

# Synthese und Charakterisierung neuartiger Hemmstoffe der mykobakteriellen DNA Gyrase



## Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (*Doctor rerum naturalium*)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I-Biowissenschaften

der

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Vorgelegt von

Dipl.-Pharm. Andreas Beuchel

Geboren am 11.06.1990 in Gera



Eingereicht: 04.05.2022

Gutachter: (1) Prof. Dr. Peter Imming

(2) Prof. Dr. René Csuk

(3) Prof. Dr. Thomas Dick

Mündliche Prüfung: 14.07.2022



*Wir brauchen eine wesentlich neue  
Denkungsart, wenn die Menschheit  
am Leben bleiben soll.*

Albert Einstein



# INHALTSVERZEICHNIS

---

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	XI
Tabellenverzeichnis.....	XV
1 Einleitung.....	1
1.1 Nicht-tuberkulöse Mykobakterien.....	1
1.1.1 Definition, Systematik, Mikrobiologie.....	1
1.1.2 Infektionen, Therapie, Drugpipeline.....	4
1.2 Topoisomeraseinhibitoren.....	14
1.2.1 Einteilung der Topoisomerasen.....	14
1.2.2 Gyrasen.....	14
1.2.3 Neue Bakterielle Topoisomeraseinhibitoren (NBTIs).....	17
1.3 Zielstellung der Arbeit.....	25
2 Resultate.....	27
2.1 Synthesen.....	27
2.1.1 Überblick.....	27
2.1.2 Synthese der anellierten 4-Aminopyridinderivate.....	29
2.1.3 Synthese der Trifluormethansulfonsäureester.....	34
2.1.4 Synthese der Anilinderivate.....	36
2.1.5 Synthese der Amidbindung.....	38
2.1.6 Entfernung der Cbz- bzw. Boc-Schutzgruppe.....	40
2.1.7 Alkylierung der sekundären Amine.....	41

---

2.1.8	Synthese der 8-Aminochinolinderivate.....	44
2.1.9	Alternativer Syntheseweg zur Darstellung der P4C.....	45
2.1.10	Synthese der Amide aus den Carbamiden.....	46
2.1.11	Synthese des Sulfonamidderivats.....	47
2.1.12	Synthese der Mesylate bzw. Tosylate.....	49
2.1.13	Synthese der finalen Produkte aus den Benzaldehyden.....	51
2.1.14	Vergleich der verwendeten Synthesewege.....	52
2.2	Mikrobiologische Untersuchungen.....	55
2.2.1	Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration.....	55
2.2.2	Bestimmung der Minimalen Bakteriziden Konzentration (MBK).....	61
2.2.3	Targetidentifizierung.....	64
2.2.4	Zytotoxizitätsuntersuchungen.....	69
2.3	<i>In silico</i> Docking-Untersuchungen.....	70
2.4	Biochemische Untersuchungen.....	73
2.4.1	Bestimmung der IC <sub>50</sub> -Werte gegen Wildtyp DNA Gyrase.....	73
2.4.2	Untersuchungen mit rekombinanter Gyrase von resistenten Mutanten.....	78
2.4.3	hERG-Inhibitionsassay.....	79
2.5	Pharmakokinetische Untersuchungen.....	82
2.5.1	<i>In vitro</i> Pharmakokinetik.....	82
2.5.2	<i>In vivo</i> Untersuchungen.....	87
2.5.3	Verbesserung der Plasmastabilität und der oralen Bioverfügbarkeit.....	88
3	Zusammenfassung und Ausblick.....	91
4	Experimenteller Teil.....	95
4.1	Synthesen.....	95
4.1.1	Geräte und Materialien.....	95

---

4.1.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften.....	96
4.1.3	Spezifische Vorschriften und analytische Daten .....	100
4.2	Mikrobiologische Untersuchungen .....	139
4.2.1	Bakterielle Stämme und Kulturmedien .....	139
4.2.2	Bestimmung der <i>in vitro</i> MHK.....	140
4.2.3	Bestimmung der Bakterizidie .....	140
4.2.4	Selektion resistenter Mutanten, Genom- und Targetsequenzierung.....	141
4.2.5	RecA-Reporterstamm.....	141
4.2.6	Zytotoxizitätsuntersuchung.....	142
4.3	<i>In silico</i> Modellierung und Docking .....	143
4.4	Biochemische Untersuchungen .....	144
4.4.1	Gewinnung der rekombinanten <i>Mabs</i> DNA Gyrase.....	144
4.4.2	Bestimmung der IC <sub>50</sub> -Werte gegen <i>Mabs</i> DNA Gyrase.....	146
4.4.3	hERG Aktivitätsbestimmung.....	146
4.5	Pharmakokinetische Untersuchungen .....	147
4.5.1	Löslichkeitsbestimmung.....	147
4.5.2	<i>In vitro</i> Plasamastabilität.....	147
4.5.3	<i>In vitro</i> Pharmakokinetik .....	148
4.5.4	<i>In vivo</i> Stabilitätsuntersuchung.....	148
5	Referenzen .....	149
	Danksagung .....	165
	Lebenslauf .....	167
	Publikationsliste .....	169
	Eigenständigkeitserklärung .....	171



# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

+/-BINAP	rac-(±)-2,2'-Bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl
4-DMAP	4-Dimethylaminopyridin
ABC	ATP binding cassette
ADME	Absorption-Distribution-Metabolismus-Exkretion
ATCC	American Type Culture Collection
ATS	American Thoracic Society
AUC	Area under the curve
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Boc <sub>2</sub> O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
Caco2	immortalisierte Colonkarzinomzellen
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CCUG	Culture Collection University Of Gothenburg
CDI	Center for Discovery and Innovation
CL <sub>hep</sub>	hepatische Clearance
CL <sub>int</sub>	intrinsische Clearance
CLR	Clarithromycin
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CTD	C-terminale Domäne
CYP450	Cytochrom P 450
DavePhos	2-Dicyclohexylphosphino-2'-( <i>N,N</i> -dimethylamino)-biphenyl
DCM	Dichlormethan

DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMI	1,3-Dimethylimidazolidin-2-on
EKG	Elektrokardiogramm
EMA	European Medicines Agency
EmbB	Membran-assoziierte Arabinosyltransferase
<i>erm</i> (41)	Erythromycin ribosome methyltransferase
ERS	European Respiratory Society
ESCMD	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
ESI-MS	Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie
EtOH	Ethanol
FDA	Food and Drug Administration
FQ	Fluorchinolone (Fluoroquinolones)
GIT	Gastrointestinaltrakt
GPL	Glycopeptidolipide
GPT	Gepotidacin
GyrA/B	Gyrase (Untereinheit A/B)
HATU	[O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorphosphat]
hERG	human Ether-a-go-go related gene
HMH	Hackensack Meridian Health
hsp	Hitzeschockprotein
IAM	Immobilized Artificial Membrane Chromatography

---

IC	Inhibitorische Konzentration
IDSA	Infectious Diseases Society of America
KBE	Koloniebildende Einheiten
$k_{el}$	Eliminationskonstante
LHS	Left-hand side
LM	Lösungsmittel
MAB	<i>Mycobacterium abscessus</i> -Gruppe
<i>Mabs</i>	<i>Mycobacterium abscessus</i>
MAC	<i>Mycobacterium-avium</i> -Komplex
<i>Mav</i>	<i>Mycobacterium avium</i>
MBK	Minimale bakterizide Konzentration
MDCK	Madin Darby Canine Kidney (Epithelial Cells)
MDR-TB	Multi drug resistant tuberculosis
MeOH	Methanol
MGI	Mycobacterial gyrase inhibitors
MHK	Minimale Hemmkonzentration
<i>Mlep</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
MmpL4	Mycobacterial membrane protein Large
MMV	Medicines for Malaria Venture
Ms	Mesylat
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MXF	Moxifloxacin
NBTI	Novel bacterial topoisomerase inhibitors

NMR	Nuklearmagnetresonanzspektroskopie
NTM	Nicht-tuberkulöse Mykobakterien
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffer solution
p.o.	<i>per os</i>
P4C	Piperidin-4-carboxamide
PAMPA	Parallel Artificial Membrane Permeability Assay
PhN(Tf) <sub>2</sub>	1,1,1-Trifluor- <i>N</i> -phenyl- <i>N</i> - ((trifluormethyl)sulfonyl)methansulfonamid
PK	Pharmakokinetik
RGM	rapid-growing mycobacteria
RHS	Right-hand side
RIF	Rifampicin
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
s.c.	<i>subcutan</i>
SC	Supercoiling
SGM	slow-growing mycobacteria
SRB	Sulforhodamin B
t <sub>1/2</sub>	Halbwertszeit
TEA	Triethylamin
Tf	Triflat

---

TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TOPRIM	Topoisomerase-Primase Domäne
V <sub>D</sub>	Verteilungsvolumen
WHD	Winged-Helix Domäne



# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

Abbildung 1	Mikroskopisches Bild einer Kultur von <i>Mabs</i> Bamboo .....	3
Abbildung 2	Chemische Struktur eines Glykopeptidolipids (GPL) R = OH, OCH <sub>3</sub> .....	3
Abbildung 3	Zelluläre Prozesse einer NTM-Infektion in der Lunge (nach <sup>1</sup> ) .....	6
Abbildung 4	Chemische Strukturen bekannter Arzneistoffe mit Wirkung gegen NTM.....	10
Abbildung 5	Chemische Strukturformeln neuartiger Wirkstoffe gegen NTM .....	12
Abbildung 6	Schema der Funktion der prokaryotischen Topoisomerase II.....	15
Abbildung 7	Chemische Strukturen der Fluorchinolone Ciprofloxacin ( <b>A</b> ) und Moxifloxacin ( <b>B</b> ). .....	16
Abbildung 8	Chemische Struktur von NBTIs am Beispiel von GSK299423. <sup>53</sup> .....	18
Abbildung 9	Häufige Heterocyklen für LHS der NBTIs (nach <sup>51</sup> ).....	20
Abbildung 10	Häufig verwendete Strukturen für den Linker von NTBIs (nach <sup>51</sup> ).....	21
Abbildung 11	Röntgenkristallografische Aufnahme des Co-Komplexes aus GyrB27–A56 von <i>S. aureus</i> mit GSK299423 und DNA. ....	21
Abbildung 12	Häufig verwendete Strukturen für die RHS von NBTIs (nach <sup>51</sup> ) .....	22
Abbildung 13	Chemische Strukturen von Beispielen für atypische NBTIs. <sup>a 62, b 63</sup> .....	23
Abbildung 14	Chemische Strukturen von Beispielen für MGIs. ....	24
Abbildung 15	Chemische Strukturformel und antimykobakterielle Aktivität von <b>844</b> . .....	25
Abbildung 16	Retrosynthese von <b>844</b> . .....	27
Abbildung 17	Syntheschema für die Darstellung der Piperidin-4-carboxamide.....	28
Abbildung 18	Syntheseweg A für die Darstellung der Heterocyklen .....	29
Abbildung 19	Syntheseweg B für die Darstellung von 6-Methoxy-1 <i>H</i> -chinolin-4- on. <sup>76</sup> .....	30
Abbildung 20	Darstellung der Aminomethylenmeldrumsäurekonjugate.....	31
Abbildung 21	Mechanismus Cyclisierung am Beispiel des Naphthyridons.....	32
Abbildung 22	Synthese des Naphthyridons bzw. Chinolons.....	33
Abbildung 23	Mögliche Synthesewege für <b>5a</b> .....	34

---

Abbildung 24	Durchgeführte Synthesewege für <b>4a</b> und <b>4b</b> .....	36
Abbildung 25	In der Literatur beschriebene Anwendungen der Reaktion <sup>84</sup> .....	37
Abbildung 26	Darstellung der Anilinderivate .....	37
Abbildung 27	Darstellung der Anilide aus verschiedenen Anilinen unter Verwendung von HATU.....	39
Abbildung 28	Darstellung der Anilide aus verschiedenen Carbonsäuren unter Verwendung von HATU.....	40
Abbildung 29	Entfernung der Cbz- bzw. Boc-Schutzgruppe .....	41
Abbildung 30	Alkylierung der sekundären Amine.....	42
Abbildung 31	Vergleich der <sup>1</sup> H-NMR von <b>8a</b> und dem Nebenprodukt <b>8m</b> in CDCl <sub>3</sub> und 400 MHz.....	43
Abbildung 32	Darstellung der 2-Methoxychinolinderivate.....	44
Abbildung 33	Alternativer Syntheseweg für die Darstellung von <b>8n</b> .....	45
Abbildung 34	Darstellung der primären Carboxamide und Palladium-katalysierte Kupplung .....	47
Abbildung 35	Darstellung des primären Sulfonsäureamids und Palladium-katalysierte Kupplung .....	48
Abbildung 36	Darstellung der Phenylethylmesylate bzw. tosylate. ....	49
Abbildung 37	Darstellung der Benzylaminderivate durch reduktive Aminierung .....	51
Abbildung 38	Vergleich der verschiedenen Synthesemethoden zur Darstellung der P4C.....	53
Abbildung 39	Bakterizidie und anti-Biofilmaktivität von <b>844</b> und <b>844-TFM</b> gegen <i>Mabs</i> .....	62
Abbildung 40	Komplementierung von P4C-resistenten Mutanten mit Wildtyp-GyrAB. ....	67
Abbildung 41	Einfluss verschiedener Gyraseinhibitoren und Clarithromycin CLR auf die LuxCDABE-Expression und das Wachstum von <i>Mabs ssp. abs</i> ATCC 19977. ....	68
Abbildung 42	Simulierte Bindungsmodi von <b>844</b> , <b>844-TFM</b> und Gepotidacin im Homologiemodell von <i>Mabs</i> GyrA.....	71

---

Abbildung 43	Simulierter Bindungsmodus von <b>8q</b> und <b>8p</b> .....	72
Abbildung 44	Effekt von P4C auf die Enzymaktivität von Wildtyp <i>Mabs</i> Gyrase und <i>Mabs</i> Gyrase D91N .....	78
Abbildung 45	Effekt von <b>844-TFM</b> auf hERG-Ströme .....	80
Abbildung 46	<i>In vitro</i> Stabilität von <b>844-TFM</b> im Plasma von Maus, Hase, Affe und Mensch über 24 h .....	86
Abbildung 47	<i>In vivo</i> PK Parameter von <b>844-TFM</b> .....	88
Abbildung 48	Stabilität von <b>844-TFM</b> und <b>8u</b> .....	89
Abbildung 49	Struktur–Wirkungsbeziehungen, welche sich aus den getesteten Derivaten von <b>844</b> ergeben. ....	92
Abbildung 50	Vorschläge für Derivate von <b>844-TFM</b> . ....	94



# TABELLENVERZEICHNIS

---

Tabelle 1	Schnell und langsam wachsende Arten von nicht-tuberkulösen Mykobakterien <sup>1</sup> .....	2
Tabelle 2	Struktur, Enzymhemmung und antibakterielle Aktivität von ausgewählten Leitstrukturen verschiedenener NBTIs.....	18
Tabelle 3	Minimale Hemmkonzentrationen (MHK) der synthetisierten Verbindungen mit modifizierter RHS.....	56
Tabelle 4	MHK der Verbindungen mit modifizierter LHS. ....	59
Tabelle 5	MHK der Verbindungen mit modifiziertem Linker. ....	60
Tabelle 6	Charakterisierung der <b>844</b> - und <b>844-TFM</b> -resistenten Mutanten von <i>Mabs</i> .....	65
Tabelle 7	Enzymhemmung der synthetisierten Verbindungen.....	75
Tabelle 8	Kinetische Löslichkeit, MHK, IC <sub>50</sub> und kalkulierte clogP-Werte der Substanzen <b>844-TFM</b> , <b>8s</b> , <b>8r</b> .....	83
Tabelle 9	<i>In vitro</i> Stabilität von <b>844-TFM</b> in murinen Mikrosomen. ....	85



# 1 EINLEITUNG

---

## 1.1 NICHT-TUBERKULÖSE MYKOBAKTERIEN

### 1.1.1 DEFINITION, SYSTEMATIK, MIKROBIOLOGIE

Nicht-tuberkulöse Mykobakterien (NTM) sind eine Gruppe von ubiquitär vorkommenden Mikroorganismen und gehören zum Phylum der Actinobacteria. Sie besiedeln sowohl Böden als auch Gewässer. NTM zählen zu der Gattung der Mykobakterien, welchen auch *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) und *Mycobacterium leprae* (*Mlep*) angehören. Zurzeit werden den NTM über 200 Arten zugeordnet.<sup>1</sup>

Charakteristisch für Mykobakterien ist ihr, im Vergleich zu anderen Mikroorganismen, langsames Wachstum. Ihre Verdopplungszeit beträgt je nach Art und Bedingungen 20–24 h.<sup>2</sup> Anhand ihrer Wachstumsgeschwindigkeit unterscheidet man zwischen langsam wachsenden (slow-growing, SGM) und schnell wachsenden (rapid-growing, RGM) Mykobakterien.<sup>3</sup> SGM bilden erst nach sieben Tagen sichtbare Kolonien bei der Kultivierung auf Agarplatten. Zu ihnen zählen u.a. *Mycobacterium avium*, *M. xenopi* und *M. kansasii*. Die Gruppe der RGM bilden bei der Kultivierung schon nach weniger als sieben Tagen sichtbare Kolonien, hierzu zählen *Mycobacterium abscessus* (*Mabs*), *M. fortuitum* und *M. smegmatis* (Tabelle 1). Außerdem bilden manche Arten bei der Einstrahlung von Sonnenlicht ein Pigment. Diese Eigenschaft dient als zusätzliches Kriterium für die Differenzierung der Spezies.<sup>4</sup> Die genaue Bestimmung der Art erfolgt durch die Ermittlung der charakteristischen 16S rRNA Sequenz.<sup>5</sup>

Ein wesentliches Merkmal von Mykobakterien ist ihre lipidreiche Zellwand. Sie ist ein Grund für die hohe Widerstandsfähigkeit der Bakterien gegenüber äußeren Einflüssen wie Säuren, Basen und antimikrobiellen Stoffen.<sup>6</sup> Entsprechend ihrer säurebeständigen Anfärbbarkeit werden Mykobakterien auch als säurefeste Stäbchen bezeichnet. Ihr mikroskopischer Nachweis gelingt dementsprechend durch Färbung nach Ziehl-Neelsen.

Obwohl sich Mykobakterien nicht nach Gram färben lassen, zählen sie dennoch zu den Grampositiven Bakterien. Entscheidend hierfür ist die Peptidoglykanschicht (Murein) auf der basalen

Seite der Zellwand, welche bei typischen Vertretern der Gram-positiven Bakterien für die Färbung verantwortlich ist.

**Tabelle 1** Schnell und langsam wachsende Arten von nicht-tuberkulösen Mykobakterien<sup>1</sup>

Langsam wachsende Mykobakterien	Schnell wachsende Mykobakterien
<i>Mycobacterium-avium</i> -Komplex (MAC)	<i>Mycobacterium-abscessus</i> -Gruppe (MAB)
<ul style="list-style-type: none"> <li>  <i>Mav</i></li> <li>  <i>Mav chimera</i></li> <li>  <i>Mav intracellulare</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>  <i>Mabs ssp. abscessus</i></li> <li>  <i>Mabs ssp. massiliense</i></li> <li>  <i>Mabs ssp. bolletti</i></li> <li>  <i>M. chelonae</i></li> </ul>
<i>M. xenopi</i>	<i>M. fortuitum</i>
<i>M. kansasii</i>	<i>M. smegmatis</i>

### **Morphotypen der NTM**

NTM können in zwei Formen auftreten, welche sich in ihrer Morphologie unterscheiden. Glatte (smooth, S) Kolonien besitzen eine gleichmäßige, runde Form mit reflektierender Oberfläche (Abbildung 1). Raue (rough, R) Kolonien hingegen sind unregelmäßig geformt mit einer gerippten Oberfläche.

Diese Morphotypen treten u.a. bei Vertretern der MAB-Gruppe, *M. kansasii* und *M. avium* auf und unterscheiden sich in ihren pathophysiologischen Merkmalen. Der Übergang von der S- in die R-Form ist für *Mabs* weitreichend untersucht und wird auf die An- bzw. Abwesenheit von Glycopeptidolipiden (GPL) zurückgeführt (Abbildung 2). GPL sind oberflächenständige Glykolipide und in die Mykolsäureschicht der Zellwand eingebettet. Sie sind kovalent an den Arabino-galactan-Peptidoglykan-Komplex gebunden.

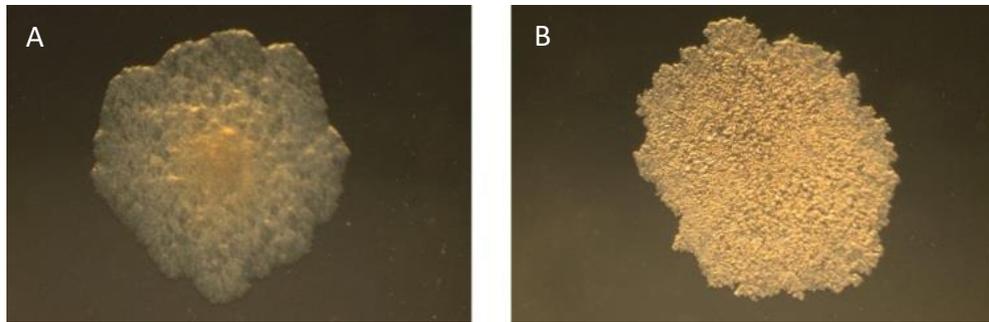


Abbildung 1 A Mikroskopisches Bild einer Kultur von *Mabs* Bamboo mit glattem (smooth, S) Phänotyp. B *Mabs* K21 mit rauem (rough, R) Phänotyp.<sup>7</sup>

Strukturell bestehen GPL aus 3-Hydroxy- und 3-Methoxy- $C_{28-30}$ -Fettsäuren, welche über eine Amidbindung an ein Tripeptid (D-Phe-d-allo-Thr-D-Ala-L-alaninol) gebunden sind.

Dieses ist an seinen Hydroxylgruppen je nach Spezies unterschiedlich glykosyliert. In *Mabs* kommen vor allem triglykosylierte GLPs mit 3,4-Diacetyl-6-desoxy- $\alpha$ -L-talose am L-allo-Threonin als glykosidische Reste vor. Am L-Alaninolteil des Tripeptids ist ein Disaccharid aus 3,4-Dimethoxy- $\alpha$ -L-Rhamnose und  $\alpha$ -L-Rhamnose glykosidisch gebunden.<sup>8</sup>

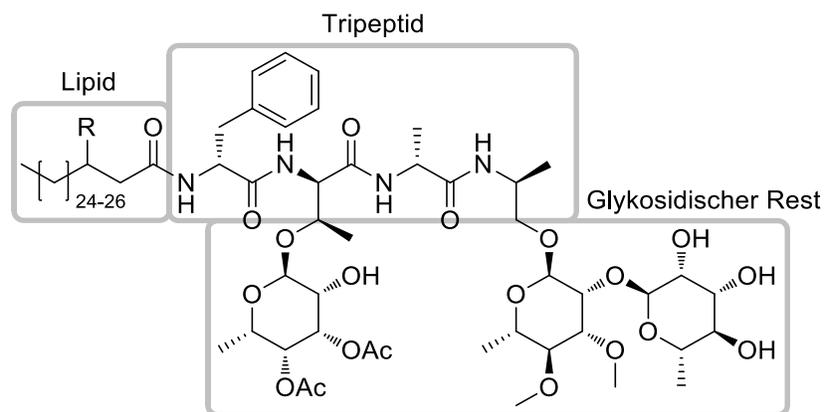


Abbildung 2 Chemische Struktur eines Glykopeptidolipids (GPL) R = OH, OCH<sub>3</sub>.

GPL beeinflusst wesentlich die Hydrophobie der bakteriellen Zellwand. In der S-Form produzieren die Mykobakterien GPL und transportieren es zur äußeren Schicht der Zellwand. Der Transport erfolgt durch die Transportproteine MmpL4a und MmpL4b. Sind diese Proteine funktional,

wachsen die Kolonien in der S-Form. Kommt es durch Mutationen oder Gendefekte zur fehlerhaften Expression von MmpL4a oder MmpL4b, gelangt kein GPL an die Oberfläche der Zellwand. Dadurch wird die Zelloberfläche hydrophober und die Kolonien gehen in die R-Form über.<sup>1</sup>

Die R-Form weist im Vergleich zur S-Form eine höhere Hydrophobie auf. Hierdurch wird die Beweglichkeit der Bakterien eingeschränkt und die Zellaggregation begünstigt. Weiterhin wird die R-Form mit der Bildung von Biofilmen assoziiert. Diese besitzen im Vergleich zur S-Form eine höhere Toleranz gegen saure Milieus, Peroxide und antimikrobielle Substanzen.<sup>9</sup> Der Übergang von der S- in die R-Form ist von besonderer Bedeutung für die Rolle von NTM als Krankheitserreger, denn die R-Form führt zu höherer Virulenz und dominiert bei schwereren Infektionen.<sup>1</sup> Im folgenden Abschnitt wird der Stellenwert von NTM als Pathogene besprochen.

## 1.1.2 INFEKTIONEN, THERAPIE, DRUGPIPELINE

### Epidemiologie

Die Zahl der NTM-Neuinfektionen steigt seit drei Jahrzehnten an. Ob der Anstieg durch verbesserte diagnostische Verfahren, erhöhte Aufmerksamkeit gegenüber der Erkrankung oder durch einen tatsächlichen Anstieg der Fälle bedingt ist, ist nicht verlässlich belegt. Die Erhebung epidemiologischer Daten ist durch die fakultative Pathogenität der Erreger erschwert. Die Isolation des Erregers aus Patienten ist nicht immer verbunden mit einer klinischen Infektion. Außerdem unterliegt die Krankheit keiner behördlichen Meldepflicht.<sup>3</sup>

In Deutschland stieg die Zahl der NTM-Patienten in der Zeit von 2009-2014 von 2.3 auf 3.3 Infizierte/100 000 Einwohner an. Die höchste Prävalenz wurde in der Altersklasse  $\geq 50$  Jahren und besonders bei den über Achtzigjährigen gefunden.<sup>10</sup> In den USA stieg die Prävalenz von 2.4 Fällen/100 000 Einwohner in den frühen Achtzigern auf 15.2 Fällen/100 000 Einwohnern in 2013.<sup>11</sup> In der Kohorte über 65 Jahren stieg die Zahl um mehr als das Doppelte von 20 Fällen/100.000 Einwohner (1997) auf 47 Fälle/100 000 Einwohner (2007).<sup>12</sup> Eine ähnliche Studie aus Kanada berichtet einen Anstieg von 4.65 Fällen/100 000 Einwohnern in 1998 auf 9.08 Fällen/100 000 Einwohnern in 2010.<sup>13</sup> Im Vereinigten Königreich hat sich die Zahl der NTM-Infizierten zwischen 1995 und 2006 von 0.9 Fällen/100 000 Einwohnern auf 2.9 Fällen/100 000 Einwohnern mehr als verdreifacht.<sup>14</sup> In Südkorea stieg die Prävalenz zwischen 2002 und 2008 um 62 %.<sup>15</sup> Anders als in

westlichen Staaten, in denen MAC dominant ist, wurden hier Vertreter der MAB-Gruppe als häufigste Erreger festgestellt. Steigende Fallzahlen sind auch aus China, Japan, Brasilien, Taiwan und dem mittleren Osten bekannt.<sup>2</sup>

### **Infektionen durch NTM**

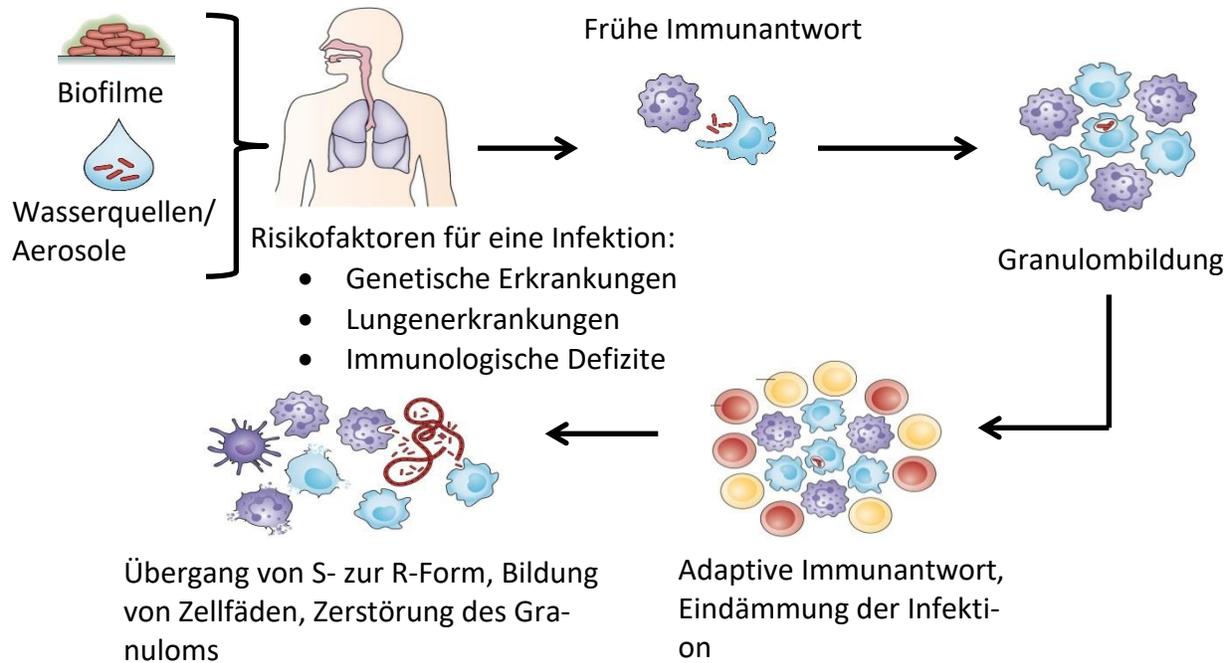
NTM sind ubiquitär vorkommende fakultative Pathogene, weshalb die Exposition vor allem über die Umwelt stattfindet. Die häufigste Quelle für NTM-Infektionen sind kontaminierte Wasserleitungen. In Duschköpfen wurde dabei die höchste Keimlast festgestellt. Durch die Bildung von Aerosolen gelangen die Bakterien in die Luft und schließlich in die Lungen. Obwohl Infektionen mit NTM auch andere Gewebe wie Haut und Weichteile betreffen können, sind pulmonale Erkrankungen durch NTM häufiger als extrapulmonale.<sup>1</sup>

Eine klinische Infektion mit NTM hängt wesentlich vom immunologischen Zustand des Wirts ab. Dazu zählen vor allem Patienten mit erworbenem (HIV/AIDS) oder angeborenem Immundefekt. Mutationen im Interferon- $\gamma$ -Signalweg führen zu einer erhöhten Anfälligkeit für *Mav* und *Mabs*. Patienten unter Therapie mit TNF- $\alpha$ -Inhibitoren tragen ein gesteigertes Risiko zu erkranken. Außerdem ist die Gabe von immunsupprimierenden Wirkstoffen ein prädisponierender Faktor für NTM-Infektionen. Ebenso besitzen Raucher ein erhöhtes Risiko an NTM zu erkranken.<sup>1</sup>

Neben den immunologischen Faktoren stellen pulmonale Erkrankungen ein erhebliches Risiko für NTM-Infektionen dar. Erworbene Lungendefekte wie COPD, vorausgegangene Lungentuberkulose, Bronchiektasie und Lungenkrebs begünstigen eine Besiedlung der Lunge mit NTM. Wegen der eingeschränkten mukoziliären Clearance und der allgemein schlechten Lungenfunktion, können die Krankheitserreger nicht ausreichend eliminiert werden. Genetische Risikofaktoren, welche die Lunge betreffen, sind zystische Fibrose und  $\alpha$ -1-Antitrypsinmangel. Unter den Patienten mit zystischer Fibrose entwickeln etwa 10-20 % eine NTM-Infektion.<sup>1</sup>

### **Pathogenese**

Die zellulären Prozesse bei einer Infektion mit NTM ähneln denen der Tuberkulose. Nach der Kolonisierung der Lunge kommt es zur Rekrutierung von immunkompetenten Zellen wie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. Nach der Phagozytose sind die Erreger in der Lage, in Makrophagen zu überdauern und entgehen der Inaktivierung.



**Abbildung 3 Zelluläre Prozesse einer NTM-Infektion in der Lunge (nach <sup>1</sup>)**

In der Folge werden inflammatorische Zytokine ausgeschüttet, wodurch vermehrt Immunzellen zum Infektionsherd migrieren. Es kommt zur Ansammlung immunologischer Zellen, welche im Zuge der adaptiven Immunantwort von den vermehrt rekrutierten B- und T-Zellen zum Granulom eingeschlossen werden.

Für den weiteren Verlauf der Infektion ist es von Bedeutung, ob die besiedelnde Spezies von der S- in die R-Form übergehen kann. Durch die veränderten Oberflächeneigenschaften der R-Form bilden die Kolonien fadenartige Strukturen und Biofilme. Diese widerstehen der Phagozytose und führen zur Zerstörung des Granuloms, wodurch es zu einer massiven Gewebeschädigung kommt (Abbildung 3).<sup>1</sup>

### **Therapie und Resistenzen**

Die medikamentöse Therapie einer NTM-Infektion ist durch eine lange Behandlungsdauer und ein multi-antibiotisches Regime gekennzeichnet. Die genaue Art der Antibiotika und die Dauer der Behandlung richten sich nach der isolierten Spezies. In jedem Fall muss vor Einleitung der Therapie sichergestellt werden, ob die positive Sputumkultur auch mit einer klinischen Erkrankung assoziiert ist. Weil NTM fakultativ pathogene Erreger sind, ist deren Nachweis nicht grund-

sätzlich mit einer Erkrankung verbunden. Vielmehr muss überprüft werden, ob die Kriterien für eine solche Erkrankung erfüllt sind. Diese schließen radiologische und mikrobiologische Befunde ein. Zur Therapie einer NTM-Infektion beziehen sich die aktuellen Empfehlungen der Fachgesellschaften (ATS/ERS/ESCMID/IDSA) auf die häufigsten Erreger: MAC, *M. kansasii*, *M. xenopi* und *Mabs*. Diese Arten sind für mehr als 90 % der NTM-Infektionen verantwortlich.<sup>16</sup> In allen Fällen ist ein *in vitro* Sensitivitätstest der Kultur vor Beginn der Behandlung empfohlen. Dadurch soll festgestellt werden, ob bereits Resistenzen gegen bestimmte Wirkstoffe vorliegen, welche bei der Auswahl der Antibiotika berücksichtigt werden müssen. Im Folgenden sind die Empfehlungen für den MAC und der MAB-Gruppe als wichtigste Erreger zusammengefasst.

### MAC

Die Basis der Therapie bilden die Makrolidantibiotika Azithromycin und Clarithromycin. Azithromycin ist wegen der besseren allgemeinen Verträglichkeit, weniger Interaktionen mit anderen Medikamenten und einmaliger Tagesdosis bei gleicher Effektivität gegenüber Clarithromycin vorzuziehen. Die Makrolide sollten mit zwei weiteren wirksamen Substanzen aus dem Sensitivitätstest kombiniert werden. Empfohlen ist die Kombination mit Ethambutol und einer weiteren wirksamen Substanz. Ein Rifamycin (Rifampicin oder Rifabutin) wird häufig eingesetzt, ist aber in den Richtlinien nicht explizit genannt. Mit dem multi-antibiotischen Regime soll verhindert werden, dass sich während der Therapie Resistenzen ausbilden. Dabei werden die Arzneimittel dreimal wöchentlich verabreicht. Patienten mit fortgeschrittenen Lungenschädigungen sollten mit parenteralem Amikacin oder Streptomycin behandelt werden. Bei schweren Infektionen soll die Dosis durch tägliche Gabe erhöht werden. Seit kurzem besteht eine Zulassung der FDA und der EMA für eine liposomale Amikacinzubereitung zur inhalativen Gabe bei refraktären MAC-Infektionen. Bei neu diagnostizierter Infektion ist diese Zubereitung nicht empfohlen. Die Dauer der Therapie richtet sich nach der negativen Sputumkultur. Vom Zeitpunkt der Sputumkonversion sollte die Therapie mindestens 12 Monate lang fortgeführt werden.<sup>16</sup>

### MAB

Die Empfehlung für die Therapie pulmonaler Infektionen durch *Mabs* besteht aus einer Initialphase und einer Erhaltungsphase. In der Initialphase werden bis zu drei parenterale Wirkstoffe mit zwei bis drei oralen kombiniert. Die Dauer der Initialphase sollte mindestens vier Wochen

betragen. Die Erhaltungsphase besteht aus zwei bis drei oralen antibakteriellen Stoffen, wobei einer gegen inhalatives Amikacin ausgetauscht werden kann. Diese Therapiephase sollte mindestens 12 Monate nach Sputumkonversion fortgeführt werden. Der Einsatz von Makroliden hängt davon ab, ob der Erreger ein intaktes *erm41* besitzt, was zu induzierbarer Resistenz gegen diese Wirkstoffklasse führt. Im Gegensatz hierzu, kann die Resistenz auch durch eine Mutation des rII Gens der 23S rRNA erworben werden. Je nachdem, ob eine intrinsische oder durch Mutation erworbene Resistenz (oder beides) vorliegt, werden verschiedene Kombinationen empfohlen. Wegen des Schweregrads einer *Mabs*-Infektion, ihrer eingeschränkten *in vitro* Empfindlichkeit gegen die meisten antibakteriellen Stoffen, dem Potenzial für Resistenzbildung und dem schnelleren Verlauf im Vergleich zu anderen NTM-Infektionen, liegen keine gesicherten allgemeinen Therapieempfehlungen bei einer *Mabs*-Infektion vor.<sup>16</sup>

### **Intrinsische Resistenz**

Als intrinsische Resistenz bezeichnet man Resistenzmechanismen von Bakterien, welche nicht durch Veränderung des Genoms hervorgerufen werden und somit bei allen Individuen einer Spezies auftreten. NTM besitzen eine sehr lipophile Zellwand, diese macht die Mykobakterien unempfindlich gegen hydrophile Verbindungen. Gegen das Antituberkulotikum Ethambutol besitzt *Mabs* eine Varianz in *embB* im Vergleich zu *Mtb*. *EmbB* kodiert die Arabinosyltransferase, das Target von Ethambutol. Die Varianz führt zu einer geänderten Aminosäuresequenz im Protein, wodurch *Mabs* unempfindlich gegenüber Ethambutol ist. Weitere intrinsische Resistenzen von NTM betreffen z.B. Rifampicin, Amikacin und Bedaquilin.<sup>1</sup>

### **Adaptive Resistenz**

Adaptive Resistenzen bilden sich unter bestimmten Umwelteinflüssen wie z.B durch Exposition mit antibakteriellen Substanzen. Dabei kommt es jedoch nicht zur Veränderung des genetischen Materials, sondern zu einer gesteigerten Gen- oder Proteinexpression als Antwort auf die externen Reize. Ein Beispiel hierfür ist die adaptive Resistenz von *Mabs* gegen Makrolide wie Clarithromycin und Azithromycin. Die Substanzen induzieren die Expression von *erm41*, welches eine ribosomale RNA-methylase kodiert. Das Enzym methyliert das A2058 Nukleotid der ribosomalen 23S rRNA. Dadurch wird das Target der Makrolide verändert und es kommt zur Resistenz.<sup>17</sup>

## **Erworbene Resistenz**

Erworbene Resistenzen entstehen durch Mutationen der Gene, welche das Target einer Substanz kodieren. In *Mabs* und *Mav* ist bekannt, dass die dauerhafte Therapie mit Makroliden zu einer Resistenz durch Alternierung der Nukleotide 2058 und 2059 in *rrl* der 23S rRNA führen kann.<sup>18</sup> In ähnlicher Weise führt die Anwendung von Aminoglykosiden zu Mutationen in *rrs* der 16S rRNA. Diese Veränderungen führen in *Mav*, *M. intracellulare* und *M. chimera* zu Resistenzen gegen Kanamycin, Amikacin und Tobramycin.<sup>1</sup>

## **Drug-pipeline**

Aufgrund der beschriebenen vielseitigen Resistenzmechanismen von NTM und *Mabs* im Besonderen sind die Genesungsraten unter der Standardtherapie ungenügend. Die lange Therapiedauer von mehr als 12 Monaten stellt ein weiteres Problem der bestehenden Empfehlungen dar. Zudem ist das Auftreten von unerwünschten Arzneimittelwirkungen und toxischen Effekten häufig therapielimitierend. Zusätzlich kommt es häufig bei erfolgreich therapierten Patienten zu einer refraktären Infektion nach Therapieende. Darum sind die Erforschung effektiverer Substanzen und die Entwicklung neuer Therapieregime von hoher Relevanz für die Verbesserung der medikamentösen Behandlung dieser Infektionen. Um zu neuen Behandlungsoptionen zu gelangen, werden zwei Strategien verfolgt: Zum einen die Entdeckung neuer chemischer Klassen von Wirkstoffen, zum anderen die Umwidmung der Indikation von bekannten Substanzen.<sup>19</sup>

### *Umwidmung bekannter Substanzen*

Die Umwidmung von bekannten und bereits zugelassenen Wirkstoffen bietet attraktive Vorteile gegenüber der Neuentwicklung. Die regulatorischen Anforderungen für die Zulassung von etablierten Substanzen sind weniger aufwendig. Dadurch wird die Entwicklung kostengünstiger und schneller.<sup>19</sup>

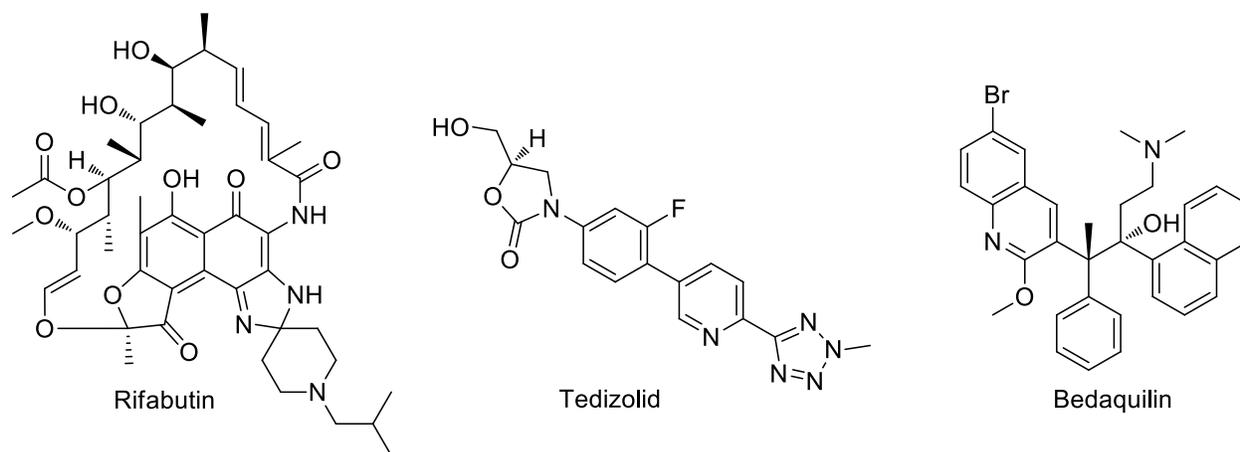


Abbildung 4 Chemische Strukturen bekannter Arzneistoffe mit Wirkung gegen NTM.

### Rifabutin

Rifamycine, wie Rifabutin, sind Hemmstoffe der mykobakteriellen RNA-Polymerase. Rifabutin ist ein Spiro-Piperidyl-Derivat von Rifampicin (RIF) (Abbildung 4). Obwohl RIF als Erstlinientherapeutikum bei Tuberkulose keine Aktivität gegen *Mabs* aufweist, zeigt Rifabutin eine minimale Hemmkonzentration (MHK) von 1.0–5.0  $\mu\text{M}$  gegen Stämme der MAB-Gruppe.<sup>20</sup> Weil die Therapie von NTM-Infektionen meist aus einer Kombination von verschiedenen Wirkstoffen besteht, ist es relevant, wie potentielle Kandidaten mit bestehenden Therapeutika wechselwirken. Für Rifabutin wurde ein synergistischer Effekt mit Clarithromycin und Tigecyclin nachgewiesen.<sup>21</sup> Im präklinischen Mausmodell konnte Rifabutin die Keimzahl in ähnlicher Weise reduzieren wie Clarithromycin.<sup>22</sup> Rifabutin besitzt exzellente pharmakokinetische Eigenschaften. Es akkumuliert stärker in *Mabs* als Rifampicin, außerdem besitzt Rifabutin nicht den dem Rifampicin eigenen Hydrochinonrest, welcher zur Autooxidation neigt.<sup>23</sup> Trotz dieser Eigenschaften wird Rifabutin klinisch noch wenig verwendet.<sup>23,24</sup>

### Tedizolid

Tedizolid gehört wie Linezolid zur Stoffklasse der Oxazolidinone (Abbildung 4). Diese entfalten ihre antimikrobielle Aktivität durch die Hemmung der Proteinbiosynthese der 23S rRNA der 50S-Untereinheit der bakteriellen Ribosomen. Tedizolid besitzt hohe Wirksamkeit gegen verschiedene Arten von NTM. Gegen klinische Isolate von *Mabs* zeigt es MHKs von 1.4–11  $\mu\text{M}$  und ist damit Linezolid überlegen (MHK = 95  $\mu\text{M}$ ).<sup>25,26</sup> Wegen der langen Behandlungsdauer einer NTM-

Infektion sind Substanzen mit bakterizider Wirkung für die Entwicklung neuer Therapieoptionen von Vorteil. Da Oxazolidinone lediglich bakteriostatische Effekte erzielen, ergibt sich daraus ein Nachteil. In Kombination mit bekannten Wirkstoffen konnten für Tedizolid keine synergistischen Effekte festgestellt werden.<sup>25</sup> Obwohl Tedizolid eine gute orale Bioverfügbarkeit und längere Halbwertszeit als Linezolid besitzt, ist die optimale Dosierung der Substanz für Langzeittherapien nicht bekannt.<sup>26</sup> Das damit verbundene Risiko für unerwünschte Arzneimittelwirkungen schränkt die klinische Verwendung von Tedizolid ein.

### **Bedaquilin**

Bedaquilin ist ein Antituberkulotikum, welches erst vor einigen Jahren zugelassen wurde. Es wirkt durch Hemmung der mykobakteriellen ATP-Synthase bakteriostatisch (Abbildung 4). Die Substanz ist zugelassen für die Therapie von multiresistenter Tuberkulose (MDR-TB). Für die Substanz wurde gegen *Mabs* eine MHK von 0.1–0.9 µM festgestellt. Bedaquilin besitzt allerdings keine bakterizide Wirkung gegen NTM.<sup>27</sup> Über die *in vivo* Effektivität wurde kontrovers berichtet. So gibt es Hinweise darauf, dass Bedaquilin eine Reduktion der *Mabs*-Keimlast in Lunge, Milz und Leber von infizierten Mäusen nach acht Tagen bewirken konnte. In Kombination mit Clofazimin konnte für Bedaquilin eine gesteigerte Effektivität gefunden werden.<sup>28</sup> In einer Fallstudie über die Therapie von *Mabs*-Lungeninfektionen mit Bedaquilin wurde bei vier Patienten eine Verringerung der Bakterienzahl nach drei Monaten berichtet. Nach sechs Monaten konnte allerdings bei nur einem Patienten eine weitere Verbesserung erreicht werden. Bei den verbleibenden Teilnehmern wurde keine Veränderung beobachtet.<sup>29</sup>

### *Neuentdeckung*

Trotz der genannten Vorteile bei der Umwidmung bekannter Wirkstoffe bestehen auch einige Nachteile dieser Vorgehensweise. Patentrechte und betriebsinterne Regularien erschweren vielfach die Neunutzung von etablierten Substanzen. Häufig mangelt es den bereits bekannten Arzneistoffen an Effektivität gegen NTM. Darum ist die Entwicklung neuer antibakterieller Stoffe essentiell.

### Benzimidazole

Die Substanz SPR719 und ihr Prodrug SPR720 (Fobrepodacin) ist ein Hemmstoff der B-Untereinheit der bakteriellen DNA Gyrase und Topoisomerase VI (Abbildung 5). Die Wirkstoffe besitzen hohe Aktivität gegen Gram-positive und Gram-negative Mikroorganismen.<sup>30</sup> Gegen klinische Isolate von *Mabs* zeigt SPR719 MHKs von 0.07–9  $\mu\text{M}$ .<sup>31</sup> In toxikologischen Studien konnten für die Substanzen keine genotoxischen Effekte festgestellt werden. *In vivo* wird SPR720 rasch in SPR719 umgewandelt, welches eine orale Bioverfügbarkeit von mehr als 70 % aufweist. In einer Phase I-Studie wurde gezeigt, dass SPR720 gut verträglich ist.<sup>32</sup> Zurzeit wird in einer Phase-IIa-Studie untersucht, ob die Substanz bei der Behandlung von Patienten mit *Mav*-Lungeninfektion effektiv ist.<sup>33</sup>

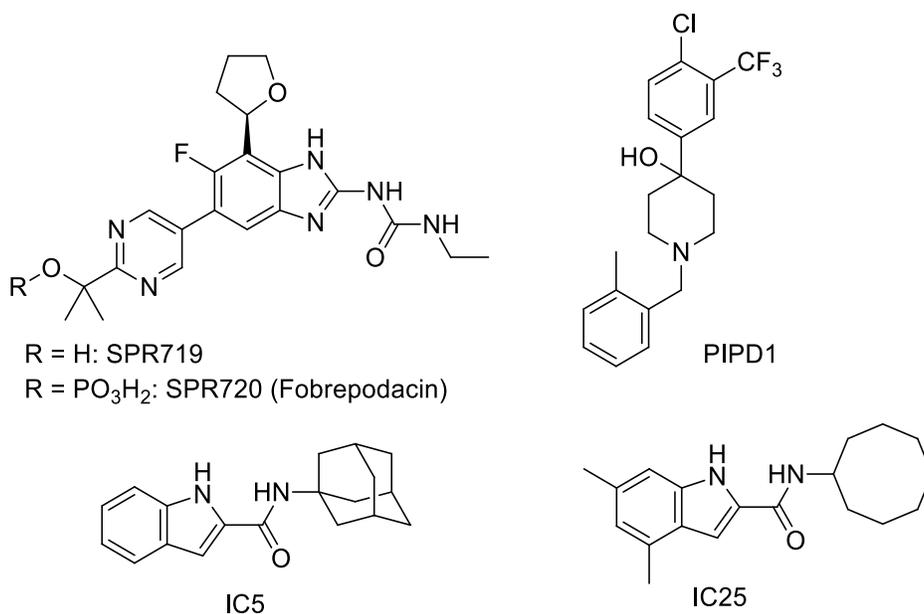


Abbildung 5 Chemische Strukturformeln neuartiger Wirkstoffe gegen NTM

### Indol-2-carboxamide

IC5 und IC25 sind Vertreter der Substanzklasse der Indol-2-carboxamide. Diese sind Inhibitoren des essentiellen Mykolsäuretransporters MmpL3 (Abbildung 5).<sup>34–36</sup> Gegen verschiedene Stämme von *Mav* besitzt IC25 MHKn von 0.17–3.3  $\mu\text{M}$ .<sup>37</sup> Sowohl IC5, als auch IC25 konnten die Keimlast in Lunge und Milz von *Mabs*-infizierten Mäusen reduzieren. Ihre Effektivität entsprach jener von Clarithromycin.<sup>38</sup> IC25 zeigt trotz seiner hohen Lipophilie eine ausreichend gute orale

Bioverfügbarkeit.<sup>39</sup> Die erreichten Plasmakonzentrationen lagen für einen Zeitraum von 24 h oberhalb der *in vitro* MHK.

#### 4-Piperidinole

Die Verbindung PIPD1 besitzt 4-Piperidinol als Grundstruktur (Abbildung 5). PIPD1 zeigt Aktivität gegen die S- und R-Form von *Mabs* mit einer MHK von 0.32 µM. Gegen andere Spezies von NTM und klinischen Isolaten ist PIPD1 ebenfalls wirksam. Bei bestimmten Arten, wie *Mav* und *Corynebakterien*, ist die Verbindung dagegen nicht aktiv. Diese Spezifität deutet darauf hin, dass PIPD1 einen für Mykobakterien essentiellen physiologischen Prozess hemmt. Resistente Mutanten von *Mabs* zeigen Polymorphismen in *mmpL3*. Es wird vermutet, dass 4-Piperidinole, wie PIPD1, Inhibitoren von MmpL3 sind und damit den Aufbau der Mykolsäureschicht der Zellwand behindern.<sup>40</sup> Die Substanz wird *in vivo* schnell eliminiert mit einer Halbwertszeit von 3 h. Die orale Bioverfügbarkeit ist relativ gering. Die ungünstigen pharmakokinetischen Eigenschaften erfordern die Weiterentwicklung der Substanzklasse nötig.<sup>41</sup>

## 1.2 TOPOISOMERASEINHIBITOREN

### 1.2.1 EINTEILUNG DER TOPOISOMERASEN

Topoisomerasen sind eine heterogene Gruppe essentieller Enzyme und kommen in allen lebenden Zellen vor. Sie nehmen Einfluss auf die Topologie des Erbmaterials. Ihre Funktion ist das kontrollierte Herbeiführen von Strangbrüchen innerhalb der DNA-Doppelhelix und deren anschließende erneute Verknüpfung. Bei zellulären Prozessen wie der DNA-Transkription und der Replikation tritt vor der Replikationsgabel mechanische Spannung innerhalb des DNA-Doppelstrangs auf, wodurch dieser überspiralisiert wird. Diese Spannung beeinträchtigt die Stabilität der DNA und muss durch einen kontrollierten Strangbruch abgebaut werden. Es werden zwei wesentliche Typen von Topoisomerasen unterschieden: Zum einen Topoisomerasen Typ I, welche ATP-unabhängig arbeiten und Einzelstrangbrüche induzieren. Zum anderen Topoisomerasen Typ II, die auf ATP angewiesen sind und vorübergehende Doppelstrangbrüche verursachen.<sup>42</sup>

Vertreter der Topoisomerase II sind die prokaryotische Topoisomerase II, welche auch als Gyrase bezeichnet wird, die prokaryotische Topoisomerase IV, sowie die eukaryotischen Topoisomerase II $\alpha$  und Topoisomerase II $\beta$ . Gyrasen fügen negative Überspiralisierung in die DNA ein. Topoisomerase IV entfernt positive Überspiralisierung aus der DNA. Zusätzlich ermöglicht Topoisomerase IV die Separierung von Tochtersträngen bei der DNA-Replikation.

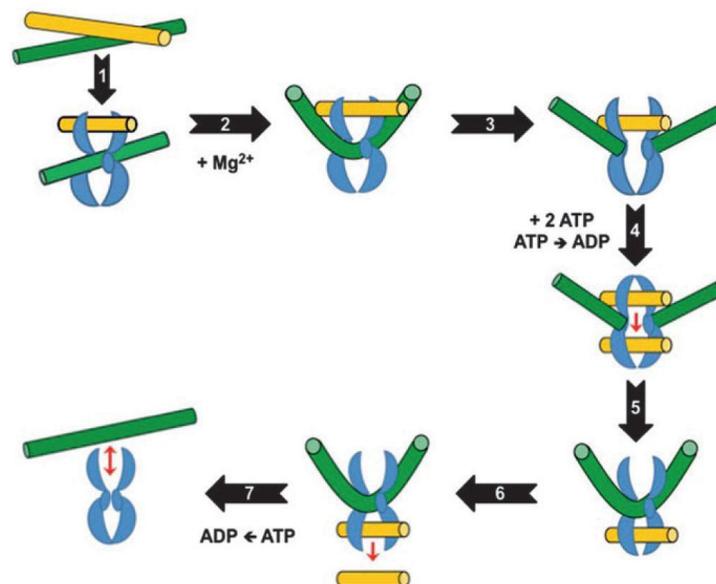
Während die meisten Bakterien sowohl Gyrase als auch Topoisomerase IV besitzen, verfügen Mykobakterien nur über Gyrase. Im folgenden Abschnitt wird die Bedeutung und Funktion der Gyrasen erörtert.<sup>42,43</sup>

### 1.2.2 GYRASEN

Gyrasen sind unter ATP-Verbrauch arbeitende Topoisomerasen vom Typ IIA in Prokaryoten. Sie führen Doppelstrangbrüche herbei und führen ein anderes DNA-Segment durch die Bruchstelle. Ihre Funktion ist der Abbau von Spannung durch positive Überspiralisierung, die vor der Replikationsgabel entsteht.

Der Mechanismus, nach welchem die Gyrase ihre Funktion ausführt, ist weitgehend untersucht und in Abbildung 5 dargestellt.<sup>44,45</sup> Gyrasen sind Heterotetramere aus zwei paarigen Untereinheiten: GyrA<sub>2</sub>B<sub>2</sub>. GyrA (96 kDa) ist für den Strangbruch, -passage und -verknüpfung verantwortlich. Die Untereinheit B (88 kDa) beinhaltet die ATPase-Region und liefert dadurch die für die Funktion notwendige Energie.<sup>44</sup>

Entlang der C<sub>2</sub> Symmetrieachse zwischen den vier Untereinheiten (GyrA<sub>2</sub>B<sub>2</sub>) befinden sich mehrere Schnittstellen, durch welche das Transport(T)-Segment an dem Gate(G)-Segment vorbeigeführt wird. Die erste Schnittstelle befindet sich in der ATPase-Domäne der beiden GyrB Untereinheiten. Unter ATP-Bindung kommt es zur Dimerisierung und zum Einschluss des T-Segments. Eine weitere Schnittstelle bilden die Winged-Helix-Domäne (WHD) und die Topoisomerase-Primase (TOPRIM)-Domäne der GyrA. Diese Schnittstelle wird DNA-Gate genannt. In diesem Bereich wird das G-Segment der DNA vorübergehend getrennt. Nachdem das T-Segment das G-Segment passiert hat, verlässt es die Gyrase über die dritte Schnittstelle (Exit-Gate).<sup>42</sup>



**Abbildung 6** Schema der Funktion der prokaryotischen Topoisomerase II (Gyrase, blau). Schritt 1: Bindung von zwei DNA-Segmenten an das Enzym. Schritt 2: Biegung des G-Segments (grün) durch Mg<sup>2+</sup>-Komplexbindung. Schritt 3: Doppelstrangbruch des G-Segments und vorübergehende Bindung der Strangenden an die GyrA. Schritt 4: Konformationsänderung durch ATP-Hydrolyse an GyrB und Passage des T-Segments (gelb) durch das G-Segment. Schritt 5: Religation des G-Segments. Schritt 6: Das T-Segment verlässt den Komplex durch die C-terminale Schnittstelle. Schritt 7: Konformationsänderung durch Hydrolyse des zweiten ATP-Moleküls und Austritt des G-Segments.<sup>42</sup>

Bei der Bindung des G-Segments an das Enzym legt sich die DNA in einer überwundenen Schleife (positive Superhelix) um die C-terminale Domäne (CTD) und wird im Bereich der WHD gebogen. Die DNA wird durch eine Konformationsänderung in Folge der ATP-Hydrolyse gedehnt. Der DNA-Bruch erfolgt durch kovalente Bindung eines 5'-Phosphatrestes an einem Tyrosin-Rest auf der WHD. Ein bivalentes Metallkation (meist  $Mg^{2+}$ ) katalysiert den Strangbruch durch koordinative Bindung mit der TOPRIM-Domäne. Die Koordination zum katalytischen Metallion erfolgt direkt oder indirekt vermittelt über ein Wassermolekül. Der zweite DNA-Strang wird in gleicher Weise von der anderen GyrA' Untereinheit getrennt. Die Schnittstellen beider DNA-Stränge überlappen sich um vier Basenpaare. Im Zuge der Konformationsänderung wird das T-Segment durch das G-Segment geführt. Schließlich wird durch die Hydrolyse des zweiten ATP-Moleküls die Gyrase zurück in ihre ursprüngliche Konformation überführt. Dadurch wird das G-Segment wieder verbunden und beide Segmente verlassen die Gyrase über das Exit-Gate (Abbildung 6).<sup>44</sup> Damit die Spaltung und die Ligation der DNA erfolgreich ablaufen, ist es nötig, dass sich die zu spaltenden Phosphatreste in der optimalen Position zum Tyrosin der WHD und der TOPRIM-Domäne befinden. Substanzen, welche in die DNA interkalieren, verringern den Abstand zwischen den zu spaltenden Phosphaten und der katalytischen Tasche des Enzyms. Dadurch erhöht sich die Stabilität des  $Mg^{2+}$ -Komplexes mit dem Phosphotyrosin und der TOPRIM-Domäne. Die Stabilisierung der gespaltenen DNA stellt für das Bakterium einen toxischen Zustand dar, welcher in der Folge zum Zelltod führt.<sup>44</sup>

Eukaryotische Topoisomerasen Typ II unterscheiden sich in ihrem Bau und ihrer Effizienz von denen der Prokaryoten. Durch diese Spezifität sind sie von hoher Bedeutung als valides Target von Antibiotika. Die wichtigste Klasse der Gyraseinhibitoren sind die Fluorchinolone (FQ) (Abbildung 7).

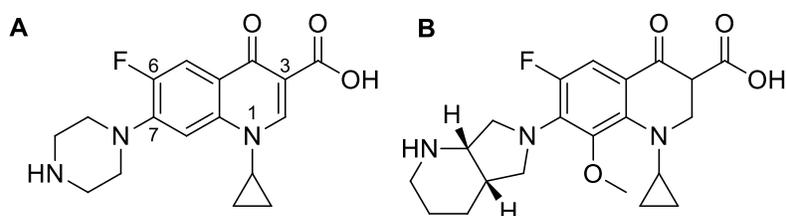


Abbildung 7 Chemische Strukturen der Fluorchinolone Ciprofloxacin (A) und Moxifloxacin (B).

Anhand von Kristallstrukturen konnte der Bindungsmodus der FQ mit dem Enzym und der DNA untersucht werden. Demnach interkalieren jeweils ein Molekül der FQ den gebogenen DNA-Strang auf beiden Seiten. Dabei interagiert das C-7-Ringsystem des Inhibitors mit der GyrB-Untereinheit, während sich die C-3-Carboxylgruppe zur GyrA-Untereinheit ausrichtet und mit einem Asparagin- oder Glutaminsäurerest und einem Serinrest eine Wechselwirkung eingeht. Diese wird über ein  $Mg^{2+}$ -Ion und ein Wassermolekül vermittelt. Außerdem wurde beobachtet, dass FQ auch in einem inversen Bindungsmodus (d.h. mit C-3-COOH zu GyrB) an den Gyr-DNA-Komplex binden können.<sup>46</sup> Durch die Interaktion der FQ mit dem Enzym-DNA-Komplex wird der DNA-Strang in getrenntem Zustand fixiert, welcher in der Folge zum Zelltod führt.

In Bezug auf Mykobakterien ist die Wirksamkeit der FQ abhängig von der betreffenden Spezies. Gegen *Mtb* sind besonders die 8-Methoxychinoline Gatifloxacin und Moxifloxacin (MXF) effektiv. Ihre Aktivität wurde sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* bestätigt.<sup>47</sup> Folglich werden diese Stoffe auch für die Behandlung von multiresistenter TB empfohlen. Gegen NTM ist die Wirksamkeit der FQ dagegen eingeschränkt. Zwar besitzt MXF gegen *Mav intracellulare* eine MHK von 2.5  $\mu$ M, gegen *Mabs* wird die MHK jedoch mit 40  $\mu$ M angegeben.<sup>48,49</sup> Ebenso weist *M. chelonae* eine ausgeprägte Resistenz gegen FQ auf.<sup>49</sup> Daraus ist ersichtlich, dass die Entwicklung neuartiger Gyraseinhibitoren mit anti-NTM-Aktivität eine hohe Relevanz für die Therapie von NTM-Infektionen besitzt.

### 1.2.3 NEUE BAKTERIELLE TOPOISOMERASEINHIBITOREN (NBTIs)

Im Zuge der Arbeit an der Synthese und Charakterisierung neuer aktiver Derivate der Hit-Verbindung **MMV688844** konnte die mykobakterielle DNA-Gyrase als molekulares Target der Substanzklasse identifiziert werden.<sup>50</sup> Außerdem konnte gezeigt werden, dass deren Bindungsstelle von der der Fluorchinolone abweicht. In der Literatur sind Inhibitoren der DNA-Gyrase mit neuartigem Bindungsmodus seit etwa zwei Jahrzehnten bekannt.<sup>51,52</sup> Im folgenden Abschnitt werden diese Neuen Bakteriellen Topoisomerase Inhibitoren (Novel Bacterial Topoisomerase Inhibitors, NBTIs) vorgestellt.

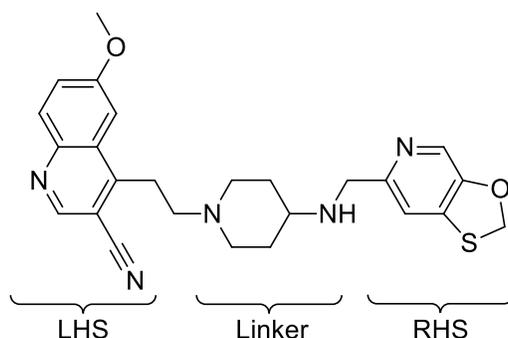
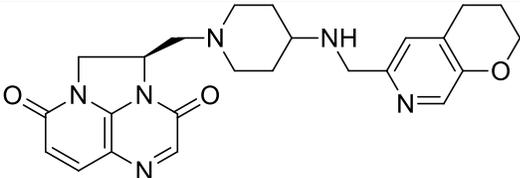


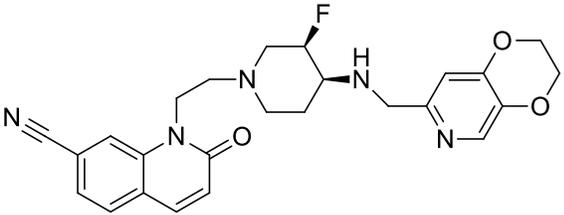
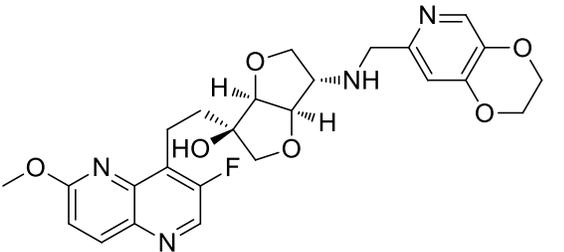
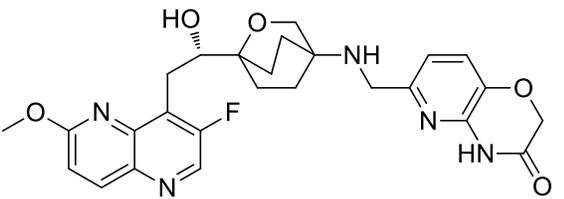
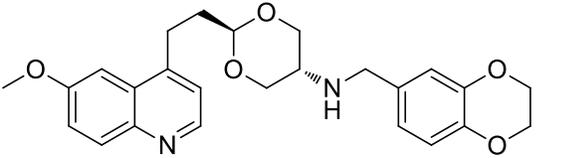
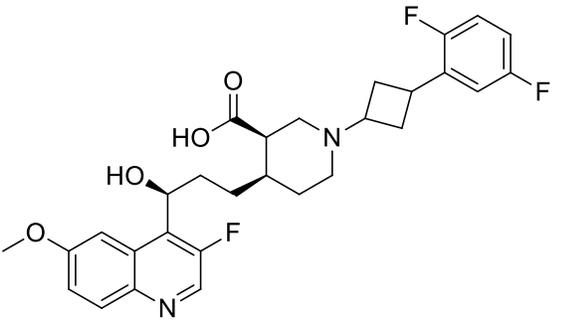
Abbildung 8 Chemische Struktur von NBTIs am Beispiel von GSK299423.<sup>53</sup>

### Strukturelle Merkmale

Die Gruppe der NBTIs weist große strukturelle Vielfalt auf.<sup>51</sup> Dennoch ist ihr chemischer Aufbau bei den meisten Vertretern vergleichbar. Häufig werden die Moleküle in drei Bausteine geteilt: Die linke Seite (left-hand side, LHS) umfasst einen anellierten Heterocyclus, der mittlere Teil (Linker), welcher strukturell unterschiedlich sein kann und der rechten Seite (right-hand side, RHS), bestehend aus einem bicyclisch anellierten Aromaten (Abbildung 8). Eine Auflistung verschiedener literaturbekannter Vertreter dieser Wirkstoffklasse bietet Tabelle 2.

**Tabelle 2** Struktur, Enzymhemmung und antibakterielle Aktivität von ausgewählten Leitstrukturen verschiedener NBTIs. Nicht alle Substanzen wurden von den Autoren mit einer literaturübergreifenden Kennung versehen. - nicht berichtet, *S.a. Staphylococcus aureus*.

Substanz	IC <sub>50</sub> [μM]		MHK <sub>90</sub> [μM]		Lit.
	<i>S.a.</i> DNA Gyrase	hERG	<i>S. a.</i>	<i>Mtb</i>	
 Gepotidacin	0.047	1.31 · 10 <sup>3</sup>	0.5	-	54

Substanz	IC <sub>50</sub> [μM]		MHK <sub>90</sub> [μM]		Lit.
	<i>S.a.</i> DNA Gyrase	hERG	<i>S. a.</i>	<i>Mtb</i>	
 AZD9742	-	233	0.06	4.31	55
 AM8191	0.53	66	4.01	-	56
 AM8191	1.02	18	0.06	-	57
 AM8191	0.10	5.1	0.25–1	-	58
 AM8191	0.977	85.9	0.125	-	59

### Die LHS der NBTIs interkaliert die DNA

Der LHS Teil des Moleküls besteht typischerweise aus einem bi- oder tricyclischen Heteroaromat. Mittels Röntgenstrukturanalyse konnte gezeigt werden, dass dieser Molekülteil im ternären Komplex aus DNA, Gyrase und NBTI aus der Spiegelachse der beiden Gyrase A-Domänen herausragt. Aufgrund der planaren Struktur schiebt sich die LHS zwischen zwei Nukleinbasen in der DNA. Damit ändert sich die Topologie der DNA und die Aktivität des Enzyms wird gestört. Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt. Unter den bicyclischen Verbindungen sind Chinolone und Naphthyridone die häufigsten vorkommenden Reste. Diese sind in Position-2 und -7 oft mit einer Methoxy-, Fluor- oder Nitril-Gruppe substituiert (Abbildung 9). Hierdurch können die physikochemischen Eigenschaften (logP und Basizität) und das pharmakologische Profil (Aktivität am hERG-Kanal) der Substanzen positiv beeinflusst werden. Zusätzlich begünstigt Fluor in 2-Position die antibakterielle Aktivität. Der Grund hierfür liegt in der zusätzlichen Inhibition der Topoisomerase IV durch diese Wirkstoffe.

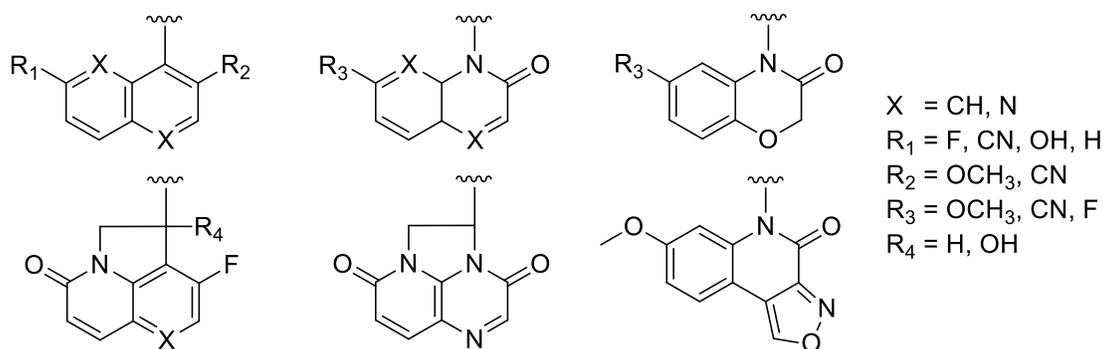


Abbildung 9 Häufige Heterocyclen für LHS der NBTIs (nach <sup>51</sup>)

### Der Linker sorgt für die richtige Positionierung von LHS und RHS

Der Linker spielt eine zentrale Rolle für die Aktivität der NBTIs. Sechsgliedrige Heterozyklen wie Piperidin oder 1,3-Dioxan und Cyclohexan sind für diesen Strukturteil typisch. Aber auch Tetrahydroindazol ist als Linker bekannt (Abbildung 10).

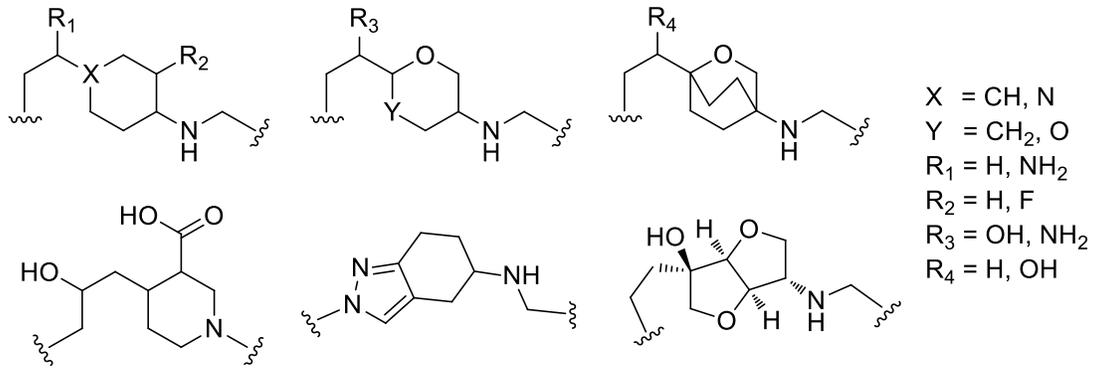


Abbildung 10 Häufige verwendete Strukturen für den Linker von NTBIs (nach <sup>51</sup>)

In jedem Fall befindet sich in Richtung der RHS ein basischer Stickstoff, welcher für die Aktivität der Verbindungen essentiell ist. Dieser tritt in seiner protonierten Form in eine ionische Wechselwirkung mit einem Aspartat-Rest aus der DNA-Gyrase (Abbildung 11).

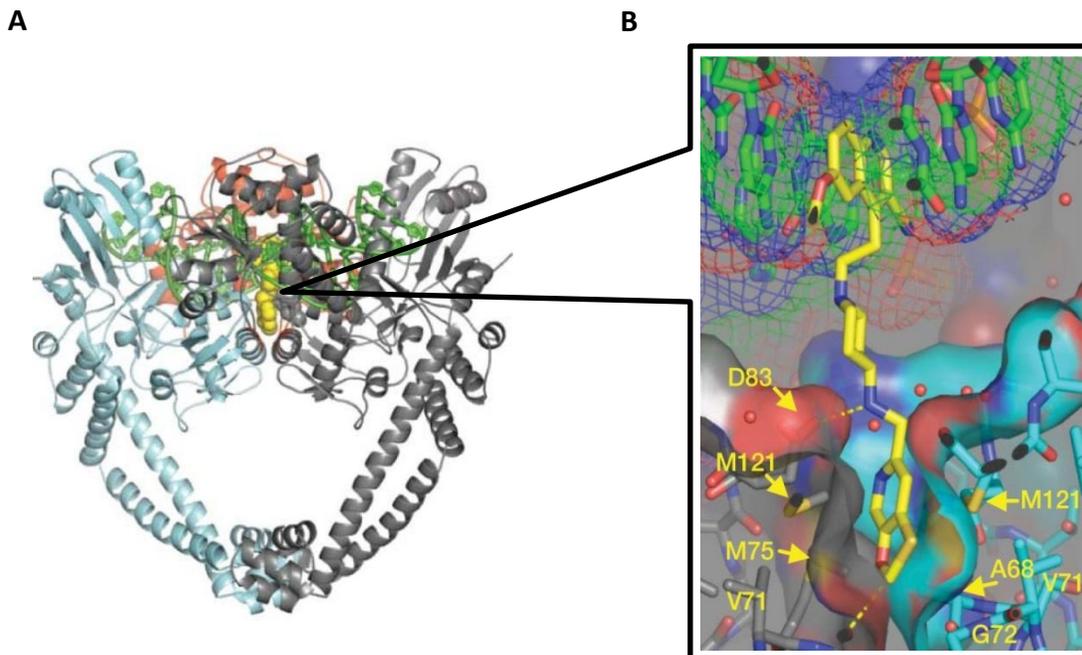
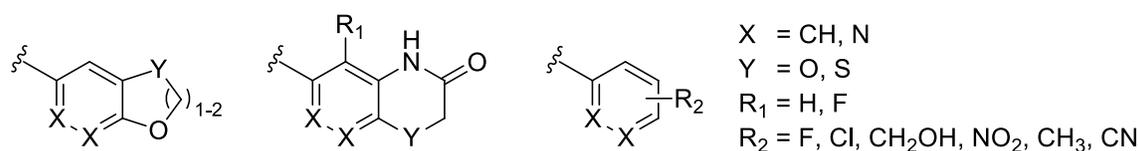


Abbildung 11 A Röntgenkristallografische Aufnahme (2.1 Å) des Co-Komplexes aus GyrB27–A56 von *S. aureus* mit GSK299423 (gelb) und DNA (grün). B Vergrößerung der Bindungsstelle. Die LHS (oben) interkaliert mit der DNA und die RHS sitzt in einer hydrophoben Tasche des Enzyms zwischen den GyrA-Untereinheiten. Der basische protonierte Stickstoff interagiert mit dem Carboxylatrest von Asp83.<sup>53</sup>

Mutationen, welche diese Aminosäure betreffen, führen zu Resistenzen der Bakterien gegen NBTIs. Mit der Modulation der chemischen Struktur des Linkers ist es ebenfalls möglich, Feinabstimmungen in der Polarität des Gesamtmoleküls vorzunehmen. So lässt sich zum Beispiel die Polarität der Verbindungen durch Einführung einer primären Aminogruppe erhöhen, was wiederum zu einer inhibierenden Aktivität am hERG-K<sup>+</sup>-Kanal führt.<sup>55</sup>

*Die RHS bindet in der Gyrase A Domäne*



**Abbildung 12** Häufig verwendete Strukturen für die RHS von NBTIs (nach <sup>51</sup>)

Als RHS der NBTIs sind vor allem Pyridooxazinone (oder Pyridothioxazinone) und Pyridodioxane (oder Oxathiinopyridazine) anzutreffen (Abbildung 12). Dieser Strukturteil bindet in der Spiegelachse der beiden Gyrase A-Untereinheiten im Gyrase-Tetramer (AA'BB'). Die Bindungstasche zeichnet sich durch eine hohe Hydrophobie aus, was dazu führt, dass polare Gruppen (Methoxy) an diesem Molekülteil eine drastische Verminderung der Aktivität zeigen. Neben den bicyclischen Motiven sind auch monocyclische Motive bekannt, die eine gute Wirksamkeit gegen verschiedene Bakterien zeigen. Dabei handelt es sich vor allem um Aromaten (Phenyl) oder Heteroaromaten (Pyridyl) welche mit hydrophoben Gruppen (Chlor, Fluor, Trifluormethyl) substituiert sind. Hinsichtlich der antibakteriellen Aktivität der Wirkstoffe ist die RHS für strukturelle Veränderungen am besten geeignet. So zeigen zum Beispiel monocyclische Reste keine Hemmung der TopIV. Hier bietet sich ein Ansatz für die Ausbalancierung der Gyrase/TopoisomeraseIV-Aktivität. Dadurch eröffnet sich die Möglichkeit, das Aktivitätsspektrum auch auf Gram-negative Bakterien auszuweiten, welche gegen NBTIs meist weniger sensibel sind.

### NBTIs mit atypischer Struktur

Neben diesen typischen Vertretern der Wirkstoffklasse, existieren auch Verbindungen, die dem charakteristischen Aufbau nicht entsprechen. Hierzu zählen zum Beispiel Zoliflodacin und Hemmstoffe mit Thiophen-Teilstruktur (Abbildung 13). Eine Gliederung in LHS, Linker und RHS ist bei diesen Substanzen nicht erkennbar. Zoliflodacin besitzt ein Spiropyrimidintrion-System, welches mit einem Benzisoxazol-Motiv anelliert ist. Die Substanz befindet sich in der klinischen Phase III zur Behandlung von unkomplizierter und multiresistenter Gonorrhö (ClinicalTrials.gov, NCT03959527).<sup>60</sup> Ihre Bindungstasche liegt in der TOPRIM-Domäne seitens der Gyrase B-Untereinheit. Kreuzresistenzen mit Fluorchinolonen wurden nicht beobachtet.<sup>61</sup>

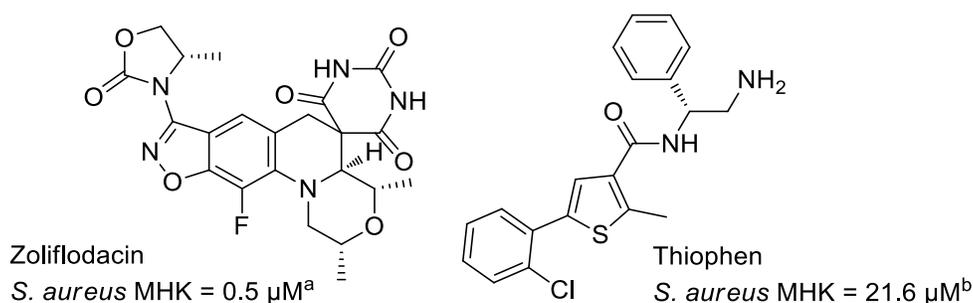


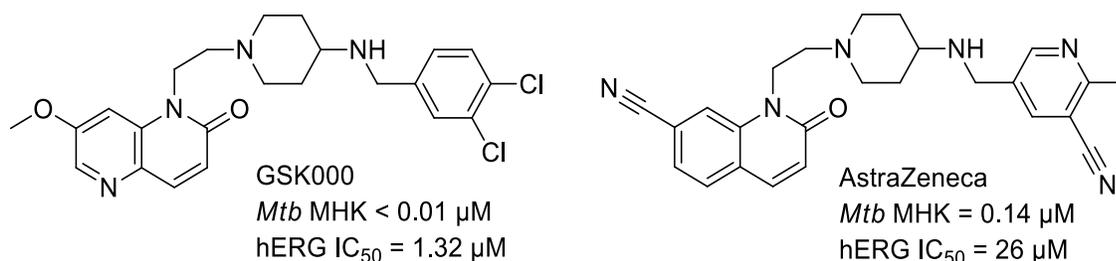
Abbildung 13 Chemische Strukturen von Beispielen für atypische NBTIs. <sup>a 62, b 63</sup>

Die Gruppe der Thiophene besitzt einen zu den klassischen NTBI abweichenden Mechanismus. Die meisten Gyraseinhibitoren können den DNA-Gyrase-Komplex im Zustand des Doppelstrangbruchs (Fluorchinolone) oder Einzelstrangbruchs (NBTI) fixieren, indem sie mit der DNA interagieren. Die Thiophene scheinen hingegen als allosterische Modulatoren an der Gyrase zu wirken. Ihre Bindungstasche liegt entfernt von der DNA-Bindungsdomäne. Es wird angenommen, dass die Thiophene bei Bindung an ihr Target eine Fixierung der Gyrase in dem jeweiligen Zustand auslösen.<sup>63</sup>

### NBTIs gegen Mykobakterien

Die gute Aktivität von NBTIs gegen ein breites Spektrum von Bakterien führte zu der Suche nach Vertretern dieser Stoffklasse, die auch das Wachstum von Mykobakterien hemmen. In einem Hochdurchsatzscreening von 3000 Substanzen mit NBTI-Struktur gegen *Mtb* konnten aussichts-

reiche Kandidaten gefunden werden.<sup>64</sup> Die Substanzen enthalten Naphthyridon als LHS und Aminopiperidin als Linker. Weiterhin sind monocyclische Motive als RHS bevorzugt (Abbildung 14).



**Abbildung 14** Chemische Strukturen von Beispielen für MGIs.

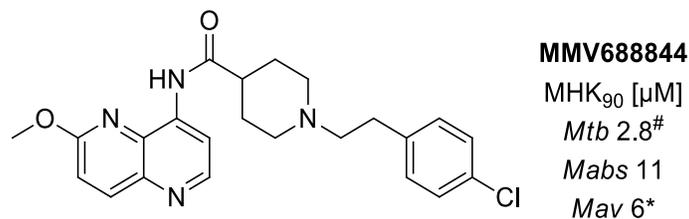
Wegen ihrer definierten chemischen Struktur und der spezifischen Wirkung wurde für NBTIs, welche Mykobakterien adressieren, der Begriff Mycobacterial Gyrase Inhibitor (MGIs) eingeführt.

Untersuchungen über den Wirkmechanismus der MGIs ergaben, dass die Inhibitoren die Bildung von Einzelstrangbrüchen innerhalb der DNA induzieren, d.h. sie fixieren den DNA-Gyrase-Komplex im Zustand des Strangbruchs. Gegen *Mtb* erreichen die Substanzen eine MHK von < 0.01  $\mu\text{M}$  (GSK) und 0.06  $\mu\text{M}$  (AstraZeneca).<sup>64,65</sup>

Ein wesentliches Problem von NBTIs ist ihre potentielle Kardiotoxizität durch starke Aktivität am hERG- $\text{K}^+$  Kanal.<sup>66</sup> Die Substanz GSK000 erreichte eine  $\text{IC}_{50}$  gegen hERG von 1.32  $\mu\text{M}$ .<sup>64</sup> Deshalb wurden für beide Leitstrukturen Derivate identifiziert, deren kardiotoxisches Potential verringert ist. Im Zuge von *in vivo* Infektionsassays konnte gezeigt werden, dass MGIs die Bakterienzahl im akuten Mausmodell verringern können.<sup>64,65</sup> Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass MGIs einen vielversprechenden Ansatz für die Entwicklung von potentiellen Wirkstoffen gegen Mykobakterien darstellen.

## 1.3 ZIELSTELLUNG DER ARBEIT

Die Grundlage dieser Arbeit war die Entdeckung der antimykobakteriellen Aktivität der Verbindung **MMV688844** (nachfolgend **844** genannt, Abbildung 15). Diese ging zurück auf eine Publikation, in welcher die Ergebnisse eines Hochdurchsatzscreenings von Substanzbibliotheken gegen *Mabs* Bamboo und *Mav* 11 veröffentlicht wurden.<sup>67</sup> Die Testsubstanz **844** stammt aus der Pathogene Box®, einer Substanzsammlung mit 400 Wirkstoffen gegen in der Wirkstoffentwicklung unterrepräsentierte Infektionskrankheiten. Die Box wurde von der Medicines for Malaria Venture (MMV) für die Erforschung von neuartigen Wirkstoffen gegen die betreffenden Erreger zur Verfügung gestellt. Die Resultate der initialen Testungen von **844** gegen verschiedene Spezies von NTM deuteten darauf hin, dass eine Leitstruktur für die präklinische Entwicklung gefunden werden konnte.



**Abbildung 15** Chemische Strukturformel und anti-mykobakterielle Aktivität von **844**. <sup>#</sup> MMV berichtet von einer MHK<sub>90</sub> von 0.4 μM gegen *Mtb*.<sup>68</sup> \* Gegen *Mav* wurde bei 6 μM lediglich eine Hemmung zu 80 % erreicht. Eine 90-prozentige Hemmung konnte im getesteten Konzentrationsbereich (bis 50 μM) nicht erreicht werden.<sup>67</sup>

Als Leitfaden für die gezielte Untersuchung und Entwicklung von **844** diente ein 2018 publiziertes Schema.<sup>69</sup> Demnach sollte die Substanz mehrere Stufen der Selektierung durchlaufen. Zu Beginn stand die Identifizierung und wiederholte Bestätigung der Aktivität der Substanz gegen verschiedene Stämme von *Mabs* und *Mav*. Hierbei sollte ebenfalls analysiert werden, ob **844** bakterizide Eigenschaften besitzt. Im Anschluss erfolgte die Untersuchung der pharmakokinetischen Eigenschaften von **844**. In der nächsten Phase wurde die Substanz im Mausmodell auf ihre Verträglichkeit geprüft und entschieden, welche Dosis für eine Effizienzstudie geeignet er-

schien. Am Endpunkt der Entwicklung sollte eine Substanz erhalten werden, die bei guter Verträglichkeit die Keimlast in einer mit NTM infizierten Maus deutlich reduzieren kann.

Um zu gewährleisten, dass der vielversprechende Wirkstoffkandidat **844** alle Phasen dieser Entwicklung durchläuft, sollte parallel zur Testung eine kontinuierliche medizinisch-chemische Modulierung der Leitstruktur **844** erfolgen. Das bedeutet, dass zunächst versucht werden sollte, die Potenz der Ausgangsverbindung **844** zu steigern. Dies wiederum erforderte zunächst die Etablierung einer erfolgreichen Synthesesequenz, um Zugang zu gewünschten Derivaten von **844** zu erhalten. Die Auswahl der herzustellenden Derivate sollte sich dabei nach ähnlichen, aus der Literatur bekannten Verbindungen richten. Ein weiteres Kriterium bildete die kommerzielle bzw. gute präparative Zugänglichkeit der benötigten Edukte.

Neben der fortlaufenden Weiterentwicklung von **844** war die Selektierung von möglichen resistenten Mutanten gegen die Substanz von besonderem Interesse. Hiermit sollte versucht werden, das Target von **844** zu bestätigen bzw. zu identifizieren. Zu Beginn der Arbeit war der Wissensstand, dass **844** einen ABC-Transporter (Rv0194) in *Mtb* adressiert. Dies stützte sich auf *in silico* gewonnene Daten.<sup>70</sup> Die Ergebnisse der Targetuntersuchung sollten wiederum dazu dienen, *in silico* computer-gestützte Modelle über die Bindung von **844** und den geplanten Derivaten zu generieren und womöglich neue Ansätze für die Optimierung der Substanz zu verfolgen. Zur Bewältigung dieser umfassenden Aufgaben wurden die Arbeitsschritte in einer Kooperation mit dem Arbeitskreis um Thomas Dick vom Center for Discovery and Innovation (CDI) des Hackensack Meridian Health (HMH) in Nutley, New Jersey, USA bearbeitet. Während die biologische Evaluation vom CDI durchgeführt wurde, erfolgten das zielgerichtete Design und die Synthese von neuartigen **844**-Derivaten an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

## 2 RESULTATE

### 2.1 SYNTHESSEN

#### 2.1.1 ÜBERBLICK

Die Retrosynthese der Hit-Verbindung **844** liefert drei Bausteine: 6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-amin **5a**, Piperidin-4-carbonsäure **9** und 1-(2-Bromoethyl)-4-chlorbenzen **10a** (Abbildung 16). Dementsprechend erfolgt die Synthese der Verbindungen durch lineare Verknüpfung der drei Bausteine. Die Darstellung der Verbindung kann nach der in der Literatur beschriebenen Sequenz erfolgen.<sup>71-74</sup>

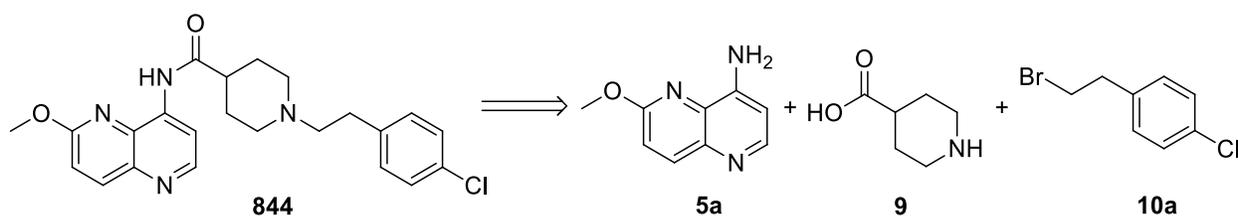
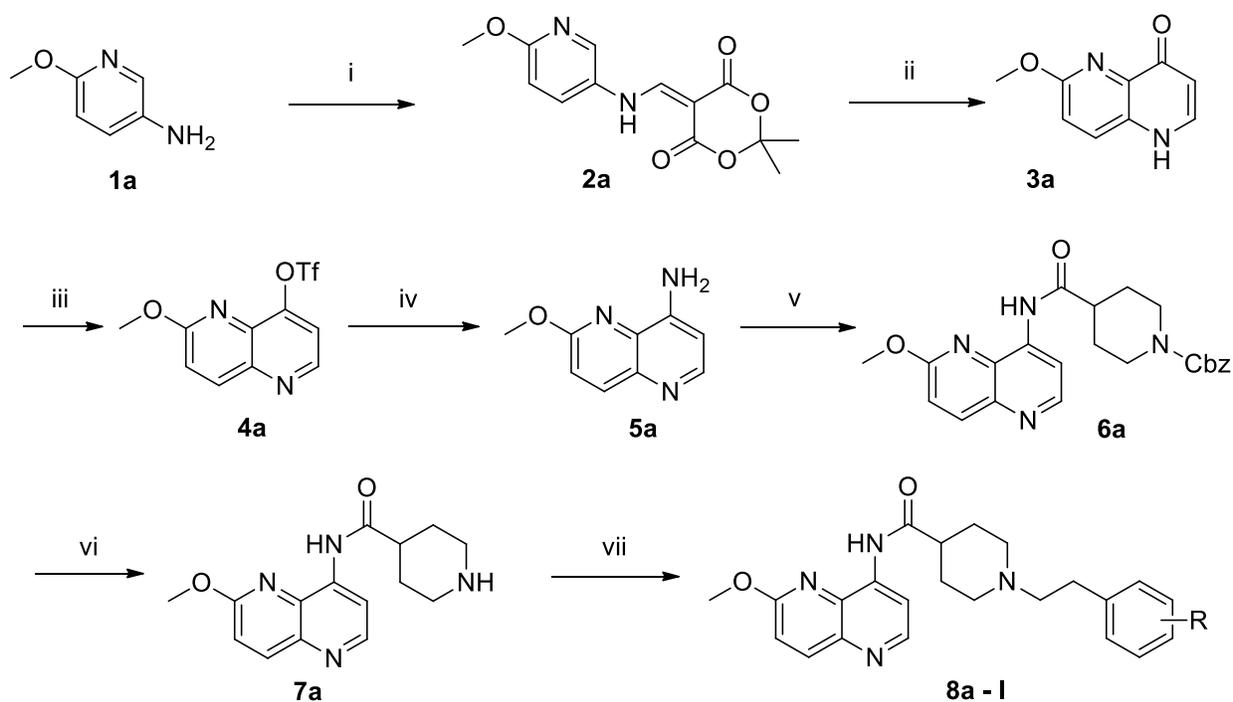


Abbildung 16 Retrosynthese von **844**. Die Endverbindung zerlegt sich in 6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-amin **5a**, Piperidin-4-carbonsäure **9** und 1-(2-Bromoethyl)-4-chlorbenzen **10a**.

Ausgangspunkt ist 6-Methoxy-pyridin-3-amin **1a**, welches im ersten Schritt mit Meldrumsäure und Orthoameisensäuretriethylester zum Aminomethylen-Meldrumsäurederivat **2a** kondensiert wird. Dieses wird im nächsten Schritt unter pyrolytischen Bedingungen im Sinne einer Gould-Jacobs-Reaktion zum 6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4(1*H*)-on **3a** cyclisiert. Anschließend wird das Naphthyridon mit 1,1,1-Trifluoro-*N*-phenyl-*N*-((trifluormethyl)sulfonyl)methansulfonamid (Phenyltriflimid) zum 6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl-trifluormethansulfonat **4a** umgesetzt. Im nächsten Schritt wird die Triflat-Gruppe substituiert und in 6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-amin **5a** überführt. Das Anilinderivat wird im nächsten Schritt mit 1-((Benzyloxy)carbonyl)piperidin-4-carbonsäure, unter Verwendung von HATU als Kupplungsreagenz, zum entsprechenden Anilid

**6a** umgesetzt. Schließlich wird das sekundäre Amin entschützt und der Stickstoff alkyliert, um die Piperidin-4-carboxamide (P4C) als Endverbindungen zu erhalten **8a-I** (Abbildung 17).



**Abbildung 17** Syntheschema für die Darstellung der Piperidin-4-carboxamide: i Meldrumsäure,  $\text{CH}(\text{OCH}_3)_3$ , EtOH, Reflux, 2 h; ii Dowtherm A<sup>®</sup>, 250 °C, 15 min, Argon; iii NaH,  $\text{PhN}(\text{Tf})_2$ , DMF, RT, 2 h; iv  $\text{C}_3\text{H}_7\text{NH}_2\text{Cl}$ , Pyridin, Reflux, 16 h; v 1-((Benzyloxy)carboxyl)piperidin-4-carbonsäure, HATU, TEA, DMF, 50 °C, 16 h; vi  $\text{H}_2$ ; Pd/C (10 %); EtOH, 50 °C; vii TEA, DMF, RT, 16 h

Die Sequenz beinhaltet sieben Stufen. Je nach Gestalt und kommerzieller Verfügbarkeit der jeweiligen Bausteine wächst die Anzahl der Syntheseschritte entsprechend an. Dies gilt zum Beispiel für die Einführung des Phenylethanbausteins. Hierfür wurden sowohl Phenylethylbromide als auch Phenylethylmesylate bzw. -tosylate verwendet. Letztere wurden eingesetzt, wenn das Phenylethylbromid mit gewünschtem Substitutionsmuster am Phenylring kommerziell nicht erhältlich war. Um die Mesylate herzustellen, wurde eine Sequenz gewählt, die von Phenylethylsäure ausgeht. Die entsprechend substituierten Phenylethylsäurederivate sind kommerziell in wesentlich größerer Vielfalt verfügbar.

Im folgenden Abschnitt werden die einzelnen Schritte der Sequenz im Detail vorgestellt. Dabei wird zunächst auf Besonderheiten und Beobachtungen bei der Herstellung der Substanzen ein-

gegangen. Die genaue Erörterung der Beweggründe der vorgenommenen Derivatisierung erfolgt im Kapitel 2.2.

## 2.1.2 SYNTHESE DER ANELLIERTEN 4-AMINOPYRIDIN-DERIVATE

Die Synthese der anellierten Heterocyclen kann durch unterschiedliche Methoden erfolgen. Häufig wird eine 4-Schritt-Synthese verwendet. Zunächst werden die Aniline **1a–b** mit Alkylalkoxymethylenpropanoaten **13** kondensiert. Letztere sind durch die Reaktion von Malonsäureestern **12** mit Trialkylorthoameisensäureestern **11** zugänglich und können *in situ* hergestellt werden. Die entstandenen Enamine **14** werden anschließend thermisch cyclisiert. In Anschluss werden die Ester **15** verseift und schließlich die aromatische Carbonsäure **16** decarboxyliert (Abbildung 18). Werden die Aniline mit Meldrumsäure **21** anstelle der Malonsäureester **12** in Gegenwart von Trialkylorthoameisensäureester **11** kondensiert, gelingt die Darstellung der Endprodukte **3a–b** ohne Verseifung und Decarboxylierung, sodass sich die Sequenz auf zwei Schritte verkürzt. Im Zuge dieser Arbeit wurde deshalb lediglich Meldrumsäure **21** verwendet. Für diese Variante wird je nach verwendetem Anilinderivat eine Ausbeute von etwa 70 % angegeben.<sup>75</sup>

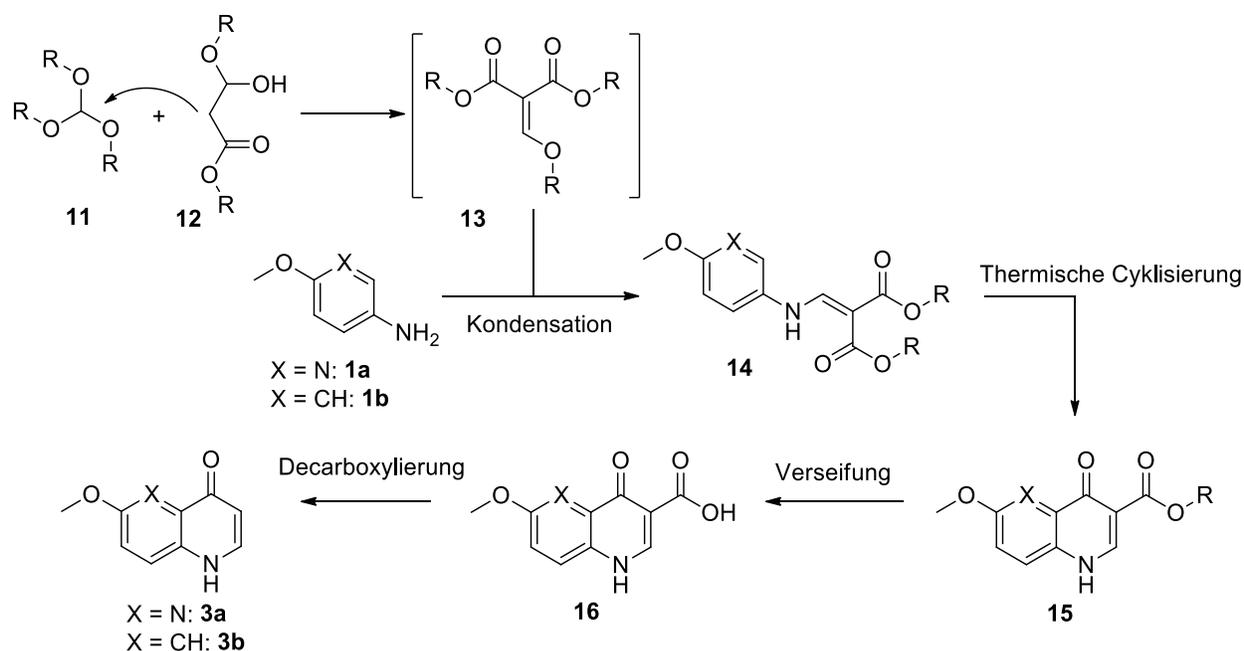


Abbildung 18 Syntheseweg A für die Darstellung der Heterocyclen, R = CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.

Für die Synthese von 4-1*H*-Chinolonen **3b** beschreibt die Literatur eine alternative Sequenz.<sup>76</sup> Hierfür wird 1-(5-Methoxy-2-nitrophenyl)ethanon **17** mit *N,N*-Dimethylformamidimidmethylacetat (DMF-DMA) zum vinylogenen Amid **18** umgesetzt. Im zweiten Schritt erfolgt die Reduktion der aromatischen Nitrogruppe am Palladiumkontakt, wobei sich das Intermediat **19** bildet. Aus diesem entsteht das Produkt **3b** durch Cyclisierung (Abbildung 19).

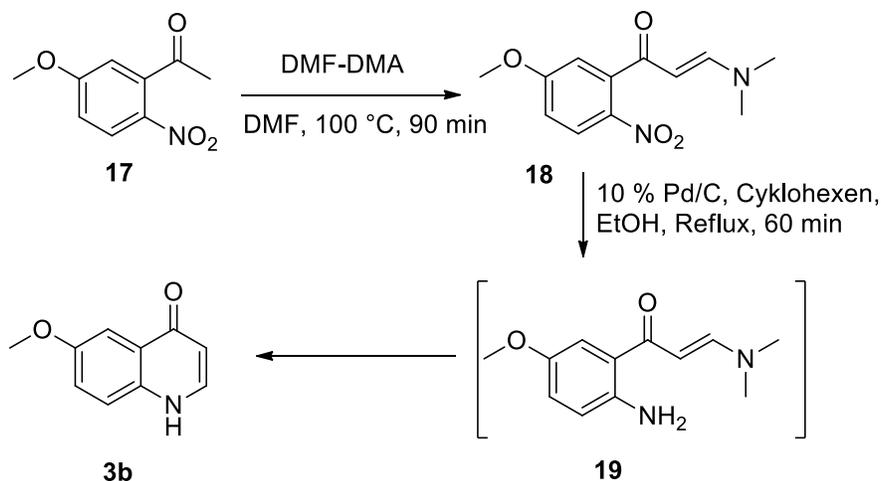


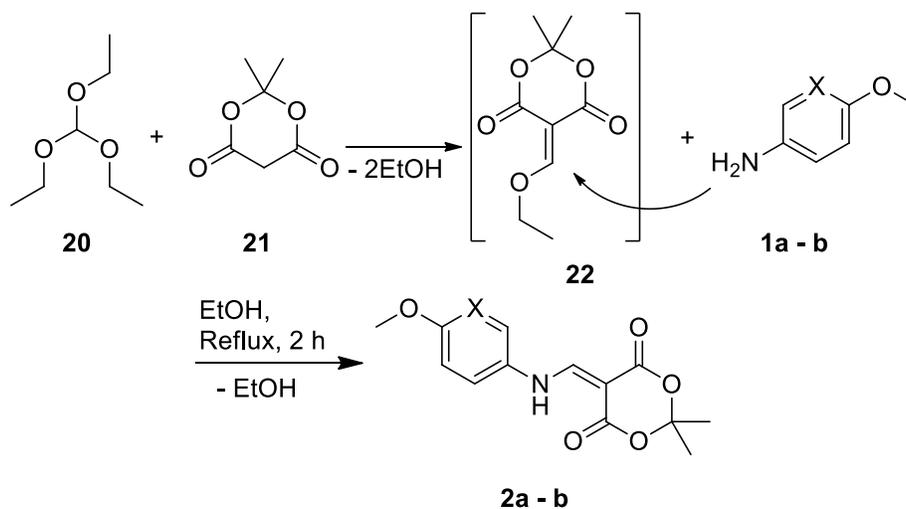
Abbildung 19 Syntheseweg B für die Darstellung von 6-Methoxy-1*H*-chinolin-4-on.<sup>76</sup>

Die Ausbeute von 6-Methoxy-1*H*-chinolin-4-on **3b** beträgt laut Literatur 52 %.<sup>76</sup> Die Darstellung von 6-Methoxy-1*H*-naphthyridin-4-on **3a** ist für dieses Verfahren nicht beschrieben. Wegen der größeren Diversität nutzbarer Edukte und den höheren Ausbeuten wurde im Zuge dieser Arbeit lediglich die zuvor beschriebene Methode verwendet.

### Synthese der Aminomethylenmeldrumsäurekonjugate

Ausgehend von 5-Amino-2-methoxypyridin **1a** bzw. 4-Methoxyanilin **1b** wurde im ersten Schritt die aromatische Aminogruppe mit Orthoameisensäuretriethylester **20** und Meldrumsäure **21** in Ethanol zu den Aminomethylenmeldrumsäurekonjugaten **2a–b** umgesetzt. Die Reaktion verläuft in zwei Schritten: Zunächst kondensiert Meldrumsäure **21** und der Orthoester **20** zur Ethoxymethylenmeldrumsäure **22**.

Die entstandene Ethoxymethylenmeldrumsäure **22** reagiert im nächsten Schritt mit dem aromatischen Amin der Aniline **1a–b**. Der Stickstoff addiert nukleophil an den Methylenkohlenstoff der Ethoxymethylenmeldrumsäure **22**. Unter den Reaktionsbedingungen wird ein weiteres Molekül Ethanol eliminiert, wodurch sich die Aminomethylenmeldrumsäurederivate **2a–b** bilden.<sup>77</sup> Die Reaktionen können in einem Arbeitsgang durchgeführt werden.



X	Edukt	Produkt	Ausbeute [%]
N	<b>1a</b>	<b>2a</b>	70
CH	<b>1b</b>	<b>2b</b>	64

**Abbildung 20** Darstellung der Aminomethylenmeldrumsäurekonjugate

Das Reaktionsgemisch wurde nach der Reaktion langsam auf Raumtemperatur abgekühlt, dabei fiel das Produkt aus. Die Ausbeuten der Reaktion waren bei der eingesetzten Anilinderivaten vergleichbar. Unter Verwendung von 6-Methoxypyridin-3-amin **1a** wurden 70 % des Produkts isoliert, während mit 4-Methoxyanilin **1b** 64 % der theoretischen Ausbeute erhalten wurde (Abbildung 20). Aminomethylenmeldrumsäure-Konjugate besitzen hohen synthetischen Wert für die Darstellung verschiedener Heterocyclen wie Chinolinone oder Pyridopyrimidone.<sup>78,79</sup>

### Synthese der anellierten Heterocyclen

Die im ersten Schritt erhaltenen Produkte **2a–b** wurden nun zu den anellierten Heterocyclen **3a–b** der LHS umgesetzt. Bei der Reaktion handelt es sich um eine Pyrolyse. Ihr Mechanismus ähnelt dem der Gould-Jacobs-Reaktion, welche für die Darstellung von 4-Hydroxychinolin-derivaten genutzt wird.<sup>80</sup> Der Unterschied besteht darin, dass bei der klassischen Gould-Jacobs-Reaktion Alkoxymethylenmalonsäureester **13** anstelle der Meldrumsäurederivate **22** verwendet werden.

Der Mechanismus der Reaktion beruht auf dem thermischen Kollaps des Meldrumsäureringsystems in **2a**. Dabei entstehen Aceton, Kohlendioxid und das Methylenketen **23**. Durch eine 1,3-Protonenverschiebung lagert sich das Methylenketen **23** zum Iminoketen **24** um (Abbildung 21). Die Reaktion gelingt ausschließlich unter Schutzgasatmosphäre, was vermutlich auf der Entstehung dieser hochreaktiven Spezies beruht. Ebenfalls könnte das Nichtgelingen der Umsetzung ohne Schutzgas dadurch erklärt werden, dass das Edukt aufgrund der hohen Temperaturen oxidiert wird. Bei den für diese Reaktion notwendigen Temperaturen findet nun eine elektrophile Addition am Aromaten und Cyclisierung zum Intermediat **25** statt. Schließlich wird durch einen Protonentransfer das aromatische System wieder hergestellt, wodurch das Produkt **3a** entsteht.<sup>79</sup>

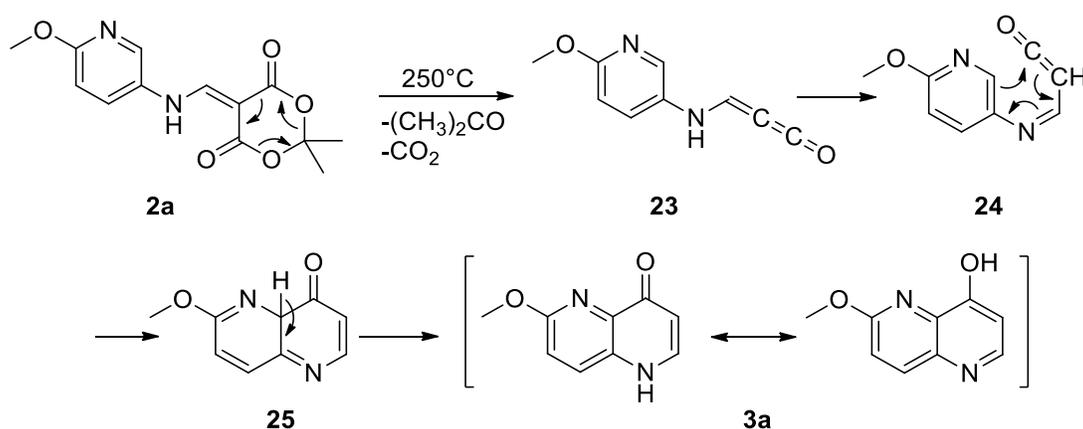
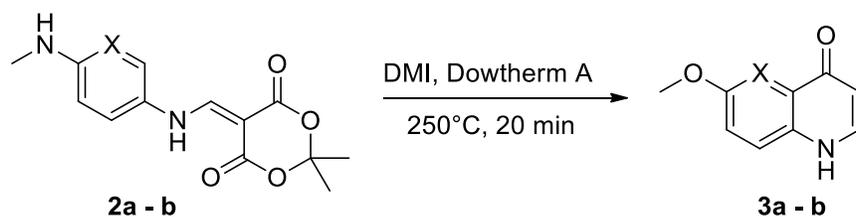


Abbildung 21 Mechanismus Cyclisierung am Beispiel des Naphthyridons

Die Reaktion wird in siedendem Dowtherm A<sup>®</sup> durchgeführt, einem kommerziell vertriebenen Hitzeübertragungsfluid. Es besteht aus einer eutektischen Mischung von Diphenyl (26.5 %) und Diphenyloxid (73.5 %). Die Mischung zeichnet sich durch ihre inerten Eigenschaften und dem hohen Siedepunkt aus, dieser liegt bei etwa 250 °C. Für die Reaktion wird das Edukt zunächst in 1,3-Dimethylimidazolidin-2-on (DMI) bei 80 °C gelöst. DMI ist ein alkylierter cyclischer Harnstoff und besitzt herausragende Lösungseigenschaften. Es wird wegen seines hohen Dipolmoments häufig als Medium für nukleophile Substitutionen eingesetzt. Zusätzlich ist es thermisch stabil und besitzt einen hohen Siedepunkt von 180 °C. Dies ist für die Durchführung von Bedeutung, da die heißgesättigte Lösung des Edukts in DMI in das siedende Dowtherm A<sup>®</sup> injiziert wird. Niedrig siedende LM sind hier ungeeignet, da der plötzliche Temperaturanstieg zum sofortigen Verdampfen des LM führt. Der damit verbundene Druckanstieg im Reaktionsgefäß stellt ein Sicherheitsrisiko dar. Dies trifft umso mehr zu, da die Reaktion unter Argonatmosphäre durchgeführt werden muss. Versuche die Reaktion ohne Schutzgas durchzuführen, waren nicht erfolgreich.<sup>75</sup>



X	Edukt	Produkt	Ausbeute [%]
N	<b>2a</b>	<b>3a</b>	50
CH	<b>2b</b>	<b>3b</b>	38

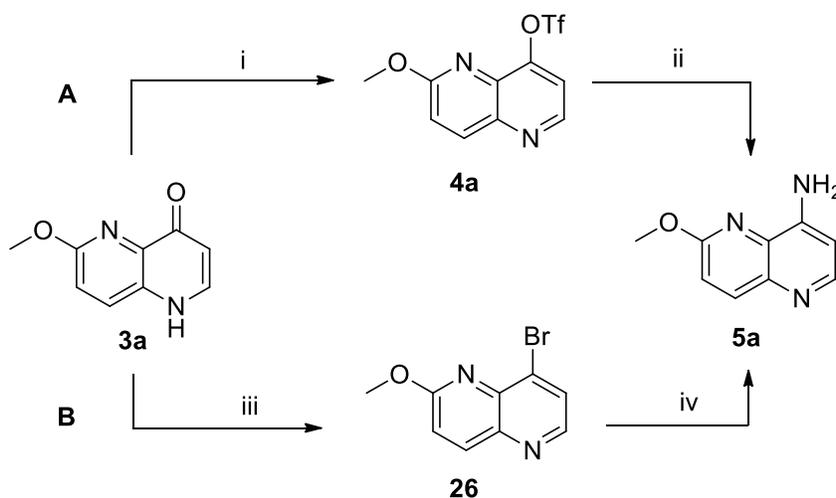
Abbildung 22 Synthese des Naphthyridons bzw. Chinolons

Die Reaktion verläuft sehr heftig. Wegen des entstehenden Drucks innerhalb des Reaktionsgefäßes muss an die Apparatur ein Überdruckventil angebracht werden. Die Ausbeuten der Reaktion sind 50 % für das Methoxynaphthyridon **3a** und 38 % für das Methoxychinolinon **3b**. Die

Reaktionszeit betrug 20 min, wobei eine Verlängerung der Reaktionszeit auf 45 min nicht zu einer höheren Ausbeute führte (Abbildung 22).

## 2.1.3 SYNTHESE DER TRIFLUORMETHANSULFONSÄURE-ESTER

Die Einführung der Trifluormethansulfonsäurefunktion (Triflat, Tf) dient der Aktivierung der Position-4 der Heterozyklen **3a–b** für eine nukleophile Substitution. Die Triflatgruppe ist das Trifluor-analoge der Mesylatgruppe (Ms). Ms wird in der organischen Synthese als Abgangsgruppe verwendet, um z.B. Alkohole für nukleophile Substitutionen am Kohlenstoff zugänglich zu machen.

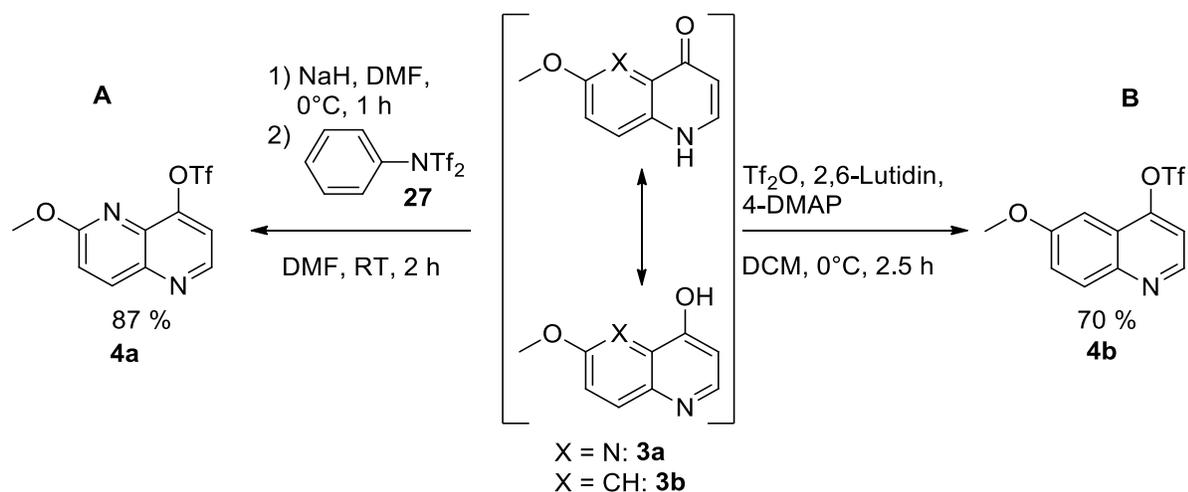


Methode	Bedingungen	Teilausbeute	Gesamtausbeute
			[%]
<b>A</b> <sup>81</sup>	i	2,6-Lutidin, DMAP, Tf <sub>2</sub> O, RT, 2.5 h	75
	ii	n-PrNH <sub>3</sub> Cl, Pyridin, Reflux, 4 h	63
<b>B</b> <sup>82</sup>	iii	DMF, PBr <sub>3</sub> , RT, 1 h	94
	iv	n-PrNH <sub>3</sub> Cl, Pyridin, Reflux, 3 h	97

Abbildung 23 Mögliche Synthesewege für 5a

Wegen der hohen Azidität der Trifluormethansulfonsäure sind ihre Ester erheblich reaktiver und reagieren wesentlich schneller als die der Methansulfonsäure.<sup>83</sup> Eine weitere Methode um die Position 4 zu aktivieren, ist die Überführung in das entsprechende Halogenid **26** mit z.B. Phosphortribromid.<sup>82</sup> Trotz der besseren Literaturnutzen für die Bromierung und weiteren Überführung in das Amin wurde im Rahmen dieser Arbeit dieser Syntheseweg nicht durchgeführt. Die Gründe hierfür sind die Vermeidung der Verwendung von giftigem Phosphortribromid und der guten Durchführbarkeit der Triflat-Methode (Abbildung 23). Die dargestellten Heterocyclen **3a–b** besitzen Enol-Keto-Tautomere. In der Enolform ist der aromatische Charakter des anellierten Systems zu erkennen. In Gegenwart einer starken Base wird der Stickstoff deprotoniert und das tautomere Gleichgewicht verlagert sich zugunsten der Enolform. Zur Erzeugung des Enolats wurde Natriumhydrid verwendet. Natriumhydrid ist kommerziell als 60 %ige Suspension in Mineralöl erhältlich. In dieser Form ist es besser lagerstabil und handhabbar als in Reinform. Um das Öl zu entfernen, wird mit Heptan überschichtet und gerührt. Nachdem der Feststoff (NaH) sedimentiert ist, kann das überstehende Alkan dekantiert werden. Der Vorgang wird mehrmals mit frischem Lösungsmittel wiederholt. Zur Einführung der Tf-Gruppe wurde vorrangig 1,1,1-Trifluor-*N*-[(trifluormethyl)sulfonyl]methan-sulfonamid **27** (Bistriflimid) verwendet.<sup>71</sup> Die Substanz ist ein weißer Feststoff mit guter Lagerstabilität. Der Umgang damit ist wesentlich vorteilhafter als mit dem flüssigen und sehr hydrolyseempfindlichen Trifluormethansulfonsäureanhydrid<sup>81</sup>, welches ebenfalls zur Darstellung von Tf-Estern verwendet wird. Nachteile sind der vergleichsweise hohe Preis und die schlechte Reaktionsökonomie von Bistriflimid. Bei der Reaktion findet eine nukleophile Substitution zwischen dem Enolat und dem Sulfonimid statt. In der Folge entsteht das gewünschte Produkt **4a** und Phenyltriflimid als Nebenprodukt. Die Ausbeute betrug 87 %. Um die beiden Methoden zu vergleichen, wurde mit dem Chinolinonderivat **3b** die Einführung der Tf-Gruppe mittels Tf<sub>2</sub>O durchgeführt. Dabei lag die erreichte Ausbeute von **4b** bei 70 % (Abbildung 24).

Für die Synthese der Triflate ist die Verwendung von Bistriflimid zu bevorzugen. Die Gründe hierfür liegen in der höheren Ausbeute, der erwähnten besseren Handhabbarkeit, aber auch in der geringeren Empfindlichkeit (Temperatur, Reaktionszeit) und der besseren Reproduzierbarkeit bei der Verwendung von Bistriflimid gegenüber dem Anhydrid.



**Abbildung 24** Durchgeführte Synthesewege für **4a** und **4b**. **A** Die Darstellung des Triflats **4a** aus **3a** mit Bistriflimid.<sup>71</sup> **B** Die Darstellung des Triflats **4b** aus **3b** mit  $\text{Tf}_2\text{O}$ .

Die isolierten Produkte sind reaktiv gegenüber Nucleophilen. Ihre Lagerung sollte unter Schutzgasatmosphäre und bei 4 °C erfolgen, da sonst rasch eine Verfärbung eintritt. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung zeigte mehrere Zersetzungsprodukte, die aber nicht charakterisiert wurden.

## 2.1.4 SYNTHESE DER ANILINDERIVATE

Die Patenliteratur beschreibt für die Synthese der Anilinderivate **4a–b** die Umsetzung der Triflate mit n-Propylaminhydrochlorid in kochendem Pyridin.<sup>72–74</sup> Diese ungewöhnliche Methode der Anilinsynthese wird folgend erläutert.<sup>84</sup> Die Autoren der Originalliteratur berichten von der Beobachtung, dass 4-Chlorpyridin-3-carbonsäure mit den Hydrochloriden von primären Aminen in kochendem Pyridin zu 4-Amino-3-carbonsäure reagiert. In der gleichen Arbeit dient diese Methode der Umsetzung von 4-Chlor-3-arylpyridin **28** zu 4-Amino-3-arylpyridin **29**. Bei der Verwendung von 2-Aminoethanolhydrochlorid anstelle von n-Propylaminhydrochlorid wurde neben dem Hauptprodukt auch 3-Benzoyl-4-(2-hydroxyethylamino)-pyridin **30** nachgewiesen. Die Reaktion von 4-Chlor-3-arylpyridin **28** mit 2-Aminoethanol lieferte **30** als einziges Produkt. Die Autoren geben an, dass es sich bei **30** um ein Nebenprodukt der Reaktion handelt, da es sich unter erneutem Kochen in Pyridin nicht zu 4-Amino-3-arylpyridin **29** umsetzt (Abbildung 25). Der Mechanismus, nach welchem die Reaktion verläuft, ist somit nicht eindeutig beschrieben.

Es wird angenommen, dass unter den Bedingungen freies Ammoniakgas gebildet wird, welches für den Cl/NH<sub>2</sub>-Austausch verantwortlich ist.<sup>84</sup>

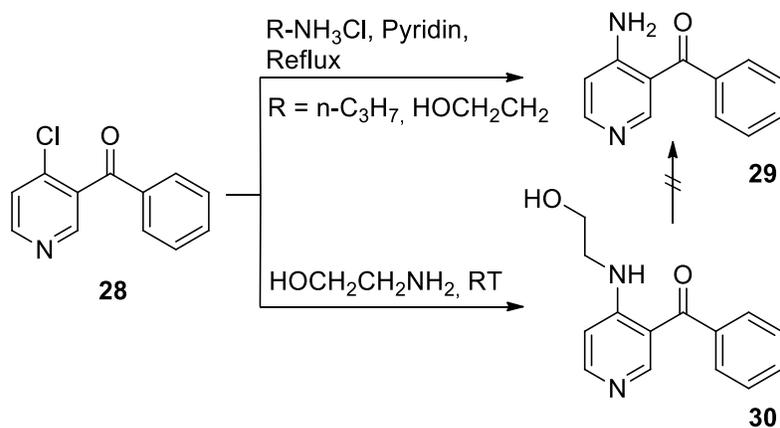
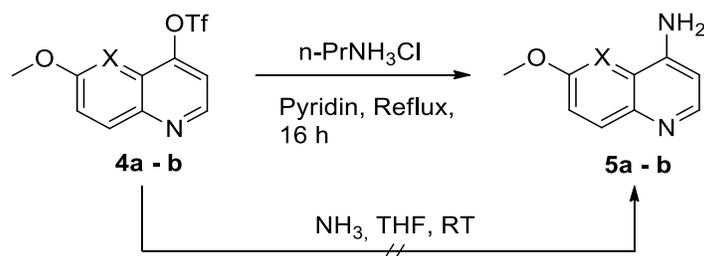


Abbildung 25 In der Literatur beschriebene Anwendungen der Reaktion<sup>84</sup>

Die Synthese der Anilinderivate **5a–b** erfolgte ausgehend von den entsprechenden Tf-Estern **4a–b**. Hierfür wurden die Edukte in siedendem Pyridin in Gegenwart von n-Propylaminhydrochlorid umgesetzt. Die Ausbeuten der Reaktionen waren vergleichbar und betrugen 70 % bzw. 78 % (Abbildung 26).



X	Edukt	Produkt	Ausbeute [%]
N	<b>4a</b>	<b>5a</b>	70
CH	<b>4b</b>	<b>5b</b>	78

Abbildung 26 Darstellung der Anilinderivate

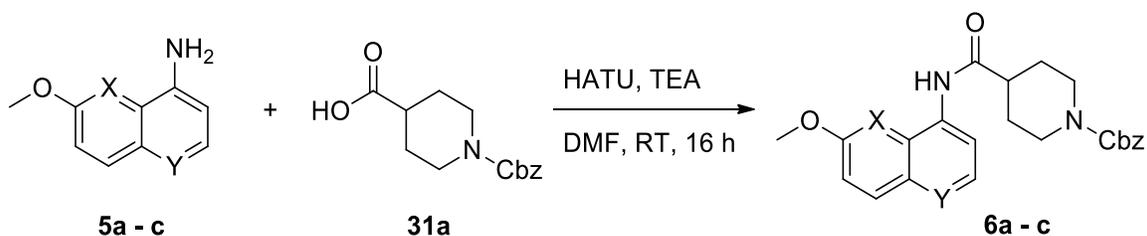
Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich *n*-Propylaminhydrochlorid im Überschuss verwendet. Die Anwendbarkeit der Methode ist plausibel, denn die Naphthyridin- und Chinolinderivate **4a** und **4b** stellen anellierte Analoga des in der Originalliteratur verwendeten Aroylpyridins **28** dar. Anstelle des Chlorids dient das Triflat als Abgangsgruppe. Die als Nebenprodukte denkbaren *N*-Propyl-derivate wurden nicht beobachtet. Um die recht harschen Reaktionsbedingungen dieser Methode zu vermeiden, wurde alternativ versucht, die Cl/NH<sub>2</sub>-Substitution mit Ammoniak in THF bei Raumtemperatur durchzuführen. Hierbei konnte jedoch keine Reaktion beobachtet werden.

## 2.1.5 SYNTHESE DER AMIDBINDUNG

In den meisten der dargestellten Verbindungen ist der bicyclische Heteroaromat der LHS über eine Amidbindung mit dem Linker verknüpft. Zur Darstellung der Amidverbindungen **6a–e** wurde HATU (*O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat) verwendet.<sup>72,73</sup> HATU ist ein in der Peptidchemie eingesetztes Kupplungsreagenz zur Darstellung von Carbonsäureamiden unter milden Bedingungen. Es kann in zwei isomeren Formen vorliegen (Guanidinium-(*N*)-Form und Uronium-(*O*)-Form). Die Verwendung als Kupplungsreagenz basiert auf der Bildung eines Aktivesters mit der Carboxylatkomponente des entstehenden Amids. Als Base wird meist DIPEA oder TEA verwendet. Der Aktivester reagiert im Anschluss mit einem Amin unter Elimination von 1-Hydroxybenzotriazol.<sup>85</sup> Die Reaktion wird üblicherweise in DMF durchgeführt.

Um die Bildung von intermolekularen Nebenprodukten der eingesetzten Piperidin-4-carbonsäuren **31a–c** in Gegenwart von Kupplungsreagenzien wie HATU zu unterdrücken, wurde die Aminfunktion zuvor als *tert*-Butylcarbammat (Boc) oder Benzylcarbammat (Cbz) geschützt.

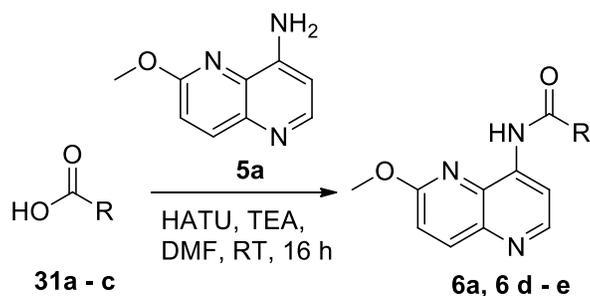
Das Gelingen und die Ausbeute der Produkte **6a–c** sind abhängig von den eingesetzten Edukten. Während die 4-Amino-pyridinderivate **5a** und **5b** mit 1-Cbz-piperidin-4-carbonsäure **31a** Ausbeuten von 66 und 99 % lieferten, wurden mit dem 8-Aminochinolinderivat **5c** lediglich 47 % erreicht (Abbildung 27).



X	Y	Edukt	Produkt	Ausbeute [%]
N	N	<b>5a</b>	<b>6a</b>	99
CH	N	<b>5b</b>	<b>6b</b>	66
N	CH	<b>5c</b>	<b>6c</b>	47

Abbildung 27 Darstellung der Anilide aus verschiedenen Anilinen unter Verwendung von HATU

Einen stärkeren Einfluss als die eingesetzten Amine **5a–c** übt die chemische Struktur der Carbonsäurekomponente auf die Ausbeute der Amidkupplung aus. 1-Cbz-4-piperidin-4-carbonsäure **31a** lieferte mit dem 4-Amino-pyridinderivat **5a** eine Ausbeute von 99 %. Bei gleichen Bedingungen reagierte hingegen *trans*-1-Cbz-4-aminocyclohexylcarbonsäure nicht mit **5a**. Erst nach Ersatz der Cbz-Schutzgruppe durch eine Boc-Schutzgruppe **31c** konnte das gewünschte Amid **6e** erhalten werden (Ausbeute 68 %). Bei der Reaktion von **5a** mit 1-Cbz-piperidin-4-methylcarbonsäure **31b** betrug die Ausbeute 46 % (Abbildung 28).



R	Edukt	Produkt	Ausbeute [%]
	<b>31a</b>	<b>6a</b>	99

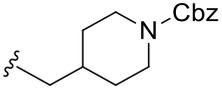
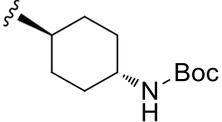
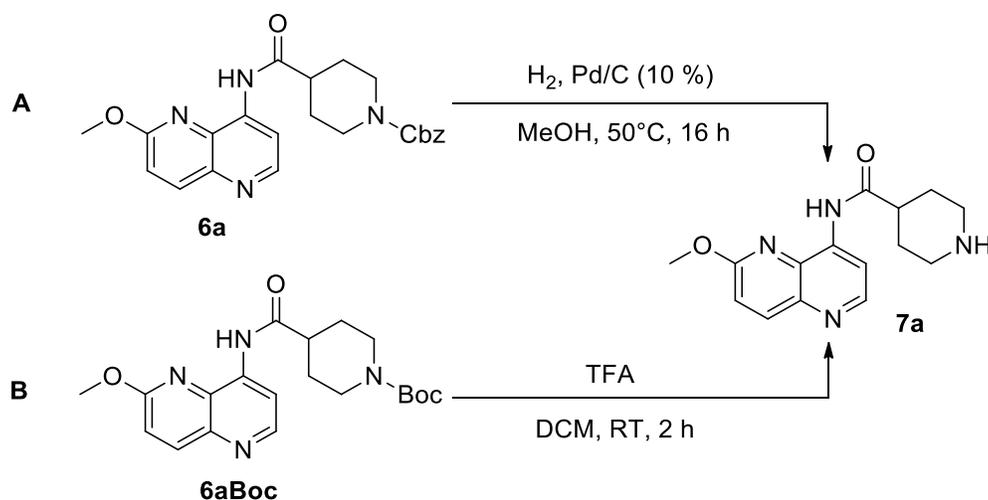
R	Edukt	Produkt	Ausbeute [%]
	<b>31b</b>	<b>6d</b>	46
	<b>31c</b>	<b>6e</b>	68

Abbildung 28 Darstellung der Anilide aus verschiedenen Carbonsäuren unter Verwendung von HATU

## 2.1.6 ENTFERNUNG DER CBZ- BZW. BOC-SCHUTZGRUPPE

Die beschriebene Methode zur Darstellung der Amide **6a–e** bedingt die Verwendung von Schutzgruppen, um die Entstehung von ungewünschten Nebenprodukten zu unterbinden. Bei den verwendeten Linkern handelt es sich um Aminosäuren. Diese würden ungeschützt dazu neigen, unter den Bedingungen der Amidkupplungsreaktion intermolekulare Nebenreaktionen einzugehen. Je nach Verfügbarkeit wurden die *N*-geschützten Edukte kommerziell bezogen oder die freien Amine mit *N*-(Benzyloxycarbonyloxy)-succinimid in die entsprechenden *N*-Cbz-Derivate überführt. Nach der Amidsynthese beinhaltet der nächste Schritt die Abspaltung der Schutzgruppe, wodurch die Zwischenverbindungen **7a–g** erhalten wurden. Die Cbz-Schutzgruppe wurde durch katalytische Hydrierung mit Pd/C 10 % und Wasserstoff unter leichtem Erwärmen entfernt (Abbildung 29, Methode **A**). Der Vorteil bei der Verwendung der Cbz-Schutzgruppe besteht in ihrer Abspaltung unter milden Bedingungen (katalytische Hydrierung). Die Abspaltung der Boc-Gruppe gelang mit TFA in DCM bei Raumtemperatur (Abbildung 29, Methode **B**). Dabei konnten allgemein höhere Ausbeuten erzielt werden als bei der Entfernung der Cbz-Gruppe.



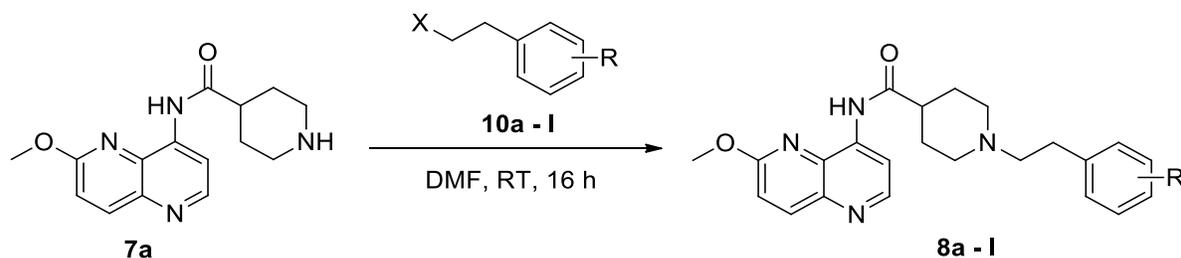
Methode	Edukt	Produkt	Ausbeute [%]
A	<b>6a</b>	<b>7a</b>	80
B	<b>6aBoc</b>	<b>7a</b>	90
A	<b>6b</b>	<b>7b</b>	34
A	<b>6c</b>	<b>7c</b>	38
A	<b>6d</b>	<b>7d</b>	73
B	<b>6e</b>	<b>7e</b>	100
B	<b>6f</b>	<b>7f</b>	85
B	<b>6g</b>	<b>7g</b>	98

Abbildung 29 Entfernung der Cbz- bzw. Boc-Schutzgruppe

## 2.1.7 ALKYLIERUNG DER SEKUNDÄREN AMINE

Der letzte Schritt der Synthesesequenz beinhaltet die Alkylierung der entschützten sekundären Amine mit den entsprechenden Phenylethylbromiden, -mesylaten bzw. -tosylaten **10a–n**. Die Reaktion erfolgte in DMF bei Raumtemperatur. Als Alkylierungsmittel wurden die entsprechenden Alkylbromide **10a–g** verwendet. In einigen Fällen waren diese nicht mit dem gewünschten Substitutionsmuster am Phenylring verfügbar. Darum wurden die gewünschten Reagenzien aus den Phenylethylsäurederivaten hergestellt. Die jeweiligen Phenylethylsäurederivate sind kommerziell in größerer Vielfalt erhältlich. Diese wurden durch eine kurze Sequenz in die Phe-

nylethylmesylate **10h–m** bzw. -tosylate **10n** überführt und so für die Substitution am Amin zugänglich gemacht (Abbildung 30).



X	R	Produkt	Ausbeute [%]
Br	4-Cl	<b>844</b>	67
Br	4-CF <sub>3</sub>	<b>844-TFM</b>	51
Br	2-F	<b>8a</b>	67
Br	4-OCH <sub>3</sub>	<b>8b</b>	12
Br	4-F	<b>8c</b>	32
Br	2,6-F	<b>8d</b>	23
Br	3,4-F	<b>8e</b>	50
OMs	3-F	<b>8f</b>	80
OMs	3-CF <sub>3</sub>	<b>8g</b>	24
OMs	4-OCF <sub>3</sub>	<b>8h</b>	41
OMs	2,3-F	<b>8i</b>	30
OMs	2,4-F	<b>8j</b>	30
OMs	3,5-F	<b>8k</b>	26
OTs	3-F-4-CF <sub>3</sub>	<b>8l</b>	17

Abbildung 30 Alkylierung der sekundären Amine

Es wurde vermutet, dass sich das Carbamat **8m** anstelle des tertiären Amins **8a** gebildet hatte. Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum deutete zunächst auf eine dem gewünschten Produkt ähnliche Struktur hin. Im Tieffeld bestehen keine Unterschiede zwischen **8a** und **8m**. Im Hochfeld sind die alkyli-schen Signale von **8m** ins Tieffeld verschoben. Im Vergleich zu **8a** ist das Triplett der Methylen-

gruppe A' des Phenylethylrests um 1.6 ppm verschoben (Abbildung 31). Einen weiteren Hinweis auf die Einführung einer Carbamatgruppe gibt das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum.

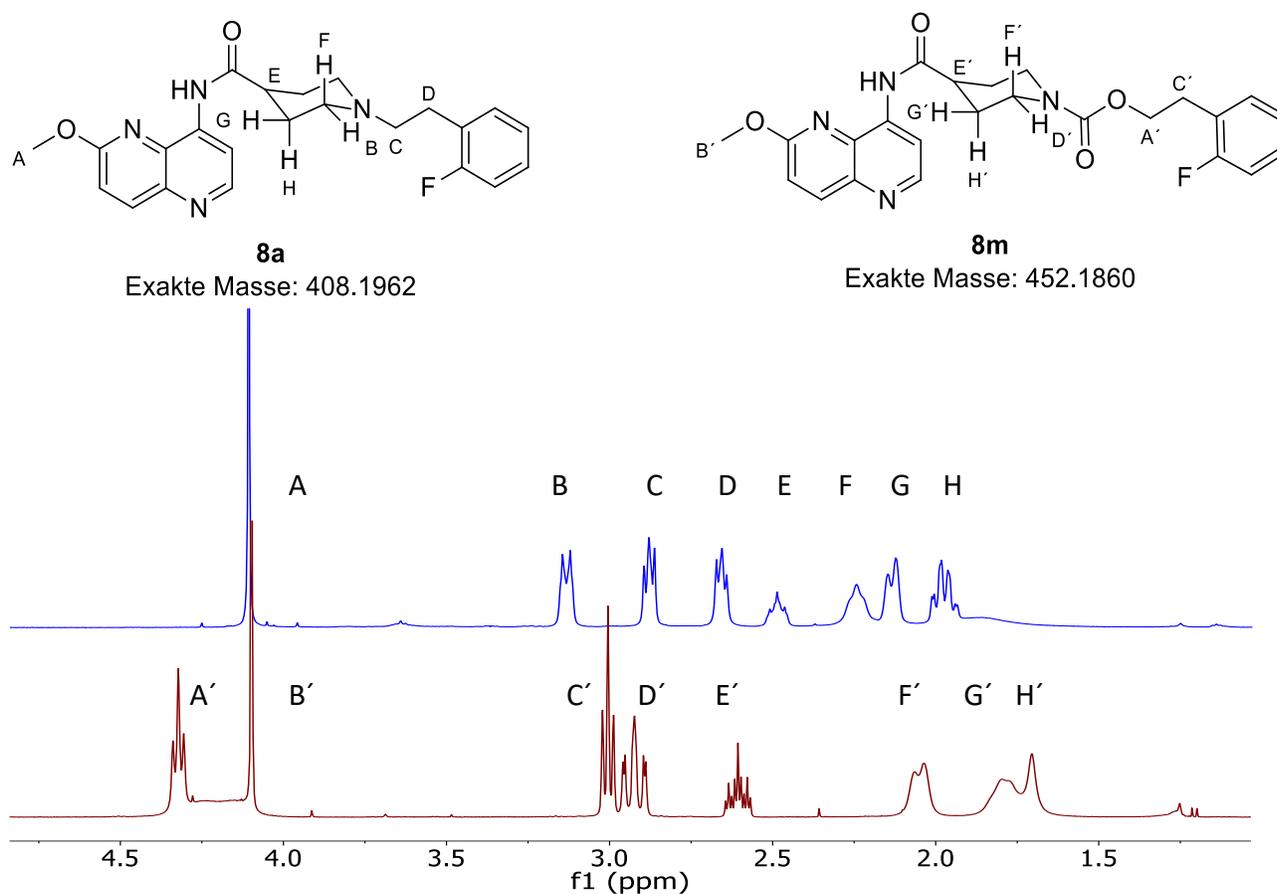


Abbildung 31 Vergleich der  $^1\text{H}$ -NMR von **8a** (blau) und dem Nebenprodukt **8m** (rot) in  $\text{CDCl}_3$  und 400 MHz.

Die Substanz **8m** zeigt bei 155.1 ppm ein Signal, welches im Spektrum von **8a** fehlt. Die analytischen Daten deuten darauf hin, dass unter den Reaktionsbedingungen das Carbamat **8m** entstanden ist. In der Literatur sind solche Reaktionen unter ähnlichen Reaktionsbedingungen bekannt.<sup>86</sup>

## 2.1.8 SYNTHESE DER 8-AMINOCHINOLINDERIVATE

Die Testsubstanzen **8n** und **8s** enthalten als LHS ein an Position 2 und 8 substituiertes Chinolin. Anstelle einer Cyclisierung unter pyrolytischen Bedingungen wurden die beiden 8-Aminochinolinderivate **5c** und **35** ausgehend von 2-Chlorchinolin **32** synthetisiert.

Zunächst erfolgte die Nitrierung des Chinolins **32** mit Nitriersäure ( $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ ).<sup>87</sup> Dadurch konnte 8-Nitro-2-chlorchinolin **33** erhalten werden. Die Identität des Produkts wurde durch Literaturvergleich anhand der  $^1\text{H-NMR}$  bestätigt werden. Damit wurde ausgeschlossen, dass es sich bei der isolierten Substanz um ein Stellungsisomer 5-Nitro-2-chlorchinolin handelt. Die Synthese lieferte eine Ausbeute von 32 %. Die Nebenprodukte wurden nicht charakterisiert. Vermutlich wurde die moderate Ausbeute durch die gleichzeitige Entstehung des Stellungsisomers verursacht.

Zur Darstellung von 2-Methoxy-8-Nitrochinolin **34** wurde **33** in einer Williamson-Ethersynthese mit Natriummethanolat in den Methylether überführt.<sup>88</sup> Die Reaktion verlief mit einer Ausbeute von 92 %.

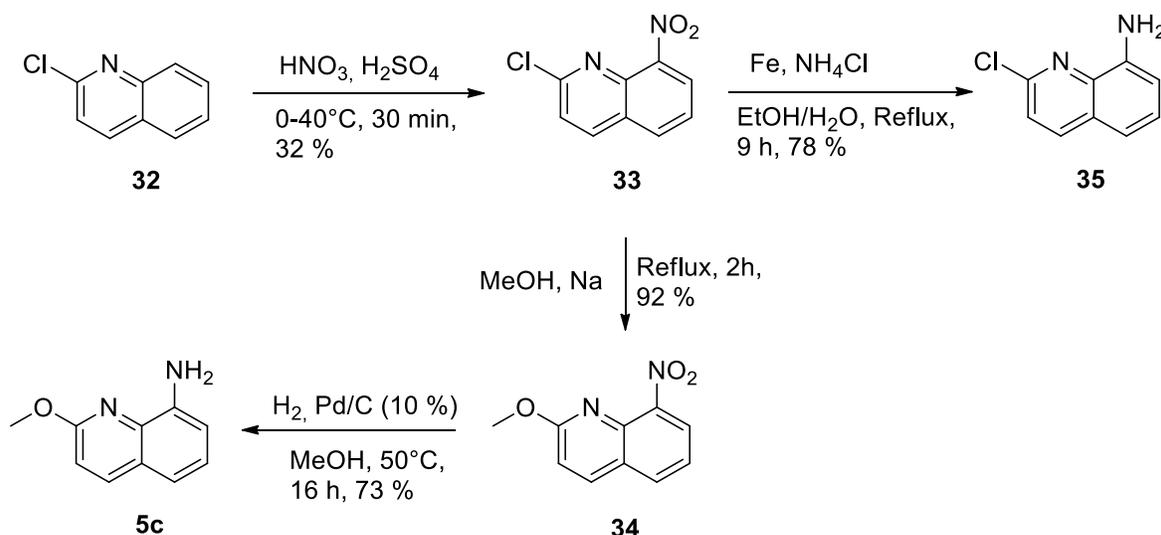


Abbildung 32 Darstellung der 2-Methoxychinolinderivate

Die Nitrogruppe der Chinolinderivate **33** und **34** wurden im nächsten Schritt zu den entsprechenden Aminochinolinen **5c** und **35** reduziert. Hierfür wurden zwei Methoden verwendet. Die

Reduktion von 2-Methoxy-8-nitrochinolin **34** zu 2-Methoxy-8-aminochinolin **5c** erfolgte durch katalytische Hydrierung mit  $H_2$  und Pd/C(10 %) in Methanol mit einer Ausbeute von 73 %. Weiterhin gelang die Reduktion mit Eisenpulver unter sauren Bedingungen ( $NH_4Cl$  oder Essigsäure) in Ethanol und Wasser. Bei der Verwendung von  $NH_4Cl$  anstelle von Essigsäure konnte die Ausbeute verbessert werden (40 vs. 78 %) <sup>89</sup> (Abbildung 32). Die hohe Selektivität dieser Reaktion ermöglichte ebenfalls die Synthese von 2-Chlor-8-aminochinolin **35** aus 2-Chlor-8-nitrochinolin **33**, welche aufgrund der Labilität des aromatischen Chlorsubstituenten durch katalytische Hydrierung nicht zugänglich ist. Die Instabilität des Chlorsubstituenten zeigte sich bei der Entfernung der Cbz-Gruppe nach der Kupplung mit 1-Cbz-piperidin-4-carbonsäure **31a** im darauffolgenden Schritt.

## 2.1.9 ALTERNATIVER SYNTHESWEG ZUR DARSTELLUNG DER P4C

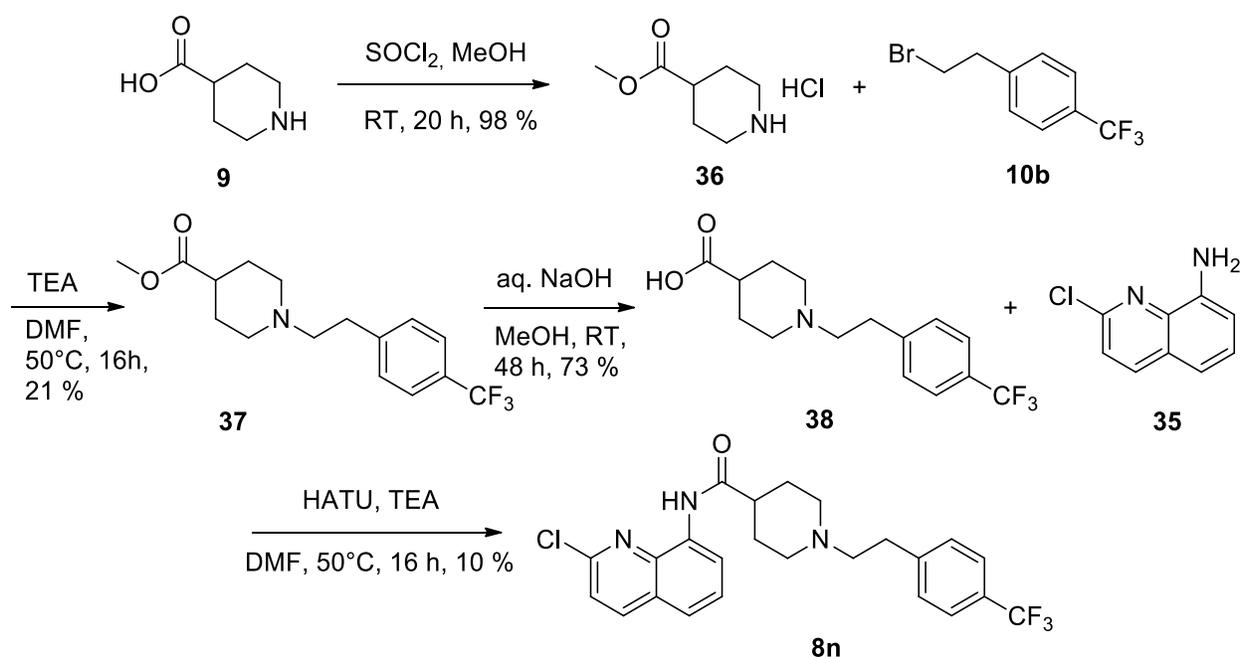


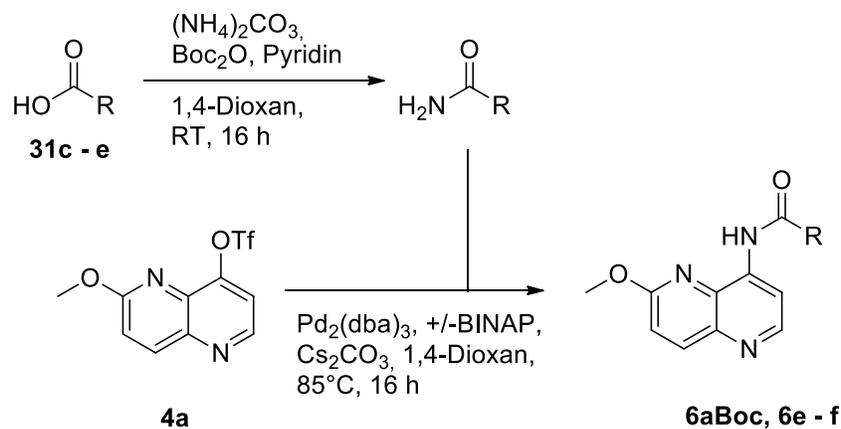
Abbildung 33 Alternativer Syntheseweg für die Darstellung von 8n

Wegen der Instabilität des Chlorsubstituenten von 8-Nitro-2-chlorchinolin **35** gegenüber den Bedingungen bei der katalytischen Hydrierung wurde ein alternativer Syntheseweg zur Herstellung von **8n** entwickelt (Abbildung 33).

Dabei wurde Piperidin-4-carbonsäure **9** zunächst in den Methylester **36** überführt, um die Carboxylatfunktion vor Nebenreaktionen zu schützen.<sup>90</sup> Anschließend wurde der sekundäre Stickstoff mit 1-(2-Bromethyl)-4-(trifluormethyl)benzen **10a** alkyliert. Danach wurde der Methylester **37** verseift und die entstandene Carbonsäure **38** mit **35** zum Carboxamid **8n** umgesetzt.<sup>72,73,91</sup> Die Amidierung hatte dabei nur eine geringe Ausbeute von 10 %. Die neue Syntheseroute wird im Kapitel 2.1.14. mit den anderen verglichen.

## 2.1.10 SYNTHESE DER AMIDE AUS DEN CARBAMIDEN

Im Zuge der Syntheseoptimierung wurde die Sequenz für die Darstellung der Anilide verändert. Laut der Literatur kann die Synthese der Amide durch Palladium-katalysierte Kreuzkupplung der Triflate und den Carbamiden erfolgen.<sup>81</sup> Für die Kreuzkupplung wurden die Carbonsäuren **31c–e** mit Ammoniumcarbonat und Boc<sub>2</sub>O in Dioxan und katalytischen Mengen Pyridin in die Carbamide überführt.<sup>92</sup> Folglich wurden die Carbamide in Gegenwart von Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>, +/-BINAP und Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 1,4-Dioxan mit dem Triflat **4a** gekoppelt. Die Bedingungen entsprechen denen einer Buchwald-Hartwig-Reaktion.<sup>93</sup> Die Kupplung gelang bei Verwendung von *tert*-Butyl-4-carbamoyl-4-methyl-piperidin-1-carboxylat mit einer Ausbeute von 35 % (Abbildung 34). Die in der Literatur angegebenen Ausbeuten von > 95 % konnten in dieser Arbeit nicht erreicht werden.<sup>81</sup> Der Vorteil dieser Methode liegt in der Vermeidung der Anilinsynthese mit *n*-Propylaminhydrochlorid und Pyridin. Damit verkürzt sich die gesamte Sequenz um einen Schritt. Außerdem erweitert diese Variante die Vielfalt der Edukte, welche als Linker eingesetzt werden können. So liefern Amidkupplungen zwischen 4-Alkyl-piperidin-4-carbonsäuren wie **31d** und Aminonaphthyridin **5a** unter Verwendung von HATU nur geringe Ausbeuten. Die Patentliteratur beschreibt die Synthese solcher Verbindungen unter Verwendung von 1,1'-Carbonyldiimidazol als Kupplungsreagenz mit einer Ausbeute von 36 %.<sup>74</sup> Diese Methode wurde im Zuge dieser Arbeit nicht durchgeführt, weil die hier beschriebene Methode zufriedenstellende Resultate mit guter Reproduzierbarkeit erzielte.



R	Edukt	Produkt	Ausbeute [%]
	<b>31c</b>	<b>6e</b>	21
	<b>31d</b>	<b>6f</b>	35
	<b>31e</b>	<b>6aBoc</b>	54

Abbildung 34 Darstellung der primären Carboxamide und Palladium-katalysierte Kupplung

## 2.1.11 SYNTHESE DES SULFONAMIDDERIVATS

Besonders wertvoll ist die vorgestellte Palladium-katalysierte Kupplung für die Darstellung des Sulfonamids **6h**. In der Literatur ist die Synthese von Sulfonamiden, bei denen der Aromat die Aminkomponente darstellt, wenig beschrieben. Häufig handelt es sich dabei um Darstellungen von Methylsulfonsäureamiden. Wesentlich vielfältiger sind die Varianten zur Herstellung von *S*-Arylsulfonsäureamiden, wie den Tosylaten. Meist wird die Synthese durch Reaktion von Sulfonsäurechloriden mit den entsprechenden Aminen beschrieben. Im Zuge dieser Arbeit waren Versuche, das Sulfonamid **6h** durch Reaktion zwischen 2-Methoxy-4-aminonaphthyridin **5a** und

*tert*-Butyl-4-(chlorosulfonyl)-piperidin-1-carboxylat **39** nicht erfolgreich. Stattdessen gelang die Synthese des Sulfonamids ebenfalls durch vorherige Überführung des Sulfonsäurechlorids **39** in das primäre Sulfonsäureamid **40** unter Verwendung von wässrigem Ammoniak.<sup>94</sup>

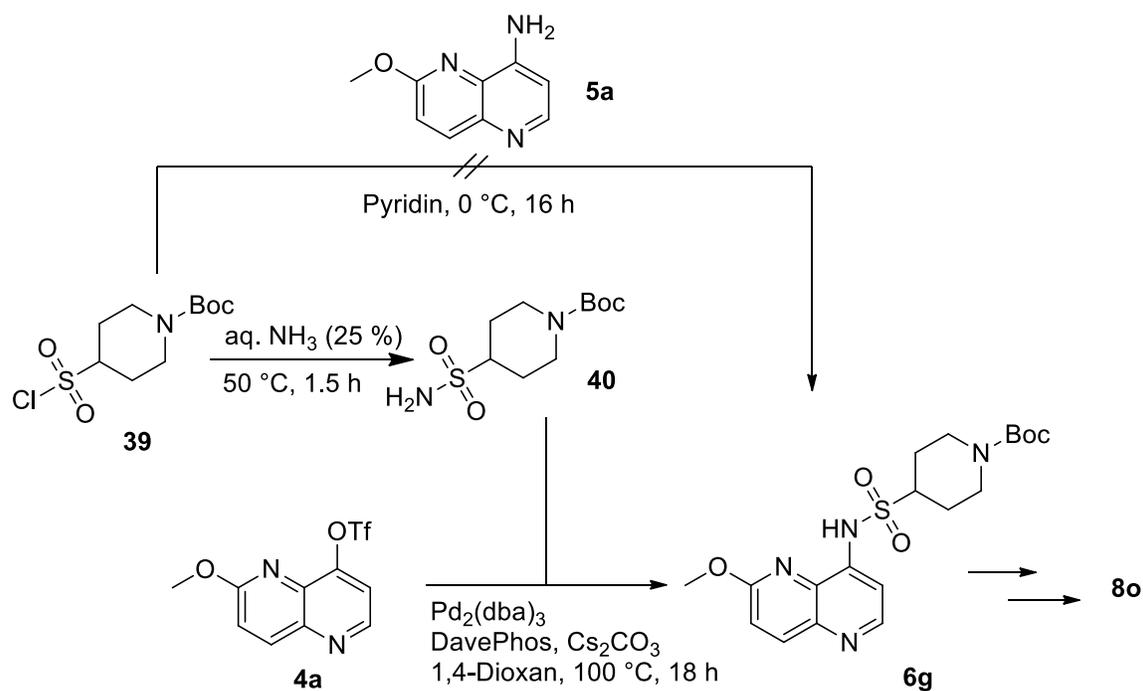
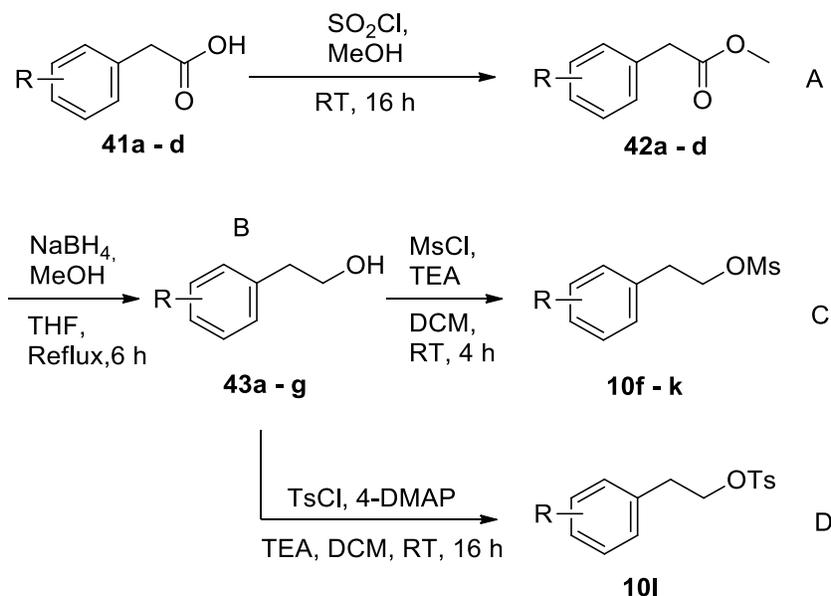


Abbildung 35 Darstellung des primären Sulfonsäureamids und Palladium-katalysierte Kupplung

Im nächsten Schritt wurde das primäre Sulfonsäureamid **40** durch ein Buchwald-Hartwig-Protokoll an das Triflat **4a** gekuppelt.<sup>95</sup> Die Reaktion verlief mit einer guten Ausbeute von 82 %. Anschließend wurde die Boc-Schutzgruppe mit TFA/DCM (25 %) vom Piperidinstickstoff abgespalten und die Endverbindung **8o** durch Alkylierung mit 1-(2-Bromethyl)-4-trifluormethylbenzen gewonnen (Abbildung 35).

## 2.1.12 SYNTHESE DER MESYLATE BZW. TOSYLATE



Edukt	R	Produkt (Ausbeute [%])			
		A	B	C	D
43e <sup>#</sup>	3-F	-	-	<b>10f</b> (99)	-
43f <sup>#</sup>	3-CF <sub>3</sub>	-	-	<b>10g</b> (20)	-
43g <sup>#</sup>	4-OCF <sub>3</sub>	-	-	<b>10h</b> (99)	-
41a	2-F-3-F	<b>42a</b> (81)	<b>43a</b> (95)	<b>10i</b> (70)	-
41b	2-F-4-F	<b>42b</b> (82)	<b>43b</b> (95)	<b>10j</b> (73)	-
41c	3-F-5-F	<b>42c</b> (90)	<b>43c</b> (83)	<b>10k</b> (46)	-
41d	3-F-4-CF <sub>3</sub>	<b>42d</b> (90)	<b>43d</b> (62)	-	<b>10l</b> (76)

Abbildung 36 Darstellung der Phenylethylmesylate bzw. tosylate. <sup>#</sup> Die Reaktionsschritte A und B wurden nicht durchgeführt, weil die entsprechenden Phenylethylalkohole kommerziell bezogen wurden.

Für die Darstellung der finalen tertiären Amine durch Alkylierung des Piperidins wurden Phenylethylmesylate aus Phenylethylalcoholen hergestellt. Grund hierfür ist die größere Vielfalt an Substitutionsmustern am Phenylrest bei den Phenylethylalcoholen **41a–d**, verglichen

mit denen der Phenethylbromide. Die Mesylate **10f–k** wurden durch die Reaktion der entsprechenden Phenylethanolderivate **43a–g** mit Mesylchlorid gewonnen. Um Phenylethanol in 2-Phenylethanol zu überführen, sind mehrere Methoden bekannt. Lithiumaluminiumhydrid ist in der Lage, Carbonsäuren direkt zu Alkoholen zu reduzieren. Mit Natriumborhydrid gelingt die Synthese der Alkohole nach der Veresterung der Carbonsäuren. Wegen der geringeren Empfindlichkeit von  $\text{NaBH}_4$  gegenüber Feuchtigkeit im Vergleich zu  $\text{LiAlH}_4$ , wurde die Synthese mit  $\text{NaBH}_4$  durchgeführt. Zusätzlich zeigte sich eine Labilität der Fluor-substituenten Phenyle gegenüber  $\text{LiAlH}_4$ . Der erste Schritt besteht in der Darstellung der Methylester **42a–d** aus den Phenylethanol-derivaten **41a–d** mit Thionylchlorid in Methanol.<sup>96</sup> Das LM dient hierbei auch als Reagenz. Die Reaktion verläuft über zwei Schritte. Zunächst erfolgt die Bildung eines Carbonsäurechlorids durch die Reaktion der Carbonsäure mit Thionylchlorid. Der Methylester bildet sich folglich durch die Reaktion des Carbonsäurechlorids mit Methanol. Die Ausbeute lag je nach eingesetztem Edukt zwischen 81 und 90 %. Anschließend wurden die Methylester mit  $\text{NaBH}_4$  in THF und in Gegenwart von katalytischen Mengen Methanol unter Rückfluss zu den 2-Phenylethanol-derivaten **43a–d** reduziert.<sup>96</sup>  $\text{NaBH}_4$  ist ohne Zusatz von Methanol nicht reaktiv genug, um Ester zu Alkoholen zu reduzieren. Die Umsetzung gelang mit Ausbeuten von 62–95 %. Schließlich konnten die 2-Phenylethanol-derivate **43a–g** mit Mesylchlorid in DCM in die entsprechenden Mesylate **10f–k** überführt werden.<sup>96</sup> Je nach Edukt verlief die Reaktion mit einer Ausbeute von 20 bis 99 %. Wegen der geringen Lagerstabilität von Mesylchlorid wurde im Fall von **43d** das Tosylat **10l** aus Tosylchlorid hergestellt.<sup>97</sup> Die Ausbeute lag bei 76 % (Abbildung 36). Die Verwendung der Tosylate bietet gegenüber der Mesylate außerdem den Vorteil, dass diese unter Normalbedingungen als Feststoffe vorliegen. Zusätzlich zeigte sich bei der darauffolgenden Alkylierung der Amine zu den finalen Produkten eine höhere Ausbeute bei der Verwendung des Tosylats anstelle des Mesylats.

## 2.1.13 SYNTHESE DER FINALEN PRODUKTE AUS DEN BENZYLALDEHYDEN

Die Synthese der Benzylamine **8p–q** erfolgte durch die Umsetzung der Amine **7d–e** mit 4-(Trifluormethyl)benzaldehyd **44** und anschließender Reduktion durch  $\text{NaBH}_4$ . Sekundäre Amine sind durch die Alkylierung primärer Amine mit Alkylhalogeniden oder Alkylmesylaten nicht zugänglich. Wegen der höheren Nucleophilie sekundärer Amine gegenüber primären käme es bei der Reaktionsführung zunächst zur Bildung von tertiären Aminen.

Darum wurde das Aminocyclohexylderivat **7e** mit 4-(Trifluormethyl)benzaldehyd **44** in Methanol unter Rückfluss umgesetzt. Um das bei der Kondensation entstehende Wasser in der Reaktionsmischung zu binden, wurde dem Gemisch etwas Molsieb 3 Å zugesetzt.

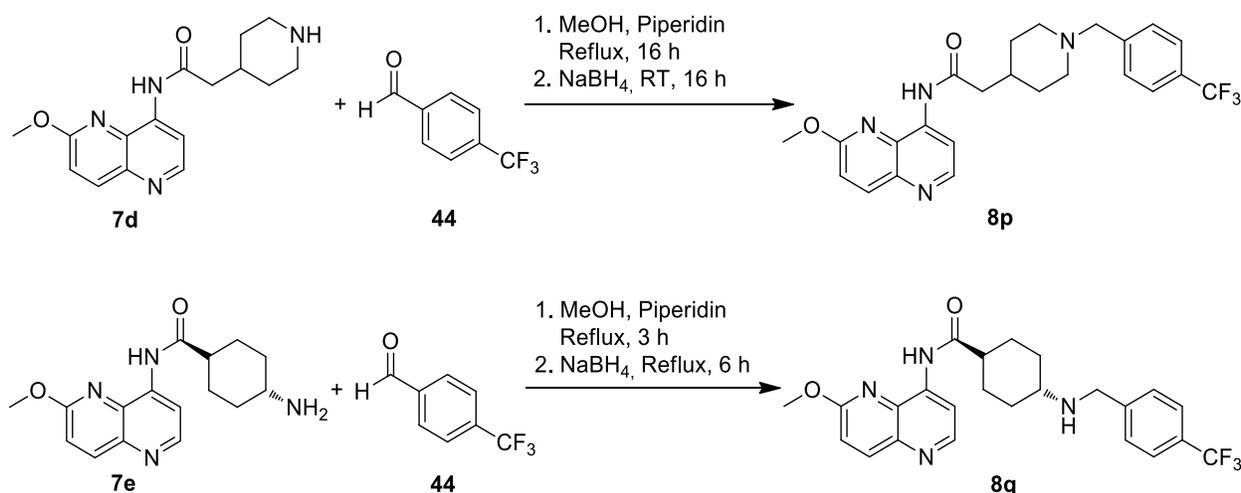


Abbildung 37 Darstellung der Benzylaminderivate durch reduktive Aminierung

Außerdem enthielt die Mischung einige Mikroliter Piperidin, der Literatur folgend.<sup>98</sup> Durch ESI-MS konnte die Bildung eines Nebenproduktes zwischen dem Benzaldehyd **44** und Piperidin beobachtet werden. Initiale Versuche, die Reaktion ohne den Zusatz von Piperidin durchzuführen, waren nicht erfolgreich. Anschließend wurde der Mischung  $\text{NaBH}_4$  zugesetzt, um das intermediär gebildete Imin aus dem Cyclohexylamin und dem Benzaldehyd zum sekundären Amin zu reduzieren. Die gleiche Methode wurde verwendet, um die Substanz **8q** aus **7e** und **44** herzustellen (Abbildung 37).

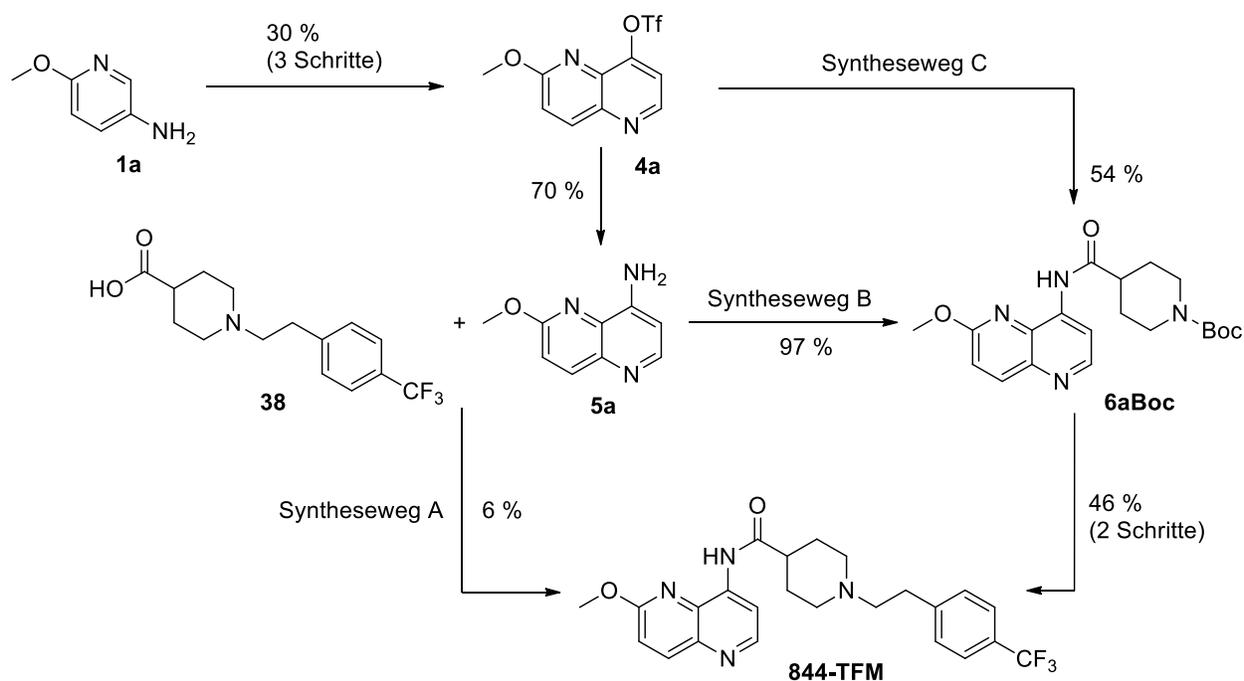
## 2.1.14 VERGLEICH DER VERWENDETEN SYNTHESEWEGE

Aus den oben beschriebenen Synthesen ergeben sich mehrere Routen, um die gewünschten Endprodukte zu erhalten. Im diesem Abschnitt sollen die verschiedenen Synthesewege miteinander verglichen und bewertet werden (Abbildung 38).

Die Methoden unterscheiden sich in der Einführung der Amidbindung zwischen dem bicyclischen Heterocyclus und der Piperidin-4-carbonsäure. Alle Sequenzen starten vom 5-Amino-2-methoxypyridin **1a**. Dieses wird über drei Schritte in das Triflat **4a** überführt. Hierbei liegt die Teilausbeute bei 30 %. Im Syntheseweg A und B wird **4a** anschließend in das Anilinderivat **5a** überführt.

Bei der Methode A wird **4a** mit der Carbonsäure **38** zum Endprodukt gekuppelt. Dieser Schritt liefert eine Ausbeute von lediglich 6 %. Daraus ergibt sich für Weg A die kürzeste Sequenz mit insgesamt fünf Schritten. Jedoch muss hier zunächst die Substanz **38** in einer 3-Schrittsequenz hergestellt werden. Wegen der geringen Gesamtausbeute der Methode (1.3 %) ist diese Synthese für die Darstellung der P4C nur bedingt geeignet. Zwar erlaubt das konvergente Design einen schnellen Aufbau von Substanzbibliotheken durch die Variation der Komponenten der Amidkupplung, jedoch ist die geringe Ausbeute der Methode ein klarer Nachteil.

Für den Syntheseweg B wird das Anilinderivat **5a** mit 1-Boc-piperidin-4-carbonsäure zum entsprechenden Amid **6aBoc** umgesetzt. Anschließend wird die Schutzgruppe entfernt und das sekundäre Amin **7a** alkyliert, um das Endprodukt zu erhalten. Diese Sequenz entspricht der in der Patentliteratur veröffentlichten Variante.<sup>71-73</sup> Route B besitzt die längste Sequenz mit insgesamt sieben Schritten. Die Gesamtausbeute liegt bei 9.3 %. Damit bietet Weg B den höchsten Ertrag unter den vorgestellten Methoden. Das Gelingen der Amidknüpfung ist allerdings abhängig von der Struktur des Linkers. Bei der Verwendung von HATU als Kupplungsreagenz fiel die Ausbeute beträchtlich, wenn die eingesetzte Carbonsäure in  $\alpha$ -Position einen Alkylrest trug. Weiterhin ist es nicht möglich, die Amidbindung selektiv aufzubauen, wenn der Linker zusätzliche Gruppen wie Amine oder Alkohole trägt. Die dabei entstehenden Nebenprodukte senken die Ausbeute der Reaktion.<sup>81</sup>



Syntheseweg	A	B	C
Anzahl der Schritte	5	7	6
Gesamtausbeute [%]	1.3	9.3	7.5

Abbildung 38 Vergleich der verschiedenen Synthesemethoden zur Darstellung der P4C

Im Syntheseweg C wird das Amid **6aBoc** zwischen Heteroaromat und Linker durch eine Palladium-katalysierte Kupplung des Triflats **4a** und *tert*-Butyl-4-carbamoylpiperidin-1-carboxylat eingeführt. Danach wird wie im Weg B verfahren, um das Endprodukt zu erhalten. Der Syntheseweg C verläuft über insgesamt sechs Schritte. Die Ausbeute der Route ist vergleichbar mit Weg B (Gesamtausbeute 7.5 %). Der wesentliche Vorteil dieser Methode liegt in der Selektivität und Flexibilität der Palladium-katalysierten Kreuzkupplung zur Einführung der Amidbindung. Während der Arbeit gelang es damit, neben Carboxamiden auch ein Sulfonsäureamid an den Naphthyridin-Rest zu koppeln. Ebenso ist es mit dieser Variante möglich, hydroxy-substituierte Linker einzusetzen, welche bei einer Amidkupplung nach B störten.<sup>81</sup> Zusammenfassend ist die Auswahl des geeigneten Synthesewegs abhängig von der Menge und Modifikation der gewünschten Endprodukte. Für die Variation des Phenylethyl-Rests und für die Herstellung von größeren Substanzmengen ist der Syntheseweg B geeignet. Durch die Kombination von Heterocyclen und

Carbonsäuren wie **38** lässt sich mit Weg A schnell eine große Strukturvielfalt generieren. Besonders nützlich ist die hohe Flexibilität und Ausbeute der Methode C. Hiermit lassen sich sowohl größere Substanzmengen herstellen, als auch verschiedene Bausteine als Linker verwenden.

## 2.2 MIKROBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

### 2.2.1 BESTIMMUNG DER MINIMALEN HEMMKONZENTRATION

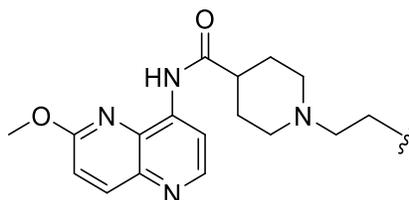
Die im Zuge der Arbeit synthetisierten Verbindungen wurden auf ihre antimykobakterielle Aktivität untersucht. Hierfür wurde die Minimale Hemmkonzentration (MHK) in konzentrationsabhängigen Mikroverdünnungsassays bestimmt.

Als MHK wird diejenige Konzentration bezeichnet, bei der das Wachstum der Bakterien zu einem bestimmten Prozentsatz (meist 90 %) gehemmt wird. Die MHK dient somit als Maß für die antibakterielle Aktivität einer Substanz. Die Bestimmung der  $MHK_{90}$  wurden zum Teil bei einem dreimonatigem Forschungsaufenthalt am Center for Discovery and Innovation (CDI) des Hackensack Meridian Health (HMH) in Nutley (NJ, USA) unter der Leitung von Thomas Dick durchgeführt.

Die anti-NTM-Aktivität der Substanzen wurde gegen verschiedene Spezies und Stämme von NTM untersucht. Die initialen Tests wurden mit *Mabs* Bamboo durchgeführt. *Mabs* Bamboo ist ein klinisches Isolat aus einem Patienten mit amyotropher Lateralsklerose und Bronchiektasie.<sup>99</sup> Der Stamm ist sensibel gegenüber Clarithromycin, d.h. er zeigt keine adaptive Makrolid-Resistenz und die Sequenz seiner 16S rRNA stimmt zu 100 % mit jener des Referenzstamms *Mabs* ATCC 19977 überein.<sup>99</sup> Erwies sich eine Substanz als aktiv gegen *Mabs* Bamboo, wurde sie anschließend gegen ein erweitertes Set von NTM getestet, darunter drei Subspezies der MAB-Gruppe (*Mabs* ssp. *abscessus*, *Mabs* ssp. *bolletii*, *Mabs* ssp. *massiliense*), *Mav* 11 als Vertreter des MAC, sowie *Mabs* K21 und *Mtb* H37Rv. *Mav* 11 wurde aus dem Knochenmark eines HIV/AIDS-Patienten mit disseminierter und pulmonaler MAC-Infektion isoliert. Der Stamm wurde als *Mav* ssp. *hominissiuus* klassifiziert. Die Klassifizierung erfolgte anhand der Sequenz der 3'-Region des *hsp65* Gens, welche zu 100 % identisch mit *Mav* ssp. *hominissuis* 104 ist (GenBank Nr. NC\_008595).<sup>100</sup> Der Stamm *Mabs* K21 ist ein klinisches Isolat und dient bei *in vivo* Effektivitätsstudien als Teststamm.

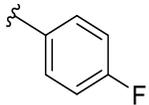
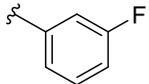
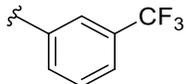
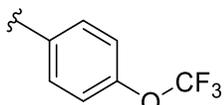
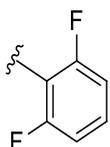
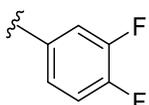
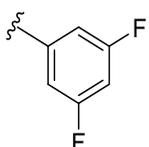
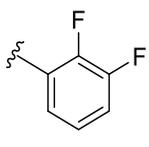
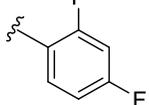
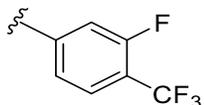
### Substanzen mit modifizierter RHS

Die molekulare Struktur der Hit-Verbindung **844** lässt sich in drei Teile gliedern: Die heteroaromatische linke Seite (LHS), den zentralen aliphatischen Linker und der Phenylethylrest auf der rechten Seite (RHS, Abbildung 8). Bei der Untersuchung der Struktur–Wirkungsbeziehung wurde zunächst die RHS modifiziert. Die Ergebnisse der MHK-Assays sind in den Tabelle 3–5 dargestellt.<sup>101</sup>



**Tabelle 3** Minimale Hemmkonzentrationen (MHK) der synthetisierten Verbindungen mit modifizierter RHS.  
<sup>a</sup> *Mabs* Bamboo, <sup>b</sup> *Mabs* ATCC 19977, <sup>c</sup> *Mabs massiliense* CCUG 48898T, <sup>d</sup> *Mabs bolletii* CCUG 50184T, <sup>e</sup> *Mabs* K21, <sup>f</sup> *Mtb* H37Rv,-nicht bestimmt.

Substanz	RHS	MHK <sub>90</sub> [μM]						
		Bb. <sup>a</sup>	ATCC <sup>b</sup>	Mas. <sup>c</sup>	Bol. <sup>d</sup>	K21 <sup>e</sup>	Mav 11	Mtb <sup>f</sup>
Gepotidacin		10	10	25	25	20	> 100	-
<b>844</b> <sup>50</sup>		12	8	14	14	14	6	2.8
<b>844–TFM</b> <sup>50</sup>		1.5	1.5	2.0	2.0	3.5	2.5	1.5
<b>8a</b>		50	-	-	-	-	> 50	-
<b>8b</b>		100	-	-	-	-	> 100	-

Substanz	RHS	MHK <sub>90</sub> [μM]						
		Bb. <sup>a</sup>	ATCC <sup>b</sup>	Mas. <sup>c</sup>	Bol. <sup>d</sup>	K21 <sup>e</sup>	Mav 11	Mtb <sup>f</sup>
8c		50	-	-	-	-	> 100	-
8f		25	-	-	-	-	> 50	-
8g		12.5	-	-	-	-	12.5	-
8h		100	-	-	-	-	> 100	-
8d		100	-	-	-	-	-	-
8e		25	-	-	-	-	-	-
8k		50	-	-	-	-	-	-
8i		100	-	-	-	-	-	-
8j		50	-	-	-	-	-	-
8l		0.6	0.6	1.5	1	2	0.8	-

Zunächst wurde der Einfluss des Chlor-Substituenten in Position 4 des Phenylrings untersucht. Die Verbindung **8c** stellt das Fluor-Derivat von **844** dar. Der Cl/F Austausch führte zu einer deut-

lichen Verringerung der Aktivität gegen *Mabs* und *Mav* (50  $\mu\text{M}$  vs. 12  $\mu\text{M}$  gegen *Mabs* Bamboo). Die Verbindungen **8a** und **8f** sind Stellungsisomere von **8c**. Beide Veränderungen senkten die Aktivität gegen die getesteten Stämme (50 und 25  $\mu\text{M}$  vs. *Mabs*).

Die Substanzen **8b** und **8h** besitzen anstelle eines Chlors eine Methoxy- bzw. Trifluormethoxygruppe. Die Modifikation zeigten eine Verschlechterung der Aktivität gegen *Mabs* (MHK = 100  $\mu\text{M}$ ) im Vergleich zu **844**. Ihre Aktivitäten gegen *Mav* wurden daher nicht bestimmt. Die Struktur von **844-TFM** unterscheidet sich von **844** durch den Austausch von Cl gegen eine Trifluormethylgruppe. Die Verbindung zeigte eine fast zehnfache Verbesserung der Aktivität gegenüber **844** (1.5 vs. 12  $\mu\text{M}$ ). Die hohe Aktivität von **844-TFM** war konsistent gegen alle getesteten Stämme. Gegen *Mtb* zeigte die Verbindung die gleiche MHK wie gegen *Mabs*. Die Verbindung **8g** trägt die für die Aktivität vorteilhafte Trifluormethylgruppe in Position 3 des Phenylrings. Die Veränderung führte zu einer Abschwächung der Wirksamkeit im Vergleich zu **844-TFM** (12.5  $\mu\text{M}$ ) (Tabelle 3).

### **Substanzen mit Di-substituierter RHS**

Die Substanzen **8d**, **8e**, **8k**, **8i** und **8j** sind Stellungsisomere von Di-Fluorphenyl-Derivaten von **844**. Die Literatur beschreibt NBTIs mit diesem Rest, die eine hohe Aktivität gegen Gram-positive Bakterien besitzen.<sup>59</sup> Keine der fünf Isomere zeigte einen vorteilhaften Einfluss auf die Wirksamkeit gegen *Mabs*. Verbindung **8e** besitzt ein 3,4-Difluor-Substitutionsmuster und erreichte unter den difluorierten Derivaten die beste MHK mit 25  $\mu\text{M}$ . Die Strukturen **8d** und **8j** (2F-6F bzw. 2F-4F) hatten mit einer MHK von 100  $\mu\text{M}$  keinen antimykobakteriellen Effekt. Ein besonders aktiver Rest wurde mit **8i** gefunden: Die Substanz trägt einen Fluor- und Trifluormethylsubstituent an den Positionen 3 und 4 des Phenylrings. Hiermit konnte eine MHK von 0.6  $\mu\text{M}$  gegen *Mabs* Bamboo erzielt werden. Die ausgeprägte Wirksamkeit zeigte sich auch gegen verschiedene Subspezies von *Mabs* (0.6 bis 2  $\mu\text{M}$ ) und gegen *Mav* (0.8  $\mu\text{M}$ ) (Tabelle 3).<sup>101</sup>

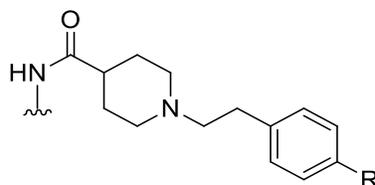
Modifikationen der LHS

Tabelle 4 MHK der Verbindungen mit modifizierter LHS. <sup>a</sup> *Mabs* Bamboo, <sup>b</sup> *Mabs* ATCC 19977, <sup>c</sup> *Mabs massili-nese* CCUG 48898T, <sup>d</sup> *Mabs bolletii* CCUG 50184T, <sup>e</sup> *Mabs* K21, <sup>f</sup> *Mtb* H37Rv, -nicht bestimmt.

Substanz	R	LHS	MHK <sub>90</sub> [μM]						
			Bb. <sup>a</sup>	ATCC <sup>b</sup>	Mas. <sup>c</sup>	Bol. <sup>d</sup>	K21 <sup>e</sup>	Mav 11	Mtb <sup>f</sup>
<b>8n</b>	-CF <sub>3</sub>		50	-	-	-	-	-	-
<b>8r</b>	-CF <sub>3</sub>		100	-	-	-	-	-	-
<b>8s</b>	-CF <sub>3</sub>		3.12	-	-	-	-	-	-
<b>8t</b>	-Cl		50	-	-	-	-	-	-

Neben der RHS wurde auch die LHS variiert, was zu einer weiteren Serie von Verbindungen führte. In der Literatur sind NBTIs bekannt, welche ein Chinolinsystem anstelle eines Naphthyridins enthalten.<sup>58,102–104</sup> Darum wurden Verbindungen mit unterschiedlichen Chinolinderivaten als LHS synthetisiert. Die Substanz **8r** trägt 6-Methoxychinolin-4-amin als LHS. Die vorteilhafte CF<sub>3</sub>-Gruppe in Position-4 des Phenylrings der RHS wurde beibehalten. Die Verbindung **8t** besitzt die gleiche LHS wie **8r**, aber einen Chlorsubstituent am Phenylring. Die Veränderungen führten zu einer starken Verringerung der Aktivität gegen *Mabs* mit einer MHK von 100 μM und 50 μM. Die Substanz **8s** ist ein Konstitutionsisomer von **8r**, bei dem die LHS über Position-8 mit dem Linker

verbunden ist. Gegen *Mabs* Bamboo zeigte **8s** (MHK = 3.12  $\mu$ M) eine ähnliche Aktivität wie **844-TFM**. Die Verbindung **8n** wurde aus einer synthetischen Vorstufe von **8s** hergestellt. Das Derivat trägt einen Chlorsubstituent anstelle eines Methylethers an Position-2 des Chinolins. Die Aktivität der Verbindung war im Vergleich zu **8s** verringert (MHK = 50  $\mu$ M) (Tabelle 4).<sup>101</sup>

### Modifikationen des Linkers

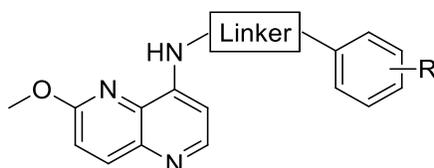


Tabelle 5 MHK der Verbindungen mit modifiziertem Linker. <sup>a</sup> *Mabs* Bamboo, <sup>b</sup> *Mabs* ATCC 19977, <sup>c</sup> *Mabs massilense* CCUG 48898T, <sup>d</sup> *Mabs bolletii* CCUG 50184T, <sup>e</sup> *Mabs* K21, <sup>f</sup> *Mtb* H37Rv, -nicht bestimmt.

Substanz	R	Linker	MHK <sub>90</sub> [ $\mu$ M]						
			Bb. <sup>a</sup>	ATCC <sup>b</sup>	Mas. <sup>c</sup>	Bol. <sup>d</sup>	K21 <sup>e</sup>	Mav 11	Mtb <sup>f</sup>
<b>8p</b>	4-CF <sub>3</sub>		100	-	-	-	-	-	-
<b>8q</b>	4-CF <sub>3</sub>		0.4	0.4	1.2	1	2	2	-
<b>8o</b>	4-CF <sub>3</sub>		100	-	-	-	-	-	-
<b>8u</b>	4-CF <sub>3</sub>		3	3	8	6.5	8	6	-
<b>8v</b>	3-F- 4-CF <sub>3</sub>		-	12.5	-	-	14	-	-

Weiterhin wurden Derivate mit modifiziertem Linker synthetisiert. Mit den Substanzen **8p** und **8q** wurde ein Versatz des basischen Stickstoffs des Linkers in Richtung RHS realisiert. Die Substanz **8p** besitzt eine zusätzliche Methylengruppe zwischen der Amidbindung und dem Piperidinring. Der Piperidinstickstoff wurde benzyliert und die phenolische Trifluormethylgruppe beibehalten. Die Veränderung führte zu einem Verlust der antimykobakteriellen Wirksamkeit (MHK = 100  $\mu$ M). Eine Möglichkeit für die exocyclische Einführung des aliphatischen Amins wurde mit der Verbindung **8q** umgesetzt. Der Stoff besitzt *trans*-4-Amino-cyclohexancarbonsäure anstelle der 4-Piperidin-carbonsäure von **844-TFM** als Linker. Die Aminfunktion ist ebenfalls benzyliert, wie bei **8p**. **8q** ähnelt strukturell den literaturbekannten Cyclohexylamiden.<sup>104</sup> Die Veränderung führte zu einer Verbesserung der Aktivität gegen alle getesteten Stämme und Spezies im Vergleich zu **844**. Gegen *Mabs* erreichte **8q** eine MHK von 0.4  $\mu$ M. Die Verbindungen **8o**, **8u** und **8v** wurden für die Optimierung der pharmakokinetischen Eigenschaften der aktiven Stoffe synthetisiert. **8o** stellt das Sulfonsäureamid-Analogon von **844-TFM** dar. Die Substanz zeigte im MHK-Assay keine Aktivität. Die Verbindungen **8u** und **8v** sind Derivate von **844-TFM** und **8l**, welche in  $\alpha$ -Position des Amids einen Methylrest tragen. Die beiden Verbindungen zeigten eine leichte Verschlechterung der Wirksamkeit mit einer MHK von 3  $\mu$ M und 12.5  $\mu$ M gegen *Mabs* ATCC19977 im Vergleich zu **844-TFM** bzw. **8l** (Tabelle 5).<sup>101</sup>

## 2.2.2 BESTIMMUNG DER MINIMALEN BAKTERIZIDEN KONZENTRATION (MBK)

Die Therapie von Infektionen durch NTM ist gekennzeichnet durch die Gabe einer Kombination verschiedener Antibiotika über einen Zeitraum von mindestens zwölf Monaten. Dadurch treten unerwünschte Arzneimittelwirkungen vermehrt auf und die Belastung für den Patienten steigt.<sup>105</sup> Zusätzlich besteht das Risiko für das Auftreten von Resistenzen, wenn eine vollständige Eradikation der Erreger nicht gelingt. Deshalb sind Substanzen mit bakterizider Wirkung gegen NTM besonders wertvoll für die Entwicklung neuer Therapien. Unter Bakterizidie wird die Fähigkeit einer Substanz verstanden, Bakterien abzutöten. Bakteriostatische Substanzen hemmen hingegen lediglich deren Wachstum. Zur Beschreibung der bakteriziden Eigenschaften eines

Stoffes wird seine minimale bakterizide Konzentration (MBK) bestimmt. Die MBK ist diejenige Konzentration, bei der die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) um 99,9 % reduziert wird (von  $1 \times 10^5$  KBE/ml auf  $1 \times 10^2$  KBE/ml). Für langsam-wachsende Mykobakterien wird empfohlen, die MBK für 99 % Keimzahlreduktion zu bestimmen.<sup>106</sup> Die MBK ist eine zeitabhängige Größe. Deshalb ist die Inkubationszeit zu berücksichtigen. Zur weiteren Abgrenzung von bakteriostatischen zu bakteriziden Stoffen dient das Verhältnis von MHK zu MBK. Für bakterizide Verbindungen gilt:  $MBK \leq 4 \times MHK$ . Die meisten Substanzen, die zurzeit für die Therapie von NTM-Infektionen eingesetzt werden, sind bakteriostatisch (z.B. Tigecyclin, Imipenem). Auch die für *E. coli* bakteriziden Wirkstoffe Amikacin und MXF zeigen keinen bakteriziden Effekt gegen *Mabs*.<sup>48</sup>

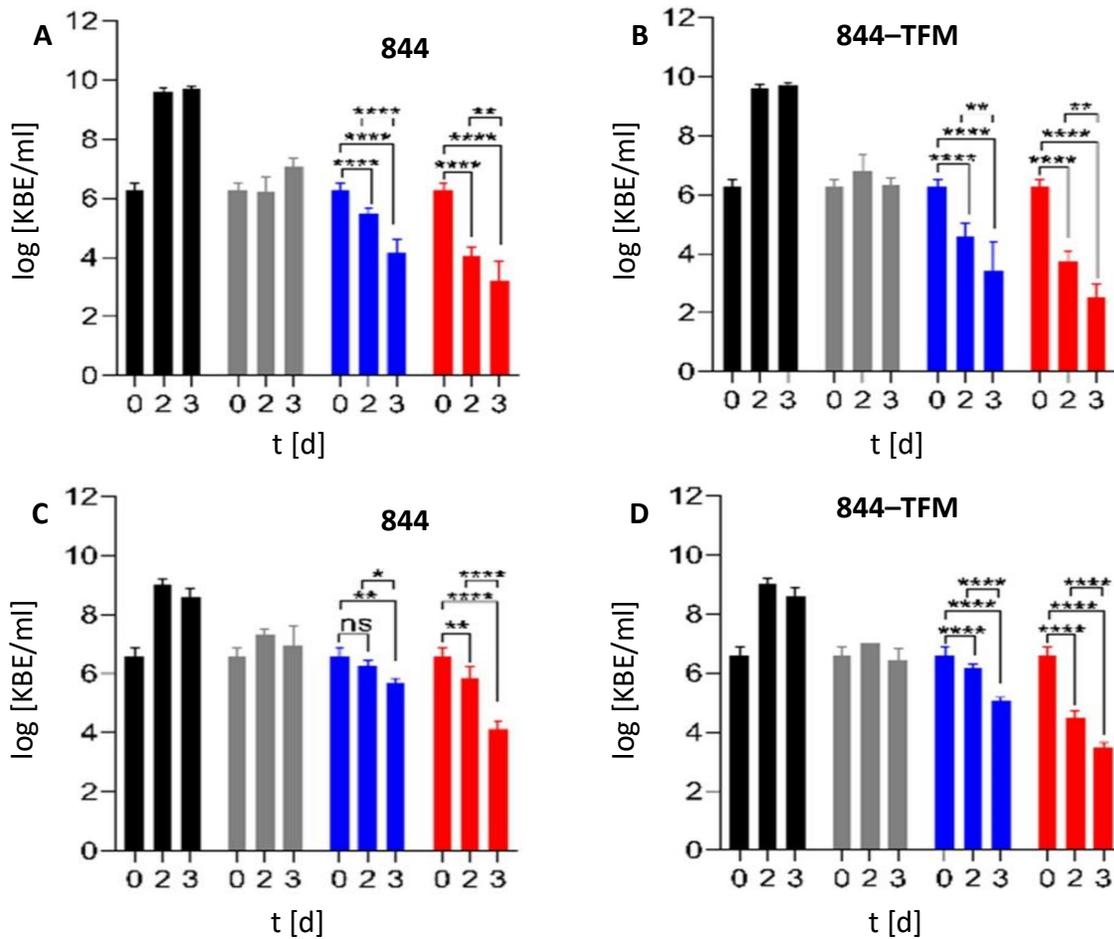


Abbildung 39 Bakterizidie und anti-Biofilmmaktivität von 844 und 844-TFM gegen *Mabs*. Kulturen von *Mabs ssp. abscessus* ATC19977 im exponentiellen Wachstum wurden mit verschiedenen Konzentrationen (unbehandelt

(schwarz), 1x (grau), 4x (blau), 8x (rot) MHK) von **844 (A)** und **844-TFM (B)** inkubiert. Die Ermittlung der KBE/ml erfolgte zu Beginn des Experiments, sowie nach zwei und drei Tagen nach der Inkubation. Biofilm-*Mabs*-Kulturen im exponentiellen Wachstum wurden mit verschiedenen Konzentrationen (unbehandelt (schwarz), 1x (grau), 4x (blau), 8x (rot) MHK) von **844 (C)** und **844-TFM (D)** inkubiert. Die Ermittlung der KBE/ml erfolgte zu Beginn des Experiments, sowie nach zwei und drei Tagen nach der Inkubation. Die Experimente wurden als Triplikate erstellt. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen. Signifikanzniveaus \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$  und \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$  (Zweiseitiger ANOVA-Test, durchgeführt mit GraphPad Prism 8).<sup>50</sup>

Wegen der sehr geringen MHKs der in dieser Arbeit vorgestellten Substanzen gegen verschiedene Arten und Stämme von NTM und der besonderen Bedeutung bakterizider Substanzen wurde die bakterizide Wirksamkeit von **844-TFM** und **844** gegen *Mabs* ATC19977 untersucht. Weiterhin wurde getestet, ob die Verbindungen auch die Keimzahl in Biofilmen reduzieren können. Die Ergebnisse der Assays sind in Abbildung 39 dargestellt. Die Experimente wurden vom Center for Discovery and Innovation (CDI) des Hackensack Meridian Health (HMH) in New Jersey, USA unter der Leitung von Thomas Dick durchgeführt.

Sowohl **844** als auch **844-TFM** zeigten einen bakteriziden Effekt gegen planktonische Kulturen von *Mabs*. Bei einer Konzentration von 4 x MHK konnten bei beiden Substanzen die KBE/ml nach 3 Tagen um 99 % reduziert werden. Bei einer Konzentration von 8 x MHK wurde diese Reduktion bereits nach 2 Tagen erreicht und nach 3 Tagen betrug die Reduktion der KBE/ml 99.9 % (Abbildung 39 **A** und **B**).

Gegen die *Mabs* Biofilme zeigten beide getesteten Substanzen disruptive Eigenschaften. Wie in Abschnitt 1.1 bereits beschrieben, zeigen Biofilme eine erweiterte Unempfindlichkeit gegen äußere Einflüsse und antibakterielle Stoffe. Nach 2 Tagen konnten weder **844** noch **844-TFM** bei einer Konzentration von 4 x MHK eine deutliche Verringerung der KBE/ml verursachen. Eine Reduktion um 99 % von  $10^7$  KBE/ml auf  $10^5$  KBE/ml zeigte **844-TFM** bei dieser Konzentration nach 3 Tagen. Ein deutlicherer Effekt wurde bei 8 x MHK beobachtet. Bei dieser Konzentration konnten **844** und **844-TFM** nach 3 Tagen eine Verringerung der KBE/ml in Biofilmen von 99.9 % erreichen (Abbildung 39 **C** und **D**).<sup>50</sup>

Die Ergebnisse der Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Verbindungsklasse der Piperidin-4-carboxamide (P4C) über eine bakterizide Wirkung gegen schnell-wachsende Mykobakterien verfügen. Darin besteht ein Vorteil gegenüber anderen Gyraseinhibitoren wie MXF und

**SPR719**, welche gegen *Mabs* keinerlei bakterizide Wirkung besitzen.<sup>48,107</sup> Weiterhin sind P4C in der Lage, die Keimzahl in Biofilmen zu reduzieren.<sup>50</sup>

### 2.2.3 TARGETIDENTIFIZIERUNG

Die Identifizierung des Targets der P4C erfolgte durch die Mitarbeiter von Prof. Dr. Thomas Dick am CDI des HMH in Nutley, NJ, USA.

Die in dieser Arbeit beschriebenen P4C sind Hemmstoffe der mykobakteriellen Topoisomerase II (Gyrase). Das Wissen um das Target einer Verbindungsklasse ist für die weitere Entwicklung von potenten Derivaten von hohem Wert. Zum Beispiel lassen sich damit Modelle erstellen, mit denen die Wechselwirkung des Targets mit dem Wirkstoff simuliert werden kann. Dadurch können Vorschläge für die Strukturoptimierung der Substrate erarbeitet werden.

Zu Beginn der Arbeit wurde angenommen, dass die P4C Hemmstoffe eines mykobakteriellen ABC-Transporters seien.<sup>70</sup> Im Zuge der Untersuchungen konnten spontan auftretende resistente Mutanten von *Mabs* Bamboo gegen **844** und *Mabs* ATCC19977 gegen **844-TFM** generiert werden. Hierzu wurden die Bakterien auf Agar kultiviert, welcher verschiedene Konzentrationen von **844** und **844-TFM** enthielt. Die resistenten Kolonien traten bei beiden Substanzen mit einer Häufigkeit von  $10^{-8}$ /KBE auf. Dies entspricht etwa der Mutationsfrequenz bei der Inkubation von *Mtb* mit Rifampicin und ist geringer als die von *Mtb* mit Isoniazid.<sup>64</sup> **844** zeigte gegen drei Kolonien der Mutanten eine zwei- bis mehr als achtfach höhere MHK und bei fünf der Kolonien lag die MHK von **844-TFM** 3–66-fach höher im Vergleich zum Wildtyp. Die Mutanten von **844** und **844-TFM** zeigten jeweils eine Kreuzresistenz gegen beide Wirkstoffe auf. Dies deutet darauf hin, dass die Substanzen über das gleiche Target verfügen. Im Gegensatz hierzu zeigten MXF-resistente Mutanten keine oder nur geringe Kreuzresistenz in Bezug auf die beiden P4C **844** und **844-TFM**. MXF ist ein klinisch eingesetzter Gyrasehemmstoff aus der Gruppe der Fluorchinolone. Das Ausbleiben einer Kreuzresistenz gibt Hinweis darauf, dass die neuen Wirkstoffe eine Bindungsstelle an der Gyrase besetzen, welche sich von jener der Fluorchinolone unterscheidet. Weiterhin wurde Clarithromycin in die Experimente eingeschlossen. Das Makrolidantibiotikum wurde als Negativkontrolle für die Charakterisierung der Mutanten verwendet. Die hemmende Wirkung von Clarithromycin gegen *Mabs* blieb bei allen selektierten Mutanten erhalten. Die Ergebnisse geben starke Hinweise darauf, dass die Resistenz gegen **844** und **844-TFM** target-

spezifisch ist und nicht durch unspezifische Resistenzmechanismen verursacht wird wie z.B. die vermehrte Expression von membranständigen Effluxproteinen.

**Tabelle 6** Charakterisierung der 844- und 844-TFM-resistenten Mutanten von *Mabs*. \* *Mabs ssp. abs* Bamboo Wildtyp. Dieser Stamm wurde zur Gewinnung der Stämme 844<sup>R</sup>-1–3 verwendet. # *Mabs ssp. abs* ATCC19977 Wildtyp. Dieser Stamm wurde zur Gewinnung der Stämme 844-TFM<sup>R</sup>-1–5 verwendet. § Dieser Stamm wurde mit Wildtyp-GyrAB komplementiert. Er diente außerdem zur Gewinnung der rekombinanten GyrA D91N. Außerdem wurde der Stamm für die RecA-Manipulationen verwendet. & *Mabs ssp. abs* ATCC 19977 wurde benutzt, um gegen MXF resistente Stämme zu gewinnen (MXF<sup>R</sup>1–3). Die Mutanten GyrA D96X zeigten eine geringere Empfindlichkeit gegen MXF. Gegen 844 und 844-TFM zeigten diese Mutanten nur geringe oder keine Kreuzresistenz. Nuc Nukleotidaustausch. AA Aminosäureaustausch

Stamm	MHK (µM)				Mutationen			
					<i>gyrA/GyrA</i>		<i>gyrB/GyrB</i>	
	844	844-TFM	MXF	CLR	Nuc	AA	Nuc	AA
<i>Mabs</i> Bamboo WT*	12	1.5	4	0.4	-	-	-	-
844 <sup>R</sup> -1	25	12	2	0.3	G217C	A73P	A1322C	K441T
844 <sup>R</sup> -2	> 100	> 100	30	0.3	G271A	D91N	-	-
844 <sup>R</sup> -3	90	5	2	0.4	-	-	C1418G	S473W
<i>Mabs</i> ATCC19977 WT#	8	1.5	3	2	-	-	-	-
844-TFM <sup>R</sup> -1 <sup>§</sup>	> 100	> 100	20	2	G271A	D91N	-	-
844-TFM <sup>R</sup> -2	> 100	> 100	6	1	A272G	D91G	-	-
844-TFM <sup>R</sup> -3	40	20	1.5	2	G136T	V46F	-	-
844-TFM <sup>R</sup> -4	40	6	2	2	-	-	G1422A	M474I
844-TFM <sup>R</sup> -5	25	5	2	2	-	-	G1486T	V496L
MXF <sup>R</sup> -1 <sup>&amp;</sup>	40	6	100	2	G286T	D96Y	-	-
MXF <sup>R</sup> -2	15	2	80	1	G286A	D96N	-	-
MXF <sup>R</sup> -3	15	1	80	1	A287G	D96G	-	-

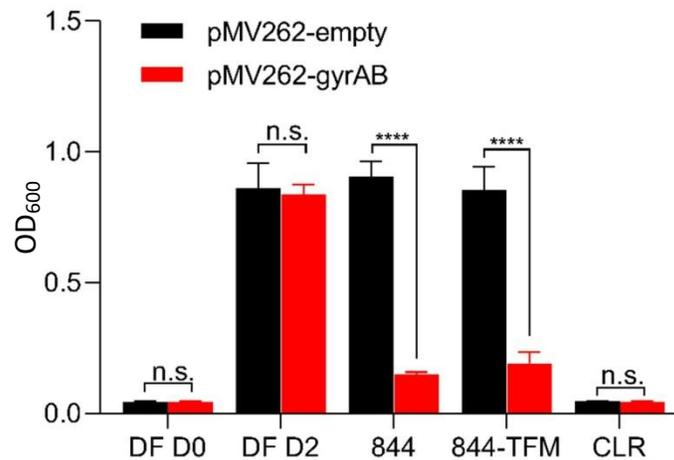
Die Genomsequenzierung der resistenten Keime zeigte *missense*-Mutationen auf den Genen *gyrA* und *gyrB*. Diese beiden Genabschnitte kodieren die Untereinheiten der mykobakteriellen DNA-Gyrase(GyrA und GyrB).<sup>108</sup> Von den drei gegen **844** resistenten Stämmen wiesen zwei je-

weils eine Mutation in GyrA auf (**844**<sup>R</sup>-2: D91N bzw. **844**<sup>R</sup>-3: S473W). Ein Stamm trug eine Mutation in GyrA und GyrB (**844**<sup>R</sup>-1: A73P und K441T). Eine stark ausgeprägte Resistenz wurde bei **844**<sup>R</sup>-2 gefunden. Die Mutation D91N verursachte bei *Mabs* Bamboo einen Anstieg der MHK von **844** und **844-TFM** auf mehr als 100 µM.

Von den fünf mit **844-TFM** generierten Mutanten von *Mabs* ATCC19977 enthielten drei eine Mutation in GyrA (**844-TFM**<sup>R</sup>-1: D91N; **844-TFM**<sup>R</sup>-2: D91G; **844-TFM**<sup>R</sup>-3: V46F) und zwei auf GyrB (**844-TFM**<sup>R</sup>-4: M474 und **844-TFM**<sup>R</sup>-5: V496L). Auch hier zeigte sich bei den Mutationen der GyrA D91N und D91G eine besonders hohe Resistenz gegen **844** und **844-TFM** mit einer MHK von jeweils mehr als 100 µM. Die Mutationen der GyrB hatten einen erheblich geringeren Einfluss auf die Aktivität der Substanzen (6 bzw. 5 µM vs. 1.5 µM gegen **844-TFM**) (Tabelle 6).

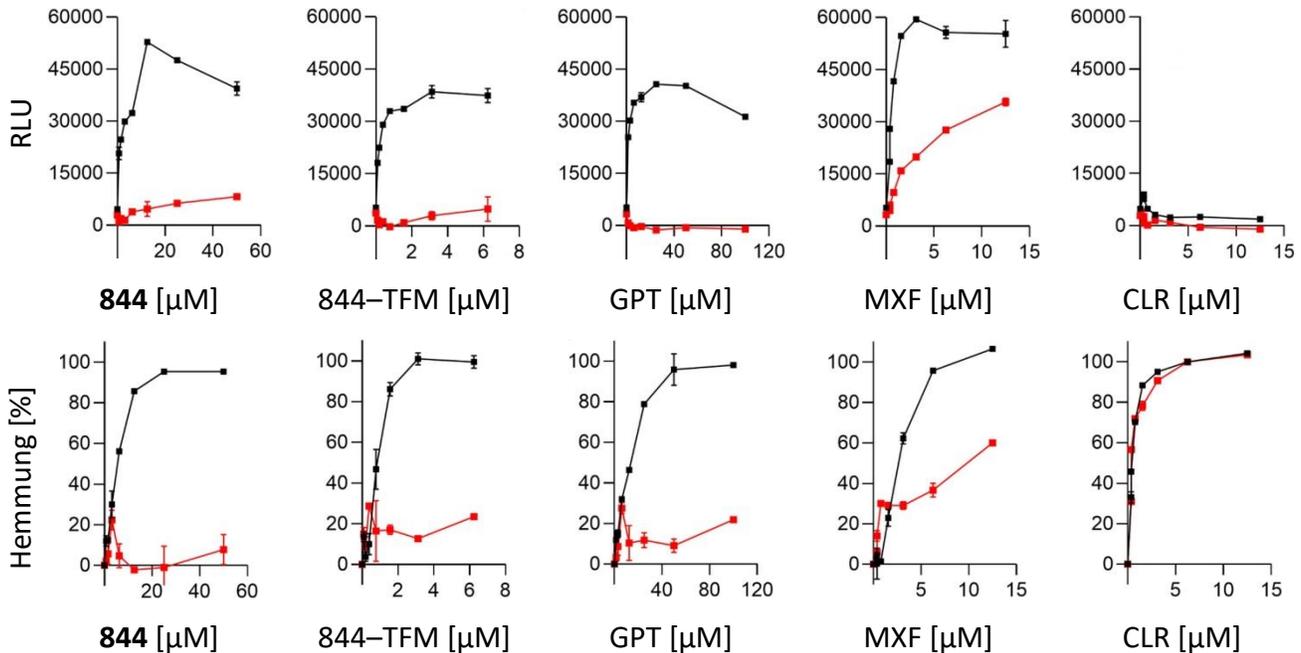
Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Bindungsstelle der neuen Verbindungen auf der Gyr-A-Untereinheit der mykobakteriellen DNA-Gyrase lokalisiert ist.<sup>50</sup>

Um zu beweisen, dass die gefundenen Polymorphismen tatsächlich für die beobachtete Resistenz verantwortlich sind, wurde ein resistenter Stamm (**844-TFM**<sup>R</sup>-1) mit intakter *gyrAB* komplementiert. Dadurch konnte die Sensitivität der der Stämme gegen **844** und **844-TFM** teilweise wiederhergestellt werden (Abbildung 40). Diese Resultate lassen darauf schließen, dass die Resistenz durch diese Mutation hervorgerufen wurde. Die oben beschriebenen Erkenntnisse geben Hinweise auf das von den P4C besetzte Target, die mykobakterielle DNA-Gyrase. Für die Hemmung der Gyrase wurden verschiedene Wirkmechanismen beschrieben. Zum Beispiel binden Gyraseinhibitoren mit Thiophen-Teilstruktur an einer Stelle im Protein, die nicht in der Nähe der katalytischen Tasche lokalisiert ist. Vermutlich wird die Inhibition durch eine allosterische Modulation hervorgerufen.<sup>63</sup> Weiterhin sind Inhibitoren der GyrA bekannt, welche einen anderen Mechanismus der Hemmung des Enzyms besitzen. Fluorchinolone sind hinreichend untersuchte und klinisch etablierte antibakterielle Wirkstoffe. Sie binden an den DNA/Gyrase-Komplex und fixieren ihn im Zustand des Dopplestrangbruchs.<sup>109</sup> Der permanente Strangbruch führt zu bakterizider Aktivität. Für MXF ist bekannt, dass es in *Mtb* DNA-Schäden hervorruft, was zu vermehrter Expression von RecA führen. Das RecA-Gen kodiert den zentralen Regulator der mykobakteriellen DNA Damage Response, welcher bei DNA-Schäden induziert wird.<sup>110,111</sup>



**Abbildung 40** Komplementierung von P4C-resistenten Mutanten mit Wildtyp-GyrAB. Der gegen die Substanz 844-TFM resistente Stamm von *Mabs* ATCC 19977 844-TFM<sup>R</sup>-1, welcher das Allel D91N in GyrA beherbergt, wurde mit dem Plasmid pMV262-GyrAB (Wildtyp) transformiert. Als Kontrolle wurde der Stamm auch mit pMV262 ohne GyrAB, („pMV262-empty“) transformiert. Die Genexpression wurde über den hsp60-Promoter vermittelt. Die Kulturen wurden für zwei Tage ohne und mit den MHK der Testsubstanzen 844 (8 µM), 844-TFM (1.5 µM) sowie Clarithromycin CLR (2 µM) inkubiert und das Bakterienwachstum durch Messung der optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) bestimmt. Die Experimente wurden als Triplikate durchgeführt. Die Balken zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen. Es wurde ein zweiseitiger ANOVA-Test durchgeführt, um die zwei Gruppen zu vergleichen. DF D0 Kontrolle ohne Testsubstanz zum Zeitpunkt t = 0, DF D2 Kontrolle ohne Testsubstanz zum Zeitpunkt t = 2 d, Signifikanzniveaus \*\*\*\* p < 0.0001, n.s. nicht signifikant

Um zu untersuchen, nach welchem Mechanismus die P4C die mykobakterielle DNA-Gyrase inhibieren, wurde ein DNA Damage Reporter Stamm konstruiert. Hierfür wurde ein Operon in *Mabs* ATCC19977 transformiert, welches bei DNA-Schäden durch die Induktion des RecA-Promotors die Expression des Biolumineszenz-Reporters LuxCDABE kontrolliert. Ähnliche Experimente wurden bereits für *Mtb* durchgeführt.<sup>110,111</sup> Dadurch lässt sich über die Messung der Lumineszenz die Aktivität der DNA Damage Response verfolgen. Der modifizierte *Mabs* Stamm wurde mit **844** und **844-TFM** inkubiert. Damit sollte dargestellt werden, dass P4C Schäden an der DNA-Doppelhelix verursachen. MXF und Gepotidacin wurden als Positivkontrollen und Clarithromycin als Negativkontrolle in die Assays einbezogen.



**Abbildung 41** Einfluss verschiedener Gyraseinhibitoren (844, 844-TFM, Geptidacin GPT, MXF) und Clarithromycin CLR auf die LuxCDABE-Expression (obere Reihe) und das Wachstum (untere Reihe) von Wildtyp *Mabs ssp. abs* ATCC 19977 (schwarze Linien), sowie des P4C-resistenten Stamms 844-TFM<sup>R</sup>-1 (rote Linien). Die LuxCDABE-Expression erfolgte in Abhängigkeit der durch DNA-Schäden induzierten Aktivität des RecA-Promoters. Die Bakterien wurden 4 h mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert. Anschließend wurde die relative Lumineszenz (RLU) bestimmt, um die Aktivität des Promoters zu ermitteln. Für die Bestimmung der Wachstumshemmung wurden die Kulturen für vier Tage mit den Testsubstanzen inkubiert. Nachfolgend wurde die optische Dichte ( $OD_{600}$ ) gemessen, um die Hemmkurven zu erstellen. Die Experimente wurden als Triplikate angefertigt. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen.

Bei der Behandlung der Kulturen mit den Wirkstoffen konnte für **844**, **844-TFM**, Geptidacin und MXF ein deutlicher Anstieg der Lumineszenz beobachtet werden, wohingegen Clarithromycin keinen Anstieg zur Folge hatte (Abbildung 41).<sup>50</sup>

Sofern die Induktion des RecA-Promoters durch die Interaktion der Substanzen mit der DNA-Gyrase verursacht wird, sollte diese in den resistenten Mutanten ausbleiben. Um die These zu untersuchen, wurde das RecA-Reporter Operon in das Genom von *Mabs ssp. abs* ATCC19977 **844-TFM<sup>R</sup>-1** eingefügt. Dieser Stamm beherbergt das mit hoher Resistenz verbundene Allel D91N auf GyrA. Die modifizierten resistenten Stämme erzeugten eine deutlich geringere Lumineszenz bei der Behandlung mit **844**, **844-TFM** und Geptidacin im Vergleich zum Wildtyp. Die

Reduktion der Lumineszenzintensität war bei MXF weniger stark ausgeprägt (Abbildung 41). Die Ergebnisse zeigen, dass P4C Schäden in der DNA verursachen, welche zu Induktion des DNA Damage Receptors RecA führt. Die Resultate lassen darauf schließen, dass die DNA-Schäden durch die Interaktion mit der mykobakteriellen DNA-Gyrase hervorgerufen werden.<sup>50</sup>

## 2.2.4 ZYTOTOXIZITÄTSUNTERSUCHUNGEN

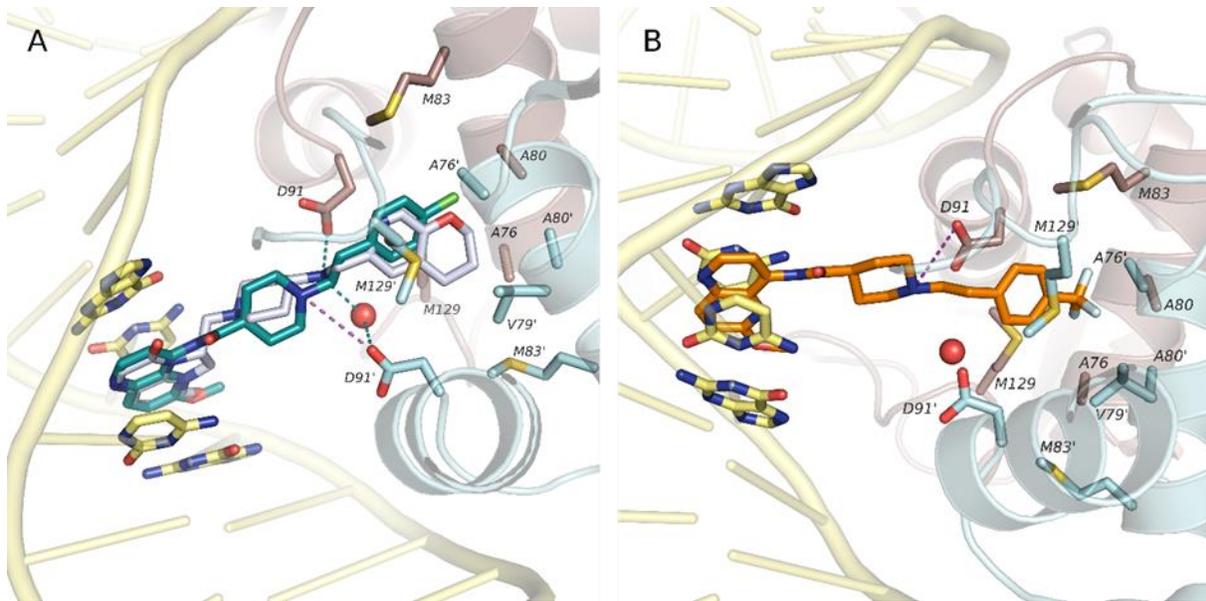
Wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben, ist der Wirkmechanismus der in dieser Arbeit beschriebenen Substanzen die Hemmung der mykobakteriellen DNA-Gyrase.<sup>50</sup> Die Gyrasen zählen zur essentiellen Familie der Topoisomerasen, welche in allen Organismen die Topologie des genetischen Materials regulieren. Eine Hemmung der Enzyme und der damit verbundene DNA-Doppelstrangbruch stellen einen zytotoxischen Prozess dar.<sup>112</sup> Um auszuschließen, dass die Substanzen auch für humane Zellen toxisch sind, wurde eine Auswahl der synthetisierten Verbindungen gegen verschiedene Zelllinien getestet. Die Verbindungen **844**, **844-TFM**, **8g**, **8l**, **8s**, **8q** und **8u** wurden *in vitro* im Sulforhodamin B (SRB) Assay gegen vier maligne Tumorzelllinien (A375, HT29, MCF-7, FaDU) und zwei nicht maligne Zelllinien (NIH3T3, HEK293) getestet. Bei keiner der untersuchten Verbindungen konnten zytotoxische Effekte bei einer Konzentration bis 30 µM gegen die getesteten Zelllinien innerhalb von 24 Stunden nachgewiesen werden.<sup>101</sup>

## 2.3 *IN SILICO* DOCKING-UNTERSUCHUNGEN

Die *in silico* Docking-Experimente wurden von Dr. Dina Robaa am Institut für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen über das Target der Verbindungen eröffneten die Möglichkeit zur Durchführung von *in silico* Docking-Experimenten. Dafür wurde ein Homologiemodell von *Mabs* GyrA generiert. Als Grundlage für das Modell diente die Kristallstruktur (PDB ID 4PLB) von *S. aureus* GyrA mit AM8191.<sup>57</sup> Die Substanz ist ein NBTI und weist strukturelle Ähnlichkeit mit den P4C auf. Die Aminosäuresequenz von *Mabs* GyrA besitzt eine höhere Ähnlichkeit mit *Mtb* GyrA verglichen mit *S. aureus* GyrA. Für *Mtb* GyrA existieren jedoch lediglich Kristallstrukturen der Apoform oder im Komplex mit einem Fluorchinolon. *Mtb* GyrA–NBTI Kristallstrukturen sind jedoch nicht verfügbar. Deshalb wurde das Homologiemodell basierend auf *S. aureus* GyrA-Kristallstruktur für die Docking-Experimente verwendet. Mit diesem Modell wurde der Bindungsmodus der synthetisierten Substanzen simuliert und mit jenem des bekannten NBTI Gepotidacin verglichen. Der 1,5-Naphthyridin-Ring von **844** überlappt deutlich mit der LHS von Gepotidacin bei der Interkalierung des DNA-Abschnitts. Ebenso zeigt sich eine Überlagerung der RHS der beiden Moleküle. Die *p*-substituierten Phenylgruppen von **844** und **844–TFM** gehen van-der-Waals-Wechselwirkungen mit der hydrophoben Schnittstelle der beiden GyrA-Untereinheiten ein. Der basische Stickstoff von Gepotidacin bildet im protonierten Zustand eine ionische Wechselwirkung mit Asp91 einer GyrA-Untereinheit aus. Zugleich entsteht eine durch ein Wassermolekül vermittelte H-Brückenbindung zu Asp91 der anderen GyrA-Untereinheit. Eine ähnliche ionische Wechselwirkung gehen die protonierten Piperidinstickstoff-Atome des Linkers von **844** und **844–TFM** ein (Abbildung 42). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass P4C den gleichen Bindungsmodus an der mykobakteriellen Gyrase aufweisen, wie bekannte NBTIs.<sup>101</sup>

Anhand der simulierten Interaktion der Wirkstoffe mit dem GyrA-DNA-Komplex konnten Voraussagen über vorteilhafte Modifikationen der Liganden getroffen werden. Die Verbindungen **8p** und **8q** wurden nach der Annahme entworfen, dass durch die Verschiebung des basischen Stickstoffs des Linkers in Richtung der RHS eine stärkere ionische Wechselwirkung zu erreichen sei.



**Abbildung 42** Simulierte Bindungsmodi von **844** (türkis), **844-TFM** (orange) und Gepotidacin (weiß) im Homologiemodell von *Mabs* GyrA. Die Beiden GyrA-Untereinheiten sind hellblau bzw. dunkelrot gefärbt. Der DNA-Doppelstrang ist gelb und das Wassermolekül als rote Kugel dargestellt. **A** Überlappung der Strukturen von **844** und Gepotidacin. Die ionische Wechselwirkung von **844** mit Asp91 ist als gestrichelte purpurfarbene Linie gezeigt. Die Wechselwirkungen von Gepotidacin mit dem Enzym sind als gestrichelte türkisfarbene Linien eingezeichnet. **B** Interaktion von **844-TFM** mit der DNA und der NBTI Bindungsstelle auf GyrA. Die ionische Wechselwirkung ist als gestrichelte purpurfarbene Linie dargestellt. (Schrödinger Release 2019-1: Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, USA)

**8p** besitzt eine zusätzliche Methylengruppe zwischen dem Piperidinring und der Carbonylgruppe des Amids. Der Stickstoff des Piperidins wurde benzyliert, dadurch blieb die Gesamtlänge des Linkers konstant. **8q** hingegen besitzt anstelle eines Piperidins ein Cyclohexylamin als Linker. Auch hier ist der basische Stickstoff um eine Position in Richtung des Phenylrestes verschoben. Die Interaktion der beiden Strukturen mit dem Modell von *Mabs* GyrA wurde ebenfalls simuliert. Basierend auf diesen Annahmen, erfolgte die Synthese und Testung der *in silico* entwickelten Derivate **8p** und **8q** (Abbildung 43). Obwohl die beiden Substanzen sowohl untereinander als auch im Vergleich zu anderen NBTIs einen ähnlichen Bindungsmodus aufweisen, zeigten sie starke Unterschiede in ihren Aktivitäten: **8p** ergab im Supercoiling(SC)-Assay eine  $IC_{50}$  von 40  $\mu$ M (vgl. 1.5  $\mu$ M für **844-TFM**). Im *in vitro* Assay gegen *Mabs* Bamboo besitzt **8p** deutlich verminderte wachstumshemmende Eigenschaften (MHK = 100  $\mu$ M) im Vergleich zu **844-TFM**. Die Modifi-

kation in **8q** bewirkte hingegen eine deutliche Steigerung der *in vitro* Aktivität im Vergleich zu **844-TFM**.

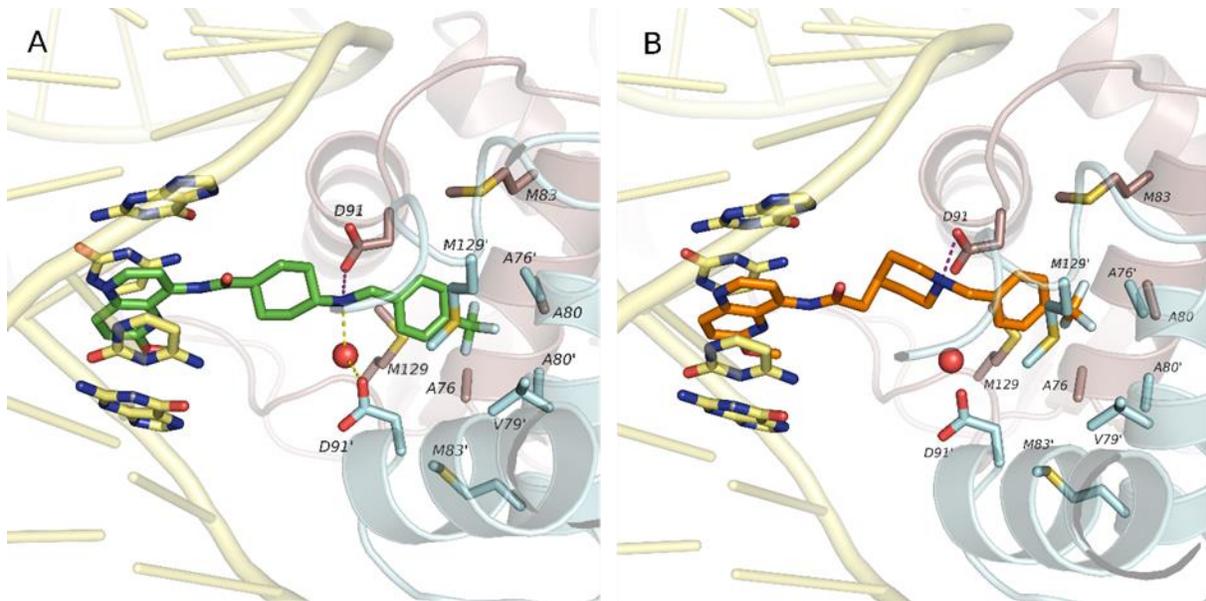


Abbildung 43 A Simulierter Bindungsmodus von **8q** (grün) im Homologiemodell von *Mabs* Gyrase. B Bindungsmodus von **8p** (orange). (Schrödinger Release 2019-1: Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, USA)

Im SC Assay ergab die Verbindung zwar die gleiche  $IC_{50}$  wie **844-TFM** ( $1.5 \mu\text{M}$ ), jedoch zeigte sich gegen *Mabs* Bamboo eine dreifach verbesserte Aktivität (MHK =  $0.4 \mu\text{M}$ ). Die Verbesserung der Wirksamkeit durch die Vorhersagen aus den Docking-Experimenten bekräftigt die Evidenz der Targetidentifizierung.<sup>50,101</sup>

## 2.4 BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

### 2.4.1 BESTIMMUNG DER IC<sub>50</sub>-WERTE GEGEN WILDTYP DNA GYRASE

Die Gewinnung der rekombinanten *Mabs* DNA Gyrase und die Enzym-Inhibitions-Assays wurden durch die Mitarbeiter von Prof. Dr. Thomas Dick vom CDI des HMH in Nutley, NJ, USA durchgeführt.

Bei der Identifizierung neuartiger antibakterieller Wirkstoffe bietet ein aktivitätsbasiertes Screening von Substanzbibliotheken gegen die adressierten Bakterien methodische Vorteile gegenüber einer gezielten targetbasierten Entwicklung. So ist die Vorhersagbarkeit der Aktivität eines Stoffs gegen prokaryotische Organismen durch deren vielseitige Abwehrmechanismen eingeschränkt. Für die gezielte Aktivitätsoptimierung einer Substanzklasse ist es dennoch vorteilhaft, die direkte Interaktion einzelner Substanzen mit ihrem Target zu untersuchen. Auf diese Weise lassen sich organismenspezifische Störgrößen wie Zellwandpermeation und Metabolismus ausschließen, was eine Feinjustierung der Targetinhibition erlaubt.

Die inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>) ist ein Maß für die Interaktion eines Wirkstoffs mit seinem Target. Der Index gibt an, dass es sich um diejenige Konzentration handelt, bei der die Aktivität des Targets zu 50 % gehemmt ist. Die physiologische Funktion der Gyrase ist die negative Überspiralisierung der prokaryotischen DNA. Die Bestimmung der Aktivität von Hemmstoffen der Gyrase kann deshalb im Supercoiling (SC)-Assay erfolgen. Die Substanzen werden mit dem Enzym und relaxiertem DNA-Plasmid inkubiert, anschließend wird die relaxierte von der spiralierten DNA mittels Gelelektrophorese getrennt und die Banden mit Ethidiumbromid gefärbt. Der Anteil der spiralierten DNA ist abhängig von der Enzymaktivität in Gegenwart verschiedener Konzentrationen der Hemmstoffe. Anhand der Konzentrationshemmkurven lässt sich die IC<sub>50</sub> ermitteln.<sup>108</sup>

Eine Auswahl der in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen wurde auf ihre IC<sub>50</sub>-Werte untersucht. Gepotidacin wurde als Referenzsubstanz mit eingeschlossen (Tabelle 7).<sup>101</sup> Die Substanz ist bislang das am weitesten entwickelte NBTI und befindet sich in der klinischen Phase III

zur Therapie von komplizierten und nicht-komplizierten Harnwegsinfektionen sowie Gonorrhoe.<sup>113</sup>

Zur besseren Interpretation der Ergebnisse wurden weiterhin die logP Werte der einzelnen Vertreter kalkuliert. Der logP Wert dient der Beschreibung der Polarität eines Stoffes und ist ein wesentlicher Parameter für die Bindung eines Ligands an sein Target. Außerdem bestimmt er die physikochemischen und pharmakokinetischen Eigenschaften eines Wirkstoffs wie Lösungs- bzw. Verteilungsverhalten und Permeation.<sup>114</sup> Die SC-Assays wurden am CDI unter der Leitung von Thomas Dick durchgeführt.

### **Gewinnung der rekombinanten *Mabs* DNA Gyrase**

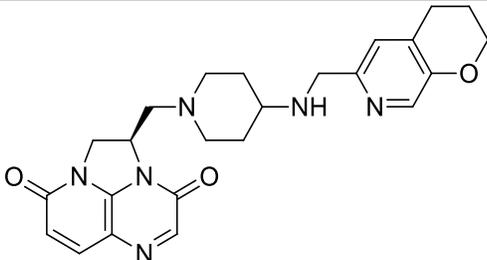
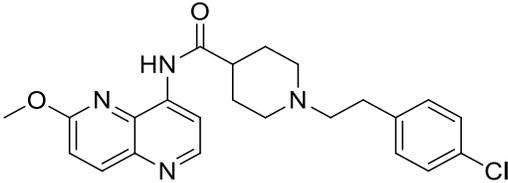
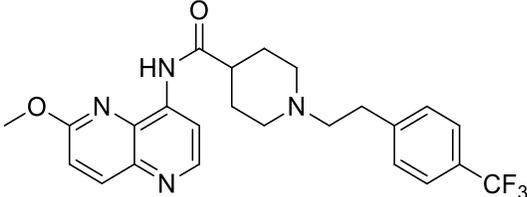
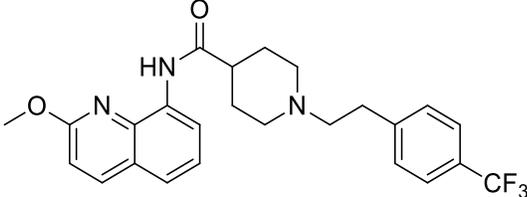
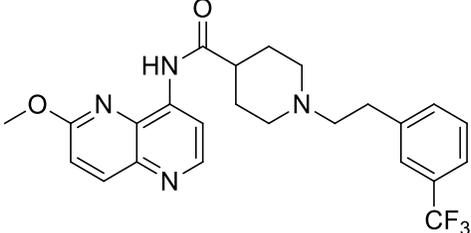
Für die Gewinnung der rekombinanten Enzyme wurde ein publiziertes Verfahren für die Expression von rekombinanter *Mtb* DNA Gyrase verwendet und mit *Mabs ssp. abs.* ATCC 19977 durchgeführt.<sup>109</sup> Um die Genabschnitte in der genomischen DNA von *Mabs ssp. abs.* ATC 19977, welche GyrA und GyrB kodieren, festzulegen und mittels PCR zu amplifizieren, wurden zunächst die entsprechenden Primer designt. Die Abschnitte wurden anschließend mit einem Alanin-Serin-Linker fusioniert und in einen Vektor kloniert (pET-28a(+)), welcher mit einem N-terminalen Polyhistidintag versehen war. Hierdurch wurde das gewünschte Plasmid pET-28a+gyrBA wt erhalten. Das analoge Plasmid pET-28+gyrBA<sup>D91N</sup>, welches für die Expression der mutierten resistenten DNA Gyrase nötig war, wurde von Genewiz (Leipzig, Deutschland) synthetisiert. Die Plasmide wurden anschließend in *E. coli* BL21 (DE3) pLysE amplifiziert. Die Zellkulturen wurden bei 37 °C bis zur frühen log-Phase inkubiert und lysiert. Das Zelllysate wurde durch Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt, um die rekombinanten DNA-Gyrase zu isolieren.<sup>50</sup>

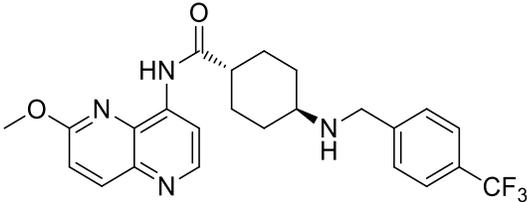
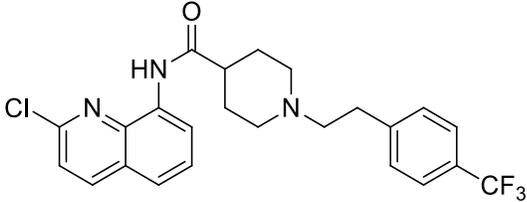
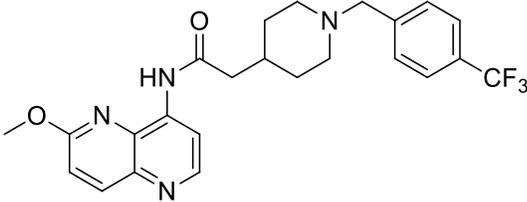
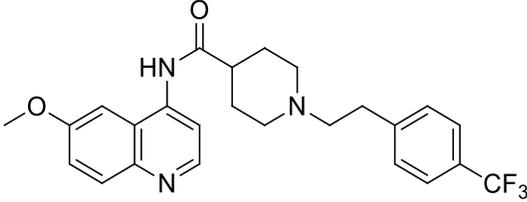
### **In vitro DNA Gyrase Supercoiling (SC) Inhibitionsassay**

Die Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte der synthetisierten Verbindungen erfolgte mit einem Kit von Inspiralix Limited (MTS002, Norwich, UK). Dafür wurde die wie oben beschrieben gewonnene *Mabs* DNA Gyrase anstelle der im Kit enthaltenen *Mtb* DNA Gyrase verwendet. Die Enzyme wurden mit relaxiertem Plasmid (pBR322) und verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und ein Aliquot des wässrigen Überstands über ein Agarosegel getrennt. Nach der Gelelektrophorese wurden die Banden des re-

laxierten bzw. superspiralisierten Plasmids mit Ethidiumbromid angefärbt. Die  $IC_{50}$ -Werte wurden dann aus der Intensität der Banden ermittelt.<sup>50</sup>

**Tabelle 7** Enzymhemmung der synthetisierten Verbindungen im Vergleich mit deren Wachstumshemmung und ihrem kalkulierten  $clogP$ -Wert.<sup>101</sup> Die Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte erfolgte als Triplikat. Die Mittelwerte sind angegeben. <sup>a</sup> SC *Mabs* DNA-Gyrase, <sup>b</sup> *Mabs* Bamboo.

Code	Struktur	$IC_{50}$ [ $\mu$ M] <sup>a</sup>	MHK <sub>90</sub> [ $\mu$ M] <sup>b</sup>	$clogP$
Gepotidacin		2	10	0.1
844		3	12	2.6
844-TFM		1.5	1.5	2.9
8s		3	3.12	3.6
8g		40	12.5	2.9

Code	Struktur	IC <sub>50</sub> [μM] <sup>a</sup>	MHK <sub>90</sub> [μM] <sup>b</sup>	clogP
8q		1.5	0.4	3.3
8n		3	50	3.9
8p		40	100	2.8
8r		6	100	3.0

Von den getesteten Verbindungen zeigten **844-TFM** und **8q** die höchste Aktivität (IC<sub>50</sub> = 1.5 μM) an der DNA-Gyrase. Dies entspricht den Ergebnissen aus den MHK-Assays, in welchen die beiden Substanzen ebenfalls zu den wirksamsten zählen. Allerdings war die MHK von **844-TFM** dreifach höher als jene von **8q** (MHK 1.5 μM bzw. 0.4 μM). Wodurch dieser Unterschied hervorgerufen wird, konnte anhand der IC<sub>50</sub>-Bestimmung nicht erklärt werden. Bei Betrachtung der logP-Werte von **844-TFM** und **8q** lässt sich konstatieren, dass letzteres eine geringere Polarität besitzt. Die Beobachtung, dass apolarere Verbindungen eine geringere MHK aufweisen, kann auch beim Vergleich weiterer Derivate beobachtet werden.

Folglich lieferten die Kandidaten **8s** und **8r** im MHK-Assay eine erhebliche Differenz ihrer Aktivität im Ganzzellassay (3.12 μM vs. 100 μM). Die Untersuchung der IC<sub>50</sub> ergab jedoch kaum Unterschiede der beiden Stoffe (3 μM und 6 μM). Strukturell sind **8s** und **8r** Stellungsisomere vonei-

inander und unterscheiden sich lediglich im Substitutionsmuster des Chinolins der LHS. Die logP-Werte zeigen, dass **8r** die polarere Verbindung ist. Auch hier zeigt sich die bessere Wirksamkeit von apolaren Strukturen.

Die getestete Verbindung **8n** ist ein Derivat von **8s**. Der Unterschied besteht im Chlorsubstituent anstelle des Methylethers der LHS. Im SC-Assay ergab **8n** die gleiche  $IC_{50}$  wie **8s** (3  $\mu$ M). Vor diesem Hintergrund ist ihre Differenz der mykobakteriellen Wirksamkeit bemerkenswert. Die MHK von **8n** ist mehr als 16-mal höher als jene von **8s**. Dieses Aktivitätsverhalten lässt sich allerdings nicht anhand der Polarität erklären, denn **8n** besitzt den höchsten logP-Wert aller getesteten Verbindungen.

Die geringste Enzymaktivität unter den getesteten Kandidaten lieferten **8g** und **8n** mit einer  $IC_{50}$  von jeweils 40  $\mu$ M. Auch ihre logP-Werte sind ähnlich (2.9 bzw. 2.8) und liegen im Bereich der aktiveren Verbindungen (**844-TFM**, **8r**). Es zeigt sich, dass die alleinige Betrachtung der Polarität für die Erklärung nicht hinreichend ist.

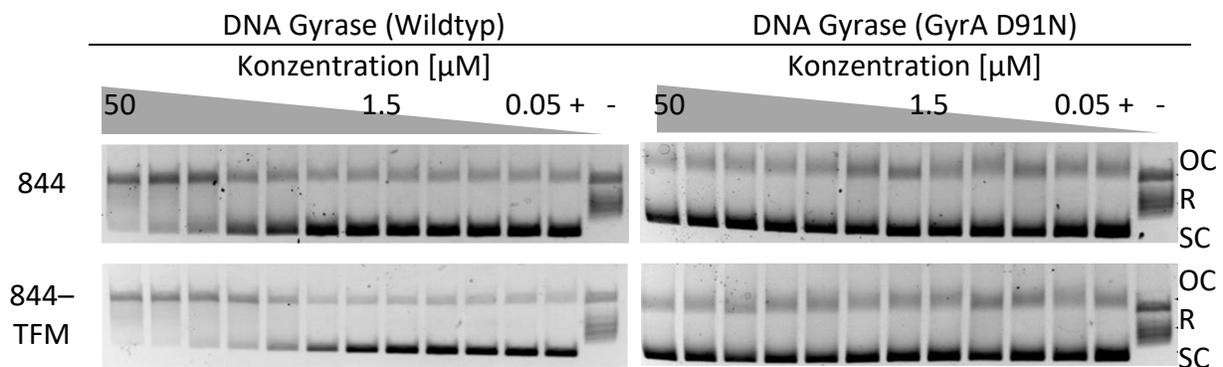
Gepotidacin besitzt gute Aktivität gegen Gram-positive Bakterien wie *S. aureus*.<sup>54</sup> Gegen *Mabs Bamboo* zeigt Gepotidacin eine eingeschränkte Wirksamkeit ( $MHK_{90} = 10 \mu$ M).<sup>50</sup> Trotz der geringen anti-mykobakteriellen Aktivität besitzt Gepotidacin im SC-Assay eine  $IC_{50}$  von 2  $\mu$ M gegen die mykobakterielle DNA-Gyrase. Die geringe Hemmung des Bakterienwachstums kann durch den logP Wert von Gepotidacin erklärt werden ( $\log P = 0.1$ ). Demnach ist die Substanz deutlich polarer als die restlichen getesteten Verbindungen. Es ist möglich, dass dadurch die Permeabilität vermindert wird, was wiederum zu einer geringeren intrazellularen Konzentration und somit schlechteren Wirksamkeit führt. Wodurch sich dieser Unterschied ergibt, wurde im Zuge dieser Arbeit nicht näher untersucht.

Die Ergebnisse der Enzym-Assays bestätigen die erwähnten Kompikationen bei der Korrelation mit der antimykobakteriellen Wirkung. Obwohl Substanzen, welche eine gute Wachstumshemmung erzielten, auch potente Enzyminhibitoren sind, gilt diese Beziehung nicht in umgekehrter Richtung. Weiterhin sind die aktivsten der hergestellten Verbindungen in ihrer Enzymhemmung mit der von Gepotidacin vergleichbar. Jedoch sind die hier vorgestellten P4C Gepotidacin bezüglich ihrer antimykobakteriellen Wirkung überlegen. Die Resultate liefern wertvolle Daten für die Verifizierung des *in silico* Homologiemodells der Inhibitor-Enzym-Interaktion.

## 2.4.2 UNTERSUCHUNGEN MIT REKOMBINANTER GYRASE VON RESISTENTEN MUTANTEN

Die konzentrationsabhängige Hemmung der Supercoiling-Aktivität der *Mabs* GyrA durch P4C liefert einen direkten Hinweis über den Wirkmechanismus der Substanzen. Weitere Evidenz kann aus der Untersuchung der Hemmaktivität gegen *Mabs* GyrA der resistenten Mutanten gewonnen werden, welche das D91N Allel trägt.

Darum wurden die Verbindungen **844** und **844-TFM** mit rekombinanter *Mabs ssp. abs* ATC19977 **844-TFM**<sup>R</sup>-1 GyrA und relaxiertem pBR322 Plasmid inkubiert. Der relaxierte Anteil des Plasmids wurde durch Gel-Elektrophorese vom Supercoil-Anteil getrennt und die Intensität der Banden nach Färbung mit Ethidiumbromid ausgewertet.



**Abbildung 44** Effekt von P4C auf die Enzymaktivität von Wildtyp *Mabs* Gyrase und *Mabs* Gyrase D91N. Die Überführung von relaxiertem (R) in überspiralisiertes Plasmid (SC) wurde durch Agarose-Gelelektrophorese sichtbar gemacht. OC, Offen zirkulares Plasmid. +, Enzym mit Plasmid (ohne Inhibitor): Vollständige Überführung in superspiralisiertes Plasmid. –, Plasmid mit Inhibitor (ohne Enzym): keine Überspiralisierung, P4C Konzentrationen von links nach rechts abnehmend (50, 25, 12.5, 6.2, 3.1, 1.5, 0.7, 0.39, 0.19, 0.09, 0.05 µM).<sup>50</sup>

**844** und **844-TFM** hemmten die Wildtyp *Mabs* GyrA mit einer IC<sub>50</sub> von 4.6 µM und 1.9 µM. Wie erwartet, zeigte sich bei Verwendung von GyrA D91N keine Inhibition der Enzymaktivität in den getesteten Konzentrationen (Abbildung 44). Die Ergebnisse bekräftigen die Annahme, dass die Resistenz der Stämme auf die D91N Mutation zurückzuführen ist und die Bindungsstelle der Testsubstanzen im erwarteten Bereich des Enzyms lokalisiert ist.<sup>50</sup>

### 2.4.3 hERG-INHIBITIONSASSAY

Die Wirkstoffklasse der NBTIs zeichnet sich durch ihre hohe Aktivität gegen ein breites Spektrum von Gram-positiven und Gram-negativen Erregern aus.<sup>51</sup> Im Falle der hier vorgestellten P4C erreichen manche Vertreter Aktivitäten im submikromolaren Bereich gegen *Mabs*. Neben ihrer potenten Wirkung *in vitro* konnte kürzlich gezeigt werden, dass einige NBTI auch *in vivo* Aktivität gegen *Mabs* besitzen.<sup>115</sup>

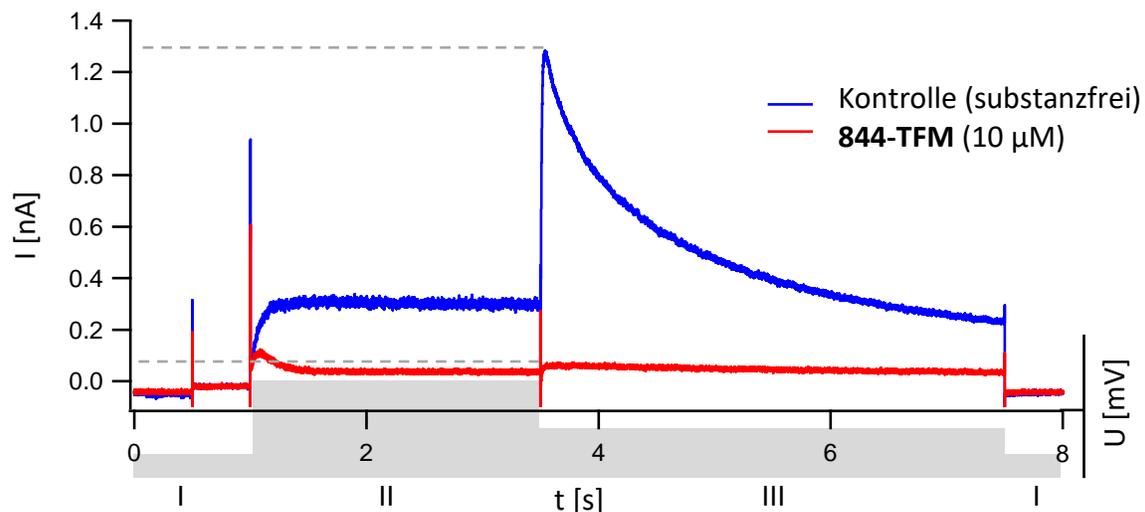
Eine besondere Herausforderung bei der Entwicklung aussichtsreicher NBTIs stellt ihr hohes kardiotoxisches Potential durch Inhibition des hERG-Kanals dar. Das *human ether-a-go-go related gene* (hERG) kodiert die  $\alpha$ -Untereinheit des schnell verzögernden einwärtsgerichteten spannungsgesteuerten Kaliumkanals am Herz (rapid delayed rectifier  $K^+$ -Kanal,  $I_{Kr}$ ).<sup>116,117</sup> Dieser ist mitverantwortlich für die Repolarisierung des Herzens nach dem Aktionspotential. Wird der hERG-Strom gehemmt, kommt es zu einer Verlängerung des QT-Intervalls im EKG. Die damit verbundene ventrikuläre Tachyarrhythmie (Torsade de Pointes) ist potentiell tödlich.<sup>118</sup> Wegen dieser unerwünschten Wirkung wurden einige vielversprechende klinische Studien mit NBTIs eingestellt. Als Folge darauf wurden vermehrt NBTIs mit Hinblick auf die Reduktion ihrer hERG-Aktivität entwickelt.<sup>66</sup>

Die Aktivität einer Substanz am hERG-Kanal wird üblicherweise mit der Patch-Clamp-Technik bestimmt.<sup>116,119</sup> Dabei wird eine spitz ausgezogene Glaspipette (Spitzeninnendurchmesser 1-2  $\mu\text{m}$ ) in sehr engen Kontakt mit der Zellmembran gebracht. Durch Erzeugung eines Unterdrucks in der Pipette wird die Verbindungsstelle (Patch) von der Umgebung isoliert. Anschließend wird durch einen kurzen kräftigen Saugimpuls das isolierte Membranstück unter der Pipette aufgebrochen. In der Folge diffundiert die Pipettenlösung in das Cytoplasma. Über eine in der Glaspipette befindliche Elektrode und einen Vorverstärker können das Membranpotential der Zelle  $U_m$  und die Ionenströme  $I_m$ , die über die Ionenkanäle der Zellmembran fließen, gemessen werden.<sup>119</sup>

Um die Inhibition des hERG-Kanals in Abhängigkeit von der Konzentration von Testsubstanzen zu ermitteln, wird ausgehend von einem Haltepotential ein Depolarisationsimpuls erzeugt. Dies erzeugt hERG-Ströme durch die langsame Aktivierung (Öffnung) der Kanäle und einer schnellen Inaktivierung. Darauf folgt die schnelle Deaktivierung (Schließung) der Kanäle, wodurch ein wei-

terer Anstieg der Ströme ausbleibt. Durch Repolarisierung des äußeren Potentials werden anschließend hERG-Tail-Ströme induziert. Diese werden durch die rasche Erholung von der Inaktivierung und die nun verzögerte Deaktivierung der hERG-Kanäle hervorgerufen. Für die Berechnung der prozentualen Inhibition der Aktivität des Kanals durch eine Testsubstanz werden die gemessenen Spitzen-Tail-Ströme mit der Kontrollmessung verglichen.

Um festzustellen, ob die in dieser Arbeit hergestellten Substanzen potentiell kardiotoxisch sind, wurde die Substanz **844-TFM** exemplarisch auf ihre hERG-Inhibition bei einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  getestet (Abbildung 45). Die Experimente wurden von Bioduro (Shanghai, China) als Auftragsanalyse durchgeführt. Als positive Referenzsubstanz wurde Cisaprid verwendet.



**Abbildung 45** Effekt von 844-TFM auf hERG-Ströme. Der Spannungsverlauf ist als graue Fläche dargestellt. I Negatives Haltepotential zu Beginn des Messlaufs. Die hERG-Kanäle sind deaktiviert. II Infolge der Depolarisation werden die hERG-Kanäle aktiviert und rasch inaktiviert. Hierdurch werden hERG-Ströme ausgelöst. Die Stärke der Ströme ist unter Einfluss von 844-TFM wesentlich geringer als bei der Kontrollmessung. III Durch die Repolarisierung werden bei der Kontrolle durch die rasche Öffnung der hERG-Kanäle Stöme induziert. Die Amplituden werden als Spitzen-Tail-Strom bezeichnet (gestrichelte Linien). In Anwesenheit von 844-TFM bleibt die Öffnung der Kanäle aus, wodurch nur ein geringer Strom gemessen wird. Die Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, dass **844-TFM** ein potenter Hemmstoff des hERG-Kanals ist. Bei einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  hemmte die Substanz die Aktivität des Kanals zu 92,6 %.<sup>101</sup> Neuartige

---

NBTI mit verbesserter hERG-Aktivität besitzen eine  $IC_{50}$  von mehr als  $300 \mu\text{M}$ .<sup>50</sup> Unter den MGIs wurden Wirkstoffe beschrieben, welche eine hERG  $IC_{50}$  von mehr als  $100 \mu\text{M}$  aufweisen. Obwohl die hier vorgestellten P4C potente Inhibitoren des hERG-Kanals sind, liegt ihre MHK deutlich unter der bestimmten Konzentration von  $10 \mu\text{M}$ . Somit besteht dennoch die Möglichkeit, dass die Substanzen bei einer angepassten Dosierung, ihre antimykobakteriellen Eigenschaften *in vivo* entfalten, ohne darüber hinaus kardiotoxische Effekte zu verursachen. Die Resultate aus anderen Arbeiten deuten außerdem darauf hin, dass die gezielte Derivatisierung der Leitverbindungen zu verringerter hERG-Aktivität unter Beibehaltung der antimykobakteriellen Wirkung führen kann.<sup>66</sup>

## 2.5 PHARMAKOKINETISCHE UNTERSUCHUNGEN

Die Pharmakokinetik (PK) bildet ein Nadelöhr bei der Entwicklung von aussichtsreichen Wirkstoffkandidaten.<sup>120</sup> Potente Substanzen können wegen ihrer unzureichenden pharmakokinetischen Eigenschaften verworfen werden. In manchen Fällen kann durch zielgerichtete Derivatisierung ein besseres pharmakokinetisches Profil geschaffen werden. Wegen der hohen Bedeutung der PK bei der Wirkstoffentwicklung sollten die entscheidenden Parameter möglichst früh bestimmt werden, um ungeeignete Strukturen zeitnah zu eliminieren.<sup>120</sup> Charakteristische Größen für die PK sind Aufnahme, Distribution, Metabolismus und Exkretion (ADME). Die Absorption beschreibt die Aufnahme eines Stoffes in das zentrale Kompartiment Blut. Die zu bestimmenden Parameter sind die Löslichkeit und die Permeation. Sie beeinflussen die Bioverfügbarkeit einer Substanz nach ihrer Verabreichung *in vivo*. Die Distribution beschreibt die Verteilung einer Substanz aus dem Plasma in tiefere Kompartimente. Dieser Vorgang wird beschrieben durch das Verteilungsvolumen ( $V_D$ ). Dieses gibt an, in welchem Maß sich die verabreichte Substanz in anderen Geweben verteilt. Der Metabolismus beschreibt die Umwandlung des Stoffes durch physiologische Prozesse bevor er exkretiert, d.h. ausgeschieden wird. Für den Metabolismus sind die mikrosomale Stabilität und die Plasmastabilität zu berücksichtigen. Dafür werden die hepatische Clearance ( $CL_{\text{hep}}$ ) und die intrinsische Clearance ( $CL_{\text{int}}$ ) bestimmt. Eine weitere wichtige Größe ist die Plasmahalbwertszeit ( $t_{1/2}$ ). Exemplarisch für die hier vorgestellten Verbindungen wurde vor allem **844-TFM** auf seine PK untersucht.

### 2.5.1 *IN VITRO* PHARMAKOKINETIK

#### Bestimmung der Löslichkeit

Die Löslichkeit von Wirkstoffkandidaten in physiologischen Medien ist die Bedingung für deren systemische Aufnahme. Eine zu geringe Löslichkeit im Gastrointestinaltrakt führt dazu, dass die erreichten Plasmakonzentrationen unter den *in vitro* ermittelten Wirkkonzentrationen (MHK, IC) liegen. Die Löslichkeit eines Wirkstoffs sollte also idealerweise höher liegen als die angestrebte Plasmakonzentration.

Bei der Bestimmung der Löslichkeit werden die kinetische und die thermodynamische Löslichkeit unterschieden. Die kinetische Löslichkeit wird anhand der Veränderung von substanzunabhängigen Größen wie z.B. Leitfähigkeit (Potentiometrie) oder Trübung (Turbidimetrie) in Abhängigkeit der gelösten Konzentration bestimmt. Für die thermodynamische Löslichkeit wird ein thermodynamisches Gleichgewicht zwischen gelöster und ungelöster Substanz erzeugt (Sättigung). Nach Filtration der gesättigten Lösung ergibt sich aus der Konzentrationsbestimmung die dynamische Löslichkeit (Shake Flask Methode). Der Vorteil gegenüber der Bestimmung der thermodynamischen Löslichkeit liegt darin, dass keine übersättigten Lösungen bestimmt werden. Ein Nachteil liegt in ihrer schlechteren Automatisierbarkeit, weshalb sich die kinetische Löslichkeit besser für Hochdurchsatzverfahren eignet.<sup>121</sup> Außerdem ist es möglich, dass sich der Analyt während der Inkubation zersetzt. Für die Verbindungen **8s**, **8r** und **844-TFM** wurde die kinetische Löslichkeit bei physiologischem pH-Wert bestimmt (Tabelle 8). Die Löslichkeit der Substanz **844-TFM** wurde von BioDuro (Shanghai, China) als Auftragsanalyse durchgeführt. Die Löslichkeiten der Verbindungen **8s** und **8r** wurden in unserer Arbeitsgruppe bestimmt.

**Tabelle 8** Kinetische Löslichkeit, MHK, IC<sub>50</sub> und kalkulierte clogP-Werte der Substanzen **844-TFM**, **8s**, **8r**. # Bestimmt durch BioDuro (Shanghai, China).

Substanz	Löslichkeit pH 7.4 [μM]	<i>Mabs</i> Bamboo MHK [μM]	SC <i>Mabs</i> DNA Gyr IC <sub>50</sub> [μM]	clogP
<b>844-TFM</b>	390 <sup>#</sup>	1.5	1.5	2.9
<b>8s</b>	69	3.12	3	3.6
<b>8r</b>	152	100	6	3.0

Die Substanz **844-TFM** besitzt eine Löslichkeit von 390 μM.<sup>50</sup> Der Wert liegt wesentlich höher als die bestimmte MHK gegen *Mabs* Bamboo (MKH = 1.5 μM). Wegen der unterschiedlichen Methoden der Löslichkeitsbestimmung ist ein Vergleich mit den ermittelten Werten für **8s** und **8r** nicht möglich. Die Stellungsisomere **8s** und **8r** wurden mit einer einheitlichen Methode getestet, wodurch die Daten vergleichbar sind.

Strukturell unterscheiden sich die beiden Derivate lediglich durch das Fehlen eines aromatischen Stickstoffs voneinander. Die Verbindung **8s** zeigte eine kinetische Löslichkeit von 69 μM

und liegt somit über der MHK ( $3.12 \mu\text{M}$ ) und der  $\text{IC}_{50}$  ( $3 \mu\text{M}$ ). Die strukturelle Variation in **8r** führte im Vergleich zu **8s** zu einer Verbesserung der kinetischen Löslichkeit von  $152 \mu\text{M}$ . Der Wert liegt über der ermittelten MHK von  $100 \mu\text{M}$  gegen Mabs Bamboo und der  $\text{IC}_{50}$  von  $6 \mu\text{M}$ . Die Ergebnisse der Löslichkeitsbestimmungen deuten darauf hin, dass die synthetisierten Verbindungen ausreichend hohe Konzentrationen bei physiologischen pH-Wert erreichen, um Mabs Wachstum in vivo zu hemmen.

### Bestimmung der Permeabilität

Die Bestimmung der Permeabilität wurde von BioDuro (Shanghai, China) als Auftragsanalyse durchgeführt. Die Permeabilität beschreibt die Fähigkeit einer Substanz, durch eine Zellmembran zu diffundieren. Bei der p.o. Applikation von Arzneistoffen erfolgt die systemische Aufnahme überwiegend durch den Gastrointestinaltrakt. Die Wirkstoffe können die apikale intestinale Membran auf unterschiedlichen Wegen passieren. Am bedeutendsten ist der passive transzelluläre Transport durch die Zellmembran in Richtung eines Konzentrationsgradienten. Für die Bioverfügbarkeit eines Wirkstoffs ist es entscheidend, wie hoch dessen Absorptionsrate in der GIT-Passage ist. Diese ist wiederum abhängig von der substanzspezifischen Permeabilität.

Zur Beurteilung der Permeabilität der in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen wurde **844-TFM** exemplarisch im PAMPA untersucht. PAMPA ist eine Methode zur Bestimmung der Permeabilität einer Substanz von einem Donorkompartiment durch eine künstliche Phospholipidmembran in ein Akzeptorkompartiment.<sup>122</sup>

Hohe Permeabilität entspricht Werten von  $\log\text{Pe} \geq -5$ . Mittlere Permeabilität wiesen Substanzen auf mit  $\log\text{Pe} -5$  bis  $-6$ . Geringe Permeabilität besitzen Substanzen mit  $\log\text{Pe} < -7$ .<sup>123</sup> **844-TFM** ergab eine moderate Permeabilität mit  $\log\text{Pe} = -5.7$  ( $\text{Pe} = 2.0 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ ).<sup>50</sup> Somit bietet sich für die weitere Entwicklung von vielversprechenden P4C die Möglichkeit, gezielt Derivate herzustellen, welche über eine verbesserte Permeabilität verfügen. Besitzen die weiteren hochpotenten Derivate dieser Schrift, wie **8q** oder **8l**, bereits entsprechend günstigere PK-Eigenschaften? Im Zuge der hier vorgestellten Arbeit wurde dies nicht näher untersucht. Der Grund dafür ergibt sich aus den Beobachtungen, welche sich bei der Bestimmung der Plasmastabilität ergaben und für die weitere Entwicklung der Substanzen schwerer wogen, als die eingeschränkte Permeabilität. Die Resultate dieser Untersuchungen werden in den folgenden Abschnitten vorgestellt.

### Bestimmung der mikrosomalen Stabilität

Die Bestimmung der mikrosomalen Stabilität erfolgte durch BioDuro (Shanghai, China) als Auftragsanalyse. Nachdem ein Wirkstoff über den GIT absorbiert wurde, wird er beim Transport mit dem Blutstrom metabolisch verändert. Der größte Anteil des Metabolismus findet durch die Enzyme der Leber statt. Jedoch weisen auch andere Organe und das Blut selbst metabolische Aktivität auf. Durch chemische und enzymatische Veränderung soll die körperfremde Substanz in eine Form überführt werden, welche besser exkretiert werden kann. Erkenntnisse über die spezifischen Reaktionen einer Substanz im Organismus sind von Wert für die Optimierung ihres pharmakokinetischen Profils. Ebenfalls ist die Identifikation von toxischen Abbauprodukten für die Arzneistoffentwicklung bedeutend.

Die *in vitro* Stabilität von **844-TFM** wurde exemplarisch für die synthetisierten Verbindungen bestimmt. Dafür wurden murine Lebermikrosomen verwendet. Mikrosomen sind subzelluläre Fraktionen der Leber, welche metabolisch aktive, membranständige Enzyme enthalten. Durch Bestimmung der Halbwertszeit lässt sich die intrinsische *in vitro* Clearance (*in vitro*  $CL_{int}$ ) ermitteln.

**Tabelle 9** *In vitro* Stabilität von 844-TFM in murinen Mikrosomen.  $k_{el}$  Eliminationskonstante,  $CL_{int}$  intrinsische Clearance,  $CL_{hep}$  hepatische Clearance.

Parameter	
$k_{el}$	0.1
$t_{1/2}$ [min]	5.2
<i>In vitro</i> $CL_{int}$ [ $\mu$ l/min/mg Protein]	267.3
$CL_{int}$ [ml/min/kg]	1052.4
$CL_{hep}$ [ml/min/kg]	82.9

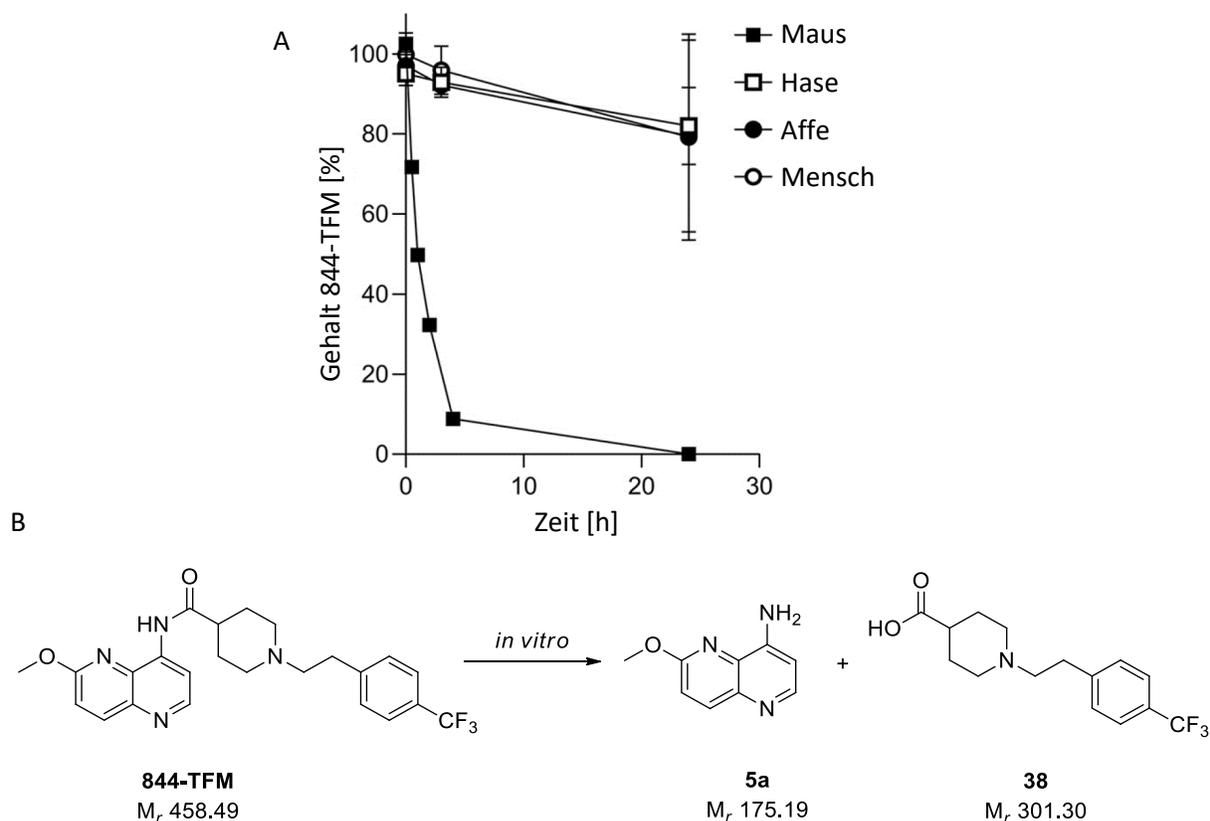
Die Untersuchungen zeigten, dass **844-TFM** in murinen Lebermikrosomen sehr instabil ist. Die Halbwertszeit der Verbindung beträgt 5.2 min und die hepatische Clearance ist annähernd so hoch wie der hepatische Blutfluss von 90 ml/min (Tabelle 9).<sup>124</sup> Daraus ergibt sich ein Extraktri-

onskoeffizient von ca. 1, was auf einen ausgeprägten First-Pass-Effekt und geringe Bioverfügbarkeit hindeutet.<sup>50</sup>

### Bestimmung der *in vitro* Plasmastabilität

Die Bestimmung der *in vitro* Plasmastabilität erfolgte durch die Mitarbeiter von Prof. Dr. Thomas Dick am CDI des HMH in Nutley, NJ, USA.

Während des Transports eines Wirkstoffs mit dem Blutstrom kann dieser durch Enzyme wie unspezifische Proteasen oder freies CYP450 metabolisiert werden. Um zu überprüfen, ob der Abbau der P4C bereits im Plasma stattfindet, wurde **844-TFM** auf seine *in vitro* Plasmastabilität untersucht. Dazu wurde die Substanz mit Mausplasma inkubiert und die Abnahme der Konzentration der Substanz verfolgt.



**Abbildung 46** A *In vitro* Stabilität von 844-TFM im Plasma von Maus, Hase, Affe und Mensch über 24 h. Die Experimente wurden als Triplikate erstellt ( $n = 3$ ). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung. B Hydrolyse der Amidbindung von 844-TFM im murinen Plasma.

**844-TFM** besitzt in Mausplasma eine kurze Halbwertszeit von weniger als 5 min. Durch die massenspektrometrische Analyse der Fraktionen aus dem *in vitro* Assay konnten 6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-amin **5a** und 1-(4-(Trifluormethyl)phenethyl)-piperidin-4-carbonsäure **38** mittels LC-MS als die beiden Hauptmetabolite identifiziert werden (Abbildung 46).<sup>50</sup> Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass im murinen Plasma die Amidbindung von **844-TFM** hydrolysiert wird. Um festzustellen, ob der rasche Abbau abhängig von der verwendeten Spezies ist, wurde die Substanz ebenfalls mit Plasma von Hase, Affe und Mensch inkubiert. **844-TFM** zeigte in keinem Plasma der getesteten Spezies eine vergleichbare Instabilität wie im murinen. In allen Experimenten konnte nach 24 h noch bis zu 80 % der Verbindung nachgewiesen werden.

## 2.5.2 *IN VIVO* UNTERSUCHUNGEN

Die Bestimmung der *in vivo* Pharmakokinetik erfolgte durch die Mitarbeiter von Prof. Dr. Thomas Dick am CDI des HMH in Nutley, NJ, USA.

Die im vorherigen Abschnitt vorgestellten *in vitro* Untersuchungen zur Pharmakokinetik der P4C lieferten wertvolle Hinweise auf das Verhalten der Substanzen gegenüber biologischen Strukturen. Mit den bisher vorgestellten Techniken lässt sich jedoch die PK in einem komplexen Organismus nicht zuverlässlich vorhersagen. Um weitergehende Erkenntnisse über ihre pharmakokinetischen Eigenschaften zu erlangen, wurde **844-TFM** auch auf seine *in vivo* PK getestet. Dafür wurden die Parameter AUC,  $t_{1/2}$ ,  $k_{el}$ ,  $V_D$  und Clearance im Mausmodell nach intravenöser Gabe von 5 mg **844-TFM**/kg bestimmt. Außerdem wurde der Stoff p.o. und s.c. verabreicht (25 mg/kg) und die Bioverfügbarkeit der Administrationswege verglichen. **844-TFM** wird im Mausmodell nach intravenöser Gabe mit einer Halbwertszeit von 1.03 h schnell eliminiert. Die Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe ist vermutlich wegen eines ausgeprägten First-Pass-Effekts gering mit 0.15 %. Die MHK gegen *Mabs* konnte im Plasma somit nicht erreicht werden.

Um die Leberpassage zu umgehen, wurde die Substanz *subkutan* appliziert. Damit konnte die Bioverfügbarkeit gegenüber der oralen Gabe erhöht werden. Der Wert blieb dennoch moderat mit 3 % und die Plasmakonzentration fiel nach einer Stunde erneut unter die MHK gegen *Mabs* (Abbildung 47).<sup>50</sup> Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die pharmakokinetischen Eigenschaf-

ten von **844-TFM** und den P4C, trotz ihrer potenten *in vitro* Aktivität, nicht ausreichend sind, um *in vivo* einen Effekt auf das Wachstum von *Mabs* zu erzielen.

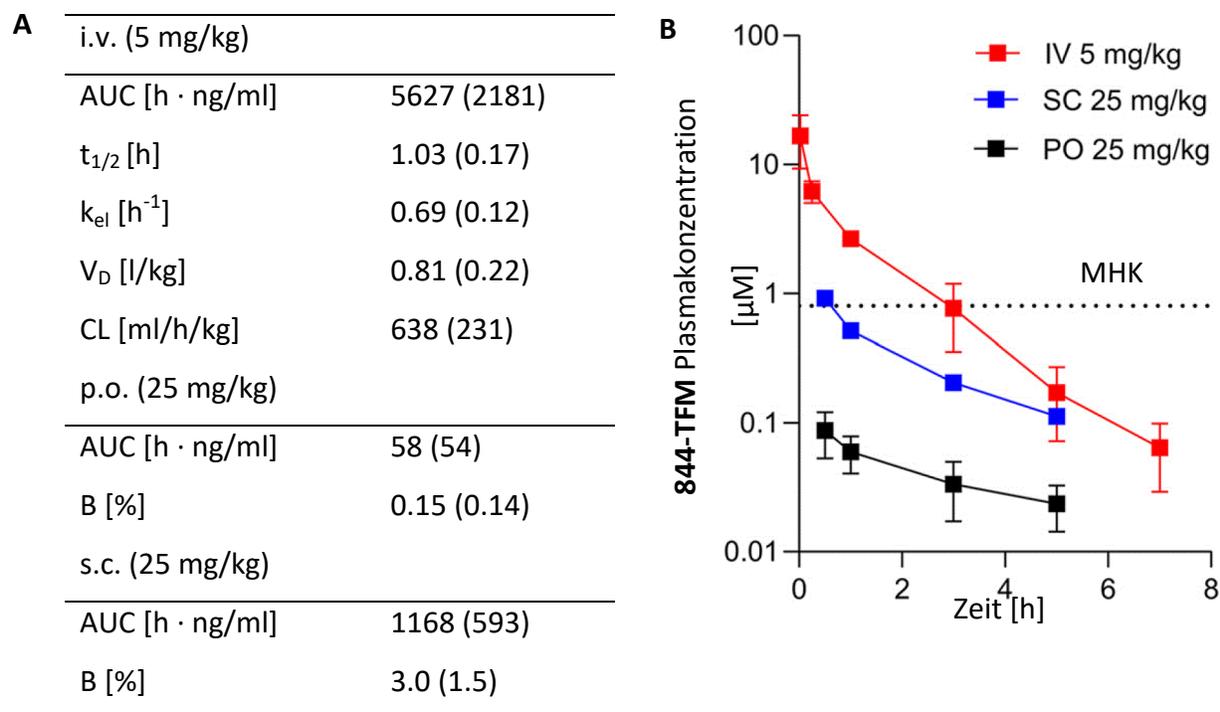


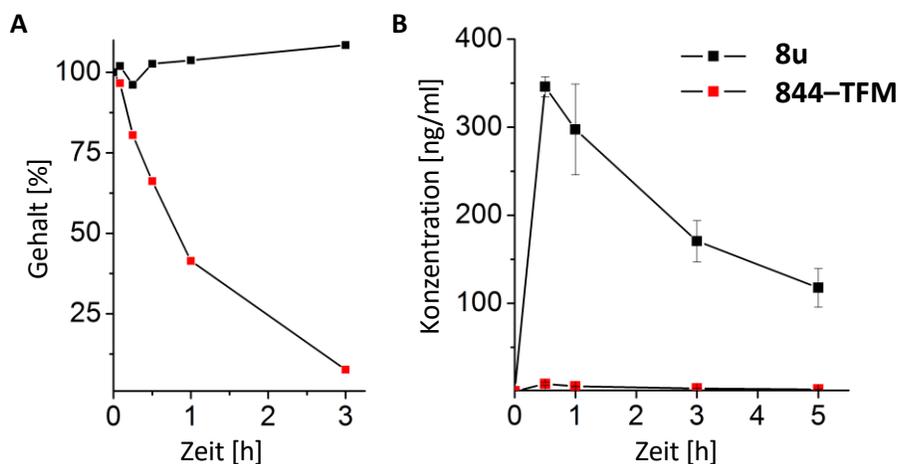
Abbildung 47 A *In vivo* PK Parameter von 844-TFM. B Konzentrations-Zeit-Profil nach einmaliger Gabe von 844-TFM in CD-1 Mäusen i.v. intravenös, AUC Area under the curve,  $t_{1/2}$  Eliminationshalbwertszeit,  $k_{el}$  Eliminationskonstante,  $V_D$  Verteilungsvolumen, CL Clearance, p.o. *per os*, s.c. *subcutan*, B Bioverfügbarkeit (Mittelwerte, Standardabweichungen in Klammern, n = 3)

### 2.5.3 VERBESSERUNG DER PLASMASTABILITÄT UND DER ORALEN BIOVERFÜGBARKEIT

Wegen der ungünstigen Pharmakokinetik von **844-TFM** als Vertreter der P4C, wurden Derivate der Substanz mit höherer metabolischer Stabilität entwickelt. Diese sollen der beobachteten Hydrolyse im murinen Plasma widerstehen und gleichzeitig eine potente Wirkung gegen NTM aufweisen. Das Ziel war es, über längere Zeit die Plasmakonzentration zu steigern und so die Bioverfügbarkeit bei oraler Applikation zu verbessern.

Die Substanz **8o** ist das Sulfonamid-Derivat von **844-TFM** und wurde vor dem Hintergrund hergestellt, dass Sulfonsäureamide bioisoster zu Carbonsäureamiden sind.<sup>125</sup> Außerdem weisen sie eine höhere Stabilität gegenüber hydrolytischen Bedingungen auf.<sup>126</sup> Trotz dieser vielversprechenden Eigenschaften wurde die Substanz nicht hinsichtlich ihrer pharmakokinetischen Eigenschaften untersucht, denn bei der initialen MHK-Bestimmung wurde festgestellt, dass diese Modifikation zum Wirkverlust gegen NTM führte (MHK > 100  $\mu$ M, siehe oben).

Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung der PK wurde mit der Verbindung **8u** verfolgt. **8u** trägt in  $\alpha$ -Stellung zur Carbonylgruppe der Amidbindung einen Methylrest.



**Abbildung 48** Stabilität von **844-TFM** und **8u**. **A** *In vitro* Gehaltsbestimmung mit murinem Plasma. (n = 1) **B** Konzentration-Zeit-Profil im Plasma von CD-1 Mäusen nach einmaliger oraler Gabe von 25 mg/kg. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. (n = 2)

Durch diese Veränderung sollte das labile Amid sterisch abgeschirmt und die Hydrolyse im Plasma verringert werden. Die Bestimmung der MHK von **8u** ergab eine leichte Senkung der Aktivität (*Mabs* Bamboo MHK = 3  $\mu$ M) im Vergleich zu **844-TFM**.

Bei der anschließenden Testung der *in vitro* Plasmastabilität konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von **8u** über die Dauer des Experiments nicht unter 80 % der Startkonzentration fiel, während jene von **844-TFM**, wie erwartet, rasch abnahm. Die Ergebnisse zeigen, dass die *in vitro* Plasmastabilität durch die  $\alpha$ -Alkylierung von **844-TFM** verbessert werden konnte. Um zu untersuchen, ob die festgestellte *in vitro* Stabilitätserhöhung zu einer Verbesserung der Biover-

ffügbarkeit der Substanz *in vivo* führt, wurde die Plasmakonzentration von **8u** nach oraler Gabe im Mausmodel bestimmt. Anhand der Abbildung 48 **B** lässt sich erkennen, dass die AUC von **8u** nach oraler Gabe deutlich größer ist, als jene von **844-TFM**. Daraus lässt sich schließen, dass die  $\alpha$ -Alkylierung ebenfalls zu verbesserter *in vivo* PK beiträgt.<sup>101</sup>

### 3 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

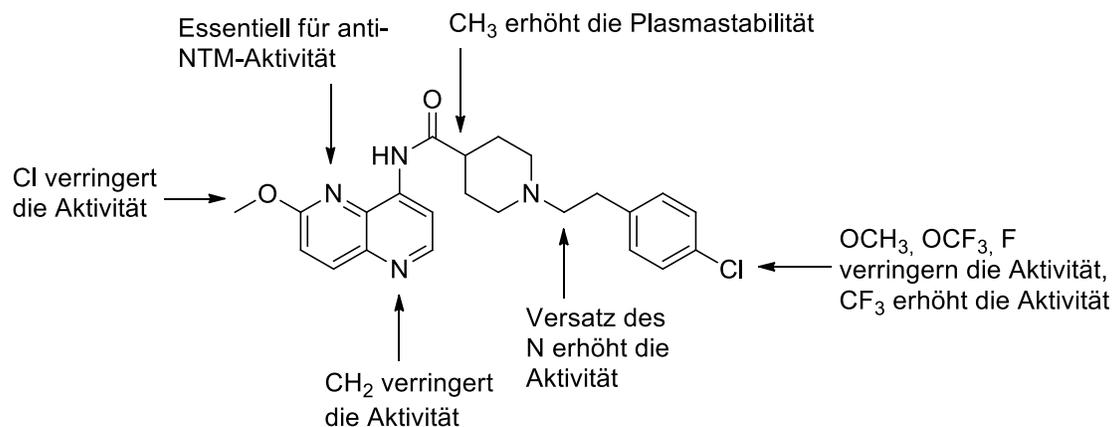
---

Die Gruppe der nicht-tuberkulösen Mykobakterien umfasst den Großteil der bekannten Arten aus der Gattung Mykobakterien. Ihre Vertreter verursachen in prädisponierten Patienten schwer zu therapierende Infektionen der Lunge und Weichteilgewebe. Besonders die Spezies der MAB-Gruppe beherbergen ausgeprägte Resistenzmechanismen, wodurch nur wenige Arzneistoffe gegen die Bakterien wirksam sind. Die zur Verfügung stehenden Therapieregime weisen ungenügende Heilungsraten auf. Außerdem entstehen durch die lange Therapiedauer von mehr als zwölf Monaten erhebliche Probleme durch das Auftreten von unerwünschten Arzneimittelnebenwirkungen der verabreichten Medikamente. Zusätzlich ist die Rate von refraktären Infektionen unter therapierten NTM-Patienten hoch.<sup>127</sup> Darum ist die Entwicklung neuartiger Substanzen mit antimykobakteriellem Effekt höchst erstrebenswert.

Diese Arbeit leistet einen Beitrag zur Identifizierung und Charakterisierung neuartiger Wirkstoffe mit Aktivität gegen ein breites Spektrum von NTMs. Einige der in dieser Arbeit beschriebenen P4C erreichen gegen *Mabs* Hemmkonzentration im submikromolaren Bereich und besitzen einen bakteriziden Effekt. Im Folgenden werden die wichtigsten gewonnenen Erkenntnisse der vorliegenden Schrift zusammengefasst.

Die Hauptleistung dieser Arbeit liegt in der Synthese von 23 neuen Derivaten der Ausgangsverbindung **844**. Die Herstellung gelang durch eine anspruchsvolle Sequenz und konnte entsprechend der Literatur reproduziert werden. Die Ausgangsstruktur wurde bei der Derivatisierung gezielt geändert, um verlässliche Struktur–Wirkungsbeziehungen aufzustellen (Abbildung 49). Durch die Einführung einer Trifluormethylgruppe an Position-4 des Phenylrests in **844–TFM** wurde die Aktivität gegen *Mabs* im Vergleich zu **844** um nahezu das Zehnfache gesteigert. Durch Fortführung dieser Variation konnte das Derivat **8I** erhalten werden, welches die antimykobakterielle Aktivität von **844–TFM** noch übertraf. Die Entwicklung dieser hochpotenten Verbindungen ist ein wesentlicher Erfolg dieser Arbeit. In Zusammenarbeit mit dem CDI des HMH wurde darüber hinaus die mykobakterielle DNA-Gyrase als molekulares Target der Strukturklasse identifiziert. Dies gelang durch die Selektierung und Genomsequenzierung von spontan aufgetretenen resistenten Mutanten von *Mabs* gegen **844** und **844–TFM**. Die Evidenz der Targetbestim-

mung konnte durch mikrobiologische und biochemische Untersuchungen bekräftigt werden. Damit widerlegen die Resultate dieser Arbeit die bislang geltende Annahme, dass **844** einen ABC-Transporter adressiere. Die Ergebnisse wurden in einer wissenschaftlichen Fachzeitschrift publiziert.<sup>50</sup>



**Abbildung 49** Struktur–Wirkungsbeziehungen, welche sich aus den getesteten Derivaten von **844** ergeben.

Weiterhin wurde hierdurch in Betracht gezogen, dass es sich bei den P4C um Vertreter der literaturbekannten Wirkstoffklasse der NBTI und den speziell gegen Mykobakterien entwickelten MGIs handelt. Darauf basierend wurde ein Homologiemodell von *Mabs* GyrA aus den Kristallstrukturen von *S. aureus* GyrA in Komplex mit dem NBTI AM8191 erstellt. Mit diesem Modell wurden *in silico* Docking-studien durchgeführt und der vorhergesagte Bindungsmodus der P4C mit jenem bekannter NBTIs wie Gepotidacin verglichen. Demnach lässt sich die Struktur der hier vorgestellten P4C in die gleichen strukturellen Funktionseinheiten einteilen wie die der bekannten NBTI/MGI (RHS, Linker, LHS). Anhand der Dockingergebnisse wurden außerdem Vorschläge für die Optimierung der antimykobakteriellen Wirkung der P4C generiert. Diese Verbindungen wurden erfolgreich synthetisiert und führten im Fall von **8q** zu einer tatsächlichen *in vitro* Aktivitätsverbesserung gegen ein breites Spektrum von NTM im Verleich zu **844–TFM**. Die erfolgreiche Vorhersage von wirkungsoptimierten Strukturen lieferte weitere Evidenz für den identischen Wirkmechanismus von P4C und NBTI/MGI. Die Ausdehnung der Strukturvielfalt der NBTI/MGI um die P4C ist somit ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit und bietet Ansatzpunkte für die gezielte Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen NTM.

Bei der Untersuchung der pharmakokinetischen Eigenschaften der Strukturklasse wurde festgestellt, dass die aktive Verbindung **844-TFM** *in vitro* rasch metabolisiert wird. Dies zeigte sich auch bei der *in vivo* PK nach intravenöser Applikation. Der schnelle Abbau und die moderate Permeabilität führten darüber hinaus zu einer sehr geringen oralen Bioverfügbarkeit. Darum wurden die potenten Substanzen nicht in einem *in vivo* Effektivitätsassay untersucht. Die Analyse der chemischen Natur der Metabolite deutete darauf hin, dass die aromatische Amidbindung zwischen LHS und Linker im murinen Plasma hydrolysiert wird. Mit dem Ziel, die unzureichende PK der Wirkstoffklasse zu verbessern, wurden die Substanzen **8o** und **8u** synthetisiert. **8o** besitzt anstelle der instabilen Carboxamidbindung in **844-TFM** ein Sulfonamid. Durch den Ersatz dieser bioisosteren Gruppe sollte bei erhöhter Hydrolysestabilität die antibakterielle Wirkung erhalten bleiben. Jedoch führte die Modifikation zum Verlust jeglicher antimykobakterieller Wirkung, worauf keine Bestimmung der Plasmastabilität erfolgte. Ein weiterer Ansatz zur Stabilitätsverbesserung wurde mit **8u** verfolgt. Die in  $\alpha$ -Position der Amidbindung eingeführte Methylgruppe zeigte nur einen geringen Effekt auf die antimykobakterielle Wirksamkeit. Bei der Bestimmung der *in vitro* Plasmastabilität zeigte die Substanz eine deutliche Verbesserung im Vergleich zu **844-TFM**. Ebenfalls zeigte sich eine Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit bei der *in vivo* PK-Analyse. Die Erkenntnis, dass die  $\alpha$ -Methylierung der P4C zu einer Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften führt, stellt ein bedeutsames Ergebnis der vorliegenden Arbeit dar. Die Resultate wurden in einem weiteren wissenschaftlichen Fachartikel publiziert.<sup>101</sup>

Die Weiterführung der Entwicklung von P4C zu präklinischen Kandidaten als Wirkstoffe gegen NTM-Infektionen erscheint aussichtsreich. Für die Verbesserung der vorgestellten Stoffe müssen mehrere Punkte adressiert werden. Zum einen ist die fortlaufende Steigerung der Potenz der plasmastabilen Derivate gegen hoch virulente NTM-Stämme erforderlich. Die unzureichende Plasmastabilität verhindert die Testung der *in vivo*-Effektivität der potenten Verbindungen (**844-TFM**, **8l**, **8q**) und zeigt eine deutliche Schwäche der P4C auf. Die stabilen Derivate **8u** und **8v** besitzen jedoch keine hinreichende Wirksamkeit gegen die für die *in vivo*-Effizienzassay eingesetzten Mabs-Stämme. Verschiedene Strukturvariationen erscheinen für die weitere Wirkungssteigerung erfolgversprechend. Besonders attraktiv erscheint dabei eine Modifikation der RHS. Da potente NBTI/MGI häufig Heteroaromaten als RHS tragen, könnte ein Ersatz des Trifluormethylphenyl-Rests in **8u** durch einen Trifluormethylpyridyl-Rest (**45**) einen positiven Effekt auf das

Wirkprofil ausüben. Außerdem könnte die Reduktion der labilen Amidbindung in **844-TFM** zum sekundären Amin **47** bewirken, dass die anti-NTM-Aktivität unter der nun eliminierten Hydrolyseanfälligkeit bestehen bleibt. Ein weiterer Gedanke für die Fortführung von wirkoptimierten Synthesevariationen ist die in **8u** und **8v** erfolgreiche Methylierung auf die aktive Verbindung **8q** anzuwenden, um die Verbindung **46** zu erhalten. Hier müsste sich zeigen, ob diese Verbindung im gleichen Maß vom Wirkverlust betroffen wäre.

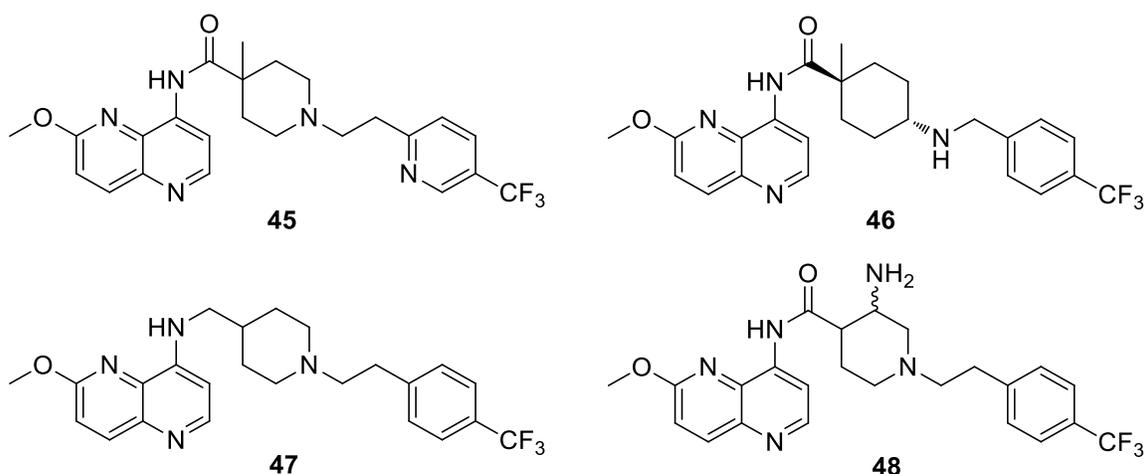


Abbildung 50 Vorschläge für Derivate von 844-TFM.

Vorrausgesetzt die Derivatisierung liefert tatsächlich weitere hochpotente und zugleich plasma-stabile Testverbindungen, müssen zukünftige Arbeiten das Ziel haben, das kardiotoxische Potential durch die Aktivität am hERG-Kanal zu verringern. Dass es gelingen kann, durch zielgerichtete Modulation von Basizität und Polarität der Kandidaten die hERG-Aktivität zu senken und zeitgleich eine starke antibakterielle Wirkung zu erzielen, ist durch zahlreiche Publikationen anderer Autoren belegt.<sup>56,58,59</sup> Ein Beispiel hierfür betrifft den Linker der Moleküle. Die Polarität dieses Strukturteils ließe sich durch die Einführung eines primären Amins erhöhen (**48**) (Abbildung 50). Für Verbindungen mit ähnlichem Aufbau konnte bereits gezeigt werden, dass hiermit ein positiver Effekt auf die hERG-Aktivität erzielt werden kann. Gelängen die beschriebenen Ansätze für die Weiterentwicklung der Substanzklasse der P4C, stehen damit wertvolle Wirkstoffe zur Verfügung, die das Arsenal an präklinischen Testkandidaten gegen NTM-Infektionen erweitern.

## 4 EXPERIMENTELLER TEIL

---

### 4.1 SYNTHESSEN

#### 4.1.1 GERÄTE UND MATERIALIEN

Die Reagenzien und Feinchemikalien wurden kommerziell bezogen (Sigma, ABCR, Enamine, VWR, Acros Organics) oder stammen aus dem Bestand der Chemikalienausgabe des Instituts der Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und wurden ohne weitere Reinigung verwendet. Die Lösungsmittel stammten aus der Chemikalienausgabe des Instituts der Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und wurden vor der Verwendung destilliert und über Molsieb 3 Å (Roth) für mindestens 24 h getrocknet. Der Reaktionsfortschritt wurde bei allen Synthesen mittels Dünnschichtchromatografie (DC) verfolgt. Für die DC wurden ALUGRAM® SIL G/UV254-Platten (Merck und Macherey-Nagel) verwendet. Die Detektion erfolgte mittels UV-Beleuchtung ( $\lambda = 254$  nm bzw.  $\lambda = 365$  nm) oder durch Färbung mit  $\text{KMnO}_4$ -Lösung. Die Reinigung der Produkte erfolgte durch Flash Chromatography an einer PuriFlash 430 (Interchim). Dabei wurden vorgepackte Säulen von unterschiedlicher Größe verwendet (Partikelgröße 30  $\mu\text{m}$ ). Die Reinheiten der Endverbindungen wurden mittels HPLC-UV ( $\lambda = 254$  nm) bestimmt und betragen mindestens 90 %. Die HPLC wurde mit einer XTerra RP18 Chromatographiesäule (3.5  $\mu\text{m}$ , 93.9 mm x 100 mm, Waters, MA, USA) verwendet. Die HPLC-Anlage bestand aus zwei LC-10AD Pumpen, einem SPD-M10A VP PDA Detektor und einem SIL-HT Autosampler (alle von Shimadzu, Kyoto, Japan). Als Eluent kam ein Wasser/Methanol-Gemisch mit 0.05 % TFA benutzt (Gradient 95 % bis 5 % Wasseranteil) zur Anwendung.

Die ESI-Massenspektren wurden mit einem LCQ-Classic-Spektrometer (Thermo Finnigan, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) aufgezeichnet. Die Kapillartemperatur betrug 220 °C, bei einer Spannung von 4.5 kV. Es wurde der Scanbereich von 50–2000  $m/z$  aufgezeichnet (Positiv- und Negativmodus). Die Messung der Proben erfolgte in Lösung (Methanol oder Ethylacetat).

APCI-Spektren wurden mit einem Expression S (Advion, Ithaca, NY, USA) aufgezeichnet. Die Vermessung der Proben erfolgte als Lösung in Methanol oder Ethylacetat am ASAP-Messkopf.

Die ESI-HSMR-Spektren wurden mit einem Q Exactive<sup>TM</sup> Plus Orbitrap Massenspektrometer (Thermo Scientific, Bremen, Deutschland) aufgezeichnet. Die Proben wurden in methanolischer Lösung vermessen.

Die Bestimmung der nicht korrigierten Schmelzpunkte erfolgte an einem Boëtius-Heiztischmikroskop (VEB Kombinat NAGEMA, Dresden, DDR).

Die NMR Spektren wurden bei RT mit einem VNMRS 400 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) und einem INOVA 500 (Varian Medical Systems, Palo Alto, CA, USA) NMR Spektrometer aufgezeichnet. Als Referenz für die Spektren wurden die Lösungsmittelrestsignale verwendet ( $\text{CDCl}_3$ :  $\delta_{\text{H}} = 7,26$  ppm;  $\delta_{\text{C}} = 77,36$  ppm;  $\text{CD}_3\text{OD}$ :  $\delta_{\text{H}} = 3,31$  ppm;  $\delta_{\text{C}} = 47,82$  ppm;  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ :  $\delta_{\text{H}} = 2,50$  ppm). Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, td = Triplett von Dubletten, m = Multiplett.

## 4.1.2 ALLGEMEINE ARBEITSVORSCHRIFTEN

### Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV) A für die Synthesen von Aminomethylenen

Die Reaktionen wurden nach der Literatur durchgeführt.<sup>74</sup> Zu einer gerührten Lösung von Anilin (1 eq) und Meldrumsäure **21** (1.2 eq) in trockenem Ethanol ( $c_{\text{Anilin}} = 1$  M) wurde Triethylorthoformiat **20** (1 eq) hinzugefügt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der ausgefallene Feststoff abfiltriert und der Rückstand mit kaltem Ethanol gewaschen. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung für den nächsten Schritt verwendet.

### Allgemeine Arbeitsvorschrift B für die pyrolytische Cyclisierung

Die Reaktionen wurden nach der Literatur durchgeführt.<sup>128</sup> Das Aminomethylen wurde in 1,3-Dimethyl-2-imidazolidinon ( $c_{\text{Aminomethylen}} = 1$  M) bei 80 °C gelöst. Die heiße Lösung wurde tropfenweise unter Argon-Atmosphäre zu siedendem Dowtherm A<sup>®</sup> ( $c_{\text{Aminomethylen}} = 0.5$  M) gegeben. Nach 15 min wurde die Reaktion auf Raumtemperatur abgekühlt. Der ausgefällte Feststoff wurde abfiltriert und der Rückstand mit mehreren Portionen Diethylether gewaschen. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung für den nächsten Schritt verwendet.

### **Allgemeine Arbeitsvorschrift C für die Synthese der aromatischen Amine**

Die Reaktionen wurden nach der Literatur durchgeführt.<sup>71</sup> Ein gerührtes Gemisch aus Triflat (1 eq) und 1-Propaminhydrochlorid (7 eq) in Pyridin ( $c_{\text{Triflat}} = 0.3 \text{ M}$ ) wurde 16 h lang auf Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde der ausgefallene Feststoff abfiltriert und der Rückstand mit Aceton gewaschen. Der Rückstand wurde in Wasser aufgelöst und mit DCM gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit wässriger NaOH-Lösung (10 M) basisch gestellt und dreimal mit DCM extrahiert. Die kombinierten organischen Extrakte wurden mit Wasser und Salzlösung gewaschen, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung für den nächsten Schritt verwendet.

### **Allgemeine Arbeitsvorschrift D für die Einführung der Cbz-Schutzgruppe**

Die Reaktionen wurden nach der Literatur durchgeführt.<sup>129</sup> Zu einer gerührten Lösung des Amins (1 eq) und  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (1 eq) in Wasser ( $c_{\text{Amin}} = 0.7 \text{ M}$ ) wurde N-(Benzyloxycarbonyloxy)succinimid (1 eq) in Acetonitril ( $c_{\text{Succinimid}} = 0.7 \text{ M}$ ) gegeben. Nach 72 h wurde die Mischung unter vermindertem Druck konzentriert. Der Rückstand wurde mit gesättigter wässriger  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung neutralisiert und die wässrige Phase dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck konzentriert. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung für den nächsten Schritt verwendet.

### **Allgemeine Arbeitsvorschrift E für die Amidkupplung**

Die Reaktionen wurden nach der Literatur durchgeführt.<sup>73</sup> Zu einer gerührten Lösung der Carbonsäure (1.5 eq) und Triethylamin (1.5 eq) in DMF ( $c_{\text{Amin}} = 0.4 \text{ M}$ ) wurde HATU (1.5 eq) zugegeben. Nach 60 Minuten wurde das Amin (1 eq) ergänzt und das Gemisch 16 Stunden lang bei 50 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser (doppeltes Volumen von DMF) gequencht und dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit saturierter wässriger  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung, Wasser und Salzlösung gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck konzentriert. Der Rückstand wurde über Kieselgel mit  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{DCM}$  (2-3 %) gereinigt, um das Produkt zu erhalten.

### **Allgemeine Arbeitsvorschrift F für die katalytische Hydrierung**

Zu einer gerührten Lösung des Amids in  $\text{CH}_3\text{OH}$  ( $c_{\text{Amid}} = 0.2 \text{ M}$ ) wurde Pd/C (10 %) (0.3 eq) zugegeben. Die Suspension wurde 15 Minuten lang mit Argon entgast. Der Reaktionskolben wurde mit einem Ballon versehen, der mit Wasserstoff gefüllt war. Die Apparatur wurde mehrmals mit Wasserstoff gespült und anschließend auf  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  erhitzt. Nach 16 h wurde der Katalysator durch Filtration über Celite<sup>®</sup> (Carl Roth) entfernt und das Filtrat unter vermindertem Druck konzentriert. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung für den nächsten Schritt verwendet.

### **Allgemeine Arbeitsvorschrift G für die Alkylierung der sekundären Amine**

Zu einer gerührten Lösung des sekundärenamins (1 eq) in DMF ( $c_{\text{Amin}} = 44 \text{ } \mu\text{M}$ ) wurde TEA (1 eq) und Phenylethylbromid/mesylat/tosylat (2 eq) hinzugefügt. Nach 16 Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe von Wasser (doppeltes Volumen von DMF) gequenchet. Die wässrige Phase wurde dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung, Wasser und Brine gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck konzentriert. Der Rückstand wurde über Kieselgel mit  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{EtOAc}$  (0-10 %) gereinigt, um das Produkt zu erhalten.

### **Allgemeine Arbeitsvorschrift H für die Entfernung der Boc-Schutzgruppe**

Die Reaktionen wurden nach der Literatur durchgeführt.<sup>72</sup> Zu einer gerührten Lösung des Carbamats (1 eq) in DCM wurden 5 ml TFA in DCM (25 %) zugegeben. Nach 16 h wurde ein Überschuss an wässriger NaOH-Lösung (2 M) zugegeben und die resultierende Mischung 10 min lang kräftig gerührt. Die organische Schicht wurde abgetrennt und die wässrige Phase zweimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Wasser und Brine gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck konzentriert. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung für den nächsten Schritt verwendet.

### **Allgemeine Arbeitsvorschrift I für die Herstellung der Phenyllessigsäuremethylester**

Die Reaktionen wurden nach der Literatur durchgeführt.<sup>96</sup> Zu einer gerührten Lösung der entsprechenden Phenyllessigsäure (1 eq) in  $\text{CH}_3\text{OH}$  ( $c_{\text{Säure}} = 0.3 \text{ M}$ ) wurde tropfenweise  $\text{SOCl}_2$  (2 eq) zugegeben. Nach 16 h wurde die Lösung unter vermindertem Druck konzentriert. Der Rückstand wurde in DCM aufgenommen. Die organische Schicht wurde mit gesättigter wässriger  $\text{NaHCO}_3$ -

Lösung, Wasser und Brine gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck konzentriert. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung für den nächsten Schritt verwendet.

### **Allgemeine Arbeitsvorschrift J für die Herstellung der 2-Phenylethano**

Die Reaktion wurde nach der Literatur durchgeführt.<sup>96</sup> Eine gerührte Suspension aus dem entsprechenden Methylphenylacetat (1 eq) und  $\text{NaBH}_4$  (4 eq) in THF ( $c_{\text{Ester}} = 0.1 \text{ M}$ ) wurde auf Rückfluss erhitzt und 1 ml  $\text{CH}_3\text{OH}$  wurde tropfenweise zugegeben. Nach 6 Stunden wurde die Mischung auf Raumtemperatur abgekühlt und mit Eiswasser gequenchet. Die wässrige Schicht wurde dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Brine gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck konzentriert. Der Rückstand wurde über Kieselgel mit EtOAc/Heptan (10 %) gereinigt.

### **Allgemeine Arbeitsvorschrift K für die Herstellung der Phenylethylmesylate**

Die Reaktionen wurden nach der Literatur durchgeführt.<sup>130</sup> Der Reaktionskolben wurde zunächst unter Argonatmosphäre gesetzt. Eine gerührte Lösung von 2-Phenylethanol (1 eq) und TEA (1.1 eq) in DCM ( $c_{\text{Alkohol}} = 0.3 \text{ M}$ ) wurde bei  $0^\circ\text{C}$  tropfenweise mit Mesylchlorid (3.3 eq) versetzt. Nach Abschluss der Zugabe wurde die Mischung auf Raumtemperatur erwärmt, mit DCM verdünnt und zweimal mit wässriger HCl (10 %) gewaschen. Die organische Schicht wurde über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck konzentriert. Der Rückstand wurde über Kieselgel mit DCM gereinigt.

### **Allgemeine Arbeitsvorschrift L für die Darstellung der primären Amide**

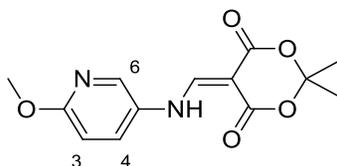
Die Synthese wurde nach der Literatur durchgeführt.<sup>92</sup> Zu einer gerührten Lösung der Carbonsäure (245 mg, 1 mmol) und Pyridin (1.7 eq) in 1,4-Dioxan ( $c_{\text{Säure}} = 0.2 \text{ M}$ ) wurde  $\text{Boc}_2\text{O}$  (1.3 eq) zugefügt. Nach 40 min wurde  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  (3 eq) zugesetzt und 15 h nachgerührt. Anschließend wurde im Vakuum eingengt. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung für den nächsten Schritt verwendet.

### Allgemeine Arbeitsvorschrift M für die Palladium-katalysierte Kreuzkupplung

Die Synthese wurde nach der Literatur durchgeführt.<sup>81</sup> Die Reaktion wurde unter Argonatmosphäre in einem trockenen Reaktionsgefäß durchgeführt. Eine Suspension des primären Amids (1.05 eq), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.5 eq), Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (3 mol %) und +/- BINAP (6 mol %) in trockenem 1,4-Dioxan (*c*<sub>Triflat</sub> = 0.1 M) wurde 10 min in Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde 6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl-trifluormethansulfonat **4a** (1 eq) hinzugefügt und das Gemisch für 18 h bei 85 °C gerührt. Der Ansatz wurde auf Raumtemperatur gekühlt, über Cellite® filtriert und das Filtrat im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde über Kieselgel mit CH<sub>3</sub>OH/EtOAc (0-3 %) gereinigt.

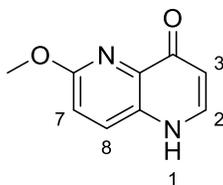
## 4.1.3 SPEZIFISCHE VORSCHRIFTEN UND ANALYTISCHE DATEN

### 5-[[6-Methoxypyridin-3-yl)amino]methyliden]-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (2a)



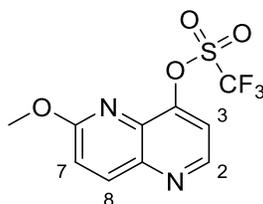
Die Synthese erfolgte entsprechend AAV A unter Verwendung von 5-Amino-2-Methoxypyridin **1a** (5.03 g, 40.3 mmol), Meldrumsäure **21** (6.9 g, 48.3 mmol, 1.2 eq) und Orthoameisensäuretriethylester **20** (6.7 ml, 40.3 mmol, 1 eq). Violett-braune Kristalle; Ausbeute 7.87 g, 28.3 mmol, 70 %; Smp: 152-153 °C (Ethanol); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 11.23 (s, 1H, NH), 8.43 (s, 1H, NH-CH), 8.36 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, *H*-6), 7.94 (dd, *J* = 9.0, 2.9 Hz, 1H, *H*-4), 6.86 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, *H*-3), 3.84 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 1.65 (s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); ESI-MS: *m/z* [M+H]<sup>+</sup> kalk. für C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 279.1, gef. 279.38.

### 6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4(1H)-on (3a)



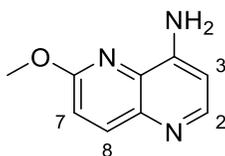
Die Synthese erfolgte entsprechend AAV B unter Verwendung von **2a**. Brauner Feststoff; Ausbeute 3.2 g, 18 mmol, 50 %; Smp. 202-204 °C (Dowtherm A®); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.97 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, *H*-2), 7.94 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, *H*-8), 7.19 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, *H*-7), 6.54 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, *H*-3), 4.08 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>); ESI-MS: *m/z* [M+H]<sup>+</sup> kalk. für C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 176.18, gef. 175.43.

### **6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl trifluormethansulfonat (4a)**



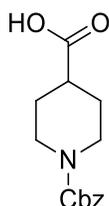
Eine 60 %ige NaH Suspension (380 mg, 9.5 mmol, 1.4 eq) wurde unter Argonatmosphäre mehrfach mit Heptan gewaschen und dekantiert. Anschließend wurde der Feststoff in DMF (20 ml) suspendiert und **3a** (1.2 g, 6.8 mmol) unter Eiskühlung eingetragen. Die Mischung wurde 60 min gerührt, wobei die Suspension teilweise aufklarte. *N*-Phenyl-bis(trifluoromethan-sulfonimid) **27** (2.68 g, 7.5 mmol, 1.1 eq) wurde zugegeben und das Gemisch 16 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser (100 ml) beendet. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 30 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen zuerst mit gesättigter wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung, dann mit Wasser und schließlich mit Brine (jeweils 30 ml) gewaschen. Die Lösung wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedunstet. Die Reinigung erfolgte über Kieselgel mit CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub> (1 %). Gelber Feststoff; Ausbeute 1.83 g, 6 mmol, 87 %; Smp. 74-78 °C (CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.97 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, *H*-2), 7.94 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, *H*-8), 7.19 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, *H*-3), 6.54 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, *H*-7), 4.08 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 163.2, 150.5, 149.5, 144.1, 140.7, 134.2, 118.9, 118.7 (q, *J* = 320.1 Hz), 116.6, 54.6; ESI-MS: *m/z* [M+H]<sup>+</sup> kalk. für C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S 309.23, gef. 309.59.

### **6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-amin (5a)**



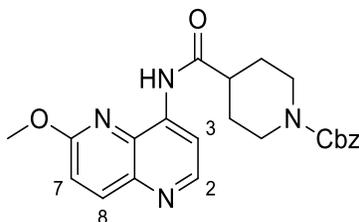
Die Synthese erfolgte entsprechend AAV C unter Verwendung von 6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl trifluormethansulfonat **4a** (3.4 g, 11 mmol). Orange-gelber, amorpher Feststoff; Ausbeute 1.5 g, 7.5 mmol, 70 % (EtOAc); Smp. 159-163 °C;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}_2$ )  $\delta$  8.20 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H,  $H-2$ ), 8.00 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H,  $H-8$ ), 7.10 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H,  $H-7$ ), 6.68 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H,  $H-3$ ), 6.54 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 3.99 (s, 3H, O- $\text{CH}_3$ ); ESI-MS:  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  kalk. für  $\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_2$  176.07, gef. 176.30.

### 1-((Benzyloxy)carbonyl)piperidin-4-carbonsäure (31a)



Die Synthese erfolgte entsprechend AAV D unter Verwendung von Piperidin-4-carbonsäure **9** (4.7 g, 36 mmol). Man erhält ein klares Öl, welches bei Zugabe eines Impfkristalls zu einem weißen Feststoff erstarrt. Weißer Feststoff; Ausbeute 9 g, 34.2 mmol, 95 %; Smp. 74-78 °C (EtOAc);  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}_2$ )  $\delta$  12.23 (s, 1H, COOH), 7.42–7.22 (m, 5H, Ar- $H$ ), 5.05 (s, 2H, Ar- $\text{CH}_2$ ), 3.88 (dt,  $J = 13.4, 3.5$  Hz, 2H, N-( $\text{CHH}_{\text{eq}}$ ) $_2$ ), 2.90 (s, 2H, N-( $\text{CHH}_{\text{ax}}$ ) $_2$ ), 2.42 (tt,  $J = 11.0, 3.8$  Hz, 1H, CH), 1.85–1.72 (m, 2H, CH-( $\text{CHH}_{\text{eq}}$ ) $_2$ ), 1.40 (dtd,  $J = 13.3, 11.3, 4.2$  Hz, 2H, CH-( $\text{CHH}_{\text{ax}}$ ) $_2$ ); ESI-MS:  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  kalk. für  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{NO}_4$  262.12, gef. 262.33.

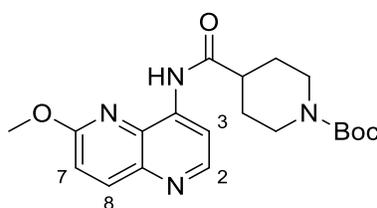
### Benzyl 4-((6-methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)carbamoyl)-piperidin-1-carboxylat (6a)



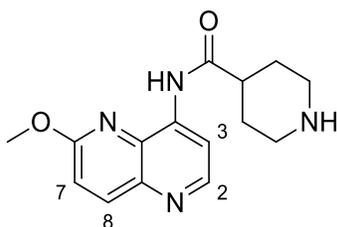
Die Synthese erfolgte entsprechend AAV E unter Verwendung von 1-((Benzyloxy)carbonyl)-piperidin-4-carbonsäure **31a** (1.15 g, 4.3 mmol, 1.5 eq) und 6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-amin **5a** (0.5 g, 2.8 mmol). Weißer, amorpher Feststoff; Ausbeute 1.17 g, 2.78 mmol, 97 %;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}_2$ )  $\delta$  9.77 (s, 1H, NH), 8.65 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H,  $H-2$ ), 8.37 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H,  $H-8$ ),

8.23 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H,  $H-7$ ), 7.39–7.29 (m, 5H, Ar- $H_5$ ), 7.27 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H,  $H-3$ ), 5.08 (s, 2H,  $CH_2-O-CO$ ), 4.11 (s, 3H, O- $CH_3$ ), 4.07 (d,  $J = 13.4$  Hz, 2H, N-( $CHH_{eq}$ ) $_2$ ), 2.95 (tt,  $J = 11.4, 3.8$  Hz, 3H, CH, N-( $CHH_{ax}$ ) $_2$ ), 1.98–1.92 (m, 2H, CH-( $CHH_{eq}$ ) $_2$ ), 1.58 (qd,  $J = 12.4, 4.3$  Hz, 2H, CH-( $CHH_{ax}$ ) $_2$ );  $^{13}C$  NMR (126 MHz,  $(CD_3)_2SO_2$ )  $\delta = 174.3, 161.4, 154.9, 149.3, 141.2, 141.1, 139.9, 137.4, 132.1, 128.9, 128.8, 128.3, 128.97, 127.96, 127.9, 117.1, 111.5, 66.7, 54.5, 43.4, 42.9, 28.5$ ; ESI-MS:  $m/z$   $[M+H]^+$  kalk. für  $C_{23}H_{25}N_4O_4$  421.18, gef. 421.47  $[M+H]^+$ .

**tert-Butyl-4-((6-methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)carbamoyl)-piperidin-1-carboxylat (6aBoc)**



Die Synthese wurde entsprechend der Literatur durchgeführt.<sup>81</sup> Ein trockener Reaktionskolben wurde unter Argonatmosphäre gesetzt. Zu einer Mischung von *tert*-Butyl-4-carbamoylpiperidin-1-carboxylat (720 mg, 3.15 mmol, 1.05 eq), +/-BINAP (58 mg, 93  $\mu$ mol, 3 mol%),  $Pd_2(dba)_3$  (114 mg, 0.12 mmol, 3.9 mol%) und  $Cs_2CO_3$  (3.94 g, 11.17 mmol, 3.62 eq) wurde 1,4-Dioxan zugegeben. Die entstandene Suspension wurde 10 min im Ultraschallbad behandelt. 6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl-trifluormethansulfonat **4a** (948 mg, 3.08 mmol) wurde zugegeben und das Gemisch 18 h bei 85 °C gerührt. Der Ansatz wurde über Celite<sup>®</sup> filtriert und der Rückstand mit DCM gewaschen. Das Filtrat wurde über Kieselgel mit  $CH_3OH/EtOAc$  (0-3 %) gereinigt. Gelber, amorpher Feststoff; Ausbeute 634 mg, 1.63 mmol, 54 %;  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  8.61 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H,  $H-2$ ), 8.50 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H,  $H-3$ ), 8.19 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H,  $H-8$ ), 7.26 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H,  $H-7$ ), 4.17 (s, 3H, O- $CH_3$ ), 4.21–4.11 (m, 2H, N-( $CHH_{eq}$ ) $_2$ ), 2.99–2.83 (m, 3H, N-( $CHH_{ax}$ ) $_2$ , CH), 2.06–1.99 (m, 2H, CH-( $CHH_{eq}$ ) $_2$ ), 1.78–1.66 (m, 2H, CH-( $CHH_{ax}$ ) $_2$ ), 1.47 (s, 9H, C( $CH_3$ ) $_3$ ); ESI-MS:  $m/z$   $[M+H]^+$  kalk. für  $C_{20}H_{27}N_4O_4$  387.20, gef. 387.15.

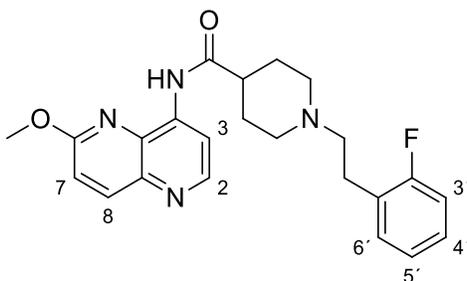
**N-(6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)piperidin-4-carboxamid (7a)**

Von Benzyl-4-((6-methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)carbamoyl)-piperidin-1-carboxylat **6a**:

Die Synthese erfolgte entsprechend AAV F unter Verwendung von Benzyl 4-((6-methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)carbamoyl)-piperidin-1-carboxylat **6a** (1.75 g, 4.1 mmol). CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH (30 ml) wurde als Lösungsmittel verwendet. Weißer, amorpher Feststoff; 0.93 g, 3.24 mmol, 80 %.

Von *tert*-butyl-4-((6-methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)carbamoyl)-piperidin-1-carboxylat **6aBoc**:

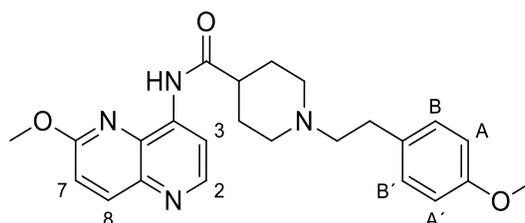
Die Synthese erfolgte entsprechend AAV H unter Verwendung von *tert*-Butyl-4-((6-methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)carbamoyl)-piperidin-1-carboxylat **6aBoc** (113 mg, 0.3 mmol). Beiger, amorpher Feststoff; Ausbeute 104 mg, 2.7 mmol, 90 %; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.61 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, *H*-2), 8.50 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, *H*-3), 8.19 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, *H*-8), 7.27 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, *H*-7), 4.16 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3.15 (dt, *J* = 12.9, 3.4 Hz, 2H, NH-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 2.88–2.77 (m, 1H, CH), 2.73 (td, *J* = 12.4, 2.7 Hz, 2H, NH-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>), 2.03 (dd, *J* = 13.6, 3.5 Hz, 2H, CH-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 1.78 (dtd, *J* = 13.2, 11.8, 4.1 Hz, 2H, CH-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>); ESI-MS: *m/z* [M+H]<sup>+</sup> kalk. für C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> 287.34, gef. 287.59; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 174.5, 161.8, 148.2, 140.3, 140.2, 139.2, 131.9, 117.1, 110.8, 53.3, 44.4, 43.3, 28.1.

**1-(2-fluorphenethyl)-N-(6-methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)piperidin-4-carboxamid (8a)**

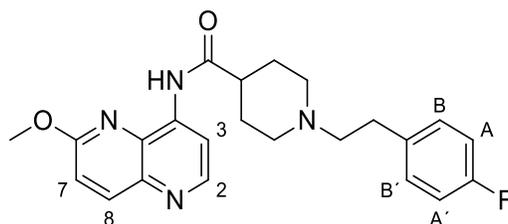
Die Synthese erfolgte entsprechend AAV G unter Verwendung von *N*-(6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)piperidin-4-carboxamid **7a** (32 mg, 0.11 mmol) und 2-(2-Fluorphenyl)-

ethylbromid **10c** (32  $\mu$ l, 0.22 mmol, 2 eq). Beiger Feststoff; 32 mg, 0.11 mmol 67 %; HPLC 97 %; Smp. 125-129 °C;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.58 (s, 1H, NH), 8.70 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H, H-2), 8.52 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H, H-3), 8.22 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H, H-8), 7.24–7.13 (m, 3H, H-7, H-4', H-5'), 7.06 (td,  $J = 7.5, 1.2$  Hz, 1H, H-6'), 7.01 (ddd,  $J = 9.8, 8.2, 1.3$  Hz, 1H, H-3'), 4.11 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3.13 (dt,  $J = 11.5, 3.7$  Hz, 2H, N-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 2.88 (dd,  $J = 9.9, 6.2$  Hz, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.66 (dd,  $J = 9.9, 6.2$  Hz, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.49 (tt,  $J = 11.4, 4.0$  Hz, 1H, CH), 2.28–2.20 (m, 2H, N-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>), 2.18–2.10 (m, 2H, CH-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 1.98 (qd,  $J = 11.6, 3.8$  Hz, 2H, CH-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  173.6, 161.4, 161.2 (d,  $^1J = 244.7$  Hz), 149.3, 140.8 (d,  $^2J = 10.4$  Hz), 139.5, 131.9, 130.9 (d,  $^3J = 5.0$  Hz), 127.9 (d,  $^3J = 8.1$  Hz), 124.00 (d,  $^4J = 3.5$  Hz), 116.7, 115.2 (d,  $^2J = 22.2$  Hz), 110.9, 58.8, 53.7, 52.9, 44.5, 28.8, 26.7; ESI-HRMS:  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> kalk. für C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> 409.2039, gef. 409.2034.

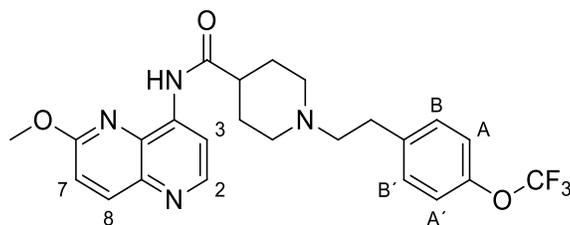
**N-(6-methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)-1-(4-methoxyphenethyl)piperidin-4-carboxamid**  
**(8b)**



Die Synthese erfolgte entsprechend AAV G unter Verwendung von N-(6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)piperidin-4-carboxamid **7a** (50 mg, 0.18 mmol) und 2-(4-Methoxyphenyl)-ethylbromid **10d** (59  $\mu$ l, 0.35 mmol, 2 eq). Beiger Feststoff; 9 mg, 21  $\mu$ mol, 12 %; HPLC 99 %; Smp. 165-167 °C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9.58 (s, 1H, NH), 8.70 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H, H-2), 8.53 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H, H-3), 8.22 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H, H-8), 7.16 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H, H-7), 7.13 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H<sub>A</sub>, H<sub>A'</sub>), 6.84 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H<sub>B</sub>, H<sub>B'</sub>), 4.11 (s, 3H, Naphthyridin-O-CH<sub>3</sub>), 3.79 (s, 3H, Ar-O-CH<sub>3</sub>), 3.12 (d,  $J = 11.9$  Hz, 2H, N-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 2.78 (dd,  $J = 9.9, 6.3$  Hz, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.65–2.56 (m, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.48 (tt,  $J = 11.4, 3.9$  Hz, 1H, CH), 2.24–2.09 (m, 4H, N-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>, CH-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 2.04–1.91 (m, 2H, CH-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.7, 161.4, 158.0, 149.3, 140.9, 140.8, 139.5, 132.2, 131.9, 129.6, 116.7, 113.8, 110.9, 76.7, 60.8, 55.2, 53.7, 53.0, 32.7, 28.8; ESI-HRMS:  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> kalk. für C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> 421.2239, gef. 421.2239.

**1-(4-fluorphenethyl)-N-(6-methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)piperidin-4-carboxamid (8c)**

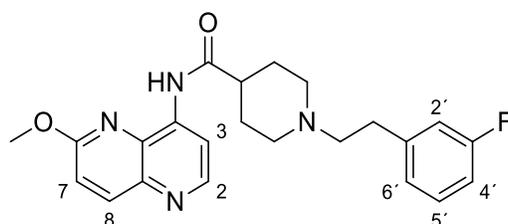
Die Synthese erfolgte entsprechend AAV G unter Verwendung von *N*-(6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)piperidin-4-carboxamid **7a** (53 mg, 0.16 mmol) und 2-(4-Fluorphenyl)ethylbromid **10e** (46  $\mu$ l, 0.33 mmol, 2 eq). Gelber Feststoff; Ausbeute 21 mg, 51  $\mu$ mol, 32 %; HPLC 99 %; Smp. 168-169 °C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.57 (s, 1H, NH), 8.70 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H, *H*-2), 8.52 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H, *H*-3), 8.21 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H, *H*-8), 7.20–7.12 (m, 3H, *H*-7,  $H_B$ ,  $H_{B'}$ ), 7.02–6.91 (m, 2H,  $H_A$ ,  $H_{A'}$ ), 4.10 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3.10 (dt,  $J = 11.3$ , 2.7 Hz, 2H, N-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 2.80 (dd,  $J = 9.7$ , 6.3 Hz, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.60 (dd,  $J = 9.5$ , 6.5 Hz, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.48 (tt,  $J = 11.4$ , 3.9 Hz, 1H, CH), 2.24–2.08 (m, 4H, N-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>, CH-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 1.96 (qd,  $J = 12.6$ , 12.1, 3.6 Hz, 2H, CH-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  174.1, 161.9, 161.7 (d,  $^1J = 243.0$  Hz), 148.3, 140.4 (d,  $^4J = 8.1$  Hz), 139.2, 132.0, 130.0 (d,  $^3J = 8.0$  Hz), 117.1, 114.8 (d,  $^2J = 21.5$  Hz), 110.9, 59.4, 53.3, 52.1, 31.0, 27.4; ESI-HRMS:  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> kalk. für C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>2</sub> 409.2039, gef. 409.2036.

**N-(6-methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)-1-(4-(trifluormethoxy)phenethyl)piperidin-4-carboxamid (8h)**

Die Synthese erfolgte entsprechend AAV G unter Verwendung von *N*-(6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)piperidin-4-carboxamid **7a** (52 mg, 0.18 mmol) und 2-(4-Trifluormethoxy)ethylmesylat **10h** (100 mg, 0.36 mmol, 2 eq). Gelber, amorpher Feststoff, Ausbeute 34 mg, 70  $\mu$ mol, 41 %; HPLC 99 %;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9.57 (s, 1H, NH), 8.70 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H, *H*-2), 8.52 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H, *H*-3), 8.21 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H, *H*-8), 7.23 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H,  $H_A$ ,  $H_{A'}$ ), 7.16

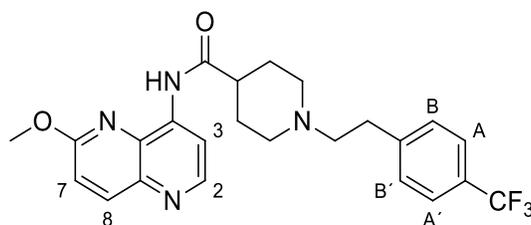
(d,  $J = 9.1$  Hz, 1H,  $H-7$ ), 7.13 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H,  $H_B, H_B'$ ), 4.10 (s, 3H, O- $CH_3$ ), 3.11 (dt,  $J = 11.9, 3.6$  Hz, 2H, N-( $CHH_{eq}$ )<sub>2</sub>), 2.84 (dd,  $J = 9.5, 6.6$  Hz, 2H, Ar- $CH_2-CH_2$ ), 2.64 (dd,  $J = 9.5, 6.6$  Hz, 2H, Ar- $CH_2-CH_2$ ), 2.48 (ddt,  $J = 11.4, 8.1, 4.0$  Hz, 1H, N-( $CHH_{ax}$ )<sub>2</sub>), 2.21 (t,  $J = 11.6$  Hz, 2H, CH), 2.17–2.09 (m, 2H, CH-( $CHH_{eq}$ )<sub>2</sub>), 1.97 (qd,  $J = 12.7, 12.2, 3.7$  Hz, 2H, CH-( $CHH_{ax}$ )<sub>2</sub>);  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  173.3, 161.4, 160.8, 149.26, 147.8, 140.9, 140.8, 139.3, 131.8, 129.9, 121.0, 120.5 (q,  $^1J = 256.7$  Hz), 116.8, 110.9, 59.9, 53.8, 52.5, 45.1, 44.5, 38.9, 32.3, 29.1, 28.1, 27.9; ESI-HRMS:  $m/z$   $[M+H]^+$  kalk. für  $C_{24}H_{26}F_3N_4O_3$  475.1957, gef. 475.1951.

**1-(3-Fluorphenethyl)-N-(6-methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)piperidin-4-carboxamid (8f)**



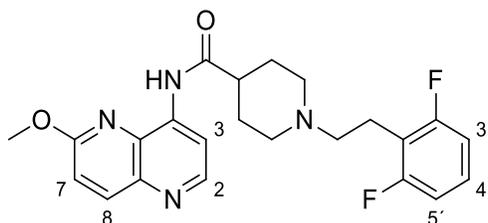
Die Synthese erfolgte entsprechend AAV G unter Verwendung von *N*-(6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)piperidin-4-carboxamid **7a** (39 mg, 0.14 mmol) und 2-(3-Fluorphenyl)ethylmesylat **10f** (0.1 g, 0.46 mmol, 3.4 eq). Weißer Feststoff; Ausbeute 44 mg, 0.107 mmol, 80 %; HPLC 99 %; Smp. 127–130 °C;  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  8.62 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H,  $H-2$ ), 8.51 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H,  $H-3$ ), 8.20 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H,  $H-8$ ), 7.32–7.25 (m, 2H,  $H-7, H-5'$ ), 7.05 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H,  $H-6'$ ), 7.01–6.96 (m, 1H,  $H-2'$ ), 6.91 (td,  $J = 8.6, 2.6$  Hz, 1H,  $H-4'$ ), 4.17 (s, 3H, O- $CH_3$ ), 3.14 (d,  $J = 11.8$  Hz, 2H, N-( $CHH_{eq}$ )<sub>2</sub>), 2.87 (t,  $J = 8.1$  Hz, 2H, Ar- $CH_2-CH_2$ ), 2.75–2.63 (m, 3H, Ar- $CH_2-CH_2, CH$ ), 2.28 (t,  $J = 11.7$  Hz, 2H, N-( $CHH_{ax}$ )<sub>2</sub>), 2.10 (d,  $J = 12.7$  Hz, 2H, CH-( $CHH_{eq}$ )<sub>2</sub>), 1.94 (qd,  $J = 13.1, 12.6, 3.5$  Hz, 2H, CH-( $CHH_{ax}$ )<sub>2</sub>);  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  173.6, 164.1, 161.6, 161.4, 149.3, 140.9, 140.8, 139.4, 131.8, 129.8 (d,  $J = 8.3$  Hz), 124.3 (d,  $J = 2.7$  Hz), 116.7, 115.5 (d,  $J = 21.1$  Hz), 113.0 (d,  $J = 21.0$  Hz), 110.9, 60.0, 53.7, 52.9, 44.3, 33.2, 28.7; ESI-HRMS:  $m/z$   $[M+H]^+$  kalk. für  $C_{23}H_{26}FN_4O_2$  409.2039, gef. 409.2033.

**N-(6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)-1-(4-(trifluormethyl)phenethyl)piperidin-4-carboxamid (844-TFM)**



Die Synthese erfolgte entsprechend AAV G unter Verwendung von *N*-(6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)piperidin-4-carboxamid **7a** (50 mg, 0.17 mmol) und 2-(4-Trifluormethylphenyl)ethylbromid **10b** (58  $\mu$ l, 0.34 mmol, 2 eq). Weißer Feststoff; Ausbeute 40 mg, 90  $\mu$ mol, 51 %; HPLC 96 %; Smp. 160-162  $^{\circ}$ C;  $^1$ H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  8.62 (d,  $J$  = 5.2 Hz, 1H,  $H$ -2), 8.51 (d,  $J$  = 5.2 Hz, 1H,  $H$ -3), 8.20 (d,  $J$  = 9.1 Hz, 1H,  $H$ -8), 7.58 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H,  $H_A, H_{A'}$ ), 7.43 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H,  $H_B, H_{B'}$ ), 7.27 (d,  $J$  = 9.1 Hz, 1H,  $H$ -7), 4.17 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3.14 (d,  $J$  = 11.3 Hz, 2H, N-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 2.93 (dd,  $J$  = 9.9, 6.3 Hz, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.76–2.64 (m, 3H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, CH), 2.27 (td,  $J$  = 11.6, 2.1 Hz, 2H, N-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>), 2.10 (d,  $J$  = 12.6 Hz, 2H, CH-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 1.94 (qd,  $J$  = 12.1, 3.7 Hz, 2H, CH-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>);  $^{13}$ C NMR (126 MHz, Methanol-d<sub>4</sub>)  $\delta$  174.7, 161.9, 148.3, 144.7, 140.4, 140.3, 139.2, 132.0, 129.0, 128.2 (q,  $^2J$  = 32.1 Hz), 125.5 (q,  $^1J$  = 270.1 Hz), 124.9 (q,  $^3J$  = 3.9 Hz), 117.1, 110.8, 59.6, 53.3, 52.4, 43.5, 32.4, 28.1; ESI-HRMS:  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> kalk. für C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> 459.2007, gef. 459.1995.

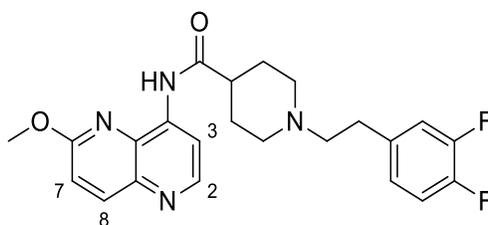
**1-(2,6-Difluorphenethyl)-N-(6-methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)piperidin-4-carboxamid (8d)**



Die Synthese erfolgte entsprechend AAV G unter Verwendung von *N*-(6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)piperidin-4-carboxamid **7a** (54.4 mg, 0.19 mmol) und 2-(2,6-Difluorphenyl)ethylbromid **10d** (55  $\mu$ l, 0.24 mmol, 1.2 eq). Weißer Feststoff; Ausbeute 19 mg, 45  $\mu$ mol, 23 %;

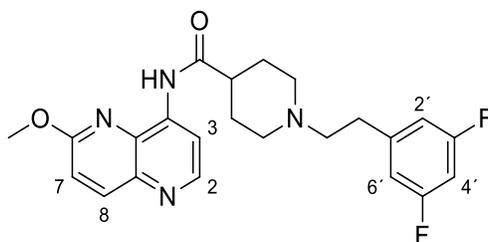
HPLC 99 %; Smp. 150-153 °C;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  8.59 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H,  $H-2$ ), 8.47 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H,  $H-3$ ), 8.15 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H,  $H-8$ ), 7.29–7.19 (m, 2H,  $H-7, H-4'$ ), 6.97–6.87 (m, 2H,  $H-3', H-5'$ ), 4.14 (s, 3H, O- $\text{CH}_3$ ), 3.12 (dt,  $J = 11.9, 3.4$  Hz, 2H, N-( $\text{CHH}_{\text{eq}2}$ )), 2.95–2.88 (m, 2H, Ar- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ), 2.67 (tt,  $J = 11.6, 4.0$  Hz, 1H, CH), 2.63–2.55 (m, 2H, Ar- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ), 2.25 (td,  $J = 11.8, 2.5$  Hz, 2H, N-( $\text{CHH}_{\text{ax}2}$ )), 2.07 (d,  $J = 12.4$  Hz, 2H, CH-( $\text{CHH}_{\text{eq}2}$ )), 1.91 (dtd,  $J = 13.1, 11.7, 3.7$  Hz, 2H, CH-( $\text{CHH}_{\text{ax}2}$ ));  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  174.8, 161.8, 161.5 (dd,  $J = 245.4, 8.7$  Hz), 148.3, 140.2, 139.2, 132.0, 128.0 (t,  $J = 10.4$  Hz), 117.1, 115.1 (t,  $J = 20.4$  Hz), 110.7 (t,  $J = 13.0$  Hz), 110.7 (d,  $J = 14.2$  Hz), 110.6, 57.3, 53.3, 52.4, 43.6, 28.2, 23.8, 19.3 (t,  $J = 2.2$  Hz); ESI-HRMS:  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  kalk. für  $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_2$  427.1945, gef. 427.1939.

**1-(3,4-Difluorphenethyl)-N-(6-methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)piperidin-4-carboxamid (8e)**



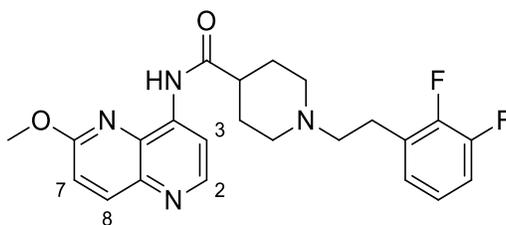
Die Synthese erfolgte entsprechend AAV G unter Verwendung von *N*-(6-methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)piperidin-4-carboxamid **7a** (54 mg, 0.19 mmol) und 2-(3,4-Difluorphenyl)ethylbromid **10e** (55  $\mu\text{l}$ , 0.24 mmol, 1.2 eq). Weißer Feststoff; Ausbeute 40 mg, 95  $\mu\text{mol}$ , 50 %; HPLC 99 %; Smp. 135-137 °C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  8.61 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H,  $H-2$ ), 8.50 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H,  $H-3$ ), 8.18 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H,  $H-8$ ), 7.26 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H,  $H-7$ ), 7.21–7.09 (m, 2H, Ar- $H_2$ ), 7.02 (ddt,  $J = 8.1, 3.9, 1.6$  Hz, 1H, Ar- $H$ ), 4.16 (s, 3H, O- $\text{CH}_3$ ), 3.12 (dt,  $J = 12.1, 3.5$  Hz, 2H, N-( $\text{CHH}_{\text{eq}2}$ )), 2.87–2.78 (m, 2H, Ar- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ), 2.78–2.59 (m, 3H, Ar- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ , CH), 2.25 (td,  $J = 11.8, 2.6$  Hz, 2H, N-( $\text{CHH}_{\text{eq}2}$ )), 2.13–2.04 (m, 2H, CH-( $\text{CHH}_{\text{eq}2}$ )), 2.03–1.85 (m, 2H, CH-( $\text{CHH}_{\text{ax}2}$ ));  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  174.7, 161.8, 148.3, 140.4, 140.3, 139.2, 137.5, 132.0, 124.64 (d,  $J = 6.1$  Hz), 124.61 (d,  $J = 6.2$  Hz), 117.1, 117.0 (d,  $J = 17.1$  Hz), 116.7 (d,  $J = 17.1$  Hz), 110.8, 59.7, 53.3, 52.4, 43.6, 31.7 (d,  $J = 1.3$  Hz), 28.2, 23.8; ESI-HRMS:  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  kalk. für  $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_2$  427.1945, gef. 427.1942.

**1-(3,5-Difluorphenethyl)-N-(6-methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)piperidin-4-carboxamid**  
**(8k)**



Die Synthese erfolgte entsprechend AAV G unter Verwendung von *N*-(6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)piperidin-4-carboxamid **7a** (55.6 mg, 0.19 mmol) und 2-(3,5-Difluorphenyl)-ethylmethansulfonat **10k** (64 mg, 0.24 mmol, 1.2 eq). Weißer Feststoff; Ausbeute 21 mg, 49  $\mu$ mol, 26 %; HPLC 99 %; Smp. 139-140 °C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  8.61 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H, *H*-2), 8.50 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H, *H*-3), 8.19 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H, *H*-8), 7.26 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H, *H*-7), 7.11–7.01 (m, 2H, *H*-2', *H*-6'), 7.01–6.89 (m, 1H, *H*-4'), 4.16 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3.13 (dt,  $J = 12.2, 3.5$  Hz, 2H, N-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 2.88 (dd,  $J = 9.8, 6.2$  Hz, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.76–2.60 (m, 3H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, CH), 2.26 (td,  $J = 11.8, 2.6$  Hz, 2H, N-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>), 2.13–2.05 (m, 2H, CH-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 1.99–1.84 (m, 2H, CH-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  174.7, 161.8, 158.7 (dd,  $J = 240.6, 2.2$  Hz), 157.1 (dd,  $J = 239.3, 2.5$  Hz), 148.3, 146.1, 140.4, 140.3, 139.2, 132.0, 128.8, 128.7, 128.6, 128.6, 117.1, 116.8 (dd,  $J = 24.2, 5.2$  Hz), 115.9 (dd,  $J = 25.7, 8.9$  Hz), 113.8 (dd,  $J = 24.4, 8.7$  Hz), 110.8, 110.0, 58.1, 53.3, 52.4, 43.6, 28.2, 25.8; ESI-HRMS:  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> kalk. für C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>F<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> 427.1945, gef. 427.1936.

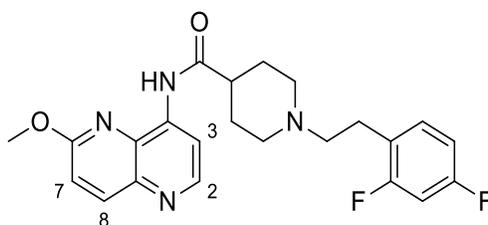
**1-(2,3-Difluorphenethyl)-N-(6-methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)piperidin-4-carboxamid**  
**(8i)**



Die Synthese erfolgte entsprechend AAV G unter Verwendung von *N*-(6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)piperidin-4-carboxamid **7a** (58 mg, 0.20 mmol) und 2-(2,3-Difluorphenyl)-

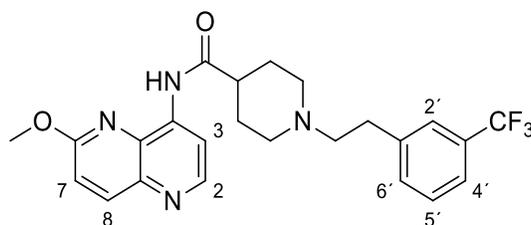
ethylmethansulfonat **10i** (56 mg, 0.24 mmol, 1.2 eq). Weißer, amorpher Feststoff; Ausbeute 26 mg, 61  $\mu\text{mol}$ , 30 %; HPLC 99 %; Smp. 129-133  $^{\circ}\text{C}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  8.58 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H,  $H-2$ ), 8.46 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H,  $H-3$ ), 8.14 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H,  $H-8$ ), 7.22 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H,  $H-7$ ), 7.14–7.00 (m, 3H,  $\text{Ar-}H_3$ ), 4.13 (s, 3H,  $\text{O-CH}_3$ ), 3.13 (dt,  $J = 12.0, 3.6$  Hz, 2H,  $\text{N-}(\text{CHH}_{\text{eq}})_2$ ), 2.96–2.86 (m, 2H,  $\text{Ar-CH}_2\text{-CH}_2$ ), 2.74–2.60 (m, 3H,  $\text{Ar-CH}_2\text{-CH}_2$ ,  $\text{CH}$ ), 2.27 (td,  $J = 11.8, 2.6$  Hz, 2H,  $\text{N-}(\text{CHH}_{\text{ax}})_2$ ), 2.13–2.02 (m, 2H,  $\text{CH-}(\text{CHH}_{\text{eq}})_2$ ), 1.98–1.85 (m, 2H,  $\text{CH-}(\text{CHH}_{\text{ax}})_2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  174.7, 161.8, 148.3, 140.3 (d,  $J = 12.8$  Hz), 139.2, 132.0, 129.2 (d,  $J = 13.3$  Hz), 125.6, 124.0, 117.1, 114.8 (d,  $J = 17.4$  Hz), 110.8, 58.2, 53.3, 52.4, 43.5, 28.1, 25.6, 23.8; ESI-HRMS:  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  kalk. für  $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_2$  427.1945, gef. 409.2037.

**1-(2,4-Difluorphenethyl)-N-(6-methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)piperidin-4-carboxamid (8j)**



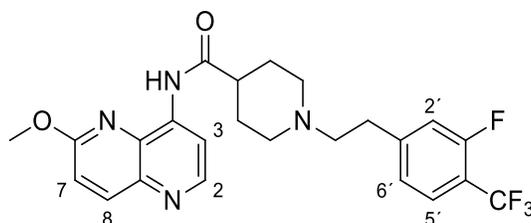
Die Synthese erfolgte entsprechend AAV G unter Verwendung von *N*-(6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)piperidin-4-carboxamid **7a** (57 mg, 0.20 mmol) und 2-(2,4-Difluorphenyl)ethylmethansulfonat **10j** (60 mg, 0.24 mmol, 1.2 eq). Weißer Feststoff; Ausbeute 26 mg, 61  $\mu\text{mol}$ , 30 %; HPLC 99 %; Smp. 158-159  $^{\circ}\text{C}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  8.60 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H,  $H-2$ ), 8.49 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H,  $H-3$ ), 8.17 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H,  $H-8$ ), 7.35–7.21 (m, 2H,  $H-7$ ,  $\text{Ar-}H$ ), 6.94–6.83 (m, 2H,  $\text{Ar-}H_2$ ), 4.15 (s, 3H,  $\text{O-CH}_3$ ), 3.14 (dt,  $J = 12.0, 3.4$  Hz, 2H,  $\text{N-}(\text{CHH}_{\text{eq}})_2$ ), 2.86 (dd,  $J = 10.0, 6.2$  Hz, 2H,  $\text{Ar-CH}_2\text{-CH}_2$ ), 2.76–2.58 (m, 3H,  $\text{Ar-CH}_2\text{-CH}_2$ ,  $\text{CH}$ ), 2.28 (td,  $J = 11.8, 2.6$  Hz, 2H,  $\text{N-}(\text{CHH}_{\text{ax}})_2$ ), 2.14–2.03 (m, 2H,  $\text{CH-}(\text{CHH}_{\text{eq}})_2$ ), 2.03–1.85 (m, 2H,  $\text{CH-}(\text{CHH}_{\text{ax}})_2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  174.7, 162.5 (dd,  $J = 58.8, 11.8$  Hz), 161.8, 160.1 (dd,  $J = 71.5, 12.1$  Hz), 148.3, 140.4, 140.3, 139.2, 132.0, 131.6 (dd,  $J = 9.5, 6.5$  Hz), 122.6 (dd,  $J = 16.2, 3.8$  Hz), 117.1, 110.8, 110.7 (dd,  $J = 21.2, 3.7$  Hz), 103.0 (dd,  $J = 26.5, 25.8$  Hz), 63.3, 58.4, 53.3, 52.4, 43.5, 29.3, 28.1, 25.3 (d,  $J = 1.7$  Hz), 25.3, 23.8, 22.2; ESI-HRMS:  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  kalk. für  $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_2$  427.1945, gef. 427.1937.

**1-(3-(Trifluormethyl)phenethyl)-N-(6-methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)piperidin-4-carboxamid (8g)**



Die Synthese erfolgte entsprechend AAV G unter Verwendung von *N*-(6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)piperidin-4-carboxamid **7a** (57 mg, 0.20 mmol) und 2-(3-(Trifluormethyl)phenyl)ethylmethansulfonat **10g** (68 mg, 0.25 mmol, 1.2 eq). Beiger Feststoff; Ausbeute 22 mg, 48  $\mu$ mol, 24 %; HPLC 96 %; Smp. 145 °C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.62 (d,  $J$  = 5.2 Hz, 1H,  $H$ -2), 8.51 (d,  $J$  = 5.2 Hz, 1H,  $H$ -3), 8.19 (d,  $J$  = 9.1 Hz, 1H,  $H$ -8), 7.57–7.43 (m, 4H,  $\text{Ar-H}_4$ ), 7.27 (d,  $J$  = 9.1 Hz, 1H,  $H$ -7), 4.16 (s, 3H,  $\text{O-CH}_3$ ), 3.14 (dt,  $J$  = 12.0, 3.4 Hz, 2H,  $\text{N-(CHH}_{\text{eq}})_2$ ), 2.93 (dd,  $J$  = 9.6, 6.5 Hz, 2H,  $\text{Ar-CH}_2\text{-CH}_2$ ), 2.76–2.62 (m, 3H,  $\text{Ar-CH}_2\text{-CH}_2$ ,  $\text{CH}$ ), 2.26 (td,  $J$  = 11.7, 2.3 Hz, 2H,  $\text{N-(CHH}_{\text{ax}})_2$ ), 2.09 (d,  $J$  = 12.9 Hz, 2H,  $\text{CH-(CHH}_{\text{eq}})_2$ ), 1.94 (td,  $J$  = 12.0, 3.1 Hz, 2H,  $\text{CH-(CHH}_{\text{ax}})_2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  161.4, 144.6, 139.4, 136.0, 132.8, 132.8, 129.0, 128.6, 128.3, 125.2, 124.6, 124.4, 121.4, 117.3, 117.3, 113.2, 60.0, 53.3, 53.2, 44.6, 33.5, 29.0; ESI-MS:  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  kalk. für  $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_2$  459.2007, gef. 459.2003.

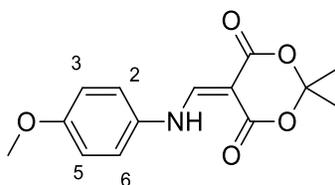
**1-(3-Fluor-4-(trifluormethyl)phenethyl)-N-(6-methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)piperidin-4-carboxamid (8l)**



Die Synthese erfolgte entsprechend AAV G unter Verwendung von *N*-(6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)piperidin-4-carboxamid **7a** (50 mg, 0.18 mmol) und 2-(3-Fluor-4-(trifluormethyl)phenyl)ethyl-4-methylbenzensulfonat **10l** (76 mg, 0.21 mmol, 1.2 eq). Beiger Feststoff; Ausbeute 17 mg, 38  $\mu$ mol, 17 %; HPLC 93 %; Smp. 146–149 °C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.56

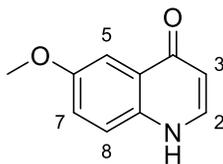
(s, 1H, NH), 8.70 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H,  $H-2$ ), 8.52 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H,  $H-3$ ), 8.21 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H,  $H-8$ ), 7.50 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H,  $H-5'$ ), 7.16 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H,  $H-7$ ), 7.11–7.03 (m, 2H,  $H-2'$ ,  $H-6'$ ), 4.10 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3.07 (dt,  $J = 11.1, 2.9$  Hz, 2H, N-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 2.86 (dd,  $J = 9.0, 6.4$  Hz, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.68–2.60 (m, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.47 (tt,  $J = 11.4, 3.9$  Hz, 1H, CH), 2.19 (td,  $J = 11.5, 2.2$  Hz, 2H, N-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>), 2.15–2.07 (m, 2H, CH-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 1.95 (qd,  $J = 11.7, 3.7$  Hz, 2H, CH-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.47, 161.38, 160.80, 160.71 (dq,  $J = 257.9, 2.4$  Hz), 147.55, 147.48 (dd,  $J = 4.9, 2.1$  Hz), 140.85, 140.77, 139.43, 131.82, 126.98 (qd,  $J = 4.4, 1.9$  Hz), 124.32 (d,  $J = 3.3$  Hz), 123.07 (qd,  $J = 271.6, 1.1$  Hz), 121.62, 117.01, 116.85, 116.70, 116.15 (dd,  $J = 32.9, 11.9$  Hz), 110.85, 59.32, 53.68, 52.90, 44.32, 33.17, 28.70; ESI-HRMS:  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> kalk. für C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>F<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> 477.1913, gef. 477.1916.

### **5-(((4-Methoxyphenyl)amino)methylen)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (2b)**



Die Synthese erfolgte entsprechend AAV A unter Verwendung von 4-Methoxyanilin **1b** (8.9 g, 72.2 mmol). Weiße Kristalle; Ausbeute 12.8 g, 46.2 mmol, 64 %; Smp. 159-161 °C (Ethanol); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>) δ 11.21 (s, 1H, NH), 8.44 (s, 1H, NH-C), 7.53–7.44 (m, 2H,  $H-2$ ,  $H-6$ ), 7.01–6.92 (m, 2H,  $H-3$ ,  $H-5$ ), 3.75 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 1.65 (s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); ESI-MS:  $m/z$  [M+Na]<sup>+</sup> kalk. für C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>5</sub>Na 300.08, gef. 300.10.

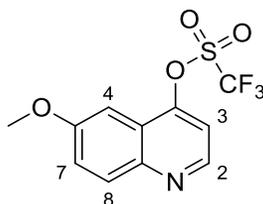
### **6-Methoxychinolin-4(1H)-on (3b)**



Die Synthese erfolgte entsprechend AAV B unter Verwendung von 5-(((4-methoxyphenyl)amino)methylene)-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-dion **2b** (4 g, 14.4 mmol). Brauner Feststoff; Ausbeute 730 mg, 4.2 mmol, 38 %; Smp. 239-246 °C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.89 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1H,  $H-2$ ), 7.63 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H,  $H-5$ ), 7.51 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H,  $H-8$ ), 7.32 (dd,  $J = 9.1, 2.9$

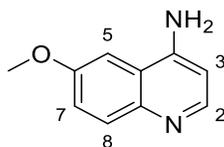
Hz, 1H, *H*-7), 6.31 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, *H*-3), 3.88 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>); ESI-MS: *m/z* [M+H]<sup>+</sup> kalk. für C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>2</sub>, gef. 176.33.

### **6-Methoxychinolin-4-yl-trifluormethansulfonat (4b)**

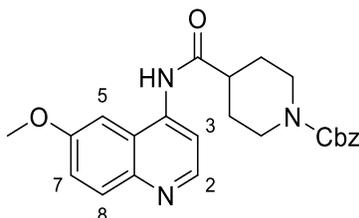


Die Reaktionen wurden entsprechend der Literatur durchgeführt.<sup>74</sup> Zu einem gerührten Gemisch von 6-Methoxychinolin-4(1*H*)-on **3b** (5 g, 28.5 mmol), 2,6-Lutidin (4.98 ml, 43 mmol, 1.5 eq) und 4-Dimethylaminopyridin (23 mg, 2.9 mmol, 0.1 eq) in DCM (100 ml) wurde bei 0 °C gekühlt Trifluormethansulfonsäureanhydrid (5.3 ml, 26.2 mmol, 0.9 eq) hinzugegeben. Nach 2.5 h wurde die Reaktion mit gesättigter wässriger NH<sub>4</sub>Cl-Lösung im Überschuss versetzt und noch 2.5 h bei 0 °C nachgerührt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedunstet. Die Reinigung erfolgte über Kieselgel mit DCM. Gelber, amorpher Feststoff; Ausbeute 6.14 g, 19.9 mmol, 70 %; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.79 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, *H*-2), 8.07 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, *H*-8), 7.46 (dd, *J* = 9.3, 2.8 Hz, 1H, *H*-7), 7.37 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, *H*-3), 7.24 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, *H*-4), 3.95 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ = 163.2, 150.5, 149.5, 144.1, 140.7, 134.2, 122.5, 119.9, 118.9, 117.4, 116.6, 114.8, 79.6, 54.6.

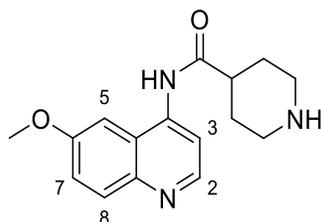
### **6-Methoxychinolin-4-amin (5b)**



Die Synthese erfolgte entsprechend AAV C unter Verwendung von 6-Methoxychinolin-4-yl-trifluormethanesulfonat **4b** (2.2 g, 7.2 mmol). Gelber, amorpher Feststoff; Ausbeute 0.98 g, 5.6 mmol, 78 %; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.79 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, *H*-2), 8.07 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, *H*-8), 7.46 (dd, *J* = 9.3, 2.8 Hz, 1H, *H*-7), 7.37 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, *H*-3), 7.24 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, *H*-5), 3.95 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); ESI-MS: *m/z* [M+H]<sup>+</sup> kalk. für C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O 175.09, gef. 175.2.

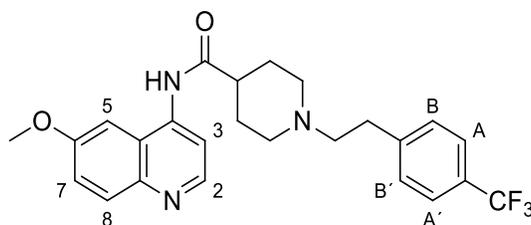
**Benzyl-4-((6-methoxychinolin-4-yl)carbamoyl)piperidin-1-carboxylat (6b)**

Die Synthese erfolgte entsprechend AAV D unter Verwendung von 6-Methoxychinolin-4-amin **5b** und 1-((Benzyloxy)carbonyl)piperidin-4-carbonsäure **31a** (1.77 g, 6.72 mmol, 1.2 eq). Brauner, amorpher Feststoff; Ausbeute 2.22 g, 5.3 mmol, 94 %;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}_2$ )  $\delta$  10.05 (s, 1H, NH), 8.61 (d,  $J = 5.0$  Hz, 1H, H-2), 7.96 (d,  $J = 5.0$  Hz, 1H, H-3), 7.90 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H, H-8), 7.58 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H, H-5), 7.41 (dd,  $J = 9.2, 2.7$  Hz, 1H, H-7), 7.38–7.28 (m, 5H, Ar-H), 5.09 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CO}$ ), 4.10 (d,  $J = 13.4$  Hz, 2H, N-(CHHeq) $_2$ ), 3.93 (s, 3H, O-CH $_3$ ), 2.92 (tt,  $J = 11.2, 3.6$  Hz, 3H, CH, N-(CHHax) $_2$ ), 1.95–1.87 (m, 2H, CH-(CHHeq) $_2$ ), 1.58 (qd,  $J = 12.4, 4.3$  Hz, 2H, CH-(CHHax) $_2$ ); ESI-MS:  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  kalk. für  $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_4$  420.19, gef. 420.19.

**N-(6-Methoxyquinolin-4-yl)piperidin-4-carboxamid (7b)**

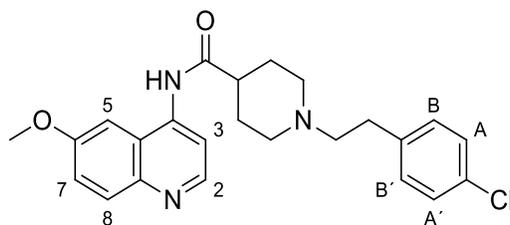
Die Synthese erfolgte entsprechend AAV F unter Verwendung von Benzyl-4-((6-methoxychinolin-4-yl)carbamoyl)piperidin-1-carboxylat **6b** (1.5 g, 3.57 mmol) und EtOAc als Lösungsmittel. Braunes Öl; Ausbeute 343 mg, 1.2 mmol, 34 %;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.59 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H, H-2), 8.06 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H, H-3), 7.91 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H, H-8), 7.58 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H, H-5), 7.43 (dd,  $J = 9.2, 2.6$  Hz, 1H, H-7), 4.01 (s, 3H, O-CH $_3$ ), 3.56–3.48 (m, 2H, NH-(CHHeq) $_2$ ), 3.21–3.11 (m, 3H, NH-(CHHax) $_2$ , CH), 2.27–2.19 (m, 2H, CH-(CHHeq) $_2$ ), 2.12–2.01 (m, 2H, CH-(CHHax) $_2$ ); ESI-MS:  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  kalk. für  $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2$  286.16, gef. 286.12.

**N-(6-Methoxychinolin-4-yl)-1-(4-(trifluormethyl)phenethyl)piperidin-4-carboxamid (8r)**



Die Synthese erfolgte entsprechend AAV G unter Verwendung von *N*-(6-Methoxychinolin-4-yl)piperidin-4-carboxamid **7b** (50 mg, 0.17 mmol) und 1-(2-Bromomethyl)-4-(trifluormethyl)benzen **10b** (58  $\mu$ l, 0.34 mmol, 2eq). Beiger Feststoff; Ausbeute 27 mg, 59  $\mu$ mol, 35 %; HPLC 99 %; Smp. 200-205  $^{\circ}$ C;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.58 (d,  $J$  = 5.1 Hz, 1H,  $H$ -2), 8.03 (d,  $J$  = 5.1 Hz, 1H,  $H$ -3), 7.91 (d,  $J$  = 9.2 Hz, 1H,  $H$ -8), 7.58 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H,  $H_A$ ,  $H_{A'}$ ), 7.50 (d,  $J$  = 2.7 Hz, 1H,  $H$ -5), 7.46–7.40 (m, 3H,  $H_B$ ,  $H_{B'}$ ,  $H$ -7), 3.98 (s, 3H, O- $\text{CH}_3$ ), 3.17 (dt,  $J$  = 12.0, 3.4 Hz, 2H, N-( $\text{CHH}_{\text{eq}}$ ) $_2$ ), 2.97–2.90 (m, 2H, Ar- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ), 2.80–2.72 (m, 1H, CH), 2.72–2.67 (m, 2H, Ar- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ), 2.27 (td,  $J$  = 11.8, 3.0 Hz, 2H, N-( $\text{CHH}_{\text{ax}}$ ) $_2$ ), 2.05–1.91 (m, 4H, CH-( $\text{CHH}_{\text{eq}}$ ) $_2$ , CH-( $\text{CHH}_{\text{ax}}$ ) $_2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  175.6, 158.2, 147.2, 144.6, 144.6, 144.2, 141.2, 129.7, 129.0, 129.0, 128.1 (q,  $J$  = 32.3 Hz), 124.9 (q,  $J$  = 3.8 Hz), 124.4 (q,  $J$  = 270.9 Hz), 122.6, 122.1, 113.4, 99.9, 59.6, 54.9, 52.5, 47.2, 42.9, 32.3, 28.2; ESI-HRMS:  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  kalk. für  $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2$  458.2055, gef. 458.2040.

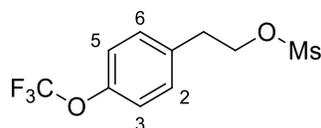
**1-(4-Chlorphenethyl)-N-(6-methoxychinolin-4-yl)piperidin-4-carboxamid (8t)**



Die Synthese erfolgte entsprechend AAV G unter Verwendung von *N*-(6-Methoxychinolin-4-yl)piperidin-4-carboxamid **7b** (50 mg, 0.17 mmol) und 1-(2-Bromomethyl)-4-chlorbenzen **10a** (50  $\mu$ l, 0.34 mmol, 2 eq). Die Reinigung erfolgte über Kieselgel mit  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{DCM}$  (5-10 %) +0.5 % TEA. Weißer Feststoff; Ausbeute 27 mg, 59  $\mu$ mol, 35 %; HPLC 99 %; Smp. 220-222  $^{\circ}$ C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.59 (d,  $J$  = 5.1 Hz, 1H,  $H$ -2), 8.03 (d,  $J$  = 5.2 Hz, 1H,  $H$ -3), 7.91 (d,  $J$  = 9.2 Hz, 1H,

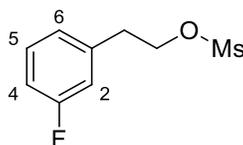
*H*-8), 7.50 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H, *H*-5), 7.43 (dd,  $J = 9.2, 2.7$  Hz, 1H, *H*-7), 7.27 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H,  $H_A, H_A'$ ), 7.22 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H,  $H_B, H_B'$ ), 3.99 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3.18–3.11 (m, 2H, N-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 2.87–2.80 (m, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.79–2.69 (m, 1H, CH), 2.66–2.59 (m, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.23 (td,  $J = 11.4, 3.2$  Hz, 2H, N-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>), 2.06–1.88 (m, 4H, CH-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>, CH-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  175.7, 158.2, 147.2, 144.2, 141.2, 138.7, 131.5, 129.9, 129.7, 128.1, 122.6, 122.1, 113.4, 99.9, 63.3, 60.0, 54.9, 52.6, 43.0, 32.0, 28.3, 23.8; ESI-HRMS:  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> kalk. für C<sub>24</sub>H<sub>27</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub> 424.1791, gef. 424.1793.

### 2-(4-(Trifluormethoxy)phenyl)ethylmethansulfonat (10h)

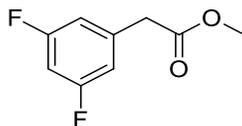


Die Synthese erfolgte entsprechend AAV K unter Verwendung von 2-(4-(Trifluormethoxy)phenyl)ethanol **43g** (0.35 ml, 2.1 mmol). Gelbes Öl; Ausbeute 0.6 g, 2.11 mmol, 99 %; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.28–7.24 (m, 2H,  $H_3, H_5$ ), 7.19–7.15 (m, 2H,  $H_2, H_5$ ), 4.40 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H, Ms-O-CH<sub>2</sub>), 3.06 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>), 2.89 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  148.3 (q,  $J = 1.9$  Hz), 135.2, 130.3, 121.20 (q,  $J = 1.2$  Hz), 120.43 (q,  $J = 257.0$  Hz), 69.7, 37.3, 37.3, 34.9, 29.7; <sup>19</sup>F NMR (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  -58.0.

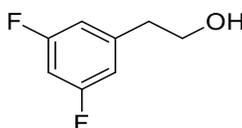
### 3-Fluorphenethylmethansulfonat (10f)



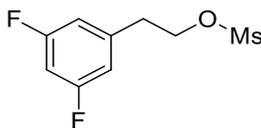
Die Synthese erfolgte entsprechend AAV K unter Verwendung von 2-(3-Fluorphenyl)ethanol **43e** (0.35 ml, 2.14 mmol). Gelbes Öl; Ausbeute 0.46 g, 2.11 mmol, 99 %; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.32–7.22 (m, 1H,  $H_2$ ), 7.04–6.88 (m, 3H,  $H_4, H_5, H_6$ ), 4.39 (t,  $J = 6.8$  Hz, 1H, Ms-O-CH<sub>2</sub>), 3.03 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>), 2.87 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  164.1, 161.6, 138.9 (d,  $J = 7.3$  Hz), 130.21 (d,  $J = 8.3$  Hz), 124.66 (d,  $J = 2.8$  Hz), 115.88 (d,  $J = 21.3$  Hz), 113.97 (d,  $J = 20.9$  Hz), 69.7, 37.3, 35.26 (d,  $J = 1.8$  Hz); <sup>19</sup>F NMR (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  -112.95 (td,  $J = 9.2, 6.0$  Hz).

**Methyl-2-(3,5-difluorphenyl)acetat (42c)**

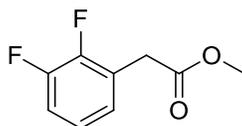
Die Synthese erfolgte entsprechend AAV I unter Verwendung von 3,5-Difluorphenylessigsäure **41c** (0.5 g, 2.9 mmol). Farbloses Öl; Ausbeute 0.49 g, 2.63 mmol, 90 %;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.05–6.90 (m, 3H, Ar-*H*), 5.29 (s, DCM), 3.72 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.65 (s, 2H, Ar- $\text{CH}_2$ ).

**2-(3,5-Difluorphenyl)ethanol (43c)**

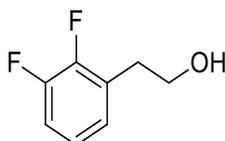
Die Synthese erfolgte entsprechend AAV J unter Verwendung von Methyl-2-(3,5-difluorphenyl)acetat **42c** (0.41 g, 2.2 mmol). Weißer, amorpher Feststoff; 0.29 g, 1.83 mmol, 83 %;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.02–6.84 (m, 3H, Ar-*H*), 4.12 (q,  $J = 7.1$  Hz, EtOAc), 3.87 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H, OH- $\text{CH}_2$ ), 2.89 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H, Ar- $\text{CH}_2$ ), 2.04 (s, EtOAc), 1.30–1.21 (t,  $J = 7.1$  Hz, EtOAc).

**3,5-Difluorphenethylmethansulfonat (10k)**

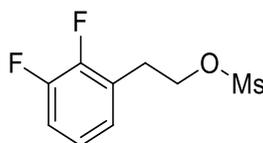
Die Synthese erfolgte entsprechend AAV K unter Verwendung von 2-(3,5-Difluorphenyl)ethanol **43c** (290 mg, 1.83 mmol). Gelbes Öl; Ausbeute 200 mg 0.85 mmol, 46 %;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.06–6.89 (m, 3H, Ar-*H*), 4.42 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H, Ms-O- $\text{CH}_2$ ), 3.08 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H, Ar- $\text{CH}_2$ ), 2.94 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  159.03 (dd,  $J = 138.8, 2.5$  Hz), 156.63 (dd,  $J = 137.6, 2.5$  Hz), 124.96 (dd,  $J = 18.3, 7.9$  Hz), 117.68 (dd,  $J = 24.0, 4.8$  Hz), 116.46 (dd,  $J = 24.9, 8.7$  Hz), 115.28 (dd,  $J = 23.9, 8.6$  Hz), 68.14 (d,  $J = 1.8$  Hz), 37.39, 29.33–29.26 (m);  $^{19}\text{F NMR}$  (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -118.76 (dtd,  $J = 17.8, 8.1, 4.6$  Hz), -124.27– -124.38 (m).

**Methyl-2-(2,3-difluorphenyl)acetat (42a)**

Die Synthese erfolgte entsprechend AAV I unter Verwendung von (2,3-Difluorphenyl)-essigsäure **41a** (0.50 g, 2.9 mmol). Farbloses Öl; Ausbeute 0.43 g, 2.35 mmol, 81 %;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.12–6.96 (m, 3H, Ar-H), 3.70 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.68 (d,  $J = 1.5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ).

**2-(2,3-Difluorphenyl)ethanol (43a)**

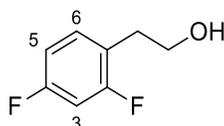
Die Synthese erfolgte entsprechend AAV I unter Verwendung von Methyl-2-(2,3-difluorphenyl)acetat **42a** (0.43 g, 2.34 mmol). Weißer Feststoff; Ausbeute 0.35 g, 2.23 mmol, 95 %;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.09–6.95 (m, 3H, Ar-H), 3.88 (q,  $J = 6.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{-OH}$ ), 2.95 (td,  $J = 6.6, 1.5$  Hz, 2H, Ar- $\text{CH}_2$ ), 1.41 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H, OH).

**2,3-Difluorphenethyl-methansulfonat (10i)**

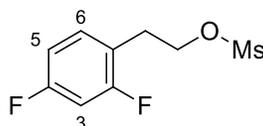
Die Synthese erfolgte entsprechend AAV J unter Verwendung von 2-(2,3-Difluorphenyl)ethanol **43a** (0.28 g, 1.79 mmol). Gelbes Öl; Ausbeute 0.3g, 1.25 mmol, 70 %;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.14–6.96 (m, 3H, Ar-H), 4.44 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H, Ms-O- $\text{CH}_2$ ), 3.14 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H, Ar- $\text{CH}_2$ ), 2.93 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  151.10 (dd,  $J = 140.3, 12.9$  Hz), 148.64 (dd,  $J = 139.3, 12.9$  Hz), 125.94 (t,  $J = 3.4$  Hz), 125.78 (d,  $J = 12.3$  Hz), 124.21 (dd,  $J = 6.9, 4.7$  Hz), 116.22 (d,  $J = 17.1$  Hz), 68.30 (d,  $J = 1.6$  Hz), 37.35, 28.99 (t,  $J = 2.5$  Hz);  $^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -138.04–-138.15 (m), -143.40 (ddd,  $J = 21.0, 8.5, 5.5$  Hz).

**Methyl-2-(2,4-difluorphenyl)acetat (42b)**

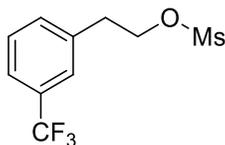
Die Synthese erfolgte entsprechend AAV I unter Verwendung von (2,4-Difluorphenyl)essigsäure **41b** (0.50 g, 2.9 mmol). Farbloses Öl; Ausbeute 0.44 g, 2.38 mmol, 82 %;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.25–7.18 (m, 1H, *H*-6), 6.90–6.77 (m, 2H, *H*-3, *H*-5), 3.71 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.64 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ).

**2-(2,4-Difluorphenyl)ethanol (43b)**

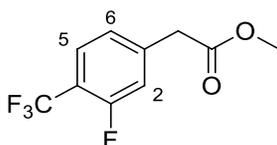
Die Synthese erfolgte entsprechend AAV J unter Verwendung von Methyl-2-(2,4-difluorphenyl)acetat **42b** (0.44 g, 2.38 mmol). Weißer Feststoff; Ausbeute 0.36 g, 2.26 mmol, 95 %;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.21 (m, 1H, *H*-6), 6.87–6.75 (m, 2H, *H*-3, *H*-5), 3.84 (q,  $J = 6.1$  Hz, 2H,  $\text{OH-CH}_2$ ), 2.88 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H,  $\text{Ar-CH}_2$ ), 1.38 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H, *OH*).

**2,4-Difluorphenethylmethansulfonat (10j)**

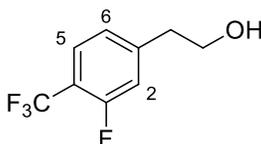
Die Synthese erfolgte entsprechend AAV K unter Verwendung von 2-(2,4-Difluorphenyl)ethanol **43b** (0.28 g, 1.76 mmol). Gelbes Öl; Ausbeute 0.30 g, 1.28 mmol, 73 %;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.25–7.16 (m, 1H, *H*-3), 6.90–6.75 (m, 2H, *H*-5, *H*-6), 4.40 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H,  $\text{Ms-O-CH}_2$ ), 3.07 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H,  $\text{Ar-CH}_2$ ), 2.92 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  162.9 (dd,  $J = 105.2, 12.0$  Hz), 160.4 (dd,  $J = 105.1, 11.8$  Hz), 132.0 (dd,  $J = 9.5, 6.1$  Hz), 119.2 (dd,  $J = 16.0, 3.9$  Hz), 111.4 (dd,  $J = 21.1, 3.8$  Hz), 103.9 (t,  $J = 25.6$  Hz), 68.6 (t,  $J = 1.6$  Hz), 37.3, 28.7 (d,  $J = 2.1$  Hz);  $^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -111.37 (p,  $J = 7.8$  Hz), -114.01 (q,  $J = 8.7, 8.1$  Hz).

**3-(Trifluormethyl)phenethylmethansulfonat (10g)**

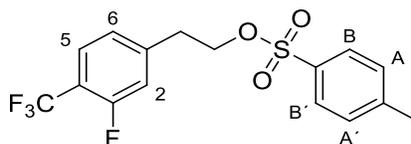
Die Synthese erfolgte entsprechend AAV K unter Verwendung von 2-(3-Trifluormethylphenyl)ethanol **34f** (0.48 g, 2.52 mmol). Gelbes Öl; Ausbeute 134 mg, 0.5 mmol, 20 %;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.57–7.40 (m, 4H, Ar-H), 4.44 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H, Ms-O- $\text{CH}_2$ ), 3.13 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H, Ar- $\text{CH}_2$ ), 2.90 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ );  $^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -62.7.

**Methyl-2-(3-fluor-4-(trifluormethyl)phenyl)acetat (42d)**

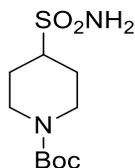
Die Synthese erfolgte entsprechend AAV I unter Verwendung von (3-Fluor-4-trifluormethylphenyl)essigsäure **41d** (0.30 g, 1.35 mmol). Farbloses Öl; Ausbeute 0.29 g, 1.22 mmol, 90 %;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.56 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H, H-5), 7.16 (d,  $J = 9.1$  Hz, 2H, H-2, H-6), 3.73 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.68 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ).

**2-(3-Fluor-4-(trifluormethyl)phenyl)ethanol (43d)**

Die Synthese erfolgte entsprechend AAV J unter Verwendung von Methyl-2-(3-fluor-4-(trifluormethyl)phenyl)acetat **42d** (0.29 g, 1.22 mmol). Weißer Feststoff; Ausbeute 158 mg, 0.76 mmol, 62 %;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.53 (s, 1H, H-5), 7.11 (s, 2H, H-2, H-6), 3.91 (d,  $J = 6.3$  Hz, 2H, OH- $\text{CH}_2$ ), 2.92 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H, Ar- $\text{CH}_2$ ), 1.39 (t,  $J = 5.5$  Hz, 1H, OH).

**3-Fluor-4-(trifluormethyl)phenethyl-4-methylbenzensulfonat (10)**

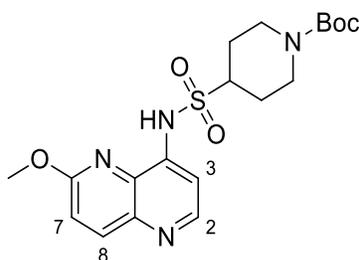
Die Synthese erfolgte wie in der Literatur beschrieben.<sup>97</sup> Die Reaktion wurde in einem trockenen Reaktionskolben unter Argonatmosphäre durchgeführt. Zu einer gerührten Lösung von 4-Methylbenzen-1-sulphonylchlorid (0.16 g, 0.76 mmol), 4-Dimethylaminopyridin (30 mg, 0.26 mmol, 0.2 eq) und TEA (0.4 ml, 2.89 mmol, 2.1 eq) in DCM (5 ml) wurde bei 0 °C 2-(3-Fluor-4-(trifluormethyl)phenyl)ethanol (283 mg, 1.36 mmol) in DCM (5 ml) zugetropft. Die Mischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde anschließend durch die Zugabe überschüssiger ges. wss. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gequenchet. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser und Brine gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde über Kieselgel mit Heptan/EtOAc (2:1) gereinigt. Gelber, amorpher Feststoff; Ausbeute 399 mg, 1.10 mmol, 76 %; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.65–7.62 (m, 2H, H<sub>B</sub>, H<sub>B'</sub>), 7.45 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-5), 7.26 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H<sub>A</sub>, H<sub>A'</sub>), 6.98 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-2), 6.88 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, H-6), 4.25 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, Ts-O-CH<sub>2</sub>), 2.98 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>), 2.43 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 160.6 (q, *J* = 2.1 Hz), 158.6 (q, *J* = 2.1 Hz), 145.0, 143.6 (d, *J* = 8.1 Hz), 132.5, 129.5 (d, *J* = 3.5 Hz), 127.2 (qd, *J* = 4.6, 1.8 Hz), 124.6 (d, *J* = 3.6 Hz), 122.5 (q, *J* = 271.6 Hz), 117.1 (d, *J* = 20.6 Hz), 116.9 (dd, *J* = 33.0, 12.3 Hz), 69.3, 34.9 (d, *J* = 1.5 Hz); <sup>19</sup>F NMR (470 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -61.26 (d, *J* = 12.4 Hz), -114.38 (pd, *J* = 12.3, 7.5 Hz).

**tert-Butyl-4-sulfamoylpiperidin-1-carboxylat (40)**

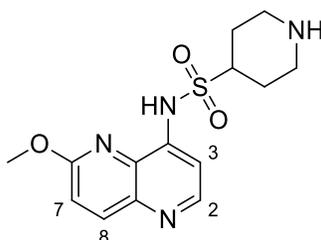
Eine gerührte wässrige Ammoniaklösung (25 %) (5 ml) wurde bei 0 °C portionsweise mit *tert*-Butyl-4-(chlorosulfonyl)piperidin-1-carboxylat **39** (120 mg, 0.4 mmol) versetzt. Anschließend wurde das Gemisch auf 40 °C erwärmt und 2 h nachgerührt. Die Mischung wurde mit 10 ml

Wasser verdünnt und mit verd. HCl (1 M) neutralisiert. Die wässrige Phase wurde dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeeengt. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung für den nächsten Schritt verwendet. Weiß-gelber Feststoff; Ausbeute 90 mg, 0.34 mmol, 79 %;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  6.73 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 4.07–3.94 (m, 2H,  $\text{N}-(\text{CHH}_{\text{eq}})_2$ ), 2.99 (tt,  $J = 11.9, 3.7$  Hz, 1H, CH), 2.74 (br s, 2H,  $\text{N}-(\text{CHH}_{\text{ax}})_2$ ), 2.01–1.90 (m, 2H,  $\text{CH}-(\text{CHH}_{\text{eq}})_2$ ), 1.46–1.34 (m, 11H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ,  $\text{CH}-(\text{CHH}_{\text{ax}})_2$ ); ESI-MS:  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  kalk. für  $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4\text{SNa}$  287.10, gef. 287.01.

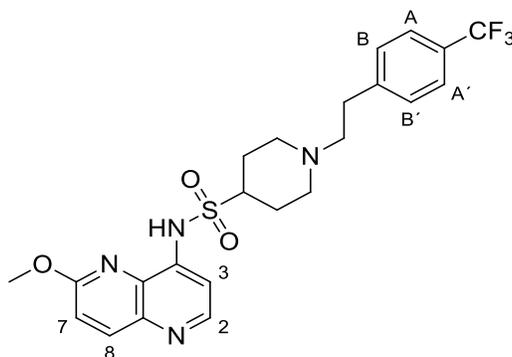
**tert-Butyl-4-(N-(6-methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)sulfamoyl)piperidin-1-carboxylat (6g)**



6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl-trifluormethansulfonat **4a** (174 mg, 0.55 mmol) wurde zusammen mit *tert*-Butyl-4-sulfamoylpiperidin-1-carboxylat **40** (192 mg, 0.72 mmol, 1.3 eq),  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$  (15 mg, 16.4  $\mu\text{mol}$ ), DavePhos (32 mg, 81  $\mu\text{mol}$ ) und  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (419 mg, 0.8 mmol, 1.45 eq) in 1,4-Dioxan (5 ml) wurde 18 h bei 100 °C gerührt. Wasser (20 ml) wurde hinzugefügt und die wässrige Phase dreimal mit EtOAc (3x5 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Brine gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde über Kieselgel mit  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{EtOAc}$  (0-10 %) gereinigt. Gelber, amorpher Feststoff; Ausbeute 192 mg, 0.45 mmol, 82 %;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.56 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1H,  $H-2$ ), 8.17 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H,  $H-8$ ), 7.76 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1H,  $H-3$ ), 7.26 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H,  $H-7$ ), 4.14 (m, 5H,  $\text{O}-\text{CH}_3$ ;  $\text{N}-(\text{CHH}_{\text{eq}})_2$ ), 3.54 (tt,  $J = 11.9, 3.8$  Hz, 1H, CH), 2.76 (br s, 2H,  $\text{N}-(\text{CHH}_{\text{ax}})_2$ ), 2.12 (d,  $J = 12.7$  Hz, 2H,  $\text{CH}-(\text{CHH}_{\text{eq}})_2$ ), 1.72 (m, 2H,  $\text{CH}-(\text{CHH}_{\text{ax}})_2$ ), 1.40 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); ESI-MS:  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  kalk. für  $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$  423.17, gef. 423.10.

**N-(6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)piperidin-4-sulfonamid (7g)**

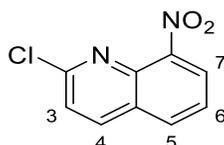
*tert*-Butyl-4-(*N*-(6-methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)sulfamoyl)piperidin-1-carboxylat **6g** (100 mg, 0.24 mmol) wurde mit TFA (2.7 ml) in DCM (12 ml) versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mit HCl in 1,4-Dioxan (4 M) (3 ml) versetzt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert und in CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub> (15 %) (10 ml) gelöst. Die Lösung wurde zweimal über K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (250 mg) gerührt und filtriert. Der Rückstand wurde mit CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub> (15 %) gewaschen und im Vakuum eingeeengt. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung für den nächsten Schritt verwendet. Weißer, amorpher Feststoff; Ausbeute 75 mg, 0.23 mmol, 98 %; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.52 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, *H*-2), 8.15 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, *H*-8), 7.70 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, *H*-3), 7.62 (s, 1H), 7.22 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, *H*-7), 4.10 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3.41–3.33 (m, 1H, CH), 3.13 (dt, *J* = 12.4, 3.2 Hz, 2H, NH-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 2.54 (td, *J* = 12.8, 2.7 Hz, 2H, NH-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>), 2.12 (br d, *J* = 12.1 Hz, 2H, CH-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 1.80 (qd, *J* = 12.5, 4.3 Hz, 2H, CH-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>); ESI-MS: *m/z* [M+H]<sup>+</sup> kalk. für C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S 323.11, gef. 323.00.

**N-(6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)-1-(4-(trifluormethyl)phenethyl)piperidin-4-sulfonamid (8o)**

Die Synthese erfolgte entsprechend AAV G unter Verwendung von *N*-(6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)piperidin-4-sulfonamid **7g** (75 mg, 0.23 mmol) und 2-(4-Trifluormethyl-

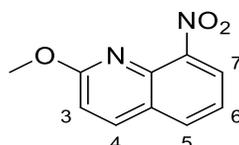
phenyl)ethylbromid **10b** (80  $\mu$ l, 0.46 mmol, 2 eq). Beiger Feststoff; Ausbeute 29 mg, 59  $\mu$ mol, 26 %; HPLC 92 %; Smp. 181-183  $^{\circ}$ C;  $^1$ H NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.56 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H,  $H-2$ ), 8.18 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H,  $H-8$ ), 7.78 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H,  $H-3$ ), 7.53 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H,  $H_A, H_A'$ ), 7.36 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H,  $H_B, H_B'$ ), 7.27 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H,  $H-7$ ), 4.13 (s, 3H, O- $\text{CH}_3$ ), 3.40–3.32 (m, 1H, CH), 3.12–3.05 (m, 2H, N-( $\text{CHH}_{\text{eq}}$ ) $_2$ ), 2.87–2.80 (m, 2H, Ar- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ), 2.62–2.56 (m, 2H, N-( $\text{CHH}_{\text{ax}}$ ) $_2$ ), 2.19–2.12 (m, 2H, Ar- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ), 2.08 (td,  $J = 11.9, 2.3$  Hz, 2H, CH-( $\text{CHH}_{\text{eq}}$ ) $_2$ ), 1.99–1.87 (m, 2H, CH-( $\text{CHH}_{\text{ax}}$ ) $_2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  161.9, 148.6, 143.9, 141.3, 140.8, 139.9, 131.4, 128.9, 128.6 (q,  $^2J = 32.3$  Hz), 125.32 (q,  $^3J = 3.5$  Hz), 123.84 (q,  $^1J = 271.3$  Hz), 117.6, 108.4, 59.2, 54.1, 52.0, 33.2, 29.7, 25.8; ESI-HRMS:  $m/z$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  kalk. für  $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$  495.1677, gef. 495.1680.

### 2-Chlor-8-nitrochinolin (33)



Zu einer gerührten Lösung von 2-Chlorchinolin **32** (4.9 g, 30 mmol) in Schwefelsäure (75 ml) wurde bei 0  $^{\circ}$ C eine Mischung aus  $\text{HNO}_3$  (8 ml) und  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (4 ml) zugetropft. Dabei färbte sich das Gemisch gelb. Nach der Zugabe wurde auf 40  $^{\circ}$ C erwärmt und noch 30 min nachgerührt. Der Ansatz wurde auf Eiswasser (400 ml) gegossen und der entstandene Feststoff abfiltriert. Die Reinigung erfolgte über Kieselgel mit Petrolether/EtOAc (5%). Weißer, amorpher Feststoff; Ausbeute 2.02 g, 9.7 mmol, 32 %;  $^1$ H NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.20 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H,  $H-4$ ), 8.09 (dd,  $J = 7.6, 1.3$  Hz, 1H,  $H-5$ ), 8.04 (dd,  $J = 8.2, 1.3$  Hz, 1H,  $H-7$ ), 7.65 (t,  $J = 7.67$  Hz, 1H,  $H-6$ ), 7.54 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H,  $H-3$ ); ESI-MS:  $m/z$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  kalk. für  $\text{C}_9\text{H}_6\text{ClN}_2\text{O}_2$  209.01, gef. 209.20.

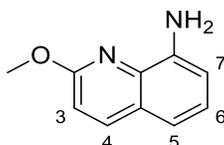
### 2-Methoxy-8-nitrochinolin (34)



Die Reaktion wurde in einem trockenen Reaktionsgefäß unter Argonatmosphäre durchgeführt. Zu einer gerührten Lösung von Natrium (0.3 g, 10 mmol, 3 eq) in Methanol (45 ml) wurde 2-Chlor-8-nitrochinolin **33** (1.05 g, 5 mmol) zugegeben und das Gemisch auf Rückfluss erhitzt.

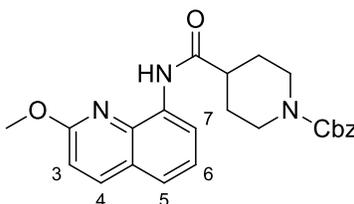
Nach zwei Stunden wurde der Ansatz auf Raumtemperatur gekühlt und im Vakuum eingengt. Die Reinigung erfolgte über Kieselgel mit DCM. Gelb-weißer, amorpher Feststoff; Ausbeute 0.94 g, 4.6 mmol, 92 %;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.05 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H,  $H-4$ ), 7.97 (dd,  $J = 7.7, 1.4$  Hz, 1H,  $H-5$ ), 7.91 (dd,  $J = 8.0, 1.4$  Hz, 1H,  $H-7$ ), 7.42 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H,  $H-6$ ), 7.02 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H,  $H-3$ ), 4.07 (s, 3H, O- $\text{CH}_3$ ); ESI-MS:  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  kalk. für  $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_3$  205.06, gef. 205.16.

### 2-Methoxychinolin-8-amin (5c)

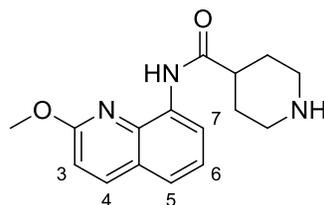


Die Synthese erfolgte entsprechend AAV F unter Verwendung von 2-Methoxy-8-nitrochinolin **34** (0.81 g, 4 mmol). Gelber, amorpher Feststoff; Ausbeute 0.51 g, 2.9 mmol, 73 %;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  8.05 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H,  $H-4$ ), 7.11 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H,  $H-6$ ), 6.98 (dd,  $J = 8.0, 1.3$  Hz, 1H,  $H-5$ ), 6.92 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H,  $H-3$ ), 6.82 (dd,  $J = 7.5, 1.3$  Hz, 1H,  $H-7$ ), 5.60 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 3.98 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); ESI-MS:  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  kalk. für  $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}$  175.09, gef. 175.26.

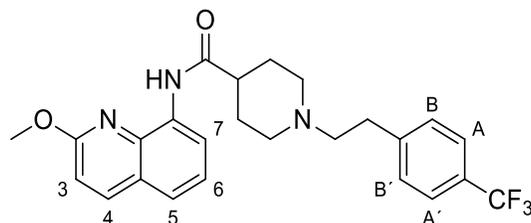
### Benzyl-4-((2-methoxychinolin-8-yl)carbamoyl)piperidin-1-carboxylat (6c)



Die Synthese erfolgte entsprechend AAV E unter Verwendung von 2-Methoxychinolin-8-amin **5c** (0.35 g, 2 mmol) und 1-((Benzyloxy)carbonyl)piperidin-4-carbonsäure **31a** (0.64 g, 2.4 mmol, 1.2 eq). Oranger, amorpher Feststoff; Ausbeute 0.39 g, 0.93 mmol, 47 %;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  9.63 (s, 1H, NH), 8.45 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H,  $H-5$ ), 8.25 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H,  $H-4$ ), 7.57 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H,  $H-7$ ), 7.41–7.27 (m, 6H, Ar- $H$ ,  $H-6$ ), 7.08 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H,  $H-3$ ), 5.08 (s, 2H, Ar- $\text{CH}_2$ ), 4.11–4.03 (m, 5H,  $\text{CH}_3$ , N-( $\text{CHH}_{\text{eq}}$ ) $_2$ ), 2.95 (br s, 2H, N-( $\text{CHH}_{\text{ax}}$ ) $_2$ ), 2.88–2.78 (m, 1H, CH), 1.96 (d,  $J = 12.9$  Hz, 2H, CH-( $\text{CHH}_{\text{eq}}$ ) $_2$ ), 1.59 (qd,  $J = 12.3, 4.3$  Hz, 2H, CH-( $\text{CHH}_{\text{ax}}$ ) $_2$ ); ESI-MS:  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  kalk. für  $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4\text{Na}$  442.17, gef. 442.39.

**N-(2-Methoxychinolin-8-yl)piperidin-4-carboxamid (7c)**

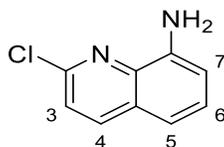
Die Synthese erfolgte entsprechend AAV F unter Verwendung von Benzyl-4-((2-methoxychinolin-8-yl)carbamoyl)piperidin-1-carboxylat **6c** (0.39 g, 0.93 mmol). Die Reinigung erfolgte über Kieselgel mit CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub> (5-10 %). Weißer, amorpher Feststoff; Ausbeute 100 mg, 0.35 mmol, 38 %; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.50 (dd, *J* = 7.8, 1.3 Hz, 1H, *H*-5), 8.11 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, *H*-4), 7.51 (dd, *J* = 8.1, 1.3 Hz, 1H, *H*-7), 7.36 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, *H*-6), 6.99 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, *H*-3), 4.11 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3.18–3.11 (m, 2H, N-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 2.76–2.64 (m, 3H, CH, N-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>), 2.09–2.00 (m, 2H, CH-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 1.77 (dtd, *J* = 13.1, 11.8, 4.0 Hz, 2H, CH-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>); ESI-MS: *m/z* [M+H]<sup>+</sup> kalk. für C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> 286.16, gef. 286.09.

**N-(2-Methoxychinolin-8-yl)-1-(4-(trifluormethyl)phenethyl)piperidin-4-carboxamid (8s)**

Die Synthese erfolgte entsprechend AAV G unter Verwendung von *N*-(2-Methoxychinolin-8-yl)piperidin-4-carboxamid **7c** (59 mg, 0.2 mmol) und 2-(4-Trifluormethylphenyl)ethylbromid **10b** (51 μl, 0.3 mmol, 1.5 eq). Weißer Feststoff; Ausbeute 12 mg, 26 μmol, 13 %; HPLC 98 %; Smp. 163-166 °C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.51 (dd, *J* = 7.8, 1.3 Hz, 1H, *H*-7), 8.14 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, *H*-4), 7.58 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, *H*<sub>A</sub>, *H*<sub>A'</sub>), 7.53 (dd, *J* = 8.1, 1.3 Hz, 1H, *H*-5), 7.43 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, *H*<sub>B</sub>, *H*<sub>B'</sub>), 7.37 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, *H*-6), 7.01 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, *H*-3), 4.12 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3.14 (d, *J* = 11.6 Hz, 2H, N-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 2.98–2.89 (m, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.72–2.65 (m, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.61 (tt, *J* = 11.6, 4.0 Hz, 1H, CH), 2.27 (td, *J* = 11.8, 2.6 Hz, 2H, N-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>), 2.11 (d, *J* = 12.2 Hz, 2H, CH-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 1.94 (qd, *J* = 12.0, 3.7 Hz, 2H, CH-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.8, 172.8, 161.4, 144.6, 139.4, 136.0, 135.9, 132.8, 132.8, 129.0, 128.4 (q, <sup>2</sup>*J* = 32.3 Hz), 125.3 (q, <sup>3</sup>*J* = 3.8

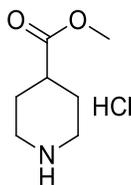
Hz), 124.6, 124.4, 123.2 (q,  $^4J = 271.5$  Hz), 121.4, 117.3, 117.3, 113.2, 60.0, 53.3, 53.2, 44.6, 44.6, 33.5, 29.0; ESI-HRMS:  $m/z$   $[M+H]^+$  kalk. für  $C_{25}H_{27}F_3N_3O_2$  458.2055, gef. 458.2044.

### 2-Chlorchinolin-8-amin (35)



Eine gerührte Suspension von **33** (0.70 g, 3.36 mmol),  $NH_4Cl$  (1.83 g, 33.5 mmol, 10 eq) und Eisenpulver (1.41 g, 25 mmol, 7,5 eq) in 42 ml einer Mischung aus EtOH und Wasser (5:1) wurde auf Rückfluss erhitzt. Nach 9 h wurde der Ansatz auf 60 °C abgekühlt und über Celite<sup>®</sup> filtriert. Der Feststoff wurde mit iPrOH/EtOAc (1:1) gewaschen und das Filtrat im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde in EtOAc aufgenommen. Die organische Phase wurde mit Wasser, wässriger  $NaHCO_3$  (5%) und Brine gewaschen, über  $Na_2SO_4$  getrocknet, filtriert und im Vakuum eingengt. Das Produkt wurde durch Verreibung mit Heptan erhalten. Braun-gelber, amorpher Feststoff; Ausbeute 0.46 g, 2.6 mmol, 78 %;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $(CD_3)_2SO$ )  $\delta$  8.24 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H,  $H-4$ ), 7.47 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H,  $H-3$ ), 7.32 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H,  $H-6$ ), 7.09 (dd,  $J = 8.0, 1.3$  Hz, 1H,  $H-5$ ), 6.92 (dd,  $J = 7.7, 1.2$  Hz, 1H,  $H-7$ ), 5.83 (s, 2H,  $NH_2$ ); APCI-MS:  $m/z$   $[M+H]^+$  kalk. für  $C_9H_8ClN_2$  179.0, gef. 179.0.

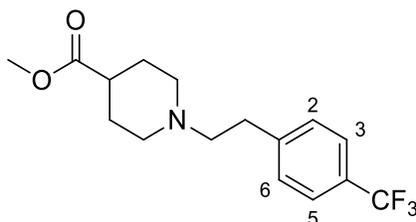
### Methyl-piperidin-4-carboxylathydrochlorid (36)



Zu einer gerührten Lösung von Thionylchlorid (2.5 ml, 33 mmol, 3.3 eq) in  $CH_3OH$  (10 ml) wurde bei 0 °C Piperidin-4-carbonsäure **9** (1.3 g, 10 mmol) portionsweise eingetragen. Das Gemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt. Nach 20 h wurde der Ansatz im Vakuum eingengt und der Rückstand in  $Et_2O$  suspendiert. Der Feststoff wurde abfiltriert und mit  $Et_2O$  gewaschen und im Vakuum getrocknet. Weißer, amorpher Feststoff; Ausbeute 1.75 g, 9.8 mmol, 98 %;  $^1H$  NMR (500 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  3.71 (s, 3H, O- $CH_3$ ), 3.38 (dt,  $J = 13.2, 4.2$  Hz, 2H,  $NH-(CHH_{eq})_2$ ), 3.07

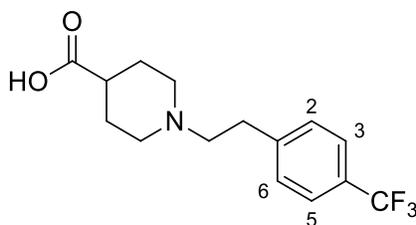
(td,  $J = 12.9, 3.3$  Hz, 2H, NH-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>), 2.78–2.71 (m, 1H, CH), 2.15 (ddd,  $J = 12.3, 7.2, 3.5$  Hz, 3H, CH-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 1.89 (dtd,  $J = 14.8, 11.0, 4.0$  Hz, 2H, CH-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>); ESI-MS:  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> kalk. für C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>2</sub> 144.10, gef. 144.14.

### Methyl-1-(4-(trifluormethyl)phenethyl)piperidin-4-carboxylat (37)



Eine gerührte Lösung Methyl-piperidin-4-carboxylathydrochlorid **36** (0.27 g, 1.5 mmol), 2-(4-Trifluormethylphenyl)ethylbromid **10b** (0.51 ml, 3 mmol, 2 eq) und TEA (0.73 ml, 5.25 mmol, 3.5 eq) in DMF (10 ml) wurde auf 50 °C erwärmt. Nach 16 h wurde der Ansatz auf einen Überschuss Wasser (20 ml) gegossen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit ges. wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung, Wasser und Brine gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde über Kieselgel mit CH<sub>3</sub>OH/EtOAc (5 %) gereinigt. Farbloses Öl; Ausbeute 0.10 g, 0.32 mmol, 21 %; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CH<sub>3</sub>OH) δ 7.57 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H, H-3, H-5), 7.41 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H, H-2, H-6), 3.67 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 2.98 (dt,  $J = 11.3, 3.7$  Hz, 2H, N-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 2.89 (dd,  $J = 9.9, 6.5$  Hz, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.65–2.59 (m, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.39 (tt,  $J = 11.2, 4.1$  Hz, 1H, CH), 2.18 (td,  $J = 11.7, 2.2$  Hz, 2H, N-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 1.97–1.89 (m, 2H, CH-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 1.80–1.69 (m, 2H, CH-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>); ESI-MS:  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> kalk. für C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> 316.15, gef. 316.21.

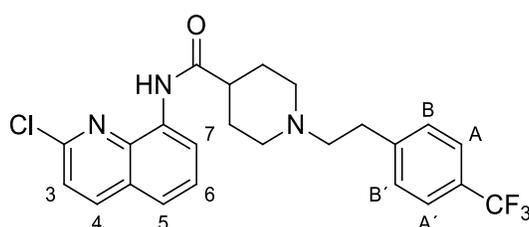
### 1-(4-(Trifluormethyl)phenethyl)piperidin-4-carbonsäure (38)



Zu einer gerührten wässrigen NaOH-Lösung (0.2 N) in CH<sub>3</sub>OH wurde Methyl-1-(4-(trifluormethyl)phenethyl)piperidin-4-carboxylat **37** (0.10 g, 0.32 mmol) zugefügt. Nach 48 h

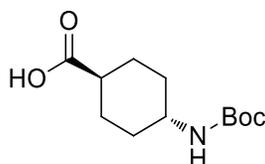
wurde die Mischung mit verd. wässriger HCl (0.1 N) auf pH 6 gestellt und im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde in Chloroform suspendiert, filtriert und im Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung für den nächsten Schritt verwendet. Weißer Feststoff; Ausbeute 70 mg, 0.23 mmol, 73 %;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.56 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H,  $H-3$ ,  $H-5$ ), 7.41 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H,  $H-2$ ,  $H-6$ ), 3.00 (dt,  $J = 11.7$ , 3.6 Hz, 2H,  $\text{N}-(\text{CHH}_{\text{eq}})_2$ ), 2.89 (dd,  $J = 9.9$ , 6.5 Hz, 2H,  $\text{Ar}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ ), 2.64–2.55 (m, 2H,  $\text{Ar}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ ), 2.19–2.06 (m, 3H,  $\text{CH}$ ,  $\text{N}-(\text{CHH}_{\text{ax}})_2$ ), 1.96–1.85 (m, 2H,  $\text{CH}-(\text{CHH}_{\text{eq}})_2$ ), 1.83–1.68 (m, 2H,  $\text{CH}-(\text{CHH}_{\text{ax}})_2$ ); ESI-MS:  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  kalk. für  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{NO}_2$  302.14, gef. 302.26.

### ***N***-(2-Chlorchinolin-8-yl)-1-(4-(trifluormethyl)phenethyl)piperidin-4-carboxamid (8n)



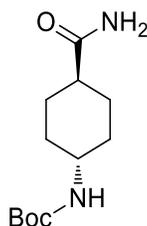
Die Synthese erfolgte entsprechend AAV E unter Verwendung von 1-(4-(Trifluormethyl)phenethyl)piperidin-4-carbonsäure **38** und 2-Chlorchinolin-8-amin **35**. Brauner Feststoff; Ausbeute 17 mg, 37  $\mu\text{mol}$ , 10 %; HPLC 96 %; Smp. 178–184  $^{\circ}\text{C}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.52 (s, 1H, NH), 8.82 (dd,  $J = 7.6$ , 1.4 Hz, 1H,  $H-7$ ), 8.11 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H,  $H-4$ ), 7.55 (m, 3H,  $H-6$ ,  $H_A$ ,  $H_{A'}$ ), 7.50 (dd,  $J = 8.2$ , 1.5 Hz, 1H,  $H-5$ ), 7.43 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H,  $H-3$ ), 7.34 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H,  $H_B$ ,  $H_{B'}$ ), 3.18 (dt,  $J = 12.2$ , 3.8 Hz, 2H,  $\text{N}-(\text{CHH}_{\text{eq}})_2$ ), 2.96–2.90 (m, 2H,  $\text{Ar}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ ), 2.75–2.70 (m, 2H,  $\text{Ar}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ ), 2.56 (tt,  $J = 10.9$ , 4.1 Hz, 1H,  $\text{CH}$ ), 2.34 (t,  $J = 10.9$  Hz, 2H,  $\text{N}-(\text{CHH}_{\text{ax}})_2$ ), 2.15–2.09 (m, 2H,  $\text{CH}-(\text{CHH}_{\text{eq}})_2$ ), 2.09–2.01 (m, 2H,  $\text{CH}-(\text{CHH}_{\text{ax}})_2$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.4, 149.2, 144.2, 139.3, 138.0, 133.7, 129.0, 128.5 (q,  $^2J = 32.3$  Hz), 127.8, 126.6, 125.3 (q,  $^3J = 3.8$  Hz), 124.9 (q,  $^1J = 274.7$  Hz), 123.2, 122.8, 121.3, 117.9, 60.0, 52.9, 44.2, 33.3, 28.7; ESI-HRMS:  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  kalk. für  $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{ClF}_3\text{N}_3\text{O}$  462.1559, gef. 462.1556.

### **(1r,4r)**-4-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)cyclohexancarbonsäure (31c)



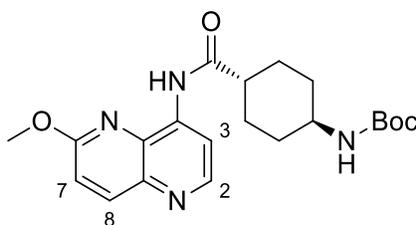
Zu einer gerührten Mischung von Di-*tert*-butyldicarbonat (2.39 g, 10.4 mmol, 1.04 eq) und wässriger NaOH-Lösung (1 M) (12 ml, 12 mmol, 1.2 eq) wurde eine Suspension von (1*r*,4*r*)-4-Aminocyclohexancarbonsäure (1.45 g, 10 mmol) in *tert*-Butanol (19 ml). Nach 16 h wurde die Reaktion durch die Zugabe von Wasser im Überschuss gequenchet. Die wässrige Phase wurde mit Heptan gewaschen, mit wässriger HCl (2 M) neutralisiert und dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Brine gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeeengt. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung für den nächsten Schritt verwendet. Weißer, amorpher Feststoff; Ausbeute 2.18 g, 9 mmol, 90 %; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.41 (br s, 1H, NH), 3.40 (br s, 1H, NH-CH), 2.23 (tt, *J* = 11.8, 3.1 Hz, 1H, CH-COOH), 2.10–1.98 (m, 4H, NH-CH-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>, COOH-CH-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 1.52 (q, *J* = 12.9, 11.8 Hz, 2H, NH-CH-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>), 1.43 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.12 (q, *J* = 10.9, 10.4 Hz, 2H, COOH-CH-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>); ESI-MS: *m/z* [M-H]<sup>-</sup> kalk. für C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>4</sub> 242.14, gef. 242.26.

#### ***tert*-Butyl ((1*r*,4*r*)-4-carbamoylcyclohexyl)carbamate**



Die Synthese erfolgte entsprechend AAV L unter Verwendung von (1*r*,4*r*)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)cyclohexancarbonsäure **31c** (1 g, 4.11 mmol). Weißer, amorpher Feststoff; 1.3 g; 5.36 mmol 130 %; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 3.30–3.23 (m, 1H, NH-CH), 2.14 (tt, *J* = 12.2, 3.5 Hz, 1H, CO-CH), 2.01–1.92 (m, 2H, NH-CH-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 1.92–1.83 (m, 2H, CO-CH-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 1.52 (qd, *J* = 13.2, 3.4 Hz, 2H, NH-CH-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>), 1.42 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.21 (qd, *J* = 12.9, 3.5 Hz, 2H, CO-CH-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>); ESI-MS: *m/z* [M+Na]<sup>+</sup> kalk. für C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Na 265.15, gef. 265.22.

**tert-Butyl-((1r,4r)-4-((6-methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)carbamoyl)cyclohexyl)-carbammat (6e)**



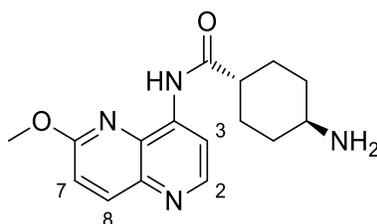
Von (1r,4r)-4-((tert-Butoxycarbonyl)amino)cyclohexancarbonsäure **31c** :

Die Synthese erfolgte entsprechend AAV E unter Verwendung von (1r,4r)-4-((Tert-butoxycarbonyl)amino)cyclohexan-carbonsäure **31c** (380 g, 1.56 mmol, 1.56 eq) und 6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-amin **5a** (176 mg, 1 mmol). Weißer, amorpher Feststoff; Ausbeute 273 mg, 0.68 mmol, 68 %.

Von tert-Butyl ((1r,4r)-4-carbamoylcyclohexyl)carbammat:

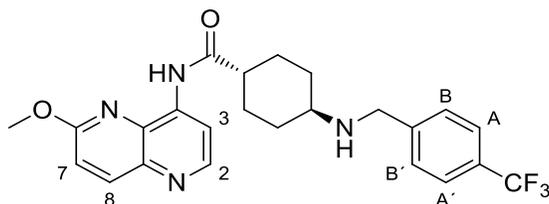
Die Synthese erfolgte entsprechend AAV M unter Verwendung von tert-Butyl ((1r,4r)-4-carbamoylcyclohexyl)carbammat (311mg, 1.36 mmol, 1.05 eq), +/-BINAP (49 mg, 78  $\mu$ mol, 6 mol%), Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (37.5 mg, 39  $\mu$ mol, 3 mol%), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.06 g, 3.24 mol, 2,5 eq) und 6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl-trifluormethansulfonat **4a** (400 mg, 1.3 mmol). Hellgelber, amorpher Feststoff, Ausbeute 112 mg, 0.28 mmol, 21 %, <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.59 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, *H*-2), 8.47 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, *H*-3), 8.17 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, *H*-8), 7.24 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, *H*-7), 4.14 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3.38 (m, 1H, NH-CH), 2.57 (t, *J* = 12.1 Hz, 1H, CO-CH), 2.14 (d, *J* = 13.0 Hz, 2H, NH-CH-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 2.05 (d, *J* = 11.8 Hz, 2H, CO-CH-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 1.68 (q, *J* = 12.4 Hz, 2H, NH-CH-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>), 1.44 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.34 (q, *J* = 12.7 Hz, 2H, CO-CH-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>); ESI-MS: *m/z* [M+H]<sup>+</sup> kalk. für C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> 401.22, gef. 401.25.

**(1r,4r)-4-Amino-N-(6-methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)cyclohexancarboxamid (7e)**



Die Synthese erfolgte entsprechend AAV H unter Verwendung von *Tert*-butyl-((1*r*,4*r*)-4-((6-methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)carbamoyl)cyclohexyl)carbamate MC7 (0.24 g, 0.6 mmol), Beiger Feststoff; (180 mg, 0.6 mmol, 100 %);  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  8.62 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H, *H*-2), 8.50 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H, *H*-3), 8.20 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H, *H*-8), 7.27 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H, *H*-7), 4.17 (s, 3H, O- $\text{CH}_3$ ), 3.13 (tt,  $J = 11.8, 3.9$  Hz, 1H,  $\text{NH}_2\text{-CH}$ ), 2.70 (tt,  $J = 12.1, 3.6$  Hz, 1H, CO- $\text{CH}$ ), 2.25–2.20 (m, 2H,  $\text{NH}_2\text{-CH-(CHH}_{\text{eq}})_2$ ), 2.19–2.13 (m, 2H, CO- $\text{CH-(CHH}_{\text{eq}})_2$ ), 1.74 (qd,  $J = 13.3, 3.2$  Hz, 2H,  $\text{NH}_2\text{-CH-(CHH}_{\text{ax}})_2$ ), 1.54 (qd,  $J = 12.7, 3.4$  Hz, 2H, CO- $\text{CH-(CHH}_{\text{ax}})_2$ ); ESI-MS:  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  kalk. für  $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_2$  301.16, gef. 301.10.

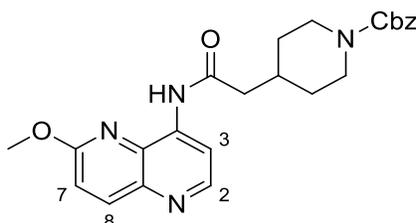
**(1*r*,4*r*)-*N*-(6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)-4-((4-(trifluormethyl)benzyl)amino)-cyclohexancarboxamid (8q)**



Eine gerührte Lösung von (1*r*,4*r*)-4-Amino-*N*-(6-methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)cyclohexancarboxamid **7e** (54 mg, 0.18 mmol), 4-Trifluormethylbenzaldehyd **44** (72  $\mu\text{l}$ , 0.54 mmol, 3 eq) und Piperidin (18  $\mu\text{l}$ , 0.18 mmol) in  $\text{CH}_3\text{OH}$  (5 ml) wurde mit wenig Molsieb (3  $\text{\AA}$ ) versetzt und auf Rückfluss erhitzt. Nach zwei Stunden wurde die Wärmezufuhr beendet und über Nacht nachgerührt.  $\text{NaBH}_4$  (38 mg, 1 mmol, 5.5 eq) wurde zugesetzt und das Gemisch weitere 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wurde mit DCM (20 ml) verdünnt und filtriert. Das Filtrat wurde im Vakuum eingengt und der Rückstand über Kieselgel mit  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3$  (5 %) gereinigt. Weißer Feststoff; Ausbeute 25 mg, 55  $\mu\text{mol}$ , 30 %; HPLC 92 %; Smp. 150  $^\circ\text{C}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.58 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H, *H*-2), 8.46 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H, *H*-3), 8.16 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H, *H*-8), 7.63 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H,  $H_{\text{A}}, H_{\text{A}'}$ ), 7.56 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H,  $H_{\text{B}}, H_{\text{B}'}$ ), 7.23 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H, *H*-7), 4.14 (s, 3H, O- $\text{CH}_3$ ), 3.90 (s, 2H, Ar- $\text{CH}_2$ ), 2.59 (dtt,  $J = 26.3, 11.2, 3.4$  Hz, 2H, NH- $\text{CH}$ , CO- $\text{CH}$ ), 2.18–2.10 (m, 4H,  $\text{NH-CH-(CHH}_{\text{eq}})_2$ , CO- $\text{CH-(CHH}_{\text{eq}})_2$ ), 1.62 (qd,  $J = 13.5, 12.7, 3.4$  Hz, 2H,  $\text{NH-CH-(CHH}_{\text{ax}})_2$ ), 1.39–1.27 (m, 2H, CO- $\text{CH-(CHH}_{\text{ax}})_2$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174.3, 174.2, 161.3, 149.3, 144.7, 140.9, 140.8, 139.4, 131.8, 131.8, 129.3 (q,  $J = 32.4$  Hz), 128.3, 128.2, 125.5, 125.3

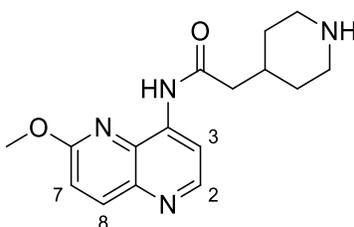
(q,  $J = 3.7$  Hz), 122.9, 119.4, 116.6, 110.83, 110.79, 55.7, 53.7, 50.6, 46.35, 46.31, 32.6, 28.3; ESI-  
HRMS:  $m/z$   $[M+H]^+$  kalk. für  $C_{24}H_{26}F_3N_4O_2$  459.2007, gef. 459.2000.

**Benzyl-4-(2-((6-methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)amino)-2-oxoethyl)piperidin-1-carboxylat (6d)**



Die Synthese erfolgte entsprechend AAV E unter Verwendung von 2-(1-((Benzyloxy)carbonyl)piperidin-4-yl)essigsäure **31b** (478 mg, 1.5 mmol, 1.5 eq) und 6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-amin **5a** (176 mg, 1 mmol). Farbloses Öl; Ausbeute 199 mg, 0.46 mmol, 46 %;  $^1H$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  8.52 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H,  $H-2$ ), 8.42 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H,  $H-3$ ), 8.08 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H,  $H-8$ ), 7.33–7.20 (m, 5H, Ar- $H$ ), 7.15 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H,  $H-7$ ), 5.07 (s, 2H, Ar- $CH_2$ ), 4.12 (d,  $J = 13.4$  Hz, 2H, N-( $CHH_{eq}$ ) $_2$ ), 4.08 (s, 3H, O- $CH_3$ ), 2.84 (s, 2H, N-( $CHH_{ax}$ ) $_2$ ), 2.55 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2H, CO- $CH_2$ ), 2.09 (ddh,  $J = 14.5, 6.8, 3.4$  Hz, 1H, CH), 1.79 (d,  $J = 12.2$  Hz, 2H, CH-( $CHH_{eq}$ ) $_2$ ), 1.24 (qd,  $J = 12.5, 4.2$  Hz, 2H, CH-( $CHH_{ax}$ ) $_2$ ); ESI-MS:  $m/z$   $[M+H]^+$  kalk. für  $C_{24}H_{27}N_4O_4$  435.20, gef. 435.18.

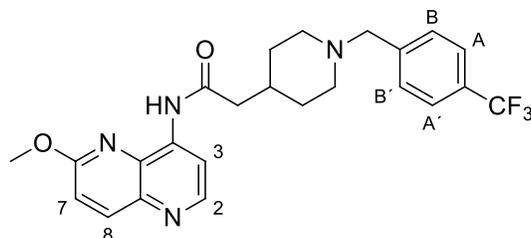
**N-(6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)-2-(piperidin-4-yl)acetamid (7d)**



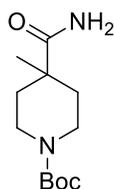
Die Synthese erfolgte entsprechend AAV F unter Verwendung von Benzyl-4-(2-((6-methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)amino)-2-oxoethyl)piperidin-1-carboxylat **6d** (0.2 g, 0.46 mmol). Weißer, amorpher Feststoff; Ausbeute 118 mg, 0.39 mmol, 73 %;  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  9.35 (br s, 1H, NH), 8.68 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H,  $H-2$ ), 8.50 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H,  $H-3$ ), 8.20 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H,  $H-8$ ), 7.15 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H,  $H-7$ ), 4.10 (s, 3H, O- $CH_3$ ), 3.14–3.05 (m, 2H, NH-( $CHH_{eq}$ ) $_2$ ), 2.66 (td,  $J =$

12.2, 2.4 Hz, 2H, NH-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>), 2.46 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2H, CO-CH<sub>2</sub>), 2.09 (dddq,  $J = 15.0, 11.1, 7.2, 3.8$  Hz, 1H, CH), 1.83 (d,  $J = 12.6$  Hz, 2H, CH-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 1.29 (qd,  $J = 12.1, 4.0$  Hz, 2H, CH-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>); ESI-MS:  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> kalk. für C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> 301.16, gef. 301.08.

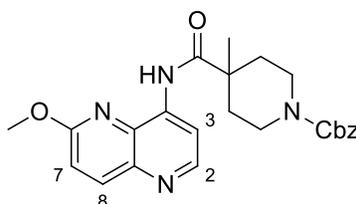
***N*-(6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)-2-(1-(4-(trifluormethyl)benzyl)piperidin-4-yl)-acetamid (8p)**



Eine gerührte Lösung von *N*-(6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)-2-(piperidin-4-yl)acetamid **7d** (52 mg, 0.17 mmol), 4-Trifluormethylbenzaldehyd **44** (27  $\mu$ l, 0.2 mmol, 1.2 eq) und Piperidin (17  $\mu$ l, 0.17 mmol) in CH<sub>3</sub>OH (10 ml) wurde mit wenig Molsieb (3 Å) versetzt und auf Rückfluss erhitzt. Nach zwei Stunden wurde die Wärmezufuhr beendet und über Nacht nachgerührt. NaBH<sub>4</sub> (30 mg, 0.79 mmol, 4.6 eq) wurde zugesetzt und das Gemisch weitere 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wurde mit DCM (20 ml) verdünnt und filtriert. Das Filtrat wurde im Vakuum eingengt und der Rückstand über Kieselgel mit CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub> (10 %) gereinigt. Beiger Feststoff; Ausbeute 21 mg, 46  $\mu$ mol, 27 %; HPLC 98 %; Smp. 170 °C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.34 (s, 1H, NH), 8.69 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H, H-2), 8.51 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H, H-3), 8.21 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H, H-8), 7.56 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H, HA, HA'), 7.43 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H, HB, HB'), 7.15 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H, H-7), 4.10 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3.54 (s, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>), 2.88 (d,  $J = 12.0$  Hz, 2H, N-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 2.47 (d,  $J = 7.0$  Hz, 2H, CO-CH<sub>2</sub>), 2.10–1.93 (m, 3H, CH, N-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>), 1.83 (d,  $J = 12.8$  Hz, 2H, CH-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 1.49–1.37 (m, 2H, CH-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  170.9, 161.4, 149.3, 142.7, 140.9, 140.8, 139.4, 131.6, 129.3 (q, <sup>2</sup> $J = 32.9$  Hz), 129.2, 125.1 (q, <sup>3</sup> $J = 3.8$  Hz), 124.2 (q, <sup>1</sup> $J = 271.7$  Hz), 116.7, 110.8, 110.0, 62.7, 53.7, 53.6, 45.2, 33.3, 32.2; ESI-HRMS:  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> kalk. für C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> 459.2007, gef. 459.2003.

**tert-Butyl-4-carbamoyl-4-methylpiperidin-1-carboxylat**

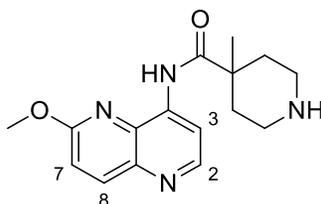
Zu einer gerührten Lösung von N-Boc-4-methyl-4-piperidincarbonsäure **31d** (245 mg, 1 mmol) und Pyridin (140  $\mu$ l, 1.7 mmol, 1.7 eq) in 1,4-Dioxan (5 ml) wurde  $\text{Boc}_2\text{O}$  (230 mg, 1.3 mmol, 1.3 eq) zugefügt. Nach 40 min wurde  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  (310 mg, 3.2 mmol, 3.2 eq) zugesetzt und 15 h nachgerührt. Anschließend wurde im Vakuum eingengt. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung für den nächsten Schritt verwendet. Weißer, amorpher Feststoff; Ausbeute 209 mmol, 0.86 mmol, 86 %;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  7.14 (s, 1H, NHH), 6.85 (s, 1H, NHH), 3.49 (dt,  $J = 13.3, 4.4$  Hz, 2H, N-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 3.04–2.94 (m, 2H, N-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>), 1.87 (dt,  $J = 13.5, 3.7$  Hz, 2H, C-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 1.36 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.21 (dt,  $J = 10.1, 3.9$  Hz, 2H, C-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>), 1.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); ESI-HRMS:  $m/z$  [M+Na]<sup>+</sup> kalk. für C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Na 265.15, gef. 265.05.

**tert-Butyl-4-((6-methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)carbamoyl)-4-methylpiperidin-1-carboxylat (6f)**

Die Synthese erfolgte entsprechend AAV M unter Verwendung von **31d** (128 mg, 0.52 mmol, 1.05 eq), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (673 mg, 2.06 mmol, 3.93 eq), Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (70.9 mg, 0.08 mmol, 0.15 eq), +/-BiNAP (87 mg, 0.14 mmol, 0.28 eq) und 6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl-trifluormethansulfonat **4a** (154 mg, 0.5 mmol). Hellgelber, amorpher Feststoff; 70 mg, 0.17 mmol, 35 %;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.64 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H, H-2), 8.48 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H, H-3), 8.21 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H, H-8), 7.28 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H, H-7), 4.14 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3.74–3.63 (m, 2H, N-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 3.43–3.33 (m, 2H, N-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>), 2.25–2.14 (m, 2H, C-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 1.66 (ddd,  $J = 13.5, 9.1,$

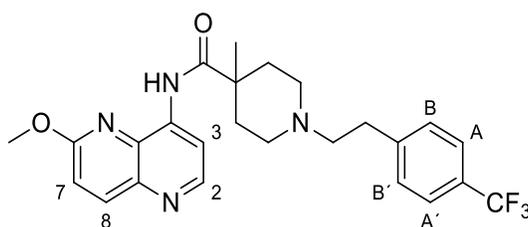
3.9 Hz, 2H, C-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>), 1.45 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.45 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); ESI-MS:  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> kalk. für C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Na 423.2, gef. 423.1.

**N-(6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)-4-methylpiperidin-4-carboxamid (7f)**



Die Synthese erfolgte entsprechend AAV H unter Verwendung von *tert*-Butyl-4-((6-methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)carbamoyl)-4-methylpiperidin-1-carboxylat **6f** (106 mg, 0.26 mmol). Oranger, amorpher Feststoff; Ausbeute 66 mg, 0.22 mmol, 85 %; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.88–9.83 (s, 1H, CO-NH), 8.69 (d,  $J$  = 5.1 Hz, 1H, *H*-2), 8.49 (d,  $J$  = 5.1 Hz, 1H, *H*-3), 8.21 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H, *H*-8), 7.15 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H, *H*-7), 4.07 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3.00 (ddd,  $J$  = 12.7, 5.9, 3.9 Hz, 2H, N-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 2.90 (ddd,  $J$  = 12.6, 9.1, 3.2 Hz, 2H, N-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>), 2.20 (ddd,  $J$  = 13.9, 5.8, 3.6 Hz, 2H, C-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 1.66 (ddd,  $J$  = 13.4, 9.1, 3.9 Hz, 2H, C-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>), 1.40 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); ESI-MS:  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> kalk. für C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> 301.2, gef. 301.0.

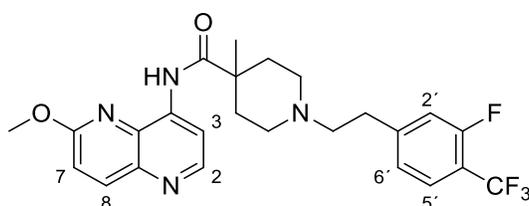
**N-(6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)-4-methyl-1-(4-(trifluormethyl)phenethyl)-piperidin-4-carboxamid (8u)**



Die Synthese erfolgte entsprechend AAV G unter Verwendung von *N*-(6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)-4-methylpiperidin-4-carboxamid **7f** (25 mg, 0.08 mmol) und 2-(4-Trifluormethylphenyl)ethylbromid **10b** (30 µl, 0.18 mmol, 2.1 eq). Weißer Feststoff; Ausbeute 14 mg, 30 µmol, 37 %; HPLC 99 %; Smp. 150-152 °C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.87 (s, 1H, NH), 8.71 (d,  $J$  = 5.1 Hz, 1H, *H*-2), 8.51 (d,  $J$  = 5.1 Hz, 1H, *H*-3), 8.22 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H, *H*-8), 7.51 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 2H, *H*<sub>A</sub>, *H*<sub>A'</sub>), 7.29 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H, *H*<sub>B</sub>, *H*<sub>B'</sub>), 7.16 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H, *H*-7), 4.08 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 2.85

(dd,  $J = 9.3, 6.6$  Hz, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.77 (dt,  $J = 9.6, 3.9$  Hz, 2H, N-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 2.61 (dd,  $J = 9.3, 6.6$  Hz, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.50–2.40 (m, 2H, N-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>), 2.35–2.26 (m, 2H, C-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 1.77 (ddd,  $J = 13.6, 9.9, 3.6$  Hz, 2H, C-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>), 1.40 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 175.7, 161.3, 149.4, 144.3, 140.8, 139.5, 132.0, 128.9, 128.5 (q, <sup>2</sup> $J = 32.2$  Hz), 125.3 (q, <sup>3</sup> $J = 3.8$  Hz), 124.2 (q, <sup>1</sup> $J = 271.9$  Hz), 116.7, 110.7, 59.8, 53.6, 50.6, 42.8, 35.1, 33.4, 26.4; ESI-HRMS:  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> kalk. für C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> 473.2164, gef. 473.2165.

**1-(3-Fluor-4-(trifluormethyl)phenethyl)-N-(6-methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)-4-methylpiperidin-4-carboxamid (8v)**



Die Synthese erfolgte entsprechend AAV G unter Verwendung von *N*-(6-Methoxy-1,5-naphthyridin-4-yl)-4-methylpiperidin-4-carboxamid **7f** (42 mg, 0.14 mmol) und 3-Fluor-4-(trifluormethyl)phenethyl-4-methylbenzensulfonat **10I** (61 mg, 0.17 mmol, 1.2 eq). Die Reinigung erfolgte über Kieselgel mit Heptan/EtOAc (10–0 %). Beiger Feststoff; Ausbeute 42 mg, 86 μmol, 61 %; HPLC 94 %; Smp. 120–124 °C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.62 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H, *H*-2), 8.46 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H, *H*-3), 8.18 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H, *H*-8), 7.54 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H, *H*-5'), 7.25 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H, *H*-7), 7.23–7.15 (m, 2H, *H*-2', *H*-6'), 4.11 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 2.89 (dd,  $J = 9.4, 6.3$  Hz, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.85–2.75 (m, 2H, N-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 2.69–2.60 (m, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.49 (ddd,  $J = 11.9, 9.4, 2.4$  Hz, 2H, N-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>), 2.36–2.26 (m, 2H, C-(CHH<sub>eq</sub>)<sub>2</sub>), 1.77 (ddd,  $J = 13.4, 9.4, 3.5$  Hz, 2H, C-(CHH<sub>ax</sub>)<sub>2</sub>), 1.40 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 175.66, 161.33, 160.67 (q,  $J = 2.0$  Hz), 158.64 (q,  $J = 1.7$  Hz), 149.38, 147.59 (d,  $J = 7.6$  Hz), 140.83, 140.81, 139.50, 132.01, 126.94 (qd,  $J = 4.5, 1.9$  Hz), 124.27 (d,  $J = 3.4$  Hz), 122.70 (q,  $J = 272.1$  Hz), 116.89 (d,  $J = 20.3$  Hz), 116.68, 116.07 (qd,  $J = 32.9, 12.4$  Hz), 110.70, 59.30, 53.57, 50.53, 42.81, 35.11, 33.25, 26.39; ESI-HRMS:  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> kalk. für C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>F<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> 491.207, gef. 491.206.

## 4.2 MIKROBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

Die Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte, der *in vitro* und *in vivo* Plasmastabilität, die RecA-Reporter Manipulationen sowie die Selektierung der resistenten Mutanten zur Targetevaluierung, wurden am Center for Innovation and Discovery (CDI) des Hackensack Meridian Health (HMH) in New Jersey, USA unter der Leitung von Prof. Thomas Dick durchgeführt. Die Bestimmung der MICs der Testsubstanzen erfolgte zum Teil am CDI und im Arbeitskreis Pharmazeutische Chemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Prof. Dr. Peter Imming.

### 4.2.1 BAKTERIELLE STÄMME UND KULTURMEDIEN

Die Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration erfolgte eigenständig am Center for Discovery and Innovation (CDI) des Hackensack Meridian Health (HMH) in Nutley, New Jersey, USA unter der Leitung von Prof. Thomas Dick. Die verwendeten Spezies stammten aus der American Type Culture Collection (ATCC) oder der Culture Collection University of Gothenburg (CCUG). *Mabs* Bamboo wurde aus dem Sputum eines Patienten mit amyotropher Lateralsklerose und Bronchiektasie isoliert und wurde bereitgestellt durch Wei Chang Huang, Taichung Veterans General Hospital, Taiwan. Über Vergleich der Sequenzen der 16S rRNA, des erm(41)- und rpoB-Gens, konnte das Isolat als Mitglied der *Mabs ssp. abscessus* Unterfamilie klassifiziert werden. *Mabs* Bamboo besitzt ein inaktives erm(41) C28 Sequenvar und ist sensibel gegen Clarithromycin (GenBank accession no. MVDX00000000). *M. avium* 11 wurde aus dem Knochenmark eines Patienten mit erworbenem Immundefektsyndrom (AIDS) mit ausbreitender NTM-Infektion isoliert. Das Isolat wurde bereitgestellt von Jung-Yien Chien und Po-Ren Hsueh, National Taiwan University Hospital, Taipei. Die Sequenzierung des Genoms ergab, dass das Isolat der Unterfamilie *M. avium ssp. hominissuis* zugehörig ist. Die Mykobakterien wurden in Suspension in Middelbrook 7H9 Medium (BD, Difco) mit 0.05 % Tween® 80, 0.2 % Glycerol und 10 % Albumin-Dextrose-Katalase kultiviert. Für die Kultivierung der Mykobakterien auf Kulturplatten wurde Complete Middelbrook 7H10 mit Zusatz von 0.5 % Glycerol und 10 % Middelbrook Oleic Acid-Albumin-Dextrose-Catalase (BD Difco) verwendet. Die Bestimmung erfolgte mit jeweils einem biologischen und einem technischen Replikat.

## 4.2.2 BESTIMMUNG DER *IN VITRO* MHK

Die Bestimmung der MHKs erfolgte durch die Mikroverdünnungsmethode in 96-Wellplatten entsprechend der Literatur.<sup>131</sup>

*Mabs* Bamboo Kulturen wurden aus gefrorenen Stocks ( $OD_{600} = 0.1$ ) generiert. Dazu wurde die Bakterienkultur (60  $\mu$ l) in 12 ml Middelbrookk 7H9 Medium (Becton Dickinson, Difco) in 50 ml konischen Falcon Tubes (Corning 352070 Reynosa, TM) verdünnt und unter Agitation bei 450 rpm und 37 °C im Inkubator 24 h inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte ( $OD_{600}$ ) bestimmt. Bei einem Wert  $OD_{600} = 0.4$ – $0.6$  ist die mid-log Phase mit exponentiellem Wachstum erreicht. Die Kulturen werden für den Assay mit frischem 7H9 Medium auf eine optische Dichte  $OD_{600} = 0.01$  eingestellt. In 96-Well Plates (flat-bottom, Corning Costar) werden zunächst 100  $\mu$ l 7H9 Medium vorgelegt. Anschließend wurde eine 10 mM Urlösung (gelöst in DMSO bzw. EtOH) der Testverbindungen über einen Dispenser der Firma Tecan eingetragen (Tecan D300e Digital Dispenser). Typischerweise wurde eine zweifache Verdünnung mit finalen Konzentrationen von 100–0.78  $\mu$ M erstellt. Danach werden 100  $\mu$ l der auf  $OD_{600} = 0.01$  eingestellten Kultur ergänzt. Das finale Volumen betrug 200  $\mu$ l und die optische Dichte ( $OD_{600} = 0.005$ ) wurde als Wert für die Normalisierung gemessen (Infinite M200 Pro Tecan Plate Reader). Die Plates wurden mit Breathe-Easy sealing membrane (Sigma-Aldrich) verschlossen und zusammen mit feuchtem Zellstoff in luftdichten Containern bei 37 °C auf einem Orbitalschüttler mit 110 rpm für drei Tage inkubiert. Schließlich wurde die finale  $OD_{600}$  nach manueller Resuspendierung mit dem Plattenreader gemessen. Bestimmt wurde die Minimale Hemmkonzentration<sub>90</sub> (MHK<sub>90</sub>). Die MHK<sub>90</sub> wurde definiert als diejenige Konzentration einer Testverbindung, welche das Wachstum der Bakterien zu 90 % inhibiert, verglichen mit einer unbehandelten Kultur.

## 4.2.3 BESTIMMUNG DER BAKTERIZIDIE

Zur Bestimmung der bakteriziden Aktivität wurden die Platten nach der MHK-Bestimmung manuell resuspendiert und 10  $\mu$ l der optisch klaren Verdünnungen auf festem 7H10 Agar vier Tage bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien per Hand ausgezählt. Bestimmt wurde die Minimale Bakterizide Konzentration<sub>90</sub> (MBK<sub>90</sub>). Die MBK<sub>90</sub> wurde definiert als diejenige Kon-

zentration, welche die Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten pro ml (CFU/ml) um 90 % reduzierte, verglichen mit einer unbehandelten Kontrollkultur zum Startzeitpunkt.

## 4.2.4 SELEKTION RESISTENTER MUTANTEN, GENOM- UND TARGETSEQUENZIERUNG

Spontan resistente Mutanten von *Mabs ssp. abscessus* Bamboo und *Mabs ssp. abscessus* ATCC 19977 gegen **844** und **844-TFM** wurden wie zuvor beschrieben erhalten.<sup>132</sup> 107 bis 109 KBE exponentiell wachsender Kulturen wurden auf 7H10-Agar plattiert. Dieser wurde versetzt mit **844**, **844-TFM** (achtfache MIC) oder **MXF** (32fache MIC). Die Platten wurden mit Parafilm versiegelt und für 7 Tage bei 37 °C inkubiert. Resistente Kolonien wurden selektiert, gereinigt und erneut auf 7H10-Agar mit gleicher Konzentration (**844**, **844-TFM**, **MXF**) aufgebracht. Die Extraktion der genomischen DNA erfolgte wie zuvor beschrieben mit der Phenol-Chloroform-Methode.<sup>133</sup> Die Genomsequenzierung, sowie die bioinformatische Analysen wurden von Genewiz (Genewiz, Inc., South AQ: F Plainfield, NJ, USA) durchgeführt. Die ermittelten Polymorphismen in *gyrA* (MAB\_0019) und *gyrB* (MAB\_0006) wurden durch Sanger-Sequenzierung (Genewiz, Inc., South Plainfield, NJ, USA) unter Verwendung entsprechender Primer (*gyrA*: (Fw-*gyrA* 59-GCATCTAAAGCCGCTGAGAACG-39; Rv-*gyrA* 59-GGTCCACGGGGCGT-TCGTTTGC-39); *gyrB*: (Fw-*gyrB* 59-CTGAAACTAGGTGCCGTGGGTGC-39; Rv-*gyrB* 59-CTTGAAC-TACCTGGGCGGGTTACC-39) bestätigt.

## 4.2.5 RECA-REPORTERSTAMM

Um festzustellen, ob die Verbindungen DNA-Schäden verursachen, wurde die Lumineszenz von *Mabs*-Kulturen gemessen, die einen LuxCDABE-Reporter enthalten, der unter der Kontrolle des RecA-Promotors exprimiert wird. Dafür wurde ein RecA-LuxCDABE-Reporterplasmid konstruiert, indem das NotI-EcoRI hsp60-Promotorfragment von pMV306hsp60-LUX<sup>134</sup> (Addgene, 26159), durch den RecA-Promotor von *Mabs ssp. abscessus* ATCC 19977<sup>111</sup> ersetzt wurde. Der RecA-Promotor von *Mabs* wurde mit den Primern Fw-PrecA [NotI, unterstrichen] 5'-gcgcgccgcGTTGGGGGAACCGGTTAC-3' und Rv-PrecA [EcoRI, unterstrichen] 5'-ccggaattcGGTGTTCTCCGTTTCGTGCG-3' unter Verwendung der Phusion™ High-Fidelity DNA Poly-

merase (Fisher Scientific, F530S, USA) amplifiziert. Das resultierende Amplikon wurde mit NotI (New England Biolabs Nr. R31189L) und EcoRI (New England Biolabs Nr. R3101S) verdaut, über Gel gereinigt (Qiagen, Hilden, Deutschland) und in das mit NotI-EcoRI verdaute pMV306hsp60-LUX ligiert, um das Reporterplasmid pMV306recA-LUX<sup>134</sup> zu erhalten. Das Ligationsprodukt wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und auf LB-Agar-Medien mit 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Kanamycin ausplattiert. Das Plasmid wurde durch PCR verifiziert und durch Elektroporation<sup>135</sup> in den Wildtyp *Mabs ssp. abscessus* ATCC19977 und den P4C-resistenten Stamm *Mabs ssp. abscessus* ATCC19977 **844-TFM**<sup>R</sup>-1 (D91N-Allel von GyrA, Tabelle 2) transformiert. Das Ligationsprodukt wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und auf LB-Agar-Medien mit 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Kanamycin ausplattiert. Zur Messung der Wirkung der Testsubstanzen auf die Aktivität des RecA-Promotors wurden exponentiell wachsende Reporterulturen ( $\text{OD}_{600} = 0.4$  bis  $0.8$ ) auf  $\text{OD}_{600} = 0.1$  eingestellt und mit verschiedener Substanzkonzentrationen inkubiert. Die Lumineszenzintensität wurde mit einem TECAN Infinite Pro 200 Plattenreader (Integrationszeit 250 ms mit automatischer Abschwächung) zu Beginn ( $t_0$ ) und nach 4 Stunden ( $t_1$ ) bei 37 °C gemessen. Die Datenanalyse ( $t_1-t_0$ ) wurde mit der Software GraphPad Prism 8 durchgeführt.

## 4.2.6 ZYTOTOXIZITÄTSUNTERSUCHUNG

Die Bestimmung der Zytotoxizität wurde an Institut für Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Prof. René Csuk durchgeführt.

Die Zelllinien wurden vom Institut für Onkologie (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) bezogen. Die Zellen wurden als Monolayer in RPMI 1640-Medium mit L-Glutamin (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Deutschland), ergänzt durch 10 % hitzeinaktiviertes fötales Rinderserum (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und Penicillin/Streptomycin (1 %, Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Deutschland) bei 37 °C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 5 %  $\text{CO}_2$  kultiviert.

Die Zytotoxizität der Verbindungen wurde mit dem kolorimetrischen Mikrokulturtest Sulforhodamin-B (Kiton-Red S, ABCR) bestimmt. Über die Methode wurde bereits mit konfluenten Zellen berichtet.<sup>136-138</sup> Die  $\text{EC}_{50}$ -Werte wurden aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in dreifacher Ausführung durchgeführt wurden, gemittelt und aus semilogarithmischen Dosis-

Wirkungs-Kurven unter Anwendung einer nichtlinearen Hills-Slope-Gleichung (GraphPad Prism5; die Variablen oben und unten wurden auf 100 bzw. 0 gesetzt) berechnet.

Die Zellen wurden zu Beginn in 96-Well-Platten mit angemessener Zelldichte eingebracht, um eine Konfluenz der Zellen während des Versuchszeitraums zu verhindern. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen (1, 3, 7, 12, 20 und 30  $\mu\text{M}$ ) behandelt. Die Endkonzentration von DMSO/DMF (Lösungsmittel) betrug höchstens 0,5 % und war für die Zellen nicht toxisch. Nach 72 Stunden wurde das überstehende Medium aus den 96-Well-Platten verworfen. Anschließend wurden die Zellen mit 10 %iger Trichloressigsäure fixiert und ruhten bei 4 °C. Nach 24 Stunden wurden die Zellen in einem strip washer gewaschen und 20 Minuten lang mit SRB-Lösung (200  $\mu\text{l}$ , 10 mM) gefärbt. Dann wurden die Platten viermal mit 1 %iger Essigsäure gewaschen, um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen, und über Nacht an der Luft getrocknet. Tris-Base-Lösung (200  $\mu\text{L}$ , 10 mM) wurde in jedes Well gegeben. Die Absorption wurde mit einem 96-Well-Plattenlesegerät von Tecan Spectra gemessen.

### 4.3 *IN SILICO* MODELLIERUNG UND DOCKING

Die *in silico* Experimente wurden von Dina Robaa am Institut für Pharmazie der Martin-Luther-Universität durchgeführt.

Homologie-Modellierung: Das Homologiemodell von GyrA von *Mabs* (Uniprot-Zugangsnummer B1ME58) wurde mit Modeller<sup>139</sup> Version 9.11 auf der Grundlage der verfügbaren *S. aureus*-Kristallstruktur mit AM8191 (PDB ID 4PLB) erstellt. Die Sequenzausrichtung wurde zunächst in MOE v.2019.1 (Chemical Computing Group ULC, Montreal, Kanada) durchgeführt. Die erhaltene Alignment-Datei wurde dann zur Erstellung des Homologiemodells verwendet; der kokristallisierte Ligand sowie das Wassermolekül in der Bindungsstelle wurden während des Homologiemodellierungsverfahrens beibehalten.

#### Docking

Die Proteinvorbereitung wurde mit dem Softwarepaket Schrödinger's Protein Preparation Wizard (Schrödinger Suite 2019-1, Schrödinger, New York, NY, USA) wie folgt durchgeführt: Die Wasserstoffatome wurden hinzugefügt und die Protonierungszustände zugewiesen. Das Was-

sermolekül im aktiven Zentrum wurde beibehalten. Anschließend wurden die Wasserstoffbrückennetzwerke und die Protonierungszustände der Aminosäurereste mit PROPKA optimiert. Der Komplex wurde schließlich einem Energieminimierungsschritt mit dem OPLS3e-Kraftfeld in den Standardeinstellungen unterzogen. Schließlich wurde ein Rezeptorgitter mit den Standardeinstellungen erzeugt, indem der kokristallisierte Ligand als Zentrum des Gitters zugewiesen wurde.

Die Liganden wurden zunächst mit dem Tool LigPrep (Schrödinger Release 2019-1: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019) für das Docking vorbereitet: Das OPLS3e-Kraftfeld wurde für die Minimierung verwendet, der Protonierungszustand bei  $\text{pH } 7.0 \pm 1$  wurde mit Epik generiert. Andere Einstellungen wurden als Standard beibehalten. Anschließend wurden maximal 20 Konformere der vorbereiteten Liganden mit dem in Schrödinger implementierten Modul ConfGen (Schrödinger Suite 2019-1, Schrödinger, New York, NY, USA) erzeugt.

Das molekulare Docking wurde mit Glide (Schrödinger Release 2019-1: Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, USA) im Standard-Präzisionsmodus durchgeführt, um die generierten Ligandenkonformationen an die vorbereitete Proteinstruktur zu docken. Es wurden die Standardeinstellungen ohne Einschränkungen verwendet. Die Anzahl der Docking-Posen wurde für die Post-Docking-Minimierung pro Ligand auf 20 erhöht und die maximale Anzahl der ausgegebenen Posen pro Ligand auf zwei festgelegt.

## 4.4 BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

### 4.4.1 GEWINNUNG DER REKOMBINANTEN *MABS* DNA GYRASE

Die Gewinnung der rekombinanten Gyrasen erfolgte anhand der Literatur.<sup>109</sup> Das Verfahren wurde auf *Mabs ssp. abs* ATCC 19977 angewendet.

Zunächst wurden die Aminosäuren 2–675 für GyrB und 2–839 für GyrA aus dem Genom von Wildtyp *Mabs ssp. abs* ATCC 19977 mit Hilfe der Primer Fw-*gyrA* (NheI, unterstrichen) 5′-gcagcagctagc-ATGACTGACACAACGCTGCCCCC-3′, Rv-*gyrA* (HindIII, unterstrichen) 5′-tgctgc-aagcttTTACTCG-CCTGCGGTCGTGCCGGC-3′, Fw-*gyrB* (NdeI, unterstrichen) 5′-gcagcacatag-

GCTGCCAGAAGAA-GAGTGCCAAG-3' und Rv-*gyrB* (NheI, unterstrichen) 5'-tgctgcgctagc-TACGTCGAGGAAGCGCA-CGTCC-3' amplifiziert. Die beiden Abschnitte wurden mit einem Alanin-Serin-Linker fusioniert und in einen Vektor (pET-28a(+)) kloniert sowie mit einem N-terminalen Polyhistitintag versehen. Dafür wurden die Restriktionsenzyme NdeI (R0111S), NheI (R3131S) und HindIII (R3104M) von New England Biolabs verwendet. Dadurch wurden das Plasmid pET28a+*gyrBA* wt erhalten. Für die Expression der mutierten resistenten GyrA D91N wurde das benötigte Gen von Genewiz (Leipzig, Deutschland) synthetisiert. Daraus wurde das analoge Plasmid pET28a+*gyrBA*<sup>D91N</sup> erhalten. Die beiden Plasmide wurden in *E. coli* BL21 (DE3) pLysE transformiert. Dafür wurden die Zellen bei 37 °C bis zur frühen log-Phase kultiviert. Um die Expression der Proteine zu induzieren, wurden die Kulturen für drei Stunden mit 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (Sigma-Aldrich, USA) bei 30 °C behandelt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und in Pufferlösung A500 (20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol, pH 8.0) und Halt Protease Inhibitor Cocktail [100x], 78429 (Thermo Scientific, USA) (4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid-hypochlorid (AEBSF), Aprotinin, Bestatin, E64, Leupeptin, Pepstatin A) resuspendiert, mit Ultraschall behandelt und zentrifugiert (8000 rpm, 4 °C). Das klare Lysat wurde auf eine Chromatographiesäule geladen und die mit dem His-Tag versehenen Gyr-Proteine durch Nickel-Affinitätschromatographie immobilisiert. Die Säule (IMAC nickel resin, 1560131, Bio-Rad, USA) wurde zuvor mit Pufferlösung A500 äquilibriert. Dann wurde das geklärte Zelllysate geladen. Nach der Immobilisierung wurde mit 10 Säulenvolumen Pufferlösung A500 gewaschen, um Verunreinigungen zu entfernen. Schließlich wurde das Protein mit Pufferlösung B500 (20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 500 mM NaCl, 250 mM Imidazol, Proteaseinhibitoren) eluiert. Die Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht bei 4 °C gegen Pufferlösung A500 dialysiert. Für die biochemischen Assays wurde das Protein mit einem Pierce protein concentrator PES (10K MWCO, 5–20 ml, Thermo Scientific, USA) konzentriert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

## 4.4.2 BESTIMMUNG DER IC<sub>50</sub>-WERTE GEGEN *MABS* DNA GYRASE

Der mykobakterielle DNA-Gyrase-Inhibitionsassay wurde mit dem Kit von Inspiralis Limited (MTS002, Norwich, UK) durchgeführt. Anstelle der rekombinanten *Mtb*-DNA-Gyrase aus dem Kit wurde rekombinante DNA-Gyrase von *Mabs* verwendet. Der Test wurde mit einem finalen Volumen von 30  $\mu$ L durchgeführt. Die Probenlösung enthielt 50 mM HEPES KOH (pH 7.9), 6 mM Magnesiumacetat, 4 mM DTT, 1 mM ATP, 100 mM Kaliumglutamat, 2 mM Spermidin, 0.05 mg/mL Rinderserumalbumin, 40 nM der Wildtyp- oder GyrA D91N-Mutante-DNA-Gyrase und 0.5  $\mu$ L (1  $\mu$ g/ $\mu$ L) relaxierte pBR322-DNA. Das Gemisch wurde 30 Minuten lang bei 37 °C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 30  $\mu$ L Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) und 30  $\mu$ L STEB-Lösung (40 % Saccharose, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM EDTA und 0.5 mg/mL Bromphenolblau) gestoppt. Die Tubes wurden kurz geschüttelt (Vortex) und 1 Minute lang zentrifugiert. 20  $\mu$ L der wässrigen (oberen blauen) Phase wurden auf Agarosegel (1 % w/v) gegeben. Das Gel wurde 2 Stunden lang bei 75 V entwickelt und mit wässriger Ethidiumbromidlösung (1  $\mu$ g/mL) gefärbt. Anschließend wurden die Gele 10 min mit Wasser entfärbt. Die aufgenommenen Bilder wurden mit dem iBright™ FL1000-Imaging-System von Invitrogen analysiert. Zur Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte wurde die Intensität der Banden gemessen und mit Hilfe der iBright-Analysesoftware mit den substanzfreien Referenzen verglichen. Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden mit der Software GraphPad Prism 8.0.1 durch nicht-regressive Modellanpassung bestimmt.

## 4.4.3 HERG AKTIVITÄTSBESTIMMUNG

Die Bestimmung der hERG-Aktivität von **844-TFM** erfolgte durch Bioduro-Sundia (BioDuro, Shanghai). Cisaprid wurde als Referenzsubstanz verwendet.

## 4.5 PHARMAKOKINETISCHE UNTERSUCHUNGEN

### 4.5.1 LÖSLICHKEITSBESTIMMUNG

Die Bestimmung der kinetischen Löslichkeit der Substanzen **8s** und **8r** erfolgte am Institut für Pharmazie der Martin-Luther-Universität. Eine 25 mM Stammlösung der Testsubstanzen in DMSO wurde angefertigt. Aus der Stammlösung wurden eine äquidistante (25–7.5 mM) und eine logarithmische (5–0.39 mM) Verdünnungsreihe mit DMSO und einem finalen Volumen von 25 µl hergestellt. Für die Messlösungen wurden jeweils 5 µl der Verdünnungsreihe in 245 µl PBS (pH 7.4) überführt und in einer 96-Wellplate gemischt. Als Kontrolllösung wurden freie Wells mit 5 µl DMSO und 245 µl PBS befüllt. Hierdurch ergaben sich ein äquidistanter Konzentrationsbereich von 500–150 µM und ein logarithmischer Konzentrationsbereich von 100–0.78 µM. Anschließend wurde die Verdünnungsreihe am Nephelometer (Nephelostar Plus, BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland) vermessen. Nach grafischer Auswertung der Messwerte und linearer Regression der Achsenabschnitte wurde die Löslichkeit aus dem Schnittpunkt der Regressionsgeraden ermittelt.

### 4.5.2 *IN VITRO* PLASMASTABILITÄT

Die Stabilitätstests wurden mit Plasma von weiblichen CD-1-Mäusen, weißen Neuseeland-Kaninchen und vom Menschen unter Zusatz von K<sub>2</sub>EDTA als Antikoagulanzen (Bioreclamation) durchgeführt. Für die Proben wurden 5 µl der Stammlösung der Verbindung **844-TFM** in 100 % DMSO mit 95 µl Plasma versetzt, um eine Endkonzentration von 1 µg/ml zu erreichen. Die Proben wurden bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Zu den Messzeiten (5 min, 15 min, 30 min, 60 min, 180 min) wurden 10 µl entnommen und mit 100 µl 1:1 Acetonitril/Methanol, 10 ng/mL Verapamil und 10 µl 1:1 Acetonitril/Wasser versetzt. Die Proben wurden mittels LC-MS/MS mit einem hochauflösenden Massenspektrometer Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific) mit einer Massengenauigkeit von 5 ppm vermessen. Die Stabilität wurde berechnet als der prozentuale Anteil der verbleibenden Stammverbindung im Vergleich zur ursprünglichen Konzentration.

### 4.5.3 *IN VITRO* PHARMAKOKINETIK

Die Bestimmung der kinetischen Löslichkeit und der mikrosomalen Stabilität sowie der PAMPA Permeabilitätsassay von **844-TFM** wurden von Bioduro-Sundia (BioDuro, Shanghai) durchgeführt.

### 4.5.4 *IN VIVO* STABILITÄTSUNTERSUCHUNG

Die LC-MS/MS-Analyse wurde auf einem Sciex Applied Biosystems Qtrap 6500+ Triple-Quadrupol-Massenspektrometer durchgeführt, das mit einem Agilent 1260 HPLC-System gekoppelt war, um die Analyten im Plasma zu quantifizieren. Die Kalibrierung erfolgte durch Kalibrierlösungen, welche aus Stammlösungen von **844-TFM** und **8v** in DMSO (1 mg/mL) durch serielle Verdünnung mit 50/50 Acetonitril-Wasser hergestellt wurden. 10 µL dieser Verdünnungslösungen wurden mit 90 µL substanzfreiem Plasma (CD-1 K<sub>2</sub>EDTA Mouse, Bioreclamation IVT) versetzt. 20 µL der Kalibrierlösung bzw. der Untersuchungsprobe wurden mit Acetonitril/Methanol 50/50 zu 200 µL versetzt. Verpamil wurde als interner Standard (10 ng/mL) zugesetzt. Die Proben wurden für 5 Minuten geschüttelt (Vortex) und für 5 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. 100 µL des Überstands wurden mit 100 µL deionisiertem Milli-Q-Wasser verdünnt und mittels HPLC-MS/MS analysiert.

Die Chromatographie erfolgte mit einer Agilent Zorbax SB-C8-Säule (2.1x30 mm; Partikelgröße 3.5 µm) und Wasser (Milli-Q deionisiert)/Acetonitril (Gradient) mit 0.1 % Ameisensäure als mobile Phase. Zur Quantifizierung wurde die Fragmentierung der Analyten im Elektrospray-Modus mit positiver Ionisierung genutzt. Folgende Ionen-Fragmente wurden für die Quantifizierung verwendet: **844-TFM** (459.10/133.00), **8v** (473.2/270) und **Verapamil** (455.4/165.2). Die Probenanalyse wurde akzeptiert, wenn die Konzentrationen der Qualitätskontrollproben innerhalb von 20 % des Nominalwerts lagen. Die Datenverarbeitung erfolgte mit der Software Analyst (Version 1.6.2; Applied Biosystems Sciex).

## 5 REFERENZEN

---

- (1) Johansen, M. D.; Herrmann, J.-L.; Kremer, L. Non-tuberculous mycobacteria and the rise of *Mycobacterium abscessus*. *Nature Reviews Microbiology* **2020**, *18*, 392–407.
- (2) Ratnatunga, C. N.; Lutzky, V. P.; Kupz, A.; Doolan, D. L.; Reid, D. W.; Field, M.; Bell, S. C.; Thomson, R. M.; Miles, J. J. The Rise of Non-Tuberculosis Mycobacterial Lung Disease. *Frontiers in Immunology* **2020**, *11*, 303.
- (3) Johnson, M. M.; Odell, J. A. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. *Journal of Thoracic Disease* **2014**, *6*, 210–220.
- (4) Koh, W.-J.; Kwon, O. J.; Lee, K. S. Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Diseases in Immunocompetent Patients. *Korean Journal of Radiology* **2002**, *3*, 145.
- (5) Forbes, B. A.; Kraft, C. S. Mycobacterial Taxonomy. *Journal of Clinical Microbiology* **2017**, *55*, 380–383.
- (6) van Ingen, J.; Boeree, M. J.; van Soolingen, D.; Mouton, J. W. Resistance mechanisms and drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy* **2012**, *15*, 149–161.
- (7) Yee-Kuen Yam, Characterization of Current and Novel Antibacterials Against *Mycobacterium Abscessus* Persisters, Dissertation, Penn State University, 2020.
- (8) Gutiérrez, A. V.; Viljoen, A.; Ghigo, E.; Herrmann, J.-L.; Kremer, L. Glycopeptidolipids, a Double-Edged Sword of the *Mycobacterium abscessus* Complex. *Frontiers in Microbiology* **2018**, *9*, E943.
- (9) Clary, G.; Sasindran, S. J.; Nesbitt, N.; Mason, L.; Cole, S.; Azad, A.; McCoy, K.; Schlesinger, L. S.; Hall-Stoodley, L. *Mycobacterium abscessus* Smooth and Rough Morphotypes Form Antimicrobial-Tolerant Biofilm Phenotypes but Are Killed by Acetic Acid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2018**, *62*, 2920.
- (10) Ringshausen, F. C.; Wagner, D.; Roux, A. de; Diel, R.; Hohmann, D.; Hickstein, L.; Welte, T.; Rademacher, J. Prevalence of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease, Germany, 2009–2014. *Emerging Infectious Diseases* **2016**, *22*, 1102–1105.

- (11) Donohue, M. J.; Wymer, L. Increasing Prevalence Rate of Nontuberculous Mycobacteria Infections in Five States, 2008–2013. *Annals of the American Thoracic Society* **2016**, *13*, 2143–2150.
- (12) Mirsaeidi, M.; Farshidpour, M.; Allen, M. B.; Ebrahimi, G.; Falkinham, J. O. Highlight on Advances in Nontuberculous Mycobacterial Disease in North America. *BioMed Research International* **2014**, *2014*, 1–10.
- (13) Brode, S. K.; Marchand-Austin, A.; Jamieson, F. B.; Marras, T. K. Pulmonary versus Nonpulmonary Nontuberculous Mycobacteria, Ontario, Canada. *Emerging Infectious Diseases* **2017**, *23*, 1898–1901.
- (14) Moore, J. E.; Kruijshaar, M. E.; Ormerod, L. P.; Drobniewski, F.; Abubakar, I. Increasing reports of non-tuberculous mycobacteria in England, Wales and Northern Ireland, 1995-2006. *BMC Public Health* **2010**, *10*, 202.
- (15) Lee, H.; Myung, W.; Koh, W.-J.; Moon, S. M.; Jhun, B. W. Epidemiology of Nontuberculous Mycobacterial Infection, South Korea, 2007-2016. *Emerging Infectious Diseases* **2019**, *25*, 569–572.
- (16) Daley, C. L.; Iaccarino, J. M.; Lange, C.; Cambau, E.; Wallace, R. J.; Andrejak, C.; Böttger, E. C.; Brozek, J.; Griffith, D. E.; Guglielmetti, L.; Huitt, G. A.; Knight, S. L.; Leitman, P.; Marras, T. K.; Olivier, K. N.; Santin, M.; Stout, J. E.; Tortoli, E.; van Ingen, J.; Wagner, D.; Winthrop, K. L. Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease: An Official ATS/ERS/ESCMID/IDSA Clinical Practice Guideline: Executive Summary. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* **2020**, *71*, e1-e36.
- (17) Nash, K. A.; Brown-Elliott, B. A.; Wallace, R. J. A Novel Gene, erm (41), Confers Inducible Macrolide Resistance to Clinical Isolates of *Mycobacterium abscessus* but Is Absent from *Mycobacterium chelonae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2009**, *53*, 1367–1376.
- (18) Bastian, S.; Veziris, N.; Roux, A.-L.; Brossier, F.; Gaillard, J.-L.; Jarlier, V.; Cambau, E. Assessment of Clarithromycin Susceptibility in Strains Belonging to the *Mycobacterium abscessus* Group by erm (41) and rrl Sequencing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2011**, *55*, 775–781.

- (19) Egorova, A.; Jackson, M.; Gavrilyuk, V.; Makarov, V. Pipeline of anti- *Mycobacterium abscessus* small molecules: Repurposable drugs and promising novel chemical entities. *Medicinal Research Reviews* **2021**, *41*, 2350–2387.
- (20) Aziz, D. b.; Low, J. L.; Wu, M.-L.; Gengenbacher, M.; Teo, J. W. P.; Dartois, V.; Dick, T. Rifabutin Is Active against *Mycobacterium abscessus* Complex. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2017**, *61*.
- (21) Pryjma, M.; Burian, J.; Thompson, C. J. Rifabutin Acts in Synergy and Is Bactericidal with Frontline *Mycobacterium abscessus* Antibiotics Clarithromycin and Tigecycline, Suggesting a Potent Treatment Combination. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2018**, *62*, 123.
- (22) Dick, T.; Shin, S. J.; Koh, W.-J.; Dartois, V.; Gengenbacher, M. Rifabutin Is Active against *Mycobacterium abscessus* in Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2020**, *64*.
- (23) Ganapathy, U. S.; Dartois, V.; Dick, T. Repositioning rifamycins for *Mycobacterium abscessus* lung disease. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2019**, *14*, 867–878.
- (24) Cheng, A.; Sun, H.-Y.; Wu, U.-i.; Sheng, W.-H.; Chen, Y.-C.; Chang, S.-C. 1360. Disseminated *Mycobacterium abscessus* Infections in Patients with Neutralizing Anti-interferon-gamma Auto-antibodies Treated with Rifabutin-based Combination Regimens. *Open Forum Infectious Diseases* **2019**, *6*, S492-S493.
- (25) Brown-Elliott, B. A.; Wallace, R. J.; Land, G. A. In Vitro Susceptibility Testing of Tedizolid against Nontuberculous Mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology* **2017**, *55*, 1747–1754.
- (26) Compain, F.; Soroka, D.; Heym, B.; Gaillard, J.-L.; Herrmann, J.-L.; Dorchène, D.; Arthur, M.; Dubée, V. In vitro activity of tedizolid against the *Mycobacterium abscessus* complex. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **2018**, *90*, 186–189.
- (27) Dupont, C.; Viljoen, A.; Thomas, S.; Roquet-Banères, F.; Herrmann, J.-L.; Pethe, K.; Kremer, L. Bedaquiline Inhibits the ATP Synthase in *Mycobacterium abscessus* and Is Effective in Infected Zebrafish. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2017**, *61*, 1051.
- (28) Obregón-Henao, A.; Arnett, K. A.; Henao-Tamayo, M.; Massoudi, L.; Creissen, E.; Andries, K.; Lenaerts, A. J.; Ordway, D. J. Susceptibility of *Mycobacterium abscessus* to Antimycobacterial Drugs in Preclinical Models. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2015**, *59*, 6904–6912.

- (29) Philley, J. V.; Wallace, R. J.; Benwill, J. L.; Taskar, V.; Brown-Elliott, B. A.; Thakkar, F.; Aksamit, T. R.; Griffith, D. E. Preliminary Results of Bedaquiline as Salvage Therapy for Patients With Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease. *Chest* **2015**, *148*, 499–506.
- (30) Grillot, A.-L.; Le Tiran, A.; Shannon, D.; Krueger, E.; Liao, Y.; O'Dowd, H.; Tang, Q.; Ronkin, S.; Wang, T.; Waal, N.; Li, P.; Lauffer, D.; Sizensky, E.; Tanoury, J.; Perola, E.; Grossman, T. H.; Doyle, T.; Hanzelka, B.; Jones, S.; Dixit, V.; Ewing, N.; Liao, S.; Boucher, B.; Jacobs, M.; Bennani, Y.; Charifson, P. S. Second-Generation Antibacterial Benzimidazole Ureas: Discovery of a Preclinical Candidate with Reduced Metabolic Liability. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *57*, 8792–8816.
- (31) Locher, C. P.; Jones, S. M.; Hanzelka, B. L.; Perola, E.; Shoen, C. M.; Cynamon, M. H.; Ngwane, A. H.; Wiid, I. J.; van Helden, P. D.; Betoudji, F.; Nuermberger, E. L.; Thomson, J. A. A Novel Inhibitor of Gyrase B Is a Potent Drug Candidate for Treatment of Tuberculosis and Nontuberculosis Mycobacterial Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2015**, *59*, 1455–1465.
- (32) Lister, T.; Utey, L.; Bleavins, M., A GLP 28 Day Repeat Dose Toxicology Study of SPR720 in Monkeys.: Poster presented at: ASM Microbe 2019. San Francisco CA, USA, 21.06.2019, <https://7kh1s27nul32laip2jdnb518-wpengine.netdna-ssl.com/wp-content/uploads/2019/06/720-NCD-Poster.pdf>, 08.02.2022.
- (33) Talley, A. K.; Thurston, A.; Moore, G.; Gupta, V. K.; Satterfield, M.; Manyak, E.; Stokes, S.; Dane, A.; Melnick, D. First-in-Human Evaluation of the Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of SPR720, a Novel Oral Bacterial DNA Gyrase (GyrB) Inhibitor for Mycobacterial Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2021**, *65*.
- (34) Zhang, B.; Li, J.; Yang, X.; Wu, L.; Zhang, J.; Yang, Y.; Zhao, Y.; Zhang, L.; Yang, X.; Yang, X.; Cheng, X.; Liu, Z.; Jiang, B.; Jiang, H.; Guddat, L. W.; Yang, H.; Rao, Z. Crystal Structures of Membrane Transporter MmpL3, an Anti-TB Drug Target. *Cell* **2019**, *176*, 636-648.e13.
- (35) Li, W.; Stevens, C. M.; Pandya, A. N.; Darzynkiewicz, Z.; Bhattarai, P.; Tong, W.; Gonzalez-Juarrero, M.; North, E. J.; Zgurskaya, H. I.; Jackson, M. Direct Inhibition of MmpL3 by Novel Antitubercular Compounds. *Infectious Diseases* **2019**, *5*, 1001–1012.
- (36) Yang, X.; Hu, T.; Yang, X.; Xu, W.; Yang, H.; Guddat, L. W.; Zhang, B.; Rao, Z. Structural Basis for the Inhibition of Mycobacterial MmpL3 by NITD-349 and SPIRO. *Journal of Molecular Biology* **2020**, *432*, 4426–4434.

(37) Franz, N. D.; Belardinelli, J. M.; Kaminski, M. A.; Dunn, L. C.; Calado Nogueira de Moura, V.; Blaha, M. A.; Truong, D. D.; Li, W.; Jackson, M.; North, E. J. Design, synthesis and evaluation of indole-2-carboxamides with pan anti-mycobacterial activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2017**, *25*, 3746–3755.

(38) Pandya, A. N.; Prathipati, P. K.; Hegde, P.; Li, W.; Graham, K. F.; Mandal, S.; Drescher, K. M.; Destache, C. J.; Ordway, D.; Jackson, M.; North, E. J. Indole-2-Carboxamides Are Active against *Mycobacterium abscessus* in a Mouse Model of Acute Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2019**, *63*.

(39) Lun, S.; Guo, H.; Onajole, O. K.; Pieroni, M.; Gunosewoyo, H.; Chen, G.; Tipparaju, S. K.; Ammerman, N. C.; Kozikowski, A. P.; Bishai, W. R. Indoleamides are active against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Communications* **2013**, *4*, 223.

(40) Dupont, C.; Viljoen, A.; Dubar, F.; Blaise, M.; Bernut, A.; Pawlik, A.; Bouchier, C.; Brosch, R.; Guérardel, Y.; Lelièvre, J.; Ballell, L.; Herrmann, J.-L.; Biot, C.; Kremer, L. A new piperidinol derivative targeting mycolic acid transport in *Mycobacterium abscessus*. *Molecular Microbiology* **2016**, *101*, 515–529.

(41) Ruyck, J.; Dupont, C.; Lamy, E.; Le Moigne, V.; Biot, C.; Guérardel, Y.; Herrmann, J.-L.; Blaise, M.; Grassin-Delyle, S.; Kremer, L.; Dubar, F. Structure-Based Design and Synthesis of Piperidinol-Containing Molecules as New *Mycobacterium abscessus* Inhibitors. *ChemistryOpen* **2020**, *9*, 351–365.

(42) Ketron, A. C.; Osheroff, N. DNA Topology and Topoisomerases. In *Molecular Life Sciences: An Encyclopedic Reference*; Wells, R. D., Bond, J. S., Klinman, J., Masters, B. S. S., Eds.; Springer New York: New York, NY, 2018; pp 261–278.

(43) Wang, J. C. Cellular roles of DNA topoisomerases: A molecular perspective. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2002**, *3*, 430–440.

(44) Soczek, K. M.; Grant, T.; Rosenthal, P. B.; Mondragón, A. CryoEM structures of open dimers of gyrase A in complex with DNA illuminate mechanism of strand passage. *eLife* **2018**, *7*, 213.

(45) Basu, A.; Parente, A. C.; Bryant, Z. Structural Dynamics and Mechanochemical Coupling in DNA Gyrase. *Journal of Molecular Biology* **2016**, *428*, 1833–1845.

- (46) Mustaev, A.; Malik, M.; Zhao, X.; Kurepina, N.; Luan, G.; Oppegard, L. M.; Hiasa, H.; Marks, K. R.; Kerns, R. J.; Berger, J. M.; Drlica, K. Fluoroquinolone-Gyrase-DNA Complexes. *Journal of Biological Chemistry* **2014**, *289*, 12300–12312.
- (47) Alvarez-Freites, E. J.; Carter, J. L.; Cynamon, M. H. In Vitro and In Vivo Activities of Gatifloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2002**, *46*, 1022–1025.
- (48) Maurer, F. P.; Bruderer, V. L.; Ritter, C.; Castelberg, C.; Bloemberg, G. V.; Böttger, E. C. Lack of Antimicrobial Bactericidal Activity in *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2014**, *58*, 3828–3836.
- (49) Gillespie, S. H.; Billington, O. Activity of moxifloxacin against mycobacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **1999**, *44*, 393–395.
- (50) Negatu, D. A.; Beuchel, A.; Madani, A.; Alvarez, N.; Chen, C.; Aragaw, W. W.; Zimmerman, M. D.; Laleu, B.; Gengenbacher, M.; Dartois, V.; Imming, P.; Dick, T. Piperidine-4-carboxamides target DNA gyrase in *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2021**.
- (51) Kolarič, A.; Anderluh, M.; Minovski, N. Two Decades of Successful SAR-Grounded Stories of the Novel Bacterial Topoisomerase Inhibitors (NBTIs). *Journal of Medicinal Chemistry* **2020**, *63*, 5664–5674.
- (52) Black, M. T.; Stachyra, T.; Platel, D.; Girard, A.-M.; Claudon, M.; Bruneau, J.-M.; Miossec, C. Mechanism of action of the antibiotic NXL101, a novel nonfluoroquinolone inhibitor of bacterial type II topoisomerases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2008**, *52*, 3339–3349.
- (53) Bax, B. D.; Chan, P. F.; Eggleston, D. S.; Fosberry, A.; Gentry, D. R.; Gorrec, F.; Giordano, I.; Hann, M. M.; Hennessy, A.; Hibbs, M.; Huang, J.; Jones, E.; Jones, J.; Brown, K. K.; Lewis, C. J.; May, E. W.; Saunders, M. R.; Singh, O.; Spitzfaden, C. E.; Shen, C.; Shillings, A.; Theobald, A. J.; Wohlkonig, A.; Pearson, N. D.; Gwynn, M. N. Type IIA topoisomerase inhibition by a new class of antibacterial agents. *Nature* **2010**, *466*, 935–940.
- (54) Biedenbach, D. J.; Bouchillon, S. K.; Hackel, M.; Miller, L. A.; Scangarella-Oman, N. E.; Jakielaszek, C.; Sahm, D. F. In Vitro Activity of Gepotidacin, a Novel Triazaacenaphthylene Bacterial Topoisomerase Inhibitor, against a Broad Spectrum of Bacterial Pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2016**, *60*, 1918–1923.

(55) Reck, F.; Ehmann, D. E.; Dougherty, T. J.; Newman, J. V.; Hopkins, S.; Stone, G.; Agrawal, N.; Ciaccio, P.; McNulty, J.; Barthlow, H.; O'Donnell, J.; Goteti, K.; Breen, J.; Comita-Prevoir, J.; Cornebise, M.; Cronin, M.; Eyermann, C. J.; Geng, B.; Carr, G. R.; Pandarinathan, L.; Tang, X.; Cotton, A.; Zhao, L.; Bezdenezhnik-Snyder, N. Optimization of physicochemical properties and safety profile of novel bacterial topoisomerase type II inhibitors (NBTIs) with activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2014**, *22*, 5392–5409.

(56) Okumu, A.; Lu, Y.; Dellos-Nolan, S.; Papa, J. L.; Koci, B.; Cockroft, N. T.; Gallucci, J.; Wozniak, D. J.; Yalowich, J. C.; Mitton-Fry, M. J. Novel bacterial topoisomerase inhibitors derived from isomannide. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2020**, *199*, 112324.

(57) Singh, S. B.; Kaelin, D. E.; Wu, J.; Miesel, L.; Tan, C. M.; Meinke, P. T.; Olsen, D.; Lagrutta, A.; Bradley, P.; Lu, J.; Patel, S.; Rickert, K. W.; Smith, R. F.; Soisson, S.; Wei, C.; Fukuda, H.; Kishii, R.; Takei, M.; Fukuda, Y. Oxabicyclooctane-linked novel bacterial topoisomerase inhibitors as broad spectrum antibacterial agents. *Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *5*, 609–614.

(58) Li, L.; Okumu, A.; Dellos-Nolan, S.; Li, Z.; Karmahapatra, S.; English, A.; Yalowich, J. C.; Wozniak, D. J.; Mitton-Fry, M. J. Synthesis and anti-staphylococcal activity of novel bacterial topoisomerase inhibitors with a 5-amino-1,3-dioxane linker moiety. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2018**, *28*, 2477–2480.

(59) Mitton-Fry, M. J.; Brickner, S. J.; Hamel, J. C.; Barham, R.; Brennan, L.; Casavant, J. M.; Ding, X.; Finegan, S.; Hardink, J.; Hoang, T.; Huband, M. D.; Maloney, M.; Marfat, A.; McCurdy, S. P.; McLeod, D.; Subramanyam, C.; Plotkin, M.; Reilly, U.; Schafer, J.; Stone, G. G.; Uccello, D. P.; Wisialowski, T.; Yoon, K.; Zaniewski, R.; Zook, C. Novel 3-fluoro-6-methoxyquinoline derivatives as inhibitors of bacterial DNA gyrase and topoisomerase IV. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2017**, *27*, 3353–3358.

(60) Bradford, P. A.; Miller, A. A.; O'Donnell, J.; Mueller, J. P. Zoliflodacin: An Oral Spiropyrimidinetrione Antibiotic for the Treatment of *Neisseria gonorrhoeae*, Including Multi-Drug-Resistant Isolates. *Infectious Diseases* **2020**, *6*, 1332–1345.

(61) Basarab, G. S.; Doig, P.; Galullo, V.; Kern, G.; Kimzey, A.; Kutschke, A.; Newman, J. P.; Morningstar, M.; Mueller, J.; Otterson, L.; Vishwanathan, K.; Zhou, F.; Gowravaram, M. Discovery of Novel DNA Gyrase Inhibiting Spiropyrimidinetriones: Benzisoxazole Fusion with N-Linked Oxa-

zolidinone Substituents Leading to a Clinical Candidate (ETX0914). *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *58*, 6264–6282.

(62) Huband, M. D.; Bradford, P. A.; Otterson, L. G.; Basarab, G. S.; Kutschke, A. C.; Giacobbe, R. A.; Patey, S. A.; Alm, R. A.; Johnstone, M. R.; Potter, M. E.; Miller, P. F.; Mueller, J. P. In Vitro Antibacterial Activity of AZD0914, a New Spiropyrimidinetrione DNA Gyrase/Topoisomerase Inhibitor with Potent Activity against Gram-Positive, Fastidious Gram-Negative, and Atypical Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2014**, *59*, 467–474.

(63) Chan, P. F.; Germe, T.; Bax, B. D.; Huang, J.; Thalji, R. K.; Bacqué, E.; Checchia, A.; Chen, D.; Cui, H.; Ding, X.; Ingraham, K.; McCloskey, L.; Raha, K.; Srikannathasan, V.; Maxwell, A.; Stavenger, R. A. Thiophene antibacterials that allosterically stabilize DNA-cleavage complexes with DNA gyrase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2017**, *114*, E4492-E4500.

(64) Blanco, D.; Perez-Herran, E.; Cacho, M.; Ballell, L.; Castro, J.; González del Río, R.; Lavandera, J. L.; Remuiñán, M. J.; Richards, C.; Rullas, J.; Vázquez-Muñiz, M. J.; Woldu, E.; Zapatero-González, M. C.; Angulo-Barturen, I.; Mendoza, A.; Barros, D. *Mycobacterium tuberculosis* gyrase inhibitors as a new class of antitubercular drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2015**, *59*, 1868–1875.

(65) Hameed P, S.; Patil, V.; Solapure, S.; Sharma, U.; Madhavapeddi, P.; Raichurkar, A.; Chinna-pattu, M.; Manjrekar, P.; Shanbhag, G.; Puttur, J.; Shinde, V.; Menasinakai, S.; Rudrapatana, S.; Achar, V.; Awasthy, D.; Nandishaiah, R.; Humnabadkar, V.; Ghosh, A.; Narayan, C.; Ramya, V. K.; Kaur, P.; Sharma, S.; Werngren, J.; Hoffner, S.; Panduga, V.; Kumar, C. N. N.; Reddy, J.; Kumar K N, M.; Ganguly, S.; Bharath, S.; Bheemarao, U.; Mukherjee, K.; Arora, U.; Gaonkar, S.; Coulson, M.; Waterson, D.; Sambandamurthy, V. K.; Sousa, S. M. de. Novel N-linked aminopiperidine-based gyrase inhibitors with improved hERG and in vivo efficacy against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *57*, 4889–4905.

(66) Kolarič, A.; Minovski, N. Novel bacterial topoisomerase inhibitors: challenges and perspectives in reducing hERG toxicity. *Future medicinal chemistry* **2018**, *10*, 2241–2244.

(67) Low, J. L.; Wu, M.-L.; Aziz, D. b.; Laleu, B.; Dick, T. Screening of TB Actives for Activity against Nontuberculous Mycobacteria Delivers High Hit Rates. *Frontiers in Microbiology* **2017**, *8*, 1539.

(68) <https://www.mmv.org/mmv-open/pathogen-box/about-pathogen-box>, 10.02.2022.

- (69) Wu, M.-L.; Aziz, D. B.; Dartois, V.; Dick, T. NTM drug discovery: status, gaps and the way forward. *Drug Discovery Today* **2018**, *23*, 1502–1519.
- (70) Rebollo-Lopez, M. J.; Lelièvre, J.; Alvarez-Gomez, D.; Castro-Pichel, J.; Martínez-Jiménez, F.; Papadatos, G.; Kumar, V.; Colmenarejo, G.; Mugumbate, G.; Hurle, M.; Barroso, V.; Young, R. J.; Martinez-Hoyos, M.; González del Río, R.; Bates, R. H.; Lopez-Roman, E. M.; Mendoza-Losana, A.; Brown, J. R.; Alvarez-Ruiz, E.; Marti-Renom, M. A.; Overington, J. P.; Cammack, N.; Ballell, L.; Barros-Aguire, D. Release of 50 new, drug-like compounds and their computational target predictions for open source anti-tubercular drug discovery. *PLoS One* **2015**, *10*, e0142293.
- (71) Axten, J. M.; Brooks, G.; Brown, P.; Davies, D.; Gallagher, T. F.; Markwell, R. E.; Miller, W. H.; Pearson, N. D.; Seefeld, M. WO 2004/058144 **15.07.2004**.
- (72) Brooks, G.; Davies, D. T.; Jones, G. E.; Markwell, R. E.; Pearson, N. D. WO 03/087098 **23.10.2003**.
- (73) Dartois, C. G. Y.; Markwell, R. E.; Madler, G. M. M. G.; Pearson, N. D. WO 02/096907 **05.12.2002**.
- (74) Davies, D. T.; Jones, G. E.; Markwell, R. E.; Pearson, N. D. WO 03/010138 **06.02.2003**.
- (75) Morgentin, R.; Pasquet, G.; Boutron, P.; Jung, F.; Lamorlette, M.; Maudet, M.; Plé, P. Strategic studies in the syntheses of novel 6,7-substituted quinolones and 7- or 6-substituted 1,6- and 1,7-naphthyridones. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 2772–2782.
- (76) Tois, J.; Vahermo, M.; Koskinen, A. Novel and convenient synthesis of 4(1H)quinolones. *Tetrahedron Letters* **2005**, *46*, 735–737.
- (77) Bihlmayer, G. A.; Derflinger, G.; Derkosch, J.; Polansky, O. E. Oxy- und Aminomethylenmel drumsäuren. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* **1967**, *98*, 564–578.
- (78) Madrid, P. B.; Sherrill, J.; Liou, A. P.; Weisman, J. L.; DeRisi, J. L.; Guy, R. K. Synthesis of ring-substituted 4-aminoquinolines and evaluation of their antimalarial activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, *15*, 1015–1018.
- (79) Gaber, A. E.-A. M.; McNab, H. Synthetic Applications of the Pyrolysis of Meldrum's Acid Derivatives. *Synthesis* **2001**, *2001*, 2059–2074.
- (80) Gould, R. G.; Jacobs, W. A. The Synthesis of Certain Substituted Quinolines and 5,6-Benzoquinolines. *Journal of the American Chemical Society* **1939**, *61*, 2890–2895.

- (81) Barfoot, C.; Brooks, G.; Brown, P.; Dabbs, S.; Davies, D. T.; Giordano, I.; Hennessy, A.; Jones, G.; Markwell, R.; Miles, T.; Pearson, N.; Smethurst, C. A. Flexible palladium-catalysed amidation reactions for the synthesis of complex aryl amides. *Tetrahedron Letters* **2010**, *51*, 2685–2689.
- (82) McElhinny, C. J.; Lewin, A. H.; Mascarella, S. W.; Runyon, S.; Brieaddy, L.; Carroll, F. I. Hydrolytic instability of the important orexin 1 receptor antagonist SB-334867: Possible confounding effects on in vivo and in vitro studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, *22*, 6661–6664.
- (83) Howells, R. D.; Mc Cown, J. D. Trifluoromethanesulfonic acid and derivatives. *Chemical Reviews* **1977**, *77*, 69–92.
- (84) Radinov, R.; Haimova, M.; Simova, E. Synthesis of 4-Amino-3-pyridinyl and 4-Amino-5-pyrimidinyl Aryl Ketones and Related Compounds via an ortho -Lithiation Reaction. *Synthesis* **1986**, *1986*, 886–891.
- (85) König, W.; Geiger, R. Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazolen. *Chemische Berichte* **1970**, *103*, 788–798.
- (86) Salvatore, R. N.; Chu, F.; Nagle, A. S.; Kapxhiu, E. A.; Cross, R. M.; Jung, K. W. Efficient Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-promoted solution and solid phase synthesis of carbonates and carbamates in the presence of TBAI. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 3329–3347.
- (87) Dunn, R.; Xie, W.; Tehim, A. WO 2009/023844 **19.02.2009**.
- (88) Todorov, A. R.; Aikonen, S.; Muuronen, M.; Helaja, J. Visible-Light-Photocatalyzed Reductions of N-Heterocyclic Nitroaryls to Anilines Utilizing Ascorbic Acid Reductant. Supporting information. *Organic letters* **2019**, *21*, 3764–3768.
- (89) Vu, C. B.; Disch, J. S.; Spronger, S. K.; Blum, C. A.; Perni, R. B. WO 2009/134973 **05.11.2009**.
- (90) Alfaro-Lopez, J.; Okayama, T.; Hosohata, K.; Davis, P.; Porreca, F.; Yamamura, H. I.; Hruby, V. J. Exploring the structure-activity relationships of 1-(4-tert-butyl-3'-hydroxy)benzhydryl-4-benzylpiperazine (SL-3111), a high-affinity and selective delta-opioid receptor nonpeptide agonist ligand. *Journal of Medicinal Chemistry* **1999**, *42*, 5359–5368.
- (91) Alberati, D.; Ceccarelli, S. M.; Jolidon, S.; Krafft, E. A.; Kurt, A.; Maier, A.; Pinard, E.; Stalder, H.; Studer, D.; Thomas, A. W.; Zimmerli, D. Design and synthesis of 4-substituted-8-(2-phenylcyclohexyl)-2,8-diaza-spiro[4.5]decan-1-one as a novel class of GlyT1 inhibitors: Achieving selec-

tivity against the  $\mu$  opioid and nociceptin/orphanin FQ peptide (NOP) receptors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16*, 4305–4310.

(92) Breslin, H. J.; Curry, M. A.; Gingrich, D. E.; Learn, K. S.; Ott, G. R.; Wagner, J. C. WO 2013/116291 **08.08.2013**.

(93) Wolfe, J. P.; Buchwald, S. L. Palladium-Catalyzed Amination of Aryl Halides and Aryl Triflates: N-Hexyl-2-Methyl-4-Methoxyaniline and N-Methyl-N-(4-Chlorophenyl)Aniline. *Organic Syntheses* **2003**, *23*.

(94) Egleton, J. E.; Thinnis, C. C.; Seden, P. T.; Laurieri, N.; Lee, S. P.; Hadavizadeh, K. S.; Measures, A. R.; Jones, A. M.; Thompson, S.; Varney, A.; Wynne, G. M.; Ryan, A.; Sim, E.; Russell, A. J. Structure-activity relationships and colorimetric properties of specific probes for the putative cancer biomarker human arylamine N-acetyltransferase 1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2014**, *22*, 3030–3054.

(95) Hoelder, S.; Blagg, J.; Solanki, S.; Woodward, H.; Naud, S.; Bevetsias, V.; Sheldrake, P.; Innocenti, P.; Cheung, J.; Atrash, B. WO 2014/037750 **13.03.2014**.

(96) Xie, J.; Yang, F.; Zhang, M.; Lam, C.; Qiao, Y.; Xiao, J.; Zhang, D.; Ge, Y.; Fu, L.; Xie, D. Anti-proliferative activity and SARs of caffeic acid esters with mono-substituted phenylethanols moiety. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2017**, *27*, 131–134.

(97) Stokes, B. J.; Opra, S. M.; Sigman, M. S. Palladium-Catalyzed Allylic Cross-Coupling Reactions of Primary and Secondary Homoallylic Electrophiles. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 11408–11411.

(98) Markworth, C. J.; Marron, B. E.; Swain, N. A. WO 2010/035166 **01.04.2010**.

(99) Yee, M.; Klinzing, D.; Wei, J.-R.; Gengenbacher, M.; Rubin, E. J.; Dick, T. Draft Genome Sequence of *Mycobacterium abscessus* Bamboo. *Genome Announcements* **2017**, *5*.

(100) Yee, M.; Klinzing, D.; Wei, J.-R.; Gengenbacher, M.; Rubin, E. J.; Chien, J.-Y.; Hsueh, P.-R.; Dick, T. Draft Genome Sequence of *Mycobacterium avium* 11. *Genome Announcements* **2017**, *5*.

(101) Beuchel, A.; Robaa, D.; Negatu, D. A.; Madani, A.; Alvarez, N.; Zimmerman, M. D.; Richter, A.; Mann, L.; Hoenke, S.; Csuk, R.; Dick, T.; Imming, P. Structure–Activity Relationship of Anti-*Mycobacterium abscessus* Piperidine-4-carboxamides, a New Class of NBTI DNA Gyrase Inhibitors. *Medicinal Chemistry Letters* **2022**.

(102) Li, L.; Okumu, A. A.; Nolan, S.; English, A.; Vibhute, S.; Lu, Y.; Hervert-Thomas, K.; Seffernick, J. T.; Azap, L.; Cole, S. L.; Shinabarger, D.; Koeth, L. M.; Lindert, S.; Yalowich, J. C.; Wozniak, D. J.; Mitton-Fry, M. J. 1,3-Dioxane-Linked Bacterial Topoisomerase Inhibitors with Enhanced Antibacterial Activity and Reduced hERG Inhibition. *Infectious Diseases* **2019**, *5*, 1115–1128.

(103) Miles, T. J.; Axten, J. M.; Barfoot, C.; Brooks, G.; Brown, P.; Chen, D.; Dabbs, S.; Davies, D. T.; Downie, D. L.; Eyrisch, S.; Gallagher, T.; Giordano, I.; Gwynn, M. N.; Hennessy, A.; Hoover, J.; Huang, J.; Jones, G.; Markwell, R.; Miller, W. H.; Minthorn, E. A.; Rittenhouse, S.; Seefeld, M.; Pearson, N. Novel amino-piperidines as potent antibacterials targeting bacterial type IIA topoisomerases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21*, 7489–7495.

(104) Miles, T. J.; Barfoot, C.; Brooks, G.; Brown, P.; Chen, D.; Dabbs, S.; Davies, D. T.; Downie, D. L.; Eyrisch, S.; Giordano, I.; Gwynn, M. N.; Hennessy, A.; Hoover, J.; Huang, J.; Jones, G.; Markwell, R.; Rittenhouse, S.; Xiang, H.; Pearson, N. Novel cyclohexyl-amides as potent antibacterials targeting bacterial type IIA topoisomerases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21*, 7483–7488.

(105) Chalmers, J. D.; Aksomit, T.; Carvalho, A.C.C.; Rendon, A.; Franco, I. Non-tuberculous mycobacterial pulmonary infections. *Pulmonology* **2018**, *24*, 120–131.

(106) Heifets, L. Qualitative and Quantitative Drug-susceptibility Tests in Mycobacteriology. *American Review of Respiratory Disease* **1988**, *137*, 1217–1222.

(107) Pennings, L. J.; Ruth, M. M.; Wertheim, H. F. L.; van Ingen, J. The Benzimidazole SPR719 Shows Promising Concentration-Dependent Activity and Synergy against Nontuberculous Mycobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2021**, *65*.

(108) Aubry, A.; Pan, X.-S.; Fisher, L. M.; Jarlier, V.; Cambau, E. Mycobacterium tuberculosis DNA Gyrase: Interaction with Quinolones and Correlation with Antimycobacterial Drug Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2004**, *48*, 1281–1288.

(109) Blower, T. R.; Williamson, B. H.; Kerns, R. J.; Berger, J. M. Crystal structure and stability of gyrase–fluoroquinolone cleaved complexes from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2016**, *113*, 1706–1713.

(110) Iacobino, A.; Piccaro, G.; Pardini, M.; Fattorini, L.; Giannoni, F. Moxifloxacin Activates the SOS Response in *Mycobacterium tuberculosis* in a Dose- and Time-Dependent Manner. *Microorganisms* **2021**, *9*.

- (111) Naran, K.; Moosa, A.; Barry, C. E.; Boshoff, H. I. M.; Mizrahi, V.; Warner, D. F. Bioluminescent Reporters for Rapid Mechanism of Action Assessment in Tuberculosis Drug Discovery. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2016**, *60*, 6748–6757.
- (112) Chen, C.-R.; Malik, M.; Snyder, M.; Drlica, K. DNA Gyrase and Topoisomerase IV on the Bacterial Chromosome: Quinolone-induced DNA Cleavage. *Journal of Molecular Biology* **1996**, *258*, 627–637.
- (113) Scangarella-Oman, N. E.; Hossain, M.; Hoover, J. L.; Perry, C. R.; Tiffany, C.; Barth, A.; Dumont, E. F. Dose Selection for Phase III Clinical Evaluation of Gepotidacin (GSK2140944) in the Treatment of Uncomplicated Urinary Tract Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2022**.
- (114) Miller, R. R.; Madeira, M.; Wood, H. B.; Geissler, W. M.; Raab, C. E.; Martin, I. J. Integrating the Impact of Lipophilicity on Potency and Pharmacokinetic Parameters Enables the Use of Diverse Chemical Space during Small Molecule Drug Optimization. *Journal of Medicinal Chemistry* **2020**, *63*, 12156–12170.
- (115) Ganapathy, U. S.; del Río, R. G.; Cacho-Izquierdo, M.; Ortega, F.; Lelièvre, J.; Barros-Aguirre, D.; Aragaw, W. W.; Zimmerman, M. D.; Lindman, M.; Dartois, V.; Gengenbacher, M.; Dick, T. A *Mycobacterium tuberculosis* NBTI DNA Gyrase Inhibitor Is Active against *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2021**, *65*.
- (116) Sanguinetti, M. C.; Tristani-Firouzi, M. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature* **2006**, *440*, 463–469.
- (117) Trudeau, M. C.; Warmke, J. W.; Ganetzky, B.; Robertson, G. A. HERG, a Human Inward Rectifier in the Voltage-Gated Potassium Channel Family. *Science* **1995**, *269*, 92–95.
- (118) Roden, D. M. Torsade de pointes. *Clinical Cardiology* **1993**, *16*, 683–686.
- (119) Hamill, O. P.; Marty, A.; Neher, E.; Sakmann, B.; Sigworth, F. J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **1981**, *391*, 85–100.
- (120) Zhang, M.-Q.; Wilkinson, B. Drug discovery beyond the 'rule-of-five'. *Current Opinion in Biotechnology* **2007**, *18*, 478–488.
- (121) Bhattachar, S. N.; Deschenes, L. A.; Wesley, J. A. Solubility: It's not just for physical chemists. *Drug Discovery Today* **2006**, *11*, 1012–1018.

- (122) Kansy, M.; Senner, F.; Gubernator, K. Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes. *Journal of Medicinal Chemistry* **1998**, *41*, 1007–1010.
- (123) Di, L.; Artursson, P.; Avdeef, A.; Benet, L. Z.; Houston, J. B.; Kansy, M.; Kerns, E. H.; Lennernäs, H.; Smith, D. A.; Sugano, K. The Critical Role of Passive Permeability in Designing Successful Drugs. *ChemMedChem* **2020**, *15*, 1862–1874.
- (124) Davies, B.; Morris, T. Physiological Parameters in Laboratory Animals and Humans. *Pharmaceutical Research* **1993**, *10*, 1093–1095.
- (125) Résimont, M.; Liégeois, J.-F. Synthesis and in vitro binding studies of piperazine-alkyl-naphthamides: impact of homology and sulphonamide/carboxamide bioisosteric replacement on the affinity for 5-HT<sub>1A</sub>,  $\alpha$ 2A, D<sub>4.2</sub>, D<sub>3</sub> and D<sub>2L</sub> receptors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *20*, 5199–5202.
- (126) Wagenaar, A.; Kirby, A. J.; Engberts, J. B.F.N. Intramolecular catalysis of sulfonamide hydrolysis by a neighbouring carboxyl group. *Tetrahedron Letters* **1974**, *15*, 3735–3738.
- (127) Griffith, D. E.; Aksamit, T. R. Therapy of refractory nontuberculous mycobacterial lung disease. *Current Opinion in Infectious Diseases* **2012**, *25*, 218–227.
- (128) Abele, S.; Schmidt, G.; Fleming, M. J.; Steiner, H. A One-Pot Diazotation–Fluorodediazotiation Reaction and Fluorine Gas for the Production of Fluoronaphthyridines. *Organic Process Research & Development* **2014**, *18*, 993–1001.
- (129) Wishart, N.; Argiriadi, M. A.; Calderwood, D. J.; Ericsson, A. M.; Fiamengo, B. A.; Frank, K. E.; Friedman, M.; George, D. M.; Goedken, E. R.; Josephson, N. S.; Li, B. C.; Morytko, M. J.; Stewart, K. D.; Voss, J. W.; Wallace, G. A.; Wang, L.; Woller, K. R. WO 2009/152133 **17.12.2009**.
- (130) Romeiro, L. A. S.; da Silva Ferreira, M.; da Silva, L. L.; Castro, H. C.; Miranda, A. L. P.; Silva, C. L. M.; Noël, F.; Nascimento, J. B.; Araújo, C. V.; Tibiriçá, E.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. Discovery of LASSBio-772, a 1,3-benzodioxole N-phenylpiperazine derivative with potent  $\alpha$ 1A/D-adrenergic receptor blocking properties. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *46*, 3000–3012.
- (131) Negatu, D. A.; Liu, J. J. J.; Zimmerman, M.; Kaya, F.; Dartois, V.; Aldrich, C. C.; Gengenbacher, M.; Dick, T. Whole-Cell Screen of Fragment Library Identifies Gut Microbiota Metabolite Indole Propionic Acid as Antitubercular. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2018**, *62*.

(132) Yang, T.; Moreira, W.; Nyantakyi, S. A.; Chen, H.; Aziz, D. b.; Go, M.-L.; Dick, T. Amphiphilic Indole Derivatives as Antimycobacterial Agents: Structure–Activity Relationships and Membrane Targeting Properties. *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *60*, 2745–2763.

(133) Negatu, D. A.; Yamada, Y.; Xi, Y.; Go, M. L.; Zimmerman, M.; Ganapathy, U.; Dartois, V.; Gengenbacher, M.; Dick, T.; Jackson, M.; Kaufmann, S. H. E. Gut Microbiota Metabolite Indole Propionic Acid Targets Tryptophan Biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *mBio* **2019**, *10*.

(134) Andreu, N.; Zelmer, A.; Fletcher, T.; Elkington, P. T.; Ward, T. H.; Ripoll, J.; Parish, T.; Bancroft, G. J.; Schaible, U.; Robertson, B. D.; Wiles, S. Optimisation of bioluminescent reporters for use with mycobacteria. *PloS One* **2010**, *5*, e10777.

(135) Goude, R.; Parish, T. Electroporation of mycobacteria. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* **2009**, *465*, 203–215.

(136) Csuk, R.; Barthel, A.; Sczepek, R.; Siewert, B.; Schwarz, S. Synthesis, encapsulation and antitumor activity of new betulin derivatives. *Archiv der Pharmazie* **2011**, *344*, 37–49.

(137) Heller, L.; Knorrscheidt, A.; Flemming, F.; Wiemann, J.; Sommerwerk, S.; Pavel, I. Z.; Al-Harrasi, A.; Csuk, R. Synthesis and proapoptotic activity of oleanolic acid derived amides. *Bioorganic Chemistry* **2016**, *68*, 137–151.

(138) Sommerwerk, S.; Heller, L.; Kuhfs, J.; Csuk, R. Selective killing of cancer cells with triterpenic acid amides - The substantial role of an aromatic moiety alignment. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *122*, 452–464.

(139) Šali, A.; Blundell, T. L. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. *Journal of Molecular Biology* **1993**, *234*, 779–815.



# DANKSAGUNG

---

Diese Schrift wäre ohne die großartigen Helfer, denen ich an dieser Stelle meinen herzlichen Dank ausdrücken möchte, nicht möglich gewesen.

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Peter Imming. Er bot mir nach meinem Pharmaziestudium die Gelegenheit, mich als Diplomand im Laboralltag zu beweisen und so die Grundlagen zu schaffen, die schließlich zu dieser Dissertation führten. Ich danke ihm vielmals für die Vergabe dieses äußerst spannenden, ertragreichen Themas und die Bekanntmachung mit unseren Kooperationspartnern vom CDI, mit denen ich im engen Austausch während meines dreimonatigen Forschungsaufenthalts zusammen arbeiten durfte. Die herausragende Qualität der Betreuung und Unterstützung empfand ich stets als Privileg. Außerdem möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die durch experimentelle Arbeiten und fachliche Expertise zum Erstellen dieser Arbeit beigetragen haben. Hier sind zunächst Prof. Thomas Dick und seine Mitarbeiter vom CDI in Nutley, NJ, USA zu nennen. Danke an Dereje, Chao und Nadine für die MHK-Bestimmungen und die Einarbeitung in die mikrobiologischen Arbeitstechniken. Ein besonderer Dank geht an Abdeldjalil Madani für die Gewinnung der rekombinanten Proteine und die Untersuchung der Enzyminhibition. Prof. Thomas Dick sei hier ausdrücklich gedankt für sein Vertrauen, den anregenden Gesprächen über die Entwicklung des Kosmos und des Lebens sowie den grandiosen Buchtipps. Ebenso bedanke ich mich bei ihm für die Begutachtung der vorliegenden Dissertation. Einen wichtigen Beitrag leisteten auch die Mitarbeiter von Prof. Véronique Datrois vom CDI, Martin Gengenbacher und Matthew Zimmerman mit der Durchführung der *in vivo* Experimente und der pharmakokinetischen Evaluierung der Verbindungen. Unvergessen bleibt auch die Bereitstellung des Fahrrads während meines Aufenthalts in den USA. Danke Véronique! Einen immensen Beitrag für das Gelingen dieser Arbeit leistete Dina Robaa von der MLU. Danke Dina für die Durchführung der *in silico* Docking-Experimente und der kenntnisreichen Unterstützung beim Verfassen der Artikelmanuskripte und dem Lektorat der vorliegenden Schrift. Ich bedanke mich recht herzlich bei der Arbeitsgruppe von Prof. René Csuk vom Institut für Chemie der MLU für die Untersuchung der Zytotoxizität der potenten Verbindungen und für seine Bereitschaft, die vorliegende Schrift zu begutachten.

Überaus dankbar bin ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe, die mir den Arbeitsalltag so sorgenfrei gestalteten. Danke an die „alte“ Generation von Doktoranden Lisa, Christoph, Ruth und Thomas. Ihr habt mich freudig in eure Reihen aufgenommen. Mein Dank gilt auch den „neueren“ Doktoranden Rana, Markus, Lea und Paul für die schöne gemeinsame Zeit, die alternierende Pausenraumgestaltung und jeden besonderen Abend mit raffinierten kulinarischen Köstlichkeiten. Euch wünsche ich weiterhin viel Geduld bei eurer Forschung und hoffe wir bleiben in Kontakt. Einen besonderen Dank spreche ich auch aus an unsere Laborantinnen Ilona und Julia für ihren unerschöpflichen Fleiß bei der Bestimmung von Schmelzpunkten oder der Nachsynthese von Zwischenprodukten. Ein großer Dank gilt hierbei auch Julia, die es als meine Bürokollegin geschafft hat, meinen extravaganten Musikgeschmack zu tolerieren. Besonders hervorheben möchte ich die kompetente Unterstützung durch Adrian Richter bei allen wissenschaftlichen Angelegenheiten sowie dem Lektorat meiner Arbeit. Einen wichtigen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit leisteten auch PD Matthias Schmidt und Christian Ihling mit der Bestimmung der HPLC-Reinheiten und der HR-Massenspektren. Zu großem Dank bin ich auch all jenen verpflichtet, die sich die Zeit für die Durchsicht meiner Arbeit nahmen: Danke Rudi, Micha und Linus. Darüber hinaus waren mir die Studierenden, die zeitweise mit mir an meinem Thema gearbeitet haben, eine große Hilfe.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meiner Familie, die mich stets bei meiner akademischen Laufbahn unterstützt hat und besonders bei meinen Eltern, die mir mein Studium erst ermöglicht haben. Da die vergangene Zeit nicht nur aus Arbeit bestand, spreche ich noch einen herzlichen Dank an meine Freunde aus, mit denen ich meine Freizeit so amüsant und unbeschwert gestalten konnte. Zuletzt ein herzliches Dankeschön an meine liebe Veronika, die stets an meiner Seite steht.

# LEBENS LAUF

---

## Ausbildung und Tätigkeiten

Feb. 2021–Dez. 2021	Martin-Luther-Universität (MLU) Halle-Wittenberg Wissenschaftlicher Projektkoordinator im Trisustain-Projekt (Partnerschaften für nachhaltige Lösungen mit Subsahara-Afrika ab 2016)
Aug. 2017–Jan. 2021	MLU Halle-Wittenberg, Abt. Pharmazeutische Chemie Wissenschaftlicher Mitarbeiter/Doktorand Thema: Design, Synthese und Charakterisierung neuartiger antiinfektiver Substanzen gegen nicht-tuberkulöse Mykobakterien
Jan. 2017–Aug. 2017	Humanitas-Apotheke Halle Angestellter Apotheker
Nov. 2016–Dez. 2016	Arbeitssuchend
Nov. 2016	Approbation als Apotheker Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Mai 2016–Okt. 2016	MLU Halle-Wittenberg Diplomstudent in der Abteilung Pharmazeutische Chemie Titel: Synthese und Charakterisierung von Cyclodepsipeptiden in Anlehnung an den Naturstoff Pyridomycin als Leitmotiv

- Nov. 2015–Apr. 2016      Humanitas-Apotheke Halle  
Pharmazeut im Praktikum
- Okt. 2013–Sept. 2015      MLU Halle-Wittenberg  
Hauptstudium der Pharmazie und zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
- Okt. 2010–Sept. 2013      MLU Halle-Wittenberg  
Grundstudium der Pharmazie und erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

# PUBLIKATIONSLISTE

---

## Artikel

Beuchel, A.; Robaa, D.; Negatu, D. A.; Madani, A.; Alvarez, N.; Zimmerman, M. D.; Richter, A.; Mann, L.; Hoenke, S.; Csuk, R.; Dick, T.; Imming, P. Structure–Activity Relationship of Anti- Mycobacterium abscessus Piperidine-4-carboxamides, a New Class of NBTI DNA Gyrase Inhibitors. *ACS medicinal chemistry letters* **2022**.

Negatu, D. A.; Beuchel, A.; Madani, A.; Alvarez, N.; Chen, C.; Aragaw, W. W.; Zimmerman, M. D.; Laleu, B.; Gengenbacher, M.; Dartois, V.; Imming, P.; Dick, T. Piperidine-4-carboxamides target DNA gyrase in Mycobacterium abscessus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2021**.

Böck, D.; Beuchel, A.; Goddard, R.; Imming, P.; Seidel, R. W. Structural Characterization of Two Polymorphs of 1-(4-Methylpyridin-2-yl)thiourea and Two Derived 2-Aminothiazoles. *Journal of Chemical Crystallography* **2021**, 51, 394–404.

Böck, D.; Beuchel, A.; Goddard, R.; Richter, A.; Imming, P.; Seidel, R. W. Protonation sites and hydrogen bonding in mono-hydrobromide salts of two N,4-diheteroaryl 2-aminothiazoles. *Structural Chemistry* **2021**, 32, 989–996.

Beuchel, A.; Goddard, R.; Imming, P.; Seidel, R. W. A solid solution of ethyl and d3 -methyl 2-[(4-methylpyridin-2-yl)amino]-4-(pyridin-2-yl)thiazole-5-carboxylate. *Acta Crystallographica Section E Crystallographic Communications* **2020**, 76, 1255–1259.

### **Posterpräsentationen**

Beuchel, A.; Robaa, D.; Chen, C.; Dick, T.; Imming, P. Novel DNA Gyrase Inhibitors Targeting Non-tuberculous Mycobacteria. *Pharma Research Day, Martin–Luther–Universität Halle–Wittenberg* **26.06.2019**; Halle (Saale), Deutschland.

Beuchel, A.; Negatu, D. A.; Madani, A.; Zimmerman, M. D.; Gengenbacher, M.; Dartois, V.; Dick, T.; Imming, P. NBTI DNA gyrase inhibitors target *Mycobacterium abscessus*. *Colorado Mycobacteria Conference 2022: Focus on NTM* **31.05.2022–03.06.2022**; Fort Collins; Colorado; USA. (Abstract angenommen)

### **Vorträge**

Beuchel, A.; Novel Antibiotics against Non-tuberculous Mycobacteria (NTM). *Third TRI–SUSTAIN Graduate School* **29.11.2018**; Gaborone, Botswana.

Beuchel, A.; Novel DNA-Gyrase Inhibitors against Non-Tuberculous Mycobacteria. *Fifth TRI–SUSTAIN Graduate School* **15.11.2021**; Online-Präsentation.

# EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

---

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift gemäß der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät I (Biowissenschaften) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe.

Weiterhin habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Die daraus wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde ausschließlich der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt und an keiner anderen universitären Einrichtung, weder im In- noch im Ausland, zur Erlangung des Doktorgrades eingereicht.

Halle (Saale), den 04.05.2022

Andreas Beuchel