S.; Mayfield, J.; Sayle, R. A. ZINC20-A Free Ultralarge-Scale Chemical Database for Ligand Discovery. *J. Chem. Inf. Model.* **2020**, *60*, 6065–6073.
- (263) Chevillard, F.; Kolb, P. SCUBIDOO: A Large yet Screenable and Easily Searchable Database of Computationally Created Chemical Compounds Optimized toward High Likelihood of Synthetic Tractability. *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, *55*, 1824–1835.

- (264) Lin, L. N.; Brandts, J. F. Determination of cis-trans proline isomerization by trypsin proteolysis. Application to a model pentapeptide and to oxidized ribonuclease A. *Biochemistry* **1983**, *22*, 553–559.
- (265) Brückner, R. *Reaktionsmechanismen: Organische Reaktionen, Stereochemie, moderne Synthesemethoden*, 3. Aufl., aktualisiert u. überarb., korrigierter Nachdr; Spektrum, Akad. Verl.: München, **2007**.
- (266) Rablen, P. R.; McLarney, B. D.; Karlow, B. J.; Schneider, J. E. How alkyl halide structure affects E2 and SN₂ reaction barriers: E2 reactions are as sensitive as SN₂ reactions. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 867–879.
- (267) Cardillo, G.; Orena, M.; Sandri, S. Oxazolidin-2-ones from allylic amines by means of iodine and carbonate anion on polymeric support. A convenient synthesis of (.+.-)-propranolol. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 713–717.
- (268) Lennox, A. J. J.; Lloyd-Jones, G. C. Selection of boron reagents for Suzuki-Miyaura coupling. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 412–443.
- (269) Pagacz-Kostrzewa, M.; Sałdyka, M.; Wierzejewska, M.; Khomenko, D. M.; Doroschuk, R. O. Theoretical DFT and matrix isolation FTIR studies of 2-(1,2,4-triazolyl)phenol isomers. *Chem. Phys. Lett.* **2016**, *657*, 156–161.
- (270) Li, L.-B.; Dan, W.-J.; Tan, F.-F.; Cui, L.-H.; Yuan, Z.-P.; Wu, W.-J.; Zhang, J.-W. Synthesis and antibacterial activities of Yanglingmycin analogues. *Chem. Pharm. Bull.* **2015**, *63*, 33–37.
- (271) Shao, Z.; Yan, W.; Chapman, K.; Ramesh, K.; Ferrell, A. J.; Yin, J.; Wang, X.; Xu, Q.; Rosenbaum, D. M. Structure of an allosteric modulator bound to the CB1 cannabinoid receptor. *Nat. Chem. Biol.* **2019**, *15*, 1199–1205.
- (272) Liu, X.; Kaindl, J.; Korczynska, M.; Stöbel, A.; Dengler, D.; Stanek, M.; Hübner, H.; Clark, M. J.; Mahoney, J.; Matt, R. A.; *et al.* An allosteric modulator binds to a conformational hub in the β_2 adrenergic receptor. *Nat. Chem. Biol.* **2020**, *16*, 749–755.
- (273) Abdelrahman, M. H.; Youssif, B. G. M.; Abdelgawad, M. A.; Abdelazeem, A. H.; Ibrahim, H. M.; Moustafa, A. E. G. A.; Treambu, L.; Bukhari, S. N. A. Synthesis, biological evaluation, docking study and ulcerogenicity profiling of some novel quinoline-2-carboxamides as dual COXs/LOX inhibitors endowed with anti-inflammatory activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *127*, 972–985.
- (274) Nguyen, T.; German, N.; Decker, A. M.; Li, J.-X.; Wiley, J. L.; Thomas, B. F.; Kenakin, T. P.; Zhang, Y. Structure-activity relationships of substituted 1H-indole-2-carboxamides as CB1 receptor allosteric modulators. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 2195–2203.
- (275) Kursanov, D. N.; Parnes, Z. N. Ionic Hydrogenation. *Russ. Chem. Rev.* **1969**, *38*, 812–821.
- (276) Kobilka, B. K. *et al.* Beta-adrenergic receptor allosteric modulators. WO 2019/204768A1, **2019**.
- (277) Zhou, P.; Tian, F.; Lv, F.; Shang, Z. Geometric characteristics of hydrogen bonds involving sulfur atoms in proteins. *Proteins* **2009**, *76*, 151–163.

- (278) Zhu, M.; Wei, W.; Yang, D.; Cui, H.; Cui, H.; Sun, X.; Wang, H. NBS/DBU mediated one-pot synthesis of α -acyloxyketones from benzylic secondary alcohols and carboxylic acids. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 10998–11001.
- (279) Fojan, P.; Jonson, P. H.; Petersen, M. T.; Petersen, S. B. What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. *Biochimie* **2000**, *82*, 1033–1041.
- (280) Stoops, J. K.; Horgan, D. J.; Runnegar, M. T.; Jersey, J. de; Webb, E. C.; Zerner, B. Carboxylesterases (EC 3.1.1). Kinetic studies on carboxylesterases. *Biochemistry* **1969**, *8*, 2026–2033.
- (281) Yang, J.; Zhou, S.; Ji, L.; Zhang, C.; Yu, S.; Li, Z.; Meng, X. Synthesis and structure-activity relationship of 4-azaheterocycle benzenesulfonamide derivatives as new microtubule-targeting agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 5055–5058.
- (282) Mercader, J. V.; Montoya, A. Development of monoclonal ELISAs for azinphos-methyl. 1. Hapten synthesis and antibody production. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1276–1284.
- (283) Becker K. Dissertation. Untersuchungen zur Selektivität der Wechselwirkungen von ausgewählten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit nachgeschalteten Effektoren und deren pharmakologische Beeinflussung, Philipps-Universität Marburg, **2023**.

Summary

Development, synthesis and characterization of small-molecule ligands of G-protein-coupled receptors

Entwicklung, Synthese und Charakterisierung niedermolekularer Liganden G-Protein gekoppelter Rezeptoren

With more than 800 members, G-protein-coupled receptors (GPCRs) represent one of the largest protein superfamilies in humans. GPCRs can be activated by a wide variety of extracellular stimuli and due to their diverse signal transduction, they are associated with many diseases such as cancer, inflammation, immune diseases and the metabolic syndrome. Accordingly, around 30% of approved drugs target GPCRs. They consist of a seven-transmembrane domain with an orthosteric binding pocket in the extracellular region and an intracellular G-protein binding pocket. Because of the often conserved orthosteric binding pocket of GPCR subtypes, the development of selective drugs is challenging. Consequently, the identification and targeting of allosteric binding sites is considered a potential strategy to obtain drugs with increased receptor selectivity and reduced side effects. As part of the GLUE project (G-protein-coupled receptor ligands of underexplored epitopes), this strategy was pursued in the present work, in which the pharmacologically relevant receptor families of endothelin receptors (ETRs) and free fatty acid receptors (FFARs) as well as the orphan receptor GPRC5b served as targets.

In the first part of this thesis, the peptidic ET_BR-ligand 4Ala-ET-1 was synthesized using automated solid-phase peptide synthesis. Afterwards, the *N*-terminus of the resulting peptide was coupled to biotin via a linker in order to obtain a suitable ligand for protein purification of the ET_BR by affinity chromatography. Furthermore, a fluorescence-labeled and three truncated 4Ala-ET-1 derivatives were synthesized. After the completion of the synthesis, the obtained compounds were handed over to the cooperating working groups of the GLUE project for further investigations.

In addition, a fluorescence-labeled FFAR2 ligand, which should serve as a tool compound for a BRET binding assay, was synthesized according to an 11-step literature procedure with slight modifications. Moreover, the core structure of this FFAR2 ligand was linked to biotin via an ethylene glycol derived linker segment in order to obtain an analogous biotinylated derivative for this GLUE target.

In the third part of the work, possible allosteric ligands were evaluated based on docking studies by the working group of Prof. KOLB. The most promising ligands were selected for synthesis, which was then planned and carried out. All resulting compounds were analytically characterized. Consequently, ligands from three ET_BR docking studies were prepared, with two campaigns addressing the intracellular G-protein binding pocket and one addressing the known site 5. These docking studies were used to select seven hits, on the basis of which a total of 41 derivatives were synthesized. Furthermore, two well-known allosteric GPCR modulators and six derivatives of them were synthesized. Subsequently, all compounds were handed over to the working group of Prof. BÜNEMANN for analysis in a FRET-based G-protein binding and receptor sensor assay on the ET_BR at a concentration of 100 µM. In addition, selected compounds were examined on the structurally related GLUE target FFAR3 using analogous assays. In this *in vitro* characterization, no biological activity could be determined for any of the synthesized target compounds, neither on the ET_BR nor the FFAR3.

In a further docking study, the extracellular binding pocket of the orphan receptor GPRC5b was investigated. Based on the docking results, two hits and 42 derivatives were synthesized and analytically characterized. Afterwards, these target compounds should be examined *in vitro* in the working group of Prof. BÜNEMANN with regard to their biological activity on GPRC5b. However, this has not yet been possible due to the lack of an established test system. Therefore, the biological characterization is still pending.

E r k l ä r u n g

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Entwicklung, Synthese und Charakterisierung niedermolekularer Liganden G-Protein gekoppelter Rezeptoren“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 17.04.2024

.....
(Unterschrift mit Vor- und Zuname)

MI-Nummern der Zielverbindungen

Peptidische ET_BR-Liganden		137	2581
Nr.	MI-	138	2595
48	2500	139	2597
49	2502	140	2596
50	2501	141	2576
51	2583	144	2590
52	2584	157	2591
53	2585	158	2594
55	2561	159	2902
Niedermolekulare FFAR2-Liganden		160	2903
Nr.	MI-	161	2900
47	2906	162	2901
75	2909	163	2592
Verbindungen der ersten Dockingstudie an der G-Proteinbindetasche des ET_BR		164	2589
Nr.	MI-	165	2587
84	2505	166	2599
85	2512	167	2904
86	2511	168	2908
87	2507	171	2905
88	2509	172	2907
89	2569	176	2570
92	2563	177	2579
93	2568	178	2580
95	2503	188	2571
102	2504	189	2575
103	2506	197	2588
104	2508	Bekannte allosterische GPCR-Liganden	
Verbindungen der zweiten Dockingstudie an der G-Proteinbindetasche des ET_BR		Nr.	MI-
Nr.	MI-	202	2917
105	2578	203	2910
106	2586	215	2914
107	2593	223	2911
132	2572	224	2915
133	2573	225	2916
134	2574	226	2913
135	2598	227	2912
136	2577	Verbindungen der Dockingstudie an der KS5 des ET_BR	
		Nr.	MI-
		228	2918

234	2919	277	2567
Verbindungen der Dockingstudie am GPRC5b		278	2553
		279	2552
Nr.	MI-	280	2540
		281	2556
235	2513	282	2538
236	2562	287	2566
251	2514	288	2565
252	2525	301	2532
253	2521	302	2546
254	2528	303	2547
255	2526	304	2543
256	2519	305	2557
257	2517	306	2544
258	2541	307	2545
259	2527	308	2542
260	2539	309	2533
267	2523	310	2549
268	2524	311	2535
269	2520	312	2534
272	2536	317	2548
273	2537	318	2558
274	2554	319	2559
275	2551	320	2560
276	2555		

Lebenslauf

Wissenschaftliche Beiträge

Die nachfolgend aufgeführten wissenschaftlichen Beiträge sind aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangen.

Veröffentlichungen

Umbach, S.; Levin, R.; Neumann, S.; Steinmetzer, T.; Dötsch, V.; Bernhard, F.

Transfer mechanism of cell-free synthesized membrane proteins into mammalian cells. *Front. bioeng. biotechnol.* **2022**, *10*, 906295.

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Steinmetzer für die Möglichkeit, meine Promotionsarbeit in seinem Arbeitskreis anfertigen zu dürfen. Vielen Dank für die nette Aufnahme, die zahlreichen Ratschläge, die Freiheit in der Bearbeitung meines Projekts und die gute Betreuung. Es war mir eine Ehre.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meinem Zweitgutachter Prof. Dr. Schlitzer und der gesamten Prüfungskommission für die Begutachtung meiner Dissertation bedanken und ebenso für die Bereitschaft, als Prüfer für die folgende Disputation zur Verfügung zu stehen.

Außerdem ein herzlicher Dank an den ganzen Arbeitskreis Steinmetzer, allen aktiven Mitgliedern Roman, Luna, Heike, Charlotte und Anna-Lisa, sowie allen alten Mitgliedern Oli, Niklas, (Simon) W und H. Zum einen für die wissenschaftlichen Diskussionen, zum anderen aber vielmehr für die lustige und schöne Zeit, in der wir viel erlebt und immer miteinander lachen konnten. Besonders die Bürozeit mit Oli, Niklas und Roman war etwas Unvergessliches und einfach eine einzigartige Kombination an tollen Leuten. Und die ein oder andere Runde Skat durfte natürlich nicht fehlen. Vielen Dank euch, es war eine wunderschöne Laborzeit! Des Weiteren möchte ich mich bei allen Wahlpflichtpraktikanten, Vertiefern und Auszubildenen für die gute Hilfe bedanken.

Ein weiterer Dank an die Mitarbeiter der Service-Abteilungen für die Messungen und die Hilfsbereitschaft bei jeglichen Problemen.

Ebenso möchte ich mich bei den Mitgliedern des GLUE-Projekts für die hilfreichen Gespräche und die schöne Zeit bedanken.

Selbstverständlich möchte ich einen großen Dank an meine Eltern Ute und Holger Neumann und an meinen Bruder Alexander Neumann und allen Freunden richten, die mich in jeglicher Situation unterstützt und mir immer Rückhalt gegeben haben.

Am Schluss gilt ein ganz besonderer Dank meiner Freundin Silva, die mich seit der Schulzeit bis hin zur und während der Promotion begleitet und alles parallel selbst durchlaufen hat. Für die lieben und aufbauenden Worte, wenn es mal nicht so lief wie gewollt. Die ständige Motivation, das Verständnis und vor allem, dass du immer für mich da bist. Wir haben nun auch dieses Kapitel geschafft und werden auch in Zukunft alles gemeinsam mit viel Freude und Spaß schaffen.