

Untersuchungen von Thiazolidindionen und verwandten
Fünfringheterozyklen als Leitstruktur potenzieller
Inhibitoren der Enoyl-ACP-Reduktase InhA des
Mycobacterium tuberculosis



Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Apotheker Simon Vogel

aus Heilbronn am Neckar

Würzburg 2015

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am:

Gutachter der schriftlichen Arbeit:

1. Gutachter: Prof. Dr. Tanja Schirmeister
2. Gutachter: Prof. Dr. Christoph Sotriffer

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums:

1. Prüfer: Prof. Dr. Tanja Schirmeister
2. Prüfer: Prof. Dr. Christoph Sotriffer
3. Prüfer: Prof. Dr. Petra Högger

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von März 2011 bis Dezember 2013 am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Tanja Schirmeister angefertigt.

Für Mali

Danksagung

Ich danke allen, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Vorwort.....	1
1.2	Mykobakterien.....	7
1.2.1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7
1.3	Die Tuberkulose	9
1.3.1	Epidemiologie	9
1.3.2	Pathogenese und Symptomatik	9
1.3.3	Diagnostik und Therapie der Tuberkulose	11
1.4	Die mykobakterielle Zellwand als potenzielles Ziel von Antituberkulotika.....	17
1.4.1	Aufbau der mykobakteriellen Zellwand.....	17
1.4.2	Biosynthese von Mykolsäuren	19
a)	Der Fettsäuresyntheseweg I	19
b)	Der Fettsäuresyntheseweg II von Mykobakterien.....	20
1.5	Die Enoylreduktase InhA des FAS-II-Wegs von Mykobakterien als potenzielles Ziel neuer Antituberkulotika.....	22
1.6	Ausgangssituation und Zielsetzung	25
2	Etablierung eines InhA-Testsystems	27
2.1	Darstellung des Substrats 2- <i>trans</i> -Octenoyl-Coenzym A (2toCoA).....	27
2.1.1	Aktivierung von 2- <i>trans</i> -Octensäure.....	28
a)	Umsetzung von 2- <i>trans</i> -Octensäure mit Chlorameisensäureethylester zum gemischten Anhydrid	28
b)	Umsetzung von 2- <i>trans</i> -Octensäure mit <i>N</i> -Hydroxysuccinimid/DCC zum 2- <i>trans</i> -Octenoyl- <i>N</i> -Hydroxysuccinimidester	29
c)	Detektionsmöglichkeiten für die DC-Analytik	31
2.1.2	Umsetzung der aktivierten Säuren mit CoA zum Thioester 2toCoA.....	32
a)	Umsetzung des gemischten Anhydrid aus 2- <i>trans</i> -Octensäure und Kohlensäureethylester mit Coenzym A zu 2toCoA	33

b)	Umsetzung von 2- <i>trans</i> -Octenoyl- <i>N</i> -hydroxysuccinimidester (SV07) mit Coenzym A zu 2toCoA	33
2.1.3	Alternative Varianten der Synthese von 2toCoA	35
a)	Umsetzung des 2- <i>trans</i> -Octenoyl- <i>N</i> -hydroxysuccinimidesters mit Coenzym A zu 2- <i>trans</i> -Octenoyl-Coenzym A in Gegenwart von Thioglykolsäure	35
b)	Umsetzung des 2- <i>trans</i> -Octenoyl- <i>N</i> -hydroxysuccinimidesters mit polysilyliertem Coenzym A zu 2- <i>trans</i> -Octenoyl-Coenzym A.....	35
2.1.4	Möglichkeiten der Reaktionskontrolle	38
2.1.5	Aufreinigungs- und Aufarbeitungsmethoden.....	39
a)	Aufreinigung mittels präparativer HPLC	39
b)	Aufreinigungsmethode Fällung mit Perchlorsäure	42
2.1.6	NMR-Analytik	43
2.2	Expression, Aufreinigung und Charakterisierung von InhA	48
2.2.1	Transformation von kompetenten <i>E.coli</i> -Bakterien mit dem Plasmids pET15b	48
2.2.2	Expression von InhA in <i>E.coli</i>	48
2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	48
2.2.4	Aufreinigung der InhA mittels Nickel-Affinitätschromatographie.....	49
2.2.5	Aufreinigung der InhA mittels Größenausschlusschromatographie	50
2.3	Aufbau und Validierung des InhA-Testsystems.....	53
2.3.1	Theoretische Betrachtungen der Enzymkinetik und Enzymhemmung	53
a)	Enzymkinetik	53
b)	Enzymhemmung.....	55
c)	Bestimmung und Interpretation von IC ₅₀ -Werten.....	57
2.3.2	Prinzip des Testsystems	60
2.3.3	Etablierung des Testsystems mit UV-VIS-spektroskopischer Detektion	62
a)	Nachweis der Linearität des Messinstruments	62
b)	Messung der Initialgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion	63

c)	Bestimmung der <i>Michaelis-Menten</i> -Konstanten K_m und der Maximalgeschwindigkeit v_{max} für das Substrat 2toCoA	65
d)	Charakterisierung der Positivkontrollen Triclosan und PT04.....	67
2.3.4	Etablierung der fluorimetrischen Variante	72
2.3.5	Assay reversed.....	74
2.3.6	Versuch der Etablierung einer orthogonalen Methode (Mikroskalierte Thermophorese)	75
3	Design und Synthese der Substanzbibliothek	78
3.1	Computerbasierte Methoden.....	78
3.1.1	Berechnung der Permeabilitäts-Wahrscheinlichkeit von Liganden für <i>M.tuberculosis</i>	78
3.1.2	<i>Docking</i> -Experimente.....	81
a)	Positivkontrolle Triclosan	81
b)	(Z)-3-Benzyl-5-(4-fluorbenzyliden)-thiazolidin-2,4-dion (SV75).....	83
c)	(Z)-5-Heptyliden-3-(2-methylbenzyl)-thiazolidin-2,4-dion (SV47)	84
d)	5-Hexyl-3-(2-methylbenzyl)-thiazol-2(3H)-on (SV102)	86
3.2	Darstellung der Thiazolidin-2,4-dione	88
3.2.1	Alkylierung am Imid-Stickstoff (Schritt A).....	88
3.2.2	Einführung von Substituenten am C-5-Atom (Schritt B).....	90
a)	C-5-Alkyldenierung bzw. Benzylidenierung im Sinne einer Knoevenagel-Reaktion	90
b)	C-5-Substituenten ohne exozyklische Doppelbindung	94
3.2.3	Überlegungen zur Stereoselektivität der <i>Knoevenagel</i> -Reaktion.....	97
a)	Abklärung des Vorhandenseins eines Diastereomeregemisches mittels LC-MS	97
b)	NMR Gated-Decoupling-Experimente zur Aufklärung der Konfiguration	98
c)	Theoretische Überlegungen.....	100
3.3	Darstellung der Thiazolin-2-one.....	103

3.3.1	Retrosynthetische Betrachtungen.....	104
3.3.2	Synthese von Benzylammonium- <i>N</i> -benzylthiocarbamat (Fragment A)	105
3.3.3	Synthese von α -Bromooctanal durch Bromoborierung und Oxidation von 1-Octin (SV92/Fragment B)	106
3.3.4	Synthese von 3-Benzyl-5-hexylthiazol-2(3 <i>H</i>)-on (SV94)	108
3.4	Erweiterung und Übersicht der Substanzbibliothek	110
4	Biochemische und Biologische Testungen	111
4.1	Ergebnisse des Screenings an InhA.....	111
4.1.1	Thiazolidindione.....	113
a)	<i>N</i> -3-monosubstituierte Thiazolidindione.....	113
b)	<i>C</i> -5-monosubstituierte Thiazolidindione.....	114
c)	<i>N</i> -3- <i>C</i> -5-disubstituierte Thiazolidindione	117
d)	Sonstige disubstituierte Thiazolidindione	124
4.1.2	Thiazolin-2-one	125
4.1.3	Rhodanine.....	126
a)	<i>N</i> -3-monosubstituierte Rhodanine.....	126
b)	<i>C</i> -5-monosubstituierte Rhodanine.....	128
c)	<i>N</i> -3- <i>C</i> -5-disubstituierte Rhodanine	131
4.1.4	Thiohydantoine.....	133
a)	<i>C</i> -5-monosubstituierte Thiohydantoine.....	133
b)	Mehrfach substituierte Thiohydantoine	136
4.1.5	Hydantoine	138
4.1.6	Weitere Strukturklassen	140
a)	Pyridone	140
b)	Pyrrolidoncarboxamide	140
c)	Sulfonamide	141
d)	Biphenylether	142
4.2	Ergebnisse des Screenings an parasitären Proteasen.....	143

4.3	Biologische Testungen	147
4.3.1	Testung am attenuierten <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	147
4.3.2	Antibakterielle Aktivität.....	147
4.3.3	Antiparasitäre Aktivitäten und Zytotoxizitätstests	148
5	Diskussion und Ausblick.....	150
6	Zusammenfassung.....	156
7	Summary	158
8	Experimentalteil	161
8.1	Verwendete Messgeräte und Arbeitsmittel.....	161
8.1.1	Schmelzpunkte	161
8.1.2	Mikrowelle	161
8.1.3	Gefriertrocknung	161
8.1.4	Spektroskopische Methoden	161
a)	Infrarotspektroskopie (IR).....	161
b)	Kernresonanzspektroskopie (¹ H-NMR, ¹³ C-NMR)	161
c)	Massenspektrometrie.....	162
d)	UV-VIS-Spektroskopie/Fluorimetrie	162
8.1.5	Chromatographische Methoden	162
a)	Dünnschichtchromatographie (DC)	162
b)	Säulenchromatographie (SC)	162
c)	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)	163
8.1.6	Verwendete Chemikalien, Lösemittel und Reagenzien	163
8.2	Allgemeine synthetische Methoden.....	164
8.2.1	Methode A: Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von <i>N</i> -3-substituierten Thiazolidin-2,4-dion-Derivaten.....	164
a)	Methode A1: <i>N</i> -Benzylierung von Thiazolidin-2,4-dion.....	164
b)	Methode A2: <i>N</i> -Alkylierung von Thiazolidin-2,4-dion	164

8.2.2	Methode B: Allgemeine Vorschrift zur Umsetzung von 2,4-Thiazolidindionen mit Aldehyden und Piperidinkatalyse im Sinne einer <i>Knoevenagel</i> -Reaktion	164
a)	Methode B1: Synthese von 5-Benzyliden-3-Alkyl-2,4-Thiazolidindion-Derivaten	164
b)	Methode B2: Synthese von 3-Alkyl-5-Alkyliden-2,4-Thiazolidindion-Derivaten mit langkettigen aliphatischen Aldehyden	165
8.2.3	Methode C: Synthese von 3,5-Alkylthiazolidin-2,4-dion-Derivaten	165
a)	Methode C1: Katalytische Hydrierung von 5-Alkyliden-3-Alkylthiazolidin-2,4-dion-Derivaten.....	165
b)	Methode C2: C-5-Alkylierung von 3-Alkylthiazolidin-2,4-dion-Derivaten....	165
8.2.4	Methode D: Synthese von 2-Bromooctanal	166
8.2.5	Methode E: Darstellung von Kohlenoxysulfid.....	166
8.2.6	Methode F: Darstellung von Benzylammonium- <i>N</i> -benzylthiocarbamat-Salzen	166
8.2.7	Methode G: Darstellung von 3-Benzyl-5-hexylthiazol-2(3 <i>H</i>)-on-Derivaten...	167
8.2.8	Methode H: Darstellung des gemischten Anhydrids.....	167
a)	Methode H1	167
b)	Methode H2.....	168
8.2.9	Methode I: Darstellung von 2- <i>trans</i> -Octenoyl- <i>N</i> -Hydroxysuccinimidesters...	168
8.2.10	Methode J: Darstellung von 2- <i>trans</i> -Octenoyl-CoA	168
a)	Methode J1: Umsetzung des gemischten Anhydrids mit Coenzym A zu 2- <i>trans</i> -Octenoyl-Coenzym A.....	168
b)	Methode J2: Umsetzung von 2- <i>trans</i> -Octenoyl- <i>N</i> -Hydroxysuccinimidester mit Coenzym A zu 2- <i>trans</i> -Octenoyl-Coenzym A.....	169
c)	Methode J3: Umsetzung von 2- <i>trans</i> -Octenoyl- <i>N</i> -Hydroxysuccinimidester mit Coenzym A zu 2- <i>trans</i> -Octenoyl-Coenzym A in Gegenwart von Thioglykolsäure..	169
d)	Methode J4: Umsetzung von 2- <i>trans</i> -Octenoyl- <i>N</i> -Hydroxysuccinimidester mit polysilyliertem Coenzym A zu 2- <i>trans</i> -Octenoyl-Coenzym A.....	170
e)	Aufreinigung von 2- <i>trans</i> -Octenoyl-Coenzym A	170

8.3	Synthetisierte Verbindungen	172
8.3.1	Derivate und Zwischenstufen der Thiazolidin-2,4-dione.....	172
8.3.2	Derivate und Zwischenstufen der Thiazolin-2-one	208
8.3.3	Substrat 2- <i>trans</i> -Octenoyl-Coenzym A und Zwischenstufen	214
8.4	Expression und Aufreinigung von InhA.....	217
8.4.1	Transformation von kompetenten <i>E.coli</i> -Bakterien mit dem Plasmids pET15b	217
8.4.2	Expression von InhA in <i>E.coli</i>	217
8.4.3	Nickel-Affinitäts-Chromatographie	217
8.4.4	Größenausschlusschromatographie.....	218
8.4.5	SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	219
8.5	Enzymatische Testverfahren.....	220
8.5.1	InhA-Assay.....	220
a)	UV-VIS-spektroskopische Variante.....	220
b)	Fluorimetrische Variante.....	220
8.5.2	Protease-Assays.....	221
8.6	Mikroskalierte Thermophorese (MST).....	225
9	Anhang	226
9.1	Literaturverzeichnis	226
9.2	Abkürzungsverzeichnis	239
9.3	Eidesstattliche Erklärung	241

Allgemeiner Teil

1 Einleitung

1.1 Vorwort

Die Tuberkulose oder Schwindsucht ist eine sehr alte Krankheit, von der bereits in der Antike die Rede war. Keine Epoche oder Hochkultur blieb seither davor verschont, sei es im alten Ägypten, bei den Griechen, im römischen Reich oder im Mittelalter. Bis hin zur Neuzeit und unserer globalisierten Welt hat sie uns begleitet. Erst mit der Aufklärung von Übertragungswegen, der Entdeckung des Erregers, Verbesserung der hygienischen Verhältnisse und vor allem mit der Entwicklung effektiv wirksamer Chemotherapeutika war man in der Lage, sich erfolgreich gegen die Krankheit zu wehren.^[1] Das erfolgreiche Ausmerzen des Erregers korrelierte dabei mit der Entwicklung von Wohlstand und Verbesserung der äußeren Lebensumstände. Es ist daher leicht auszumachen, welchem Teil der Erde dieses Privileg im Zuge des Fortschritts nicht vergönnt war und ist. Während die Krankheit in Entwicklungsländern noch immer ein schwerwiegendes tödliches gesamtgesellschaftliches Problem darstellt, wiegte man sich in den westlichen Industrienationen in der vermeintlichen Sicherheit, die Tuberkulose besiegt zu haben. Sowohl die Forschung nach neuen Wirkstoffen, als auch stringente Versuche, die Tuberkulose weltweit in den Griff zu bekommen, wurden für lange Zeit sträflich vernachlässigt. Diese in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts überhebliche und ohne Weitblick herrschende Stagnation im Willen der Krankheit als weltweitem Problem den Kampf anzusagen, wurde erst mit großer Verspätung in den 1990er Jahren durch global organisierte und effektiv durchdachte Strategien und Programme der WHO nachgeholt. So konnte seit Einführung des DOTS-Therapieschemas (siehe Kapitel 1.3.3) und dem kurz darauf ins Leben gerufenen Stop-TB-Programm die weltweite TB-Sterberate um 45 % gesenkt werden.^[2,3] Die Schaffung der infrastrukturellen Voraussetzungen für Diagnostik, Behandlung und Prävention der Tuberkulose, ermöglicht in betroffenen Gebieten einen verbesserten Zugang zu medizinischer Versorgung und bestmöglicher Therapie. Darüber hinaus wird die Erforschung und Entwicklung neuer Diagnosemethoden, neuer Antituberkulotika und Präventionsmaßnahmen stark gefördert, wodurch das definierte Millenniumsziel der WHO, die TB-Sterberate bis 2015 zu halbieren, augenscheinlich in greifbare Nähe gerückt ist. Ein Blick auf die von der WHO für das Jahr 2012 veröffentlichten Daten zum *status quo* der Tuberkulose,^[3] insbesondere die sehr bedenkliche Entwicklung der Resistenzsituation und Co-Infektionen mit dem HI-Virus machen aber deutlich, dass von Kontrolle oder gar Sieg über die Krankheit keineswegs die

Rede sein kann (siehe Kapitel 1.3.1). Vielmehr belegen sie das zeitliche Versäumnis, die Tuberkulose als globales Problem rechtzeitig erkannt und reagiert zu haben. Statt das im medizinischen, pharmazeutischen und verwaltungstechnischen Bereich vorhandene Wissen über den Umgang mit Erreger und Krankheit, das letztlich zur erfolgreichen Ausrottung des Erregers in Deutschland und darüber hinaus geführt hat, frühzeitig zu exportieren und die Krankheit womöglich im Handstreich unter Kontrolle zu bringen, überließ man die Regionen der Erde, die weder über das notwendige *Know-How*, noch über die wirtschaftlichen Mittel und erst recht über keine Infrastruktur zur Bewältigung einer derartigen Aufgabe verfügten, wie bei vielen anderen Problemen einfach sich selbst. Ob aus politischen, wirtschaftlichen oder schlicht unwissenden Gründen sei dahingestellt. Fakt aber ist, dass der Wissenstand der mikrobiologischen Forschung zum damaligen Zeitpunkt ausreichend war, die mittel- bis langfristigen Folgen dieser Tatenlosigkeit und Ignoranz sowie das daraus resultierende Gefahrenpotenzial für die Menschheit prognostizieren zu können und zu müssen. Während in den entwickelten wohlhabenden Staaten aber das Kapital akkumulierte, geriet die einst gefürchtete Tuberkulose als todbringende Volkskrankheit in Vergessenheit. Gleichzeitig wie *a priori* absehbar war, führte das Fehlen einer gut ausgestatteten und organisierten Gesundheitsversorgung in den betroffenen Entwicklungsländern weiterhin zur unkontrollierten Ausbreitung der Tuberkulose. Tragischerweise kam es, sofern man Glück und überhaupt Zugang zu einer medizinischen Versorgungseinrichtung hatte, nicht selten zu folgenreichen Behandlungsfehlern, die auf die unzureichende medizinische Ausstattung zurückzuführen waren. Sofern überhaupt vorhanden war beispielsweise der mikroskopische Erregernachweis im Sputum die einzige diagnostische Methode zur Bestätigung einer Verdachtsdiagnose oder zur Überprüfung des Therapiefortschritts.^[4] Zwar lässt sie sich mit etwas Übung überall, schnell und billig durchführen, benötigt allerdings ausreichend kontaminiertes Sputum und führt daher zu fehlerbehafteten Ergebnissen. Die hohe Spezifität bzw. die vernachlässigbar kleine Wahrscheinlichkeit einen falsch positiven Erregernachweis zu erhalten, macht die Methode ideal zur sicheren Diagnose einer Lungentuberkulose. Die niedrige Sensitivität oder das Auftreten falsch negativer Diagnosen ist einleuchtend, bedenkt man beispielsweise das bei den extrapulmonalen Verlaufsformen, die in stark durchseuchten Gebieten im Verhältnis zur Lungentuberkulose wesentlich häufiger als in Europa auftreten, keine Erreger im Sputum anzutreffen sind. Analog müssen falsch negative Diagnosen bei Kleinkindern (wenig Sputum, kleine Erregeranzahl) oder bei latenten, geschlossenen Infektionen berücksichtigt werden. Die Methode des mikroskopischen Erregernachweises müsste für eine gesicherte Diagnose folglich mit weiteren diagnostischen Verfahren ergänzt

und kombiniert werden (siehe Kapitel 1.3.3). Die Realität sah und sieht teilweise auch heute noch so aus, dass die tuberkulosespezifische Erfahrung des behandelnden Arztes die fehlenden diagnostischen Möglichkeiten kompensieren muss. Neben den erläuterten Komplikationen bei Diagnosestellung und Überwachung des Therapiefortschritts war ebenso die Versorgung mit antituberkulösen Arzneimitteln unzureichend. Es ließen sich zahlreiche weitere Fakten auch außerhalb des medizinisch/pharmazeutischen Bereichs für gravierende Missstände bei der Tuberkulosebekämpfung nennen. Die angeführten Beispiele genügen allerdings hinreichend, die schwerwiegenden Folgen und deren Auswirkung auf die Entwicklung der epidemiologischen Situation nachvollziehen zu können.^[3] Die erfolgreiche Eliminierung des Erregers und Heilung des Patienten gelingt nur durch eine aufwändige, langwierige und anstrengende Therapie mit antimykobakteriellen Arzneistoffen (siehe Kapitel 1.3.3).^[5] Für deren Erfolg ist die Verfügbarkeit von Antituberkulotika gleichermaßen essenziell wie die konsequente Durchführung und Überwachung durch kompetentes und ausreichend ausgestattetes medizinisches Fachpersonal, welches wiederum durch intensive Aufklärung und Betreuung die zwingend notwendige *Compliance* des Patienten gewährleisten muss. Jede denkbare Veränderung des Therapieschemas kann einen inadäquaten Einsatz von antimykobakteriellen Arzneimitteln, eine Unterbrechung oder sogar einen Abbruch der Therapie zur Folge haben. Abgesehen von den schlimmen Konsequenzen für die Schicksale eines weiterhin leidenden und infektiösen Patienten mit schlechten Heilungschancen und seines sozialen Umfelds, wäre es nicht verwunderlich, wenn das Ausbleiben eines Erfolgserlebnisses bei unverschuldetem Therapieversagen und die Hilflosigkeit, wenn man wider besseren Wissens aber ohne die notwendigen Ressourcen ohnmächtig ist, zu Frustration und Resignation des Arztes führt. Eine Störung im Therapieverlauf stellt hingegen einen wahrlich schicksalhaften Glücksfall für das anpassungsfähige Mykobakterium dar. Ein inadäquater oder falscher Einsatz von Antituberkulotika führt nicht mehr zur notwendigen quantitativen Abtötung der Erreger im Wirtsorganismus, d.h. die Mykobakterien sind lediglich einem gewissen Selektionsdruck ausgesetzt. Letztlich war es nur eine Frage der Zeit bis das extrem anpassungsfähige Mykobakterium mit seinem zur Entwicklung effektiver Resistenzmechanismen hervorragend ausgestatteten Genom in der Lage war, sich auf die veränderten Bedingungen einzustellen (siehe Kapitel 1.3.3). Fehler im Therapieverlauf führten somit unweigerlich zur Selektion oft multiresistenter Mykobakterienstämme und die seit den 1950er Jahren eingesetzten und einst lebensrettenden Antituberkulotika verloren ihre Wirkung. Um diese resistenten Stämme wirksam bekämpfen zu können, war man gezwungen, die aufwändige antituberkulöse Therapie weiterzuentwickeln.^[6] Die Entwicklung und

Verfügbarkeit effektiver Reserveantibiotika und neuer diagnostischer Testverfahren wurden zur Abklärung der Resistenzsituation für jeden Einzelfall notwendig und essenzielle Voraussetzung für eine adäquate Therapie. Mit dem Hintergrund ohnehin unzureichender medizinischer Versorgungszustände war die konsequente Umsetzung dieser stark verkomplizierten therapeutischen Maßnahmen nicht realisierbar und die zwingend notwendige Anpassung an diese Resistenzsituation aus pharmazeutischer und therapeutischer Sicht nicht möglich. Der bis dahin herrschende Vorteil, die Erkrankung bei korrektem Einsatz von bewährten Chemotherapeutika erfolgreich behandeln zu können und die damit einhergehende Möglichkeit der progredienten weltweiten epidemiologischen Entwicklung entgegenzuwirken und möglicherweise zu kontrollieren, wurde nicht ausgenutzt und wider besseren Wissens über die folgenschweren Konsequenzen leichtfertig verspielt. Statt rechtzeitig die notwendigen logistischen und strukturellen Voraussetzungen für eine ausreichend effektive medizinische Versorgung zu etablieren, führten fortwährende Versorgungsmissstände und die daraus resultierende fehlerhafte Therapie geradewegs in einen gefährlichen *circulus vitiosus*. Die mangelhaften Versorgungsstrukturen, die bereits für die Bekämpfung von nicht-resistenten und gegenüber traditionellen Antituberkulotika empfindlichen Mykobakterienstämmen nicht ausreichten, waren logischerweise für die wesentlich aufwändigere Therapie resistenter Erreger völlig ungenügend. Noch häufigere Fehltherapien und falscher Einsatz von Reserveantituberkulotika als Folge, ermöglichten die Entstehung multiresistenter Mykobakterien und verschlimmerten die Therapiesituation wiederum beträchtlich. Die ohnehin günstigen Voraussetzungen für die Erregerausbreitung wie hohe Bevölkerungsdichte, schlechte Ernährungslage und mangelhafter Hygiene wurden nahezu ideal mit Auftreten und Verbreitung des HI-Virus in den 1980er Jahren.^[7] Das supprimierte Immunsystem durch die virale Infektion ist nicht mehr in der Lage eine mykobakterielle Infektion einzudämmen, wodurch es zum unmittelbaren Ausbruch der Tuberkulose bei latent und Neuinfizierten kommt. In umgekehrter Weise erleichtert das stark beanspruchte Abwehrsystem bei mykobakterieller Infektion dem HI-Virus eine schnellere Ausbreitung und beschleunigt dadurch den Anstieg der Viruslast, die Abnahme der Leukozytenzahl und den Ausbruch von AIDS. Bei gleichzeitig vorliegender mykobakterieller und viraler Infektion profitieren folglich beide Erreger einerseits von einer gegenseitig ermöglichten Erhöhung ihrer Pathogenität, andererseits von einer beträchtlich erschwerten Therapierbarkeit.^[8] Dass sie unter den aktuell weltweit bekannten Co-Infektionen mittlerweile den größten Anteil mit ebenso größter Co-Morbidität ausmacht, verdeutlicht wie erfolgreich und effektiv diese symbiotische Vergesellschaftung beider Erreger ist. Die gegenwärtige

globale Situation und das wahre Ausmaß der katastrophalen Negativentwicklung bei der Tuberkulosebekämpfung kann epidemiologisch lediglich auf Grundlage national erfasster und gemeldeter Falldaten abgeschätzt werden,^[3] wobei eine gewichtige Dunkelziffer auf Grund unzuverlässiger oder lückenhafter Datenlage bei der Extrapolierung auf die weltweite Grundgesamtheit einkalkuliert werden muss. Insbesondere die Einschätzungen bezüglich der gefährlichen Entwicklung von Resistenzlage und TB-HIV-Co-Infektionen sind hinreichend besorgniserregend und geben Anlass, sich mit den weitreichenden globalen Folgen zu befassen. Die Infrastruktur einer global vernetzten Welt ermöglicht nicht nur den schnellen Transport von Gütern und Personen an nahezu jeden beliebigen Ort, sondern schafft auch die Voraussetzungen für eine rasante Entstehung von Epidemien und Pandemie. Somit ist es höchste Zeit, sich von dem in unseren Breiten vorherrschenden Gedanken die Tuberkulose besiegt zu haben, zu verabschieden und stattdessen Vorbereitungen zu treffen, die dem Risiko potenziell betroffen zu sein, Rechnung tragen. Aus globaler Sicht genügt es daher nicht nur, endlich die strukturellen Voraussetzungen einer ausreichenden medizinischen Versorgung in den stark betroffenen Gebieten zu schaffen und die Entwicklung neuer effektiver antimykobakterieller Arzneimittel mit Nachdruck voranzutreiben, auch hierzulande ist es dringend nötig, verlorengegangene Kompetenzen im Umgang mit der Tuberkulose aufzufrischen. Am Erfolg der von der WHO ins Leben gerufenen Programme^[2,3] ist ersichtlich, wie effektiv eine gut geplante und strukturierte Herangehensweise funktionieren kann und, wenn nicht so verspätet eingeleitet, noch viel besser hätte funktionieren können. Unzählbare Menschenleben hätten gerettet werden können und mit großer Wahrscheinlichkeit wären Resistenzsituation und die TB-HIV-Problematik besser kontrollierbar gewesen, hätte man das globale Bedrohungspotenzial der Tuberkulose rechtzeitig ernstgenommen. Als gebildeter und aufgeklärter Mensch muss man sich also fragen, warum vorhandene Ressourcen dermaßen für die Entwicklung einer endlos erscheinenden Anzahl von *Me-too*-Präparaten gegen westliche Wohlstandskrankheiten mit zudem fragwürdigem medizinischem Nutzen verschwendet wurden. Allein mit dem Hintergrund kurzfristiger wirtschaftlicher Interessen ist die Frage zwar einfach zu beantworten und wurde tragischerweise ebenso beantwortet, bedenkt man allerdings die resultierenden Opportunitätskosten dieser gierigen und nicht nachhaltigen Denkweise, wird der unausweichliche Denkfehler offensichtlich, dass die Frage selbst bei lediglich vorhandenen Gewinnmaximierungsinteressen ungenügend formuliert wurde. Vor allem vom angehenden Wissenschaftler, der noch nicht als Zahnrad im System funktionieren muss und dessen Geist daher frei und nicht beschränkt sein sollte, ist zu erwarten, dass er im Stande ist, sich die richtigen Fragen zu stellen, diese in Frage zu stellen

und wenn nötig umzuformulieren oder zu ergänzen hat. Häufig gestellte Fragen nach dem Einstiegsgehalt, nach der Vermeidung von Intimitäten durch zwei Buchstaben mit Punkt vor dem Namen oder nach Opportunismus, wenn man als Neoliberalist Entwicklungshilfeminister wird, obwohl man diesen Posten eigentlich wegrationalisieren wollte, sind nur wenige und zugegeben leicht polemische Beispiele dafür, dass diese kindliche, kreative Eigenschaft bei der sogenannten Elite viel zu oft verkümmert ist. Schlussendlich ist festzustellen, dass man ohne die richtige Frage keine ausreichende Antwort erhalten kann und die Tatsache, dass die gestellte Frage neue Fragen aufwirft und somit aufrecht erhalten wird, ist eine Art Indikator dafür, dass man noch Kind und kreativ genug ist, richtig fragen zu können. Ich hoffe, das ist mir mit der vorliegenden Arbeit zumindest teilweise gelungen.

1.2 Mykobakterien

Die Gattung *Mycobacterium* gehört zur Familie der *Mycobacteriaceae* und zur Ordnung der *Actinomycetales*. Mykobakterien sind grampositive, säurefeste, aerobe und unbewegliche Stäbchenbakterien, die mit der Gramfärbung nur schwer anfärbbar sind. Mit Hilfe spezieller basischer Farbstoffe lassen sich Mykobakterien zuverlässig anfärben, aber im Unterschied zu nicht-säurefesten Bakterien mit ethanolischer Salzsäure bei Raumtemperatur nicht wieder entfärben.^[9,10] Bei der *Ziehl-Neelsen*-Methode erfolgt die Anfärbung mit Carbolfuchsin in der Hitze, bei einer neueren fluoreszenzmikroskopischen Kaltfärbungsmethode verwendet man eine Auramin O-Rhodamin B-Färbelösung.^[11] Das säurebeständige Anfärbeverhalten liegt im außergewöhnlichen Aufbau der wachsartigen, undurchlässigen Zellwand begründet (siehe Kapitel 1.4).

Mittlerweile sind weit über hundert Mykobakterien-Arten bekannt. Die meisten Arten dieser Gattung sind nicht-pathogene freilebende Saprophyten, die sich durch die Zersetzung organischer Stoffe ernähren und nicht auf einen Wirt angewiesen sind. Zu den obligat pathogenen Mykobakterien, die Erkrankungen bei Mensch und Tier auslösen können, gehören *M. leprae* (Lepra), *M. tuberculosis* (humane Tuberkulose), *M. bovis* (Rindertuberkulose) und *M. avium* (Geflügeltuberkulose). In der Regel gehören die obligat pathogenen Keime zu den langsam wachsenden Arten. Die sieben obligat pathogenen Erreger (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. pinnipedii*), die Tuberkulose im Menschen auslösen können, werden im sogenannten *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex zusammengefasst. Manchmal zählt man hierzu zusätzlich den fakultativ pathogenen Impfstamm *M. bovis* BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*). Atypische Mykobakterien oder MOTT (*mycobacteria other than tuberculosis*) sind fakultativ pathogen und können tuberkuloseähnliche Erkrankungen auslösen, werden in der Regel aber nicht von Mensch zu Mensch übertragen. Wichtige Beispiele hierfür sind *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. smegmatis*, *M. ulcerans* und *M. marinum*. Infektionen mit atypischen Mykobakterien treten häufig bei HIV-Patienten auf.^[9,10]

1.2.1 *Mycobacterium tuberculosis*

Der Haupterreger der menschlichen Tuberkulose ist das *M. tuberculosis* und wurde im Jahre 1882 von Robert Koch erstmals beschrieben (siehe Abbildung 1).^[12] Das stäbchenförmige Bacterium ist bis zu 4 µm lang und bis zu 0.6 µm breit und ein fakultativ intrazellulärer Parasit. Der spezielle Aufbau der Zellwand (siehe Kapitel 1.4) ermöglicht das Überleben und

die Vermehrung in Makrophagen. Das Wachstum bzw. die Zellteilung sind äußerst langsam. Bis zu 24 Stunden bei optimalen Bedingungen nimmt eine Zellteilung in Anspruch. Dies macht wiederum die schwierige Kultivierbarkeit von *M. tuberculosis* verständlich. Im Gegensatz zu avirulenten Stämmen besitzen virulente ein Glycolipid (*Cord*-Faktor), das zu schnurartigen Wachstumsformen auf Kulturmedium führt.^[10]

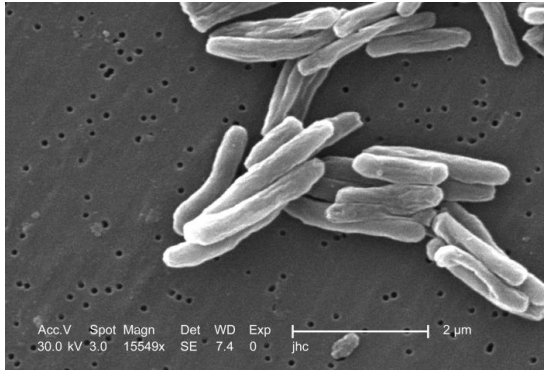


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme des *Mycobacterium tuberculosis*. (Quelle: CDC Public Health Image Library, Dr. Ray Butler; Janice Carr, PHIL #8438, 2006.)

Bemerkenswert ist auch die extreme Anpassungsfähigkeit des mykobakteriellen Stoffwechsels. Sowohl für eine sauerstoffreiche Umgebung wie das Lungengewebe als auch für die annähernd anaeroben Bereiche der Granulome, in denen die Keime über Jahre persistieren können, konnten Stoffwechselwege gefunden werden. Abhängig vom vorliegenden Wirtsgewebe kann ein aerober Kohlenhydrat-Metabolismus oder ein mikroaerophiler Lipid-Metabolismus mit Lipiden als Haupt-Kohlenstoffquelle vorliegen. Eine große Anzahl an Genen im mykobakteriellen Genom codiert Enzyme, die an Auf- und Abbau von verschiedenartigsten Lipiden beteiligt sind. Dies erklärt auch die im Vergleich zu anderen Mikroorganismen viel größere Diversität von lipophilen Molekülen.^[13]

1.3 Die Tuberkulose

1.3.1 Epidemiologie

Die Tuberkulose ist nach HIV/AIDS die Infektionskrankheit der Welt, die die meisten Todesopfer fordert. Die meisten Fälle werden aus Afrika, Südostasien, den GUS-Staaten und Regionen im westlichen Pazifik gemeldet. Schätzungsweise sind 1.9 Milliarden Menschen weltweit infiziert, was ungefähr einem Drittel der Weltbevölkerung entspricht. Laut WHO gab es im Jahre 2012 schätzungsweise 8.6 Millionen Neuerkrankungen und 1.3 Millionen Menschen, die an Tuberkulose gestorben sind. Unter den Verstorbenen litten 320 000 Menschen an einer TB-HIV-Coinfektion. Der größte Anteil der knapp neun Millionen Neuerkrankungen im Jahr 2012 betraf Patienten männlichen Geschlechts. Bei weiblichen Patientinnen wird die Inzidenz mit 2.9 Millionen neuen Fällen beziffert und von insgesamt 410 000 tödlichen Ausgängen berichtet. Unter den Verstorbenen waren wiederum 160 000 Frauen zusätzlich HIV-positiv. Sie machen somit die Hälfte aller Todesfälle durch TB-HIV-Coinfektionen aus. Vor allem für Frauen im gebärfähigem Alter zählt die Tuberkulose zu den häufigsten Todesursachen. Bei geschätzten 530 000 an TB neuerkrankten Kindern starben allein 74 000 ohne vorliegende Coinfektion mit HIV. Zwar konnte seit Einführung der DOTS-Therapie (siehe Kapitel 1.3.3) und der Stop-TB-Strategie in den neunziger Jahren durch die WHO die weltweite TB-Sterberate um 45 % gesenkt werden, von Kontrolle oder Sieg über die Krankheit kann aber keineswegs die Rede sein. Die WHO nimmt an, dass im Jahr 2012 immer noch ungefähr drei Millionen Tuberkulosepatienten medizinisch nicht versorgt werden konnten. Im selben Jahr wurden 450 000 neue TB-Fälle mit mehrfach resistenten Tuberkelbakterien bei insgesamt 170 000 Todesfällen gemeldet. Über 50 % dieser Resistenzfälle traten in China, Indien, Russland und den GUS-Staaten auf.^[2,3]

1.3.2 Pathogenese und Symptomatik

Die Ansteckung erfolgt in der Regel über aerogene Tröpfcheninfektion, z.B. durch Husten und Auswurf von erregerhaltigen Tröpfchen eines Erkrankten, die durch den sich Ansteckenden inhaliert werden. Nach der Aufnahme in die Lunge des Wirts kommt es zu einer vor allem durch Makrophagen und T-Zellen vermittelten zellulären Immunantwort. In den Alveolen werden die Erreger durch Lungenmakrophagen phagozytiert, können aber wegen ihrer widerstandsfähigen Zellwand nicht lysiert werden. Von den Makrophagen freigesetzte Signalstoffe stimulieren Fibroblasten aus der Umgebung zum Einkapseln des Infektionsorts, wodurch es zur Bildung von Granulomen oder Tuberkeln kommt. Ein funktionsfähiges

Abwehrsystem kann die Infektion dadurch lokal eindämmen, eine vollständige Eliminierung des Erregers findet jedoch nicht statt. Versteckt und eingekapselt in fibrotischen Läsionen können die Mykobakterien für viele Jahre persistieren, um dann plötzlich wieder aufzutauchen und zum aktiven Krankheitsausbruch zu führen. Es verwundert daher nicht, dass ungefähr ein Drittel der Weltbevölkerung zu den latent Infizierten, die symptomfrei und nicht infektiös sind, zählt. Ob es bereits kurz nach der Infektion, erst zu einem späteren Zeitpunkt oder nach erfolgreicher Eliminierung des Erregers durch das Wirtsimmunsystem zu überhaupt keinem Krankheitsausbruch kommt, ist abhängig von zahlreichen Faktoren, vor allem aber vom Zustand des Immunsystems. Ist dieses arzneimittelbedingt oder im Zuge einer HIV-Coinfektion supprimiert, geschwächt durch Alter, Mangelernährung und schlechten Lebensbedingungen oder wie im Kleinkindalter noch nicht vollständig ausgeprägt, führt dies zum Verlust der Erregerkontrolle. Daraus resultiert eine lokale Erkrankung, die auf lymphogenem oder hämatogenem Weg zu einer extrapulmonalen Manifestation der Tuberkulose führen kann.^[9,14,15]

Zu den allgemeinen Symptomen dieser zährenden, schleichenden Erkrankung zählen Abgeschlagenheit, Müdigkeit, Appetit- und Gewichtsverlust sowie insbesondere nachmittags bzw. abendlich erhöhte Temperatur. Bei der am häufigsten auftretenden Lungentuberkulose tritt zudem anhaltender Husten mit und ohne Auswurf auf. Ist das Sputum durch fortschreitende Nekrotisierung und Arrosion des Bronchial- bzw. Lungengewebes gar blutig und der Erreger darin nachweisbar, spricht man von einer offenen Tuberkulose. Der Befall von Lymphknoten und die tuberkulöse Pleuritis zählen zu den am häufigsten auftretenden extrapulmonalen Organtuberkulosen, gefolgt von den weniger oft beobachteten, aber meist komplizierteren Verlaufsformen der Urogenital- und Knochentuberkulose, der tuberkulösen Perikarditis und Meningitis und der Hauttuberkulose. Neben den beschriebenen Allgemeinsymptomen treten bei den extrapulmonalen Verlaufsformen vielgestaltige organbezogene Symptome auf. Allen Verlaufsformen gemeinsam ist der verkäsende, nekrotische Gewebsuntergang. Durch die hämatogene Erregerstreuung kann sich ebenfalls eine tuberkulöse Sepsis entwickeln. Diese akut lebensbedrohliche Form nennt man Milliartuberkulose. In Deutschland macht die Lungentuberkulose mit ca. 80 % der Erkrankten den deutlich größten Anteil aus, der allerdings insbesondere in Ländern mit hoher HIV-TB-Koinfektionsrate weniger deutlich ausfällt. Schätzungsweise 40–75 % aller Coinfizierten leiden an der extrapulmonalen Form.^[14,15,16,17]

1.3.3 Diagnostik und Therapie der Tuberkulose

Das Ziel der Therapie ist neben der Heilung und Wiederherstellung des Erkrankten das Verhindern von Spätschäden, Resistenzentwicklung und weiterer Verbreitung. Für eine adäquate und erfolgreiche Pharmakotherapie sind zuvor der Erregernachweis und die Testung auf Antibiotika-Resistenz notwendig.

Mit dem klassischen **Tuberkulin-Hauttest** (THT) lässt sich nach intrakutaner Applikation von mykobakteriellen Antigenen (Tuberkulin) nachweisen, ob im Organismus bereits immunkompetente T-Zellen vorhanden sind. Der Test ist mit einer niedrigen Spezifität behaftet. Beispielsweise können eine frühere BCG-Impfung oder Kontakt mit anderen Mycobakterien in der Umwelt zu falsch positiven Ergebnissen führen. Der **Interferon-Gamma-Release-Assay** (IGRAs) hat zwar eine größere Spezifität, ist aber auch mit größerem experimentellem Aufwand verbunden. Das Prinzip beruht auf dem Nachweis der *Interferon Gamma*-Produktion von kultivierten Lymphozyten nach Antigenkontakt.^[14,18] Weiterhin können durch Röntgenaufnahmen der Lunge Tuberkulose-spezifische Veränderungen sichtbar gemacht werden.

Die **Erregerkultivierung** ist die empfindlichste Nachweismethode. Sie bedarf ausreichend kontaminierten Probenmaterials und nimmt, bedingt durch langsames Wachstum und abhängig vom Kulturmedium, relativ viel Zeit in Anspruch (~10–30 Tage). Die Erregerkulturen ermöglichen einen zuverlässigen Erregernachweis durch Anfärbung und Mikroskopie (siehe Kapitel 1.2) und die Bestimmung von Resistenzen. Sofern ausreichend Erreger im Probenmaterial vorhanden sind, können diese auch direkt einer der mikroskopischen Untersuchungsmethoden unterworfen werden. Für eine effektive Therapie der multiresistenten Tuberkulose sind Resistenztestungen mit Antituberkulotika Voraussetzungen. Allerdings können in vielen Hochprävalenzländern nicht einmal ausreichende Resistenztestungen von Standardantituberkulotika gewährleistet werden.^[14,19]

Bei der **Xpert MTB/RIF-Methode**^[20,21] werden bestimmte Gen-Sequenzen, die spezifisch für das *M. tuberculosis* und die Rifampicin-Resistenz sind, mittels PCR (*Polymerase Chain Reaction*) amplifiziert und detektiert. Die Nucleinsäureamplifikationstechnik stellt somit eine schnelle (wenige Stunden) und zuverlässige Nachweismethode dar und es sollte technisch kein Problem darstellen, auch weitere resistenzcodierende Gene detektierbar zu machen. Gleichfalls können mit dieser molekularbiologischen Methode atypische Mykobakterien identifiziert werden. Ein zusätzlicher HIV-Test sollte obligatorisch durchgeführt werden.

Um die Entwicklung von Resistenzen möglichst zu verhindern, beginnt man die **Standardtherapie**^[5,14,22] mit einer Kombination aus vier Antituberkulotika. Gibt es keine Annahme einer Resistenz besteht diese initiale Kombinationstherapie einer unkomplizierten, empfindlichen Tuberkulose bei Erwachsenen aus den oralen Erstrang-Antituberkulotika Rifampicin, Isoniazid, Pyrazinamid und Ethambutol (siehe Abbildung 2).

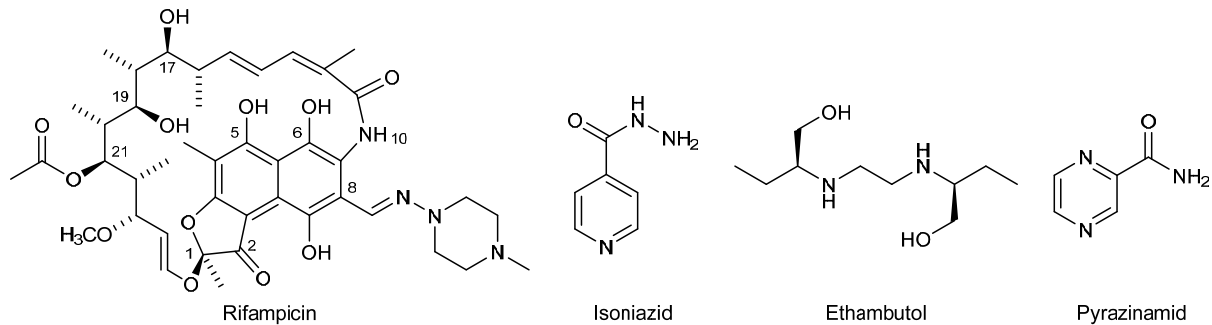


Abbildung 2: Orale Erstrang-Antituberkulotika.

Diese werden einmal täglich über zwei Monate eingenommen (4 Arzneistoffe x 2 Monate) und weitergeführt bis das Ergebnis der Resistenztestung vorliegt. An diese Intensivtherapie schließt sich eine Kontinuitätstherapie an, bei der über weitere vier Monate zwei Antituberkulotika (2 Arzneistoffe x 4 Monate), in der Regel Rifampicin und Isoniazid, appliziert werden. Unter Voraussetzung der *Compliance* des Patienten sowie konsequenter Umsetzung des Therapieschemas werden bei unkomplizierten Fällen, die keine Resistenzen aufweisen, Heilungsraten von über 85 % erreicht. Im Falle von *Non-Compliance* sollte laut WHO die Einnahme der Arzneimittel nur unter Aufsicht stattfinden. Man spricht hierbei von der sogenannten DOTS-Therapie (*Directly Observed Treatment Short-Course*).^[4] Bei Vorliegen einer offenen Tuberkulose, schwerem Krankheitsverlauf oder sonstigen Therapieproblemen ist eine initiale stationäre Behandlung in Betracht zu ziehen.^[23] Die extrapulmonale Tuberkulose wird nach demselben Schema behandelt. Bei der mykobakteriellen Meningitis ist zudem die ZNS-Gängigkeit der Wirkstoffe zu berücksichtigen und eine verlängerte Therapiedauer indiziert.^[5,14,22] Bei einer TB-HIV-Coinfektion und zusätzlicher antiretroviraler Therapie muss das Wechselwirkungspotenzial der eingesetzten Antituberkulotika, insbesondere von Rifampicin und HIV-Proteaseinhibitoren, bedacht werden.^[5,14,24] Nachfolgend werden die oralen Erstrang-Antituberkulotika besprochen.

Rifampicin und Rifabutin sind sogenannte **Rifamycine** oder Ansamycine, die halbsynthetisch aus Rifamycin B, das aus *Amycolatopsis rifamycinica* isoliert wird,^[25] darstellbar sind und bakterizide Eigenschaften haben. Die Grundstruktur besteht aus einem planaren

Naphtochinon bzw. Hydronaphtochinon, das von einer Polyketidkette in Form eines Henkels überspannt wird (lat.: *ansa* = Henkel). Die Sauerstoffe der Hydroxyl- bzw. Ketogruppe an Position 5 und 6 des planaren Ringsystems sowie die zwei Hydroxylfunktionen an Position 17 und 19 des Polyketids sind für die Wirksamkeit essenzielle Strukturelemente.^[26,27] Durch Bindung an die β -Untereinheit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase wird ein Kanal des Enzyms, den die wachsende RNA-Kette zur Freisetzung passieren muss, teilweise blockiert und führt letztlich zum Abbruch der RNA-Synthese.^[28,29] Resistenzen gegen Rifamycine bilden sich durch Mutationen im *robB*-Gen, das für die β -Untereinheit codiert.^[30,31] Das Rifampicin besitzt in Position 8 des Hydronaphtochinons einen mit 4-Methyl-*N*-aminopiperazin zum Hydrazon kondensierten Formylrest.^[26,27] Bei der hepatischen Biotransformation werden das Hydrazon wie auch die Acetylgruppe in Position 21 hydrolysiert und biliär eliminiert. Das Furanonaphtochinon-Chromophor führt zur Rotfärbung von Körperflüssigkeiten.^[26,32] Weitere Vertreter sind Rifapentin, das anstatt der Methylgruppe am Piperazin einen Cyclopentylrest besitzt,^[33] sowie das Spiroimidazorifamycin Rifabutan, welches häufig noch moderate Wirkungen gegen Rifampicin-resistente *M. tuberculosis*-Stämmen zeigt. Alle Rifamycine sind Induktoren von CYP3A4 und diverser Glucuronyl-Transferasen. Dies birgt ein großes Interaktionspotenzial, insbesondere mit vielen Wirkstoffen der HIV-Therapie.^[26,27]

Das Prodrug **Isoniazid** (Isonicotinsäurehydrazid, INH) wird seit den 1950er Jahren erfolgreich als Antituberkulotikum eingesetzt (siehe Kapitel 1.5).^[26] Nachdem INH ins Mykobakterium gelangt, wird es durch die mykobakterielle Katalase/Peroxidase KatG zum Isonicotinoylradikal oxidiert und bildet nach nicht-enzymatischer Reaktion mit NAD⁺ die eigentliche Wirkform, das kovalente Isonicotinoyl-NAD-Addukt INH-NAD (siehe Abbildung 3).^[34,35] Dieses bindet nicht-kovalent, mit großer Affinität ($K_i = 0.75$ nM) und *slow-onset*-Charakteristik an die Enoyl-Reduktase InhA und hemmt dadurch ein Schlüsselenzym der Biosynthese von Mykolsäuren.^[36] Zudem werden zahlreiche weitere mykobakterielle Proteine gehemmt, was die Effizienz der antibiotischen Wirkung weiter steigert.^[37,134] Resistenzen gegen INH bilden sich vor allem durch Mutationen im *katG*-Gen, d.h. die Aktivierung des Prodrugs wird verhindert. Mutationen im *inhA*-Gen und dessen Promotorregion führen zum einen zu einer herabgesetzten Affinität von InhA zum NAD-Teil des INH-NAD-Addukts, zum anderen wird die Biosynthese von InhA gesteigert. Weiterhin existieren noch zusätzliche Resistenzmechanismen, die allerdings eine untergeordnete Rolle spielen.^[38] INH wird entweder nach Hydrolyse des Hydrazids an Glycin gekoppelt und als Isonicotinursäure ausgeschieden oder durch eine Acetyltransferase acetyliert. Nach weiteren

Biotransformationsschritten entsteht das hepatotoxische Acetylradikal. Die Acetyltransferase unterliegt einem Polymorphismus, d.h. die Acetylierungsgeschwindigkeit kann interindividuell stark schwanken, was sich wiederum in pharmakokinetischen Parametern wie z.B. der Halbwertszeit bemerkbar macht. Das Hydrazid bzw. das nach Hydrolyse entstandene Hydrazin bildet leicht Hydrazone mit Carbonylverbindungen wie Pyruvat, α -Ketoglutarat und Pyridoxal (Vit. B6). Insbesondere letztere Reaktion kann zu neurotoxischem Pyridoxalmangel führen. Während der Behandlung sollte daher eine Substitution mit Pyridoxin erfolgen.^[26,27]

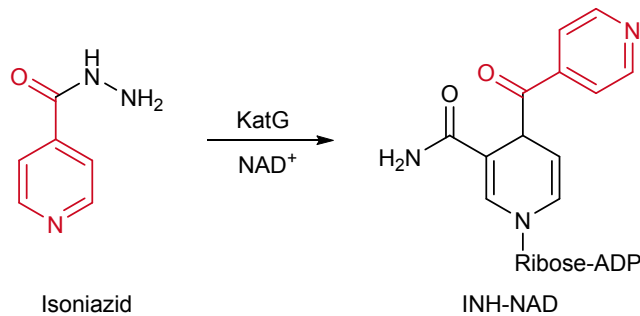


Abbildung 3: Aktivierung von Isoniazid durch die Katalase/Peroxidase KatG.

Das Ethylendiamin-Derivat **Ethambutol** wirkt bakteriostatisch gegen proliferierende Mykobakterien. Es besitzt zwei Stereozentren, wobei das *S,S*(+)-Enantiomer aktiv ist, das *R,R*(-)-Enantiomer inaktiv und die *meso*-Form schwach wirksam ist.^[26] Man nimmt an, dass *S,S*-Ethambutol eine Arabinosyltransferase hemmt, wodurch der Aufbau der Arabinogalactanschicht gestört wird.^[38,39] Dies führt wiederum zu einer Erhöhung der Zellwanddurchlässigkeit, wodurch der synergistische Effekt mit anderen Antituberkulotika erklärt werden kann. Ethambutol wird zu 60 % unverändert ausgeschieden oder nach Oxidation zum Di-Aldehyd bzw. zur Di-Säure, die dann als Di-Glucuronid ausgeschieden wird. Nebenwirkungen sind Schädigungen des Sehnervs und Erhöhung des Harnsäurespiegels.^[26,27]

Der Wirkmechanismus von **Pyrazinamid** ist nicht vollständig verstanden. Es wird angenommen, dass Pyrazinamid durch passive Diffusion in das Mykobakterium gelangt und dort durch eine Amidase zur Pyrazinsäure (pks 2.9) hydrolysiert wird. Die Säure akkumuliert im Zellinneren und senkt den pH-Wert. Dies beeinträchtigt den zur ATP-Synthese notwendigen Protonengradienten über die Zellmembran. Pyrazinsäure kann wiederum durch passive Diffusion oder durch aktiven Transport das Zellinnere verlassen. Herrscht im Zelläußeren ein saures Milieu, wie dies in Makrophagen und Phagosomen der Fall ist, so ist der protonierte ungeladene Anteil der Pyrazinsäure erneut in der Lage in das Mykobakterium zu diffundieren. Pyrazinamid ist hochwirksam gegen persistierende

Mykobakterien, die sich in saurer Umgebung unter einem pH-Wert von 5.5 befinden.^[40,26,27] Resistenzen kommen durch Mutationen im *pncA*-Gen, das für die Amidase codiert, zustande. Dadurch wird die Aktivierung von Pyrazinamid zur Säure verhindert.^[41] Gegen die Pyrazinsäure selbst sind keine Resistenzen bekannt. In der Leber findet schnelle Amidhydrolyse und Hydroxylierung in Position 5 durch die Xanthinoxidase und die Aldehyddehydrogenase statt. Als unerwünschte Nebenwirkung kommt es zur Erhöhung des Harnsäurespiegels.^[26,27,32]

Die effektive Therapie der **resistenten Tuberkulose** ist ohne Kenntnis des Resistenztyps unmöglich. Es wird zwischen drei Resistenzsituationen unterschieden. Ist der Erreger resistent gegen die zwei effektivsten Erstrang-Antituberkulotika Isoniazid und Rifampicin, spricht man von einer multiresistenten Tuberkulose (*Multidrug-resistant-TB*, *MDR-TB*). Werden zusätzlich Resistenzen gegen die Fluorchinolone und gegen die parenteral zu applizierenden Zweitstrang-Antituberkulotika (Amikacin, Kanamycin, Capreomycin) festgestellt, handelt es sich um eine extrem resistente Form (*Extensively drug-resistant-TB*, *XDR-TB*). Rifampicin-resistente Erreger sind ausschließlich gegen Rifampicin resistent (*Rifampicin-resistant-TB*, *RR-TB*).^[42] Die Therapie ist kompliziert, muss individuell abgestimmt werden und kann länger als zwei Jahre dauern. Für die initiale Pharmakotherapie sollte idealerweise eine Kombination aus fünf wirksamen Antituberkulotika der Substanzgruppen 1–5 zum Einsatz kommen (siehe Tabelle 1).^[5,6,14,22,27]

Tabelle 1: Einteilung der Antituberkulotika.

Gruppe	Beschreibung	Substanz
1	Orale-Erstrang-Antituberkulotika	Rifampicin Isoniazid Ethambutol Pyrazinamid Rifabutin
2	Injizierbare Antituberkulotika	Streptomycin Capreomycin Amikacin Kanamycin
3	Fluorchinolone	Ofloxacin Levofloxacin Moxifloxacin

Gruppe	Beschreibung	Substanz
4	Orale-Zweitrang-Antituberkulotika	Ethionamid Protionamid Cycloserin Terizidon <i>p</i> -Aminosalicylsäure
5	Substanzen mit unklarer Wirksamkeit bzw. Stellenwert für die Tuberkulosetherapie	Clofazimin Linezolid Amoxicillin/Clavulansäure Thiocetazon Clarithromycin Imipenem

Substanzen der Gruppe 5 werden derzeit nicht von der WHO zur Routinebehandlung empfohlen.

Die aktuell verwendeten Erstrang-Antituberkulotika sind allesamt um die fünfzig Jahre alt. Die zwingend notwendige Reaktion auf die globale TB-Situation erfolgte mit dem Stop-TB-Programm gegen Ende des letzten Jahrtausends. Im Zuge dessen wurde auch das Interesse der pharmazeutischen Industrie wiedererweckt, sodass sich mittlerweile insgesamt zehn neue oder bereits anderweitig bekannte Antibiotika in der **Pipeline** (Phase II/III) sowie viele weitere in der Präklinik oder Entwicklung befinden (siehe Kapitel 1.5).^[43]

Die aus dem attenuierten *M. bovis*-Stamm *Bacille-Calmette-Guérin* (BCG) hergestellten **Impfstoffe** sind bezüglich der Risiko-Nutzen-Abwägung kritisch zu betrachten und werden immer seltener eingesetzt. Die Routine-Impfung wird von der STIKO (Ständige Impfkommision) des Robert-Koch-Instituts für Deutschland seit 1981 nicht mehr empfohlen. Einige neuartige oder modifizierte BCG-Impfstoffe befinden sich aktuell in der Entwicklung.^[44,45]

Einleuchtenderweise gibt es auch auf diesem Forschungsfeld dringenden Nachholbedarf. Aktuell befinden sich zwölf neue Impfstoffe in der klinischen Phase.

1.4 Die mykobakterielle Zellwand als potenzielles Ziel von Antituberkulotika

1.4.1 Aufbau der mykobakteriellen Zellwand

Die mykobakterielle Zellwand besteht aus einer inneren Plasmamembran, die von einer lipid- und kohlenhydratreichen Schicht umgeben ist, welche ihrerseits wiederum von einer Art Kapsel aus Polysacchariden, Proteinen und Lipiden umgeben ist. Die Plasmamembran besitzt ähnlich der Zellwand Gram-positiver Bakterien eine Peptidoglykanschicht bestehend aus *N*-Acetyl- β -*D*-glucosaminyl-(1 \rightarrow 4)-*N*-acetylmuraminsäure-Einheiten, die durch an die Säure-Gruppen der Muraminsäuren geknüpfte und wiederum über Peptidlinker quervernetzte Peptidketten miteinander verbunden sind. Der Kern der Zellwand ist chemisch gesehen aus drei kovalent miteinander verbundenen Makromolekülen aufgebaut: stark quervernetztem Peptidoglykan, Arabinogalactan (AG) und Mykolsäuren. Die Arabinan-Kette des Arabinogalactans verankert hierbei die äußere Lipidschicht aus Mykolsäuren und verbindet diese über eine Galactan-Kette mit der darunter liegenden Peptidoglykanschicht. Dieser Mykolyl-Arabinogalactan-Peptidoglykan-Komplex (mAGP) bildet das Rückgrat der mykobakteriellen Zellwand. In die Mykolsäureschicht sind wiederum weitere Glycolipide eingebettet, die eine äußere Lipidschicht bilden (siehe Abbildung 4).^[46,47,48]

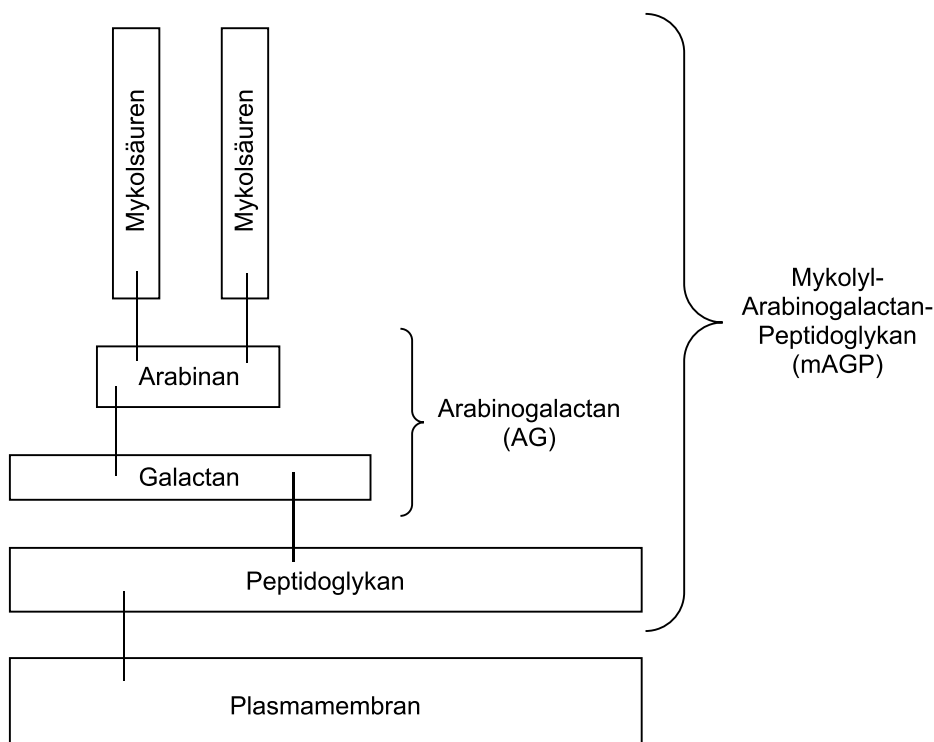
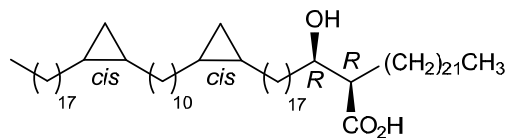


Abbildung 4: Schema zum Aufbau der mykobakteriellen Zellwand (äußere Lipidschicht und Kapselbestandteile sind nicht dargestellt).

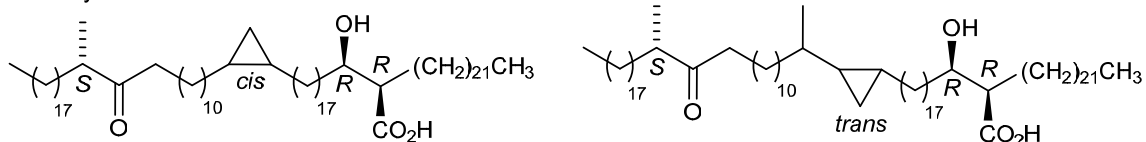
Mykolsäuren sind verzweigte α -Alkyl- β -hydroxy-Fettsäuren mit einer Kettenlänge bis zu 90 Kohlenstoffatomen und hauptsächlich verantwortlich für die wachsartige Lipidstruktur der

Zellwand. Der Großteil liegt hierbei verestert mit Arabinogalactan, ein kleinerer Teil als Trehalose-6,6'-dimykolat, dem sogenannten *Cord*-Faktor (siehe Kapitel 1.2.1), vor. Man unterscheidet α -Mykolsäuren, *Keto*-Mykolsäuren und *Methoxy*-Mykolsäuren (siehe Abbildung 5).^[49,50] Allen gemeinsam sind die Chiralitätszentren in α - und β -Position zur Carboxylgruppe mit *R,R*-Konfiguration. Die Cyclopropan-Ringe sind entweder *cis* konfiguriert oder liegen wie bei den *Keto*- und *Methoxy*-Mykolsäuren als α -Methyl-*trans*-cyclopropan vor, wobei sich die Methyl-Gruppe in distaler Position zur Hydroxysäure-Gruppe befindet.^[51] Der Aufbau und die genaue Zusammensetzung der Mykolsäuren variiert nicht nur zwischen den jeweiligen Arten von Mykobakterien, sondern auch zwischen verschiedenen Zelllinien von *M. tuberculosis*. Es wurden Mykolsäuren variierender Kettenlänge mit Doppelbindungen, zusätzlichen Cyclopropan-Ringen oder gebunden als Wachs-Ether gefunden.^[52,53] Interessanterweise zeigen langsam wachsende Mykobakterien wie *M. tuberculosis* ein Cyclopropan-Substitutionsmuster, wohingegen das schnell wachsende *M. smegmatis* ein Doppelbindungsmuster besitzt. Die Bestimmung des Mykolsäuremusters, d.h. des Aufbaus und der genauen Zusammensetzung der Mykolsäuren z.B. mittels NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie, ergibt somit eine Art Fingerabdruck eines Stammes und ermöglicht dadurch dessen Zuordnung.^[51]

α -Mykolsäuren:



Keto-Mykolsäuren:



Methoxy-Mykolsäuren:

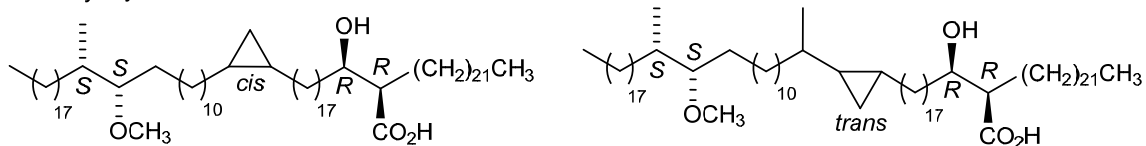


Abbildung 5: Beispiele von α -, *Keto*- und *Methoxy*-Mykolsäuren.

Als wesentlicher Bestandteil der hydrophoben Zellwand machen die Mykolsäuren zusammen mit den Peptidoglykanen und Arabinogalactanen über 60 % des Zelltrockengewichts aus. Diese außerordentlich dicke und wachsartige Zellwand ist für das Mycobacterium lebensnotwendig. Sie bietet Schutz vor mechanischer Krafteinwirkung, Austrocknung, Kälteeinwirkung, Alkohol, Säuren und Laugen. Zudem ermöglicht sie die Vermehrung in

Makrophagen und stellt eine effektive Barriere für Antibiotika dar. Auch Desinfektionsmittel wirken nur bedingt und erst nach stark verlängerter Einwirkzeit. Diese Fakten machen verständlich, dass es sich bei Mykobakterien um extrem widerstandsfähige und robuste Mikroorganismen handelt, die unter extremen äußeren Bedingungen überleben können. Gleichfalls geht daraus aber hervor, dass eine gezielte Störung des Zellwandaufbaus zu nicht überlebensfähigen Mykobakterien führt.^[50,54,55]

1.4.2 Biosynthese von Mykolsäuren

a) *Der Fettsäuresyntheseweg I*

Die Fettsäuresynthese ist ein lebenswichtiger Vorgang aller Organismen z.B. für den Aufbau von Membranen. Im Fettsäurezyklus I werden Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 16 bis 18 Kohlenstoffatomen synthetisiert. Die Fettsäuresynthase I (FAS-I) ist ein großer multifunktionaler Enzymkomplex, durch den die anabolen Stoffwechselforgänge katalysiert werden.^[56,57] Zwar ist der Aufbau der FAS-I von Organismus zu Organismus unterschiedlich, die dabei ablaufenden Reaktionsschritte sind aber gleich. Acyl-Reste, die über einen Linker mit endständiger Thiol-Gruppe kovalent an das Acyl-Carrier-Protein (ACP) gebunden sind, durchlaufen einen enzymatischen Kreislaufprozess, bei dem der an das ACP gebundene Acyl-Rest von einem enzymatischen Schritt zum nächsten innerhalb des Multienzymkomplexes weitergegeben wird. Dabei erfolgt pro Zyklus eine Kettenverlängerung von zwei Kohlenstoff-Atomen durch die Einführung eines Acetyl-Rests.^[58,59]

Im ersten Schritt wird Acetyl-CoA mit Hilfe der Acetyl-CoA-Carboxylase (1. ACC) zu Malonyl-CoA umgesetzt. Dieses wird durch die Malonyl-Acetyl-Transferase (2. MAT) in Schritt 2 auf den Thiol-Linker des ACP übertragen. Im Anschluss findet eine durch die β -Ketoacylsynthase (3. KS) katalysierte *Claisen*-Kondensation von Malonyl-ACP mit Acetyl-CoA zum β -Keto-Acyl-ACP statt. Es folgt die Reduktion des Ketons zum Alkohol durch die Ketoreduktase (4. KR), Elimination von H₂O durch die Dehydratase (5. DH) und schließlich die Hydrierung der zuvor entstandenen Doppelbindung durch die Enoylreduktase (6. ER). Das entstandene gesättigte Butanoat-ACP ist gegenüber dem Substrat Acetyl-CoA um zwei Kohlenstoffatome verlängert und wird erneut dem Elongationszyklus zugeführt. Dieser Prozess wiederholt sich so lange, bis Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C₁₆–C₁₈, bei Mykobakterien bis C₂₆, entstanden sind (siehe Abbildung 6).^[56,57,58]

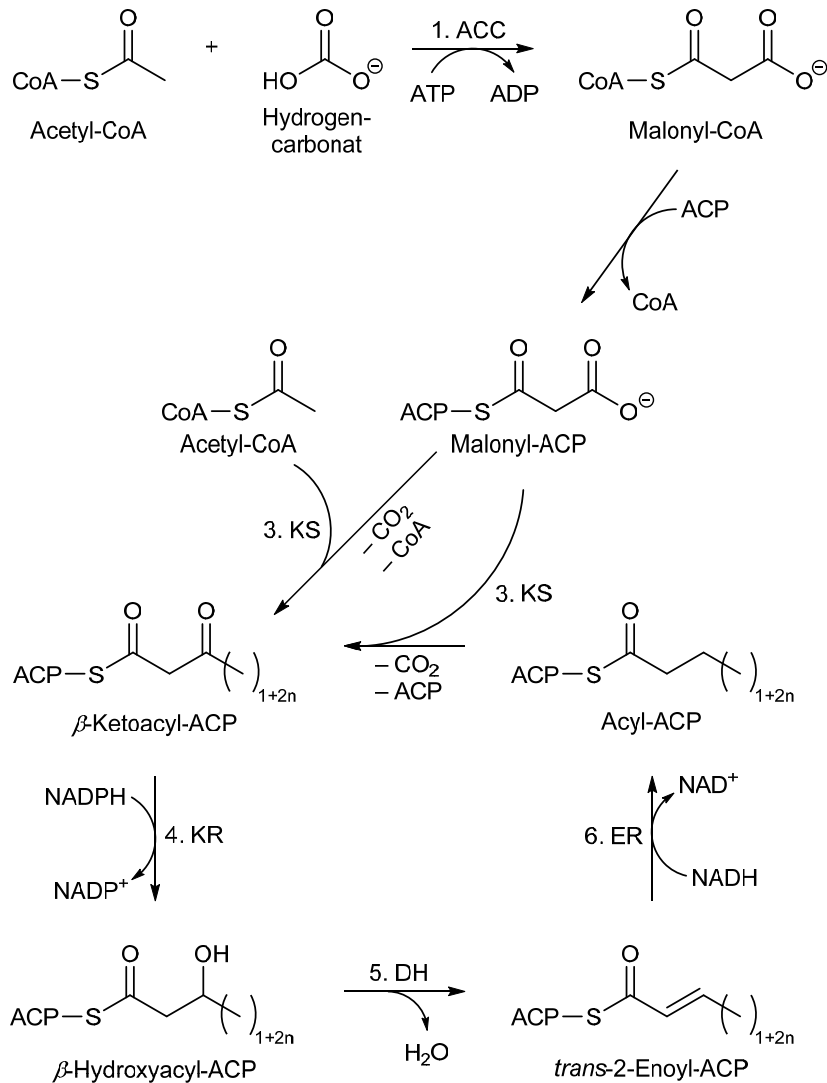


Abbildung 6: Reaktionen des FAS-I-Zyklus.

b) Der Fettsäuresyntheseweg II von Mykobakterien

Mykobakterien besitzen die besondere Fähigkeit, die im FAS-I synthetisierten Fettsäuren anschließend bis auf eine Kettenlänge von 56 Kohlenstoffatome zu verlängern. Dies findet im sogenannten Fettsäuresyntheseweg-II (FAS-II) statt (siehe Abbildung 7). Die einzelnen Reaktionen des Elongationsprozess' sind analog des FAS-I, werden aber im Unterschied zum FAS-I nicht durch ein großes Multifunktionsenzym katalysiert. Die jeweiligen Teilschritte werden durch einzelne kleine Enzyme katalysiert, wobei die Intermediate wiederum als Thioester an ACP gebunden vorliegen.^[58,60] Eine β -Ketoacylsynthase (FabH, KasA, KasB) katalysiert die *Claisen*-Kondensation von Malonyl-ACP mit der aus dem FAS-I stammenden und mit CoA veresterten Fettsäure. Durch die Ketoreduktase MabA findet anschließend die Reduktion der Ketofunktion zur Hydroxylfunktion statt. Nach Eliminierung von H_2O durch

eine Dehydratase (HadAB, HadBC) wird die entstandene Doppelbindung durch die Enoylreduktase InhA zum gesättigten und um zwei Kohlenstoffatome verlängerten Acyl-ACP-Intermediat hydriert. Wiederholtes Durchlaufen des Elongationskreislaufs ermöglicht dem Mycobakterium die Synthese von Fettsäuren mit einer Kettenlänge von bis zu 56 C-Atomen, die auch Meromykolsäuren genannt werden. Durch anschließende enzymatische Kondensationsreaktionen sowie durch Einführung diverser funktioneller Gruppen entstehen letztlich die eigentlichen Mykolsäuren mit Kettenlängen bis zu 90 C-Atomen (siehe Kapitel 1.4.1).^[61]

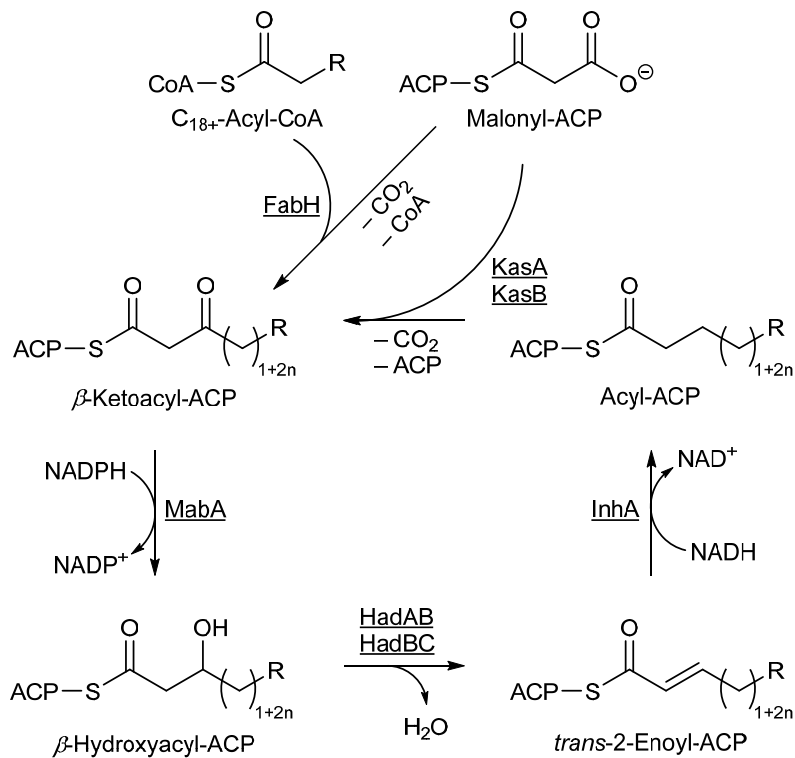


Abbildung 7: Der mykobakterielle FAS-II-Zyklus.

1.5 Die Enoylreduktase InhA des FAS-II-Wegs von Mykobakterien als potenzielles Ziel neuer Antituberkulotika

Wie bereits ausgeführt sind die Mykolsäuren als essenzieller Baustein seiner Zellwand für das Mycobacterium überlebenswichtig (siehe Kapitel 1.4). Die gezielte Störung der Biosynthese von Mykolsäuren resultiert daher in nicht überlebensfähigen Mykobakterien. Im Gegensatz zum FAS-I-Kreislauf, der von humanen wie auch von mykobakteriellen Zellen zur Synthese kurzkettiger Fettsäuren verwendet wird, liegt der FAS-II-Zyklus mit seiner hierfür notwendigen Enzymausstattung nur im Mycobacterium vor. Die am FAS-II-Zyklus beteiligten Enzyme (siehe Kapitel 1.4.2.b)) unterscheiden sich zudem strukturell deutlich von denen des FAS-I-Komplexes. Die Entwicklung selektiver Antibiotika, die gezielt das FAS-II-System und damit die Biosynthese von Mykolsäuren inhibieren, macht es also möglich, den Zellwandaufbau des Mycobacteriums zu unterbinden, ohne mit den physiologischen Stoffwechselvorgängen zu interferieren.^[62,63]

Die Dehydrogenase InhA ist die Enoyl-ACP-Reduktase des FAS-II-Systems in Mykobakterien. Sie katalysiert die Hydrierung der *trans*-konfigurierten Doppelbindung an Position 2 der an ACP gebundenen Fettsäure mit Hilfe von NADH als Cofaktor.^[64,65] In der aktiven Form liegt InhA als Homotetramer vor, wobei die Grenzflächen der Monomere durch α -Helices bzw. β -Faltblätter stabilisiert sind. Jedes Monomer besteht aus sieben β -Faltblatt-Strängen, die zusammen ein parallel angeordnetes β -Faltblatt bilden, sowie aus acht α -Helices. Zusammen mit sechs α -Helices bildet das β -Faltblatt wiederum die sogenannte *Rossmann*-Faltung aus. Hierunter versteht man eine Sekundärstruktur, die Dinucleotide wie NADH binden kann.^[66] Zwei der drei α -Helices, die eine tiefe hydrophobe Tasche formen, bilden die flexible Substratbindeschleife. Anders als bei anderen Enoylreduktasen ist die Substratbindeschleife von InhA länger und bildet eine tiefere Tasche. Dieses strukturelle Merkmal erklärt wiederum die Spezifität von InhA gegenüber länger-kettigen Fettsäuren als Substrat.^[67] Die Hemmung von InhA als essenziellem Enzym des FAS-II-Systems führt zu einer Störung des mykobakteriellen Zellwandaufbaus und schließlich zur Zellyse.^[68]

Altbekannte Hemmstoffe der Enoylreduktase InhA, die therapeutisch eingesetzt werden, sind Isoniazid (INH) (siehe Kapitel 1.3.3) und das strukturell verwandte Ethionamid (ETH). Die aktiven Formen beider Prodrugs besitzen denselben Wirkmechanismus, der Aktivierungsschritt unterscheidet sich hingegen. Während INH durch die Katalase/Peroxidase KatG oxidiert bzw. aktiviert wird, erfolgt die Aktivierung von Ethionamid über die Monooxygenase EthA.^[36,69,70] Die meisten INH-Resistenzen beruhen auf Mutationen von

KatG, wodurch die Bildung des aktiven INH-NAD-Addukts ausbleibt.^[71] Analog führen Mutationen im ethA-Gen zum Ausbleiben der Ethionamid-Aktivierung, wodurch das aktive ETH-NAD-Addukt nicht gebildet werden kann.^[72] Die Suche nach neuartigen InhA-Inhibitoren konzentriert sich daher auf die Entwicklung direkter Hemmstoffe, die keiner vorangehenden enzymatischen Aktivierung bedürfen und somit auch gegen KatG-mutierte INH-resistente und EthA-mutierte ETH-resistente Mykobakterien wirksam sind. Einige vielversprechende Verbindungen befinden sich aktuell in der Optimierungsphase. Hierzu gehören die vom antibakteriell wirksamen Triclosan abgeleiteten Diphenylether-Derivate,^[73,74] die in der vorliegenden Arbeit zu Validierungszwecken verwendet wurden und dort ausführlicher besprochen werden (siehe Kapitel 2.3.3.d)). Im Zuge eines Hochdurchsatz-Screenings wurde die Strukturklasse der Arylamide ausfindig gemacht und optimiert (z. B. Genz-10850).^[75] Vielversprechende Ergebnisse bei *in vitro* Testungen beider Verbindungsklassen konnten allerdings bei *in vivo*-Testungen nicht reproduziert werden. Diese Tatsache verdeutlicht die Komplexität bei der Entwicklung neuer Antituberkulotika. Die erforderlichen lipophilen Eigenschaften für die Penetration durch die mykobakterielle Zellwand machen es sehr schwer, auch den pharmakokinetischen Anforderungen bezüglich Löslichkeit, Absorption, Verteilung und Plasmaproteinbindung zu genügen. Seitens der pharmazeutischen Industrie wurde im Jahre 2010 von *GlaxoSmithKline* eine Verbindung (**I**) mit guten inhibitorischen *in vitro* Eigenschaften zum Patent angemeldet.^[76] Weiterhin befinden sich Derivate von Pyrrolidincarboxamiden als Leitstruktur in der Optimierungsphase (siehe Abbildung 8).^[77]

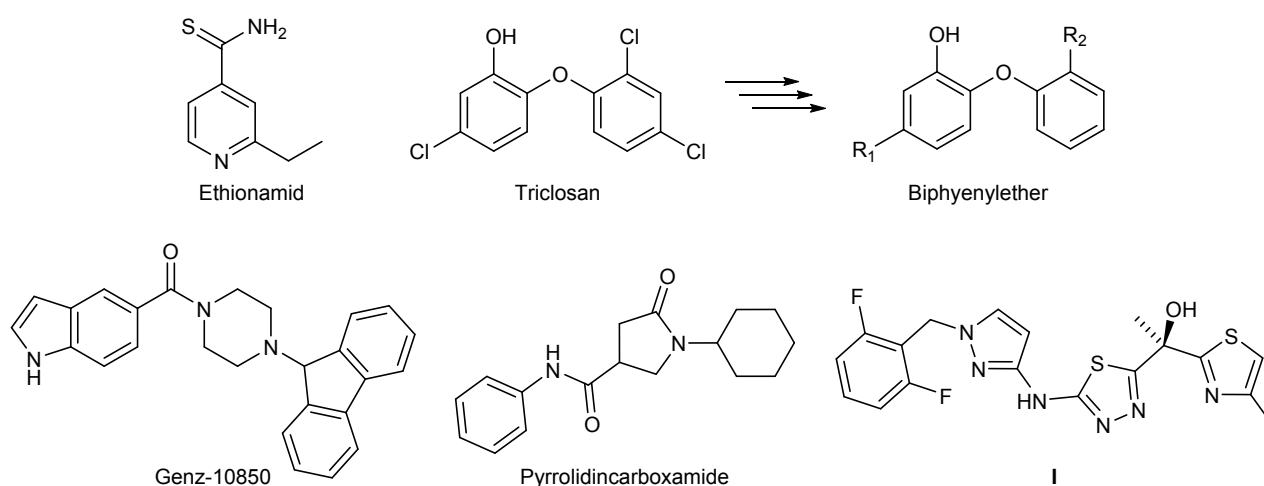


Abbildung 8: Das orale Zweitrang-Antituberkulotikum Ethionamid und eine Übersicht neuer InhA-Inhibitoren in der Entwicklung.

In dieser Arbeit wird die Strukturklasse der Thiazolidindione und verwandter Fünfringheterozyklen als potenzielle Hemmstoffe der Enoylreduktase InhA untersucht.

1.6 Ausgangssituation und Zielsetzung

Die vorangegangenen Ausführungen machen deutlich, wie wichtig und dringend die Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen Mykobakterien ist. Als Grundlage dieser Arbeit dienten Vorarbeiten, die im Arbeitskreis von *Prof. Dr. C. Sotriffer* an der Universität Würzburg geleistet wurden.^[78] Im Rahmen des strukturbasierten Wirkstoffdesigns wurde ein virtuelles Screening nach neuen direkten InhA-Inhibitoren durchgeführt. Hierbei konnte eine Reihe potenzieller Inhibitoren der InhA identifiziert werden, von denen neun kommerziell erworben wurden. Drei dieser Substanzen wiesen eine moderate Hemmung des Enzyms von bis zu 25 % bei eingesetzten Konzentrationen von 30–50 μM auf (siehe Abbildung 9).

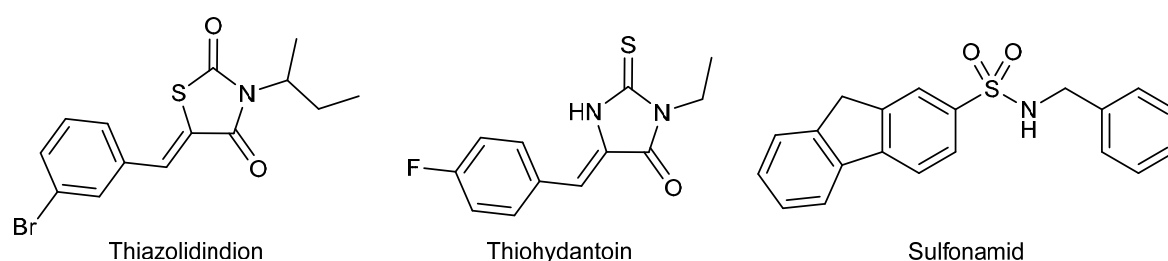


Abbildung 9: Verbindungen mit moderaten InhA-Hemmeigenschaften.

Ziel dieser Arbeit war zum einen der Aufbau und die Validierung eines Testsystems, das es ermöglichen soll, die bisherigen Ergebnisse zu bestätigen und die Möglichkeit bietet, weitere Verbindung zuverlässig und schnell testen zu können.

Außerdem sollten Derivate der Thiazolidindione und verwandter Fünfringheterozyklen synthetisiert und in einem iterativen Prozess in Kooperation mit dem Arbeitskreis von *Prof. Dr. C. Sotriffer* optimiert werden (Testung–Docking–Synthese neuer Derivate).

Mit der aufgebauten Substanzbibliothek sollten parallel *in-vitro*-Testungen an den Erregern sowie mit guten Inhibitoren Cokristallisationsversuche durchgeführt werden. Enzymkinetische Experimente sollten zudem Aufschluss über den Inhibitionsmechanismus geben.

Die Problematik, dass die in dieser Arbeit untersuchte Leitstruktur mit Thiazolidin-Fragment in der Literatur als häufig auftretendes falsch positives Ergebniss von *Screening*-Kampagnien bekannt ist,^[79,80] sollte ebenfalls näher untersucht werden. Die Frage, ob lediglich promiskes Verhalten oder spezifische Bindungsmodalitäten für die beobachteten Hemmungen von InhA verantwortlich sind, sollte geklärt werden.

Zusätzlich sollten Testungen an Proteasen und Erregern, die Bestandteil der Forschung im Arbeitskreis von *Prof. Dr. Tanja Schirmeister* sind, durchgeführt werden. Neben der

Berücksichtigung von Zufällen bei wissenschaftlichen Arbeiten sollten hierdurch weitere Informationen bezüglich der Promiskuität der untersuchten Verbindungsklasse erhalten werden.

2 Etablierung eines InhA-Testsystems

Vor der praktischen Umsetzung bzw. Etablierung eines enzymatischen Testverfahrens wurde das Substrat 2toCoA synthetisiert und das Enzym InhA isoliert und aufgereinigt. Nachstehend werden die hierzu durchgeführten Experimente erläutert. Im Anschluss werden die theoretischen Grundlagen der Enzymkinetik und -inhibition besprochen, um dann detailliert den Aufbau und die Validierung des enzymatischen Assays aufzuzeigen.

2.1 Darstellung des Substrats 2-trans-Octenoyl-Coenzym A (2toCoA)

Für die enzymatischen Testungen der Inhibitoren wurde das Substrat 2-trans-Octenoyl-Coenzym A aus der entsprechenden aktivierten 2-trans-Octensäure und dem Coenzym A synthetisiert. Bevor die Synthesewege näher erläutert werden, soll das Coenzym A (CoA) bzw. das 2-trans-Octenoyl-Coenzym A (2toCoA) bezüglich seiner strukturellen Eigenschaften und der damit einhergehenden Stabilitätsproblematik betrachtet werden (siehe Abbildung 10).

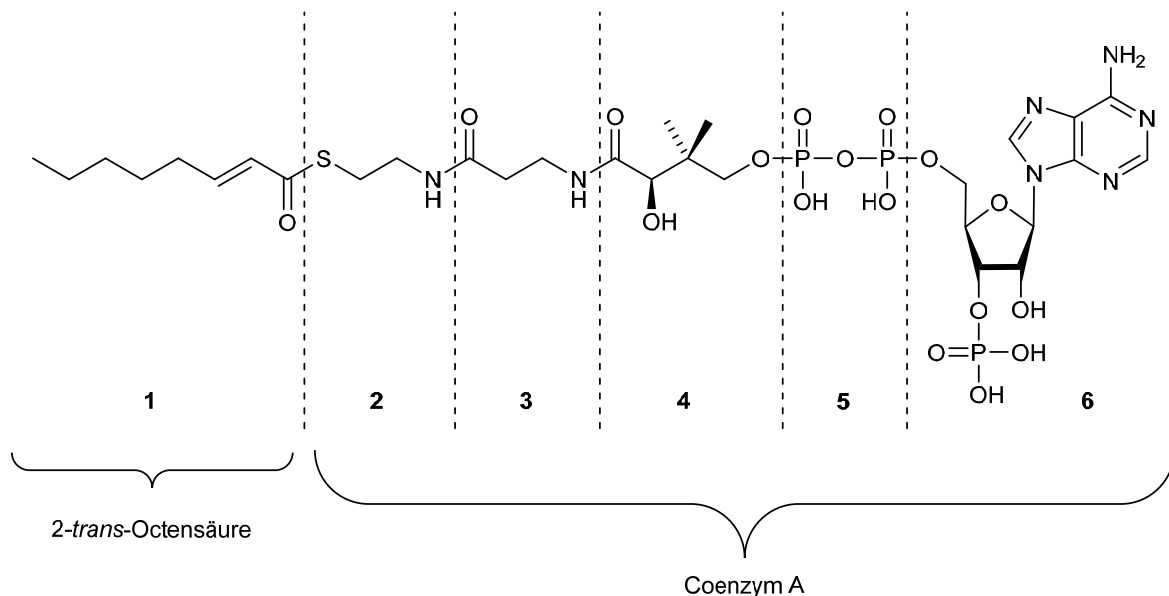


Abbildung 10: Übersicht der Struktur von 2toCoA.

Die Struktur des Coenzym A wurde von *Lipman et al.* erstmals aufgeklärt.^[81] Es besteht aus Cysteamin (2), β -Alanin (3), 2,4-Dihydroxy-3,3-dimethylbutansäure (Pantoinsäure, 4), Pyrophosphat (5) und 3'-phosphoryliertem Adenosin (6). Die 2-trans-Octensäure (1) liegt im Produkt 2toCoA als Thioester gebunden an das Cysteamin des CoA vor.^[82] Hieraus ergeben sich folgende Probleme für die Stabilität und Synthese:

- Die als Thioester gebundene 2-trans-Octensäure (1) besitzt ein *Michael*-System und ist somit am β -C-Atom nucleophil angreifbar.

- Die energiereiche Thioesterbindung von 2toCoA ist stark hydrolyseempfindlich.
- Die freie Thiolgruppe des CoA wird durch Luftsauerstoff rasch zum Disulfid oxidiert.
- Die Pyrophosphatgruppe (5) ist im Sauren hydrolyseempfindlich.
- Die Vielzahl von hydrophilen Gruppen erklärt die gute Wasserlöslichkeit sowie die sehr schlechte Löslichkeit in organischen Lösemitteln.
- Eine Vielzahl von nucleophilen Gruppierungen des CoA erschwert die regioselektive Acylierung des Thiols zum Thioester 2toCoA.

Nacheinander und unter Berücksichtigung der genannten Schwierigkeiten werden nun die sich daraus ergebenden Syntheserouten besprochen. Zuerst werden die Synthesemöglichkeiten zur Aktivierung von *2-trans*-Octensäure, anschließend die Kondensation der aktivierten Säure mit CoA zum Thioester und zum Schluss die Aufreinigungsmethoden diskutiert.

2.1.1 Aktivierung von *2-trans*-Octensäure

Vor Umsetzung der *2-trans*-Octensäure mit CoA musste diese aktiviert werden. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass die Überführung der Säure in eine zu reaktive Form unter Umständen in einer Überacylierung von CoA resultiert, da neben der Thiol- auch andere nucleophile Gruppen des Moleküls bedient werden können. Da die spätere Kondensation zum Thioester im wässrigen Milieu stattfindet, besteht ebenso die Gefahr einer raschen Inaktivierung durch Hydrolyse. Andererseits muss die Reaktivität groß genug sein, sodass eine möglichst kurze Reaktionszeit gewährleistet ist (vgl. Stabilität CoA). Auf Grund von diesen Überlegungen fiel die Entscheidung auf eine Aktivierung als gemischter Anhydrid (a) und als *N*-Hydroxysuccinimidester (b)).

a) Umsetzung von 2-trans-Octensäure mit Chlorameisensäureethylester zum gemischten Anhydrid

Zur Aktivierung wurde die Säure klassisch mit Chlorameisensäureethylester zum gemischten Anhydrid aus *2-trans*-Octensäure und Kohlensäureethylester umgesetzt (siehe Kapitel 8.2.8).^[83] Hierfür wurde die Säure (1.0 Äq.) unter Argonschutzatmosphäre in trockenem THF oder Diethylether gelöst und mit Hilfe eines Eisbades auf 0 °C abgekühlt. Welches der beiden Lösemittel verwendet wird, ist prinzipiell egal, wichtig aber ist, dass diese absolut trocken sind. Für befriedigende Ausbeuten sind ebenfalls ausschließlich durch vorhergehendes Ausglühen im Vakuum getrocknete Reaktionsgefäße zu verwenden. Nach Zusatz von Triethylamin (1.5 Äq.) als nicht nucleophile Base zur Deprotonierung der Säure wurde die Reaktionslösung mit Chlorameisensäureethylester (1.5 Äq.) versetzt. Binnen weniger Minuten

ist die Präzipitation von Triethylammoniumchlorid in Form eines weißen Niederschlags zu beobachten (siehe Abbildung 11).

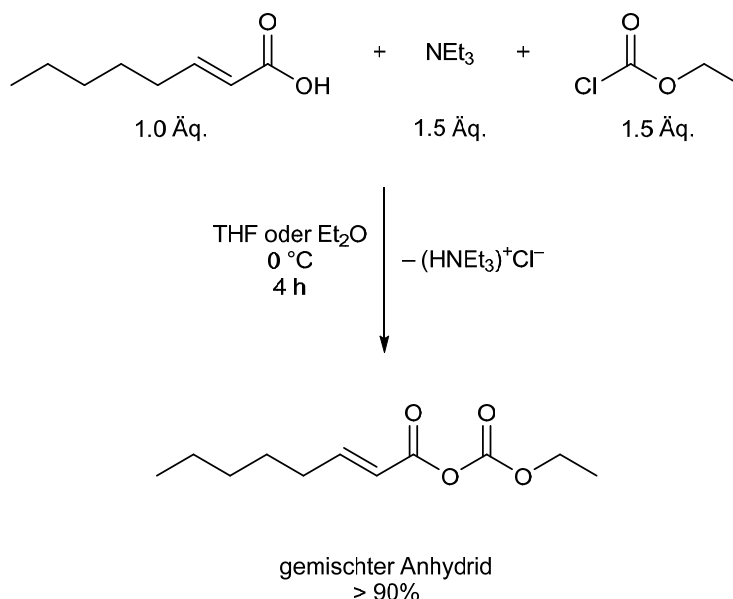


Abbildung 11: Darstellung des gemischten Anhydrids aus 2-*trans*-Octensäure und Kohlensäureethylester.

Die durch Kühlung forcierte Fällung des im unpolaren organischen Lösemittel unlöslichen Salzes bildet letztlich die Triebkraft der Reaktion. Nach Filtration unter Schutzgas mittels einer zuvor im Vakuum ausgeglühten Umkehrfritte kann das Filtrat entweder im Vakuum eingengt und anschließend in frischem Lösemittel wieder gelöst (Methode H1, siehe Kapitel 8.2.8.a)) oder im Scheidetrichter mit etwas kaltem diethylethergesättigtem Wasser gewaschen werden (Methode H2, siehe Kapitel 8.2.8.b)).^[77] Beide Methoden führen zu vergleichbaren Ergebnissen bezüglich Qualität und Ausbeute des gemischten Anhydrids. Praktischerweise empfiehlt sich aber Methode H1, da das Produkt nicht wie bei Methode H2 unmittelbar weiterverwendet werden muss, sondern unter Schutzgas und Lichtausschluss auf Eis bis zu 24 h gelagert werden kann.

b) Umsetzung von 2-*trans*-Octensäure mit N-Hydroxysuccinimid/DCC zum 2-*trans*-Octenoyl-N-Hydroxysuccinimidester

Um zufriedenstellende Ausbeuten an 2-*trans*-Octensäure-*N*-hydroxysuccinimidester zu erreichen, wurde für die Veresterung die Variante mit Dicyclocarbodiimid (DCC, **1**) in trockenem Ethylacetat gewählt (siehe Abbildung 12 und Kapitel 8.2.9).^[84] Hierbei greift die deprotonierte Säure am elektrophilen Kohlenstoff des DCC an und bildet den reaktiven *O*-Acylisoharnstoff (**2**). Dieser ist in der Lage die Acylgruppe bzw. die Säure auf die OH-Gruppe des *N*-Hydroxysuccinimid (NHS, 1-Hydroxy-2,5-pyrrolidindion, **3**) zu übertragen. Neben dem 2-*trans*-Octensäure-*N*-Hydroxysuccinimidester (SV07) entsteht der *N*, *N'*-

Dicyclohexylharnstoff (**4**), der formal das bei der Esterkondensation freiwerdende H₂O enthält und, da in Essigsäureethylester unlöslich, durch Präzipitation aus dem Gleichgewicht entfernt wird. Nach Entfernung des Niederschlags durch Filtration, Einengung des Filtrats unter vermindertem Druck, Aufreinigung des Rohprodukts durch Umkristallisation aus Ethanol und Säulenchromatographie wurde das Produkt SV07 mit einer Ausbeute von 73 % erhalten. Diese ordentliche Ausbeute deutet auch darauf hin, dass die Konkurrenzreaktion einer irreversiblen 1,3-Umlagerung des *O*-Acylisoharnstoff zum *N*-Acylharnstoff und der damit einhergehende Verlust des Acylgruppenübertragungspotentials, vernachlässigbar sind. Durch Einsatz von Säure:DCC:NHS im Verhältnis 1:1:1 wird ebenso die theoretisch denkbare Entstehung des symmetrischen Anhydrids der 2-*trans*-Octensäure unterdrückt. Vorteilhaft gegenüber dem gemischten Anhydrid ist die Lagerfähigkeit des Aktivesters, er muss also nicht unmittelbar weiterverarbeitet werden.

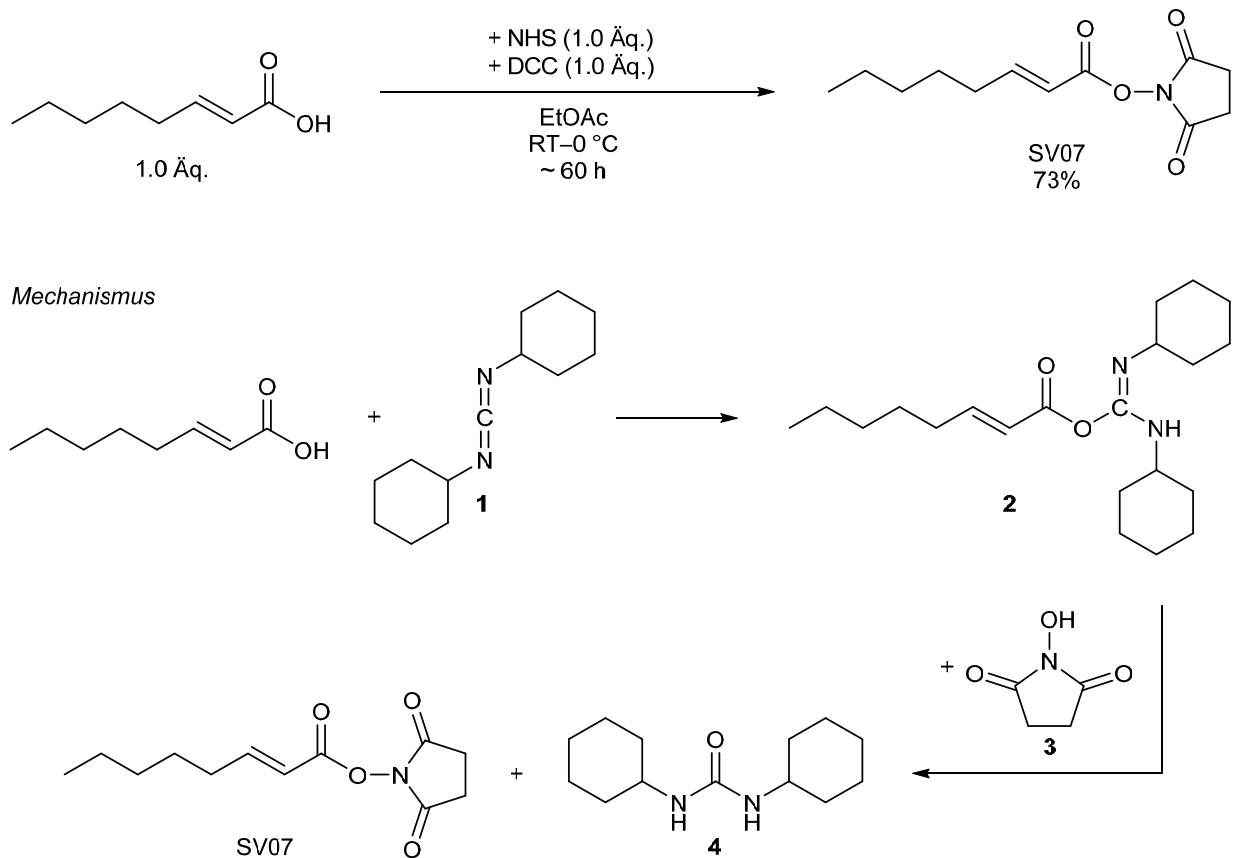
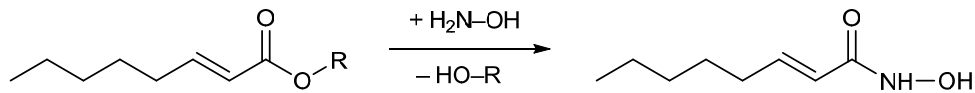


Abbildung 12: Darstellung von 2-*trans*-Octensäure-*N*-hydroxysuccinimidester.

c) Detektionsmöglichkeiten für die DC-Analytik

Für die DC-Analytik zur Reaktionskontrolle und Aufreinigung der aktivierten Säure wurde ein Sprühreagenz verwendet, das in der Lage ist Carbonsäureester qualitativ nachzuweisen.^[84,85] Das Sprühreagenz 1 enthält Hydroxylamin in alkalischem Medium. Unter diesen Bedingungen reagiert der Aktivester (R= –Succinimid) bzw. der gemischte Anhydrid (R= –CO₂Et) zur Hydroxamsäure, die mit Eisen-(III)-chlorid (Sprühreagenz 2) zum roten Chelat-Komplex reagiert. Die Farbgebung ermöglicht somit eine schnelle und einfache Identifizierung der gewünschten Produkte (siehe Abbildung 13). Zur genauen Zusammensetzung der Reagenzien und zur Durchführung der Detektion siehe Kapitel 8.1.6.

Reagenz 1) Reaktion zur Hydroxamsäure



Reagenz 2) Bildung eines roten Chelat-Komplexes mit Fe³⁺

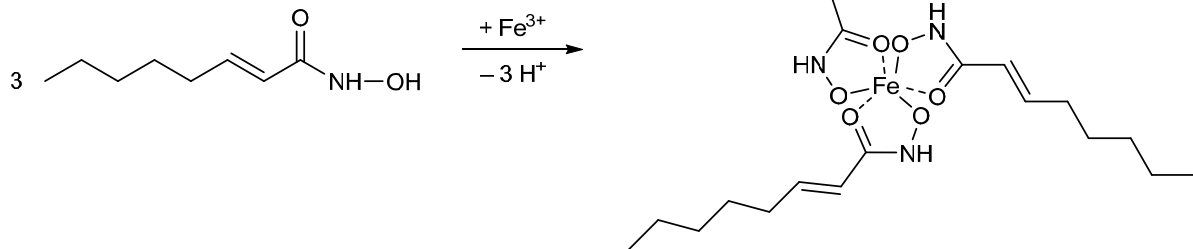


Abbildung 13: Detektion der aktivierten Säure in der DC-Analytik mit H₂N-OH/Fe³⁺-Sprühreagenz (R= –Succinimid bzw. –CO₂Et).

2.1.2 Umsetzung der aktivierten Säuren mit CoA zum Thioester 2toCoA

Im Hinblick auf die strukturellen Eigenschaften und Stabilitätsoptima von Edukten und Produkt mussten für die Synthesepanung von 2toCoA mehrere Punkte bedacht werden. Wässrige Lösungen von CoA sind im pH-Bereich von 2–6 für einen Tag stabil, wobei es in neutralen Lösungen oder Exposition an der Luft zur raschen Inaktivierung kommt.^[82] Lösungsversuche in polaren nicht nucleophilen organischen Lösemitteln wie DMF oder DMSO waren negativ. Folglich musste auf wässrige und andere polar protische Lösemittelsysteme zurückgegriffen werden, obwohl weder das CoA noch die aktivierte Säure sonderlich stabil darin sind. Das Lösen und die Reaktion sollten grundsätzlich unter Schutzgasatmosphäre stattfinden, da die Oxidation von CoA zum Disulfid verhindert werden muss. Weiterhin ist es wichtig die Nebenreaktion zum symmetrischen Anhydrid der *2-trans*-Octensäure zu verhindern. Da dieser thermodynamisch stabiler als der Thioester 2toCoA ist, muss die Reaktion kinetisch kontrolliert werden. Um also das kinetisch kontrollierte Produkt 2toCoA zu erhalten, muss die Reaktionsdauer möglichst kurz gewählt werden und eine Abkühlung der Reaktionslösung erfolgen. Dies erhöht gleichzeitig die Stabilität von Edukten und Produkt, weil dadurch Hydrolysereaktionen vermindert werden. Zusätzlich kann die Nucleophilie der Thiol-Gruppe durch teilweise Deprotonierung zum Thiolat-Anion erhöht werden. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass man sich durch Alkalisierung des Milieus vom Stabilitätsoptimum des CoA entfernt. Der pH-Wert muss also so gewählt werden, dass die daraus resultierende Beschleunigung der Reaktion die Stabilitätsproblematik mindestens kompensiert. Die Mercapto-Gruppe des CoA besitzt einen pK_s -Wert 9.6.^[82] Stellt man also einen pH-Wert von acht ein, so liegen weniger als fünf Prozent des CoA als Thiolat vor, gleichzeitig führt dies aber zu einer solchen Beschleunigung der Reaktion, dass Instabilitäten ob des leicht alkalischen Milieus zu vernachlässigen sind. Außerdem wird die regioselektive Acylierung der Thiol-Gruppe begünstigt, da das Thiolat-Anion als bestes Nucleophil des CoA schneller mit der aktivierten Säure reagieren wird als andere acylierbare Gruppierungen des CoA (siehe Kapitelanfang 2.1). Bei den Aufreinigungs- und Aufarbeitungsmethoden (Kapitel 2.1.5) wird die Abhängigkeit der Reaktion vom pH-Wert näher betrachtet. Dies steht auch im Einklang mit in der Literatur beschriebenen Methoden,^[77,83,86,87,88] die überwiegend einen pH-Wert von acht beschreiben. Diese Überlegungen gelten allgemein für alle nun angeführten Syntheserouten.

a) Umsetzung des gemischten Anhydrid aus 2-trans-Octensäure und Kohlendäureethylester mit Coenzym A zu 2toCoA

Es wurden 2 ml des *in situ* hergestellten und in frischem THF gelösten gemischten Anhydrid aus 2-trans-Octensäure und Kohlendäureethylester zu 2 ml (1.0 Äq.) einer auf einem Eisbad gekühlten wässrigen Lösung von CoA der Konzentration 10 mg/ml, die mit 0.1 M Natronlauge auf pH 8 eingestellt wurde, binnen 5 min unter Argon zugetropft (siehe Kapitel 8.2.10.a)). Unter Abspaltung von Ethanol und CO₂ bildet sich der Thioester 2toCoA. Ein Volumen von 2 ml der THF-Lösung sollte ungefähr 1.6 Äq. des gemischten Anhydrids entsprechen. Insgesamt erhält man damit ein Gesamtvolumen der Reaktionslösung von 4 ml bestehend aus THF:H₂O bzw. Et₂O:H₂O im Verhältnis 1:1. Nach 10–15 min wird die Reaktion gestoppt und die Reaktionslösung zur Aufreinigung unmittelbar in die präparative HPLC eingespritzt (siehe Abbildung 14).

Für die Aufreinigung per HPLC sollten die genannten Volumina und Konzentrationen möglichst exakt eingehalten werden, denn nur auf diese Weise ist eine Überladung der Trennsäule und folglich eine reproduzierbare Aufreinigung möglich. Die Verwendung eines Lösemittelgemisches aus Na₂CO₃-Puffer/ 50 mM/ pH 8, Ethanol und Essigsäureethylester im Verhältnis 1:1:1 erweist sich bei dieser Reaktion nicht als überlegen. Eine stark verlängerte Lösungsdauer des CoA sowie eine schlechtere Auftrennung bei der anschließenden Aufreinigung sind hierbei sogar hinderlich. Diese Syntheseroute des CoA funktioniert zuverlässig und reproduzierbar. Idealerweise löst man den gemischten Anhydrid zuvor in so viel frischem THF oder Diethylether, dass sich Aliquote zu je 2 ml á 1.6 Äq. ergeben (Methode H1, siehe Kapitel 8.2.8.a)). Diese ermöglicht eine sukzessive Synthese von 2toCoA, indem die Aliquote des gemischten Anhydrids nacheinander mit CoA umgesetzt und aufgereinigt werden. Bei Verwendung des nach Methode H2 (siehe Kapitel 8.2.8.b)) hergestellten gemischten Anhydrid muss auf Grund des vorangegangenen Waschvorgangs mit ethergesättigtem H₂O die Umsetzung mit CoA unverzüglich erfolgen. Für die Herstellung von 2toCoA im größeren Maßstab eignet sich diese Methode daher nicht, weil eine sukzessive Synthese bzw. Aufreinigung hier nicht möglich ist.

b) Umsetzung von 2-trans-Octenoyl-N-hydroxysuccinimidester (SV07) mit Coenzym A zu 2toCoA

Die Umsetzung von 2-trans-Octenoyl-N-hydroxysuccinimidester (SV07) mit Coenzym A zu 2toCoA erfolgt prinzipiell analog zur Synthese mit einem gemischten Anhydrid (siehe Kapitel 8.2.10.b)).^[87,88] Vorteilhaft hierbei ist die leichtere Handhabbarkeit des 2-trans-Octenoyl-N-hydroxysuccinimidesters. So musste dieser auf Grund seiner Lagerfähigkeit nicht vor jeder

Synthese von 2toCoA neu hergestellt werden. Nachteilig sind allerdings eine längere Reaktionsdauer (~1 h) und eine erschwerte Aufreinigung, da als Nebenprodukt *N*-Hydroxysuccinimid entsteht, das im Gegensatz zu CO₂ und Ethanol als Nebenprodukte der Synthese via gemischtem Anhydrid die Gefahr erhöht, die semipräparative Trennsäule der HPLC zu überladen.

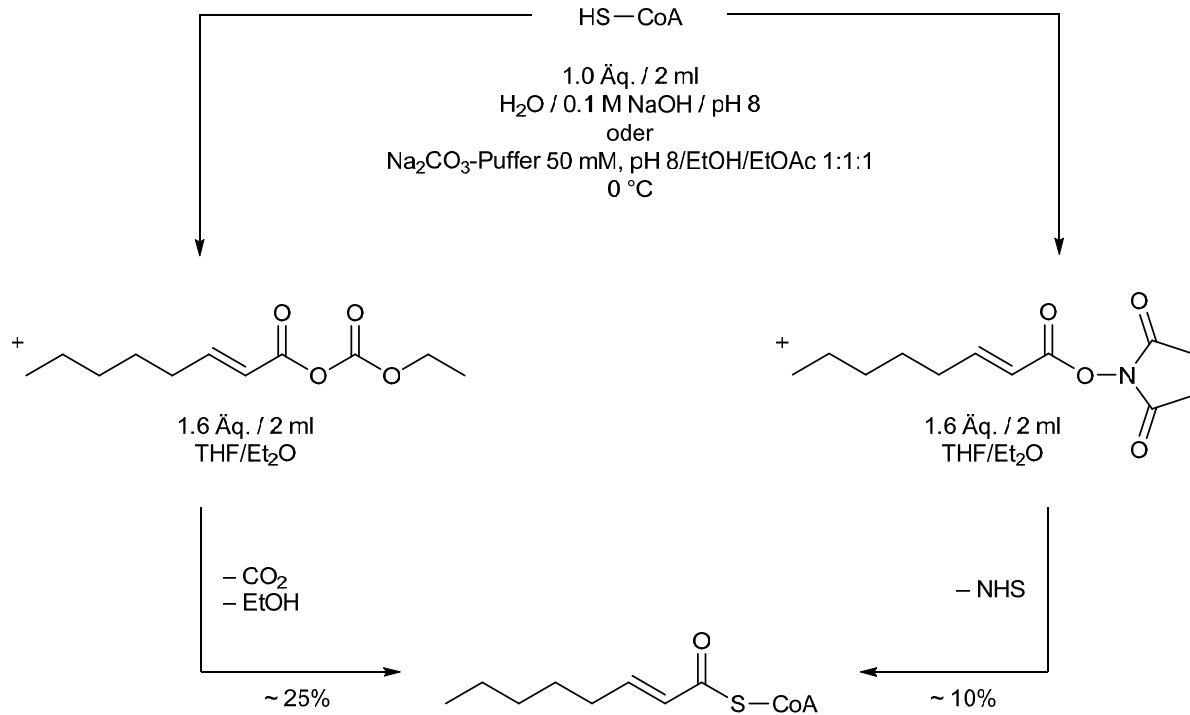


Abbildung 14: Syntheserouten von 2toCoA.

2.1.3 Alternative Varianten der Synthese von 2toCoA

a) Umsetzung des 2-trans-Octenoyl-N-hydroxysuccinimidesters mit Coenzym A zu 2-trans-Octenoyl-Coenzym A in Gegenwart von Thioglykolsäure

Bereits im kommerziell erworbenen CoA liegt ein großer Teil als Disulfid-Oxidationsprodukt vor. *Al-Arif* und *Blecher* berichten über eine Methode, das unerwünschte Disulfid durch Zusatz von Thioglykolsäure (Mercaptoessigsäure) -analog der Präparation von Dauerwellen- zu reduzieren (siehe Abbildung 15).^[87]

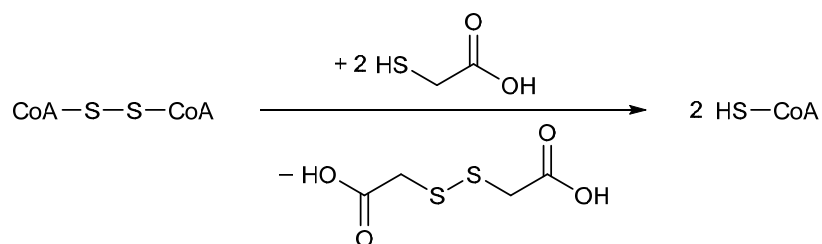


Abbildung 15: Die Oxidation von CoA zum Disulfid kann durch Zugabe von Thioglykolsäure verhindert werden.

Durch die Überführung in die zu acylierende freie Thiol-Form könnte man teures CoA einsparen. Allerdings empfiehlt sich die Zugabe eines sehr großen Überschusses (~30 Äq.) an Acylierungsreagenz, da logischerweise auch freie Thiol-Gruppen der Thioglykolsäure mit der aktivierten Säure reagieren (siehe Kapitel 8.2.10.c)). Die Reaktionskontrolle erfolgte mit *Ellmans*-Reagenz (siehe Kapitel 2.1.4), womit nach ca. dreieinhalb Stunden keine freien Thiol-Gruppen mehr detektiert werden konnten. Da eine Aufreinigung mittels HPLC unbefriedigend war, wurde eine Fällung von 2toCoA mit Perchlorsäure durchgeführt. Selbst nach intensiver Kühlung, Lagerung und Zentrifugation mittels Ultrazentrifuge konnten nur sehr geringe und daher nur sehr schwer handhabbare Mengen des Niederschlags isoliert werden (Ausbeuten < 4 %). Zu berücksichtigen ist allerdings, dass nur 50 mg an CoA eingesetzt wurden. Eine Vergrößerung des Ansatzes würde unter Umständen zu wesentlich besser zu isolierenden Niederschlägen führen. Ebenso ist denkbar, dass Thioester mit größerer Kettenlänge besser präzipitieren. Wirtschaftliche Aspekte wie der sehr hohe Preis von CoA und die Fragestellung, ob das Perchlorat-Salz von 2toCoA als Substrat im enzymatischen Assay in gleicher Weise funktioniert wie die freie Form, führten dazu, diese Strategie nicht weiter zu verfolgen.

b) Umsetzung des 2-trans-Octenoyl-N-hydroxysuccinimidesters mit polysilyliertem Coenzym A zu 2-trans-Octenoyl-Coenzym A

Ein großes Problem der bisher aufgeführten Synthesen ist die Verwendung eines binären Gemisches aus Wasser und einem organischen Lösemittel wie THF oder Diethylether bei der

Reaktion der aktivierten Säure mit CoA. Da dies sich negativ auf die Stabilität vom Acylierungsreagenz und von CoA auswirkt, das CoA gleichzeitig aber stark hydrophil ist, liegt der Gedanke nahe die Lipophilie von CoA durch geeignete Derivatisierung so stark zu erhöhen, dass dieses in organischen Lösemitteln in Lösung geht. *Lucet-Levannier et al.* beschreiben hierfür eine Methode, bei der die hydrophilen Gruppen von CoA (**1**) durch 1-Methoxy-2-methyl-1-trimethylsiloxyprom (**2**, 25 Äq.) silyliert und dadurch geschützt werden (siehe Kapitel 8.2.10.d).^[89,90] Somit sind auch die nucleophilen Gruppen am CoA durch Trimethylsilyl-Gruppierungen geschützt.^[91] Daraus resultiert die Löslichkeit des polysilylierten CoA (**3**) in organischen Lösemitteln wie Acetonitril und THF, die Vermeidung einer Überacylierung von CoA und die Unterdrückung der Oxidation zum Disulfid. Nach dem Silylierungsschritt wurde das Acetonitril im Vakuum entfernt. Überschüssiges 1-Methoxy-2-methyl-1-trimethylsiloxyprom (**2**) sowie die flüchtigen Nebenprodukte der Silylierungsreaktion wie Hexamethyldisiloxan(**4**) und Methylisobutyrat (**5**) wurden hierbei entfernt. Nach Lösen in frischem trockenem THF erfolgte *in situ*-Entschützung durch Fest-Flüssig-Phasentransferkatalyse mit CsF und Dicyclohexyl-18-Krone-6 (DCH-18-C-6) zum polyanionischen CoA (**6**) und konzertiertem Umsatz mit der aktivierten Säure zu 2toCoA (**8**). Die Reaktionslösung wurde filtriert und mit Hilfe der HPLC aufgereinigt (siehe Kapitel 2.1.5). Da die geringen Ausbeuten auf Grund der kleinen Ansatzgröße (13 μmol , 10.84 mg, Na_3CoA) nicht über die Masse bestimmbar waren, wurden diese über Flächenvergleiche des Produktpeaks mit den bereits beschriebenen Methoden abgeschätzt. Obwohl die Ausbeuten meist deutlich unter vier Prozent und somit unbefriedigend ausfielen, stellt diese interessante Syntheseroute eine elegante und ausbaufähige Alternative dar (siehe Abbildung 16).

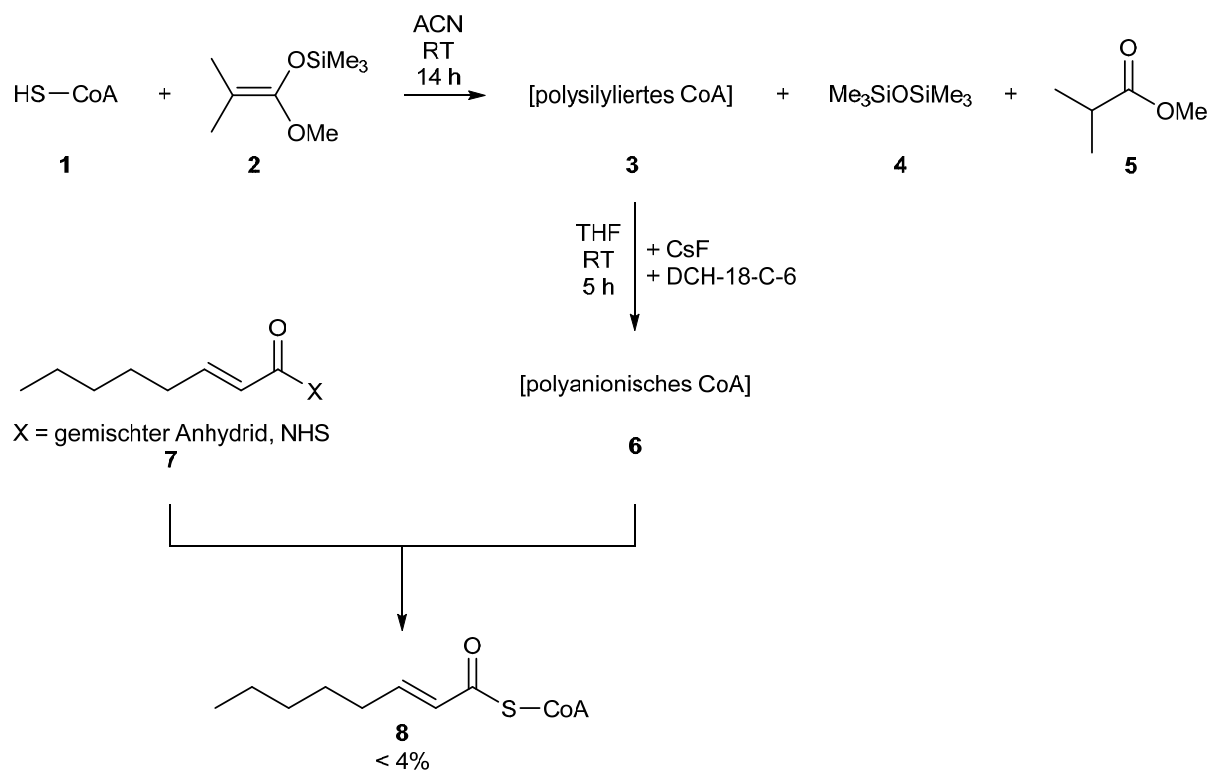


Abbildung 16: Trimethylsilyl-Schutzgruppen ermöglichen die Umsetzung von CoA im wasserfreien Medium.

2.1.4 Möglichkeiten der Reaktionskontrolle

Die Reaktionskontrolle der Thioesterbildung erfolgte auf nasschemischem Wege oder mit Hilfe der HPLC. Ersteres wurde auf Tüpfelplatten mit *Ellmans*-Reagenz (DTNB, 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure, **2**) durchgeführt.^[92] Freie Thiole wie das CoA (**1**) reagieren mit DTNB unter Spaltung dessen Disulfidbindung zur 2-Nitro-5-thiobenzoessäure (NTB, **3**), die unter den gewählten leicht alkalischen Bedingungen bei pH 8 als gelbes Dianion NTB²⁻ vorliegt. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass bei keiner weiteren Zunahme der Gelbfärbung alle Mercapto-Gruppen aufgebraucht sind (siehe Abbildung 17). Vorteilhaft ist die leichte Handhabung und Durchführbarkeit, nachteilig ist allerdings, dass im Allgemeinen die Reaktionsgeschwindigkeit der Thioesterbildung zum 2toCoA sehr groß ist und die Reaktion abhängig von den Bedingungen innerhalb von Minuten vollzogen ist. Somit ist es sehr schwer auszumachen, ob es sich bei einem positiven Ergebnis um einen Zeitpunkt vor oder nach vollständig abgelaufener Reaktion handelt, da durch Hydrolyse des Thioesters erneut freie Thiolgruppen freigesetzt werden. Besser eignet sich daher die Reaktionskontrolle mittels HPLC (Kapitel 2.1.5).

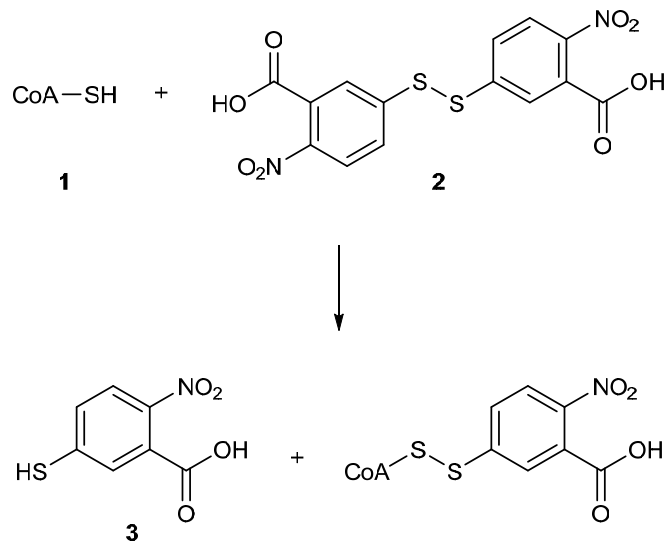


Abbildung 17: Freie Mercapto-Gruppen können mit *Ellmans*-Reagenz detektiert werden.

2.1.5 Aufreinigungs- und Aufarbeitungsmethoden

a) *Aufreinigung mittels präparativer HPLC*

Die am besten durchführbare und reproduzierbare Aufreinigung von 2toCoA gelang mit Hilfe einer präparativen HPLC, wobei mit einer semipräparativen Trennsäule die beste Auftrennung erzielt wurde (siehe Kapitel 8.2.10.e)). Wie in Kapitel 2.1.2.a) beschrieben ist hierbei so zu verfahren, dass sukzessive kleine Ansätze synthetisiert und diese nach Reaktionsende unmittelbar zur Aufreinigung als Ganzes in das HPLC-System injiziert werden. Die relevanten gesammelten Fraktionen werden dann vereinigt, mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und lyophilisiert. Das Lyophilisat eines jeden Ansatzes wird daraufhin vereint und erneut gefriergetrocknet. Auf diese Weise lässt sich das aus dem Fließmittel stammende Ammoniumacetat entfernen und das Substrat 2toCoA zuverlässig und reproduzierbar in handhabbaren Mengen isolieren. Weiterhin bietet dieses Verfahren eine gute Möglichkeit zur Reaktionskontrolle, da sämtliche Veränderungen von Parametern der Reaktionsbedingungen sich unmittelbar im resultierenden Chromatogramm bemerkbar machen. Somit ließen sich die Reaktionsbedingungen bei jeder Syntheserunde von 2toCoA anpassen und optimieren. *Upscale*-Versuche waren nicht zufriedenstellend, da die Verwendung von größeren präparativen Trennsäulen trotz Methodenanpassung keine ausreichende Trennung lieferte. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass maximal 10 ml in die Injektionsschleife des HPLC-Systems injiziert werden können. Dies bildet insofern einen limitierenden Faktor, als dass bei einem Ansatzvolumen von über 10 ml eine Einengung des Lösemittelvolumens vor der Injektion in die HPLC zu viel Zeit in Anspruch nehmen würde (vgl. Stabilitätsproblematik) und nur unter vermindertem Druck und ohne jegliche Zufuhr von Energie durchführbar wäre. In Abbildung 18 sind exemplarisch drei aus der Synthese mit dem gemischten Anhydrid und durch Aufreinigung mit einer semipräparativen Säule sowie photometrischer Detektion bei 260 nm (rot) und 285 nm (schwarz) hervorgegangene Chromatogramme dargestellt. Die drei Hauptsignale sind mit den Buchstaben **a**, **b** und **c** gekennzeichnet. **Peak a** mit einer Retentionszeit von 1–5 min entspricht dem freien, nicht umgesetzten CoA, dem zum Disulfid oxidierten CoA und der freien *2-trans*-Octensäure. **Peak b** mit einer Retentionszeit im Bereich von 22–28 min entspricht dem Produkt 2toCoA und **Peak c** (Retentionszeit ca. 53 min) beinhaltet den symmetrischen Anhydrid der *2-trans*-Octensäure. Die Signalzuordnung erfolgte durch NMR-Analytik sowie durch Einzelinjektionen der jeweiligen Edukte. Das obere Chromatogramm resultiert aus der Synthese in neutralem Milieu, das mittlere entstand nach einer Synthese bei pH 8 und das untere bei pH 9. Vergleicht man die Flächen von Produktpeak b in den jeweiligen Chromatogrammen, so erkennt man deutlich,

dass sich mit steigendem pH-Wert die Peakfläche vergrößert und damit auch die Ausbeute an 2toCoA. Allerdings erhält man bei pH 8 eine schönere Peaksymmetrie und die im Bereich von 9–20 min nicht identifizierten Nebenproduktsignale sind weniger stark ausgeprägt. Die besten Ausbeuten von 2toCoA (20–30 %) und die größte Reinheit wurden demzufolge bei pH-Werten zwischen acht und neun erzielt. Die Chromatogramme zeigen aber auch, dass 2toCoA ungefähr bei der Hälfte der Gesamtretentionszeit eluiert wird und der Produktpeak b viel Platz nach links und rechts zeigt. Mit dieser Aufreinigungsmethode sollte es also möglich sein, Thioester des CoA mit größerer oder kleinerer Kettenlänge ebenso erfolgreich auftrennen zu können (siehe Kapitel 5).

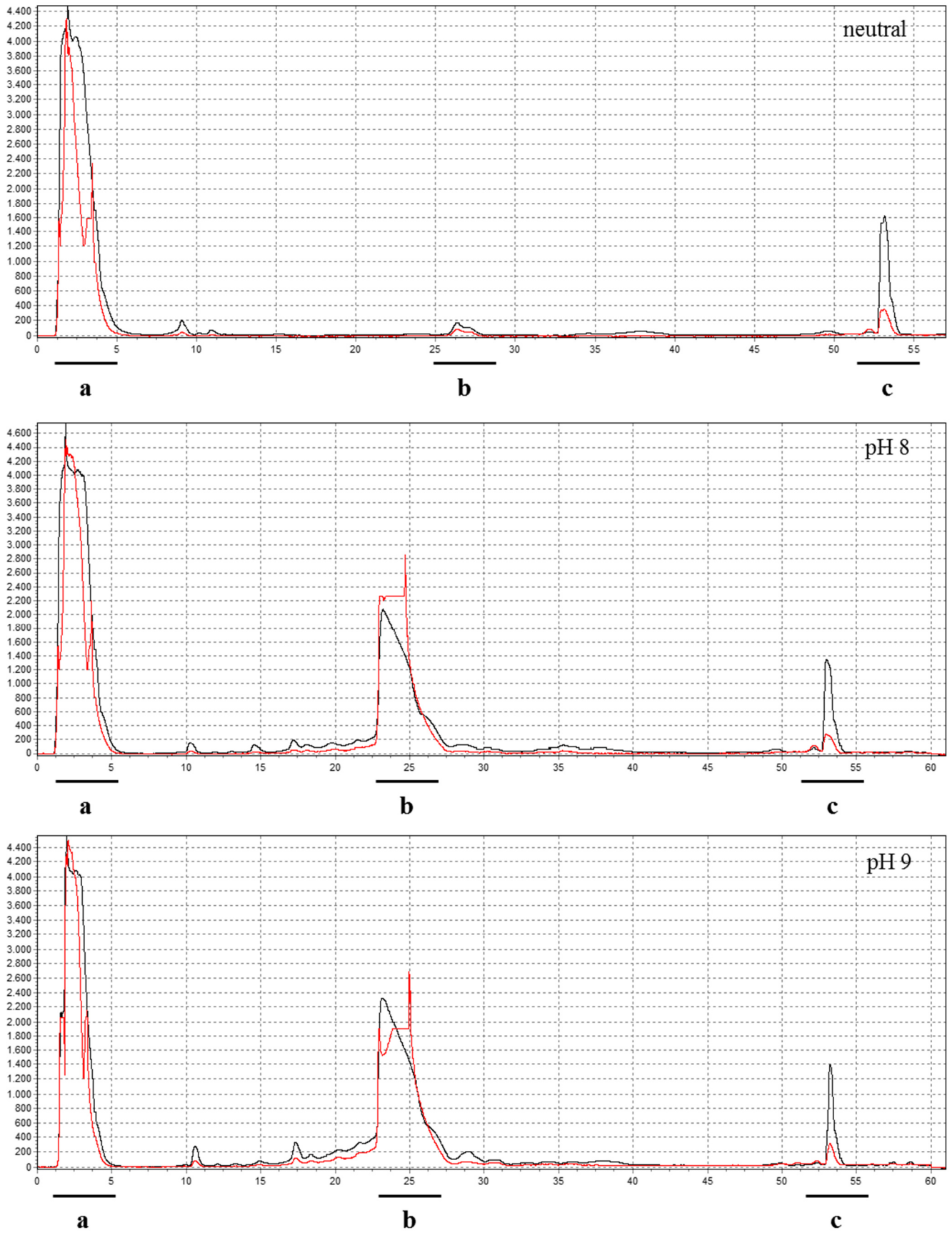


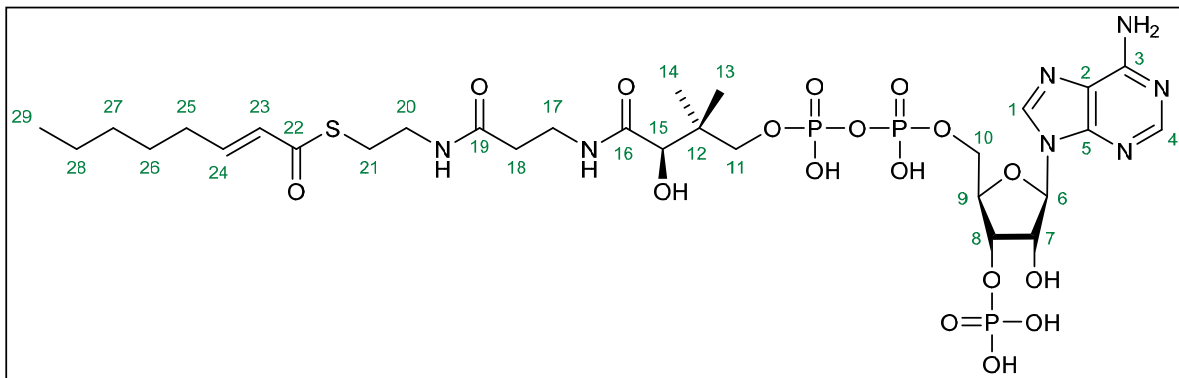
Abbildung 18: Chromatogramme der Aufreinigung von 2toCoA mittels semipräparativer HPLC.

b) Aufreinigungsmethode Fällung mit Perchlorsäure

Die Fällung von 2toCoA mit HClO_4 (siehe Kapitel 8.2.10.e)) bietet nur für sehr große Ansätze und bei optionalem Einsatz von Thioglykolsäure eine Alternative.^[87]

2.1.6 NMR-Analytik

Die Identifizierung und Strukturaufklärung vom synthetisierten 2toCoA erfolgte mittels MS- und NMR-Analytik (siehe Kapitel 8.1.4). Im Loop-ESI-MS wurde eine Masse von $[M+H]^+$ 892.3 gefunden, die mit der berechneten Masse von 891.20 übereinstimmt. In Abbildung 19 sind die Strukturformel und das zugehörige $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 2toCoA abgebildet. Wichtige zugeordnete Multipletts sind in einem magentafarbenen Kasten über dem jeweiligen aufgespalteten Signal eingezeichnet. Die zur Überprüfung einer erfolgreichen Thioesterbildung zu betrachtenden Feld- bzw. Verschiebungsbereiche sind grün umrahmt und werden anschließend im Tieffeld beginnend nacheinander abgehandelt. Hierzu wird als Vergleich das Spektrum vom freien Thiol Coenzym A herangezogen.



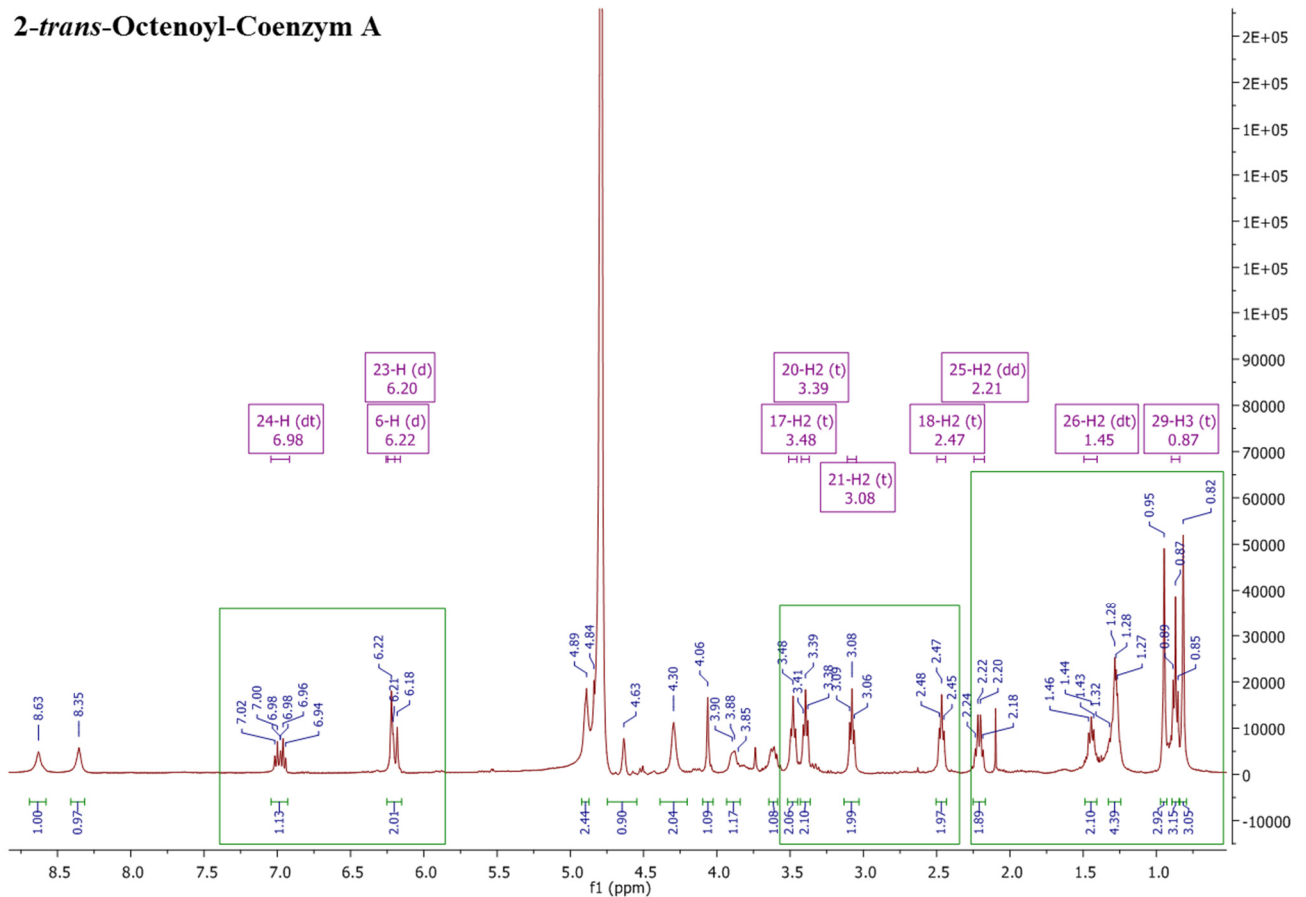
2-trans-Octenoyl-Coenzym A


Abbildung 19: Strukturformel und $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 2toCoA. Grün gerahmt: Wichtige Verschiebungsbereiche zur Überprüfung der erfolgreichen Entstehung des Thioesters.

Die Zuordnung der einzelnen Signale erfolgte wie in Kapitel 8 beschrieben.

$^1\text{H-NMR}$: (D_2O , 400.13 MHz), δ [ppm] = 8.63 (s, 1H, 4-H), 8.35 (s, 1H, 1-H), 6.98 (dt, $^3J_{trans} = 15.4$ Hz, $^3J = 6.9$ Hz, 1H, 24-H), 6.22 (d, $^3J = 4.7$ Hz, 1H, 6-H), 6.20 (d, $^3J_{trans} = 15.4$ Hz, 1H, 23-H), 4.89–4.84 (m, 2H, 7-H, 8-H), 4.63 (s, 1H, 9-H), 4.30 (s, 2H, 10-H₂), 4.06 (s, 1H, 15-H), 3.90–3.85 (m, 1H, 11-H_A), 3.63–3.59 (m, 1H, 11-H_B), 3.48 (t, $^3J = 6.4$ Hz, 2H, 17-H₂), 3.39 (t, $^3J = 6.2$ Hz, 2H, 20-H₂), 3.08 (t, $^3J = 6.2$ Hz, 2H, 21-H₂), 2.47 (t, $^3J = 6.4$ Hz, 2H, 18-H₂), 2.21 (dd, $^3J = 13.8$ Hz, $^3J = 6.9$ Hz, 2H, 25-H₂), 1.45 (dt, $^3J = 13.8$ Hz, $^3J = 7.1$ Hz, 2H, 26-H₂), 1.33–1.25 (m, 4H, 27-H₂, 28-H₂), 0.95 (s, 3H, 12-CH_{3A}), 0.87 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 3H, 29-H₃), 0.82 (s, 3H, 12-CH_{3B}).

Im Bereich von 7.3–6.0 ppm liegt im Spektrum von CoA nur ein Dublett des Protons am Kohlenstoffatom C-6 der Ribose (*kurz*: 6-H) bei 6.20 ppm mit der Kopplungskonstanten $^3J = 4.7$ Hz vor. Nach erfolgreicher Kondensation zum Thioester 2toCoA wird dieses Dublett von ebenfalls einem Dublett vom Proton 23-H der *trans*-konfigurierten Doppelbindung der kondensierten Säure 2tO mit der Kopplungskonstanten $^3J_{trans} = 15.4$ Hz überlagert. Die

Gesamtfläche der beiden Dubletts entspricht somit zwei Protonen. Weiterhin wird bei 6.98 ppm ein Dublett vom Triplet vom Proton 24-H der *trans*-konfigurierten Doppelbindung der kondensierten Säure 2tO mit den Kopplungskonstanten ${}^3J_{trans} = 15.4$ Hz und ${}^3J = 6.9$ Hz sichtbar. Alle genannten in diesem Feldbereich auftretenden Signale müssen bei einer erfolgreichen Entstehung des Thioesters im Flächenverhältnis 1:1:1 vorliegen (siehe Abbildung 20).

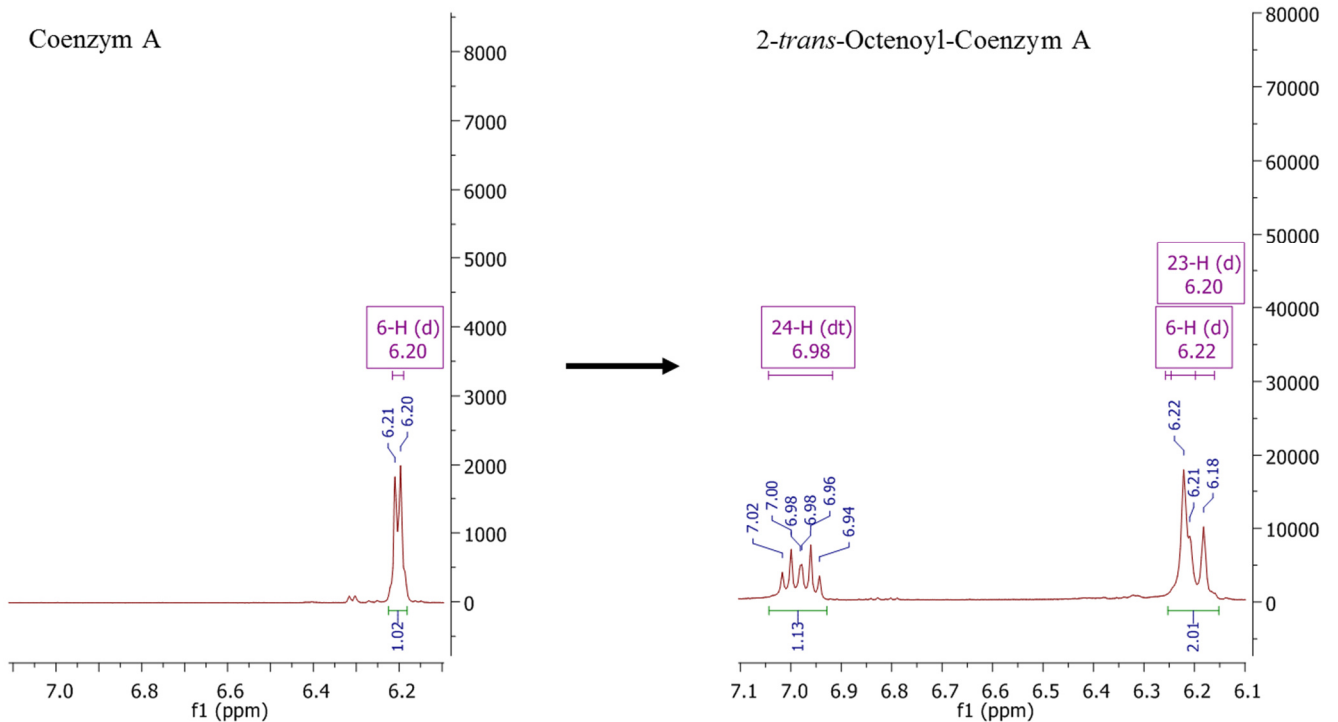


Abbildung 20: Spektrenvergleich von CoA und 2toCoA im Tieffeld.

Im Feldbereich von 3.5–2.4 ppm liegen im Spektrum von CoA wie auch von 2toCoA jeweils vier Triplets der Protonen 17-H₂, 20-H₂, 21-H₂ und 18-H₂ der Cysteamin- und β -Alanin-Methylenprotonen vor. Im Falle der erfolgreichen Veresterung und der daraus resultierenden Entschirmung wird das Triplet der 21-H₂ Methylenprotonen in α -Position des Thiols der Cysteamin-Partialstruktur um 0.44 ppm von 2.64 ppm im CoA nach 3.08 ppm im 2toCoA ins Tieffeld verschoben (${}^3J = 6.2$ Hz) (siehe Abbildung 21).

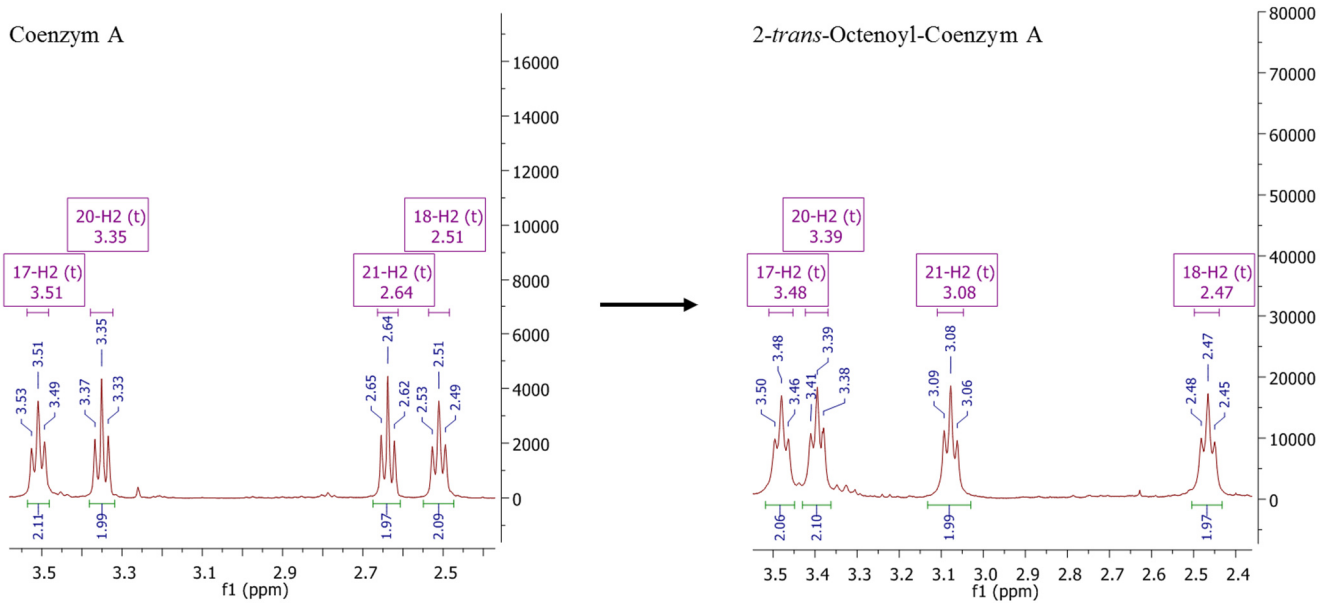


Abbildung 21: Spektrenvergleich von CoA und 2toCoA für den Feldbereich der Cysteamin- und β -Alanin-Methylenprotonen.

Im Feldbereich von 2.3–0.0 ppm liegen beim Edukt CoA nur zwei Singulets vor. Diese sind die Protonen der diastereotopen Methylgruppen am C-12 der Pantoinsäure-Partialstruktur, die chemisch aber nicht magnetisch äquivalent sind und mit dem Stereozentrum an C-15 mit (*R*)-Konformation benachbart sind. Bei erfolgreicher Esterbildung liegt das Triplet der endständigen Methylgruppe der kondensierten Säure 29-H₃ mit der Kopplungskonstante $^3J = 6.9$ Hz bei 0.87 ppm genau zwischen den Singuletsignalen der diastereotopen Methylgruppen der Pantoinsäure. Logischerweise entsprechen die Flächen unter den jeweiligen Signalen jeweils drei Protonen und liegen im Verhältnis 1:1:1 vor. Weitere Signale, die bei erfolgreicher Veresterung entstehen, sind die zu den Methylenprotonen der Alkylkette der kondensierten Säure gehörenden Multipletts. Bei vorliegender Messmethode erscheint 25-H₂ als Dublett vom Dublett mit $^3J = 13.8$ Hz und $^3J = 6.9$ Hz bei 2.21 ppm, 26-H₂ resultiert in einem Dublett vom Triplet mit $^3J = 13.8$ Hz und $^3J = 7.1$ Hz bei 1.45 ppm und die Protonen der beiden Methylengruppen 27-H₂ und 28-H₂ erscheinen als Multiplett bei 1.33–1.25 ppm (siehe Abbildung 22).

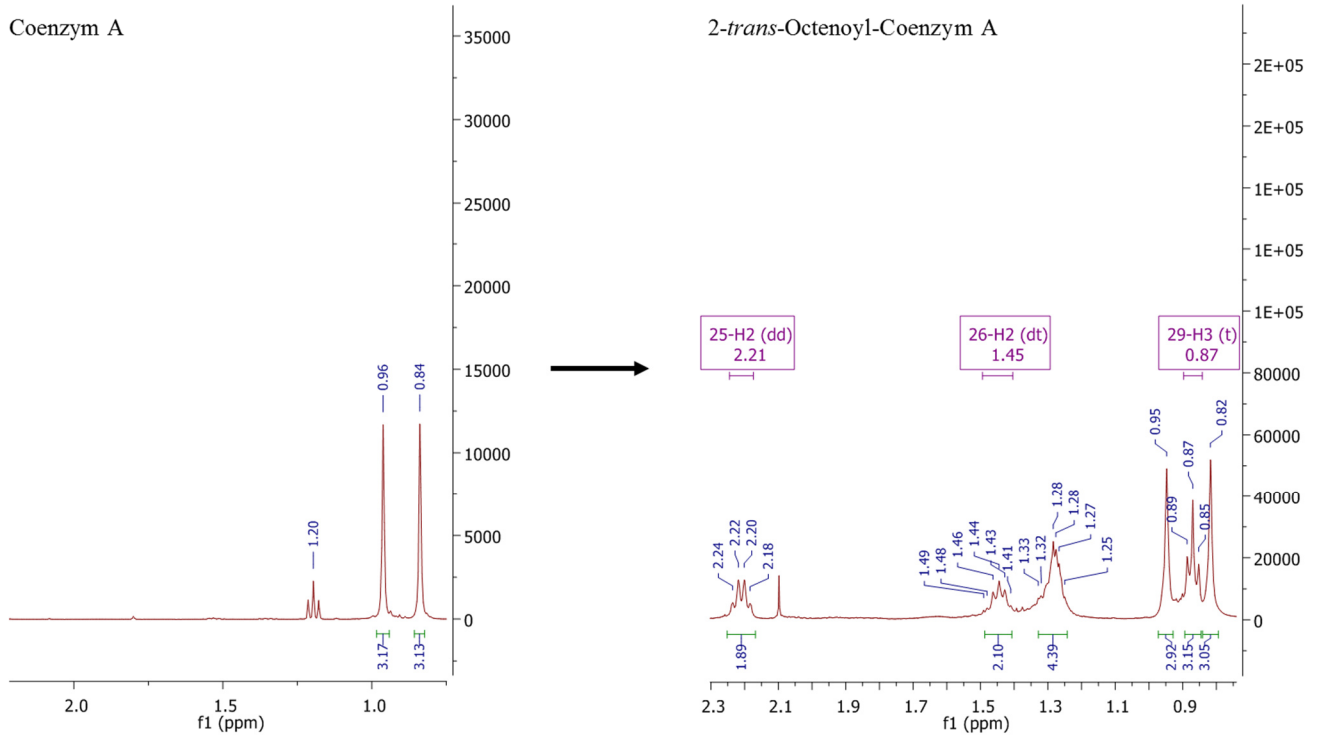


Abbildung 22: Spektrenvergleich von CoA und 2toCoA im Hochfeld.

2.2 Expression, Aufreinigung und Charakterisierung von InhA

Die molekularbiologischen Arbeiten wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe *Prof. Dr. C. Kisker* am Institut für Strukturbiologie des Rudolph-Virchow-Zentrums an der Universität Würzburg durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung der verwendeten Methoden, Arbeitsgeräte, Puffer und Reagenzien befindet sich in Kapitel 8.4.^[86,93]

2.2.1 Transformation von kompetenten *E.coli*-Bakterien mit dem Plasmids pET15b

Für die gezielte, induzierte Überexpression von InhA wurde ein Plasmidvektor mit einer Gen- bzw. Expressionskassette für InhA, Markierungs- und Regulationseinheiten in kompetente *E.coli*-Zellen transformiert (siehe Kapitel 8.4.1). Unter Transformation versteht man die gezielte Aufnahme von DNA aus der Umgebung durch kompetente Akzeptorzellen. *E.coli*-Zellen werden durch Behandlung mit eiskalter CaCl₂-Lösung während der exponentiellen Wachstumsphase chemisch kompetent gemacht. Anschließend wird durch abwechselnde Hitze- und Kälteschockbehandlungen der *E.coli*-Zellen die Aufnahme der DNA ermöglicht. Das Plasmid pET15b, das neben dem Gen für *Mycobacterium tuberculosis* InhA mit *N*-terminalem His-Tag ein Ampicillin-Resistenzgen enthält, wurde durch Hitzeschockbehandlung in den *E.coli*-Expressionsstamm BL21(DE3)pLysS transformiert.

2.2.2 Expression von InhA in *E.coli*

Das Plasmid pet15b enthält zusätzlich einen T7 RNA Polymerase Promotor und eine Lac-Operator Region *upstream* des Zielgens. Der konstitutiv exprimierte Lac-Repressor LacI verhindert die Expression der T7 RNA Polymerase im Genom des Expressionsstammes *E.coli* (BL21) und folglich die Transkription des Zielgens InhA. In Gegenwart des chemischen Induktors Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) löst sich LacI von der DNA, T7 RNA Polymerase wird exprimiert und beginnt mit der Transkription des Zielgens. Um nach der Zellernte die Aufreinigung von InhA zu erleichtern, wurde das Protein mit einer *N*-terminalen Hexahistidinkette (His₆-tag) exprimiert (siehe Kapitel 8.4.2).

2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*SDS-Page*) werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. SDS (Sodium Dodecylsulfate) ist ein starkes anionisches Detergenz, welches sich an Proteine anlagert und diese denaturiert. Die negative Ladung des SDS-Protein-Komplexes ist hierbei ungefähr proportional zum Molekulargewicht des Proteins. Die Proteinprobe wird erhitzt um die Tertiär- und Quartärstrukturen zu brechen. Zusätzlich wird das Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT) zugesetzt um Disulfidbrücken zu lösen. Auf diese Weise lassen sich

Proteine unabhängig ihrer natürlichen Ladung und Konformation im elektrischen Feld auftrennen (siehe Kapitel 8.4.5).^[94]

2.2.4 Aufreinigung der InhA mittels Nickel-Affinitätschromatographie

Die Nickel-Affinitätschromatographie (*Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*, IMAC) beruht auf der reversiblen Komplexbindung von Histidin und Ni²⁺-Ionen (*His-Trap*), die wiederum über starke Chelatkomplexbindungen gebunden an einer stationären Phase immobilisiert vorliegen. Da das Protein InhA mit einer N-terminalen Hexahistidin-Kette (His₆-tag) exprimiert wurde, konnte es spezifisch an die Ni²⁺-Ionen der stationären Matrix binden und durch einen Imidazol-Gradienten kompetitiv aus dieser Bindung verdrängt werden. Für die Nickel-Affinitätschromatographie wurde eine HisTrap HP 5 ml Säule (*GE Healthcare*) mit einer Nickel-Sepharose-Matrix verwendet. Zur Elution wurde ein Gradient von 60–500 mM Imidazol verwendet (siehe Kapitel 8.4.3). Das Chromatogramm in Abbildung 23 zeigt die photometrische Detektion bei Wellenlängen von 260 und 280 nm, sowie den Gradienten an Imidazol bzw. den Anteil des Elutionspuffers in Prozent. Man erkennt deutlich, dass InhA bei etwa der Hälfte des Gradienten (50% Elutionspuffer, ca. 250 mM Imidazol, ca. 55 ml) und mit stark geteilter Peakform eluiert.

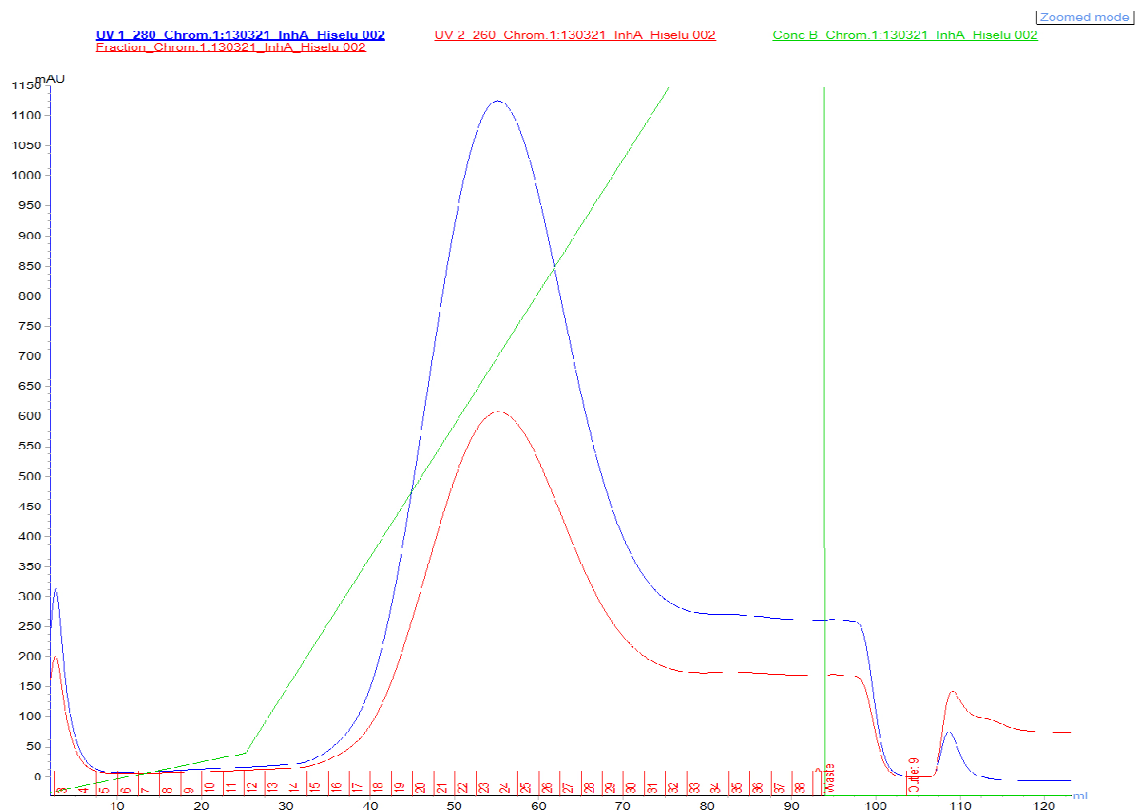


Abbildung 23: Aufreinigung von InhA mit Nickel-Affinitätschromatographie. Rot: Absorption bei 260 nm. Blau: Absorption bei 280 nm. Grün: prozentualer Anteil an Elutionspuffer (Gradient). InhA eluiert bei etwa der Hälfte des Gradienten (Elutionsvolumen ca. 55 ml) in Form eines geteilten Peaks.

Die Überprüfung des Reinheitsgrades der gesammelten Fraktionen erfolgte durch eine SDS-PAGE. Hierzu wurden Proben des Durchfluss-, Wasch- und Elutionsschrittes auf ein 15 % SDS-Gel geladen und entwickelt (siehe Abbildung 24). Nur sehr wenig InhA ist in der Durchflussfraktion enthalten, was an Hand der schwachen Bande bei 28.5 kDa, die dem Molekulargewicht von InhA entspricht, deutlich wird. Dies beweist, dass das aufzureinigende Protein mit ausreichender Stärke an die stationäre Phase bindet. Beim Waschvorgang wurde ebenso eine geringe Menge InhA eluiert. Dieser Verlust an Protein ist mit einer moderaten Überladung der Trennsäule zu erklären. Unterstützt wird diese Annahme durch das starke Tailing des Hauptpeaks. Die Proben des Elutionsschrittes (1–11) weisen eine sehr deutliche Hauptbande bei 28.5 kDa auf, wohingegen die Nebenbanden nur sehr schwach ausgeprägt sind. Das Protein liegt also nahezu in reiner Form vor.

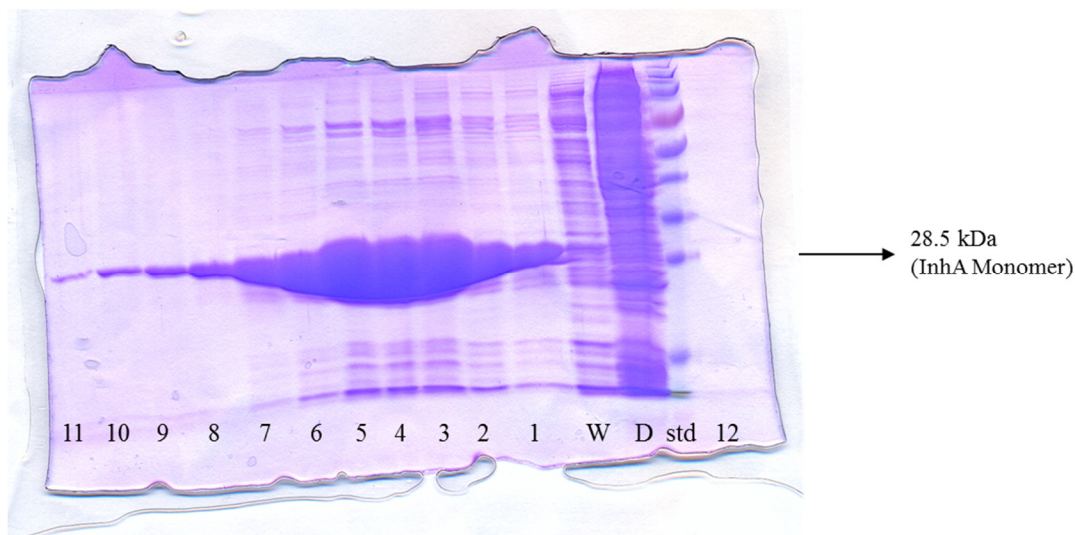


Abbildung 24: SDS-PAGE nach IMAC. Std: Standardproteinmarker, D: Durchflussfraktion, W: Waschfraktion, 1–12: Elutionsfraktionen.

Die entsprechenden Elutionsfraktionen wurden vereinigt und nach Umpufferung auf den Größenausschlusspuffer und Aufkonzentrierung weiter mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie aufgereinigt.

2.2.5 Aufreinigung der InhA mittels Größenausschlusschromatographie

Unter der Größenausschlusschromatographie (*Size Exclusion Chromatography, SEC*) versteht man die Auftrennung von Proteinen nach der Größe bzw. nach ihrem hydrodynamischen Volumen. Die Säulenmatrix besteht hierbei aus porösen, polymeren, hydrophilen und quervernetzten Dextran- oder Agarosepartikeln mit einem durchschnittlichen Durchmesser von ca. 32 μm . Je größer ein Protein, desto weniger kann es in die Poren der Matrix diffundieren und wird daher schneller eluiert. Kleinere Moleküle hingegen können gut in die

Partikelporen diffundieren, haben somit eine längere Verweildauer auf der Säule und werden dadurch langsamer eluiert (siehe Kapitel 8.4.4). Das Chromatogramm in Abbildung 25 zeigt deren photometrische Detektion bei Wellenlängen von 260 und 280 nm. Das Elutionsprofil von InhA weist einen homogenen Peak bei einem Elutionsvolumen von ca. 200 ml auf, was dem Tetramer von InhA entspricht.

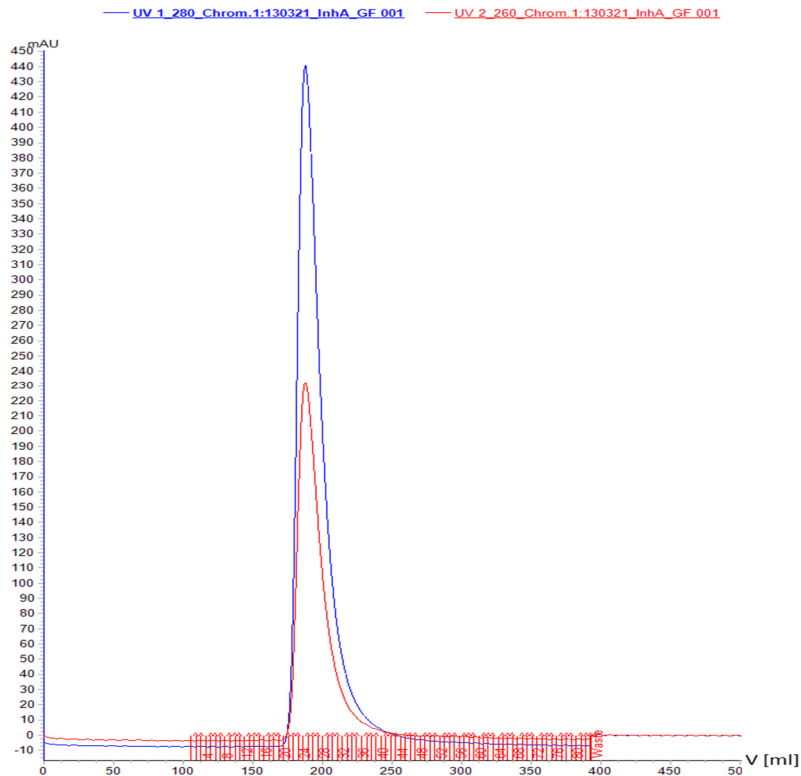


Abbildung 25: Aufreinigung von InhA durch Größenausschlusschromatographie. Rot: Absorption bei 260 nm. Blau: Absorption bei 280 nm.

Das entwickelte 15 % SDS-Gel in Abbildung 26 zeigt, dass die Fraktionen des Peaks reines InhA enthalten. Folglich wurden diese vereinigt, aufkonzentriert, aliquotiert und mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingelagert.

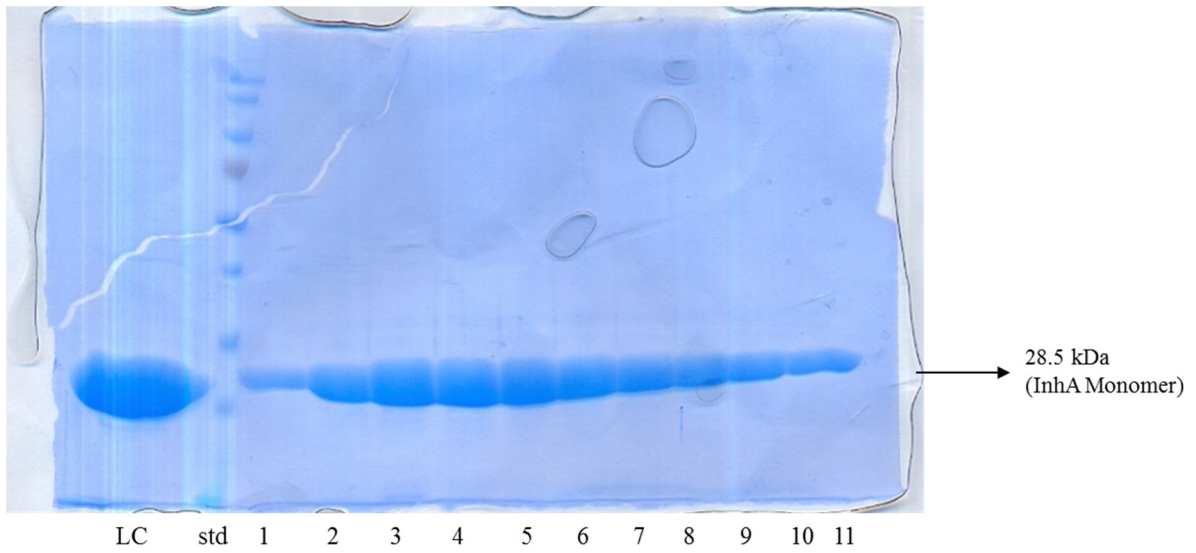


Abbildung 26: SDS-PAGE nach SEC. Std: Standardproteinmarker, LC: Ladekontrolle, 1-11: Elutionsfraktionen.

2.3 Aufbau und Validierung des InhA-Testsystems

2.3.1 Theoretische Betrachtungen der Enzymkinetik und Enzymhemmung

a) Enzymkinetik

Enzyme sind Biokatalysatoren. Durch Senkung der Aktivierungsenergie vermögen sie Reaktionen zu beschleunigen, ohne dabei selbst umgesetzt zu werden. Die Aktivität eines Enzyms ist von äußeren Bedingungen wie z.B. Temperatur, pH-Wert, usw. abhängig. Das kinetische Verhalten vieler Enzyme kann durch folgendes Modell beschrieben werden.



Hierbei steht E für Enzym, S für Substrat und P für das entstehende Produkt. ES stellt den Komplex aus Enzym und Substrat dar, der vor der eigentlichen katalytischen Reaktion gebildet wird. Die Geschwindigkeitskonstante für die Bildung des ES-Komplexes ist k_1 und für die Rückreaktion bzw. die Dissoziation des ES-Komplexes k_{-1} . Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreaktion ist die Umsetzung vom ES-Komplex zum Produkt, der mit der Geschwindigkeitskonstante k_2 beschrieben ist und als irreversibel angenommen wird. Unter gleichzeitiger Annahme einer schnellen Gleichgewichtseinstellung zwischen Enzym, Substrat und ES-Komplex ($k_1 \sim k_{-1} \gg k_2$), kann die Konzentration des ES-Komplexes für eine bestimmte Zeitdauer als nahezu konstant angesehen werden (Fließgleichgewicht/Steady-State). *Henri, Brown, Briggs, Haldane, Michaelis* und *Menten* leiteten daraus folgenden mathematischen Zusammenhang des kinetischen Verhaltens eines Enzyms in Abhängigkeit von der Substratkonzentration her.^[95,96,97,98]

$$v = \frac{[S] v_{\max}}{[S] + K_m}$$

Die Gleichung enthält die Substratkonzentration $[S]$, die Reaktionsgeschwindigkeit v und die Konstanten v_{\max} (maximale Reaktionsgeschwindigkeit) und die *Michaelis-Menten*-Konstante K_m . Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} beschreibt hierbei den substratabhängigen Sättigungswert der Umsatzgeschwindigkeit, die durch weitere Substraterhöhung folglich nicht weiter erhöht werden kann. Die *Michaelis-Menten*-Konstante K_m ist die Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit ($v = 0.5 \cdot v_{\max}$). Abhängig vom verwendeten Substrat ist sie als charakteristisch für ein Enzym anzusehen. Aus dem Quotienten v_{\max} und der anfänglichen Enzymkonzentration $[E]_i$ ergibt sich die Wechselzahl oder katalytische Konstante k_{cat} . Sie beschreibt den maximalen Enzymumsatz pro Zeit mit der Einheit s^{-1} Durch

Bildung des Quotienten k_{cat}/K_m erhält man als weiteren Parameter die sogenannte katalytische Effizienz a . Sie ist ein Maß dafür, wie schnell ein Enzym Edukt zu Produkt umsetzen kann und wird in der Einheit mol/s angegeben.

$$k_{\text{cat}} = \frac{v_{\text{max}}}{[E]_i}$$

$$a = \frac{k_{\text{cat}}}{K_m}$$

Die Auftragung der reziproken Werte der Geschwindigkeit gegen die reziproken Substratkonzentrationen (doppelt-reziproke Auftragung) ergibt eine Gerade. Diese lineare Transformation der *Michaelis-Menten*-Gleichung wurde von *Lineweaver* und *Burk* durch folgende Gleichung beschrieben.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\text{max}}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\text{max}}}$$

Nach linearer Regression der Datenpunkte einer Messreihe können die relevanten Parameter somit durch die Ermittlung des Schnittpunkts mit der Abszisse ($-1/K_m$) und aus dem Ordinatenabschnitt ($1/v_{\text{max}}$) ermittelt werden. Diese Methode hat allerdings den Nachteil, dass die Fehlergrenzen zum Koordinatenursprung hin komprimiert, zur anderen Seite hin, also bei kleinen Substratkonzentrationen, stark aufgeweitet werden. Ohne die Einführung von Gewichtungsfaktoren kann dies zu großen Abweichungen bei den ermittelten Parametern v_{max} und K_m führen.

Ein weiteres Linearisierungsverfahren der *Michaelis-Menten*-Gleichung wurde von *Eadie* und *Hofstee* beschrieben.

$$v = v_{\text{max}} - K_m \cdot \frac{v}{[S]}$$

Bei Auftragung von v gegen $v/[S]$ kann v_{max} aus dem Ordinatenabschnitt und $-K_m$ aus der Steigung ermittelt werden. Die Verzerrung der Fehlergrenzen ist hierbei weniger drastisch als bei der doppelt-reziproken Auftragung nach *Lineweaver-Burk*. Die Fehlergrenzen werden ausgehend von der Diagramm-Mitte nach beiden Seiten hin zu niederen und zu hohen Substratkonzentrationen aufgeweitet.

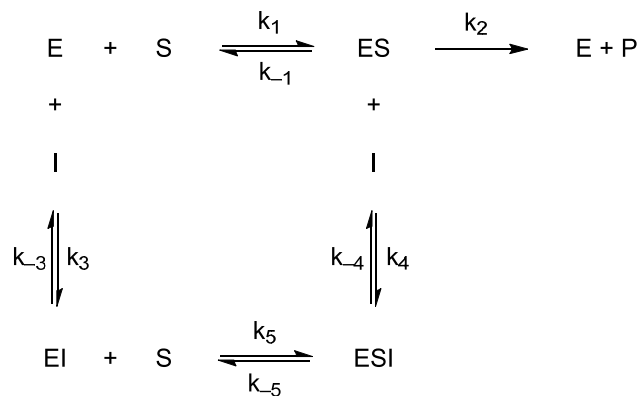
Diese und weitere Linearisierungsverfahren, z.B. nach *Hanes* oder *Cornish-Bowden*, dienen mittlerweile vor allem der Veranschaulichung der Untersuchung von Inhibitionsmechanismen (siehe Kapitel 2.3.1.b)). Die Möglichkeit der rechnergestützten Nicht-linearen

Regressionsanalyse liefert exaktere Werte der beschriebenen Parameter. Durch Vermessung einer Verdünnungsreihe vom Substrat in einem Konzentrationsbereich eine Zehnerpotenz über und unter dem K_m -Wert erhält man die jeweiligen Geschwindigkeiten in Abhängigkeit der Substratkonzentration. Durch *Fitting* der Variablen $[S]$ und v in die *Michaelis-Menten*-Gleichung lassen sich K_m sowie v_{max} berechnen. Prinzipiell beinhaltet eine einzige Zeit-Umsatz-Kurve bei einer Substratkonzentration im Sättigungsbereich alle relevanten Parameter. Über die Ordinatenwerte (z. B. Absorption) bei verschiedenen Zeitpunkten kann man die aktuelle Substratkonzentration $[S]$ berechnen und durch Tangentenbildung die jeweilige Geschwindigkeit v . Ungenauigkeiten bei diesem Verfahren können allerdings durch etwaige Produkthemmung der Reaktion sowie der Unsicherheit bei der Tangentenbildung an sich entstehen.^[95-98]

b) Enzymhemmung

Klassischerweise unterscheidet man bei der reversiblen Hemmung eines Enzyms zwischen kompetitiver, nicht-kompetitiver und unkompetitiver Hemmung.

Ein nicht-kompetitiver Inhibitor bindet mit gleicher Affinität an das freie Enzym E und an den Enzym-Substrat-Komplex ES. Die Bindung erfolgt hierbei nicht direkt an der Substratbindungsstelle. Für die nicht-kompetitive Hemmung lässt sich unter Annahme einer vollständigen Hemmung folgender Hemm-Mechanismus annehmen.



Daraus lässt sich folgende Geschwindigkeitsgleichung herleiten.

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}} \right) + \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}} \right) [S]}$$

Für die lineare Transformation nach Lineweaver-Burke mit $f\left(\frac{1}{[S]}\right) = \frac{1}{v}$ gilt folglich:

$$\frac{1}{v} = \frac{1 + \frac{[I]}{K_{iu}}}{v_{\max}} + \frac{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right)}{v_{\max} \cdot [S]}$$

Für die lineare Transformation nach Eadie-Hofstee mit $f\left(\frac{v}{[S]}\right) = v$ gilt:

$$v = \frac{v_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_{iu}}} - \frac{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right)}{1 + \frac{[I]}{K_{iu}}} \cdot \frac{v}{[S]}$$

K_{ic} ist hierbei die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes EI und K_{iu} des Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplexes ESI.

$$K_{ic} = \frac{k_{-3}}{k_3} = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

$$K_{iu} = \frac{k_{-4}}{k_4} = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

$$\alpha = \frac{K_{iu}}{K_{ic}}$$

Durch Bildung und Bestimmung des Quotienten α aus den Dissoziationskonstanten K_{iu} und K_{ic} lassen sich nun mathematischen Bedingungen formulieren, die eine Aussage über den Inhibitionsmechanismus möglich machen.

Für den Fall $K_{iu} = K_{ic} = K_i$ ($\alpha = 1$) spricht man von nicht-kompetitiver Hemmung. Der Inhibitor besitzt die gleiche Affinität zum freien Enzym und zum Enzym-Substrat-Komplex. Mit steigender Inhibitorkonzentration erniedrigt sich die scheinbare Maximalgeschwindigkeit v_{\max} , wogegen K_m gleich bleibt. Die Geschwindigkeitsgleichung vereinfacht sich wie folgt.

$$v = \frac{1}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \cdot \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Bei $K_{iu} \rightarrow \infty$ ($\alpha \rightarrow \infty$) spricht man von kompetitiver Hemmung. Der Inhibitor konkurriert mit dem Substrat um die Bindung an das freie Enzym. Kompetitive Inhibitoren zeigen alle denselben Effekt auf die Substratbindung und Katalyse. Mit steigender Inhibitorkonzentration erhöht sich der scheinbare K_m -Wert, wogegen v_{\max} gleich bleibt. Die Geschwindigkeitsgleichung vereinfacht sich wie folgt.

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right) + [S]}$$

Bei $K_{ic} \rightarrow \infty$ ($\alpha \rightarrow 0$) spricht man von unkompetitiver Hemmung. Der Inhibitor bindet ausschließlich an den Enzym-Substratkomplex. Mit steigender Inhibitorkonzentration erniedrigen sich K_m und v_{max} . Die Geschwindigkeitsgleichung vereinfacht sich wie folgt.

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right)}$$

Zeigt ein Inhibitor innerhalb der mathematisch beschriebenen Grenzfälle unterschiedliche Affinitäten zum freien Enzym und zum ES-Komplex spricht man von gemischter Hemmung ($0.1 \leq \alpha \leq 10$). Mit steigender Inhibitorkonzentration erniedrigt sich die scheinbare Maximalgeschwindigkeit v_{max} , wogegen der scheinbare K_m in Abhängigkeit von K_{ic} und K_{iu} steigen oder fallen kann. Logischerweise gilt hierfür die ungekürzte Geschwindigkeitsgleichung für die nicht-kompetitive Hemmung.

Die linearen Transformationen der jeweiligen Geschwindigkeitsgleichungen vereinfachen sich entsprechend. Die Schaubilder dieser Funktionen ermöglichen es, gewisse Hemmtypen leicht zuordnen zu können. Mit Hilfe von Ordinaten-, Abszissenabschnitten, Steigungen und unter Zuhilfenahme von Sekundärauftragungen ist zudem die direkte Ermittlung der beschriebenen Hemmkonstanten möglich, aber wie in Kapitel 2.3.1.a) beschrieben gewissen Ungenauigkeiten unterworfen. Ohne Inhibitor vereinfachen sich alle Geschwindigkeitsgleichungen zur MM-Gleichung ohne Anwesenheit eines Inhibitors bzw. deren linearen Transformationen. Idealerweise bestimmt man den Hemmtyp und die dazugehörigen Konstanten durch Vermessung von Verdünnungsreihen eines Inhibitors bei verschiedenen Substratkonzentrationen und erhält daraus die Variablen $[S]$, $[I]$ und die Geschwindigkeit v . Mit Hilfe Nicht-linearer Regression lässt sich auf K_m und v_{max} bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen und somit auf den Inhibitionsmechanismus schließen. Wiederum durch Nicht-lineare Regression und *Fitting* in die jeweilige Geschwindigkeitsgleichung können schließlich die K_i -Werte berechnet werden.^[95–98]

c) Bestimmung und Interpretation von IC_{50} -Werten

Der IC_{50} -Wert entspricht der Inhibitorkonzentration, die eine Halbierung der Enzymaktivität verglichen mit der Aktivität der ungehemmten Reaktion bewirkt. Zur Bestimmung vermisst man bei konstanter Substratkonzentration Inhibitorkonzentrationen im Potenzbereich über und unter dem angenommenen IC_{50} -Wert, den man durch vorhergehende Messung einer sehr hohen und einer kleinen Inhibitorkonzentration abschätzen kann. Für die Berechnung durch Nicht-lineare-Regression kann folgende 4-Parameter-Gleichung herangezogen werden.

$$v = \frac{v_{\max} - v_{\min}}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^s} + v_{\min}$$

Für v_{\max} wird hierbei näherungsweise die Geschwindigkeit, die ohne Inhibitor bzw. bei kleinen Inhibitorkonzentrationen gemessen wurde, herangezogen. Die gemessene Geschwindigkeit bei sehr großen Inhibitorkonzentrationen ist v_{\min} . Der Hill-Koeffizient s ist die Steigung des näherungsweise linearen mittleren Abschnitts der Funktion bei halblogarithmischer Auftragung. Durch Festlegung von $v_{\max} = v_0$ als 100 % Enzymaktivität und v_{\min} als 0 % Enzymaktivität vereinfacht sich der Term zu folgender 2-Parameter-Gleichung. Durch Nicht-lineare Regression erhält man daraus den IC_{50} -Wert und den Steigungsfaktor s . Ist $s \gg 1$ spricht dies für eine unspezifische Hemmung durch Aggregatbildung.^[98,99]

$$v = \frac{v_0}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^s}$$

Ungenauigkeiten ergeben sich nicht nur aus der Annahme $v_{\max} = v_0$. Der IC_{50} -Wert ist zudem abhängig vom Inhibitionsmechanismus und den Assaybedingungen. Er dient somit vor allem zum Vergleich von Inhibitoren, die unter denselben Assaybedingungen getestet wurden. Um eine genaue Aussage über Hemmtyp und Inhibitionskonstanten machen zu können, müssen die IC_{50} -Werte in Abhängigkeit von der Konzentration des Substrats und dessen K_m -Wert betrachtet werden. *Cheng* und *Prusoff* formulierten folgende Gleichungen für den Zusammenhang von IC_{50} - und K_i -Werten für die verschiedenen reversiblen Hemmtypen. Mit ihnen kann man K_i -Werte abschätzen, wenn man den Hemmtyp kennt.^[100,101]

Für kompetitive Hemmstoffe:

$$IC_{50} = K_{ic} \left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right)$$

Für Unkompetitive Inhibitoren:

$$IC_{50} = K_{iu} \left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right)$$

Für Nicht-kompetitive bzw. gemischte Inhibitoren:

$$IC_{50} = \frac{[S] + K_m}{\frac{K_m}{K_{ic}} + \frac{[S]}{\alpha \cdot K_{ic}}}$$

Für nicht-kompetitive Inhibitoren gilt $\alpha = 1$ und somit $IC_{50} = K_{ic} = K_{iu} = K_i$. Der IC_{50} -Wert ist also unabhängig von der Konzentration des Substrats bzw. dessen K_m -Wert.

Bei kompetitiver Inhibition steigen die IC_{50} -Werte mit zunehmender Substratkonzentration und zunehmender Affinität des Substrats zum Enzym ($K_m \downarrow$), da das Substrat und der Inhibitor um die gleiche Bindungsstelle des freien Enzyms konkurrieren.

Bei unkompetitiver Hemmung erniedrigen sich die IC_{50} -Werte mit steigender Substratkonzentration und zunehmender Affinität des Substrats zum Enzym ($K_m \downarrow$), da der Inhibitor nur an den gebildeten Enzym-Substrat-Komplex bindet.

Die Testung der Substanzbibliothek (siehe Kapitel 4) in der vorliegenden Arbeit wurde ohne Kenntnisse über den Hemmtyp bei einer Substratkonzentration von $600 \mu\text{M}$, die etwas kleiner als der experimentell bestimmten K_m -Wert von 2toCoA ($941 \pm 214 \mu\text{M}$) ist, durchgeführt. Dies hatte zum einen den bereits erwähnten Grund, dass bei Substratkonzentrationen am bzw. knapp unter dem K_m -Wert alle Hemmtypen bezüglich der Hemmstärke gleich gut erfasst werden. Zum anderen konnte das Substrat 2toCoA eingespart werden, welches wie in Kapitel 2.1 beschrieben, sehr aufwändig und teuer war herzustellen.

Insbesondere bei Inhibitoren, die im klassischen *Steady-State*-Modell einen nicht-kompetitiven oder gemischten Hemmtyp aufweisen, kann tatsächlich ein Fließungleichgewicht vorliegen. In diesem Fall muss an Hand der Umsatz-Zeit-Kurven (linearer oder kurvenartiger Verlauf) und experimentell untersucht werden, ob eine *Tight-Binding* (IC_{50} -Wert steigt mit zunehmender Enzymkonzentration), eine zeitabhängige und/oder irreversible (Verdünnungsassay, kontinuierlicher Assay) Hemmung vorliegt. Dieser Sachverhalt wird im Kapitel 2.3.3.d) an Hand der zur Validierung verwendeten Positivkontrollen näher betrachtet.

2.3.2 Prinzip des Testsystems

Um *in-vitro* Testungen der Verbindungen der Substanzbibliothek durchzuführen, deren inhibitorischen Eigenschaften zu vergleichen, den Bindungsmechanismus zu untersuchen und daraus erste SAR ableiten zu können, wurden zwei photometrische Testverfahren etabliert, die -im 96-well-Format betrieben- in der Lage sind, im Hinblick auf die aufzuwendende Zeit einen mittleren Durchsatz an Testungen zu ermöglichen. Beim UV-VIS-spektroskopischen gekoppelten enzymatischen Testverfahren macht man sich das unterschiedliche Absorptionsverhalten des Coenzym und Redoxpaares NAD^+/NADH bei 340 nm zu Nutze (I). Die Elektronen der durch die Dehydrogenase InhA katalysierten Reduktion bzw. Hydrierung der Doppelbindung des Substrates 2toCoA stammen von der reduzierten Form NADH, die bei gegebener Wellenlänge ein Absorptionsmaximum hat (II). Der bei der Reaktion entstehende oxidierte Zustand NAD^+ besitzt hierbei ein Absorptionsminimum. Verfolgt man nun die Abnahme der Absorption bei der Wellenlänge 340 nm als Funktion der Zeit erhält man eine Umsatz-Zeit-Kurve (III) der ablaufenden enzymatischen Reaktion (siehe Abbildung 27).

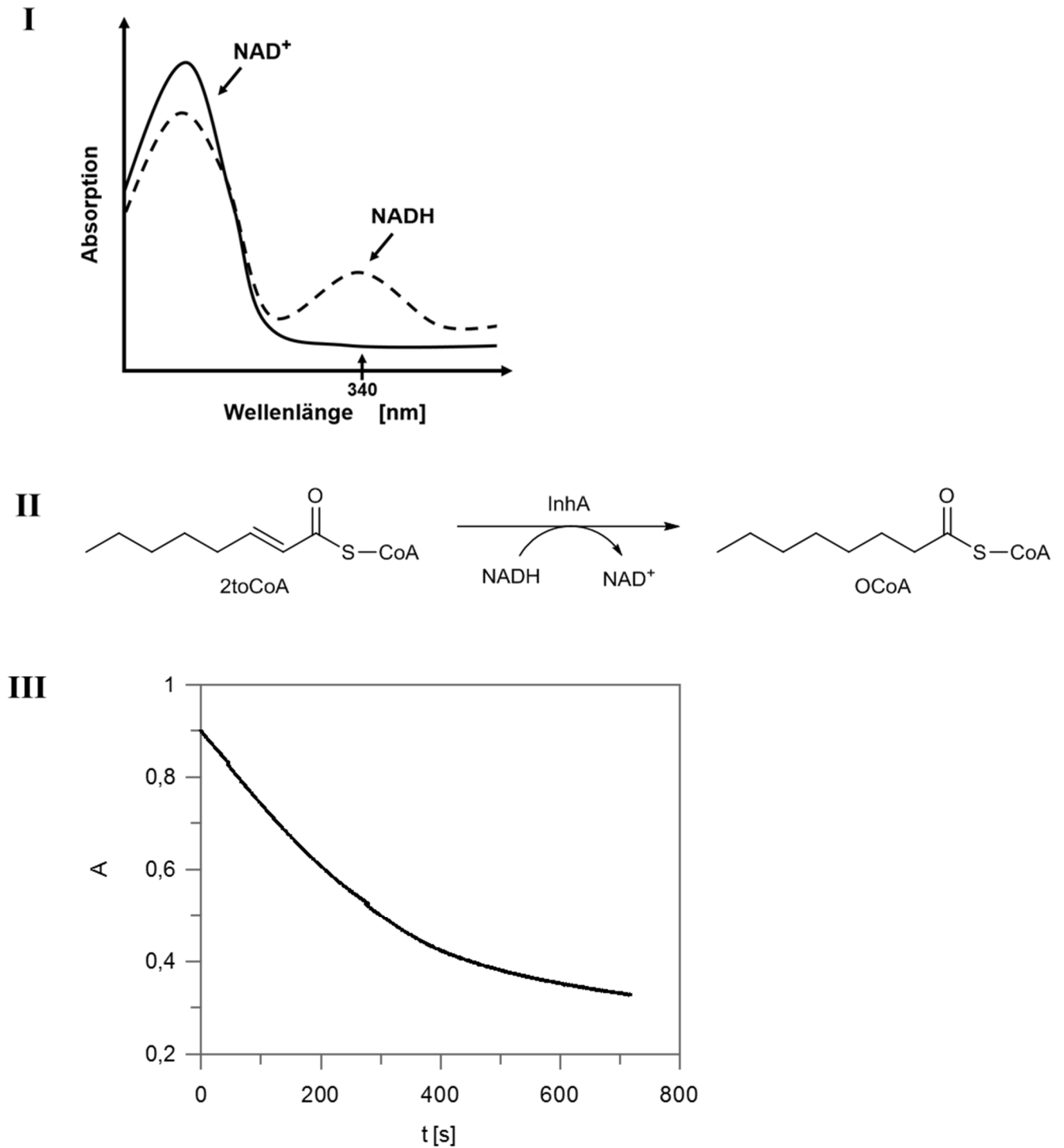


Abbildung 27: Prinzip des gekoppelten enzymatischen Testverfahrens.

Bei der fluorimetrischen Detektionsvariante macht man sich entsprechend das unterschiedliche Anregungs- bzw. Emissionsverhalten von NADH/NAD⁺ zu Nutze (siehe Kapitel 2.3.4). Im Folgenden wird auf die Einrichtung der Rahmenbedingungen sowie auf die durchgeführten Validierungsschritte eingegangen.

2.3.3 Etablierung des Testsystems mit UV-VIS-spektroskopischer Detektion

Die folgenden Experimente wurden an einem *Appliscan-Microplate-Reader* von *ThermoFischerScientific* im 96-Well-Format durchgeführt.

a) Nachweis der Linearität des Messinstruments

Die gemessenen Absorptionen sollten idealerweise im Gültigkeitsbereich des *Lambert-Beerschen-Gesetzes* liegen.^[102] Dieses beschreibt den linearen Zusammenhang von Absorption, durchstrahlter Schichtdicke und der Konzentration einer Lösung.

$$A = c \cdot \varepsilon \cdot d$$

A = Absorption

c = Konzentration

ε = Absorptionskoeffizient (Proportionalitätsfaktor)

d = Schichtdicke

Da man während der Testung die Abnahme der Absorption von NADH bei 340 nm betrachtet, wurden Konzentrationen an NADH von 250 μM bis 500 μM in Schritten von 25 μM bei einem Endvolumen von 300 μl pro Well und gegebener Wellenlänge vermessen. Hierdurch konnte neben der Güte der erhaltenen linearen Funktion auch die Ausgangskonzentration an NADH für das Testsystem festgelegt werden (siehe Abbildung 28).

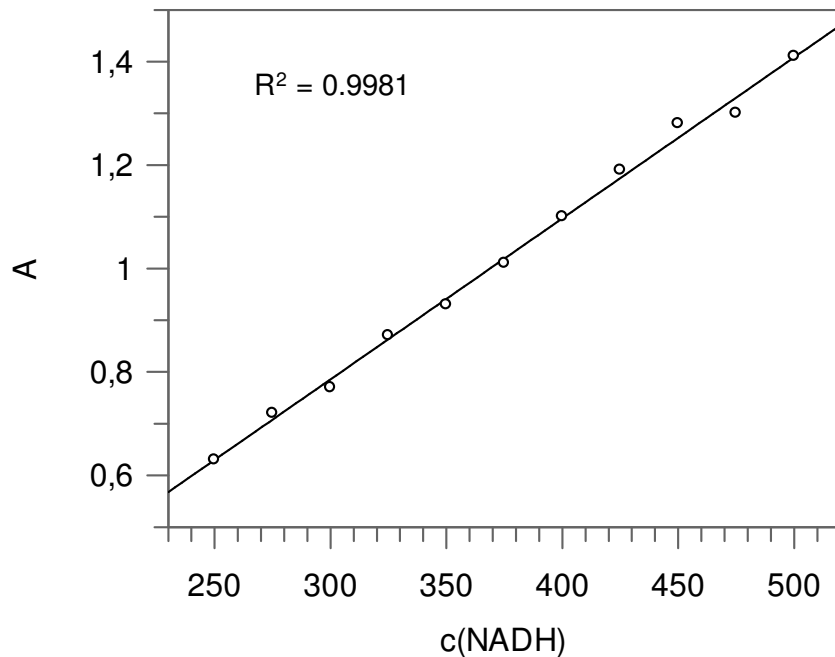


Abbildung 28: Linearer Absorptionsbereich von NADH.

Durch lineare Regression ergibt sich ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0.9981$. Die Linearität des Messinstruments ist somit bei gegebener Wellenlänge und im vermessenen Konzentrationsbereich gegeben. Das Detektionssystem erlaubt somit valide Messungen über einen breiten Absorptions- bzw. Konzentrationsbereich. Für Messungen bei einem Endvolumen von 300 μl pro Well wurde eine Ausgangskonzentration von 325 μM NADH ($A = 0.87$) gewählt. Zur Einsparung von Substrat wurde das Assayvolumen auf 100 μl angepasst, was durch die Erniedrigung der Schichtdicke wiederum nach *Lambert-Beer* eine Erhöhung der Konzentration auf 800 μM erforderlich macht.

b) Messung der Initialgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion

Unter Initialgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion versteht man den anfänglichen linearen Bereich der Umsatz-Zeit-Kurve, in dem weniger als zehn Prozent Substrat bzw. Cosubstrat umgesetzt wurden.^[96,97] Bei diesen Bedingungen kann angenommen werden, dass sich die Konzentration an Substrat nicht signifikant ändert, eine etwaige Rückreaktion wegen vernachlässigbarer Menge an entstandenem Produkt sowie Produktinhibition nicht stattfinden, die Substratsättigung des Enzyms gewährleistet ist und eine mögliche Inaktivierung des Enzyms auf Grund von Instabilitäten bei gegebener Temperatur oder gegebenem pH-Wert verhindert wird. Nimmt man zusätzlich an, dass bei der Reaktion kein anderes Enzymintermediat als der Enzym-Substrat-Komplex entsteht und wählt die Substratkonzentration um ein Vielfaches größer als die Konzentration des Enzyms, liegt ein Fließgleichgewicht (*steady state*, siehe Kapitel 2.3.1) vor. Die Konzentration vom Cosubstrat NADH wurde hierbei um ein Vielfaches höher gewählt als sein K_m -Wert (Lit.: 7.6 μM).^[65] Durch Titration von Enzym- und Substratmenge wurde die Initialgeschwindigkeit so eingestellt, dass der Umsatz von zehn Prozent Substrat bzw. Cosubstrat in eine Zeitspanne von 40 Sekunden linear verläuft (siehe Abbildung 29). Anfangs- und Endabsorption wurden hierbei entsprechend als Anfangspunkt bzw. als Endpunkt unter Annahme eines vollständigen Umsatzes der enzymatischen Reaktion herangezogen. Ein Zusatz von bis zu fünf Prozent DMSO als Lösemittel wurde toleriert. Bis zu acht Wells einer 96-Well-Platte können auf einmal vermessen werden, ohne dass die Anzahl der Messpunkte im linearen Anfangsbereich zu gering wird.

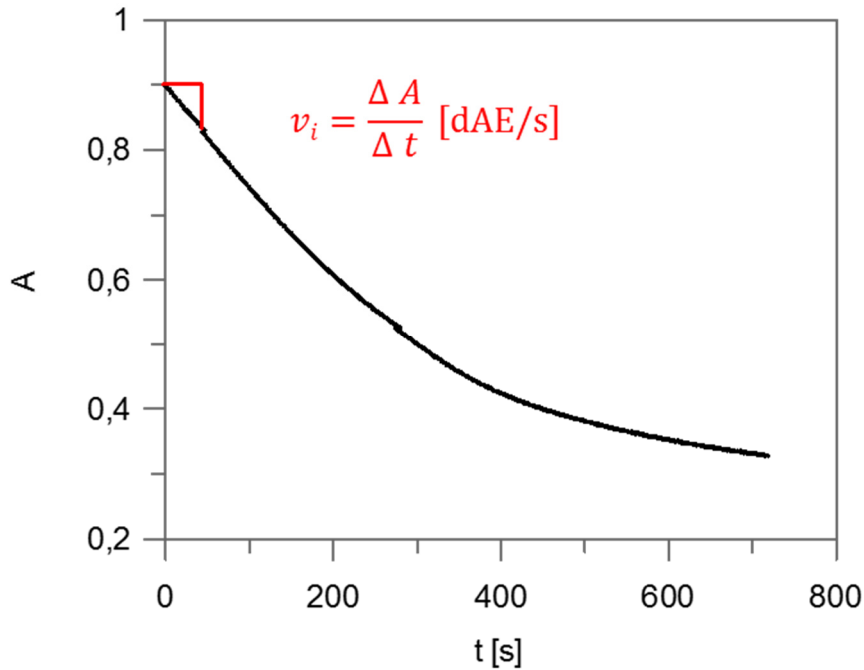


Abbildung 29: Umsatz-Zeit-Diagramm und die daraus bestimmte Initialgeschwindigkeit v_i .

Durch Berechnung des Quotienten der Initialgeschwindigkeit bei zugesetztem Inhibitor v_i mit der Initialgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion ohne Inhibitor (reiner DMSO-Wert, v_0) erhält man die Restaktivität respektive die relative Hemmung in Prozent.

$$\text{Restaktivität [\%]} = \frac{v_i}{v_0} \cdot 100$$

$$\text{relative Hemmung [\%]} = 100 - \text{Restaktivität}$$

Die zuverlässige Bestimmung der Initialgeschwindigkeit und die sich daraus ableitende prozentuale Hemmung wurden zur Validierung des Testverfahrens sowie zum Vergleich der Verbindungen der Substanzbibliothek im Hinblick auf ihre inhibitorischen Eigenschaften herangezogen. Folgende quantitative Zusammensetzung pro *Well* der Assay-Bestandteile wurde durch die beschriebenen Vorversuche evaluiert (siehe Tabelle 2):

Tabelle 2: Zusammensetzung des InhA-Assays

InhA-Assay (Endvolumen 100 μ l)	
Volumina	73 μ l Puffer, 8 μ l NADH 10mM, 12 μ l 2toCoA 5mM, 5 μ l DMSO bzw. Inhibitor 400 μ M, 2 μ l InhA 25 μ M
Endkonzentration/well	NADH 800 μ M, 2toCoA 600 μ M, DMSO/Inhibitor 5%/20 μ M, InhA 500 nM
Substrat	2- <i>trans</i> -Octenoyl-CoA (2toCoA), Cosubstrat NADH
Enzympuffer	PIPES 30 mM pH 6.8, 150 mM NaCl

InhA-Assay (Endvolumen 100 µl)	
Assaypuffer	PIPES 30 mM pH 6.8, 150 mM NaCl, 1mM EDTA
Temperatur	25 °C
Detektion	UV/VIS 340 nm

c) Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten K_m und der Maximalgeschwindigkeit v_{max} für das Substrat 2toCoA

Zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten K_m und der Maximalgeschwindigkeit v_{max} von 2toCoA wurden die Initialgeschwindigkeiten bei sechs Substratkonzentrationen bestimmt. Der Konzentrationsbereich des Substrats wurde dabei so gewählt, dass je drei Konzentrationen über und drei Konzentrationen unter dem in der Literatur gelisteten K_m -Wert für das Substrat 2toCoA von 467 µM liegen.^[65] Durch Nicht-lineare-Regression der Michaelis-Menten-Gleichung wurden neben einem K_m -Wert von 941 ± 214 µM eine Maximalgeschwindigkeit von 0.0016 ± 0.0002 AE/s berechnet. Die erhaltenen Werte liegen im Bereich der Literaturdaten und sind somit als valide anzusehen. Durch Auftragen der Initialgeschwindigkeit als Funktion der Substratkonzentration erhält man ein Schaubild mit hyperbolem Kurvenverlauf (Michaelis-Menten-Plot, siehe Abbildung 30).

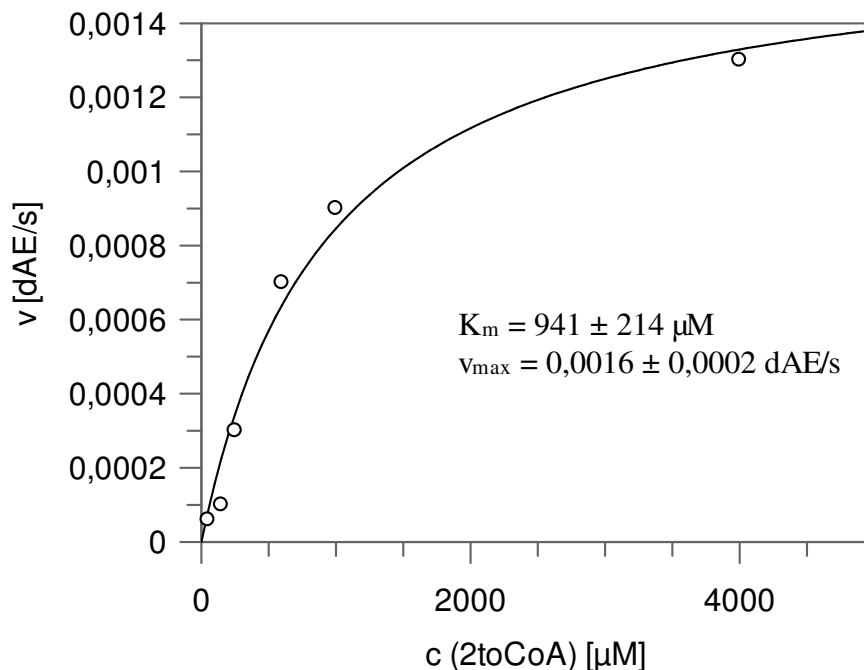


Abbildung 30: Michaelis-Menten-Plot von 2toCoA und InhA.

Zusätzlich wurde versucht, an Hand der Umsatz-Zeit-Kurve von 2toCoA bei 4000 µM den K_m -Wert und v_{max} mit dem Tangentenverfahren (siehe Kapitel 2.3.1) zu reproduzieren. Sollte

dieses Verfahren valide Ergebnisse liefern, würde dies eine massive Einsparung von 2toCoA im Hinblick auf die enzymkinetische Charakterisierung von Verbindungen der Substanzbibliothek bedeuten. Es müssten dann lediglich Umsatz-Zeit-Kurven von verschiedenen Inhibitorkonzentrationen bei einer Substratkonzentration im Sättigungsbereich aufgenommen werden, anstatt bei mehreren Substratkonzentrationen. Mit Hilfe des *Lambert-Beerschen-Gesetzes* lässt sich aus der gemessenen Absorption auf die jeweilige Konzentration von NADH schließen. Über das *Well*-Volumen wurde unter Annahme eines zylindrischen Körpers und den technischen Angaben des Mikrotiter-Platten-Herstellers die Höhe der Flüssigkeitssäule im *Well* berechnet. Diese entspricht der Schichtdicke einer Küvette. Tatsächlich aber hat ein *Well* die Form eines konischen Kegelstumpfes mit leichter Verjüngung hin zum Plattenboden. Da die technischen Angaben des Herstellers für die Berechnung eines solchen Körpers nicht ausreichend waren, wurde wie bereits erwähnt näherungsweise die Form eines Zylinders angenommen. Mit den ermittelten Konzentrationen von NADH in Abständen von je 12 s wurden unter Annahme eines 1:1 Umsatzes von Substrat und Cosubstrat die jeweiligen Konzentrationen von 2toCoA berechnet. Hierbei stellte sich heraus, dass selbst nach 30 minütiger Reaktionsdauer kein vollständiger Umsatz von 2toCoA festzustellen war und auf Grund des asymptotischen Verhaltens der Umsatz-Zeit-Kurve auch nicht mehr zu erwarten war. Dies ist seltsam, da eine so unvollständige Umsetzung nicht erwartet wurde und sich auch bei den Umsatz-Zeit-Kurven mit niedrigeren Substratkonzentrationen nicht abzeichnete. Es ist anzunehmen, dass eventuell eine schwache Produkthemmung durch das gebildete NAD⁺ oder durch Octanoyl-Coenzym A (OCoA) kombiniert mit Messfehlern vorliegt. Bei Auftragung der berechneten Geschwindigkeit v der jeweiligen Zeitabschnitte gegen die berechneten Substratkonzentrationen resultierte dies in einem Schaubild, welches nicht am Koordinatenursprung, sondern erst bei höheren Abszissenwerten begann. Die Ermittlung der enzymkinetischen Parameter war somit unmöglich. Anders gestaltete sich dieser Fall bei einer eingesetzten Substratkonzentration von 1000 μM . Hierbei stellte sich allerdings bei Berechnung der kinetischen Parameter heraus, dass der Sättigungsbereich von 2toCoA nicht erreicht wurde. Die Ermittlung der enzymkinetischen Parameter war somit ebenfalls weder durch Nicht-lineare-Regression noch durch Verwendung von Linearisierungsverfahren möglich. Die durch das Tangentenverfahren ermittelten Schaubilder sind in Abbildung 31 dargestellt. Abschließend ist festzustellen, dass diese per se viele Unsicherheiten beinhaltende alternative Methode zu Bestimmung enzymkinetischer Parameter bezüglich des InhA-Assay-Systems nicht erfolgreich angewendet werden konnte.

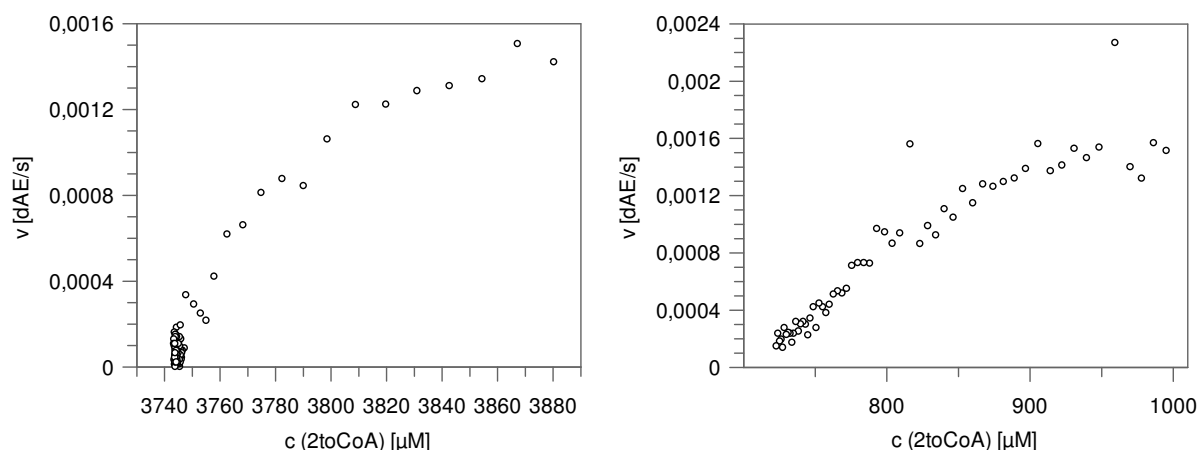


Abbildung 31: Die durch das Tangentenverfahren erhaltenen Schaubilder bei Ausgangssubstratkonzentrationen von 4000 μM (links) und 1000 μM (rechts).

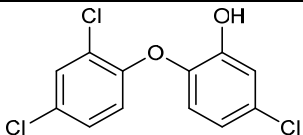
d) Charakterisierung der Positivkontrollen Triclosan und PT04

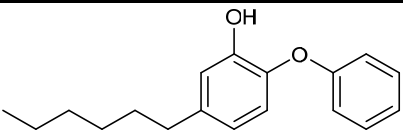
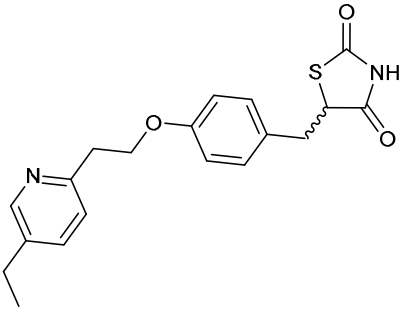
Zur weiteren Validierung wurden die Biphenylether-Derivate Triclosan und 6PP (PT04) als Positivkontrollen herangezogen (siehe Tabelle 3). Triclosan wird aufgrund seiner breiten antibakteriellen Eigenschaften als Zusatzstoff für Kosmetika, Zahnpasta usw. verwendet und ist käuflich zu erwerben. *Tonge et al.* charakterisierten es als unkompetitiven Inhibitor von InhA mit *rapid-reversible*-Charakteristik und einem K_{iu} -Wert von $220 \pm 20 \text{ nM}$.^[103]

Der Biphenylether 6PP (PT04) ist ein davon strukturell abgeleiteter unkompetitiver Hemmstoff von InhA mit *rapid-reversible*-Charakteristik im unteren nanomolaren Bereich ($K_{iu} = 9.4 \pm 0.5 \text{ nM}$) und wurde von den kollaborierenden Arbeitsgruppen *Kisker* (RVZ, Universität Würzburg) bzw. *Tonge* (Stony Brooke University, New York) zur Verfügung gestellt.^[104]

Zusätzlich wurde als Vergleichsprobe der Arzneistoff *R,S*-Pioglitazon, ein Insulinsensitizer und Agonist am $\text{PPAR}\gamma$ -Rezeptor herangezogen. Er besitzt ein Thiazolidindion-Grundgerüst mit einem Substituenten an Position 5 des Fünfrings. In Tabelle 3 sind die Strukturformeln und Restaktivitäten bei Substanzkonzentrationen von 20 μM aufgelistet.

Tabelle 3: Die Biphenylether-Derivate Triclosan und PT04 wurden als Positivkontrolle und der Arzneistoff Pioglitazon als Vergleichsprobe verwendet ($[I] = 20 \mu\text{M}$).

Verbindung	Strukturformel	Restaktivität InhA [%]
Triclosan		14 ± 3

Verbindung	Strukturformel	Restaktivität InhA [%]
PT04		17 ± 2
R,S-Pioglitazon		n.i.

Die prozentualen Restaktivitäten der InhA liegen für Triclosan bei 14 % und für 6PP bei 17 %. Das Assay-System ist folglich in der Lage, potenzielle Hemmstoffe zu detektieren. Die Vergleichsprobe Pioglitazon zeigte keine hemmenden Eigenschaften bezüglich der Aktivität von InhA. Auf den ersten Blick mag es zum einen eigenartig erscheinen, dass die beiden in der Literatur als potente Hemmstoffe von InhA beschriebenen Biphenylether-Derivate (vgl. K_{iu} -Werte) bei einer Assay-Konzentration von 20 μM keine größeren prozentualen Hemmwerte aufzeigen. Zum anderen, dass sich die prozentualen Hemmungen von Triclosan und 6PP quasi nicht unterscheiden. Ersteres ist durch den unkompetitiven Inhibitionsmechanismus dieser Verbindungen erklärbar. Niedrige eingesetzte Substratkonzentrationen unter dem K_m -Wert des Substrats wie im vorliegenden Fall ($K_m(2\text{toCoA}) = 941 \mu\text{M}$, $[\text{S}] = 600 \mu\text{M}$) führen bei unkompetitiven Inhibitoren zur Erniedrigung der scheinbaren prozentualen Hemmung bzw. zur Erhöhung der IC_{50} -Werte. Für die Testung von unkompetitiven Hemmstoffen sollte daher idealerweise $[\text{S}] \gg K_m$ gelten. Würde man also eine viel größere Konzentration von 2toCoA als sein K_m -Wert einsetzen, würden die prozentualen Hemmwerte der beiden Positivkontrollen entsprechend ansteigen. Aus den bereits angeführten Gründen eignen sich allerdings für *Screening*-Kampagnien ohne Kenntnisse über den Hemmtyp Assay-Konzentrationen des Substrats am bzw. knapp unter dem K_m -Wert, wie dies in der vorliegenden Arbeit umgesetzt wurde (siehe Kapitel 2.3.1). Dass 6PP trotz sehr viel größerer Affinität keine besseren Hemmwerte als Triclosan zeigt, ist der Tatsache geschuldet, dass hierbei *eine tight-binding*-Charakteristik vorliegt. Die Hemmstärke ist somit abhängig von der Enzymkonzentration. Mit steigender Enzymkonzentration nehmen die IC_{50} -Werte zu bzw. die prozentuale Hemmung ab. Im vorliegenden Testsystem ist die Enzymkonzentration mit 500 nM relativ hoch gewählt.

Würde man diese sehr stark erniedrigen, sollte sich die sehr viel höhere Potenz von 6PP gegenüber Triclosan wie zu erwarten in den prozentualen Hemmwerten niederschlagen. In Abbildung 32 sind die Umsatz-Zeit-Kurven mit Triclosan 20 μM und ohne Hemmstoff (DMSO) sowie die Ausgleichsgeraden bis zum Zeitpunkt $t = 40$ s dargestellt.

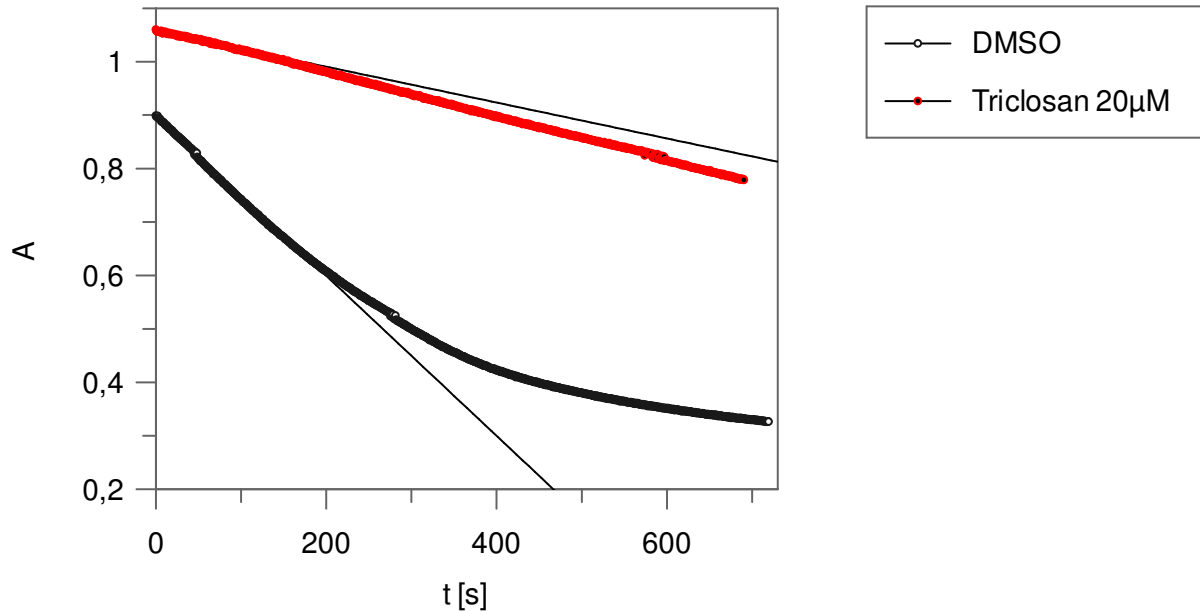


Abbildung 32: Beispiel der Umsatz-Zeit-Kurven mit und ohne Triclosan 20 μM .

Das Umsatz-Zeit-Diagramm mit Triclosan zeigt hierbei *rapid-reversible*-Charakteristik. Die Absorption sinkt nahezu linear mit der Zeit mit betragsmäßig viel kleinerer Steigung als die der Initialgeschwindigkeit der ungehemmten Reaktion mit kurvenartigem Abfall.

Als Nächstes wurde der IC_{50} -Wert von Triclosan bestimmt und mit Literaturwerten verglichen. Hierzu wurden die Initialgeschwindigkeiten bei acht Triclosan-Konzentrationen in einem Bereich von 0–25 μM bestimmt. Durch Nicht-lineare-Regression unter Verwendung der 2-Parameter-Gleichung (siehe Kapitel 2.3.1) wurde ein IC_{50} -Wert von $2.2 \pm 0.5 \mu\text{M}$ bestimmt. Durch Auftragen der Initialgeschwindigkeit als Funktion der Triclosan-Konzentration und logarithmischer Skalierung der Abszisse erhält man ein Schaubild mit sigmoidem Kurvenverlauf (siehe Abbildung 33).

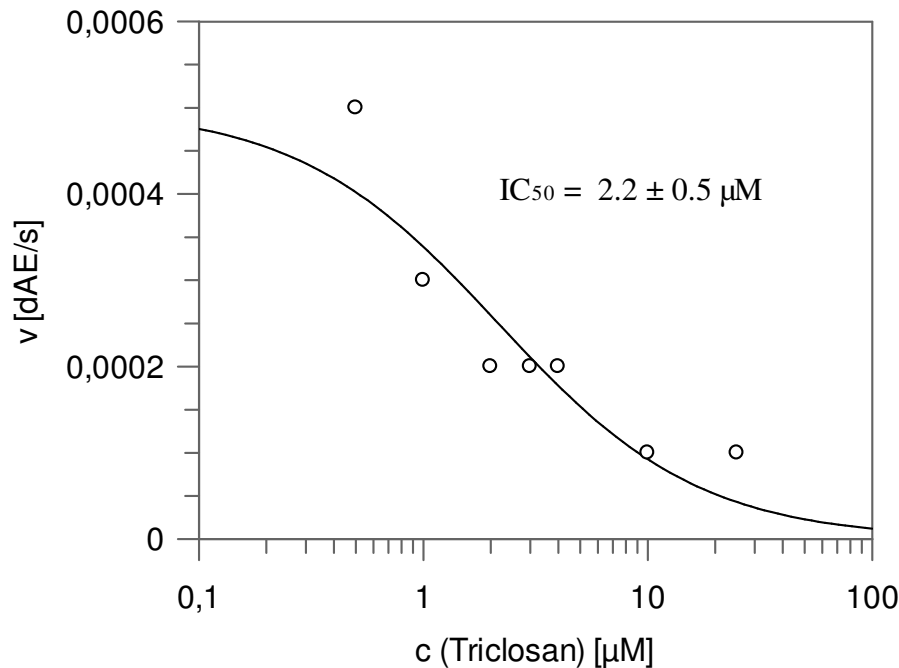


Abbildung 33: Beispiel der Bestimmung des IC_{50} -Werts von Triclosan.

Der Steigungsfaktor oder *Hill*-Koeffizient des linearen Mittelbereichs beträgt 0,97. Eine unspezifische Hemmung durch Aggregatbildung kann daher ausgeschlossen werden.

Tonge et al. ermittelten für Triclosan einen IC_{50} -Wert von $1,0 \pm 0,1 \mu\text{M}$. Sie verwendeten 2-*trans*-Dodecenoyl-CoA (DD-CoA) als Substrat, welches eine sehr viel höhere Affinität zu InhA ($K_m = 29 \mu\text{M}$) besitzt als 2toCoA, in einer Konzentration von $85 \mu\text{M}$.^[103,104] Die eingesetzte Substratkonzentration ist also nahezu dreimal so groß wie der K_m -Wert von DD-CoA, was verständlich ist, wenn man den unkompetitiven Hemmtyp von Triclosan in Betracht zieht. Dass der in dieser Arbeit bestimmte IC_{50} -Wert von Triclosan mit $2,2 \pm 0,5 \mu\text{M}$ gut doppelt so groß ist, lässt sich wiederum dadurch begründen, dass die Affinität von 2toCoA zu InhA ($K_m = 941 \mu\text{M}$) wesentlich kleiner ist und eine Substratkonzentration von $600 \mu\text{M}$ und damit eine unter dem K_m -Wert gewählt wurde, was bei unkompetitiver Inhibition folglich zu größeren IC_{50} -Werten führt. Um wertvolles Substrat einzusparen, wurde auf die Vermessung von Triclosan-Verdünnungsreihen bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen und der Ermittlung von K_{iu} verzichtet und stattdessen nach *Cheng-Prusoff* abgeschätzt (siehe Kapitel 2.3.1.c)). Hieraus ergibt sich ein geschätzter K_{iu} -Wert von 857 nM . *Tonge et al.* bestimmten experimentell einen K_{iu} -Wert von $220 \pm 20 \text{ nM}$ für Triclosan. Schätzt man aber den K_{iu} -Wert mit deren ermittelten K_m von DD-CoA und IC_{50} von Triclosan ergibt sich daraus ein geschätzter Wert von 746 nM . Dies zeigt einerseits, dass die Näherungsgleichungen nach *Cheng-Prusoff* insbesondere für unkompetitive Inhibitoren sehr ungenaue Werte liefern und eine experimentelle Bestimmung von K_i unumgänglich ist.

Andererseits bestätigen die sehr nah beieinander liegenden Schätzwerte für K_{iu} die Funktionstüchtigkeit des etablierten Testsystems.

Die Validität des gekoppelten enzymatischen Testsystems mit UV-Detektion kann somit als belegt angesehen werden. Es ermöglicht einen hohen Durchsatz an Proben bequem im 96-*Well*-Format zu testen und bietet die notwendigen experimentellen Voraussetzungen zur zuverlässigen Bestimmung von enzymkinetischen Hemmparametern.

2.3.4 Etablierung der fluorimetrischen Variante

Zusätzlich zur UV-VIS-spektroskopischen-Detektion wurde mittels Methoden-Transfer eine Variante mit fluorimetrischer Detektion etabliert (siehe Kapitel 8.5.1.b)). Die Experimente hierzu wurden an einem *Cary Eclipse* Fluorimeter mit *microplate reader* der Firma *Varian* im 96-Well-Format durchgeführt. Diese bietet neben besserer Empfindlichkeit auch eine weitere Bestätigung der Validität des Testverfahrens. Zur fluorimetrischen Detektion des gekoppelten enzymatischen Testverfahrens macht man sich das unterschiedliche Fluoreszenzverhalten des Redoxpaares NADH/NAD⁺ zu Nutze. Dieses wurde näher untersucht, indem Lösungen verschiedener Konzentrationen an NADH bzw. NAD⁺ bei verschiedenen Anregungs- und Emissionswellenlängen vermessen wurden. Die sich aus den jeweiligen Intensitätswerten ergebenden Differenzen wurden anschließend verglichen, um die geeignetsten Parameter herauszufinden. Bei einer Konzentration von 500 µM NADH, einer Anregungswellenlänge von 345 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm sind die Intensitätswerte ausreichend hoch und die Intensitätsdifferenz am größten (siehe Abbildung 34).

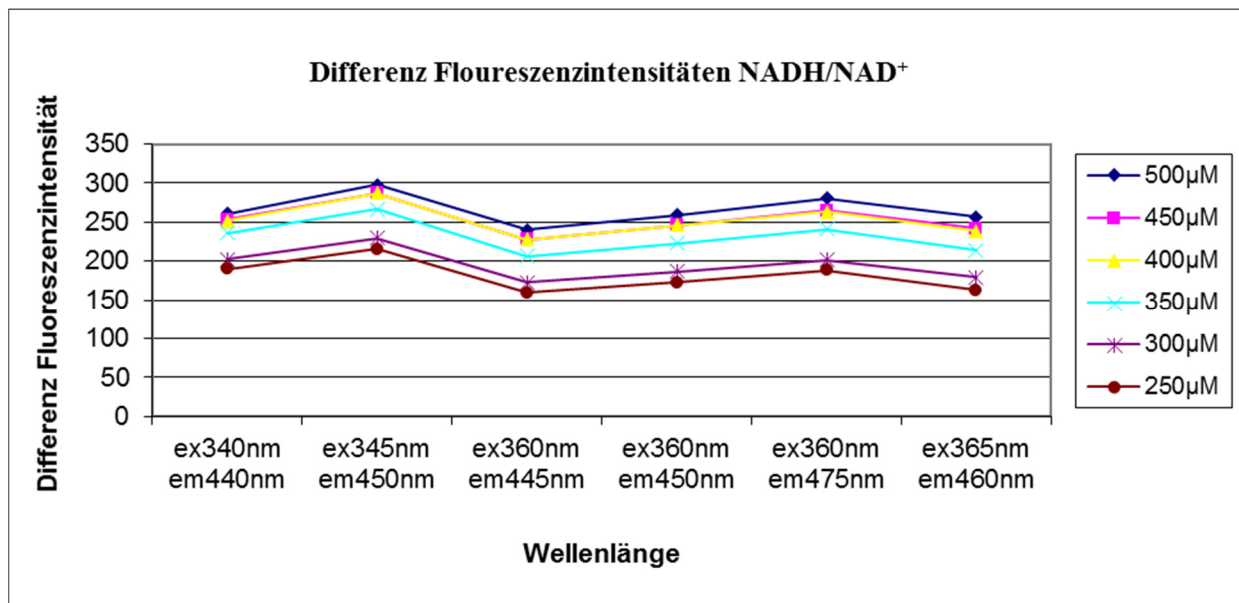


Abbildung 34: Differenz der gemessenen Fluoreszenz-Intensität von verschiedenen Konzentrationen von NADH und NAD⁺ bei verschiedenen Anregungs- und Emissionswellenlängen.

In Tabelle 4 ist die quantitative Zusammensetzung pro Well der Assay-Bestandteile abgebildet.

Tabelle 4: Zusammensetzung des fluorimetrischen InhA-Assays.

InhA-Assay (Endvolumen 200 µl)	
Volumina	142 µl Puffer, 20 µl NADH 5mM, 24 µl 2toCoA 5mM, 10 µl DMSO bzw. Inhibitor 400 µM, 4 µl InhA 25µM

InhA-Assay (Endvolumen 200 µl)	
Endkonzentration/well	NADH 500 µM, 2toCoA 600 µM, DMSO/Inhibitor 5%/20 µM, InhA 500 nM
Substrat	2-trans-Octenoyl-CoA (2toCoA), Cosubstrat NADH
Enzypuffer	PIPES 30 mM pH 6.8, 150 mM NaCl
Assaypuffer	PIPES 30 mM pH 6.8, 150 mM NaCl, 1mM EDTA
Temperatur	25 °C
Detektion	Ex 345 nm / Em 450 nm

Zur Validierung wurde eine Dreifachbestimmung von je 20 µM Triclosan als Positivkontrolle durchgeführt. Wie bei der UV-VIS-Variante beschrieben wurden die Initialgeschwindigkeiten bestimmt und eine daraus resultierende InhA-Restaktivität von $16 \pm 5 \%$ resp. eine Hemmung von $\sim 84 \%$ berechnet (siehe Abbildung 35). Potenzielle Hemmstoffe werden folglich angezeigt.

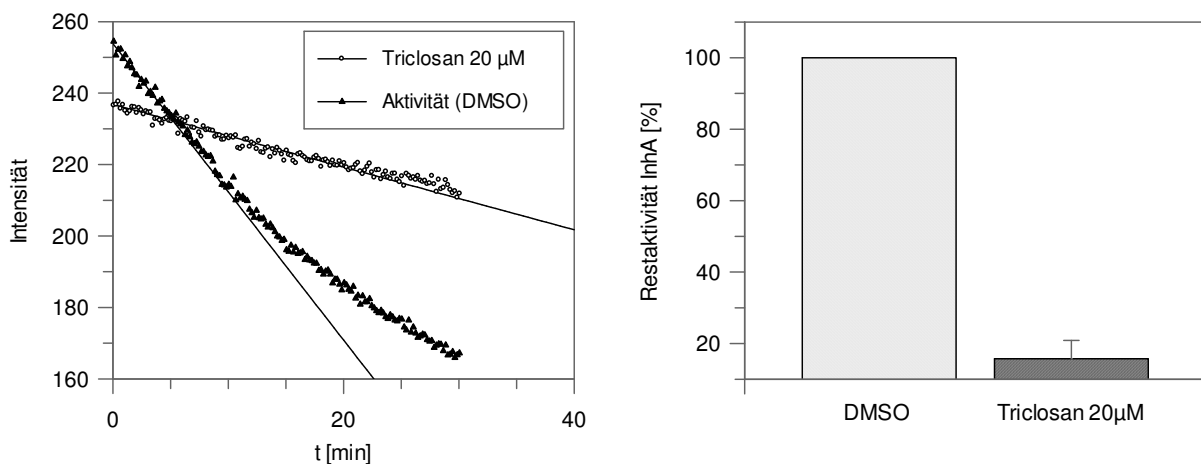


Abbildung 35: Beispiel einer Messung der Initialgeschwindigkeit bei 20 µM Triclosan (links). Die sich aus der Dreifachmessung ergebende Restaktivität (links).

Die fluorimetrische Variante kann somit als Detektionsalternative zur UV-VIS-Spektroskopie ebenfalls als valide betrachtet werden.

2.3.5 Assay reversed

Wie in Kapitel 2.1 beschrieben, erwies sich die Synthese des Substrats 2toCoA als sehr aufwändig. Bis zur Lösung dieses Problems wurden gleichzeitig andere Lösungsstrategien für die Etablierung eines Testverfahrens angestrebt. Im Gegensatz zum 2toCoA ist das Produkt der durch InhA katalysierten Reaktion, der Octanoyl-Coenzym A-Ester (OCoA), kommerziell erwerbbar und muss somit nicht selber hergestellt werden. Theoretisch sollte es möglich sein, dass unter bestimmten Bedingungen die Rückreaktion von OCoA zu 2toCoA mit NAD^+ als Coenzym durch die InhA katalysiert wird (siehe Abbildung 36). Die zur Untersuchung dieser Frage durchgeführten Experimente verliefen allerdings durchweg negativ und wurden nach erfolgreicher Substratsynthese eingestellt. Die geeigneten Bedingungen wurden nicht gefunden. Dies ist womöglich auf die fehlende thermodynamische Triebkraft der Rückreaktion zurückzuführen.

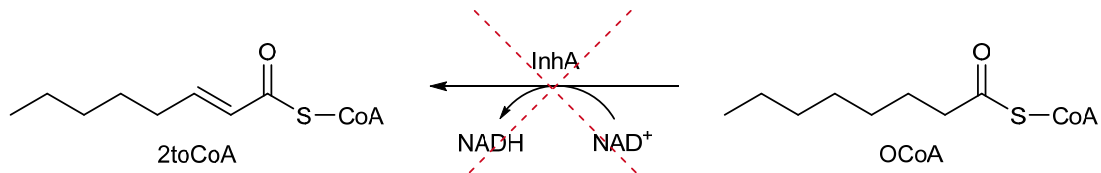


Abbildung 36: Eine Umkehr der von InhA katalysierten Reaktion konnte nicht beobachtet werden.

2.3.6 Versuch der Etablierung einer orthogonalen Methode (Mikroskalierte Thermophorese)

Um das enzymatische Testverfahren weiter zu validieren, wurde versucht eine orthogonale Messmethode zu etablieren, die auf einer anderen nicht photometrischen Messtechnik beruht. Ebenso sollte eine Methode etabliert werden, welche die Affinität eines Inhibitors zu InhA substratunabhängig bestimmen kann. Die mikroskalierte Thermophorese (*Microscale Thermophoresis*, MST) nutzt die physikalische Größe der Thermodiffusion oder Thermophorese, um das Bindungsverhalten von Liganden an Zielmoleküle zu bestimmen. Die Thermophorese beschreibt die Teilchenbewegung in einem Fluid entlang eines Temperaturgradienten. Sie ist eine stoffspezifische Größe, die von Parametern wie Molekülgröße, Ladung oder Solvatationshülle abhängig ist. Eine Veränderung dieser Parameter resultiert in einer Veränderung der Thermophorese. Diesen Umstand macht man sich bei der MST zunutze, um über die Messung des thermophoretischen Verhaltens von Ligand oder Inhibitor und Zielprotein auf die Bindungsaffinität zu schließen.^[105,106]

Vor der Messung wurde zunächst das Zielprotein InhA mit einem Fluoreszenzfarbstoff NT-647-NHS markiert. Der Farbstoff bindet als NHS-Ester an Aminogruppen des Proteinkomplexes (beispielsweise über Seitenketten von Lysin) und ermöglicht somit die Detektion der Fluoreszenzintensität mit einem Maximum im Bereich von 650–670 nm Wellenlänge. Eine ausführliche Beschreibung hierfür befindet sich in Kapitel 8.6. Anschließend wurde das markierte InhA im Volumenverhältnis 1:1 mit einer Triclosan-Verdünnungsreihe (1.22 nM–40 µM) gemischt. Alle Proben enthielten 5 % DMSO. Die erste von zwei Messreihen enthielt NAD⁺ in einer Konzentration von 500 µM, wohingegen die zweite ohne Zusatz des Cosubstrates hergestellt wurde. Triclosan sollte nur bei Anwesenheit des Cosubstrats an InhA binden. Nach dem Aufziehen der Proben in eine Glaskapillare, wurden diese mit Hilfe eines Schlittens in das Messgerät eingeführt. In Abbildung 37 ist das Messverfahren in einer Übersicht dargestellt.

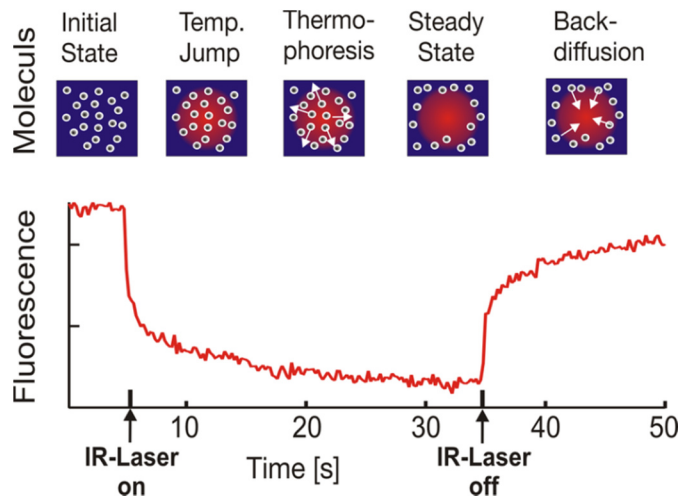


Abbildung 37: Messverfahren MST. Die Fluoreszenzintensität innerhalb der Kapillare wird gemessen und als Funktion der Zeit aufgetragen. Zum Zeitpunkt $t=5$ s wird der IR-Laser eingeschaltet und die fluoreszenzmarkierten Moleküle bewegen sich vom lokal erwärmten Bereich weg. Folglich wird dort eine Abnahme der Fluoreszenzintensität gemessen. Nach Ausschalten des IR-Lasers erfolgt die Rückdiffusion der Moleküle einhergehend mit zunehmender Fluoreszenzintensität.

(Work found at: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:MicroscaleThermophoresisSketch.png> / CC BY-SA 3.0

Author: NanoTemper Technologies GmbH

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/3e/MicroscaleThermophoresisSketch.png/800px-MicroscaleThermophoresisSketch.png>

<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>)

Zunächst wird mit Hilfe eines Infrarotlasers die jeweilige Glaskapillare punktuell erhitzt und somit ein Temperaturgradient erzeugt. Die sich darin befindenden Moleküle, die zuvor gleichmäßig verteilt waren (*initial state* der Abbildung) beginnen nun mit der Bewegung entlang des Temperaturgradienten (*thermophoresis*). Diese Bewegung kann mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors gemessen werden, der die konzentrationsabhängige Fluoreszenzintensität an einem bestimmten Punkt des zuvor markierten Zielmoleküls misst. Der zunächst starke Abfall der Fluoreszenzintensität ist auf den Temperatursprung zurückzuführen. Danach kommt es zu einer thermophoretischen Konzentrationsänderung am Messpunkt, bis die Molekülbewegung endet und sich ein Gleichgewicht einstellt (*steady state*). Nach der Deaktivierung des IR-Lasers erfolgt zunächst der umgekehrte Temperatursprung, anschließend beginnt die Rückdiffusion der Moleküle (*backdiffusion*) und es stellt sich der Ausgangszustand ein. Die Bestimmung der Differenz der Fluoreszenzintensität zwischen dem Ausgangspunkt (*initial state*, nach ca. 5 s) und dem Punkt, an dem die Thermophorese ein Gleichgewicht erreicht (*steady state*, nach ca. 30 s) kann durch die Messung verschiedener Konzentrationen einer Verdünnungsreihe die Bindungsaffinität bestimmt werden. Als Maß für die Bindungsaffinität dient hierbei die Dissoziationskonstante K_d des Enzym-Inhibitor-Komplexes. Nach dem Massen-Wirkungsgesetz ist diese wie folgt definiert:

$$K_d = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]}$$

[E] ist dabei die Konzentration an freiem Enzym, [I] ist die Konzentration des freien Inhibitors und [EI] die Konzentration des Enzym-Inhibitor-Komplexes. Je höher die Affinität eines Liganden zum Protein, desto kleiner ist der K_d -Wert.

Vor dem eigentlichen Messvorgang ist es erforderlich, die Fluoreszenzintensität der Lösung des gelabelten InhA zu bestimmen. Dazu wurden die konzentrierte Proteinlösung sowie Verdünnungen im Verhältnis 1:5, 1:10 und 1:20 hergestellt und mit Hilfe der Funktion *Capillary Scan* deren Intensitäten bestimmt. Idealerweise sollte die gemessene Intensität im Bereich von etwa 150–500 liegen. Unter Berücksichtigung, dass die Proteinlösung bei den folgenden Thermophorese-Messungen im Volumenverhältnis 1:1 mit der Triclosan-Lösung verdünnt wird und die Fluoreszenzintensität sich demnach halbiert, ist folglich jene Proteinverdünnung geeignet, die beim *Capillary Scan* eine Intensität im Bereich von 300–1000 zeigt. Zusätzlich muss der geeignete Kapillartyp ermittelt werden. Die Kapillaren sind unbehandelt, innen hydrophil oder innen hydrophob beschichtet erhältlich. Die besten Intensitäten und Peaksymmetrien ergaben sich bei einer 1:5 Verdünnung des gelabelten InhA und der Verwendung von hydrophob beschichteten Kapillaren (*K003 Monolith™ NT.115 Hydrophobic Capillaries*). Somit war aber auch die erfolgreiche Markierung von InhA mit dem Fluoreszenzfarbstoff nachgewiesen.

Die anschließende Vermessung der präparierten Triclosan-Verdünnungsreihen zeigten stark schwankende Thermophorese-Werte bei den jeweiligen Konzentrationen. Die LED-Power betrug bei diesen Messungen 40 %, die MST-Power 60 % bzw. 40 %. Eine Auswertung bzw. die Bestimmung des K_d -Werts war somit nicht möglich. Ebenfalls konnte kein Unterschied in An- oder Abwesenheit des Cosubstrats NAD festgestellt werden.

Weitere Experimente mit dieser Messmethode sind somit notwendig. Hierbei muss herausgefunden werden, ob sich InhA für die Labeling-Prozedur und die thermophoretische Messung grundsätzlich eignet. Sollte dies verifiziert werden, böte die MST eine substratlose Alternative zum photometrischen InhA-Assay.

3 Design und Synthese der Substanzbibliothek

In diesem Kapitel wird zuerst auf die rechnergestützten Methoden eingegangen, die zur Unterstützung für die Optimierung der im Anschluss besprochenen synthetisierten Derivate der Thiazolidindione und Thiazolinone angewendet wurden. Zum Schluss wird ein Überblick über die gesamte Substanzbibliothek gegeben. Diese besteht aus den selbst synthetisierten Vertretern, den Verbindungen, die von Kooperationspartnern bezogen wurden sowie aus kommerziell erworbenen Substanzen.

3.1 Computerbasierte Methoden

3.1.1 Berechnung der Permeabilitäts-Wahrscheinlichkeit von Liganden für *M.tuberculosis*

Ein großes Problem bei der Suche nach neuen Wirkstoffen gegen das *Mycobacterium tuberculosis* ist die undurchlässige Zusammensetzung der mykobakteriellen Zellwand. *Merget et al.* entwickelten im Arbeitskreis von *Prof. Dr. C. Sotriffer* an der Universität Würzburg eine computergestützte Methode (*MycPermCheck*), um die Wahrscheinlichkeit der Permeabilität einer Struktur zu berechnen.^[107] Durch die Analyse von bekannten antimykobakteriell wirksamen Substanzen bis zu einer Molekülmasse von 500 g/mol konnten Grenzwerte verschiedener physikalisch-chemischer Deskriptoren festgesetzt werden, die es wiederum ermöglichen auf dieser Grundlage die Wahrscheinlichkeit der Permeabilität einer Substanz zu berechnen. Folgende Deskriptoren sind definiert.

- **FOSA:** Der dem Lösemittel zugängliche hydrophobe Teil der Oberfläche (gesättigte Kohlenwasserstoffe).
- **clogP:** Logarithmus des berechneten Wasser/Octanol-Verteilungskoeffizienten.
- **PISA:** Der dem Lösemittel zugängliche Teil der Oberfläche mit π -Wechselwirkung.
- **accptHB:** Anzahl der H-Brücken-Akzeptoren.
- **glob:** Quotient der generierten sphärischen Oberfläche zur Moleküloberfläche.

Im Folgenden sind die berechneten Deskriptoren sowie die Wahrscheinlichkeiten für die Permeabilität der selbst synthetisierten Vertreter der Substanzbibliothek (siehe Kapitel 3.2 und 3.3) sowie der Positivkontrollen Triclosan und PT04 (6PP) dargestellt (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Ergebnisse *MycPermCheck*.

Verbindung	Wahrscheinlichkeit p	FOSA	clogP	PISA	accptHB	glob
SV37	0.339	89.833	2.051	184.977	3	0.8968573

Verbindung	Wahrscheinlichkeit p	FOSA	clogP	PISA	acceptHB	glob
SV38	1.000	49.967	4.628	340.03	3	0.839359
SV39	1.000	49.969	4.548	340.728	3	0.8417258
SV40	0.927	317.621	4.671	190.641	3	0.812284
SV41	0.949	349.782	5.051	190.65	3	0.8032483
SV42	0.100	140.796	2.332	153.465	3	0.9213747
SV43	1.000	96.482	4.56	324.971	3	0.8510056
SV44	1.000	96.492	4.826	315.359	3	0.8445001
SV45	0.334	91.388	2.453	157.796	3	0.9010572
SV46	1.000	96.484	4.905	314.569	3	0.8421967
SV47	0.844	364.139	4.949	165.147	3	0.8150897
SV48	0.889	396.319	5.329	165.135	3	0.8057902
SV49	1.000	47.463	4.69	329.333	3	0.8366853
SV50	1.000	47.469	4.956	319.767	3	0.8306548
SV51	1.000	47.472	5.035	319.069	3	0.8283943
SV57	1.000	49.967	4.042	388.333	3	0.852456
SV58	1.000	96.485	4.319	362.876	3	0.8555445
SV59	1.000	47.465	4.45	367.368	3	0.840807
SV60	0.000	243.2745	1.418	0	3	0.92011655
SV62	0.823	198.962	3.412	209.4495	3	0.8574603
SV63	0.798	204.2045	3.683	171.452	3	0.84327345
SV65	0.829	199.033	3.9185	161.8465	3	0.84642335
SV66	0.853	198.974	3.997	161.141	3	0.8441813
SV67	0.006	466.6215	4.0415	11.736	3	0.8163329
SV68	0.010	499.6585	4.4365	11.7355	3	0.80413805
SV69	1.000	49.965	4.625	340.387	3	0.8396144
SV70	1.000	96.492	4.903	315.024	3	0.8423057
SV71	0.853	198.9675	3.995	161.486	3	0.8443985
SV75	1.000	49.964	4.283	350.341	3	0.8480914
SV77	1.000	83.60	4.4785	321.781	3	0.8566706
SV81	0.725	229.209	4.20775	137.749	3	0.8517424
SV91	1.000	47.485	5.033	319.405	3	0.8286225
SV94	0.980	302.937	4.8	210.238	2.5	0.812705
SV102	0.928	355.402	5.042	173.496	2.5	0.8191023
Triclosan	1.000	0.000	4.738	225.618	1.25	0.898

Verbindung	Wahrscheinlichkeit p	FOSA	clogP	PISA	acceptHB	glob
PT04 (6PP)	1.000	260.549	5.175	297.639	1.25	0.817

Die disubstituierten Thiazolidindion-Derivate zeigen mit $p \geq 0.8$ theoretisch eine große Wahrscheinlichkeit in das Mykobakterium zu gelangen, bei den *N*-3-monosubstituierten Vertretern (SV37, SV42, SV45, SV60, $p \leq 0.35$) ist dies eher unwahrscheinlich. Insbesondere die Einführung eines *sec*-Butyl-Rests an dieser Stelle in Kombination mit einem Alkylden-Rest an *C*-5 (SV67, SV68, $p \leq 0.01$) vermindert die Durchgängigkeits-Wahrscheinlichkeit erheblich. Einerseits ist aus den gezeigten Daten leicht zu entnehmen, dass sehr lipophile Substanzen ($\text{clogP} \geq 5$) mit hoher theoretischer Wahrscheinlichkeit permeabel sind. Bedenkt man die dicke, wachsartige Zellwand der Mykobakterien, die eine effektive Barriere für Antibiotika darstellt, ist dies nachvollziehbar. Mittlerweile werden in virtuelle Screening-Kampanien sogar Substanzen einbezogen, die einen clogP zwischen 5 und 6 aufweisen.^[108] Diese werden nach den Standard-Kriterien (*Lipinsky Rule of Five*, $\text{clogP} \leq 5$) normalerweise nicht als potenzielle Arzneistoffe in Betracht gezogen.^[109] Die Voraussetzung hoher Lipophilie bedingt andererseits die Schwierigkeiten der experimentellen Handhabung dieser Verbindungen. Bei den enzymatischen und zellbasierten Testverfahren ergeben sich Löslichkeitsprobleme im höheren mikromolaren Konzentrationsbereich. Zeigt eine der Verbindungen keine validen positiven Hemmeigenschaften mindestens im niederen mikromolaren Bereich, ist die Vermessung aussagekräftiger Verdünnungsreihen kritisch. Im etablierten enzymatischen InhA-Assay wurde versucht die schlechten Löseeigenschaften durch Zugabe von 5 % DMSO zu kompensieren. Die Puffer-Löslichkeit der getesteten Substanzen im Screening bei 20 μM konnte somit gewährleistet werden. Für Messungen im höheren mikromolaren Bereich müsste über den Zusatz von Lösungsvermittlern und Detergenzien wie zum Beispiel *Brij* nachgedacht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, das InhA-Puffersystem so puristisch als möglich zu halten, um etwaige Fehlinterpretationen basierend auf diesen Zusätzen zu vermeiden.

Trotz ihrer großen theoretischen Permeabilitäts-Wahrscheinlichkeit führten Verbindungen, die teilweise moderate Hemmung von InhA im enzymatischen Assay-Verfahren zeigten (SV75, SV47, SV50, SV66, SV102), zu keiner Wachstumshemmung von attenuierten Tuberkelbakterien (siehe Kapitel 4.3.1).

3.1.2 Docking-Experimente

Die Docking-Simulationen wurden im Rahmen des SFB630 von *Steffen Wagner* im Arbeitskreis von *Prof. Dr. C. Sotriffer* am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg durchgeführt. Es wurden die Programme *Glide (Schrödinger)* und *Autodock 3.0* verwendet. Ziel der *Docking*-Studien ist es, mögliche Bindemodi zu ermitteln auf deren Basis optimierte Hemmstoffe vorgeschlagen werden können.

Das katalytische Zentrum von InhA besteht aus den Aminosäuren Phe149, Tyr158 und Lys165. Über eine Wasserstoffbrückenbindung zur Carbonylfunktion des Substrats stabilisiert Tyr158 den Übergangszustand des Hydrid-Transfers. Die positiv geladene Anino-Gruppe von Lys165 interagiert durch eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Ribose-2'-Hydroxygruppe des Cosubstrats NADH/NAD⁺ und stabilisiert zusammen mit dem Dinukleotid-Binding-Loop der Aminosäuren Gly14 bis Ala22 das Cosubstrat in der Bindetasche.^[86,110]

Nachfolgend sind der Bindemodus von Triclosan im Komplex mit der InhA laut Röntgenstrukturanalyse sowie die *Docking*-Posen der Thiazolidindion-Derivate SV75, SV47 und des Thiazolinon-Deivats SV102 dargestellt. Die Liganden bzw. Inhibitoren sind alle blau, das Protein InhA grau und NAD⁺ in orange eingefärbt. Bei den oberen Darstellungsmethoden mit transparenter Oberfläche werden einige Seitenketten der Bindetasche als Sticks dargestellt. Die unteren reduzierten Darstellungen zeigen neben Ligand und Cofaktor die Seitenketten Phenylalanin149 (Phe149) und Tyrosin158 (Tyr158) der Bindetasche.

a) Positivkontrolle Triclosan

Triclosan bindet in Gegenwart von NAD⁺ unkompetitiv mit *rapid-reversible*-Charakteristik an InhA ($K_{iu} = 220 \text{ nM}$).^[103] Der aromatische Phenolring A interagiert hierbei über π - π -*stacking*-Wechselwirkungen mit dem Pyridin-Ring von NAD⁺. Die Hydroxyl-Gruppe bildet ebenso Wasserstoffbrückenbindungen mit Tyr158 vom InhA und mit der Ribose-2'-Hydroxygruppe von NAD⁺ aus (siehe Abbildung 38). Weiter Wechselwirkungen sind vorwiegend hydrophober Natur. Der Dichlorphenyl-Ring B liegt orthogonal zu Ring A und einer der Chlor-Reste zeigt in Richtung NAD⁺, während der andere dem Lösungsmittel ausgesetzt ist (*solvent exposed*). Die Einführung von Alkyl-Resten in Position 5 vom A-Ring an Stelle von Chlor sowie Entfernung der Chlor-Reste von Ring B führen zu stark verbesserten Hemmeigenschaften (5-Alkyl-Biphenylether-Derivate, z.B. Positivkontrolle 5-Hexyl-2-phenoxyphenol, 6PP, $K_{iu} = 9.4 \text{ nM}$).^[104] Abhängig vom eingeführten Alkyl-Rest können zusätzlich hydrophobe Wechselwirkungen mit Phe149 und Tyr158 beobachtet werden. Dies führt zu *tight-binding* Inhibitoren mit *rapid-reversible*-Charakteristik. Durch

Einführen eines Methyl-Substituenten an C-2' des B-Rings kommt es zu hydrophoben Wechselwirkungen mit Ala198, Ile202, Val203 und Met199, die als Bestandteil des *Substrate-Binding-Loops* (α -Helix aus den Aminosäuren-Reste 195-210) zur räumlichen Umlagerung dieser Helix führen (*loop-ordering*). Diese Helix versperrt nun den Eingang zum aktiven Zentrum. Hemmstoffe von InhA, die zu diesem *Loop-ordering* führen, zeigen eine *slow onset* und *tight-binding* Charakteristik (z.B. 2-(o-Tolyloxy)-5-hexylphenol, PT70, $K_i = 22 \text{ pM}$).^[74,111]

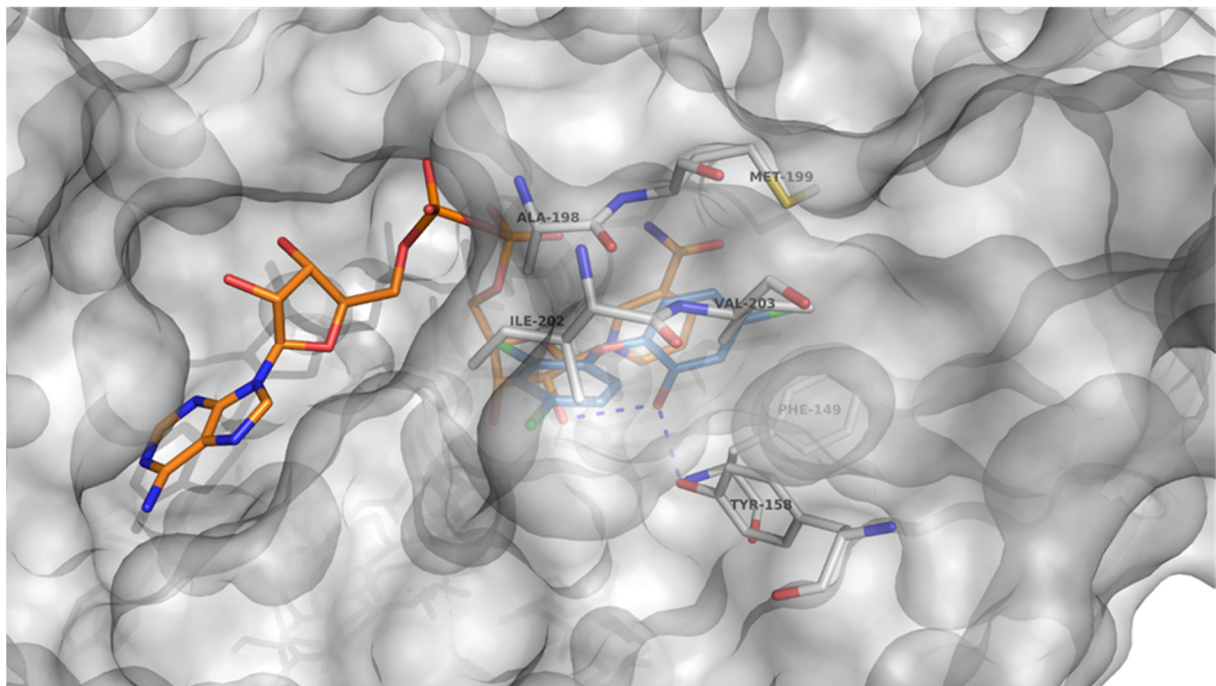
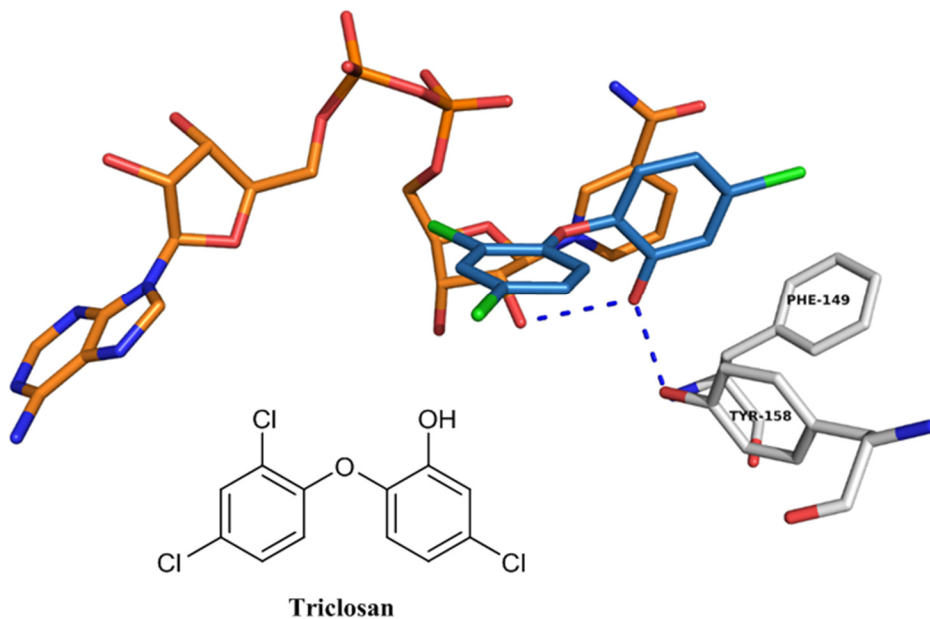


Abbildung 38: Bindemodus von Triclosan an InhA laut Röntgenstruktur pdb2B35 *aligned to* pdb2X23.

b) (Z)-3-Benzyl-5-(4-fluorbenzyliden)-thiazolidin-2,4-dion (SV75)

Bisher gibt es keine Co-Kristallstrukturen von Thiazolidindion-Derivaten und InhA. Den *Docking*-Simulationen zu Folge nimmt man ein ähnliches Bindungsverhalten wie bei den Diphenylether-Derivaten an. Die Carbonyl-Funktion an Position 2 des Fünfrings bildet demnach Wasserstoffbrückenbindungen mit Tyr158 und der Ribose-2'-Hydroxygruppe des Cosubstrats NAD⁺ (siehe Abbildung 39). Die C-4-Carbonyl-Funktion zeigt keine Wechselwirkungen mit InhA. Eine π - π -*stacking*-Wechselwirkungen des Thiazolidindion-Rings mit dem Nicotinamid-Ring von NAD⁺ ist denkbar. Ähnlich der räumlichen Anordnung von Triclosan stehen der Fünfring und der *N*-Benzyl-Rest ungefähr orthogonal zueinander. Zusätzlich nimmt man an, dass es zu hydrophoben Wechselwirkungen des *N*-Benzyl-Rests mit den Aminosäuren-Resten Ala198, Ile202, Val203 und Met199 des *Substrate-Binding-Loops* und durch den *p*-Fluor-Benzyliden-Rest an Position 4 des Thiazolidindion-Rings mit Phe149 und Tyr158 kommt.

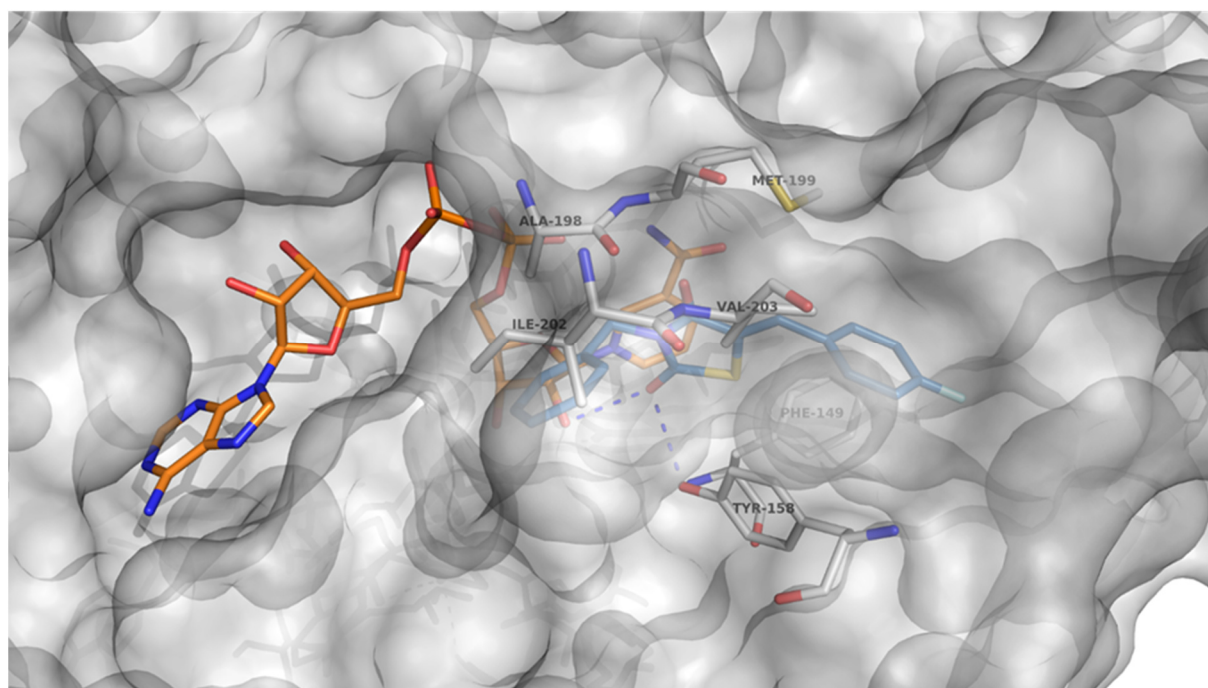
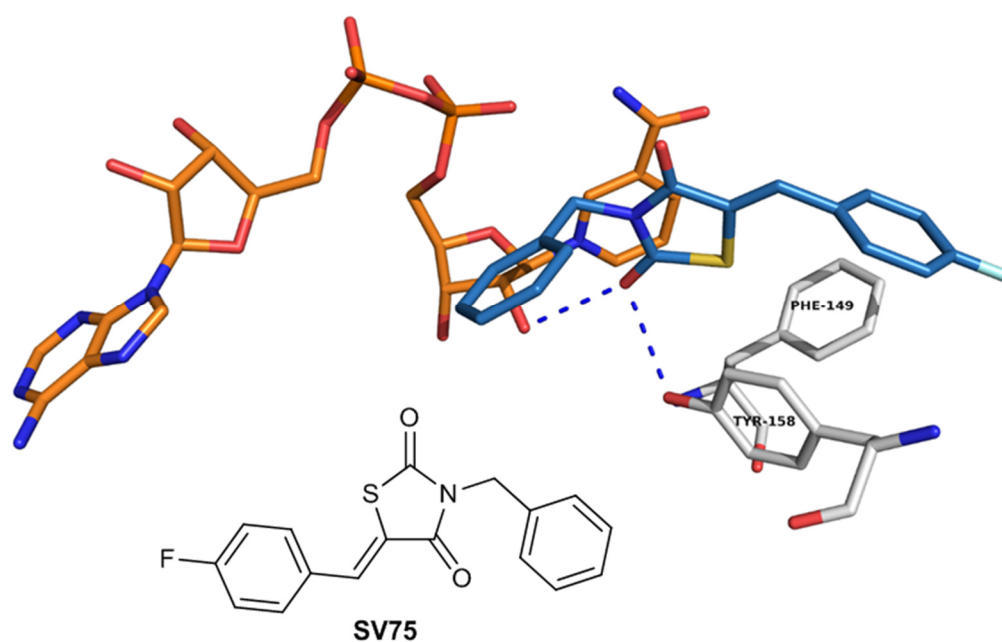


Abbildung 39: Postulierter Bindemodus von SV75 an InhA. Für das Docking wurde *Glide* und *Autodock 3.0* verwendet (pdb-Struktur 2X23).

c) (Z)-5-Heptyliden-3-(2-methylbenzyl)-thiazolidin-2,4-dion (SV47)

In Anlehnung an die 5-Alkyl-Biphenylther-Derivate wurde versucht durch die Einführung eines Heptyliden-Rests an Position 5 die hydrophoben Wechselwirkungen mit Phe149 und Tyr158 zu verbessern (siehe Abbildung 40). Die Einführung einer Methyl-Gruppe in *ortho*-Position des *N*-Benzyl-Rests sollte die hydrophoben Wechselwirkungen mit den Aminosäuren

des *Substrate-Binding-Loops* verbessern. Beim InhA-Screening dieser Derivate zeigte sich allerdings keine signifikante Verbesserung der Hemmeigenschaften gegenüber den potentesten Thiazolidindionen mit einem Benzyliden-Substituenten (siehe Kapitel 4.1.1.c)).

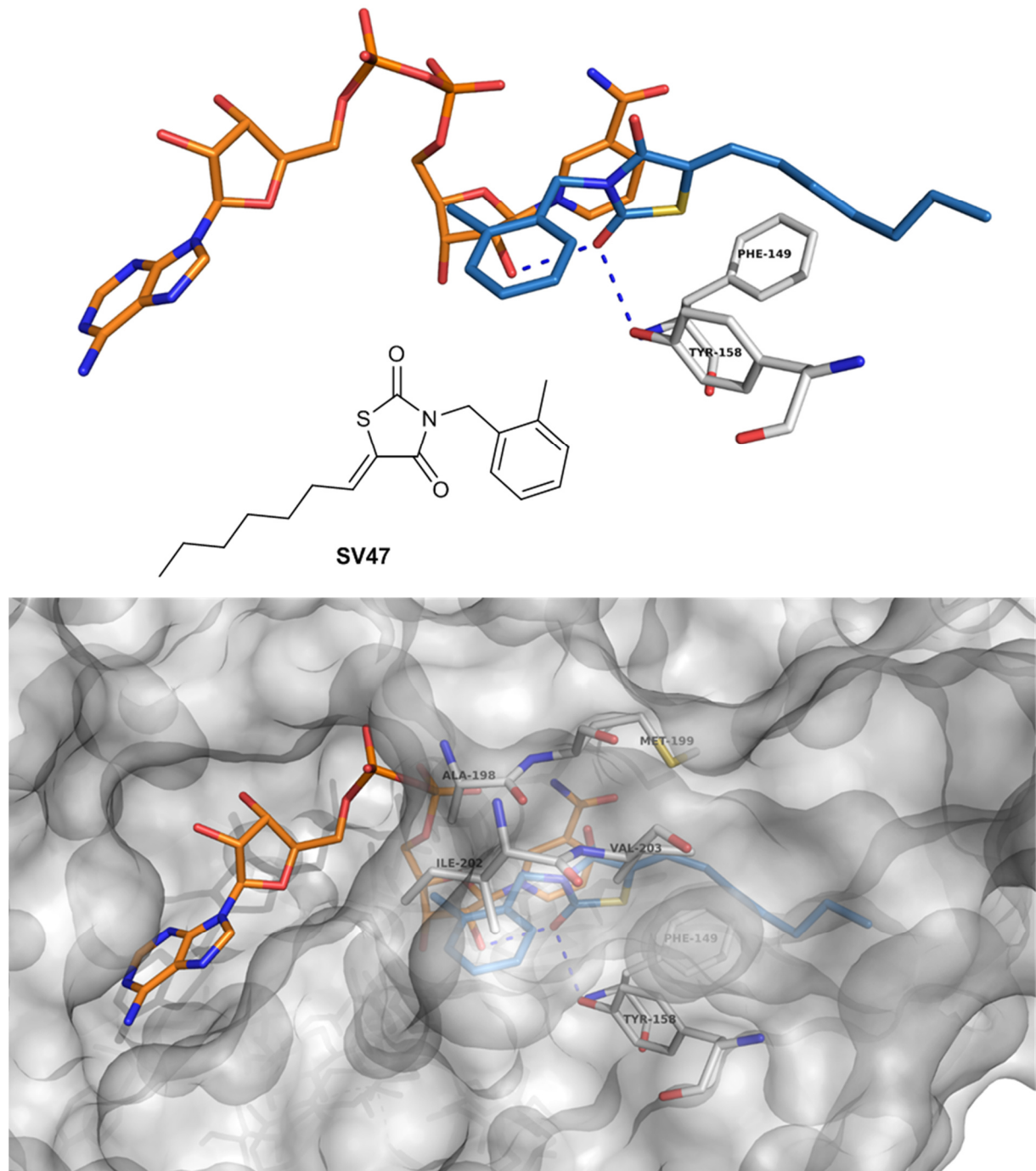


Abbildung 40: Postulierter Bindemodus von SV47 an InhA. Für das Docking wurde *Glide* und *Autodock 3.0* verwendet (pdb-Struktur 2X23).

d) 5-Hexyl-3-(2-methylbenzyl)-thiazol-2(3H)-on (SV102)

Wie bei der Beschreibung der Docking-Simulation von SV75 angeführt, zeigt die C-4-Carbonyl-Funktion keine Wechselwirkungen mit InhA. Vielmehr scheint sie sich störend für Wechselwirkungen mit den hydrophoben Aminosäuren des *Substrate-Binding-Loops* auszuwirken. Einem Thiazolinon-Ring fehlt eben diese Carbonyl-Gruppe. Zusätzlich sollte durch die erhöhte Planarität des Heterozyklus‘ die π - π -*stacking*-Wechselwirkungen mit dem Nicotinamid-Ring von NAD⁺ vergrößert werden. Ebenso wird die Nucleophilie des an Position 2 des Fünfrings verbleibenden Carbonylsauerstoffs erhöht, was wiederum in einer Verbesserung der Wasserstoffbrückenbindungen mit Tyr158 und der Ribose-2‘-Hydroxygruppe von NAD⁺ führen sollte (siehe Abbildung 41). Die hydrophoben Wechselwirkungen des 5-Hexyl- und des *o*-Methylbenzyl-Substituenten sind analog der bereits beschriebenen Thiazolidindione. Leider zeigte sich durch diese Abwandlungen ebenfalls keine Verbesserung der Hemmeigenschaft gegenüber InhA im Screening (siehe Kapitel 4.1.2).

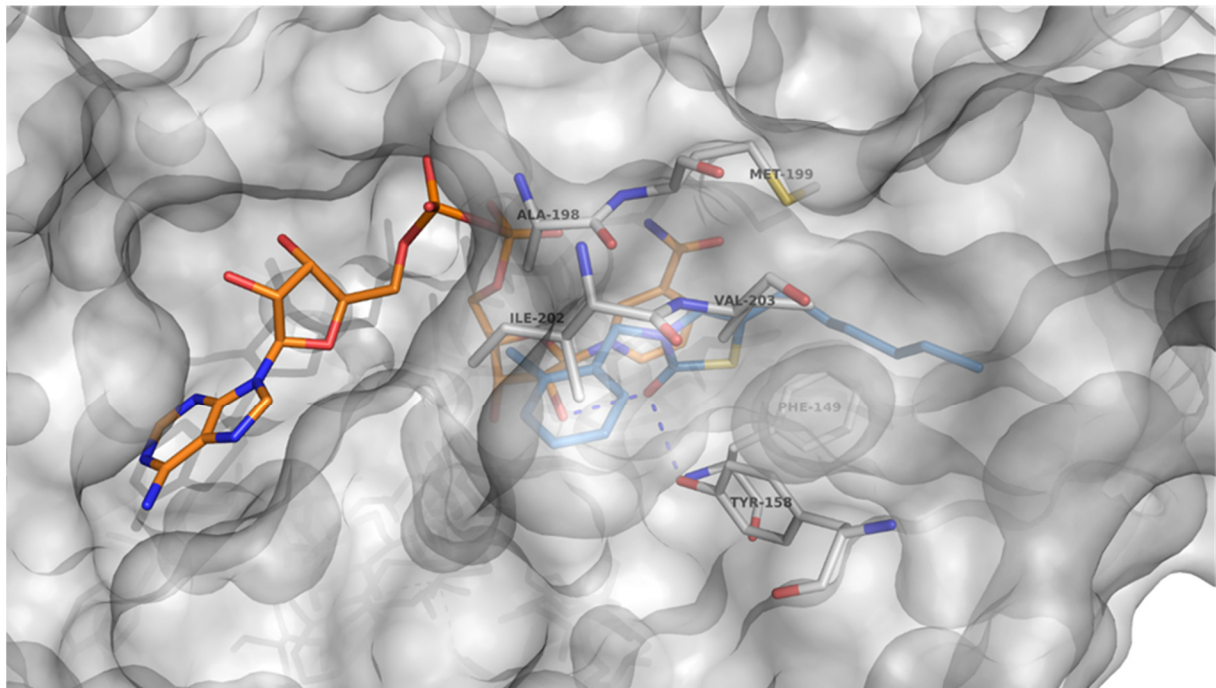
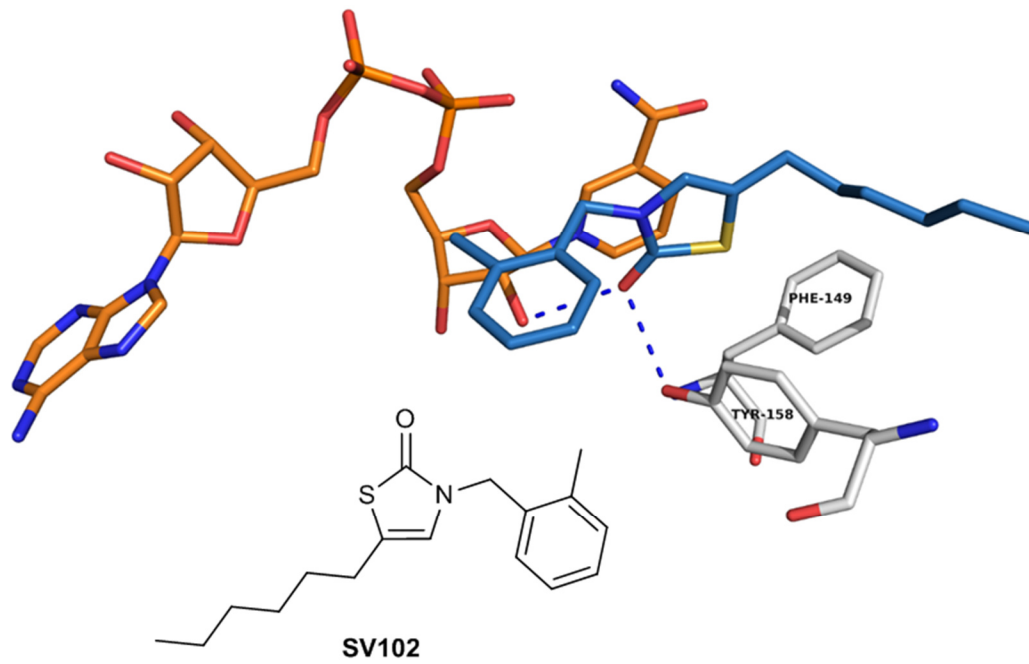


Abbildung 41: Postulierter Bindemodus von SV102 an InhA. Für das Docking wurde *Glide* und *Autodock 3.0* verwendet (pdb-Struktur 2X23).

Mit einer starken Base sollte es also möglich sein das Thiazolidindion zu deprotonieren, um die Nucleophilie wieder zu erhöhen. In der Literatur ist die Verwendung von NaH (pks ca. 35, 1.0 Äq.) oder K_2CO_3 (pks ca. 10.5, 3.0 Äq.) als nicht nucleophile Basen beschrieben.^[113,114] Letztere bietet neben milderer Reaktionsbedingungen den Vorteil leichter handhabbar zu sein.

Durch den Einsatz eines Überschusses an K_2CO_3 (3 Äq.) wird das Gleichgewicht noch weiter zu Gunsten der deprotonierten Form verschoben, die unmittelbar mit dem Alkylhalogenid abreagieren kann. Zudem ist K_2CO_3 eine zu schwache Base, um die *CH*-azide Position 5 des Thiazolidindion-Rings ausreichend deprotonieren zu können. Eine mögliche, aber unerwünschte Alkylierung an dieser Stelle wird somit verhindert. Da die Ausbeuten an 3-substituierten Thiazolidindionen zufriedenstellend waren (siehe Abb. 44), wurde die Verwendung der schwachen Base K_2CO_3 bevorzugt.

In dieser Arbeit wurden als elektrophile Reaktanden für die nucleophile Substitution hauptsächlich Benzylbromide oder verzweigt-kettige Alkylbromide verwendet. Benzylbromide liegen nach Bromidabspaltung als stabile Benzylkationen vor und sollten daher bevorzugt nach einem S_N1 -Mechanismus reagieren. Die verzweigt-kettigen Alkylbromide können sowohl nach einem S_N1 - als auch S_N2 -Mechanismus reagieren. Durch die Verwendung eines polaren aprotischen Lösungsmittels wie DMF und die damit einhergehende fehlende Solvataion von Anionen wird allerdings ein Mechanismus via S_N2 begünstigt.^[115,116] Auf diese Weise wurden vier *N*-3-substituierte Thiazolidindionderivate synthetisiert (siehe Abbildung 44).

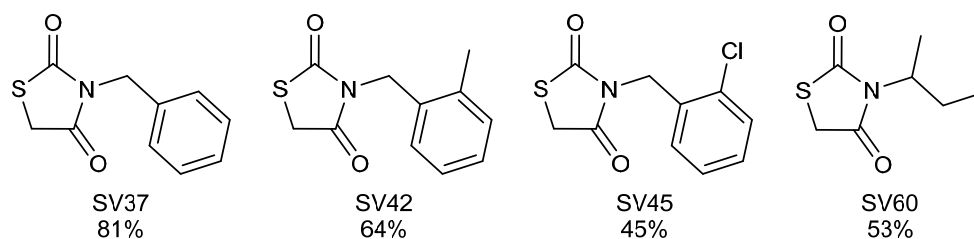


Abbildung 44: Übersicht der Strukturen und Ausbeuten der synthetisierten *N*-3-substituierten Thiazolidin-2,4-dion-Derivate.

3.2.2 Einführung von Substituenten am C-5-Atom (Schritt B)

Als nächstes soll die Einführung von Substituenten R_2 am C-5-Atom des Fünfrings näher betrachtet werden. Neben Alkyliden- und Benzylidenresten (**II**) sollten auch Reste ohne Doppelbindung (**III**) eingeführt werden (siehe Kapitel 8.2.2 und 8.2.3). Ersteres gelang durch Reaktion eines Aldehyds mit dem entsprechenden *N*-3-substituierten Thiazolidindion (**I**) unter organischer Basenkatalyse im Sinne einer *Knoevenagel*-Reaktion. Das Anbringen eines Alkylrests ohne Doppelbindung erfolgte auf zwei verschiedenen Syntheserouten. Neben der Möglichkeit einer katalytischen Hydrierung eines 5-Alkyliden- bzw. 5-Benzylidenthiazolidindionderivats (Syntheseroute a)) konnte durch nucleophile Substitution mit einem entsprechenden Alkylhalogenid (Syntheseroute b)) der gewünschte Substituent eingeführt werden. Die Abbildung 45 zeigt eine Übersicht der genannten Syntheserouten, die im Folgenden näher besprochen werden.

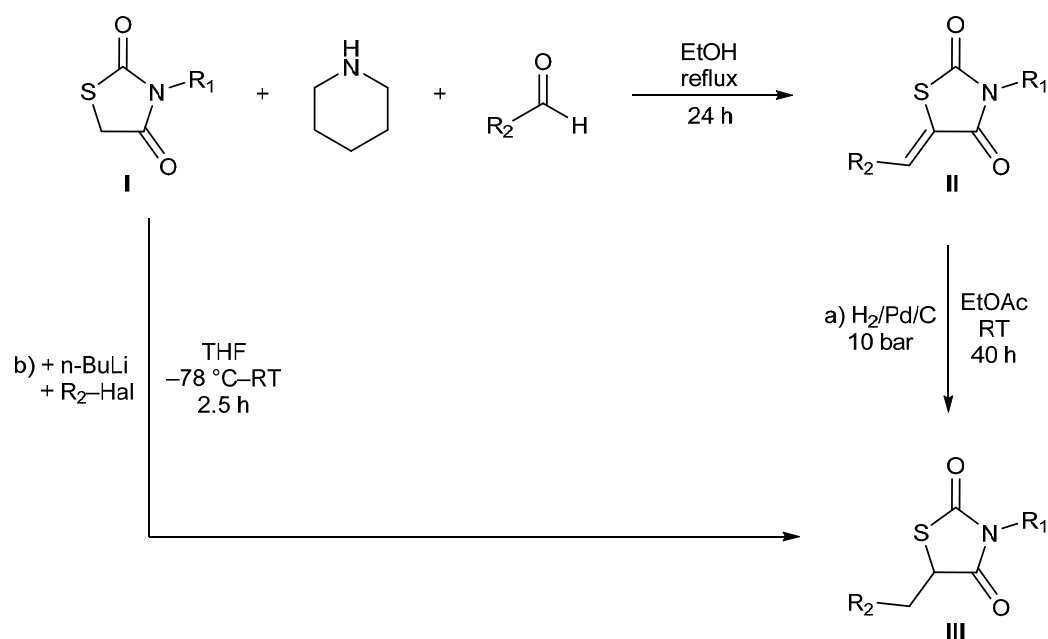


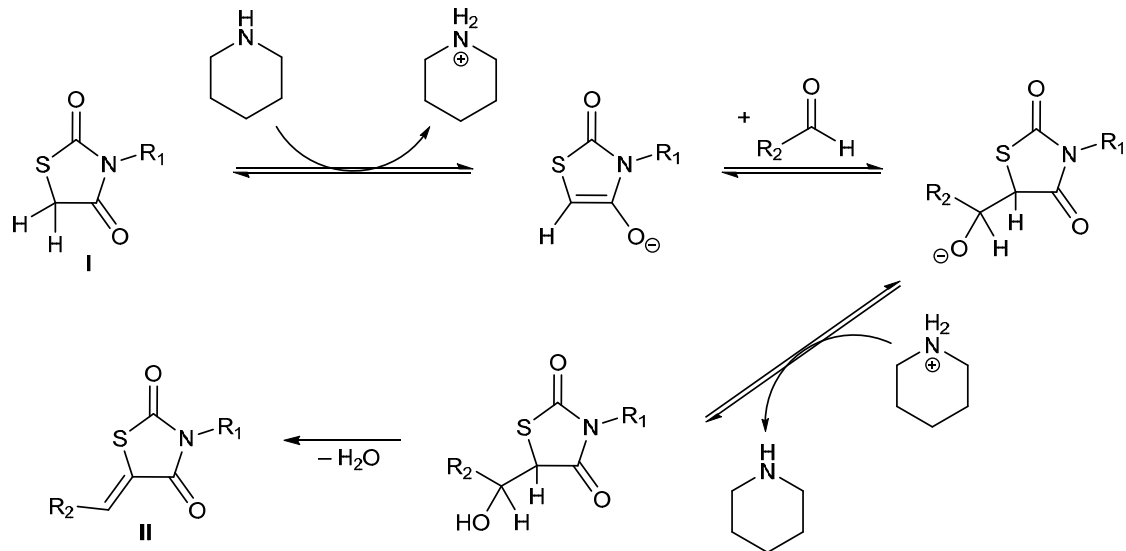
Abbildung 45: Übersicht der Syntheserouten für 3,5-disubstituierte Thiazolidindionderivate. (**I**): *N*-3-substituiertes Thiazolidindion, (**II**): 5-Alkyliden- bzw. Benzylidenderivat, (**III**): 5-Alkyl- bzw. Benzylderivat.

a) C-5-Alkylidenylierung bzw. Benzylidenylierung im Sinne einer Knoevenagel-Reaktion

Die C-5-Substitution unter Einführung einer exozyklischen Doppelbindung erfolgte im Sinne einer *Knoevenagel*-Reaktion.^[117] Hierunter versteht man allgemein die Kondensation von Aldehyden oder Ketonen mit der Enolform einer Carbonylverbindung unter basischer Katalyse. In dieser Arbeit dienten die *N*-3-substituierten Thiazolidin-2,4-dionderivate (**I**) als

CH-acide Methylene Komponente (1.0 Äq.), entsprechende Derivate aliphatischer Aldehyde oder des Benzaldehyds als Aldehydkomponente (1.1 Äq) und Piperidin (0.7 Äq.) als organischer Basenkatalysator (siehe Kapitel 8.2.2).^[114] In Abbildung 46 sind zwei denkbare Reaktionsmechanismen dargestellt.

Mechanismus A



Mechanismus B

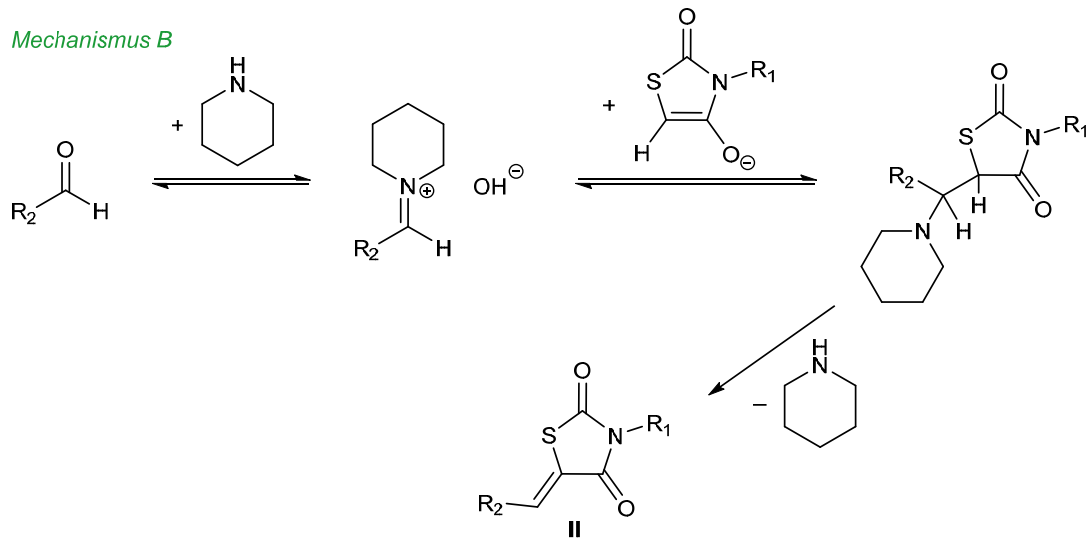


Abbildung 46: Diskutierte Reaktionsmechanismen der *Knoevenagel*-Reaktion.

Mechanismus A sieht im ersten Schritt die Abstraktion eines Protons der CH-aciden Thiazolidindionkomponente durch das als Piperidin vor. Das gebildete Anion addiert anschließend an die Carbonylverbindung und unter Wasserabspaltung entsteht die α, β-ungesättigte Carbonylverbindung bzw. durch die eingeführte exozyklische Doppelbindung an Position C-5 ein Fünfringheterozyklus (**II**), der im Sinne der *Hückel*-Regel formal einen gewissen aromatischen Charakter aufweist.

Der erste Schritt von **Mechanismus B** ist die Bildung eines Iminium-Salzes gefolgt von der Reaktion mit der *CH*-aziden Komponente. Dieser Mechanismus macht auch die sehr gute Eignung der organischen Base Piperidin als Katalysator verständlich. In der Literatur werden beide Mechanismen als denkbar diskutiert.^[118,119,120] Der aus thermodynamischer Sicht bei der Aromatisierung des Heterozyklus durch die Eliminierung von H₂O bzw. Piperidin im letzten Schritt der Reaktion resultierende energetische Gewinn bildet letztlich die Triebkraft der Reaktion. Wahrscheinlich verläuft dieser Eliminierungsschritt über einen E1cB-Mechanismus. Dafür spricht neben den strukturellen Voraussetzungen für ein mesomeriestabilisiertes Carbanion auch die Wahl des polar protischen Lösemittels Ethanol, welches in der Lage ist das Anion gut zu solvatisieren. Ethanol ist indes nicht in der Lage die stark lipophilen Endprodukte zu solvatisieren, was zu deren selektiver Präzipitation und einer Verschiebung des Gleichgewichts zur Produktseite führt und außerdem die anschließenden Aufreinigungsschritte vereinfacht. Auf diese Weise konnten 26 Derivate mit folgenden Ausbeuten synthetisiert werden (siehe Abbildung 47 bis 50).

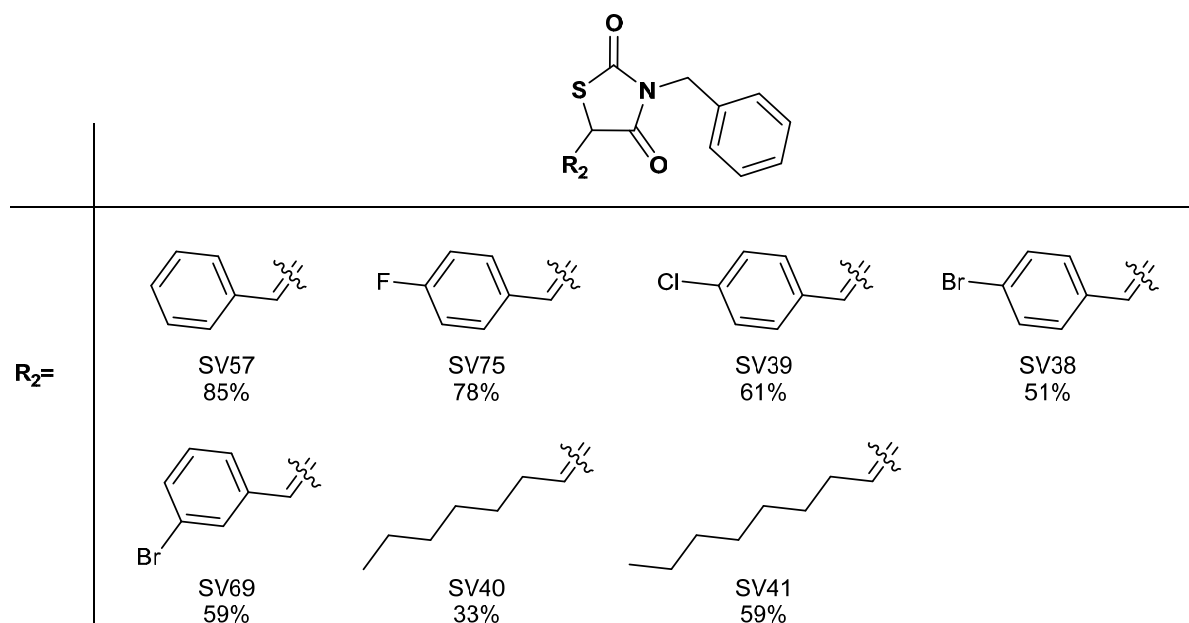


Abbildung 47: Übersicht der Strukturen und Ausbeuten der synthetisierten disubstituierten Thiazolidindione mit *N*-Benzyl-Rest.

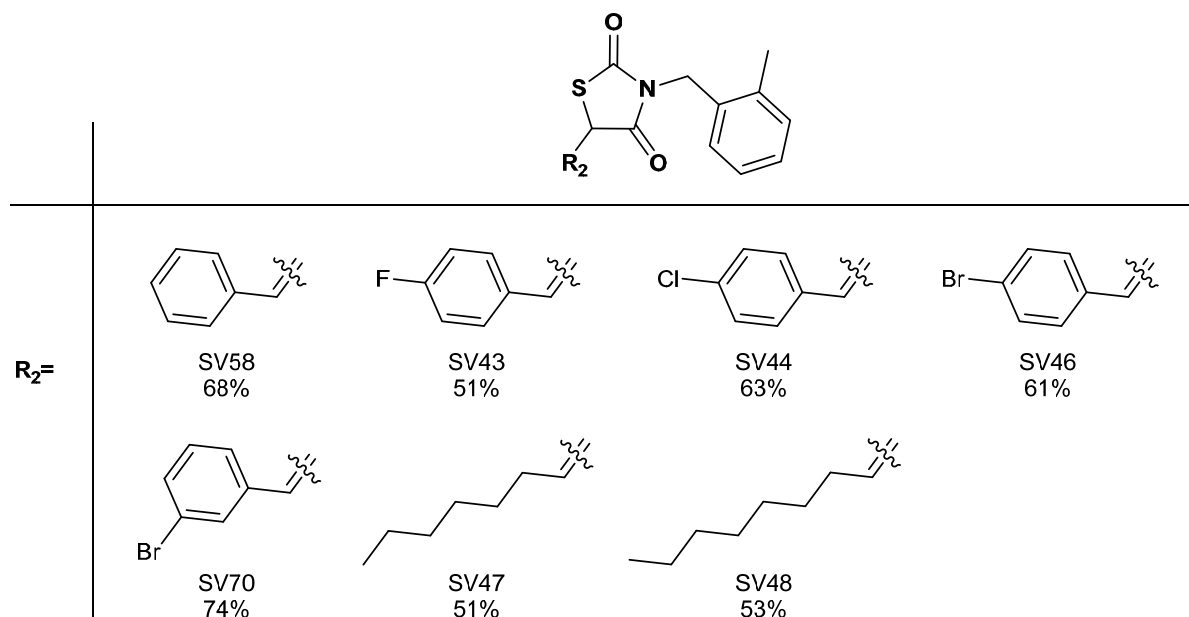


Abbildung 48: Übersicht der Strukturen und Ausbeuten der synthetisierten disubstituierten Thiazolidindione mit N-2-Methylbenzyl-Rest.

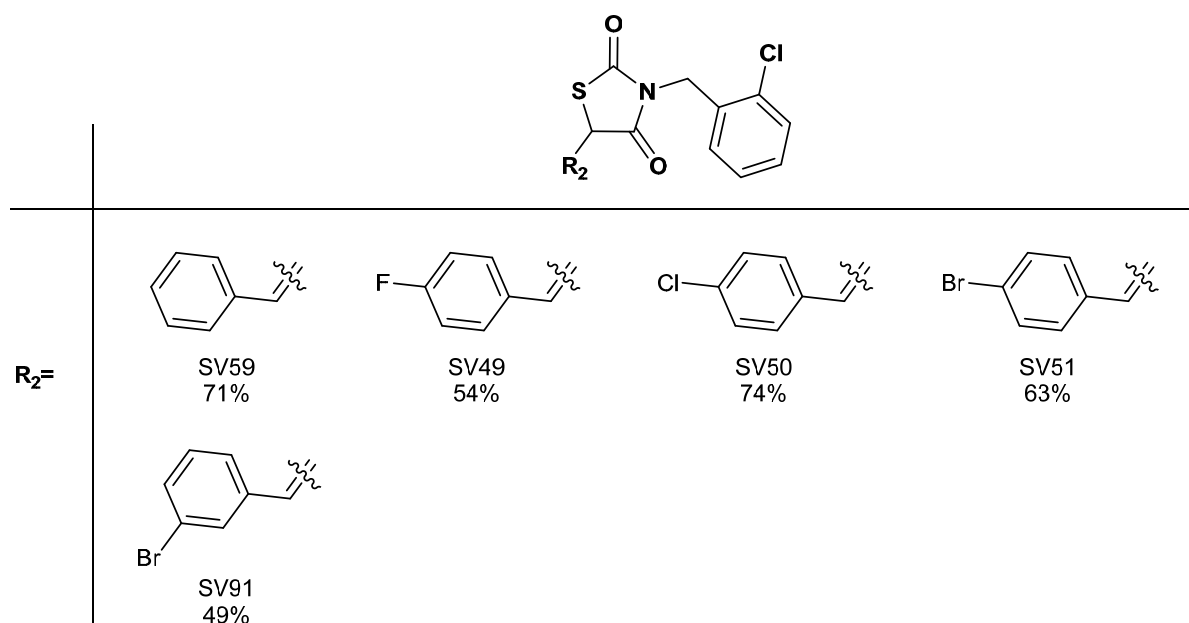


Abbildung 49: Übersicht der Strukturen und Ausbeuten der synthetisierten disubstituierten Thiazolidindione mit N-2-Chlorbenzyl-Rest.

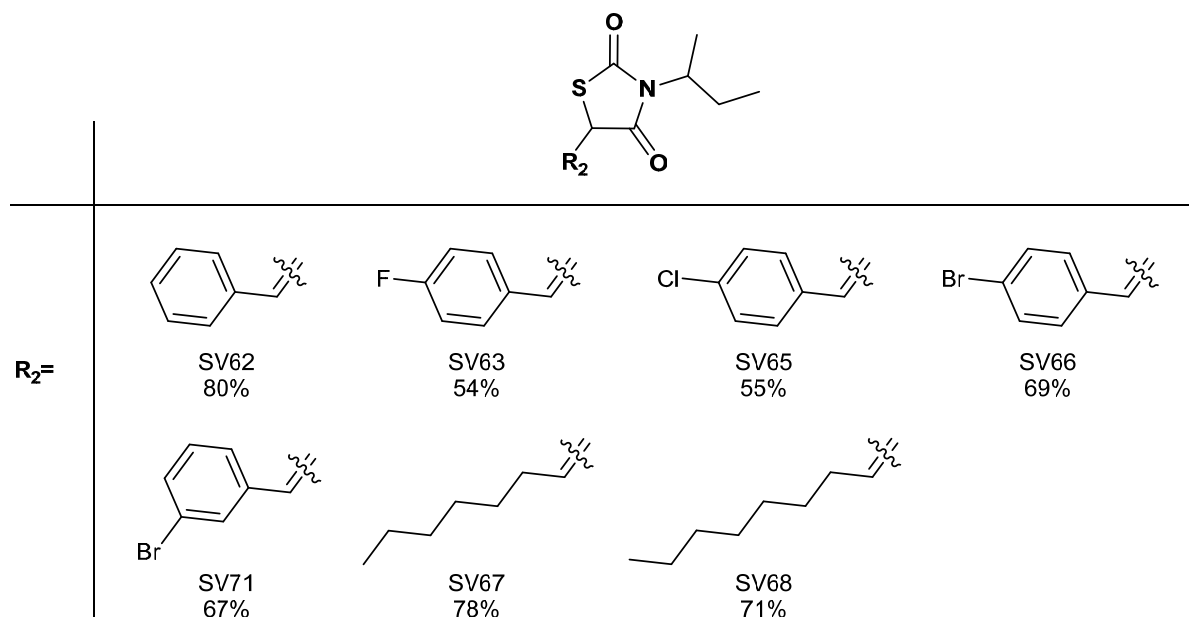


Abbildung 50: Übersicht der Strukturen und Ausbeuten der synthetisierten disubstituierten Thiazolidindione mit *N-sec*-Butyl-Rest.

b) C-5-Substituenten ohne exozyklische Doppelbindung

Hierbei handelt es sich um Verbindungen ohne exozyklische Doppelbindung (**III**). Diese Vertreter konnten auf zwei verschiedenen Syntheserouten a) und b) (siehe Kapitel 8.2.3) synthetisiert werden, die im Folgenden vergleichend betrachtet und diskutiert werden sollen. In Abbildung 51 sind als Beispiel beide Reaktionswege für SV77 dargestellt.

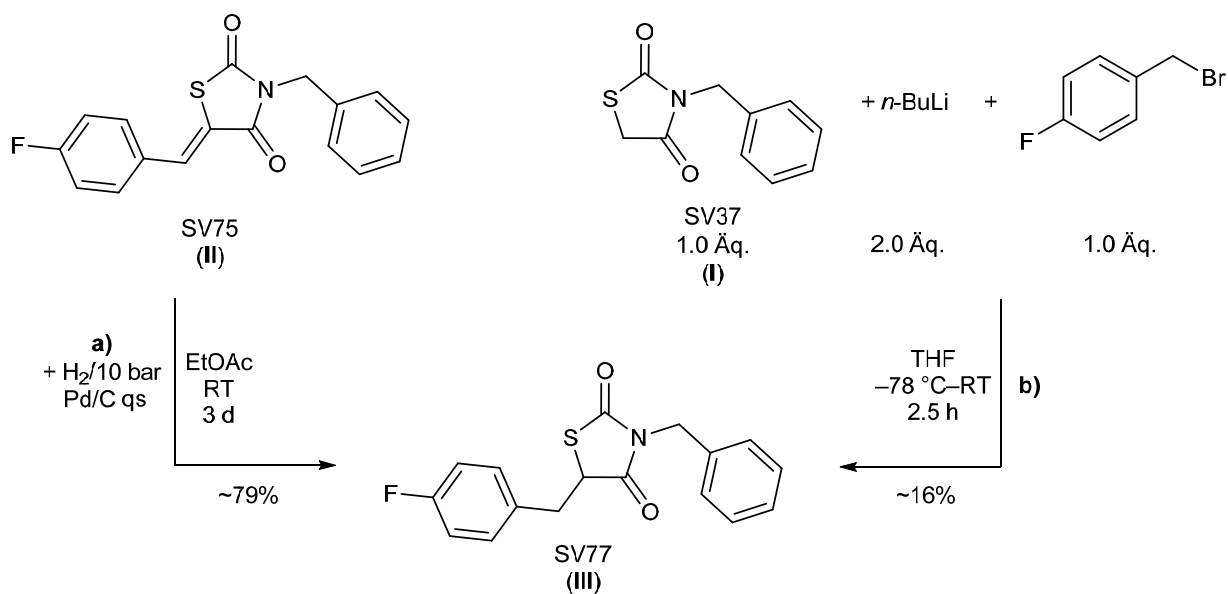


Abbildung 51: Syntheserouten a) und b) von SV77 im Vergleich.

Bei **Syntheseroute a)** wurde eine katalytische Hydrierung von C-5-Alkyliden- bzw. Benzyliden-Derivaten (**II**) mit Palladium/Kohle als Katalysator in Ethylacetat im Autoklaven durchgeführt.^[121] Hierbei müssen die Reaktionsbedingungen so gewählt werden, dass es einerseits zu einer selektiven Hydrierung der exozyklischen Doppelbindung unter Aufhebung des aromatischen Charakters des Heterozyklus‘ kommt, aber andererseits die Hydrierung der Carbonylgruppen oder die mögliche Abspaltung von *N*-Benzylresten verhindert wird. Es wurde daher mit sehr milden Bedingungen bei Raumtemperatur und Atmosphärendruck begonnen und der H₂-Druck allmählich angepasst. Reaktionskontrollen erfolgten mittels DC und ¹H-NMR-Spektroskopie. Dadurch wurde verfolgt, wie weit die Reaktion fortgeschritten war und überprüft bzw. sichergestellt, dass es weder zu einer Reaktion der Carbonylgruppen noch zu einer Abspaltung (sofern vorhanden) von *N*-Benzylresten kam. Daraus ergaben sich optimale Reaktionsbedingungen bei Raumtemperatur und einem Druck von zehn bar. Außerdem konnte eine Katalysatorvergiftung durch die als Edukt eingesetzten Thiazolidindion-Derivate beobachtet werden. Durch Zugabe von frischem Palladium/Kohle (10% m/m) ca. alle 24 Stunden und einer verlängerten Reaktionsdauer von ungefähr drei Tagen wurde dieses Problem gelöst. Diese Methode stellt somit eine gute Möglichkeit dar, bei fast quantitativem Umsatz (Ausbeute SV77: 79 %) die exozyklische Doppelbindung selektiv zu hydrieren.

Die C-5-Alkylierung bzw. Benzylierung (**Syntheseroute b**) erfolgte durch Deprotonierung an C-5 von an *N*-3-substituierten Thiazolidindionderivaten (**I**, 1.0 Äq.) mit *n*-BuLi (2.0 Äq.) und anschließende nucleophile Substitution durch das entsprechende Alkyl- bzw. Benzylbromid (1.0 Äq.) in absolutiertem THF.^[122] Hierbei gilt es die Reaktionsbedingungen, Temperaturen und Zeitabstände genau einzuhalten, da ansonsten kein Erfolg dieser Reaktion gewährleistet ist. So konnte trotz exakter Reaktionsführung wegen zahlreich ablaufender Nebenreaktionen nach säulenchromatographischer Aufreinigung nur eine sehr kleine Menge an Produkt isoliert werden (Ausbeute SV77: 16 %). Der Versuch die Reaktionsbedingungen durch den Einsatz von schwächeren Basen (Natriumhydrid, K₂CO₃) abzumildern, schlug fehl.^[123]

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die katalytische Hydrierungsreaktion (Syntheseroute a)), trotz eines weiteren erforderlichen Syntheseschrittes, die Methode der Wahl zur Darstellung von Thiazolidindionen ohne exozyklische Doppelbindung ist. Der zufriedenstellende Reaktionsverlauf machte ebenso den Einsatz von selektiven Hydrierungsreagenzien wie LiBH₄ überflüssig.^[124,125] Nachfolgend sind die synthetisierten Vertreter und deren Ausbeuten angegeben (siehe Abbildung 52).

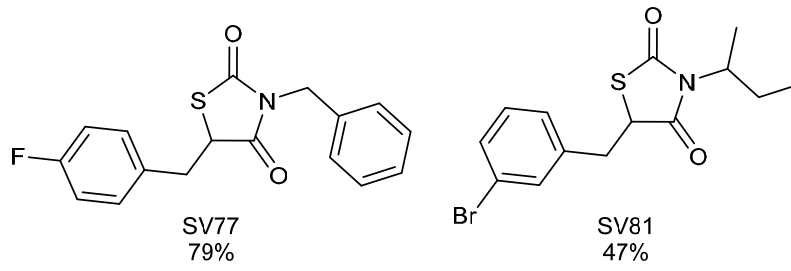


Abbildung 52: Übersicht der synthetisierten Thiazolidindion-Derivate ohne exozyklische Doppelbindung.

3.2.3 Überlegungen zur Stereoselektivität der *Knoevenagel*-Reaktion

Der letzte Eliminierungsschritt bei der Synthese disubstituierter Thiazolidindione mit exozyklischer Doppelbindung (siehe Kapitel 3.2.2.a)) legt ebenso die Stereochemie des Endprodukts fest. Theoretisch können bei dieser Reaktion *E* und *Z*-Diastereomere erhalten werden. Um die genauen stereochemischen Verhältnisse aufzuklären, wurde zunächst durch LC-MS-Analytik geklärt, ob ein Diastereomergemisch vorliegt. Anschließend wurde mit Hilfe von geeigneten NMR-Experimenten die Konfiguration des Isomers ermittelt. Abschließend wurden die erhaltenen Ergebnisse durch theoretische Überlegungen belegt. Im Folgenden ist dieses Vorgehen exemplarisch an Hand der Verbindung SV71 beschrieben (siehe Abbildung 53).

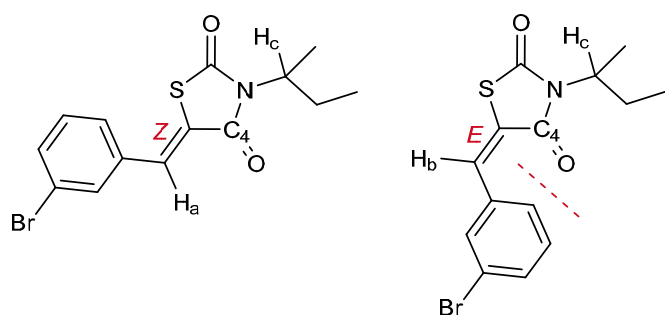


Abbildung 53: Die beiden möglichen *E/Z*-Diastereomere von SV71 im Vergleich.

a) *Abklärung des Vorhandenseins eines Diastereomergemisches mittels LC-MS*

Im Zuge der LC-MS-Analytik zur Feststellung der Reinheit (siehe Kapitel 8) der Produkte konnte das Verhältnis von *E* zu *Z*-Isomeren ermittelt werden. In Abbildung 54 sind das UV-Chromatogramm bei 272–288 nm und die zugehörigen ESI-Massenspektren der einzelnen Peaks von SV71 nach HPLC-Auftrennung dargestellt. Bei einer Retentionszeit von $R_t = 16.9$ min (Peak 3) findet man für SV71 die Massen $[M+H] = 340.1$ und $[M+Na] = 362.0$ (berechnet: 338.99). Durch Flächenvergleich der Signale ergibt sich eine Reinheit von 99.0 %. Anhand der Masse lässt sich feststellen, dass es sich bei Peak 1 (0.1 %) und Peak 2 (0.9 %) nicht um SV71 handelt. Somit ist bewiesen, dass keineswegs ein Diastereomergemisch, sondern ausschließlich ein Isomer vorliegt.

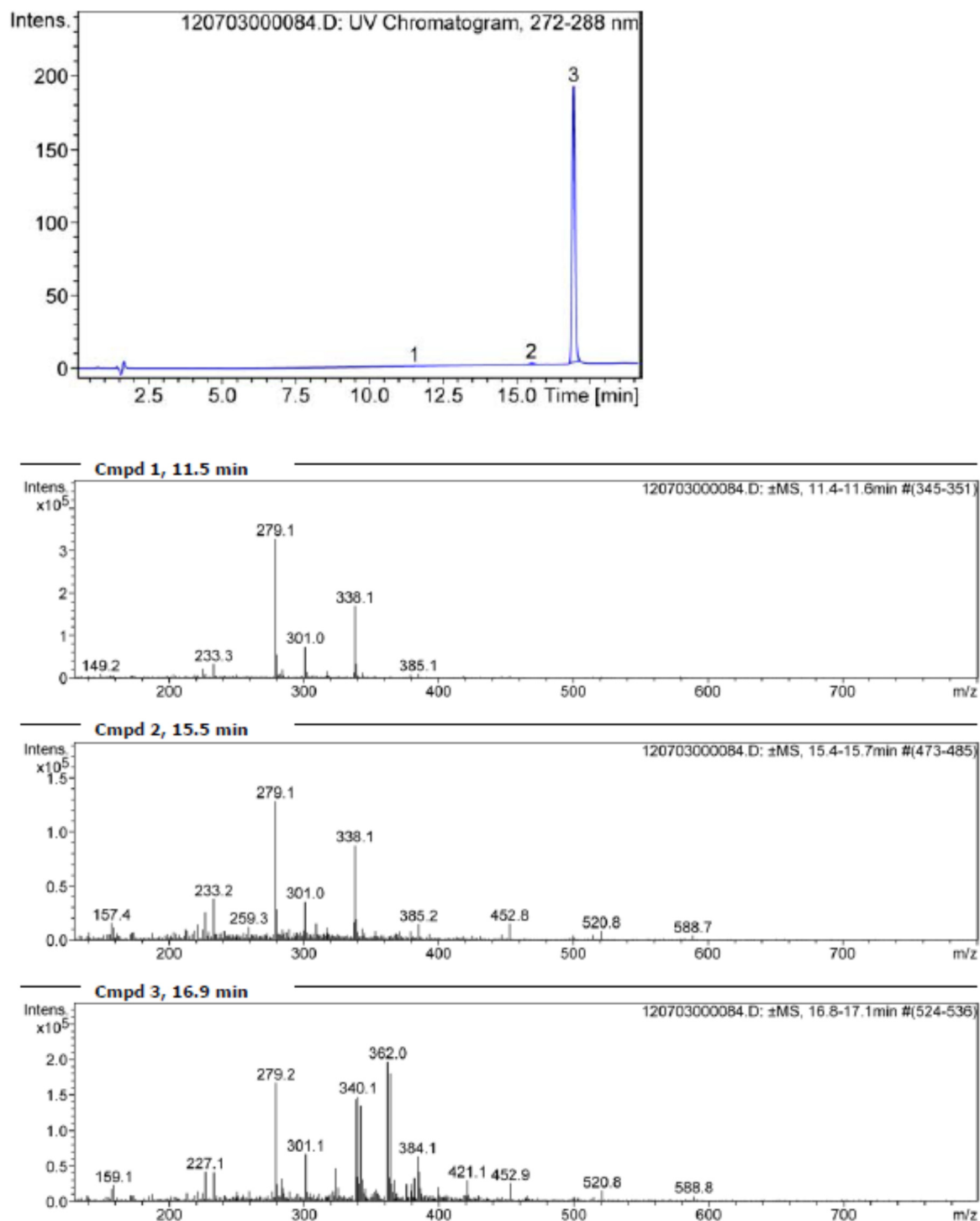


Abbildung 54: UV-Chromatogramm und zugehörige Massenspektren der LC-MS-Analytik von SV71.

b) NMR Gated-Decoupling-Experimente zur Aufklärung der Konfiguration

Die Frage, um welches der beiden möglichen Diastereomere es sich nun handelt, wurde durch kernresonanzspektroskopische Experimente beantwortet. Hierzu wurden Spektren nach dem *Gated-Decoupling*-Verfahren aufgenommen. Ein *Gated-Decoupling*-Experiment ist ein

spezielles Impuls-Experiment, mit dem man ^{13}C -NMR-Spektren mit C,H-Kopplungen messen kann, ohne auf den Intensitätsgewinn durch den *Nuclear Overhauser Effekt* (NOE) verzichten zu müssen. Dies bedeutet eine erhebliche Einsparung an Messzeit gegenüber einem gekoppelten ^{13}C -Spektrum (nicht ^1H -Breitband-entkoppelt). In Abbildung 55 ist das Messverfahren schematisch dargestellt. Zu Beginn ist der Breitbandentkoppler (BB) im ^1H -Kanal eingeschaltet, wodurch sich durch den NOE Besetzungsverhältnisse aufbauen, die eine Intensitätszunahme der Signale bewirken. Vor der Impulsgabe und Datenaufnahme wird der BB-Entkoppler ausgeschaltet. Dies bewirkt, dass die indirekte Spin-Spin-Kopplung wieder vorhanden ist, wohingegen sich die Gleichgewichte der Besetzungszahlen nur langsam einstellen. Die Relaxationszeit T_1 ist die Zeit, die zur Rückkehr in den Gleichgewichtszustand erforderlich ist. Da die Relaxationszeiten T_1 länger sind als die zur Datenaufnahme erforderliche Zeit, erhält man ein ^{13}C -NMR-Spektrum mit C,H-Kopplungen und Signalverstärkung durch den NOE.^[126,127]

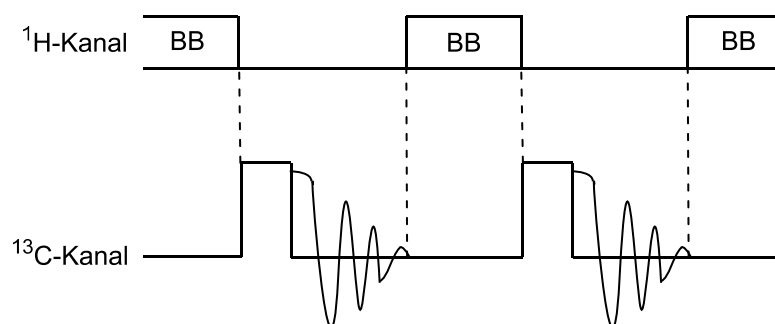


Abbildung 55: Bei einem *Gated-Decoupling*-Experiment wird der ^1H -Breitbandentkoppler (BB) während des Beobachtungsimpulses und der Datenaufnahme im ^{13}C -Kanal ausgeschaltet.

Daraus ergibt sich das in Abbildung 56 gezeigte Spektrum von SV71. Die Zuordnung der Signale ergab für das C_4 -Atom ein Dublett vom Dublett mit den Kopplungskonstanten $^3J(\text{C,H}) = 6.6 \text{ Hz}$ und 4.0 Hz bei 166.26 ppm . Dieses Aufspaltungsmuster resultiert aus den vicinalen Kopplungen von C_4 mit H_a (*cis*) oder H_b (*trans*) und H_c . In der Literatur finden sich für C,H-*cis*-Kopplungen im Allgemeinen Werte, die kleiner sind als 10 Hz und für C,H-*trans*-Kopplungen Werte, die größer sind als 10 Hz .^[126,127] Im vorliegenden Fall sind beide relevanten Kopplungskonstanten kleiner als 10 Hz , was auf eine *cis*-Kopplung hindeutet. Es kann also angenommen werden, dass SV71 als *Z*-Diastereomer vorliegt. Das Dublett bei 167.2 ppm mit $^3J(\text{C,H}_c) = 6.6 \text{ Hz}$ ist dem anderen Carbonyl-Kohlenstoff an Position 2 des Fünfrings und dessen vicinaler Kopplung mit H_c zuzuordnen.

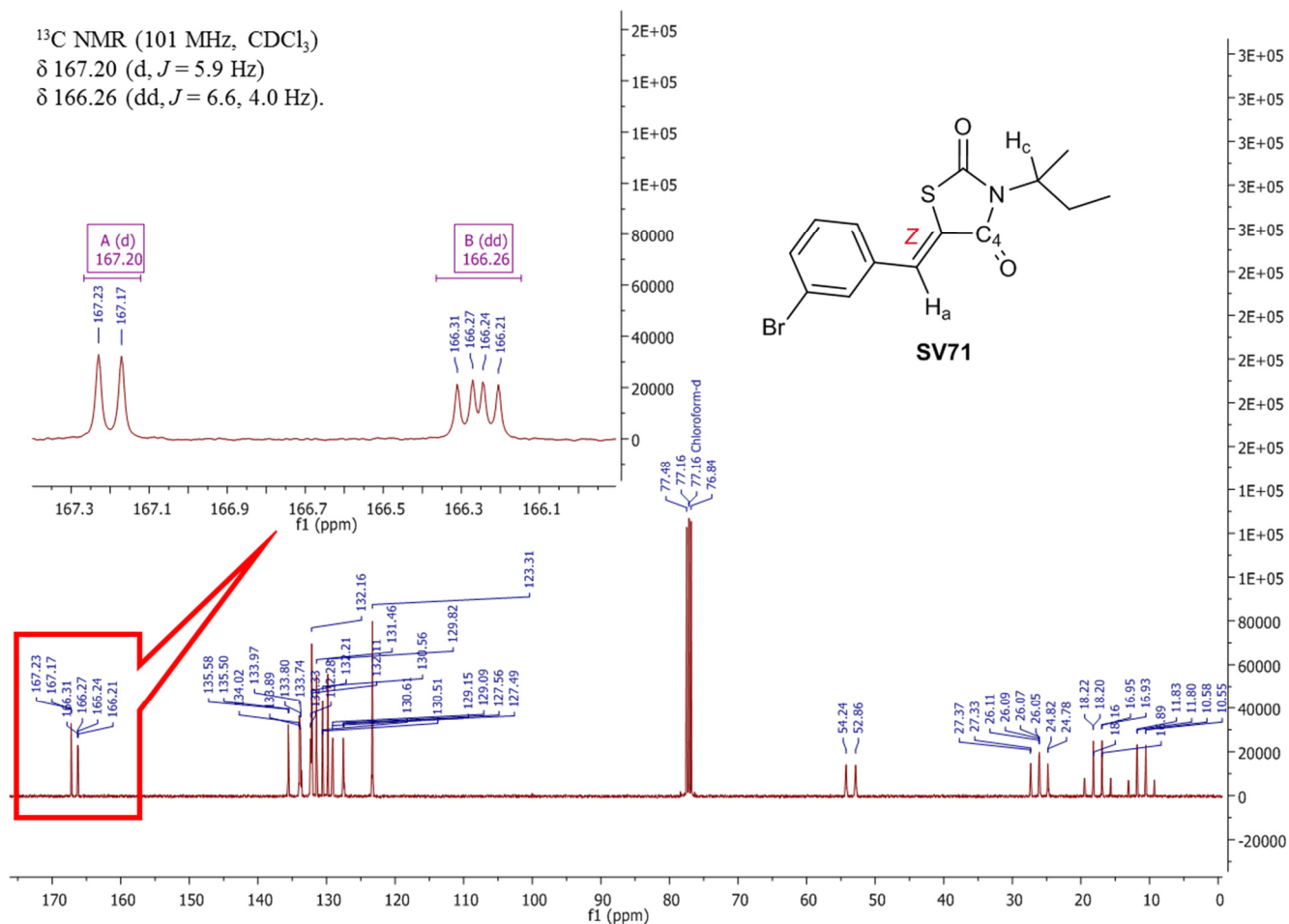


Abbildung 56: Gated-Decoupling-Spektrum von von SV71. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt das relevante Dublett vom Dublett bei 166.26 ppm.

c) Theoretische Überlegungen

Diese experimentellen Ergebnisse stehen ebenfalls im Einklang mit der theoretisch anzunehmenden Diastereoselektivität der Reaktion. Der Übergangszustand des Eliminierungsschrittes, der zum thermodynamisch stabileren Produkt führt, besitzt ebenso einen niedrigeren energetischen Zustand (*Product Development Control*),^[128] d.h. das unter kinetischer Kontrolle entstehende Produkt ist auch das stabilere. Wie man leicht erkennen kann, ist das Diastereomer mit *Z*-Konfiguration sterisch weniger gehindert als das *E*-Isomer und somit auch stabiler. Unter Annahme des in Kapitel 3.2.2.a) postulierten E1cB-Mechanismus‘ ist dieses kinetische bzw. thermodynamische Verhalten in Abbildung 57 graphisch dargestellt. Nach der schnellen reversiblen Deprotonierung zum Enolat- bzw. Carbanion (Zwischenprodukt) folgt die Eliminierung der Abgangsgruppe Y als geschwindigkeitsbestimmender Schritt. Die konformationsabhängige Stellung des sterisch anspruchsvollen Substituenten X zusammen mit der zur Eliminierung notwendigen möglichst

anti-periplanaren Stellung des freien Elektronenpaares im p-Orbital am C5 zur Abgangsgruppe Y im Zwischenprodukt bedingen folglich die Geometrie des Endproduktes.

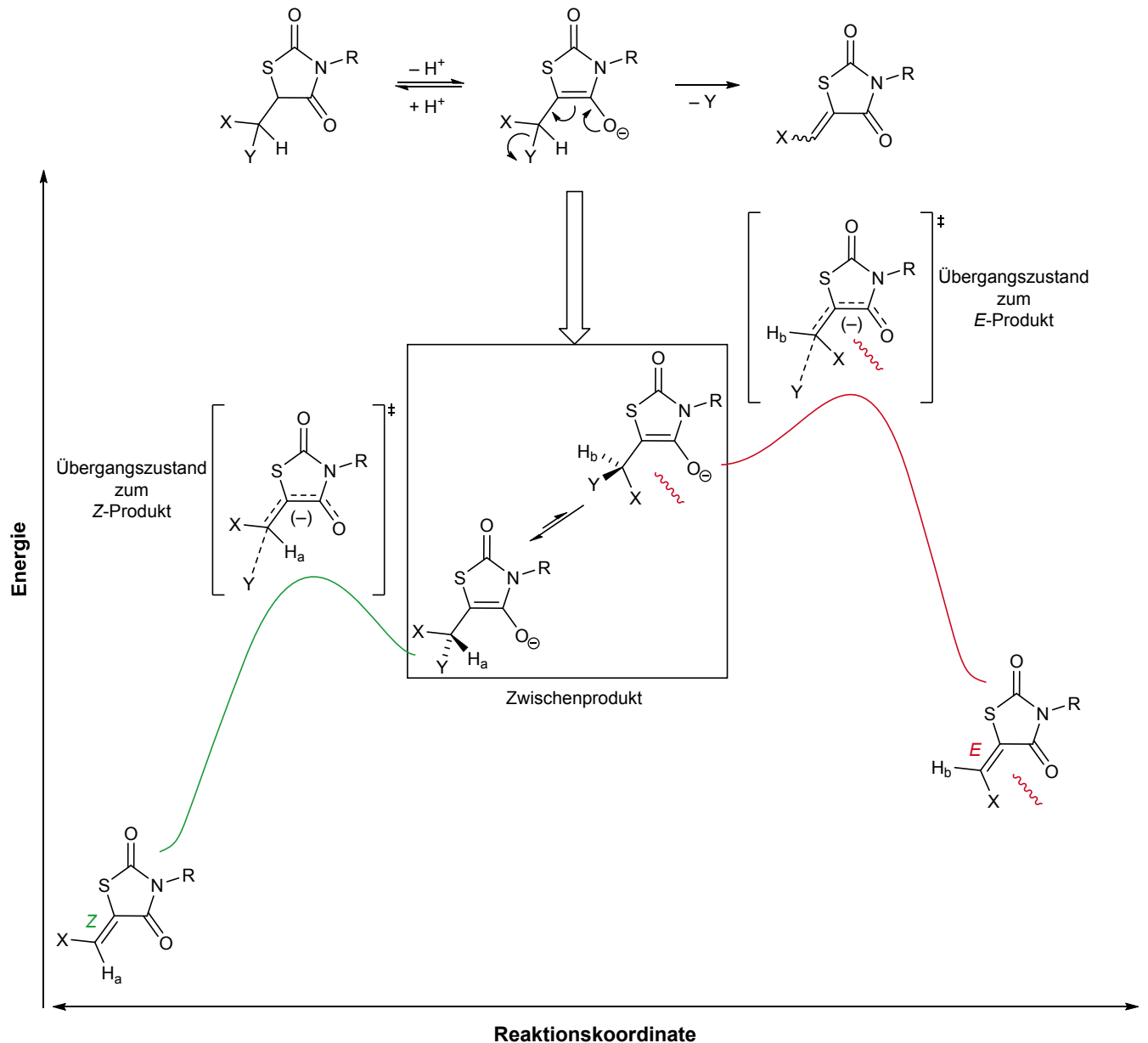


Abbildung 57: Energiediagramm der stereoselektiven E1cB-Eliminierung zum stabileren Z-Produkt. (X=sterisch anspruchsvoller Substituent; Y=Abgangsgruppe; rote Wellenlinien=sterische Hinderung). Das thermodynamisch stabilere Z-Diastereomer wird auch schneller gebildet.

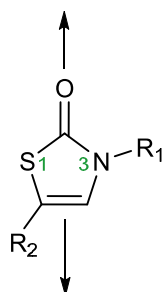
In der Literatur beschriebene Röntgenstrukturaufklärungen von C-5-substituierten Thiazolidindionen bestätigen das Vorliegen von Z-Diastereomeren bei dieser Reaktion.^[80] Abschließend gilt bei dieser Abhandlung zu berücksichtigen, dass hier die E- bzw. Z-Geometrie in gewisser Weise Idealformen darstellen. Die tatsächliche Stellung im Raum hängt vom weiteren Substitutionsmuster bzw. möglichen intramolekularen

Wechselwirkungen ab. Streng genommen müsste sie in jedem Einzelfall durch Röntgenstrukturaufklärung ermittelt werden, um eine exakte Aussage darüber zu tätigen.

3.3 Darstellung der Thiazolin-2-one

Aus den Ergebnissen der ersten Testungen und *Docking*-Simulationen (siehe Kapitel 3.1.2) folgten strukturelle Änderungen der Thiazolidindion-Derivate, um deren inhibitorische Eigenschaften weiter zu verbessern. Hierbei ging es vor allem um eine Restrukturierung des Thiazolidin-2,4-dion-Grundgerüsts. Der Wegfall der Carbonylfunktion an C-4, die den *Docking*-Experimenten zur Folge keine Wechselwirkungen mit der InhA-Bindetasche eingeht und sich eher negativ auf mögliche hydrophobe Wechselwirkungen mit dem *Substrate-Binding-Loop* auswirkt, sowie die Einführung einer Doppelbindung zwischen C-4 und C-5 resultieren in einem Heterozyklus mit formal aromatischem Charakter, dessen Nucleophilie am verbleibenden C-2-Carbonylsauerstoff erhöht sein sollte. Dies wiederum sollte die Wechselwirkung durch Wasserstoffbrückenbindung zum Tyrosin 158 im aktiven Zentrum von InhA verstärken. Zusätzlich wird durch diese strukturelle Veränderung des Fünfrings dessen Planarität erhöht, was in einer Erhöhung der π - π -Stacking-Wechselwirkung mit dem Nicotinamid vom Cosubstrat NAD^+ resultieren sollte. Mit dieser strukturellen Abwandlung zum Thiazolinon und Verwendung der aus den bisherigen Testungen resultierenden besten Substituenten R_1 und R_2 sollte die Affinität der Inhibitoren gegenüber InhA vergrößert werden (siehe Abbildung 58).

vergrößerte Nucleophilie



vergrößerte Planarität

Abbildung 58: Die mit der Thiazolin-2-on-Struktur einhergehenden Eigenschaften.

3.3.1 Retrosynthetische Betrachtungen

Das Grundgerüst der Thiazolin-2-one (**IV**) war kommerziell nicht erhältlich und auch synthetisch nicht von den Thiazolidin-2,4-dionen ableitbar, da eine selektive Reduktion der C-4-Carbonylgruppe sowie eine selektive Einführung der Doppelbindung nicht umsetzbar waren. Der Fünfringheterozyklus musste daher synthetisch aufgebaut werden. Hierzu wurde eine Retrosynthese der Verbindungsklasse durchgeführt (siehe Abbildung 59).

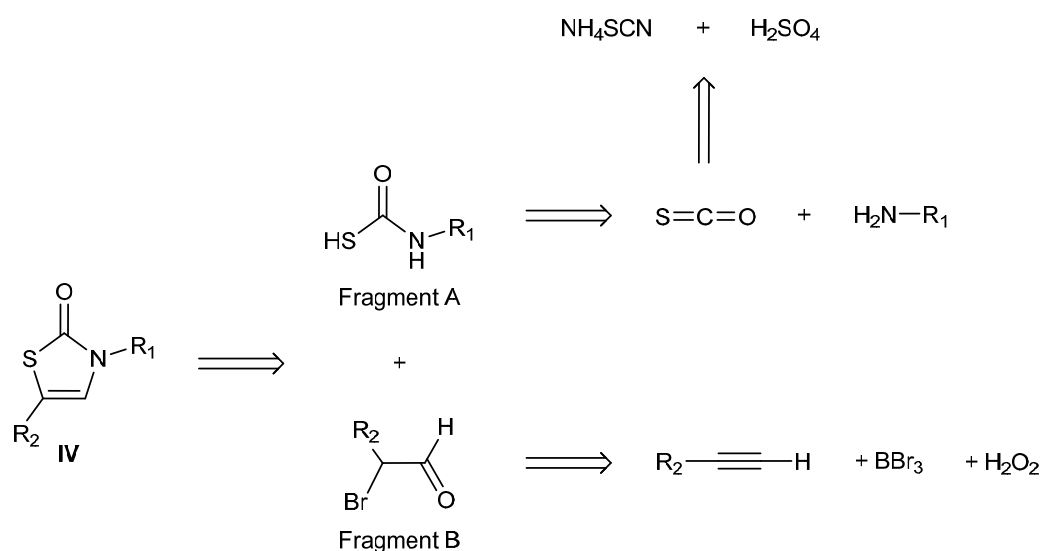


Abbildung 59: Retrosynthetische Betrachtung der Thiazolinon-Derivate (**IV**).

Der Fünfring des Thiazolin-2-ons (**IV**) kann durch Reaktion eines Thiocarbamats (**Fragment A**) mit einem α -bromierten Aldehyd (**Fragment B**) synthetisiert werden. Das entsprechende Thiocarbamat ist durch Reaktion von Kohlenoxysulfid mit einem Amin herstellbar. Das gasförmige Kohlenoxysulfid erhält man durch Umsetzung von Ammoniumthiocyanat mit konzentrierter Schwefelsäure. Der entsprechende α -bromierte Aldehyd ist durch Reaktion eines 1-Alkins mit Bortribromid zum 2-Brom-1-alkenylboran und anschließende Oxidation synthetisch zugänglich. Theoretisch wäre auch ein Syntheseweg von Fragment B denkbar, bei dem ausgehend von der Carbonsäure mit einer *Hell-Volhard-Zelinskii*-Reaktion die α -Brom-Säure erhalten wird, die nach Reduktion zum entsprechenden Alkohol mit einer *Swern*-Oxidation zum α -bromierten Aldehyd umgesetzt wird. Hierbei wären allerdings drei Syntheseschritte von Nöten, wohingegen die Herstellung von Fragment B durch Bromoborierung und Oxidation als komfortable Eintopf-Synthese durchgeführt werden kann. Nachfolgend werden die einzelnen Schritte beispielhaft an der Synthese der Zielverbindung SV94 näher erläutert.

3.3.2 Synthese von Benzylammonium-*N*-benzylthiocarbamat (Fragment A)

Zur Herstellung von Benzylammonium-*N*-benzylthiocarbamat (SV93) wurde gasförmiges Kohlenoxysulfid, das aus einer gesättigten Ammoniumthiocyanat-Lösung mit konzentrierter Schwefelsäure generiert wurde,^[129] in eine ethanolische Benzylamin-Lösung eingeleitet (siehe Kapitel 8.2.5 und 8.2.6). Nach nucleophilem Angriff vom Stickstoffatom des Benzylamins am elektrophilen C-Atom des Kohlenoxysulfids präzipitiert das Benzylammonium-Salz als weißer Feststoff.^[130,131] Nach Filtration und Waschen mit Diethylether erhält man ausreichend sauberes Produkt. Weitere Aufreinigungsschritte waren somit nicht notwendig (siehe Abbildung 60).

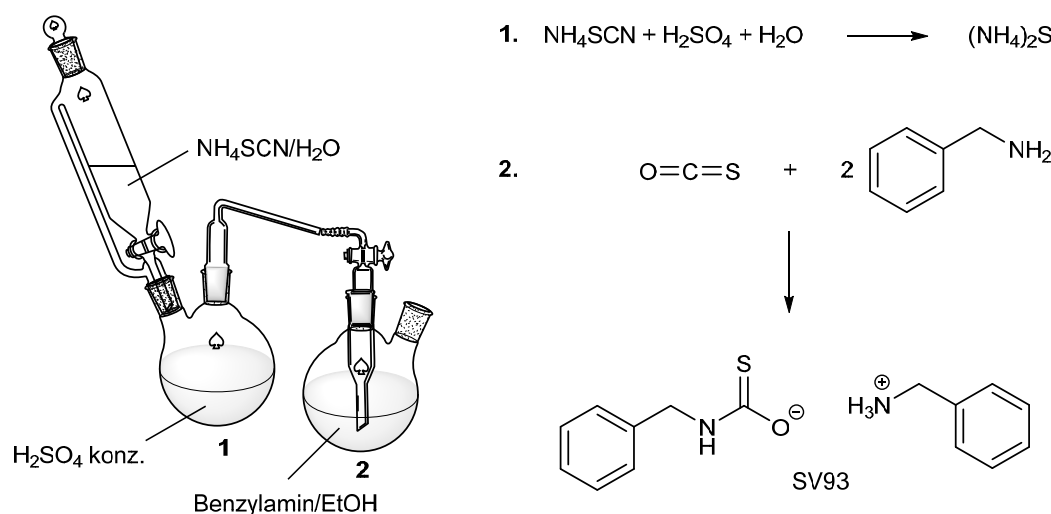


Abbildung 60: Links: Vereinfachtes Schema der Apparatur für die Synthese von Ammoniumthiocarbamatsalzen. Die verwendeten Geräte zur Trocknung des in 1 generierten Kohlenoxysulfids vor dessen Einleitung in 2 sind nicht eingezeichnet. Rechts: Die zu 1 und 2 gehörenden Reaktionsgleichungen.

Das generierte Kohlenoxysulfid kann zuvor zur Aufreinigung (Verunreinigungen: NH_3 , H_2S , CS_2 , CO_2 , HCN , H_2O u.a.) über ein mit Natronlauge 33 % beschicktes Zehnkugelnrohr geleitet und anschließend in zwei mit Kalk gefüllten und einem mit CaCl_2 versehenen Trockentürmen bzw. umfunktionalisierten Waschflaschen getrocknet werden (in Abb. 60 nicht abgebildet). Beim experimentellen Arbeiten stellte sich allerdings heraus, dass man bei *in situ*-Generation des Gases und unmittelbarer Weiterverwendung diese Waschschrte einsparen kann. Möchte man hingegen das Gas über eine Kühlfalle isolieren, so sind diese Zwischenstationen unumgänglich.^[129] Bei der Reaktionsführung ist vor allem darauf zu achten, dass das Lumen des Gaseinleitungsrohres in 2 weit genug ist, sodass keine Verstopfung durch das Präzipitat eintritt (Explosionsgefahr!). Ebenso ist es zwingend erforderlich bei der stark exothermen Generation von Kohlenoxysulfid 1, die gesättigte Ammoniumthiocyanat-Lösung nur sehr langsam dazu zutropfen. Neben dem *N*-Benzyl- (SV93, 26 %) wurde auf gleiche Weise auch das *N*-2-Methylbenzyl-Derivat (SV96, 42 %) synthetisiert.

3.3.3 Synthese von α -Bromooctanal durch Bromoborierung und Oxidation von 1-Octin (SV92/Fragment B)

Durch Bromoborierung von 1-Octin (**1**) erhält man 2-Brom-1-octenylboran (**2**). Dieses Intermediat lässt sich unter bestimmten Bedingungen selektiv zu 2-Bromooctanal (SV92) oxidieren (siehe Abbildung 61 und Kapitel 8.2.4).^[132]

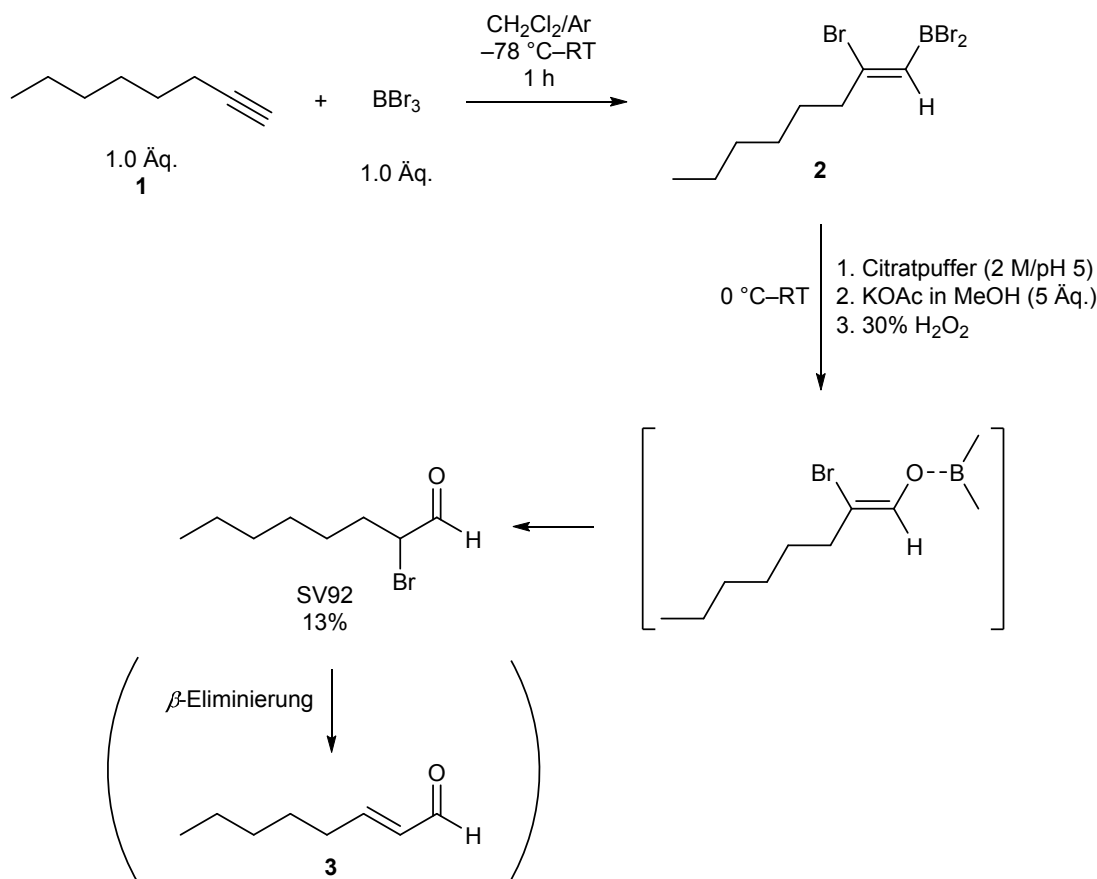


Abbildung 61: Synthese von 2-Bromooctanal durch Bromoborierung und anschließende Oxidation von 1-Octin.

Gewöhnlich findet der Oxidationsschritt mit Wasserstoffperoxid in Gegenwart einer starken Base statt. Dies hat allerdings den Nachteil, dass es hierbei leicht zur β -Eliminierung von 2-Bromooctanal (SV92) zum α, β -ungesättigten Aldehyd (**3**) als nicht gewünschte Nebenreaktion kommt. Wie *Satoh et al.* berichten, lässt sich diese konkurrierende Eliminierungsreaktion während der Oxidation durch Einstellung eines pH-Werts von fünf mit Hilfe eines zwei molaren Citrat-Puffersystems, sowie durch Zugabe einer methanolischen Kaliumacetat-Lösung (5.0 Äq.) unterdrücken.^[132] Ausbeuten von 13 % konnten diesen Sachverhalt allerdings nur bedingt bestätigen. Die β -Eliminierung von 2-Bromooctanal (**3**) kann mit diesen Bedingungen daher zwar vermindert, aber nicht vollständig unterdrückt werden. Zu berücksichtigen ist allerdings auch die durch ein energetisch sehr niedriges LUMO an Position 2 resultierende, stark erhöhte Reaktivität von 2-Bromooctanal (SV92) gegenüber

Nucleophilen und der damit einhergehende Verlust an Stabilität des Produktes. Zieht man die Schwierigkeiten anderer Herstellungsverfahren von 2-Bromooctanal und die Möglichkeit einer komfortablen Eintopf-Synthese in Betracht, so erweist sich diese Synthesevariante aber als vorteilhaft.

3.3.4 Synthese von 3-Benzyl-5-hexylthiazol-2(3H)-on (SV94)

Der Ringschluss zum 3-Benzyl-5-hexylthiazol-2(3H)-on (SV94/(IV)) erfolgte durch Kopplung von Fragment A (SV93) und Fragment B (SV92) (siehe Abbildung 62 und Kapitel 8.2.7).^[130,131,133]

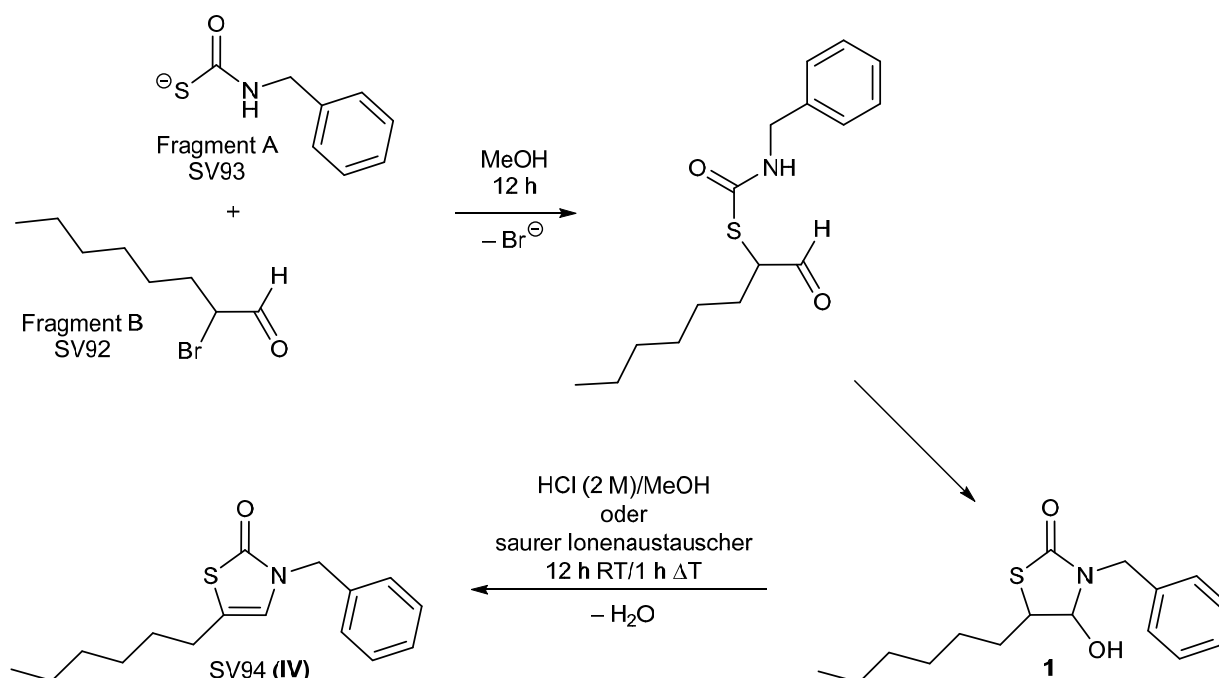


Abbildung 62: Ringschluss von Fragment A und B zum Thiazolinon.

Im Sinne einer $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion greift das Thiolat-Anion des Thiocarbamats hierbei als Erstes das energetisch sehr tief liegende LUMO in α -Position des 2-Bromooctanals an. Die gute Elektrophilie bzw. das energetisch günstige LUMO ergibt sich nach der MO-Theorie durch lineare Kombination des π^* -Orbitals der Carbonylgruppe mit dem σ^* -Orbital der C–Br-Bindung. Im zweiten Schritt erfolgt dann der Ringschluss durch nucleophilen Angriff des räumlich angenäherten Stickstoffs an der Carbonylgruppe des Aldehyds zum 3-Benzyl-5-hexyl-4-hydroxythiazolidin-2-on (**1**). Nach diversen Aufreinigungsschritten des Zwischenproduktes (**1**) wurde die Eliminierungsreaktion von Wasser unter Aromatisierung des Fünfringes im sauren Milieu zum 3-Benzyl-5-hexylthiazolin-2(3H)-on (SV94/(IV)) durchgeführt. Hierzu wurde Salzsäure 2 M oder ein stark saurer Ionenaustauscher (Dowex[®]) verwendet. Die formal beobachtete Aromatisierung zum thermodynamisch stabilen Produkt macht ebenso verständlich, dass eine ausreichend lange Reaktionsdauer des Eliminierungsschrittes, der optional durch Erhitzen unter Rückflusskühlung beschleunigt werden kann, zum gewünschten Produkt führt. Auf diese Weise wurde neben dem *N*-Benzyl- (SV94, $\text{R}_1 = \text{Benzyl}$, $\text{R}_2 = \text{Hexyl}$, 12 %) auch das *N*-2-Methylbenzyl-Derivat (SV102, $\text{R}_1 = 2$ -

Methylbenzyl, $R_2 = \text{Hexyl}$, 10 %) als Zielverbindungen synthetisiert (siehe Abbildung 63). Der Versuch, statt eines Hexyl-Rests an Position 5 einen Benzyl-Rest einzuführen, schlug fehl. Ausgehend vom 3-Phenyl-1-propin konnte der α -Bromaldehyd (2-Brom-3-phenyl-1-Propanal) als Zwischenstufe nicht isoliert werden. Ursache ist wahrscheinlich die erhöhte Tendenz zur β -Eliminierung unter Entstehung eines konjugierten π -Elektronensystems.

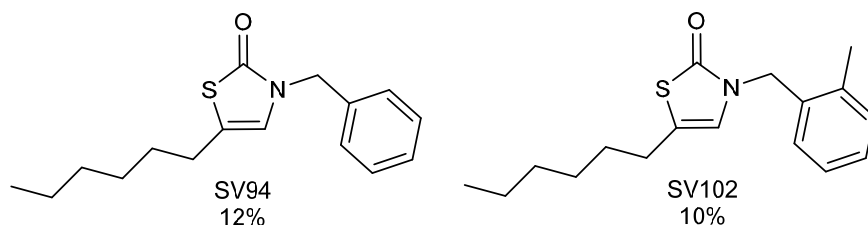
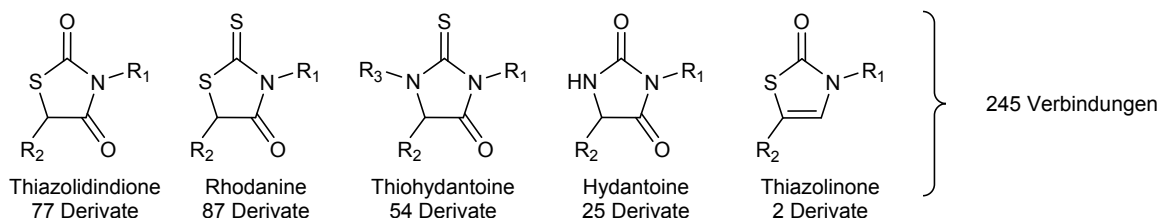


Abbildung 63: Übersicht der Strukturen und Ausbeuten der synthetisierten Thiazolin-2-on-Derivate.

3.4 Erweiterung und Übersicht der Substanzbibliothek

Die Verbindungen der Substanzbibliothek wurden eigenständig synthetisiert (**SV-Verbindungen**) oder von den Kooperationspartnern *Prof. Dr. C. Klein* (Universität Heidelberg, **tm- und cf-Verbindungen**) und *Prof. Dr. C. Kisker* (Rudolf-Virchow-Zentrum, Universität Würzburg) bzw. *Prof. P. Tonge* (Stony Brook University New York, **PT-Verbindungen**) bezogen oder kommerziell bei *Princeton BioMolecular Research* und *Hit2Lead* erworben (**I1–I21**). Im Folgenden ist die umfassende Substanzbibliothek in einer Übersicht dargestellt (siehe Abbildung 64). Die jeweiligen Verbindungen wurden nach groben strukturellen Gesichtspunkten eingeordnet. Insgesamt besteht die Substanzbibliothek aus 254 Verbindungen. Eine detaillierte strukturelle Auflistung befindet sich bei der Diskussion der Testergebnisse (siehe Kapitel 4).

Ähnliche Fünfring-Heterozyklen



Sonstige Strukturklassen

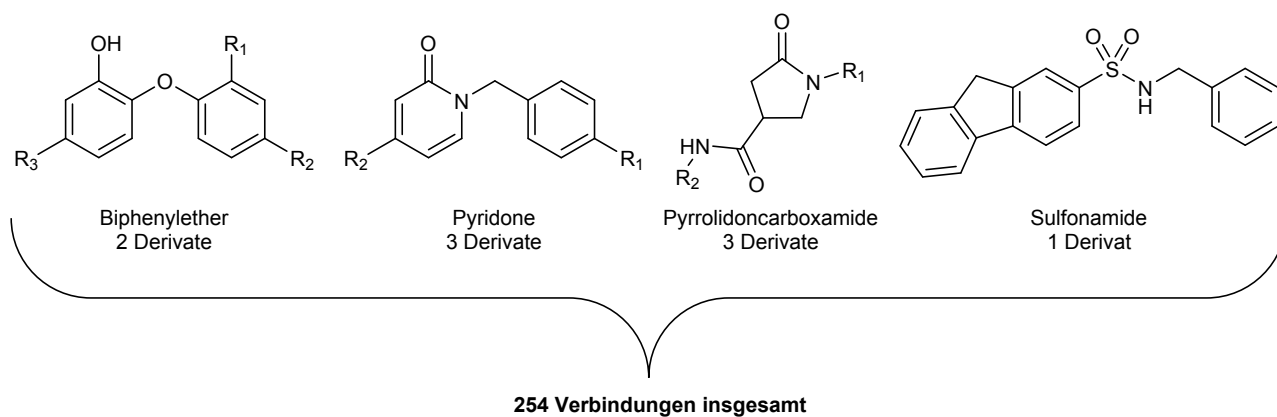


Abbildung 64: Übersicht der Substanzbibliothek.

4 Biochemische und Biologische Testungen

Nachfolgend wird das Screening der Substanzbibliothek an InhA und weiteren Zielenzymen diskutiert. Mit den daraus erhaltenen Informationen sollten etwaige Struktur-Aktivitäts-Beziehungen abgeleitet bzw. die generelle Eignung der Thiazolidindione und seiner ähnlichen Vertreter als Leitstrukturen näher untersucht werden. Nach den in-vitro-Testungen mit Hilfe enzymatischer Assay-Systeme wird auf die Ergebnisse der in-vitro-Testungen am Erreger eingegangen.

4.1 Ergebnisse des Screenings an InhA

Mit dem validierten InhA-Testverfahren (siehe Kapitel 2) wurde die Substanzbibliothek (siehe Kapitel 3) vermessen. Hierzu wurden in einem ersten Schritt die prozentualen Restaktivitäten von InhA bestimmt, um eine Übersicht über die inhibitorischen Qualitäten zu erhalten, evtl. erste Struktur-Aktivitäts-Beziehungen ableiten zu können und die Substanzbibliothek zielführend erweitern und verbessern zu können. Dieses Screening wurde durch Drei- oder Zweifachbestimmungen der Testverbindungen bei einer Endkonzentration von 20 μM durchgeführt. Die große Lipophilie (vgl. logP, Kapitel 3.1.1) der disubstituierten Thiazolidindione führte bei höheren Konzentrationen trotz Zusatzes von fünf Prozent DMSO zur Präzipitation. Die schlechte Wasserlöslichkeit wiederum bedingt die niedrig gewählte Grenze (*Cut-Off*) für die Auswahl von vielversprechenden Verbindungen (*Hits*). Verbindungen, die das Enzym mehr als 50 % hemmen, sollten weiter bezüglich ihrer inhibitorischen Eigenschaften unter Aufklärung der Inhibitionsmechanismen etc. charakterisiert werden. Verbindungen, die das Enzym weniger als 50 % hemmen und somit einen geschätzten IC_{50} von $> 20 \mu\text{M}$ aufweisen, machen aufgrund der beginnenden Präzipitation die erforderliche Vermessung von Verdünnungsreihen im höheren mikromolaren Bereich nicht möglich. Noch vor der synthetischen Derivatisierung der Thiazolidindione wurden die auf Grundlage des virtuellen Screenings^[78] kommerziell erworbenen Verbindungen getestet (I1–I21). Die daraus resultierenden Informationen wurden anschließend genutzt, um unter Einbeziehung von rechnerbasierten Methoden (siehe Kapitel 3.1) die Leitstruktur der Thiazolidindione synthetisch zu verbessern (SV-Verbindungen). Sich abwechselnde Zyklen bestehend aus Testung – rechnergestützten Methoden–Synthese–Testung sollten somit das Ziel verfolgen, die Leitstruktur in einem iterativen Prozess zu verbessern. Dieser Plan war leider nur schwer umsetzbar, da sich unter den getesteten Substanzen keine Derivate mit zufriedenstellenden Hemmeigenschaften befanden. Während des weiteren experimentellen Vorgehens wurde nun das Hauptaugenmerk auf die Testung einer umfassenden Substanzbibliothek von Fünfring-Heterozyklen bestehend aus Derivaten

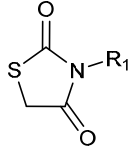
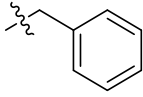
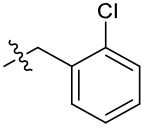
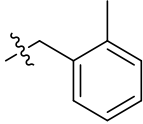
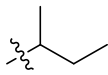
der Thiazolidindione, Thiazolinone, Thiohydantoine, Rhodanine und Hydantoine gelegt (siehe Kapitel 3.4). Die Testung dieser großen Stichprobe sollte Klarheit darüber schaffen, ob sich diese heterozyklischen Fünfringsysteme als Leitstruktur potenzieller InhA-Inhibitoren bewähren. Im Folgenden werden die Screening-Ergebnisse systematisch nach strukturellen Gesichtspunkten geordnet wiedergegeben und diskutiert. Die Ableitung von Struktur-Aktivitätsbeziehungen gestaltete sich hierbei aber ebenso als schwierig, da keine der getesteten Verbindungen über eine moderate Hemmung von InhA hinaus kam. Zusätzlich sind getestete Derivate der Biphenylether, Pyrrolidoncarboxamide, Sulfonamide und Pyridone aufgelistet.

4.1.1 Thiazolidindione

a) *N*-3-monosubstituierte Thiazolidindione

Die *N*-3-monosubstituierten Thiazolidindione dienen vor allem als Zwischenstufe zur Synthese der disubstituierten Vertreter (siehe Kapitel 3). Im Zuge des InhA-Screenings wurden sie dennoch mitgetestet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Screeningergebnisse *N*-3-monosubstituierte Thiazolidindione bei $[I] = 20 \mu\text{M}$. Gezeigt werden die Mittelwerte von Drei- bzw. Zweifachbestimmungen. Die Standardabweichungen betragen $\leq 10\%$. Messungen mit Abweichungen von $> 10\%$ werden nicht berücksichtigt.

R ₁ -monosubstituierte Thiazolidindione					
					
Verbindung	Substituent R ₁	Restaktivität InhA [%]	Verbindung	Substituent R ₁	Restaktivität InhA [%]
SV37		n.i.	SV45		n.i.
SV42		95	SV60		n.i.

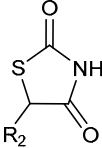
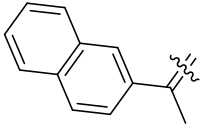
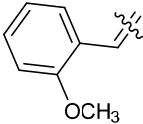
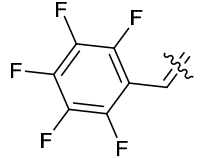
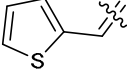
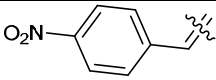
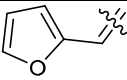
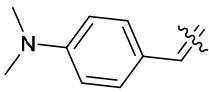
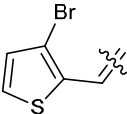
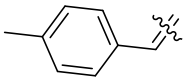
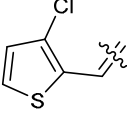
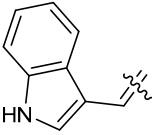
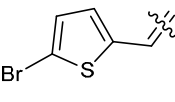
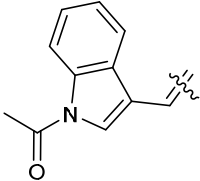
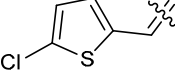
n.i. = no inhibition (keine Hemmung)

Wie zu erwarten war, zeigte keine der vier getesteten Substanzen hemmende Eigenschaften auf die katalytische Aktivität von InhA. Einzig die Verbindung SV42 mit 2-Methylbenzyl-Rest zeigt eine ganz schwache Hemmung von 5 %.

b) C-5-monosubstituierte Thiazolidindione

Die C-5-monosubstituierten Thiazolidindione besitzen bis auf die Verbindung tm407 mit einfachem Benzyl-Rest allesamt eine exozyklische Doppelbindung an Position 5. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Screeningergebnisse C-5-monosubstituierte Thiazolidindione bei $[I] = 20 \mu\text{M}$. Gezeigt werden die Mittelwerte von Drei- bzw. Zweifachbestimmungen. Die Standardabweichungen betragen $\leq 10\%$. Messungen mit Abweichungen von $>10\%$ werden nicht berücksichtigt.

R₂-monosubstituierte Thiazolidindione					
					
Verbindung	Substituent R ₂	Rest-aktivität InhA [%]	Verbindung	Substituent R ₂	Rest-aktivität InhA [%]
tm247		86	tm245		n.i.
tm354		n.i.	tm314		n.i.
tm356		93	tm340		93
tm246		n.i.	tm312		n.i.
tm344		n.i.	tm362		n.i.
tm242		82	tm352		n.i.
tm358		85	tm315		n.i.

R₂-monosubstituierte Thiazolidindione					
Verbindung	Substituent R ₂	Rest-aktivität InhA [%]	Verbindung	Substituent R ₂	Rest-aktivität InhA [%]
tm279		88	tm241		n.i.
tm248		88	tm252a		n.i.
tm271		n.i.	tm359		n.i.
tm401		n.i.	tm372		n.i.
tm396		86	tm368		n.i.
tm342		n.i.	tm238		n.i.
tm275		n.i.	tm398		n.i.
tm249		n.i.	tm407		n.i.

n.i. = no inhibition (keine Hemmung)

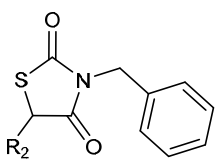
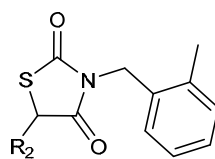
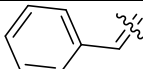
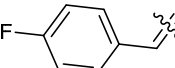
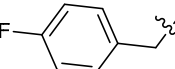
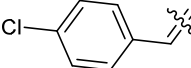
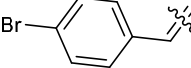
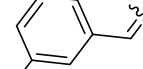
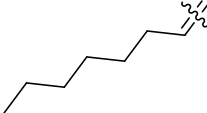
Keine der getesteten 30 Verbindungen zeigte eine bessere Hemmung als 18 %. Hierzu gehörten vor allem die Thiazolidindione mit 3'-Indolyl-Resten an Position 5 mit exozyklischer Doppelbindung (tm242: 18 %, tm 358: 15 % und tm279: 12 %). Ebenso zeigten Substituenten mit Naphtalin- (tm247: 14 %), *m*-Phenol- (tm396: 14 %) und *p*-Methoxyphenyl-Strukturen (tm248: 12 %) schwache Hemmung. Das einzige Derivat ohne exozyklische Doppelbindung mit einem einfachen Benzyl-Rest (tm407) zeigte keine

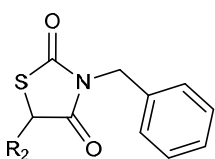
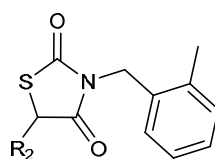
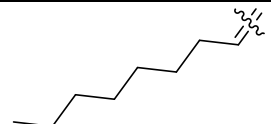
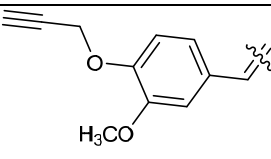
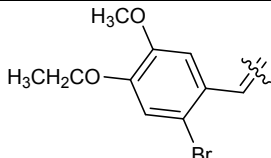
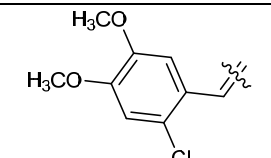
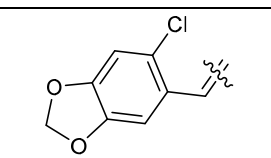
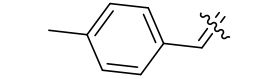
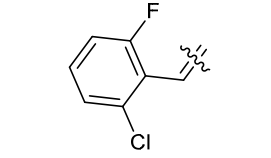
Hemmung. Es zeichnet sich hierbei bereits ab, dass das Vorhandensein der exozyklischen Doppelbindung an Position 5 des Fünfrings essenziell zu sein scheint. Diese Beobachtung konnte im Laufe der weiteren Vermessung der Substanzbibliothek bestätigt werden.

c) *N-3-C-5-disubstituierte Thiazolidindione*

Die disubstituierten Thiazolidindione sind die eigentlichen Zielverbindungen, die als potenzielle Inhibitoren von InhA entworfen, synthetisiert und getestet wurden. Sie wurden ausgehend von den *N-3*-monosubstituierten Thiazolidindionen SV37, SV42, SV45 und SV60 synthetisiert. In den nachstehenden Tabellen 8 und 10 werden die InhA-Screeningergebnisse dargestellt. Hier werden zuerst die von SV37 (*N*-Benzyl) und SV42 (*N*-2-Methylbenzyl) abgeleiteten Vertreter (Teil 1) und anschließend die von SV45 (*N*-2-Chlorbenzyl) und SV60 (*N*-*sec*-butyl) (Teil 2) abgeleiteten Verbindungen genannt und näher besprochen. Mit den sonstigen disubstituierten Thiazolidindionen in Abschnitt d) wurden insgesamt 43 Derivate dieser Art getestet.

Tabelle 8: Screeningergebnisse der *N-3-C-5*-disubstituierten Thiazolidindione bei $[I] = 20 \mu\text{M}$ (Teil 1). Gezeigt werden die Mittelwerte von Drei- bzw. Zweifachbestimmungen. Die Standardabweichungen betragen $\leq 10\%$. Messungen mit Abweichungen von $>10\%$ werden nicht berücksichtigt.

R₁-R₂-disubstituierte Thiazolidindione	SV37		SV42	
				
Substituent R₂	Verbindung	Restaktivität InhA [%]	Verbindung	Restaktivität InhA [%]
	SV57	n.i.	SV58	74
	II (SV75)	78	SV43	99
	SV77	n.i.	-	-
	SV39	n.i.	SV44	n.i.
	SV38	n.i.	SV46	n.i.
	SV69	83	SV70	83
	SV40	97	SV47	75

R ₁ -R ₂ -disubstituierte Thiazolidindione	SV37		SV42	
				
Substituent R ₂	Verbindung	Restaktivität InhA [%]	Verbindung	Restaktivität InhA [%]
	SV41	96	SV48	75
	I8	n.i.	-	-
	I6	92	-	-
	I7	96	-	-
	I5	n.i.	-	-
	I9	n.i.	-	-
	I15	92	-	-

n.i. = no inhibition (keine Hemmung)

Bei den vom *N*-Benzyl-substituierten Thiazolidindion SV37 abgeleiteten Verbindungen zeigten nur das *p*-Fluorbenzyliden-Derivat SV75 (I1) mit 22 % und das *m*-Brombenzyliden-Derivat SV69 mit 17 % schwach hemmende Eigenschaften. Das aus SV75 erhaltene Derivat SV77 ohne exozyklische Doppelbindung zeigte keine Hemmung. Dies festigt den Verdacht, dass diese exozyklische Doppelbindung als essenzielles Strukturelement für die inhibitorische Qualität der Thiazolidindione anzusehen ist. Die Verbindungen SV40 und SV41 mit C₇- bzw. C₈-Alkyliden-Resten zeigten überraschenderweise nur sehr schwache Hemmung (3 % bzw.

4 %). Den Docking-Simulationen zur Folge wurden hierbei verbesserte hydrophobe Wechselwirkungen mit Phe149 und Tyr158 der InhA-Bindetasche erwartet.

Bei den vom *N*-2-Methylbenzyl-substituierten Thiazolidindion SV42 abgeleiteten Verbindungen zeigte das Benzyliden-Derivat SV58 eine Hemmung von 26 %. Interessanterweise zeigte das gleichfalls mit einem Benzyliden-Rest an Position 5 substituierte *N*-Benzyl-Derivat SV57 keinerlei hemmenden Eigenschaften. Die Einführung der Methylgruppe scheint die inhibitorische Qualität zu steigern. Dies steht mit den aus den *Docking*-Studien (siehe Kapitel 3.1.2) erhaltenen Theorie in Einklang, die besagt, dass dieses Substitutionsmuster zu besseren hydrophoben Wechselwirkungen mit den Aminosäuren des *Substrate-Binding-Loops* führen kann. Das *m*-Brombenzyliden-Derivat SV70 mit 17 % Hemmung zeigt jedoch keine Verbesserung, aber auch keine Verschlechterung bezüglich der inhibitorischen Qualität gegenüber dem *N*-Benzyl-Derivat SV69. Die Verbindungen SV47 und SV48 mit C₇- bzw. C₈-Alkyliden-Resten zeigten mit jeweils 25 % Hemmung eine klare Verbesserung gegenüber den alkylidenylierten *N*-Benzyl-Derivaten SV40/41. Die aus den *Docking*-Posen abgeleiteten möglichen hydrophoben Wechselwirkungen mit Phe149 und Tyr158 der InhA-Bindetasche sind also denkbar. Beispielhaft sind in Abbildung 65 die Umsatz-Zeit-Kurven mit SV75 und ohne Inhibitor (DMSO-Wert) von einer Messung dargestellt. Die Ausgleichsgeraden mit zugehörigen Steigungen zur Bestimmung der initialen Geschwindigkeit sind ebenfalls eingezeichnet. Nach Dreifachbestimmung ergab sich die oben genannte Hemmung von 22 %.

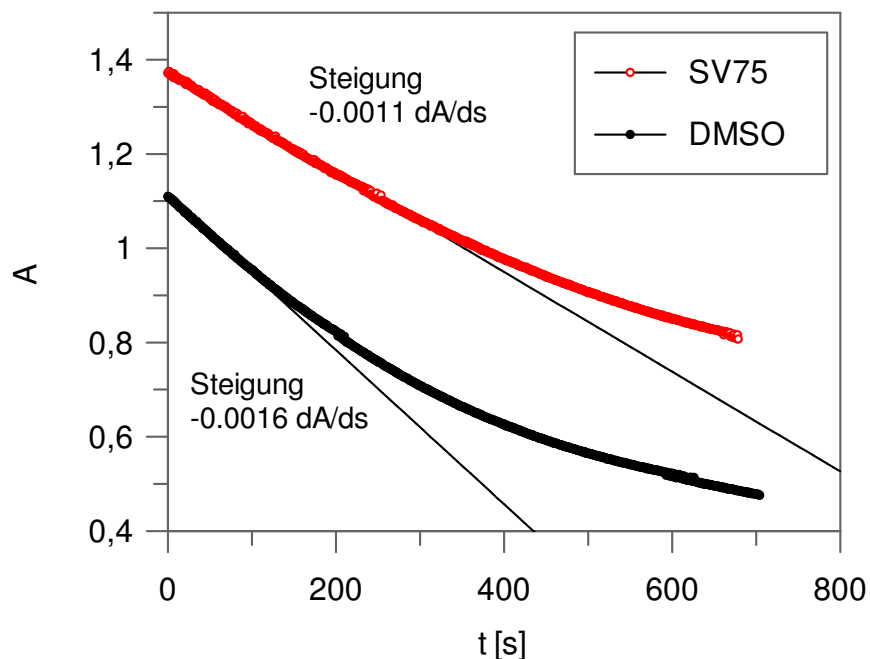


Abbildung 65: Umsatz-Zeit-Kurven mit und ohne Zusatz von $20 \mu\text{M}$ SV75 und zugehörige Steigungen der initialen Geschwindigkeiten. Die Dreifachbestimmung von SV75 ergab eine Hemmung von 22 %.

Ob eine zeitabhängige Hemmung vorliegt, ist nicht eindeutig zu erkennen. Da der lineare Bereich der SV75-Kurve über einen längeren Zeitraum als derjenige der DMSO-Kurve anhält, ist aber anzunehmen, dass es sich wahrscheinlich um einen reversiblen Inhibitionsmechanismus handelt. Die strukturelle Eigenschaft der exozyklischen Doppelbindung an Position 5 des Fünfrings hingegen, die mit der Keto-Gruppe an Position 4 ein *Michael*-System bildet, sollte die Möglichkeit eines nucleophilen Angriffs theoretisch denkbar machen. Hierdurch wäre wiederum die strukturelle Grundlage für ein irreversibles Verhalten geschaffen. *Klein et al.* konnten allerdings nach Inkubation ähnlich strukturierter Fünfringsysteme mit Glutathion keine Reaktion beobachten.^[80] Sie begründen die fehlende Elektrophilie des *Michael*-Systems bzw. das Ausbleiben eines nucleophilen Angriffs mit der daraus resultierenden Zerstörung des aromatischen Ringsystems. Eine Reaktion an dieser Position scheint daher ungünstig zu sein. Die genaue Aufklärung des Inhibitionsmechanismus war auf Grund der nur schwach ausgeprägten prozentualen Hemmung von 22 % in Kombination mit den bereits besprochenen Löslichkeitsproblemen der disubstituierten Thiazolidindione leider nicht möglich. Vergleicht man allerdings die prozentualen Hemmwerte bei gleichbleibender Inhibitorkonzentration von $20 \mu\text{M}$ und verschiedenen Substratkonzentrationen von standardmäßig $600 \mu\text{M}$ und $1000 \mu\text{M}$ 2toCoA, ist zu erkennen, dass die prozentualen Hemmwerte mit Erhöhung der Substratkonzentration steigen. Dies deutet auf einen unkompetitiven Inhibitionsmechanismus (siehe Kapitel 2.3.1)

von InhA der Thiazolidindione hin. In Tabelle 9 ist dieses Verhalten beispielhaft für den C-5-Benzyliden-Vertreter SV75 und den C-5-Alkyliden-Vertreter SV47 gezeigt.

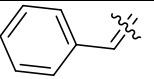
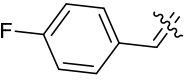
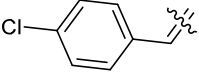
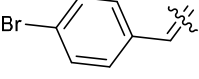
Tabelle 9: Die prozentuale Hemmung von SV75 und SV47 in Abhängigkeit von der Substratkonzentration.

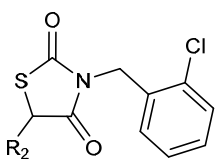
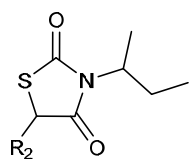
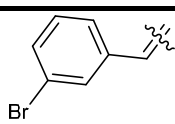
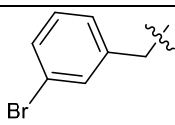
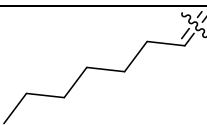
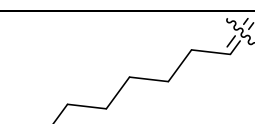
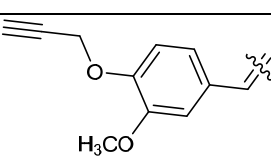
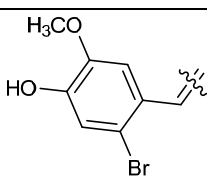
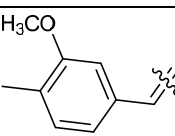
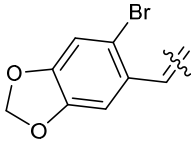
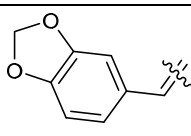
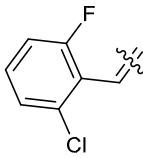
	600 μM 2toCoA	1000 μM 2toCoA
SV75	22 %	42 %
SV47	25 %	33 %

Wie bei den Biphenylether-Derivaten besprochen, sollte bei Vorliegen von unkompetitiver Hemmung idealerweise bei Substratkonzentrationen über dem K_m -Wert gescreent werden, um bessere prozentuale Hemmwerte zu erhalten (siehe Kapitel 2.3.1 und 2.3.3.d)). Die Untersuchungen hierzu fanden allerdings erst nach vollzogenem Screening der Substanzbibliothek bei (aus den bereits besprochenen Gründen) 600 μM 2toCoA statt.

Als nächstes werden die Ergebnisse des InhA-Screenings für die disubstituierten Thiazolidindione, die ausgehend von den einfachsubstituierten Vertretern mit *N*-*o*-Chlorbenzyl-Rest (SV45) und *sec*-Butyl-Rest (SV60) hergestellt wurden, dargestellt und diskutiert (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Screeningergebnisse der *N*-3-*C*-5-disubstituierten Thiazolidindione bei $[\text{I}] = 20 \mu\text{M}$ (Teil 2). Gezeigt werden die Mittelwerte von Drei- bzw. Zweifachbestimmungen. Die Standardabweichungen betragen $\leq 10 \%$. Messungen mit Abweichungen von $> 10 \%$ werden nicht berücksichtigt.

R ₁ -R ₂ -disubstituierte Thiazolidindione	SV45		SV60	
	Verbindung	Restaktivität InhA [%]	Verbindung	Restaktivität InhA [%]
	SV59	n.i.	SV62	77
	SV49	97	SV63	71
	SV50	n.i.	SV65	85
	SV51	76	SV66	79

R ₁ -R ₂ -disubstituierte Thiazolidindione	SV45		SV60	
				
Substituent R ₂	Verbindung	Restaktivität InhA [%]	Verbindung	Restaktivität InhA [%]
	SV91	92	SV71 (I18)	75
	-	-	SV81	n.i.
	-	-	SV67	n.i.
	-	-	SV68	94
	I2	n.i.	-	-
	I3	n.i.	-	-
	I21	n.i.	-	-
	I4	n.i.	-	-
	I17	n.i.	-	-
	I15	92	-	-

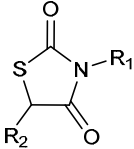
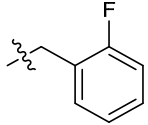
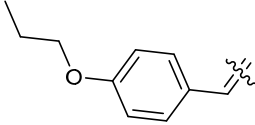
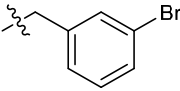
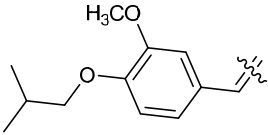
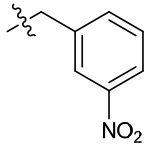
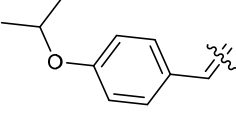
n.i. = no inhibition (keine Hemmung)

Ähnlich den *N*-2-Methylbenzyl-Vertretern sollten die *N*-2-Chlorbenzyl-Derivate den *Docking*-Studien zu Folge stärkere hydrophobe Wechselwirkungen mit den hydrophoben Aminosäuren des *Substrate-Binding-Loops* in der Bindetasche von InhA eingehen können. Dieser theoretische Sachverhalt konnte experimentell nicht belegt werden. Allein die Verbindung SV51 mit einem *p*-Brombenzyliden-Rest an Position 5 des Fünfrings zeigt eine moderate Hemmung von 24 %. Bei den getesteten Verbindungen mit einem verzweigt-kettigen *N*-*sec*-Butyl-Rest (abgeleitet von SV60) wiesen alle Vertreter mit verschiedenen substituierten Benzyliden-Resten an C-5 (SV62, SV63, SV65, SV66) eine Hemmung bis max. 29 % auf. Der *sec*-Butyl-Rest wirkt sich dagegen negativ auf die Hemmeigenschaften in Kombination mit C₇- bzw. C₈-Alkyliden-Resten (SV67: keine Hemmung bzw. SV68: 6 %) aus. Erneut wurde festgestellt, dass Derivate der Thiazolidindione ohne exozyklische Doppelbindung wie SV81 keine Hemmung aufweisen. Den *Docking*-Posen zur Folge ist dieses Verhalten theoretisch damit begründbar, dass die fehlende sp²-Hybridisierung am Kohlenstoff C-5 und der Verlust an Planarität des Fünfrings zu einem Ausbleiben des π - π -*Stackings* mit dem Nicotinamid des Cofaktors NAD⁺ führt und die Affinität des potenziellen Inhibitors zur InhA-Bindetasche sinkt.

d) Sonstige disubstituierte Thiazolidindione

Es folgen die Testergebnisse weiterer disubstituierter Thiazolidindione (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Screeningergebnisse sonstiger disubstituierter Thiazolidindione bei $[I] = 20 \mu\text{M}$. Gezeigt werden die Mittelwerte von Drei- bzw. Zweifachbestimmungen. Die Standardabweichungen betragen $\leq 10\%$. Messungen mit Abweichungen von $>10\%$ werden nicht berücksichtigt.

R₁-R₂-disubstituierte Thiazolidindione			
			
Substituent		Verbindung	Restaktivität InhA [%]
R₁	R₂		
		I16	n.i.
		I19	n.i.
		I20	n.i.

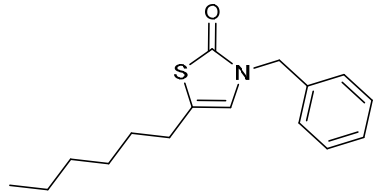
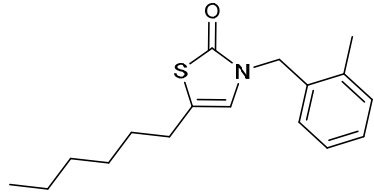
n.i. = no inhibition (keine Hemmung)

Keine der sonstigen gestesteten disubstituierten Thiazolidindione I16, I19 und I20 zeigten hemmende Eigenschaften gegenüber InhA.

4.1.2 Thiazolin-2-one

Die Thiazolinon-Derivate wurden im Zuge der Optimierung der Thiazolidindion-Leitstruktur entworfen und synthetisiert. Hierbei sollten zum einen die am besten bewährten Substituenten zum Einsatz kommen, zum anderen sollte die den Docking-Ergebnissen zu Folge unwichtige bzw. evtl. sogar störende Carbonylgruppe an Position 4 zu Gunsten einer Doppelbindung zwischen C₄ und C₅ entfernt werden. Das daraus resultierende Ringsystem höherer Planarität sollte theoretisch zu einem verbesserten π - π -Stacking mit dem Nicotinamid des Cofaktors NAD⁺ führen. Die gleichfalls resultierende Erhöhung der Nucleophilie des Carbonylsauerstoffs an Position 2 sollte die Wasserstoffbrückenbindungen zum Tyr158 im aktiven Zentrum von InhA und zur Ribose-2'-hydroxygruppe von NAD⁺ begünstigen. Nachfolgend sind die Testergebnisse dargestellt (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Screeningergebnisse der Thiazolin-2-one bei [I] = 20 μ M. Gezeigt werden die Mittelwerte von Drei- bzw. Zweifachbestimmungen. Die Standardabweichungen betragen ≤ 10 %. Messungen mit Abweichungen von >10 % werden nicht berücksichtigt.

Verbindung	Strukturformel	Restaktivität InhA [%]
SV94		n.i.
SV102		97

n.i. = no inhibition (keine Hemmung)

Leider zeigte keines der getesteten Thiazolinone eine nennenswerte Hemmung der Aktivität von InhA. Die theoretische Strukturoptimierung konnte experimentell nicht belegt werden. Interessanterweise zeigten die Thiazolinone aber gute Hemmung gegenüber einigen parasitären Proteasen (siehe Kapitel 4.2).

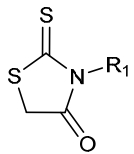
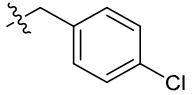
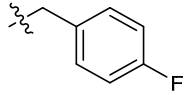

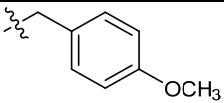

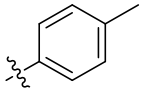
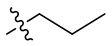
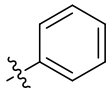
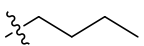
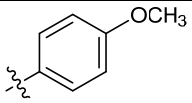
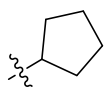
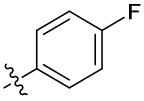
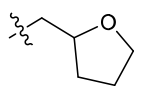
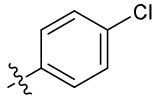
4.1.3 Rhodanine

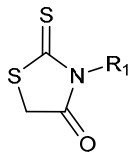
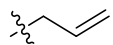
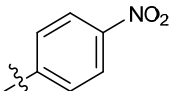
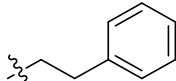
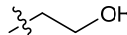
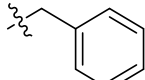
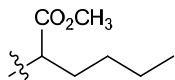
Die Strukturklasse der Rhodanine unterscheidet sich von den Thiazolidindionen durch das Ersetzen des Carbonylsauerstoffs an Position 2 im Heterozyklus durch ein Schwefel-Atom.

a) *N*-3-monosubstituierte Rhodanine

Nachstehend sind die Testergebnisse der *N*-3-substituierten Rhodanine dargestellt (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Screeningergebnisse der *N*-3-monosubstituierten Rhodanine bei [I] = 20 µM. Gezeigt werden die Mittelwerte von Drei- bzw. Zweifachbestimmungen. Die Standardabweichungen betragen ≤10 %. Messungen mit Abweichungen von >10 % werden nicht berücksichtigt.

R ₁ -monosubstituierte Rhodanine					
					
Verbindung	Substituent R ₁	Restaktivität InhA [%]	Verbindung	Substituent R ₁	Restaktivität InhA [%]
cn321	-CH ₃	n.i.	cn332		92
cn329	-CH ₂ CH ₃	n.i.	cn341		95
cn327		84	cn337		89
cn330		95	cn362		97
cn331		83	cn371		94
cn333		n.i.	cn366		96
cn340		86	cn365		n.i.
cn335		82	cn378		n.i.

R₁-monosubstituierte Rhodanine					
					
Verbindung	Substituent R ₁	Restaktivität InhA [%]	Verbindung	Substituent R ₁	Restaktivität InhA [%]
cn363		95	cn370		95
cn359		91	cn364		94
cn324		95	cn367		n.i.

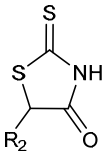
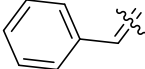
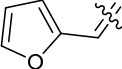
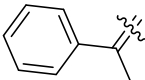
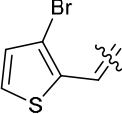
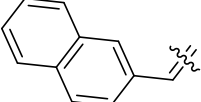
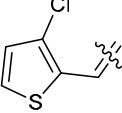
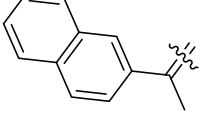
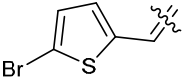
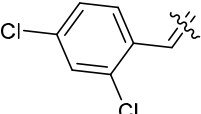
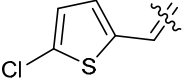
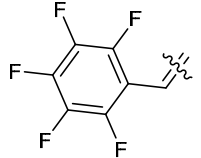
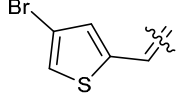
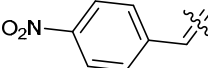
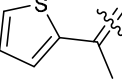
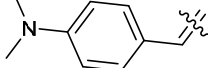
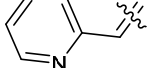
n.i. = no inhibition (keine Hemmung)

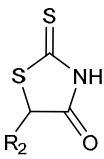
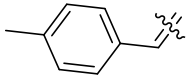
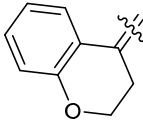
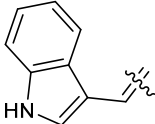
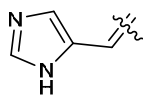
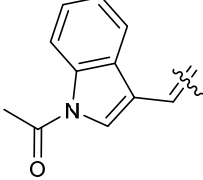
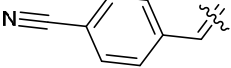
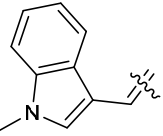
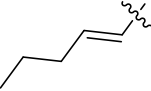
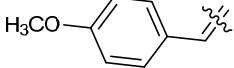
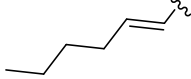
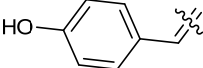
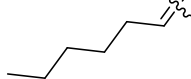
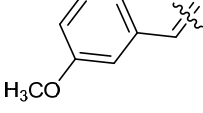
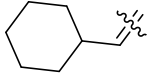
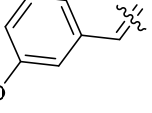
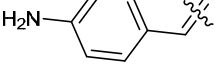
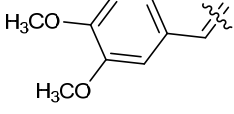
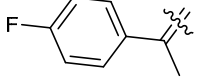
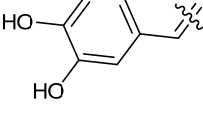
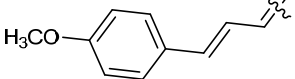
Keine der getesteten Verbindungen zeigte eine bessere Hemmung von InhA als 18 % (cn335). Insgesamt fünf Verbindungen zeigten Hemmwerte zwischen zehn und zwanzig Prozent (cn327, cn331, cn340, cn335, cn337). Die restlichen 17 Rhodanine zeigten entweder sehr schwache Hemmung (< 10 %) oder überhaupt keine.

b) C-5-monosubstituierte Rhodanine

Nachstehend sind die Testergebnisse der C-5-substituierten Rhodanine dargestellt (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Screeningergebnisse der C-5-monosubstituierten Rhodanine bei [I] = 20 µM. Gezeigt werden die Mittelwerte von Drei- bzw. Zweifachbestimmungen. Die Standardabweichungen betragen ≤10 %. Messungen mit Abweichungen von >10 % werden nicht berücksichtigt.

R₂-monosubstituierte Rhodanine					
					
Verbindung	Substituent R ₂	Rest-aktivität InhA [%]	Verbindung	Substituent R ₂	Rest-aktivität InhA [%]
tm168		90	tm300		n.i.
tm373		91	tm285		n.i.
tm222a		90	tm299		n.i.
tm215a		n.i.	tm286		n.i.
tm220a		n.i.	tm284		n.i.
tm305		95	tm291		n.i.
tm282		87	tm219a		82
tm217		91	tm363		98

R₂-monosubstituierte Rhodanine					
					
Verbindung	Substituent R ₂	Rest-aktivität InhA [%]	Verbindung	Substituent R ₂	Rest-aktivität InhA [%]
tm281		98	tm218a		n.i.
tm228		n.i.	tm233		n.i.
tm232		86	tm287		n.i.
tm234		91	tm179		n.i.
tm250		n.i.	tm181a		91
tm269		n.i.	tm181b		86
tm400		n.i.	tm172		98
tm395		n.i.	tm238		90
tm294		n.i.	tm375		98
tm273		n.i.	tm367		n.i.

R₂-monosubstituierte Rhodanine					
Verbindung	Substituent R ₂	Rest-aktivität InhA [%]	Verbindung	Substituent R ₂	Rest-aktivität InhA [%]
tm251		n.i.	tm425		n.i.
tm216a		n.i.	cn294		n.i.
tm313		89	cn296		n.i.

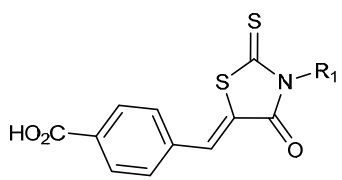
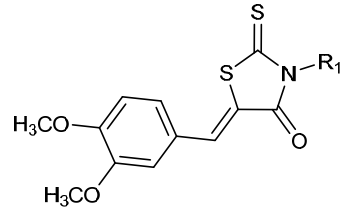

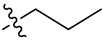


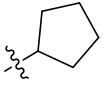
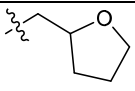
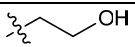
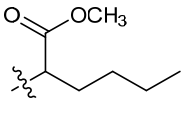
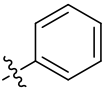
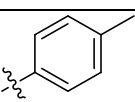
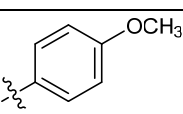
n.i. = no inhibition (keine Hemmung)

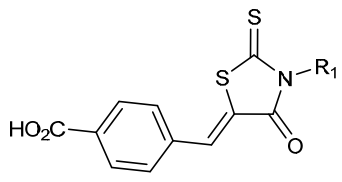
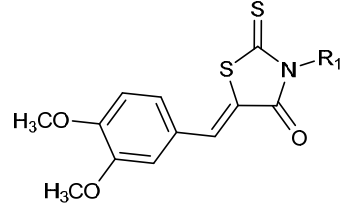
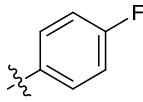
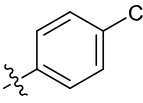
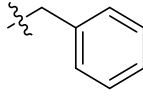
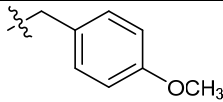
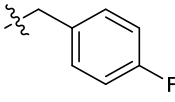
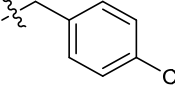
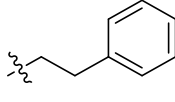
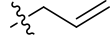
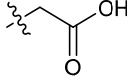
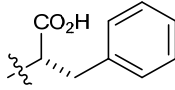
Von den 42 getesteten C-5-substituierten Rhodaninen zeigte die Verbindung tm219a mit 18 % die beste Hemmung. Vier der Substanzen (tm282, tm232, tm181b und tm313) hemmten die Aktivität von InhA zwischen 18 % und 10 %. Die restlichen vermessenen Rhodanine mit diesem Substitutionsmuster zeigten überhaupt keine Hemmung (25 Verbindungen) oder nur sehr schwache Hemmung bis zehn Prozent (12 Verbindungen).

c) *N-3-C-5-disubstituierte Rhodanine*

Die im InhA-Screening vermessenen disubstituierten Rhodanine und deren Hemmwerte sind nachfolgend in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Screeningergebnisse *N-3-C-5-disubstituierter Rhodanine* bei $[I] = 20 \mu\text{M}$. Gezeigt werden die Mittelwerte von Drei- bzw. Zweifachbestimmungen. Die Standardabweichungen betragen $\leq 10\%$. Messungen mit Abweichungen von $>10\%$ werden nicht berücksichtigt.

R₁-R₂-disubstituierte Rhodanine				
	Substituent R₁	Verbindung	Restaktivität InhA [%]	Verbindung
-CH ₃	cn389	93	-	-
-CH ₂ CH ₃	cn388	94	-	-
	cn396	90	-	-
	cn386	91	-	-
	cn385	80	-	-
	cn387	83	-	-
	cn394	87	-	-
	cn397	93	-	-
	cn399	n.i.	-	-
	cn400	92	-	-
	cn392	n.i.	-	-
	cn374	n.i.	-	-
	cn379	99	-	-

R₁-R₂-disubstituierte Rhodanine				
	Substituent R₁	Verbindung	Restaktivität InhA [%]	Verbindung
	cn391	90	-	-
	cn393	n.i.	-	-
	cn375	88	-	-
	cn401	95	-	-
	cn383	97	-	-
	cn402	94	-	-
	cn395	97	-	-
	cn312	95	-	-
	-	-	cn291	n.i.
	-	-	cn297	n.i.

n.i. = no inhibition (keine Hemmung)

Von 23 disubstituierten Rhodaninen zeigte die Verbindung cn385 mit 20 % die beste Hemmung. Die Derivate cn387, cn394 und cn375 verminderten die katalytische Aktivität von InhA zwischen 10 % und 20 %. Zu den sechs Vertretern ohne Hemmung gehörten auch die Derivate, die am C-5 vom Heterozyklus einen *m*, *p*-Dimethoxybenzyliden-Rest (cn291 und cn297) besitzen. Die restlichen 13 Rhodanine zeigten nur sehr schwache Inhibition (< 10 %).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass keine der getesteten Rhodanine die Aktivität von InhA mehr als 20 % hemmt.

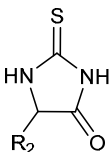
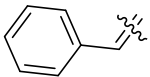
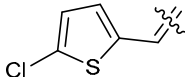
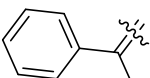
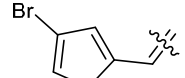
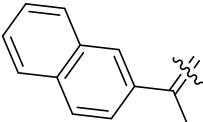
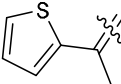
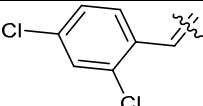
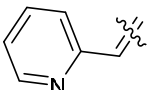
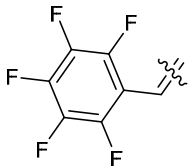
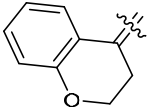
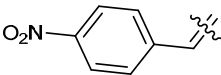
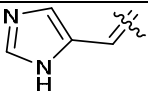
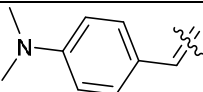
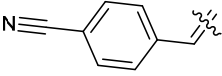
4.1.4 Thiohydantoine

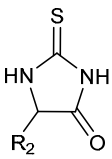
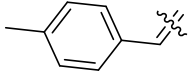
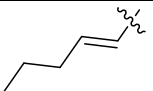
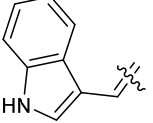
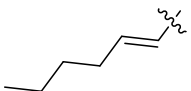
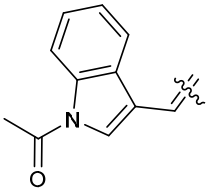
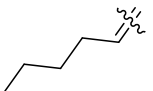
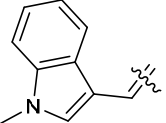
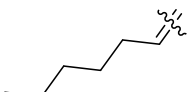
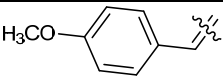
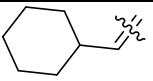
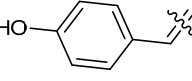
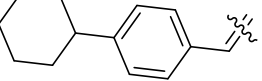
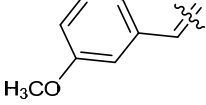
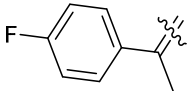
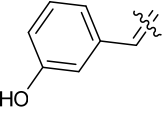
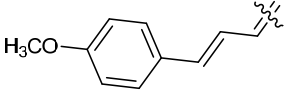
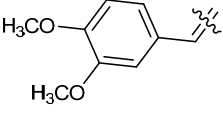
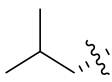
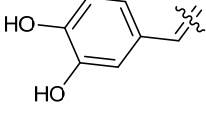
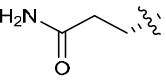
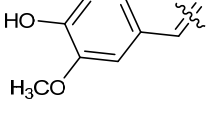
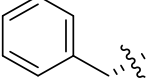
Die Strukturklasse der Thiohydantoine unterscheidet sich von den Thiazolidindionen durch Ersetzen des Schwefels an Position 1 im Heterozyklus mit einem Stickstoff und des Carbonylsauerstoffs an Position 2 durch ein Schwefel-Atom.

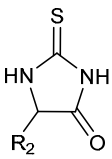
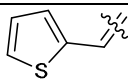
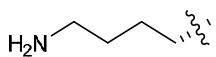
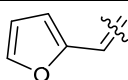
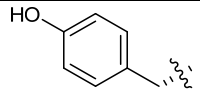
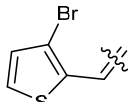
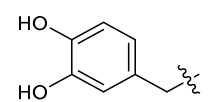
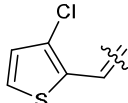
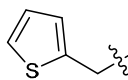
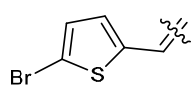
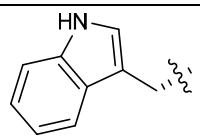
a) C-5-monosubstituierte Thiohydantoine

Die im InhA-Screening vermessenen an Position 5 substituierten Thiohydantoine und deren Hemmwerte sind nachfolgend in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Screeningergebnisse der C-5-monosubstituierten Thiohydantoine bei [I] = 20 μ M. Gezeigt werden die Mittelwerte von Drei- bzw. Zweifachbestimmungen. Die Standardabweichungen betragen ≤ 10 %. Messungen mit Abweichungen von >10 % werden nicht berücksichtigt.

R ₂ -monosubstituierte Thiohydantoine					
					
Verbindung	Substituent R ₂	Rest-aktivität InhA [%]	Verbindung	Substituent R ₂	Rest-aktivität InhA [%]
tm157		n.i.	tm316a		93
tm182		98	tm349		92
tm192a		98	tm199b		95
tm188b		n.i.	tm205a		n.i.
tm353		87	tm198b		n.i.
tm355		81	tm262		n.i.
tm196b		96	tm346		n.i.

R ₂ -monosubstituierte Thiohydantoine					
					
Verbindung	Substituent R ₂	Rest-aktivität InhA [%]	Verbindung	Substituent R ₂	Rest-aktivität InhA [%]
tm343		n.i.	tm178a		n.i.
tm227		n.i.	tm180a		n.i.
tm216a		n.i.	tm178b		97
tm277		81	tm180b		96
tm259		86	tm174		86
tm268		n.i.	tm195a		n.i.
tm190b		n.i.	tm197		84
tm394		n.i.	tm163		n.i.
tm341		n.i.	cf11		88
tm272		n.i.	cf14		n.i.
tm260a		n.i.	cf12		87

R₂-monosubstituierte Thiohydantoine					
					
Verbindung	Substituent R ₂	Rest-aktivität InhA [%]	Verbindung	Substituent R ₂	Rest-aktivität InhA [%]
tm345		85	cf17		n.i.
tm339		n.i.	tm336		85
tm348		97	tm416		88
tm361		n.i.	tm417		98
tm351		95	cf15		97

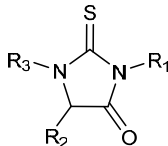
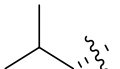

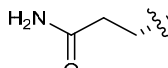

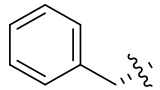

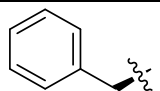

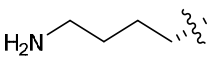

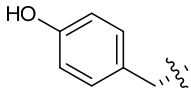

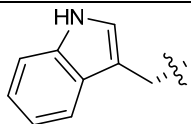


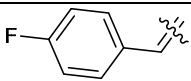
n.i. = no inhibition (keine Hemmung)

Insgesamt wurden 46 *C*-5-monosubstituierte Thiohydantoine getestet. Elf Verbindungen zeigten Hemmungen zwischen 20 % und 10 %. Unter ihnen war die Substanz tm355 mit einem *p*-Nitrobenzyliden-Rest mit 19 % Hemmung am potentesten. Zwölf Verbindungen zeigten Hemmungen bis 10 %. Die verbleibenden 23 Thiohydantoine hemmten die Aktivität von InhA nicht.

b) Mehrfach substituierte Thiohydantoine

Im Folgenden werden die Testergebnisse von weiteren einfach-, zweifach- und dreifachsubstituierten Thiohydantoinen dargestellt und besprochen (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Screeningergebnisse der mehrfach substituierten Thiohydantoine bei $[I] = 20 \mu\text{M}$. Gezeigt werden die Mittelwerte von Drei- bzw. Zweifachbestimmungen. Die Standardabweichungen betragen $\leq 10\%$. Messungen mit Abweichungen von $>10\%$ werden nicht berücksichtigt.

mehrfach substituierte Thiohydantoine				
				
Verbindung	Substituent			Restaktivität InhA [%]
	R ₁	R ₂	R ₃	
cf1-1	H			98
cf2	H			n.i.
cf5	H			n.i.
cf6	H			n.i.
cf8	H			n.i.
tm333	H			n.i.
cf9	H			95
I10			H	n.i.

n.i. = no inhibition (keine Hemmung)

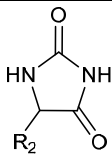
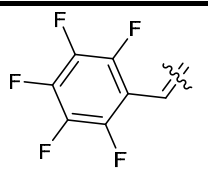
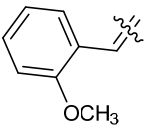
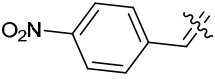
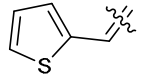
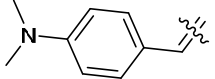
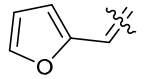
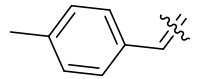
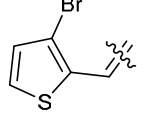
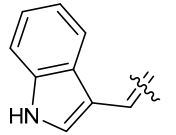
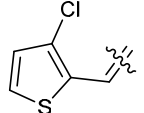
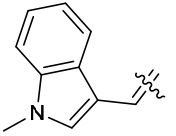
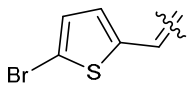
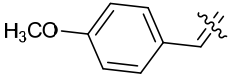
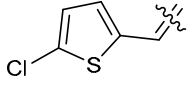
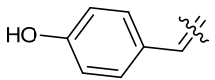
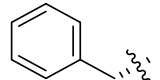
Insgesamt wurden acht verschiedene, aber mindestens zweifach substituierte Thiohydantoine getestet. Keine der Verbindungen zeigte eine nennenswerte Hemmung der Aktivität von InhA.

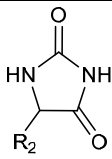
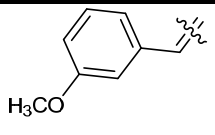
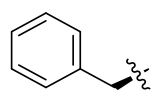
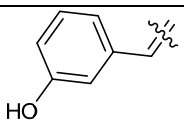
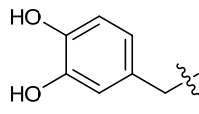
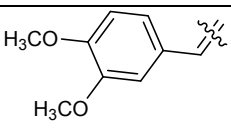
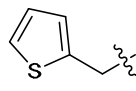
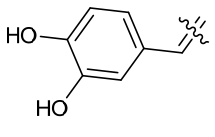
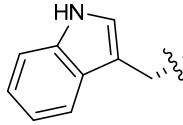
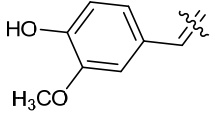
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass keine der getesteten Thiohydantoine die Aktivität von InhA mehr als 19 % hemmt.

4.1.5 Hydantoine

Die Strukturklasse der Hydantoine unterscheidet sich von den Thiazolidindionen durch das Ersetzen des Schwefelatoms an Position 1 im Heterozyklus durch ein Stickstoffatom. Es wurden ausschließlich Verbindungen mit unterschiedlichem Substitutionsmuster an Position 5 des Fünfrings getestet. Nachfolgend werden die Ergebnisse des InhA-Screenings für die Hydantoine tabellarisch dargestellt und erläutert (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18: Screeningergebnisse der Hydantoine bei [I] = 20 μ M. Gezeigt werden die Mittelwerte von Drei- bzw. Zweifachbestimmungen. Die Standardabweichungen betragen ≤ 10 %. Messungen mit Abweichungen von > 10 % werden nicht berücksichtigt.

Hydantoine					
	Verbindung	Substituent R ₂	Restaktivität InhA [%]	Verbindung	Substituent R ₂
tm385		n.i.	tm255		95
tm388		n.i.	tm384		n.i.
tm256		89	tm383b		83
tm366		97	tm381b		95
tm230		95	tm387		96
tm278		94	tm379		97
tm253b		n.i.	tm386		n.i.
tm270		n.i.	tm410		82

Hydantoine					
Verbindung	Substituent	Restaktivität InhA [%]	Verbindung	Substituent	Restaktivität InhA [%]
	R ₂			R ₂	
tm402		n.i.	tm409		82
tm397		n.i.	tm412		n.i.
tm382		n.i.	tm413		88
tm274		n.i.	tm411		98
tm254b		n.i.			

n.i. = no inhibition (keine Hemmung)

Insgesamt wurden 25 Derivate der Hydantoine getestet. Fünf Verbindungen zeigten Hemmungen < 18 %, acht Substanzen zeigten Hemmwerte < 10 % und zwölf Verbindungen zeigten überhaupt keine Hemmung. Eigenartigerweise zeigen vor allem die Verbindungen ohne exozyklische Doppelbindung moderate Hemmung (tm410, tm409 und tm413).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass keine der getesteten Hydantoine die Aktivität von InhA mehr als 18 % hemmt.

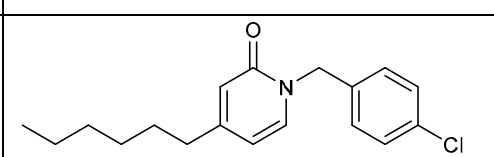
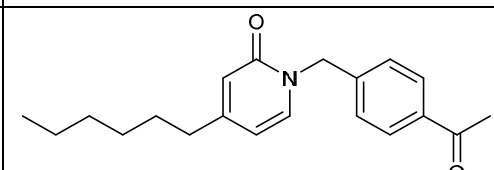
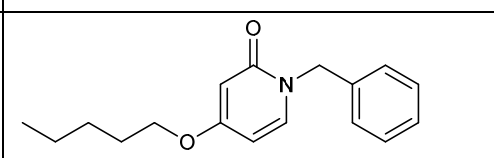
4.1.6 Weitere Strukturklassen

Nachfolgend werden weitere Strukturklassen als potenzielle Inhibitoren von InhA dargestellt und besprochen.

a) Pyridone

Die Pyridon-Derivate wurden für die Arbeitsgruppen von *Prof. Dr. C. Kisker* (Institut für Strukturbiologie, Rudolf-Virchow-Zentrum, Universität Würzburg) bzw. *Prof. P. Tonge* (Stony Brook University, New York) getestet. Die Pyridone sind strukturell von den Biphenylether-Derivaten abgeleitet und Inhalt aktueller Arbeiten zur Entwicklung neuer Inhibitoren der Enoyl-ACP Reduktase FabI in *E. coli* (siehe Tabelle 19).

Tabelle 19: Screeningergebnisse der Pyridone bei $[I] = 20 \mu\text{M}$. Gezeigt werden die Mittelwerte von Drei- bzw. Zweifachbestimmungen. Die Standardabweichungen betragen $\leq 10 \%$. Messungen mit Abweichungen von $>10 \%$ werden nicht berücksichtigt.

Verbindung	Strukturformel	Restaktivität InhA [%]
PT426		45
PT427		39
PT428		48

Alle getesteten Vertreter zeigten mittelstarke Hemmung der InhA.

b) Pyrrolidincarboxamide

Die Pyrrolidincarboxamide oder Pyrrolidoncarboxamide wurden von *He et al.* als potenzielle Inhibitoren von InhA entwickelt.^[77] In Tabelle 20 sind die Screening-Testergebnisse dargestellt.

Tabelle 20: Screeningergebnisse der Pyrrolidoncarboxamide bei [I] = 20 µM. Gezeigt werden die Mittelwerte von Drei- bzw. Zweifachbestimmungen. Die Standardabweichungen betragen ≤10 %. Messungen mit Abweichungen von >10 % werden nicht berücksichtigt.

Verbindung	Substituent		Restaktivität InhA [%]
	R ₁	R ₂	
I11			93
I12			92
I13			96

Von den hier getesteten Derivaten zeigte keines nennenswerte Hemmeigenschaften gegenüber der Aktivität von InhA.

c) Sulfonamide

Das einzige getestete Sulfonamid-Derivat mit Screening-Resultat ist nachfolgend dargestellt.

Die Verbindung zeigt eine moderate Hemmung von 24 % (siehe Tabelle 21).

Tabelle 21: Screeningergebnisse der Sulfonamide bei [I] = 20 µM. Gezeigt werden die Mittelwerte von Drei- bzw. Zweifachbestimmungen. Die Standardabweichungen betragen ≤10 %. Messungen mit Abweichungen von >10 % werden nicht berücksichtigt.

Verbindung	Strukturformel	Restaktivität InhA [%]
I14		76

d) Biphenylether

Die Biphenylether Triclosan und 6PP (PT04) wurden als Positivkontrolle zu Validierungszwecken des InhA-Testsystems verwendet. Die Testergebnisse und deren Diskussion befinden sich in Kapitel 2.3.3.d).

4.2 Ergebnisse des Screenings an parasitären Proteasen

Fünf stichprobenartig ausgewählte Vertreter der synthetisierten Thiazolidin-2,4-dione und Thiazolin-2-one wurden auf ihre inhibitorischen Eigenschaften gegenüber sechs verschiedenen Proteasen untersucht. Die Verbindungen dieser Stichprobe sind nachfolgend dargestellt (siehe Abbildung 66).

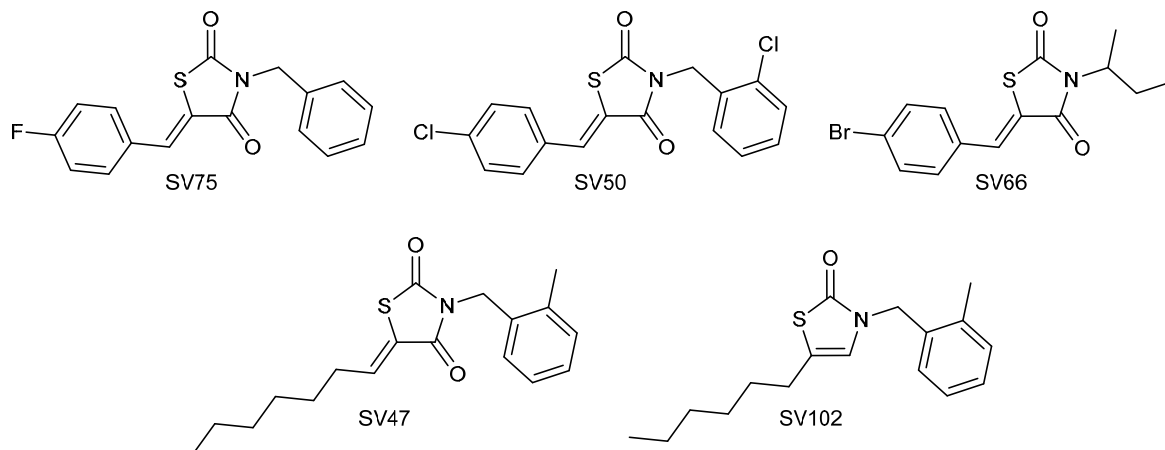


Abbildung 66: Stichprobe aus der Substanzbibliothek.

Die Substanzen wurden mit etablierten enzymatischen Protease-Assays (siehe Kapitel 8.5.2) an den nachfolgend beschriebenen Zielproteinen getestet. Rhodesain ist ein eiweißspaltendes Enzym mit der Aminosäure Cystein als Nucleophil im katalytischen Zentrum. Diese Cystein-Protease ist ein essenzielles Enzym von *Trypanosoma brucei rhodesiense*, dem Erreger der Afrikanischen Schlafkrankheit. Die lysosomalen Endoproteasen Cathepsin B und Cathepsin L sind ebenfalls Cystein-Proteasen und spielen bei der Verdauung von Zellbestandteilen eine wichtige Rolle. Die Überexpression dieser Enzyme wird mit Krebs- und Immunerkrankungen in Zusammenhang gebracht. Falcipain ist eine essenzielle Cystein-Protease des Parasiten *Plasmodium falciparum*, dem Erreger der Malaria *tropica*. LeishmaniaCPB ist eine dem Cathepsin L ähnliche Cystein-Protease, die in *Leishmania*-Parasiten vorkommt. Die *Dengue*-Protease ist eine Serin-Protease des *Dengue*-Virus. Die Ergebnisse dieser Testungen dienen ebenfalls zur Untersuchung der Selektivität zwischen Cystein- und Serinproteasen.

Zur Bestimmung der prozentualen Hemmung wurden Doppelbestimmungen bei Inhibitorkonzentrationen von 20 μM durchgeführt. In Tabelle 22 sind die daraus errechneten Mittelwerte aufgelistet.

Tabelle 22: Ergebnisse des Stichprobenscreenings bei einer Konzentration des Inhibitors von 20 μM . Gezeigt werden die Mittelwerte von Zweifachbestimmungen. Die Standardabweichungen betragen $\leq 10\%$. Messungen mit Abweichungen von $>10\%$ werden nicht berücksichtigt.

Verbindung	Enzym					Dengue-Protease
	Rhodesain	Cathepsin B	Cathepsin L	Falcipain	LeishmaniaCPB	
SV75	97	84	n.i.	89	84	98
SV47	97	92	n.i.	95	80	99
SV66	85	84	98	82	n.i.	90
SV50	91	81	77	73	91	64
SV102	16	4	29	27	58	38
Restaktivität [%]						

Die Verbindung SV102 weist starke bis mittelstarke Erniedrigungen der Aktivitäten bezogen auf die Aktivität ohne Inhibitor (DMSO-Wert) aller getesteten Proteasen auf. In einem weiteren Schritt wurden daher die IC_{50} -Werte bestimmt. In Abhängigkeit der Potenz wurden hierzu Verdünnungsreihen mit Konzentrationen an SV102 von 0–5, 0–10, 0–20 und 0–25 μM an den jeweiligen Enzymen getestet. In Tabelle 23 sind die durch Zweifachbestimmung ermittelten Werte mit den jeweiligen Standardabweichungen aufgelistet.

Tabelle 23: Ermittelte IC_{50} -Werte von SV102.

Verbindung	Enzym					Dengue-Protease
	Rhodesain	Cathepsin B	Cathepsin L	Falcipain	Leishmania CPB	
SV102	11.0 ± 0.7	1.3 ± 0.02	11.7 ± 1.8	11.3 ± 3.9	14.3 ± 1.6	19.5 ± 4.0
IC_{50} [μM]						

Insbesondere gegenüber Cathepsin B zeigte die Verbindung SV102 mit einem IC_{50} von $1.3 \pm 0.02 \mu\text{M}$ gute Hemmeigenschaften. Die Vermessung von Verdünnungsreihen des Inhibitors von 0–20 μM bei Substratkonzentrationen von 50, 100, 150 und 200 μM ermöglichten nun eine Aussage über den vorliegenden Hemmtyp zu machen. Mit Hilfe der Variablen [I], [S] und der Geschwindigkeit v wurde zuerst die Abhängigkeit der daraus ermittelten IC_{50} -Werte von der Substratkonzentration untersucht. Abbildung 67 zeigt als Beispiel die Umsatz-Zeit-Diagramme verschiedener Konzentrationen von SV102 bei einer Substratkonzentration von 100 μM . Wiederum wird durch lineare Regression aus den

Steigungen die Geschwindigkeit v erhalten und durch nicht-lineare Regression (Zwei-Parameter-Gleichung, siehe Kapitel 2.3.1) die jeweiligen IC_{50} -Werte bei den verschiedenen Substratkonzentrationen berechnet.

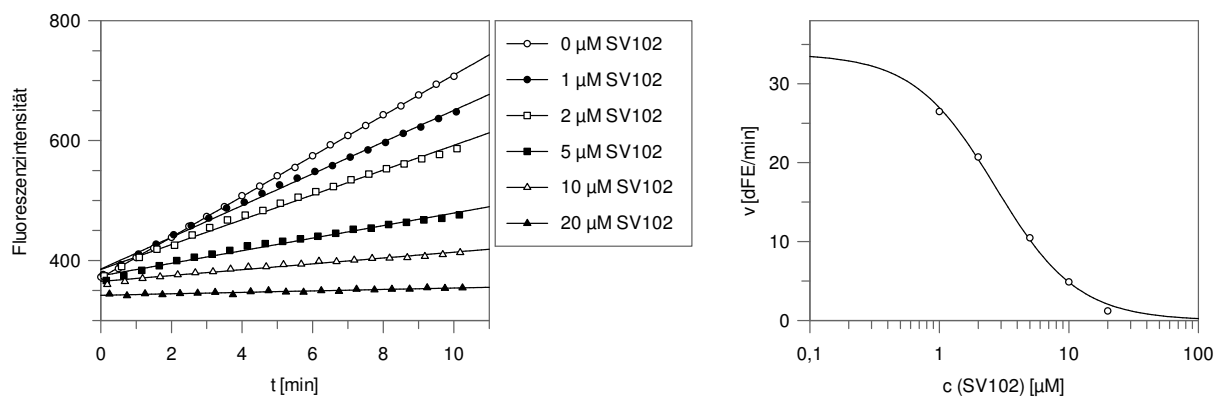


Abbildung 67: Umsatz-Zeit-Diagramme und die daraus resultierenden IC_{50} -Funktion beispielhaft bei einer Substratkonzentration von $100 \mu\text{M}$.

Man erkennt, dass die Umsatz-Zeit-Kurven für den Zeitraum von zehn Minuten annähernd linear verlaufen. Der Inhibitionsmechanismus ist daher zeitunabhängig und reversibel. Die Struktur von SV102 untermauert dieses Ergebnis. Der Fünfring ist nur unter Verlust seines aromatischen Charakters nucleophil angreifbar und zeigt daher keine strukturellen Gegebenheiten für eine irreversible Hemmung von Cystein- oder Serinproteasen. Die Hill-Koeffizienten der IC_{50} -Kurven deuten mit Werten um eins nicht auf eine unspezifische Hemmung durch Aggregatbildung hin. Die ermittelten IC_{50} -Werte sind bei den verwendeten Substratkonzentrationen annähernd gleich und somit substratunabhängig (siehe Tabelle 24).

Tabelle 24: IC_{50} -Werte von SV102 für Cathepsin B bei verschiedenen Substratkonzentrationen.

c (Substrat) [μM]	50	100	150	200
IC_{50} (SV102) [μM]	3.6 ± 0.03	2.9 ± 0.2	3.3 ± 0.3	2.8 ± 0.3

Es liegt folglich ein nicht-kompetitiver Hemmtyp vor. Die Bestimmung der kinetischen Parameter K_m , v_{\max} und K_i bei den verschiedenen Konzentrationen von SV102 war leider unmöglich, da bei einer Substratkonzentration von $200 \mu\text{M}$ bereits eine Substratüberschusshemmung vorliegt (siehe Abbildung 68). Bei $150 \mu\text{M}$ Substrat hingegen ist der Sättigungsbereich noch nicht erreicht. Eine valide Aussage über die Hemmparameter war somit nicht möglich. Fakt aber ist, dass die Unabhängigkeit des IC_{50} -Werts von der Substratkonzentration für nicht-kompetitive Hemmung spricht. Somit bindet SV102 mit gleicher Affinität an das freie Enzym als auch an den Enzym-Substrat-Komplex ($\alpha = 1$). Nach

Cheng-Prusoff gilt daher $IC_{50} = K_{iu} = K_{ic} = K_i = 1.3 \pm 0.02 \mu\text{M}$ (ermittelt aus Verdünnungsreihe von SV102 0–5 μM und $[S] = 100 \mu\text{M}$ siehe Tabelle 23).

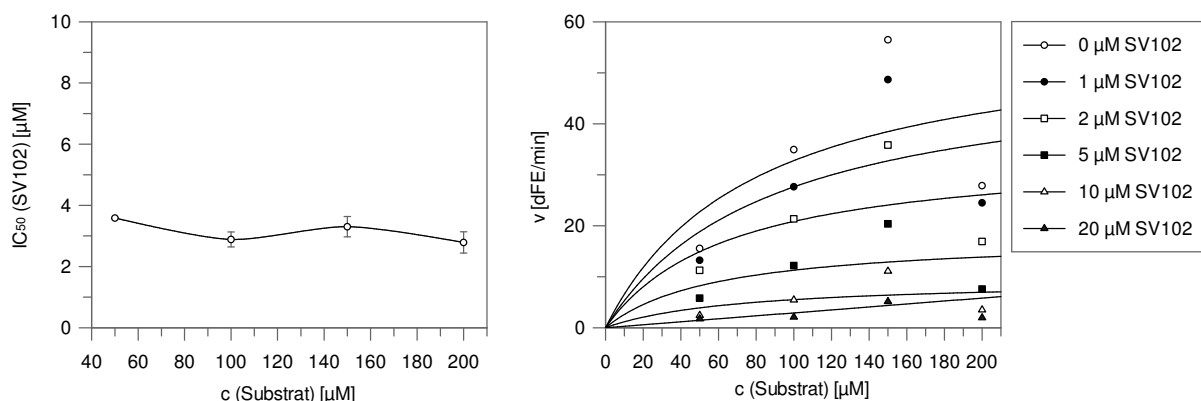


Abbildung 68: Die IC_{50} -Werte von SV102 sind substratunabhängig (links). Die *Michaelis-Menten*-Plots zeigen bei einer Substratkonzentration von 200 μM einen deutlichen Abfall der Geschwindigkeit (Substratüberschusshemmung, rechts).

Die Verbindung SV102 ist also ein nicht-kompetitiver Hemmstoff von Cathepsin B mit $K_i = 1.3 \pm 0.02 \mu\text{M}$. Die Synthese und Testung weiterer Thiazolin-2-on-Derivate sowie Co-Kristallisationsversuche mit Cathepsin B sind somit in Betracht zu ziehen. Zwar zeigt SV102 gegenüber der Cystein-Protease Cathepsin B die besten Hemmeigenschaften, doch ist die Verminderung der Aktivität der anderen Cystein-Proteasen mit IC_{50} -Werten zwischen 10 μM und 15 μM ebenfalls bemerkenswert, was durch die Testungen am Erreger bestätigt werden konnte (siehe Kapitel 4.3.3). Der berechnete IC_{50} -Wert von 19.5 μM gegenüber der Serin-Protease des *Dengue*-Virus‘ zeigt, dass keine nennenswerte Selektivität von SV102 zwischen Cystein- bzw. Serin-Proteasen vorliegt. Vergleicht man allerdings die inhibitorischen Eigenschaften des Thiazolinons SV102 bezüglich der Dehydrogenase InhA (rel. Hemmung 97 %) mit denen, die gegenüber den oben angeführten Proteasen bestimmt wurden, so ist eine deutliche Selektivität erkennbar.

4.3 Biologische Testungen

Im Rahmen des Sonderforschungsbereichs SFB630 *Recognition, Preparation and Functional Analysis of Agents against Infectious Diseases* kooperiert die Arbeitsgruppe Schirmeister (Teilprojekt A4) mit anderen interdisziplinären Teilprojekten, die u.a. biologische Testungen nach etablierten Arbeitsanweisungen (*SOP, Standard Operating Procedure*) an diversen Erregern durchführen. Zuständig hierfür sind *PD Dr. H. Bruhn* (Qualitätsmanagement), *Dr. T. Ölschläger* und *Prof. Dr. A. Stich* (Teilprojekt Z1) sowie *Prof. Dr. J. Morschhäuser* (Teilprojekt B2).^[135] Es wurde dieselbe Auswahl an Verbindungen der Substanzbibliothek (SV75, SV47, SV66, SV50 und SV102) getestet wie bei den Protease-Assays (siehe Kapitel 4.2). Nachfolgend sind die Testergebnisse für die jeweiligen Erreger dargestellt.

4.3.1 Testung am attenuierten *Mycobacterium tuberculosis*

Bei diesem Assay macht man sich den steigenden Sauerstoffverbrauch von wachsenden Tuberkelbakterien zu Nutze. In einem MGIT (*Mycobacteria Growth Indicator Tube*) Indikator-/Kultivierungsröhrchen befindet sich ein in Silikon eingebetteter Fluoreszenzfarbstoff. In Gegenwart von Sauerstoff erfolgt Fluoreszenzlöschung. Je besser das Mycobakterium in Gegenwart eines Hemmstoffes wachsen kann, desto größer sind der Sauerstoffverbrauch und folglich auch der Fluoreszenz-Zuwachs. Als Referenz wird ein Antibiotika-Cocktail aus Streptomycin (1.0 µg/ml), Isoniazid (0.1 µg/ml), Rifampicin (1.0 µg/ml) und Ethambutol (5.0 µg/ml) verwendet. Die getesteten Verbindungen wurden in einer Konzentration von 40 µM eingesetzt. Keine der getesteten Verbindungen zeigten hierbei inhibitorische Eigenschaften.

4.3.2 Antibakterielle Aktivität

Am Zentrum für Infektionsforschung (ZINF) Würzburg wurden Testreihen zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK oder *Minimum Inhibitory Concentration, MIC*) an verschiedenen Bakterienstämmen durchgeführt. Die MHK ist definiert als die niedrigste Konzentration einer Substanz, bei der makroskopisch keine Vermehrung eines Mikroorganismus‘ mehr wahrgenommen werden kann. Die Auswahl an Verbindungen der Substanzbibliothek wurde an folgenden Erregern getestet.

- *Staphylococcus aureus* (NCTC 8325)
- *Staphylococcus epidermidis* (RP62a)
- *Enterococcus faekalis* (JH212)
- *Enterococcus faecium* (6413)
- *Escherichia coli* (536)

- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Yersinia pseudotuberculosis* (252 01A)
- *Yersinia pestis* (KUMA)

Zusätzlich wurde die Biofilm- und Wachstumshemmung der Verbindungen auf den Bakterienstamm *Staphylococcus epidermidis* (RP62a) untersucht.

Keine der getesteten Substanzen zeigte hemmende Eigenschaften. Die bestimmten MHK-Werte lagen für alle Verbindungen über dem definierten Schwellenwert von 40 μM .

4.3.3 Antiparasitäre Aktivitäten und Zytotoxizitätstests

Die Antiparasitäre Aktivitäten der Verbindungen wurde an Promastigoten von *Leishmania major* und trypomastigoten Formen von *Trypanosoma brucei brucei* untersucht. Zudem wurde mit Hilfe eines Zytotoxizitätstests an Makrophagen (J774.1) untersucht, ob die hemmenden Eigenschaften der getesteten Verbindungen auf unspezifischer Zytotoxizität beruhen. Die Bildung des Quotienten aus den IC₅₀-Werten der Zytotoxizität und den IC₅₀-Werten an den Erregern wird als Selektivitätsindex (SI-Wert) definiert.^[136] Prinzipiell sollten gute Substanzen, die es lohnt, weiterzuentwickeln, Aktivitäten im unteren μM -Bereich zeigen bei natürlich möglichst geringer Toxizität. Einleuchtenderweise sollte der SI-Wert somit möglichst hoch sein. Bei Trypanosomen liegen die Richtwerte bei IC₅₀ < 1 μM und SI > 100. Bei Leishmanien ist man nicht ganz so kritisch. Ein SI-Wert von 20 bei den hier gemessenen Promastigoten (eigentlich das Insektenstadium) ist bereits akzeptabel. Die intrazellulär lebenden Amastigoten sind sogar oftmals empfindlicher. Gerade hier ist natürlich die geringe Zytotoxizität wichtig, um eine Schädigung der Wirtszelle zu verhindern. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind nachfolgend dargestellt (siehe Tabelle 25).

Tabelle 25: Gemessene antiparasitäre und zytotoxische Aktivitäten und die daraus ermittelten Selektivitätsindices.

Verbindung	<i>L. major</i>		<i>T. brucei</i>		<i>T. brucei</i>		Makroph.J774.1 IC ₅₀ [μM] (48 h)
	IC ₅₀ [μM] (48 h)	SI- Wert	IC ₅₀ [μM] (48 h)	SI- Wert	IC ₅₀ [μM] (72 h)	SI- Wert	
SV75	>100	1	13.3 \pm 2.2	7.5	17.5 \pm 0.2	5.7	>100
SV47	47.2	0.6	2.1 \pm 0.4	14.5	3.5 \pm 0.5	8.7	30.5
SV66	>100	1	15.4 \pm 2.8	6.4	16.1 \pm 1.0	6.2	>100
SV50	>100	1	n.d.	-	n.d.	-	>100

Verbindung	<i>L. major</i>		<i>T. brucei</i>		<i>T. brucei</i>		Makroph.J774.1 IC ₅₀ [μM] (48 h)
	IC ₅₀ [μM] (48 h)	SI- Wert	IC ₅₀ [μM] (48 h)	SI- Wert	IC ₅₀ [μM] (72 h)	SI- Wert	
SV102	69.5	0.8	2.5 ± 0.4	22.4	3.0 ± 0.3	18.7	56.1

Interessanterweise zeigt das Thiazolidindion SV75 eine Aktivität im unteren mikromolaren Bereich gegen *T. brucei*, die an der isolierten Protease Rhodesain nicht beobachtet werden konnte. Gegenüber Leishmanien konnte ebenfalls keine Hemmung ausgemacht werden. Die gegenüber Makrophagen scheinbar nicht nennenswerten zytotoxischen Eigenschaften (IC₅₀-Wert >100 μM), werden durch niedrige SI-Werte widerlegt. Analog verhält sich die Verbindung SV66. Das C-5-Alkyliden-Derivat SV47 zeigt Aktivitäten gegen Trypanosomen im unteren mikromolaren Bereich und gegen Leishmanien im mittleren mikromolaren Bereich. Zu beachten ist allerdings eine erhöhte Zytotoxizität und die damit einhergehenden kleinen SI-Werte. Die Verbindung SV50 zeigte keine nennenswerten Aktivitäten. Zu erwähnen ist hierbei allerdings, dass die Testung an Trypanosomen auf Grund von Löslichkeitsproblemen nicht durchführbar war. Die guten Hemmeigenschaften des Thiazolinons SV102 an den isolierten Proteasen konnte bei den Aktivitätsassays am Erreger bestätigt werden. Berücksichtigt man allerdings die oben definierten Richtwerte für den SI-Quotienten relativieren sich diese vielversprechenden Ergebnisse aufgrund einer erhöhten Zytotoxizität.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Strukturklasse der Thiazolidindione bzw. Thiazolinone als denkbare Hemmstoffe mit Optimierungspotenzial von Leishmanien und Trypanosomen in Betracht gezogen werden können, wobei die real existente Zytotoxizität bzw. zu geringe Selektivität zwingend berücksichtigt werden muss.

5 Diskussion und Ausblick

In diesem Kapitel werden weitere wichtige Inhalte diskutiert, die bei den detaillierten Diskussionen in den jeweiligen Kapiteln noch nicht abgehandelt wurden. Ebenso werden Ideen und Gedanken zu weiterführenden Experimenten angeführt. Im Mittelpunkt steht die wissenschaftliche Einordnung und Einschätzung der untersuchten verwandten Fünfringheterozyklen als potenzielle Leitstruktur für InhA-Inhibitoren und darüber hinaus.

Die Etablierung und Validierung des enzymatischen InhA-Assays war erfolgreich (siehe Kapitel 2). Die hierfür notwendige Expression und Aufreinigung von InhA konnte mit Hilfe eines optimierten Protokolls schnell, zuverlässig und in guten Ausbeuten durchgeführt werden. Zwei zuverlässige gekoppelte enzymatische Assay-Systeme mit UV-VIS-spektroskopischer bzw. fluorimetrischer Detektion wurden etabliert. Geeignete Bedingungen für die Verwendung von 96-Well-Mikrotiterplatten wurden ermittelt und ermöglichten die simultane Vermessung von bis zu acht Wells und somit einen hohen Durchsatz an Testungen bei kurzer Dauer. Als ungleich komplizierter stellte sich die notwendige Substratsynthese heraus, die letztlich als geschwindigkeitsbestimmender Schritt des gesamten Testverfahrens aufgefasst werden kann. Mehrere Synthese- und Aufreinigungsvarianten des Substrats 2toCoA wurden ausprobiert und miteinander kombiniert. Die daraus erhaltenen Informationen ermöglichten es, einen reproduzierbaren, wirtschaftlichen Herstellungsweg zu finden, der dem teuren Edukt CoA und der bestehenden Stabilitätsproblematik Rechnung trägt und ausreichende Ausbeuten liefert. Trotz allem bleibt die Darstellung von 2toCoA zeitaufwändig und erfordert ein nicht geringes Maß an Handfertigkeit. Denkbar wäre der Austausch der 2-*trans*-Octensäure z.B. durch die längerkettige 2-*trans*-Dodecensäure. Der daraus resultierende Thioester 2-*trans*-Dodecenoyl-CoA besitzt als Substrat eine wesentlich höhere Affinität zu InhA. Im Enzymassay könnte man dadurch erhebliche Mengen an Substrat einsparen. Bei gleichen Ausbeuten an längerkettigem Substrat könnten somit wesentlich mehr Messungen durchgeführt werden. Weiterhin wäre die Entwicklung eines enzymatischen Verfahrens zur Synthese des Thioesters in Betracht zu ziehen.^[89] Mit dem Hintergrund der komplexen Substratsynthese wurden grundlegende Experimente zur Errichtung einer substratlosen Testalternative mittels MSC durchgeführt. Ebenso sollte dadurch eine orthogonale Methode zu den photometrischen Assays etabliert werden, die eine Aussage über das thermodynamische Bindungsverhalten von Ligand und Enzym erlaubt. Neben den erforderlichen weiterführenden Experimenten zur MSC sollte daher ebenso die Einführung weiterer orthogonaler und substratunabhängiger Methoden wie SPR und ITC in Betracht gezogen werden.^[137,138]

Die Thiazolidindion- resp. Thiazolinon-Derivate der Substanzbibliothek konnten mit den beschriebenen Methoden allesamt problemlos dargestellt werden (siehe Kapitel 3). Die Reaktionsdauer der Synthese der Thiazolidindion-Derivate mit exozyklischer Doppelbindung im Sinne einer Knoevenagel-Reaktion könnte mit Hilfe einer Mikrowelle stark verkürzt werden. Somit könnte man innerhalb kurzer Zeit noch mehr Derivate darstellen und somit das kombinatorische Potenzial für die Erstellung einer großen Substanzbibliothek besser ausnutzen. In analoger Weise ließe sich die exozyklische Doppelbindung auch bei den anderen Fünfringheterozyklen wie z.B. den Rhodaninen mit Hilfe einer Mikrowelle einführen.^[80,139]

Letztlich umfasste die Substanzbibliothek 256 Substanzen, die dem InhA-Testverfahren unterzogen wurden (siehe Kapitel 4). Die Ergebnisse sind nachfolgend zusammenfassend dargestellt (siehe Tabelle 26).

Tabelle 26: Ergebnisse InhA-Screening Substanzbibliothek bei [I] = 20 µM.

Verbindungsklasse	relative Hemmung [%]
Thiazolidindione	< 30
Thiazolinone	n.i.
Rhodanine	< 20
Thiohydantoine	< 20
Hydantoine	< 20
Biphenylether	> 80
Pyridone	< 61
Pyrrolidoncarboxamide	< 10
Sulfonamid	24

n.i. = no inhibition (keine Hemmung)

In dieser Arbeit wurde das Hauptaugenmerk auf die Strukturklasse der Thiazolidindione und verwandter Fünfringheterozyklen gelegt. Leider zeigte keiner ihrer Vertreter zufriedenstellende Hemmeigenschaften. Dies machte die Ableitung von Struktur-Aktivitätsbeziehungen (SAR) ebenso schwierig wie Cokristallisationsversuche mit dem Enzym. Es stellte sich heraus, dass die exozyklische Doppelbindung am Fünfring essenziell für die Aktivität gegen InhA ist. Gleichfalls zeigen ausschließlich die disubstituierten Derivate eine nennenswerte inhibitorische Aktivität. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die strukturellen Abwandlungen zur Optimierung der Thiazolidindione als Leitstruktur potenzieller InhA-Inhibitoren nicht erfolgreich waren. Auf Grund der Testung einer

umfassenden Substanzbibliothek, die auch den Thiazolidindionen ähnliche Fünfring-Heterozyklen enthielt, lässt sich vielmehr feststellen, dass die Thiazolidindione als potenzielle Inhibitoren von InhA im Gegensatz zu den vielversprechenden Ergebnissen des virtuellen Screenings nicht geeignet erscheinen. Die Testungen am Erreger bestätigten diese Beobachtung. Die Ergebnisse bezüglich der Hemmeigenschaften gegenüber Proteasen und antiparasitärer Aktivität insbesondere der Thiazolinone sind aber vielversprechend und sollten daher weitergehend untersucht werden.

Die Strukturklasse der Thiazolidindione und verwandte Fünfringheterozyklen, insbesondere die Rhodanine, werden bezüglich ihrer Eignung als potenzielle Leitstrukturen bei Hochdurchsatz-Testungen (*High Throughput Screening, HTS*) in der medizinisch-chemischen Fachliteratur kontrovers diskutiert. *Baell et al.* klassifizieren die 5-Alkyliden-Rhodanine als sogenannte *pan assay interference compounds (PAINS)*,^[79,140] die ein promiskues Bindungsverhalten aufweisen und teils auf unspezifische Weise z.B. durch Aggregatbildung oder elektrophile Reaktivität an eine Vielzahl von Zielmolekülen binden (siehe Abbildung 69). Diese Eigenschaft führte in den letzten Jahren dazu, dass die Anzahl an Publikationen, bei denen Rhodanine als Leitstruktur aus *High-Throughput-Screening*-Kampagnien hervorgegangen sind, stark zunahm, im Verhältnis dazu aber die Anzahl an auf dieser Struktur basierenden zugelassenen Arzneistoffen minimal ist. Die Autoren gehen soweit, diese Verbindungsklasse als nutzlos in der Arzneistoffentwicklung einzustufen und folglich nicht bei HTS-Kampagnien zu berücksichtigen.

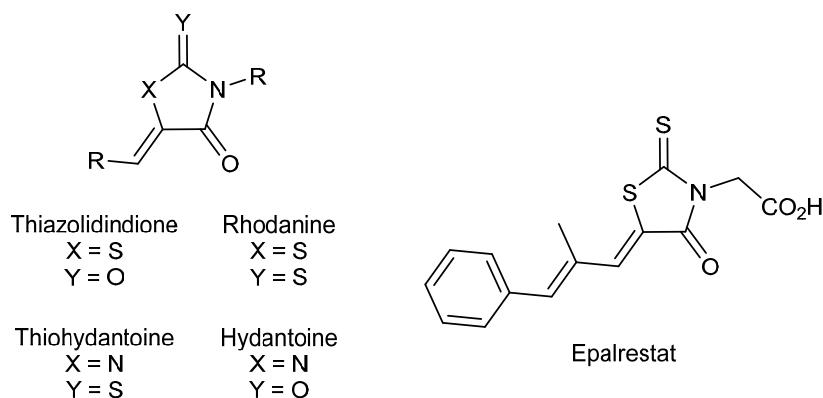


Abbildung 69: Thiazolidindione und verwandte Fünfringheterozyklen mit exozyklischer Doppelbindung als *pan assay interference compounds* und der Arzneistoff Epalrestat mit Rhodanin-Struktur.

Andererseits werden insbesondere die Rhodanine und verwandte Fünfringheterozyklen als eine sehr vielversprechende Strukturklasse angesehen.^[141] Zudem wird die vermeintlich negative Eigenschaft eine Affinität gegenüber zahlreichen Zielstrukturen zu besitzen in ein weitaus positiveres Licht gerückt, wenn ein polypharmakologischer Ansatz verfolgt wird.

Hierbei ist es als Vorteil anzusehen, wenn ein Molekül mit seinen strukturellen Eigenschaften in der Lage ist, mehrere Angriffspunkte wahrzunehmen.^[142] Ein gewisses Maß an Unselektivität muss folglich nicht zwangsläufig negativ sein. Zudem sollte es durch synthetische Abwandlung möglich sein, eine gewisse Feinabstimmung der Selektivität vorzunehmen. Gegen eine pauschale Ablehnung dieser Verbindungsklassen spricht zudem die Existenz von Arzneistoffen wie z.B. dem Aldose-Reduktase-Hemmer Epelrestat (siehe Abbildung 69) oder dem PPAR γ -Agonisten Pioglitazon (siehe Kapitel 2.3.3.d)), denen diese strukturellen Eigenschaften zugrunde liegen.

Von größter Wichtigkeit bei diesen Überlegungen ist allerdings die Frage, ob das promiske Bindungsverhalten dieser multiheterozyklischen Fünfringsysteme tatsächlich unspezifischer oder spezifischer Natur ist. Ersteres geschieht z.B. durch die Bildung von Aggregaten, die sich wiederum an die Oberfläche von Zielproteinen anlagern und zu einer unspezifischen Inaktivierung führen. Auch hochreaktive elektrophile Strukturelemente wie beispielsweise Michael-Systeme können durch ihre Reaktivität gegenüber Nucleophilen auf kovalente Art und unspezifischer Weise an Zielproteine binden. Kann man hingegen den genauen Bindemodus zwischen Ligand und Zielprotein beispielsweise mit Hilfe einer Cokristallisation und Röntgenstrukturaufklärung bestimmen und ist dieser auf molekularer Ebene durch Wasserstoffbrückenbindungen und anderen intermolekularen Wechselwirkungen erklärbar und nachvollziehbar, kann, sofern unspezifisches Bindungspotenzial ausgeschlossen worden ist, von spezifischen Bindungseigenschaften ausgegangen werden.

Mit Hilfe der aus den Testungen der umfassenden Substanzbibliothek erhaltenen Ergebnisse soll nun die Frage geklärt werden, ob sich die Thiazolidindione und ähnliche Heterozyklen tatsächlich als vielversprechende potenzielle Leitstrukturen eignen oder ob vielmehr von promiskem Bindungsverhalten ausgegangen werden muss.

Auch wenn sich die Ableitung von SAR ob der moderaten Hemmeigenschaften als schwierig gestaltete, so konnten doch gewisse Struktureigenschaften ausgemacht werden, die essenziell für eine Aktivitätsminderung erscheinen. Diese Beobachtung steht nicht im Einklang mit den Voraussetzungen für eine unspezifische Bindung. Weiterhin konnten deutliche Selektionsunterschiede zwischen der Dehydrogenase InhA und den untersuchten Proteasen beobachtet werden.

Unspezifisches Verhalten auf Grund von Aggregatbildung kann zumindest bei den Testungen an Proteasen ausgeschlossen werden, da gewisse Hemmeigenschaften beobachtet wurden, obwohl den Assay-Puffersystemen als Detergenz *Brij* zugesetzt wurde, welches allgemein

bekannt ist, die Bildung von Aggregaten zu verhindern. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Untersuchungen von *Klein et al.* mittels Dynamic Light Scattering (DLS), einer analytischen Methode zur Bestimmung von Partikelgrößen in Lösungen. Hierbei konnte eine Tendenz zur Aggregatbildung der verwandten Fünfringheterozyklen nahezu ausgeschlossen werden.^[80]

Die exozyklischen Doppelbindung des Fünfrings hingegen, die zusammen mit der Keto-Gruppe ein *Michael*-System bildet, sollte die Möglichkeit eines nucleophilen Angriffs theoretisch denkbar machen. Hierdurch wäre wiederum die strukturelle Grundlage für Unspezifität geschaffen. *Klein et al.* konnten allerdings nach Inkubation ähnlich strukturierter Fünfringsysteme mit Glutathion keine Reaktion beobachten.^[80] Sie begründen die fehlende Elektrophilie des *Michael*-Systems bzw. das Ausbleiben eines nucleophilen Angriffs mit der daraus resultierenden Zerstörung des aromatischen Charakters des Ringsystems. Eine Reaktion an dieser Position scheint daher ungünstig zu sein. Die durchgeführten Testungen in dieser Arbeit deuten ebenfalls nicht auf ein Vorliegen irreversibler Hemmmechanismen hin, weder im InhA-Assay noch in den Protease-Assays.

In einer breit angelegten Analyse von publizierten Cokristallstrukturen konnten Strukturmerkmale der verwandten Fünfringheterozyklen aufgefunden werden, die für Ligand-Protein-Wechselwirkungen essenziell sind. Darunter befinden sich beispielsweise der durch die exozyklische Doppelbindung bedingte aromatische Charakter der Heterozyklen, aber auch das Wasserstoffbrückenbindungspotenzial der Thiocarbonyl- bzw. carbonyl-Gruppe.^[80]

Die obigen Ausführungen deuten also vielmehr darauf hin, dass es sich eben nicht um unspezifisches Bindungsverhalten handelt, sondern dass die promiskuen Eigenschaften dieser Verbindungsklassen vielmehr auf den strukturellen Merkmalen auf molekularer Ebene beruhen, die eine Vielzahl von intermolekularen WW ermöglichen.

Den *Docking*-Berechnungen zur Folge, spielen diese Strukturmerkmale bei den Wechselwirkungen mit der InhA-Bindetasche ebenso eine wichtige Rolle. Ob die Bindetasche aber tatsächlich auf die berechnete Art und Weise adressiert wird ist fragwürdig, da die synthetischen Abwandlungen, die gerade diese WW-Eigenschaften verbessern sollten, zu keiner verbesserten Hemmung führten. Letztlich ließe sich in dieser Arbeit der Verdacht auf Unselektivität nur durch Cokristallisationsversuche mit anschließender Röntgenstrukturaufklärung sicher ausschließen. Auch für weitere *Docking*-Simulationen wären die daraus erhaltenen Informationen unabdingbar. Die zu geringe Affinität der

Thiazolidindione und ähnlich strukturierter Fünfringheterozyklen an InhA ließen derart Kristallisations-Experimente aber leider nicht zu. Ein sicherer Beweis von Selektivität macht also eine große Affinität idealerweise im nanomolaren Bereich notwendig. Es bleibt spekulativ, ist aber anzunehmen, dass die in der vorliegenden Arbeit untersuchten substituierten Fünfringheterozyklen schlicht zu klein sind und somit als ausbaufähige Strukturbausteine aufzufassen sind. Ansätze zur Vergrößerung der Molekülstruktur und einer damit einhergehenden Erweiterung des molekularen Interfaces sind denkbar. Hierfür spricht ebenfalls die Tatsache, dass nur disubstituierte Vertreter eine inhibitorische Aktivität aufweisen.

Zwar sind die getätigten Überlegungen nicht hinreichend, um Unselektivität und unspezifisches Bindungsverhalten mit letzter Sicherheit auszuschließen, schlussendlich überwiegen aber die Hinweise für das Vorliegen von Selektivität und damit einhergehender spezifischer Bindungsweise. Die Frage nach der Eignung von Thiazolidindionen und verwandten Fünfringheterozyklen als potenzielle Leitstruktur *per se* kann auf Grund der in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen und Schlussfolgerungen im Einklang mit den Erkenntnissen von *Klein et al.* wie folgt beantwortet werden: Aus medizinisch-chemischer Sicht wäre es falsch, die Thiazolidindione und verwandte Fünfringheterozyklen von der modernen Arzneistoffentwicklung auszuschließen. Vielmehr sollten sie als attraktive und ausbaufähige Strukturbausteine betrachtet werden, die eine bemerkenswert hohe Dichte an intermolekularen Wechselwirkungspunkten besitzen. Gleichwohl sollte die Kenntnis dieser Eigenschaften, insbesondere bei Vorliegen von moderaten Affinitäten, vor einer Überinterpretation und vorschneller Akzeptanz als Leitstruktur warnen.

6 Zusammenfassung

Weltweit zählt die Tuberkulose zu den tödlichsten und am weitesten verbreiteten Infektionskrankheiten. Missstände in der ohnehin komplexen Therapie einerseits und fehlende Entwicklung neuartiger adäquater Wirkstoffe andererseits, führten zur Entstehung von multi- und sogar total-resistenten Keimen. Der Haupterreger ist das *Mycobacterium tuberculosis*. Charakteristisch für Mykobakterien ist eine dicke und undurchlässige wachsartige Zellwand mit einem großen Anteil an bestimmten Fettsäuren. Die mykobakterielle Biosynthese dieser Fettsäuren unterscheidet sich stark von eukaryotischen Zellen. Die selektive Beeinflussung dieses Systems führt zu nicht überlebensfähigen Mykobakterien und stellt somit ein idealer Angriffspunkt für Arzneistoffe dar.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Entwicklung neuartiger direkter Hemmstoffe von InhA, einem für den Zellwandaufbau des *Mycobacterium tuberculosis* essenziellem Enzym.

Es wurden zwei photometrische gekoppelt-enzymatische **Assay-Systeme** im 96-Well-Format entwickelt, die sich das Absorptions- bzw. Fluoreszenzverhalten des Coenzym NADH zu Nutze machen.

Das hierzu benötigte Enzym InhA wurde überexprimiert und aufgereinigt. Mehrere Synthesemethoden für das im Testverfahren verwendete **Substrat** 2-*trans*-Octenoyl-CoA (2toCoA) wurden etabliert.

Die etablierten Assay-Systeme wurden mit Hilfe von **Positivkontrollen** validiert. Grundlegende Experimente zur Errichtung einer substratunabhängigen orthogonalen Methode mittels MST wurden getätigt.

Basierend auf den Ergebnissen eines in Vorarbeiten durchgeführten **virtuellen Screenings** wurden erste potenzielle Inhibitoren kommerziell erworben und getestet. Nachfolgend wurde mit der Synthese von Derivaten begonnen, welche auf iterativem Wege optimiert wurden (Testung – Docking – Synthese neuer Derivate). Hierdurch wurde eine umfassende **Substanzbibliothek** bestehend aus insgesamt 254 Verbindungen aufgebaut. Diese setzte sich aus unterschiedlich substituierten Thiazolidin-2,4-dionen- und Thiazolin-2-on-Derivaten, Derivaten der ähnlich strukturierten Fünfring-Heterozyklen Rhodanine, Thiohydantoine und Hydantoine und weiteren Strukturklassen bestehend aus Biphenylether-, Pyrrolidoncarboxamid-, Pyridon- und Sulfonamid-Derivaten zusammen. Die Verbindungen wurden entweder selbst synthetisiert, kommerziell erworben oder von Kooperationspartnern bezogen. Neben der Etablierung zuverlässiger und effizienter Syntheserouten stand hierbei

ebenso die strukturelle Aufklärung der stereochemischen Verhältnisse der Produkte im Mittelpunkt.

Die Verbindungen der aufgebauten Substanzbibliothek wurden mit dem etablierten InhA-Testsystem auf ihre inhibitorischen Eigenschaften gegenüber InhA untersucht. Soweit möglich wurden Struktur-Aktivitätsbeziehungen abgeleitet. Insbesondere einige disubstituierte Thiazolidindione zeigten eine schwache Hemmung von bis zu 25 %. Die zur Aufklärung des Inhibitionsmechanismus durchgeführten Experimente deuten auf eine unkompetitive Hemmung hin. Bei den direkten Testungen an Mykobakterien konnten die inhibitorischen Eigenschaften hingegen nicht bestätigt werden.

Weiterhin wurden Testungen an Cystein- und Serin-Proteasen von Erregern anderer Infektionskrankheiten durchgeführt. Das Thiazolinon SV102 wurde hierbei als nicht-kompetitiver Hemmstoff von Cathepsin B mit einem K_i -Wert von 1.3 μM identifiziert. Die Synthese und Testung weiterer Thiazolin-2-on-Derivate sowie Cokristallisationsversuche mit Cathepsin B sind somit in Betracht zu ziehen. Die getesteten Thiazolidindion-Derivate der Substanzbibliothek zeigten hierbei mittelstarke bis gute Hemmeigenschaften, die ebenfalls an den Erregern beobachtbar waren. Relativiert werden diese vielversprechenden Ergebnisse allerdings durch eine ebenfalls zu beobachtende Zytotoxizität. Weiterhin konnte eine antibakterielle Wirkung der untersuchten Verbindungen in zellulären Assay-Systemen nicht gezeigt werden.

Abschließend wurde die Eignung der Thiazolidindione und verwandter Fünfringheterozyklen als Leitstruktur für potenzielle InhA-Inhibitoren, aber auch die Eignung dieser Verbindungsklasse als potenzielle Leitstruktur *per se* diskutiert.

7 Summary

Tuberculosis is one of the most deadly infectious diseases and it is highly prevalent worldwide. The issues arising from the complexity of the current treatments schemes as well as the lacking development of effective new drugs have led to the formation of multi- or even totally drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* which is known as the major microbial species causing tuberculosis.

Mycobacteria are characterized by a unique, thick and waxy cell wall that functions as a nearly impermeable barrier due to its high concentration of mycolic acids. The biosynthesis of these fatty acids requires the presence of a specific set of mycobacterial enzymes that differ markedly from their eukaryotic counterparts. Disturbance in the proper formation of this essential cell wall invariably interferes with mycobacterial survival. Thus, the mycobacterial fatty acid synthesis pathway is an attractive target for the development of selective new drugs against *Mycobacterium tuberculosis*.

The aim of this work was the synthesis and optimization of thiazolidindiones and related five membered heterocycles as lead structures for the development of novel, direct inhibitors of InhA, an essential enzyme in the biosynthesis of mycolic acids.

Two coupled photometric enzyme assays that monitor the absorption of the involved cofactor NADH were developed in a 96-well-plate format. For this purpose, the enzyme InhA was recombinantly expressed and purified from *E.coli*. Several routes of synthesis for its substrate 2-*trans*-octenoyl-CoA were established.

Assay systems were validated by characterizing positive controls known from the literature, and an orthogonal analysis method was introduced by using microscale thermophoresis.

Thiazolidindiones as lead compound structure were discovered by performing a virtual screening campaign in preliminary works. Several substances were commercially acquired and tested in the established InhA-assay-system. Based on these results the syntheses of further compounds were started and optimized in an iterative manner (testing – docking – synthesis of new derivatives). Thus, a large compound library of 254 substances was built up. It consists of different substituted thiazolidindiones, thiazolinons and related five membered heterocycles such as rhodanines, thiohydantoines and hydantoines as well as further compound classes, namely, derivatives of biphenylethers, pyrrolidincarboxamides, pyridines and sulfonamides. The compounds were either synthesized, received from collaboration partners, or acquired commercially. Concerning the synthetic work, the focus was on

developing effective routes of synthesis, elucidating reaction mechanisms and determining the stereochemical properties of the received products.

The compound library was subsequently tested against InhA by using the previously established assay systems. As far as possible, structure-activity relationships were derived. In particular, some disubstituted thiazolidindiones showed moderate inhibitory properties of up to 25 % when tested against the purified enzyme. Kinetic experiments performed to obtain information about the mode of inhibition indicated that thiazolidinediones acted as uncompetitive inhibitors of InhA. However, these results could not be confirmed in direct measurements using mycobacteria.

Further measurements against various cysteine- and serine-proteases were performed. The thiazolinone SV102 was identified as non-competitive inhibitor of cathepsin B ($K_i = 1.3 \mu\text{M}$). Consequently, synthesis of new derivatives as well as co-crystallization experiments should be taken into consideration. Thiazolidinedione derivatives also showed proper inhibition of isolated proteases. This inhibitory activity also was also observed in direct measurements against trypanosoma and leishmania but was actually accompanied by a certain extent of cytotoxicity.

Finally, the question was addressed of whether thiazolidindiones and related five membered heterocycles should be seen as a privileged scaffold in drug development, or just as promiscuous binders that should be excluded from drug discovery.

Experimenteller Teil

8 Experimentaltail

8.1 Verwendete Messgeräte und Arbeitsmittel

8.1.1 Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden an einem Schmelzpunktgerät SMP3 der Firma *Stuart* in offener Kapillare gemessen. Die angegebenen Werte sind in °C angegeben und unkorrigiert.

8.1.2 Mikrowelle

Es wurde eine Mikrowellenapparatur Ethos 1600 der Firma *MLS GmbH* verwendet.

8.1.3 Gefriertrocknung

Es wurde ein Lyophilisator Alpha 1-4 LD Plus der Firma *Christ* verwendet.

8.1.4 Spektroskopische Methoden

a) Infrarotspektroskopie (IR)

Alle IR-Spektren wurden unverdünnt an einem PharmalyzIR FT-IR-Spektrometer der *Fa. Bio-Rad* mittels einer diamondATR-Einheit aufgenommen. Die Angabe der Werte erfolgt in Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]. Die Intensitäten der Signale werden durch folgende Abkürzungen angegeben: s = stark, m = mittelstark, w = schwach, br = breit.

b) Kernresonanzspektroskopie ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$)

Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgte an einem AVANCE 400 MHz Spektrometer der *Fa. Bruker Biospin GmbH*. Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm und die Kopplungskonstanten J in Hertz (Hz) angegeben. Als interner Standard dienten bei allen Spektren das Tetramethylsilan mit $\delta(\text{TMS}) = 0.00$ ppm bzw. die Resonanzsignale der Restprotonen der eingesetzten deuterierten Lösungsmittel CDCl_3 ($^1\text{H-NMR}$: $\delta = 7.26$ ppm, $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 77.16$ ppm), MeOD-d_4 ($^1\text{H-NMR}$: $\delta = 3.31$ ppm, $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 49.05$ ppm), DMSO-d_6 ($^1\text{H-NMR}$: $\delta = 2.50$ ppm, $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 39.52$ ppm) und D_2O ($^1\text{H-NMR}$: $\delta = 4.79$ ppm). Alle Messungen erfolgten bei einer Temperatur von 300 K. Die ^{13}C -Spektren wurden ^1H -breitbandentkoppelt oder „Gated Decoupled“ aufgenommen. Signalzuordnungen wurden durch $^1\text{H},^1\text{H-COSY}$ -, $^{13}\text{C},^1\text{H}$ -Korrelationsexperimente (HMQC bzw. HMBC) und DEPT-135-Experimente unterstützt. Die Multiplizitäten der Signale werden durch folgende Abkürzungen wiedergegeben: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, dd = Dublett vom Dublett, dt = Dublett vom Triplett, ddd = Dublett vom Dublett vom Dublett, q = Quartett, qu = Quintett, sex = Sextett, sep = Septett, m = Multipllett und b = breit.

c) Massenspektrometrie

Die LC/MS-Analysen und die Aufnahmen der ESI-Massenspektren erfolgten an einer Agilent 1100 LC/MSD-Trap ausgerüstet mit einem HPLC-System 1100 von *Agilent*. Die Analyse der Reinheit der Verbindungen wurde durch LC-MS ermittelt. Dafür wurden eine *Phenomenex* Jupiter Proteo 90 Å RP C18-Säule (2.0 x 150 mm, 4 µm) und eine *Phenomenex* Gemini 110^a C18-Säule (2.0 x 150 mm, 5 µm) verwendet. Als Standard-Fließmittel wurden Mischungen aus Millipore[®]-Wasser mit 0,1 % Ameisensäure (Fließmittel A) und Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure oder Methanol und 0,1 % Ameisensäure (Fließmittel B) bei einer Flussrate von 600 µl/min verwendet. Die Detektion wurde mittels eines UV-VIS-Detektors bei Wellenlängen von 215 nm und 254 nm durchgeführt. Standardmäßig betrug die Kapillarspannung 2,6 kV und als Trockengas wurde N₂ verwendet. Die Verbindungen wurden im positiven oder negativen Modus vermessen. Angegeben werden die bei der LC/MS erhaltenen Retentionszeiten R_t in Minuten und die Reinheiten in Prozent der Fläche des Produktpeaks bezogen auf die Gesamtfläche aller auftretenden Peaks.

d) UV-VIS-Spektroskopie/Fluorimetrie

Die fluorimetrischen Messungen wurden an einem Cary Eclipse Fluorimeter der Firma *Varian* mit Mikroplattenleser- und Heizeinheit durchgeführt.

Die UV-VIS-spektroskopischen Messungen wurden an einem Appliscan Plattenlesegerät der Firma *ThermoFisherScientific* und an einem UV-VIS-Spektrophotometer *Varian Cary 50 Bio* der Firma *Varian* durchgeführt.

8.1.5 Chromatographische Methoden

a) Dünnschichtchromatographie (DC)

Es wurden Fertigfolien aus Aluminium, beschichtet mit 0.20 mm Kieselgel 60 F254 bzw. Kieselgel RP C18 der Firma *Merck* verwendet. Zur Detektion der Substanzen dienten die Fluoreszenzlöschung bei 254 nm, die Eigenfluoreszenz bei 366 nm, sowie das Anfärbeverhalten der Substanzen gegenüber Ioddampf, gesättigter wässriger Kaliumpermanganat-Lösung, Hydroxylamin-/FeCl₃-Reagenz, *Ellmans*-Reagenz und halbkonzentrierter Schwefelsäure. Die Zusammensetzungen der Laufmittel sind in Volumenprozent angegeben.

b) Säulenchromatographie (SC)

Als Säulenfüllmaterial wurde Kieselgel 60 (0.063–0.2 mm) oder Kieselgel 60 (35–63 µm) der Firma *Merck* verwendet. Die Säulen wurden nass befüllt. Die Zusammensetzungen der Laufmittel sind in Volumenprozent angegeben. Abhängig vom Trennproblem wurden Säulen

verschiedener Durchmesser und Länge verwendet. Die Proben wurden als hochkonzentrierte Lösungen oder auf Kieselgel aufgezogen aufgetragen.

c) Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

Es wurde das HPLC-System *ProStar* der Firma *Varian* verwendet, das analytisch und präparativ betrieben werden kann. Es besteht aus drei Pumpen (*Prep Star Modell 218*), einem Autosampler (*Pro Star Modell 410*), einem Fraktionssammler (*Pro Star Modell 701*), einem UV-VIS-Detektor (*Pro Star Modell 325*) sowie der *Software Galaxie Chromatography Data System Version 1.9.3.2*.

8.1.6 Verwendete Chemikalien, Lösemittel und Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien und Lösemittel wurden von *Alfa Aesar*, *Bachem*, *Acros*, *Sigma Aldrich*, *Fluka*, *Hartenstein*, *Clariant*, *Carl Roth* oder *Merck*, das Coenzym A- Trinatriumsalz von *Wako Chemicals* bezogen. Alle verwendeten Lösemittel wurden zuvor durch Destillation gereinigt und getrocknet (KOH, Molekularsieb 3 Å und 4 Å, CaCl₂, Na₂SO₄, K₂CO₃). Absolute Lösungsmittel wurden durch mehrstündiges Refluxieren über gängigen Trockenmitteln (Natrium, Kalium, P₄O₁₀, K₂CO₃) nach Literaturangaben hergestellt und anschließend über Molekularsieb 3 Å bzw. 4 Å oder KOH unter Schutzgasatmosphäre aufbewahrt. Das Molekularsieb wurde zuvor mit Hilfe der Mikrowelle aktiviert. Als Schutzgas wurde Argon verwendet, welches zuvor durch ein mit P₄O₁₀ befülltes Trockenrohr getrocknet wurde.

Ellmanns Reagenz:

12.11 g DTNB (5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure, *Ellmans* Reagenz) wurden in 50.0 ml TRIS-Puffer 0.5 M pH 8 gelöst. Die leicht gelbliche Lösung wurde unter Lichtausschluss im Kühlschrank gelagert und zur Reaktionskontrolle entweder getüpfelt oder auf die entwickelte DC-Platte gesprüht.

Hydroxylamin-/FeCl₃-Sprühreagenz:

- 1) 20.0 ml wässrige Hydroxylaminlösung 14 % wurden mit 8.5 ml Natronlauge 14 % versetzt.
- 2) 2.5 g FeCl₃ wurden in 50.0 ml 1.2 M Salzsäure gelöst.

Die mit der Hydroxylamin-Lösung besprühte DC-Platte wurde nach zwei Minuten mit der FeCl₃-Lösung besprüht. Die Detektion erfolgte durch kurzes Erhitzen auf 130 °C.

8.2 Allgemeine synthetische Methoden

8.2.1 Methode A: Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von *N*-3-substituierten Thiazolidin-2,4-dion-Derivaten

a) Methode A1: *N*-Benzylisierung von Thiazolidin-2,4-dion

1.0 Äq. Thiazolidin-2,4-dion wurden in mit Molekularsieb 4 Å getrocknetem DMF unter Rühren gelöst. Die Reaktionsmischung wurde mit Hilfe eines Eisbades auf 0 °C abgekühlt und nach Zugabe von 3.0 Äq. Kaliumcarbonat weitere zehn Minuten gerührt. Zu der trüben Reaktionssuspension wurden 1.0 Äq. des substituierten Benzylbromids langsam zugetropft. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wurde für weitere 5 Stunden gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in das etwa 20-fache Volumen an Eiswasser überführt, mit etwa dem 5-fachen Volumen an *n*-Hexan überschichtet und gut umgeschüttelt. Nach Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C über Nacht bildeten sich abhängig vom Substitutionsmuster des eingesetzten Benzylbromids feste oder flüssige Niederschläge. Abhängig von der Beschaffenheit und falls nötig wurde das Rohprodukt umkristallisiert oder säulenchromatographisch aufgereinigt.

b) Methode A2: *N*-Alkylierung von Thiazolidin-2,4-dion

1.0 Äq. Thiazolidin-2,4-dion wurden in mit Molekularsieb 4Å getrocknetem DMF unter Rühren gelöst. Die Reaktionsmischung wurde mittels eines Eisbades auf 0 °C abgekühlt und nach Zugabe von 3.0 Äq. Kaliumcarbonat weitere zehn Minuten gerührt. Zu der trüben Reaktionssuspension wurden 1.0 Äq. des substituierten Alkylhalogenids langsam zugetropft. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wurde für weitere 24 Stunden gerührt. Es wurde demineralisiertes Wasser hinzugefügt und mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit wässriger Ammoniumchlorid-Lösung 10 % und halbgesättigter wässriger Natriumchloridlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Der Feststoff wurde abfiltriert und das Lösemittel des Filtrats im Vakuum entfernt. Falls nötig wurde das flüssige Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt.

Variationsmöglichkeit: Anstelle von 3.0 Äq. K₂CO₃ kann 1.0 Äq. NaH verwendet werden.

8.2.2 Methode B: Allgemeine Vorschrift zur Umsetzung von 2,4-Thiazolidindionen mit Aldehyden und Piperidinkatalyse im Sinne einer *Knoevenagel*-Reaktion

a) Methode B1: Synthese von 5-Benzyliden-3-Alkyl-2,4-Thiazolidindion-Derivaten

1.0 Äq. des *N*-substituierten 2,4-Thiazolidindions (siehe Methode A) wurden in Ethanol gelöst. Dem Reaktionsgemisch wurden sukzessive 0.7 Äq. Piperidin und 1.1 Äq. des jeweiligen Aldehyds zugegeben und anschließend für 24 Stunden unter Rückfluss erhitzt.

Nach Abkühlung auf Raumtemperatur, optionalem Einengen der organischen Phase unter vermindertem Druck und Lagerung bei 4 °C im Kühlschrank wurde der entstandene Niederschlag abfiltriert, mit Ethanol nachgewaschen und anschließend im Exsikkator über P₂O₁₀ im Vakuum getrocknet. Wenn nötig wurde das Produkt aus Ethanol umkristallisiert oder säulenchromatographisch aufgereinigt.

b) Methode B2: Synthese von 3-Alkyl-5-Alkyliden-2,4-Thiazolidindion-Derivaten mit langkettigen aliphatischen Aldehyden

1.0 Äq. des *N*-substituierten 2,4-Thiazolidindions (siehe Methode A) wurden in Ethanol gelöst. Dem Reaktionsgemisch wurden sukzessive 0.7 Äq. Piperidin und 1.1 Äq. des jeweiligen Aldehyds zugegeben und anschließend für 24 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Kühlung auf 0 °C mit Hilfe eines Eisbades wurde 0.5 M wässrige Salzsäure hinzugefügt, das Reaktionsgemisch in 15 ml Falcon-Tubes aliquotiert und mit kaltem demineralisiertem Wasser überschichtet. Es wurde gut durchgeschüttelt, die entstandene Emulsion mit 4400 rpm für 90 Minuten zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der hochviskose ölige Niederschlag wurde mit kaltem demineralisiertem Wasser und mit Petrolether gewaschen, wobei der jeweilige Überstand abdekantiert wurde. Die zurückbleibende milchige Emulsion wurde anschließend im Vakuum und Ausbildung eines hochviskosen Öls getrocknet. Wenn nötig wurde das Produkt durch Säulenchromatographie aufgereinigt.

8.2.3 Methode C: Synthese von 3,5-Alkylthiazolidin-2,4-dion-Derivaten

a) Methode C1: Katalytische Hydrierung von 5-Alkyliden-3-Alkylthiazolidin-2,4-dion-Derivaten

50.0 mg SV_75/SV_80 wurden in 5 ml Ethylacetat gelöst, mit 10 mg Pd-C versetzt und mit H₂ bei 10 bar und Raumtemperatur 50 Stunden hydriert. Das Reaktionsgemisch wurde über Celite® filtriert und mit Ethylacetat gut nachgewaschen. Anschließend wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt.

b) Methode C2: C-5-Alkylierung von 3-Alkylthiazolidin-2,4-dion-Derivaten

Zu einer Lösung von 1.0 Äq. (4.20 mmol) 3-Alkylthiazolidin-2,4-dion, die durch ein Aceton-/Trockeneisbad auf -78 °C gekühlt wurde, wurden 2.0 Äq. (8.40 mmol) *n*-Butyllithium getropft und anschließend 15 Minuten gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Hilfe eines Eisbades auf 0 °C erwärmt und für weitere 30 Minuten gerührt. Mit einem Aceton-/Trockeneisbad wurde erneut auf -78 °C gekühlt und 1.0 Äq. (4.20 mmol) Alkylbromid

zugegeben. Nach 30 minütigem Rühren wurde die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 90 Minuten gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 % Schwefelsäure gestoppt und die wässrige Phase mit Essigsäureethylester extrahiert. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und anschließend mittels Säulenchromatographie aufgereinigt.

8.2.4 Methode D: Synthese von 2-Bromoctanal

1.0 Äq. Bortribromid wurden unter Argon-Atmosphäre in trockenem Dichlormethan gelöst. Die Reaktionsmischung wurde auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ mittels eines Aceton-/Trockeneis-Bades gekühlt. 1.0 Äq. 1-Octin wurden tropfenweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 30 Minuten bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ und weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Mit Hilfe eines Eisbades wurde die gelbe Reaktionsmischung auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Nach Zugabe von Citrat-Puffer (2 M, pH 5), methanolischer Kaliumacetat-Lösung (5 Äq.) und Wasserstoffperoxid 35 % wurde die Reaktionsmischung unter Erwärmung auf Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 40 ml Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit 40 ml gesättigter Natriumchlorid-Lösung, 40 ml halbgesättigter Natriumchlorid-Lösung und 40 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösemittel des Filtrats wurde im Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

8.2.5 Methode E: Darstellung von Kohlenoxysulfid

In einen Zweihalsrundkolben, der mit einem Gasableitungsrohr und einem Tropftrichter versehen ist, wurde etwa 150 ml konzentrierte H_2SO_4 eingebracht. Aus dem Tropftrichter wurden langsam 25 ml einer gesättigten wässrigen Ammoniumthiocyanat-Lösung unter Rühren zugetropft. Eine lebhafte Gasentwicklung unter starker Erwärmung des Reaktionsgemisches setzte ein. Das entwickelte Gas (Verunreinigungen: NH_3 , H_2S , CS_2 , CO_2 , HCN , H_2O u.a.) wurde durch ein mit 33 % Natronlauge beschicktes Zehnkugelrohr geleitet und danach in zwei mit Kalk gefüllten und einem mit CaCl_2 versehenen Trockentürmen getrocknet. Optional wurde das erhaltene Kohlenoxysulfid in einem durch ein Aceton-/Trockeneisbad auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperierten U-Rohr kondensiert oder zur weiteren Verwendung unmittelbar aus dem System in die gewünschte Folgereaktionsmischung eingeleitet.

8.2.6 Methode F: Darstellung von Benzylammonium-N-benzylthiocarbamat-Salzen

In einem Weithalsrundkolben wurden 0.1 mol Benzylamin in etwa 20 ml kaltem Ethanol gelöst. In diese Reaktionsmischung wurde frisch präpariertes gasförmiges Kohlenoxysulfid eingeleitet. Nach wenigen Minuten präzipitierte ein weißer Feststoff. Der Feststoff wurde

abfiltriert, sorgfältig mit Diethylether nachgewaschen und anschließend im Exsikkator über P_2O_{10} im Vakuum getrocknet. Das instabile Produkt wurde bei -20 °C unter Lichtausschluss trocken eingelagert.

8.2.7 Methode G: Darstellung von 3-Benzyl-5-hexylthiazol-2(3H)-on-Derivaten

1.0 Äq. eines Benzylammonium-*N*-benzylthiocarbamat-Salzes wurden in Methanol suspendiert und die Reaktionsmischung mit Hilfe eines Eisbades auf ca. 4 °C abgekühlt. 1.0 Äq. 2-Bromooctanal wurden in wenig Methanol gelöst und der kalten Reaktionsmischung zugeführt. Nach einer Stunde wurde das Eisbad entfernt und die gelbliche Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand anschließend in ein Gemisch aus Diethylether und Wasser aufgenommen und dreimal mit ca. 30 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde dreimal mit ca. 30 ml Wasser gewaschen und das Lösemittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in einem Gemisch aus Methanol und 3 M Salzsäure bzw. in Gegenwart eines stark sauren Ionenaustauschers aufgenommen und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Nach Erhitzen unter Rückfluss für etwa 1.5 Stunden wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Diethylether aufgenommen und dreimal mit ca. 30 ml halbgesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Anschließend wurde das Lösemittel des Filtrats unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt.

8.2.8 Methode H: Darstellung des gemischten Anhydrids

a) Methode H1

1.0 Äq. (154 μmol , 23 μl) 2-*trans*-Octensäure wurden in 12 ml absolutiertem Tetrahydrofuran unter Argon-Atmosphäre in einer zuvor im Vakuum ausgeglühten Reaktionsapparatur gelöst. Nach Zugabe von 1.5 Äq. (231 μmol , 32 μl) absolutiertem Triethylamin wurde die Reaktionsmischung mit Hilfe eines Eisbades auf 0 °C abgekühlt. Es wurden 1.5 Äq. (231 μmol , 22 μl) Chlorameisensäureethylester zugeführt und für ca. vier Stunden gerührt. Der ausgefallene weiße Feststoff wurde unter Argon-Schutzgasatmosphäre mit einer zuvor im Vakuum ausgeglühten Umkehrfritte abfiltriert und das Lösemittel des Filtrats unter vermindertem Druck ohne Zufuhr von Energie entfernt. Der ölige Rückstand wurde unter Argon-Atmosphäre in 8 ml absolutiertem Tetrahydrofuran gelöst und bis zur weiteren Umsetzung unter Ausschluss von Licht und auf Eis gelagert.

b) Methode H2

1.0 Äq. (160 µmol, 24 µl) 2-*trans*-Octensäure wurden in 5 ml absolutiertem Diethylether unter Argon-Atmosphäre in einer zuvor im Vakuum ausgeglühten Reaktionsapparatur gelöst. Nach Zugabe von 1.56 Äq. (250 µmol, 35 µl) absolutiertem Triethylamin wurde die Reaktionsmischung mit Hilfe eines Eisbades auf 0 °C abgekühlt. 1.56 Äq. (250 µmol, 24 µl) Chlorameisensäureethylester wurden in 2 ml Diethylether abs. gelöst und der Reaktionsmischung langsam zugetropft. Der ausgefallene weiße Feststoff wurde unter Argon-Schutzgasatmosphäre mit einer zuvor im Vakuum ausgeglühten Umkehrfritte in einen Scheidetrichter abfiltriert. Das Filtrat wurde dreimal mit 3 ml kaltem diethylethergesättigten Wasser gewaschen. Die Wasserphase wurde verworfen und die leicht gelb gefärbte organische Phase unter vermindertem Druck ohne Erhitzen eingeeengt und direkt zur weiteren Umsetzung verwendet.

8.2.9 Methode I: Darstellung von 2-*trans*-Octenoyl-*N*-Hydroxysuccinimidesters

1.0 Äq. (15 mmol, 1.73 g) *N*-Hydroxysuccinimid und 1.0 Äq. (15 mmol, 2.26 ml) 2-*trans*-Octensäure wurden in 50 ml trockenem Essigsäureethylester gelöst. Nachdem 1.0 Äq. (15 mmol, 3.09 g) in 5 ml Essigsäureethylester gelöstes Dicyclohexylcarbodiimid hinzugefügt wurden, wurde das Reaktionsgemisch für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, anschließend für 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen und abschließend 24 Stunden im Kühlschrank gelagert. Der entstandene weiße Niederschlag wurde abfiltriert und mit Essigsäureethylester nachgewaschen. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck eingeeengt, das Rohprodukt aus Ethanol umkristallisiert und säulenchromatographisch aufgereinigt.

8.2.10 Methode J: Darstellung von 2-*trans*-Octenoyl-CoA

a) Methode J1: Umsetzung des gemischten Anhydrids mit Coenzym A zu 2-*trans*-Octenoyl-Coenzym A

1.0 Äq. (24 µmol, 20 mg) Coenzym A-Trinatrium wurden in 2 ml Millipore®-Wasser unter Argon gelöst und die Reaktionsmischung anschließend mit Hilfe eines Eisbades auf 0 °C abgekühlt. Durch vorsichtige tropfenweise Zugabe von 0.1 M wässriger Natriumhydroxid-Lösung wurde ein pH-Wert zwischen acht und neun eingestellt. Anschließend wurden 2 ml (ca. 1.6 Äq.) der zuvor hergestellten Lösung des gemischten Anhydrids in absolutiertem Tetrahydrofuran binnen fünf Minuten zugetropft. Nach einer Reaktionsdauer von ungefähr zehn Minuten wurde die Reaktion gestoppt und die Reaktionslösung unmittelbar mit Hilfe der HPLC aufgereinigt.

Variation 1: Anstelle von Millipore®-Wasser wurde ein Lösemittelgemisch aus einem Na₂CO₃-Puffer/ 50 mM/ pH 8, Ethanol und Essigsäureethylester im Verhältnis 1:1:1 verwendet.

b) Methode J2: Umsetzung von 2-trans-Octenoyl-N-Hydroxysuccinimidester mit Coenzym A zu 2-trans-Octenoyl-Coenzym A

1.0 Äq. (24 µmol, 20 mg) Coenzym A-Trinatrium wurden in 2 ml Millipore®-Wasser unter Argon gelöst und die Reaktionsmischung anschließend mit Hilfe eines Eisbades auf 0 °C abgekühlt. Durch vorsichtige tropfenweise Zugabe von 0.1 M wässriger Natriumhydroxid-Lösung wurde ein pH-Wert zwischen acht und neun eingestellt. 2.0 Äq. (48 µmol, 11.5 mg) 2-trans-Octenoyl-N-hydroxysuccinimidester wurden in 2 ml THF abs. gelöst und der Reaktionsmischung langsam zugetropft. Die Reaktionskontrolle erfolgte mit *Ellmans* Reagenz bzw. per HPLC. Nach ca. einer Stunde wurde die Reaktion gestoppt und unmittelbar mit Hilfe der HPLC augereinigt.

Variation 1: Anstelle von Millipore®-Wasser wurde ein Lösemittelgemisch aus einem Na₂CO₃-Puffer/ 50 mM/ pH 8, Ethanol und Essigsäureethylester im Verhältnis 1:1:1 verwendet.

c) Methode J3: Umsetzung von 2-trans-Octenoyl-N-Hydroxysuccinimidester mit Coenzym A zu 2-trans-Octenoyl-Coenzym A in Gegenwart von Thioglykolsäure

Zu einer Lösung von 1.0 Äq. (60 µmol, 50 mg) Coenzym A-Trinatrium in 3 ml Millipore®-Wasser wurden 8.3 Äq. (0.5 mmol, 34.6 µl) Thioglykolsäure und anschließend 33.3 Äq. (2 mmol, 168 mg) Natriumhydrogencarbonat hinzugefügt. Dieser Reaktionsmischung wurde eine Lösung von 33.3 Äq. (2 mmol, 478.5 mg) 2-trans-Octenoyl-N-Hydroxysuccinimidester in 6 ml absolutem Tetrahydrofuran zugegeben und bei Raumtemperatur für ca. vier Stunden gerührt. Um Einphasigkeit zu wahren, wurde bei Bedarf zusätzlich absolutes Tetrahydrofuran zugegeben. Die Reaktionskontrolle erfolgte mit *Ellmans*-Reagenz. Nach Beendigung der Reaktion wurden 12 ml kalte 5 % wässriger HClO₄-Lösung zugegeben. Die beginnende, leichte Präzipitation wurde durch Einengen des Lösemittels unter vermindertem Druck vergrößert. Der Niederschlag wurde abfiltriert und mit 25 ml kalter 0.8 % wässriger HClO₄-Lösung nachgewaschen. Der Filterkuchen wurde in ein 15 ml Falcon®-Tube überführt und mit zweimal 12 ml Aceton, sowie zweimal 12 ml Diethylether durch jeweiliges Resuspendieren, Zentrifugieren und Dekantieren extrahiert. Der Rückstand wurde mit dreimal 4 ml H₂O pH 5 extrahiert. Die vereinten wässrigen Phasen wurden mit 6 ml kalter 5 % wässriger HClO₄-Lösung versetzt. Der Niederschlag wurde nach Filtration mit 10 ml kalter

0.8 % wässriger HClO₄-Lösung und mit zweimal 5 ml Aceton nachgewaschen. Der weiße Feststoff wurde im Exsikkator über P₂O₁₀ im Vakuum getrocknet und bei -20 °C gelagert.

d) Methode J4: Umsetzung von 2-trans-Octenoyl-N-Hydroxysuccinimidester mit polysilyliertem Coenzym A zu 2-trans-Octenoyl-Coenzym A

Schützen der nucleophilen Gruppierungen des Coenzym A durch Silylierung

1.0 Äq. (13 µmol, 10.84 mg) Na₃CoA wurden in 1 ml ACN abs. unter Argon in einem verschließbaren Vial suspendiert. Nach Zugabe von 8.0 Äq. (104 µmol, 21.13 µl) 1-Methoxy-2-methyl-1-trimethylsiloxypren wurde bei Raumtemperatur über Nacht bis zur Homogenität der Reaktionsmischung gerührt. Das Lösemittel wurde mit Stickstoff abgeblasen und der ölige, pastöse Rückstand in 1.5 ml frischem THF abs. gelöst.

In-situ-Entschützung von polysilyliertem Coenzym A und Kondensation mit 2-trans-Octenoyl-N-Hydroxysuccinimidester

Unter Argon wurden 25 Äq. (325 µmol, 50 mg) CsF, 2.5 Äq. (32.5 µmol, 12 mg) Dicyclohexyl-18-Krone-6 (DCH-18-C-6) und 1.5 Äq. (5 mg, 19.5 µmol) 2-trans-Octenoyl-N-hydroxysuccinimidester in 3.5 ml THF abs. suspendiert. Nach Zugabe von der in Methode A) erhaltenen Lösung von silyliertem CoA wurde die Reaktionsmischung für etwa fünf Stunden bei RT unter Argon gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 ml KH₂PO₄ 10 mM gestoppt, die Reaktionsmischung durch einen Spritzenfilter (0.2 µm) filtriert und anschließend per HPLC aufgereinigt.

e) Aufreinigung von 2-trans-Octenoyl-Coenzym A

Die am besten reproduzierbare Aufreinigung von 2toCoA gelang mittels HPLC. Als semipräparative Trennsäule diente eine *Varian* Dynamax 60-8 C18, 250x10.0 mm, Microsorb (4 µm). Nachstehend sind die Bedingungen dargestellt:

Fließmittel A: Ammoniumacetat-Puffer 20 mM / Fließmittel B: Acetonitril

- 0 min: 100 % A, 0 % B
- 0–40 min: 40 % A, 60 % B
- 40–55 min: 0 % A, 100 % B
- 55–60 min: 100 % A, 0 % B

Durchfluss: 3.0 ml/min

Detektion: UV-VIS, 260 nm und 285 nm

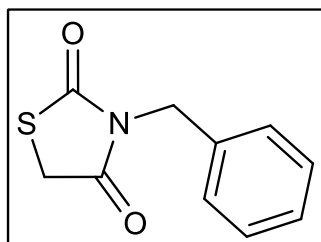
R_t (2toCoA) = 22–28 min

Die Fällung von 2toCoA mit Perchlorsäure (siehe Methode J3) eignet sich nur für sehr große Ansätze. Aufgrund des sehr teuren Edukts CoA war diese Methode nicht wirtschaftlich.

8.3 Synthetisierte Verbindungen

8.3.1 Derivate und Zwischenstufen der Thiazolidin-2,4-dione

SV37: 3-Benzylthiazolidin-2,4-dion



Molare Masse: 207.25 g/mol

Summenformel: C₁₀H₉NO₂S

Methode: A1

Ansatz: -Thiazolidin-2,4-dion: 2.00 g, 17 mmol (1 Äq.)

-K₂CO₃: 7.08 g, 51 mmol (3 Äq.)

-Benzylbromid: 2.03 ml, 17 mmol (1 Äq.)

Aufreinigung: Kristallisation aus H₂O/n-Hexan liefert sauberes Produkt

Ausbeute: 2.85 g (13.75 mmol, 81 %), hellbrauner Feststoff

R_f-Wert: 0.55 (Petrolether/Ethylacetat [2/1])

Schmelzpunkt: 40.9 °C

Loop-ESI-MS: gefunden: [M+Na]⁺ 230.0, [M]⁺ 207.3; berechnet: 207.04

LC-MS: R_t = 5.3 min, Reinheit: 98.1 %

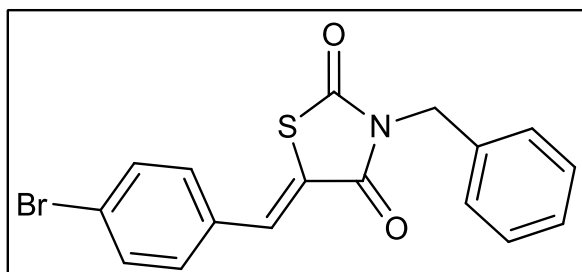
¹H-NMR: (DMSO-d₆, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.36–7.26 (m, 5H, Ph-H), 4.68 (s, 2H, NCH₂), 4.28 (s, 2H, SCH₂).

¹³C-NMR: (DMSO-d₆, 100.62 MHz), δ [ppm] = 172.31 (C=O), 171.91 (C=O), 135.60 (NCH₂C_q), 128.53 (2C, NCH₂C_qCHCH), 127.65 (NCH₂C_qCHCHCH), 127.60 (2C, NCH₂C_qCH), 44.29 (NCH₂), 34.02 (SCH₂).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3397 (w, Oberschwingung C=O), 3065–3036 (w, C-H aromatisch, ν), 2975–2931 (m, C-H gesättigt, ν), 1744 (s, C=O, ν), 1662 (s, C=O, ν), 1586 (m, C=C aromatisch, ν),

1496 (m, C=C aromatisch, v), 1456 (m, C-H₂, δ), 1427 (m, C-H₂, δ neben C=O), 758 und 695 (s, C-H, δ *out of plane*, monosubstituierter Aromat).

SV38: (Z)-3-Benzyl-5-(4-brombenzyliden)-thiazolidin-2,4-dion



Molare Masse: 374.25 g/mol

Summenformel: C₁₇H₁₂BrNO₂S

Methode: B1

Ansatz: -3-Benzylthiazolidin-2,4-dion (SV_37): 207.3 mg, 1.0 mmol (1.0 Äq.)

-Piperidin: 69.3 µl, 0.7 mmol (0.7 Äq.)

-4-Brombenzaldehyd: 203.5 mg, 1.1 mmol (1.1 Äq.)

Aufreinigung: Umkristallisation aus EtOH/MeOH [10/1]

Ausbeute: 190.5 mg (0.51 mmol, 51 %), hellgelber Feststoff

R_f-Wert: 0.41 (Petrolether/Ethylacetat [10/1])

Schmelzpunkt: 169.2 °C

Loop-ESI-MS: gefunden: [M+Na]⁺ 397.9 und 395.9; berechnet: 372.98

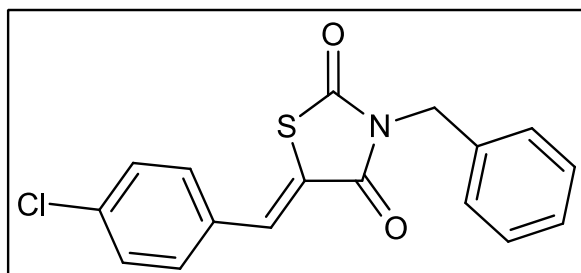
LC-MS: R_t = 16.6 min, Reinheit: 98.5 %

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.82 (s, 1H, BrPh-CH=C), 7.61–7.58 (m, 2H, BrC_qCH), 7.43 (dt, ³J_{ortho} = 8.4 Hz, ⁴J_{meta} = 2.2 Hz, 2H, NCH₂C_qCH), 7.36–7.28 (m, 5H, Ph-H), 4.90 (s, 2H, NCH₂).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 167.41 (S_C=O), 166.09 (N(C=O)C_q), 135.15 (NCH₂C_q), 132.70 (BrPh-CH=C_q), 132.66 (2C, BrC_qCH), 132.24 (BrC_qCHCHC_q), 131.55 (2C, BrC_qCHCH), 129.03 (2C, NCH₂C_qCHCH), 128.91 (2C, NCH₂C_qCH), 128.47 (NCH₂C_qCHCHCH), 125.23 (BrC_q), 122.41 (N(C=O)C_q), 45.52 (NCH₂).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3389 (w, Oberschwingung C=O), 3092–3034 (w, C-H aromatisch/ungesättigt, v), 1729 (s, C=O, v), 1671 (s, C=O, v), 1601 (s, C=C aromatisch, v), 1578 (s, C=C aromatisch, v), 1455 (m, C-H₂, δ), 1070 (s, Aryl-Br), 813 (s, C-H, δ *out of plane*, *p*-substituierter Aromat), 735 und 690 (s, C-H, δ *out of plane*, monosubstituierter Aromat).

SV39: (Z)-3-Benzyl-5-(4-chlorbenzyliden)thiazolidin-2,4-dion



Molare Masse: 329.80 g/mol

Summenformel: C₁₇H₁₂ClNO₂S

Methode: B1

Ansatz: -3-Benzylthiazolidin-2,4-dion (SV_37): 207.3 mg, 1.0 mmol (1.0 Äq.)

-Piperidin: 69.3 μ l, 0.7 mmol (0.7 Äq.)

-4-Chlorbenzaldehyd: 154.6 mg, 1.1 mmol (1.1 Äq.)

Aufreinigung: Umkristallisation aus EtOH/MeOH [10/1]

Ausbeute: 200.3 mg (0.61 mmol, 61 %), hellgelber Feststoff

R_f-Wert: 0.44 (Petrolether/Ethylacetat [10/1])

Schmelzpunkt: 165.5 °C

Loop-ESI-MS: gefunden: [M+Na]⁺ 352.1; berechnet: 329.03

LC-MS: R_t = 16.4 min, Reinheit: 98.6 %

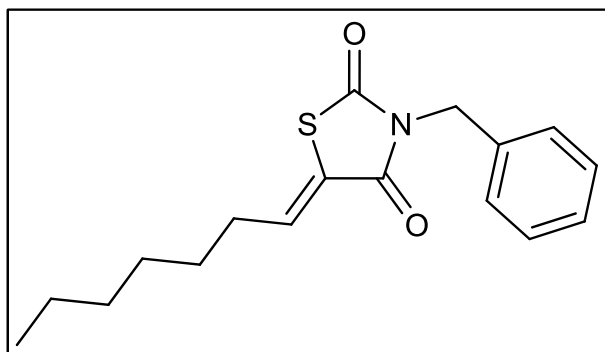
¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.84 (s, 1H, ClPh-CH=C), 7.45–7.28 (m, 9H, Ph-H), 4.90 (s, 2H, NCH₂).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 167.43 (SC=O), 166.09 (N(C=O)C_q), 136.80 (ClC_q), 135.16 (NCH₂C_q), 132.63 (ClPh-CH=C_q), 131.82 (ClC_qCHCHC_q), 131.41 (2C,

$\text{ClC}_q\text{CH}\underline{\text{C}}\text{H}$), 129.69 (2C, $\text{ClC}_q\text{C}\underline{\text{H}}$), 129.02 (2C, $\text{NCH}_2\text{C}_q\text{CH}\underline{\text{C}}\text{H}$), 128.90 (2C, $\text{NCH}_2\text{C}_q\text{C}\underline{\text{H}}$), 128.46 ($\text{NCH}_2\text{C}_q\text{CHCH}\underline{\text{C}}\text{H}$), 122.26 ($\text{N}(\text{C}=\text{O})\underline{\text{C}}_q$), 45.51 ($\text{N}\underline{\text{C}}\text{H}_2$).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3388 (w, Oberschwingung C=O), 3094–3035 (w, C-H aromatisch/ungesättigt, v), 1730 (s, C=O, v), 1672 (s, C=O, v), 1603 (s, C=C aromatisch, v), 1584 (s, C=C aromatisch, v), 1455 (m, C-H₂, δ), 1072 (s, Aryl-Cl), 824 (s, C-H, δ *out of plane*, *p*-substituierter Aromat), 736 und 691 (s, C-H, δ *out of plane*, monosubstituierter Aromat).

SV40: (Z)-3-Benzyl-5-heptylidenthiazolidin-2,4-dion



Molare Masse: 303.42 g/mol

Summenformel: C₁₇H₂₁NO₂S

Methode: B2

Ansatz: -3-Benzylthiazolidin-2,4-dion (SV_37): 207.3 mg, 1.0 mmol (1.0 Äq.)

-Piperidin: 69.3 μl , 0.7 mmol (0.7 Äq.)

-Heptanal: 147.8 μl , 1.1 mmol (1.1 Äq.)

Aufreinigung: SC, PE/EtOAc [20/1] → [5:1]

Ausbeute: 101.4 mg (0.33 mmol, 33 %), braune hochviskose Flüssigkeit

R_f-Wert: 0.57 (Petrolether/Ethylacetat [10/1])

Loop-ESI-MS: gefunden: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 326.1 und $[\text{M}+\text{H}]^+$ 304.1; berechnet: 303.13

LC-MS: R_t = 17.2 min, Reinheit: > 99.9 %

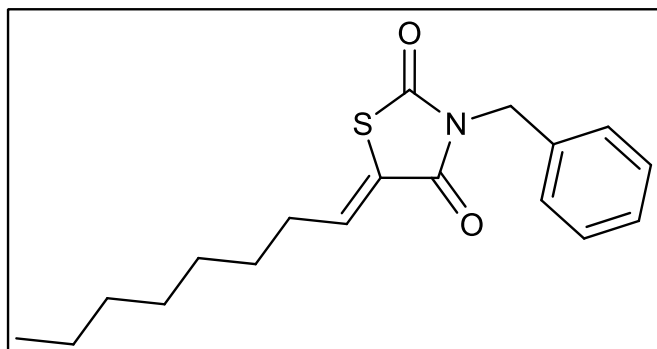
¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.40 (dt, ³J_{ortho} = 8.3 Hz, ⁴J_{meta} = 2.2 Hz, 2H, $\text{NCH}_2\text{C}_q\text{C}\underline{\text{H}}$), 7.34–7.28 (m, 3H, Ph-H), 7.08 (t, ³J = 7.6 Hz, 1H, $\text{SC}_q=\text{C}\underline{\text{H}}$), 4.83 (s, 2H,

NCH_2), 2.21 (dd, $^3J = 14.9$ Hz, $^3J = 7.6$ Hz, 2H, $\text{SC}_q=\text{CHCH}_2$), 1.56–1.48 (m, 2H, $\text{SC}_q=\text{CHCH}_2\text{CH}_2$), 1.35–1.24 (m, 6H, $\text{H}_3\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 0.88 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 3H, H_3C).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 167.79 ($\text{SC}=\text{O}$), 165.05 ($\text{N}(\text{C}=\text{O})\text{C}_q$), 139.17 ($\text{SC}_q=\text{CH}$), 135.39 (NCH_2C_q), 129.00 (2C, $\text{NCH}_2\text{C}_q\text{CHCH}$), 128.82 (2C, $\text{NCH}_2\text{C}_q\text{CH}$), 128.31 ($\text{NCH}_2\text{C}_q\text{CHCHCH}$), 125.28 ($\text{N}(\text{C}=\text{O})\text{C}_q$), 45.15 (NCH_2), 31.91 ($\text{SC}_q=\text{CHCH}_2$), 31.60 ($\text{H}_3\text{CCH}_2\text{CH}_2$), 29.01 ($\text{H}_3\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 27.97 ($\text{SC}_q=\text{CHCH}_2\text{CH}_2$), 22.61 (H_3CCH_2), 14.14 (H_3C).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3418 (w, Oberschwingung C=O), 3065–3034 (w, C-H aromatisch/ungesättigt, ν), 2954 (s, C-H gesättigt, ν), 2926 (s, C-H gesättigt, ν), 2856 (s, C-H gesättigt, ν), 1739 (s, C=O, ν), 1683 (s, C=O, ν), 1633 (s, C=C, ν), 1587 (w, C=C aromatisch, ν), 1496 (m, C=C aromatisch, ν), 1456 (m, C-H gesättigt, δ), 734 und 697 (m, C-H, δ *out of plane*, monosubstituierter Aromat).

SV41: (Z)-3-Benzyl-5-octylidenthiazolidin-2,4-dion



Molare Masse: 317.45 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{NO}_2\text{S}$

Methode: B2

Ansatz: -3-Benzylthiazolidin-2,4-dion (SV_37): 207.3 mg, 1.0 mmol (1.0 Äq.)

-Piperidin: 69.3 μl , 0.7 mmol (0.7 Äq.)

-Octanal: 171.8 μl , 1.1 mmol (1.1 Äq.)

Aufreinigung: SC, PE/EtOAc [20/1] \rightarrow [5:1]

Ausbeute: 186.5 mg (0.59 mmol, 59 %), braune hochviskose Flüssigkeit

R_f-Wert: 0.57 (Petrolether/Ethylacetat [10/1])

Loop-ESI-MS: gefunden: [M+Na]⁺ 340.1 und [M+H]⁺ 318.2; berechnet: 317,14

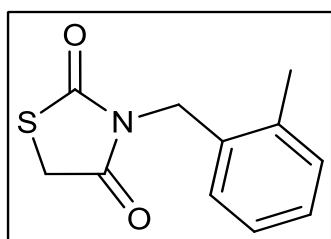
LC-MS: R_t = 17.9 min, Reinheit: 97.7 %

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.40 (dt, ³J_{ortho} = 8.4 Hz, ⁴J_{meta} = 2.2 Hz, 2H, NCH₂C_qCH), 7.34–7.28 (m, 3H, Ph-H), 7.08 (t, ³J = 7.6 Hz, 1H, SC_q=CH), 4.83 (s, 2H, NCH₂), 2.21 (dd, ³J = 14.8 Hz, ³J = 7.6 Hz, 2H, SC_q=CHCH₂), 1.52 (dt, ³J = 14.8 Hz, ³J = 7.2 Hz, 2H, SC_q=CHCH₂CH₂), 1.37–1.27 (m, 8H, H₃CCH₂CH₂CH₂CH₂), 0.88 (t, ³J = 6.6 Hz, 3H, H₃C).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 167.75 (SC=O), 165.02 (N(C=O)C_q), 139.14 (SC_q=CH), 135.38 (NCH₂C_q), 128.98 (2C, NCH₂C_qCHCH), 128.80 (2C, NCH₂C_qCH), 128.28 (NCH₂C_qCHCHCH), 125.27 (N(C=O)C_q), 45.12 (NCH₂), 31.88 (SC_q=CHCH₂), 31.76 (H₃CCH₂CH₂), 29.28 (H₃CCH₂CH₂CH₂), 29.05 (SC_q=CHCH₂CH₂CH₂), 27.98 (SC_q=CHCH₂CH₂), 22.69 (H₃CCH₂), 14.15 (H₃C).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3408 (w, Oberschwingung C=O), 3064–3034 (w, C-H aromatisch/ungesättigt, ν), 2925–2854 (s, C-H gesättigt, ν), 1739 (s, C=O, ν), 1683 (s, C=O, ν), 1634 (s, C=C, ν), 1496 (m, C=C aromatisch, ν), 1456 (m, C-H gesättigt, δ), 734 und 697 (m, C-H, δ *out of plane*, monosubstituierter Aromat).

SV42: 3-(2-Methylbenzyl)thiazolidin-2,4-dion



Molare Masse: 221.28 g/mol

Summenformel: C₁₁H₁₁NO₂S

Methode: A1

Ansatz: -Thiazolidin-2,4-dion: 2.00 g, 17 mmol (1 Äq.)

-K₂CO₃: 7.08 g, 51 mmol (3 Äq.)

-2-Methylbenzylbromid: 2.28 ml, 17 mmol (1 Äq.)

Aufreinigung: Fällung aus H₂O/n-Hexan liefert sauberes Produkt

Ausbeute: 2.42 g (10.94 mmol, 64 %), hellbraune hochviskose Flüssigkeit

R_f-Wert: 0.43 (Petrolether/Ethylacetat [3/1])

Loop-ESI-MS: gefunden: [M+Na]⁺ 244.0 und [M+H]⁺ 222.2; berechnet: 221.05

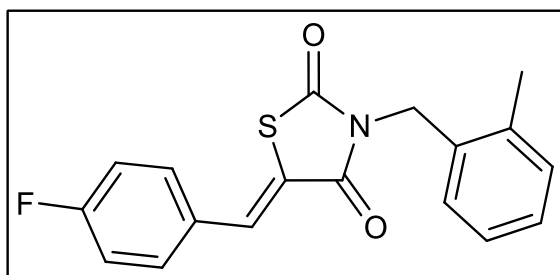
LC-MS: R_t = 7.4 min, Reinheit: 93.8 %

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.21–7.13 (m, 4H, Ph-H), 4.78 (s, 2H, NCH₂), 3.90 (s, 2H, SCH₂), 2.43 (s, 3H, Ph-CH₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 171.64 (C=O), 171.27 (C=O), 136.18 (NCH₂C_q), 132.89 (NCH₂C_qC_qCH₃), 130.50 (H₃CC_qCH), 127.92 (C_{Ar}), 127.82 (NCH₂C_qCH), 126.11 (C_{Ar}), 42.67 (NCH₂), 33.62 (SCH₂), 19.35 (Ph-CH₃).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3419 (w, Oberschwingung C=O), 3022 (w, C-H aromatisch, ν), 2983–2939 (m, C-H gesättigt, ν), 1751 (s, C=O, ν), 1670 (s, C=O, ν), 1492 (m, C=C aromatisch, ν), 1462 (m, C-H gesättigt, δ), 1422 (m, C-H₂, δ neben C=O), 1376 (s, C-H₃, δ_s), 742 (s, C-H, δ *out of plane*, *o*-substituierter Aromat).

SV43: (Z)-5-(4-Fluorbenzyliden)-3-(2-methylbenzyl)-thiazolidin-2,4-dion



Molare Masse: 327.37 g/mol

Summenformel: C₁₈H₁₄FNO₂S

Methode: B1

Ansatz: -3-(2-Methylbenzyl)thiazolidin-2,4-dion (SV_42): 221.3 mg, 1.0 mmol (1.0 Äq.)

-Piperidin: 69.3 μ l, 0.7 mmol (0.7 Äq.)

-4-Fluorbenzaldehyd: 116.2 μ l, 1.1 mmol (1.1 Äq.)

Aufreinigung: Umkristallisation aus EtOH/MeOH [10/1]

Ausbeute: 168.3 mg (0.51 mmol, 51 %), gelber Feststoff

R_f-Wert: 0.30 (Petrolether/Ethylacetat [10/1])

Schmelzpunkt: 179.6 °C

Loop-ESI-MS: gefunden: [M+Na]⁺ 350.0 und [M+H]⁺ 328.1; berechnet: 327.07

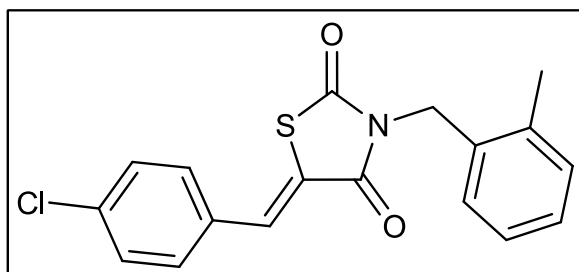
LC-MS: R_t = 15.9 min, Reinheit: > 99.9 %

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.88 (s, 1H, FPh-CH=C), 7.53–7.48 (m, 2H, FC_qCHCH), 7.24–7.15 (m, 6H, Ph-H), 4.94 (s, 2H, NCH₂), 2.46 (s, 3H, Ph-CH₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 167.65 (SC=O), 166.32 (N(C=O)C_q), 163.83 (d, ¹J (C,F) = 254.1 Hz, FC_q), 136.36 (NCH₂C_q), 133.04 (NCH₂C_qC_qCH₃), 132.92 (FPh-CH=C_q), 132.43 (d, ³J (C,F) = 8.7 Hz, 2C, FC_qCHCH), 130.74 (H₃CC_qCH), 129.69 (d, ⁴J (C,F) = 3.4 Hz, FC_qCHCHC_q), 128.18 (C_{Ar}), 128.12 (NCH₂C_qCH), 126.38 (C_{Ar}), 121.21 (d, ⁶J (C,F) = 2.5 Hz, N(C=O)C_q), 116.72 (d, ²J (C,F) = 22.1 Hz, 2C, FC_qCH), 43.04 (NCH₂), 19.57 (Ph-CH₃).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3404 (w, Oberschwingung C=O), 3060–3034 (w, C-H aromatisch/ungesättigt, ν), 2973–2925 (m, C-H gesättigt, ν), 1744 (s, C=O, ν), 1669 (s, C=O, ν), 1612 (m, C=C, ν), 1595 (s, C=C aromatisch, ν), 1584 (s, C=C aromatisch, ν), 1506 (s, C=C aromatisch, ν), 1458 (m, C-H gesättigt, δ), 1384 (s, C-H₃, δ_s), 1145 (s, Aryl-F), 832 (s, C-H, δ *out of plane*, *p*-substituierter Aromat), 740 (s, C-H, δ *out of plane*, *o*-substituierter Aromat).

SV44: (Z)-5-(4-Chlorbenzyliden)-3-(2-methylbenzyl)-thiazolidin-2,4-dion



Molare Masse: 343.83 g/mol

Summenformel: C₁₈H₁₄ClNO₂S

Methode: B1

Ansatz: -3-(2-Methylbenzyl)thiazolidin-2,4-dion (SV_42): 221.3 mg, 1.0 mmol (1.0 Äq.)

-Piperidin: 69.3 μ l, 0.7 mmol (0.7 Äq.)

-4-Chlorbenzaldehyd: 154.6 mg, 1.1 mmol (1.1 Äq.)

Aufreinigung: Umkristallisation aus EtOH/MeOH [10/1]

Ausbeute: 215.7 mg (0.63 mmol, 63 %), hellgelber Feststoff

R_f-Wert: 0.37 (Petrolether/Ethylacetat [10/1])

Schmelzpunkt: 183.7 °C

Loop-ESI-MS: gefunden: [M+Na]⁺ 366.1; berechnet: 343.04

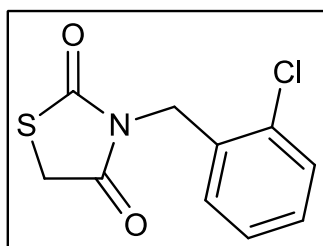
LC-MS: R_t = 16.9 min, Reinheit: > 99.9 %

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.86 (s, 1H, ClPh-CH=C), 7.47–7.42 (m, 4H, ClPh-H), 7.23–7.14 (m, 4H, H₃CPh-H), 4.94 (s, 2H, NCH₂), 2.46 (s, 3H, Ph-CH₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 167.49 (SC=O), 166.25 (N(C=O)C_q), 136.86 (ClC_q), 136.38 (NCH₂C_q), 133.00 (NCH₂C_qC_qCH₃), 132.72 (ClPh-CH=C_q), 131.86 (ClC_qCHCHC_q), 131.46 (2C, ClC_qCHCH), 130.77 (H₃CC_qCH), 129.73 (2C, ClC_qCH), 128.22 (C_{Ar}), 128.15 (NCH₂C_qCH), 126.40 (C_{Ar}), 122.17 (N(C=O)C_q), 43.09 (NCH₂), 19.58 (Ph-CH₃).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3401 (w, Oberschwingung C=O), 3057–3029 (w, C-H aromatisch/ungesättigt, ν), 2976–2926 (m, C-H gesättigt, ν), 1734 (s, C=O, ν), 1672 (s, C=O, ν), 1604 (s, C=C aromatisch, ν), 1585 (s, C=C aromatisch, ν), 1458 (m, C-H gesättigt, δ), 1382 (m, C-H₃, δ_s), 1080 (s, Aryl-Cl), 829 (s, C-H, δ *out of plane*, *p*-substituierter Aromat), 746 (s, C-H, δ *out of plane*, *o*-substituierter Aromat).

SV45: 3-(2-Chlorbenzyl)-thiazolidin-2,4-dion



Molare Masse: 241.69 g/mol

Summenformel: C₁₀H₈ClNO₂S

Methode: A1

Ansatz: -Thiazolidin-2,4-dion: 2.00 g, 17 mmol (1 Äq.)

-K₂CO₃: 7.08 g, 51 mmol (3 Äq.)

-2-Chlorbenzylbromid: 2.21 ml, 17 mmol (1 Äq.)

Aufreinigung: SC, PE/EtOAc [10/1] → [2/1]

Ausbeute: 1.83 g (10.94 mmol, 45 %), dunkelbraune hochviskose Flüssigkeit

R_f-Wert: 0.32 (Petrolether/Ethylacetat [3/1])

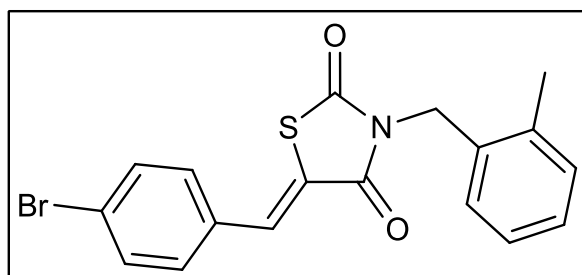
Loop-ESI-MS: gefunden: [M+Na]⁺ 264.0 und [M+H]⁺ 242.2; berechnet: 241.00

LC-MS: R_t = 7.5 min, Reinheit: 99.4 %

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.38–7.12 (m, 4H, Ph-H), 4.90 (s, 2H, NCH₂), 3.99 (s, 2H, SCH₂).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 171.32 (C=O), 170.99 (C=O), 133.19 (NCH₂C_q), 132.07 (NCH₂C_qC_qCl), 129.84 (C_{Ar}), 129.25 (C_{Ar}), 128.65 (NCH₂C_qCH), 127.01 (C_{Ar}), 43.01 (NCH₂), 33.79 (SCH₂).

SV46: (Z)-5-(4-Brombenzyliden)-3-(2-methylbenzyl)thiazolidin-2,4-dion



Molare Masse: 388.28 g/mol

Summenformel: C₁₈H₁₄BrClNO₂S

Methode: B1

Ansatz: -3-(2-Methylbenzyl)thiazolidin-2,4-dion (SV_42): 221.3 mg, 1.0 mmol (1.0 Äq.)

-Piperidin: 69.3 µl, 0.7 mmol (0.7 Äq.)

-4-Brombenzaldehyd: 203.5 mg, 1.1 mmol (1.1 Äq.)

Aufreinigung: Umkristallisation aus EtOH/MeOH [10/1]

Ausbeute: 236.7 mg (0.61 mmol, 61 %), gelber Feststoff

R_f-Wert: 0.48 (Petrolether/Ethylacetat [10/1])

Schmelzpunkt: 185.6 °C

Loop-ESI-MS: gefunden: [M+Na]⁺ 410.1 und 412.1; berechnet: 386.99

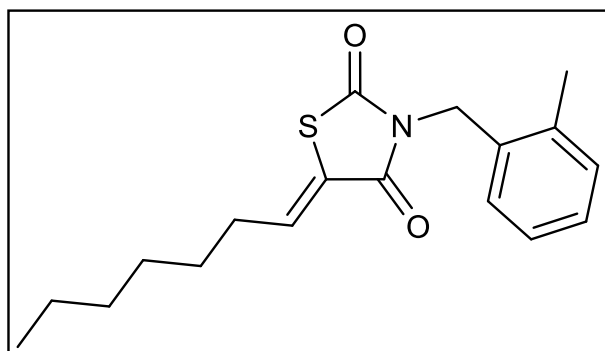
LC-MS: R_t = 17.2 min, Reinheit: > 99.9 %

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.84 (s, 1H, BrPh-CH=C), 7.63–7.59 (m, 2H, BrC_qCH), 7.38–7.35 (m, 2H, BrC_qCHCH), 7.23–7.14 (m, 4H, H₃CPh-H), 4.93 (s, 2H, NCH₂), 2.46 (s, 3H, Ph-CH₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 167.46 (SC=O), 166.24 (N(C=O)C_q), 136.37 (NCH₂C_q), 132.98 (NCH₂C_qC_qCH₃), 132.77 (BrPh-CH=C_q), 132.69 (2C, BrC_qCH), 132.27 (BrC_qCHCHC_q), 131.60 (2C, BrC_qCHCH), 130.76 (H₃CC_qCH), 128.22 (C_{Ar}), 128.15 (NCH₂C_qCH), 126.39 (C_{Ar}), 125.27 (BrC_q), 122.32 (N(C=O)C_q), 43.09 (NCH₂), 19.58 (Ph-CH₃).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3395 (w, Oberschwingung C=O), 3070–3025 (w, C-H aromatisch/ungesättigt, v), 2958 (m, C-H gesättigt, v), 1733 (s, C=O, v), 1676 (s, C=O, v), 1605 (s, C=C aromatisch, v), 1577 (s, C=C aromatisch, v), 1495 (m, C=C aromatisch, v), 1463 (m, C-H gesättigt, δ), 1379 (m, C-H₃, δ_s), 1067 (s, Ar-Br), 814 (s, C-H, δ *out of plane*, *p*-substituierter Aromat), 742 (s, C-H, δ *out of plane*, *o*-substituierter Aromat).

SV47: (Z)-5-Heptyliden-3-(2-methylbenzyl)-thiazolidin-2,4-dion



Molare Masse: 317.45 g/mol

Summenformel: C₁₈H₂₃NO₂S

Methode: B2

Ansatz: -3-(2-Methylbenzyl)thiazolidin-2,4-dion (SV_42): 221.3 mg, 1.0 mmol (1.0 Äq.)

-Piperidin: 69.3 μ l, 0.7 mmol (0.7 Äq.)

-Heptanal: 147.8 μ l, 1.1 mmol (1.1 Äq.)

Aufreinigung: SC, PE/EtOAc [20/1] \rightarrow [5:1]

Ausbeute: 163.3 mg (0.51 mmol, 51 %), braune hochviskose Flüssigkeit

R_f-Wert: 0.55 (Petrolether/Ethylacetat [10/1])

Loop-ESI-MS: gefunden: [M+Na]⁺ 341.2 und [M+H]⁺ 318.2; berechnet: 317.14

LC-MS: R_t = 17.7 min, Reinheit: > 99.9 %

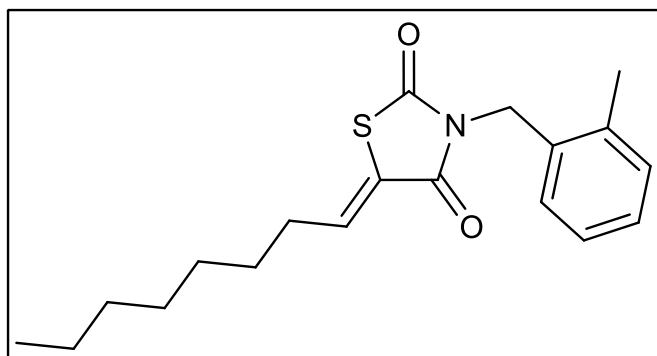
¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.20–7.14 (m, 4H, Ph-H), 7.09 (t, ³J = 7.6 Hz, 1H, SCq=CH), 4.86 (s, 2H, NCH₂), 2.44 (s, 3H, Ph-CH₃), 2.24 (dd, ³J = 14.9 Hz, ³J = 7.6 Hz,

2H, $\text{SC}_q=\text{CHCH}_2$), 1.58–1.50 (m, 2H, $\text{SC}_q=\text{CHCH}_2\text{CH}_2$), 1.39–1.21 (m, 6H, $\text{H}_3\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 0.89 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 3H, H_3CCH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 167.83 ($\text{SC}=\text{O}$), 165.19 ($\text{N}(\text{C}=\text{O})\text{C}_q$), 139.24 ($\text{SC}_q=\text{CH}$), 136.30 (NCH_2C_q), 133.20 ($\text{NCH}_2\text{C}_q\text{C}_q\text{CH}_3$), 130.67 ($\text{H}_3\text{CC}_q\text{CH}$), 128.05 (2C, $\text{NCH}_2\text{C}_q\text{CH}$ und C_{Ar}), 126.32 (C_{Ar}), 125.18 ($\text{N}(\text{C}=\text{O})\text{C}_q$), 42.70 (NCH_2), 31.93 ($\text{SC}_q=\text{CHCH}_2$), 31.61 ($\text{H}_3\text{CCH}_2\text{CH}_2$), 29.03 ($\text{H}_3\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 27.99 ($\text{SC}_q=\text{CHCH}_2\text{CH}_2$), 22.62 (H_3CCH_2), 19.54 (Ph-CH_3), 14.15 (H_3CCH_2).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3418 (w, Oberschwingung C=O), 3024 (w, C-H aromatisch/ungesättigt, ν), 2954 (s, C-H gesättigt, ν), 2926 (s, C-H gesättigt, ν), 2856 (s, C-H gesättigt, ν), 1741 (s, C=O, ν), 1684 (s, C=O, ν), 1633 (s, C=C, ν), 1495 (m, C=C aromatisch, ν), 1463 (m, C-H gesättigt, δ), 1374 (m, C-H₃, δ_s), 741 (s, C-H, δ *out of plane*, *o*-substituierter Aromat).

SV48: (Z)-3-(2-Methylbenzyl)-5-octylidenthiazolidin-2,4-dion



Molare Masse: 331.47 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{NO}_2\text{S}$

Methode: B2

Ansatz: -3-(2-Methylbenzyl)thiazolidin-2,4-dion (SV_42): 221.3 mg, 1.0 mmol (1.0 Äq.)

-Piperidin: 69.3 μl , 0.7 mmol (0.7 Äq.)

-Octanal: 141.8 μl , 1.1 mmol (1.1 Äq.)

Aufreinigung: SC, PE/EtOAc [20/1] \rightarrow [5:1]

Ausbeute: 175.2 mg (0.53 mmol, 53 %), braune hochviskose Flüssigkeit

R_f-Wert: 0.58 (Petrolether/Ethylacetat [10/1])

Loop-ESI-MS: gefunden: [M+Na]⁺ 354.1 und [M+H]⁺ 332.2; berechnet: 331.16

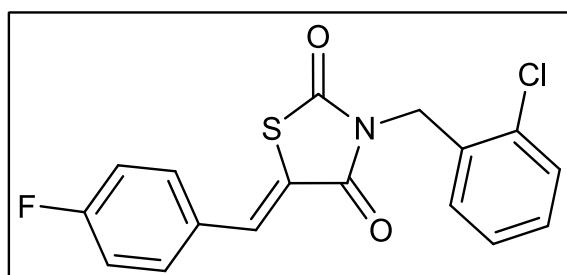
LC-MS: R_t = 18.3 min, Reinheit: > 99.9 %

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.20–7.14 (m, 4H, H₃CPh-H), 7.09 (t, ³J = 7.6 Hz, 1H, SC_q=CH), 4.86 (s, 2H, NCH₂), 2.44 (s, 3H, Ph-CH₃), 2.23 (dd, ³J = 14.8 Hz, ³J = 7.6 Hz, 2H, SC_q=CHCH₂), 1.58–1.50 (dt, ³J = 14.8 Hz, ³J = 7.3 Hz, 2H, SC_q=CHCH₂CH₂), 1.35–1.18 (m, 8H, H₃CCH₂CH₂CH₂CH₂), 0.89 (t, ³J = 6.8 Hz, 3H, H₃CCH₂).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 167.83 (SC=O), 165.19 (N(C=O)C_q), 139.24 (SC_q=CH), 136.31 (NCH₂C_q), 133.20 (NCH₂C_qC_qCH₃), 130.67 (H₃CC_qCH), 128.05 (2C, NCH₂C_qCH und C_{Ar}), 126.32 (C_{Ar}), 125.18 (N(C=O)C_q), 42.70 (NCH₂), 31.93 (SC_q=CHCH₂), 31.79 (H₃CCH₂CH₂), 29.31 (H₃CCH₂CH₂CH₂), 29.08 (SC_q=CHCH₂CH₂CH₂), 28.02 (SC_q=CHCH₂CH₂), 22.72 (H₃CCH₂), 19.54 (Ph-CH₃), 14.18 (H₃CCH₂).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3419 (w, Oberschwingung C=O), 3023 (w, C-H aromatisch/ungesättigt, ν), 2953 (s, C-H gesättigt, ν), 2925 (s, C-H gesättigt, ν), 2855 (s, C-H gesättigt, ν), 1741 (s, C=O, ν), 1685 (s, C=O, ν), 1633 (s, C=C, ν), 1494 (m, C=C aromatisch, ν), 1463 (m, C-H gesättigt, δ), 1374 (m, C-H₃, δ_s), 741 (s, C-H, δ *out of plane*, *o*-substituierter Aromat).

SV49: (Z)-3-(2-Chlorbenzyl)-5-(4-fluorbenzyliden)-thiazolidin-2,4-dion



Molare Masse: 347.79 g/mol

Summenformel: C₁₇H₁₁ClFNO₂S

Methode: B1

Ansatz: -3-(2-Chlorbenzyl)thiazolidin-2,4-dion (SV_45): - 241.7 mg, 1.0 mmol (1.0 Äq.)

-Piperidin: 69.3 μ l, 0.7 mmol (0.7 Äq.)

-4-Fluorbenzaldehyd: 116.2 μ l, 1.1 mmol (1.1 Äq.)

Aufreinigung: Umkristallisation aus EtOH/MeOH [10/1]

Ausbeute: 188.7 mg (0.54 mmol, 54 %), gelber Feststoff

R_f-Wert: 0.41 (Petrolether/Ethylacetat [10/1])

Schmelzpunkt: 189.7 °C

Loop-ESI-MS: gefunden: [M+Na]⁺ 370.0; berechnet: 347.02

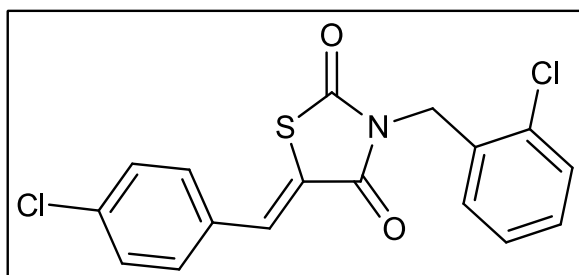
LC-MS: R_t = 15.8 min, Reinheit: > 99.9 %

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.90 (s, 1H, FPh-CH=C), 7.54–7.50 (m, 2H, FC_qCHCH), 7.42–7.15 (m, 6H, Ph-H), 5.06 (s, 2H, NCH₂).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 167.34 (SC=O), 166.02 (N(C=O)C_q), 163.88 (d, ¹J (C,F) = 254.4 Hz, FC_q), 133.33 (NCH₂C_q), 133.22 (FPh-CH=C_q), 132.49 (d, ³J (C,F) = 8.7 Hz, 2C, FC_qCHCH), 132.26 (NCH₂C_qC_qCl), 129.97 (C_{Ar}), 129.62 (d, ⁴J (C,F) = 3.5 Hz, FC_qCHCHC_q), 129.35 (C_{Ar}), 128.65 (NCH₂C_qCH), 127.14 (C_{Ar}), 120.95 (d, ⁶J (C,F) = 2.5 Hz, N(C=O)C_q), 116.76 (d, ²J (C,F) = 22.1 Hz, 2C, FC_qCH), 43.13 (NCH₂).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3398 (w, Oberschwingung C=O), 3102–3014 (w, C-H aromatisch/ungesättigt, ν), 2969–2938 (m, C-H₂, ν), 1738 (s, C=O, ν), 1668 (s, C=O, ν), 1613 (m, C=C, ν), 1595 (s, C=C aromatisch, ν), 1585 (s, C=C aromatisch, ν), 1507 (s, C=C aromatisch, ν), 1443 (m, C-H₂, δ), 1145 (s, Aryl-F), 1086 (m, Aryl-Cl), 836 (s, C-H, δ *out of plane*, *p*-substituierter Aromat), 749 (s, C-H, δ *out of plane*, *o*-substituierter Aromat).

SV50: (Z)-3-(2-Chlorbenzyl)-5-(4-chlorbenzyliden)-thiazolidin-2,4-dion



Molare Masse: 364.25 g/mol

Summenformel: C₁₇H₁₁Cl₂NO₂S

Methode: B1

Ansatz: -3-(2-Chlorbenzyl)thiazolidin-2,4-dion (SV_45): 241.7 mg, 1.0 mmol (1.0 Äq.)

-Piperidin: 69.3 µl, 0.7 mmol (0.7 Äq.)

-4-Chlorbenzaldehyd: 154.6 mg, 1.1 mmol (1.1 Äq.)

Aufreinigung: Umkristallisation aus EtOH/MeOH [10/1]

Ausbeute: 269.0 mg (0.74 mmol, 74 %), hellgelber Feststoff

R_f-Wert: 0.41 (Petrolether/Ethylacetat [10/1])

Schmelzpunkt: 192.7 °C

Loop-ESI-MS: gefunden: [M+Na]⁺ 386.0; berechnet: 362.99

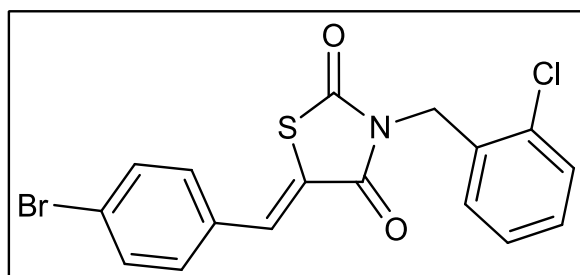
LC-MS: R_t = 16.7 min, Reinheit: > 99.9 %

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.88 (s, 1H, ClPh-CH=C), 7.48–7.43 (m, 4H, *p*-ClPh-H), 7.41–7.17 (m, 4H, *o*-ClPh-H), 5.06 (s, 2H, NCH₂).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 167.18 (SC=O), 165.95 (N(C=O)C_q), 136.98 (ClC_qCHCHC_q), 133.36 (NCH₂C_q), 133.03 (ClPh-CH=C_q), 132.22 (NCH₂C_qC_qCl), 131.78 (ClC_qCHCHC_q), 131.50 (2C, ClC_qCHCH), 130.00 (C_{Ar}), 129.77 (2C, ClC_qCH), 129.39 (C_{Ar}), 128.71 (NCH₂C_qCH), 127.16 (C_{Ar}), 121.91 (N(C=O)C_q), 43.19 (NCH₂).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3398 (w, Oberschwingung C=O), 3068–3021 (w, C-H aromatisch/ungesättigt, ν), 2972–2940 (m, C-H₂, ν), 1732 (s, C=O, ν), 1671 (s, C=O, ν), 1603 (s, C=C aromatisch, ν), 1585 (s, C=C aromatisch, ν), 1442 (m, C-H₂, δ), 1083 (m, Aryl-Cl), 834 (s, C-H, δ *out of plane*, *p*-substituierter Aromat), 749 (s, C-H, δ *out of plane*, *o*-substituierter Aromat).

SV51: (Z)-5-(4-Brombenzyliden)-3-(2-chlorbenzyl)-thiazolidin-2,4-dion



Molare Masse: 408.70 g/mol

Summenformel: C₁₇H₁₁BrClNO₂S

Methode: B1

Ansatz: -3-(2-Chlorbenzyl)thiazolidin-2,4-dion (SV_45): 241.7 mg, 1.0 mmol (1.0 Äq.)

-Piperidin: 69.3 µl, 0.7 mmol (0.7 Äq.)

-4-Brombenzaldehyd: 203.5 mg, 1.1 mmol (1.1 Äq.)

Aufreinigung: Umkristallisation aus EtOH/MeOH [10/1]

Ausbeute: 255.8 mg (0.63 mmol, 63 %), hellgelber Feststoff

R_f-Wert: 0.40 (Petrolether/Ethylacetat [10/1])

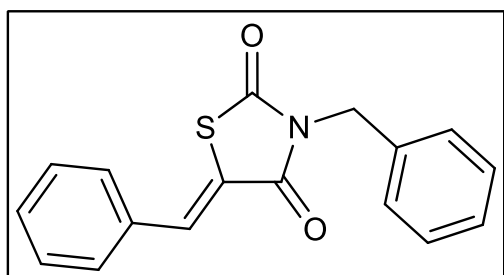
Schmelzpunkt: 199.5 °C

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.86 (s, 1H, BrPh-CH=C), 7.64–7.60 (m, 2H, BrC_qCH) 7.25–7.17 (m, 6H, Ph-H), 5.06 (s, 2H, NCH₂).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 167.14 (SC=O), 165.94 (N(C=O)C_q), 133.35 (NCH₂C_q), 133.08 (BrPh-CH=C_q), 132.73 (2C, BrC_qCH), 132.20 (2C, BrC_qCHCHC_q, NCH₂C_qCl), 131.63 (2C, BrC_qCHCH), 129.99 (C_{Ar}), 129.39 (C_{Ar}), 128.71 (NCH₂C_qCH), 127.16 (C_{Ar}), 125.39 (BrC_q), 122.06 (N(C=O)C_q), 43.19 (NCH₂).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3396 (w, Oberschwingung C=O), 3064–3020 (w, C-H aromatisch/ungesättigt, v), 2925 (m, C-H₂, v), 1730 (s, C=O, v), 1667 (s, C=O, v), 1602 (s, C=C, v), 1577 (s, C=C, v), 1485 (s, C=C, v), 1442 (m, C-H₂, δ), 1072 (m, Aryl-Cl), 1048 (m, Aryl-Br), 831 (s, C-H, δ *out of plane*, *p*-substituierter Aromat), 748 (s, C-H, δ *out of plane*, *o*-substituierter Aromat).

SV57: (Z)-3-Benzyl-5-benzylidenthiazolidin-2,4-dion



Molare Masse: 295.36 g/mol

Summenformel: C₁₇H₁₃NO₂S

Methode: B1

Ansatz: -3-Benzylthiazolidin-2,4-dion (SV_37): 207.3 mg, 1.0 mmol (1.0 Äq.)

-Piperidin: 69.3 µl, 0.7 mmol (0.7 Äq.)

-Benzaldehyd: 111.2 µl, 1.1 mmol (1.1 Äq.)

Aufreinigung: Umkristallisation aus EtOH/MeOH [10/1]

Ausbeute: 250.9 mg (0.85 mmol, 85 %), weißer Feststoff

R_f-Wert: 0.42 (Petrolether/Ethylacetat [10/1])

Schmelzpunkt: 134.8 °C

Loop-ESI-MS: gefunden: [M+Na]⁺ 318.0 und [M+H]⁺ 296.2; berechnet: 295.07

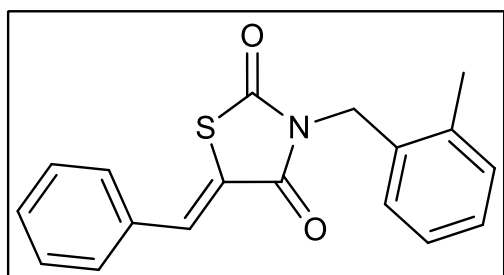
LC-MS: R_t = 15.4 min, Reinheit: > 99.9 %

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.91 (s, 1H, SC_q=CH), 7.51–7.28 (m, 10H, Ph-H), 4.91 (s, 2H, NCH₂).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 167.94 (SC=O), 166.31 (N(C=O)C_q), 135.29 (NCH₂C_q), 134.21 (SC_q=CH), 133.39 (SC_q=CHC_q), 130.70 (SC_q=CHC_qCHCH_q), 130.36 (2C, SC_q=CHC_qCH), 129.37 (2C, SC_q=CHC_qCHCH), 129.03 (2C, NCH₂C_qCHCH), 128.90 (2C, NCH₂C_qCH), 128.42 (NCH₂C_qCHCHCH), 121.63 (N(C=O)C_q), 45.43 (NCH₂).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3394 (w, Oberschwingung C=O), 3062–3036 (w, C-H aromatisch/ungesättigt, ν), 2954 (m, C-H₂, ν), 1730 (s, C=O, ν), 1669 (s, C=O, ν), 1603 (s, C=C aromatisch, ν), 1574 (s, C=C aromatisch, ν), 1495 (s, C=C aromatisch, ν), 1446 (m, C-H₂, δ), 734 und 697 (s, C-H, δ out of plane, monosubstituierter Aromat).

SV58: (Z)-5-Benzyliden-3-(2-methylbenzyl)-thiazolidin-2,4-dion



Molare Masse: 309.38 g/mol

Summenformel: C₁₈H₁₅NO₂S

Methode: B1

Ansatz: -3-(2-Methylbenzyl)thiazolidin-2,4-dion (SV_42): 221.3 mg, 1.0 mmol (1.0 Äq.)

-Piperidin: 69.3 µl, 0.7 mmol (0.7 Äq.)

-Benzaldehyd: 111.2 µl, 1.1 mmol (1.1 Äq.)

Aufreinigung: Umkristallisation aus EtOH/MeOH [10/1]

Ausbeute: 211.2 mg (0.68 mmol, 68 %), gelber Feststoff

R_f-Wert: 0.46 (Petrolether/Ethylacetat [10/1])

Schmelzpunkt: 169.2 °C

Loop-ESI-MS: gefunden: [M+Na]⁺ 332.0 und [M+H]⁺ 310.2; berechnet: 309.08

LC-MS: R_t = 16.1 min, Reinheit: > 99.9 %

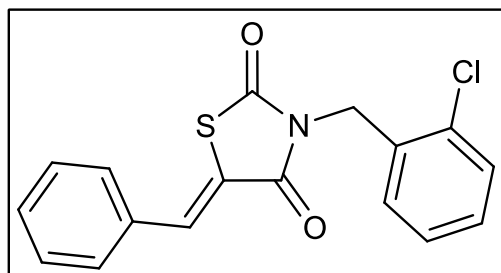
¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.92 (s, 1H, SC_q=CH), 7.53–7.41 (m, 5H, Ph-H), 7.24–7.14 (m, 4H, H₃CPh-H), 4.94 (s, 2H, NCH₂), 2.47 (s, 3H, Ph-CH₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 167.96 (SC=O), 166.44 (N(C=O)C_q), 136.36 (NCH₂C_q), 134.26 (SC_q=CH), 133.40 (SC_q=CHC_q), 133.11 (NCH₂C_qC_qCH₃), 130.74 (2C, SC_q=CHC_qCHCH), H₃CC_qCH), 130.39 (2C, SC_q=CHC_qCH), 129.39 (2C, SC_q=CHC_qCHCH), 128.16 (C_{Ar}), 128.12 (NCH₂C_qCH), 126.39 (C_{Ar}), 121.53 (N(C=O)C_q), 43.00 (NCH₂), 19.58 (Ph-CH₃).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3410 (w, Oberschwingung C=O), 3029 (w, C-H aromatisch/ungesättigt, ν), 2975–2924 (m, C-H gesättigt, ν), 1741 (s, C=O, ν), 1678 (s, C=O, ν), 1601 (s, C=C

aromatisch, ν), 1572 (s, C=C aromatisch, ν), 1490 (s, C=C aromatisch, ν), 1444 (m, C-H gesättigt, δ), 1373 (m, C-H₃, δ_s), 748 (s, C-H, δ *out of plane*, *o*-substituierter Aromat), 679 (s, C-H, δ *out of plane*, monosubstituierter Aromat).

SV59: (Z)-5-Benzyliden-3-(2-chlorbenzyl)-thiazolidin-2,4-dion



Molare Masse: 329.80 g/mol

Summenformel: C₁₇H₁₂ClNO₂S

Methode: B1

Ansatz: -3-(2-Chlorbenzyl)thiazolidin-2,4-dion (SV_45): 241.7 mg, 1.0 mmol (1.0 Äq.)

-Piperidin: 69.3 μ l, 0.7 mmol (0.7 Äq.)

-Benzaldehyd: 111.2 μ l, 1.1 mmol (1.1 Äq.)

Aufreinigung: Umkristallisation aus EtOH/MeOH [10/1]

Ausbeute: 235.6 mg (0.71 mmol, 71 %), beiger Feststoff

R_f-Wert: 0.46 (Petrolether/Ethylacetat [10/1])

Schmelzpunkt: 163.0 °C

Loop-ESI-MS: gefunden: [M+Na]⁺ 352.1 und [M+H]⁺ 330.3; berechnet: 329,03

LC-MS: R_t = 15.9 min, Reinheit: > 99.9 %

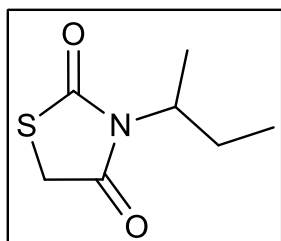
¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.94 (s, 1H, SC_q=CH), 7.54–7.42 (m, 5H, Ph-H), 7.41–7.17 (m, 4H, ClPh-H), 5.06 (s, 2H, NCH₂).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 167.66 (SC=O), 166.15 (N(C=O)C_q), 134.57 (SC_q=CH), 133.32 (2C, NCH₂C_q, SC_q=CHC_q), 132.33 (NCH₂C_qC_qCl), 130.83 (SC_q=CHC_qCHCH), 130.43 (2C, SC_q=CHC_qCH), 129.97 (C_{Ar}), 129.42 (2C,

SC_q=CHC_qCH_qCH), 129.32 (C_{Ar}), 128.61 (NCH₂C_qCH), 127.16 (C_{Ar}), 121.27 (N(C=O)C_q), 43.07 (NCH₂).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3400 (w, Oberschwingung C=O), 3050–3019 (w, C-H aromatisch/ungesättigt, v), 2968–2937 (m, C-H₂, v), 1739 (s, C=O, v), 1667 (s, C=O, v), 1597 (s, C=C aromatisch, v), 1573 (s, C=C aromatisch, v), 1493 (s, C=C aromatisch, v), 1444 (m, C-H₂, δ), 1042 (m, Aryl-Cl), 749 (s, C-H, δ *out of plane*, *o*-substituierter Aromat), 680 (s, C-H, δ *out of plane*, monosubstituierter Aromat).

SV60 61: 3-(*sec*-Butyl)-thiazolidin-2,4-dion



Molare Masse: 173.23 g/mol

Summenformel: C₇H₁₁NO₂S

Methode: A2

Ansatz: -Thiazolidin-2,4-dion: 5.00 g, 42.7 mmol (1 Äq.)

-K₂CO₃: 17.7 g, 128 mmol (3 Äq.)

-2-Bromobutan: 4.64 ml, 42.7 mmol (1 Äq.)

Aufreinigung: SC, PE/EtOAc [10/1] → [2/1]

Ausbeute: 3.91 g (22.6 mmol, 53 %), rotbraune Flüssigkeit

R_f-Wert: 0.69 (Petrolether/Ethylacetat [4/1])

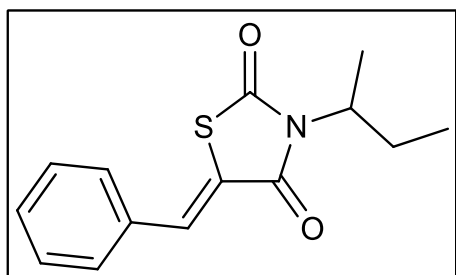
Loop-ESI-MS: gefunden: [M+Na]⁺ 196.1 und [M+H]⁺ 174.1; berechnet: 173,05

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 4.20 (dp, ³J = 9.0 Hz, ³J = 6.9 Hz, 1H, NCH), 3.86 (s, 2H, N(C=O)CH₂), 1.92 (ddq, ²J = 14.9 Hz, ³J = 9.0 Hz, ³J = 7.4 Hz, 1H, NCHCH_{2A}), 1.73–1.63 (m, 1H, NCHCH_{2B}), 1.34 (d, ³J = 6.9 Hz, 3H, NCHCH₃), 0.80 (t, ³J = 7.4 Hz, 3H, NCHCH₂CH₃).

^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 171.80 (C=O), 171.78 (C=O), 53.27 (NCH), 33.28 (N(C=O)CH₂), 25.69 (NCHCH₂), 17.21 (NCHCH₃), 11.08 (NCHCH₂CH₃).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3334 (w, Oberschwingung C=O), 2967 (s, C-H gesättigt, ν), 2933 (s, C-H gesättigt, ν), 2877 (s, C-H gesättigt, ν), 1671 (s, C=O, ν), 1455 (m, C-H gesättigt, δ), 1379 (s, C-H₃, δ_s).

SV62: (Z)-5-Benzyliden-3-(sec-butyl)-thiazolidin-2,4-dion



Molare Masse: 261.34 g/mol

Summenformel: C₁₄H₁₅NO₂S

Methode: B1

Ansatz: -3-(sec-Butyl)thiazolidin-2,4-dion (SV_61): 173.2 mg, 1.0 mmol (1.0 Äq.)

-Piperidin: 69.3 μl , 0.7 mmol (0.7 Äq.)

-Benzaldehyd: 111.2 μl , 1.1 mmol (1.1 Äq.)

Aufreinigung: SC, PE/EtOAc [25/1] \rightarrow [5/1]

Ausbeute: 210.1 mg (0.80 mmol, 80 %), hellbraune hochviskose Flüssigkeit

R_f-Wert: 0.55 (Petrolether/Ethylacetat [10/1])

Loop-ESI-MS: gefunden: [M+Na]⁺ 284.0 und [M+H]⁺ 262.1; berechnet: 261,08

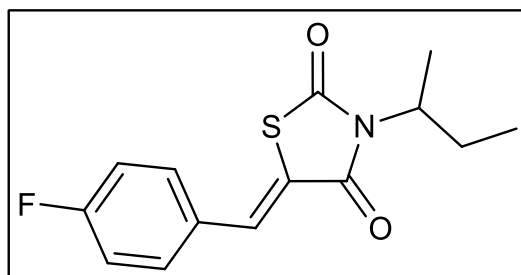
LC-MS: R_t = 15.5 min, Reinheit: > 99.9 %

^1H -NMR: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.85 (s, 1H, SC_q=CH), 7.51–7.39 (m, 5H, Ph-H), 4.42 (dp, $^3J = 9.1$ Hz, $^3J = 6.9$ Hz, 1H, NCH), 2.05 (ddq, $^2J = 14.9$ Hz, $^3J = 9.1$ Hz, $^3J = 7.4$ Hz, 1H, NCHCH_{2A}), 1.83–1.73 (m, 1H, NCHCH_{2B}), 1.46 (d, $^3J = 6.9$ Hz, 3H, NCHCH₃), 0.88 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 3H, NCHCH₂CH₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 167.87 (SC=O), 166.70 (N(C=O)C_q), 133.56 (SC_q=CHC_q), 133.37 (SC_q=CH), 130.43 (SC_q=CHC_qCHCH), 130.29 (2C, SC_q=CHC_qCH), 129.28 (2C, SC_q=CHC_qCHCH), 121.62 (N(C=O)C_q), 53.42 (NCH), 26.14 (NCHCH₂), 17.64 (NCHCH₃), 11.23 (NCHCH₂CH₃).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3409 (bw, Oberschwingung C=O), 3060–3027 (w, C-H aromatisch, ν), 2968 (s, C-H gesättigt, ν), 2935 (s, C-H gesättigt, ν), 2876 (s, C-H gesättigt, ν), 1739 (bs, C=O, ν), 1676 (s, C=O, ν), 1608 (s, C=C aromatisch, ν), 1574 (m, C=C aromatisch, ν), 1493 (m, C=C aromatisch, ν), 1447 (m, C-H gesättigt, δ), 1381 (s, C-H₃, δ_s), 760 und 686 (s, C-H, δ *out of plane*, monosubstituierter Aromat).

SV63: (Z)-3-(*sec*-Butyl)-5-(4-fluorbenzyliden)-thiazolidin-2,4-dion



Molare Masse: 279.33 g/mol

Summenformel: C₁₄H₁₄FNO₂S

Methode: B1

Ansatz: -3-(*sec*-Butyl)thiazolidin-2,4-dion (SV_61): 173.2 mg, 1.0 mmol (1.0 Äq.)

-Piperidin: 69.3 μ l, 0.7 mmol (0.7 Äq.)

-4-Fluorbenzaldehyd: 116.2 μ l, 1.1 mmol (1.1 Äq.)

Aufreinigung: Umkristallisation aus EtOH/MeOH [10/1]

Ausbeute: 150.6 mg (0.54 mmol, 54 %), hellgelber Feststoff

R_f-Wert: 0.50 (Petrolether/Ethylacetat [10/1])

Schmelzpunkt: 82.6 °C

Loop-ESI-MS: gefunden: [M+Na]⁺ 302.0 und [M+H]⁺ 280.1; berechnet: 279.07

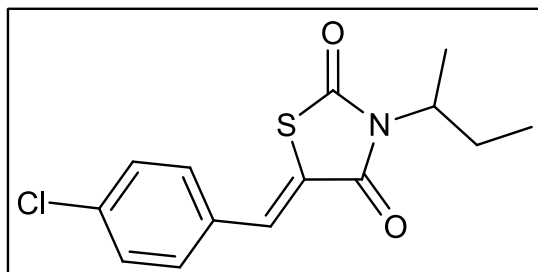
LC-MS: R_t = 15.4 min, Reinheit: > 99.9 %

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.81 (s, 1H, $\text{SC}_q=\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 7.52–7.47 (m, 2H, $\text{FC}_q\text{CH}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 7.19–7.14 (m, 2H, $\text{FC}_q\text{C}\underline{\text{H}}$), 4.42 (dp, $^3J = 9.2$ Hz, $^3J = 6.9$ Hz, 1H, $\text{NCH}\underline{\text{H}}$), 2.05 (ddq, $^2J = 14.9$ Hz, $^3J = 9.2$ Hz, $^3J = 7.4$ Hz, 1H, NCHCH_2A), 1.84–1.73 (m, 1H, NCHCH_2B), 1.46 (d, $^3J = 6.9$ Hz, 3H, NCHCH_3), 0.88 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 3H, $\text{NCHCH}_2\text{CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 167.64 ($\text{SC}=\text{O}$), 166.66 ($\text{N}(\underline{\text{C}}=\text{O})\text{C}_q$), 163.70 (d, 1J (C,F) = 253.7 Hz, FC_q), 132.35 (d, 3J (C,F) = 8.6 Hz, 2C, $\text{FC}_q\text{CH}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$), 132.14 (FPh- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}=\text{C}_q$), 129.90 (d, 4J (C,F) = 3.4 Hz, $\text{FC}_q\text{CHCH}\underline{\text{C}}_q$), 121.36 (d, 6J (C,F) = 2.5 Hz, $\text{N}(\text{C}=\text{O})\text{C}_q$), 116.66 (d, 2J (C,F) = 22.0 Hz, 2C, $\text{FC}_q\text{C}\underline{\text{H}}$), 53.56 (NCH), 26.17 (NCHCH_2), 17.68 (NCHCH_3), 11.26 ($\text{NCHCH}_2\text{CH}_3$).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3398 (w, Oberschwingung C=O), 3077 (w, C-H aromatisch, v), 2972 (s, C-H gesättigt, v), 2934 (s, C-H gesättigt, v), 2877 (s, C-H gesättigt, v), 1733 (s, C=O, v), 1672 (s, C=O, v), 1613 (s, C=C, v), 1599 (s, C=C aromatisch, v), 1587 (s, C=C aromatisch, v), 1508 (s, C=C aromatisch, v), 1459 (m, C-H gesättigt, δ), 1393 (m, C-H₃, δ_s), 1335 (s, Ar-F), 836 (s, C-H, δ out of plane, *p*-substituierter Aromat).

SV65: (Z)-3-(*sec*-Butyl)-5-(4-chlorbenzyliden)-thiazolidin-2,4-dion



Molare Masse: 295.78 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{ClNO}_2\text{S}$

Methode: B1

Ansatz: -3-(*sec*-Butyl)thiazolidin-2,4-dion (SV_61): 173.2 mg, 1.0 mmol (1.0 Äq.)

-Piperidin: 69.3 μl , 0.7 mmol (0.7 Äq.)

-4-Chlorbenzaldehyd: 154.6 mg, 1.1 mmol (1.1 Äq.)

Aufreinigung: Umkristallisation aus EtOH/MeOH [10/1]

Ausbeute: 163.9 mg (0.55 mmol, 55 %), gelber Feststoff

R_f-Wert: 0.33 (Petrolether/Ethylacetat [20/1])

Schmelzpunkt: 74.0 °C

Loop-ESI-MS: gefunden: [M+Na]⁺ 318.0 und [M+H]⁺ 296.2; berechnet: 295.04

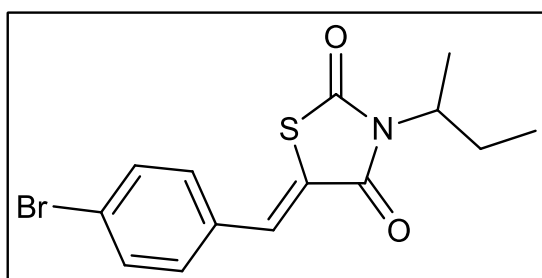
LC-MS: R_t = 16.6 min, Reinheit: 97.1 %

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.79 (s, 1H, SC_q=CH), 7.46–7.41 (m, 4H, ClPh-H), 4.41 (dp, ³J = 9.2 Hz, ³J = 6.9 Hz, 1H, NCH), 2.05 (ddq, ²J = 14.8 Hz, ³J = 9.2 Hz, ³J = 7.4 Hz, 1H, NCHCH_{2A}), 1.83–1.73 (m, 1H, NCHCH_{2B}), 1.46 (d, ³J = 6.9 Hz, 3H, NCHCH₃), 0.88 (t, ³J = 7.4 Hz, 3H, NCHCH₂CH₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 167.44 (SC=O), 166.55 (N(C=O)C_q), 136.56 (ClC_q), 132.06 (ClC_qCHCHC_q), 131.90 (SC_q=CH), 131.40 (2C, ClC_qCHCH), 129.65 (2C, ClC_qCH), 122.30 (N(C=O)C_q), 53.60 (NCH), 26.15 (NCHCH₂), 17.66 (NCHCH₃), 11.25 (NCHCH₂CH₃).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3405 (w, Oberschwingung C=O), 2965 (s, C-H gesättigt, ν), 2935 (s, C-H gesättigt, ν), 2876 (s, C-H gesättigt, ν), 1736 (s, C=O, ν), 1677 (s, C=O, ν), 1609 (s, C=C, ν), 1586 (s, C=C, ν), 1489 (s, C=C, ν), 1449 (m, C-H gesättigt, δ), 1395 (s, C-H₃, δ_s), 1093 (m, Ar-Cl), 815 (s, C-H, δ *out of plane*, *p*-substituierter Aromat).

SV66: (Z)-5-(4-Brombenzyliden)-3-(*sec*-butyl)-thiazolidin-2,4-dion



Molare Masse: 340.24 g/mol

Summenformel: C₁₄H₁₄BrNO₂S

Methode: B1

Ansatz: -3-(*sec*-Butyl)thiazolidin-2,4-dion (SV_61): 173.2 mg, 1.0 mmol (1.0 Äq.)

-Piperidin: 69.3 μ l, 0.7 mmol (0.7 Äq.)

-4-Brombenzaldehyd: 203.5 mg, 1.1 mmol (1.1 Äq.)

Aufreinigung: Umkristallisation aus EtOH/MeOH [10/1]

Ausbeute: 235.8 mg (0.69 mmol, 69 %), hellgelber Feststoff

R_f-Wert: 0.50 (Petrolether/Ethylacetat [15/1])

Schmelzpunkt: 96.6 °C

Loop-ESI-MS: gefunden: [M+Na]⁺ 362.0 und 364.0; berechnet: 338.99

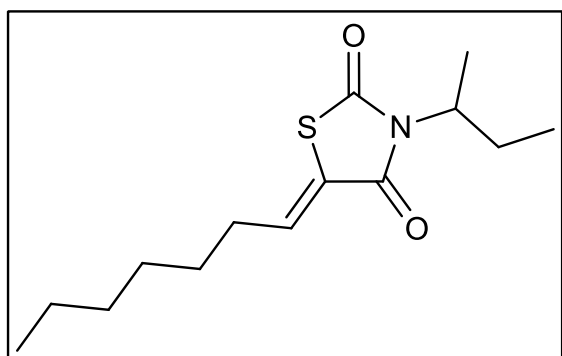
LC-MS: R_t = 16.8 min, Reinheit: 83.9 % (vor Umkristallisation)

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.77 (s, 1H, SC_q=CH), 7.61–7.58 (m, 2H, BrC_qCH), 7.37–7.34 (m, 2H, BrC_qCHCH), 4.41 (dp, ³J = 9.2 Hz, ³J = 6.9 Hz, 1H, NCH), 2.04 (ddq, ²J = 14.8 Hz, ³J = 9.2 Hz, ³J = 7.4 Hz, 1H, NCHCH_{2A}), 1.83–1.73 (m, 1H, NCHCH_{2B}), 1.46 (d, ³J = 6.9 Hz, 3H, NCHCH₃), 0.88 (t, ³J = 7.4 Hz, 3H, NCHCH₂CH₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 167.42 (SC=O), 166.55 (N(C=O)C_q), 132.62 (2C, BrC_qCH), 132.48 (BrC_qCHCHC_q), 131.96 (SC_q=CH), 131.55 (2C, BrC_qCHCH), 124.96 (BrC_q), 122.46 (N(C=O)C_q), 53.62 (NCH), 26.15 (NCHCH₂), 17.67 (NCHCH₃), 11.25 (NCHCH₂CH₃).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3402 (w, Oberschwingung C=O), 3095 (w, C-H aromatisch, v), 2964 (s, C-H gesättigt, v), 2935 (s, C-H gesättigt, v), 2875 (s, C-H gesättigt, v), 1735 (s, C=O, v), 1677 (s, C=O, v), 1608 (s, C=C aromatisch, v), 1583 (s, C=C aromatisch, v), 1486 (s, C=C aromatisch, v), 1448 (m, C-H gesättigt, δ), 1396 (m, C-H₃, δ_s), 1072 (m, Ar-Br), 812 (s, C-H, δ *out of plane*, *p*-substituierter Aromat).

SV67: (Z)-3-(*sec*-Butyl)-5-heptylidenthiazolidin-2,4-dion



Molare Masse: 269.40 g/mol

Summenformel: C₁₄H₂₃NO₂S

Methode: B2

Ansatz: -3-(*sec*-Butyl)thiazolidin-2,4-dion (SV_61): 173.2 mg, 1.0 mmol (1.0 Äq.)

-Piperidin: 69.3 µl, 0.7 mmol (0.7 Äq.)

-Heptanal: 147.8 µl, 1.1 mmol (1.1 Äq.)

Aufreinigung: SC, PE/EtOAc [25/1] → [5:1]

Ausbeute: 209.7 mg (0.78 mmol, 78 %), braune hochviskose Flüssigkeit

R_f-Wert: 0.70 (Petrolether/Ethylacetat [10/1])

Loop-ESI-MS: gefunden: [M+Na]⁺ 292.1 und [M+H]⁺ 270.2; berechnet: 269.14

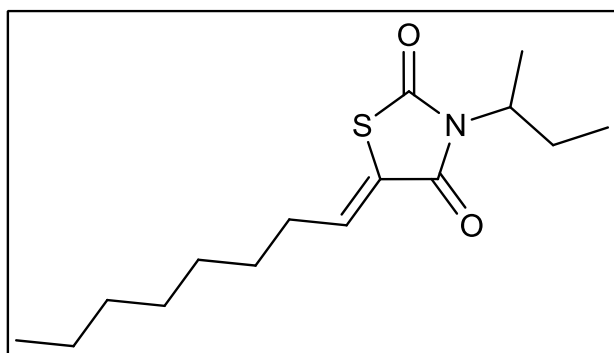
LC-MS: R_t = 17.3 min, Reinheit: 99.1 %

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.00 (t, ³J = 7.6 Hz, 1H, SC_q=CH), 4.33 (dp, ³J = 9.2 Hz, ³J = 6.9 Hz, 1H, NCH), 2.20 (dd, ³J = 14.9 Hz, ³J = 7.6 Hz, 2H, SC_q=CHCH₂), 1.99 (ddq, ²J = 14.9 Hz, ³J = 9.2 Hz, ³J = 7.4 Hz, 1H, NCHCH_{2A}), 1.78–1.67 (m, 1H, NCHCH_{2B}), 1.57–1.46 (m, 2H, SC_q=CHCH₂CH₂), 1.40 (d, ³J = 6.9 Hz, 3H, NCHCH₃), 1.37–1.22 (m, 6H, H₃CCH₂CH₂CH₂), 0.89–0.82 (m, 6H, H₃CCH₂CH₂, NCHCH₂CH₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 167.80 (SC=O), 165.54 (N(C=O)C_q), 138.21 (SC_q=CH), 125.16 (N(C=O)C_q), 53.11 (NCH), 31.80 (SC_q=CHCH₂), 31.60 (H₃CCH₂CH₂), 29.02 (H₃CCH₂CH₂CH₂), 28.00 (SC_q=CHCH₂CH₂), 26.09 (NCHCH₂), 22.61 (H₃CCH₂CH₂), 17.58 (NCHCH₃), 14.12 (H₃CCH₂CH₂), 11.21 (NCHCH₂CH₃).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3408 (w, Oberschwingung C=O), 2958 (s, C-H gesättigt, ν), 2928 (s, C-H gesättigt, ν), 2857 (s, C-H gesättigt, ν), 1744 (s, C=O, ν), 1681 (s, C=O, ν), 1632 (s, C=C, ν), 1458 (m, C-H gesättigt, δ), 1380 (m, C-H₃, δ_s), 737 (m, CH₂-rocking).

SV68: (Z)-3-(*sec*-Butyl)-5-octylidenthiazolidin-2,4-dion



Molare Masse: 283.43 g/mol

Summenformel: C₁₅H₂₅NO₂S

Methode: B2

Ansatz: -3-(*sec*-Butyl)thiazolidin-2,4-dion (SV_61): 173.2 mg, 1.0 mmol (1.0 Äq.)

-Piperidin: 69.3 µl, 0.7 mmol (0.7 Äq.)

-Octanal: 171.8 µl, 1.1 mmol (1.1 Äq.)

Aufreinigung: SC, PE/EtOAc [25/1] → [5:1]

Ausbeute: 202.4 mg (0.71 mmol, 71 %), braune hochviskose Flüssigkeit

R_f-Wert: 0.71 (Petrolether/Ethylacetat [10/1])

Loop-ESI-MS: gefunden: [M+Na]⁺ 306.1 und [M+H]⁺ 284.2; berechnet: 283.16

LC-MS: R_t = 18.0 min, Reinheit: 99.1 %

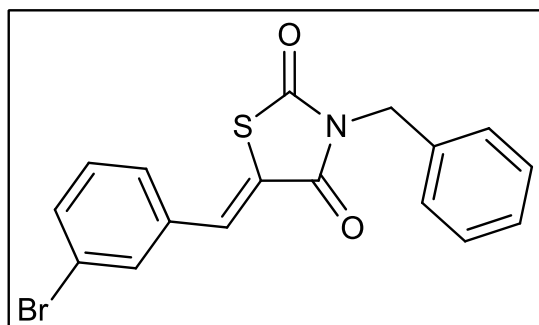
¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.00 (t, ³J = 7.6 Hz, 1H, SC_q=CH), 4.32 (dp, ³J = 9.1 Hz, ³J = 6.9 Hz, 1H, NCH), 2.19 (dd, ³J = 14.8 Hz, ³J = 7.6 Hz, 2H, SC_q=CHCH₂), 1.98 (ddq, ²J = 14.9 Hz, ³J = 9.1 Hz, ³J = 7.4 Hz, 1H, NCHCH_{2A}), 1.77–1.66 (m, 1H, NCHCH_{2B}), 1.51 (dt, ³J = 14.8 Hz, ³J = 7.2 Hz, 2H, SC_q=CHCH₂CH₂), 1.39 (d, ³J = 6.9 Hz, 3H, NCHCH₃), 1.37–1.25 (m, 8H, H₃CCH₂CH₂CH₂CH₂), 0.88–0.81 (m, 6H, H₃CCH₂CH₂, NCHCH₂CH₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 167.76 (SC=O), 165.51 (N(C=O)C_q), 138.18 (SC_q=CH), 125.14 (N(C=O)C_q), 53.08 (NCH), 31.78 (SC_q=CHCH₂), 31.76 (H₃CCH₂CH₂), 29.29 (H₃CCH₂CH₂CH₂), 29.05 (SC_q=CHCH₂CH₂CH₂), 28.02 (SC_q=CHCH₂CH₂), 26.07

(NCH \underline{C} H $\underline{2}$), 22.68 (H $\underline{3}$ C \underline{C} H $\underline{2}$ CH $\underline{2}$), 17.56 (NCH \underline{C} H $\underline{3}$), 14.13 (H $\underline{3}$ C \underline{C} H $\underline{2}$ CH $\underline{2}$), 11.19 (NCHCH $\underline{2}$ \underline{C} H $\underline{3}$).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm $^{-1}$] = 3417 (w, Oberschwingung C=O), 2958 (s, C-H gesättigt, ν), 2926 (s, C-H gesättigt, ν), 2856 (s, C-H gesättigt, ν), 1744 (s, C=O, ν), 1682 (s, C=O, ν), 1633 (s, C=C, ν), 1459 (m, C-H gesättigt, δ), 1380 (m, C-H $\underline{3}$, δ_s), 737 (m, CH $\underline{2}$ -rocking).

SV69: (Z)-3-Benzyl-5-(3-brombenzyliden)-thiazolidin-2,4-dion



Molare Masse: 374.25 g/mol

Summenformel: C $_{17}$ H $_{12}$ BrNO $_2$ S

Methode: B1

Ansatz: -3-Benzylthiazolidin-2,4-dion (SV_37): 207.3 mg, 1.0 mmol (1.0 Äq.)

-Piperidin: 69.3 μ l, 0.7 mmol (0.7 Äq.)

-3-Brombenzaldehyd: 128.8 μ l, 1.1 mmol (1.1 Äq.)

Aufreinigung: Umkristallisation aus EtOH/MeOH [10/1]

Ausbeute: 222.3 mg (0.59 mmol, 59 %), weißer Feststoff

R $_f$ -Wert: 0.28 (Petrolether/Ethylacetat [15/1])

Schmelzpunkt: 132.5 °C

Loop-ESI-MS: gefunden: [M+Na] $^+$ 396.2 und 398.2; berechnet: 372,98

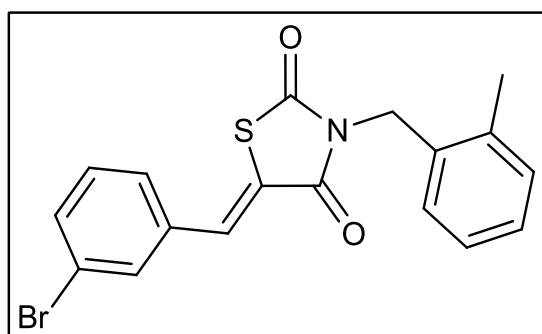
LC-MS: R $_t$ = 16.7 min, Reinheit: > 99.9 %

1 H-NMR: (CDCl $_3$, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.81 (s, 1H, SC $_q$ =CH), 7.62 (t, $^4J_{meta}$ = 1.8 Hz, 1H, BrC $_q$ CHC $_q$), 7.55 (ddd, $^3J_{ortho}$ = 7.9 Hz, $^4J_{meta}$ = 1.8 Hz, $^4J_{meta}$ = 1.1 Hz, 1H, BrC $_q$ CHCHCH), 7.45–7.31 (m, 7H, Ph-H), 4.90 (s, 2H, NCH $\underline{2}$).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 100.62 MHz), δ [ppm] = 167.39 ($\text{S}\underline{\text{C}}=\text{O}$), 165.97 ($\text{N}(\underline{\text{C}}=\text{O})\text{C}_q$), 135.41 ($\text{BrC}_q\text{CH}\underline{\text{C}}_q$), 135.12 ($\text{NCH}_2\underline{\text{C}}_q$), 133.46 ($\text{BrC}_q\underline{\text{C}}\text{HCHCH}$), 133.06 ($\text{BrC}_q\underline{\text{C}}\text{HC}\text{C}_q$), 132.27 ($\text{S}\text{C}_q=\underline{\text{C}}\text{H}$), 130.79 ($\text{BrC}_q\text{CH}\underline{\text{C}}\text{HCH}$), 129.05 (2C, $\text{NCH}_2\text{C}_q\text{CH}\underline{\text{C}}\text{H}$), 128.93 (2C, $\text{NCH}_2\text{C}_q\underline{\text{C}}\text{H}$), 128.50 ($\text{NCH}_2\text{C}_q\text{CHCH}\underline{\text{C}}\text{H}$), 128.44 ($\text{BrC}_q\text{CHCH}\underline{\text{C}}\text{H}$), 123.47 ($\text{Br}\underline{\text{C}}_q$), 123.37 ($\text{N}(\text{C}=\text{O})\underline{\text{C}}_q$), 45.56 ($\text{N}\underline{\text{C}}\text{H}_2$).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3410 (w, Oberschwingung C=O), 3058–3015 (w, C-H aromatisch/ungesättigt, ν), 2952 (w, C-H₂, ν), 1743 (s, C=O, ν), 1675 (s, C=O, ν), 1603 (s, C=C aromatisch, ν), 1551 (s, C=C aromatisch, ν), 1494 (s, C=C aromatisch, ν), 1456 (m, C-H₂, δ), 1084 (m, Aryl-Br), 826 (m) und 785 (s, C-H, δ *out of plane*, *m*-substituierter Aromat), 737 und 701 (s, C-H, δ *out of plane*, monosubstituierter Aromat).

SV70: (Z)-5-(3-Brombenzyliden)-3-(2-methylbenzyl)-thiazolidin-2,4-dion



Molare Masse: 388.28 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{BrNO}_2\text{S}$

Methode: B1

Ansatz: -3-(2-Methylbenzyl)thiazolidin-2,4-dion (SV_42): 221.3 mg, 1.0 mmol (1.0 Äq.)

-Piperidin: 69.3 μl , 0.7 mmol (0.7 Äq.)

-3-Brombenzaldehyd: 128.8 μl , 1.1 mmol (1.1 Äq.)

Aufreinigung: Umkristallisation aus EtOH/MeOH [10/1]

Ausbeute: 289.1 mg (0.74 mmol, 74 %), gelber Feststoff

R_f-Wert: 0.28 (Petrolether/Ethylacetat [15/1])

Schmelzpunkt: 156.8 °C

Loop-ESI-MS: gefunden: $[M+Na]^+$ 410.1 und 412.1; berechnet: 386,99

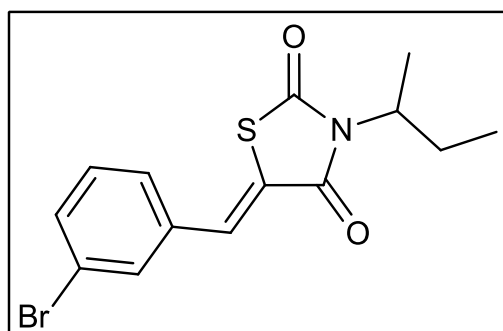
LC-MS: $R_t = 17.3$ min, Reinheit: 98.0 %

1H -NMR: ($CDCl_3$, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.82 (s, 1H, $SC_q=CH$), 7.64 (t, $^4J_{meta} = 1.7$ Hz, 1H, BrC_qCHC_q), 7.56 (ddd, $^3J_{ortho} = 7.9$ Hz, $^4J_{meta} = 1.7$ Hz, $^4J_{meta} = 1.1$ Hz, 1H, $BrC_qCHCHCH$), 7.43 (d, $^3J_{ortho} = 7.9$ Hz, 1H, $BrC_qCHCHCH$), 7.35 (t, $^3J_{ortho} = 7.9$ Hz, 1H, $BrC_qCHCHCH$), 7.23–7.14 (m, 4H, H_3CPh-H), 4.94 (s, 2H, NCH_2), 2.46 (s, 3H, $Ph-CH_3$).

^{13}C -NMR: ($CDCl_3$, 100.62 MHz), δ [ppm] = 167.41 ($SC=O$), 166.10 ($N(C=O)C_q$), 136.39 (NCH_2C_q), 135.42 (BrC_qCHC_q), 133.48 ($BrC_qCHCHCH$), 133.08 (BrC_qCHC_q), 132.95 ($NCH_2C_qC_qCH_3$), 132.33 ($SC_q=CH$), 130.81 ($BrC_qCHCHCH$), 130.78 (H_3CC_qCH), 128.48 ($BrC_qCHCHCH$), 128.25 (C_{Ar}), 128.18 (NCH_2C_qCH), 126.41 (C_{Ar}), 123.48 (BrC_q), 123.27 ($N(C=O)C_q$), 43.13 (NCH_2), 19.58 ($Ph-CH_3$).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3414 (w, Oberschwingung C=O), 3086–3024 (w, C-H aromatisch/ungesättigt, v), 2924 (w, C-H gesättigt, v), 1741 (s, C=O, v), 1682 (s, C=O, v), 1602 (s, C=C aromatisch, v), 1554 (m, C=C aromatisch, v), 1496 (m, C=C aromatisch, v), 1454 (w, C-H gesättigt, δ), 1373 (s, C-H₃, δ_s), 1075 (s, Aryl-Br), 824 (w) und 778 (s, C-H, δ *out of plane*, *m*-substituierter Aromat), 746 (s, C-H, δ *out of plane*, *o*-substituierter Aromat).

SV71: (Z)-5-(3-Brombenzyliden)-3-(*sec*-butyl)-thiazolidin-2,4-dion



Molare Masse: 340.24 g/mol

Summenformel: $C_{14}H_{14}BrNO_2S$

Methode: B1

Ansatz: -3-(*sec*-Butyl)thiazolidin-2,4-dion (SV_61): 173.2 mg, 1.0 mmol (1.0 Äq.)

-Piperidin: 69.3 μ l, 0.7 mmol (0.7 Äq.)

-3-Brombenzaldehyd: 128.8 μ l, 1.1 mmol (1.1 Äq.)

Aufreinigung: Umkristallisation aus EtOH/MeOH [10/1]

Ausbeute: 226.5 mg (0.67 mmol, 67 %), weißer Feststoff

R_f-Wert: 0.51 (Petrolether/Ethylacetat [10/1])

Schmelzpunkt: 86.7 °C

Loop-ESI-MS: gefunden: $[M+Na]^+$ 362.0 und 364.0, $[M+H]^+$ 340.1 und 342.1; berechnet: 338.99

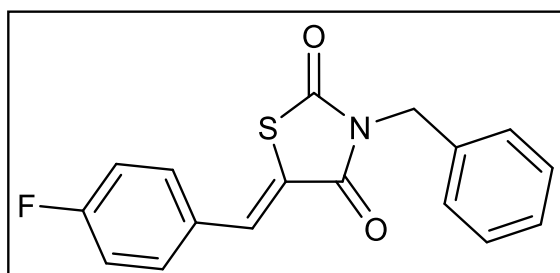
LC-MS: R_t = 16.9 min, Reinheit: 99.0 %

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.75 (s, 1H, SC_q=CH), 7.63 (t, ⁴J_{meta} = 1.7 Hz, 1H, BrC_qCHC_q), 7.54 (ddd, ³J_{ortho} = 7.9 Hz, ⁴J_{meta} = 1.7 Hz, ⁴J_{meta} = 1.1 Hz, 1H, BrC_qCHCHCH), 7.42 (d, ³J_{ortho} = 7.9 Hz, 1H, BrC_qCHCHCH), 7.34 (t, ³J_{ortho} = 7.9 Hz, 1H, BrC_qCHCHCH), 4.41 (dp, ³J = 9.1 Hz, ³J = 6.9 Hz, 1H, NCH), 2.05 (ddq, ²J = 14.8 Hz, ³J = 9.1 Hz, ³J = 7.4 Hz, 1H, NCHCH_{2A}), 1.84–1.73 (m, 1H, NCHCH_{2B}), 1.46 (d, ³J = 6.9 Hz, 3H, NCHCH₃), 0.88 (t, ³J = 7.4 Hz, 3H, NCHCH₂CH₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 167.37 (SC=O), 166.41 (N(C=O)C_q), 135.64 (BrC_qCHC_q), 133.24 (BrC_qCHCHCH), 133.04 (BrC_qCHC_q), 131.52 (SC_q=CH), 130.75 (BrC_qCHCHCH), 128.43 (BrC_qCHCHCH), 123.42 (BrC_q), 123.40 (N(C=O)C_q), 53.67 (NCH), 26.16 (NCHCH₂), 17.67 (NCHCH₃), 11.25 (NCHCH₂CH₃).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3402 (w, Oberschwingung C=O), 3060–3030 (w, C-H aromatisch/ungesättigt, ν), 2968 (s, C-H gesättigt, ν), 2936 (s, C-H gesättigt, ν), 2874 (s, C-H gesättigt, ν), 1738 (s, C=O, ν), 1678 (s, C=O, ν), 1606 (s, C=C aromatisch, ν), 1554 (m, C=C aromatisch, ν), 1476 (m, C=C aromatisch, ν), 1449 (m, C-H gesättigt, δ), 1388 (m, C-H₃, δ_s), 1073 (m, Aryl-Br), 778 (s, C-H, δ *out of plane*, *m*-substituierter Aromat).

SV75: (Z)-3-Benzyl-5-(4-fluorbenzyliden)-thiazolidin-2,4-dion



Molare Masse: 313.35 g/mol

Summenformel: C₁₇H₁₂FNO₂S

Methode: B1

Ansatz: -3-Benzylthiazolidin-2,4-dion (SV_37): 207.3 mg, 1.0 mmol (1.0 Äq.)

-Piperidin: 69.3 µl, 0.7 mmol (0.7 Äq.)

-4-Fluorbenzaldehyd: 116.2 µl, 1.1 mmol (1.1 Äq.)

Aufreinigung: Umkristallisation aus EtOH/MeOH [10/1]

Ausbeute: 245.0 mg (0.78 mmol, 78 %), gelb/oranger Feststoff

R_f-Wert: 0.55 (Petrolether/Ethylacetat [10/1])

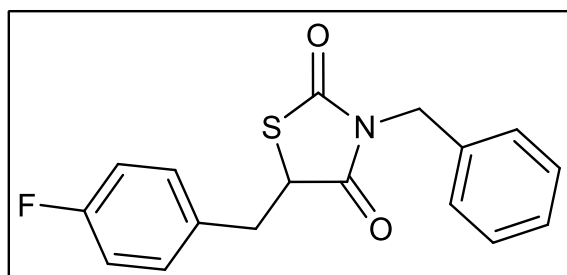
Schmelzpunkt: 131.0 °C

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.87 (s, 1H, SC_q=CH), 7.52–7.47 (m, 2H, FC_qCHCH), 7.44 (dd, ³J_{ortho} = 7.9 Hz, ⁴J_{meta} = 1.6 Hz, 2H, NCH₂C_qCH), 7.36–7.30 (m, 3H, NCH₂C_qCHCHCH), 7.19–7.13 (m, 2H, FC_qCH), 4.90 (s, 2H, NCH₂).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 167.65 (SC=O), 166.22 (N(C=O)C_q), 163.83 (d, ¹J (C,F) = 254.1 Hz, FC_q), 135.23 (NCH₂C_q), 132.90 (d, ⁵J (C,F) = 0.5 Hz, FPh-CH=C_q), 132.41 (d, ³J (C,F) = 8.7 Hz, 2C, FC_qCHCH), 129.69 (d, ⁴J (C,F) = 3.4 Hz, FC_qCHCHC_q), 129.03 (2C, NCH₂C_qCHCH), 128.91 (2C, NCH₂C_qCH), 128.46 (NCH₂C_qCHCH), 121.33 (d, ⁶J (C,F) = 2.5 Hz, N(C=O)C_q), 116.72 (d, ²J (C,F) = 22.1 Hz, 2C, FC_qCH), 45.49 (NCH₂).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3387 (w, Oberschwingung C=O), 3069–3040 (w, C-H aromatisch/ungesättigt, ν), 1731 (s, C=O, ν), 1671 (s, C=O, ν), 1609 (s, C=C, ν), 1595 (s, C=C aromatisch, ν), 1583 (s, C=C aromatisch, ν), 1507 (s, C=C aromatisch, ν), 1456 (w, C-H₂, δ), 1137 (s, Aryl-F), 830 (s, C-H, δ *out of plane*, *p*-substituierter Aromat), 739 und 693 (s, C-H, δ *out of plane*, monosubstituierter Aromat).

SV77: 3-Benzyl-5-(4-fluorbenzyl)-thiazolidin-2,4-dion



Molare Masse: 315.36 g/mol

Summenformel: C₁₇H₁₄FNO₂S

Methode: C1/C2

Ansatz (Methode C1): -(Z)-3-Benzyl-5-(4-fluorbenzyliden)thiazolidin-2,4-dion

(SV_75): 50.0 mg, 160 μmol (1.0 Äq.)

-Pd/C: 10.0 mg

-H₂/10 bar

Aufreinigung (C1): SC (Petrolether/Ethylacetat [15/1])

Ausbeute (C1): 40.0 mg (126.8 μmol, 79 %), hellgelbe, hochviskose Flüssigkeit

Ansatz (Methode C2): 3-Benzylthiazolidindion (SV37):

870.5 mg, 4.2 mmol (1.0 Äq.)

n-Buli (2.5 M/n-Hexan): 3.36 ml, 8.4 mmol (2.0 Äq.)

4-Fluorbenzylbromid: 519 μl, 4.2 mmol (1.0 Äq.)

Aufreinigung (C2): SC (Petrolether/Ethylacetat [15/1])

Ausbeute (C2): 205.4 mg (651 μmol, 16 %), hellgelbe, hochviskose Flüssigkeit

R_f-Wert: 0.18 (Petrolether/Ethylacetat [10/1])

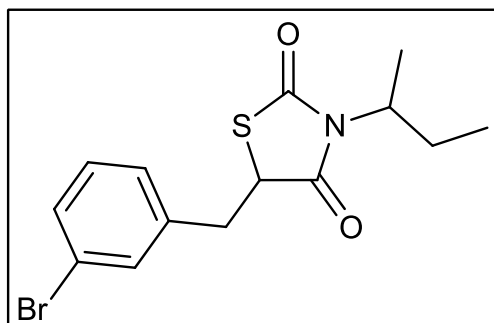
¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.30–7.23 (m, 5H, Ph-H), 7.13–7.08 (m, 2H, FC_qCHCH), 6.92–6.87 (m, 2H, FC_qCHH), 4.69 (s, 2H, NCH₂), 4.45 (dd, ³J = 8.3 Hz, ³J = 4.0 Hz, 1H, N(C=O)CH), 3.38 (dd, ²J = 14.2 Hz, ³J = 4.0 Hz, 1H, SCHCH_{2A}), 3.18 (dd, ²J = 14.2 Hz, ³J = 8.3 Hz, 1H, SCHCH_{2B}).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 173.62 (N(C=O)C_q), 170.74 (SC=O), 162.36 (d, ¹J (C,F) = 246.4 Hz, FC_q), 135.05 (NCH₂C_q), 131.19 (d, ³J (C,F) = 8.1 Hz, 2C, FC_qCHCH),

130.98 (d, 4J (C,F) = 3.3 Hz, FC_qCHCHC_q), 128.82 (2C, NCH₂C_qCHCH), 128.81 (2C, NCH₂C_qCH), 128.32 (NCH₂C_qCHCHCH), 115.74 (d, 2J (C,F) = 21.4 Hz, 2C, FC_qCH), 51.24 N(C=O)CH, 45.37 (NCH₂), 37.54 (SCHCH₂).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3416 (w, Oberschwingung C=O), 3066–3034 (w, C-H aromatisch, ν), 2926 (w, C-H gesättigt, ν), 1748 (m, C=O, ν), 1672 (s, C=O, ν), 1603 (m, C=C aromatisch, ν), 1508 (s, C=C aromatisch, ν), 1456 (w, C-H gesättigt, δ), 1222 (s, Aryl-F), 824 (m, C-H, δ *out of plane*, *p*-substituierter Aromat), 717 und 698 (s, C-H, δ *out of plane*, monosubstituierter Aromat).

SV81: 5-(3-Bromobenzyl)-3-(*sec*-butyl)-thiazolidin-2,4-dion



Molare Masse: 342.25 g/mol

Summenformel: C₁₄H₁₆BrNO₂S

Methode: C1

Ansatz: (Z)-5-(3-Brombenzyliden)-3-(*sec*-butyl)thiazolidin-2,4-dion (SV71):

50.0 mg, 147 μ mol (1.0 Äq.)

-Pd/C: 10.0 mg

-H₂/10 bar

Aufreinigung: SC (Petrolether/Ethylacetat [15/1] → [5/1])

Ausbeute: 23.4 mg (68.37 μ mol, 47 %), hellgelbe, hochviskose Flüssigkeit

R_f-Wert: 0.51 (Petrolether/Ethylacetat [5/1])

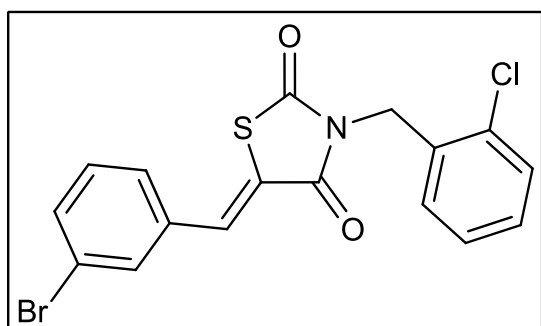
¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.33–7.22 (m, 4H, Ph-H), 4.40 (dd, 3J = 9.0 Hz, 3J = 3.8 Hz, 1H, N(C=O)CH), 4.18 (dp, 3J = 9.1 Hz, 3J = 6.9 Hz, 1H, NCH), 3.47 (dd, 2J = 14.0 Hz, 3J = 3.8 Hz, 1H, SCHCH_{2A}), 3.13 (dd, 2J = 14.0 Hz, 3J = 9.0 Hz, 1H, SCHCH_{2B}),

1.95–1.84 (m, 1H, NCHCH_{2A}), 1.71–1.61 (m, 1H, NCHCH_{2B}), 1.32 (d, ³J = 6.9 Hz, 3H, NCHCH₃), 0.75 (t, ³J = 7.5 Hz, 3H, NCHCH₂CH₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 174.34 (N(C=O)C_q), 171.14 (S_C=O), 135.78 (BrC_qCHC_q), 129.63 (C_{Ar}), 129.60 (C_{Ar}), 128.83 (C_{Ar}), 127.69 (C_{Ar}), 127.68 (C_{Ar}), 53.30 (NCH), 50.70 N(C=O)CH, 38.88 (SCHCH₂), 25.90 (NCHCH₂), 17.35 (NCHCH₃), 11.14 (NCHCH₂CH₃).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3407 (w, Oberschwingung C=O), 3063–3031 (w, C-H aromatisch, ν), 2968 (m, C-H gesättigt, ν), 2934 (m, C-H gesättigt, ν), 2877 (m, C-H gesättigt, ν), 1747 (m, C=O, ν), 1669 (s, C=O, ν), 1604 (w, C=C aromatisch, ν), 1496 (m, C=C aromatisch, ν), 1454 (m, C-H gesättigt, δ), 1381 (m, C-H₃, δ_s), 1031 (w, Aryl-Br), 788 (m, C-H, δ out of plane, m-substituierter Aromat).

SV91: (Z)-5-(3-Brombenzyliden)-3-(2-chlorbenzyl)-thiazolidin-2,4-dion



Molare Masse: 408.70 g/mol

Summenformel: C₁₇H₁₁BrClNO₂S

Methode: B1

Ansatz: -3-(2-Chlorbenzyl)thiazolidin-2,4-dion (SV_45):

50.0 mg, 0.21 mmol (1.0 Äq.)

-Piperidin: 14.3 μ l, 0.14 mmol (0.7 Äq.)

-3-Brombenzaldehyd: 26.6 μ l, 0.23 mmol (1.1 Äq.)

Aufreinigung: Umkristallisation aus EtOH/MeOH [10/1]

Ausbeute: 41.3 mg (0.10 mmol, 49 %), gelber Feststoff

R_f-Wert: 0.62 (Petrolether/Ethylacetat [10/1])

Schmelzpunkt: 179.4 °C

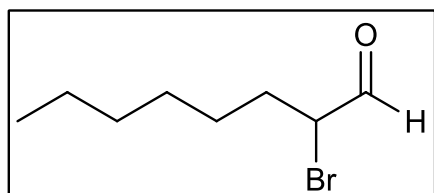
¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.84 (s, 1H, SC_q=CH), 7.65 (t, ⁴J_{meta} = 1.8 Hz, 1H, BrC_qCHC_q), 7.57 (ddd, ³J_{ortho} = 7.9 Hz, ⁴J_{meta} = 1.8 Hz, ⁴J_{meta} = 1.1 Hz, 1H, BrC_qCHCHCH), 7.45 (dd, ³J_{ortho} = 7.9 Hz, ⁴J_{meta} = 1.1 Hz, 1H, BrC_qCHCHCH), 7.42–7.38 (m, 1H, ClPh-H), 7.36 (t, ³J_{ortho} = 7.9 Hz, 1H, BrC_qCHCHCH), 7.27–7.17 (m, 3H, ClPh-H), 5.06 (s, 2H, NCH₂).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 167.10 (SC=O), 165.81 (N(C=O)C_q), 135.36 BrC_qCHC_q, 133.58 (BrC_qCHCHCH), 133.37 (NCH₂C_q), 133.12 (BrC_qCHC_q), 132.63 (BrPh-CH=C_q), 132.17 (NCH₂C_qC_qCl), 130.84 (BrC_qCHCHCH), 130.01 (ClC_{Ar}), 129.42 (ClC_{Ar}), 128.76 (NCH₂C_qCH), 128.52 (BrC_qCHCHCH), 127.18 (ClC_{Ar}), 123.52 (BrC_q), 123.04 (N(C=O)C_q), 43.22 (NCH₂).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3410 (w, Oberschwingung C=O), 3087–3027 (w, C-H aromatisch/ungesättigt, v), 2965–2933 (w, C-H₂, v), 1739 (s, C=O, v), 1682 (s, C=O, v), 1603 (s, C=C aromatisch, v), 1555 (m, C=C aromatisch, v), 1474 (s, C=C aromatisch, v), 1441 (w, C-H₂, δ), 1079 (s, Aryl-Cl), 1040 (s, Aryl-Br), 746 (s, C-H, δ *out of plane*, *o*-substituierter Aromat), 777 (s, C-H, δ *out of plane*, *m*-substituierter Aromat).

8.3.2 Derivate und Zwischenstufen der Thiazolin-2-one

SV92: 2-Bromooctanal



Molare Masse: 207.11 g/mol

Summenformel: C₈H₁₅BrO

Methode: D

Ansatz:

- Bortribromid: 385 µl, 4 mmol (1.0 Äq.) in DCM 12 ml
- 1-Octin: 590 µl, 4 mmol (1.0 Äq.)
- Na-Citrat-Puffer (2M/pH5): 12 ml
- methanol. Kaliumacetat-Lsg.: 1.96 g, 20 mmol (5 Äq.) in 10 ml MeOH

-H₂O₂ 35 %: 12 ml

Aufreinigung: SC (Cyclohexan/Ethylacetat [15/1])

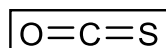
Ausbeute: 105 mg (507 μmol, 13 %), klare, farblose Flüssigkeit

R_f-Wert: 0.33 (n-Hexan/Diethylether [10/1])

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 9.42 (d, ³J = 3.1 Hz, 1H, CHO), 4.21 (ddd, ³J = 8.1 Hz, ³J = 6.2 Hz, ³J = 3.1 Hz, 1H, BrCH), 2.04 (ddt, ²J = 14.5 Hz, ³J = 9.9 Hz, ³J = 6.2 Hz, 1H, BrCHCH_{2A}), 1.95–1.86 (m, 1H, BrCHCH_{2B}), 1.56–1.23 (m, 8H, H₃CCH₂CH₂CH₂CH₂), 0.88 (t, ³J = 7.0 Hz, 3H, H₃C).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 192.96 (C=O), 55.61 (BrCH), 31.82 (BrCHCH₂), 31.60 (H₃CCH₂CH₂), 28.71 (H₃CCH₂CH₂CH₂), 27.02 (H₃CCH₂CH₂CH₂CH₂), 22.62 (H₃CCH₂), 14.13 (H₃C).

SV Kohlenoxysulfid



Molare Masse: 60.07 g/mol

Summenformel: COS

Methode: E

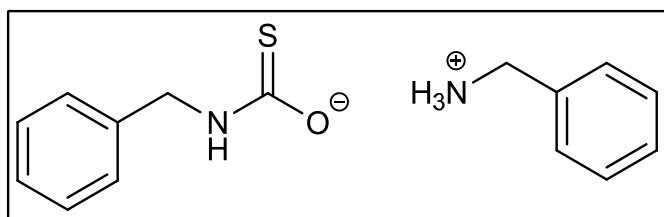
Ansatz: -H₂SO₄ konz.: 150 ml

-gesättigte, wässrige NH₄SCN-Lösung: 25 ml

Aufreinigung: Sofern nicht unmittelbar ohne weitere Aufreinigungsschritte weiter umgesetzt wurde das generierte Gas durch ein mit 33 % Natronlauge beschicktes Zehnkugelrohr und anschließend durch mit CaCO₃ und CaCl befüllte Waschflaschen geleitet und in einem U-Rohr bei ca. –70 °C kondensiert.

Eigenschaften: farbloses Gas

SV93: Benzylammonium-*N*-benzylthiocarbamat



Molare Masse: 274.38 g/mol

Summenformel: C₁₅H₁₈N₂OS

Methode: E/FAnsatz: -Benzylamin: 10.9 ml, 0.1 mol in 15 ml EtOH

-Kohlenoxysulfid ↑: frisch generiert aus gesättigter, wässriger NH₄SCN-Lösung und konzentrierter H₂SO₄ (vgl. Methode E)

Aufreinigung: Waschen des filtrierten Feststoffs mit Et₂O liefert sauberes Produkt

Ausbeute: 3.5 g (12.8 mmol, 26 %), weißer Feststoff

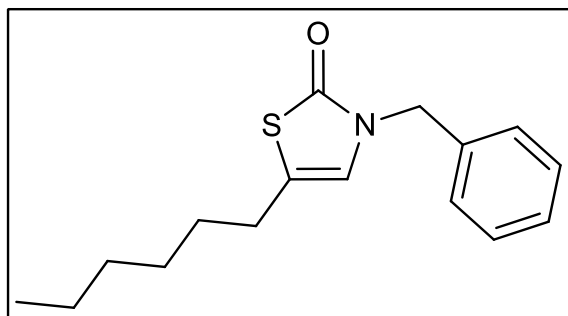
Schmelzpunkt: Zersetzung ab 45 °C

¹H-NMR: (DMSO-d₆, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.49–7.46 (m, 3H, Benzyl-NH₃), 7.39–7.14 (m, 10 H, Ph-H), 7.02 (s, 1H, Benzyl-NH), 4.13 (d, ³J = 5.1 Hz, 2H, Ph-CH₂NH), 4.06 (s, 2H, Ph-CH₂NH₃).

¹³C-NMR: (DMSO-d₆, 100.62 MHz), δ [ppm] = 184.39 (C=S), 141.66 (HNCH₂C_q), 135.36 (H₃NCH₂C_q), 128.75 (2C, H₃NCH₂C_qCH), 128.43 (2C, H₃NCH₂C_qCHCH), 128.01 (H₃NCH₂C_qCHCHCH), 127.89 (2C, HNCH₂C_qCH), 127.09 (2C, HNCH₂C_qCHCH), 126.03 (HNCH₂C_qCHCHCH), 44.02 (Ph-CH₂NH), 42.50 (Ph-CH₂NH₃).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3288 (s, N-H, ν), 2858 (bs, N-H₃⁺, ν), 1604 (m, C=C aromatisch, ν), 1584 (m, C=C aromatisch, ν), 1546 (s, N-H₃⁺, δ), 1492 (s, Amid II), 1453 (m, C-H₂, δ), 1213 (s, Amid I), 719 und 693 (s, C-H, δ *out of plane*, monosubstituierter Aromat).

SV94: 3-Benzyl-5-hexylthiazol-2(3H)-on



Molare Masse: 275.41 g/mol

Summenformel: C₁₆H₂₁NOS

Methode: G

Ansatz: -Benzylammonium-*N*-benzylthiocarbamat (SV93):

116.6 mg, 425 μmol (1.0 Äq.)

-2-Bromooctanal (SV92): 105 mg, 510 μmol (1.2 Äq.)

Aufreinigung: SC (PE/EtOAc [20/1] → [2/1])

Ausbeute: 13.5 mg (49 μmol, 12 %), gelbliche, hochviskose Flüssigkeit

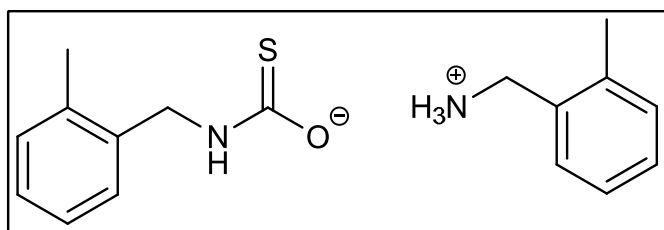
R_f-Wert: 0.43 (PE/EtOAc [5/1])

¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.38–7.24 (m, 5H, Ph-H), 6.15 (t, ⁴J = 1.2 Hz, 1H, NCH=C_q), 4.82 (s, 2H, NCH₂), 2.41 (dt, ³J = 6.7 Hz, ⁴J = 1.2 Hz, 2H, SC_qCH₂), 1.54–1.46 (m, 2H, SC_qCH₂CH₂), 1.33–1.23 (m, 6H, H₃CCH₂CH₂CH₂), 0.87 (t, ³J = 6.9 Hz, 3H, H₃C).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 171.97 (C=O), 136.37 (NCH₂C_q), 129.05 (2C, NCH₂C_qCHCH), 128.15 (NCH₂C_qCHCHCH), 127.95 (2C, NCH₂C_qCH), 120.13 (NCHC_q), 118.99 (NCHC_q), 48.41 (NCH₂), 31.54 (H₃CCH₂CH₂), 29.72 (SC_qCH₂CH₂), 28.81 (H₃CCH₂CH₂CH₂), 28.65 (SC_qCH₂), 22.65 (H₃CCH₂), 14.14 (H₃C).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3312 (w, Oberschwingung C=O), 3086–3032 (w, C-H aromatisch, ν), 2954 (s, C-H gesättigt, ν), 2925 (s, C-H gesättigt, ν), 2854 (s, C-H gesättigt, ν), 1658 (bs, C=O, ν), 1496 (m, C=C aromatisch, ν), 1455 (m, C-H₂, δ), 1374 (m, C-H₃, δ_s), 728 (m) und 698 (s, C-H, δ *out of plane*, monosubstituierter Aromat).

SV96: 2-Methylbenzylammonium-*N*-(2-methylbenzyl)-thiocarbamat



Molare Masse: 302.43 g/mol

Summenformel: C₁₇H₂₂N₂OS

Methode: E/F

Ansatz: -2-Methylbenzylamin: 5.12 ml, 41.2 mmol in 15 ml EtOH

-Kohlenoxysulfid ↑: frisch generiert aus gesättigter, wässriger NH₄SCN-Lösung und konzentrierter H₂SO₄ (vgl. Methode E)

Aufreinigung: Waschen des filtrierten Feststoffs mit Et₂O liefert sauberes Produkt

Ausbeute: 2.6 g (8.6 mmol, 42 %), weißer Feststoff

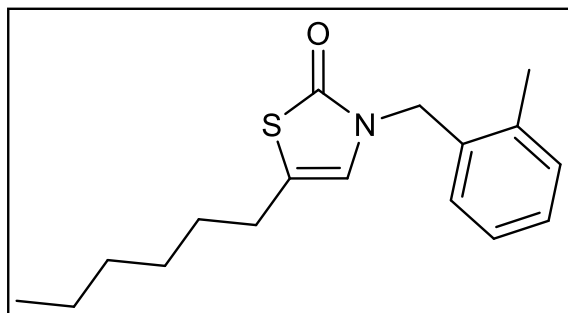
Schmelzpunkt: Zersetzung ab 45 °C

¹H-NMR: (DMSO-d₆, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.41–7.39 (m, 1H, Benzyl-NH), 7.23–7.05 (m, 8 H, Ph-H), 6.97–6.84 (m, 3H, Benzyl-NH₃), 4.11–4.10 (m, 2H, Ph-CH₂NH₃), 3.93 (m, 2H, Ph-CH₂NH), 2.31–2.23 (m, 6H, H₃C).

¹³C-NMR: (DMSO-d₆, 100.62 MHz), δ [ppm] = 183.98 (C=S), 139.13 (C_{q/Ar}), 137.96 (C_{q/Ar}), 136.02 (C_{q/Ar}), 134.87 (C_{q/Ar}), 129.97 (C_{Ar}), 129.44 (C_{Ar}), 128.27 (C_{Ar}), 127.45 (C_{Ar}), 127.22 (C_{Ar}), 125.98 (C_{Ar}), 125.85 (C_{Ar}), 125.40 (C_{Ar}), 41.93 (Ph-CH₂NH₃), 40.84 (Ph-CH₂NH), 18.64 (2C, Ph-CH₃).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3260 (s, N-H, v), 2836 (bs, N-H₃⁺, v), 1606 (m, C=C aromatisch, v), 1556 (s, N-H₃⁺, δ), 1504 (s, Amid II), 1459 (s, C-H gesättigt, δ), 1387 (m, C-H₃, δ_s), 1223 (s, Amid I), 747 (s, C-H, δ *out of plane*, *o*-substituierter Aromat).

SV102: 5-Hexyl-3-(2-methylbenzyl)-thiazol-2(3H)-on



Molare Masse: 289.44 g/mol

Summenformel: C₁₇H₂₃NOS

Methode: G

Ansatz: -2-Methylbenzylammonium-*N*-(2-methylbenzyl)-thiocarbamat (SV96):
1.512 g, 5 mmol (1.0 Äq.)

-2-Bromooctanal (SV92): 1.048 g, 5 mmol (1.0 Äq.)

Aufreinigung: SC (PE/EtOAc [20/1] → [2/1])

Ausbeute: 143 mg (494 μmol, 10 %), gelbliche, hochviskose Flüssigkeit

R_f-Wert: 0.21 (PE/EtOAc [10/1])

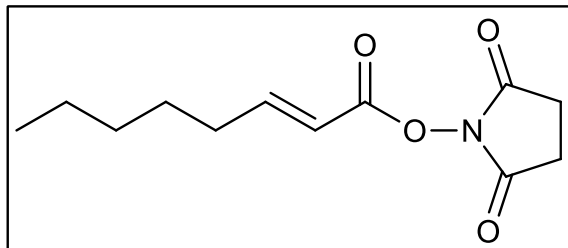
¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.24–7.11 (m, 4H, H₃CPh-H), 6.03 (t, ⁴J = 1.2 Hz, 1H, NCH=C_q), 4.81 (s, 2H, NCH₂), 2.39 (dt, ³J = 6.7 Hz, ⁴J = 1.2 Hz, 2H, SC_qCH₂), 2.29 (s, 3H, H₃C-Ph), 1.52–1.45 (m, 2H, SC_qCH₂CH₂), 1.32–1.19 (m, 6H, H₃CCH₂CH₂CH₂), 0.86 (t, ³J = 6.9 Hz, 3H, H₃CCH₂).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 171.77 (C=O), 136.75 (NCH₂C_q), 134.09 (H₃CC_q), 130.91 (H₃CC_qCH), 128.74 (NCH₂C_qCH), 128.42 (C_{Ar}), 126.49 (C_{Ar}), 120.07 (NCHC_q), 118.73 (NCHC_q), 46.70 (NCH₂), 31.51 (H₃CCH₂CH₂), 29.76 (SC_qCH₂CH₂), 28.79 (H₃CCH₂CH₂CH₂), 28.59 (SC_qCH₂), 22.63 (H₃CCH₂), 19.17 (Ph-CH₃), 14.12 (H₃CCH₂).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2954 (s, C-H gesättigt, ν), 2925 (s, C-H gesättigt, ν), 2855 (s, C-H gesättigt, ν), 1662 (bs, C=O, ν), 1493 (m, C=C aromatisch, ν), 1459 (s, C-H₂, δ), 1376 (m, C-H₃, δ_s), 740 (s, C-H, δ *out of plane*, *o*-substituierter Aromat).

8.3.3 Substrat 2-*trans*-Octenoyl-Coenzym A und Zwischenstufen

SV07: 2-*trans*-Octenoyl-*N*-hydroxysuccinimidester



Molare Masse: 239.27 g/mol

Summenformel: C₁₂H₁₇NO₄

Methode: I

Ansatz: -*N*-Hydroxysuccinimid: 1.73 g, 15 mmol (1.0 Äq.)

-2-*trans*-Octensäure: 2.26 ml, 15 mmol (1.0 Äq.)

-Dicyclohexylcarbodiimid DCC: 3.09 g, 15 mmol (1.0 Äq.)

Aufreinigung: Umkristallisation aus EtOH und SC (PE/EtOAc [10/1])

Ausbeute: 2.63 g (11 mmol, 73 %), weißer Feststoff

R_f-Wert: 0.24 (Petrolether/Ethylacetat [5/1])

Schmelzpunkt: 60–61 °C

Loop-ESI-MS: gefunden: [M+Na]⁺ 262.0 und [M+H]⁺ 240.2; berechnet: 239.12

LC-MS: R_t = 10.0 min, Reinheit: 97.9 %

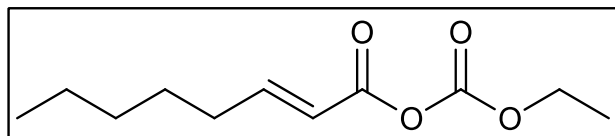
¹H-NMR: (CDCl₃, 400.13 MHz), δ [ppm] = 7.28 (dt, ³J_{trans} = 15.8 Hz, ³J = 6.9 Hz, 1H, CO₂CH=CH), 6.01 (dt, ³J_{trans} = 15.8 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 1H, CO₂CH=CH), 2.84 (s, 4H, N(C=O)CH₂CH₂), 2.32–2.26 (m, 2H, CO₂CH=CHCH₂), 1.54–1.46 (m, 2H, H₃CCH₂CH₂CH₂), 1.35–1.28 (m, 4H, H₃CCH₂CH₂CH₂), 0.89 (t, ³J = 7.0 Hz, 3H, H₃C).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100.62 MHz), δ [ppm] = 169.46 (2C, N(C=O)₂), 161.54 (CO₂CH=CH), 156.39 (CO₂CH=CH), 115.43 (CO₂CH=CH), 32.95 (CO₂CH=CHCH₂), 31.39 (H₃CCH₂CH₂), 27.37 (H₃CCH₂CH₂CH₂), 25.74 (2C, N(C=O)CH₂CH₂), 22.49 (H₃CCH₂), 14.01 (H₃C).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3509 (w, Oberschwingung C=O), 2955 (s, C-H gesättigt, v), 2925 (s, C-H gesättigt, v), 2859 (s, C-H gesättigt, v), 1770 (s, C=O, v), 1727 (bs, C=O, v), 1644 (s, C=O)

oder C=C, ν), 1454 (w, C-H gesättigt, δ), 1365 (m, C-H₃, δ_s), 1208 (s, C-O, ν), 726 (m, CH₂-rocking).

SV Ethylcarbonat-2-trans-octenoyl-anhydrid



Molare Masse: 214.26 g/mol

Summenformel: C₁₁H₁₈O₄

Methoden: H1/H2

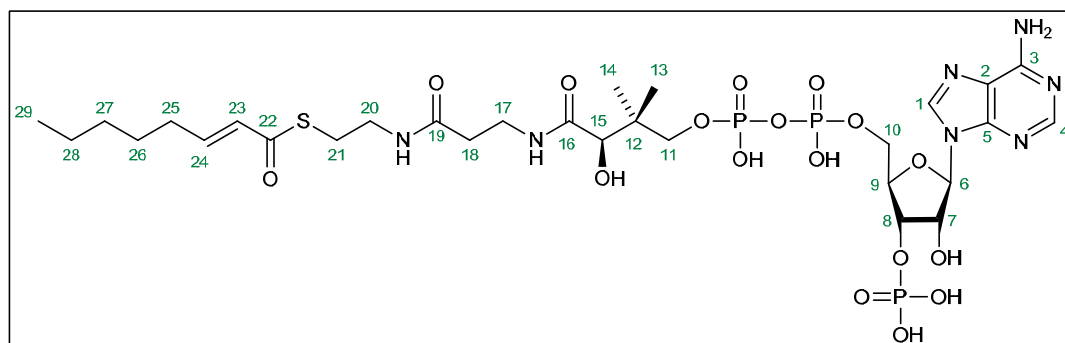
Ansatz: siehe Methoden H

Aufreinigung: Das Rohprodukt wurde unmittelbar weiter umgesetzt

Ausbeuten: mittels DC-Kontrollen wurde die quantitative Umsetzung nachvollzogen

R_f-Wert: 0.65 (PE/EtOAc [10/1])

SV 2-trans-Octenoylcoenzym A



Molare Masse: 891.71 g/mol

Summenformel: C₂₉H₄₈N₇O₁₇P₃S

Methoden: J1/2/3/4

Ansatz: siehe Methoden J (Kapitel 8.2.10)

Aufreinigung: siehe Methoden J (Kapitel 8.2.10)

Ausbeuten: J1 ($\leq 25\%$), J2 ($\leq 10\%$), J3 ($\leq 4\%$), J4 ($\leq 4\%$)

Loop-ESI-MS: gefunden: $[M+H]^+$ 892.3; berechnet: 891.20

$^1\text{H-NMR}$: (D_2O , 400.13 MHz), δ [ppm] = 8.63 (s, 1H, 4-H), 8.35 (s, 1H, 1-H), 6.98 (dt, $^3J_{trans} = 15.4$ Hz, $^3J = 6.9$ Hz, 1H, 24-H), 6.22 (d, $^3J = 4.7$ Hz, 1H, 6-H), 6.20 (d, $^3J_{trans} = 15.4$ Hz, 1H, 23-H), 4.89–4.84 (m, 2H, 7-H, 8-H), 4.63 (s, 1H, 9-H), 4.30 (s, 2H, 10-H₂), 4.06 (s, 1H, 15-H), 3.90–3.85 (m, 1H, 11-H_A), 3.63–3.59 (m, 1H, 11-H_B), 3.48 (t, $^3J = 6.4$ Hz, 2H, 17-H₂), 3.39 (t, $^3J = 6.2$ Hz, 2H, 20-H₂), 3.08 (t, $^3J = 6.2$ Hz, 2H, 21-H₂), 2.47 (t, $^3J = 6.4$ Hz, 2H, 18-H₂), 2.21 (dd, $^3J = 13.8$ Hz, $^3J = 6.9$ Hz, 2H, 25-H₂), 1.45 (dt, $^3J = 13.8$ Hz, $^3J = 7.1$ Hz, 2H, 26-H₂), 1.33–1.25 (m, 4H, 27-H₂, 28-H₂), 0.95 (s, 3H, 12-CH_{3A}), 0.87 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 3H, 29-H₃), 0.82 (s, 3H, 12-CH_{3B}).

$^{13}\text{C-NMR}$: (D_2O , 100.62 MHz): Trotz Messzeiten bis 72 h S/N-Verhältnis feldweise zu klein.

8.4 Expression und Aufreinigung von InhA

Nachfolgend sind einige charakteristische Parameter von InhA dargestellt (siehe Tabelle 27).

Tabelle 27: Charakteristische Parameter von InhA.

Molekular- gewicht	Isoelektrischer Punkt	Amino- säuren	SDS- Gel	Quartär- struktur	Extinktions- koeffizient ϵ	Korrekturfaktor (Nanodrop 280 nm)
28.5 kDa	5.73	269	15%	Tetramer	30940 M ⁻¹ cm ⁻¹	0.922

8.4.1 Transformation von kompetenten *E.coli*-Bakterien mit dem Plasmids pET15b

Es wurde 1 μ l Plasmid (pET15b, Novagen) auf 100 μ l kompetente *E.coli*-Zellen (BL21(DE3)pLysS, Stratagene) pipettiert und für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Nach Behandlung für 90 Sekunden bei 42 °C (Hitzeschock) erfolgte sofortige Eiskühlung. Es wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und anschließend für 15 Minuten bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. 100 μ l der transformierten Zellen wurden auf LB^{amp/com}-Agarplatten ausgestrichen, die Ampicillin (100 μ g/ml) und Chloramphenicol (34 μ g/ml) enthielten. Das Wachstum der positiven Transformanten erfolgte bei 37 °C über Nacht.

8.4.2 Expression von InhA in *E.coli*

Zur Kultivierung einer Vorkultur wurden zwei Kolonien der Transformanten geerntet und in mit 100 μ g/ml Ampicillin und 34 μ g/ml Chloramphenicol angereichertes LB-Medium eingebracht. Bei 37 °C und unter Schütteln mit 200 rpm wurde bis zur Zellsättigung inkubiert. Mit der Vorkultur wurde eine Hauptkultur in LB-Medium durch Animpfen bis zu einem OD₆₀₀-Wert von 0.05 angesetzt. Die Hauptkultur wurde bei 37 °C und Schütteln mit 200 rpm inkubiert. Bei einem OD₆₀₀-Wert von 0.5–0.6 erfolgte die Induktion durch Zufügen von Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid IPTG bis zur Endkonzentration von 0.5 mM und gleichzeitiger Temperaturniedrigung auf 30 °C. Nach 4 Stunden bei 30 °C unter Schütteln bei 200 rpm wurde die Zellsuspension für 15 Minuten bei 4 °C mit 5000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets bei –80 °C eingefroren.

8.4.3 Nickel-Affinitäts-Chromatographie

Bei einer Temperatur von 4 °C wurde das aufgetaute Bakterienpellet in Bindepuffer resuspendiert. Die Zellyse erfolgte durch Ultraschall. Das Zellysate wurde zentrifugiert (1 h, 50000 g, 4 °C) um die Zellfragmente vom Überstand zu trennen. Der Niederschlag wurde verworfen und der Überstand wurde mit der Probenpumpe P960 auf die Nickel-Affinitätssäule (HisTrap HP 5 ml Säule (GE Healthcare)), die zuvor mit Bindepuffer äquilibriert wurde, geladen. Mit acht Säulenvolumina Bindepuffer (5 mM Imidazol,

Durchflussfraktion) wurden die ungebundenen Proteine ausgewaschen. Anschließend wurden mit sechs Säulenvolumina Waschpuffer mit etwas höherer Konzentration an Imidazol (50 mM Imidazol, Waschfraktion) die unspezifisch gebundenen Proteine entfernt. Das Zielprotein InhA wurde kompetitiv durch einen Imidazol-Gradienten von 60–500 mM über 20 Säulenvolumina Elutionspuffer (500 mM Imidazol, Elutionsfraktion) aus dessen Bindung an die stationäre Phase verdrängt und eluiert. Das Volumen der gesammelten Fraktionen betrug 3 ml. Die Detektion erfolgte photometrisch bei 280 nm, sowie durch SDS-PAGE der Durchfluss-, Wasch- und Elutionsfraktionen. Die vereinigten Fraktionen des gereinigten Proteins wurden über PD10 DesaltingColumns (*GE Healthcare*) auf den Größenausschlusspuffer (20 mM PIPES pH 6.8, 150 mM NaCl) umgepuffert und vom Imidazol befreit. Das Volumen wurde über einen Zentrifugalfilter (*Vivaspin*, MW cut off 5000 Da) auf ca. 5 ml eingengt. Diese Proteinlösung wurde anschließend einer Größenausschlusschromatographie unterzogen. Die Zusammensetzungen der verwendeten Puffersysteme sind nachfolgend aufgeführt (siehe Tabelle 28).

Tabelle 28: Zusammensetzungen der Puffersysteme für die Nickel-Affinitäts-Chromatographie.

Bindepuffer	Waschpuffer	Elutionspuffer
20 mM TRIS pH 7.9	20 mM TRIS pH 7.9	20 mM TRIS pH 7.9
500 mM NaCl	500 mM NaCl	500 mM NaCl
5 mM Imidazol	50 mM Imidazol	500 mM Imidazol

8.4.4 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie (Size Exclusion Chromatography, SEC) erfolgte mit einem ÄktaPurifier 10 Flüssigkeitschromatographie-System (*GE Healthcare*) ausgestattet mit einer Probenpumpe P960, dem Detektionssystem Monitor pH/C-900 zur pH-, Leitfähigkeits- und Temperaturmessung, dem Detektionssystem Monitor UV-900 zur UV-VIS-Messung bei bis zu drei verschiedenen Wellenlängen und dem Fraktionssammler Frac-950. Es wurde eine HiLoad 26/60 Superdex 200pg-Säule (*GE Healthcare*) mit einem Säulenvolumen von 320 ml und einem Trennbereich von 10–600 kDa bei einer Flussrate von 1.5 ml/min und isokratisch eluierten gesammelten Fraktionsvolumina ca. 3.5 ml verwendet. Die Detektion erfolgte photometrisch bei 260 und 280 nm. Mittels SDS-PAGE wurden die Fraktionen mit reinem Protein identifiziert, vereinigt und über einen Zentrifugalfilter (*Vivaspin*, MW cut off 5000 Da) bis zur Konzentration von 6.7 mg/ml eingengt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit einem NanoDrop2000 Spektrophotometer (*Thermo Fisher*

Scientific) unter Einbezug eines Korrekturfaktors von 0.922. Die Proteinlösung wurde umgehend in Aliquote á 50 µl aufgeteilt und nach Einfrieren mit flüssigem Stickstoff bei – 80 °C gelagert. Die Zusammensetzung des verwendeten Puffersystems ist nachfolgend aufgeführt (siehe Tabelle 29).

Tabelle 29: Zusammensetzung des Größenausschlusspuffers.

Größenausschlusspuffer
20 mM PIPES pH 6.8
150 mM NaCl

8.4.5 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zum qualitativen Nachweis und zur Analyse des Reinheitsgrades des Proteins wurde nach jedem Aufreinigungsschritt ein SDS-Gel entwickelt. Um das Molekulargewicht der verschiedenen, nach Entwicklung erhaltenen Proteinbanden abschätzen zu können, wurde ein Größenmarker (*PageRuler Fermentas*) mitentwickelt, der bereits gefärbte Proteine bekannter Molekülmassen zwischen 10 und 170 kDa enthielt. Bevor die Proben auf das Gel aufgetragen wurden, wurden 10 µl der Proteinprobe mit 3 µl Ladepuffer 5x gemischt und für fünf Minuten bei 95 °C erhitzt. Die Entwicklung erfolgte bei einer angelegten Spannung von 200 V für 45 Minuten. Das Gel wurde anschließend für 20 Minuten die Färbelösung eingelegt um die Proteinbanden anzufärben. Vor der Auswertung wurde überschüssiger Farbstoff mit Entfärbelösung entfernt. Nachstehend sind die verwendeten Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE aufgelistet (siehe Tabelle 30).

Tabelle 30: Verwendete Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE.

Färbelösung	Entfärbelösung	Laufpuffer 1x	Ladepuffer 1x
50% Methanol	10% Methanol	25 mM TRIS	50 mM TRIS pH 6.8
10% Essigsäure	5 % Essigsäure	0.1% SDS	2% SDS
0.1% Coomassie brilliant blue		192 mM Glycin	0.1% Bromphenolblau
			10% Glycerol
			100 mM DTT

8.5 Enzymatische Testverfahren

Die Auswertung der gemessenen enzymkinetischen Daten erfolgte mit der Software GraFit Version 5.0.13 von *Erithacus Software Limited* oder SkanIt Version 2.3 von *Thermo Fisher Scientific*.

8.5.1 InhA-Assay

a) UV-VIS-spektroskopische Variante

Der gekoppelte enzymatische Assay wurde an einem *Appliscan-Microplate-Reader* von *ThermoFischerScientific* in transparenten 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Die angegebenen Konzentrationen sind Endkonzentrationen bei einem Gesamtvolumen von 100 µl pro Well. Das Screening der Substanzbibliothek erfolgte bei Inhibitorkonzentrationen von jeweils 20 µM, wobei jede Messung als Duplikat oder Triplikat durchgeführt wurde. Die Negativkontrolle erfolgte ohne Zugabe von Inhibitor (DMSO-Wert). Die Steigung der Geraden dieser Messung entspricht einer Enzymaktivität von 100 %. Die Steigungen der Geraden der Messungen mit Inhibitoren entsprechen den Restenzymaktivitäten. Die folgende Tabelle fasst die Assaybedingungen des Screenings zusammen (siehe Tabelle 31).

Tabelle 31: Assaybedingungen für die UV-VIS-spektroskopische Detektion.

InhA-Assay (Endvolumen 100 µl)	
Volumina	73 µl Puffer, 8 µl NADH 10mM, 12 µl 2toCoA 5mM, 5 µl DMSO bzw. Inhibitor 400 µM, 2 µl InhA 25µM
Endkonzentration/well	NADH 800 µM, 2toCoA 600 µM, DMSO/Inhibitor 5%/20 µM, InhA 500 nM
Substrat	2- <i>trans</i> -octenoyl-CoA (2toCoA), Cosubstrat NADH
Enzympuffer	PIPES 30 mM pH 6.8, 150 mM NaCl
Assaypuffer	PIPES 30 mM pH 6.8, 150 mM NaCl, 1mM EDTA
Temperatur	25 °C
Detektion	UV/VIS 340 nm
Screening	[I]: 20 µM
Verdünnungsreihe	[I]: 0–25 µM Triclosan

b) Fluorimetrische Variante

Der fluorimetrische Enzymassay wurde an einem Cary Eclipse Fluorimeter der Firma *Varian* mit weißen 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Die angegebenen Konzentrationen sind Endkonzentrationen bei einem Gesamtvolumen von 200 µl pro Well. Die Validierung erfolgte

durch Vermessung der Positivkontrolle Triclosan bei 20 μM , wobei jede Messung als Triplikat durchgeführt wurde. Die Negativkontrolle erfolgte ohne Zugabe von Inhibitor (DMSO-Wert). Die Steigung der Geraden dieser Messung entspricht einer Enzymaktivität von 100 %. Die Steigungen der Geraden der Messungen mit Inhibitor entsprechen den Restenzymaktivitäten. Die folgende Tabelle fasst die Assaybedingungen mit fluorimetrischer Detektion zusammen (siehe Tabelle 32).

Tabelle 32: Assaybedingungen für die fluorimetrische Detektion.

InhA-Assay (Endvolumen 200 μl)	
Volumina	142 μl Puffer, 20 μl NADH 5mM, 24 μl 2toCoA 5mM, 10 μl DMSO bzw. Inhibitor 400 μM , 4 μl InhA 25 μM
Endkonzentration/well	NADH 500 μM , 2toCoA 600 μM , DMSO/Inhibitor 5%/20 μM , InhA 500 nM
Substrat	2- <i>trans</i> -octenoyl-CoA (2toCoA), Cosubstrat NADH
Enzypuffer	PIPES 30 mM pH 6.8, 150 mM NaCl
Assaypuffer	PIPES 30 mM pH 6.8, 150 mM NaCl, 1mM EDTA
Temperatur	25 °C
Detektion	Ex 345 nm / Em 450 nm

8.5.2 Protease-Assays

Diese fluorimetrischen Enzymassays wurden an einem Cary Eclipse Fluorimeter der Firma *Varian* mit weißen 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Die angegebenen Konzentrationen sind Endkonzentrationen bei einem Gesamtvolumen von 200 μl pro Well. Das Screening an den Enzymen erfolgte bei Inhibitorkonzentrationen von jeweils 20 μM , wobei jede Messung als Duplikat durchgeführt wurde. Die Negativkontrolle erfolgte ohne Zugabe von Inhibitor (DMSO-Wert). Die Steigung der Geraden dieser Messung entspricht einer Enzymaktivität von 100 %. Die Steigungen der Geraden der Messungen mit Inhibitoren entsprechen den Restenzymaktivitäten. Die folgenden Tabellen fassen die Assaybedingungen des Screenings, sowie Herkunft der verwendeten Enzyme und Substrate zusammen (siehe Tabelle 33–40).

Tabelle 33: Assaybedingungen für Cathepsin B.

Cathepsin B	(humane Leber)
Volumina	180 μl Puffer, 5 μl Enzym, 10 μl DMSO bzw. Inhibitor 400 μM , 5 μl Substrat
Substrat	Z-Phe-Arg↓(7-amino-4-methylcumarin), HCl (100 μM), $K_m = 150 \mu\text{M}$

Experimentaltteil

Cathepsin B	(humane Leber)
Enzympuffer	TRIS-Puffer (pH 6.5): 50 mM TRIS, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 2mM DTT
Assaypuffer	TRIS-Puffer (pH 6.5): 50 mM TRIS, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0.005% Brij 35
Temperatur	25 °C
Detektion	Ex: 380 nm / Em: 460 nm, 10 min
Screening	[I]: 20 µM
Verdünnungsreihen	[I]: 0–20 µM

Tabelle 34: Assaybedingungen für Cathepsin L.

Cathepsin L	(<i>Paramecium tetraurelia</i> oder human liver)
Volumina	180 µl Puffer, 5µl Enzym, 10 µl DMSO bzw. Inhibitor 400 µM, 5 µl Substrat
Substrat	Z-Phe-Arg↓(7-amino-4-methylcumarin), HCl (6.25 µM), $K_m = 6.5 \mu\text{M}$
Enzympuffer	TRIS-Puffer (pH 6.5): 50 mM TRIS, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 2mM DTT
Assaypuffer	TRIS-Puffer (pH 6.5): 50 mM TRIS, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0.005% Brij 35
Temperatur	25 °C
Detektion	Ex: 380 nm / Em: 460 nm, 10 min
Screening	[I]: 20 µM
Verdünnungsreihen	[I]: 0–20 µM

Tabelle 35: Assaybedingungen für Rhodospain.

Rhodospain	(<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>)
Volumina	180 µl Puffer, 5µl Enzym, 10 µl DMSO bzw. Inhibitor 400 µM, 5 µl Substrat
Substrat	Z-Phe-Arg↓(7-amino-4-methylcumarin), HCl (10 µM), $K_m = 826.5 \text{ nM}$
Enzympuffer	Acetat-Puffer (pH 5.5): 50 mM Natriumacetat, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 2mM DTT
Assaypuffer	Acetat-Puffer (pH 5.5): 50 mM Natriumacetat, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0.005% Brij 35
Temperatur	25 °C
Detektion	Ex: 380 nm / Em: 460 nm, 10 min
Screening	[I]: 20 µM
Verdünnungsreihen	[I]: 0–20 µM

Experimententeil

Tabelle 36: Assaybedingungen für Falcipain.

Falcipain-2	<i>(Plasmodium falciparum)</i>
Volumina	180 µl Puffer, 5µl Enzym, 10 µl DMSO bzw. Inhibitor 400 µM, 5 µl Substrat
Substrat	Z-Phe-Arg↓(7-amino-4-methylcumarin), HCl (25 µM), $K_m = 21.5 \mu\text{M}$
Enzympuffer	Acetat-Puffer (pH 5.5): 50 mM Natriumacetat, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 2mM DTT
Assaypuffer	Acetat-Puffer (pH 5.5): 50 mM Natriumacetat, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0.005% Brij 35
Temperatur	25 °C
Detektion	Ex: 380 nm / Em: 460 nm, 10 min
Screening	[I]: 20 µM
Verdünnungsreihen	[I]: 0–20 µM

Tabelle 37: Assaybedingungen für Leishmania-CPB.

Leishmania-CPB	<i>(Leishmania mexicana)</i>
Volumina	180 µl Puffer, 5 µl Enzym, 10 µl DMSO bzw. Inhibitor 400 µM, 5 µl Substrat
Substrat	Z-Phe-Arg↓(7-amino-4-methylcumarin), HCl (10 µM), $K_m = 5 \mu\text{M}$
Enzympuffer	Phosphat-puffer
Assaypuffer	Phosphat-puffer
Temperatur	25 °C
Detektion	Ex: 380 nm / Em: 460 nm, 10 min
Screening	[I]: 20 µM
Verdünnungsreihen	[I]: 0–20 µM

Tabelle 38: Assaybedingungen für die Dengue-Protease.

Dengue-Protease	
Volumina	180 µl Puffer, 5µl Enzym, 10 µl DMSO bzw. Inhibitor 400 µM, 5 µl Substrat
Substrat	Boc-Gly-Arg-Arg↓(7-amino-4-methylcumarin), HCl, $K_m = 194 \mu\text{M}$
Enzympuffer	TRIS-Puffer (pH 9.0): 50 mM TRIS, 10 % Ethylenglykol, 0.0016% Brij
Assaypuffer	TRIS-Puffer (pH 9.0): 50 mM TRIS, 10 % Ethylenglykol, 0.0016% Brij
Temperatur	25 °C
Detektion	Ex: 380 nm / Em: 460 nm, 10 min
Screening	[I]: 20 µM
Verdünnungsreihen	[I]: 0–20 µM

Tabelle 39: Herkunft der jeweiligen Enzyme.

Cathepsin B	Calbiochem
Cathepsin L	Calbiochem
Rhodesain	Prof. Dr. C. Kisker, Universität Würzburg
Falcipain-2	M. Stempka, AK Schirmeister, Universität Würzburg
Leishmania-CPB2.8	Prof. Dr. J. Mottram, University of Glasgow, UK
Dengue-Protease	AK Dr. Jochen Bodem, Virologie Uni Würzburg

Tabelle 40: Herkunft der verwendeten Substrate.

Z-Phe-Arg↓(7-amino-4-methylcumarin), HCl	Bachem
Boc-Gly-Arg-Arg↓(7-amino-4-methylcumarin), HCl	Bachem

8.6 Mikroskalierte Thermophorese (MST)

Für die Markierung von InhA mit einem Fluoreszenzfarbstoff wurde das *Monolith NTTM Protein Labeling Kit RED-NHS* der Firma *NanoTemper* verwendet. Das Test-Kit setzt sich wie folgt zusammen.

- 25 µg NT-647-NHS dye
- Spin Column A, Buffer Exchange
- Gravity Flow Column B, Purification
- Adapter 15 ml Falcons
- Labeling Buffer

Die folgenden Arbeitsschritte wurden nach dem *Protein Labeling Procedure Manual (User Manual Monolith NTTM Protein Labeling Kit V011 Feb. 2012)* des Test-Kits durchgeführt. Im ersten Schritt wurde das aufgereinigte InhA mit InhA-Puffer auf eine Konzentration von 20 µM verdünnt und anschließend mit Labeling-Puffer umgepuffert. Im zweiten Schritt wurde das umgepufferte InhA mit dem Fluoreszenzfarbstoff NT-647-NHS gelabelt. Im dritten Schritt wurde das gelabelte Protein aufgereinigt.

Vor der Vermessung mit einem Gerät des Typs MonolithTM NT.115 der Firma *NanoTemper* wurden die gelabelte Proteinlösung mit den Proben der jeweiligen Triclosan-Verdünnungsreihe (mit oder ohne NAD⁺) im Verhältnis 1:1 gemischt und in die jeweiligen Kapillaren (Typ *K003 MonolithTM NT.115 Hydrophobic Capillaries*) aufgezogen.

9 Anhang

9.1 Literaturverzeichnis

- [1] Kornelia Grundmann, Christoph Friedrich, Zur Geschichte der Tuberkulosebehandlung, *PharmiuZ* **2012**, *41*, 10-18.
- [2] The Stop TB-Strategy, WHO, **2006**.
http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_HTM_STB_2006.368_eng.pdf.
Stand: 06/2014.
- [3] Global Tuberculosis Report, WHO, **2013**.
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/91355/1/9789241564656_eng.pdf
Stand: 06/2014.
- [4] Commercial Serodiagnostic Tests for Diagnosis of Tuberculosis, Policy Statement, WHO, **2011**.
http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241502054_eng.pdf
Stand: 06/2014.
- [5] Treatment of Tuberculosis, Guidelines, Fourth Edition, WHO, **2010**.
http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547833_eng.pdf
Stand: 06/2014.
- [6] Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis, WHO, **2011**.
http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501583_eng.pdf
Stand: 06/2014.
- [7] Marx, J. L., New disease baffles medical community, *Science* **1982**, *217*, 618-621.
- [8] WHO policy on collaborative TB/HIV activities, Guidelines for national programmes and other stakeholders, WHO, **2012**.
http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241503006_eng.pdf
Stand: 06/2014.
- [9] Madigan, M. T., Martinko, J. M., Brock Mikrobiologie, 11. Auflage, Pearson Studium, München, **2009**.
- [10] Koch, O., Selzer, P. M., Biologie der Mykobakterien und neue molekulare Targets, *PharmiuZ* **2012**, *41*, 19-26.

- [11] Hagemann, P. K. H., Fluoreszenzfärbung von Tuberkelbakterien mit Auramin, *Münchener Medizinische Wochenschrift* **1938**, 85, 1066-1068.
- [12] Koch, R., Die Aetiologie der Tuberculose, *Berl. Klein. Wochenschr.* **1882**, 19, 221-230.
- [13] Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E. et al., Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence, *Nature* **1998**, 393, 537-544.
- [14] Müller, A., Klinische Aspekte der Tuberkulose, *PharmiuZ* **2012**, 41, 27-34.
- [15] Lawn, S. D., Zumla, A. I., Tuberculosis, *Lancet* **2011**, 378, 57-72.
- [16] Maniar, J. A., Kamath, R. R., Mandalia, S., Shah, K., Maniar, A., HIV and Tuberculosis: Partners in Crime, *Indian J. Dermatol. Venerol. Leprol.* **2006**, 72, 276-282.
- [17] Kwan, C. K., Joel, D. E., HIV and tuberculosis: a deadly human syndemic, *Clin. Microbiol. Rev.* **2011**, 24, 351-376.
- [18] Deutsches Zentralkomitee zur Bekämpfung der Tuberkulose: Empfehlungen für die Umgebungsuntersuchungen bei Tuberkulose, *Pneumologie* **2011**, 65, 359-368 und *Gesundheitswesen* **2011**, 73, 369-388.
- [19] MIQ 5: Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik, Podbielski, A., Herrmann, M., Kniehl, E., Mauch, H., Rüssmann, H. (Hrsg.); Autoren: Richter, E., Beer, J., Diel, R., Hillemann, D., Hoffmann, H., Klotz, M. I., Mauch, H., Rüscher-Gerdes, S., *Tuberkulose / Mykobakteriose*, 2. Aufl. **2010**.
- [20] Boehme, C. C., Nabeta, P., Hillemann, D., Nicol, M. P., Shenai, S. et al., Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampicin Resistance, *N. Eng. J. M.* **2010**, 363, 1005-1015.
- [21] Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children, Policy Update, WHO **2013**.
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112472/1/9789241506335_eng.pdf.

Stand: 06/2014.

- [22] Deutsches Zentralkomitee zur Bekämpfung der Tuberkulose: Empfehlungen zur Therapie, Chemoprävention und Chemoprophylaxe der Tuberkulose im Erwachsenen- und Kindesalter, *Pneumologie* **2012**, *66*, 133-171.
- [23] Arbeitskreis Tuberkulose im Fachausschuss Infektionsschutz des Berufsverbandes der Ärztinnen und Ärzte des OGD. Sicherung des Behandlungserfolges bei Tuberkulose. *Epid Bull* **2012**, *11*, 93-95.
- [24] Abdool Karim, S. S., Naidoo, K., Grobler, A., Padayatchi, N., Baxter, C. et al., Timing of Initiation of Antiretroviral Drugs during Tuberculosis Therapy, *N. Engl. J. Med.* **2010**, *362*, 697-706.
- [25] Bala, S., Khanna, R. et al., Reclassification of *Amycolatopsis mediterranei* DSM 46095 as *Amycolatopsis rifamycinica* sp. nov., *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **2004**, *54*, 1145-1149.
- [26] Thomas L. Lemke, David A. Williams, Foye's Principles of Medicinal Chemistry, Sixth Edition, Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business **2008**.
- [27] Weeken, D., Schlitzer, M., Wirkstoffe gegen *Mycobacterium tuberculosis* in klinischer Anwendung, *PharmiuZ* **2012**, *41*, 35-47.
- [28] Arora, S. K., Correlation of structure and activity in ansamycins: structure, conformation and interactions of antibiotic rifamycin, *S. J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 1099-1102.
- [29] Campbell, E. A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S. et al., Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase, *Cell* **2001**, *104*, 901-912.
- [30] Levin, M. E., Hatfull, G. F., *Mycobacterium smegmatis* RNA polymerase: DNA supercoiling, action of rifampicin and mechanism of rifampicin resistance, *Mol. Microbiol.* **1993**, *8*, 277-285.
- [31] Blanchard, J. S., Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 215-239.
- [32] Holdiness, M. R., Clinical pharmacokinetics of the antituberculosis drugs, *Clin. Pharmacokinet.* **1984**, *9*, 511-544.

- [33] Jarvis, B., Lamb, H. M., Rifapentine, *Drugs* **1998**, *56*, 607-616.
- [34] Ghiladi, R. A., Medzihradzsky, K. F., Rusnak, F. M., Ortiz de Montellano, P. R., Correlation between Isoniazid Resistance and Superoxide Reactivity in *Mycobacterium tuberculosis* KatG, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13428-13442.
- [35] Bertrand, T., Eady, N. A. J., Jones, J. N., Jesmin, Nagy, J. M., Jamart-Grégoire, B., Lloyd Raven, E., Brown, K. A., Crystal Structure of *Mycobacterium tuberculosis* Catalase-Peroxidase, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 38991-38999.
- [36] Rawat, R., Whitty, A., Tonge, P. J., The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase: Adduct affinity and drug resistance, *PNAS USA* **2003**, *100*, 13881-13886.
- [37] Argyrou, A., Vetting, M. W., Aladegbami, B., Blanchard, J. S., *Mycobacterium tuberculosis* dihydrofolat reductase is a target for isoniazid, *Nat. Struc. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 408-413.
- [38] Zhang, Y., Yew, W. W., Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **2009**, *13*, 1320-1330.
- [39] Belanger, A. E., Besra, G. S., Ford, M. E., et al., The embAB genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol, *PNAS USA* **1996**, *93*, 11919-11924.
- [40] Zhang, Y., Wade, M. M., Scorpio, A., et al., Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid, *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *52*, 790-795.
- [41] Scorpio, A., Zhang, Y., Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus, *Nat. Med.* **1996**, *2*, 662-667.
- [42] Matteelli, A., Roggi, A., Carvalho, A. C. C., Extensively drug-resistant tuberculosis: epidemiology and management, *Clinical Epidemiology* **2014**, *6*, 111-118.
- [43] Laqua, K., Rudolph, I., Imming, P., Die Suche nach neuen Antituberkulotika, *PharmiuZ* **2012**, *41*, 48-57.

- [44] Kaufmann, S., Fact and fiction in tuberculosis vaccine research: 10 years later, *Lancet Inf. Dis.* **2011**, *11*, 633-640.
- [45] Winckler, T., Experimentelle Impfung gegen Tuberkulose, *PharmiuZ* **2012**, *41*, 7-8.
- [46] Rastogi, N., Structure and functions of the cell envelope in relation to mycobacterial virulence, pathogenicity and multiple drug resistance. 7th Form in microbiology. *Res. Microbiol.* **1991**, *142*, 419-481.
- [47] Minnikin, D. E., Chemical principles in the organization of lipid components in the mycobacterial cell envelope, *Res. Microbiol.* **1991**, *142*, 423-427.
- [48] Brennan, J. B., Nikaido, H., The envelope of Mycobacteria, *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 29-36.
- [49] Khasnobis, S., Escuyer, V. E., Chatterjee, D., Emerging therapeutic targets in tuberculosis: post-genomic era, *Expert Opin. Ther. Targets* **2002**, *6*, 21-40.
- [50] Favrot, L., Ronning, D. R., Targeting the mycobacterial envelope for tuberculosis drug development, *Expert Rev Anti Infect Ther.* **2012**, *10*, 1023-1036.
- [51] Verschoor, J. A., Baird, M. S., Grooten, J., Towards understanding the functional diversity of cell wall mycolic acids of *Mycobacterium tuberculosis*, *Progress in Lipid Research* **2012**, *51*, 325-339.
- [52] Barkan, D., Liu, Z., Sacchettini, J. C., Glickman, M. S., Mycolic acid cyclopropanation is essential for viability, drug resistance and cell wall integrity of *Mycobacterium tuberculosis*, *Chem Biol.* **2009**, *16*, 499-509.
- [53] Jackson, M., Stadthagen, G., Gicquel, B., Long-chain multiple methyl-branched fatty acid containing lipids of *Mycobacterium tuberculosis*: Biosynthesis, transport, regulation and biological activities, *Tuberculosis* **2007**, *87*, 78-86.
- [54] Brennan, P. J., Crick, D. C., The cell-wall core of *Mycobacterium tuberculosis* in the context of drug discovery, *Curr Top Med Chem.* **2007**, *7*, 475-488.
- [55] Topf, C. M., Schiebel, J., Kisker, C., Holzgrabe, U., Die Fettsäuresynthese als Angriffspunkt, *PharmiuZ* **2012**, *41*, 64-70.
- [56] Maier, T., Jenni, S., Ban, N.: Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5 Å resolution, *Science* **2006**, *311*, 1258-1262.

- [57] Maier, T., Leibundgut, M., Ban, N., The Crystal Structure of a Mammalian Fatty Acid Synthase, *Science* **2008**, *321*, 1315-1322.
- [58] Chan, D. I., Vogel, H. J., Current understanding of fatty acid biosynthesis and the acyl carrier protein, *Biochem. J.* **2010**, *430*, 1-19.
- [59] Roujenikova, A., Simon, W. J., Gilroy, J., Rice, D. W., Rafferty, J. B., Slabas, A. R., Structural studies of fatty acyl-(acyl carrier protein) thioesters reveal a hydrophobic binding cavity that can expand to fit longer substrates, *J Mol Biol* **2007**, *365*, 135-145.
- [60] White, S. W., Zheng, J., Zhang, Y. M., Rock, C. O., The structural biology of type II fatty acid biosynthesis, *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 791-831.
- [61] Barry, C. E., 3rd, Lee, R. E., Mdluli, K., Sampson, A. E., Schroeder, B. G., Slayden, R. A., Yuan, Y., Mycolic acids: structure, synthesis and biological functions, *Prog. Lipid Res.* **1998**, *37*, 143-179.
- [62] Zhang, Y. M., Lu, Y. J., Rock, C. O., The reductase steps of the type II fatty acid synthase as antimicrobial targets, *Lipids* **2004**, *39*, 1055-1060.
- [63] Payne, D. J., Warren, P. V., Holmes, D. J., Ji, Y., Lonsdale, J. T., Bacterial fatty-acid biosynthesis: a genomics-driven target for antibacterial drug discovery. *Drug Discov. Today* **2001**, *6*, 537-544.
- [64] Banerjee, A., Dubnau, E., Quemard, A., Balasubramanian, V., Um, K. S., Wilson, T., Collins, D., de Lisle, G., Jacobs, W. R. Jr., inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*, *Science* **1994**, *263*, 227-230.
- [65] Quemard, A., Sacchettini, J. C., Dessen, A., Vilchèze, C., Bittman, R., Jacobs, W. R. Jr., Blanchard, J. S., Enzymatic characterization of the target for isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*, *Biochemistry* **1995**, *34*, 8235-8241.
- [66] Rao, S. T., Rossmann, M. G., Comparison of super-secondary structures in proteins, *J. Mol. Biol.* **1973**, *76*, 241-250.
- [67] Dessen, A., Quemard, A., Blanchard, J. S., Jacobs, W. R. Jr., Sacchettini, J. C., Crystal structure and function of the isoniazid target of *Mycobacterium tuberculosis*, *Science* **1995**, *267*, 1638-1641.
- [68] Vilchèze, C., Morbidoni, H. R., Weisbrod, T. R., Iwamoto, H., Kuo, M., Sacchettini, J. C., Jacobs, W. R. Jr., Inactivation of the inhA-encoded fatty acid synthase II (FAS II)

- enoyl-acyl carrier protein reductase induces accumulation of the FAS I end products and cell lysis of *Mycobacterium smegmatis*, *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 4059-4067.
- [69] DeBarber, A. E., Mdluli, K., Bosman, M., Bekker, L. G., Barry 3rd., C. E., Ethionamide activation and sensitivity in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9677-9682.
- [70] Wang, F., Langley, R., Gulston, G., Dover, L. G., Besra, G. S. et al., Mechanism of thioamide drug action against tuberculosis and leprosy, *J. Exp. Med.* **2007**, *204*, 73-78.
- [71] Zhang, Y., Heym, B., Allen, B., Young, D., Cole, S., The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*, *Nature* **1992**, *358*, 591-593.
- [72] Morlock, G. P., Metchok, B., Sikes, D., Crawford, J. T., Cooksey, R. C., ethA, inhA and katG loci of ethionamide-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 3799-3805.
- [73] Freundlich, J. S., Wang, F., Vilchèze, C., Gulston, G., Langley, R. et al., Triclosan derivatives: Towards potent inhibitors of drug-sensitive and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, *Chem. Med. Chem.* **2009**, *4*, 241-248.
- [74] Luckner, S. R., Liu, N., am Ende, C. W., Tonge, P. J., Kisker, C., A slow, tight-binding inhibitor of InhA, the enoyl-acyl carrier protein reductase from *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 14330-14337.
- [75] He, X., Alian, A., Ortiz de Montellano, P. R., Inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl acyl carrier protein reductase InhA by arylamides, *Bioorgan. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6649-6658.
- [76] Pages, L. B., Castro Pichel, J., Gonzalez Menendez, R., Fernandez Velando, E. P., Gonzalez del Valle, S. et al., (Pyrazol-3-yl)-1,3,4-thiadiazol-2-amine and (Pyrazol-3-yl)-1,3,4-thiazol-2-amine Compounds, GlaxoSmithKline **2010**, *WO 2010/118852 A1*.
- [77] He, X., Alian, A., Stroud, R., Ortiz de Montellano, P. R., Pyrrolidine Carboxamides as a Novel Class of Inhibitors of Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase from *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6308-6323.
- [78] Waltenberger, C. R., Virtuelles Screening nach einer neuen Inhibitor-Klasse der Enoyl ACP-Reduktase InhA aus *Mycobacterium tuberculosis*, Dissertation **2012**, Universität Würzburg.

- [79] Baell, J. B., Observation on screening-based research and some concerning trends in the literature, *Future Med. Chem.* **2010**, *2*, 1529-1546.
- [80] Mendgen, T., Steuer, C., Klein, C. D., Privileged Scaffolds or Promiscuous Binders: A Comparative Study on Rhodanines and Related Heterocycles in Medicinal Chemistry, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 743-753.
- [81] Lipmann, F., Kaplan, N. O. et al., Coenzyme for acetylation, a pantothenic acid derivative, *J. Biol. Chem.* **1947**, *167*, 869.
- [82] Bruchhausen, F.v., Ebel, S., Hackenthal, E., Holzgrabe, U. (Hrsg.), Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis, 5. Auflage, Folgeband 4 Stoffe A-K, Springer **1999**.
- [83] Goldman, P., Vagelos, P. R., The Specificity of Triglyceride Synthesis from Diglycerides in Chicken Adipose Tissue, *J. Biol. Chem.* **1961**, *236*, 2620-2623.
- [84] Lapidot, Y., Rappoport, S., Wolman, Y., Use of esters of *N*-hydroxysuccinimide in the synthesis of *N*-acylamino acids, *Journal of Lipid Research* **1967**, *8*, 142-145.
- [85] Roth, H. J., Blaschke, G., Pharmazeutische Analytik, 3. überarbeitete Auflage **1989**, Georg Thieme Verlag Stuttgart New York.
- [86] Parikh, S., Moynihan, D. P., Xiao, G., Tonge, P. J., Roles of Tyrosine 158 and Lysine 165 in the Catalytic Mechanism of InhA, the Enoyl-ACP Reductase from *Mycobacterium tuberculosis*, *Biochemistry* **1999**, *38*, 13623-13634.
- [87] Al-Arif, A., Blecher, M., Synthesis of fatty acyl CoA and other thiol esters using *N*-hydroxysuccinimide esters of fatty acids, *Journal of Lipid Research* **1969**, *10*, 344-345.
- [88] Bernert, J. T. Jr., Sprecher, H., An Analysis of Partial Reactions in the Overall Chain Elongation of saturated and Unsaturated Fatty Acids by Rat Liver Microsomes, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 6736-6744.
- [89] Lucet-Levannier, K., Lellouche, J.-P., Mioskowski, C., Polysilylated Coenzyme A for a High-Yielding Preparation of Very Lipophilic Acyl Coenzymes A in Anhydrous Organic Solvents, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7546-7547.
- [90] Lucet-Levannier, K., Lellouche, J.-P., Mioskowski, C., *French Patent FR-A-2703356* **1994**, *European Patent EP-A-0618218* **1994**.

- [91] Ogilvie, K. K., The tert-Butyldimethylsilyl Group as a Protecting Group in Deoxynucleodides, *Can. J. Chem.* **1973**, *51*, 3799-3807.
- [92] Ellman, G. L., Tissue sulfhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 70-77.
- [93] Luckner, S. R.: Towards the development of high affinity InhA and KasA inhibitors with activity against drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Dissertation, Universität Würzburg, **2009**.
- [94] Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **1970**, *227*, 680-685.
- [95] Bisswanger, H., Enzymkinetik: Theorie und Methoden, 2. Auflage **1994**, VCH Weinheim.
- [96] Copeland, R. A., Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists **2005**, Wiley New York.
- [97] Brooks, H. B., Sandaruwan, G., Kahl, S. D., Montrose, C. Sittampalam, S., Smith, M. C., Weidner, J. R., Assay Guidance Manual, Basics of Enzymatic Assays for HTS, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, **2004-2014**.
- [98] Strelow, J., Dewe, W., Iversen, P. W., Brooks, H. B., Radding, J. A., McGee, J., Weidner, J., Assay Guidance Manual, Mechanism of Action assays for Enzymes, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, **2004-2014**.
- [99] Ludewig, S., Kossner M., Schiller, M., Baumann, K., Schirmeister, T., Enzyme Kinetics and Hit Validation in Fluorimetric Protease Assays, *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2010**, *10*, 1-15.
- [100] Cheng, Y.-C., Prusoff, W. H., Relationship between the Inhibition Constant (K_i) and the Concentration of Inhibitor which causes 50 per cent Inhibition (I_{50}) of an Enzymatic Reaction, *Biochemical Pharmacology* **1973**, *22*, 3099-3108.
- [101] Munson, P. J., Rodbard, D., An exact correction to the "Cheng-Prusoff" correction, *Journal of Receptor Research* **1988**, *8*, 533-546.
- [102] Beer, A., Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten, *Annalen der Physik und Chemie* **1852**, *86*, 78-88.

- [103] Parikh, S. L., Xiao, G., Tonge, P. J., Inhibition of InhA, the enoyl reductase from *Mycobacterium tuberculosis*, by triclosan and isoniazid, *Biochemistry* **2000**, *39*, 7645-7650.
- [104] Sullivan, T. J., Truglio, J. J., Boyne, M. E., Novichenok, P., Zhang, X., Stratton, C. F., Li, H. J., Kaur, T., Amin, A., Johnson, F., Slayden, R. A., Kisker, C., Tonge, P. J., High affinity InhA inhibitors with activity against drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 43-53.
- [105] Duhr, S., Braun, D., Why molecules move along a temperature gradient, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 19678-19682.
- [106] Jerabek-Willemsen, M., Wienken, C. J., Braun, D., Baaske, P., Duhr, S., Molecular interaction studies using microscale thermophoresis, *Assay Drug Dev. Technol.* **2011**, *9*, 342-353.
- [107] Merget, B., Zilian, D., Müller, T., Sottriffer, C. A., MycPermCheck: the *Mycobacterium tuberculosis* permeability prediction tool for small molecules, *Bioinformatics* **2013**, *29*, 62-68.
- [108] Manetti, F., Magnani, M., Castagnolo, D., Passalacqua, L., Botta, M., Corelli, F., Saddi, M., Deidda, D., De Logu, A., Ligand-based virtual screening, parallel solution-phase and microwave-assisted synthesis as tools to identify and synthesize new inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*, *Chem. Med. Chem.* **2006**, *1*, 973-989.
- [109] Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3-26.
- [110] Oliveira, J. S., Pereira, J. H., Canduri, F., Rodrigues, N. C., de Souza, O. N., de Azevedo, W. F. Jr, Basso, L. A., Santos, D. S., Crystallographic and pre-steady-state kinetics studies on binding of NADH to wild-type and isoniazid-resistant enoyl-ACP(CoA) reductase enzymes from *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Mol. Biol.* **2006**, *359*, 646-666.
- [111] Tonge, P. J., Kisker, C., Slayden, R. A., Development of modern InhA inhibitors to combat drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*, *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7*, 489-498.

- [112] Kanolt, C. W., Ionization of water at 0°, 18° and 25° derived from conductivity measurements of the hydrolysis of the ammonium salt of diketotetrahydrothiazole, *J. Am. Chem. Soc.* **1907**, 29, 1402-1416.
- [113] Chandrappa, S., Benaka Prasad, S. B., Vinaya, K., Ananda Kumar, C. S., Thimmegowda, N. R., Rangappa, K. S., Synthesis and in vitro antiproliferative activity against human cancer cell lines of novel 5-(4-methyl-benzylidene)-thiazolidine-2,4-diones, *Invest. New Drugs* **2008**, 26, 437-444.
- [114] Albers, H. M. H. G., van Meeteren, L. A., Egan, D. A., van Tilburg, E. W., Moolenaar, W. H., Ovaa, H., Discovery and optimization of boronic acid based inhibitors of autotaxin, *J Med Chem.* **2010**, 53, 4958-4967.
- [115] Lo, C.-P., Shropshire, E. Y., The Alkylation of 2,4-Thiazolidinedione, *J. Org. Chem.* **1957**, 22, 999-1001.
- [116] Sheehan, J. C.; Bolhofer, W. A., An Improved Procedure for the Condensation of Potassium Phthalimide with Organic Halides, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 2786-2788.
- [117] Knoevenagel, E., Ueber eine Darstellungsweise der Glutarsäure, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, 27, 2345-2346.
- [118] Hann, A. C. O., Lapworth, A., Optically active esters of β -ketonic and β -aldehydic acids. Part IV. Condensation of aldehydes with menthyl acetoacetate, *J.Chem. Soc.* **1904**, 85, 46-56.
- [119] Knoevenagel, E., Condensation von Malonsäure mit aromatischen Aldehyden durch Ammoniak und Amine, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1898**, 31, 2596-2619.
- [120] Crowell, T. I., Peck, D. W., Kinetic Evidence for a Schiff Base Intermediate in the Knoevenagel Condensation, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 1075-1077.
- [121] Bhat, B. A., Ponnala, S., Sahu, D. P., Tiwari, P., Tripathi, B. K., Srivastava, A. K., Synthesis and antihyperglycemic activity profiles of novel thiazolidinedione derivatives, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 5857-5864.
- [122] Mohler, D. L., Shen, G., Dotse, A. K., Solution- and Solid-Phase Synthesis of Peptide-Substituted Thiazolidinediones as Potential PPAR Ligands, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 2239-2242.

- [123] Dhara, K., Paladhi, S., Midya, G. C., Dash, J., Synthesis of spirocyclic thiazolidinediones using ring-closing metathesis and one-pot sequential ring-closing/cross metathesis, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 3801-3807.
- [124] Giles, R. G, Lewis, N. J., Quick, J. K., Sasse, M. J., Urquhart, M. W. J., Youssef, L., Regiospecific Reduction of 5-Benzylidene-2,4-Thiazolidinediones and 4-Oxo-2-thiazolidinethiones using Lithium Borohydride in Pyridine and Tetrahydrofuran, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 4531-4537.
- [125] Rakowitz, D., Maccari, R., Ottanà, R., Vigorita, M. G., In vitro aldose reductase inhibitory activity of 5-benzyl-2,4-thiazolidinediones, *Bioorg Med Chem.* **2006**, *14*, 567-574.
- [126] Friebolin, H., Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie, VCH Weinheim **1988**.
- [127] Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B., Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, 6. Auflage **2002**, Thieme Stuttgart.
- [128] Gold, V., McNaught, A. D., Wilkinson, A., IUPAC Compendium of Chemical Terminology, 2nd Edition **1997**.
- [129] Brauer, G., Handbuch der Präparativen Anorganischen Chemie, Band I **1960**, 580-581.
- [130] Cornwell, S. P., Kaye, P. T., Kent, A. G., Meakins, G. D., The structures of 4- and 5-substituted Δ^4 -thiazolin-2-ones, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1981**, 2340-2343.
- [131] Gelernt, Y., Sykes, P., Reaction of Nucleophiles with some 2-Alkylthio- and 2-Acylthio-3-alkylthiazolium Salts, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1974**, 2610-2616.
- [132] Satoh, Y., Tayano, T., Koshino, H., Hara, S., Suzuki, A., Organic Synthesis Using Haloboration Reaction; Part VI. Synthesis of 2-Bromoalkanals from 1-Alkynes, *Synthesis* **1985**, *4*, 406-408.
- [133] D'Amico, J. J., Fuhrhop, R. W., Bollinger, F. G. and Dahl, W. E., Synthesis of heterocyclic compounds from *o*-aminobenzenethiol and ammonium thiocarbamate. *J. Heterocyclic Chem.* **1986**, *23*, 641-645.
- [134] Slayden, R. A., Lee, R. E., Barry, C. E. 3rd., Isoniazid affects multiple components of the type II fatty acid synthase system of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mol. Microbiol.* **2000**, *38*, 514-525.
- [135] http://www.sfb630.uni-wuerzburg.de/quality_management/, Stand: 09.11.2014.

- [136] Nwaka, S., Ramirez, B., Brun, R., Maes, L., Douglas, F., Ridley, R., Advancing Drug Innovation for Neglected Diseases-Criteria for Lead Progression, *PLoS* **2009**, *3*, 1-13.
- [137] Thomson, J. A., Ladbury, J. E., Hrsg.: Ladbury, J. E., Doyle, M. L., Isothermal Titration Calorimetry: A Tutorial, *Biocalorimetry 2: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences*, **2004**, John Wiley & Sons.
- [138] Malmqvist, M., Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics, *Curr. Opin. Immunol.* **1993**, *5*, 282-286.
- [139] Radi, M., Botta, L., Casaluce, G., Bernardini, M., Botta, M., Practical One-Pot Two-Step Protocol for the Microwave-Assisted Synthesis of Highly Functionalized Rhodanine Derivatives, *Journal of Combinatorial Chemistry* **2010**, *12*, 200-205.
- [140] Baell, J. B., Holloway, G. A., New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and their exclusion in bioassays, *J. Med. Chem* **2010**, *53*, 2719-2740.
- [141] Tomasic, T., Masic, L. P., Rhodanine as a Privileged Scaffold in Drug Discovery, *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 1596-1629.
- [142] Tomasic, T., Zidar, N., Kovac, A., Turk, S., Simcic, M., Blanot, D., Mueller-Premru, M., Filipic, M., Grdadolnik, S. G., Zega, A., Anderluh, M., Gobec, S., Kikelj, D., Masic, L. P., 5-Benzylidenethiazolidin-4-ones as Multitarget Inhibitors of Bacterial Mur Ligases, *Chem. Med. Chem.* **2010**, *5*, 286-295.

9.2 Abkürzungsverzeichnis

2tO	2- <i>trans</i> -Octensäure
2toCoA	2- <i>trans</i> -Octenoyl-Coenzym A
ACN	Acetonitril
ACP	Acyl-Carrier-Protein
Äq.	Äquivalent
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ATP	Adenosintriphosphat
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
CoA	Coenzym A
CYP	Cytochrom P450
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DLS	Dynamic Light Scattering
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOTS	Directly Observed Treatment Short-Course
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
DTT	Dithiothreitol
ETH	Ethionamid
FAS	Fatty Acid Synthetase
GUS	Gemeinschaft Unabhängiger Staaten
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HTS	High Throughput Screening
IGRAs	Interferon-Gamma Release Assays
INH	Isoniazid
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
MDR-TB	Multidrug-resistant tuberculosis
MGIT	Mycobacteria Growth Indicator Tube
MHK	Minimale Hemmkonzentration

MOTT	Mycobacteria other than tuberculosis
MS	Massenspektrometrie
MSC	Microscale Thermophoresis
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OCoA	Octanoyl-Coenzym A
PAINS	pan assay interference compounds
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIPES	Piperazine- <i>N,N'</i> -bis(2-ethanesulfonic acid)
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAR	Structure Activity Relationship
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SOP	Standard Operation Protocol
SPR	Surface Plasmon Resonance
STIKO	Ständige Impfkommission
TB	Tuberkulose
THF	Tetrahydrofuran
THT	Tuberkulin-Hauttest
TMS	Tetramethylsilan
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Trometamol
WHO	World Health Organization
XDR-TB	Extensively drug-resistant tuberculosis

9.3 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation

**Untersuchungen von Thiazolidindionen und verwandten Fünfringheterozyklen als
Leitstruktur potenzieller Inhibitoren der Enoyl-ACP-Reduktase InhA des
*Mycobacterium tuberculosis***

selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den urkundlich vorgelegten und anerkannten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Simon Vogel