

Struktur-basiertes Design und Synthese von Inhibitoren der schistosomalen  
Histondesacetylase 8 - Neue Ansatzpunkte für die Therapie der Bilharziose

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

doctor rerum naturalium (Dr.rer.nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Herrn Apotheker Tino Heimburg

geb. am: 22.05.1983 in: Halle (Saale)

Gutachterin bzw. Gutachter

1. Prof. Dr. Wolfgang Sippl

2. Prof. Dr. Bodo Dobner

3. Prof. Dr. Manfred Jung

Halle (Saale), 11. November 2015







„Es kommt nicht darauf an, mit dem Kopf durch die Wand zu rennen, sondern mit den Augen die Tür zu finden.“

-Werner von Siemens-

Für meine Eltern.







# Inhaltsverzeichnis

## Inhalt

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	VI
Tabellenverzeichnis .....	X
Abkürzungen und Symbole .....	XI
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>- 1 -</b>
1.1 Die Humane Schistosomiasis.....	- 1 -
1.2 Epigenetik .....	- 3 -
1.2.1 Epigenetische Grundlagen.....	- 3 -
1.2.2 Histonmodifikationen .....	- 4 -
1.2.3 Histondesacetylasen.....	- 6 -
1.2.4 Struktur der Klasse 1 Histondesacetylasen.....	- 8 -
1.2.5 Bindungstasche und katalytischer Mechanismus der Histondesacetylase .....	- 8 -
1.3 Die schistosomale Histondesacetylase 8 als Target.....	- 11 -
1.3.1 Die schistosomale Histondesacetylasen ( <i>S. mansoni</i> ).....	- 11 -
1.3.2 Einfluss von Histondesacetylaseinhibitoren auf den Lebenszyklus von Schistosomen.....	- 11 -
1.3.3 Bekannte Histondesacetylaseinhibitoren.....	- 13 -
1.3.4 Hydroxamsäuren als selektive Histondesacetylaseinhibitoren.....	- 14 -
1.3.5 Entwicklung von SmHDAC-Inhibitoren anhand von Homologiemodellen, virtuellen “Screening“ und <i>in vitro</i> -Testungen .....	- 15 -
1.4 Zielstellung der Arbeit .....	- 18 -
<b>2. Synthetische Arbeiten .....</b>	<b>- 19 -</b>
2.1 Darstellung der 3-Aminobenzoensäuren.....	- 20 -
2.1.1 Darstellung einfach substituierter 3- <i>N</i> -(Cyclohexyl)-aminobenzoensäuren und 3- <i>N</i> -(Benzyl)-aminobenzoensäuren.....	- 20 -

2.1.2	Einführung einer <i>tert</i> -Butyloxycarbonylgruppe in die einfach substituierten 3- <i>N</i> -(Cyclohexyl)-aminobenzoesäuren und 3- <i>N</i> -(Benzyl)-aminobenzoesäuren.....	22 -
2.1.3	Darstellung einfach substituierter 3- <i>N</i> -( <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)-aminobenzoesäuren .....	25 -
2.2.	Darstellung der 3-Amidobenzoesäurederivate .....	25 -
2.2.1.	Auswahl des geeigneten Aktivierungsreagenz für die aromatischen Carbonsäuren .....	25 -
2.2.2.	Aktivierung mittels CDI.....	28 -
2.2.3.	Aktivierung mittels DCC und EDC .....	28 -
2.2.4.	Aktivierung als gemischtes Anhydrid.....	29 -
2.2.5.	Aktivierung mittels PyBOP® .....	30 -
2.2.6.	Aktivierung mittels Thionylchlorid .....	31 -
2.3.	Darstellung der 3-Amidobenzoesäuren .....	32 -
2.4.	Darstellung der 3,5-Dibenzamidobenzoesäure.....	37 -
2.5.	Darstellung der 9-Oxo-5,6,7,8-tetrahydroacridin-3-carbonsäure.....	38 -
2.6.	Darstellung der 3-( <i>N</i> -Phenyl)-carboxamidobenzoesäure .....	39 -
2.7.	Darstellung verschiedener 3-Benzamido-4-alkoxybenzhydroxamsäuren.....	39 -
2.7.1.	Darstellung von 3-Amino-4-ethoxybenzoesäure .....	41 -
2.8.	Darstellung der Benzhydroxamsäuren .....	46 -
2.8.1.	Darstellung der Benzhydroxamsäuren durch Substitution aktivierter Carbonsäuren durch Hydroxylamin.....	47 -
2.9.	Übersicht der dargestellten Benzhydroxamsäuren .....	53 -
2.9.1.	Übersicht der 3-Aminobenzhydroxamsäuren .....	53 -
2.9.2.	Übersicht der 3-Amidobenzhydroxamsäuren .....	54 -
2.8.3.	Übersicht diverser Hydroxamsäuren.....	56 -
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>57 -</b>
3.1.	Biochemische Charakterisierung der inhibitorischen Aktivität der dargestellten Verbindungen gegenüber der schistosomalen HDAC8.....	57 -

3.1.1.	Inhibitoren aus der Substanzklasse der 3-Aminobenzhydroxamsäuren .....	- 57 -
3.1.2.	Inhibitoren aus der Substanzklasse der 3-Amidobenzhydroxamsäuren .....	- 60 -
3.1.3.	Inhibitoren verschiedener Grundkörper .....	- 64 -
3.2.	Biochemische Charakterisierung der inhibitorischen Aktivität der dar-gestellten Verbindungen gegenüber den humanen Histondesacetylasen 1, 6 und 8 .....	- 66 -
3.2.1.	Fluor de Lys <sup>®</sup> und ZMAL im Vergleich <sup>151</sup> .....	- 66 -
3.3.	Röntgenkristallstrukturen ausgewählter Histondesacetylasen .....	- 73 -
3.3.1.	Röntgenkristallstruktur von SmHDAC8 kokristallisiert mit SAHA und T5979345 .....	- 73 -
3.3.2.	Röntgenkristallstrukturen ausgewählter Verbindungen kokristallisiert mit SmHDAC8 .....	- 73 -
3.3.3.	Vergleich der Bindetaschen von SmHDAC8 und HmHDAC8 .....	- 74 -
3.4.	Selektivität der dargestellten Substanzen .....	- 76 -
3.4.1.	Selektivität der dargestellten Substanzen zwischen SmHDAC8 und HmHDAC8 .....	- 76 -
3.5.	Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung der Verbindungen anhand der Proteinstruktur .....	- 79 -
3.5.1.	Inhibitoren mit 3-Aminobenzhydroxamsäure-Grundkörper .....	- 79 -
3.5.2.	Inhibitoren mit 3-Amidobenzhydroxamsäure-Grundkörper .....	- 81 -
3.5.3.	Inhibitoren mit unterschiedlichen Grundkörper .....	- 90 -
3.6.	Versuche über die Toxizität der dargestellten Verbindungen .....	- 94 -
3.6.1.	Toxizität auf <i>Schistosoma mansoni</i> .....	- 94 -
3.6.2.	Toxizität auf Jurkatzellen, Glioblastomazellen und HEK-Zellen .....	- 96 -
3.6.3.	Toxizität auf <i>Escherichia coli</i> und <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	- 97 -
<b>4.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>- 98 -</b>
4.1.	Zusammenfassung .....	- 98 -
<b>5.</b>	<b>Experimentelle Daten</b> .....	<b>- 100 -</b>
5.1.	Materialien und Methoden .....	- 100 -

5.1.1.	Chromatographische Methoden .....	- 100 -
5.1.2.	Massenspektrometrie .....	- 102 -
5.1.13.	NMR-Spektroskopie.....	- 103 -
5.1.14.	Computergestützte Methoden.....	- 103 -
5.2.	Synthese der Verbindungen.....	- 104 -
5.2.1.	Darstellung der 3-Aminobenzoessäuren.....	- 104 -
5.2.2.	Darstellung von 3- <i>N,N</i> -Dibenzylaminobenzoensäure.....	- 106 -
5.2.3.	Einführung der <i>tert</i> -Butyloxycarbonylgruppe .....	- 106 -
5.2.4.	Methode zur Darstellung einer Hydroxylaminlösung aus Hydroxylaminhydrochlorid.....	- 108 -
5.2.5	Methoden zur Darstellung der Hydroxamsäuren .....	- 108 -
5.2.6.	Abspaltung der Tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-ylgruppe.....	- 110 -
5.2.7.	Darstellung der 3- <i>N</i> -( <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)-benzhydroxamsäuren.....	- 111 -
5.2.8.	Darstellung der 3-Aminobenzhydroxamsäuren .....	- 113 -
5.2.9.	Darstellung der 3- <i>N,N</i> -Dibenzylaminobenzhydroxamsäure und 3- <i>N,N</i> -Dimethylaminobenzhydroxamsäure .....	- 114 -
5.2.10.	Darstellung verschiedener Hydroxamsäuren aus kommerziell erhältlichen Carbonsäuren .....	- 115 -
3.5.11.	Darstellung bestimmter 3-Amino-4-alkoxybenzo Säuremethylester .....	- 117 -
3.5.12.	Darstellung der 3-Aminobenzo Säuremethylester .....	- 120 -
3.5.13.	Esterhydrolyse der 3-Amidobenzo Säuremethylester .....	- 120 -
3.5.14.	Methoden zur Darstellung der 3-Amidobenzo Säuren.....	- 120 -
3.5.15.	Darstellung des 3-( <i>N</i> -Phenyl)-carboxamidobenzo Säuremethylesters.....	- 125 -
3.5.16.	Darstellung von 9-Oxo-5,6,7,8-tetrahydroacridin-3-carbonsäure .....	- 126 -
3.5.17.	Darstellung von 3,5- <i>bis</i> -Benzamidobenzo Säure .....	- 127 -
3.5.17.	Darstellung der 3-Amidobenzo Säuren .....	- 127 -
3.5.18.	Darstellung der 3-Amidobenzhydroxamsäuren.....	- 131 -
<b>Quellen</b>	.....	<b>- 141 -</b>

<b>Anhang</b> .....	<b>I</b>
<sup>1</sup> H-NMR und HPLC Spektren der Endverbindungen.....	II
Röntgenstrukturanalyse der SmHDAC8 (PDB-ID: 4BZ8) .....	XLVI
Computergestützte Methoden .....	XLVII
Toxizitätstest.....	XLVIII
SH-SY5Y Glioblastoma-Zellen .....	XLVIII
Jurkat Leukemia T-Zellen .....	XLIX
HEK-Zellen (human epithelial kidney-Zellen) .....	XLIX
<i>Escherichia coli</i> und <i>Sacharomyces cerevisiae</i> .....	L
<i>Schistosoma mansoni</i> .....	LI
Liste der Poster und Veröffentlichungen .....	- 1 -
Danksagung .....	- 2 -
Erklärung .....	- 4 -
Angaben zur Person .....	- 5 -
Lebenslauf.....	- 5 -

## Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: LEBENSZYKLUS <sup>164</sup> : S. MANSONI (S. M.), S. JAPONICUM (S. J.), S. HAEMATOBIMUM (S. H.).....	- 1 -
ABBILDUNG 2: DARSTELLUNG VERSCHIEDENER EPIGENETISCHER MODIFIZIERUNGEN. (MODIFIZIERT NACH MARDEN) <sup>29</sup> .....	- 3 -
ABBILDUNG 3: CHROMATINSTRUKTUR <sup>165</sup> (MODIFIZIERT NACH FIGUEIREDO, CROSS UND JANZEN). .....	- 4 -
ABBILDUNG 4: HISTONMODIFIZIERENDE ENZYME (HMEs) UND DEREN WIRKORT AM HISTON-DNA KOMPLEX. <sup>49</sup> (MODIFIZIERT NACH FILIPPAKOPOULOS UND KNAPP) .....	- 5 -
ABBILDUNG 5: HISTONACETYLIERUNG UND DESACETYLIERUNG. <sup>52</sup> (MODIFIZIERT NACH RODD, VERVERIS UND KARAGIANNIS) .....	- 6 -
ABBILDUNG 6: ACETYLIERUNG VON LYSIN. ....	- 6 -
ABBILDUNG 7: DIE HUMANE HDAC8 ALS INAKTIVE MUTANTE TYR 306PHE (ID 2V5W) MIT DIACETYLIERTEM SUBSTRAT (PINK), ZWEI KALIUMIONEN (LILA) UND DEM ZINKION (ORANGE) IN DER KATALYTISCHEN TASCHEN (GEPUNKTETE LINIEN). (MODIFIZIERT NACH SIPPL UND JUNG) <sup>74</sup> (MOE).....	- 9 -
ABBILDUNG 8: VERMUTETER KATALYSEMECHANISMUS DER HISTONDESACETYLASEN.(MODIFIZIERT NACH SIPPL UND JUNG) <sup>77</sup> .....	- 10 -
ABBILDUNG 9: <i>IN VITRO</i> -VIABILITÄT VON SCHISTOSOMULA IN GEGENWART VERSCHIEDENER KONZENTRATIONEN AN TSA. <sup>92</sup> .....	- 12 -
ABBILDUNG 10: PANHDAC-INHIBITOR TRICHOSTATIN A (TSA).....	- 12 -
ABBILDUNG 12: DER HDAC-INHIBITOR SAHA ALS PHARMACOPHOR. <sup>98</sup> .....	- 13 -
ABBILDUNG 11: REPRÄSENTATIVE HDAC INHIBITOREN. <sup>93</sup> .....	- 13 -
ABBILDUNG 13: BINDUNGSMODUS VON HYDROXAMSÄUREN ALS INHIBITOREN DER BINDETASCHEN VON HISTONDESACETYLASEN (HDAC8). <sup>77</sup> .....	- 14 -
ABBILDUNG 14: STRUKTUREN DER BEIM "SCREENING" GEFUNDENEN VERBINDUNGEN. <sup>104</sup> .....	- 16 -
ABBILDUNG 15: TUBASTATIN A.....	- 17 -
ABBILDUNG 16: DOCKINGLÖSUNG FÜR T5979345 (ROSA) IN DER BINDETASCHEN VON SMHDAC8. DIE ATOME SIND EINGEFÄRBT, KOHLENSTOFF (GRÜN), STICKSTOFF (BLAU), SAUERSTOFF (ROT) UND SCHWEFEL (GELB). DAS ZINKION IST ORANGE. (MOE). ....	- 17 -
ABBILDUNG 17: STRUKTUR VON T597345 UND T5971079.....	- 18 -
ABBILDUNG 18: GRUNDGERÜST DER SUBSTITUIERTEN BENZHYDROXAMSÄUREN. ....	- 18 -
ABBILDUNG 20: DAS CHEMISCHE GRUNDGERÜST DER IN DIESER ARBEIT HAUPTSÄCHLICH BESCHRIEBENEN VERBINDUNGEN.....	- 19 -
ABBILDUNG 19: LIG-PLOT VON T5979345 IN DER BINDETASCHEN VON SMHDAC8. (MOE).....	- 19 -
ABBILDUNG 21: RETROSYNTHESE VON BENZHYDROXAMSÄURE ZUR BENZOESÄURE.....	- 20 -
ABBILDUNG 22: ALLGEMEINE REAKTION DER REDUKTIVEN AMINIERUNG. ....	- 20 -
ABBILDUNG 23: DARSTELLUNG DER SUBSTITUIERTEN 3-AMINOBENZOESÄUREN. ....	- 21 -
ABBILDUNG 24: DARSTELLUNG VON 3- <i>N,N</i> -DIBENZYLAMINOBENZOESÄURE.....	- 22 -
ABBILDUNG 25: EINFÜHRUNG DER <i>tert</i> -BUTYLOXYCARBONYLGRUPPE. ....	- 22 -
ABBILDUNG 26: REAKTIONSMCHANISMUS DER EINFÜHRUNG DER <i>tert</i> -BUTYLOXYCARBONYLGRUPPE. ....	- 23 -
ABBILDUNG 27: STRUKTURFORMEL VON 3,5- <i>N,N'</i> -DIBENZYL-CARBAMOYL-BENZOESÄURE.....	- 24 -
ABBILDUNG 28: EINFÜHREN DER <i>tert</i> -BUTYLOXYCARBONYLGRUPPE. ....	- 25 -

ABBILDUNG 29: STRUKTURFORMELN DER 3-CARBAMOYL-BENZOESÄUREDERIVATE. ....	- 25 -
ABBILDUNG 30: RETROSYNTHESE VON 3-AMIDOBENZOESÄUREN AUS 3-AMINOBENZOESÄUREN. ....	- 26 -
ABBILDUNG 31: ABNAHME DER RESONANZSTABILITÄT VON LINKS NACH RECHTS. (MODIFIZIERT NACH BRÜCKNER) <sup>116</sup> .....	- 27 -
ABBILDUNG 32: BENZOTRIAZOLYLESTER, PENTAFLUORPHENYLESTER UND ARYLESTER EINER CARBONSÄURE ALS <i>N</i> -METHYLPYRIDINIUMCHLORID. ....	- 27 -
ABBILDUNG 33: AKTIVIERUNG DER CARBONSÄURE MIT CARBONYLDIIMIDAZOL. (MODIFIZIERT NACH BRÜCKNER) <sup>116</sup> .....	- 28 -
ABBILDUNG 34: AKTIVIERUNG DER CARBONSÄURE MIT DCC UND EDC. (MODIFIZIERT NACH BRÜCKNER) <sup>116</sup> .....	- 29 -
ABBILDUNG 35: AKTIVIERUNG DER CARBONSÄURE MIT CHLORCARBONSÄUREESTER. ....	- 30 -
ABBILDUNG 36: BENZOTRIAZOL-1-YL-OXYTRIPYRROLIDINOPHOSPHONIUM-HEXAFLUOROPHOSPHAT (PYBOP®). ...	- 30 -
ABBILDUNG 37: AKTIVIERUNG DER CARBONSÄURE MIT PYBOP®. (MODIFIZIERT NACH KIM UND PATEL) <sup>127</sup> ...	- 31 -
ABBILDUNG 38: AKTIVIERUNG DER CARBONSÄURE MIT THIONYLCHLORID. (MODIFIZIERT NACH BRÜCKNER) <sup>116</sup> ....	- 32 -
ABBILDUNG 39: DARSTELLUNG DER 3-AMINOBENZOESÄUREMETHYLESTER. ....	- 33 -
ABBILDUNG 40: DARSTELLUNG DER 3-AMIDOBENZOESÄUREMETHYLESTERDERIVATE. ....	- 33 -
ABBILDUNG 41: HYDROLYSE DER 3-AMIDOBENZOESÄUREMETHYLESTERDERIVATE. ....	- 34 -
ABBILDUNG 42: STRUKTURFORMEL VON 3,5-DIBENZAMIDOBENZOESÄURE.....	- 37 -
ABBILDUNG 43: DARSTELLUNG DER 3,5-DIBENZAMIDOBENZOESÄURE.....	- 38 -
ABBILDUNG 44: STRUKTURFORMEL VON 9-Oxo-5,6,7,8-TETRAHYDROACRIDIN-3-CARBONSÄURE.....	- 38 -
ABBILDUNG 45: DARSTELLUNG DER 9-Oxo-5,6,7,8-TETRAHYDROACRIDIN-3-CARBONSÄURE <sup>129,130,131</sup> .....	- 38 -
ABBILDUNG 46: STRUKTURFORMEL VON 3-( <i>N</i> -PHENYL)-CARBOXAMIDOBENZOESÄURE.....	- 39 -
ABBILDUNG 47: DARSTELLUNG DER 3-( <i>N</i> -PHENYL)-CARBOXAMIDOBENZOESÄURE.....	- 39 -
ABBILDUNG 48: RÖNTGENKRISTALLSTRUKTUR VON SMHDAC8 KOKRISTALLISIERT MIT VERBINDUNG 50A (LINKS), 50B (MITTE), 50D (RECHTS). (MOE).....	- 40 -
ABBILDUNG 49: ZUNEHMENDER EINFLUSS AUF DIE INHIBITORISCHE AKTIVITÄT GEGENÜBER DER SMHDAC8 IN ABHÄNGIGKEIT DES SUBSTITUENTEN IN POSITION 4 DER BENZHYDROXAMSÄURE. ....	- 40 -
ABBILDUNG 50: DARSTELLUNG DER 3-AMINO-4-ALKOXYBENZOESÄUREN NACH DOW <sup>134</sup> (LINKS) UND WILLIAMSON <sup>135</sup> (RECHTS). ....	- 41 -
ABBILDUNG 51: PHENOLSYNTHESE NACH DOW MIT ARINZWISCHENSCHRITT <sup>134</sup> . ....	- 41 -
ABBILDUNG 52: BILDUNG DES DIANIONS. ....	- 42 -
ABBILDUNG 53: MODIFIZIERTE ETHERSYNTHESE NACH DIF ET AL. <sup>136,137</sup> .....	- 42 -
ABBILDUNG 54: ETHERSYNTHESE NACH LIU ET AL. <sup>139</sup> .....	- 43 -
ABBILDUNG 55: POSITION DER ZWEITSUBSTITUTION IN ABHÄNGIGKEIT DES ERSTSUBSTITUENTEN. ....	- 44 -
ABBILDUNG 56: AUTOPROTOLYSE VON SALPETERSÄURE.....	- 44 -
ABBILDUNG 57: BILDUNG DER NITRIERSÄURE. ....	- 44 -
ABBILDUNG 58: DARSTELLUNG DES 3-NITRO-4-ETHOXYBENZOESÄUREMETHYLESTERS. ....	- 45 -
ABBILDUNG 59: DARSTELLUNG DES 3-AMINO-4-ETHOXYBENZOESÄUREMETHYLESTERS. ....	- 45 -
ABBILDUNG 60: IN DIESEM KAPITEL DARGESTELLTE 3-BENZAMIDO-4-ALKOXYBENZOESÄUREN.....	- 45 -
ABBILDUNG 61: RETROSYNTHESE VON BENZHYDROXAMSÄURE ZUR BENZOESÄURE. ....	- 46 -

ABBILDUNG 62: METHODEN ZUR DARSTELLUNG SUBSTITUIERTER BENZHYDROXAMSÄUREN.....	48 -
ABBILDUNG 63: METHODEN ZUR DARSTELLUNG VON BENZHYDROXAMSÄUREN.....	49 -
ABBILDUNG 64: DARSTELLUNG DER BENZHYDROXAMSÄURE MITTELS CHLOROETHYLFORMIAT. ....	49 -
ABBILDUNG 65: VERGLEICH DER LIPOPHILIE ZWISCHEN BENZOESÄURE (LINKS) UND BENZHYDROXAMSÄURE (RECHTS). LIPOPHIL (GRÜN), HYDROPHIL (PINK), NEUTRAL (BLAU). (MOE) .....	50 -
ABBILDUNG 66: DARSTELLUNG DER LIPOPHILIE VON BENZ-[O-(TETRAHYDRO-2H-PYRAN-2- YL)]HYDROXAMSÄURE. LIPOPHIL (GRÜN), HYDROPHIL (PINK), NEUTRAL (BLAU). (MOE) .....	51 -
ABBILDUNG 67: DARSTELLUNG DER BENZ-[O-(TETRAHYDRO-2H-PYRAN-2-YL)]HYDROXAMSÄURE. ....	51 -
ABBILDUNG 68: DARSTELLUNG DER 3-AMIDOBENZHYDROXAMSÄUREN AUS DEN 3-AMIDOBENZ-[O- (TETRAHYDRO-2H-PYRAN-2-YL)]HYDROXAMSÄUREN. ....	52 -
ABBILDUNG 69: DARSTELLUNG DER 3-AMINOBENZHYDROXAMSÄUREDERIVATE. ....	52 -
ABBILDUNG 70: T5979345 MIT EC <sub>50</sub> -WERTEN FÜR SMHDAC8 (FLUOR DE LYS®). ....	57 -
ABBILDUNG 71: ALLGEMEINES REAKTIONSSCHEMA FÜR DEN HDAC-ASSAY. (MODIFIZIERT NACH TRAPP) <sup>151</sup> . -	66 -
ABBILDUNG 72: REAKTIONSSCHEMA FÜR DEN HDAC-ASSAY MIT ZMAL.....	67 -
ABBILDUNG 73: STRUKTURFORMEL VON ZMAL UND ZMTFAL.....	68 -
ABBILDUNG 74: ALLGEMEINE STRUKTUR DER 3-PHENYLAMIDOBENZHYDROXAMSÄUREN. ....	72 -
ABBILDUNG 75: RÖNTGENKRISTALLSTRUKTUREN VON SMHDAC8 KOKRISTALLISIERT MIT 50A (A), 50B (B), 50D (C) UND 50E (D). (MOE) .....	73 -
ABBILDUNG 76: DIE ÜBERLAGERTEN STRUKTUREN VON 50A, 50B, 50D UND 50E. (MOE) .....	74 -
ABBILDUNG 77: RÖNTGENKRISTALLSTRUKTUREN VON (A): SMHDAC8 KOKRISTALLISIERT MIT 50B KETTE B, (B) HmHDAC8 PDB ID 2V5X KETTE C, (C) HmHDAC1 PDB ID 5BKX KETTE D, (D) HmHDAC6 HOMOLOGIEMODELL, KATALYTISCHE DOMÄNE 2. DIE LIGANDEN WURDEN FÜR DIESE ANSICHT ENTFERNT. (MOE).....	75 -
ABBILDUNG 78: DOCKINGLÖSUNGEN FÜR DIE VERBINDUNGEN 51C (GELB), 52C (WEIß), 52D (GRAU) UND 54 (ROSA) IN (A) SMHDAC8 UND (B) HmHDAC8. (MOE) .....	80 -
ABBILDUNG 79: DOCKINGLÖSUNGEN FÜR DIE VERBINDUNGEN 50G (WEIß), 50N (GELB) UND 50S (ROSA) IN (A) SMHDAC8 UND (B) HmHDAC8. (MOE).....	81 -
ABBILDUNG 80: EINTEILUNG DER 3-AMIDOBENZHYDROXAMSÄUREN IN EINE ÜBERGEORDNETE KLASSE UND EINE UNTERGEORDNETE KLASSE. ....	82 -
ABBILDUNG 81: DOCKINGLÖSUNGEN FÜR DIE VERBINDUNGEN 50D (WEIß), 50K (SCHWARZ), 50M (DUNKEL GRAU) UND 50N (HELL GRAU). (SMHDAC8) MOE.....	83 -
ABBILDUNG 82: DOCKINGLÖSUNGEN FÜR DIE VERBINDUNGEN 50B (SCHWARZ) UND 50C (WEIß). (SMHDAC8) MOE.....	85 -
ABBILDUNG 83: DOCKINGLÖSUNGEN FÜR DIE VERBINDUNGEN 50E (WEIß), 50F (GRAU) UND 50L (SCHWARZ). (SMHDAC8) MOE.....	87 -
ABBILDUNG 84: DOCKINGLÖSUNGEN FÜR DIE VERBINDUNGEN 50H (WEIß), 50I (GRAU) UND 50J (SCHWARZ). (SMHDAC8) MOE.....	88 -
ABBILDUNG 85: DAS SUBSTITUTIONSMUSTER DER 3-AMIDOBENZHYDROXAMSÄUREN MIT POTENTESTEN UND SELEKTIVSTEN VERTRETEREN GEGENÜBER SMHDAC8 UND HmHDAC8.....	89 -
ABBILDUNG 86: DOCKINGLÖSUNGEN FÜR DIE VERBINDUNGEN 58 (ROSA), 59 (GELB) UND 63 (WEIß). (A) SMHDAC8 UND (B) HmHDAC8. (MOE).....	90 -

ABBILDUNG 87: DOCKINGLÖSUNGEN FÜR DIE VERBINDUNGEN 62 (WEIß) UND 63 (SCHWARZ). (SMHDAC8) MOE. .....	- 91 -
ABBILDUNG 88: GRUNDKÖRPER FÜR ZUKÜNFTIGE HISTONDESACETYLASEINHIBITOREN. ....	- 93 -
ABBILDUNG 89: REDUKTION DES REDOXFARBSTOFFS RESAZURIN DURCH NADH/H <sup>+</sup> .....	- 95 -
ABBILDUNG 90: STRUKTURFORMEL DES CARBONSÄUREDERIVATS 50E' UND DES METHYLBENZOATDERIVATS 50E'' .....	- 96 -
ABBILDUNG 91: AUSWERTUNG DER TOXIZITÄTSTESTS VON <i>ESCHERICHIA COLI</i> (LINKS) UND <i>SACHAROMYCES CEREVICIAE</i> (RECHTS). ....	L
ABBILDUNG 92: MOTILITÄT DER ADULTEN SCHISTOSOMEN BEI BEHANDLUNG MIT TH65 (50E).....	LI
ABBILDUNG 93: VIABILITÄT DER JUVENILEN SCHISTOSOMEN BEI BEHANDLUNG MIT TH65 (50E).....	LII
ABBILDUNG 94: STRUKTURFORMELN VON TH65 (50E) UND TH65A/L (50E').....	LII
ABBILDUNG 95: VIABILITÄT DER JUVENILEN SCHISTOSOMEN BEI BEHANDLUNG MIT TH65A/L (50E''). ....	LIII

## Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: HISTONDESACETYLASESUPERFAMILIEN.....	- 8 -
TABELLE 2: 3-AMINOBENZOESÄUREDERIVATE .....	- 24 -
TABELLE 3: DARGESTELLTE SUBSTITUIERTE 3-AMIDOBENZHYDROXAMSÄUREN .....	- 34 -
TABELLE 4: ÜBERSICHT DER 3-AMINOBENZHYDROXAMSÄUREN .....	- 53 -
TABELLE 5: ÜBERSICHT DER 3-AMIDOBENZHYDROXAMSÄUREN .....	- 54 -
TABELLE 6: ÜBERSICHT DIVERSEER HYDROXAMSÄUREN .....	- 56 -
TABELLE 7: EC <sub>50</sub> -WERTE FÜR DIE INHIBITION DER SMHADC8 DURCH DIE 3-AMINOBENZOESÄUREN UND DEREN DERIVATE .....	- 58 -
TABELLE 8: EC <sub>50</sub> -WERTE FÜR DIE INHIBITION DER SMHADC8 DURCH DIE 3-AMIDOBENZOESÄUREN .....	- 60 -
TABELLE 9: EC <sub>50</sub> -WERTE FÜR DIE INHIBITION DER SMHADC8 DURCH HYDROXAMSÄUREN MIT VERSCHIEDENEN GRUNDKÖRPER .....	- 64 -
TABELLE 10: EC <sub>50</sub> -WERTE DER 3-AMINOBENZHYDROXAMSÄUREDERIVATE AUF DIE HMHDAC1,6(ZMAL),8(FLUOR DE LYS®).....	- 68 -
TABELLE 11: EC <sub>50</sub> -WERTE DER 3-AMIDOBENZHYDROXAMSÄUREDERIVATE AUF DIE HMHDAC1,6(ZMAL),8(FLUOR DE LYS®).....	- 70 -
TABELLE 12: EC <sub>50</sub> -WERTE DER HYDROXAMSÄUREN MIT VERSCHIEDENEN GRUNDKÖRPER AUF DIE HMHDAC1,6(ZMAL),8(FLUOR DE LYS®).....	- 71 -
TABELLE 13: EC <sub>50</sub> -WERTE FÜR SMHDAC8 UND HMHDAC8 GEMESSEN MIT DEM FLUOR DE LYS®-ASSAY-KIT. DER QUOTIENT AUS DEN EC <sub>50</sub> -WERTEN DER HMHDAC8 UND SMHDAC8 ZUR DARSTELLUNG DER SELEKTIVITÄT. EC <sub>50</sub> -WERTE FÜR HMHDAC1 UND HMHDAC6 GEMESSEN MIT DEM ZMAL-ASSAY-KIT. DIE WERTE WURDEN GERUNDET UND OHNE STANDARDABWEICHUNG DARGESTELLT. ....	- 77 -
TABELLE 14: EC <sub>50</sub> -WERTE SMHDAC8 UND HMHDAC8 (FLUOR DE LYS®) FÜR 50A UND 64 .....	- 92 -
TABELLE 15: SH-SY GLIOBLASTOMA-ZELLEN VIABILITÄT IN % (ALAMAR BLUE®).....	XLVIII
TABELLE 16: JURKAT LEUKEMIA T-ZELLEN VIABILITÄT IN % (ALAMAR BLUE®) .....	XLIX
TABELLE 17: HEK-ZELLEN VIABILITÄT IN % (ALAMAR BLUE®).....	XLIX
TABELLE 18: <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i> VIABILITÄT IN %.....	LIV

## Abkürzungen und Symbole

Å	Angström
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
ACE	angiotensin converting enzyme
Acetyl-CoA	Acetylcoenzym A
AcOH	Essigsäure
ADP	Adenosindiphosphat
Äq.	Äquivalent
Akt.	Aktivität
Alloc	Allyloxycarbonyl
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
AMC Ex/Em	(eng.: AMC $\frac{\text{Excitation wavelenght}}{\text{Emission wavelenght}}$ ), AMC $\frac{\text{Anregungswellenlänge}}{\text{Emissionswellenlänge}}$
Boc	<i>tert.</i> -Butoxycarbonyl
Boc <sub>2</sub> O	Di- <i>tert.</i> -butyldicarbonat
BOP	(Benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat
BuOH	<i>n</i> -Butanol
Bu <sub>4</sub> POH	Tetrabutylphosphoniumhydroxid
BzT	Benzotriazolgruppe
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CDI	<i>N,N'</i> -Carbonyldiimidazol
CEF	Chloroethylformiat
d	Duplett (NMR)
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	<i>para</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DNA	(engl.: deoxyribonucleic acid), Desoxyribonukleinsäure
DPE	Diphenylether
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimidhydrochlorid

ESI-MS	Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie
Et <sub>3</sub> N	Triethylamin
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
Fluor de Lys <sup>®</sup>	Fluorimetric Drug Discovery Kit
Fmoc	(Fluoren-9-yl)methoxycarbonyl
°C	Grad Celsius
ges.	gesättigt
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondesacetylase
HDLP	(engl.: histone deacetylase like protein)
HDM	Histondemethylase
HEK-Zellen	(engl.: human embryonic kidney) Zellen
HME	(engl.: histone modifying enzyme), Histonmodifizierendes Enzym
HmHDAC8	humane Histondesacetylase 8
HMT	Histonmethyltransferase
HPLC	(engl.: high performance liquid chromatography), Hochleistungsflüssig-chromatographie
HR-MS	(engl.: high resolution mass spectrometry), hochauflösende Massenspektrometrie
Hz	Hertz
I-Effekt	induktiver Effekt
J	Kopplungskonstante (NMR-Spektroskopie)
konz.	konzentriert
LM	Laufmittel (Dünnschichtchromatographie), Lösungsmittel
m	Multiplett (NMR)
+/- M-Effekt	positiver/negativer mesomerer Effekt
MeOH	Methanol
MOE	Molecular Operating Environment
MS	Massenspektrometrie
MTT	(3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid)
Na(AcO) <sub>3</sub> BH	Natriumtriacetoxyborhydrid
NAD <sup>+</sup>	oxidierte Form von NADH
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid

n.b.	nicht bestimmt
NCoA1	Nuclear Receptor Coactivator 1
NH <sub>2</sub> OTHP	<i>O</i> -(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)hydroxylamin
NMR-Spektroskopie	(engl.: nuclear magnetic resonance), Kernspinresonanzspektroskopie
p53	Tumor protein p53
PHD	(engl.: plant homeodomain)
PyBOP®	Benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
R <sub>f</sub>	ratio of fronts
rt	(engl.: retention time) Retentionszeit bei der Hochleistungsflüssigchromatographie
RT	Raumtemperatur
s	Singulett (NMR)
SAHA	suberoyl anilide hydroxamic acid, Vorinostat®
SIRT	(engl.: silent mating type information regulation 2 homolog)
SmCBP1	(engl.: <i>S. mansoni</i> CREB-binding protein 1)
SmCBP2	(engl.: <i>S. mansoni</i> CREB-binding protein 2)
SmGCN5	(engl.: <i>S. mansoni</i> NR co-activator 5)
SmHDAC8	schistosomale Histondesacetylase 8
SmPoMuc	(engl.: <i>S. mansoni</i> polymorphic mucin proteins)
SUMO	(engl.: small ubiquitin-related modifier), „kleiner Ubiquitin-verwandter Modifikator“
t	Triplett (NMR)
<i>t</i> -/ <i>tert</i> -	tertiär
Tab.	Tabelle
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran
TEA	Triethylamin
Temp.	Temperatur
TFA	Trifluoressigsäure
Ts	Tosylat
TSA	Trichostatin A
TsCl	<i>p</i> -Toluolsulfonsäurechlorid
TsOH	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
TY	Tyrosinkinase

UV-Vis	ultraviolett-visuell
Verb.	Verbindung
XTT	(2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-((phenylamino)carbonyl)-2H-tetrazoliumhydroxid)
ZBG	(engl.: zinc binding group) zinkbindende Gruppe
ZMAL	( <i>S</i> )-[5-Acetylamino-1-(4-methyl-2-oxo-2 <i>H</i> -chromen-7-ylcarbamoyl)-pentyl]-carbaminsäurebenzylester
ZMTFAL	( <i>S</i> )-[1-(4-Methyl-2-oxo-2 <i>H</i> -chromen-7-ylcarbamoyl)-5-trifluoracetylaminopentyl]-carbaminsäurebenzylester

### Standardaminosäuren

Aminosäure	Dreibuch- stabencode	Einbuch- stabencode	Aminosäure	Dreibuch- stabencode	Einbuch- stabencode
Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V





## 1. Einleitung

### 1.1 Die Humane Schistosomiasis

Die humane Schistosomiasis ist eine parasitäre Erkrankung, sie kommt in den tropischen und subtropischen Gebieten Südamerikas, Afrikas und Süd-Ostasiens vor<sup>1,2</sup>. Sie ist auch unter dem Namen Bilharziose bekannt<sup>3</sup>, benannt nach ihrem Entdecker, dem deutschen Tropenarzt

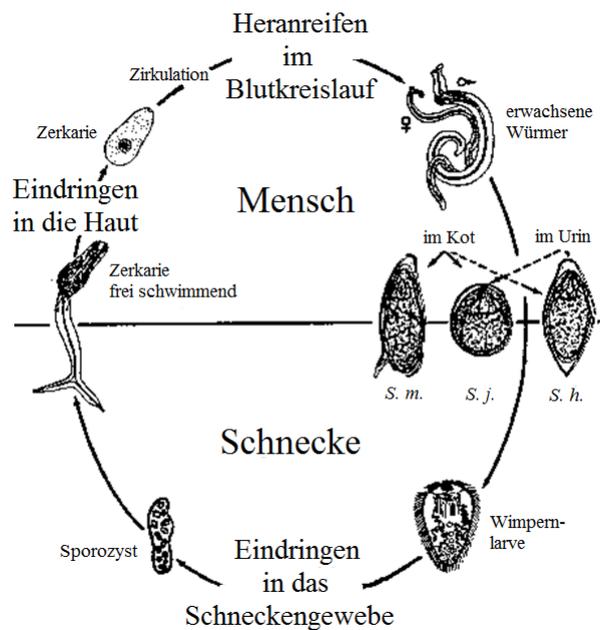


Abbildung 1: Lebenszyklus<sup>164</sup>: *S. mansonii* (S. m.), *S. japonicum* (S. j.), *S. haematobium* (S. h.).

Theodor Bilharz. Die Erreger dieser Erkrankung sind 7 – 20 mm lange Würmer der Gattung *Schistosoma*, der sogenannten Pärchenegel. Man kann sie in verschiedene Spezies einteilen. Die Meistverantwortlichen für diese Erkrankung sind *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni* und *Schistosoma japonicum*. Der Lebenszyklus dieser Parasiten benötigt die Verschmutzung von Oberflächengewässern mit menschlichen Exkrementen, eine für die jeweilige Art spezifische Süßwasserschnecke (*Bulinus*, *Biomphalaria*, *Oncomelania*) als Zwischenwirt und anschließend den Kontakt des Menschen mit dem kontaminierten Wasser<sup>3,4</sup>

(Abb.: 1). Laut WHO sind weltweit 250 Millionen Menschen infiziert wobei Kinder sowie schwangere Frauen stärker betroffen sind als andere Personengruppen<sup>2,5,6</sup>. Einmal infiziert reifen die männlichen und weiblichen Schistosomen im Blutkreislauf zu ihrer adulten und geschlechtsreifen Form heran. Bei der Paarung umschließt das kleinere Männchen das größere aber schlankere Weibchen und bildet so eine permanente Einheit. Das Weibchen kann nach der Befruchtung, je nach Art, von einhundert (afrikanische Spezies) bis zu eintausend (orientalische Spezies) Eier pro Tag produzieren. Jedes Ei enthält eine Wimpernlarve (*Miracidium*), welche mittels proteolytischer Enzyme die Membran der Blase oder des Intestinaltraktes durchdringt und so mit dem Urin und dem Stuhl ausgeschieden werden kann. Bei Wasserkontakt schlüpft die Wimpernlarve, infiziert eine Schnecke und vermehrt sich in ihr asexuell zu Sporozysten, die später zu Zerkarienlarven heranreifen. Der Zwischenwirt scheidet mehrere tausend Zerkarien pro Tag aus, diese begeben sich auf die Suche nach ihrem menschlichen Wirt. Haben diese einen passenden Wirt gefunden, penetrieren sie über die

## 1. Einleitung

Haut in den Blutkreislauf, finden sich zu Pärchen und wandern zu ihren Zielorganen, wodurch der Kreislauf von Neuem beginnt<sup>4</sup>. *Schistosoma mansoni* ist hauptverantwortlich für die Infektion am Menschen, sein Zwischenwirt ist die Süßwasserschnecke *Biomphalaria*. Eine chronische Erkrankung mit *Schistosoma* führt in der Regel zu einer immunpathologischen Entzündungsreaktion auf die Eier der Schistosomen, welche in verschiedenen Geweben abgelegt werden. So führt eine Infektion mit *S. haematobium* zu obstruktiven Erkrankungen der Harnwege und des Intestinaltraktes, während eine Infektion mit *S. mansoni* und *S. japonicum* zu hepatosplenalen Entzündungen und Leberfibrose führen. Die akute Form der Schistosomiasis ist das Katayama Fieber. Sie stellt eine systemische Überempfindlichkeitsreaktion gegen die eingedrungenen Schistosomen dar. Diese Form wird häufig bei Touristen festgestellt und tritt ein paar Wochen nach der Infektion auf. Häufige Symptome sind Fieber, Abgeschlagenheit und Muskelschmerzen<sup>7,8,9</sup>. Eine gängige Nachweismethode der Erkrankung ist die mikroskopische Untersuchung des Stuhls auf Vorhandensein der Eier<sup>10</sup>. Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keinen Impfstoff gegen diese Erkrankung, und dazu schafft es *Schistosoma* sich durch komplexe Immunmechanismen an das Immunsystem des Wirtes anzupassen und so Resistenzen zu entwickeln. Das Arzneimittel der Wahl ist Praziquantel, ein weitverbreitetes Anthelminthikum. Der Wirkmechanismus ist weitestgehend unbekannt doch es wird angenommen, dass die durch den Wirkstoff verursachte Öffnung der Kalziumkanäle der kontraktilen Zellen der Wurmaußenhaut zur spastischen Lähmung des Wurmes und zu dessen Tod und Austreibung mit dem Stuhl führt<sup>11</sup>. Allerdings hat Praziquantel keine oder nur geringe Effekte auf die Eier und die unreifen Würmer. Dies führt bei unzureichender Behandlungsdauer zu einer schnellen Reinfektion<sup>12,13,14,15</sup>. Zur Behandlung des Katayama Fiebers werden zusätzlich Kortikosteroide eingesetzt um die überschießende Immunreaktion zu unterdrücken<sup>7,8</sup>. In Brasilien wird außerdem Oxamniquine eingesetzt, welches aber nur auf *S. mansoni* wirkt<sup>16</sup>. Durch die Anwendung von Oxamniquine sind die weiblichen Würmer nicht mehr in der Lage Eier zu legen<sup>17</sup>. Ein weiteres Medikament ist ein Artemisinderivat, welches auf die unreifen Würmer wirkt<sup>18</sup>. Es wird in Kombination mit Praziquantel zur Prophylaxe und zur Behandlung der akuten Schistosomiasis eingesetzt<sup>19</sup>. Allerdings wurden schon Resistenzen gegen Oxamniquine und Praziquantel nachgewiesen<sup>20</sup>. Vor allem bei der Massenbehandlung von Viehbeständen in Afrika mit Praziquantel konnten resistente Stämme von *Schistosoma* im Labor nachgewiesen werden<sup>21</sup>. Auch eine unzureichende Behandlung und die dadurch resultierenden Reinfektionen können die Bildung von Resistenzen begünstigen. Diese Situation erfordert es, in die Entwicklung neuer Medikamente gegen die humane Schistosomiasis zu investieren.

## 1.2 Epigenetik

### 1.2.1 Epigenetische Grundlagen

Die Epigenetik ist ein Teilgebiet der Biologie. Sie ist definiert als die vererbare Veränderung der Genexpression und beschreibt die Ausgestaltung des Phänotyps ohne dabei den Genotyp zu verändern<sup>22,23</sup>. So können durch endogene Signale, aber auch Umwelteinflüsse und Krankheitserreger, Zellen mit Hilfe der Expression bestimmter Gene auf ihre Umwelt reagieren<sup>24,25</sup>, bzw. ermöglicht dieser Mechanismus auch die Differenzierung von Zellen. Modulatoren dieser Mechanismen kontrollieren den Zeitpunkt und Ablauf von Transkription, Rekombination, DNA-Replikation und DNA-Reparatur<sup>26</sup>. Diese werden auch unter dem Begriff "Epigenom" zusammengefasst. Auf molekularer Ebene bedeutet dies die dynamische Regulation von kovalenten Modifikationen an der DNA und an Histonproteinen, sowie "Nicht-Histonproteinen"<sup>27</sup>. Kovalente Modifikationen der DNA sind hauptsächlich die Methylierung und Hydroxymethylierung von Cytosin an Position 5. Diese gehen in eukariotischen Zellen mit dem Ausschalten der betroffenen Genabschnitte einher<sup>28</sup> (Abb.: 2).

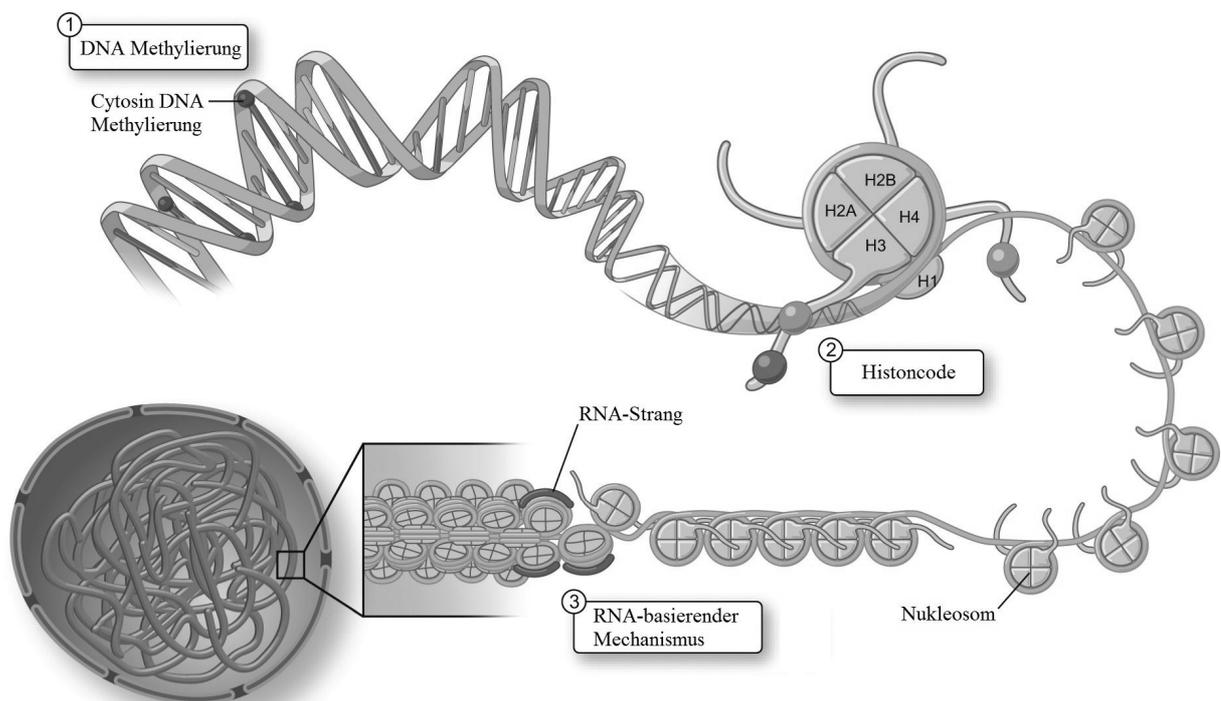


Abbildung 2: Darstellung verschiedener epigenetischer Modifizierungen. (modifiziert nach MARSDEN)<sup>29</sup>

Kovalente Modifikationen an Histonproteinen sind vielseitiger und können Gene sowohl aktivieren als auch supprimieren<sup>30,31,32</sup>. Am besten untersucht sind Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung. Weitere Modifikationen sind Ubiquitylierung, SUMOylierung und ADP-ribosylierung<sup>33,33,34,35</sup>. Diese Veränderungen ermöglichen es im

## 1. Einleitung

Zusammenspiel mit der großen Zahl an Genen, codiert in der DNA, und den regulierenden Enzymen eine hohe zelluläre Diversität in einem Organismus zu schaffen. Dieses Zusammenspiel bildet den sogenannten Histoncode<sup>27,33,36,32</sup>. Ebenso wie die Steuerung und Verwaltung des Zellzyklus durch epigenetische Modifikationen kann auch der Zelltod durch Apoptose eingeleitet werden<sup>37,38,39,40</sup>.

### 1.2.2 Histonmodifikationen

Histone sind Proteine die im Zellkern von eukariotischen Zellen vorkommen. Sie bilden zusammen mit der DNA das Chromatin und unterscheiden sich in fünf Histonklassen (H1, H2A, H2B, H3, H4). Vier Untereinheiten bilden untereinander Dimere aus, die zusammen ein Histonoktamer bilden können  $(H2A/H2B)-(H3H4)_2-(H2A/H2B)$ <sup>41,42</sup>. Histone besitzen in ihrem Aufbau ein globuläres Zentrum und Seitenketten mit hauptsächlich basischen Aminosäuren. Unter physio-logischen Bedingungen liegen diese Aminosäuren (Lysin, Arginin) protoniert, also positiv geladen vor. Mit ihrer positiven Ladung können sie über elektrostatische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Phosphatgruppen, die zusammen mit der Desoxyribose das Rückgrat der DNA bilden, interagieren<sup>43,44,45</sup>. Dies führt zu der besonderen Packung des Chromatins, dessen kleinste Untereinheit das Nukleosom ist und bei einer 1,65-fachen Wicklung der DNA um das Histon in etwa 146 Basenpaare entspricht<sup>46,43</sup>. Die einzelnen Nukleosome sind durch nichtassoziierte DNA (*Linker DNA*) miteinander verbunden. Die Histonklasse H1 dient als Gerüstprotein bei der Ausbildung übergeordneter Strukturen der DNA Doppelhelix. Diese dicht gepackte Struktur (Abb.: 3)

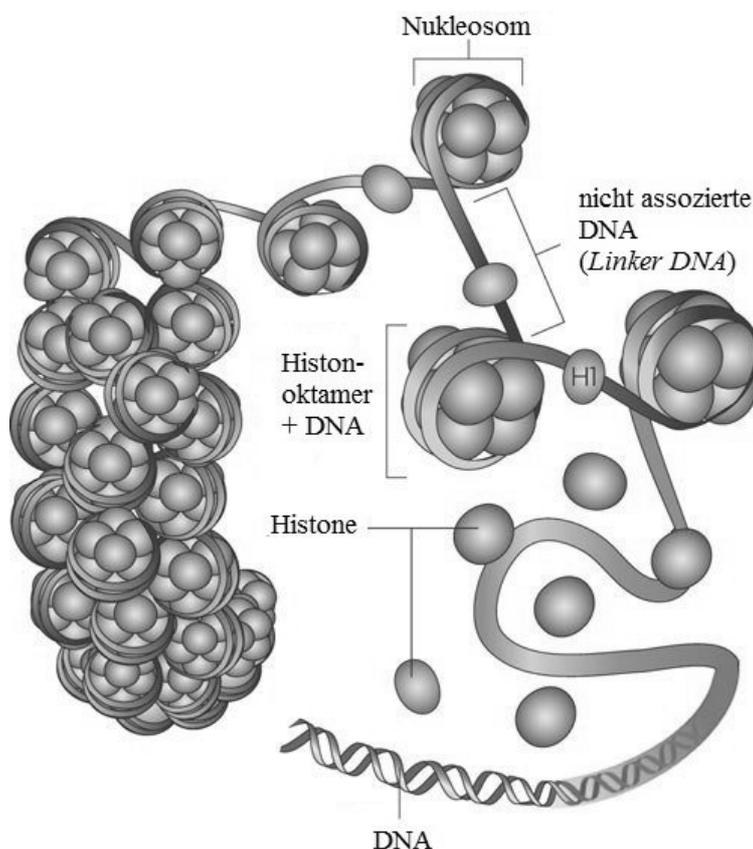
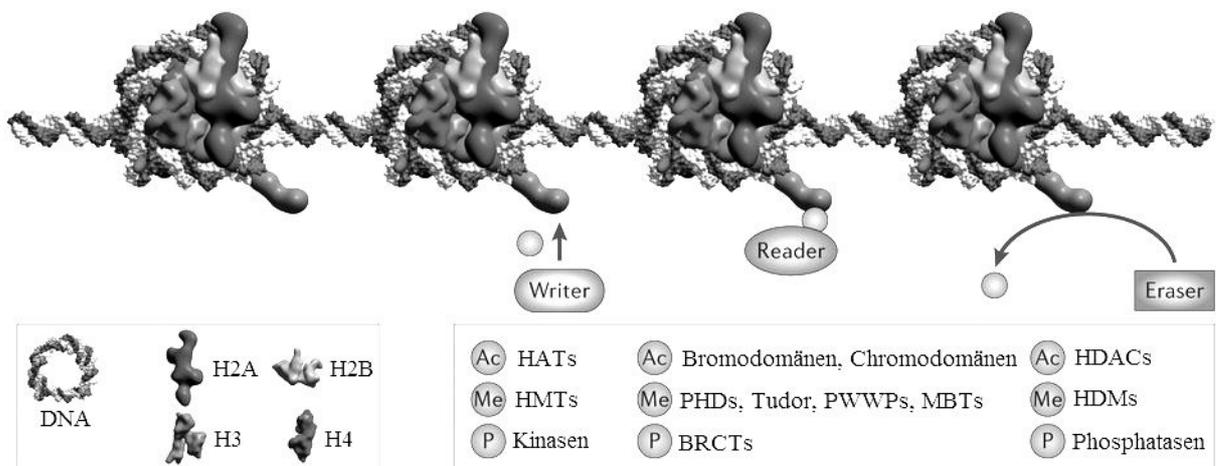


Abbildung 3: Chromatinstruktur<sup>165</sup>(modifiziert nach Figueiredo, CROSS und JANZEN).

verhindert, dass bestimmte Gene transkribiert werden können (Hetero-chromatin)<sup>47,48</sup>. Durch Modifikationen an den Seitenketten der Histone, die verantwortlich sind für die Inter-aktion von DNA und Histon, lässt sich dieses Zusammenspiel schwächen oder verstärken. Enzyme, die hierbei eine wichtige Rolle spielen, nennt man Histon modifizierende Enzyme (*histone modifying enzymes*, HME's). Zu ihnen gehören Histonacetyltransferasen (HAT) und Histonmethyltransferasen (HMT), respektive Histondesacetylasen (HDAC) und Histondemethylasen (HDM)<sup>49,50</sup>. Enzyme, die für das Hinzufügen von Modifikationen verantwortlich sind, werden auch als „writer“ bezeichnet. Hierzu gehören die Transferasen, welche eine Erkennungsdomäne „reader“ genannt aufweisen, um den aktuellen Stand der Modifikation am Histon zu prüfen. So besitzen alle Histonacetyltransferasen eine sogenannte Bromodomäne, welche mit den acetylierten Lysinresten der Histonden interagiert. Lysinmethylierungen werden von *plant homeodomains* (PHDs) erkannt. Als „eraser“ werden die Enzyme benannt, welche die Modifikationen wieder entfernen (HDMs und HDACs)<sup>51,51,32</sup> (Abb.: 4).



**Abbildung 4: Histonmodifizierende Enzyme (HMEs) und deren Wirkort am Histon-DNA Komplex.<sup>49</sup> (modifiziert nach FILIPPAKOPOULOS und KNAPP)**

1. Einleitung

1.2.3 Histondesacetylasen

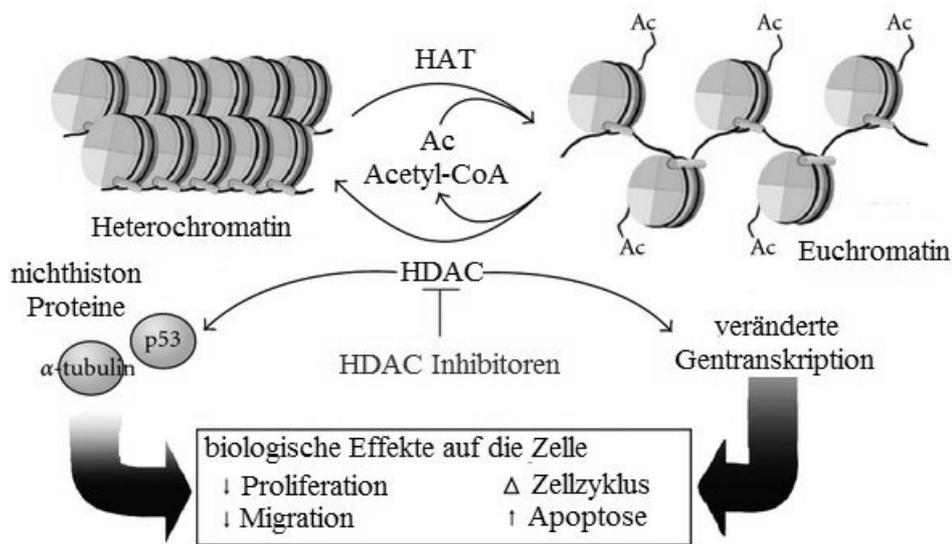


Abbildung 5: Histonacetylierung und Desacetylierung.<sup>52</sup> (modifiziert nach RODD, VERVERIS und KARAGIANNIS)

Die Acetylierung von Histonen an der endständigen Aminogruppe der Lysinseitenkette wird von Histonacetyltransferasen (HAT) mit Hilfe von Acetyl-CoenzymA katalysiert, die dementsprechende Rückreaktion katalysieren die sogenannten Histondesacetylasen (HDAC) (Abb.: 5). Durch Acetylierung der ε-Aminogruppe des Lysins wird die positive Ladung am Lysin neutralisiert (Abb.: 6) und so die Interaktion mit der negativ geladenen DNA geschwächt<sup>53,54,55</sup>. Auf diese Weise werden ausgeschaltete Genabschnitte in Euchromatin überführt (Abb.: 5) und die Transkription kann an dieser Stelle beginnen<sup>32</sup>. Im Umkehrschluss führt eine Desacetylierung zur Suppression des betroffenen Genabschnittes, da nun eine verstärkte Interaktion zwischen DNA und Histon hergestellt ist.

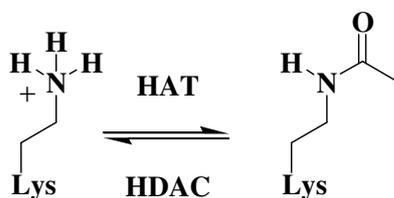


Abbildung 6: Acetylierung von Lysin.

Histondesacetylasen werden oft mit Genrepression in Zusammenhang gebracht, da sie die Bildung von Chromatin höher geordneter Struktur fördern. Außerdem desacetylieren HDACs zusätzlich Nicht-histonproteine, zu denen hauptsächlich Transkriptionsfaktoren, Proteine des

Zytoskeletts und Proteine die für den Transport in den Zellkern verantwortlich sind, zählen. Außerdem werden Chaperone in ihrer biologischen Stabilität und Aktivität beeinflusst<sup>56,57,58,59,60</sup>. HDACs gehören zu der Lysindesacetylasesuperfamilie, welche sowohl in Bakterien als auch tierischen Lebewesen vorkommen. Mindestens 18 Lysindesacetylasen werden in Wirbeltieren gefunden und nach ihrer Phylogenie in 4 Klassen unterschieden<sup>61,60</sup>(Tabelle: 1). In die Klasse 1 (HDAC1-3,8), die Klasse 2 (HDAC4-7,9,10), sowie Klasse 3 (SIRT1-7) und Klasse 4, welche bisher nur HDAC11 als Vertreter aufweist. Klasse 1,2,4 sind  $Zn^{2+}$  abhängige Lysindesacetylasen<sup>62,60</sup>, während die Vertreter der Klasse 3 von  $NAD^+$  abhängen und auch Sirtuine genannt werden. Klasse 2 kann ihrerseits noch in zwei Subklassen unterteilt werden. Klasse 2a (HDAC4,5,7,9) besitzt nur eine und Klasse 2b (HDAC6,10) hingegen zwei katalytische Domänen.

Klassische HDACs sind verwandt mit Enzymen der Arche- und Eubakterien, was auf ein gemeinsames Vorgängerenzym hinweist, welches eine Nichthistondesacetylaseaktivität vorweist<sup>61,60</sup>. Aus diesem Zusammenhang wird verständlich, dass nicht alle HDACs Histone als Substrat haben. Enzymatisch gesehen besitzen hauptsächlich die HDACs der Klasse 1 Histondesacetylaseaktivität, während die anderen Klassen hauptsächlich in Transportvorgänge zwischen Zytoplasma und Nukleus, sowie Regulationsvorgänge im Zytoplasma involviert sind<sup>58</sup>. Für die Klasse 1 konnte in Studien gezeigt werden, dass ihre Isoformen stetig exprimiert werden, abgesehen von HDAC8, welche in nur geringen Maß vorkommt<sup>62</sup>. Klasse 1-HDACs treten mit Ausnahme von HDAC8 als Multiproteinkomplexe auf und in „*knockout*“ Studien von Mäusen wurde gezeigt, dass diese Klasse für die Zellproliferation und das Überleben von Zellen mitverantwortlich ist<sup>63,64</sup>. Klasse 2-HDACs bewegen sich hauptsächlich zwischen dem Nukleus und dem Zytoplasma und übernehmen gewebespezifische Aufgaben, wie die Desacetylierung von Tubulin und Cortactin oder von Chaperonen. Sie spielen somit eine wichtige Rolle in der microtubulin- und actin-abhängigen Zellmortalität sowie in der Überwachung der Proteinfaltung<sup>63,65,66,67</sup>. Über Klasse 4 ist bisher noch wenig bekannt. Sie scheint aber Einfluss bei der Entscheidung zwischen Immunsystemaktivierung und Immuntoleranz zu haben<sup>68</sup>. (Tabelle: 1)

## 1. Einleitung

**Tabelle 1: Histondesacetylasesuperfamilien**

Klasse 1	Klasse 2a	Klasse 2b	Klasse 3	Klasse 4
HDAC1	HDAC4	HDAC6	SIRT1/SIRT2	HDAC11
HDAC2	HDAC5	HDAC10	SIRT3/SIRT4	
HDAC3	HDAC7		SIRT5/SIRT6	
HDAC8	HDAC9		SIRT7	

### 1.2.4 Struktur der Klasse 1 Histondesacetylasen

Der strukturelle Aufbau der Klasse 1-HDACs beinhaltet eine einfache  $\alpha/\beta$  Domäne mit einem sandwichartigen Aufbau. In der mittleren Region des Enzyms ordnen sich acht  $\beta$ -Faltblätter nebeneinander an, welche zwischen zwei Lagen aus  $\alpha$ -Helices liegen. Ungefähr nur die Hälfte der vorhandenen Aminosäuren bilden die Sekundärstrukturen, die andere Hälfte formt Schleifen zwischen den Strukturen und bildet unter anderem auch die katalytische Tasche aus. Das  $\text{Zn}^{2+}$  Ion wird von zwei konservierten Aspartatmolekülen und einem konservierten Histidin in der Bindetasche koordiniert<sup>69,70</sup>. Die Strukturaufklärung erfolgte anfangs anhand der bakteriellen Klasse 1 Homologen von *Aquifex aeolicus* (thermophiles Bakterium) HDLP (engl.: *histone desacetylase-like-protein*)<sup>71</sup>. Inzwischen gibt es aufgelöste Strukturen von der humanen und schistosomalen HDAC8, einer Klasse 1 Histondesacetylase. Außerdem bindet HDAC8 nicht nur das katalytische  $\text{Zn}^{2+}$  Ion sondern noch zwei andere Kationen, vermutlich  $\text{K}^+$ , welche anscheinend in der Strukturgebung eine Rolle spielen<sup>60</sup>.

### 1.2.5 Bindungstasche und katalytischer Mechanismus der Histondesacetylase

Mit der Struktur einer inaktiven Mutante von HDAC8 und einem von p53 abgeleiteten diacetylierten Substrat ((*N*-acetyl)Arg-His-Lys( $\epsilon$ -acetyl)-Lys( $\epsilon$ -acetyl)(*C*-amino-7-yl-methyl-4-coumarin))<sup>72,73</sup> (Abb.: 7) konnte die schon von diversen Inhibitoren abgeleitete Position der Bindungstasche bestätigt werden. Sie ähnelt einer 12 Å langen, hydrophoben Vertiefung mit dem katalytischen  $\text{Zn}^{2+}$  Ion an ihrem Ende. In der Struktur ist zu erkennen, dass das acetylierte Lysin in diese hydrophobe Vertiefung hineinragt und der Carbonylsauerstoff der Acetylgruppe in Richtung  $\text{Zn}^{2+}$  koordiniert (Abb.: 7). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Aspartat 101, welches in Klasse 1- und Klasse 2-HDACs konserviert ist, eine wichtige Rolle in der Substratbindung spielt. Es liegt am Rand der hydrophoben Tasche und man erkennt

eine Interaktion der Seitenkette von Asp101 mit dem Peptidrückgrat des Substrates. Vermutlich ist diese Aminosäure dafür verantwortlich die Histonseitenkette und das acetylierte Lysin festzuhalten und in eine korrekte Position während der Desacetylierungsreaktion zu bringen<sup>73</sup>.

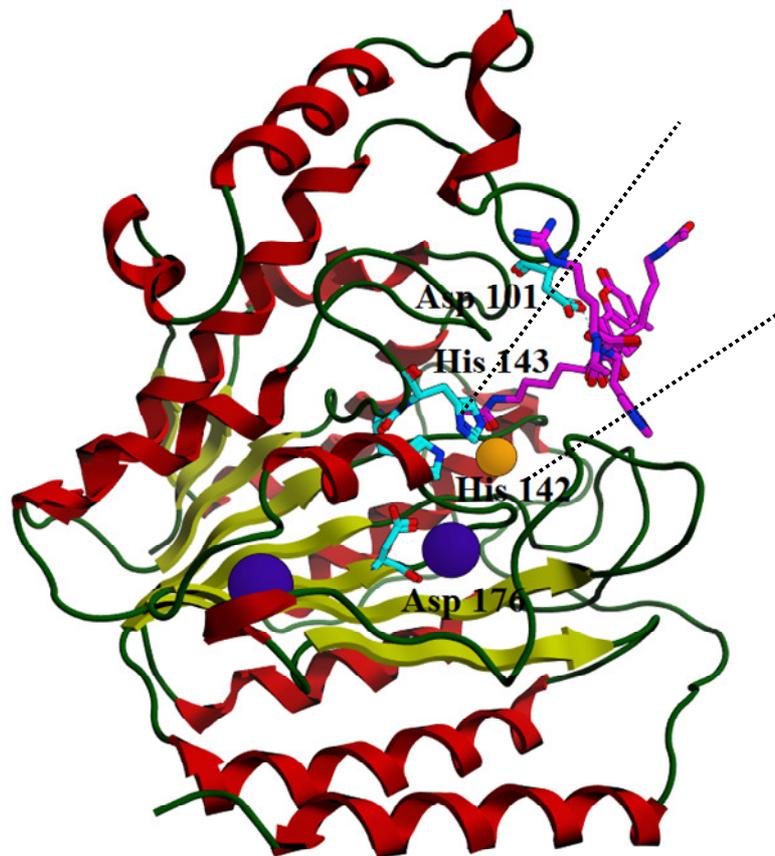


Abbildung 7: Die humane HDAC8 als inaktive Mutante Tyr 306Phe (ID 2V5W) mit diacetyliertem Substrat (pink), zwei Kaliumionen (lila) und dem Zinkion (orange) in der katalytischen Tasche (gepunktete Linien). (Modifiziert nach SIPPL und JUNG<sup>74</sup> (MOE)

Biochemische und mutagenese Studien verschiedener HDACs lassen auf einen Katalysemechanismus schließen bei dem ein nukleophiler Angriff von einem enzymatisch aktivierten Wassermolekül (deprotoniert von dem His142-Asp176 Ladungsverteilungssystem) auf den Carbonylkohlenstoff der  $\epsilon$ -Acetylgruppe des acetylierten Lysins erfolgt und sich ein tetraedrales Intermediat ausbildet. Man vermutet, dass das Proton von His142 auf sein benachbartes His143 übertragen wird und von dort aus auf den Stickstoff des Amides<sup>75,76</sup>. Eine andere Hypothese besagt, dass das Proton von Tyr306 stammt, was erklären

# 1. Einleitung

würde, warum eine Tyr306Phe-Mutante keine Aktivität besitzt<sup>72,76</sup>. Allerdings bleibt dabei ungeklärt, wie das daraus entstehende Tyr306 Anion stabilisiert wird. Zumindest wird angenommen, dass Tyr306 im katalytischen Mechanismus involviert ist (Abb.: 8), es wäre auch denkbar, dass Tyr306 den Carbonylsauerstoff der Acetylgruppe über eine Wasserstoffbrückenbindung der Tyr306-OH-Gruppe polarisiert und so den Carbonylkohlenstoff nukleophil angreifbarer macht<sup>76</sup>.

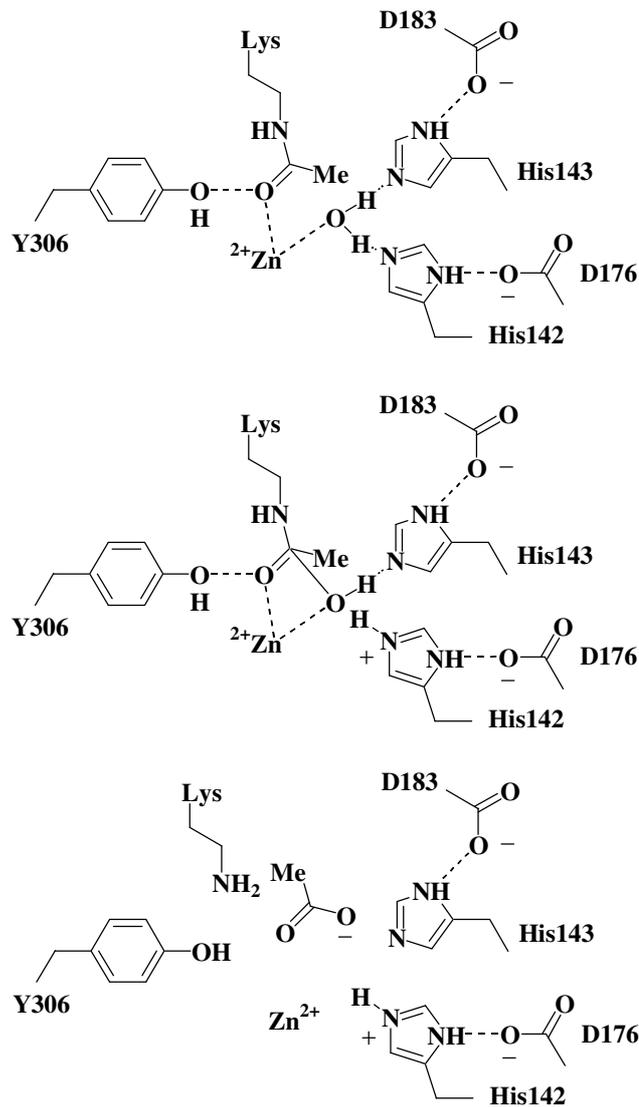


Abbildung 8: Vermuteter Katalysemechanismus der Histondesacetylase.(Modifiziert nach SIPPL und JUNG)<sup>77</sup>

### 1.3 Die schistosomale Histondesacetylase 8 als Target

#### 1.3.1 Die schistosomale Histondesacetylase (S. mansoni)

Um die Entwicklung neuer antiparasitärer Wirkstoffe zu beschleunigen, kann man eine sogenannte Huckepack-Strategie (engl.: *piggyback*) verfolgen, welche darauf aufbaut, bekannte chemische Strukturen zu nutzen, die eigentlich für andere Krankheiten entwickelt wurden<sup>78,79</sup>. Die humanen HDACs sind die am besten studierten epigenetischen Targets<sup>80</sup> und deren Inhibitoren werden bereits gegen verschiedene Krebsarten am Menschen eingesetzt<sup>81,82,83,84</sup> (zum Beispiel: Vorinostat<sup>®</sup>). Momentan werden verschiedene HDAC-Inhibitoren gegen verschiedene parasitäre Erkrankungen entwickelt und getestet, wie zum Beispiel Leishmaniose, Malaria, Toxoplasmose, Bilharziose und Trypanosomiasis<sup>85,86</sup>. Dabei ist aber immer das Risiko der Kreuzreaktivität zu den humanen Enzymen zu beachten und nach Möglichkeit gering zu halten um unerwünschten Wirkungen vorzubeugen.

Schistosomen besitzen eine Chromatinstruktur, wie sie auch in anderen tierischen Lebewesen zu finden ist<sup>87</sup>. Es wurden verschiedene Histone (H1/H5, H3, H4, H2A und H2B) und deren Modifikationsmuster (Methylierung von H3K4, Acetylierung von H3K9 und Seitenketten von H4) identifiziert. Es konnten weitere schistosomale Histonacetyltransferasen (SmHATs) (SmGCN5, SmCBP1, SmCBP2 und NCoA1) nachgewiesen werden. Die SmHDACs werden ebenso wie die HmHDACs in 4 Klassen unterteilt und die Benennung erfolgte nach dem orthologen Enzym im Menschen<sup>88</sup>. Für Klasse 1-HDACs wurden HDAC1/2, HDAC3 und HDAC8 gefunden<sup>89,90,87</sup>, Klasse 2 beinhaltet die Enzyme HDAC4 und HDAC6<sup>67</sup> und für Klasse 4 HDAC 11 konnte kein orthologes Enzym in *S. mansoni* gefunden werden. 5 vermeintliche Mitglieder der Klasse 3, den NAD<sup>+</sup> abhängigen HDACs, konnten ebenfalls identifiziert werden<sup>91</sup>.

Für die humane HDAC8 wurde bereits erwähnt, dass diese in humanen Zellen nur wenig exprimiert wird. Studien konnten zeigen, dass eine Inhibition von HmHDAC8 keine Veränderungen im Acetylierungsmuster der Histone bewirkt<sup>62</sup>.

#### 1.3.2 Einfluss von Histondesacetylaseinhibitoren auf den Lebenszyklus von Schistosomen

Für die schistosomalen Klasse 1-SmHDACs hat man festgestellt, dass diese in allen Lebensabschnitten der Parasiten exprimiert werden und die SmHDAC8 am Stärksten vertreten ist. Die Behandlung der Schistosomen mit Histondesacetylaseinhibitoren führte zu erhöhten Acetylierungsmustern von Proteinen und in Abhängigkeit der Dosis auch zum Tod

## 1. Einleitung

adulter Würmer<sup>92</sup>. Dadurch wird SmHDAC8 zu einem wichtigen Target für die Entwicklung spezifischer Inhibitoren zur Behandlung der humanen Schistosomiasis.

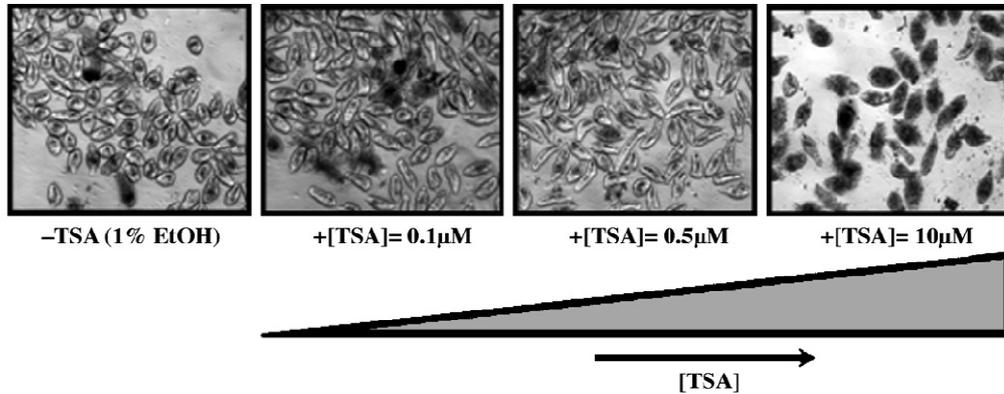


Abbildung 9: *In vitro*-Viabilität von Schistosomula in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an TSA.<sup>92</sup>

Behandlungen der Schistosomula mit dem PanHDAC-Inhibitor Trichostatin A (Abb.: 10; TSA) konnten die Wirksamkeit von HDAC-Inhibitoren bestätigen (Abb.: 9). Der Einsatz eines HDAC Inhibitors verhindert den Übergang und Reifung der Wimpernlarven zu den Sporozysten<sup>93</sup> und führt bei längerer Anwendung zur Einleitung der Apoptose in den erwachsenen Parasiten<sup>88</sup>. Larven, die mit HDAC-Inhibitoren behandelt wurden, zeigen phänotypische Veränderungen und exprimierten neue Oberflächenantigene (Muzin-Typ, SmPoMuc)<sup>94</sup>. Dies führt zu einer veränderten Reaktion zwischen Parasit und dem Immunsystems des Wirtes<sup>95,96</sup>. Allerdings eignet sich TSA nicht zur Therapie von parasitären Erkrankungen, da es ebenfalls die humanen HDACs hemmt und somit eine Mortalität gegenüber humanen Zellen aufweist<sup>85</sup>.

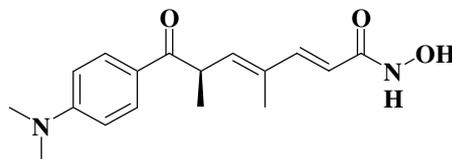
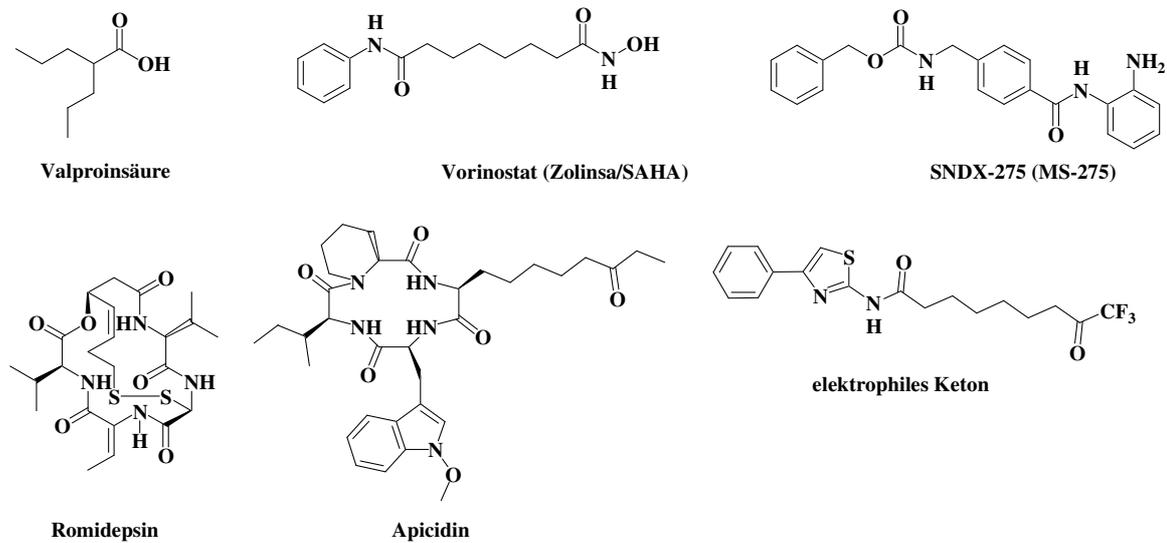
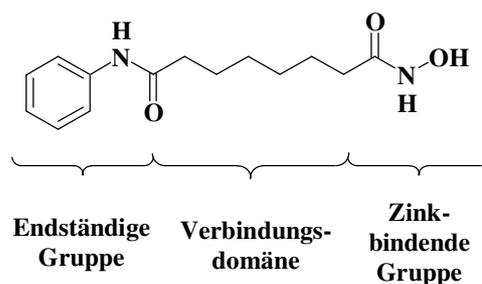


Abbildung 10: PanHDAC-Inhibitor Trichostatin A (TSA).

## 1.3.3 Bekannte Histondesacetylaseinhibitoren

Abbildung 11: Repräsentative HDAC Inhibitoren.<sup>93</sup>

Es gibt sieben verschiedene Klassen von Histondesacetylaseinhibitoren. Dazu gehören kurzkettige Fettsäuren wie Valproinsäure, Hydroxamsäuren wie zum Beispiel Vorinostat<sup>®</sup>, Aminoaniline, hier dargestellt durch SNDX-275, natürlich vorkommende zyklische Peptide wie Romidepsin und Apicidin, aber auch Moleküle mit Thiolgruppen oder elektrophile Ketone (Abb.: 11). Strukturell lassen sich alle diese Verbindungen, abgesehen von Valproinsäure, in drei gemeinsame Untereinheiten aufteilen. Das erste Merkmal ist die Zinkbindende Gruppe (ZBG), welche das Zinkion am Boden der Bindetasche der Histondesacetylase koordiniert (Klasse 1, 2 und 4). Als Zweites ist eine endständige Gruppe zu nennen, die am Rand der tunnelartigen Bindetasche mit Aminosäuren der HDAC interagiert. Dazu ist eine Verbindungsdomäne notwendig, welche zum Einen die Ausrichtung von der ZBG zur endständigen Gruppe bestimmt und zum Anderen mit der tunnelartigen lipophilen Bindetasche interagiert (Abb.: 12).<sup>97</sup>

Abbildung 12: Der HDAC-Inhibitor SAHA als Pharmacophor.<sup>98</sup>

## 1. Einleitung

### 1.3.4 Hydroxamsäuren als selektive Histondesacetylaseinhibitoren

Trichostatin A und SAHA (Vorinostat<sup>®</sup>) haben bereits als PanHDAC-Inhibitoren gezeigt, dass Hydroxamsäuren als mehrzählige Liganden durch Komplexbildung des katalytischen Zinkions (Abb.: 13) innerhalb der Bindetaschen der Histondesacetylase diese effizient hemmen<sup>92,99,51,100,85</sup>.

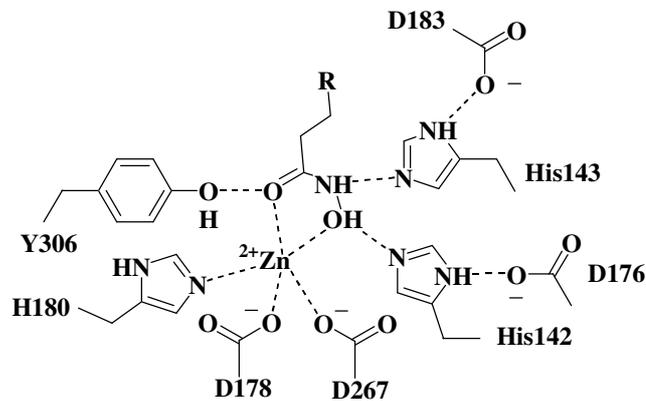


Abbildung 13: Bindungsmodus von Hydroxamsäuren als Inhibitoren der Bindetasche von Histondesacetylase (HDAC8).<sup>77</sup>

Hieraus ergibt sich eine weitere Anforderung an die Verbindungen um später als Wirkstoff im Menschen oder am Tier angewendet werden zu können. Sie müssen nicht nur selektiv auf die schistosomale Isoform SmHDAC8 wirken und dabei eine niedrige Aktivität gegenüber den humanen Enzymen aufweisen, sie sollten ebenso keine anderen Zink-abhängigen Enzyme beeinflussen. Allerdings stellen diese Enzyme eine große und sehr diverse Klasse im menschlichen Körper dar. Es gibt ungefähr 100 spezifische Enzyme, die Zink für ihre katalytische Aktivität benötigen (Alkoholdehydrogenasen, Carboanhydrasen, alkalische Phosphatasen) oder Zink als Strukturbildner nutzen (Zinkfingerdomäne)<sup>101</sup>.

Auch andere Strukturen, die mehrwertige Kationen beinhalten (z.B. Eisenion im Hämoglobin) sollten möglichst nicht beeinflusst werden, da ein Verlust des Kations auch ein Verlust der Aktivität der jeweiligen Struktur bedeutet und so die Wahrscheinlichkeit für unerwünschte Arzneimittelwirkung erhöht. Eine Untersuchung<sup>102</sup> verschiedener Metallenzym-inhibitoren konnte eine hohe Selektivität der einzelnen Inhibitoren auf die für sie bestimmte Zielstruktur nachweisen. Untersucht wurden verschiedene Metalloenzyme wie Carboanhydrase (HmCAII), verschiedene Matrixmetalloproteasen, *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE), Histondesacetylase (HDAC2) und Tyrosinkinase (TYK), ebenso die Fähigkeit der Inhibitoren Fe<sup>3+</sup> aus der Bindung von Holotransferin, einem Transportprotein für Fe<sup>3+</sup>, zu entfernen. Zu den Inhibitoren zählten unter anderem Acetazolamid (Sulfonamid), Captopril

(Thiol), Vorinostat (Hydroxamsäure) und Deferoxamin. Diese Erkenntnisse bilden eine vielversprechende Grundlage für die Entwicklung potenter und selektiver Verbindungen, mit einer Hydroxamsäure als wichtigen Strukturelement, zur Behandlung der humanen Schistosomiasis und anderer parasitärer Erkrankungen.

### **1.3.5 Entwicklung von SmHDAC-Inhibitoren anhand von Homologiemodellen, virtuellen „Screening“ und *in vitro*-Testungen**

In einer internationalen Zusammenarbeit von verschiedenen universitären Arbeitsgruppen und Forschungseinrichtungen (*European Unions's Seventh Framework Program for research, technological development, and demonstration under grant agreements nos. 241865 SEtTReND and nos. 602080 A-ParaDDisE*) konnte anhand des Homologiemodells der SmHDAC8 ein virtuelles „Screening“ durchgeführt werden<sup>103,104</sup>. Für diesen Fall wurde die „ZINC drug-like“-Datenbank durchsucht, welche über 20 Millionen Verbindungen enthält. Die ZINC-Datenbank ist öffentlich zugänglich, steht zum freien Herunterladen auf den eigenen Computer zur Verfügung und man kann mittels individuell eingestellten Filtern eine Vorselektion treffen<sup>103</sup>. Desweiteren sind die Verbindungen in dieser Datenbank käuflich zu erwerben.

Nach dem ersten „Screening“ konnten circa 5000 Verbindungen mit einer typischen Zink-bindenden Gruppe, darunter Thiazole, Hydroxamsäuren und Anilinobenzamide identifiziert werden. Diese Verbindungen wurden in die Bindetasche des Homologiemodells der SmHDAC8 „gedockt“. Der Vorgang des „dockens“ beschreibt eine Bewertung der einzelnen untersuchten Liganden zueinander. Dazu werden sie in räumliche Nähe zur Bindetasche gebracht und somit mögliche Konformationen der Liganden und Interaktionen dieser mit dem Enzym nach bestimmten Kriterien und Deskriptoren (zum Beispiel: Verformung von Bindungswinkeln, Entfernung zwischen interagierenden Atomen, Anzahl der Interaktionen) bewertet. Dieser Vorgang läuft nach definierten und veränderlichen Algorithmen und kann mit einer speziellen Software (MOE) visualisiert werden. Es wurden 75 kommerziell erhältliche Verbindungen für eine *in vitro*-Testung ausgewählt (51 Hydroxamsäuren, 22 Thiazolosulfonamide und 2 Anilinobenzamide). Anhand der Testung konnten 26 aktive Verbindungen (25 Hydroxamsäuren und ein Thiazolosulfonamid) bestimmt werden<sup>104</sup>.

## 1. Einleitung

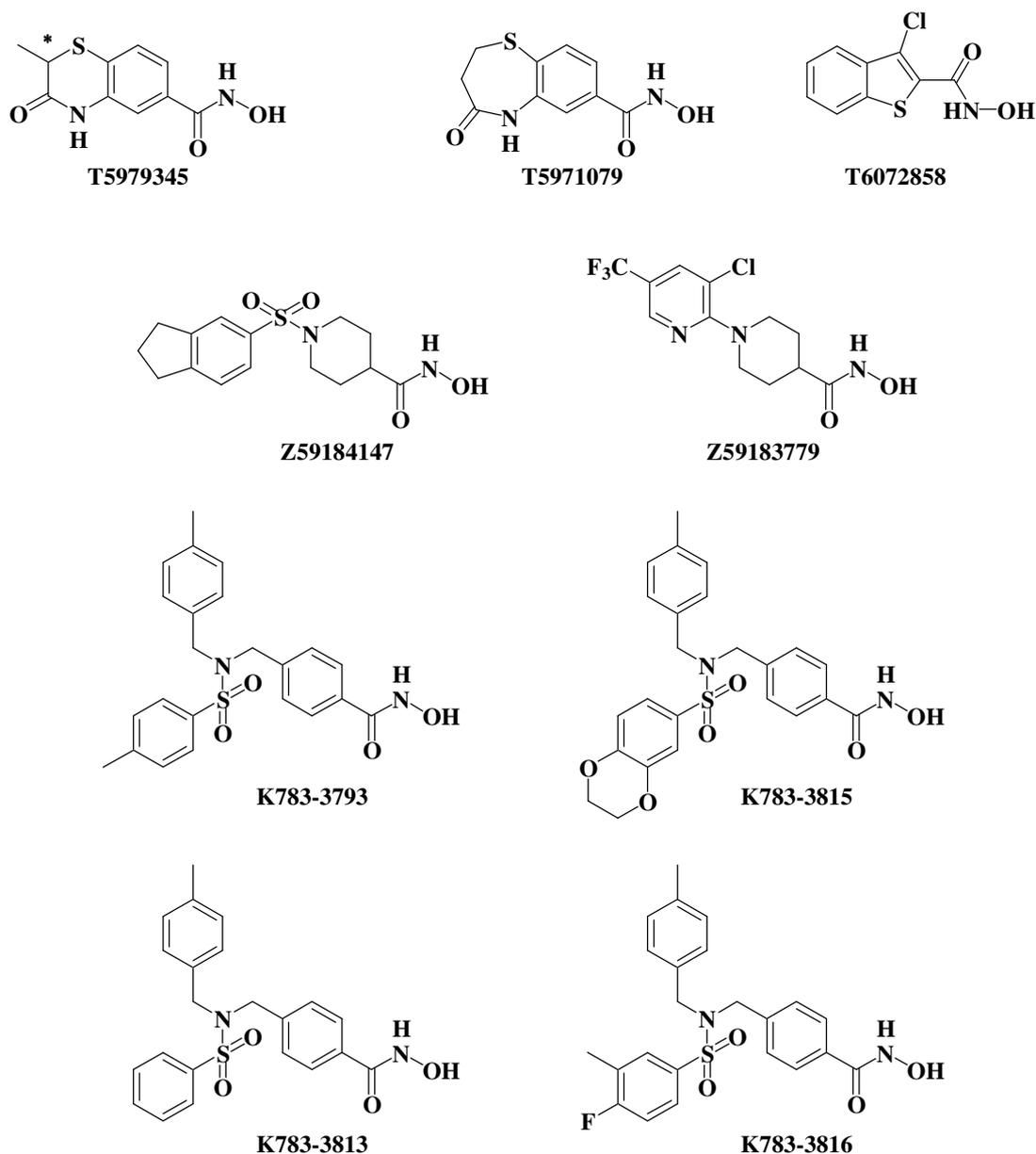


Abbildung 14: Strukturen der beim "Screening" gefundenen Verbindungen.<sup>104</sup>

Die aktivsten Verbindungen (Abb.: 14) haben eine inhibitorische Aktivität gegenüber der schistosomalen HDAC8 im unteren mikromolaren Bereich. Weiterhin entsprechen diese nicht der typischen Struktur, welche als Pharmakophor für Histondesacetylasen vorhergesagt wurde. Sie besitzen größten teils keine Verbindungsdomäne zwischen der Zink-bindenden Gruppe und den größeren, meist aromatischen, endständigen Resten wie TSA und SAHA. Sie ähneln eher Tubastatin A (Abb.: 15), einem anderen bekannten Histondesacetylasehemmer mit einem  $IC_{50}$ -Wert für die SmHDAC8 von  $1,48 \mu M$ <sup>104</sup>. Die Zink-bindende Domäne befindet sich in den meisten Fällen direkt an einem aromatischen System und stellt so eine substituierte Benzhydroxamsäure dar.

### 1.3 Die schistosomale Histondesacetylase 8 als Target

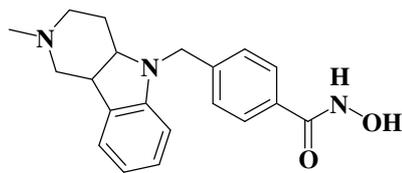


Abbildung 15: Tubastatin A.

Alle gefundenen Hydroxamsäuren besitzen die gleiche Ausrichtung innerhalb der Bindetasche, die ZBG koordiniert das Zinkion, wie dies auch schon für Hydroxamsäuren anhand der Kristallstruktur von HmHDAC8 im Komplex mit Hydroxamsäuren beobachtet wurde<sup>104</sup>. Die Inhibitoren **T5971079** und **T5979345** erreichten die besten „Docking“ Bewertungen und inhibieren die SmHDAC8 im unteren mikromolaren Bereich. Allerdings besitzen sie keine Aktivität auf zellulärer Ebene. Die „Docking“-Lösung (Abb.: 16) für die Ausrichtung von **T5979345** zeigt eine Interaktion zwischen dem Stickstoff der Amidfunktion des Liganden mit His292 in der SmHDAC8. Diese Interaktion kann es auf gleiche Weise in der HmHDAC8 nicht geben, da dort Histidin statt Methionin (Met274) vorliegt. Im Vergleich der inhibitorischen Aktivitäten gegenüber dem humanen und dem schistosomalen Enzym konnte keine Selektivität festgestellt werden<sup>104</sup>.

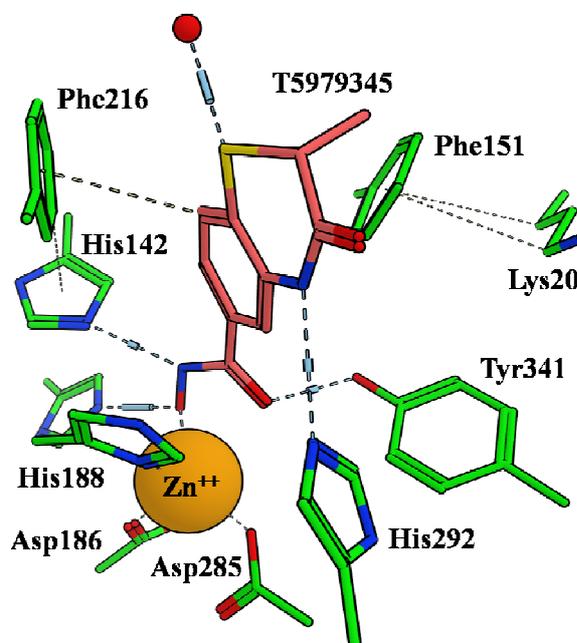


Abbildung 16: Dockinglösung für T5979345 (rosa) in der Bindetasche von SmHADC8. Die Atome sind eingefärbt, Kohlenstoff (grün), Stickstoff (blau), Sauerstoff (rot) und Schwefel (gelb). Das Zinkion ist orange. (MOE).

## 1. Einleitung

### 1.4 Zielstellung der Arbeit

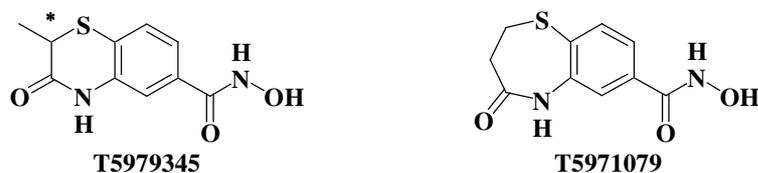


Abbildung 17: Struktur von T597345 und T5971079.

Basierend auf den Ergebnissen vorangegangener Forschungsarbeiten sollten neue potente Verbindungen zur selektiven Inhibition der schistosomalen Histondesacetylase 8 dargestellt werden. Die dafür gewählten Leitstrukturen auf denen diese Arbeit aufbaut sind **T597345** und **T5971079** (Abb.: 17)<sup>104</sup>. Das Grundgerüst für die Optimierung und zugleich Merkmal dieser Substanzklasse ist eine substituierte Benzhydroxamsäure (Abb.: 18).

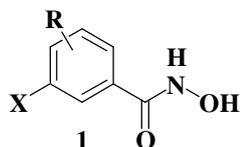


Abbildung 18: Grundgerüst der substituierten Benzhydroxamsäuren.

Hauptaufgabe dieser Arbeit war es eine Substanzbibliothek verschiedener 3-Amino- und 3-Amidobenzhydroxamsäuren darzustellen, diese zu charakterisieren und hinsichtlich ihrer Struktur-Wirkungs-Beziehung zu analysieren. Durch eine Zusammenarbeit mit nationalen sowie internationalen Arbeitsgruppen sollten die Ergebnisse zusammengetragen und bewertet werden um so eine zeitnahe, auf Ergebnissen basierende Wirkstoffoptimierung vornehmen zu können. Die in dieser Arbeit genutzten Methoden beinhalten die Auswertung verschiedener *in vivo*- und *in vitro*-Assays, computergestützte Methoden zur Vorhersage von Ligand-Protein-Interaktionen und zusätzlich die Auswertung von Kristallstrukturen, der in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen kristallisiert mit SmHDAC8.

## 2. Synthetische Arbeiten

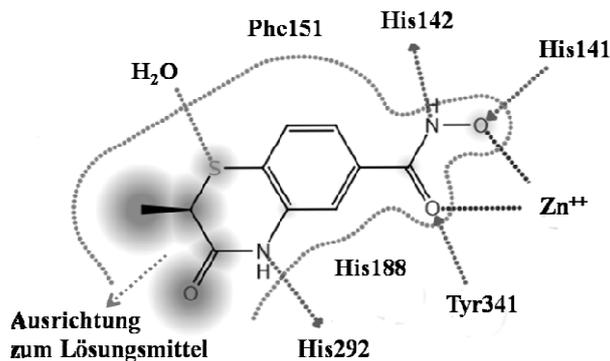


Abbildung 19: Lig-Plot von T5979345 in der Bindetasche von SmHDAC8. (MOE)

Als Ausgangsstruktur der in dieser Arbeit beschriebenen Verbindungen diente Verbindung **T5979345**. Sie stellt im weitesten Sinn eine 3,4-disubstituierte Benzhydroxamsäure dar. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden<sup>104</sup>, dass die Hydroxamsäurestruktur zuständig für die Chelatierung des Zinkions innerhalb der Bindetasche ist und das Proton des Amidstickstoffs eine Wasserstoffbrücke zu einem benachbarten Histidin der SmHDAC8 ausbildet. Die restlichen Strukturen des anelierten und gesättigten Rings bilden keine oder nur sehr unspezifische Wechselwirkungen mit der Bindetasche des Enzyms aus, bzw. deuten in Richtung des Lösungsmittels außerhalb der Bindetasche (Abb.: 19).

Hieraus ergaben sich zwei Verbindungsklassen, die hinsichtlich ihrer Struktur-Wirkungs-Beziehung untersucht werden sollten. Zum einen ist es die Klasse der 3-Aminobenzhydroxamsäuren mit verschiedenen Substituenten an Position 4 des aromatischen Ringes und zum anderen die der 3-Amidobenzhydroxamsäuren ebenfalls mit verschiedenen Substitutionen an Position 4 des aromatischen Ringes (Abb.: 20). Für die Substitution an Position 4 wurde ein Substitutionsmuster gewählt, welches sich in den beiden Klassen wiederholt und somit eine Aussage zulässt, welche Struktur für eine weiterführende gerichtete Synthese geeignet ist.

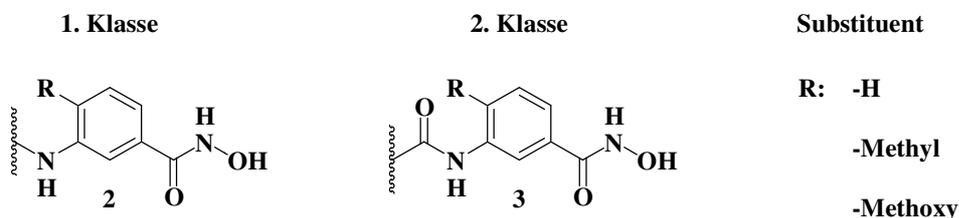


Abbildung 20: Das chemische Grundgerüst der in dieser Arbeit hauptsächlich beschriebenen Verbindungen.

Zur Darstellung der verschiedenen Benzhydroxamsäuren wurden ihre korrespondierenden Carbonsäuren benötigt (Abb.: 21). Darauf hin sind die folgenden Synthesen ausgerichtet.

## 2. Synthetische Arbeiten

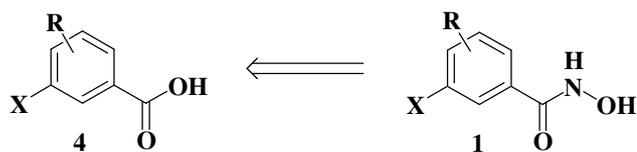


Abbildung 21: Retrosynthese von Benzhydroxamsäure zur Benzoesäure.

Dieses Kapitel ist in drei Abschnitte unterteilt, in die Darstellung der 3-Aminobenzoesäurederivate, die Darstellung der 3-Amidobenzoesäurederivate und die Konvertierung der entstandenen Carbonsäurederivate in die entsprechenden Hydroxamsäuren, welche am Ende des Kapitels beschrieben wird.

### 2.1 Darstellung der 3-Aminobenzoesäuren

#### 2.1.1 Darstellung einfach substituierter 3-N-(Cyclohexyl)-aminobenzoesäuren und 3-N-(Benzyl)-aminobenzoesäuren

Zur Darstellung der verschieden substituierten Derivate und die damit verbundene Knüpfung einer Aminbindung wurde die reduktive Aminierung angewendet. Als Ausgangsverbindung diente die jeweilige 3-Aminobenzoesäure mit unterschiedlichen Substituenten in Position 4. Diese wurde mit den entsprechenden Aldehyden, bzw. Ketonen in die resultierenden Imine überführt und anschließend mittels eines geeigneten Reduktionsmittels zu den entsprechenden Aminen umgesetzt (Abb.: 22).

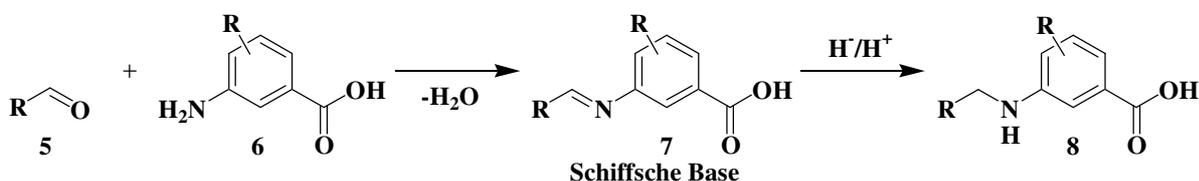


Abbildung 22: Allgemeine Reaktion der reduktiven Aminierung.

Beim ersten Schritt der reduktiven Aminierung erfolgt ein nukleophiler Angriff des freien Elektronenpaares des anilinschen Stickstoffs (6) auf das Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe des Aldehyds (5). Die daraus entstehende SCHIFF'sche Base (7) wird quantitativ gebildet. Lösungsmittel der Wahl war Toluol, welches aufgrund seiner hohen

Siedetemperatur und mit Hilfe eines Wasserabscheiders für wasserentziehende Bedingungen sorgte und so eine Hydrolyse der SCHIFF'schen Base in die Ausgangsstoffe verhindert. Im zweiten Schritt erfolgt die Reduktion zu den jeweiligen sekundären Aminen (**8**) mittels Hydrid. Als Hydridquelle wurde Natriumtriacetoxyborhydrid verwendet. Natriumtriacetoxyborhydrid ist im Gegensatz zu anderen Reagenzien, wie zum Beispiel Borhydrid und Lithiumaluminiumhydrid oder auch gegenüber der katalysierten Hydrierung mittels Wasserstoff ein mildes und selektives Hydrierungsreagenz.<sup>105,106,107,108</sup>

Die Wahl eines milden Reduktionsmittels ist nötig, um die Reduktion der Carbonsäure im Molekül in das entsprechende Aldehyd, bzw. weiterführend in den Alkohol zu verhindern, bzw. auszuschließen, da mit einem Überschuss an Hydrierungsreagenz gearbeitet wurde. Für die folgenden Reaktionen wurde die indirekte reduktive Aminierung gewählt. Bei dieser Methode reagiert zuerst der Aldehyd, bzw. das Keton und das entsprechende Amin (**6**) zu dem resultierenden Imin (**9**, **11**) und erst nach Reinigung des Imins erfolgt die Reduktion in das resultierende Amin<sup>108</sup> (**10**, **12**) (Abb.: 23).

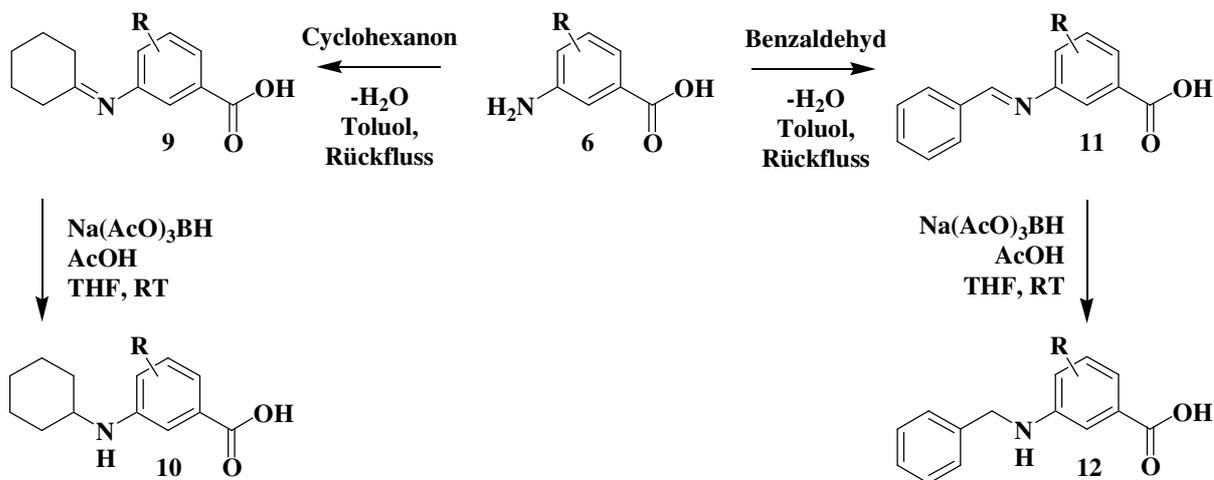


Abbildung 23: Darstellung der substituierten 3-Aminobenzoesäuren.

Da sowohl im ersten Schritt der Aldehyd und im nächsten Schritt das Hydrid im Überschuss zugesetzt wurde, war es möglich, dass bei unzureichender Reinigung der SCHIFF'schen Base das entstandene sekundäre Amin eine Folgereaktion einging. In diesem Fall reagiert das sekundäre Amin erneut mit der Carbonylgruppe des Aldehyds zu einem Halbamin, welches mittels Hydrid zum tertiären Amin reduziert wird (Abb.: 24). Diese Methode, bei der alle Reaktanten und das Hydrierungsmittel in einem Reaktionsgemisch vorliegen, wird auch als direkte reduktive Aminierung bezeichnet<sup>108</sup>.

## 2. Synthetische Arbeiten

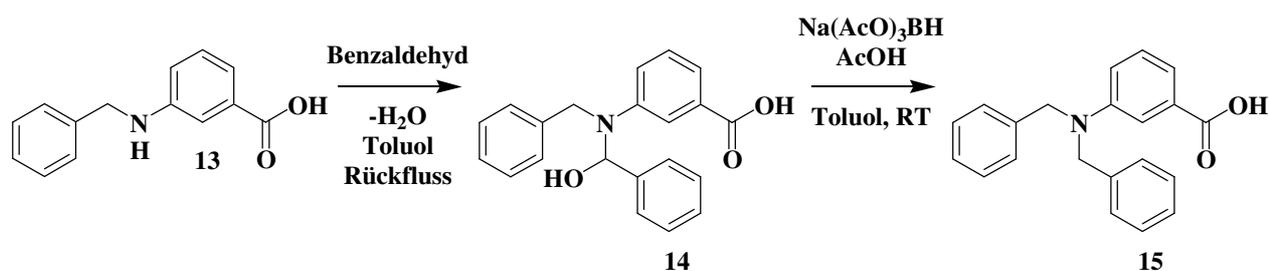


Abbildung 24: Darstellung von 3-*N,N*-Dibenzylaminobenzoessäure.

### 2.1.2 Einführung einer *tert*-Butyloxycarbonylgruppe in die einfach substituierten 3-*N*-(Cyclohexyl)-aminobenzoessäuren und 3-*N*-(Benzyl)-aminobenzoessäuren

Für die weitere Umsetzung des Hydroxylamins zur Hydroxamsäure mittels nukleophiler Substitution benötigt man eine reaktive Carbonylverbindung. Carbonsäuren können unter Verwendung bestimmter Reagenzien in reaktive Carbonylverbindungen überführt werden. Da aber die für diese Reaktion benötigten 3-Aminobenzoessäurederivate mit dem anilinischem Stickstoff selbst ein nukleophiles Zentrum besitzen, würde es zu unerwünschten Nebenprodukten führen. Auf Grund dessen wurde eine *tert*-Butyloxycarbonylgruppe eingeführt (Abb.: 25). Diese dient in der organischen Chemie als sogenannte Schutzgruppe (auch Boc-Schutzgruppe genannt) für primäre und sekundäre Amine<sup>109,110</sup>. Mit Einführung dieser Schutzgruppe verliert das Amin seine nukleophilen Eigenschaften und kann in diesem Fall nicht mehr mit der aktivierten Carbonylgruppe reagieren. Außerdem dient diese Schutzgruppe zur Maskierung des Protons am Stickstoff, welches mit dem Histidin der Bindetasche interagiert. So ließ sich sowohl eine Aussage treffen ob diese Interaktion essentiell für die Aktivität mit der SmHDAC8 ist, als auch über die Auswirkung auf die Selektivität dieser Modifikation am Molekül.

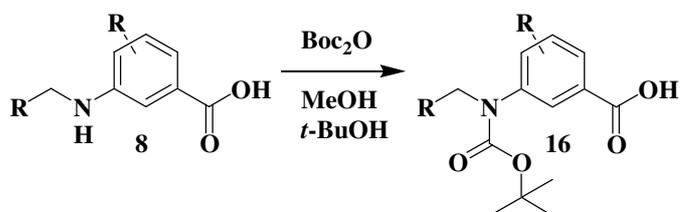


Abbildung 25: Einführung der *tert*-Butyloxycarbonylgruppe.

Die Einführung dieser Schutzgruppe erfolgt mittels Di-*tert*-butyldicarbonat<sup>111</sup>. Hierbei reagiert das freie Elektronenpaar desamins mit dem Carbonylkohlenstoff des Anhydrids unter Abspaltung von Kohlenstoffdioxid und *tert*-Butanol zu einem Carbamat (Abb.: 26). Die Wahl der Schutzgruppe hatte praktische Gründe. Denn die *tert*-Butyloxycarbonylgruppe ist im basischen Milieu stabil<sup>109,112</sup>. Diese Eigenschaft ist unerlässlich, da im weiteren Verlauf der Synthese im Basischen gearbeitet wird. Aus diesem Grund konnte eine Fluorenylmethylenoxy-carbonylgruppe (Fmoc) als Schutzgruppe nicht genutzt werden, da diese im basischen Milieu gespalten wird. Einen weiteren Grund liefern die Bedingungen zur Abspaltung der Schutzgruppe. Benzyloxycarbonyl (Cbz) - und Allyloxycarbonylgruppen (Alloc) bedürfen einer aufwendigere Prozedur diese wieder vom Molekül zu entfernen. Die Benzyloxycarbonylgruppe wird hydrogenolytisch mit Wasserstoff und Palladium auf Aktivkohle abgespalten, während die Spaltung die Allyloxycarbonylgruppe durch Übergangsmetallkatalyse mit Metallen wie Palladium<sup>0</sup>- oder Nickel<sup>0</sup>-Komplexen erreicht wird. Die *tert*-Butyloxycarbonylgruppe kann dagegen im Sauren mit Trifluoressigsäure (TFA) oder Salzsäurelösung in Dichlormethan abgespalten werden<sup>112</sup>.

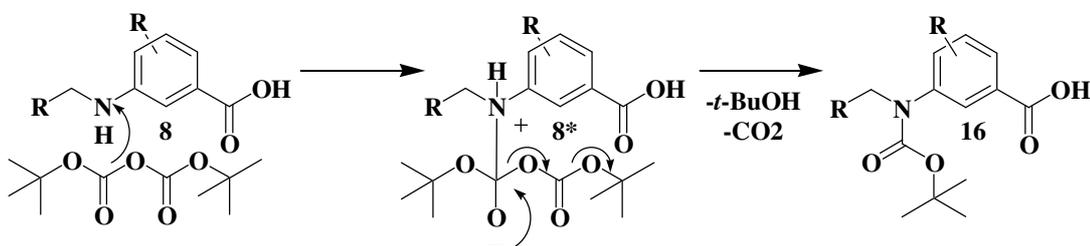
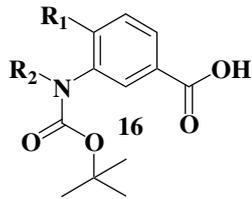


Abbildung 26: Reaktionsmechanismus der Einführung der *tert*-Butyloxycarbonylgruppe.

## 2. Synthetische Arbeiten

Tabelle 2: 3-Aminobenzoesäurederivate



Verbindung	Rest 1	Rest 2
16a	H	
16b	H	
16c	Methyl	
16d	Methyl	
16e	Methoxy	
16f	Methoxy	

Nach dem oben genannten Verfahren wurde ebenso eine 3,5-*N,N'*-Dibenzylcarbamoylebenzoesäure dargestellt (Abb.: 27).

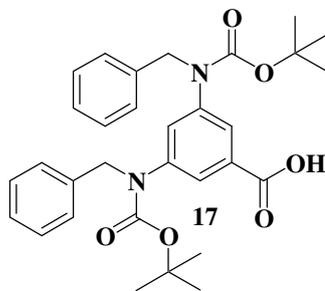


Abbildung 27: Strukturformel von 3,5-*N,N'*-Dibenzylcarbamoylebenzoesäure.

### 2.1.3 Darstellung einfach substituierter 3-*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-aminobenzoessäuren

Ausgehend von den bereits synthetisierten Aminen mit zyklischen Resten sollte mit den hier synthetisierten Verbindungen die Auswirkung niedermolekularer Reste überprüft werden, ob diese ebenfalls eine inhibitorische Aktivität auf die SmHDAC8 besitzen, gegebenenfalls sogar selektive Effekte gegenüber der HmHDAC8 oder den Isoenzymen der humanen Desacetylasen zeigen. Dazu wurden die 3-Aminobenzoessäurederivate wie bereits unter Abschnitt 2.1.2. beschrieben mit Di-*tert*-butyldicarbonat umgesetzt (Abb.: 28).

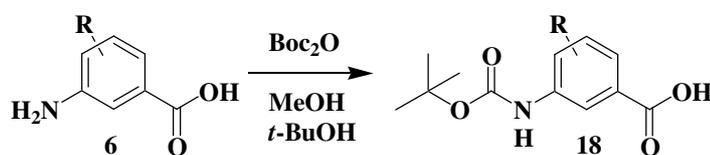


Abbildung 28: Einführen der *tert*-Butyloxycarbonylgruppe.

Diese Schutzgruppenstrategie resultierte in 3 unterschiedlich substituierten Aminobenzoessäurederivaten (Abb 29).

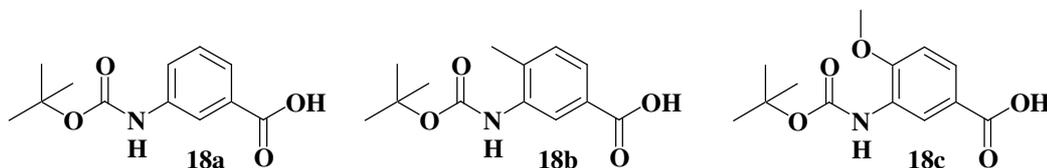


Abbildung 29: Strukturformeln der 3-Carbamoyl-benzoessäurederivate.

## 2.2. Darstellung der 3-Amidobenzoessäurederivate

### 2.2.1. Auswahl des geeigneten Aktivierungsreagenz für die aromatischen Carbonsäuren

Diese Substanzgruppe umfasst den größten Teil der in dieser Arbeit dargestellten Verbindungen. Die hier beschriebenen Synthesen werden in der Art ihrer Herangehensweisen unterteilt. Zum einen wurde die direkte Synthese aus den kommerziell erhältlichen 3-Aminobenzoessäurederivaten mit den jeweiligen Carbonsäuren zu den entsprechenden 3-Amidobenzoessäurederivaten durchgeführt. Zum anderen erfolgte eine vorgelagerte Synthese bestimmter 3-Amino-benzoessäurederivate mit anschließender Amidierung zu den jeweiligen 3-Amidobenzoessäure-derivaten.

## 2. Synthetische Arbeiten

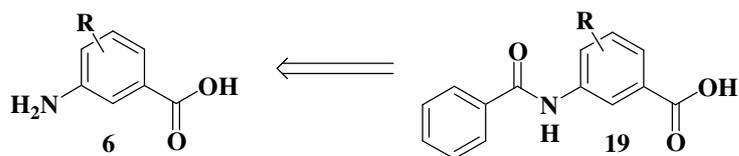


Abbildung 30: Retrosynthese von 3-Amidobenzoensäuren aus 3-Aminobenzoensäuren.

Die Darstellung von Säureamiden aus ihren Carbonsäuren und den entsprechenden primären Aminen im Sinne einer Aminolyse ergibt nur geringe Ausbeuten, einerseits entstehendes Reaktionswasser ständig entfernt werden muss, und andererseits sich Carbonsäuren und Amine leicht unter Salzbildung umsetzen<sup>113</sup>. Die Aminolyse von Carbonsäuren hat im Labor schon seit längeren keine oder nur noch geringe Bedeutung. Sie findet in analytischen Verfahren manchmal noch Anwendung<sup>113</sup> (Hydroxamsäurereaktion).

Der bevorzugte Weg zur Darstellung der Amide ist die Aminolyse der Säurechloride oder Säureanhydride. Da die Reaktivität der nukleophilen Komponente bei Aminolysen mit ihrer Basizität steigt, bzw. fällt umso sterisch anspruchsvoller das Amin gebaut ist, liegt die maximale Reaktivität beim primären Amin<sup>113</sup>. In diesen und in den folgenden Reaktionen ist das primäre Amin ein aromatisches Amin, welches in der Literatur als Anilin bezeichnet wird<sup>114</sup>. Die nukleophile Eigenschaft von Anilin wird durch den mesomeren Effekt des Aromaten abgeschwächt (-M-Effekt), da dieser die Elektronendichte der Aminogruppe verringert. Die Carboxygruppe am Aromaten wirkt auf ihn desaktivierend, da diese aufgrund ihres negativen mesomeren Effekts die Elektronendichte im aromatischen Ring verringert<sup>114</sup>. Durch diese Abnahme der Elektronendichte wird der +M-Effekt des Amins verstärkt, was zur weiteren Reduktion der nukleophilen Eigenschaften des Anilins führt. Aus diesem Grund wurden verschiedene Reagenzien untersucht um die Carbonsäure in ein effektives Acylierungsreagenz zu überführen. Die Reaktivität des Acylierungsreagenzes hängt hierbei von der Resonanzstabilität der angegriffenen Carbonyldoppelbindung ab. Ein Überblick zu dieser Thematik liefert BRÜCKNER<sup>115</sup>. Hier wird die Reaktivität eines Acylierungsmittel mit der Eigenschaft zur Resonanzstabilisierung seiner Carbonyldoppelbindung beschrieben. Das Acylierungsmittel ist im Allgemeinen umso energiereicher, je geringer die Resonanzstabilisierung seiner Carbonyldoppelbindung durch die Aktivierungsgruppe ist (Abb.: 31)<sup>116</sup>.

## 2.2. Darstellung der 3-Amidobenzoessäurederivate

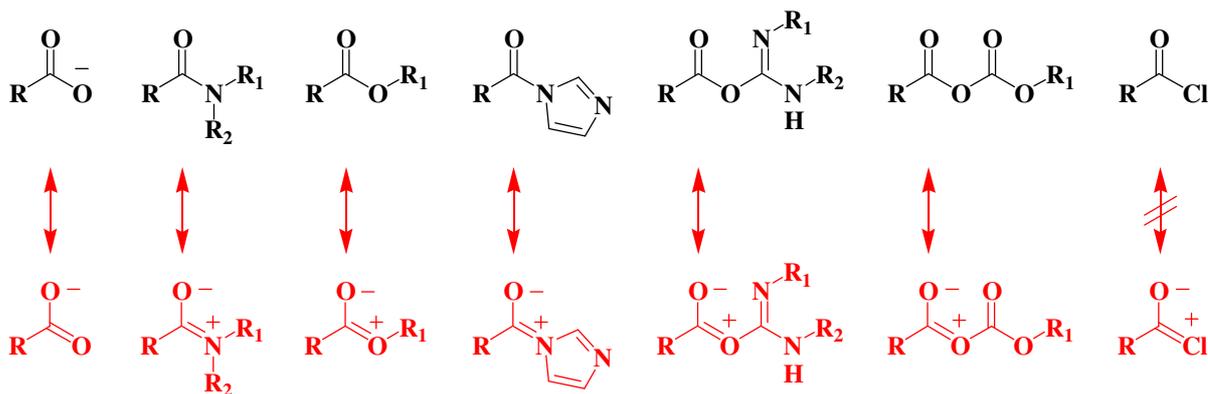


Abbildung 31: Abnahme der Resonanzstabilität von links nach rechts. (Modifiziert nach BRÜCKNER)<sup>116</sup>

Die größte Mesomeriestabilisierung besitzt das Carboxylation und ist damit das schwächste Acylierungsmittel. Ebenso sind Amide ausgeprägt mesomeriestabilisiert. Carbonsäuren und Carbonsäureester sind gegenüber den Amiden schon deutlich reaktiver, allerdings gilt dies nur für Carbonsäuren in Abwesenheit von Basen. Der Grund für die Abnahme der Mesomeriestabilisierung ist die Abnahme des +M-Effekts der Substituenten am Carbonylkohlenstoff. Für das Acylimidazolin kommt hinzu, dass das freie Elektronenpaar des acylierten Stickstoffs nur eingeschränkt für eine Stabilisierung der Carbonyldoppelbindung durch Mesomerie zur Verfügung steht, da es Bestandteil des  $\pi$ -Elektronensystems des Imidazolrings ist. Die weitere Reaktivitätszunahme in dieser Reihe ist darauf begründet, dass das freie Elektronenpaar am benachbarten, d.h. am einfach gebundenen O-Atom, nur noch zunehmend eingeschränkt zur Stabilisierung der Carbonyldoppelbindung durch Mesomerie beiträgt. Es dient partiell auch zur Mesomeriestabilisierung einer zweiten C-Heteratom-Doppelbindung. Die Mitbeanspruchung des freien Elektronenpaars durch diese zweite C-Heteratom-Doppelbindung ist umso ausgeprägter, je größer deren  $-M$ -Effekt ist. Weitere ausgezeichnete Hydroxylierungsmittel stellen elektronenarme Hydroxyaromaten dar, da deren Fähigkeit zur Stabilisierung der Carbonyldoppelbindung durch Mesomerie noch geringer ist (Abb.: 32)<sup>116</sup>.

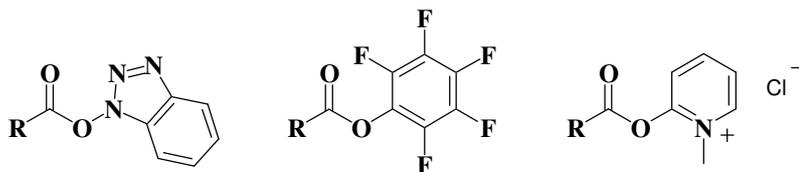


Abbildung 32: Benzotriazolylester, Pentafluorphenylester und Arylester einer Carbonsäure als N-Methylpyridiniumchlorid.

## 2. Synthetische Arbeiten

Das stärkste Acylierungsreagenz in diesen Gruppen (Abb.: 31 und 32) ist das Carbonsäurechlorid. Das Chlor-Atom ist überhaupt nicht mehr in der Lage die benachbarte Carbonyldoppelbindung über Mesomerie zu stabilisieren. Im weiteren Verlauf der Synthese wurde verschiedene Möglichkeiten der Aktivierung und verschiedene Acylierungsreagenzien getestet und nach ihrer Effektivität und Handhabung bewertet um die entsprechenden 3-Amidobenzoensäuren zu erhalten.

### 2.2.2. Aktivierung mittels CDI

Zur Darstellung der Amidbindung wurde im ersten Schritt die unsubstituierte aromatische Benzoensäure mittels Carbonyldiimidazol (CDI) aktiviert. Diese Methode wird auch als Azolid-Methode bezeichnet<sup>117</sup>. Im nächsten Schritt wurde die aktivierte Carbonsäure mit 3-Aminobenzoensäure umgesetzt. Diese Methode läuft unter milden Bedingungen ab, führte jedoch nach der Reinigung zu einer zu geringen Ausbeute von 3-Benzamidobenzoensäure um die geplante Synthese der 3-Amidobenzhydroxamsäuren fortführen zu können (Abb. 33).

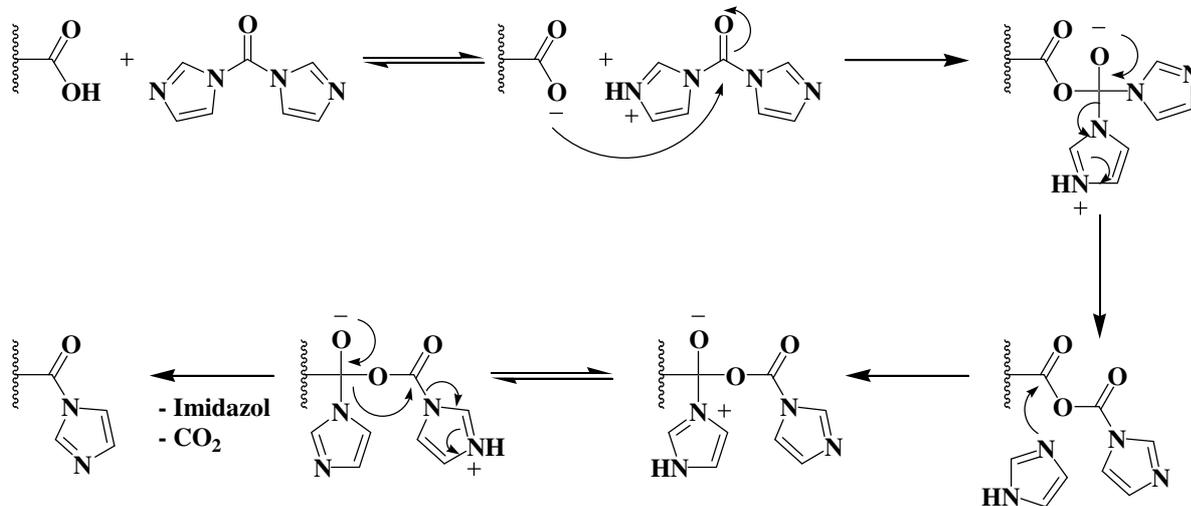


Abbildung 33: Aktivierung der Carbonsäure mit Carbonyldiimidazol. (Modifiziert nach BRÜCKNER)<sup>116</sup>

### 2.2.3. Aktivierung mittels DCC und EDC

Die Aktivierung mittels der Carbodiimide *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)<sup>118,119,120</sup> und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)<sup>121,122</sup> verläuft ebenfalls unter milden Bedingungen. Bei der Reaktion mit Carbonsäuren reagiert das Carbodiimid zu einem *O*-Acylnstoffderivat, welches auch als aktivierter Ester betrachtet werden kann. In

## 2.2. Darstellung der 3-Amidobenzoessäurederivate

Anwesenheit eines Nucleophils entsteht das entsprechende Harnstoffderivat und das jeweilige Produkt aus Carbonsäure und Nucleophil, in diesen Fall ein Amid (Abb.: 34). Vorteil bei dieser Methode gegenüber der Aktivierung als gemischtes Anhydrid ist der, dass keine weiteren nucleophilen Reaktionsprodukte entstehen, die im weiteren Reaktionsverlauf zu Nebenprodukten führen können. DCC geht nach der Reaktion in *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff über, welches ein sehr lipophiles Reaktionsprodukt darstellt und durch einfache Extraktion nicht vom gewünschten Produkt zu trennen ist. EDC dagegen geht nach der Reaktion in 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-harnstoff über. Das tertiäre Amin in dieser Verbindung lässt sich im sauren Milieu protonieren und so durch Extraktion in die wässrige Phase überführen und vom Hauptprodukt trennen. Diese Methode brachte ebenfalls nicht den gewünschten Umsatz und wurde nicht weiter auf die Synthese der 3-Amidobenzoessäuren angewandt.

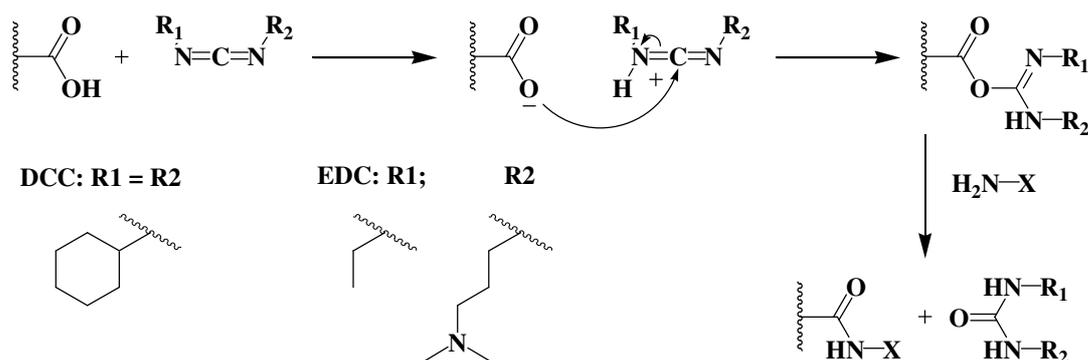


Abbildung 34: Aktivierung der Carbonsäure mit DCC und EDC. (Modifiziert nach BRÜCKNER)<sup>116</sup>

### 2.2.4. Aktivierung als gemischtes Anhydrid

Eine weitere Methode zur Aktivierung von Carbonsäuren ist die Darstellung von Carbonsäureanhydriden, beziehungsweise gemischter Anhydride. Hier ist das Aktivierungsreagenz Chloroethylformiat<sup>123,124</sup>. Bei dieser Synthese wurde die zu aktivierende Carbonsäure mit Triethylamin als Hilfsbase und Chloroethylformiat umgesetzt. Das entstandene Carbonsäureanhydrid sollte im nächsten Schritt unter nucleophiler Substitution mit der 3-Aminobenzoessäure reagieren (Abb.: 35).

Mit Hilfe dieser Methode konnten die Ausbeuten leicht gesteigert werden. Weiterhin ergaben sich unerwünschte Nebenprodukte, da bei der Umsetzung von Chloroethylformiat Ethanol als zusätzliches Nucleophil freigesetzt wird. Um die Ausbeuten zu steigern und die

## 2. Synthetische Arbeiten

Nebenprodukte zu reduzieren, wurden verschiedene gemischte Anhydride angewendet. Dazu zählten Chloromethylformiat, Chloro-2,2,2-trichloro-1,1-dimethylethyl-formiat und Chloroisopropylformiat. Es konnte dadurch aber keine Optimierung der Synthese erreicht werden.

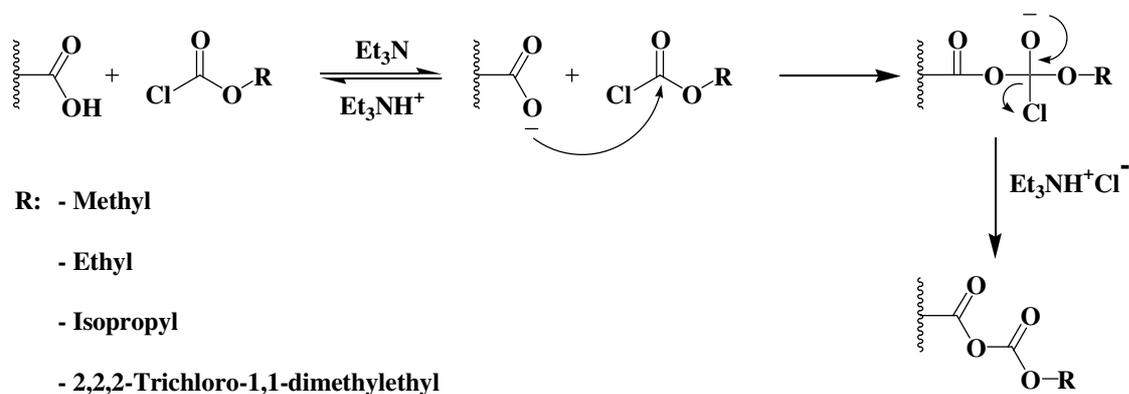


Abbildung 35: Aktivierung der Carbonsäure mit Chlorcarbonsäureester.

### 2.2.5. Aktivierung mittels PyBOP<sup>®</sup>

Ein weiteres Reagenz für Amidknüpfungen ist das Phosphoniumsalz Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP<sup>®</sup>)<sup>125,122,126</sup>.

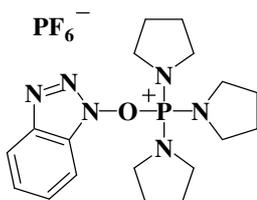


Abbildung 36: Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP<sup>®</sup>).

Bei dieser Methode besteht die Möglichkeit die Carbonsäure als Phosphoniumsalz oder als *O*-Benzotriazolester zu aktivieren. Letzteres ist weniger reaktiv und reagiert vornehmlich mit Aminen zu Amiden. Das Phosphoniumsalz der Carbonsäure ist sehr reaktiv und reagiert sowohl mit Alkoholen als auch Aminen zu den jeweiligen Estern oder Amiden. Im Reaktionsansatz reagiert das Phosphoniumsalz innerhalb weniger Minuten zu den jeweiligen aktiven *O*-Benzotriazolestern der Carbonsäuren (Abb.: 37).<sup>126,127</sup>

## 2.2. Darstellung der 3-Amidobenzoesäurederivate

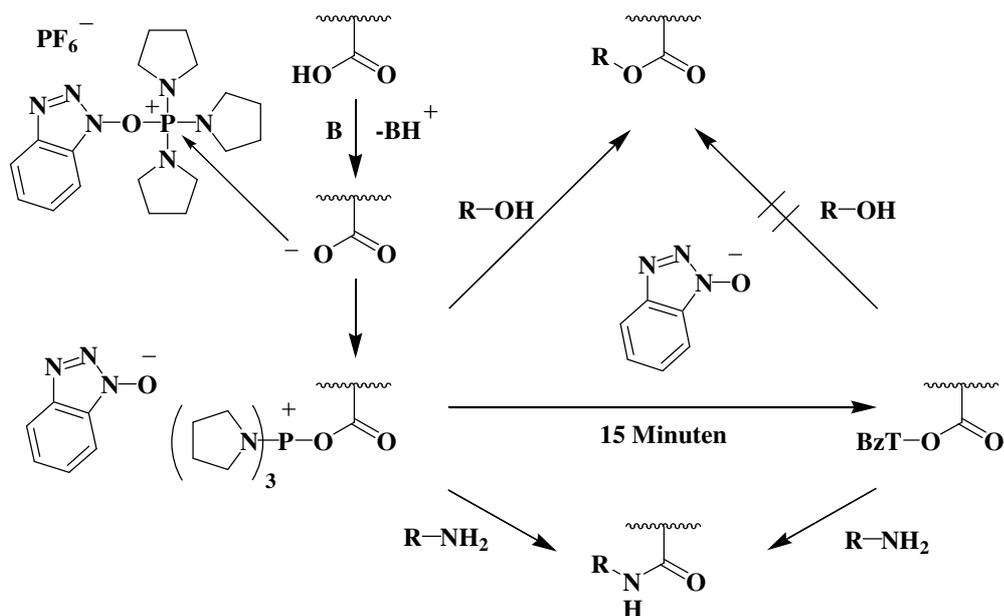


Abbildung 37: Aktivierung der Carbonsäure mit PyBOP®. (Modifiziert nach KIM und PATEL)<sup>127</sup>

Für diesen Syntheseweg wurde die jeweilige Carbonsäure mit der Hünig-Base (DIPEA, Diisopropylethylamin) und PyBOP® zur Reaktion gebracht. Die so aktivierte Carbonsäure sollte im nächsten Schritt mit einem 3-Aminobenzoesäurederivat zu dem jeweiligen Amid reagieren. Mit dieser Methode konnten die Ausbeuten verbessert und die Nebenprodukte reduziert werden. Allerdings ist diese Variante unwirtschaftlich, da der Ausgangsstoff PyBOP® preisintensiv ist und am Anfang einer mehrstufigen Synthese in entsprechend hohen Mengen eingesetzt werden muss.

### 2.2.6. Aktivierung mittels Thionylchlorid

Die Aktivierung einer Carbonsäure mittels Thionylchlorid zum Carbonsäurechlorid mit anschließender Aminolyse zu dem entsprechenden Carbonsäureamid (Abb.: 38) ist die gängigste und am häufigsten genutzte Methode zur Darstellung dieser Verbindungen<sup>128</sup>. Die Reaktion beginnt mit der Veresterung der Carbonsäure zum Chlorsulfonester. Der gebildete Chlorwasserstoff protoniert die Carbonyl-Gruppe und das Chlor-Atom addiert sich an das Carbonyl-Kohlenstoff-Atom. Die gebildete Zwischenstufe wird deprotoniert und zerfällt in das Säurechlorid, Schwefeldioxid und Chlorwasserstoff.<sup>116</sup>

## 2. Synthetische Arbeiten

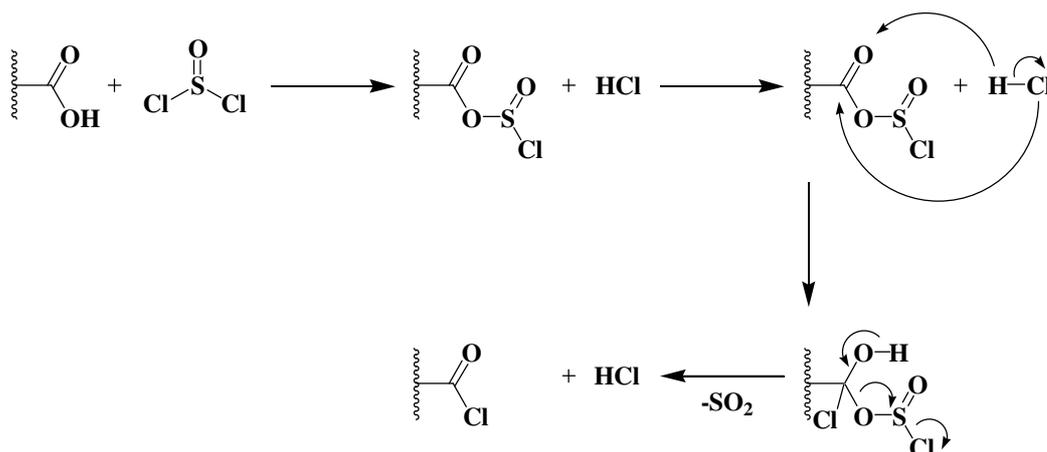


Abbildung 38: Aktivierung der Carbonsäure mit Thionylchlorid. (Modifiziert nach BRÜCKNER)<sup>116</sup>

Der hierbei entstehende Chlorwasserstoff bindet das in der Reaktion befindliche Nukleophil durch Salzbildung und entzieht es so der Reaktion. Um dies zu verhindern, braucht man einen Überschuss des Nukleophils oder man setzt eine Hilfsbase ein, die eine höhere Basizität als das Nukleophil aufweist. Diese Reaktion erfordert einen etwas höheren Materialaufwand und läuft unter drastischeren Bedingungen ab als die zuvor genannten Reaktionen zur Aktivierung der Carbonsäuren. Sie ist allerdings robust, zuverlässig und führt sowohl zu hohen Ausbeuten als auch bei der vorliegenden Verbindungsklasse zu keinen Nebenreaktionen. Diese Methode wurde somit zum Standard der Darstellung von 3-Amidobenzoesäuren.

### 2.3. Darstellung der 3-Amidobenzoesäuren

Zur Darstellung der 3-Amidobenzoesäuren wurde ein Zwischenschritt in die Synthese eingeführt um die Ausbeute zu erhöhen. Da bei der wässrigen Aufarbeitung des Reaktionsgemisches der Aminolyse noch vorhandene aktivierte Säure wieder in die Carbonsäure hydrolysiert, entsteht ein Reaktionsgemisch welches bis zu drei aromatische Carbonsäuren enthalten kann. Bei einem unvollständigen Umsatz können sowohl noch 3-Aminobenzoesäure, das Produkt, die 3-Amidobenzoesäure, sowie bereits beschrieben die Carbonsäure, welche aus der aktivierten Säure hervorgeht, enthalten sein. Diese drei aromatischen Carbonsäuren chromatographisch zu trennen ist aufwendig und führt aufgrund des ähnlichen Retentionsverhalten häufig zu überlappenden Fraktionen, was eine Minderung der Ausbeute bedeutet. Um dem entgegenzuwirken, wurden die 3-Amino-benzoesäuren verestert (Abb.: 39). Die so erhaltenen 3-Aminobenzoesäuremethylester lassen sich gut

### 2.3. Darstellung der 3-Amidobenzoesäuren

handhaben und ihre entsprechenden Produkte aus der Aminolyse sich aufgrund ihrer veränderten Polarität gegenüber den Carbonsäuren chromatographisch leichter aus dem Reaktionsgemisch isolieren. Nach einer einfachen und robusten Methode konnte der Methylester dargestellt werden. Mittels Thionylchlorid wurde *in situ* das Säurechlorid erzeugt. Als Lösungsmittel wurde Methanol eingesetzt, welches im Überschuss auch als Reaktant diente. Die Reaktion verlief quantitativ und ohne Nebenprodukte ab.

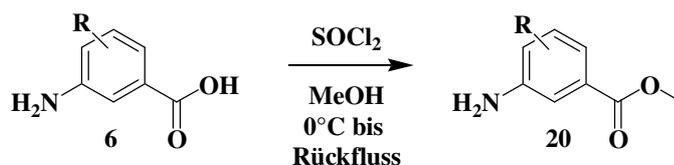


Abbildung 39: Darstellung der 3-Aminobenzoesäuremethylester.

Im weiteren Verlauf der Synthese wurden die 3-Aminobenzoesäuremethylester mit den entsprechenden Carbonsäurechloriden zu den 3-Amidobenzoesäuremethylestern umgesetzt.

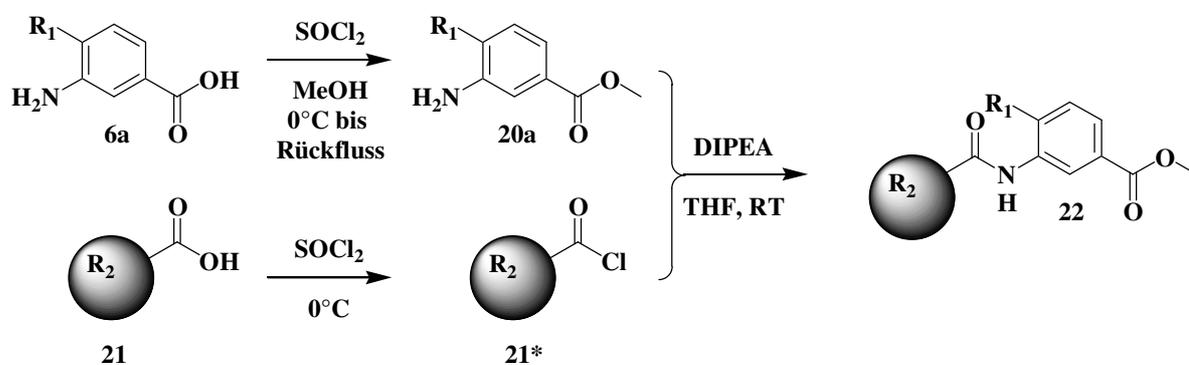


Abbildung 40: Darstellung der 3-Amidobenzoesäuremethylesterderivate.

Diese Methode zur Darstellung von 3-Amidobenzoesäuremethylesterderivaten als Vorstufe der 3-Amidobenzoesäuren hat sich als effektivste Variante herausgestellt und wurde für die weiteren Synthesen dieser Substanzklasse verwendet. Diese Herangehensweise bedeutete zwei zusätzliche Synthesestufen. Zunächst erfolgte die Veresterung zum Methylester, anschließend die Hydrolyse des Esters um die gewünschten 3-Amidobenzoesäuren für die

## 2. Synthetische Arbeiten

weitere Synthese zu erhalten. Das günstigere Retentionsverhalten der Methylester bei der chromatographischen Reinigung führte zu höheren Ausbeuten und rechtfertigt somit den synthetisch präparativen Mehraufwand.

Die Hydrolyse der Ester erfolgte unter milden Bedingungen. Der betreffende Ester wurde dazu in Methanol gelöst, bzw. suspendiert und unter basischen Bedingungen mittels einer wässrigen Natriumhydrogencarbonat- oder Natriumhydroxid-Lösung hydrolysiert (Abb.: 41).

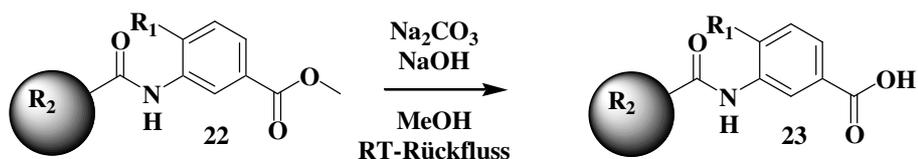
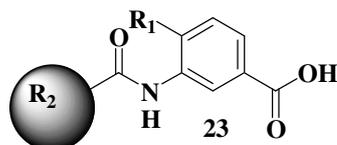


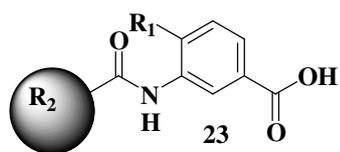
Abbildung 41: Hydrolyse der 3-Amidobenzoesäuremethylesterderivate.

Tabelle 3: Dargestellte substituierte 3-Amidobenzhydroxamsäuren



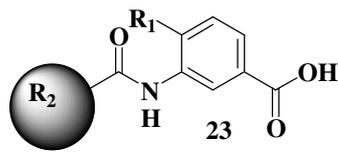
Verbindung	Rest 1	R <sub>2</sub>
23a	H	
23b	Methyl	
23c	Methyl	

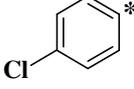
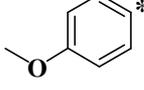
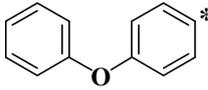
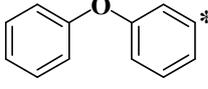
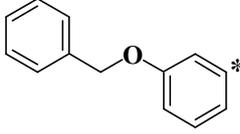
### 2.3. Darstellung der 3-Amidobenzoensäuren



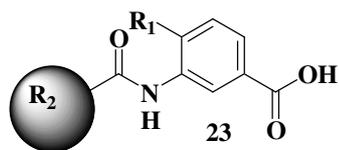
Verbindung	Rest 1	R <sub>2</sub>
23d	Methoxy	
23e	Methoxy	
23f	Methoxy	
23g	Methoxy	
23h	Methoxy	
23i	Methoxy	
23j	Methoxy	
23k	Ethoxy	
23l	Ethoxy	

2. Synthetische Arbeiten



Verbindung	Rest 1	
23m	Propoxy	
23n	Isopropoxy	
23o	Chlor	
23p	Chlor	
23q	Chlor	
23r	Chlor	
23s	Chlor	
23t	Chlor	
23u	Chlor	
23v	Brom	

## 2.4. Darstellung der 3,5-Dibenzamidobenzooesäure



Verbindung	Rest 1	R <sub>2</sub>
23w	Fluor	
23x	Trifluormethyl	

## 2.4. Darstellung der 3,5-Dibenzamidobenzooesäure

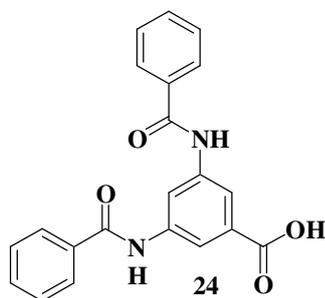


Abbildung 42: Strukturformel von 3,5-Dibenzamidobenzooesäure.

Die hier dargestellte Verbindung ist eine 3,5-disubstituierte Benzooesäure und wurde direkt aus der Umsetzung der 3,5-Diaminobenzooesäure mit Benzoylchlorid und einer Hilfsbase dargestellt (Abb.: 43). Dieses Substitutionsmuster soll in folgenden Testungen zeigen, ob eine raumgreifende Substitution in Position 5 der Benzhydroxamsäure einen Einfluss auf Selektivität und inhibitorische Aktivität auf die SmHDAC8 besitzt.

## 2. Synthetische Arbeiten

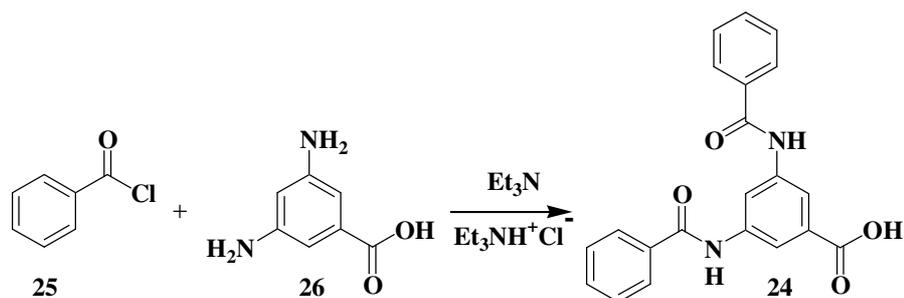


Abbildung 43: Darstellung der 3,5-Dibenzamidobenzoessäure.

### 2.5. Darstellung der 9-Oxo-5,6,7,8-tetrahydroacridin-3-carbonsäure

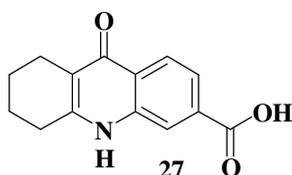


Abbildung 44: Strukturformel von 9-Oxo-5,6,7,8-tetrahydroacridin-3-carbonsäure.

Die 9-Oxo-5,6,7,8-tetrahydroacridin-3-carbonsäure stellt eine trizyklische Carbonsäure dar. Sie vereint mit ihrem gesättigten Ring die Merkmale der 3-(*N*-Cyclohexyl)aminobenzoessäure und durch ihr vinyloges Amid die chemischen Eigenschaften der *NH*-Funktion der 3-Amidobenzoessäuren. Die Verbindung wurde direkt aus 3-Aminoterephthalsäure und Cyclohexanon, gelöst in hochsiedenden Diphenylether (DPE), dargestellt<sup>129,130,131</sup> (Abb.: 45). Sie stellt eine starre Verbindung mit einem leicht gewinkelten gesättigten Ring dar. Und weist eine Oxo/Hydroxy-Tautomerie auf. Frühere Röntgenuntersuchungen für diese Substanzklasse haben gezeigt, dass das Verhältnis der Tautomere in Lösung 1000:1 auf der Seite der Oxo-Verbindung liegt<sup>132,133</sup>.

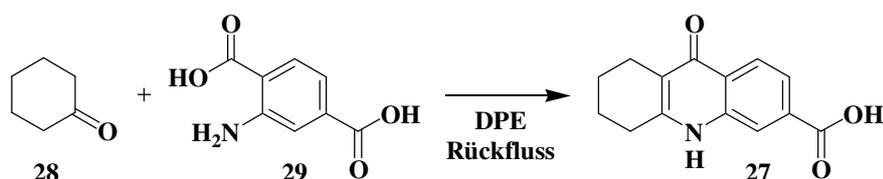


Abbildung 45: Darstellung der 9-Oxo-5,6,7,8-tetrahydroacridin-3-carbonsäure<sup>129,130,131</sup>.

## 2.6. Darstellung der 3-(*N*-Phenyl)-carboxamidobenzoessäure

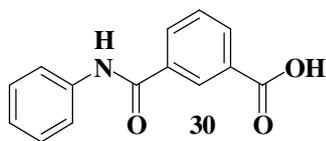


Abbildung 46: Strukturformel von 3-(*N*-Phenyl)-carboxamidobenzoessäure.

Die 3-(*N*-Phenyl)-carboxamidobenzoessäure stellt eine Derivat der 3-Benzamidobenzoessäure mit inverser Amidgruppierung dar und soll im Vergleich dieser beiden Verbindungen aufzeigen, welchen Einfluss diese Modifikation auf die Interaktion mit der SmHDAC8 besitzt. Als Ausgangsstoffe dienten die 3-Carboxybenzoessäure, Thionylchlorid als Aktivierungsreagenz und als Aminkomponente das Anilin, welches ebenso Lösungsmittel und Hilfsbase darstellte (Abb.: 47). Der daraus entstandene 3-(*N*-Phenyl)-carboxamidobenzoessäuremethylester wurde im darauffolgenden Schritt hydrolysiert (Absatz: 2.3.)

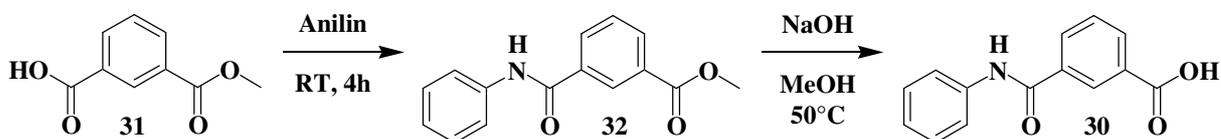


Abbildung 47: Darstellung der 3-(*N*-Phenyl)-carboxamidobenzoessäure.

## 2.7. Darstellung verschiedener 3-Benzamido-4-alkoxybenzhydroxamsäuren

Im Laufe der hier beschriebenen Arbeit ließ sich bei der Auswertung von Struktur-Wirkungsbeziehungen anhand von *in vitro*-Aktivitätsmessungen in Form von EC<sub>50</sub>-Werten und hochaufgelösten Röntgenkristallstrukturen (Abb.: 48) eine Substitutionsvariation ableiten, die zu einer gesteigerten inhibitorischen Aktivität gegenüber der SmHDAC8 führt. Es wurden drei unterschiedliche Strukturen betrachtet: 3-Benzamidobenzhydroxamsäure **50a**, 3-Benzamido-4-methylbenzhydroxamsäure **50b** und 3-Benzamido-4-methoxybenzhydroxamsäure **50d**. Die Unterschiede der drei Verbindungen liegen in ihrer Substitution an Position 4 der Benzhydroxamsäure.

## 2. Synthetische Arbeiten

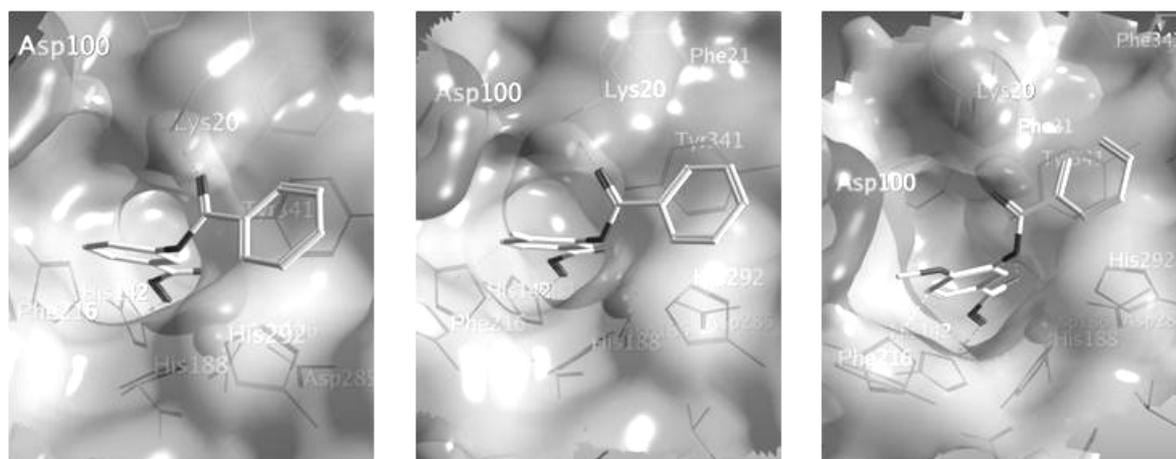


Abbildung 48: Röntgenkristallstruktur von SmHDAC8 kokristallisiert mit Verbindung 50a (links), 50b (mitte), 50d (rechts). (MOE)

In Abbildung 48 sind die drei Kristallstrukturen mit den jeweiligen Verbindungen kokristallisiert dargestellt. Man erkennt, dass die Ausrichtung der Liganden nahezu identisch ist. Die Hydroxamsäurefunktion koordiniert das Zinkion im Inneren der Bindetasche, die Carbonylfunktion des Amidlinkers bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit Lys20 aus und der zweite aromatische Ring interagiert vermutlich über  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit Tyr341. Am Rand der Bindungstasche von SmHDAC8 kann man im Bereich der Aminosäure Asp100 eine kleine lipophile Seitentasche erkennen, welche so in der HmHDAC8 nicht vorhanden ist. Betrachtet man die Verbindungen in der mittleren und rechten Abbildung sieht man, dass die Substitution in Position 4 der Benzhydroxamsäure in Richtung dieser Seitentasche deutet. Bei der Auswertung ergab sich der Trend, dass je größer der Rest in Position 4 der Benzhydroxamsäure ist, desto stärker ist die inhibitorische Wirkung auf SmHDAC8 (Abb.: 49).

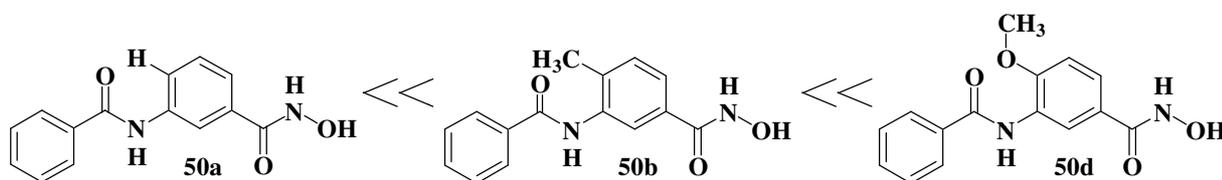


Abbildung 49: Zunehmender Einfluss auf die inhibitorische Aktivität gegenüber der SmHDAC8 in Abhängigkeit des Substituenten in Position 4 der Benzhydroxamsäure.

## 2.7. Darstellung verschiedener 3-Benzamido-4-alkoxybenzhydroxamsäuren

Daraus ergab sich die Idee weitere 3-Benzamido-4-alkoxybenzhydroxamsäurederivate zu synthetisieren und den Einfluss der Alkoxygruppe hinsichtlich der Aktivität auf SmHDAC8 und Selektivität zu den humanen Histondesacetylasen zu untersuchen. Da die Grundkörper als 3-Amino-4-alkoxybenzoesäuren kommerziell nicht verfügbar waren, mussten diese zuerst dargestellt werden.

### 2.7.1. Darstellung von 3-Amino-4-ethoxybenzoesäure

Zur Darstellung der 3-Amino-4-ethoxybenzoesäure wurde zuerst der Ansatz der Phenolsynthese nach DOW<sup>134</sup> und der klassischen WILLIAMSON-Ethersynthese<sup>135</sup> gewählt (Abb.: 50), da die jeweiligen 3-Amino-4-chlorbenzoesäuren, bzw. 3-Amino-4-hydroxybenzoesäuren und die entsprechenden Alkohole, bzw. Halogenalkane verfügbar waren.

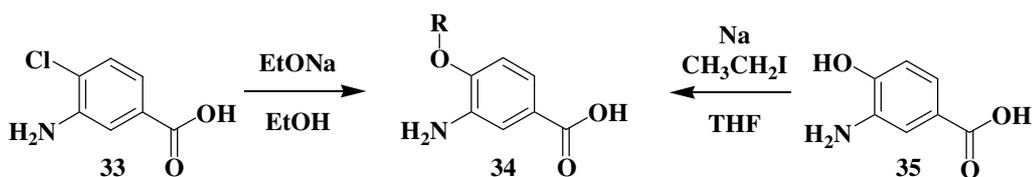


Abbildung 50: Darstellung der 3-Amino-4-alkoxybenzoesäuren nach DOW<sup>134</sup> (links) und WILLIAMSON<sup>135</sup> (rechts).

Im ersten Versuch wurde 3-Amino-4-chlorbenzoesäure mit einer frisch hergestellten Natriumethanolat-Lösung in Ethanol umgesetzt. Dies führte auch unter Variation der Reaktionsbedingungen nicht zum gewünschten Produkt. Diese nukleophile aromatische Substitution verläuft über einen Arinzwischenschritt (*cine*-Substitution, Phenolsynthese von DOW<sup>134</sup>) (Abb.: 51) und kann Gemische aus 3-Amino-4-ethoxybenzoesäure und 3-Amino-5-ethoxybenzoesäure ergeben, weshalb diese Strategie nicht weiter verfolgt wurde.

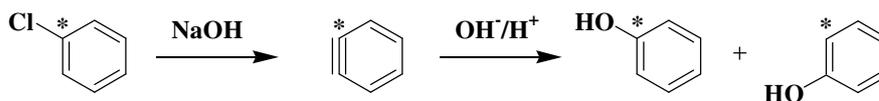


Abbildung 51: Phenolsynthese nach DOW mit Arinzwischenschritt<sup>134</sup>.

## 2. Synthetische Arbeiten

Die zweite Möglichkeit einen Ether nach der WILLIAMSON Ethersynthese aus einem Halogenalkan und einem Phenolat darzustellen war ebenfalls nicht erfolgreich. Hierbei wurde vorher die Aminfunktion mit einer Boc-Schutzgruppe versehen um eine *N*-Alkylierung zu verhindern. Vermutlich entsteht bei dieser Methode das Phenolatanion nur in unzureichenden Mengen, da zuerst Natriumbenzoat gebildet wird und somit die Ausbildung eines Dianions erschwert ist (Abb.: 52).

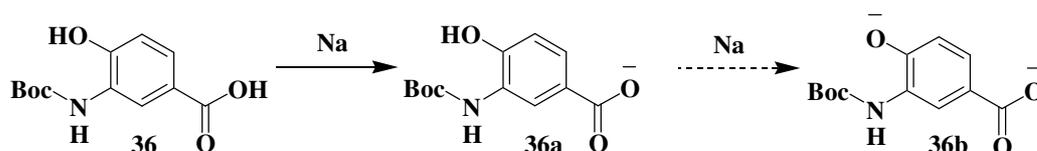


Abbildung 52: Bildung des Dianions.

Eine abgewandelte Form der WILLAMSON Ethersynthese wird von DIF et al. beschrieben<sup>136</sup>, wobei das Eisenoxid durch Silberoxid ersetzt und die eingesetzten Äquivalente abgewandelt wurden<sup>137</sup>. Bei dieser Reaktion wurde der entsprechende Alkohol und das entsprechende Halogenalkan mit Hilfe von Silberoxid als Katalysator unter milden Bedingungen zur Reaktion gebracht (Abb.: 53).

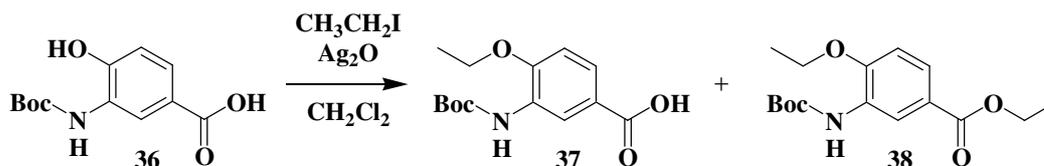


Abbildung 53: Modifizierte Ethersynthese nach Dif et al.<sup>136,137</sup>

Diese, in einer vorangegangenen Arbeit bereits erprobte Methode führte ebenfalls nicht zum gewünschten Produkt. Ebenso erwiesen sich die Methoden der modifizierten WILLIAMSON Ethersynthese, bei denen das Deprotonierungsreagenz variiert wurde, als erfolglos. Zum einen wurde Natriumhydrid<sup>138</sup> genutzt um das Phenolatanion zu erzeugen und zum anderen Tetrabutylphosphoniumhydroxid, welches nach LIU et al. selektiv und quantitativ zu einer *O*-Alkylierung in Anwesenheit einer Carbonsäuregruppe führen sollte (Abb.: 54)<sup>139</sup>.

## 2.7. Darstellung verschiedener 3-Benzamido-4-alkoxybenzhydroxamsäuren

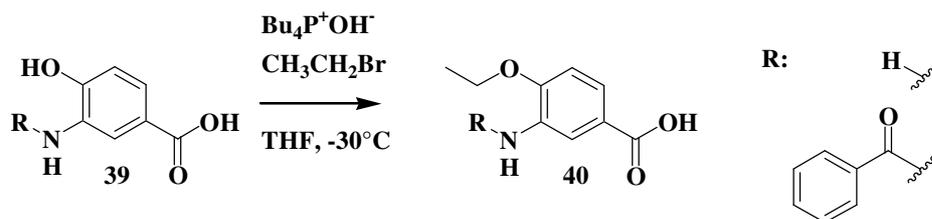


Abbildung 54: Ethersynthese nach LIU et al.<sup>139</sup>

Da die vorangegangenen Versuche einer *O*-Alkylierung nicht zu den gewünschten Produkten führten, wurde die Synthese der 3-Amino-4-alkoxybenzoesäuren überdacht und eine neue Syntheseroute etabliert. Als Grundkörper dienten hierzu kommerziell erhältliche 4-Alkoxybenzoesäuren, welche durch Nitrierung und anschließender Reduktion in die entsprechenden Amine überführt wurden. Laut Literatur<sup>140,141</sup> hat bei einer Zweitsubstitution am Aromaten der erste Substituent einen erheblichen Einfluss auf die Reaktivität des Aromaten und zugleich eine dirigierende Wirkung auf den Ort der Zweitsubstitution. Die Reaktion zwischen dem nukleophilen Kern und dem elektrophilen Agens erfolgt umso leichter, je basischer der Aromat und je saurer das Reagenz ist. Die Basizität des Kerns wird durch Substituenten erhöht, die die Elektronendichte durch induktive und mesomere Effekte vergrößern. Hierzu zählen, Alkyl-, Alkoxy-, Hydroxy- und Aminsubstituenten. Diese sind Substituenten erster Ordnung und dirigieren in *ortho*- und *para*-Stellung des Aromaten (Abb.: 55). Die Reaktivität von Aromaten wird durch Carbonsäuren und Carbonsäureester, sowie Nitril- und Nitrogruppen erniedrigt. Hierbei nimmt das Ausmaß der Desaktivierung von der Carbonsäuregruppe zur Nitrogruppe zu. Diese Substituenten dirigieren vornehmlich in *meta* Position des Aromaten (Abb.: 55)<sup>140,141</sup>.

In diesem Fall handelt es sich um eine Drittsubstitution. Die Ethoxyfunktion übt einen +M-Effekt aus, hat somit eine aktivierende Wirkung auf den Aromaten und dirigiert zudem in *ortho*- und *para*-Position. Die Carbonsäurefunktion wurde im Vorfeld in einen Carbonsäuremethylester überführt und hat einen –M-Effekt, was zu einer Inaktivierung des Aromaten führt und sie dirigiert die Zweitsubstitution in *meta*-Position. Die Substituenten weisen gegenläufige Eigenschaften hinsichtlich des Einflusses auf die Reaktivität des Aromaten auf, ergänzen sich aber hinsichtlich der Position für eine Drittsubstitution. Diese sollte daher bevorzugt in Position drei des Aromaten stattfinden.

## 2. Synthetische Arbeiten

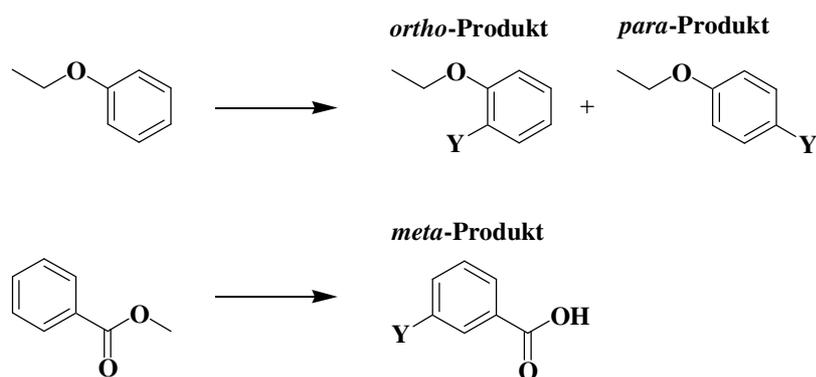


Abbildung 55: Position der Zweitsubstitution in Abhängigkeit des Erstsubstituenten.

Für die Einführung einer Nitrogruppe mittels Nitrierung am Aromaten bietet die Literatur<sup>142</sup> drei Möglichkeiten, die sich jeweils nach der Reaktivität des Aromaten richten. Dabei wird in reaktionsträge Aromaten (Variante A), Aromaten mittlerer Reaktivität (Variante B) und reaktionsfähige Aromaten (Variante C) unterschieden. Als elektrophiles Reagens wirkt bei der Nitrierung das Nitrylkation. Aus Salpetersäure bildet sich das Nitrylkation nur im sauren Milieu. Im einfachsten Fall protoniert sich Salpetersäure in Form der Autoprotolyse selbst. Allerdings liegt das Gleichgewicht auf der linken Seite und so können nur reaktionsfähige Aromaten umgesetzt werden<sup>142</sup> (Abb.: 56).



Abbildung 56: Autoprotolyse von Salpetersäure.

Der Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure verschiebt dieses Gleichgewicht und erhöht die Konzentration der Nitrylkationen<sup>142</sup> (Abb.: 57).



Abbildung 57: Bildung der Nitriersäure.

Dieses Salpetersäure-Schwefelsäuregemisch wird auch als Nitriersäure bezeichnet. Für die Nitrierung des *para*-Ethoxybenzoesäuremethylesters wurde Variante B für Aromaten mittlerer Reaktivität gewählt (68%ige Salpetersäure/konz. Schwefelsäure; 1/1,4 V/V)

## 2.7. Darstellung verschiedener 3-Benzamido-4-alkoxybenzhydroxamsäuren

(Abb.: 58). Eine Viertsubstitution ist unter diesen Bedingungen nahezu ausgeschlossen und wurde auch nicht beobachtet.

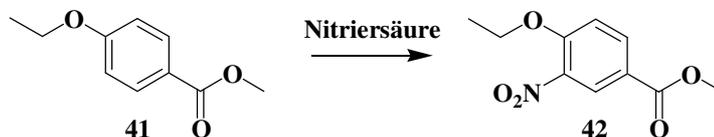


Abbildung 58: Darstellung des 3-Nitro-4-ethoxybenzoesäuremethylesters.

Im nächsten Schritt wird die Nitrogruppe zum Amin reduziert. Hierfür wurde eine Vorschrift nach PFLÄSTERER et al. modifiziert<sup>143</sup> und auf die Verbindung erfolgreich angewendet. Die Reduktion verläuft in einer salzsauren ethanolischen Lösung unter Verwendung von Eisenspänen als Reduktionsmittel (Abb.: 59).

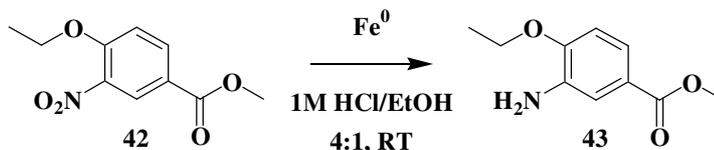


Abbildung 59: Darstellung des 3-Amino-4-ethoxybenzoesäuremethylesters.

Mit Hilfe dieser Vorschrift konnten weitere 3-Amino-4-alkoxybenzoesäuremethylester dargestellt werden. Anschließend wurden wie unter Kapitel 2.3. beschrieben diese in die jeweiligen 3-Benzamido-4-alkoxybenzoesäuren überführt.

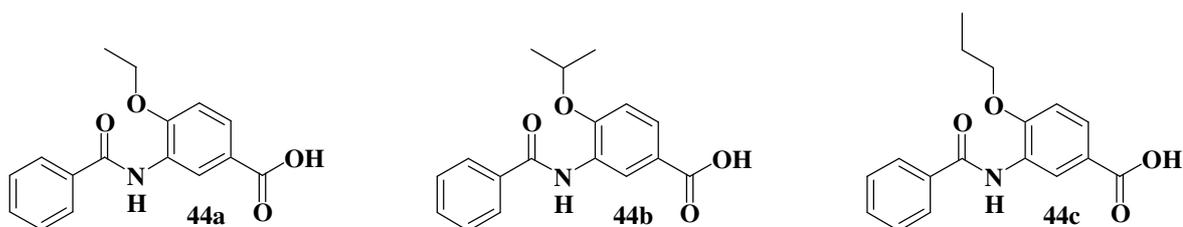


Abbildung 60: In diesem Kapitel dargestellte 3-Benzamido-4-alkoxybenzoesäuren.

## 2.8. Darstellung der Benzhydroxamsäuren

Die Umwandlung der Benzoesäuren in ihre entsprechenden Benzhydroxamsäurederivate erfolgte im Allgemeinen über eine nukleophile Substitution am Carbonyl-Kohlenstoff der aktivierten Carbonsäure (siehe: Absatz 2.2.) durch Hydroxylamin. Im Folgenden wird auf die verschiedenen Darstellungsmöglichkeiten der Hydroxamsäuren eingegangen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden. Da sich zu Beginn dieser Arbeit schnell abzeichnete, dass die Darstellung der Hydroxamsäuren nach allgemeinen Literaturangaben wie zum Beispiel die basische Aminolyse von Benzoesäureester mit Hydroxylaminhydrochlorid<sup>144,145,122</sup> nicht effektiv genug ist und eine schwierige Reinigung nach sich zieht, wurden verschiedene Aktivierungsreagenzien und Hydroxylaminquellen auf ihre Praktikabilität hin getestet.

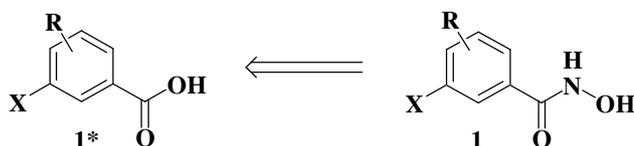


Abbildung 61: Retrosynthese von Benzhydroxamsäure zur Benzoesäure.

Die ersten Versuche zur Darstellung der Hydroxamsäuren verlaufen im Allgemeinen nach folgendem Schema. Zuerst wird die Carbonsäure aktiviert um den Carbonyl-Kohlenstoff für eine nukleophile Reaktion zugänglich zu machen und anschließend wird das Nukleophil hinzugegeben<sup>99</sup>, in diesen Fall Hydroxylamin. Hydroxylamin ist eine farblose, kristalline anorganische Verbindung die unter Luftausschluss ebenso als wässrige Lösung einige Wochen stabil ist. Bei Anwesenheit von Luftsauerstoff zersetzt sich Hydroxylamin sowohl als Reinstoff wie auch in Lösung sehr schnell. Oberhalb von 70 °C erfolgt die Zersetzung explosionsartig<sup>146</sup>. Aufgrund dieser Instabilität findet Hydroxylamin meist als Salz Verwendung, zum Beispiel als Hydroxylaminhydrochlorid. In der Salzform geht der Stickstoff allerdings keine nukleophile Reaktion ein, da sein freies Elektronenpaar zur Bildung des Hydrochlorids benötigt wird. Für die folgende Synthese wird die Base Hydroxylamin benötigt. Diese kann durch Zusatz stärkere Basen als Hydroxylamin selbst aus ihrer Salzform freigesetzt werden. Es gibt die Möglichkeit sie aus einer ethanolischen Kaliumhydroxidlösung, oder aus einer methanolischen Natriummethanolatlösung freizusetzen, welche durch Auflösen einer definierten Menge metallischen Natriums in Methanol hergestellt wird<sup>147</sup>.

### 2.8.1. Darstellung der Benzhydroxamsäuren durch Substitution aktivierter Carbonsäuren durch Hydroxylamin

Als erste Methode wurde die Azolid-Methode angewendet. Sie verläuft unter milden Bedingungen. Die Hydroxylaminquelle war zum einen Hydroxylaminhydrochlorid, welches *in situ* durch Triethylamin in die freie Base überführt wurde und zum anderen eine methanolische Hydroxylaminlösung. In beiden Fällen konnte kein nennenswerter Umsatz in die gewünschte Benzhydroxamsäure beobachtet werden. Der zu erwartende Benzoessäuremethylester als Nebenprodukt wurde allerdings nicht gefunden, was auf eine unzureichende Aktivierung der Carbonsäure schließen lässt.

Eine weitere Methode war die Aktivierung der Carbonsäure als Carbonsäurechlorid mit anschließender Umsetzung zur Hydroxamsäure durch Hydroxylaminhydrochlorid und Triethylamin als Hilfsbase. Triethylamin setzt bei dieser Reaktion das Hydroxylamin aus seinem Salz frei und dient zusätzlich dazu das bei der Substitution freiwerdende Hydrochlorid des Carbonsäurechlorids zu binden. Diese Reaktion erforderte einen höheren Materialaufwand und führte zu geringen Ausbeuten, sowie Nebenprodukten.

Als nächstes Verfahren wurde die Aminolyse der Benzoessäuremethylester getestet. Sie stellt eine ältere aber robuste Methode zur Darstellung von Hydroxamsäuren dar. Dazu wird Hydroxylaminhydrochlorid in einer methanolischen Natriummethanolatlösung gelöst. Es werden wenigstens zwei Äquivalente Natriummethanolat benötigt. Das erste Äquivalent dient zur Freisetzung des Hydroxylamins und das zweite Äquivalent deprotoniert das Hydroxylamin zum Hydroxylaminanion, welches ein noch stärkeres Nukleophil darstellt als Hydroxylamin selbst. Dieses Anion reagiert in einer nukleophilen Reaktion mit dem Carbonyl-Kohlenstoff des Carbonsäuremethylesters unter Abspaltung von Methanolat zu einer Hydroxamsäure. Bei dieser Methode konnte ebenfalls keine ausreichende Umsetzung zum gewünschten Produkt erreicht werden, aber mit dem Carbonsäuremethylester gab es nur ein Nebenprodukt (Abb.: 62). Da die Konvertierung der Benzoessäurederivate in ihre Benzhydroxamsäurederivate am Ende einer mehrstufigen Synthese steht, musste eine Möglichkeit zur Darstellung gefunden werden, bei der keine Nebenprodukte entstehen, beziehungsweise das Produkt leicht von seinen Nebenprodukten zu isolieren ist.

## 2. Synthetische Arbeiten

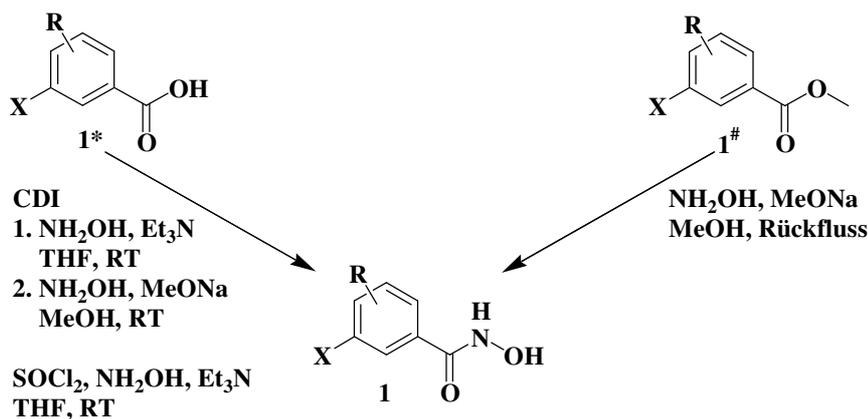


Abbildung 62: Methoden zur Darstellung substituierter Benzhydroxamsäuren.

Um die Ausbeute zu steigern wurden weitere Aktivierungsreagenzien auf die Reaktion angewendet. Diese wurden allerdings nicht an bereits synthetisierten Benzoesäurederivaten erprobt, sondern an reiner Benzoesäure. Diese ist günstig zu erwerben und erspart den Verlust bereits synthetisierter Zwischenverbindungen. Außerdem kann man so die unterschiedlichen Methoden besser miteinander vergleichen. Es wurde die Umsetzung des Carbonsäuremethylesters unter basischen Bedingungen (Abb.: 62), die Aktivierung der Carbonsäure mittels Cyanurchlorid<sup>148</sup> oder Tosylchlorid<sup>118</sup> und die Aktivierung als gemischtes Anhydrid mit Chloroethylformiat<sup>147</sup> miteinander verglichen. Die Substitution des Carbonsäuremethylesters lieferte unter den gewählten Bedingungen die gewünschte Benzhydroxamsäure, aber die Umsetzung verlief nicht vollständig. Da die Bedingungen recht drastisch sind und eine Spaltung der bereits geknüpften Amidbindung bei der späteren Umsetzung der 3-Amidobenzoensäuren ebenso mit sich führen könnte, wurde diese Methode verworfen. Die Umsetzung mittels Cyanurchlorid und Dimethylaminopyridin als Katalysator<sup>148</sup> ergaben ebenfalls die gewünschte Benzhydroxamsäure, allerdings auch eine große Anzahl an Nebenprodukten. Selbst nach verschiedenen Reinigungsversuchen konnte die Benzhydroxamsäure nicht vollständig von den anderen Reaktionsprodukten getrennt werden. Als weitere Möglichkeit zur Darstellung der Benzhydroxamsäure wurde eine lösungsmittelfreie Methode<sup>118</sup> getestet. Hierbei wird Hydroxylaminhydrochlorid in Wasser gelöst und anschließend an Kieselgel adsorbiert und getrocknet. Im Anschluss werden die einzelnen Edukte in einem Reagenzglas verrührt und so zur Reaktion gebracht. Das Aktivierungsmittel ist Tosylchlorid und Triethylamin stellt die Hilfsbase dar (Abb.: 63). Es konnte kein nennenswerter Umsatz zur Hydroxamsäure beobachtet werden.

## 2.8. Darstellung der Benzhydroxamsäuren

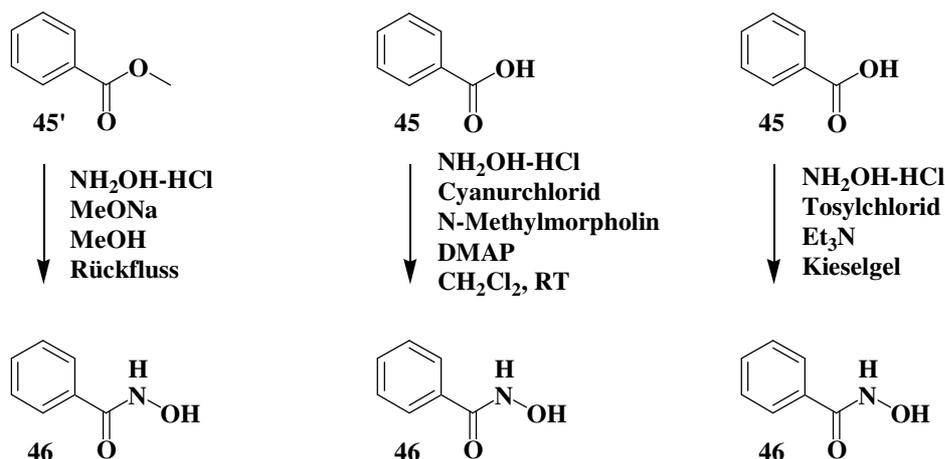


Abbildung 63: Methoden zur Darstellung von Benzhydroxamsäuren.

Die Aktivierung der Benzoesäure mittels Chloroethylformiat zum gemischten Anhydrid und anschließender Umsetzung zur Benzhydroxamsäure verläuft unter milden Bedingungen<sup>147</sup>. Als Hydroxylaminquelle diente eine frisch hergestellte methanolische Hydroxylaminlösung (Abb.: 64). Die Umsetzung verläuft quantitativ, als Nebenprodukte treten Benzoesäure, Dibenzoesäureanhydrid, Benzoesäuremethylester und Benzoesäureethylester auf. Diese Methode wurde auf einige Verbindungen angewendet. Es zeigte sich aber, dass die Anwesenheit freier, nicht umgesetzter Carbonsäure einen erheblichen Ausbeuteverlust an Hydroxamsäure bedeutet.

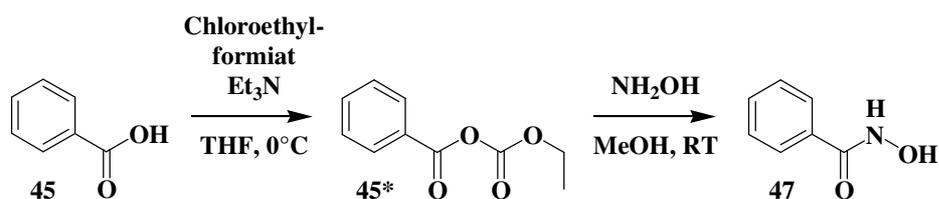


Abbildung 64: Darstellung der Benzhydroxamsäure mittels Chloroethylformiat.

Dabei ist nicht die Menge der freien Carbonsäure von Bedeutung. Die chemischen und physikalischen Eigenschaften der synthetisierten Benzhydroxamsäurederivate und deren Carbonsäurehomologe ähneln sich stark (Abb.: 65), was eine Reinigung mittels chromatographischer Methoden oder Umkristallisation nur unter erheblichen Verlusten zulässt.

## 2. Synthetische Arbeiten

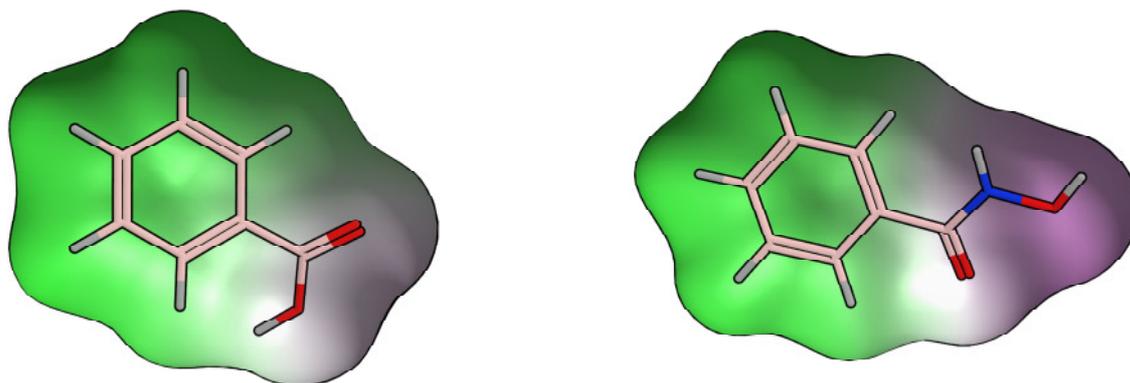


Abbildung 65: Vergleich der Lipophilie zwischen Benzoessäure (links) und Benzhydroxamsäure (rechts). lipophil (grün), hydrophil (pink), neutral (blau). (MOE)

Da bei der Reinigung des Reaktionsgemisches die freie Carbonsäure auftritt, sei es durch Hydrolyse von noch vorhandenem gemischtem Carbonsäureanhydrid oder wie im Fall der Benzoessäure durch Hydrolyse des Dibenzoesäureanhydrids, musste die Synthese weiterhin optimiert werden. Eine weitere Möglichkeit besteht im Wechsel zu einer alternativen Hydroxylaminquelle, anstelle das Aktivierungsreagenz auszutauschen. In der Literatur wird die Nutzung von *O*-substituierten Hydroxylaminen beschrieben<sup>120</sup>. Diese stellen Hydroxylaminverbindungen dar, bei denen die *OH*-Funktion durch Einführung einer typischen Alkoholschutzgruppe substituiert ist. Zwei Beispiele dafür sind *O*-Benzylhydroxylamin und *O*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-hydroxylamin. In dieser Arbeit wurde *O*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)hydroxylamin als alternative Hydroxylaminquelle auf seine Eignung für die Darstellung der verschiedenen Benzhydroxamsäuren untersucht. Die Einführung dieser Gruppe führt zu einer Zwischenverbindung (Abb.: 66), welche deutlich andere chemische Eigenschaften aufweist als die freie Carbonsäure und Hydroxamsäure. Sie ist deutlich lipophiler und kann durch chromatographische Methoden von der freien Carbonsäure abgetrennt werden. Da sie säurelabil ist und in saurer Umgebung sich leicht zu der entsprechenden Hydroxamsäure und 2-Dihydropyran zersetzt, wird die chromatographische Trennung unter basischen Bedingungen durchgeführt. Dies erleichtert zusätzlich die Trennung von der Carbonsäure.

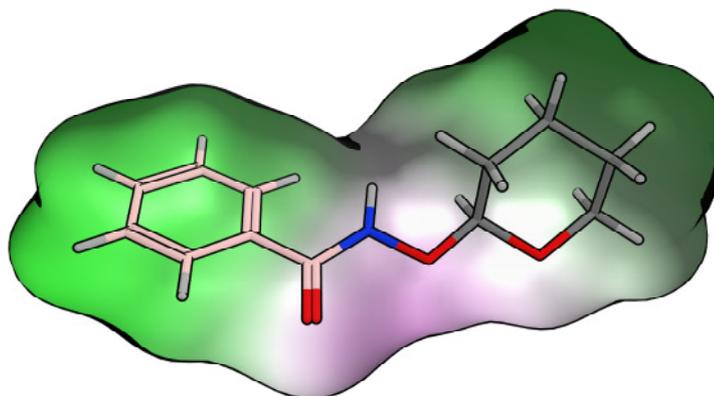


Abbildung 66: Darstellung der Lipophilie von Benz-[O-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)]hydroxamsäure. lipophil (grün), hydrophil (pink), neutral (blau). (MOE)

Im Folgenden wurde die schon beschriebene Methode unter Verwendung von Chloroethylformiat als Aktivierungsreagenz genutzt um die Zwischenstufe zu erhalten. Bei der Bildung des gemischten Carbonsäureanhydrids wird Salzsäure frei. Diese wird mittels Hilfsbase als Triethylammoniumchlorid gebunden, es reicht aber aus um bereits in gewissem Ausmaß die Tetrahydro-2H-pyran-2-ylgruppe abzuspalten. Da im Verlauf dieser Arbeit verschiedene Aktivierungsreagenzien respektive Peptidbildungsreagenzien untersucht wurden, fiel die Wahl auf PyBOP<sup>®</sup> (Abb.: 67). Die Synthese verläuft zügig, unter milden Bedingungen und hat einen geringen Materialaufwand.

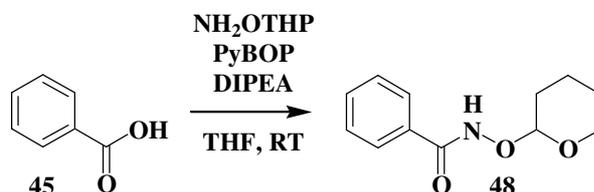


Abbildung 67: Darstellung der Benz-[O-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)]hydroxamsäure.

Die so gewonnene Zwischenstufe wird in einem letzten Syntheseschritt in das gewünschte Endprodukt überführt. Hierfür wird die Zwischenstufe lediglich in THF gelöst und mit einer katalytischen Menge *para*-Toluensulfonsäure oder Salzsäure versetzt und bei

## 2. Synthetische Arbeiten

Raumtemperatur rühren gelassen. Bei der Charakterisierung der Endverbindungen fiel bei der Überprüfung der Reinheit auf, dass bei der Methode mit *para*-Toluensulfonsäure diese nach der Reinigung immer noch nachweisbar war. Daraufhin wurde die Spaltungsmethode mit Salzsäure zum Standard, da diese in einem einfachen Waschschrift aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden kann (Abb.: 68).

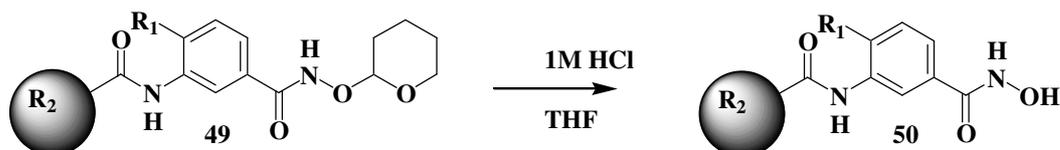


Abbildung 68: Darstellung der 3-Amidobenzhydroxamsäuren aus den 3-Amidobenz-[*O*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)]hydroxamsäuren.

Bei dieser Reaktion ist zu beachten, dass man nicht zu stark ansäuert, da sonst 5-Hydroxypentanal entsteht<sup>149</sup>, welches Nebenreaktionen verursachen kann oder es entsteht ein *O*-Pentanal-Benzhydroxamsäureesterderivat. Unter den im Verlauf dieser Arbeit dargestellten Verbindungen befinden sich die substituierten 3-Aminobenzoesäurederivate mit einer *tert*-Butyloxycarbonylgruppe am anilinischem Stickstoff. Diese wird ebenfalls gespalten um die einfach substituierten 3-*N*-(Cyclohexyl)-aminobenzhydroxamsäuren und 3-*N*-(Benzyl)-aminobenzhydroxamsäuren zu erhalten. Die *tert*-Butyloxycarbonylgruppe ist ebenfalls wie die Tetrahydro-2*H*-pyran-2-ylgruppe basenstabil und säurelabil<sup>110,150</sup>, benötigt aber drastischere Bedingungen zur Abspaltung. Hierfür wird konzentrierte Trifluoressigsäure in Dichlormethan verwendet (Abb.: 69).

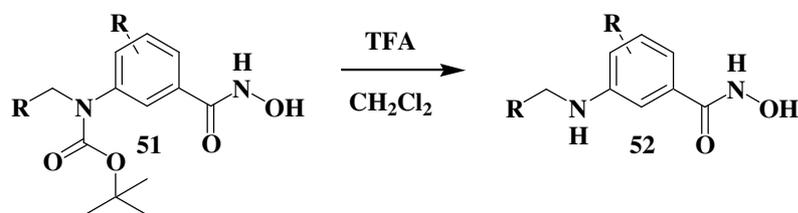


Abbildung 69: Darstellung der 3-Aminobenzhydroxamsäurederivate.

## 2.9. Übersicht der dargestellten Benzhydroxamsäuren

Abschließend zu den synthetischen Arbeiten kann zusammengefasst werden, dass eine geeignete Methode zur Darstellung der 3-Aminobenzoesäuren mittels reduktiver Aminierung unter Verwendung von Triacetoxyborhydrid gefunden wurde. Ebenso konnte eine wirtschaftliche und robuste Methode zur Darstellung der 3-Amidobenzoesäuren mittels Thionylchlorid ermittelt werden und die Darstellung der Benzhydroxamsäuren aus den jeweiligen Carbonsäuren unter Nutzung einer Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl-Zwischenstufe etabliert werden.

## 2.9. Übersicht der dargestellten Benzhydroxamsäuren

### 2.9.1. Übersicht der 3-Aminobenzhydroxamsäuren

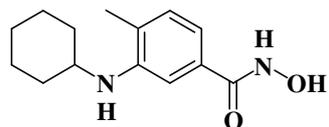
Diese Übersicht beinhaltet die in dieser Arbeit dargestellten 3-Aminobenzhydroxamsäure-derivate sowie einige ihrer 3-*N-tert*-Butyloxycarbonylvorstufen.

Tabelle 4: Übersicht der 3-Aminobenzhydroxamsäuren

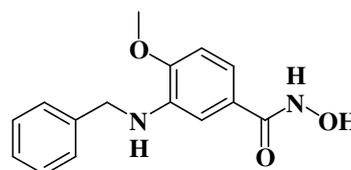
Verb.	Strukturformel	Verb.	Strukturformel
<b>52a</b> (TH32)		<b>51b</b> (TH35boc)	
<b>51a</b> (TH32boc)		<b>52d</b> (TH34)	
<b>52b</b> (TH28)		<b>51c</b> (TH34boc)	
<b>53</b> (TH40)		<b>54</b> (TH44)	

## 2. Synthetische Arbeiten

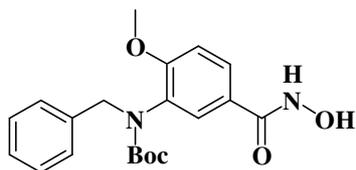
**52c**  
(TH35)



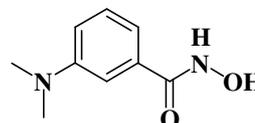
**52e**  
(TH42)



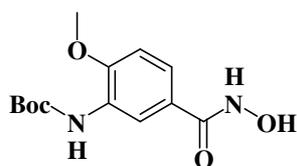
**51d**  
(TH42boc)



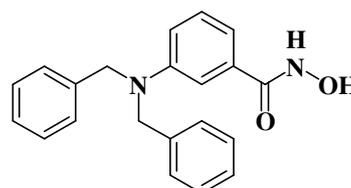
**56**  
(TH36)



**55**  
(TH41)



**57**  
(TH72)

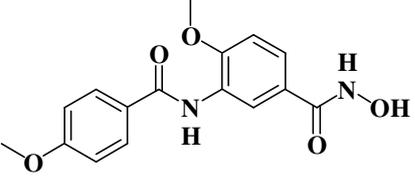
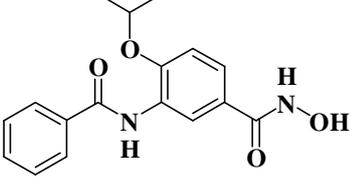
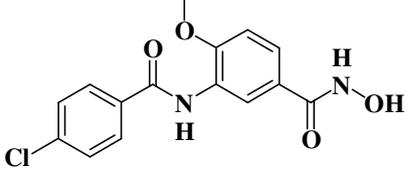
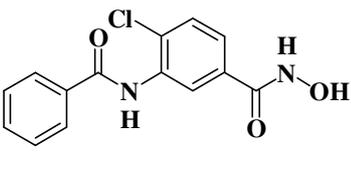
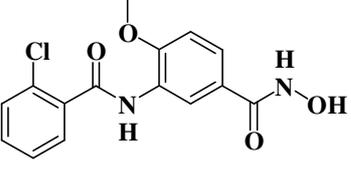
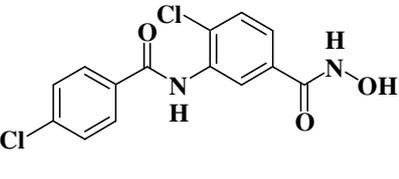
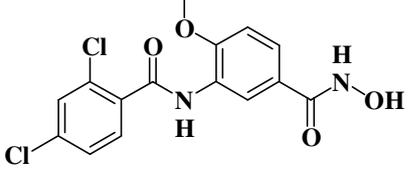
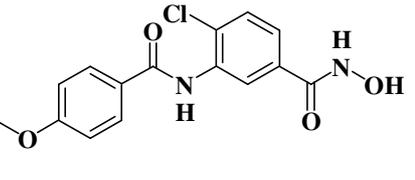
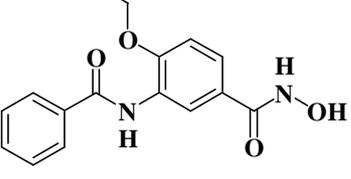
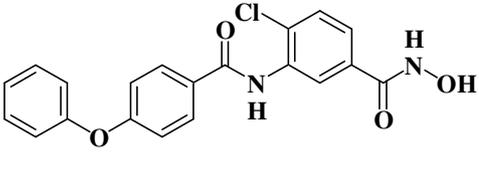
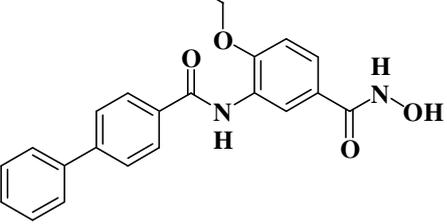
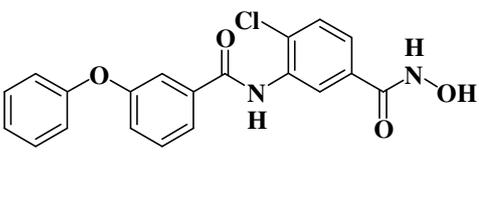
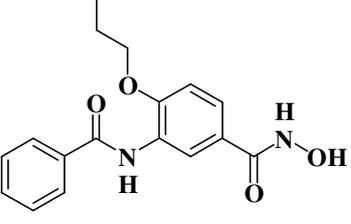
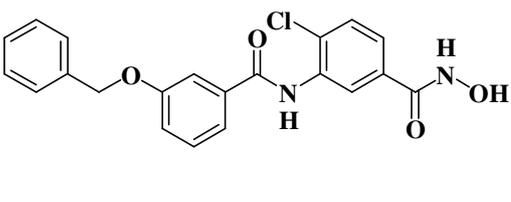


### 2.9.2. Übersicht der 3-Amidobenzhydroxamsäuren

Tabelle 5: Übersicht der 3-Amidobenzhydroxamsäuren

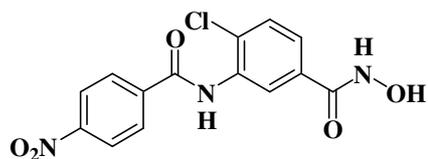
Verb.	Strukturformel	Verb.	Strukturformel
<b>50a</b> (TH31)		<b>50d</b> (TH39)	
<b>50b</b> (TH33)		<b>50e</b> (TH65)	
<b>50c</b> (TH60)		<b>50f</b> (TH95)	

2.9. Übersicht der dargestellten Benzhydroxamsäuren

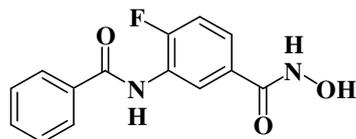
Verb.	Strukturformel	Verb.	Strukturformel
<b>50g</b> (TH69)		<b>50n</b> (TH83)	
<b>50h</b> (TH68)		<b>50o</b> (TH61)	
<b>50i</b> (TH85)		<b>50p</b> (TH93)	
<b>50j</b> (TH86)		<b>50q</b> (TH74)	
<b>50k</b> (TH66)		<b>50r</b> (TH81)	
<b>50l</b> (TH92)		<b>50s</b> (TH78)	
<b>50m</b> (TH67)		<b>50t</b> (TH77)	

## 2. Synthetische Arbeiten

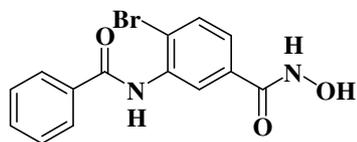
**50u**  
(TH96)



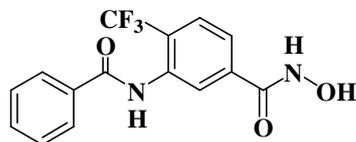
**50w**  
(TH76)



**50v**  
(TH75)



**50x**  
(TH94)



### 2.8.3. Übersicht diverser Hydroxamsäuren

Diese Übersicht beinhaltet eine Reihe diverser Hydroxamsäuren, die nicht einer der beiden zuvor genannten Gruppen zugeordnet werden können. Sie unterscheiden sich in ihrem Grundgerüst oder in ihrer Verknüpfung zwischen den beiden aromatischen Ringsystemen.

Tabelle 6: Übersicht diverser Hydroxamsäuren

Verb.	Strukturformel	Verb.	Strukturformel
<b>58</b> (TH23)		<b>61</b> (TH57)	
<b>59</b> (TH45)		<b>62</b> (TH70)	
<b>60</b> (TH58)		<b>63</b> (TH71)	
<b>64</b> (TH97)		<b>65</b> (TH98)	

3.1. Biochemische Charakterisierung der inhibitorischen Aktivität der dargestellten Verbindungen gegenüber der schistosomalen HDAC8

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1. Biochemische Charakterisierung der inhibitorischen Aktivität der dargestellten Verbindungen gegenüber der schistosomalen HDAC8

Die hier angegebenen Werte wurden in der Arbeitsgruppe von MANFRED JUNG an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg ermittelt und zur Verfügung gestellt. Für die Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehungen werden die  $EC_{50}$ -Werte der in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen angegeben. Die Messung der Histondesacetylaseaktivität wurde mittels eines kommerziell erhältlichen HDAC8 Fluorimetric Drug Discovery Kit (Fluor de Lys<sup>®</sup> R-HDAC8, BML-KI178) durchgeführt.

##### 3.1.1. Inhibitoren aus der Substanzklasse der 3-Aminobenzhydroxamsäuren

Als erste Substanzklasse wurden die 3-Aminobenzhydroxamsäuren und deren Derivate hinsichtlich ihrer Struktur-Wirkungsbeziehung untersucht. Eine Bewertung ihrer chemischen Stabilität und Eignung als Arzneistoff wird hier nicht betrachtet, folgend aber in Kapitel 3.2. diskutiert. Ausgehend von **T5979345** ( $EC_{50}$ ,  $1.48 \pm 0.46 \mu\text{M}$ ) (Abb.: 70) wird die gemessene *in vitro*-Aktivität der Substanzen in  $EC_{50}$ -Werten angegeben und miteinander verglichen.

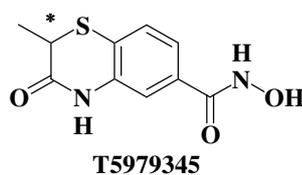
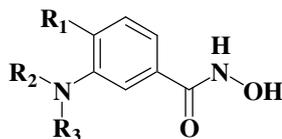


Abbildung 70: T5979345 mit  $EC_{50}$ -Werten für SmHDAC8 (Fluor de Lys<sup>®</sup>).

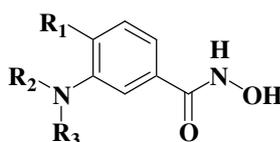
### 3. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 7: EC<sub>50</sub>-Werte für die Inhibition der SmHDAC8 durch die 3-Aminobenzoesäuren und deren Derivate



Verbindung	Rest 1	Rest 2	Rest 3	EC <sub>50</sub> [μM] SmHDAC8 Fluor de Lys <sup>®</sup>
52a	H		H	3,63 ± 0,62
51a	H		Boc	4,01 ± 0,62
52b	H		H	1,08 ± 0,25
53	H	-H-	Boc	0,22 ± 0,09
52c	Methyl		H	0,60 ± 0,20
51b	Methyl		Boc	0,66 ± 0, 8
52d	Methyl		H	1,29 ± 1,33
51c	Methyl		Boc	16,04 ± 9,26
54	Methyl	-H-	Boc	0,13 ± 0,01
52f	Methoxy		H	0,62 ± 0,12
51d	Methoxy		Boc	2,09 ± 0,17

3.1. Biochemische Charakterisierung der inhibitorischen Aktivität der dargestellten Verbindungen gegenüber der schistosomalen HDAC8



Verbindung	Rest 1	Rest 2	Rest 3	EC <sub>50</sub> [μM] SmHDAC8 Fluor de Lys®
55	Methoxy	H	Boc	0,14 ± 0,04
56	H	Methyl	Methyl	1,43 ± 0,55
57	H			9,29 ± 1,50

Die 3-Aminobenzhydroxamsäuren mit einem Cyclohexylrest an der Aminfunktion (**52a** und **51a**) zeigen eine Aktivität im unteren mikromolaren Bereich, wobei das Boc-geschützte Derivat geringer wirksam ist. Beide Verbindungen sind weniger aktiv gegenüber der SmHDAC8 als **T5979345**. Der Austausch des Cyclohexylrestes gegen einen Benzylrest bei Verbindung **52b** führte zu einer Aktivitätssteigerung gegenüber **T5979345**, ebenso konnte die Einführung einer einzelnen *tert*-Butyloxycarbonylgruppe in das Molekül die Aktivität fast um den Faktor sieben steigern. Die Einführung einer Methylgruppe in Position 4 der 3-Aminobenzhydroxamsäure führte für die Derivate mit Cyclohexylrest an der Aminogruppe zu einer Aktivitätssteigerung gegenüber SmHDAC8. Dabei ist Verbindung **52c** mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von 0,60 ± 0,20 μM ebenfalls stärker wirksam als sein Boc-geschütztes Derivat **51b** (0,66 ± 0,80 μM), wie dies schon bei Verbindung **52a** in Bezug zu **51a** beobachtet werden konnte. Der Austausch der Cyclohexylstruktur gegen einen Benzylrest bedeutet einen Verlust der inhibitorischen Aktivität gegenüber SmHDAC8 um die Hälfte (**52d**). Das Boc-geschützte Derivat (**52e**) ist sogar um Faktor 20 schlechter wirksam als die entsprechenden Cyclohexylderivate. Das 3-Amino-4-methylbenzhydroxamsäurederivat mit einer *tert*-Butyloxycarbonylgruppe (**54**) ist der potenteste Vertreter der 3-Aminobenzoessäuren mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von 0,13 ± 0,01 μM. Die Verbindungen **52f** und **51c** sind *N*-benzylsubstituierte 3-Amino-4-methoxybenzhydroxamsäuren. Durch die Einführung der Methoxygruppe konnte eine Aktivitätssteigerung gegenüber ihrer 4-Methylderivate erreicht

### 3. Ergebnisse und Diskussion

werden. Verbindung **52f** weist eine um Faktor zwei erhöhte inhibitorische Aktivität gegenüber SmHDAC8 auf, als Verbindung **52d**. Dies trifft ebenso im Vergleich der Boc-Derivate **51c** ( $EC_{50}$ ,  $16,04 \pm 9,26 \mu\text{M}$ ) und **51d** ( $EC_{50}$ ,  $2,09 \pm 0,17 \mu\text{M}$ ) zu. Das 3-Amino-4-methoxybenzhydroxamsäurederivat mit einer *tert*-Butyloxycarbonylgruppe (**55**) ist mit einem  $EC_{50}$ -Wert von  $0,14 \pm 0,04 \mu\text{M}$  nahezu identisch in seiner Aktivität wie Verbindung **54**. Verbindung **56** führt mit seiner *N,N*-Dimethylaminfunktion zu keiner Aktivitätssteigerung im Vergleich zu **T5979345** und das Derivat mit der *N,N*-Dibenzylaminfunktion im Molekül für zu einem deutlichen Abfall der inhibitorischen Aktivität gegenüber SmHDAC8.

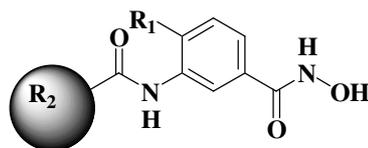
#### 3.1.2. Inhibitoren aus der Substanzklasse der 3-Amidobenzhydroxamsäuren

Tabelle 8:  $EC_{50}$ -Werte für die Inhibition der SmHDAC8 durch die 3-Amidobenzoensäuren



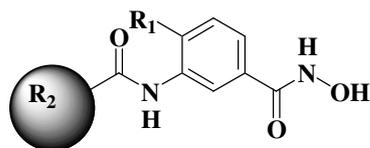
Verbindung	Rest 1	R <sub>2</sub>	$EC_{50}$ [nM] SmHDAC8 Fluor de Lys <sup>®</sup>
<b>50a</b>	H		$468,2 \pm 79,0$
<b>50b</b>	Methyl		$154,4 \pm 26,0$
<b>50c</b>	Methyl		$96,1 \pm 13,7$
<b>50d</b>	Methoxy		$135,6 \pm 25,0$
<b>50e</b>	Methoxy		$75,4 \pm 25,5$

3.1. Biochemische Charakterisierung der inhibitorischen Aktivität der dargestellten Verbindungen gegenüber der schistosomalen HDAC8



Verbindung	Rest 1	R <sub>2</sub>	EC <sub>50</sub> [nM] SmHDAC8 Fluor de Lys <sup>®</sup>
50f	Methoxy		289.7 ± 20,0
50g	Methoxy		106,0 ± 17,5
50h	Methoxy		146.0 ± 4.3
50i	Methoxy		699.3 ± 27.4
50j	Methoxy		121.6 ± 18.7
50k	Ethoxy		129,3 ± 7,6
50l	Ethoxy		92,0 ± 26,0
50m	Propoxy		266.9 ± 49.5
50n	Isopropoxy		220.1 ± 56.2

### 3. Ergebnisse und Diskussion



Verbindung	Rest 1	R <sub>2</sub>	EC <sub>50</sub> [nM] SmHDAC8 Fluor de Lys <sup>®</sup>
50o	Chlor		67,0 ± 10.2
50p	Chlor		234,8 ± 10.3
50q	Chlor		147.1 ± 4.8
50r	Chlor		979,1 ± 1100,0
50s	Chlor		396.4 ± 43.3
50t	Chlor		378.1 ± 44.9
50u	Chlor		393.6 ± 50.5
50v	Brom		150.4 ± 8.5
50w	Fluor		177.6 ± 8.1
50x	Trifluormethyl		139.6 ± 8.3

### 3.1. Biochemische Charakterisierung der inhibitorischen Aktivität der dargestellten Verbindungen gegenüber der schistosomalen HDAC8

Vergleicht man die verschiedenen 3-Benzamidobenzhydroxamsäure, welche sich nur in Position 4 der Benzhydroxamsäure ( $R_1$ ) unterscheiden, besitzt **50a** als unsubstituiertes Derivat die niedrigste inhibitorische Aktivität gegenüber SmHDAC8. Mit der Einführung größerer Substituenten kann die Aktivität gesteigert werden. So nimmt die Aktivität über Verbindung **50b** (Methylsubstituent), **50d** (Methoxysubstituent) bis hin zum Ethoxyderivat **50k** kontinuierlich zu, wobei der Unterschied von **50d** zu **50k** nur marginal ist. Voluminösere Alkoxysubstituenten wie in Verbindung **50m** und **50n** können die Aktivität nicht weiter steigern sondern führen sogar zu einer verringerten inhibitorischen Aktivität gegenüber der SmHDAC8.

Die Einführung von Halogenatomen in Position 4 bewirkt ebenfalls eine gesteigerte Aktivität im Vergleich zum unsubstituierten Derivat (**50a**). So weist Verbindung **50o** die höchste Aktivität mit einem  $EC_{50}$ -Wert von  $67,0 \pm 10,2$  nM auf. Die Verbindungen (**50v** – **50x**) mit Brom, Fluor und Trifluormethylsubstituenten waren den Verbindungen (**50b** und **50d**) mit Methyl- und Methoxysubstituenten gleichwertig. Vergleicht man **50b** mit **50c**, so führt der Austausch eines Phenylrestes gegen einen Chinaldinrest ( $R_2$ ) zu einer gesteigerten Aktivität gegenüber dem Enzym. Ein 4-Biphenylrest an dieser Position konnte die Aktivität ebenfalls steigern (**50e**), wobei ein 3-Biphenylrest (**50f**) führt dagegen zu einem Verlust um Faktor 4 im Vergleich zu **50e**. Ein 4-Biphenylrest ( $R_2$ ) in Kombination mit einem Ethoxysubstituenten ( $R_1$ ) an der Benzhydroxamsäure (**50l**) hat eine ähnliche Aktivität wie **50e**.

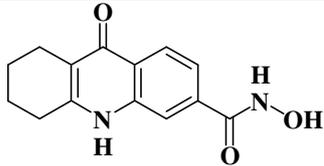
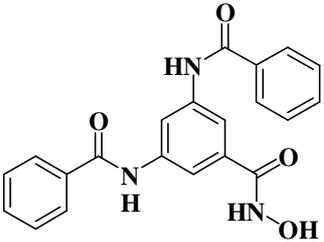
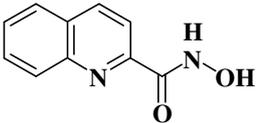
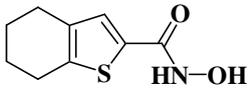
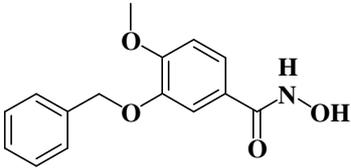
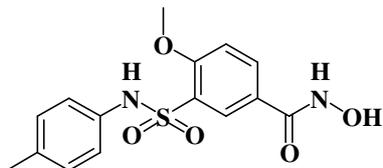
Verbindungen mit größeren aromatischen Resten (**50r**- **50t**) wie Phenoxy- und Benzyloxy- oder Aromaten mit Substituenten mit –M-Effekt (**50u**) führen zu schlechteren  $EC_{50}$ -Werten im Vergleich zu Verbindung **50e** und **50l**. Kleine Substituenten am zweiten aromatischen Ring ( $R_2$ ) führen zu  $EC_{50}$ -Werten zwischen 100 und 150 nM, wobei hier die Position der Substitution entscheidend ist. Ein *para*-Methoxygruppe führt bei Verbindung **50g** zu einer gesteigerten Aktivität gegenüber SmHDAC8 im Vergleich zu **50d**, vergleicht man **50g** mit Verbindung **50p** und **50q** so wurde durch diese Substitution die Aktivität erniedrigt. Desweiteren erkennt man eine marginale Verschlechterung der Aktivität bei **50h** (*para*-chlorsubstituiert), eine drastische Verschlechterung um Faktor bei **50i** (*ortho*-chlorsubstituiert) und eine leichte Aktivitätssteigerung bei Verbindung **50j** (2,4-dichlorsubstituiert), in Bezug zur Inhibition mit Verbindung **50d**.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

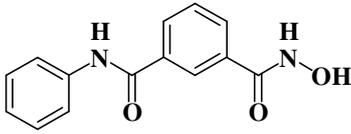
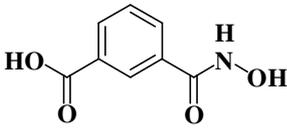
#### 3.1.3. Inhibitoren verschiedener Grundkörper

In diesen Absatz werden verschiedene Hydroxamsäuren mit unterschiedlichen Grundkörpern welche nicht direkt zu einer der oben beschriebenen Substanzklassen zugeordnet werden können, hinsichtlich ihrer biochemischen Wirksamkeit untersucht. Sie unterscheiden sich in ihren Grundkörper, in ihren Substitutionsstellen sowie chemisch in der Art der Verknüpfung der beiden aromatischen Systeme.

Tabelle 9: EC<sub>50</sub>-Werte für die Inhibition der SmHDAC8 durch Hydroxamsäuren mit verschiedenen Grundkörper

Verbindung	Strukturformel	EC <sub>50</sub> [μM] SmHDAC8 Fluor de Lys <sup>®</sup>
58		3,22 ± 0,64
59		7,73 ± 3,84
60		8,21 ± 1,30
61		10,09 ± 2,35
62		0,27 ± 0,02
63		0,49 ± 0,16

3.1. Biochemische Charakterisierung der inhibitorischen Aktivität der dargestellten Verbindungen gegenüber der schistosomalen HDAC8

Verbindung	Strukturformel	EC <sub>50</sub> [ $\mu$ M] SmHDAC8 Fluor de Lys <sup>®</sup>
64		0,22 ± 0,01
65		1.59 ± 0.19

Betrachtet man die Verbindungen (**58 - 61, 65**) mit den Vertretern der 3-Aminobenzhydroxamsäuren und der 3-Amidobenzhydroxamsäuren, so fällt auf, dass diese immer noch potent die SmHDAC8 inhibieren, aber keine Verbesserung zu **T5979345** darstellen. Verbindung **62** als Derivat von **50d** besitzt mit Einführung der Methylenoxystruktur anstelle der Amidstruktur eine um die Hälfte niedrigere Aktivität. Ebenso ist bei Verbindung **63** mit der Sulfonamidstruktur eine Abnahme der Aktivität gegenüber der SmHDAC8 im Vergleich zu **50d** zu beobachten. Verbindung **64** stellt ein Derivat von **50a** dar und führt mit der Inversion der Amidstruktur zwischen den beiden aromatischen Ringen zu einer gesteigerten inhibitorischen Aktivität. Verbindung **65** führte zu keiner Verbesserung im Vergleich zu **T5979345**.

### 3.2. Biochemische Charakterisierung der inhibitorischen Aktivität der dargestellten Verbindungen gegenüber den humanen Histondesacetylasen 1, 6 und 8

#### 3.2.1. Fluor de Lys<sup>®</sup> und ZMAL im Vergleich<sup>151</sup>

Beide hier besprochene Testsysteme leiten sich nach den Testsystemen von WEGENER et al. für die Klasse I- und II-HDACs ab<sup>152</sup>. In einem ersten Reaktionsschritt wird das Lysinsubstrat, welches ein Chromophor/Fluorophor trägt (Abb.: 71; gelb dargestellt), von den Histondesacetylasen zu einem desacetylierten Metabolit umgesetzt. In einem zweiten Reaktionsschritt wird der entstandene Metabolit mit der Endopeptidase Trypsin zum Lysinderivat und dem Chromophor bzw. Fluorophor gespalten, welches andere spektroskopische Eigenschaften (Abb.: 71; orange dargestellt) besitzt als das ursprüngliche Substrat. Die verbleibende Menge an acetyliertem Substrat wird von der Endopeptidase nicht gespalten (Abb.: 71).

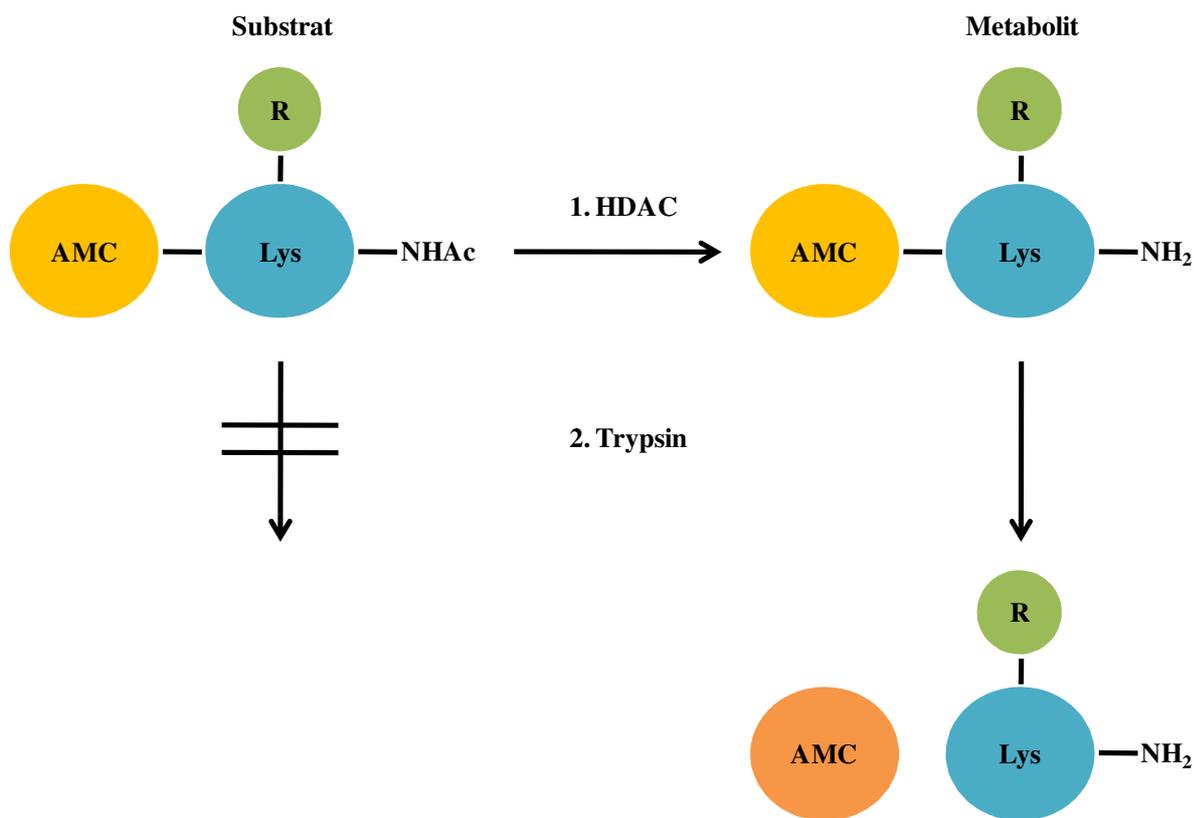


Abbildung 71: Allgemeines Reaktionsschema für den HDAC-Assay. (modifiziert nach TRAPP)<sup>151</sup>

### 3.2. Biochemische Charakterisierung der inhibitorischen Aktivität der dar-gestellten Verbindungen gegenüber den humanen Histondesacetylasen 1, 6 und 8

In vorangegangenen Arbeiten wurden verschiedene Testsysteme entwickelt und hinsichtlich ihrer Eignung zur Messung der Aktivität bestimmter Substanzen auf die Histondesacetylasen untersucht<sup>153,151</sup>. Bei dem Fluor de Lys<sup>®</sup> Assay handelt es sich um ein Testsystem, bei dem das komplette Substrat nicht vollständig bekannt ist. Es besteht zumindest aus einer aliphatischen Seitenkette mit einer acetylierten endständigen Aminogruppe. Ebenfalls im Molekül befindet sich ein Fluorophor, welches sich nach Abspaltung durch Trypsin in seiner Fluoreszenz unterscheidet und somit bestimmt werden kann. ZMAL ((*S*)-[5-Acetylamino-1-(4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-7-ylcarbamoyl)-pentyl]-carbaminsäurebenzylester) stellt ebenfalls ein acetyliertes Substrat dar und soll wie bei Fluor de Lys<sup>®</sup> die acetylierte Seitenkette von Lysin imitieren, welche Substrat der Histondesacetylasen ist.

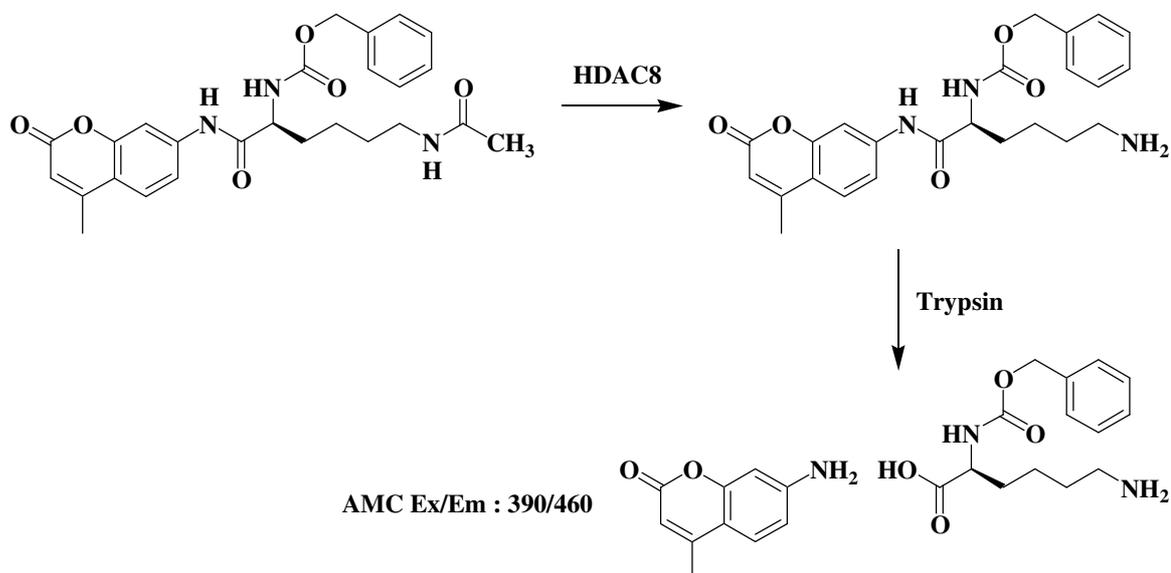


Abbildung 72: Reaktionsschema für den HDAC-Assay mit ZMAL.

Allerdings zeigte sich, dass der Subtyp HDAC8 nur sehr schlecht auf dieses Substrat anspricht und deshalb keine reproduzierbaren Ergebnisse erhalten werden konnten<sup>106,107,154</sup>. Fluor de Lys<sup>®</sup> hingegen ist als Substrat sehr gut geeignet um die inhibitorische Aktivität von verschiedenen Liganden zu messen. Um vergleichbare Ergebnisse unter den Substanzen zu erzielen, wird dieser Test nur auf die schistosomale und humane HDAC8 angewendet, da die Anschaffung des Assay-Kits sehr preisintensiv ist. Für die humanen Isoformen der Histondesacetylasen Subtyp 1 und 6 wurde der günstigere ZMAL Assay benutzt und dient als Orientierung und dem Vergleich der Substanzen untereinander hinsichtlich ihrer

### 3. Ergebnisse und Diskussion

inhibitorischen Aktivität. Die beiden Testsysteme können und werden nicht direkt miteinander verglichen, finden aber beide Eingang in die Bewertung der einzelnen Substanzen. Ein weiteres Substrat, auf welches hier aber nicht weiter eingegangen werden soll ist ZMTFAL ((*S*)-[1-(4-Methyl-2-oxo-2*H*-chromen-7-ylcarbamoyl)-5-trifluoracetyl-amino-pentyl]-carbaminsäurebenzylester). ZMTFAL wird sowohl von der schistosomalen und humanen HDAC8 erkannt und umgesetzt und stellt ein Derivat von ZMAL dar (Abb.: 73), welchen anstelle einer Acetylgruppe eine Trifluoracetylgruppe trägt. Die mit diesem Substrat erhaltenen EC<sub>50</sub>-Werte (siehe Anhang) für SmHDAC8 und HmHDAC8 waren nicht reproduzierbar.

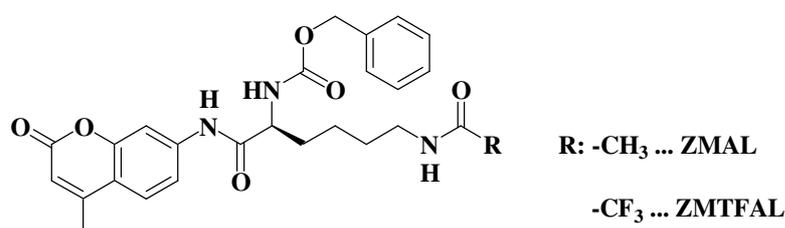
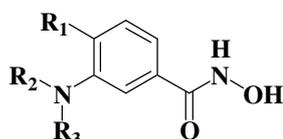


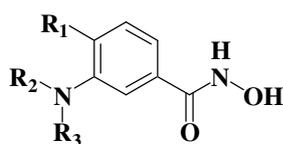
Abbildung 73: Strukturformel von ZMAL und ZMTFAL.

Tabelle 10: EC<sub>50</sub>-Werte der 3-Aminobenzhydroxamsäurederivate auf die HmHDAC1,6(ZMAL),8(Fluor de Lys<sup>®</sup>)



Verb.	Rest 1	Rest 2	Rest 3	EC <sub>50</sub> [μM]	EC <sub>50</sub> [μM]	EC <sub>50</sub> [μM]
				HmHDAC8 Fluor de Lys <sup>®</sup>	HmHDAC1 ZMAL	HmHDAC6 ZMAL
52a	H	Cyclohexyl	H	0,83 ± 0,04	129,59 ± 18,47	n.b.
51a	H	Cyclohexyl	Boc	1,95 ± 0,52	n.b.	n.b.
52b	H	Benzyl	H	0,14 ± 0,01	41,4% @ 10μM	n.b.
53	H	H	Boc	0,01 ± 0,01	n.b.	n.b.
52c	Methyl	Cyclohexyl	H	0,10 ± 0,01	49,5% @ 10μM	n.b.

3.2. Biochemische Charakterisierung der inhibitorischen Aktivität der dar-gestellten Verbindungen gegenüber den humanen Histondesacetylasen 1, 6 und 8

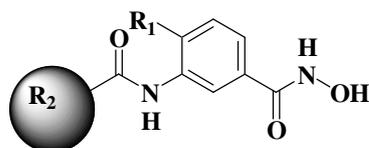


Verb.	Rest 1	Rest 2	Rest 3	EC <sub>50</sub> [μM]	EC <sub>50</sub> [μM]	EC <sub>50</sub> [μM]
				HmHDAC8 Fluor de Lys <sup>®</sup>	HmHDAC1 ZMAL	HmHDAC6 ZMAL
<b>51b</b>	Methyl	Cyclohexyl	Boc	0,07 ± 0,01	n.b.	n.b.
<b>52d</b>	Methyl	Benzyl	H	0,02 ± 0,01	16,3% @ 5μM	35,1% @ 5μM
<b>51c</b>	Methyl	Benzyl	Boc	0,08 ± 0,01	n.b.	n.b.
<b>54</b>	Methyl	H	Boc	0,03 ± 0,01	n.b.	n.b.
<b>52f</b>	Methoxy	Benzyl	H	0,03 ± 0,01	49,3% @ 10μM	n.b.
<b>51d</b>	Methoxy	Benzyl	Boc	0,04 ± 0,01	n.b.	n.b.
<b>55</b>	Methoxy	H	Boc	0,03 ± 0,01	n.b.	n.b.
<b>56</b>	H	Methyl	Methyl	0,07 ± 0,01	n.b.	n.b.
<b>57</b>	H	Benzyl	Benzyl	2,19 ± 0,42	42,27 ± 3,82	8,59 ± 1,94

Vergleicht man die Verbindungen mit einer *N*-Benzylaminogruppe (**52b**, **52d** und **52f**) so sind diese stärker aktiv gegenüber der humanen HDAC8 als ihre Derivate mit einer *N*-Cyclohexylsubstitution (**52a** und **52c**). Die Einführung einer Boc-Schutzgruppe in diese Verbindungen führt im Allgemeinen zu einer niedrigeren Aktivität, wobei die einfach *tert*-Butyloxycarbonyl-substituierten Derivate (**53**, **54**, **55**) EC<sub>50</sub>-Werte im Bereich der Verbindungen **52b**, **52d** und **52f** aufweisen. Verbindung **56** ist mit seinen inhibitorischen Eigenschaften auf die HmHDAC8 vergleichbar mit **51b** und **51c**. Ersetzt man die Dimethylaminogruppe von Verbindung **56** durch eine Dibenzylaminogruppe wie bei Verbindung **57**, so führt dies zu einem deutlichen Aktivitätsverlust. Auch die Isoenzyme HmHDAC1 und HmHDAC6 werden nur im mikromolaren Bereich inhibiert, wobei die HmHDAC6 um Faktor 5 stärker als HmHDAC1 inhibiert wird.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 11: EC<sub>50</sub>-Werte der 3-Amidobenzhydroxamsäurederivate auf die HmHDAC1,6(ZMAL),8(Fluor de Lys®)



Verb.	Rest 1	Rest 2	EC <sub>50</sub> [μM]	EC <sub>50</sub> [μM]	EC <sub>50</sub> [μM]
			HmHDAC8 Fluor de Lys®	HmHDAC1 ZMAL	HmHDAC6 ZMAL
50a	H	Benzyl	0,58 ± 0,05	31,80 ± 13,30	3,00 ± 0,30
50b	Methyl	Benzyl	0,20 ± 0,02	8,35 ± 2,02	0,90 ± 0,39
50c	Methyl	Chinaldin	0,03 ± 0,01	2,68 ± 0,84	0,09 ± 0,01
50d	Methoxy	Benzyl	0,09 ± 0,02	2,32 ± 1,24	2,47 ± 1,06
50e	Methoxy	4-Biphenyl	0,03 ± 0,02	6,34 ± 2,10	0,39 ± 0,01
50f	Methoxy	3-Biphenyl	n.b.	n.b.	n.b.
50g	Methoxy	4-Methoxyphenyl	0,08 ± 0,01	2,59 ± 0,18	0,40 ± 0,06
50h	Methoxy	4-Chlorphenyl	0,24 ± 0,10	2,85 ± 0,30	0,88 ± 0,10
50i	Methoxy	2-Chlorphenyl	n.b.	9,64 ± 1,04	3,10 ± 0,65
50j	Methoxy	2,4-Dichlorphenyl	0,55 ± 0,09	13,02 ± 1,90	2,29 ± 0,35
50k	Ethoxy	Benzyl	0,17 ± 0,02	4,56 ± 0,30	1,30 ± 0,10
50l	Ethoxy	4-Biphenyl	0,15 ± 0,02	2,08 ± 0,14	0,61 ± 0,08
50m	Propoxy	Benzyl	n.b.	n.b.	n.b.
50n	Isopropoxy	Benzyl	0,03 ± 0,01	3,59 ± 0,33	2,59 ± 0,39
50o	Chlor	Benzyl	0,12 ± 0,04	11,55 ± 3,90	0,12 ± 0,02
50p	Chlor	4-Chlorbenzyl	0,29 ± 0,05	3,48 ± 0,19	0,08 ± 0,05
50q	Chlor	4-Methoxyphenyl	0,24 ± 0,05	4,08 ± 0,90	0,12 ± 0,01
50r	Chlor	4-Phenoxyphenyl	1,08 ± 0,30	8,05 ± 2,10	0,15 ± 0,01
50s	Chlor	3-Phenoxyphenyl	0,45 ± 0,10	6,42 ± 0,70	0,31 ± 0,07
50t	Chlor	3-Benzylloxyphenyl	0,21 ± 0,03	9,41 ± 2,80	1,51 ± 0,10
50u	Chlor	4-Nitrophenyl	n.b.	n.b.	n.b.
50v	Brom	Benzyl	0,19 ± 0,03	7,43 ± 0,80	0,15 ± 0,01
50w	Fluor	Benzyl	0,32 ± 0,05	22,25 ± 7,70	0,50 ± 7,70
50x	Trifluormethyl	Benzyl	0,34 ± 0,08	2,44 ± 0,10	0,14 ± 0,02

### 3.2. Biochemische Charakterisierung der inhibitorischen Aktivität der dar-gestellten Verbindungen gegenüber den humanen Histondesacetylasen 1, 6 und 8

Wie zuvor bei den 3-Aminobenzhydroxamsäuren wird auch hier nur ein kurzer Überblick über die biochemischen Eigenschaften der 3-Amidobenzhydroxamsäuren gegeben. Alle dargestellten Verbindungen weisen eine inhibitorische Aktivität gegenüber HmHDAC8 im nanomolaren Bereich auf. Die unsubstituierte Phenylamidobenzhydroxamsäure (**50a**) besitzt einen EC<sub>50</sub>-Wert von 582 ± 48 nM und zählt somit zu den Verbindungen mit der schlechtesten inhibitorischen Eigenschaft in dieser Gruppe, zusammen mit den Verbindungen (**50j**, **50r** – **50t**), die größere aromatische Reste tragen (**R**<sub>2</sub>), und die fluorierten Verbindungen **50w** und **50x**. Die restlichen Verbindungen weisen unabhängig von ihren strukturellen Eigenschaften ähnliche EC<sub>50</sub>-Werte in einem Bereich von ca. 25 – 200 nM auf. Betrachtet man die inhibitorische Aktivität zu den Isoenzymen HmHDAC1 und HmHDAC6, so sind diese Werte deutlich im mikromolaren Bereich für HmHDAC1 und im unteren mikromolaren bis niedrigen nanomolaren Bereich für die HmHDAC6. Die Werte des ZMAL-Assays kann man nur bedingt mit den Werten des Fluor de Lys<sup>®</sup>-Assay vergleichen, es gilt aber dennoch, je höher der EC<sub>50</sub>-Wert für die HmHDAC1 und 6 ist, desto selektiver scheint der Ligand auf die HmHDAC8 zu wirken. Besser vergleichbar sind die EC<sub>50</sub>-Werte zwischen HmHDAC1 und HmHDAC6. Es ist ersichtlich, dass HmHDAC1 weniger stark inhibiert wird als HmHDAC6 und für die HmHDAC6 erkennt man außerdem eine Präferenz für Substanzen mit Chlor- und Bromsubstituenten in Position 4 der Benzhydroxamsäure (**50o** – **50r** und **50v**).

**Tabelle 12: EC<sub>50</sub>-Werte der Hydroxamsäuren mit verschiedenen Grundkörper auf die HmHDAC1,6(ZMAL),8(Fluor de Lys<sup>®</sup>)**

Verb.	Strukturformel	EC <sub>50</sub> [μM]	EC <sub>50</sub> [μM]	EC <sub>50</sub> [μM]
		HmHDAC8 Fluor de Lys <sup>®</sup>	HmHDAC1 ZMAL	HmHDAC6 ZMAL
<b>58</b>	9-Oxo-5,6,7,8-tetrahydroacridin-3-hydroxamsäure	3,90 ± 0,38	61,06 ± 8,29	n.b.
<b>59</b>	3,5-bis-Benzamido-benzhydroxamsäure	1,47 ± 1,20	14,4% @ 10μM	n.b.
<b>60</b>	Chinaldin-2-hydroxamsäure	0,58 ± 0,09	n.b.	n.b.
<b>61</b>	4,5,6,7-Tetrahydro-benzothiophen-2-hydroxamsäure	1,47 ± 0,20	n.b.	n.b.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Verb.	Strukturformel	EC <sub>50</sub> [μM] HmHDAC8 Fluor de Lys <sup>®</sup>	EC <sub>50</sub> [μM] HmHDAC1 ZMAL	EC <sub>50</sub> [μM] HmHDAC6 ZMAL
<b>62</b>	3-Benzylloxy-4-methoxy- benzhydroxamsäure	0,02 ± 0,01	33,9% @ 5μM	53,4% @ 5μM
<b>63</b>	3-(4-Methylphenylsulfonamido)-4- methoxy-benzhydroxamsäure	0,02 ± 0,01	27,6% @ 5μM	55,9% @ 5μM
<b>64</b>	3- <i>N</i> -Phenylcarboxamido- benzhydroxamsäure	0,27 ± 0,05	39,12 ± 8,93	3,12 ± 0,10
<b>65</b>	3-Carboxybenzhydroxamsäure	n.b.	n.b.	n.b.

Betrachtet man hier die Verbindungen, die sich von dem allgemeinen Aufbau der 3-Phenylamidobenzhydroxamsäuren unterscheiden, so erkennt man, dass diese abgesehen von Verbindung **60** nur EC<sub>50</sub>-Werte im mikromolaren Bereich erreichen.

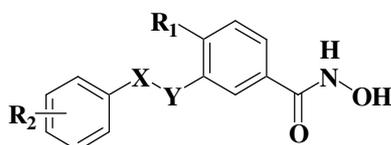


Abbildung 74: Allgemeine Struktur der 3-Phenylamidobenzhydroxamsäuren.

Die Verbindung mit dem Methylenoxy-Linker (**62**) und dem Sulfonamid-Linker (**63**) erreichen ähnlich hohe EC<sub>50</sub>-Werte und sind die beiden Verbindungen mit der höchsten inhibitorischen Aktivität gegenüber der HmHDAC8 aller der in dieser Arbeit dargestellten Verbindungen. Verbindung **64**, die ein Derivat von **50a** mit inversen Amidlinker darstellt, ist ca. um Faktor zwei stärker wirksam auf HmHDAC8 als **50a**. Wie bereits für die anderen Substanzen beschrieben, kann sie zwischen den humanen Isoformen HmHDAC1 und 6 diskriminieren ebenso mit einer Präferenz für die HmHDAC6.

### 3.3. Röntgenkristallstrukturen ausgewählter Histondesacetylasen

#### 3.3.1. Röntgenkristallstruktur von SmHDAC8 kokristallisiert mit SAHA und T5979345

In vorangegangenen Arbeiten wurden bereits SAHA und T5979345 mit SmHDAC8 kokristallisiert und so mögliche Interaktionen zwischen Enzym und Ligand bestimmt.

#### 3.3.2. Röntgenkristallstrukturen ausgewählter Verbindungen kokristallisiert mit SmHDAC8

Während dieser Arbeit gelang es der Arbeitsgruppe von CHRISTOPHE ROMIER am Institut für Genetik, Zell- und Molekularbiologie in Strasbourg Kristallstrukturen der SmHDAC8 kokristallisiert mit den Verbindungen **50a**, **50b**, **50d** und **50e** aufzulösen (Abb.: 75).

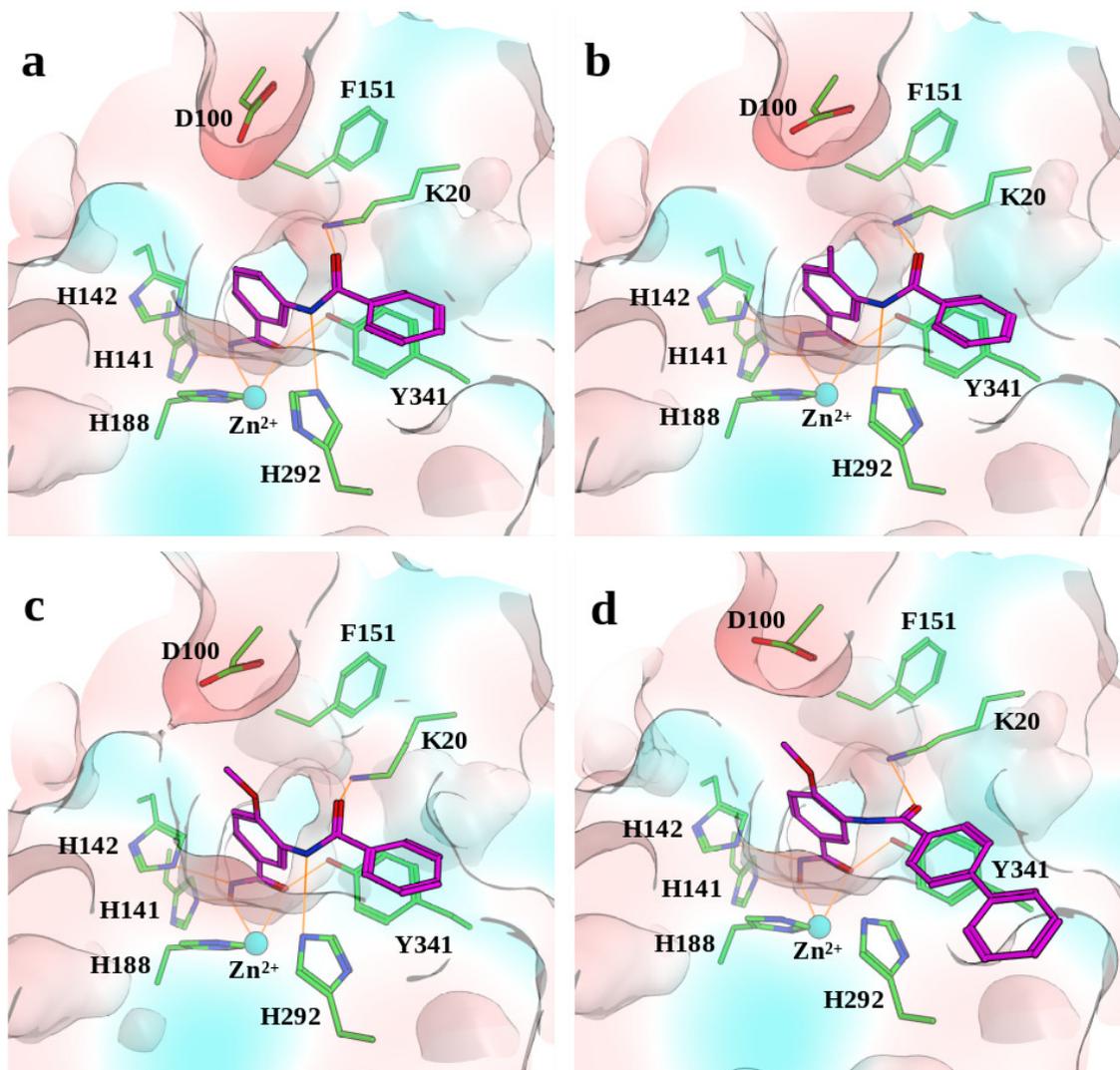


Abbildung 75: Röntgenkristallstrukturen von SmHDAC8 kokristallisiert mit 50a (a), 50b (b), 50d (c) und 50e (d). (MOE)

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Man erkennt in allen vier Darstellungen (Abb.: 75), dass die Verbindungen die gleiche Orientierung innerhalb der Bindetasche einnehmen. Die ZBG koordiniert das Zinkion. Die Amidstruktur ist so ausgerichtet, dass der Sauerstoff der Carbonylgruppe eine Interaktion mit Lys20 eingeht und der Substituent in Position 4 der Benzhydroxamsäure weist in Richtung einer kleinen lipophilen Tasche unterhalb der Aminosäure Asp100. Weiterhin scheint es

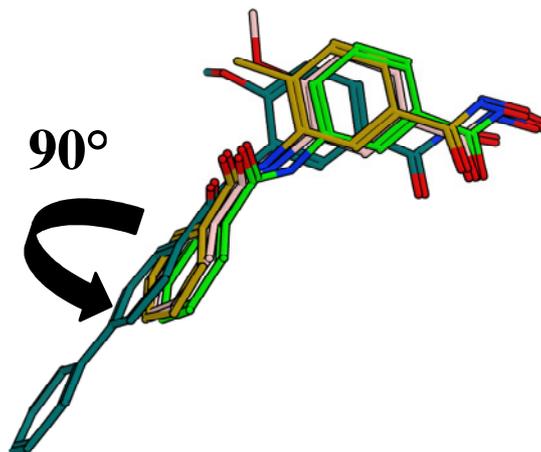


Abbildung 76: Die überlagerten Strukturen von 50a, 50b, 50d und 50e. (MOE)

eine Wechselwirkung zwischen dem zweiten aromatischen Ring der Verbindungen und Tyr341 zu geben. Zu vermuten wären hier  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen der beiden aromatischen Ringsysteme. Eine weitere Auffälligkeit ist der  $90^\circ$  Winkel der beiden aromatischen Ringsysteme innerhalb des Moleküls zueinander (Abb.: 76).

#### 3.3.3. Vergleich der Bindetaschen von SmHDAC8 und HmHDAC8

Die für diesen Vergleich verwendete Röntgenkristallstruktur ist die SmHDAC8 kokristallisiert mit Verbindung **50b**. Zur übersichtlicheren Darstellung und Erläuterung des hier besprochenen Sachverhalts wurde Verbindung **50e** aus der Grafik entfernt. Für die HmHDAC8 wurde eine Röntgenkristallstruktur von der Proteindatenbank bezogen (ID 2V5X, Kette C), ebenso für die HmHDAC1 (ID 5BKX, Kette D). Für die HmHDAC6 wurde ein Homologiemodell verwendet (siehe Abbildung: 77).

Vergleicht man die Architektur der katalytischen Tasche von SmHDAC8 (Abb.: 77 Figur **a**) und HmHDAC8 (Abb.: 77 Figur **b**), so ergeben sich einige Unterschiede zwischen diesen beiden Proteinen. Als Erstes wäre der Austausch von Methionin M274 durch Histidin H292 in der schistosomalen HDAC8 zu nennen. Dies verringert den hydrophoben Charakter dieses Bereiches der Bindetasche, welcher normalerweise mit dem aliphatischen Teil des acetylierten Lysins interagiert. Eine Gemeinsamkeit besitzen beide Proteine in der Lage der Histidine H141, H142 und H188 für die SmHDAC8 und entsprechend für die HmHDAC8 H142, H143 und H180. Ebenso ist die Ausrichtung von Tyrosin Y341 im schistosomalen Enzym identisch mit Tyrosin Y306 im humanen Gegenstück. Dies trifft ebenso für die Aminosäuren C152 und G150 in der SmHDAC8 zu, respektive C153 und G151 in der

### 3.3. Röntgenkristallstrukturen ausgewählter Histondesacetylasen

HmHDAC8. Ein wichtiger Unterschied, in der Konformation der einzelnen Aminosäuren betrifft die Ausrichtung von Phenylalanin F151 in der SmHDAC8. Die aromatische Seitenkette hat sich so ausgerichtet, dass diese von der Bindetasche weg zeigt. Diese Konformation wird auch als „*flipped out*“-Konformation bezeichnet. Im Gegensatz zum Phenylalanin F152 in der HmHDAC8, welches das Gegenstück zu F151 darstellt, besitzt dieses eine sogenannte „*flipped in*“-Konformation. Für die SmHDAC8 konnte in verschiedenen Kristallstrukturen mit unterschiedlichen Inhibitoren sowohl die „*flipped in*“ als auch die „*flipped out*“ Konformation beobachtet werden.

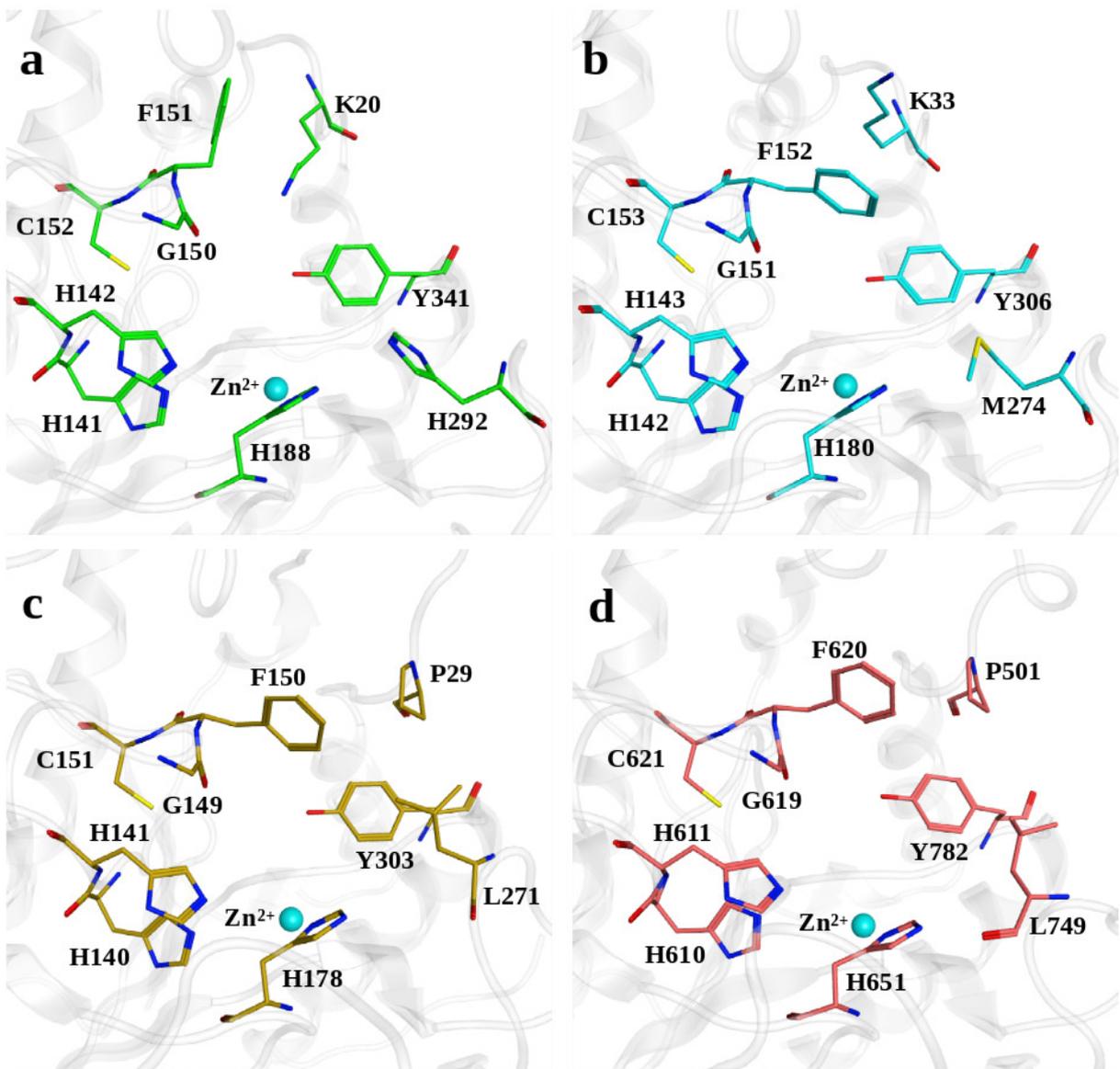


Abbildung 77: Röntgenkristallstrukturen von (a): SmHDAC8 kokristallisiert mit 50b Kette B, (b) HmHDAC8 PDB ID 2V5X Kette C, (c) HmHDAC1 PDB ID 5BKX Kette D, (d) HmHDAC6 Homologiemodell, katalytische Domäne 2. Die Liganden wurden für diese Ansicht entfernt. (MOE)

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Eine Untersuchung der HmHDAC8 ergab, dass diese sehr wahrscheinlich nur die „*flipped in*“-Konformation für F152 einnehmen kann. Eine Erklärung hierfür könnten Aminosäuren in der näheren Umgebung von F151 bzw. F152 geben, die sich hinsichtlich ihrer Struktur unterscheiden. In der humanen HDAC8 befindet sich die Aminosäure Leucin L31 in räumlicher Nähe zu F152. Diese ist in ihrer Ausrichtung und durch Nachbaraminosäuren so starr eingebunden, so dass die „*flipped out*“-Konformation von F152 höchst wahrscheinlich nicht möglich ist. In der schistosomalen HDAC8 ist dieses Leucin durch die Aminosäure Serin S18 ausgetauscht. Diese kleinere Aminosäure verändert die Seitentasche in der sich F151 in der „*flipped in*“-Konformation befindet derart, dass eine Konformationsänderung in die „*flipped out*“-Konformation möglich ist. Die „*flipped out*“-Konformation scheint durch starke Van-der-Waals-Kräfte in dieser Position begünstigt zu sein. Abgesehen von der HmHDAC6, welche an dieser Stelle ein Tyrosin besitzt, scheint das Phenylalanin stark konserviert und in allen humanen Histondesacetylasen vorhanden zu sein und stets in der „*flipped in*“-Konformation vorzuliegen (Abb.: 77 Figur **c** für die humane HDAC1 und Figur **d** für die humane HDAC6). Diese Konformation ist ein spezifisches Merkmal für das schistosomale Protein und ermöglicht ebenso eine Konformationsänderung für Lysin 20 in der SmHDAC8. In der HmHDAC8 zeigt Lysin K33, welches das Gegenstück zu K20 in der SmHDAC8 darstellt, weg von der katalytischen Tasche. In der SmHDAC8 mit der „*flipped out*“-Konformation von F151 zeigt K20 in die katalytische Tasche und kann mit potentiellen Liganden interagieren. Ebenso erweitert sich dadurch die räumliche Ausdehnung der katalytischen Tasche im Vergleich zur humanen Histondesacetylase. Zusammengefasst stellen der Austausch von M274 gegen H292 und die „*flipped out*“-Konformation von F151 spezifische Unterschiede zwischen den beiden Proteinen dar und bietet die Möglichkeit zur Darstellung selektiver Inhibitoren.

#### 3.4. Selektivität der dargestellten Substanzen

##### 3.4.1. Selektivität der dargestellten Substanzen zwischen SmHDAC8 und HmHDAC8

Die in dieser Arbeit dargestellten Verbindungen sollten einerseits zu einer Verbesserung der inhibitorischen Aktivität gegenüber der SmHDAC8 im Vergleich zur Leitsubstanz **T5979345** führen, und andererseits eine Selektivität gegenüber den humanen Histondesacetylasen (HmHDAC1,6 und 8) aufweisen. In der nachfolgenden Tabelle wird für die Steigerung der inhibitorischen Aktivität zusätzlich zum Zahlenwert des  $EC_{50}$ -Wertes ein Farbcode angewendet (grün für  $EC_{50,Substanz} < EC_{50,T5979345}/10$  ; hellgrün für  $EC_{50,T5979345}/10 \leq$  76

### 3.4. Selektivität der dargestellten Substanzen

$EC_{50,Substanz} < EC_{50,T5979345}$  , hellrot für  $EC_{50,T5979345} \leq EC_{50,Substanz} \leq 2 \times EC_{50,T5979345}$  , rot für  $EC_{50,Substanz} > 2 \times EC_{50,T5979345}$ ). Die Selektivität wird als einheitsloser Quotient der  $EC_{50}$ -Werte von HmHDAC8 und SmHDAC8 dargestellt. Ein Wert von 1 bedeutet, dass keine Diskriminierung zwischen beiden Enzymen stattfindet. Ein Wert unter 1 bedeutet, dass das humane Enzym bevorzugt gehemmt wird wohingegen ein Wert über 1 für eine Selektivität gegenüber dem schistosomalen Enzym spricht (grün für Werte größer 1, rot für Werte unter 1). Die Werte für die humanen Isoformen HmHDAC1 und HmHDAC6 werden nur ergänzend erwähnt, da diese im Aktivitätstest durch ein anderes Substrat ermittelt wurden. Da wie schon erwähnt ein Vergleich der beiden Testsysteme, in diesen Fall nicht möglich ist, soll hier nur eine Präferenz der einzelnen Substanzen dargestellt werden. Die folgende Tabelle dient ausschließlich zur Wertung der Substanzen untereinander sowie als Vergleich zu **T5979345**.

**Tabelle 13:**  $EC_{50}$ -Werte für SmHDAC8 und HmHDAC8 gemessen mit dem Fluor de Lys<sup>®</sup>-Assay-Kit. Der Quotient aus den  $EC_{50}$ -Werten der HmHDAC8 und SmHDAC8 zur Darstellung der Selektivität.  $EC_{50}$ -Werte für HmHDAC1 und HmHDAC6 gemessen mit dem ZMAL-Assay-Kit. Die Werte wurden gerundet und ohne Standardabweichung dargestellt.

Verbindung	$EC_{50}$ [ $\mu$ M] SmHDAC8 Fluor de Lys <sup>®</sup>	$EC_{50}$ [ $\mu$ M] HmHDAC8 Fluor de Lys <sup>®</sup>	$\frac{\text{HmHDAC8}}{\text{SmHDAC8}}$	$EC_{50}$ [ $\mu$ M] HmHDAC1 ZMAL	$EC_{50}$ [ $\mu$ M] HmHDAC6 ZMAL
<b>T5979345</b>	<b>1,48</b>	<b>0,97</b>	<b>0,66</b>	<b>27,48</b> <b>28,39</b>	<b>3,56</b>
<b>52a</b>	3,63	0,83	0,23	-	-
<b>51a</b>	4,01	1,95	0,49	-	-
<b>52b</b>	1,08	0,14	0,13	-	-
<b>53</b>	0,22	0,10	0,46	-	-
<b>52c</b>	0,60	0,10	0,17	-	-
<b>51b</b>	0,66	0,07	0,11	-	-
<b>52d</b>	1,29	0,02	0,02	-	-
<b>51c</b>	16,04	0,08	0,01	-	-
<b>54</b>	0,13	0,03	0,23	-	-
<b>52f</b>	0,62	0,03	0,05	-	-
<b>51d</b>	2,09	0,04	0,02	-	-
<b>55</b>	0,14	0,03	0,21	-	-
<b>56</b>	1,43	0,07	0,05	-	-

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Verbindung	EC <sub>50</sub> [µM]	EC <sub>50</sub> [µM]	$\frac{\text{HmHDAC8}}{\text{SmHDAC8}}$	EC <sub>50</sub> [µM]	EC <sub>50</sub> [µM]
	SmHDAC8	HmHDAC8		HmHDAC1	HmHDAC6
	Fluor de Lys <sup>®</sup>	Fluor de Lys <sup>®</sup>		ZMAL	ZMAL
57	9,29	2,19	0,24	42,27	8,59
50a	0,47	0,58	1,23	-	-
50b	0,15	0,20	1,33	-	-
50c	0,10	0,03	0,3	-	-
50d	0,14	0,09	0,64	-	-
50e	0,08	0,03	0,38	6,34	0,39
50f	0,29	-	-	-	-
50g	0,11	0,08	0,73	2,59	0,40
50h	0,15	0,24	1,60	2,85	0,88
50i	0,70	-	-	9,64	3,10
50j	0,12	0,55	4,58	13,02	2,29
50k	0,13	0,17	1,31	4,56	1,30
50l	0,09	0,15	1,67	2,08	0,61
50m	0,27	-	-	-	-
50n	0,22	0,03	0,14	3,59	2,59
50o	0,07	0,12	1,71	11,55	0,12
50p	0,23	0,29	1,26	3,84	0,08
50q	0,15	0,24	1,60	4,08	0,12
50r	0,98	1,08	1,10	8,05	0,15
50s	0,40	0,45	1,13	6,42	0,31
50t	0,38	0,21	0,55	9,41	1,51
50u	0,39	-	-	-	-
50v	0,15	0,19	1,27	7,43	0,15
50w	0,18	0,32	1,78	22,25	0,50
50x	0,14	0,34	2,43	2,44	0,14
58	3,22	3,90	1,21	-	-
59	7,73	1,47	0,19	-	-
60	8,21	0,58	0,07	-	-
61	10,09	1,47	0,15	-	-
62	0,27	0,02	0,07	-	-
63	0,49	0,02	0,04	-	-
64	0,22	0,27	1,23	39,12	3,12
65	1,59	-	-	-	-

### 3.5. Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung der Verbindungen anhand der Proteinstruktur

Betrachtet man die drei Gruppen hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung auf die SmHDAC8 erkennt man deutlich eine Potenzsteigerung der Substanzen im Vergleich zu **T5979345**, wobei die Derivate der 3-Benzamidobenzhydroxamsäuren (**50a – 50x**) durchweg höhere Hemmwerte aufweisen als **T5979345** und über die Hälfte der Substanzen eine höhere Affinität auf SmHDAC8 zeigt. Die Substanzen die eine 3-Aminobenzhydroxamsäure als Struktur besitzen (**51a – 51d, 52a – 52f, 53 - 57**) weisen ebenfalls potente Vertreter auf, zeigen aber eine gesteigerte Aktivität an der HmHDAC8. Bei den Substanzen mit verschiedenen Grundkörpern (**58 – 65**) findet einzig Verbindung **64** Bedeutung, da diese EC<sub>50</sub>-Werte im Bereich der 3-Benzamidobenzhydroxamsäuren vorweist und im direkten Vergleich mit Verbindung **50a** zu einer zweifach höheren Aktivität geführt hat.

### 3.5. Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung der Verbindungen anhand der Proteinstruktur

Zur Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung wurden die Ergebnisse aus den Röntgenkristallstrukturexperimenten an SmHDAC8, *in vitro* Daten des Fluor de Lys<sup>®</sup>-Assays und optimierte Dockinglösungen von SmHDAC8 und HmHDAC8 genutzt. Die Dockinglösungen wurden von JELENA MELESINA innerhalb der Arbeitsgruppe von Prof. SIPPL angefertigt und zur Verfügung gestellt.

#### 3.5.1. Inhibitoren mit 3-Aminobenzhydroxamsäure-Grundkörper

Für die Substanzklasse der 3-Aminobenzhydroxamsäuren gibt es keine Röntgenkristallstruktur. Die Diskussion der Struktur-Wirkungsbeziehung verläuft anhand von ausgewählten Dockinglösungen. Um eine Orientierung innerhalb der katalytischen Tasche zu erhalten, wurden wahlweise die Dockinglösungen für die Verbindungen **51c** (gelb), **52c** (weis), **52d** (grau) und **54** (rot) sowohl in der Bindetasche der schistosomalen HDAC8 (Abb.: 78 Figur **a**) als auch in der humanen HDAC8 abgebildet (Abb.: 78 Figur **b**). Die dargestellten Dockinglösungen entsprechen den von dem Programm am besten bewerteten Lösungen.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

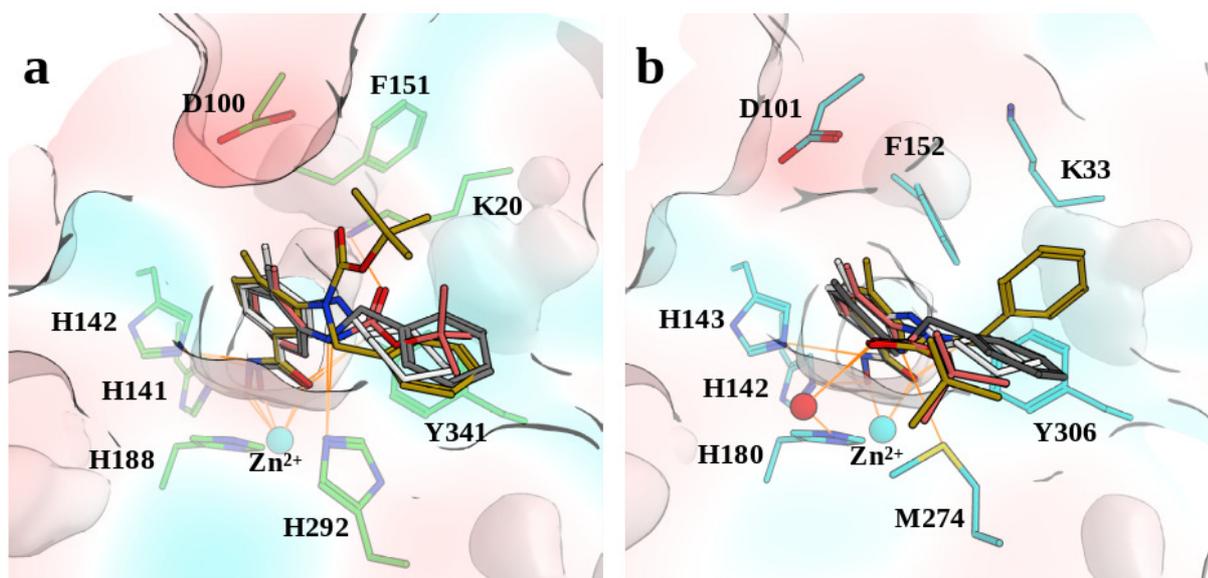


Abbildung 78: Dockinglösungen für die Verbindungen 51c (gelb), 52c (weiß), 52d (grau) und 54 (rosa) in (a) SmHDAC8 und (b) HmHDAC8. (MOE)

Betrachtet man die Hemmkonzentrationen der hier dargestellten 3-Aminobenzhydroxamsäuren und 3-Carbamoylbenzhydroxamsäuren für die SmHDAC8 sind keine direkten Beziehungen zwischen unterschiedlichen Substitutionsmustern und der inhibitorischen Aktivität nachvollziehbar. Der Austausch der Cyclohexylgruppe gegen eine Benzylgruppe am anilinischem Stickstoff führt bei den unsubstituierten Derivaten in Position 4 der Benzhydroxamsäure zu einer Aktivitätssteigerung von  $EC_{50} = 3,63 \pm 0,62 \mu\text{M}$  (**52a**) auf  $EC_{50} = 1,08 \pm 0,25 \mu\text{M}$  (**52b**). Dagegen führt dieser Austausch der *N*-Substituenten bei den Derivaten mit einer Methylgruppe in Position 4 der Benzhydroxamsäure zu niedrigeren Aktivitäten ( $EC_{50} = 0,60 \pm 0,20 \mu\text{M}$  für **52c** und  $EC_{50} = 1,29 \pm 1,33 \mu\text{M}$  für **52d**). Vergleicht man die Verbindungen **50b**, **52d** und **52f**, so erkennt man einen Trend, dass Verbindungen mit größeren Resten in Position 4 der Benzhydroxamsäure auch eine höhere Aktivität gegenüber der SmHDAC8 aufweisen. Substanzen, die eine *N,N*-Disubstitution im Molekül aufweisen (**51a**, **51b**, **51c**, **51d**, **56** und **57**), besitzen schlechtere Hemmkonstanten als Verbindungen mit einem freien Proton am anilinischem Stickstoff. Dieses scheint eine für die Aktivität wichtige Interaktion mit His242 auszubilden. Ebenso ist vorstellbar, dass wie in Abbildung 78 (Figur a) die Substituenten keine Interaktion zu den Aminosäuren des Proteins eingehen und aus der Bindetasche hinausragen (**51c**,  $EC_{50} = 16,04 \pm 9,26 \mu\text{M}$ ) und so auf Grund von entropischen Effekten eine schlechtere Aktivität besitzen.

### 3.5. Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung der Verbindungen anhand der Proteinstruktur

Die Verbindungen **53**, **54** und **55** weisen die höchste inhibitorische Aktivität in dieser Verbindungsklasse auf. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass diese sowohl eine Interaktion mit His242 ausbilden und zusätzlich eine Interaktion zwischen der Carbonylfunktion und Lys20 ausbilden. Betrachtet man diese Substanzen hinsichtlich ihrer Selektivität zur HmHDAC8, so muss man sagen, dass sie eine höhere Aktivität gegenüber dem humanen Protein aufweisen. Die 4-Methylbenzhydroxamsäurederivate scheinen die aktivsten Verbindungen zu sein und dazu erhöht die *N*-Benzylgruppe (**52d**,  $EC_{50} = 0,015 \pm 0,002 \mu\text{M}$ ) die Aktivität gegenüber einer *N*-Cyclohexylgruppe (**52c**,  $EC_{50} = 0,104 \pm 0,012 \mu\text{M}$ ).

Die größere Affinität der Substanzen zum humanen Protein lässt sich aus der Architektur der Bindetaschen erklären. Zum einen bilden sie eine Interaktion zu Met274 aus und zum anderen besteht ein Wasserstoffbrückennetzwerk über ein Wassermolekül und His180. Dies scheint auszureichen um in einer im Schnitt zweifach höheren Aktivität auf die HmHDAC8 zu resultieren (Beispiel: **52f**,  $EC_{50}(\text{SmHDAC8}) = 0,062 \pm 0,012 \mu\text{M}$ ; **52f**,  $EC_{50}(\text{HmHDAC8}) = 0,032 \pm 0,006 \mu\text{M}$ ).

#### 3.5.2. Inhibitoren mit 3-Amidobenzhydroxamsäure-Grundkörper

Um die Struktur-Wirkungsbeziehung der 3-Amidobenzhydroxamsäuren zu diskutieren und zu veranschaulichen, stützt sich dieses Kapitel auf vorhandene Röntgenkristallstrukturen und Dockinglösungen ausgewählter Verbindungen.

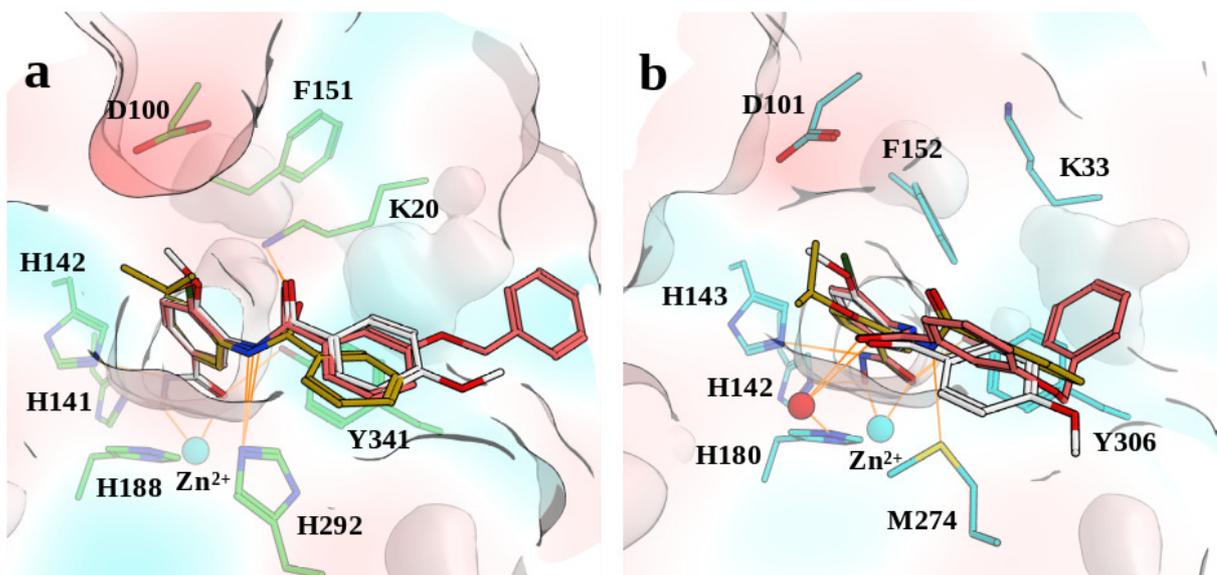


Abbildung 79: Dockinglösungen für die Verbindungen 50g (weiß), 50n (gelb) und 50s (rosa) in (a) SmHDAC8 und (b) HmHDAC8. (MOE)

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Die Substanzklasse der 3-Amidobenzhydroxamsäuren kann aufgrund des Substitutionsmusters in zwei Klassen eingeteilt werden. In der übergeordneten Klasse diskutiert man die Auswirkung verschiedener Substituenten in Position 4 der Benzhydroxamsäure auf die inhibitorische Aktivität gegenüber der SmHDAC8 und HmHDAC8 während man in der untergeordneten Klasse die Variationen der aromatischen Ringsysteme und deren Substitutionen mit dem unsubstituierten Benzamidrest vergleicht (Abb.: 80).

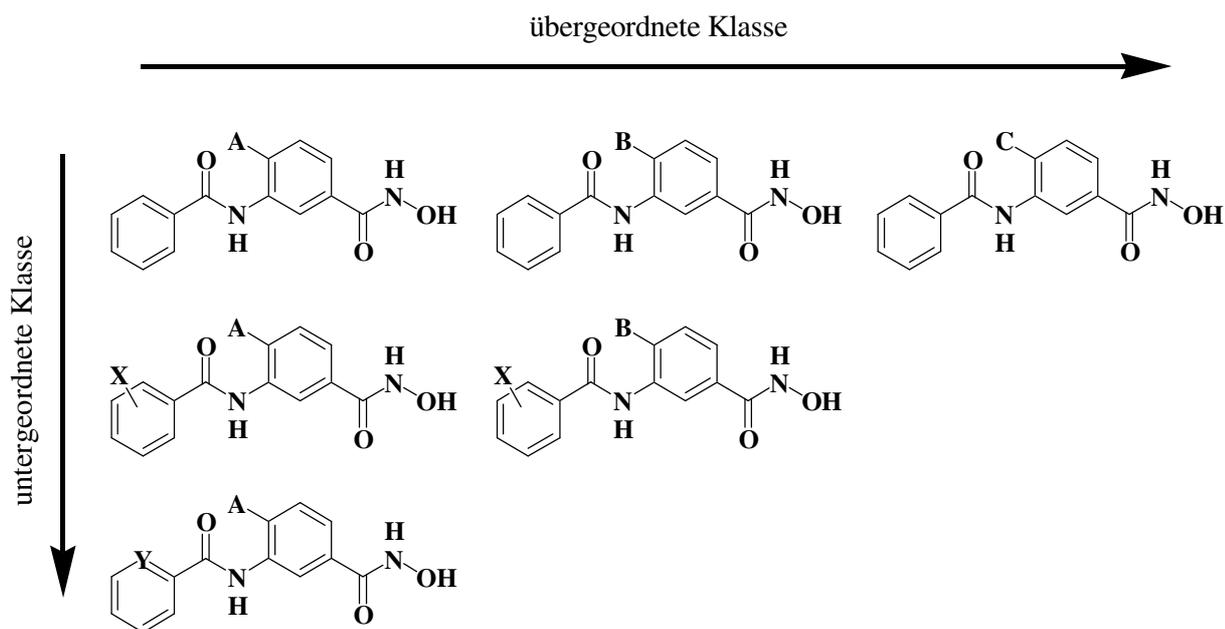


Abbildung 80: Einteilung der 3-Amidobenzhydroxamsäuren in eine übergeordnete Klasse und eine untergeordnete Klasse.

Als Erstes wird die Auswirkung der verschiedenen Substituenten auf die Aktivität gegenüber der SmHDAC8 und der HmHDAC8 in der übergeordneten Klasse diskutiert. Die Grundstruktur bildet hierbei die 3-Benzamidobenzhydroxamsäure (Verbindung **50a**,  $EC_{50} = 468,2 \pm 79,0$  nM). Um eine Aussage über die Struktur-Wirkungsbeziehung der unterschiedlichen Substituenten treffen zu können, werden in dieser übergeordneten Klasse einzig die Verbindungen mit verschiedenen Substituenten in Position 4 der Benzhydroxamsäure diskutiert.

Verbindung **50a** stellt in dieser Reihe, die Verbindung mit der geringsten Potenz gegen SmHDAC8 dar. Allein die Einführung einer Methylgruppe (**50b**) konnte die inhibitorische Aktivität um das Dreifache steigern. Vermutlich ist dies auf den induktiven Effekt der

### 3.5. Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung der Verbindungen anhand der Proteinstruktur

Methylgruppe und der daraus folgenden gesteigerten Elektronendichte im Aromaten zurückzuführen. Der Austausch der Methylgruppe durch eine Methoxygruppe (Verbindung **50d**,  $EC_{50} = 135,6 \pm 25,0$  nM) steigert nur marginal die inhibitorische Aktivität gegenüber SmHDAC8. Hier könnte der positiv mesomere Effekt verantwortlich sein, bei dem die Erhöhung der Elektronendichte im Aromaten über die freien Elektronenpaare des Sauerstoffatoms realisiert werden kann. Verstärkt man diesen Effekt durch Alkoxysubstituenten mit größerem Alkylanteil (Ethoxy, Propoxy, Isopropoxy, ...) und der dadurch verstärkten elektronenschiebenden Wirkung in Richtung Sauerstoffatom der Alkoxygruppe, müsste die Aktivität theoretisch weiter steigen.

Verbindung **50k** scheint diese Theorie zu bestätigen, wobei der Aktivitätsgewinn nur sehr gering ausfällt ( $EC_{50} = 129,3 \pm 7,6$  nM). Verbindung **50m** und **50n**, jeweils mit Propoxy- und Isopropoxyrest zeigen allerdings eine um die Hälfte geminderte inhibitorische Aktivität gegenüber SmHDAC8 im Vergleich zu **50d**.

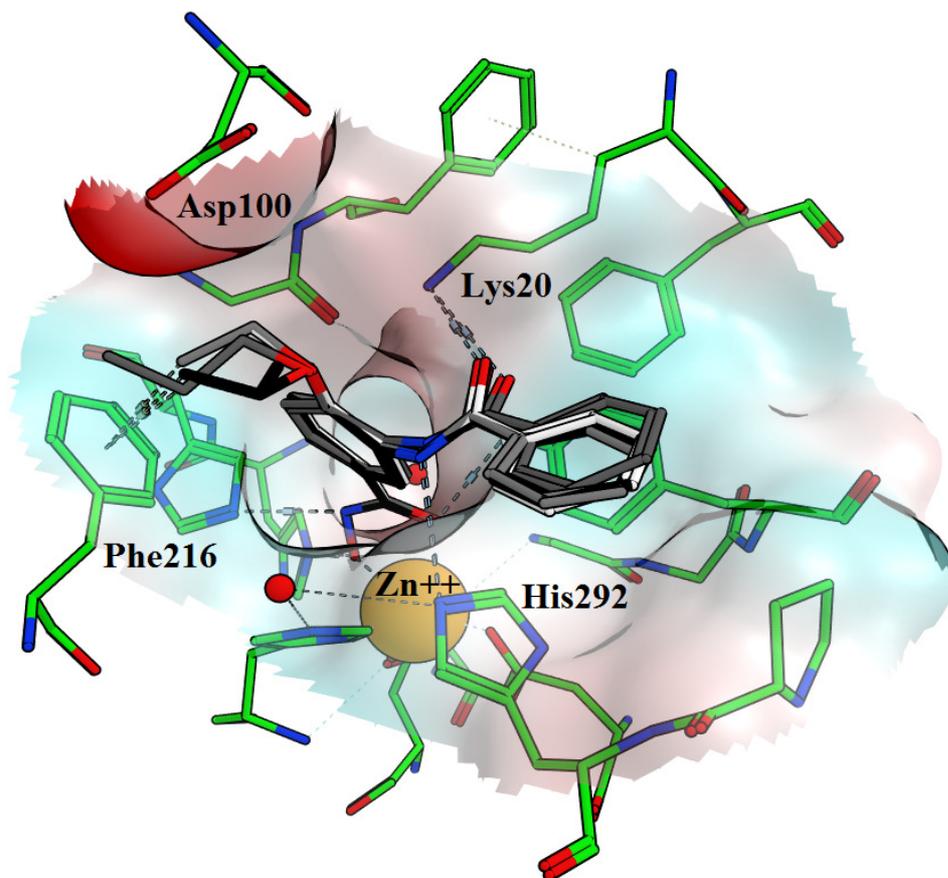


Abbildung 81: Dockinglösungen für die Verbindungen **50d** (weiß), **50k** (schwarz), **50m** (dunkel grau) und **50n** (hell grau). (SmHDAC8) MOE

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Der Grund hierfür könnte sterischer Natur sein. In Abbildung 79 (a) ist die anhand von Röntgenkristallstrukturexperimenten und computergestützter Methoden ermittelte Ausrichtung der 3-Amidobenzhydroxamsäuren in SmHDAC8 zu erkennen. Der Substituent an Position 4 der Benzhydroxamsäure deutet in Richtung einer kleinen hydrophoben Tasche unterhalb von Asp100. Bei Verbindung **50m** und **50n** scheint das Volumen dieser Tasche ausgereizt und der Inhibitor ist gezwungen, eine für die Interaktion mit dem Enzym ungünstigere Position einzunehmen. (Vergleiche Abb.: 81) Allerdings können Dockinglösungen nur bedingt zur Ableitung der Struktur-Wirkungsbeziehung heran gezogen werden. Die dynamischen Wechselwirkungen von Protein und Ligand werden hierbei nur als Momentaufnahme dargestellt. Sie können nur unzureichend die unterschiedlichen inhibitorischen Aktivitäten der in Abbildung 81 besprochenen Verbindungen bildlich darstellen. So ist zu erkennen, dass alle vier Verbindungen die gleiche Orientierung innerhalb der Bindetasche einnehmen und ebenso die gleichen Interaktionen zu den Aminosäuren des Enzyms ausbilden.

Betrachtet man an dieser Stelle die inhibitorischen Aktivitäten der bisher besprochenen Verbindungen gegenüber der humanen HDAC8, so sind für **50a** und **50b** keine nennenswerten Unterschiede in den  $EC_{50}$ -Werten zu erkennen. Die strukturellen und konstitutionellen Unterschiede beider Enzyme innerhalb der Bindetasche scheinen für diese Liganden nicht ausreichend zu sein um eine Selektivität zu erzeugen. Die für die SmHDAC8 spezifische Interaktion von His292 mit dem Liganden und die „*flipped out*“ Konformation von Phe151 und die damit verbundene Interaktion von Lys20 mit der Carbonylgruppe des Liganden scheint im humanen Enzym durch ein Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen dem Liganden, einem Wassermolekül und His180 sowie der Interaktion des Liganden mit Met274 gleichwertig ersetzt zu sein. Allein Verbindung **50k** zeigt eine leichte Präferenz für das schistosomale Enzym ( $EC_{50}(\text{SmHDAC8}) = 129,3 \pm 7,6 \text{ nM}$ ;  $EC_{50}(\text{HmHDAC8}) = 172,0 \pm 16,0 \text{ nM}$ ). Verbindung **50n** ( $EC_{50} = 29,0 \pm 1,0 \text{ nM}$ ) bestätigt für das humane Enzym, dass eine erhöhte Elektronendichte im aromatischen Ring der Benzhydroxamsäure auch zu einer erhöhten inhibitorischen Aktivität führt.

Die Einführung von Halogenatomen in Position 4 der Benzhydroxamsäure steigerte ebenfalls die inhibitorische Aktivität gegenüber der SmHDAC8 im Vergleich zu **50a** und führte zu einer messbaren Selektivität zum schistosomalen Enzym um den Faktor 2. Dabei weist die Verbindung mit Chlor in Position 4 (**50o**) die höchste inhibitorische Aktivität auf ( $EC_{50}(\text{SmHDAC8}) = 67,0 \pm 10,2 \text{ nM}$ ;  $EC_{50}(\text{HmHDAC8}) = 120,0 \pm 37 \text{ nM}$ ). Die Verbindungen mit Brom (**50v**) und Fluor (**50w**) sowie einer Trifluormethylgruppe (**50x**) sind

### 3.5. Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung der Verbindungen anhand der Proteinstruktur

ebenfalls potent und ergaben vergleichbare Aktivitäten ähnlich der Verbindungen mit Methyl- und Methoxysubstituenten. Dies widerspricht der These, dass eine erhöhte Elektronendichte im Aromaten für eine Aktivitätssteigerung erforderlich ist, sowohl die Halogenatome als auch die stark elektronenziehende Trifluormethylgruppe durch ihren negativ-induktiven Effekt eher die Elektronendichte im aromatischen System verringern. So scheinen möglicherweise das ungesättigte Verdrängen von Wasser aus der Bindetasche von SmHDAC8 und HmHDAC8 sowie sterische Effekte für die unterschiedlichen Aktivitäten verantwortlich zu sein. Bereits bekannte Inhibitoren wie SAHA oder TSA bestätigen anhand ihrer Struktur, dass ein  $\pi$ -Elektronensystem nicht zwingend für eine gerichtete Interaktion mit Histondesacetylasen notwendig ist. Betrachtet man die Dockinglösungen für die 3-Amidobenz-hydroxamsäuren (Abb.: 79) so ist zum einen die Position der Amidstruktur als Verbindung der beiden aromatischen Systeme und zum anderen die Interaktion des Liganden mit spezifischen Aminosäuren am Rand der Histondesacetylase eher von Bedeutung. Diese Beobachtung wird in der untergeordneten Klasse diskutiert, welche sich aus den Vertretern der potentesten Verbindungen aus der übergeordneten Klasse zusammensetzt.

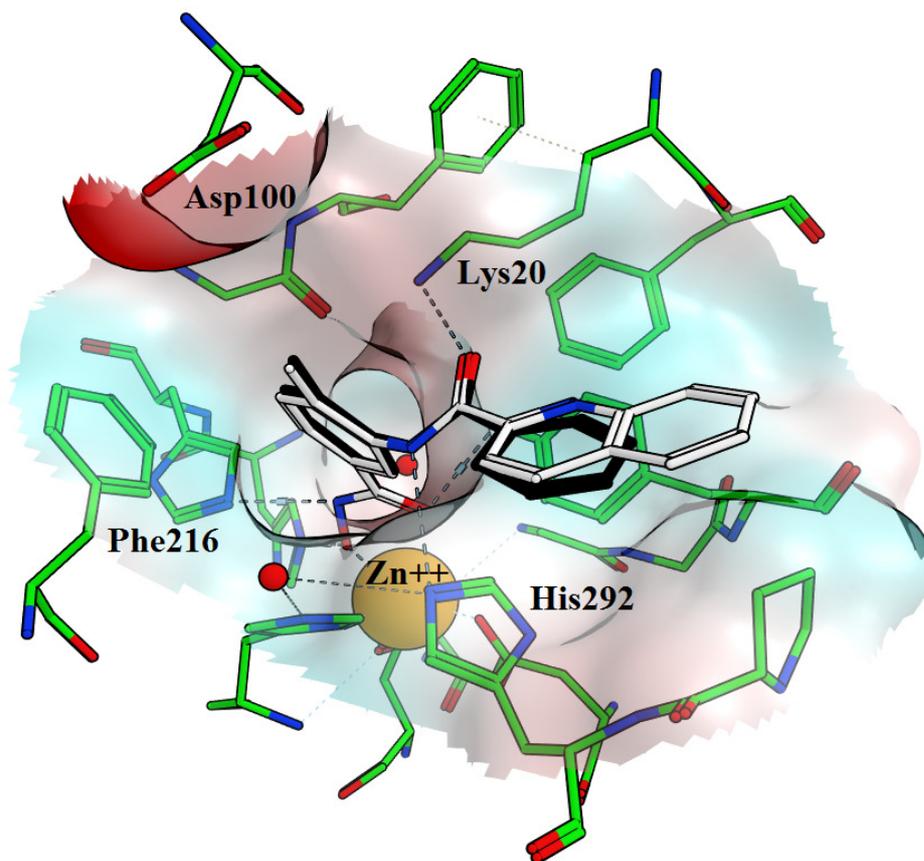


Abbildung 82: Dockinglösungen für die Verbindungen 50b (schwarz) und 50c (weiß). (SmHDAC8) MOE

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Vergleicht man Verbindung **50b** mit Verbindung **50c** (Abb.: 82), so hat sich durch den Austausch des Phenylrestes gegen einen 2-Chinaldinyrest die Aktivität auf SmHDAC8 um 35% steigern lassen. Vergleicht man die beiden Substanzen hinsichtlich ihrer inhibitorischen Aktivität auf die HmHDAC8 so wurde die Aktivität um 85% gesteigert. Gründe hierfür können die Änderung der Elektronendichte im Phenylring im Vergleich zum elektronenarmen 2-Chinaldinyringsystems sowie deren unterschiedliche räumliche Ausdehnung sein. Im Verlauf dieser Diskussion wird für die in dieser Arbeit dargestellten Verbindungen deutlich, dass weniger die Elektronendichte im aromatischen System Auswirkung auf die Aktivität hat sondern vorwiegend die sterische Konstitution der verschiedenen Substituenten am Phenylring.

So führt ein 4-Biphenylrest (**50e**) bei den Derivaten der 3-Amido-4-methoxybenzhydroxamsäuren zu einer Steigerung der Aktivität auf die SmHDAC8 um Faktor 2 in Bezug auf Verbindung **50d**, jedoch ein 3-Biphenylrest (**50f**) führt zu einer Verschlechterung der Aktivität um Faktor 2. Nachteilig ist bei Verbindung **50e** die dreifach höhere Aktivität auf das humane Enzym ( $EC_{50}(\text{SmHDAC8}) = 75,4 \pm 25,5 \text{ nM}$ ;  $EC_{50}(\text{HmHDAC8}) = 26,0 \pm 18,0 \text{ nM}$ ).

Die Übertragung dieses Substituenten auf die 3-Amido-4-ethoxybenzhydroxamsäure **50k**, welche eine leichte Präferenz auf die SmHDAC8 aufweist, erzielte den erwünschten Effekt. Die resultierende Verbindung **50l** ist potenter als **50k** mit Beibehaltung der etwas höheren Aktivität gegenüber dem schistosomalen Enzym ( $EC_{50}(\text{SmHDAC8}) = 92,0 \pm 26,0 \text{ nM}$ ;  $EC_{50}(\text{HmHDAC8}) = 149,0 \pm 23,0 \text{ nM}$ ). Die Dockinglösung zeigt für Verbindung **50l** zeigt eine zusätzlich Interaktion zum Pro291 der SmHDAC8, dies könnte die leicht gesteigerte Aktivität gegenüber **50e** erklären. (Abb.: 83)

3.5. Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung der Verbindungen anhand der Proteinstruktur

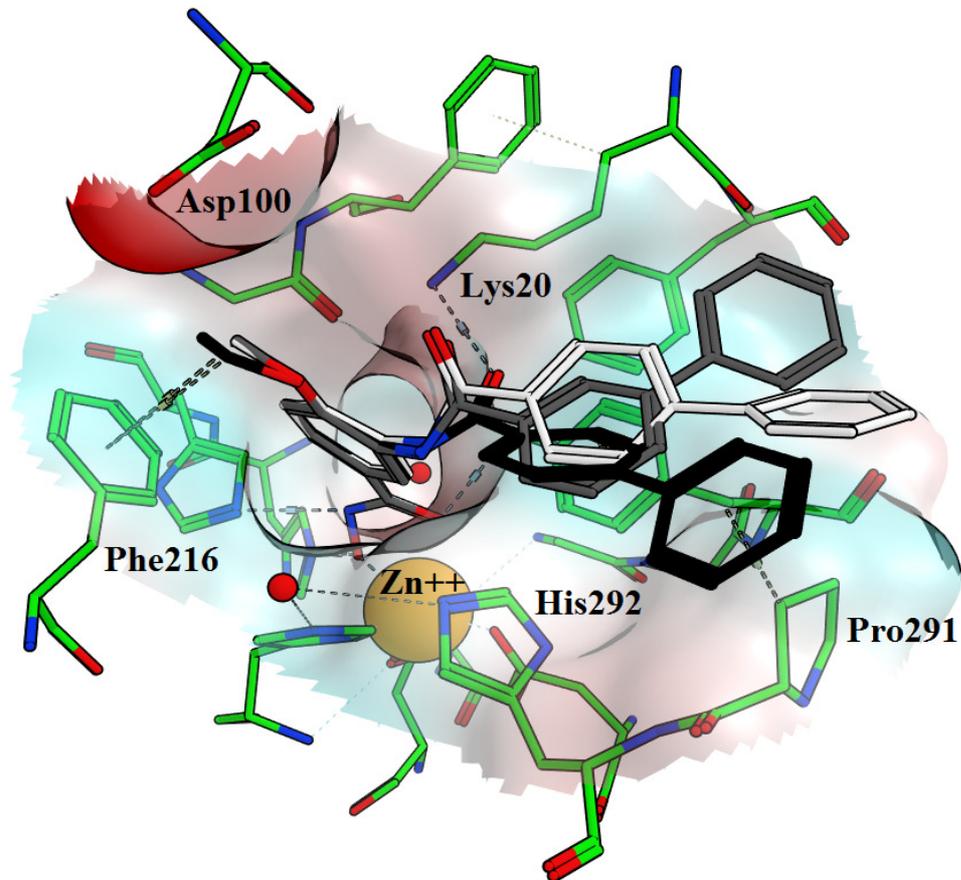


Abbildung 83: Dockinglösungen für die Verbindungen 50e (weiß), 50f (grau) und 50l (schwarz). (SmHDAC8) MOE

In der übergeordneten Klasse der 3-Amido-4-methoxybenzhydroxamsäuren führten Chloratome am zweiten aromatischen Ringsystem nur marginal zur Erhöhung der inhibitorischen Aktivität gegenüber SmHDAC8. Interessant ist, dass Chlor in *para*-Position (**50h**) kaum eine Auswirkung auf die Aktivität besitzt aber in *ortho*-Position (**50i**) zu einer erkennbaren Verminderung der Aktivität führt. Eine Disubstitution von Chlor in der *ortho*- und *para*-Position (**50j**) führt hingegen zu einer gleichwertigen Inhibition von SmHDAC8 in Bezug auf **50d**. Betrachtet man nur die Verbindungen **50h** ( $EC_{50}(\text{SmHDAC8}) = 146,0 \pm 4,3$  nM) und **50i** ( $EC_{50}(\text{SmHDAC8}) = 699,3 \pm 27,4$  nM), so könnte man sterische Ursachen für die unterschiedlichen Aktivitäten verantwortlich machen. Die Größe des Chlorsubstituenten in *ortho*-Position könnte die Drehbarkeit des Phenylrestes einschränken und so die für die Interaktion notwendige Konformation des Moleküls unmöglich machen. Dies wird durch die Ergebnisse von **50j** jedoch nicht bestätigt. Allerdings scheint die Kombination aus *ortho*- und *para*- Substitution ein Schlüssel für die Selektivität zwischen SmHDAC8 und HmHDAC8 darzustellen. Möglicherweise bildet Chlor in *para*-Position eine für die Aktivität wichtige Interaktion zwischen Ligand und Enzym aus. Die Einführung des 4-Biphenylrestes (**50e** und

### 3. Ergebnisse und Diskussion

**50l)** bekräftigt den Vorteil eines lipophilen Substituenten in *para*-Position und kann mit Verbindung **50g** ( $EC_{50}(\text{SmHDAC8}) = 106,0 \pm 17,5 \text{ nM}$ ) bestätigt werden. (Abb.: 84) Der Substituent in *ortho*-Position scheint hierbei eine Rolle bei der Diskriminierung der Substanz bezüglich des schistosomalen und humanen Enzyms einzunehmen.

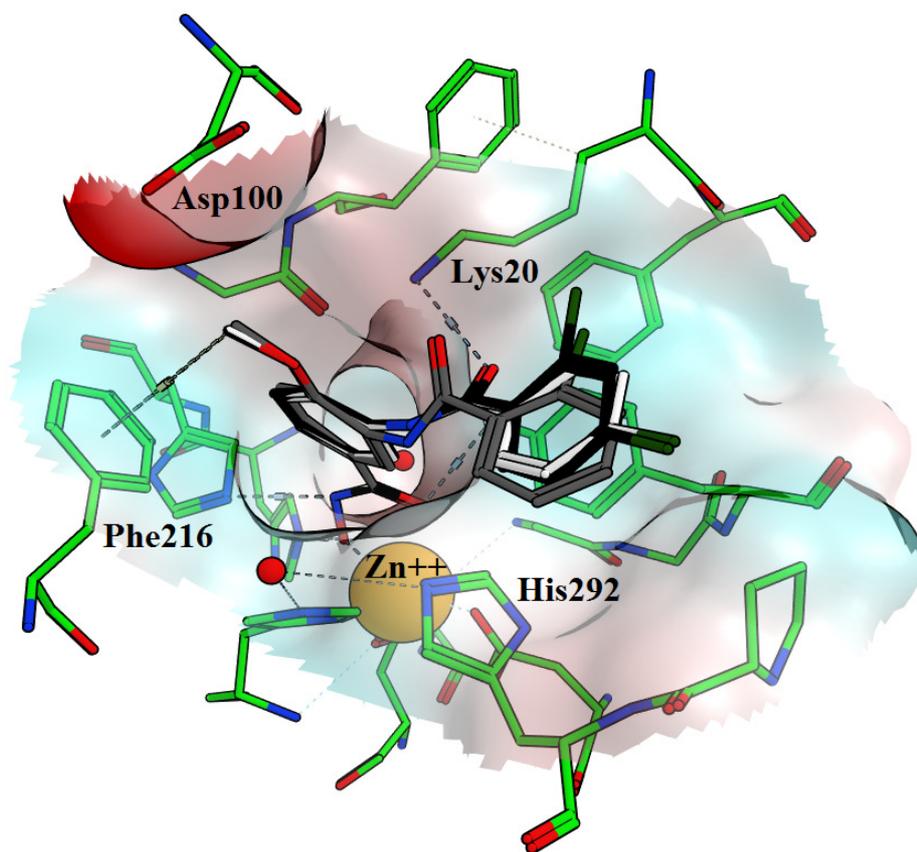


Abbildung 84: Dockinglösungen für die Verbindungen 50h (weiß), 50i (grau) und 50j (schwarz). (SmHDAC8) MOE

Diese Beobachtung kann indirekt auch in der Klasse der 3-Amido-4-chlorbenzhydroxamsäuren gemacht werden. Da alle Derivate in dieser Klasse eine geringere inhibitorische Aktivität gegenüber SmHDAC8 aufweisen als ihre übergeordnete Verbindung **50o** kann die Schlussfolgerung nur indirekt gezogen werden. Vergleicht man **50p** ( $EC_{50}(\text{SmHDAC}) = 234,8 \pm 10,3 \text{ nM}$ ) und **50q** ( $EC_{50}(\text{SmHDAC}) = 147,1 \pm 4,8 \text{ nM}$ ), so erkennt man in Analogie zu **50h** und **50g**, dass der Methoxysubstituent im Vergleich zu Chlor zu höheren Aktivitäten führt. Tauscht man den Methoxyrest gegen einen Phenoxyrest (**50r**), verliert die Verbindung dramatisch an Aktivität, sowohl gegenüber dem schistosomalen als auch dem humanen Enzym. Grund hierfür scheint die Konformation des Moleküls zu sein, welche möglicherweise die Interaktion mit dem Enzym schwächt oder entropisch ungünstige

### 3.5. Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung der Verbindungen anhand der Proteinstruktur

Solvatationseffekte hervorruft, verursacht durch den Phenoxyrest in Position 4. Verbindungen **50s** und **50t** hingegen besitzen im Vergleich zu **50r** eine höhere Aktivität. Vermutlich erlaubt die Substitution in Position 3 eine Interaktion des Phenoxyrestes mit dem Enzym bzw. ermöglicht die flexiblere Benzyloxyseitenkette eine vorteilhaftere Ausrichtung des Moleküls zum Enzym.

Mit der Einführung einer stark elektronenziehenden polaren Nitrogruppe in *para*-Position (**50u**) wird die Aktivität gegenüber SmHDAC8 im Vergleich zu **50o** ebenfalls gesenkt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Klasse der 3-Amido-4-methoxyderivate und 3-Amido-4-ethoxyderivate, sowie die 3-Amido-4-chlorbenzhydroxamsäuren bisher das erfolgreichste Substitutionsmuster der Benzhydroxamsäuren darstellt. Als potenteste Strukturen für die Seitenkette erweisen sich 4-Biphenyl-, 4-Methoxyphenyl- und 2,4-Dichlorphenylsubstituenten. Um diese These zu stützen sind weitere Untersuchungen nötig die auch außerhalb dieser Arbeit durch- und fortgeführt werden. Ebenso sind pharmakokinetische und pharmakodynamische Erwierungen der potenten Verbindung angestrebt und werden bereits für eine der dargestellten Verbindungen durchgeführt.

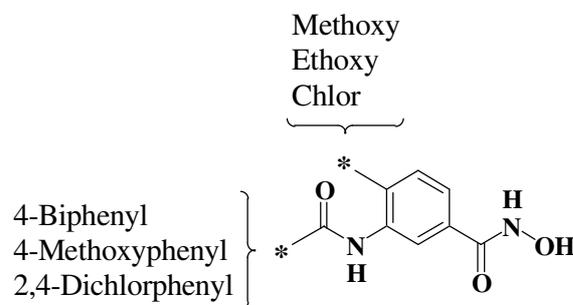


Abbildung 85: Das Substitutionsmuster der 3-Amidobenzhydroxamsäuren mit potentesten und selektivsten Vertretern gegenüber SmHDAC8 und HmHDAC8.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.5.3. Inhibitoren mit unterschiedlichen Grundkörper

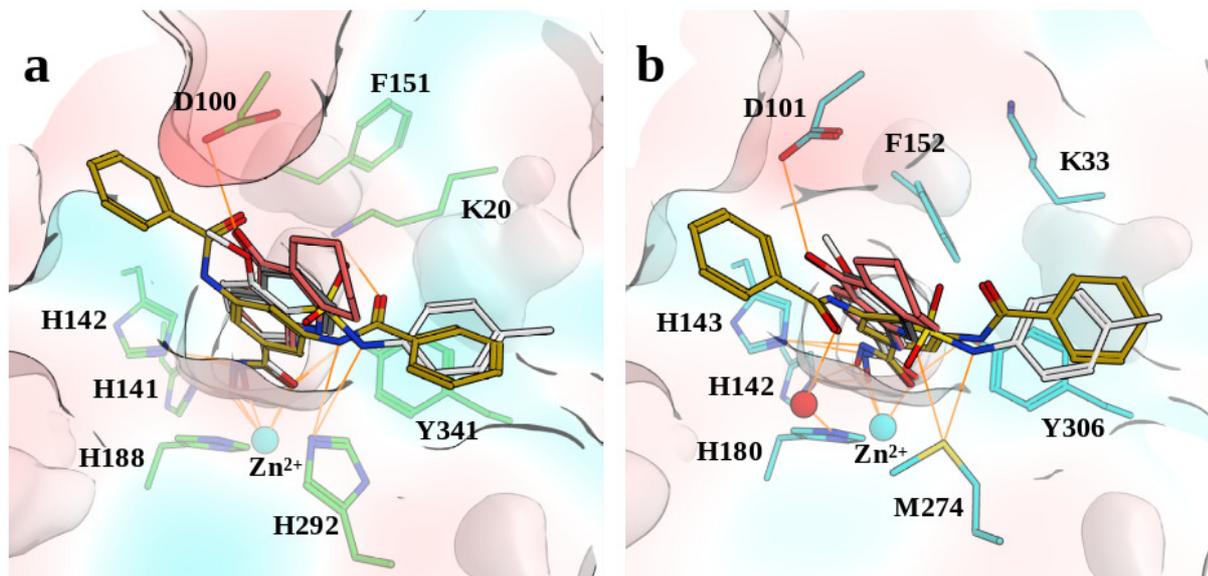


Abbildung 86: Dockinglösungen für die Verbindungen 58 (rosa), 59 (gelb) und 63 (weiß). (a) SmHDAC8 und (b) HmHDAC8. (MOE)

Um die Struktur-Wirkungsbeziehungen dieser Gruppe zu diskutieren und mögliche Erklärungen für ihre unterschiedliche inhibitorische Aktivität auf SmHDAC8 und HmHDAC8 zu geben, wurden ausschließlich Dockinglösungen und die für die jeweilige Substanz dazugehörigen  $EC_{50}$ -Werte genutzt.

Betrachtet man zuerst die Derivate mit abweichendem Grundkörper in Bezug auf die bisher behandelten Verbindungen so ist für alle Verbindungen eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Minderung in der Aktivität gegenüber SmHDAC8 und HmHDAC8 zu verzeichnen.

Das Acridinderivat (**58**) zeigt mit einem  $EC_{50}$ -Wert (SmHDAC8) =  $3,22 \pm 0,38 \mu\text{M}$  eine Minderung um Faktor 2 im Vergleich zu **T5979345**. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich die rigide Struktur des Tetrahydroacridinmoleküls, wodurch eine günstige Ausrichtung innerhalb der Bindetasche unmöglich wird. Verbindung **59** stellt ein symmetrisch disubstituiertes Derivat der 3-Benzamidobenzhydroxamsäuren dar. Die Dockinglösung (Abb.: 86) für diese Verbindung zeigt die für die 3-Benzamidobenzhydroxamsäuren typische Ausrichtung innerhalb der Bindungsregion der beiden Enzyme, wobei der Substituent in Position fünf der Benzhydroxamsäure eine lipophile Region unterhalb von Asp100/Asp101 adressiert. Für das schistosomale Enzym führt dies zu einer Verringerung der inhibitorischen Aktivität, für das humane Enzym zu einer gleichwertigen Aktivität in Bezug auf **T5979345**. In Abbildung 82 ist zu erkennen, dass der Carbonylsauerstoff des Benzamidrestes in Position 5 eine Wasserstoff-

### 3.5. Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung der Verbindungen anhand der Proteinstruktur

brücke über ein Wassermolekül in der Bindetasche mit His180 ausbildet. Dies könnte die höhere inhibitorische Aktivität auf HmHDAC8 erklären.

Verbindung **60** und **61** zeigen ebenfalls deutlich schlechtere Aktivitäten auf die SmHDAC8 und eine Selektivität gegenüber dem humanen Enzym. Grund für die unterschiedlichen Aktivitäten kann das unspezifische Verdrängen von Wasser aus der Bindetasche der Enzyme sein. Aus den Dockinglösungen ist keine gerichtete Interaktion, abgesehen von der Koordination der Hydroxamsäure mit dem Zinkion, zwischen Molekül und Enzym zu erkennen.

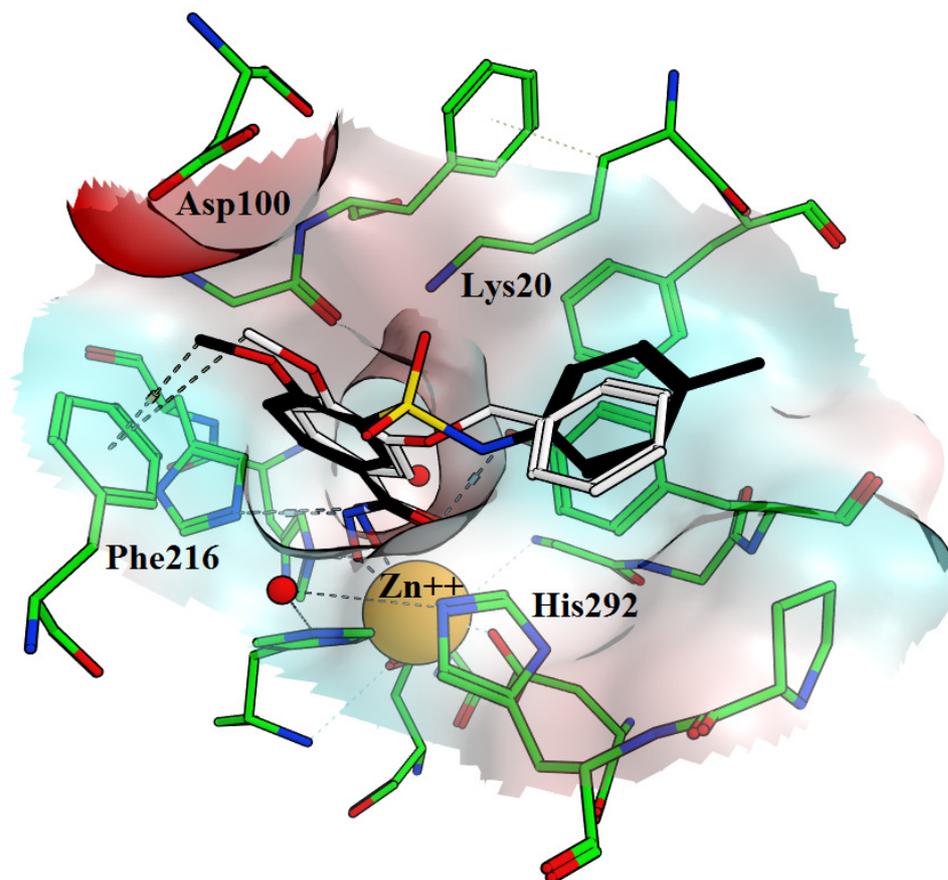


Abbildung 87: Dockinglösungen für die Verbindungen 62 (weiß) und 63 (schwarz). (SmHDAC8) MOE

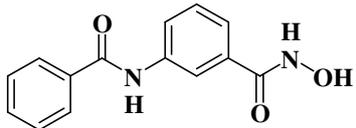
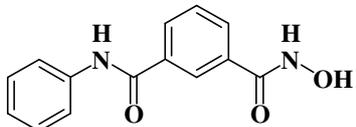
Die Verbindungen **62** und **63** stellen Derivate von **50d** dar. Bezüglich ihrer inhibitorischen Aktivität auf SmHDAC8 sind sie schlechter wirksam als **50d**. Betrachtet man die Aktivität auf HmHDAC8 so sind beide Verbindung deutlich stärker wirksam auf dieses Enzym. In der Abbildung 86 ist eine Interaktion zwischen der Sulfoxygruppe von Verbindung **63** und Met274 zu erkennen, die so im schistosomalen Enzym nicht existieren kann. Womöglich ist dies ein Grund für die gesteigerte Aktivität auf HmHDAC8. Ebenso kann die erhöhte

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Elektronendichte des *para*-Methylphenylrestes mitverantwortlich sein. In Abbildung 87 ist für beide Verbindungen keine Wechselwirkung mit Lys20 und His292 zu erkennen, dies könnte die geringere inhibitorische Aktivität gegenüber der SmHDAC8 im Vergleich zu Verbindung **50d** erklären.

Ein weiterer interessanter Vergleich hinsichtlich ihrer Struktur-Wirkungsbeziehung ergibt sich bei der Betrachtung von Verbindung **64** und **50a**. Verbindung **64** stellt das Derivat von Verbindung **50a** mit inverser Amidstruktur zwischen den beiden aromatischen Ringsystemen dar. Diese Modifikation führt zu einer Erhöhung der inhibitorischen Aktivität um den Faktor 2 sowohl für das schistosomale als auch für das humane Enzym.

Tabelle 14: EC<sub>50</sub>-Werte SmHDAC8 und HmHDAC8 (Fluor de Lys<sup>®</sup>) für **50a** und **64**

Verb.	Strukturformel	EC <sub>50</sub> [μM] SmHDAC8 Fluor de Lys <sup>®</sup>	EC <sub>50</sub> [μM] HmHDAC8 Fluor de Lys <sup>®</sup>
<b>50a</b>		0,47 ± 0,08	0,58 ± 0,05
<b>64</b>		0,22 ± 0,01	0,27 ± 0,05

Eine mögliche Erklärung liegt sehr wahrscheinlich in der unterschiedlichen räumliche Nähe zum Enzym (Lys20) der an den Interaktionen beteiligten Molekülstrukturen (Carbonylsauerstoff) beider Verbindungen.

Die 3-Carboxybenzhydroxamsäure (**65**) sollte als chemische Sonde dienen und eine gerichtete Interaktion zu Lys20 im schistosomalen Enzym forcieren. Mit einem EC<sub>50</sub>-Wert (SmHDAC8) = 1,59 ± 0,19 μM auf SmHDAC8 ist Verbindung **65** ähnlich wirksam wie **T5979345**. Selektive Eigenschaften konnten bisher nicht nachgewiesen werden, da weitere Tests am humanen Enzym noch ausstehen.

### 3.5. Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung der Verbindungen anhand der Proteinstruktur

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Anordnung von Benzhydroxamsäure, kurzem Amidlinker und zweiter aromatischer Ring an sich von Vorteil für die Aktivität auf die Histondesacetylasen ist, jedoch mit Blick auf die Selektivität nur eine äquipotente Hemmung der Enzyme erreicht werden kann. Die Inversion des Amidlinkers (**64**) (Abb.: 88) stellt eine Verbesserung der bisherigen 3-Benzamidobenzhydroxamsäuren dar, konnte aber im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht werden. Sie stellt aber einen guten Ansatz für die weiterführende Entwicklung von potenten und selektiven Histondesacetylaseinhibitoren dar.

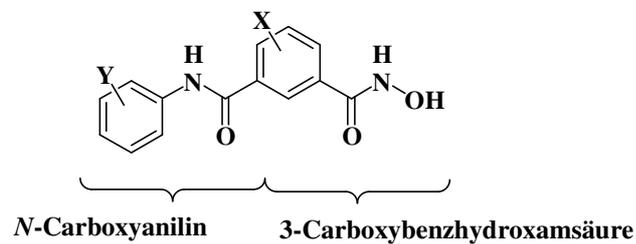


Abbildung 88: Grundkörper für zukünftige Histondesacetylaseinhibitoren.

### 3.6. Versuche über die Toxizität der dargestellten Verbindungen

Die Toxizitätstests der in dieser Arbeit dargestellten Substanzen dienen dazu, eine potentielle Giftigkeit der Substanzen auf die ausgewählten Organismen und Zellen zu bestimmen. Die komplexe Stoffeigenschaft „Toxizität“ hat einerseits eine qualitative Komponente (z. B. Wirkmechanismus oder Organbezug) und andererseits eine quantitative Komponente, die die toxische Potenz des Stoffes (u. a. die Dosis-Wirkungsbeziehung) beschreibt<sup>155</sup>. Die hier ermittelten Daten in Form von Viabilitätsstudien und Inhibitionstests in Abhängigkeit von der Dosis oder Dauer der Exposition durch die gewählte Substanz, können nur einen Aufschluss über die quantitative Komponente wiedergeben. Der Wirkmechanismus, der für die Toxizität auf die jeweilige Zelle oder den behandelten Parasiten ausschlaggebend ist, wurde nicht ermittelt. Ein Vergleich der *in vivo*-Daten mit den Ergebnissen aus den *in vitro*-Experimenten lässt dennoch eine Diskussion über die Eigenschaften der Substanzen als potentielle Wirkstoffe zu.

Tabellen für die durchgeführten Tests und die dazugehörigen Diagramme und Abbildungen können im Anhang nachgeschlagen werden.

#### 3.6.1. Toxizität auf *Schistosoma mansoni*

Die für diese Arbeit stattgefundenen Testungen an *Schistosoma mansoni* wurden in der Arbeitsgruppe von RAYMOND PIERCE in Lille (Centre d'Infection et d'Immunité de Lille) durchgeführt und zur Verfügung gestellt. Die Messung der Toxizität ausgewählter Verbindungen auf *Schistosoma mansoni* wurde auf verschiedenen Wegen realisiert. Zur Messung der Viabilität der Schistosomen wurde das Larvenstadium genommen und mittels *Alamar Blue*<sup>®</sup>-Test die Viabilität nach der Exposition mit einer gewählten Substanz bestimmt. Der *Alamar Blue*<sup>®</sup>-Viabilitätstest bestimmt die metabolische Aktivität und das Redoxpotential der Zelle und kann so zur Messung der Zytotoxizität von Substanzen verwendet werden<sup>156</sup>. Dabei wird der Farbstoff Resazurin verwendet. Resazurin ist ein ungiftiger, wasserlöslicher, blauer Redox-Farbstoff, der bei Reduktion irreversibel zum rosafarbenen, fluoreszierenden Resafurin umgesetzt wird<sup>157</sup> (Abbildung: 81).

### 3.6. Versuche über die Toxizität der dargestellten Verbindungen

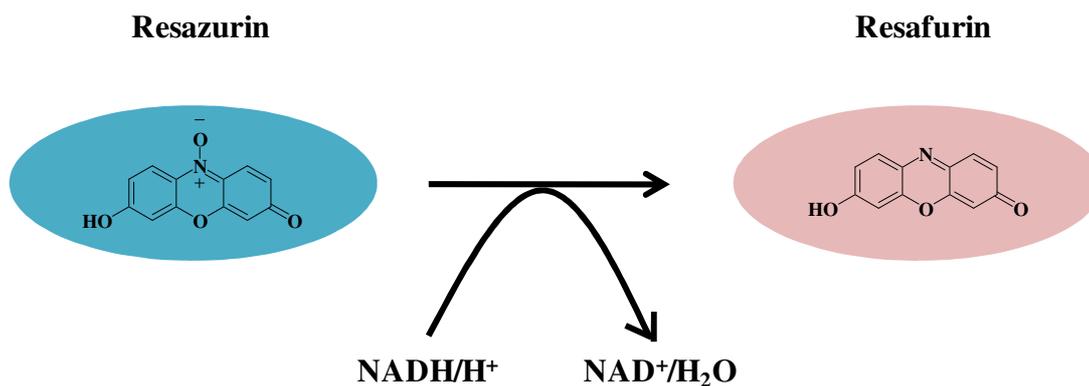


Abbildung 89: Reduktion des Redoxfarbstoffs Resazurin durch NADH/H<sup>+</sup>

Die ausgewählten Verbindungen zeigten bei diesem Test eine mäßige Toxizität auf die Schistosomen. Im Durchschnitt verringerte sich die Viabilität um etwa 35 %. Ein anderer Test, bei dem die mikroskopisch gestützte Auszählung der lebenden beziehungsweise toten Schistosomen zur Anwendung kommt, ergab eine gesteigerte Toxizität für **50e**.

Die Behandlung der juvenilen Schistosomen mit **50e** in einer Konzentration von 10 µM führte nach zwei Tagen zu keinen überlebenden Parasiten. Ein weiterer Aspekt war das Verhalten der adulten Schistosomen während der Geschlechtsreife, da diese als Pärchen auftreten und auch nur in der gepaarten Form fähig zur Fortpflanzung sind. Unter der Behandlung mit **50e** in einer Konzentration von 10 µM waren nach fünf Tagen nur noch 40 % der Schistosomen gepaart. Die abweichenden Ergebnisse der beiden Viabilitätstests können unter anderem durch die unterschiedliche Versuchsdurchführung erklärt werden. Beim *Alamar Blue*<sup>®</sup> Test wurden die Parasiten nur einmal mit der jeweiligen Substanz und *Alamar Blue*<sup>®</sup> inkubiert und nach zwei Tagen das Ergebnis ausgewertet. Im Test mit der optischen Auswertung wurde die Substanz anfangs in das Medium zu den Schistosomen gegeben und täglich halb erneuert, d.h. die Hälfte des Mediums wurde entfernt und wieder mit der halben Menge an Substanz und Medium aufgefrischt. Weiterhin lief dieser Test über zwei Tage. Pharmakokinetikstudien über **50e** haben gezeigt, dass die Halbwertszeit, gemessen in Ratten, mit ca. 30 Minuten, recht gering ist. So ist zu überlegen, ob die Stabilität der Verbindungen bei einmaliger Gabe überhaupt ausreichend ist. Ebenso könnte das Beobachtungsfenster von zwei Tagen zu kurz gewählt sein. Der hier angewendete *Alamar Blue*<sup>®</sup> Test hat noch Optimierungsbedarf und sollte als „medium throughput“-Test als Vortest fungieren.

Im Rahmen von *A-ParaDDisE* wurden einige Substanzen auch hinsichtlich ihrer Wirkung auf andere Parasiten untersucht. Dabei wurden zwei verschiedene Plasmodienstämme und drei

### 3. Ergebnisse und Diskussion

verschiedene Leishmanienstämme mit ausgewählten Substanzen dieser Arbeit inkubiert. Viele der Substanzen (u.a. **50e**) zeigten eine Toxizität gegenüber den Plasmodienstämmen im unteren mikromolaren Bereich und wären durchaus für weitere Testungen in diese Richtung interessant. Gegenüber den Leishmanienstämmen konnte nur im höheren mikromolaren Bereich eine toxische Wirkung beobachtet werden. Für Verbindung **50e** wurden im Lauf dieser Arbeit Negativkontrollen angefertigt um einen zusätzlichen Mechanismus für die gemessene Toxizität auszuschließen, welcher nicht auf die inhibitorische Wirkung der SmHDAC aufbaut.

Hierfür wurden das Carbonsäurederivat (**50e'**) und das Methylbenzoatderivat (**50e''**) untersucht. Beide Verbindungen zeigten *in vitro* und *in vivo* der hier angewendeten Testsysteme keine Aktivität. Von daher ist ein Wirkmechanismus, der auf die Inhibition der SmHDAC8 beruht, wahrscheinlich.

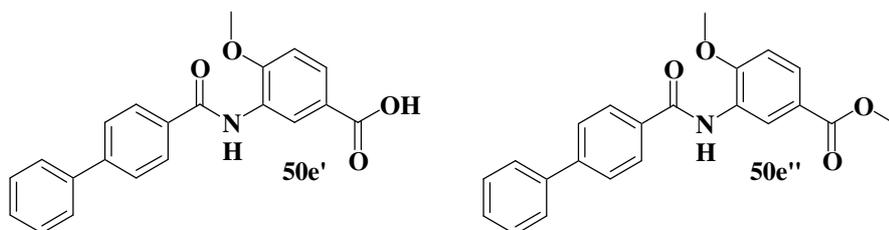


Abbildung 90: Strukturformel des Carbonsäurederivats **50e'** und des Methylbenzoatderivats **50e''**.

#### 3.6.2. Toxizität auf Jurkatzellen, Glioblastomazellen und HEK-Zellen

Die hier vorgestellten Tests an humanen Zelllinien wurden von FRANK ERDMANN am Institut für Pharmazie der Martin-Luther-Universität in Halle durchgeführt. Es sollte untersucht werden ob die dargestellten Verbindungen ebenso einen Effekt auf humane Zellen haben. Die verwendeten Zelllinien sind humane Krebszelllinien (Jurkat und Glioblastoma) aus unterschiedlichen Geweben sowie durch ein Virus immortalisierte, menschliche embryonale Nierenzellen (HEK-Zellen). Die Viabilität wurde ebenfalls mittels *Alamar Blue*<sup>®</sup>-Test ermittelt. Die getesteten Substanzen zeigten überwiegend nur im unteren mikromolaren Bereich eine toxische Wirkung auf die Krebszelllinien. Dies ist konform mit anderen Studien, die die Toxizität von HDAC-Inhibitoren auf Krebszellen untersucht haben. Gegenüber den HEK-Zellen zeigen die untersuchten Substanzen in den entsprechenden Konzentrationen, abgesehen von wenigen Ausnahmen, keine oder nur geringe Toxizität.

### 3.6. Versuche über die Toxizität der dargestellten Verbindungen

#### **3.6.3. Toxizität auf *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae***

Die Zytotoxizitätstests der Substanzen an *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* dienten ebenfalls dazu Hinweise auf eine generelle Toxizität auf Zellen zu erkennen bzw. nach Möglichkeit auszuschließen. Alle hier getesteten Substanzen zeigten unter den jeweiligen Testbedingungen keine Zytotoxizität.

Zusammenfassend können die bisherigen Toxizitätstests positiv bewertet werden. Es gibt Raum für Optimierung hinsichtlich der Tests an *Schistosoma mansoni* und die Einführung weiterer Testsysteme zur Überprüfung der Viabilität (zum Beispiel TTC-Test, MTT- und XTT-Test). Ebenso scheint der Einsatz eines Matrix-Metalloprotease Tests bei den hier aufgeführten Verbindungen sinnvoll. Erste pharmakokinetische Versuche an Ratten zeigen, dass die für diese Versuche verwendete Benzhydroxamsäure keine akute Toxizität besitzt und gut von den Tieren vertragen wurde. Die hohe Bioverfügbarkeit sowie die lange Halbwertszeit ermöglichen Blutkonzentrationen, die für eine Therapie nötig sind. Die Tests an den humanen Zellen können ebenfalls als erfolgreich angesehen werden und lassen auf eine zusätzliche Verwendung der Substanzen hoffen. Vorläufige *in vitro*-Tests an mehreren humanen Histondesacylasen wurden bereits durchgeführt. Auch die Verwendung für andere parasitäre Erkrankungen scheint mit dieser Substanzklasse vielversprechend.

## 4. Zusammenfassung

### 4.1. Zusammenfassung

Betrachtet man die Tatsache, dass die Investitionen in neue therapeutische Ansätze und die Entwicklung neuer Medikamente für viele Erkrankungen nur wenig bzw. nicht die nötige Aufmerksamkeit bekommt (engl.: *neglected diseases*), die in Betracht der großen Zahl an erkrankten Menschen bedeutsam wäre, so stellt die Entwicklung neuer Arzneistoffe in diesem Bereich eine wichtige Säule in der Behandlung dieser Erkrankungen dar. Mit der schistosomalen Histondesacetylase 8 ist ein vielversprechendes Target zur Behandlung der humanen Schistosomiasis gefunden worden.

Durch vorangegangene Arbeiten, im Rahmen einer internationalen Zusammenarbeit von verschiedenen universitären Arbeitsgruppen und Forschungseinrichtungen (*European Unions's Seventh Framework Programme for research, technological development, and demonstration under grant agreements nos. 241865 SEtTReND and nos. 602080 A-ParaDDisE*), konnten mit Hilfe von Röntgenkristallstrukturen und computergestützten Methoden (*in silico*) einige Verbindungen ausgemacht werden, welche sich sowohl als aktiv in *in vitro*-Studien als auch in *in vivo*-Experimenten zeigten. Um die inhibitorische Wirkung dieser Substanzen auf die schistosomale HDAC8 zu steigern und gleichzeitig eine Selektivität zu den humanen Histondesacetylase zu schaffen, wurden zwei dieser Strukturen erwählt um als Startstrukturen für die ligandenbasierte Strukturoptimierung zu fungieren.

Daraus ergaben sich zwei Inhibitorclassen. Zum einen die 3-Aminobenzhydroxamsäuren, welche sich durch ihre hohe inhibitorische Aktivität gegenüber den Histondesacetylase auszeichneten, jedoch eine deutliche Präferenz zu den humanen Enzymen aufwiesen und die 3-Amidobenzhydroxamsäuren, welche ebenfalls im unteren nanomolaren Bereich aktiv waren. Die 3-Aminobenzhydroxamsäuren werden derzeit in fortführenden Projekten hinsichtlich ihrer Eignung in der Krebstherapie untersucht.

Durch Kristallisationsexperimente mit den 3-Amidobenzhydroxamsäuren konnten vier Kristallstrukturen der SmHDAC8 kokristallisiert mit einem Inhibitor erhalten werden. Darauf aufbauend war eine gerichtete Strukturoptimierung möglich, welche durch verbesserte Computersimulationen unterstützt wurde. Es konnte eine praktikable und wirtschaftliche Methode zur Synthese der 3-Amidobenzhydroxamsäuren entwickelt werden, ebenso für kommerziell nicht erhältliche Vorstufen.

Die Ausdehnung des Forschungsprojektes *SEtTReND* zu *A-ParaDDisE* erweiterte die Testung der in dieser Arbeit dargestellten Verbindungen auf zusätzliche Targets. So wurde

nicht nur die Aktivität auf das schistosomale Enzym untersucht sondern ebenso die Eignung der Substanzen als Inhibitoren anderer parasitärer Histondesacetylasen (*Plasmodium falciparum* (Dd2, 3D7), *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* und *Trypanosoma brucei*). In verschiedenen Toxizitätstests erwiesen sich viele der Verbindungen in Konzentrationen die auch in therapeutischen Bereichen liegen würden als wenig bis nicht toxisch. Durch die voranschreitende Strukturoptimierung konnte ein Substitutionsmuster gefunden werden, welches sowohl potente als auch leicht selektive Verbindungen erlaubt. Versuche an lebenden Schistosomen konnten eine Toxizität auf die juvenilen und auf die adulten Lebensstadien zeigen. Bisherige Medikamente zeigten nur eine Wirkung auf die adulten Lebensformen. Die vielversprechendste Verbindung wurde bereits zu pharmakokinetischen Studien an Mäusen verwendet und bewies eine sehr gute Verträglichkeit und hohe Bioverfügbarkeit.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde die Strukturoptimierung mehr in Richtung Bioverfügbarkeit, Halbwertszeit und die Fähigkeit Zellbarrieren zu überwinden ausgerichtet (engl.: *drug like*). Mit der Inversion des Amidlinkers der 3-Amidobenzhydroxamsäuren konnte eine neue strukturelle Optimierung erzielt werden, deren Effekt hinsichtlich Aktivität und Selektivität weiter untersucht werden müsste. Ebenso müssen noch manche der in dieser Arbeit enthaltenen Verbindungen abschließenden und ergänzenden Tests unterzogen werden um ihre Eignung als möglichen Kandidat zur Arzneistoffentwicklung zu prüfen.

Am Ende dieser Arbeit kann durchaus ein positives Resümee gezogen werden. Das Ziel die Optimierung der Startstrukturen hinsichtlich Aktivität und Selektivität konnte erfüllt werden. Es konnte eine große Menge an Daten ( $EC_{50}$ , Halbwertszeit, Bioverfügbarkeit, Toxizität, Röntgenkristallstrukturen) gewonnen werden, die zur Zeit noch nicht alle vollständig ausgewertet sind und es wurden vielversprechende Ansätze für eine weiterführende Forschung auf diesen und auch auf anderen pharmazeutisch wichtigen Gebieten (Krebsforschung, Forschungen am Grippevirus) geschaffen.

## 5. Experimentelle Daten

### 5. Experimentelle Daten

#### 5.1. Materialien und Methoden

##### 5.1.1. Chromatographische Methoden

###### Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Dünnschichtchromatographie diente zur Überwachung von Reaktionsverläufen und zur Prüfung der Reinheit von Zwischen- und Endprodukten sowie zur Charakterisierung der einzelnen Verbindungen durch Bestimmung der  $R_f$ -Werte und Laufverhalten mit den jeweiligen Laufmitteln. Es wurden mit Kieselgel 60 F254-beschichtete Aluminiumplatten der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Substanz wurde in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst bzw. direkt dem Reaktionsgemisch entnommen und auf die DC-Platten aufgetragen. Anschließend wurden diese in Chromatographiekammern unter Kammersättigung entwickelt. Als mobile Phase dienten Standardlaufmittel folgender Zusammensetzungen (V/V).

LM 1: Chloroform/Methanol; 80/20

LM 2: Chloroform/Methanol; 90/10

LM 3: Chloroform

LM 4: Chloroform/Methanol; 80/20; (Zusatz von 0,5 % Triethylamin)

LM 5: Chloroform/Methanol; 80/20; (Zusatz von 0,5 % Trifluoressigsäure)

LM 6: Ethylacetat/Heptan; 50/50

LM 7: Ethylacetat

Detektionsverfahren

Gebrauch von UV-Licht mit der Wellenlänge 254 nm (kurzwellig) und 366 nm (langwellig). Dieses Verfahren der Detektion basiert auf Fluoreszenzlöschung und kam bei allen Substanzen mit aromatischen Ringsystemen zum Einsatz.

Ehrlichs Reagenz diente als Detektionsmittel für primäre aromatische Amine, diese ergeben eine hellgelbe Färbung auf der DC-Platte. Ehrlichs Reagenz ist laut Literatur<sup>158</sup> eine Lösung aus 2 % Dimethylaminobenzaldehyd in 20 %iger Salzsäure. Für den Gebrauch im Labor

wurden 2 g Dimethylaminobenzaldehyd in 50 ml destillierten Wasser suspendiert und anschließend 50 ml konzentrierte Salzsäurelösung (36 %) hinzugegeben.

Eisen-(III)-chloridlösung wurde verwendet um die Hydroxamsäuren zu detektieren. Diese färben sich mit Eisen-(III)-Ionen tief rot bis lila.

Die Säulenchromatographie diente zur Reinigung der Zwischen- und Endprodukte. Als Trennmittel diente Kieselgel 60 (Korngröße: 0,063-0,200 mm) der Firma *Merck* (Darmstadt, Deutschland). Als Elutionsmittel dienten Chloroform und Heptan, sowie Gemische aus Chloroform und Methanol, Heptan und Chloroform sowie Heptan und Ethylacetat. In der Regel wurde die Polarität der Elutionsmittel während der Chromatographie kontinuierlich erhöht. Um den Ansprüchen der jeweiligen Substanzen gerecht zu werden, wurde diesen Gemischen geringe Mengen Triethylamin oder Trifluoressigsäure zugesetzt. Die Detektion erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie. Es kamen drei verschiedene Methoden zum Einsatz:

### Methode 1a

Trocken gepackte Säulen: Die benötigte Kieselgelmenge wurde für ein Verhältnis von 20/1 (mKieselgel/mSubstanzgemisch) berechnet und anschließend trocken und mit Hilfe von angelegtem Unterdruck in die Säule eingefüllt.

### Methode 1b

Trocken gepackte Säulen: Die benötigte Kieselgelmenge wurde für ein Verhältnis von 20/1 (mKieselgel/mSubstanzgemisch) berechnet und anschließend trocken und mit Hilfe von angelegtem Unterdruck in die Säule eingefüllt. Anschließend wurde das Säulenmaterial mit Chloroform/Triethylamin (99 %: 1 %; V/V) konditioniert, diese Methode wurde zur Reinigung der THP-geschützten Zwischenstufen verwendet.

### Methode 2

Eingeschwemmte Säulen: Die benötigte Kieselgelmenge wurde für ein Verhältnis von 100/1 (mKieselgel/mSubstanzgemisch) berechnet und mit dem Elutionsmittel suspendiert und unter kontinuierlichem Elutionsmittelstrom in die Säule eingeschwemmt.

## 5. Experimentelle Daten

Das Auftragen der Proben auf das Säulenmaterial erfolgte nach 2 verschiedenen Varianten.

### Variante 1

Direktes Auftragen: Die Substanz bzw. das Substanzgemisch wird in dem Lösungsmittel aufgenommen, welches die unpolare Komponente des Elutionsmittels darstellt. Das Volumen wird hierbei so gering wie möglich gewählt um eine möglichst schmale Bande der Substanz am Startpunkt der Chromatographie zu gewährleisten.

### Variante 2

Auftragen nach Adsorption: Falls die Substanz nicht nach Variante 1 auf das Säulenmaterial aufgetragen werden kann, z.B. hervorgerufen durch Probleme der Löslichkeit, kann diese in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst werden. Polarität und Volumen können frei gewählt werden. Danach wird Kieselgel in einem Mengenverhältnis von 1/1 (mKieselgel/mSubstanzgemisch) hinzugegeben und das Lösungsmittel anschließend am Rotationsverdampfer unter Vakuum vorsichtig entfernt. Zu niedrige Drücke beim Entfernen des Lösungsmittels können ein spontanes Aufwirbeln des Gemisches verursachen. Das Kieselgel-Substanzgemisch kann anschließend auf das Säulenmaterial aufgebracht werden.

Zum Abschließen der Säule wird Seesand reinst der Firma *Grüssing* (Filsum, Deutschland), vorgeglüht und säurebehandelt aufgegeben um ein Aufwirbeln des Säulenmaterials bei Zugabe des Elutionsmittels zu verhindern.

### **5.1.2. Massenspektrometrie**

#### Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die Proben wurden in einer  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ -Mischung (unterschiedliche Zusammensetzung) gelöst und über eine Spritzenpumpe Havard Apparatus 22 injiziert ( $20 \mu\text{l min}^{-1}$ ). Die Ionisation wurde sowohl positiv als auch negativ im Elektronenspray bei 5,0 kV durchgeführt. Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit einem Ionenfallen-Massenspektrometer Finnigan LCQ-Classical der Firma Thermo Electron (Egelsbach, Deutschland). Das Gerät verfügt über eine beheizbare Kapillare ( $220 \text{ }^\circ\text{C}$ ) und weist eine Flussrate von  $20 \mu\text{l min}^{-1}$  auf.

#### Hochauflösende Massenspektrometrie (HR-MS)

Für die Identitätsbestimmung der Endprodukte wurden Massenspektren mit hoher Auflösung aufgenommen. Die Proben wurden in einer  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ -Mischung (unterschiedliche Zusammensetzung) gelöst und mittels Proxeon-Nano-ESI-Quelle der Firma Thermo Fisher

Scientific (Bremen, Deutschland) bei 1,3 kV ionisiert. Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit einem LTQ-Orbitrap-XL-Massenspektrometer der Firma Thermo Fisher Scientific (Bremen, Deutschland).

#### 5.1.13. NMR-Spektroskopie

$^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden an einem Varian Gemini 2000 (400 MHz für  $^1\text{H}$ -NMR und 100 MHz für  $^{13}\text{C}$ -NMR) und an einem Varian Inova 500 (500 MHz für  $^1\text{H}$ -NMR und 125 MHz für  $^{13}\text{C}$ -NMR) aufgenommen. Als interner Standard diente das verwendete Lösungsmittel. Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren wurden in  $\text{CDCl}_3$  und d-DMSO aufgenommen. Bei den  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurde d-DMSO verwendet.

Die chemische Verschiebung  $\delta$  ist in ppm angegeben und für Signale mit definierten Multiplizitäten auf die Symmetrieachse bezogen. Für Multipletts wurde ein Bereich der chemischen Verschiebung angegeben. Die Signale im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum werden wie folgt zugeordnet: (Multiplizität, Kopplungskonstante J in Hz, Protonenzahl; zugeordnetes Proton (fett, kursiv)).

Für die Multiplizitäten wurden folgende Abkürzungen verwendet: s (Singulett), d (Duplett), t (Triplett), dd (Duplett vom Duplett), m (Multiplett).

#### 5.1.14. Computergestützte Methoden

Das Homolgiemodell der HmHDAC6 wurde mit dem Programm MODELLER erstellt. Die hierbei verwendeten Einstellungen entsprechen denen der Publikation von KANNAN et. al.<sup>104</sup>. Das Docking der Substanzen in die Röntgenkristallstrukturen von SmHDAC8, HmHDAC8, HmHDAC1 und in das Homolgiemodell von HmHDAC6 erfolgte mit Schrödingers Glide. Das hierfür verwendete Protokoll entspricht dem früherer Studien, welches im Rahmen dieses Projektes benutzt wurde. Als Erstes wurde das Protein für das Dockingexperiment mittels den Programm Schrödingers Protein Preparation Wizard vorbereitet. Anschließend wurden Wasserstoffatome hinzugefügt und der Protonierungsstatus angepasst, außerdem wurde eine sogenannte sanfte Minimierung des Systems durchgeführt (engl.: *restrained minimization*). Die Liganden wurden mittels MOE vorbereitet. Dazu wurden diese als neutralgeladene Liganden gedockt. Dieses Docking wurde mehrmals durchgeführt, wobei als Startpunkt verschiedene energieminierte Konformationen des Liganden genutzt wurden. Die Visualisierung der Ergebnisse ebenso die Erstellung von Bildern erfolgte mittels MOE.

## 5.2. Synthese der Verbindungen

### 5.2.1. Darstellung der 3-Aminobenzoensäuren

Zur Darstellung der folgenden Verbindungen werden als Ausgangsstoffe 2 mmol (1 Äq.) der verschiedenen 3-Aminobenzoensäurederivate und 4 mmol (2 Äq.) des entsprechenden Aldehyds bzw. Ketons, in diesen Fall Benzaldehyd oder Cyclohexanon, eingesetzt. Als Lösungsmittel dient Toluol (100 ml). Die Substanzen werden in einem Dreihalskolben gelöst und unter Rückfluss und der Anwendung eines Wasserabscheiders für 1 Stunde erhitzt. Die daraus entstandenen 3-Imino-benzoensäurederivate werden ohne weitere Reinigung zu den entsprechenden Aminen umgesetzt. Dazu wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum bis zur Trockene eingeengt. Hierbei wird auch überschüssiger Aldehyd entfernt. Das Reaktionsgemisch wird anschließend in trockenen THF aufgenommen und mit 4 Äquivalenten Natriumtriacetoxyborhydrid<sup>107</sup> versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur rühren gelassen. Danach wird dem Reaktionsansatz 4 Äquivalente Essigsäure (99,5 %ig) zugesetzt und für weitere 2 Stunden bzw. über Nacht rühren gelassen. Die Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie überwacht (Chloroform/Methanol; 9/1, V/V), das Detektionsmittel war Ehrlichs Reagenz. Zum Abbruch der Reaktion wird diese auf 0°C gekühlt und vorsichtig Wasser hinzugefügt. Danach wird das Gemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum eingeengt, anschließend in Ethylacetat aufgenommen und mit einer 1 molaren Kochsalzlösung gewaschen (3 mal 50 ml). Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie gereinigt (Gradient: Chloroform 100 %, Methanol 0 % bis Chloroform 95 %, Methanol 5 %, V/V).

## 5.2. Synthese der Verbindungen

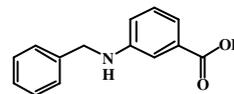
3-*N*-Benzyliminobenzoessäure

MS m/z: 224.17 [M-H]<sup>-</sup>

3-*N*-Benzylaminobenzoessäure

MS m/z: 226.17 [M-H]<sup>-</sup>

Ausbeute: 450 mg; 1,99 mmol; 99,5 %



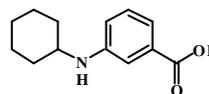
3-(*N*-Cyclohexyl)-iminobenzoessäure (5 mmol)

MS m/z: 216.34 [M-H]<sup>-</sup>

3-(*N*-Cyclohexyl)-aminobenzoessäure

MS m/z: 218.26 [M-H]<sup>-</sup>

Ausbeute: n.b.



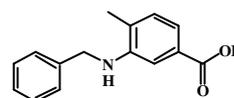
3-*N*-Benzylimino-4-methylbenzoessäure

MS m/z: 238.21 [M-H]<sup>-</sup>

3-*N*-Benzylamino-4-methylbenzoessäure

MS m/z: 240.29 [M-H]<sup>-</sup>

Ausbeute: n.b.



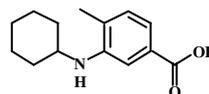
3-(*N*-Cyclohexyl)-imino-4-methylbenzoessäure

MS m/z: 230.26 [M-H]<sup>-</sup>

3-(*N*-Cyclohexyl)-amino-4-methylbenzoessäure

MS m/z: 232.30 [M-H]<sup>-</sup>

Ausbeute: n.b.



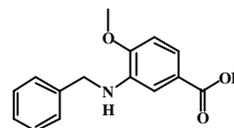
3-*N*-Benzylimino-4-methoxybenzoessäure

MS m/z: 254.22 [M-H]<sup>-</sup>

3-*N*-Benzylimino-4-methoxybenzoessäure

MS m/z: 256.24 [M-H]<sup>-</sup>

Ausbeute: n.b.



## 5. Experimentelle Daten

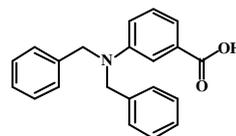
### 5.2.2. Darstellung von 3-*N,N*-Dibenzylaminobenzoessäure

5 mmol der 3-Aminobenzoessäure wird in 100 ml THF gelöst. Danach werden 20 mmol an Benzaldehyd hinzugegeben und unter Rückfluss und unter Benutzung eines Wasserabscheiders 2 Stunden erhitzt. Nach dem Abkühlen wird zum Reaktionsgemisch 20 mmol Natriumtriacetoxyborhydrid<sup>107</sup> gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur rühren gelassen. Anschließend wird 20 mmol Essigsäure (99,5 %) hinzugefügt und über Nacht rühren gelassen. Die Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie überwacht (Chloroform: Methanol; 80 %: 20 %, V/V) und mit Ehrlichs Reagenz. Zum Abbruch der Reaktion wird diese auf 0°C gekühlt und vorsichtig Wasser hinzugefügt. Danach wird das Gemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum eingeeengt, anschließend in Ethylacetat aufgenommen und mit einer 1 molaren Kochsalzlösung gewaschen (3 mal 50 ml). Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie gereinigt (Gradient: Chloroform 100 %, Methanol 0 % bis Chloroform 95 %, Methanol 5 %, V/V).

3-*N,N*-Dibenzylaminobenzoessäure

MS m/z: 216.26 [M-H]<sup>-</sup>

Ausbeute: n.b.



### 5.2.3. Einführung der *tert*-Butyloxycarbonylgruppe

Für die Einführung der *tert*-Butyloxycarbonylgruppe werden die substituierten und unsubstituierten 3-Aminobenzoessäuren (1 Äq.) in einer Mischung aus gleichen Teilen Methanol und *tert*-Butanol (total: 100 ml) gelöst und anschließend 4 Äquivalente an Di-*tert*-butyloxydicarbonat hinzugegeben<sup>159,160,161</sup>. Es wird 6 Stunden bzw. über Nacht bei Raumtemperatur rühren gelassen. Danach wird das Gemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum zur Trockene eingeeengt und mittels Säulenchromatographie gereinigt (Gradient: Chloroform 100 %, Methanol 0 % bis Chloroform 95 %, Methanol 5 %, V/V).

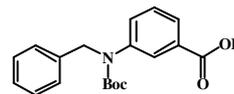
Die 3-*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-benzoessäurederivate werden nach einer anderen Methode gereinigt. Hierbei wird nach Abschluss der Reaktion das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter Vakuum abgezogen und das Reaktionsgemisch anschließend in heißen Toluol aufgenommen. Das Produkt wird heiß filtriert und der Filtrierückstand anschließend am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet.

## 5.2. Synthese der Verbindungen

3-*N*-[Benzyl-(*tert*-butyloxycarbonyl)-amino]-benzoesäure

MS m/z: 326.24 [M-H]<sup>-</sup>

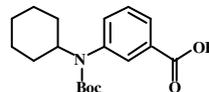
Ausbeute: n.b.



3-*N*-[Cyclohexyl-(*tert*-butyloxycarbonyl)-amino]-benzoesäure

MS m/z: 318.26 [M-H]<sup>-</sup>

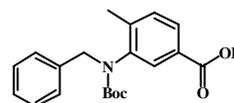
Ausbeute: n.b.



3-*N*-[Benzyl-(*tert*-butyloxycarbonyl)-amino]-4-methylbenzoesäure

MS m/z: 340.25 [M-H]<sup>-</sup>;

Ausbeute: n.b.

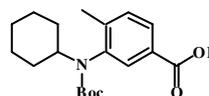


3-*N*-[Cyclohexyl-(*tert*-butyloxycarbonyl)-amino]-4-

methylbenzoesäure

MS m/z: 332.27 [M-H]<sup>-</sup>;

Ausbeute: n.b.

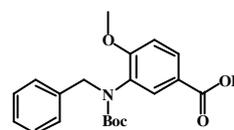


3-*N*-[Benzyl-(*tert*-butyloxycarbonyl)-amino]-4-

methoxybenzoesäure

MS m/z: 356.30 [M-H]<sup>-</sup>;

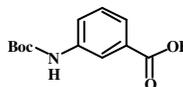
Ausbeute: n.b.



3-*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-aminobenzoic acid

MS m/z: 356.30 [M-H]<sup>-</sup>;

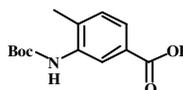
Ausbeute: 1,6 g; 6,75 mmol, 67,5 %



3-*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-amino-4-methylbenzoic acid

MS m/z: 250.17 [M-H]<sup>-</sup>

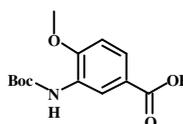
Ausbeute: 1,6 g; 6,37 mmol; 63,7 %



3-*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-amino-4-methoxybenzoic acid

MS m/z: 266.27 [M-H]<sup>-</sup>

Ausbeute: 2,17 g; 8,57 mmol; 85,7 %



#### **5.2.4. Methode zur Darstellung einer Hydroxylaminlösung aus Hydroxylaminhydrochlorid**

Die Herstellung einer frischen Hydroxylaminlösung aus Hydroxylaminhydrochlorid ist Ausgangspunkt jeder Synthese, bei der Hydroxylaminhydrochlorid als Ausgangsstoff diente. Hierbei wird das Hydroxylaminhydrochlorid in Methanol gelöst und zu einer vorher berechneten Menge an Natriummethanolat in Methanol gegeben (10 mmol Hydroxylaminhydrochlorid in 100 ml Methanol). Die Lösung wird vor Gebrauch filtriert.

#### **5.2.5 Methoden zur Darstellung der Hydroxamsäuren**

##### Methode A: Darstellung mittels Thionylchlorid und Hydroxylaminhydrochlorid

Zuerst wird die jeweilige Carbonsäure (1 Äq.) in Diethylether gelöst, danach das Thionylchlorid hinzugegotft (1,5 Äq.) und 30 Minuten unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel und überschüssiges Thionylchlorid am Rotationsverdampfer unter Vakuum abgezogen. Das Gemisch wird in Diethylether aufgenommen und nacheinander das Triethylamin (2 Äq.) und eine frisch hergestellte Hydroxylaminlösung (1,5 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie überwacht (Chloroform: Methanol; 8 %: 2 %, V/V) Als Detektionsmittel dient eine 3 %ige Eisen-(III)-chloridlösung. Für die Reinigung wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter Vakuum abgezogen und das Reaktionsgemisch in Ethylacetat aufgenommen. Es wurde mit 1M HCl-Lösung gewaschen und anschließend die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und zur Trockene am Rotationsverdampfer eingeengt. Anschließend wurde das Produkt mittels Säulenchromatographie gereinigt (Gradient: Chloroform: Methanol; 100 %: 0 % bis 95 %: 5 %, V/V).

##### Methode B: Darstellung mittels Chloroethylformiat und Hydroxylaminhydrochlorid

Zuerst wird die jeweilige Carbonsäure (1. Äq.) in THF gelöst und auf 0°C gekühlt. Danach werden Chloroethylformiat (1,2 Äq.) und Triethylamin (1,3 Äq.) hinzugegeben und 10 Minuten bei 0°C rühren gelassen. Anschließend wird das Gemisch filtriert, das Filtrat zu einer frisch hergestellten Hydroxylaminlösung (1,5 Äq.) hinzugegotft und für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur rühren gelassen. Die Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie überwacht (Chloroform: Methanol; 80 %: 20 %, V/V), Detektionsmittel ist eine 3 %ige Eisen-(III)-chloridlösung. Für die Reinigung wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter Vakuum abgezogen und das Reaktionsgemisch in Ethylacetat aufgenommen. Es wurde

mit 1M HCl-Lösung gewaschen und anschließend die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und zur Trockene am Rotationsverdampfer eingeengt. Anschließend wurde das Produkt mittels Säulenchromatographie gereinigt (Gradient: Chloroform: Methanol; 100 %: 0 % bis 95 %: 5 %, V/V).

Methode C: Darstellung mittels Chloroethylformiat und *O*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-hydroxylamin

Zuerst wird die jeweilige Carbonsäure (1. Äq.) in THF gelöst und auf 0°C gekühlt. Danach werden Chloroethylformiat (1,2 Äq.) und Triethylamin (1,3 Äq.) hinzugegeben und 10 Minuten bei 0°C rühren gelassen. Anschließend wird das Gemisch filtriert und das Filtrat wird zu einem Gemisch aus *O*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-hydroxylamin (1,5 Äq.) und Diisopropylethylamin (1,5 Äq.) in etwas THF hinzugetropft und 4 Stunden bzw. über Nacht bei Raumtemperatur rühren gelassen. Die Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie überwacht. Detektionsmittel ist eine 3 %ige Eisen-(III)-chloridlösung. Für die Reinigung wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter Vakuum abgezogen und das Reaktionsgemisch in Ethylacetat aufgenommen. Es wird anschließend mit 1M Kaliumcarbonatlösung gewaschen und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und zur Trockene am Rotationsverdampfer eingeengt. Danach wird das Produkt mittels Säulenchromatographie gereinigt (Gradient: Chloroform + 0,2 % Triethylamin: Methanol; 100%: 0 % bis 95 %: 5 %, V/V).

Methode D: Darstellung mittels PyBOP<sup>®</sup>, EDC und *O*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-hydroxylamin

Zuerst wird die jeweilige Carbonsäure (1. Äq.) in THF gelöst, anschließend PyBOP<sup>®</sup> (1,2 Äq.) und EDC (1,2 Äq.) hinzugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur rühren gelassen. Im Anschluss wird ein Gemisch aus *O*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-hydroxylamin (1,5 Äq.) und Diisopropylethylamin (1,5 Äq.) in etwas THF hinzugetropft und 4 Stunden bzw. über Nacht bei Raumtemperatur rühren gelassen. Die Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie überwacht (Chloroform: Methanol; 80 %: 20 %, V/V), Detektionsmittel ist eine 3 %ige Eisen-(III)-chloridlösung. Für die Reinigung wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter Vakuum abgezogen und das Reaktionsgemisch in Ethylacetat aufgenommen. Es wurde mit 1M Kaliumcarbonatlösung gewaschen und anschließend die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und zur Trockene

## 5. Experimentelle Daten

am Rotationsverdampfer eingengt. Anschließend wurde das Produkt mittels Säulenchromatographie gereinigt (Gradient: Chloroform + 0,2 % Triethylamin: Methanol; 100 : 0 bis 95 : 5).

### Methode E: Darstellung mittels PyBOP<sup>®</sup> und *O*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)hydroxylamin

Zuerst wird die jeweilige Carbonsäure (1. Äq.) in THF gelöst, anschließend PyBOP<sup>®</sup> (1,2 Äq.) hinzugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur rühren gelassen. Anschließend wird ein Gemisch aus *O*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-hydroxylamin (1,5 Äq.) und Diisopropylethylamin (1,5 Äq.) in etwas THF hinzugetropft und 4 Stunden bzw. über Nacht bei Raumtemperatur rühren gelassen. Die Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie überwacht (Chloroform: Methanol; 80 %: 20 %, V/V), Detektionsmittel ist eine 3 %ige Eisen-(III)-chloridlösung. Für die Reinigung wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter Vakuum abgezogen und das Reaktionsgemisch in Ethylacetat aufgenommen. Es wurde mit 1M Kaliumcarbonatlösung gewaschen und anschließend die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und zur Trockene am Rotationsverdampfer eingengt. Anschließend wurde das Produkt mittels Säulenchromatographie gereinigt (Gradient: Chloroform + 0,2 % Triethylamin : Methanol; 100%: 0 % bis 95 %: 5 %, V/V).

### **5.2.6. Abspaltung der Tetrahydro-2*H*-pyran-2-ylgruppe**

Die *O*-Tetrahydro-2*H*-pyran-2-ylgruppe am stickstoffständigen Sauerstoffatom der Hydroxamsäure ist eine basenstabile Schutzgruppe, welche sich im leicht sauren Medium abspalten lässt. Hierzu werden zwei Methoden aufgeführt.

### Methode 1: Abspaltung der Tetrahydro-2*H*-pyran-2-ylgruppe mit *para*-Toluensulfonsäure

Die jeweilige THP-geschützte Hydroxamsäure wird in THF gelöst und zusammen mit katalytischen Mengen *para*-Toluensulfonsäure bei Raumtemperatur rühren gelassen. Die Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie überwacht (Chloroform: Methanol; 80 %: 20 %, V/V), Detektionsmittel ist eine 3 %ige Eisen-(III)-chloridlösung. Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter Vakuum entfernt und das Gemisch wird säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform + 0,2 % Ameisensäure/Methanol; 100 %: 0 % bis 95 %: 5 %, V/V).

Methode 2: Abspaltung der Tetrahydro-2H-pyran-2-ylgruppe mit Salzsäure

Die jeweilige THP-geschützte Hydroxamsäure wird in THF gelöst und zusammen mit katalytischen Mengen konzentrierter Salzsäure bei Raumtemperatur rühren gelassen. Die Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie überwacht (Chloroform : Methanol; 80 % : 20 %, V/V). Detektionsmittel ist eine 3 %ige Eisen-(III)-chloridlösung. Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter Vakuum entfernt und das Gemisch wird Säulenchromatographisch gereinigt (Gradient: Chloroform + 0,2 % Ameisensäure/Methanol; 100 %: 0 % bis 95 %: 5 %, V/V).

**5.2.7. Darstellung der 3-N-(tert-Butyloxycarbonyl)-benzhydroxamsäuren**

Die 3-N-(tert-Butyloxycarbonyl)-benzoesäuren werden in diesem Syntheseschritt in ihre entsprechenden Benzhydroxamsäurederivate überführt. Die Darstellung erfolgte über einer der oben genannten Methoden.

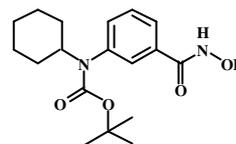
**51a (TH32boc)**

Methode: B

3-(N-tert-Butyloxycarbonyl-N-cyclohexyl)-aminobenzhydroxamsäure

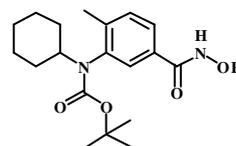
MS m/z: 333.27 [M-H]<sup>-</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.26 (s, 1H, -HN-OH), 9.02 (s, 1H, -NH-OH), 7.69 – 7.64 (m, 1H, Ar<sub>C4</sub>-H), 7.46 – 7.39 (m, 2H, Ar<sub>C2/5</sub>-H), 7.24 – 7.19 (m, 1H, Ar<sub>C6</sub>-H), 3.92 (t, J = 12.0 Hz, 1H, -N-CH-), 1.83 – 1.74 (m, 2H, N-CH-CH<sub>2</sub>-), 1.72 – 1.64 (m, 2H, N-CH-CH<sub>2</sub>-), 1.54 – 1.46 (m, 1H, -CH<sub>2</sub>-), 1.28 (s, 9H, -(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.25 – 1.19 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 1.10 – 0.98 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 0.93 – 0.80 (m, 1H, -CH<sub>2</sub>-).

**51b (TH35boc)**

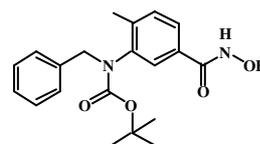
Methode: B

3-(N-tert-Butyloxycarbonyl-N-cyclohexyl)-amino-4-methylbenzhydroxamsäure

MS m/z: 348.44 [M-H]<sup>-</sup>**51c (TH34boc)**

Methode: B

3-(N-tert-Butyloxycarbonyl-N-benzyl)-amino-4-methylbenzhydroxamsäure

MS m/z: 355.30 [M-H]<sup>-</sup>

## 5. Experimentelle Daten

### 51d (TH42boc)

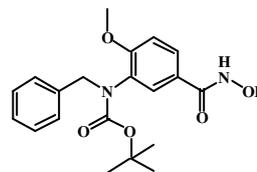
Methode: B

3-(*N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-*N*-benzyl)-amino-4-methoxybenzhydroxamsäure

MS m/z: 371.30 [M-H]<sup>-</sup>

Ausbeute: 530 mg; 1,42 mmol; 25,5 %

HR-MS m/z: 281.1134 [M-H]<sup>-</sup>; berechnet für C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>-</sup>: 281.1143



### 53 (TH40)

Methode: D und 1

3-(*N*-*tert*-Butyloxycarbonyl)-aminobenzhydroxamsäure

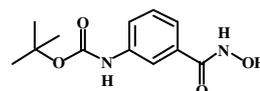
MS m/z: 351.30 [M-H]<sup>-</sup>

HPLC: rt 8,42 min (97,07 %)

Ausbeute: 40 mg; 0,16 mmol; 8 %

HR-MS m/z: 251.1030 [M-H]<sup>-</sup>; berechnet für C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>: 251.1037

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.08 (s, 1H, -HN-OH), 9.44 (s, 1H, -NH-OH), 7.88 (s, 1H, Ar<sub>C2</sub>-H), 7.50 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, Ar-H), 7.30 – 7.24 (m, 2H, Ar-H), 1.46 (s, 9H, -(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).



### 54 (TH44)

Methode: D und 1

3-(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-4-methylbenzhydroxamsäure

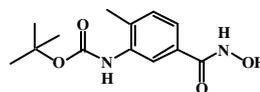
MS m/z: 265.24 [M-H]<sup>-</sup>

HPLC: rt 9,62 min (97,22 %)

Ausbeute: 15 mg; 0,06 mmol; 3 %

HR-MS m/z: 265.1187 [M-H]<sup>-</sup>; berechnet für C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>: 265.1194

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.97 (s, 1H, Ar<sub>C2</sub>-H), 7.41 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, Ar<sub>C6</sub>-H), 7.08 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, Ar<sub>C5</sub>-H), 6.58 (s, 1H, -CONH-Ar), 2.19 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>), 1.46 (s, 9H, -(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).



### 55 (TH41)

Methode: D und 1

3-(*N*-*tert*-Butyloxycarbonyl)-amino-4-methoxybenzhydroxamsäure

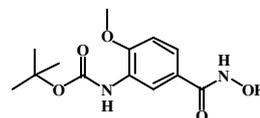
MS m/z: 281.20 [M-H]<sup>-</sup>

HPLC: rt 8,35 min (98,20 %)

Ausbeute: 55 mg; 0,2 mmol; 10 %

HR-MS m/z: 281.1134 [M-H]<sup>-</sup>; berechnet für C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>-</sup>: 281.1143

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 11.01 (s, 1H, -HN-OH), 8.84 (s, 1H, -NH-OH), 8.36 (s, 1H, Ar<sub>C2</sub>-H), 7.52 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Ar<sub>C6</sub>-H), 7.02 (s, 1H, -CONH-Ar), 6.80 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, Ar<sub>C5</sub>-H), 3.84 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>), 1.49 (d, *J* = 10.7 Hz, 9H, -(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).



**5.2.8. Darstellung der 3-Aminobenzhydroxamsäuren**

Zur Darstellung der 3-Aminobenzhydroxamsäuren aus ihren Vorstufen den 3-*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-benzhydroxamsäuren werden diese in einem Gemisch aus konzentrierter Trifluoressigsäure und Dichlormethan gelöst (1: 4, V/V) und eine Stunde bei Raumtemperatur rühren gelassen<sup>162</sup>. Die Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie überwacht (Chloroform: Methanol; 80 %: 20 %, V/V), Detektionsmittel ist eine 3 %ige Eisen-(III)-chloridlösung. Nachdem die Boc-Schutzgruppe vollständig abgespalten ist, wird die Reaktion auf 0°C gekühlt und vorsichtig eine 1M Kaliumcarbonatlösung hinzugetropft, bis die wässrige Phase einen pH-Wert zwischen 4 und 5 aufweist. Die organische Phase wird abgetrennt, mit einer 1M-Natriumchloridlösung gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer unter Vakuum zur Trockene eingengt. Anschließend wurde das Produkt mittels Säulenchromatographie gereinigt (Gradient: Chloroform/Methanol; 100/0 bis 95/5, V/V).

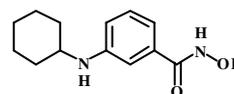
**52a (TH32)**3-(*N*-Cyclohexyl)-aminobenzhydroxamsäureMS m/z: 233.36 [M-H]<sup>-</sup>

HPLC: rt 5,67 min (96,62 %)

Ausbeute: 25 mg; 0,11 mmol; 2,2 %

HR-MS m/z: 235.1442 [M+H]<sup>+</sup>; berechnet für C<sub>13</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>: 235.1441

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.96 (s, 1H, -HN-OH), 8.83 (s, 1H, -NH-OH), 7.15 – 7.09 (m, 1H, Ar-H), 7.09 – 7.02 (m, 1H, Ar-H), 6.89 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, Ar-H), 6.80 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, Ar-H), 6.68 – 6.62 (m, 1H, -NH-Ar), 5.56 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-NH-Ar), 1.95 – 1.84 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 1.74 – 1.64 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 1.62 – 1.54 (m, 1H, -CH<sub>2</sub>-), 1.37 – 1.06 (m, 6H, -CH<sub>2</sub>-).

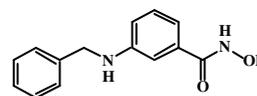
**52b (TH28)**3-*N*-BenzylaminobenzhydroxamsäureMS m/z: 241.29 [M-H]<sup>-</sup>

HPLC: rt 7,02 min (95,07 %)

Ausbeute: 7 mg; 0,03 mmol; 1,5 %

HR-MS m/z: 243.1130 [M+H]<sup>+</sup>; berechnet für C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>: 243.1128;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.95 (s, 1H, -HN-OH), 8.83 (s, 1H, -NH-OH), 7.38 – 7.24 (m, 4H, Ar-H), 7.20 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.06 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar-H), 6.95 (s, 1H, Ar-H), 6.84 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, Ar-H), 6.66 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 6.41 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, Ar-H), 4.27 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-).



## 5. Experimentelle Daten

### 52c (TH35)

3-(*N*-Cyclohexyl)-amino-4-methylbenzhydroxamsäure

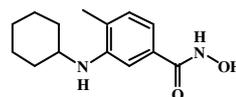
MS m/z: 249.03 [M+H]<sup>+</sup>

HPLC: rt 6,70 min (95,18 %)

Ausbeute: 140 mg; 0,56 mmol; 11,2 %

HR-MS m/z: 249.1598 [M+H]<sup>+</sup>; berechnet für C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>: 249.1598

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10.99 (s, 1H, -HN-OH), 8.81 (s, 1H, -NH-OH), 6.99 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, Ar-**H**), 6.90 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H, Ar-**H**), 6.87 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, Ar-**H**), 2.08 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>), 1.98 – 1.90 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 1.77 – 1.69 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 1.66 – 1.58 (m, 1H, -CH<sub>2</sub>-), 1.41 – 1.11 (m, 6H, -CH<sub>2</sub>-).



### 52d (TH34)

3-*N*-Benzylamino-4-methylbenzhydroxamsäure

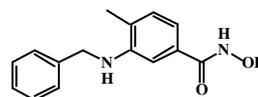
MS m/z: 255.33 [M-H]<sup>-</sup>;

HPLC: rt 7,87 min (99,23 %)

Ausbeute: 145 mg; 0,57 mmol; 11,4 %

HR-MS m/z: 255.1133 [M-H]<sup>-</sup>; berechnet für C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>: 255.1139;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.88 (s, 1H, -HN-OH), 8.75 (s, 1H, -NH-OH), 7.38 – 7.24 (m, 4H, Ar'-**H**), 7.24 – 7.14 (m, 1H, Ar'<sub>C4</sub>-**H**), 6.99 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar<sub>C6</sub>-**H**), 6.85 (dd, *J* = 7.6, 1.5 Hz, 1H, Ar<sub>C5</sub>-**H**), 6.79 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, Ar<sub>C2</sub>-**H**), 5.72 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-NH-Ar), 4.38 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-NH-Ar), 2.16 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>).



### 52e (TH42)

3-*N*-Benzylamino-4-methoxybenzhydroxamsäure

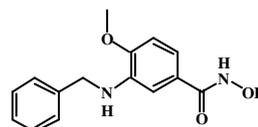
MS m/z: 271.34 [M-H]<sup>-</sup>

HPLC: rt 7,42 min (98,29%)

Ausbeute: 160 mg; 0,6 mmol; 10%

HR-MS m/z: 273.1235 [M+H]<sup>+</sup>; berechnet für: C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>: 273.1234<sup>+</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.83 (s, 1H, -HN-OH), 8.70 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, -NH-OH), 7.35 – 7.24 (m, 4H, Ar-**H**), 7.23 – 7.14 (m, 1H, Ar-**H**), 7.00 – 6.94 (m, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H), 6.85 – 6.80 (m, 2H, Ar-**H**), 5.61 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-NH-Ar), 4.34 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 3.83 (s, 3H, Ar-O-CH<sub>3</sub>).



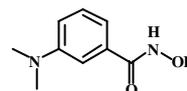
### 5.2.9. Darstellung der 3-*N,N*-Dibenzylaminobenzhydroxamsäure und 3-*N,N*-Dimethylaminobenzhydroxamsäure

Zur Darstellung dieser beiden Hydroxamsäuren wurden die jeweiligen Carbonsäuren nach Methode F behandelt und im Anschluss mittels Methode 2 in ihre Hydroxamsäuren überführt.

**56 (TH36)**3-*N,N*-DimethylaminobenzhydroxamsäureMS m/z: 181.13 [M+H]<sup>+</sup>

HPLC: rt 2,31 min (95,41%)

Ausbeute: 90 mg; 0,5 mmol; 50%

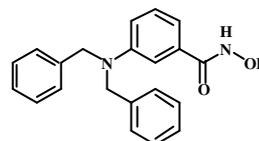
HR-MS m/z: 181.0973 [M+H]<sup>+</sup>; berechnet für C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>: 181.0972<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO) δ 11.07 (s, 1H, -HN-OH), 7.24 – 7.19 (m, 1H, Ar-H), 7.05 (s, 1H, Ar-H), 7.00 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, Ar-H), 6.84 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar-H), 2.92 (s, 6H, -N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).**57 (TH72)**

3-Dibenzylaminobenzhydroxamsäure

MS m/z: 331.29 [M-H]<sup>-</sup>

HPLC: rt 13,35 min (95,68%)

Ausbeute: 110 mg; 0,33 mmol

HR-MS m/z: 333.1599 [M-H]<sup>-</sup>; berechnet für: C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>: 333.1598<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.99 (s, 1H, -HN-OH), 8.84 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, -NH-OH), 7.37 – 7.27 (m, 4H, Ar-H), 7.27 – 7.16 (m, 6H, Ar-H), 7.10 (dd, *J* = 16.8, 8.8 Hz, 2H, Ar-H), 6.92 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, Ar-H), 6.76 (dd, *J* = 8.2, 2.3 Hz, 1H, Ar-H), 4.70 (s, 4H, -N-(CH<sub>2</sub>-Ar)<sub>2</sub>).**5.2.10. Darstellung verschiedener Hydroxamsäuren aus kommerziell erhältlichen Carbonsäuren**

Zur Darstellung dieser Hydroxamsäuren wurden die jeweiligen Carbonsäuren nach Methode E behandelt und im Anschluss mittels Methode 1 bzw. 2 in ihre Hydroxamsäuren überführt.

**60**

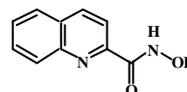
Methode: E und 1

Chinaldin-2-hydroxamsäure

MS m/z: 189.11 [M+H]<sup>+</sup>

HPLC: rt 8,70 min (96,06%)

Ausbeute: 65 mg; 0,35 mmol; 35%

HR-MS m/z: 189.0657 [M+H]<sup>+</sup>; berechnet für C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>: 189.0659<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ (bs, 1H, -HN-OH), 8.53 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, Ar<sub>C4</sub>-H), 8.10 – 8.02 (m, 3H, Ar-H), 7.88 – 7.80 (m, 1H, Ar<sub>C6</sub>-H), 7.73 – 7.65 (m, 1H, Ar<sub>C7</sub>-H).

## 5. Experimentelle Daten

### 61

Methode: E und 1

4,5,6,7-Tetrahydrobenzothiophen-2-hydroxamsäure

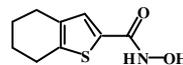
MS m/z: 196.27 [M-H]<sup>-</sup>

HPLC: rt 9,97 min (98,15%)

Ausbeute: 35 mg; 0,18 mmol; 18%

HR-MS m/z: 220,0403 [M+Na]<sup>+</sup>; berechnet für C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>SNa<sup>+</sup>: 220.0403

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.53 (s, 1H, -HN-OH), 8.94 (s, 1H, -NH-OH), 7.19 (s, 1H, Ar<sub>C3</sub>-H), 2.83 (d, J = 6.0 Hz, 2H, -C7H<sub>2</sub>-), 2.64 (d, J = 5.8 Hz, 2H, -C4H<sub>2</sub>-), 1.63 (dd, J = 9.8, 6.8 Hz, 4H, -C4/5H<sub>2</sub>-).



### 62

Methode: E und 2

3-Benzyloxy-4-methoxybenzhydroxamsäure

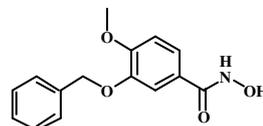
MS m/z: 274.04 [M+H]<sup>+</sup>

HPLC: rt 10,85 min (98,46%)

Ausbeute: 110 mg; 0,4 mmol; 40,25%

HR-MS m/z: 274.1073 [M+H]<sup>+</sup>; berechnet für C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup>: 274.1074

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.03 (s, 1H, -HN-OH), 8.87 (s, 1H, -NH-OH), 7.47 – 7.41 (m, 3H, Ar-H), 7.41 – 7.35 (m, 3H, Ar-H), 7.35 – 7.29 (m, 1H, Ar-H), 7.01 (d, J = 8.4 Hz, 1H, Ar-H), 5.09 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-Ar), 3.79 (s, 3H, Ar-O-CH<sub>3</sub>).



### 63

Methode: E und 2

3-(4-Methylphenylsulfonamido)-4-methoxy-benzhydroxamsäure

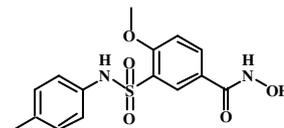
MS m/z: 335.32 [M-H]<sup>-</sup>;

HPLC: rt 8,24 min (99,51%)

Ausbeute: 25 mg; 0,075 mmol; %

HR-MS m/z: 337.0855 [M+H]<sup>+</sup>; berechnet für: C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S<sup>+</sup>: 337.0853

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.25 (s, 1H, -HN-OH), 9.87 (s, 1H, -Ar-NH-SO<sub>2</sub>), 8.98 (s, 1H, -NH-OH), 8.13 (s, 1H, Ar<sub>C2</sub>-H), 7.90 (d, J = 7.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.20 (d, J = 8.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.03 – 6.87 (m, 4H, Ar-H), 4.03 – 3.83 (m, 3H, Ar-O-CH<sub>3</sub>), 2.12 (s, 3H, Ar<sup>t</sup>-CH<sub>3</sub>).



**3.5.11. Darstellung bestimmter 3-Amino-4-alkoxybenzoesäuremethylester**

Für die Darstellung kommerziell nicht verfügbarer substituierter 3-Amino-4-alkoxybenzoesäureester wurde der Grundkörper im Labor synthetisiert. Als Ausgangsstoff dienen die jeweiligen *para*-Alkoxybenzoesäuren.

Darstellung der *para*-Alkoxybenzoesäuremethylester

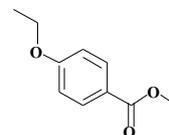
Zur Darstellung der *para*-Alkoxybenzoesäuremethylester werden die *para*-Alkoxybenzoesäuren (1 Äq.) in Methanol (50 – 100 ml) gelöst und auf 0°C gekühlt. Anschließend wird vorsichtig Thionylchlorid hinzugegeben, das Gemisch auf Raumtemperatur erwärmen gelassen, und danach für 30 Minuten unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie überwacht (Chloroform: Methanol; 80 %: 20 %, V/V). Anschließend wird das Lösungsmittel und überschüssiges Thionylchlorid am Rotationsverdampfer unter Vakuum abgezogen, das Reaktionsgemisch in Ethylacetat aufgenommen und mit 1M Natriumhydroxid-Lösung gewaschen (3 mal 50 ml). Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und im Anschluss mittels Säulenchromatographie gereinigt (Gradient: Chloroform: Methanol; 100 %: 0 % bis 95 %: 5 %, V/V).

**41**

4-Ethoxybenzoesäuremethylester

MS m/z: 181.21 [M-H]<sup>-</sup>

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.94 – 7.80 (m, 2H, Ar<sub>C2/6</sub>-H), 7.08 – 6.93 (m, 2H, Ar<sub>C3/5</sub>-H), 4.15 – 4.02 (m, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3.79 (s, 3H, Ar-COOCH<sub>3</sub>), 1.32 (t, J = 7.0 Hz, 3H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).

Darstellung der 3-Nitro-4-alkoxybenzoesäuremethylester

Zur Darstellung der 3-Nitro-4-alkoxybenzoesäuremethylester werden die *para*-Alkoxybenzoesäuremethylester auf 0°C gekühlt und eine auf 0°C gekühlte Nitriersäure hinzugegeben. Die Reaktion wird für 1 Stunde ohne weitere Kühlung rühren gelassen. Anschließend wird Eis hinzugegeben und das Reaktionsgemisch über einer Fritte mit Saugflasche und Vakuum abgezogen. Das Produkt wird mit Wasser gewaschen und anschließend am Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet, danach wird aus heißem Ethanol umkristallisiert. Die ausfallenden Nadeln werden über einer Fritte mit Saugflasche und Vakuum abgezogen und mit kaltem Ethanol gewaschen. Eine weitere Reinigung ist nicht nötig.

## 5. Experimentelle Daten

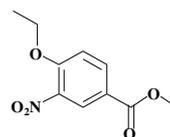
Zur Herstellung der Nitriersäure legt man die Salpetersäure (68 %ig) vor und fügt unter Kühlen und Rühren langsam die Schwefelsäure (konz.) hinzu. Für 10 mmol *para*-Alkoxybenzoesäuremethylester benötigt man 1 ml Salpetersäure (15 mmol) und 1,2 ml Schwefelsäure.

### 42a

4-Ethoxy-3-nitrobenzoesäuremethylester

MS m/z: 225.99 [M+H]<sup>+</sup>;

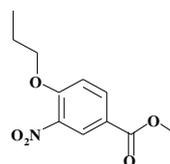
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  8.33 (s, 1H, Ar<sub>C2</sub>-H), 8.15 (s, 1H, Ar<sub>C6</sub>-H), 7.45 (s, 1H, Ar<sub>C5</sub>-H), 4.29 (s, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3.83 (s, 3H, Ar-COOCH<sub>3</sub>), 1.33 (s, 3H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).



### 42b

4-Propoxy-3-nitrobenzoesäuremethylester

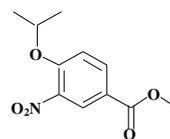
MS m/z: 239.91 [M+H]<sup>+</sup>



### 42c

4-Isopropoxy-3-nitrobenzoesäuremethylester

MS m/z: 239.88 [M+H]<sup>+</sup>

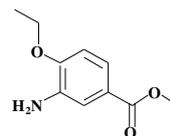


Darstellung der 3-Amino-4-alkoxybenzoesäuremethylester

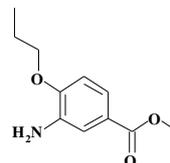
Zur Darstellung der 3-Amino-4-alkoxybenzoesäuremethylester werden die 3-Nitro-4-alkoxybenzoesäuremethylester (1 Äq.) in einer Mischung aus Methanol und 1M Salzsäure-Lösung (4/1, V/V) gelöst, mit Eisenspänen (10 Äq.) versetzt und für eine Stunde unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie überwacht (Chloroform: Methanol; 8 %: 2 %, V/V), das Detektionsmittel ist Ehrlichs Reagenz. Anschließend wird das Reaktionsgemisch filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer unter Vakuum eingeeengt. Das Gemisch wird in Ethylacetat aufgenommen und mit einer 1M Natriumcarbonatlösung gewaschen. Die wässrige Phase wird auf einen pH-Wert zwischen 4-5 eingestellt. Danach wird das Produkt mittels Säulenchromatographie gereinigt (Gradient: Chloroform: Methanol; 100 %: 0 % bis 95 %: 5 %, V/V).

**43'a**

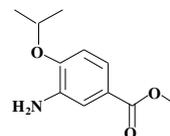
4-Ethoxy-3-aminobenzoesäuremethylester

MS m/z: 196.05 [M+H]<sup>+</sup>**43'b**

4-Propoxy-3-aminobenzoesäuremethylester

MS m/z: 210.09 [M+H]<sup>+</sup>**43'c**

4-Isopropoxy-3-aminobenzoesäuremethylester

MS m/z: 209.93 [M+H]<sup>+</sup>

## 5. Experimentelle Daten

### 3.5.12. Darstellung der 3-Aminobenzoessäuremethylester

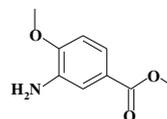
Zur Darstellung der 3-Aminobenzoessäuremethylester werden die 3-Aminobenzoensäuren (1 Äq.) in Methanol (50 – 100 ml) gelöst und auf 0°C gekühlt, anschließend wird vorsichtig Thionylchlorid hinzugegeben, Gemisch auf Raumtemperatur erwärmen gelassen und danach wird 30 Minuten unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie überwacht. Anschließend wird das Lösungsmittel und überschüssiges Thionylchlorid am Rotationsverdampfer unter Vakuum abgezogen, das Reaktionsgemisch in Ethylacetat aufgenommen und mit 1M Natriumhydroxidlösung gewaschen (3 mal 50 ml). Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und anschließend mittels Säulenchromatographie gereinigt (Gradient: Chloroform: Methanol; 100 %: 0 % bis 95 %: 5 %, V/V).

3-Amino-4-methoxybenzoessäuremethylester

MS m/z: 182.23 [M+H]<sup>+</sup>

Ausbeute: 3,64 g ; 19,97 mmol; 99,8 %

<sup>1</sup>H NMR: (400 MHz, DMSO) δ 7.26 (d, J = 2.0 Hz, 1H, Ar<sub>C2</sub>-H), 7.20 (dd, J = 8.4, 2.1 Hz, 1H, Ar<sub>C6</sub>-H), 6.86 (d, J = 8.4 Hz, 1H, Ar<sub>C5</sub>-H), 5.01 (s, 2H, Ar-NH<sub>2</sub>), 3.81 (s, 3H, Ar-COOCH<sub>3</sub>), 3.75 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>).



### 3.5.13. Esterhydrolyse der 3-Amidobenzoessäuremethylester

Zur Hydrolyse der Methylester werden die 3-Amidobenzoessäuremethylester in Methanol (50 – 100 ml) gelöst, mit einer berechneten Menge an 1M Natriumcarbonatlösung (10 Äq.) oder 1M Natriumhydroxidlösung (10 Äq.) versetzt und je nach Verlauf der Reaktion bei Raumtemperatur bzw. unter Rückfluss erhitzt rühren gelassen. Die Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie überwacht (Chloroform: Methanol; 80 %: 20 %, V/V). Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter Vakuum abgezogen, das Reaktionsgemisch in Ethylacetat aufgenommen und mit 1M Salzsäurelösung gewaschen (3 mal 50 ml). Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und anschließend mittels Säulenchromatographie gereinigt (Gradient: Chloroform: Methanol; 100 %: 0 % bis 95 %: 5 %, V/V).

### 3.5.14. Methoden zur Darstellung der 3-Amidobenzoensäuren

#### Methode I: Darstellung mittels Thionylchlorid

Zur Darstellung der 3-Amidobenzoensäuren bzw. 3-Amidobenzoessäuremethylester wird die Carbonsäurekomponente, die im weiteren Verlauf der Reaktion die Amidbindung eingeht, mit Thionylchlorid in das entsprechende Carbonsäurechlorid überführt. Zuerst wird die

120

Carbonsäure (2 Äq.) auf 0°C gekühlt und anschließend das Thionylchlorid (3 Äq.) hinzugegeben. Danach wird das Reaktionsgemisch vorsichtig unter Rückfluss erhitzt bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten ist. Anschließend wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum das überschüssige Thionylchlorid abgezogen und das verbliebene Säurechlorid in trockenem THF aufgenommen. Dieses wird zu einem Gemisch aus der jeweiligen 3-Amidobenzoessäure (1 Äq.) bzw. dem 3-Amidobenzoessäuremethylester (1 Äq.) zusammen mit Triethylamin (3 Äq.) gelöst in THF getropft und für 4 Stunden bzw. über Nacht rühren gelassen. Die Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie überwacht (Chloroform: Methanol; 80 %: 20 %, V/V), das Detektionsmittel ist Ehrlichs Reagenz. Zur Reinigung wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer unter Vakuum abgezogen, anschließend wieder in Ethylacetat aufgenommen und mit 1M Natriumcarbonatlösung gewaschen (3 mal 50 ml). Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer unter Vakuum zur Trockene eingengt und anschließend mittels Säulenchromatographie gereinigt (Gradient: Chloroform: Methanol; 100 %: 0 % bis 95 %: 5 %, V/V).

### Methode II: Darstellung mittels PyBOP<sup>®</sup>

Zur Darstellung der 3-Amidobenzoessäuremethylester wird die Carbonsäurekomponente, die im weiteren Verlauf der Reaktion die Amidbindung eingeht, mit PyBOP<sup>®</sup> aktiviert. Zuerst wird die Carbonsäure (1,5 Äq.) in THF gelöst. Anschließend werden PyBOP<sup>®</sup> (1,8 Äq.) und DIPEA (2 Äq.) hinzugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur rühren gelassen. Danach wird der jeweilige 3-Aminobenzoessäuremethylester gelöst in THF hinzugegeben und 4 Stunden bzw. über Nacht rühren gelassen. Die Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie überwacht (Gradient: Chloroform: Methanol; 80 %: 20 %, V/V), das Detektionsmittel ist Ehrlichs Reagenz. Die Reinigung des Reaktionsgemisches erfolgt wie unter Methode I beschrieben.

### Methode III: Darstellung mittels Benzoylchlorid

Zur Darstellung der 3-Amidobenzoessäuren, bzw. 3-Amidobenzoessäuremethylester wird der jeweilige 3-Aminobenzoessäuremethylester (1 Äq.) zusammen mit DIPEA (3 Äq.) in THF gelöst, anschließend wird Benzoylchlorid (2 Äq.) hinzugegeben und 4 Stunden bzw. über Nacht rühren gelassen. Die Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie überwacht (Gradient: Chloroform: Methanol; 80 %: 20 %, V/V), das Detektionsmittel ist Ehrlichs Reagenz. Die Reinigung des Reaktionsgemisches erfolgt wie unter Methode I beschrieben.

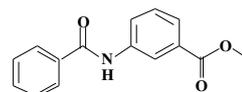
## 5. Experimentelle Daten

### 22a

Aktivierung: Methode I

3-Benzamidobenzoensäuremethylester

MS m/z: 256.02 [M+H]<sup>+</sup>;



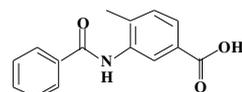
### 23b

Aktivierung: Methode II

3-Benzamido-4-methylbenzoensäure

MS m/z: 254.23 [M-H]<sup>-</sup>;

Ausbeute: 140 mg; 0,55 mmol; 55 %



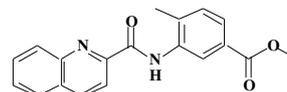
### 22c

Aktivierung: Methode II

3-(Chinaldin-2-carboxamido)-4-methylbenzoensäuremethylester

MS m/z: 321.18 [M+H]<sup>+</sup>;

Ausbeute: 255 mg; 0,8 mmol; 80 %

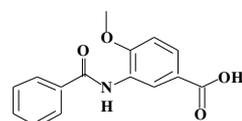


### 23d

Aktivierung: Methode II

3-Benzamido-4-methoxybenzoensäure

MS m/z: 270.23 [M-H]<sup>-</sup>;



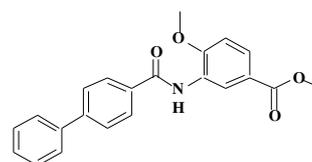
### 22e

Aktivierung: Methode I

3-(4-Biphenyl)-amido-4-methoxybenzoensäuremethylester

MS m/z: 360.32 [M-H]<sup>-</sup>

Ausbeute: 900 mg; 2,49 mmol; 71,2 %

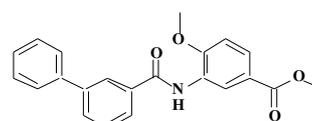


### 22f

Aktivierung: Methode I

3-(3-Biphenyl)-amido-4-methoxybenzoensäuremethylester

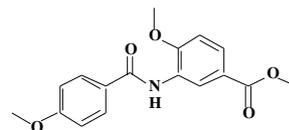
Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung umgesetzt.



**22g**

Aktivierung: Methode II

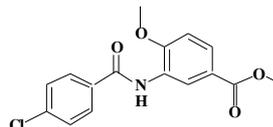
3-(4-Methoxyphenyl)-amido-4-methoxybenzoesäuremethylester

MS m/z: 338.32 [M+Na]<sup>+</sup>;**22h**

Aktivierung: Methode II

3-(4-Chlorphenyl)-amido-4-methoxybenzoesäuremethylester

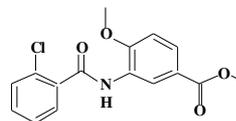
Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung umgesetzt.

**22i**

Aktivierung: Methode I

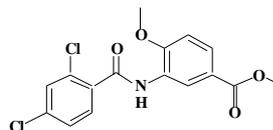
3-(2-Chlorphenyl)-amido-4-methoxybenzoesäuremethylester

Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung umgesetzt.

**22j**

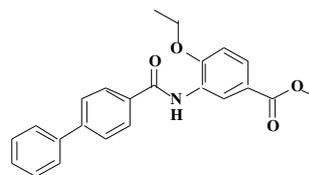
Aktivierung: Methode I

3-(2,4-Dichlorphenyl)-amido-4-methoxybenzoesäuremethylester

MS m/z: 353.95 [M+H]<sup>+</sup>;**22l**

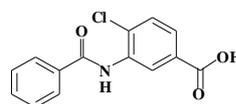
Aktivierung: Methode I

3-(4-Biphenyl)-amido-4-ethoxybenzoesäuremethylester

MS m/z: 375.95 [M+H]<sup>+</sup>;**23o**

Aktivierung: Methode II

3-Benzamido-4-chlorbenzoesäure

MS m/z: 274.13 [M-H]<sup>-</sup>

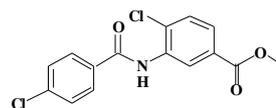
## 5. Experimentelle Daten

### 22p

Aktivierung: Methode I

3-(4-Chlorphenyl)-amido-4-chlorbenzoesäuremethylester

Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung umgesetzt.

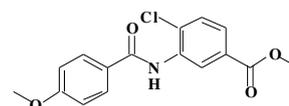


### 22q

Aktivierung: Methode II

3-(4-Methoxyphenyl)-amido-4-chlorbenzoesäuremethylester

Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung umgesetzt.

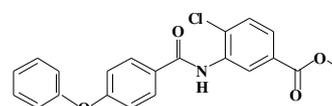


### 22r

Aktivierung: Methode II

3-(4-Phenoxyphenyl)-amido-4-chlorbenzoesäuremethylester

Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung umgesetzt.

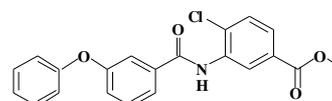


### 22s

Aktivierung: Methode II

3-(3-Phenoxyphenyl)-amido-4-chlorbenzoesäuremethylester

Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung umgesetzt.

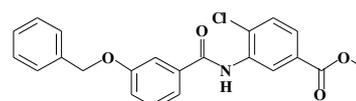


### 22t

Aktivierung: Methode II

3-(3-Benzoylphenyl)-amido-4-chlorbenzoesäuremethylester

Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung umgesetzt.

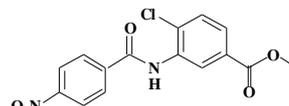


### 22u

Aktivierung: Methode I

3-(4-Nitrophenyl)-amido-4-chlorbenzoesäuremethylester

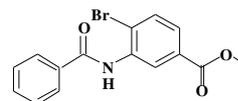
Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung umgesetzt.



**22v**

Aktivierung: Methode III

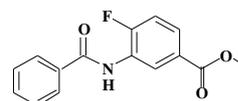
3-Benzamido-4-brombenzoesäuremethylester

MS m/z: 335.94 [M+H]<sup>+</sup>;**22w**

Aktivierung: Methode II

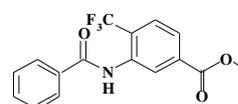
3-Benzamido-4-Fluorbenzoesäuremethylester

Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung umgesetzt.

**22x**

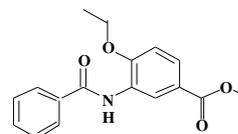
Aktivierung: Methode III

3-Benzamido-4-trifluormethylbenzoesäuremethylester

MS m/z: 322.42 [M-H]<sup>-</sup>;**43a**

Aktivierung: Methode III

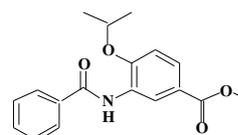
3-Benzamido-4-ethoxybenzoesäuremethylester

MS m/z: 298.23 [M-H]<sup>-</sup>;**43b**

Aktivierung: Methode III

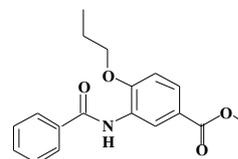
3-(Benzamido-4-isopropoxy)benzoesäuremethylester

Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung umgesetzt.

**43c**

Aktivierung: Methode III

3-Benzamido-4-propoxybenzoesäuremethylester

MS m/z: 312.23 [M-H]<sup>-</sup>;**3.5.15. Darstellung des 3-(N-Phenyl)-carboxamidobenzoessäuremethylesters**

Zur Darstellung des 3-(N-Phenyl)-carboxamidobenzoessäuremethylesters dient der kommerziell erhältliche 3-Carbonsäurebenzoesäuremethylester als Ausgangsstoff. Dazu wird dieser in Anilin gelöst und auf 0°C gekühlt. Anschließend wird vorsichtig Thionylchlorid

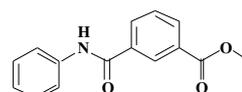
## 5. Experimentelle Daten

hinzugetropft. Danach wird das Reaktionsgemisch vorsichtig unter Rückfluss erhitzt bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten ist. Im Anschluss wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum das überschüssige Thionylchlorid und Anilin abgezogen. Das Gemisch wird in Ethylacetat aufgenommen und mit einer 1M Natriumcarbonatlösung gewaschen (3 mal 25 ml). Die organische Phase wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum zur Trockene eingengt und das Produkt anschließend mittels Säulenchromatographie gereinigt (Gradient: Chloroform: Methanol; 100 %: 0 % bis 95 %: 5 %, V/V).

TH97AE

3-(*N*-Phenyl)-carboxamidobenzoessäuremethylester

Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung umgesetzt.



### 3.5.16. Darstellung von 9-Oxo-5,6,7,8-tetrahydroacridin-3-carbonsäure

Zur Darstellung der 9-Oxo-5,6,7,8-tetrahydroacridin-3-carbonsäure wird 2-Aminoterephthalsäure (1 Äq.) zusammen mit Cyclohexanon (1 Äq.) in Diphenylether gelöst und auf 230°C unter Rückfluss erhitzt. Danach wird stündlich Cyclohexanon (1. Äq.) hinzugetropft. Die Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie überwacht, Detektionsmittel ist Ehrlichs Reagenz. Anschließend wird die Reaktion auf Raumtemperatur erkalten gelassen und überschüssiges Cyclohexanon am Rotationsverdampfer unter Vakuum abgezogen. Anschließend wird das Reaktionsgemisch für weitere 6 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Produkt über einer Fritte und Saugflasche mittels Vakuum abgezogen und mit Heptan gewaschen (3 mal 50 ml). Eine weitere Reinigung ist nicht notwendig.

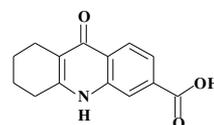
27

9-Oxo-5,6,7,8-tetrahydroacridin-3-carbonsäure

MS m/z: 242.26 [M-H]<sup>-</sup>

Ausbeute: 6,15 g; 25 mmol; 91,5 %

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 13.22 (s, 1H, -NH-), 11.50 (s, 1H, Ar-COOH), 8.19 – 8.04 (m, 2H, Ar-H), 7.69 (dd, *J* = 8.4, 1.6 Hz, 1H, Ar-H), 2.75 – 2.66 (m, 2H, -C8-H<sub>2</sub>), 2.43 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, C5-H<sub>2</sub>), 1.83 – 1.62 (m, 4H, C6/7-H<sub>2</sub>).

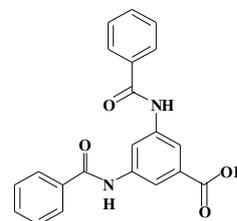


**3.5.17. Darstellung von 3,5-bis-Benzamidobenzoessäure**

Zur Darstellung der 3,5-bis-Benzamidobenzoessäure wird Benzoessäure zusammen mit Triethylamin in THF gelöst und auf 0°C gekühlt. Danach wird das Chloroethylformiat hinzugetropft und 15 Minuten rühren gelassen. Im Anschluss wird das Gemisch filtriert, das Filtrat direkt in eine Lösung aus 3,5-Diaminbenzoessäure in THF geleitet und bei Raumtemperatur rühren gelassen. Die Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie überwacht, Detektionsmittel ist Ehrlichs Reagenz. Danach wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter Vakuum abgezogen und das Reaktionsgemisch mittels Säulenchromatographie gereinigt (Gradient: Chloroform: Methanol; 100 %: 0 % bis 95 %: 5 %, V/V).

**24**

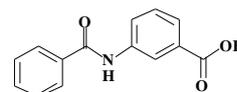
3,5-bis-Benzamidobenzoessäure

MS m/z: 359.26 [M-H]<sup>-</sup>**3.5.17. Darstellung der 3-Amidobenzoessäuren**

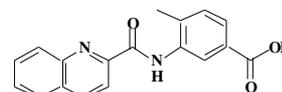
Die Darstellung der 3-Amidobenzoessäuren erfolgt aus ihren 3-Amidobenzoessäuremethylestern mittels Esterhydrolyse (Absatz: 3.5.13. Esterhydrolyse der 3-Amidobenzoessäuremethylester).

**23a**

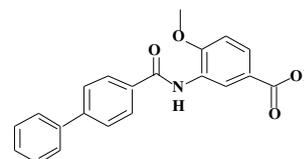
3-Benzamidobenzoessäure

MS m/z: 240.19 [M-H]<sup>-</sup>**23c**

3-(Chinaldin-2-carboxamido)-4-methylbenzoessäure

MS m/z: 305.23 [M+H]<sup>+</sup>**23e**

3-(4-Biphenyl)-amido-4-methoxybenzoessäure

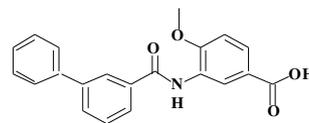
MS m/z: 346.21 [M-H]<sup>-</sup>

## 5. Experimentelle Daten

### 23f

3-(3-Biphenyl)-amido-4-methoxybenzoesäure

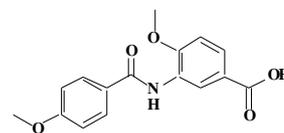
MS m/z: 346.21 [M-H]<sup>-</sup>



### 23g

3-(4-Methoxyphenyl)-amido-4-methoxybenzoesäure

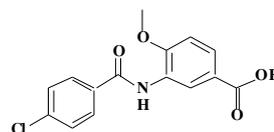
Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung umgesetzt.



### 23h

3-(4-Chlorphenyl)-amido-4-methoxybenzoesäuremethylester

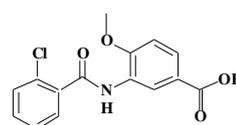
MS m/z: 304.17 [M-H]<sup>-</sup>



### 23i

3-(2-Chlorphenyl)-amido-4-methoxybenzoesäure

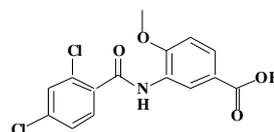
Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung umgesetzt.



### 23j

3-(2,4-Dichlorphenyl)-amido-4-methoxybenzoesäure

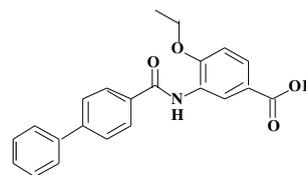
MS m/z: 338.09 [M-H]<sup>-</sup>



### 23l

3-(4-Biphenyl)-amido-4-ethoxybenzoesäure

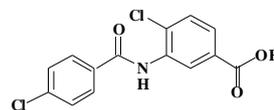
MS m/z: 360.26 [M+H]<sup>+</sup>



### 23p

3-(4-Chlorphenyl)-amido-4-chlorbenzoesäure

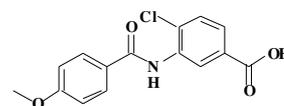
Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung umgesetzt.



### 23q

3-(4-Methoxyphenyl)-amido-4-chlorbenzoesäure

Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung umgesetzt.

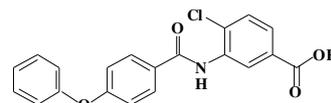


## 5.2. Synthese der Verbindungen

### 23r

3-(4-Phenoxyphenyl)-amido-4-chlorbenzoesäure

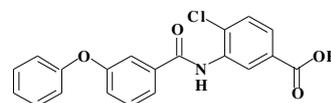
Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung umgesetzt.



### 23s

3-(3-Phenoxyphenyl)-amido-4-chlorbenzoesäure

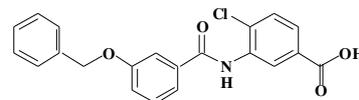
Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung umgesetzt.



### 23t

3-(3-Benzoylphenyl)-amido-4-chlorbenzoesäure

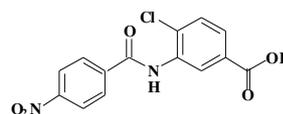
Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung umgesetzt.



### 23u

3-(4-Nitrophenyl)-amido-4-methoxybenzoesäure

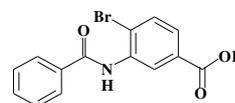
Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung umgesetzt.



### 23v

3-Benzamido-4-brombenzoesäure

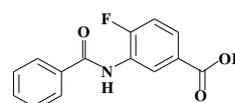
MS m/z: 318.10 [M-H]<sup>-</sup>



### 23w

3-Benzamido-4-Fluorbenzoesäure

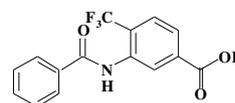
MS m/z: 258.16 [M-H]<sup>-</sup>



### 23x

3-Benzamido-4-trifluormethylbenzoesäure

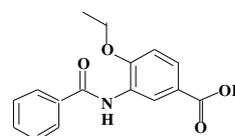
MS m/z: 308.24 [M-H]<sup>-</sup>



### 44a

3-Benzamido-4-ethoxybenzoesäure

MS m/z: 284.19 [M-H]<sup>-</sup>

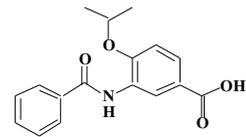


## 5. Experimentelle Daten

### 44b

3-Benzamido-4-isopropoxybenzoesäure

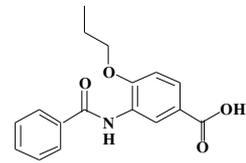
Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung umgesetzt.



### 44c

3-Benzamido-4-propoxybenzoesäure

MS m/z: 298.23 [M-H]<sup>-</sup>



**3.5.18. Darstellung der 3-Amidobenzhydroxamsäuren**

Die 3-Amidobenzhydroxamsäuren wurden direkt aus den jeweiligen 3-Amidobenzoensäuren oder über die Zwischenstufe der *O*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-3-amidobenzhydroxamsäuren dargestellt.

**50a** (TH31)

Methode: B

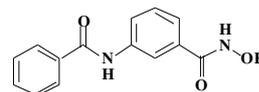
3-Benzamidobenzhydroxamsäure

MS *m/z*: 255.23 [M-H]<sup>-</sup>HPLC: *rt* 9,88min (86,11%)

Ausbeute: 20 mg; 0,08 mmol; 4 %

HR-MS *m/z*: 257.0923 [M+H]<sup>+</sup>; berechnet für: C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>: 257.0921

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.11 (s, 1H, -NH-OH), 9.47 (s, 1H, -CONH-Ar), 9.02 (s, 1H, -NH-OH), 8.22 – 8.15 (m, 1H, Ar-H), 8.02 – 7.87 (m, 3H, Ar-H), 7.64 – 7.47 (m, 3H, Ar-H), 7.47 – 7.33 (m, 2H, Ar-H).

**50b** (TH33)

Methode: B

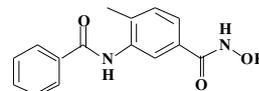
3-Benzamido-4-methylbenzhydroxamsäure

MS *m/z*: 269.25 [M-H]<sup>-</sup>HPLC: *rt* 9,83 min (96,67%)

Ausbeute: 35 mg; 0,13 mmol; 6,5 %

HR-MS *m/z*: 271.1079 [M+H]<sup>+</sup>; berechnet für: C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>: 271.1077

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO) δ 11.17 (s, 1H, -NH-OH), 9.97 (s, 1H, -CONH-Ar), 8.97 (s, 1H, -NH-OH), 8.00 – 7.95 (m, 2H, Ar-H), 7.77 (s, 1H, Ar-H), 7.62 – 7.50 (m, 4H, Ar-H), 7.34 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Ar-H), 2.26 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>).

**50c** (TH60)

Methode: E und 1

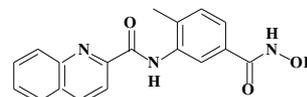
3-(Chinaldin-2-amido)-4-methylbenzhydroxamsäure

MS *m/z*: 320.03 [M-H]<sup>-</sup>HPLC: *rt* 13,00 min (97,95%)

Ausbeute: 180 mg; 0,59 mmol; 59%

HR-MS *m/z*: 322.1186 [M+H]<sup>+</sup>; berechnet für: C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>: 322.1186

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.18 (s, 1H, -NH-OH), 10.54 (s, 1H, -CONH-Ar), 8.97 (s, 1H, -NH-OH), 8.65 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, Ar-H), 8.31 – 8.23 (m, 2H, Ar-H), 8.21 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, Ar-H), 8.13 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.96 – 7.86 (m, 1H, Ar-H), 7.79 – 7.72 (m, 1H, Ar-H), 7.51 (dd, *J* = 7.9, 1.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.37 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, Ar-H), 2.40 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>).



## 5. Experimentelle Daten

### 50d (TH39)

Methode: B

3-Benzamido-4-methoxybenzhydroxamsäure

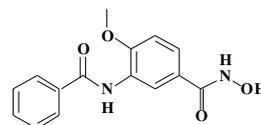
MS m/z: 285.31 [M-H]<sup>-</sup>

HPLC: rt 10,28 min (96,31%)

Ausbeute: 70 mg; 0,25 mmol; 12,5 %

HR-MS m/z: 287.1028 [M+H]<sup>+</sup>; berechnet für: C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>: 287.1026

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.09 (s, 1H, -NH-OH), 9.53 (s, 1H, -CONH-Ar), 8.90 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, -NH-OH), 8.17 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, Ar<sub>C2</sub>-H), 7.99 – 7.92 (m, 2H, Ar-H), 7.65 – 7.56 (m, 2H, Ar-H), 7.55 – 7.49 (m, 2H, Ar-H), 7.14 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, Ar-H), 3.87 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>).



### 50e (TH65)

Methode: E und 2

3-(4-Biphenylamido)-4-methoxybenzhydroxamsäure

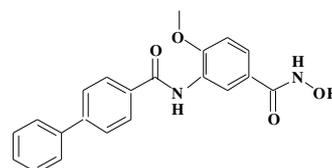
MS m/z: 361.38 [M-H]<sup>-</sup>

HPLC: rt 13,45 min (95,98%)

Ausbeute: 50 mg; 0,14 mmol; %

HR-MS m/z: 363.1341 [M+H]<sup>+</sup>; berechnet für: C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>: 363.1339

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.09 (s, 1H, -NH-OH), 9.58 (s, 1H, -CONH-Ar), 8.89 (s, 1H, -NH-OH), 8.18 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, Ar<sub>C2</sub>-H), 8.05 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar'<sub>C2/6</sub>-H), 7.82 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.74 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.66 – 7.59 (m, 1H, Ar-H), 7.50 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, Ar-H), 7.41 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.14 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar-H), 3.88 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>).



### 50f (TH95)

Methode: E und 2

3-(3-Biphenyl)-4-methoxybenzhydroxamsäure

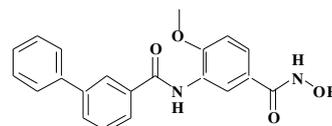
MS m/z: 361.26 [M-H]<sup>-</sup>

HPLC: rt 12,08 min (99,00%)

Ausbeute: 60 mg; 0,17 mmol; 17 %

HR-MS m/z: 361.1182 [M-H]<sup>-</sup>; berechnet für: C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>: 361.1194

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.11 (s, 1H, -NH-OH), 9.74 (s, 1H, -CONH-Ar), 8.92 (s, 1H, -NH-OH), 8.24 (s, 1H, Ar<sub>C2</sub>-H), 8.12 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, Ar-H), 7.93 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.88 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, Ar-H), 7.76 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar-H), 7.67 – 7.58 (m, 2H, Ar-H), 7.50 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar-H), 7.40 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.15 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar-H), 3.86 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>).



**50g (TH69)**

Methode: E und 2

3-(4-Methoxybenzamido)-4-methoxybenzhydroxamsäure

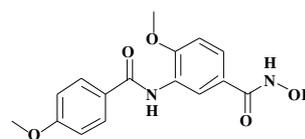
MS m/z: 315.34 [M-H]<sup>-</sup>

HPLC: rt 8,96 min (95,35%)

Ausbeute: 20 mg; 0,06 mmol; 3 %

HR-MS m/z: 315.0981 [M-H]<sup>-</sup>; berechnet für: C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>-</sup>: 315.0986

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.06 (s, 1H, -NH-OH), 9.36 (s, 1H, -CONH-Ar), 8.88 (s, 1H, -NH-OH), 8.15 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, Ar<sub>C2</sub>-H), 7.94 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, Ar'<sub>C2/5</sub>-H), 7.65 – 7.55 (m, 1H, Ar-H), 7.12 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.04 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, Ar-H), 3.86 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>), 3.80 (s, 3H, Ar'-O-CH<sub>3</sub>).

**50h (TH68)**

Methode: E und 2

3-(2-Chlorobenzamido)-4-methoxybenzhydroxamsäure

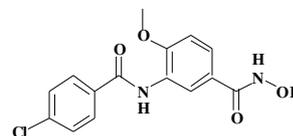
MS m/z: 319.30 [M-H]<sup>-</sup>

HPLC: rt 8,33 min (97,65%)

Ausbeute: 12 mg; 0,04 mmol; %

HR-MS m/z: 319.0482 [M-H]<sup>-</sup>; berechnet für: C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>: 319.0491

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.08 (s, 1H, -NH-OH), 9.66 (s, 1H, -CONH-Ar), 8.90 (s, 1H, -NH-OH), 8.10 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, Ar<sub>C2</sub>-H), 7.97 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar'<sub>C2/5</sub>-H), 7.66 – 7.54 (m, 3H, Ar-H), 7.13 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar-H), 3.85 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>).

**50i (TH85)**

Methode: E und 2

3-(2-Chlorobenzamido)-4-methoxybenzhydroxamsäure

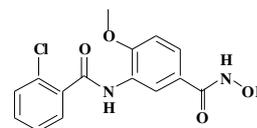
MS m/z: 319.13 [M-H]<sup>-</sup>

HPLC: rt 9,12 min (96,34%)

Ausbeute: 100 mg; 0,31 mmol; 38%

HR-MS m/z: 319.0484 [M-H]<sup>-</sup>; berechnet für: C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>: 319.0491

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.09 (s, 1H, -NH-OH), 9.70 (s, 1H, -CONH-Ar), 8.88 (s, 1H, -NH-OH), 8.32 (s, 1H, Ar<sub>C2</sub>-H), 7.61 – 7.38 (m, 5H, Ar-H), 7.11 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar-H), 3.84 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>).



## 5. Experimentelle Daten

### 50j (TH86)

Methode: E und 2

3-(2,4-Dichlorobenzamido)-4-methoxybenzhydroxamsäure

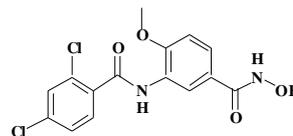
MS m/z: 353.18 [M-H]<sup>-</sup>

HPLC: rt 10,24 min (97,43%)

Ausbeute: 200 mg; 0,57 mmol; 5,7 %

HR-MS m/z: 353.0094 [M-H]<sup>-</sup>; berechnet für: C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>: 353.0101

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.10 (s, 1H, -NH-OH), 9.82 (s, 1H, -CONH-Ar), 8.90 (s, 1H, -NH-OH), 8.33 (s, 1H, Ar<sub>C2</sub>-H), 7.71 (s, 1H, Ar'<sub>C3</sub>-H), 7.63 – 7.45 (m, 3H, Ar-H), 7.11 (d, J = 8.5 Hz, 1H, Ar-H), 3.84 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>).



### 50k (TH66)

Methode: E und 2

3-Benzamido-4-ethoxybenzhydroxamsäure

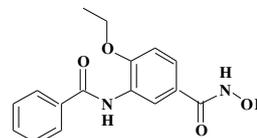
MS m/z: 300.73 [M-H]<sup>-</sup>

HPLC: rt 10,28 min (99,05%)

Ausbeute: 140 mg; 0,47 mmol; 4,7 %

HR-MS m/z: 299.1030 [M-H]<sup>-</sup>; berechnet für: C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>: 299.1037

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.01 (s, 1H, -NH-OH), 9.44 (s, 1H, -CONH-Ar), 8.90 (s, 1H, -NH-OH), 8.22 (d, J = 1.9 Hz, 1H, Ar<sub>C2</sub>-H), 7.94 (d, J = 7.3 Hz, 2H, Ar'<sub>C2/5</sub>-H), 7.64 – 7.47 (m, 4H, Ar-H), 7.12 (d, J = 8.6 Hz, 1H, Ar-H), 4.14 (q, J = 6.9 Hz, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.35 (t, J = 6.9 Hz, 3H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).



### 50l (TH92)

Methode: E und 2

3-(4-Biphenylamido)-4-ethoxybenzhydroxamsäure

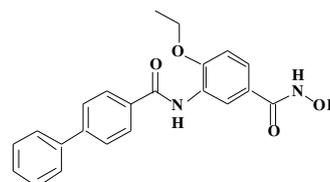
MS m/z: 375.24 [M-H]<sup>-</sup>

HPLC: rt 12,66 min (98,10%)

Ausbeute: 60 mg; 0,16 mmol; 8 %

HR-MS m/z: 375.1341 [M-H]<sup>-</sup>; berechnet für: C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>: 375.1350

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.09 (s, 1H, -NH-OH), 9.51 (s, 1H, -CONH-Ar), 8.90 (s, 1H, -NH-OH), 8.23 (d, J = 1.4 Hz, 1H, Ar<sub>C2</sub>-H), 8.04 (d, J = 8.1 Hz, 2H, Ar'<sub>C2/6</sub>-H), 7.83 (d, J = 8.1 Hz, 2H, Ar'<sub>C3/5</sub>-H), 7.75 (d, J = 7.5 Hz, 2H, Ar''<sub>C2/6</sub>-H), 7.62 – 7.56 (m, 1H, Ar<sub>C6</sub>-H), 7.50 (t, J = 7.4 Hz, 2H, Ar''<sub>C3/5</sub>-H), 7.44 – 7.37 (m, 1H, Ar''<sub>C4</sub>-H), 7.13 (d, J = 8.6 Hz, 1H, Ar<sub>C5</sub>-H), 4.15 (q, J = 6.7 Hz, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.36 (t, J = 6.8 Hz, 3H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).



**50m** (TH67)

Methode: E und 2

3-Benzamido-4-propoxybenzhydroxamsäure

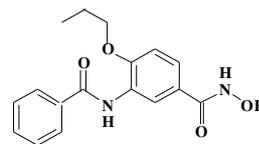
MS m/z: 313.24 [M-H]<sup>-</sup>

HPLC: rt 10,59 min (99,23%)

Ausbeute: 30 mg; 0,1 mmol; 1 %

HR-MS m/z: 313.1187 [M-H]<sup>-</sup>; berechnet für: C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>: 313.1194

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.08 (s, 1H, -NH-OH), 9.46 (s, 1H, -CONH-Ar), 8.90 (s, 1H, -NH-OH), 8.17 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, Ar<sub>C2</sub>-H), 7.93 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, Ar'<sub>C2/5</sub>-H), 7.62 – 7.49 (m, 4H, Ar-H), 7.12 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar-H), 4.03 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.74 (dq, *J* = 13.9, 7.1 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.95 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).

**50n** TH83

Methode: E und 2

3-Benzamido-4-isopropoxybenzhydroxamsäure

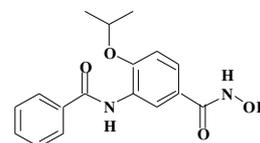
MS m/z: 313.14 [M-H]<sup>-</sup>

HPLC: rt 10,38 min (98,35%)

Ausbeute: 80 mg; 0,25 mmol; 5%

HR-MS m/z: 313.1189 [M-H]<sup>-</sup>; berechnet für: C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>: 313.1194

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.06 (s, 1H, -NH-OH), 9.34 (s, 1H, -CONH-Ar), 8.88 (s, 1H, -NH-OH), 8.25 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ar<sub>C2</sub>-H), 7.92 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, Ar'<sub>C2/5</sub>-H), 7.62 – 7.49 (m, 4H, Ar-H), 7.13 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, Ar-H), 4.71 (dt, *J* = 11.9, 5.9 Hz, 1H, -O-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.30 (d, *J* = 6.0 Hz, 6H, -O-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**50o** (TH61)

Methode: E und 1

3-Benzamido-4-chlorobenzhydroxamsäure

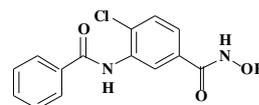
MS m/z: 289.25 [M-H]<sup>-</sup>

HPLC: rt 4,72 min (95,17%)

Ausbeute: 170 mg; 0,58 mmol; 58%

HR-MS m/z: 313.0351 [M+Na]<sup>+</sup>; berechnet für: C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Na<sup>+</sup>: 313.0350

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.32 (s, 1H, -NH-OH), 10.15 (s, 1H, -CONH-Ar), 9.10 (s, 1H, -NH-OH), 8.04 – 7.92 (m, 3H, Ar-H), 7.68 – 7.58 (m, 3H, Ar-H), 7.57 – 7.48 (m, 2H, Ar-H).



## 5. Experimentelle Daten

### 50p (TH93)

Methode: E und 2

3-(4-Chlorobenzamido)-4-chloro-benzhydroxamsäure

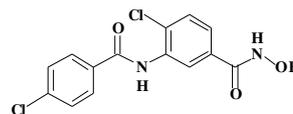
MS m/z: 323.15 [M-H]<sup>-</sup>

HPLC: rt 10,46 min (97,07%)

Ausbeute: 140 mg; 0,43 mmol; 21,5 %

HR-MS m/z: 322.9992 [M-H]<sup>-</sup>; berechnet für: C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>-</sup>: 322.9996

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.32 (s, 1H, -NH-OH), 10.26 (s, 1H, -CONH-Ar), 9.11 (s, 1H, -NH-OH), 8.05 – 7.92 (m, 3H, Ar-H), 7.67 – 7.59 (m, 4H, Ar-H).



### 50q (TH74)

Methode: E und 2

3-(4-Methoxybenzamido)-4-chlorobenzhydroxamsäure

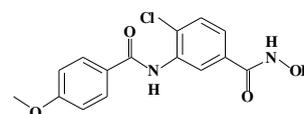
MS m/z: 320.99 [M+H]<sup>+</sup>

HPLC: rt 9,62 min (97,22%)

Ausbeute: 50 mg; 0,16 mmol; 8,2%

HR-MS m/z: 319.0488 [M-H]<sup>-</sup>; berechnet für: C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>: 319.0491

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.31 (s, 1H, -NH-OH), 9.97 (s, 1H, -CONH-Ar), 9.09 (s, 1H, -NH-OH), 8.00 – 7.93 (m, 3H, Ar-H), 7.66 – 7.60 (m, 2H, Ar-H), 7.06 (d, J = 8.8 Hz, 2H, Ar-H), 3.83 (s, 3H, Ar'-O-CH<sub>3</sub>).



### 50r (TH81)

Methode: E und 2

3-(4-Phenoxybenzamido)-4-chlorobenzhydroxamsäure

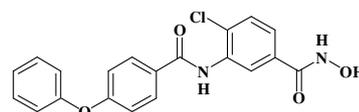
MS m/z: 381.17 [M-H]<sup>-</sup>

HPLC: rt 12,35 min (99,00%)

Ausbeute: 10mg; 0,03 mmol; 0,59%

HR-MS m/z: 381.0638 [M-H]<sup>-</sup>; berechnet für: C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>: 381.0648

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.32 (s, 1H, -NH-OH), 9.91 (s, 1H, -CONH-Ar), 9.10 (s, 1H, -NH-OH), 8.02 (d, J = 8.8 Hz, 2H, Ar-H), 7.96 (s, 1H, Ar-H), 7.66 – 7.60 (m, 2H, Ar-H), 7.45 (t, J = 7.9 Hz, 2H, Ar-H), 7.22 (t, J = 7.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.10 (t, J = 8.0 Hz, 4H, Ar-H).



**50s (TH78)**

Methode: E und 2

3-(3-Phenoxybenzamido)-4-chlorobenzhydroxamsäure

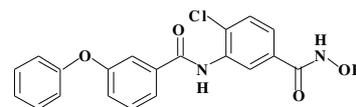
MS m/z: 381.19 [M-H]<sup>-</sup>

HPLC: rt 12,18 min (99,83%)

Ausbeute: 165 mg; 0,43 mmol; 19,3%

HR-MS m/z: 381.0641 [M-H]<sup>-</sup>; berechnet für: C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>: 381.0648

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.31 (s, 1H, -NH-OH), 10.21 (s, 1H, -CONH-Ar), 9.10 (s, 1H, -NH-OH), 7.93 (s, 1H, Ar<sub>C2</sub>-H), 7.76 (d, J = 7.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.65 – 7.62 (m, 2H, Ar-H), 7.60 – 7.56 (m, 1H, Ar-H), 7.54 (d, J = 7.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.42 (t, J = 7.9 Hz, 2H, Ar<sup>‘</sup><sub>C3/5</sub>-H), 7.25 (dd, J = 8.1, 2.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.18 (t, J = 7.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.07 (d, J = 7.9 Hz, 2H, Ar<sup>‘</sup><sub>C2/6</sub>-H).

**50t (TH77)**

Methode: E und 2

3-(3-Benzyloxybenzamido)-4-chlorobenzhydroxamsäure

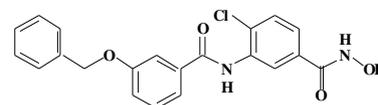
MS m/z: 395.18 [M-H]<sup>-</sup>

HPLC: rt 12,25 min (99,49%)

Ausbeute: 50 mg; 0,13 mmol; 5,5%

HR-MS m/z: 395.0797 [M-H]<sup>-</sup>; berechnet für: C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>: 395.0804

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.32 (s, 1H, -NH-OH), 10.13 (s, 1H, -CONH-Ar), 9.10 (s, 1H, -NH-OH), 7.96 (s, 1H, Ar-H), 7.64 (s, 2H, Ar-H), 7.63 – 7.59 (m, 1H, Ar-H), 7.57 (d, J = 7.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.50 – 7.42 (m, 3H, Ar-H), 7.39 (t, J = 7.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.36 – 7.30 (m, J = 7.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.25 (dd, J = 8.2, 2.1 Hz, 1H, Ar-H), 5.18 (s, 2H, Ar<sup>‘</sup>-CH<sub>2</sub>-O-Ar<sup>‘</sup>).

**50u (TH96)**

Methode: E und 2

3-(4-Nitrobenzamido)-4-chlorobenzhydroxamsäure

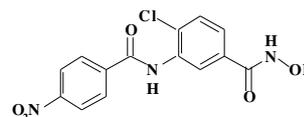
MS m/z: 334.27 [M-H]<sup>-</sup>

HPLC: rt 9,15 min (97,24%)

Ausbeute: 30 mg; 0,09 mmol; 4,5 %

HR-MS m/z: 334.0227 [M-H]<sup>-</sup>; berechnet für: C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub><sup>-</sup>: 334.0236

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.34 (s, 1H, -NH-OH), 10.55 (s, 1H, -CONH-Ar), 9.12 (s, 1H, -NH-OH), 8.38 (d, J = 8.6 Hz, 2H, Ar-H), 8.20 (d, J = 8.5 Hz, 2H, Ar-H), 8.00 – 7.93 (m, 1H, Ar-H), 7.69 – 7.64 (m, 2H, Ar-H).



## 5. Experimentelle Daten

### 50v (TH75)

Methode: E und 2

3-Benzamido-4-bromobenzhydroxamsäure

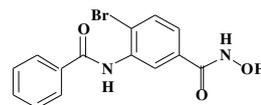
MS m/z: 334.95 [M-H]<sup>-</sup>

HPLC: rt 9,75 min (95,95%)

Ausbeute: 120 mg; 0,36 mmol; 33%

HR-MS m/z: 332.9875 [M-H]<sup>-</sup>; berechnet für: C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>-</sup>: 332.9880

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.33 (s, 1H, -NH-OH), 10.13 (s, 1H, -CONH-Ar), 9.10 (s, 1H, -NH-OH), 7.99 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, Ar-H), 7.93 (s, 1H, Ar-H), 7.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.64 – 7.51 (m, 4H, Ar-H).



### 50w (TH76)

Methode: E und 2

3-Benzamido-4-fluorobenzhydroxamsäure

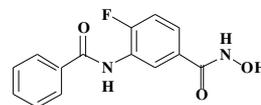
MS m/z: 273.18 [M-H]<sup>-</sup>

HPLC: rt 8,47 min (98,23%)

Ausbeute: 20 mg; 0,07 mmol; 4,7 %

HR-MS m/z: 273.0676 [M-H]<sup>-</sup>; berechnet für: C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>-</sup>: 273.0681

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.01 (s, 1H, -NH-OH), 9.44 (s, 1H, -CONH-Ar), 8.90 (s, 1H, -NH-OH), 8.22 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.93 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H, Ar-H), 7.62 – 7.45 (m, 4H, Ar-H), 7.12 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar'<sub>C4</sub>-H).



### 50x (TH94)

Methode: E und 2

3-Benzamido-4-trifluormethylbenzhydroxamsäure

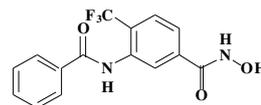
MS m/z: 323.25[M-H]<sup>-</sup>

HPLC: rt 9,04 min (99,75%)

Ausbeute: 75 mg; 0,23 mmol; 11,5 %

HR-MS m/z: 323.0638 [M-H]<sup>-</sup>; berechnet für: C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>-</sup>: 323.0649

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.49 (s, 1H, -NH-OH), 10.23 (s, 1H, -CONH-Ar), 9.24 (s, 1H, -NH-OH), 7.97 – 7.92 (m, 2H, Ar-H), 7.90 (d, *J* = 7.9 Hz, 3H, Ar-H), 7.64 – 7.58 (m, 1H, Ar-H), 7.58 – 7.50 (m, 2H, Ar-H).



**58** (TH23)

Methode: A

9-Oxo-5,6,7,8-tetrahydroacridin-3-hydroxamsäure

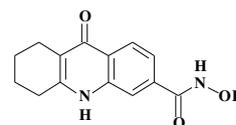
MS m/z: 257.30 [M-H]<sup>-</sup>

HPLC: rt 5,65 min (80,78%)

Ausbeute: 150 mg; 0,58 mmol; 29 %

HR-MS m/z: 259.1081 [M+H]<sup>+</sup>; berechnet für: C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>: 259.1077

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.35 (s, 1H, -NH-OH), 9.12 (s, 1H, -NH-OH), 8.05 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Ar<sub>C1</sub>-H), 7.86 (s, 1H, Ar<sub>C4</sub>-H), 7.49 (d, *J* = 8.4, 1.5 Hz, 1H, Ar<sub>C2</sub>-H), 2.74 – 2.65 (m, 2H, C8H<sub>2</sub>), 2.45 – 2.39 (m, 2H, C5H<sub>2</sub>), 1.80 – 1.63 (m, 4H, C6/7H<sub>2</sub>);

**59** (TH45)

Methode: B

3,5-bis-Benzamidobenzhydroxamsäure

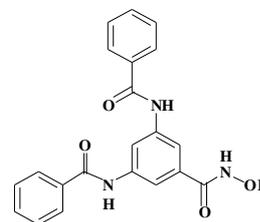
MS m/z: 374.32 [M-H]<sup>-</sup>

HPLC: rt 10,85 min (98,54%)

Ausbeute: 7 mg; 0,02 mmol; 1 %

HR-MS m/z: 374.1128 [M+H]<sup>+</sup>; berechnet für: C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>: 374.1146

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.13 (s, 1H, -NH-OH), 10.42 (s, 2H, -(CONH)<sub>2</sub>-Ar), 8.98 (s, 1H, -NH-OH), 8.48 – 8.41 (m, *J* = 1.9 Hz, 1H, Ar-H), 8.03 – 7.94 (m, 4H, Ar-H), 7.85 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H, Ar-H), 7.63 – 7.46 (m, 6H, Ar-H).

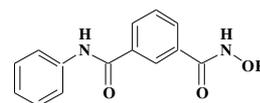
**64** (TH97)3-*N*-PhenylcarboxamidobenzhydroxamsäureMS m/z: 255.24 [M-H]<sup>-</sup>

HPLC: rt 7,79 min (99,83%)

Ausbeute: 45 mg; 0,18 mmol; 8,8%

HR-MS m/z: 255.0773 [M-H]<sup>-</sup>; berechnet für: C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>-</sup>: 255.0775

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.31 (s, 1H, -NH-OH), 10.33 (s, 1H, -CONH-Ar), 9.11 (s, 1H, -NH-OH), 8.31 (s, 1H, Ar<sub>C2</sub>-H), 8.06 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar<sub>C6</sub>-H), 7.91 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, Ar<sub>C4</sub>-H), 7.76 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, Ar'<sub>C2/6</sub>-H), 7.58 (t, *J* = 17.8, 10.1 Hz, 1H, Ar<sub>C5</sub>-H), 7.35 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, Ar'<sub>C3/5</sub>-H), 7.10 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, Ar'<sub>C4</sub>-H).



## 5. Experimentelle Daten

### 65 (TH98)

3-Carboxybenzhydroxamsäure

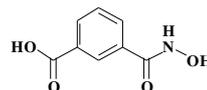
MS m/z: 180.14 [M-H]<sup>-</sup>

HPLC: rt 3,82 min (99,55%)

Ausbeute: 60 mg; 0,33 mmol; 16,5%

HR-MS m/z: 182.0449 [M+H]<sup>+</sup>; berechnet für: C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup>: 182.0448

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 13.15 (s, 1H, Ar-COOH), 11.35 (s, 1H, -NH-OH), 9.08 (s, 1H, -NH-OH), 8.31 (s, 1H, Ar<sub>C2</sub>-H), 8.05 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar<sub>C6</sub>-H), 7.96 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar<sub>C4</sub>-H), 7.57 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, Ar<sub>C5</sub>-H).



## Quellen

1. Doumenge, J. P. & Mott, K. E. Global distribution of schistosomiasis: CEGET/WHO atlas. *World Health Stat. Q.* **37**, 186–99 (1984).
2. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. 37–44 (2012).
3. Medicine, C. M. E. T. CME Tropical medicine. **11**, (2011).
4. Gryseels, B., Polman, K., Clerinx, J. & Kestens, L. Human schistosomiasis. *Lancet* **368**, 1106–1118 (2006).
5. Gray, D. J., Ross, A. G., Li, Y.-S. & McManus, D. P. Diagnosis and management of schistosomiasis. *BMJ* **342**, d2651 (2011).
6. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. 21–28 (2014).
7. Bottieau, E. *et al.* Imported Katayama fever: Clinical and biological features at presentation and during treatment. *J. Infect.* **52**, 339–345 (2006).
8. Lambertucci, J. R. Acute schistosomiasis: Clinical, diagnostic and therapeutic features. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **35**, 399–404 (1993).
9. Rocha, M. O. *et al.* Gastro-intestinal manifestations of the initial phase of schistosomiasis mansoni. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **89**, 271–278 (1995).
10. Feldmeier, H. & Poggensee, G. Diagnostic techniques in schistosomiasis control. A review. *Acta Trop.* **52**, 205–220 (1993).
11. Jeziorski, M. C. & Greenberg, R. M. Voltage-gated calcium channel subunits from platyhelminths: Potential role in praziquantel action. *Int. J. Parasitol.* **36**, 625–632 (2006).
12. Ismail, M. *et al.* Resistance to Praziquantel: Direct evidence from schistosoma mansoni isolated from egyptian villagers. **60**, 932–935 (1999).
13. Doenhoff, M. J., Kusel, J. R., Coles, G. C. & Cioli, D. Resistance of Schistosoma mansoni to praziquantel: Is there a problem? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **96**, 465–469 (2002).
14. Doenhoff, M. J., Cioli, D. & Utzinger, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **21**, 659–667 (2008).
15. Norton, A. J. *et al.* Genetic consequences of mass human chemotherapy for Schistosoma mansoni: Population structure pre-and post-praziquantel treatment in Tanzania. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **83**, 951–957 (2010).
16. Fenwick, A., Savioli, L., Engels, D., Bergquist, N. R. & Todd, M. H. Drugs for the control of parasitic diseases: Current status and development in schistosomiasis. *Trends Parasitol.* **19**, 509–515 (2003).
17. Martindale, The Extra Pharmacopoeia. **31st ed**, 121

## Quellen

18. Shuhua, X. *et al.* Recent investigations of artemether, a novel agent for the prevention of schistosomiasis japonica, mansoni and haematobia. in *Acta Trop.* **82**, 175–181 (2002).
19. Utzinger, J., Keiser, J., Shuhua, X., Tanner, M. & Singer, B. H. Schistosomiasis in Laboratory Studies and Clinical Trials Minireview Combination Chemotherapy of Schistosomiasis in Laboratory Studies and Clinical Trials. doi:10.1128/AAC.47.5.1487. (2003).
20. Cioli, D., Pica-Mattocchia, L. & Archer, S. Drug resistance in schistosomes. *Parasitol. Today* **9**, 162–166 (1993).
21. Geerts, S. & Gryseels, B. Drug resistance in human helminths: Current situation and lessons from livestock. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 207–222 (2000).
22. Carey, N. *The epigenetics revolution: how modern biology is rewriting our understanding of genetics, disease and inheritance.* Icon Books Ltd. doi:10.1002/cncr.11518. (2012).
23. Bird, A. Perceptions of epigenetics. *Nature* **447**, 396–398 (2007).
24. Turner, B. M. Environmental sensing by chromatin: An epigenetic contribution to evolutionary change. *FEBS Lett.* **585**, 2032–2040 (2011).
25. Bennett, M. R. *et al.* Metabolic gene regulation in a dynamically changing environment. *Nature* **454**, 1119–1122 (2008).
26. Yoo, C. B. & Jones, P. A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 37–50 (2006).
27. Turner, B. M. The adjustable nucleosome: An epigenetic signaling module. *Trends Genet.* **28**, 436–444 (2012).
28. Klose, R. J. & Bird, A. P. Genomic DNA methylation: The mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 89–97 (2006).
29. Yan, M. S.-C., Matouk, C. C. & Marsden, P. a. Epigenetics of the vascular endothelium. *J. Appl. Physiol.* **109**, 916–26 (2010).
30. Azuara, V. *et al.* Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat. Cell Biol.* **8**, 532–538 (2006).
31. Bernstein, B. E. *et al.* A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells. *Cell* **125**, 315–326 (2006).
32. Jenuwein, T. & Allis, C. D. Translating the histone code. *Science* **293**, 1074–1080 (2001).
33. Strahl, B. D. & Allis, C. D. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41–45 (2000).
34. Turner, B. M. Defining an epigenetic code. *Nat. Cell Biol.* **9**, 2–6 (2007).
35. Kouzarides, T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* **128**, 693–705 (2007).
36. Turner, B. M. Histone acetylation and an epigenetic code. *BioEssays* **22**, 836–845 (2000).

37. Nakata, S. *et al.* Histone deacetylase inhibitors upregulate death receptor 5/TRAIL-R2 and sensitize apoptosis induced by TRAIL/APO2-L in human malignant tumor cells. *Oncogene* **23**, 6261–6271 (2004).
38. Shao, Y., Gao, Z., Marks, P. A. & Jiang, X. Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *PNAS* **101**, 18030–18035 (2004).
39. Willis, S. N. & Adams, J. M. Life in the balance: How BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 617–625 (2005).
40. Ruefli, A. A. *et al.* The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10833–10838 (2001).
41. Noll, M. Subunit structure of chromatin. *Nature* **251**, 249–251 (1974).
42. Finch, J. T. *et al.* Structure of nucleosome core particles of chromatin. *Nature* **269**, 29–36 (1977).
43. Brower-Toland, B. *et al.* Specific contributions of histone tails and their acetylation to the mechanical stability of nucleosomes. *J. Mol. Biol.* **346**, 135–146 (2005).
44. Hall, M. A. *et al.* High-resolution dynamic mapping of histone-DNA interactions in a nucleosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 124–129 (2009).
45. Jackson, V. In vivo studies on the dynamics of histone-DNA interaction: Evidence for nucleosome dissolution during replication and transcription and a low level of dissolution independent of both. *Biochemistry* **29**, 719–731 (1990).
46. Trouche, D., Khochbin, S. & Dimitrov, S. Chromatin and epigenetics: Dynamic organization meets regulated function. in *Mol. Cell* **12**, 281–286 (2003).
47. Happel, N. & Doenecke, D. Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function. *Gene* **431**, 1–12 (2009).
48. Woodcock, C. L., Skoultchi, A. I. & Fan, Y. Role of linker histone in chromatin structure and function: H1 stoichiometry and nucleosome repeat length. *Chromosome Res.* **14**, 17–25 (2006).
49. Filippakopoulos, P. & Knapp, S. Targeting bromodomains: epigenetic readers of lysine acetylation. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 337–56 (2014).
50. Furdas, S. D., Carlino, L., Sippl, W. & Jung, M. Inhibition of bromodomain-mediated protein–protein interactions as a novel therapeutic strategy. *Medchemcomm* **3**, 123 (2012).
51. Arrowsmith, C. H., Bountra, C., Fish, P. V., Lee, K. & Schapira, M. Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 384–400 (2012).
52. Rodd, A. L., Ververis, K. & Karagiannis, T. C. Current and Emerging Therapeutics for Cutaneous T-Cell Lymphoma: Histone Deacetylase Inhibitors. *Lymphoma* **2012**, 1–10 (2012).
53. Croken, M. M., Nardelli, S. C. & Kim, K. Chromatin modifications, epigenetics, and how protozoan parasites regulate their lives. *Trends Parasitol.* **28**, 202–213 (2012).

54. Pierce, R. J. *et al.* Chromatin regulation in schistosomes and histone modifying enzymes as drug targets. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **106**, 794–801 (2011).
55. Grunstein, M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**, 349–352 (1997).
56. Olson D. E. *et al.* An Unbiased Approach To Identify Endogenous Substrates of Histone Deacetylase 8. *ACS Chem. Biol.*, 9 (10), pp 2210–2216 , (2014).
57. Spange, S., Wagner, T., Heinzl, T. & Krämer, O. H. Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 185–198 (2009).
58. Fass, D. M. *et al.* in *Encycl. Mol. Cell Biol. Mol. Med.* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. doi:10.1002/3527600906.mcb.201100036. (2006).
59. Glozak, M. a., Sengupta, N., Zhang, X. & Seto, E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* **363**, 15–23 (2005).
60. Sippl W., Jung M.. Epigenetic Targets in Drug Discovery. Wiley-VCH Verlag Weinheim. 30 (2009).
61. Gregoretta, I. V., Lee, Y. M. & Goodson, H. V. Molecular evolution of the histone deacetylase family: Functional implications of phylogenetic analysis. *J. Mol. Biol.* **338**, 17–31 (2004).
62. De Ruijter, A. J. M., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S. & van Kuilenburg, A. B. P. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.* **370**, 737–749 (2003).
63. Marks, P. a. Histone deacetylase inhibitors: a chemical genetics approach to understanding cellular functions. *Biochim. Biophys. Acta* **1799**, 717–25 (2010).
64. Wiech, N. L., Fisher, J. F., Helquist, P. & Wiest, O. Inhibition of histone deacetylases: a pharmacological approach to the treatment of non-cancer disorders. *Curr. Top. Med. Chem.* **9**, 257–271 (2009).
65. Delcuve, G. P., Khan, D. H. & Davie, J. R. Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors. *Clin. Epigenetics* **4**, 5 (2012).
66. Xiang-Jiao Yang & Edward Seto. The Rpd3/Hda1 Family of Lysine Deacetylases: From Bacteria and Yeast to Mice and Men. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9 (3), 206–209 (2009)
67. Joshi, P.; Greco, T. M.; Guise, A. J.; Luo, Y.; Yu, F.; Nesvizhskii, A. I.; Cristea, I. M. The Functional Interactome Landscape of the Human Histone Deacetylase Family. *Mol. Syst. Biol.* 9 (672), 1–21. (2013).
68. Villagra, A., Sotomayor, E. M. & Seto, E. Histone deacetylases and the immunological network: implications in cancer and inflammation. *Oncogene* **29**, 157–173 (2010).
69. Somoza, J. R. *et al.* Structural snapshots of human HDAC8 provide insights into the class I histone deacetylases. *Structure* **12**, 1325–1334 (2004).
70. Vannini, A. *et al.* Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase , human HDAC8 , complexed with a hydroxamic acid inhibitor. (2004).

71. Finnin, M. S. *et al.* Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* **401**, 188–193 (1999).
72. Vannini, A. *et al.* Substrate binding to histone deacetylases as shown by the crystal structure of the HDAC8-substrate complex. *EMBO Rep.* **8**, 879–884 (2007).
73. Sippl W., Jung M.. Epigenetic Targets in Drug Discovery. Wiley-VCH Verlag Weinheim. 32 (2009)
74. Sippl W., Jung M.. Epigenetic Targets in Drug Discovery. Wiley-VCH Verlag Weinheim. 31 (2009).
75. Vanommeslaeghe, K., De Proft, F., Loverix, S., Tourwé, D. & Geerlings, P. Theoretical study revealing the functioning of a novel combination of catalytic motifs in histone deacetylase. *Bioorganic Med. Chem.* **13**, 3987–3992 (2005).
76. Sippl W., Jung M.. Epigenetic Targets in Drug Discovery. Wiley-VCH Verlag Weinheim. 33 (2009).
77. Sippl W., Jung M.. Epigenetic Targets in Drug Discovery. Wiley-VCH Verlag Weinheim. 187 (2009).
78. Nwaka, S. & Hudson, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 941–955 (2006).
79. Dissous, C. & Grevelding, C. G. Piggy-backing the concept of cancer drugs for schistosomiasis treatment: A tangible perspective? *Trends Parasitol.* **27**, 59–66 (2011).
80. Lombardi, P. M., Cole, K. E., Dowling, D. P. & Christianson, D. W. Structure, mechanism, and inhibition of histone deacetylases and related metalloenzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **21**, 735–743 (2011).
81. Atadja, P. W. HDAC inhibitors and cancer therapy. *Prog Drug Res* **67**, 175–195 (2011).
82. Xu, W. S., Parmigiani, R. B. & Marks, P. A. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* **26**, 5541–5552 (2007).
83. Balasubramanian, S. *et al.* A novel histone deacetylase 8 (HDAC8)-specific inhibitor PCI-34051 induces apoptosis in T-cell lymphomas. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund, U.K* **22**, 1026–1034 (2008).
84. Bradner, J. E. *et al.* Chemical phylogenetics of histone deacetylases. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 238–243 (2010).
85. Andrews, K. T., Haque, A. & Jones, M. K. HDAC inhibitors in parasitic diseases. *Immunol. Cell Biol.* **90**, 66–77 (2012).
86. Pierce, R. Targeting Schistosome Histone Modifying Enzymes for Drug Development. *Curr. Pharm. Des.* doi:10.2174/138161212801327248. (2012).
87. Oger, F. *et al.* The class I histone deacetylases of the platyhelminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **377**, 1079–1084 (2008).

## Quellen

88. Dubois, F. *et al.* Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis, histone hyperacetylation and up-regulation of gene transcription in *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **168**, 7–15 (2009).
89. Grzenda, A., Lomberk, G., Zhang, J. S. & Urrutia, R. Sin3: Master scaffold and transcriptional corepressor. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1789**, 443–450 (2009).
90. Nakayama, J. I. & Hayakawa, T. Physiological roles of class I HDAC complex and histone demethylase. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, (2011).
91. Mourão, M. M., Grunau, C., LoVerde, P. T., Jones, M. K. & Oliveira, G. Recent advances in *Schistosoma* genomics. *Parasite Immunol.* **34**, 151–62 (2012).
92. Dubois, F. *et al.* Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis, histone hyperacetylation and up-regulation of gene transcription in *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **168**, 7–15 (2009).
93. Azzi, A., Cosseau, C. & Grunau, C. *Schistosoma mansoni*: Developmental arrest of miracidia treated with histone deacetylase inhibitors. *Exp. Parasitol.* **121**, 288–291 (2009).
94. Cosseau, C. *et al.* Epigenetic and phenotypic variability in populations of *Schistosoma mansoni*- a possible kick-off for adaptive host/parasite evolution. *Oikos* **119**, 669–678 (2010).
95. Roger, E. *et al.* Controlled chaos of polymorphic mucins in a metazoan parasite (*Schistosoma mansoni*) interacting with its invertebrate host (*Biomphalaria glabrata*). *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2**, (2008).
96. Perrin, C. *et al.* *Schistosoma mansoni* Mucin Gene (SmPoMuc) Expression: Epigenetic Control to Shape Adaptation to a New Host. *PLoS Pathog.* **9**, (2013).
97. Sippl W., Jung M.. Epigenetic Targets in Drug Discovery. Wiley-VCH Verlag Weinheim. 188 (2009).
98. Sippl W., Jung M.. Epigenetic Targets in Drug Discovery. Wiley-VCH Verlag Weinheim. 189 (2009).
99. KrennHrubec, K., Marshall, B. L., Hedglin, M., Verdin, E. & Ulrich, S. M. Design and evaluation of ‘Linkerless’ hydroxamic acids as selective HDAC8 inhibitors. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **17**, 2874–2878 (2007).
100. Jung, M. *et al.* Amide analogues of trichostatin A as inhibitors of histone deacetylase and inducers of terminal cell differentiation. *J. Med. Chem.* **42**, 4669–4679 (1999).
101. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc <http://www.nap.edu/catalog/10026.html> 12. 442–501, 25.03.2015 10:55:12. (2015).
102. Day, J., Cohen, S. M. Investigating the selectivity of metalloenzyme inhibitors. *J. Med. Chem.* **56**, 7997–8007 (2013).
103. Irwin, J. J., Sterling, T., Mysinger, M. M., Bolstad, E. S. & Coleman, R. G. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. *J. Chem. Inf. Model.* **52**, 1757–68 (2012).

104. Kannan, S.; Melesina, J.; Hauser, A.; Chakrabarti, A.; Heimbürg, T.; Schmidtkunz, K.; Walter, A.; Marek, M.; Pierce, R. J.; Romier, C.; Jung, M.; Sippl, W. Discovery of Inhibitors of *Schistosoma Mansoni* HDAC8 by Combining Homology Modeling, Virtual Screening, and in Vitro Validation. *54*, 3005–3019. (2014).
105. Shokrolahi, A., Zali, A. & Keshavarz, M. H. Reductive amination of aldehydes and ketones by NaBH<sub>4</sub> using carbon-based solid acid (CBSA) as catalyst. *Green Chem. Lett. Rev.* **4**, 195–203 (2011).
106. Hosokawa, S.; Sekiguchi, K.; Hayase, K.; Hirukawa, Y.; Kobayashi, S. *Tetrahedron Lett.* **41**, 6435-6439. (2000).
107. Abdel-Magid, A. F. & Mehrman, S. J. A Review on the Use of Sodium Triacetoxyborohydride in the Reductive Amination of Ketones and Aldehydes. *Org. Process Res. Dev.* **10**, 971–1031 (2006).
108. Abdel-Magid, a. F., Carson, K. G., Harris, B. D., Maryanoff, C. a. & Shah, R. D. ChemInform Abstract: Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures. *ChemInform* **27**, no–no (2010).
109. McKay, F. . C. . & Albertson, N. . F. . New Amine-masking Groups for Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 4686–4690 (1957).
110. Kocienski, P. J. Protecting Groups. Georg Thieme Verlag Stuttgart -New York. 506 (2005).
111. Tarbell, D. S., Yamamoto, Y. & Pope, B. M. New Method to Prepare N-t-Butoxycarbonyl Derivatives and the Corresponding Sulfur Analogs from di-t-Butyl Dicarboxylate or di-t-Butyl Dithiol Dicarboxylates and Amino Acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **69**, 730–732 (1972).
112. Kocienski, P. J. Protecting Groups. Georg Thieme Verlag Stuttgart -New York. 488–632 (2005).
113. Becker et. al. Organikum. Wiley-VCH Verlag Weinheim. 481–482 (2004).
114. K. Peter C. Vollhardt. Organische Chemie. VCH Verlagsgesellschaft Weinheim. 922–924 (1990).
115. Reinhard Brückner. Reaktionsmechanismen. Spektrum Akademischer Verlag. **3. Auflage**, (2009).
116. Reinhard Brückner. Reaktionsmechanismen. Spektrum Akademischer Verlag. **3. Auflage**, 269–283 (2009).
117. El-Faham, A. & Albericio, F. Peptide coupling reagents, more than a letter soup. *Chem. Rev.* **111**, 6557–6602 (2011).
118. Khalafi-Nezhad, A., Parhami, A., Soltani Rad, M. N. & Zarea, A. Efficient method for the direct preparation of amides from carboxylic acids using tosyl chloride under solvent-free conditions. *Tetrahedron Lett.* **46**, 6879–6882 (2005).
119. Misra, R. N. *et al.* Cyclic aryl hydroxamic acids: Synthesis and inhibition of 5-lipoxygenase. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **1**, 295–298 (1991).

120. Suzuki, T. *et al.* Rapid discovery of highly potent and selective inhibitors of histone deacetylase 8 using click chemistry to generate candidate libraries. *J. Med. Chem.* **55**, 9562–75 (2012).
121. Fleming, C. L., Ashton, T. D., Gaur, V., McGee, S. L. & Pfeffer, F. M. Improved Synthesis and Structural Reassignment of MC1568: A Class IIa Selective HDAC Inhibitor. *J. Med. Chem.* **57**, 1132–5 (2014).
122. Huang, Q. *et al.* Searching for new cures for tuberculosis: design, synthesis, and biological evaluation of 2-methylbenzothiazoles. *J. Med. Chem.* **52**, 6757–6767 (2009).
123. Barrett, C. *et al.* Potent Histone Deacetylase Inhibitors Derived from 4 - (Aminomethyl) - N - hydroxybenzamide with High Selectivity for the HDAC6 Isoform. **56**, 7201-7211 (2013).
124. Bieliauskas, A. V.; Weerasinghe, S. V. W.; Pflum, M. K. H. Structural Requirements of HDAC Inhibitors : SAHA Analogs Functionalized Adjacent to the Hydroxamic Acid., *17*, 2216–2219. (2007).
125. Høeg-Jensen, T., Jakobsen, M. H. & Holm, A. A new method for rapid solution synthesis of shorter peptides by use of PyBOP®. *Tetrahedron Lett.* **32**, 6387–6390 (1991).
126. Lenguyen, D.; Castro, B. D. LeNguyen. *Tetrahedron Lett.* *31* (2), 205–208. (1990).
127. Kim, M. H. & Patel, D. V. ‘BOP’ as a reagent for mild and efficient preparation of esters. *Tetrahedron Lett.* **35**, 5603–5606 (1994).
128. Becker et. al. Organikum. Wiley-VCH Verlag Weinheim. 498 (2004).
129. A. Reed : Hydroacridones. Synthesis and Dehydrogenation. *J. Chem. Soc.* 425–426 (1924).
130. Frideling, A. *et al.* Tetrahydroacridin-9-ones, 9-chlorotetrahydroacridines, 9-amino-tetrahydroacridines and 9-(pyrazol-1-yl)-tetrahydroacridines derived from chiral cyclanones. *Eur. J. Med. Chem.* **39**, 37–48 (2004).
131. Tripathi, R. P. *et al.* Search of antitubercular activities in tetrahydroacridines: Synthesis and biological evaluation. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **16**, 5144–5147 (2006).
132. Beak, P. Energies and Alkylations of Tautomeric Heterocyclic Compounds: Old Problems - New Answers. *Accounts of Chemical Research.* 186–192 (1976).
133. <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-16-05141>, 25.11.2014 10:14:48. (2014).
134. Reinhard Brückner. Reaktionsmechanismen. Spektrum Akademischer Verlag. **3. Auflage**, 254 f. (2009).
135. Becker et. al. Organikum. Wiley-VCH Verlag Weinheim. 239 f. (2004).
136. Dif, A. L. *et al.* Small and stable peptidic PEGylated quantum dots to target polyhistidine-tagged proteins with controlled stoichiometry. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 14738–14746 (2009).
137. Wölk, C. Kationische Lipide für den Gentransfer – Synthese und Charakterisierung neuer Lipide auf Malonamidbasis sowie Beiträge zur Untersuchung des Aggregationsverhaltens im wässrigen Milieu. *Dissertation.* (2014).

138. Scott Sawyer, J. Recent Advances in Diaryl Ether Synthesis. *Tetrahedron* **56**, 5045–5065 (2000).
139. Liu, P., Huang, L. & Faul, M. M. A simple method for chemoselective phenol alkylation. *Tetrahedron Lett.* **48**, 7380–7382 (2007).
140. K. Peter C. Vollhardt. *Organische Chemie*. VCH Verlagsgesellschaft Weinheim. 928 ff. (1990).
141. Becker et. al. *Organikum*. Wiley-VCH Verlag Weinheim. 354 ff. (2004).
142. Becker et. al. *Organikum*. Wiley-VCH Verlag Weinheim. 358 f. (2004).
143. Pflästerer, D. et al. On the Gold-Catalyzed Intramolecular 7- exo-trig Hydroamination of Allenes. *Adv. Synth. Catal.* **355**, 1383–1393 (2013).
144. Spencer, J. et al. Click JAHAs: conformationally restricted ferrocene-based histone deacetylase inhibitors. *Medchemcomm* **3**, 61 (2012).
145. Cázares Marinero, J. D. J. et al. Efficient new constructs against triple negative breast cancer cells: synthesis and preliminary biological study of ferrocifen-SAHA hybrids and related species. *Dalton Trans.* **42**, 15489–501 (2013).
146. GESTIS-Stoffdatenbank-Hydroxylamin.  
[http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis\\_de/570151.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$3.0](http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/570151.xml?f=templates$fn=default.htm$3.0), 06.04.2015 09:16:36. (2015).
147. Reddy, A. S., Kumar, M. S. & Reddy, G. R. A convenient method for the preparation of hydroxamic acids. **41**, 6285–6288 (2000).
148. Giacomelli, G., Porcheddu, A. & Salaris, M. Simple one-flask method for the preparation of hydroxamic acids. *Org. Lett.* **5**, 2715–2717 (2003).
149. Institutsinterner Informationsaustausch, Prof. Bodo Dobner.
150. Kocienski, P. J. *Protecting Groups*. Georg Thieme Verlag Stuttgart -New York. 315 f. (2005).
151. Trapp, J. *Neue Testsysteme und Hemmstoffe für NAD<sup>+</sup>-abhängige Histondesacetylasen*. *Disseration*. (2007).
152. Hildmann, C. et al. Substrate and inhibitor specificity of class 1 and class 2 histone deacetylases. *J. Biotechnol.* **124**, 258–270 (2006).
153. Heltweg, B. et al. Subtype selective substrates for histone deacetylases. *J. Med. Chem.* **47**, 5235–5243 (2004).
154. Wegener, D., Hildmann, C., Riester, D. & Schwienhorst, A. Improved fluorogenic histone deacetylase assay for high-throughput-screening applications. *Anal. Biochem.* **321**, 202–208 (2003).
155. Toxizität.  
<http://de.wikipedia.org/wiki/Toxizität>, 06.04.2015 09:23:52. (2015)

## Quellen

156. Mansour, N. R. & Bickle, Q. D. Comparison of microscopy and alamar blue reduction in a larval based assay for schistosome drug screening. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**, (2010).
157. Tigg, R. S. Oxidation-Reduction Aspects of Resazurin. *Nature* **155**, 401–402 (1945).
158. Pröscher, F.; Zur Kenntniss der Ehrlich'schen Dimethylamidobenzaldehyd-Reaktion. In: Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie. Bd. 31, S. 520–526. (1900).
159. Ohfuné, Y.; Tomita, M.; Total Synthesis of (-)-Domoic Acid. A Revision of the Original Structure. *J. Am. Chem. Soc.* No. 17, 3511–3513. (1982).
160. Flynn D. L. *et al.* A Mild Two-step Method for the Hydrolysis/Methanolysis of Secondary Amides and Lactams. *J. Am Chem Soc.* 2424–2426 (1983).
161. Leif Grehn, Kerstin Gunnarsson, U. R. A Simple Method for Tert-Butoxycarbonylation of Amides. *Acta Chem. Scand.* 745–750. (1986)
162. Kocienski, P. J. Protecting Groups. Georg Thieme Verlag Stuttgart -New York. 506 (2005).
163. Marek, M. *et al.* Structural Basis for the Inhibition of Histone Deacetylase 8 (HDAC8), a Key Epigenetic Player in the Blood Fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog.* **9**, (2013).
164. Image of *Schistosoma* life cycle. <http://biology.fullerton.edu/biol261/ch/ch14.html> 06.04.2015 10:12:44. (2015).
165. Figueiredo, L. M., Cross, G. a M. & Janzen, C. J. Epigenetic regulation in African trypanosomes: a new kid on the block. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 504–13 (2009).

## Anhang

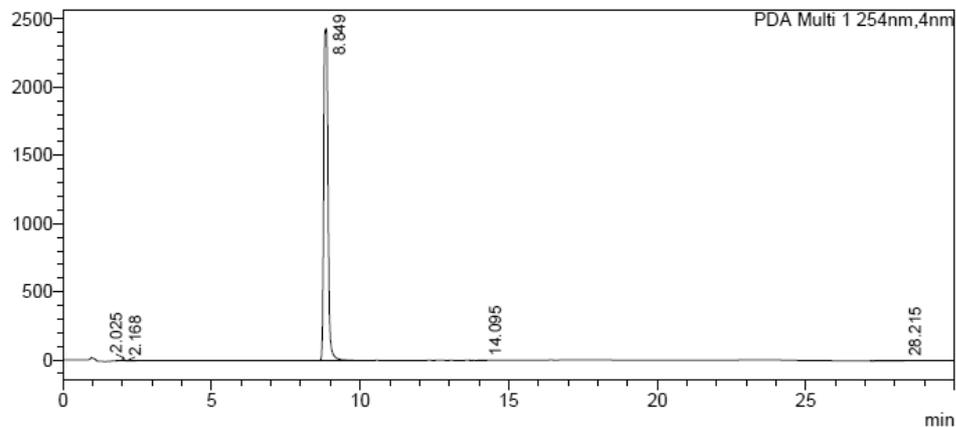
# <sup>1</sup>H-NMR und HPLC Spektren der Endverbindungen

## 50a (TH31)

### HPLC

<Chromatogram>

mAU

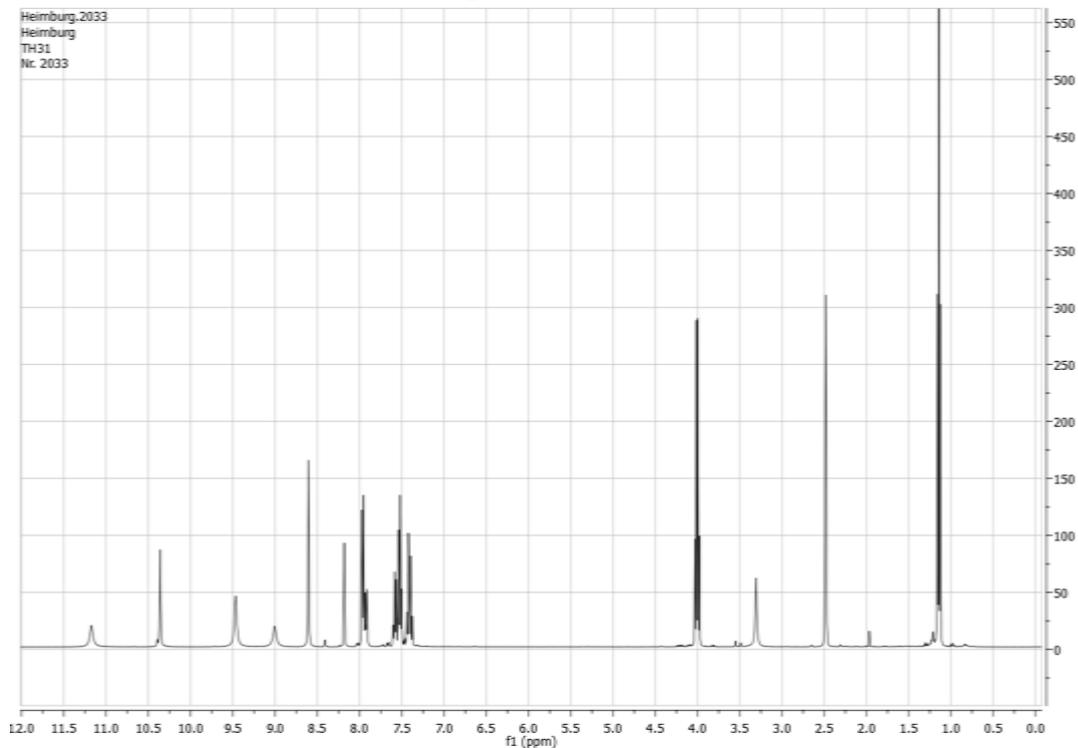


<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	2.025	0.476	118675	25322
2	2.168	0.153	38178	3418
3	8.849	99.265	24740497	2433979
4	14.095	0.041	10330	1533
5	28.215	0.064	16062	319
Total		100.000	24923741	2464571

### <sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

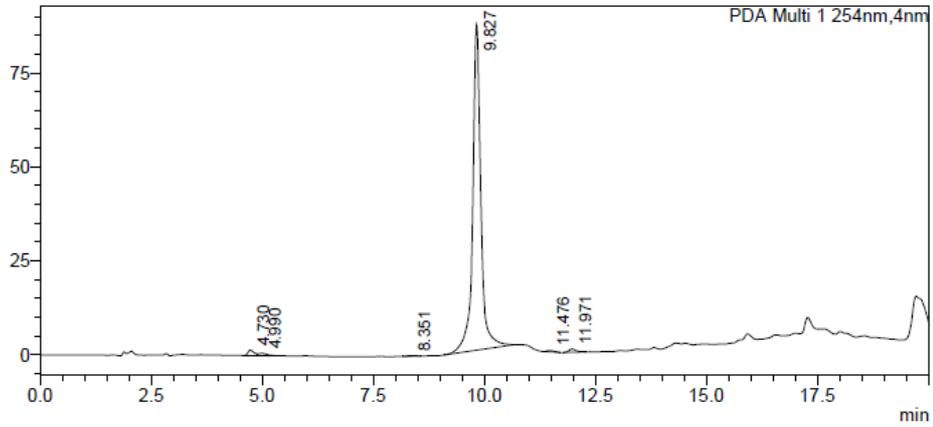


**50b (TH33)**

**HPLC**

**<Chromatogram>**

mAU

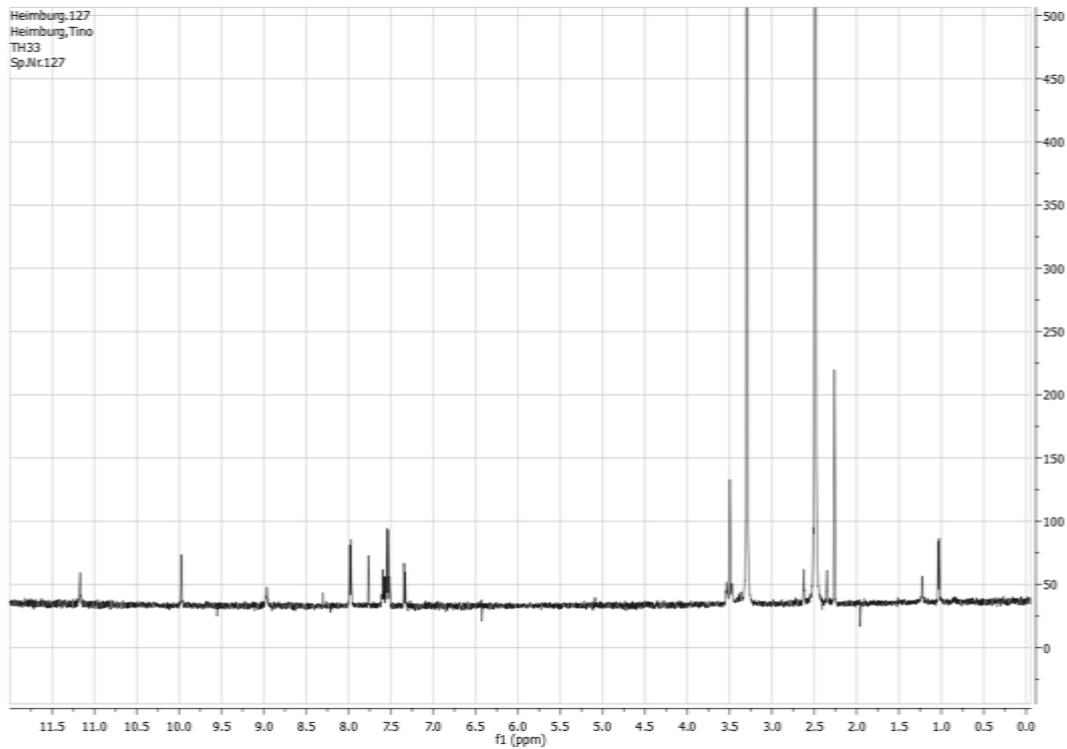


**<Peak Table>**

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	4.730	1.221	14025	1427
2	4.990	0.769	8833	632
3	8.351	0.167	1918	158
4	9.827	96.666	1110295	86624
5	11.476	0.343	3941	366
6	11.971	0.834	9580	895
Total		100.000	1148591	90103

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

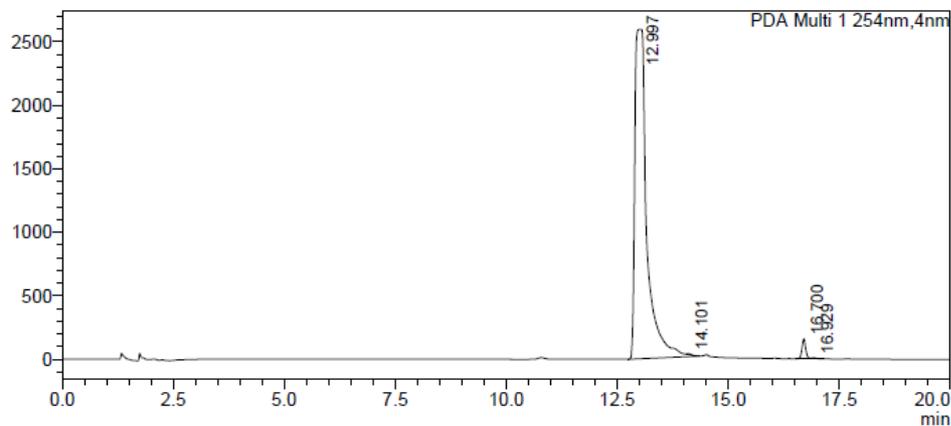


50c (TH60)

HPLC

<Chromatogram>

mAU

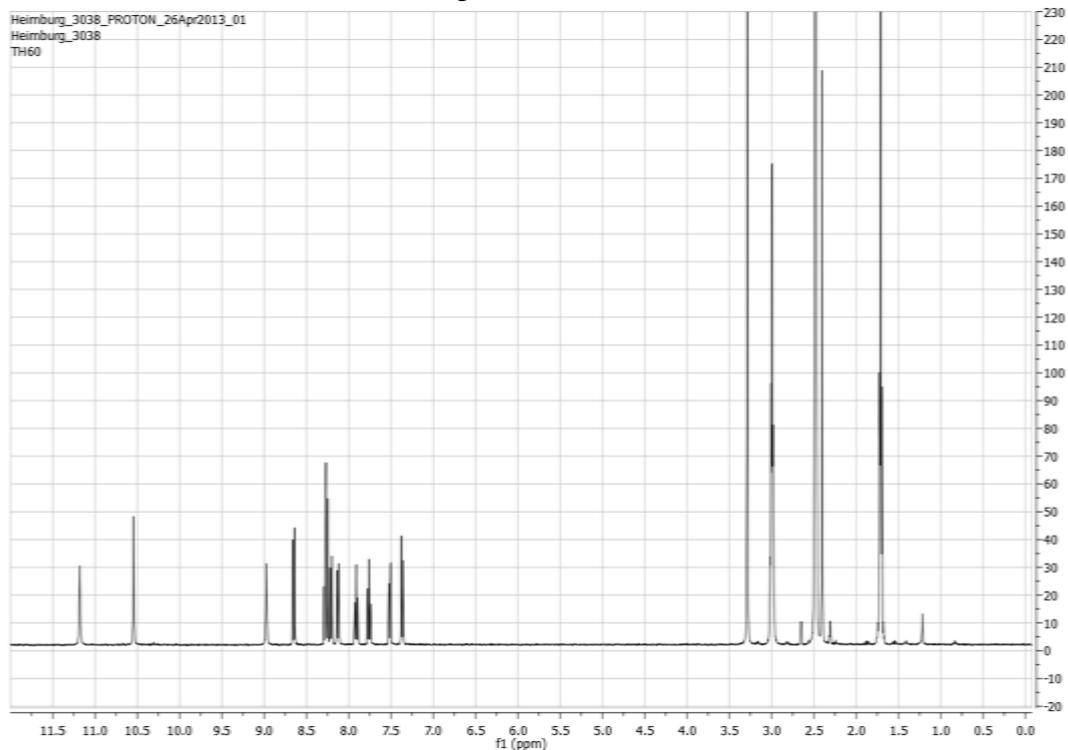


<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	12.997	97.954	48650558	2592829
2	14.101	0.055	27079	5722
3	16.700	1.871	929161	157460
4	16.929	0.121	60073	9143
Total		100.000	49666870	2765154

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

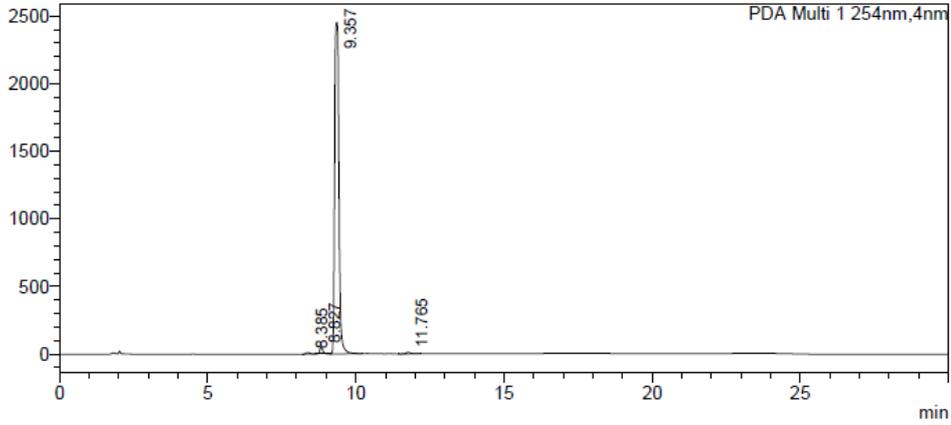


**50d (TH39)**

**HPLC**

**<Chromatogram>**

mAU

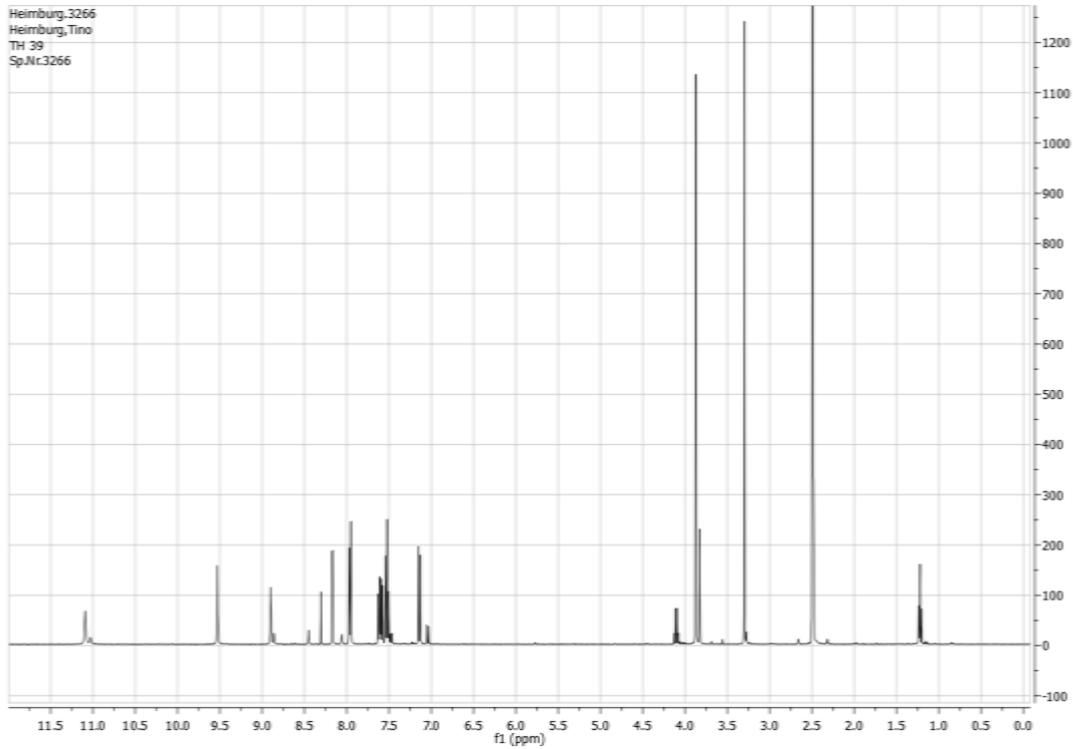


**<Peak Table>**

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	8.385	0.378	95216	12147
2	8.827	1.443	363617	50250
3	9.357	97.760	24631694	2451329
4	11.765	0.419	105476	11930
Total		100.000	25196003	2525656

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

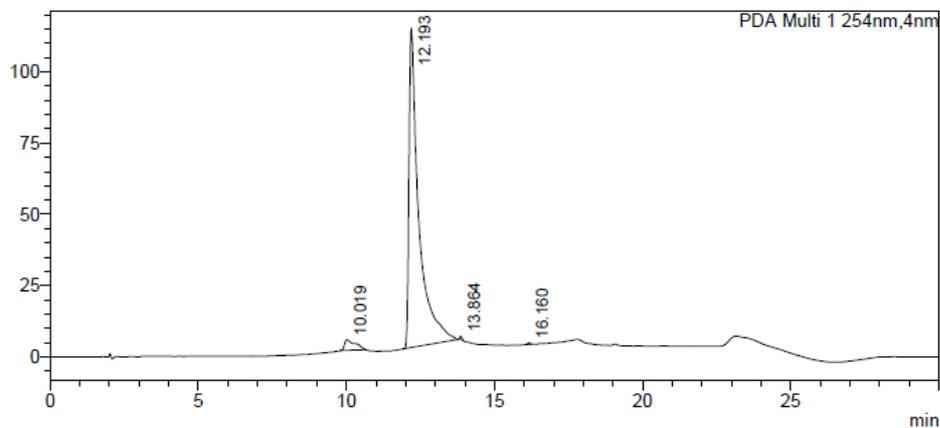


50e (TH65)

HPLC

<Chromatogram>

mAU

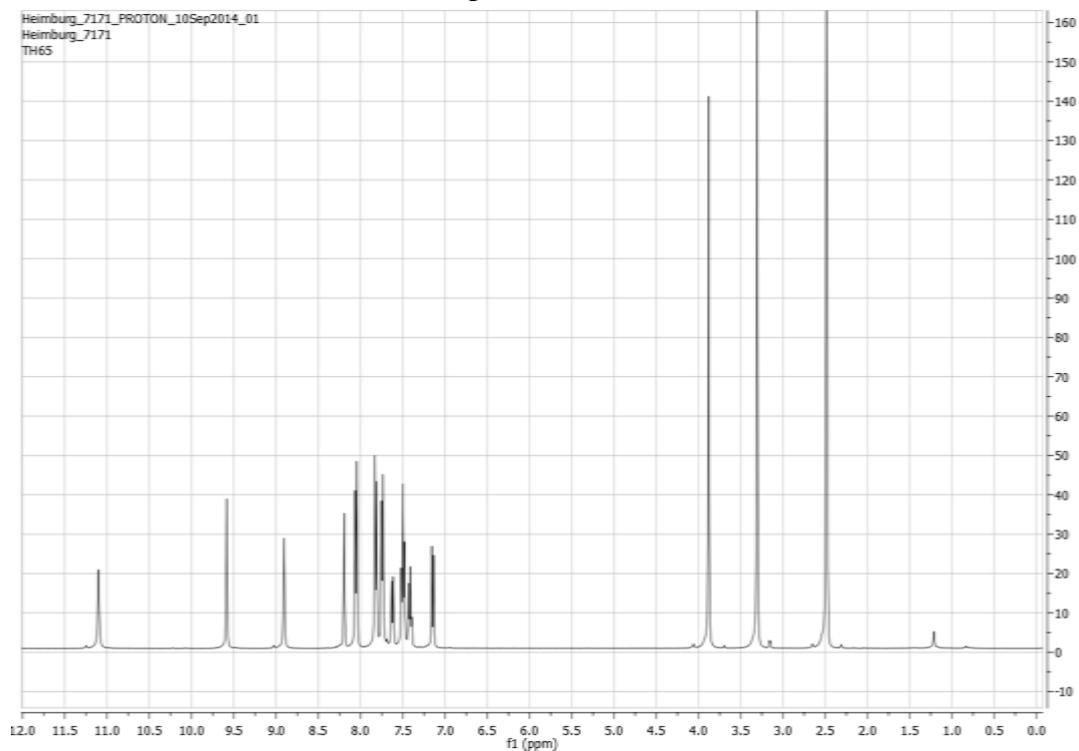


<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	10.019	3.537	95063	3770
2	12.193	96.165	2584950	111494
3	13.864	0.189	5088	1133
4	16.160	0.109	2930	562
Total		100.000	2688031	116960

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

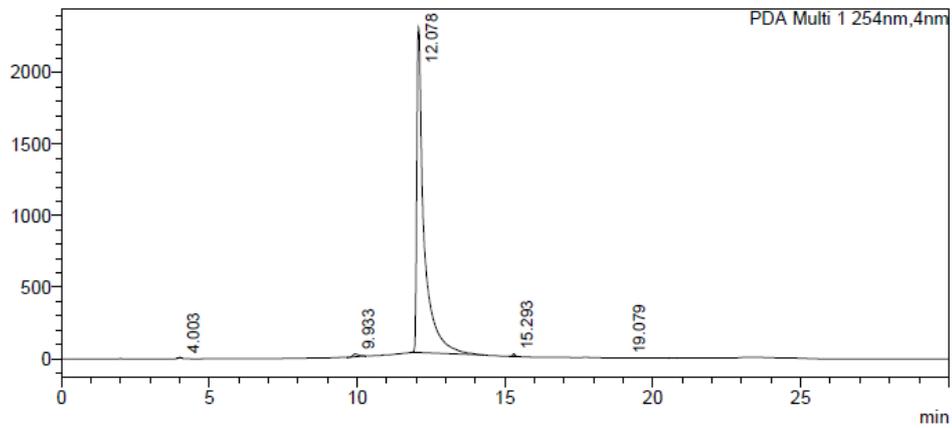


50f (TH95)

HPLC

<Chromatogram>

mAU

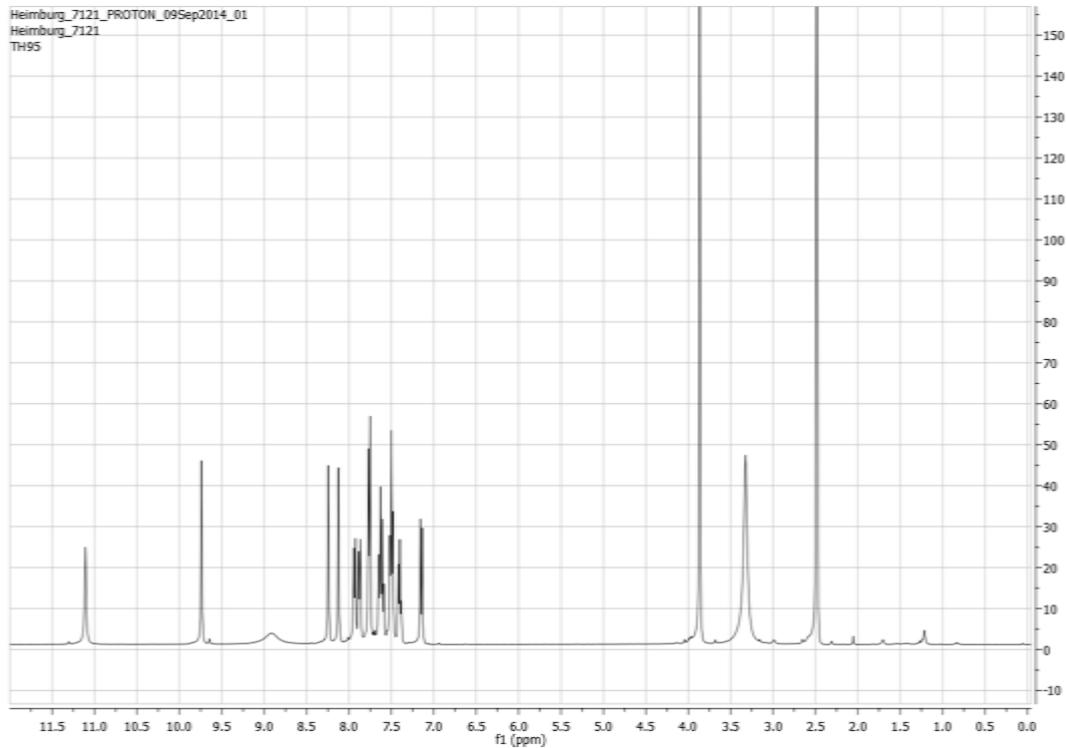


<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	4.003	0.134	52794	8287
2	9.933	0.601	237297	18540
3	12.078	98.998	39099323	2271989
4	15.293	0.261	103254	18119
5	19.079	0.006	2347	347
Total		100.000	39495016	2317282

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C



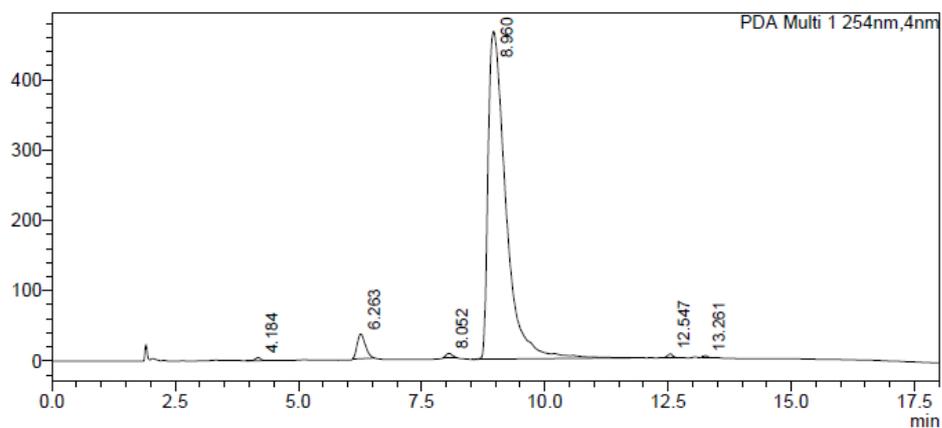
# Anhang

50g (TH69)

## HPLC

### <Chromatogram>

mAU

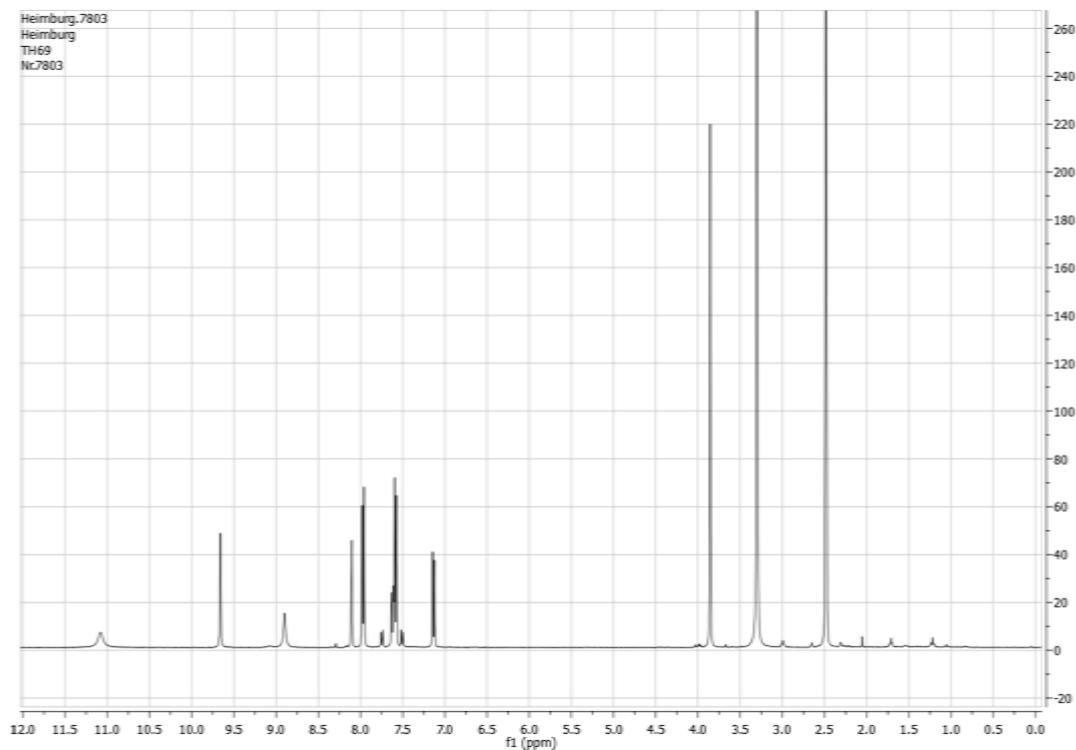


### <Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	4.184	0.255	31348	4361
2	6.263	3.340	410558	35213
3	8.052	0.524	64381	6768
4	8.960	95.354	11721240	466408
5	12.547	0.390	47901	5981
6	13.261	0.138	16952	2935
Total		100.000	12292380	521665

$^1\text{H-NMR}$ ; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

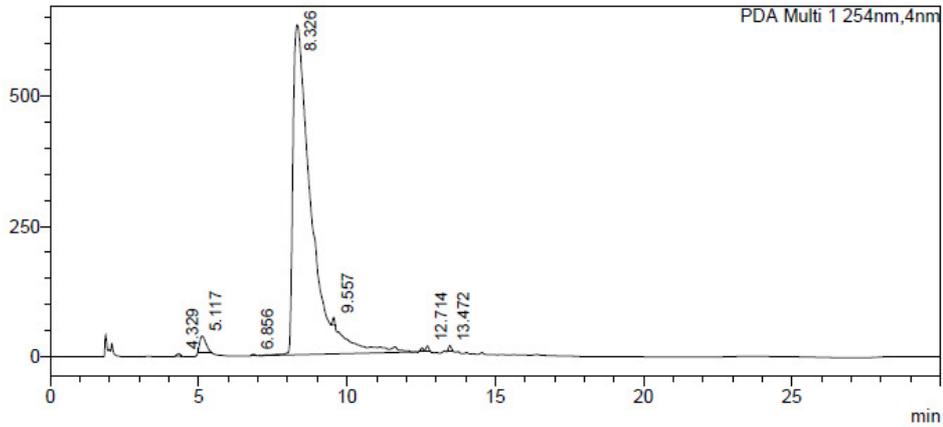


**50h (TH68)**

**HPLC**

**<Chromatogram>**

mAU

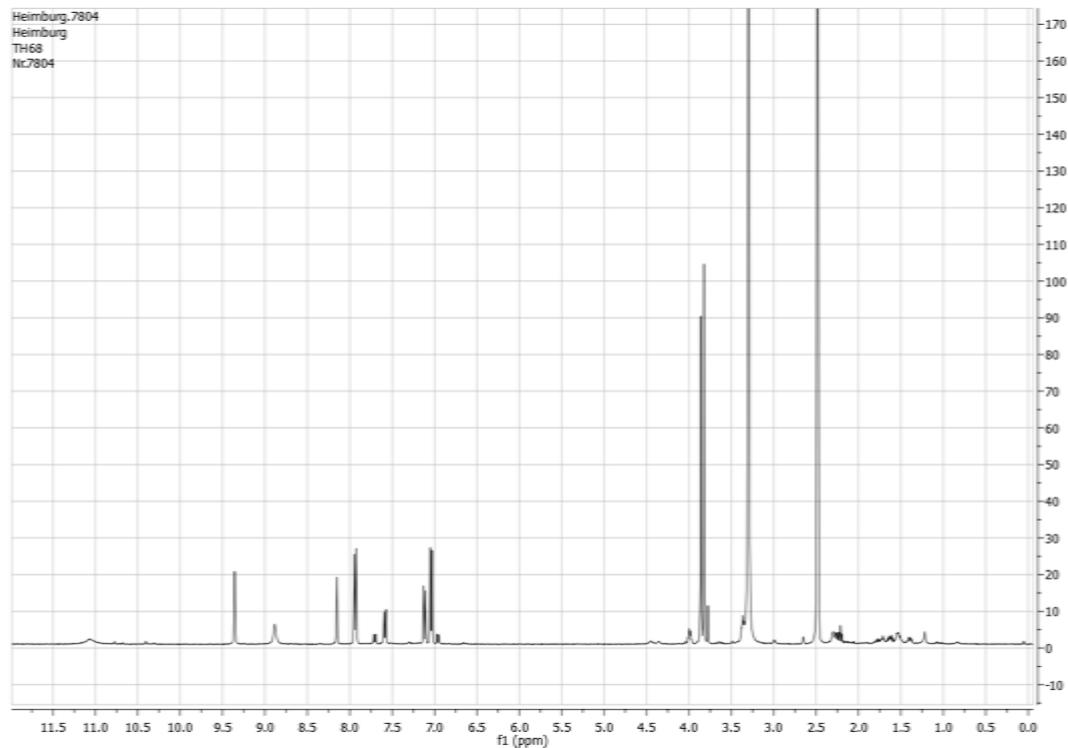


**<Peak Table>**

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	4.329	0.122	34251	5430
2	5.117	1.497	420535	30640
3	6.856	0.079	22327	3397
4	8.326	97.645	27429838	632947
5	9.557	0.205	57559	14143
6	12.714	0.260	73074	8776
7	13.472	0.192	53949	9419
Total		100.000	28091534	704751

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

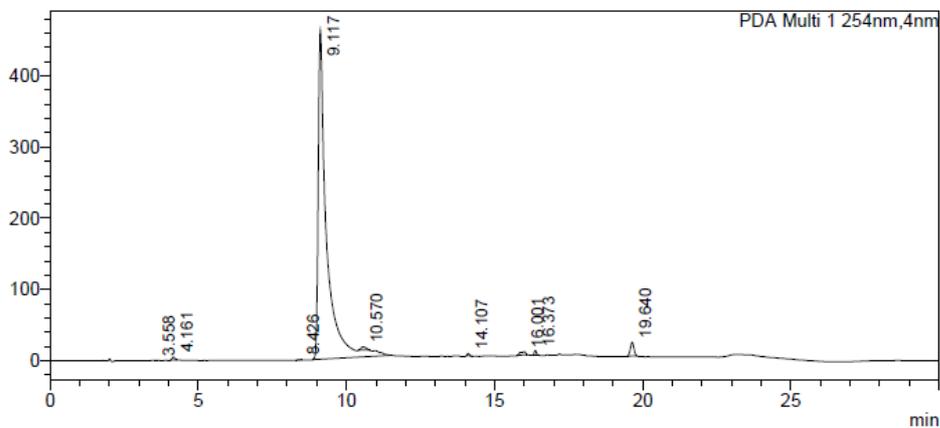


50i (TH85)

HPLC

<Chromatogram>

mAU

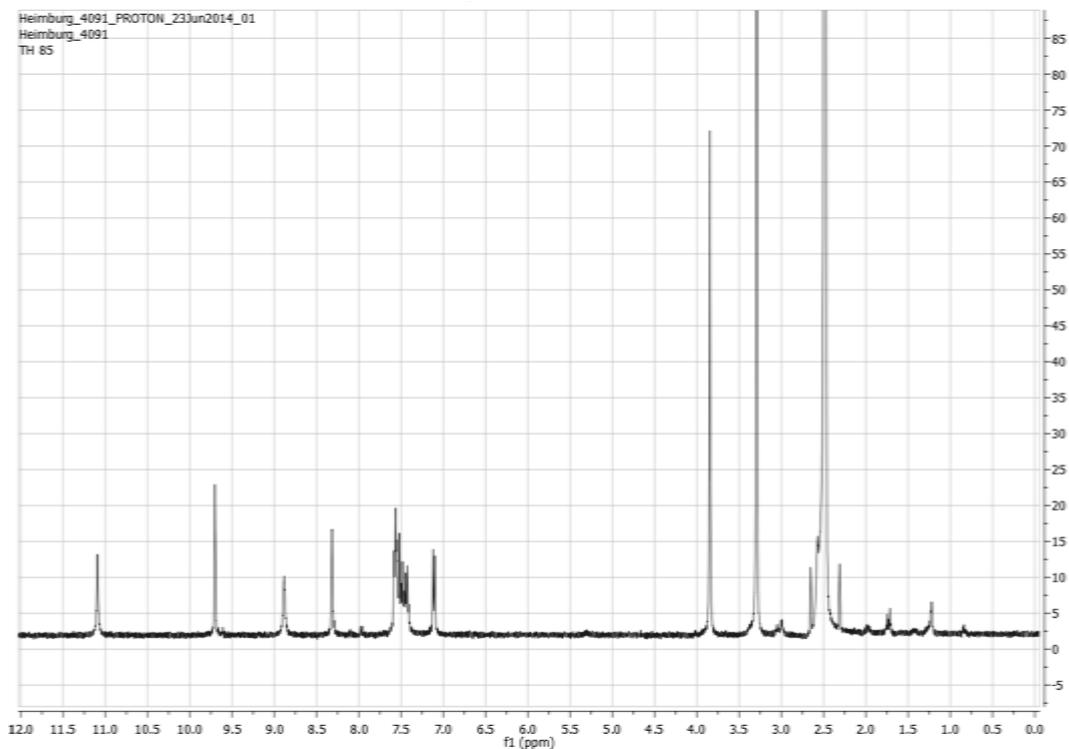


<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	3.558	0.005	470	110
2	4.161	0.270	25655	4135
3	8.426	0.032	2993	429
4	9.117	96.341	9146523	462892
5	10.570	0.534	50676	4266
6	14.107	0.139	13190	3068
7	16.001	0.629	59740	4476
8	16.373	0.359	34048	6905
9	19.640	1.692	160643	19079
Total		100.000	9493939	505360

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

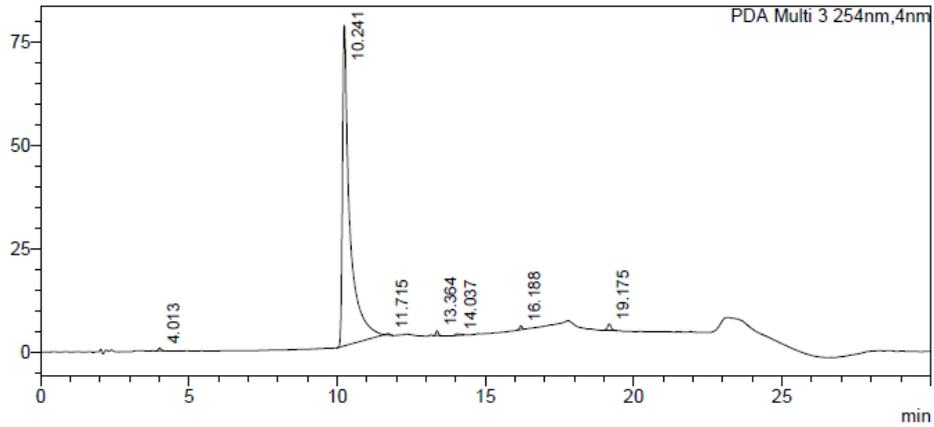


**50j (TH86)**

**HPLC**

**<Chromatogram>**

mAU

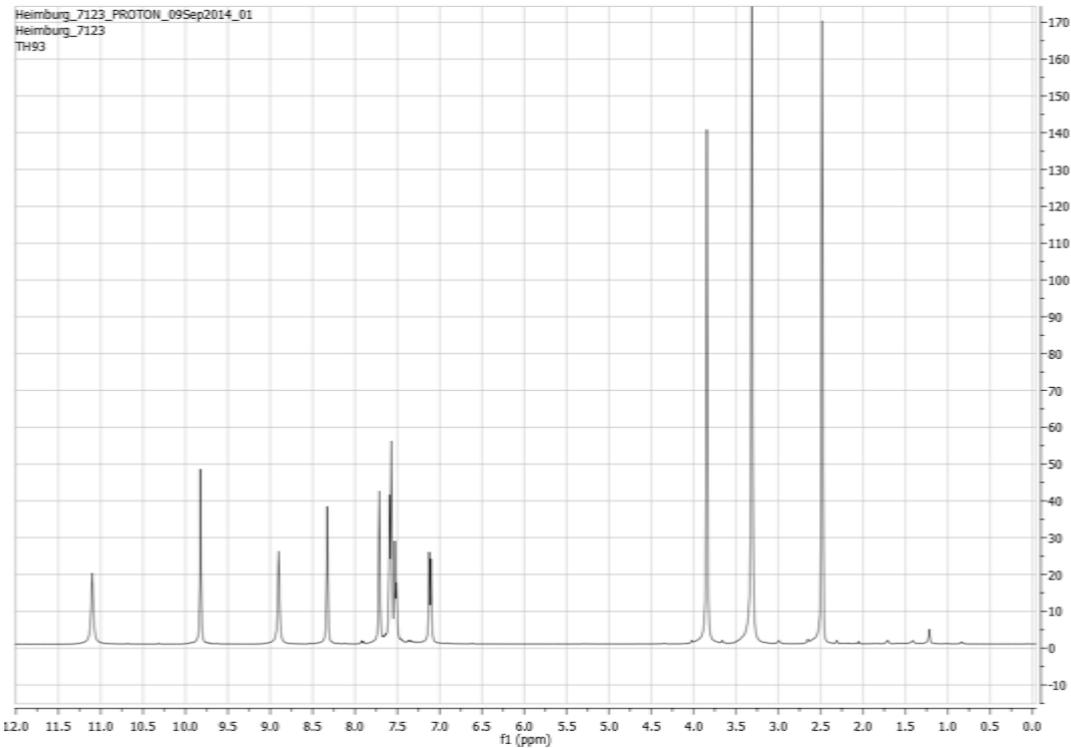


**<Peak Table>**

PDA Ch3 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	4.013	0.271	3705	637
2	10.241	97.434	1333861	77704
3	11.715	0.184	2518	387
4	13.364	0.479	6553	1178
5	14.037	0.308	4219	387
6	16.188	0.405	5546	959
7	19.175	0.920	12588	1514
Total		100.000	1368989	82766

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

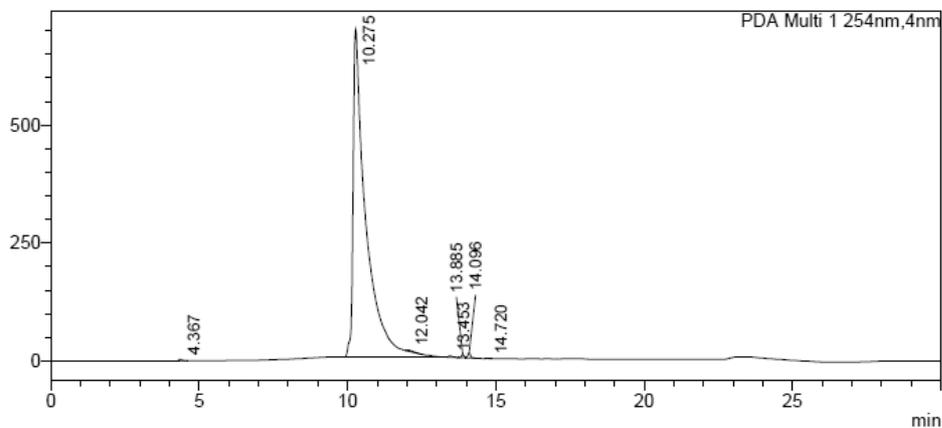


50k (TH66)

HPLC

<Chromatogram>

mAU

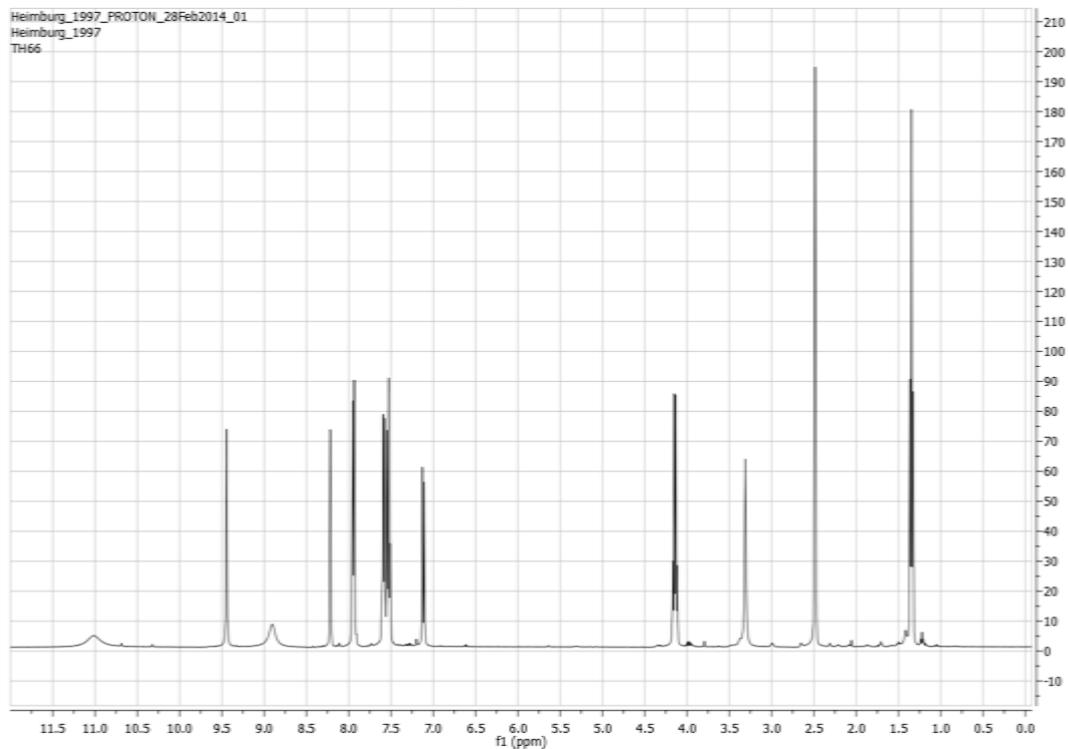


<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	4.367	0.116	24241	3401
2	10.275	99.046	20704612	693345
3	12.042	0.158	33091	2289
4	13.453	0.144	30165	3105
5	13.885	0.199	41585	6379
6	14.096	0.329	68700	11048
7	14.720	0.008	1676	273
Total		100.000	20904071	719839

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

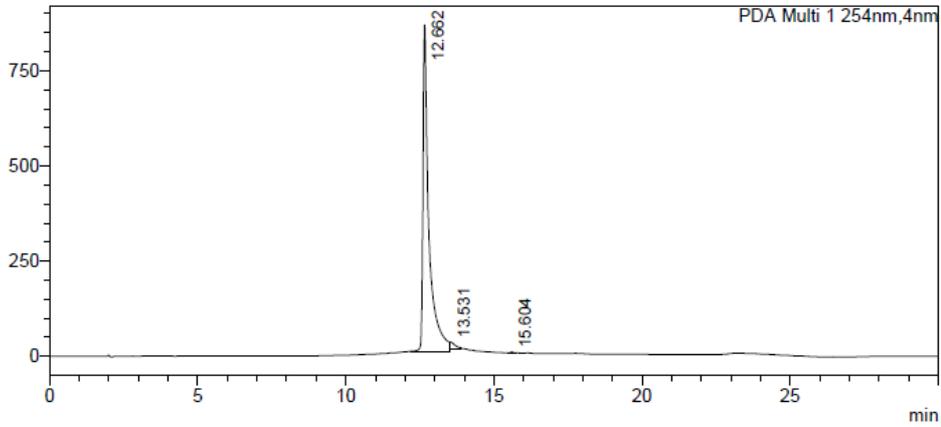


501 (TH92)

HPLC

<Chromatogram>

mAU

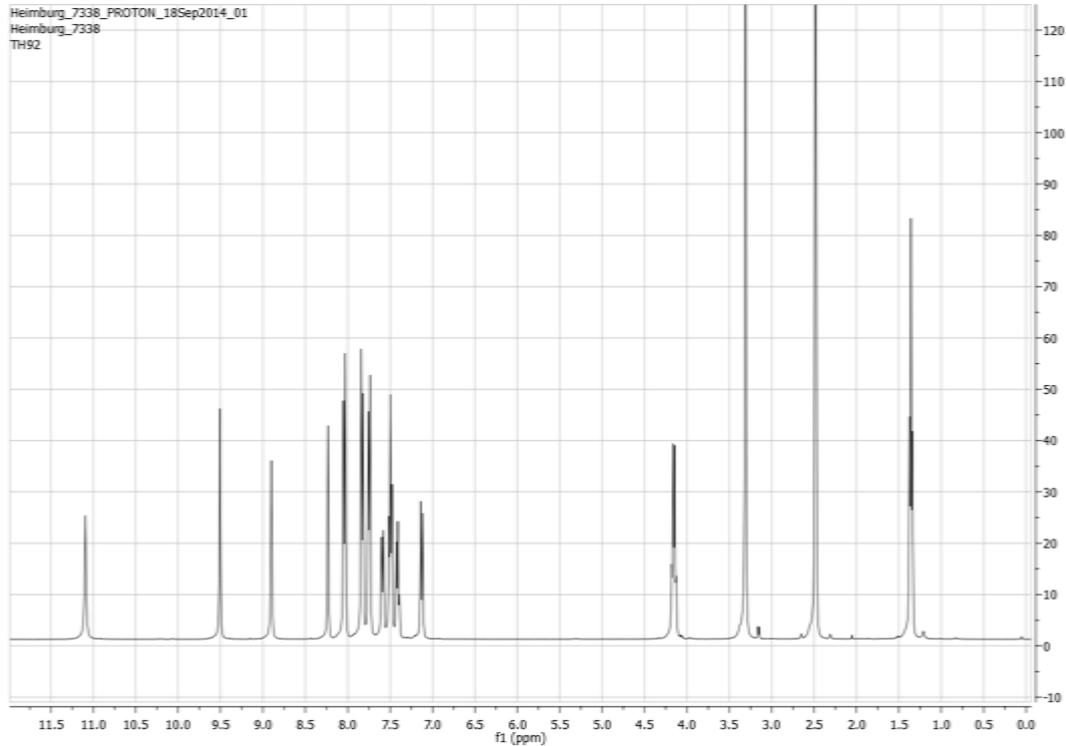


<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	12.662	98.094	11993230	859442
2	13.531	1.817	222111	18935
3	15.604	0.090	10964	2044
Total		100.000	12226305	880421

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

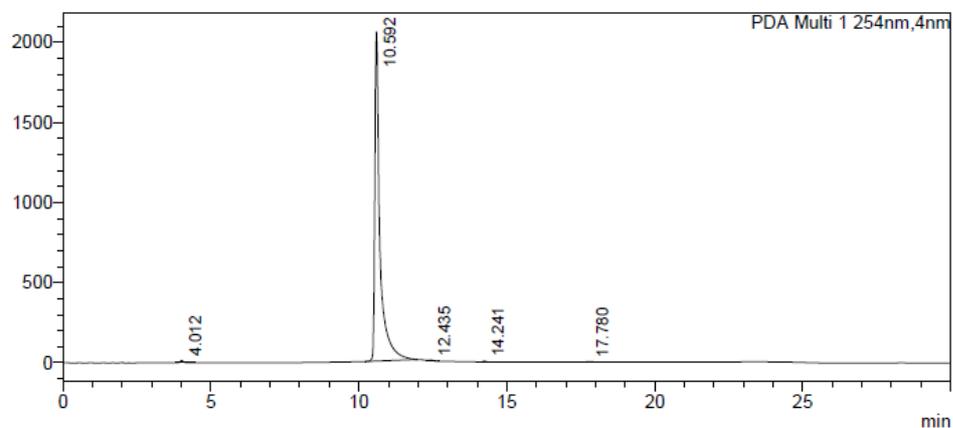


50m (TH67)

HPLC

<Chromatogram>

mAU

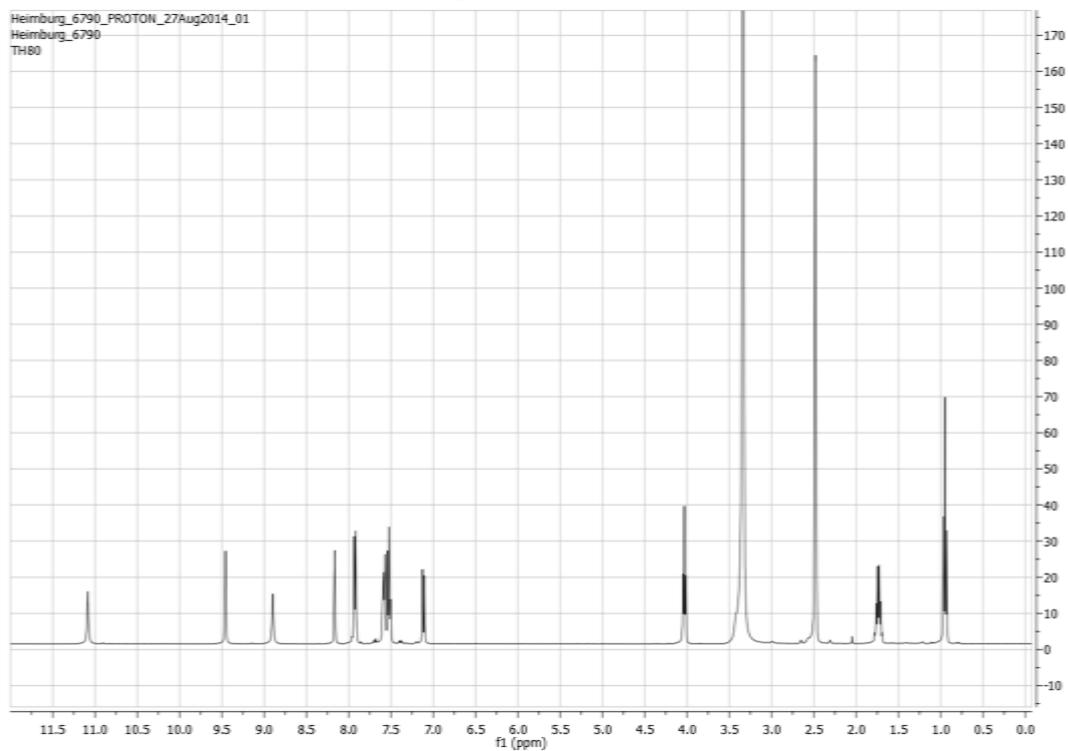


<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	4.012	0.414	103355	13580
2	10.592	99.230	24765011	2056982
3	12.435	0.105	26191	4923
4	14.241	0.135	33631	5694
5	17.780	0.116	28874	1135
Total		100.000	24957062	2082314

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

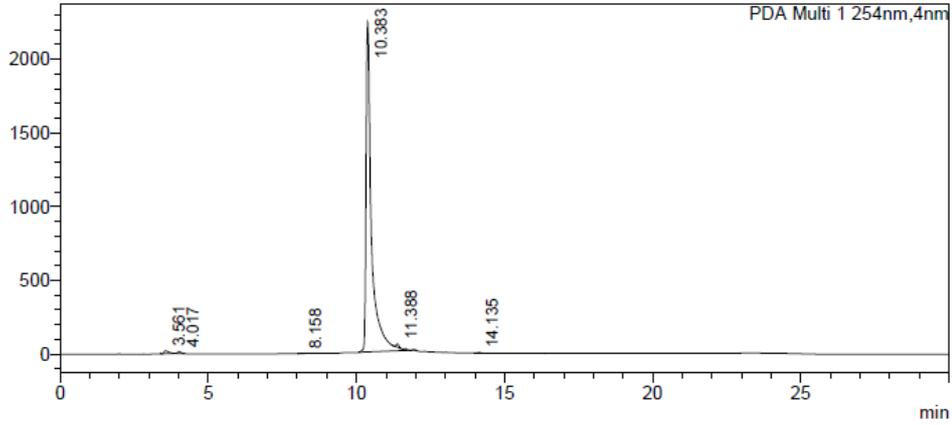


**50n (TH83)**

**HPLC**

**<Chromatogram>**

mAU

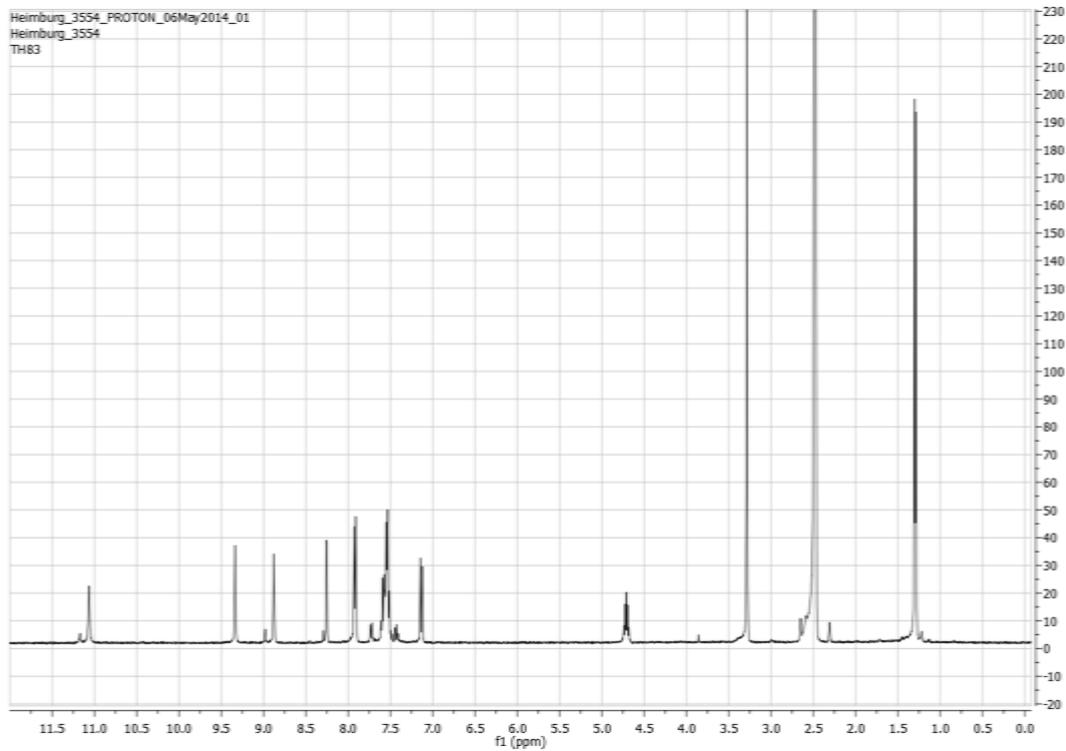


**<Peak Table>**

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	3.561	0.788	231731	20236
2	4.017	0.331	97515	14394
3	8.158	0.044	13077	1630
4	10.383	98.345	28933265	2235845
5	11.388	0.397	116661	21960
6	14.135	0.095	27890	5092
Total		100.000	29420139	2299156

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

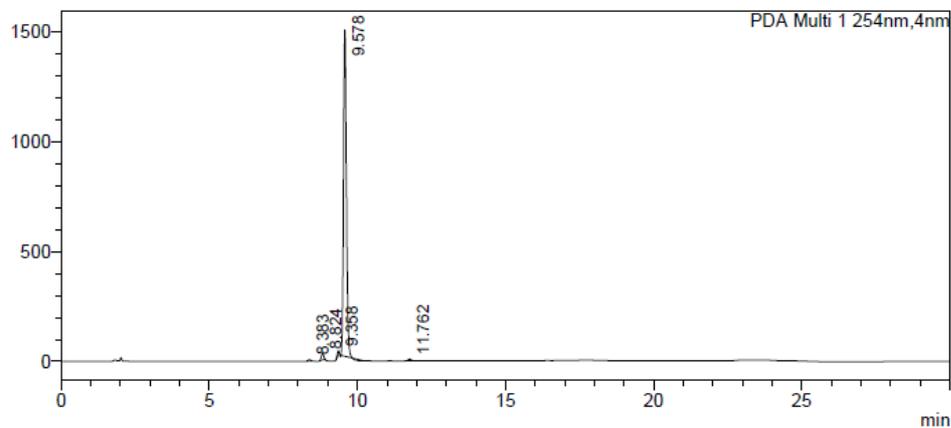


50o (TH61)

HPLC

<Chromatogram>

mAU

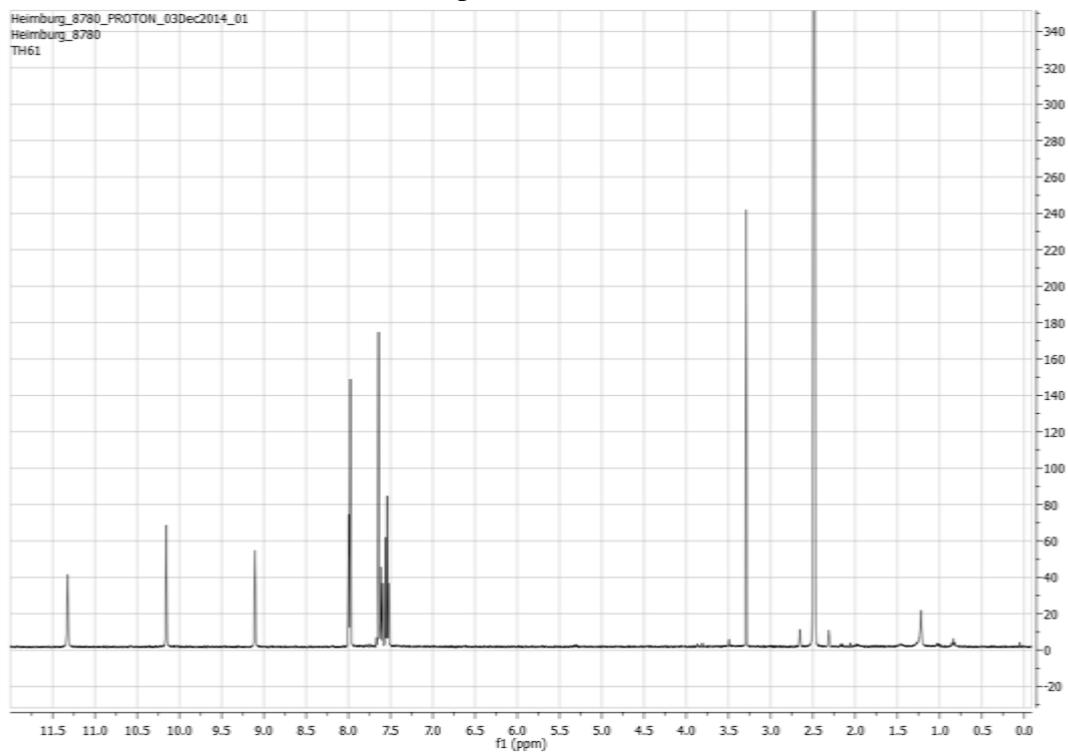


<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	8.383	0.373	38892	6782
2	8.824	1.597	166548	29407
3	9.358	0.658	68599	16044
4	9.578	96.752	10092301	1484648
5	11.762	0.620	64719	8426
Total		100.000	10431059	1545306

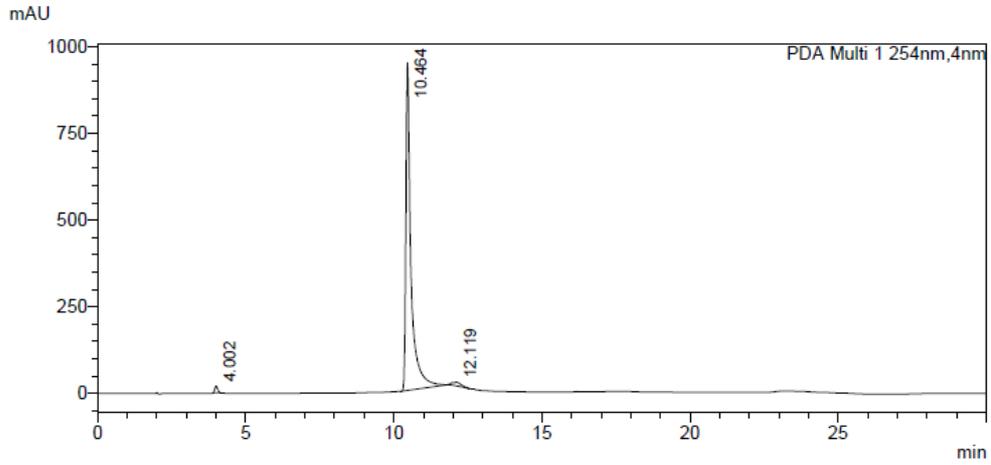
<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C



50p (TH93)

HPLC

<Chromatogram>

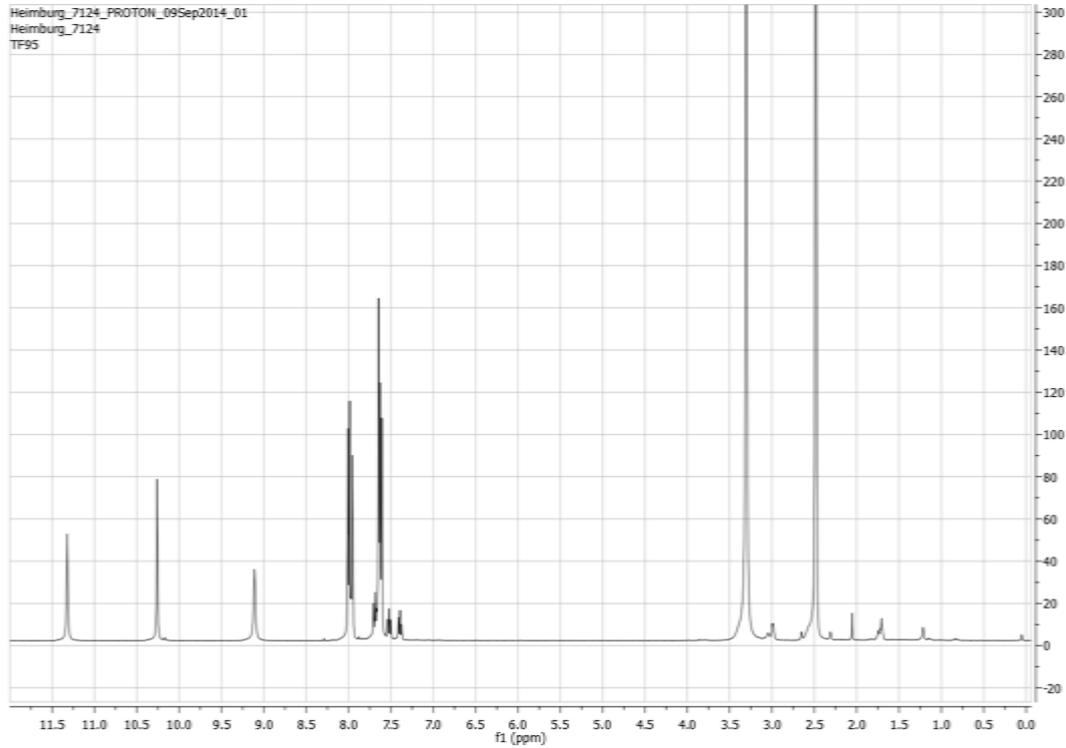


<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	4.002	1.048	122858	19027
2	10.464	97.068	11378701	946174
3	12.119	1.884	220901	11137
Total		100.000	11722460	976338

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

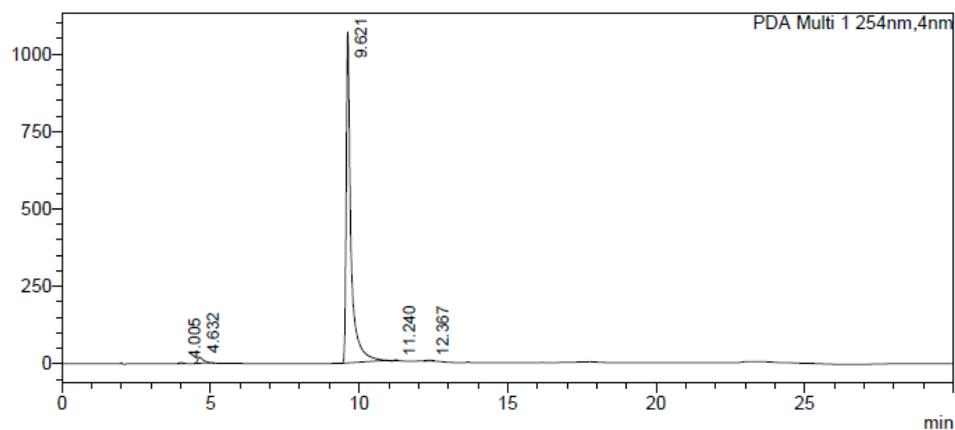


50q (TH74)

HPLC

<Chromatogram>

mAU

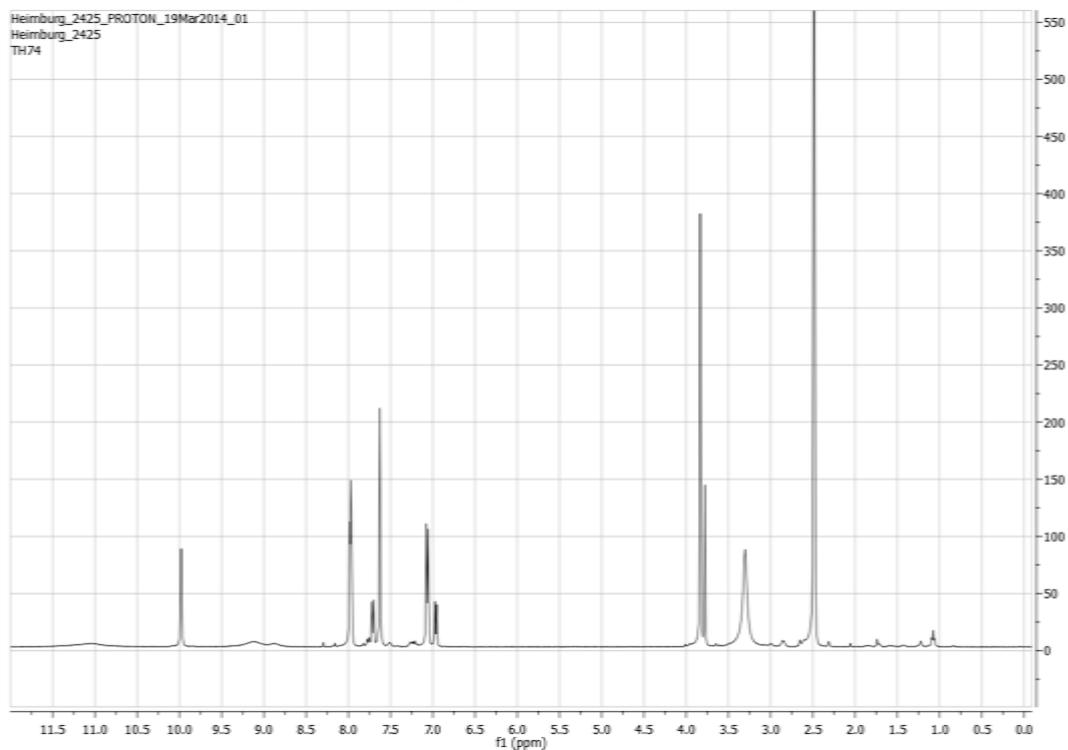


<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	4.005	0.193	23620	3542
2	4.632	2.196	269201	19242
3	9.621	97.219	11920212	1069295
4	11.240	0.129	15864	2467
5	12.367	0.264	32322	3019
Total		100.000	12261218	1097565

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

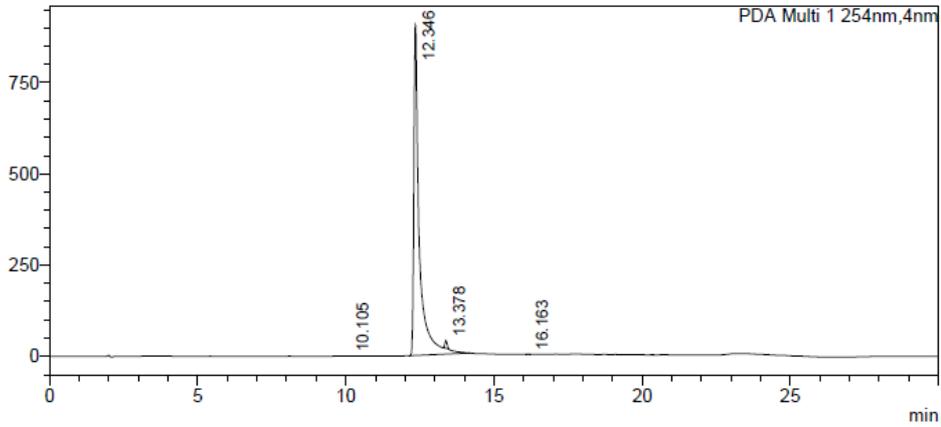


**50r (TH81)**

**HPLC**

**<Chromatogram>**

mAU

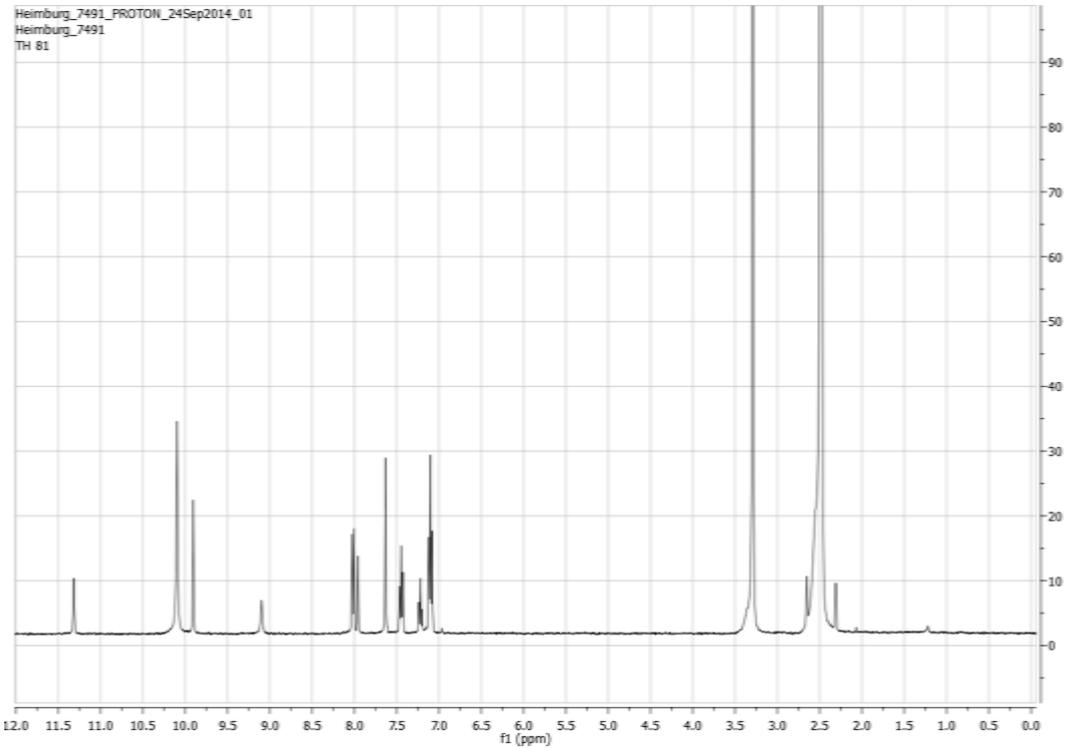


**<Peak Table>**

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	10.105	0.022	2641	355
2	12.346	99.002	11641463	906102
3	13.378	0.960	112925	21171
4	16.163	0.015	1821	414
Total		100.000	11758850	928042

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

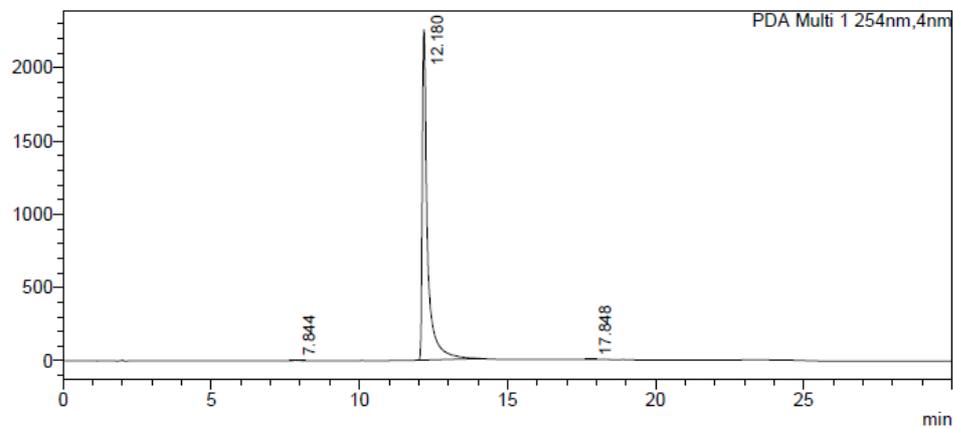


50s (TH78)

HPLC

<Chromatogram>

mAU

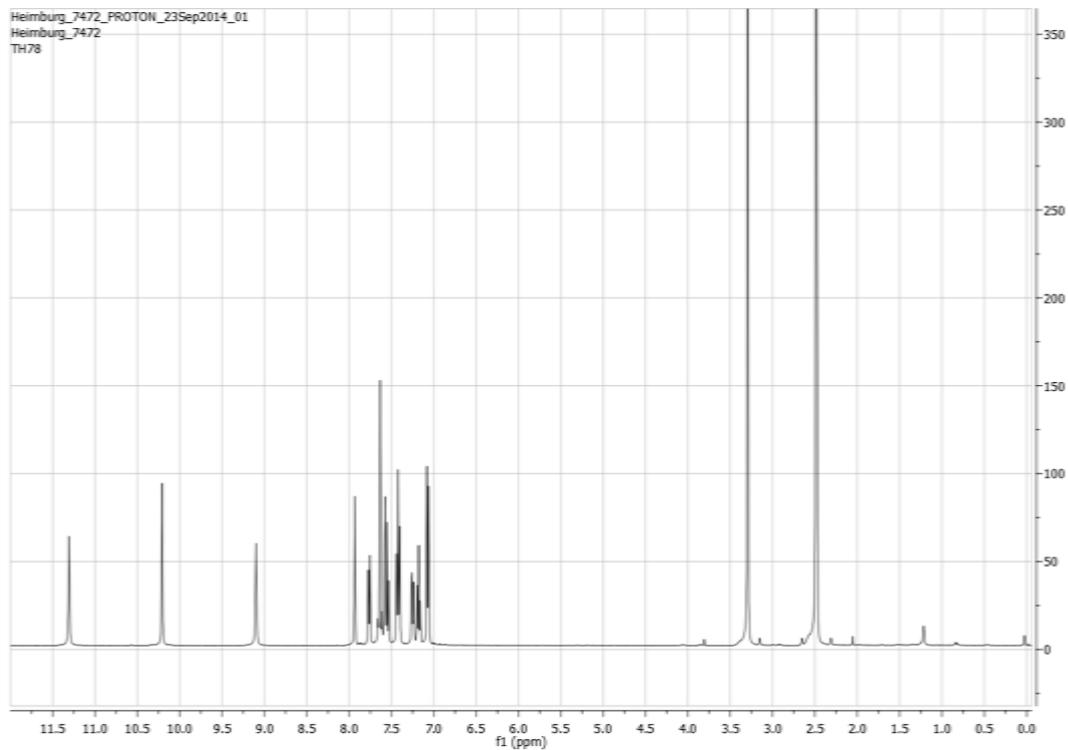


<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	7.844	0.119	33514	2636
2	12.180	99.834	28231809	2256417
3	17.848	0.048	13436	1321
Total		100.000	28278760	2260374

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

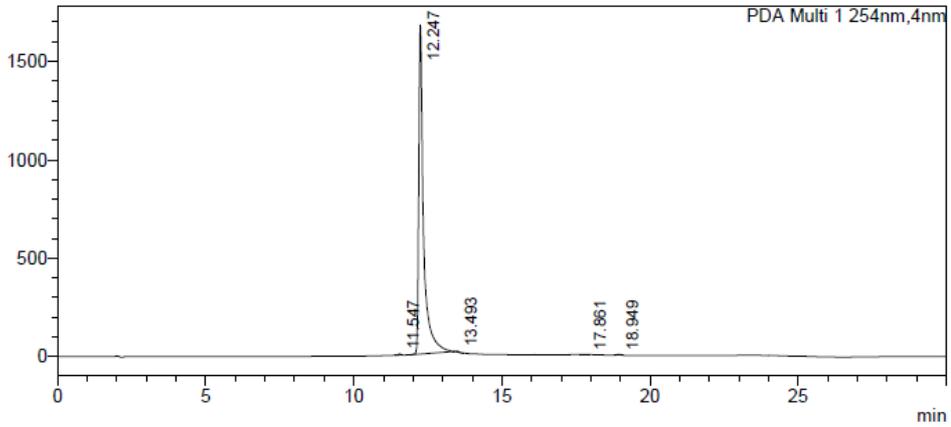


**50t (TH77)**

**HPLC**

**<Chromatogram>**

mAU

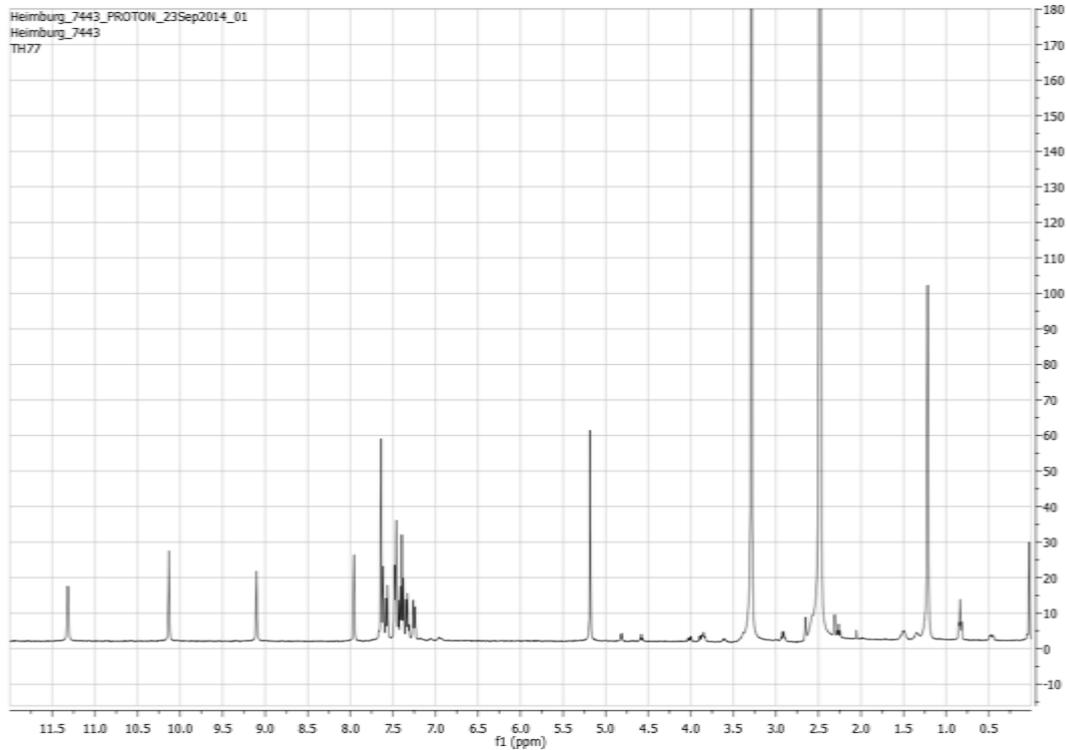


**<Peak Table>**

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	11.547	0.153	29084	5495
2	12.247	99.490	18881341	1672869
3	13.493	0.163	30870	5621
4	17.861	0.036	6815	693
5	18.949	0.159	30099	4160
Total		100.000	18978209	1688839

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

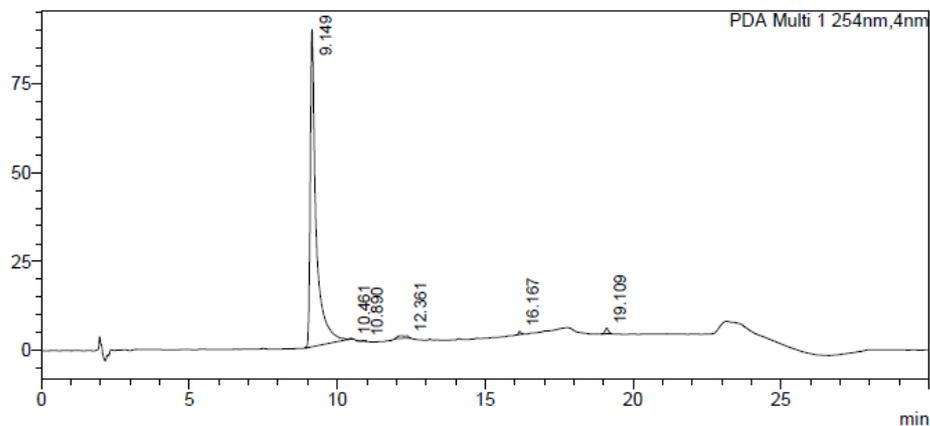


50u (TH96)

HPLC

<Chromatogram>

mAU

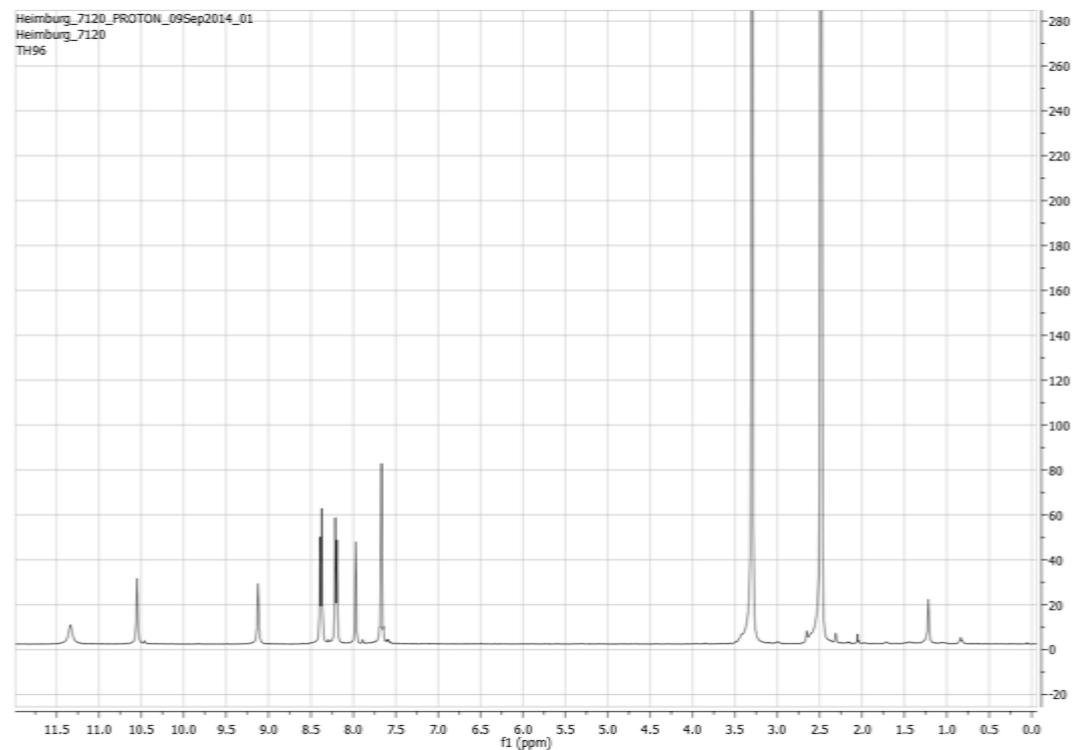


<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	9.149	97.240	1239517	89056
2	10.461	0.134	1703	263
3	10.890	-0.001	-6	167
4	12.361	1.287	16411	677
5	16.167	0.397	5057	938
6	19.109	0.943	12017	1542
Total		100.000	1274698	92643

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

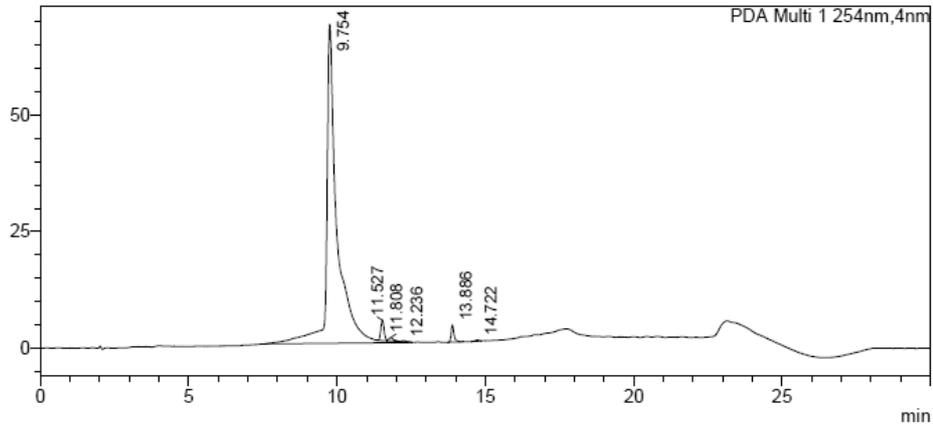


50v (TH75)

HPLC

<Chromatogram>

mAU

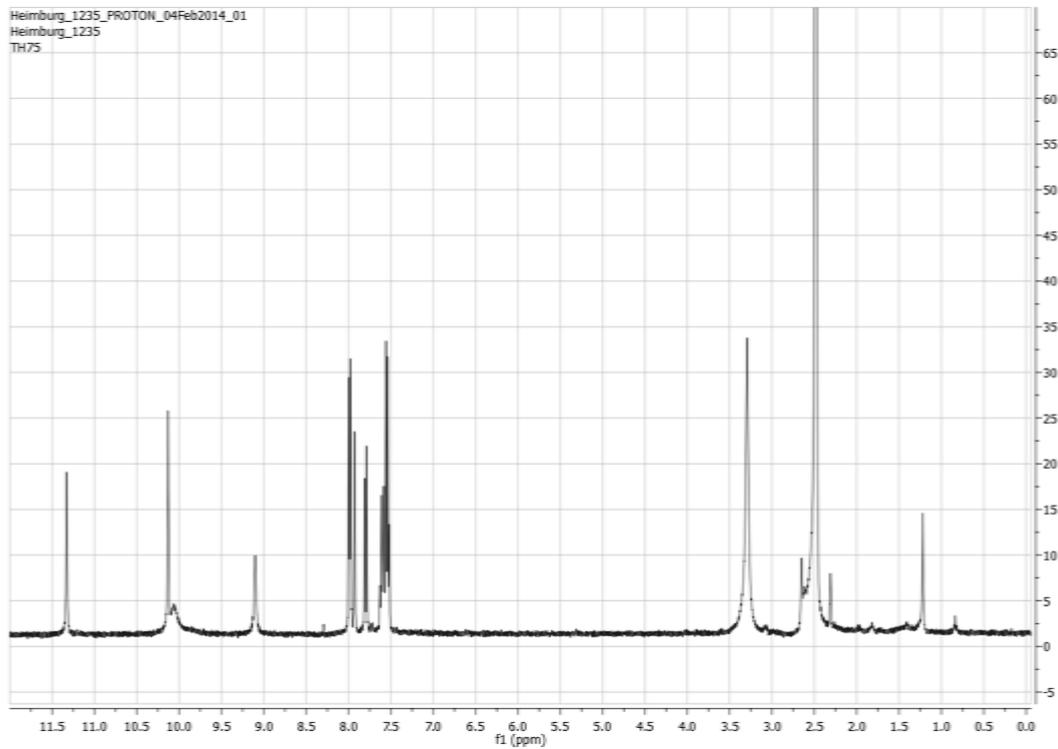


<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	9.754	95.948	1684078	68333
2	11.527	1.886	33098	4327
3	11.808	0.474	8320	731
4	12.236	0.169	2974	297
5	13.886	1.398	24542	3623
6	14.722	0.124	2182	278
Total		100.000	1755194	77589

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

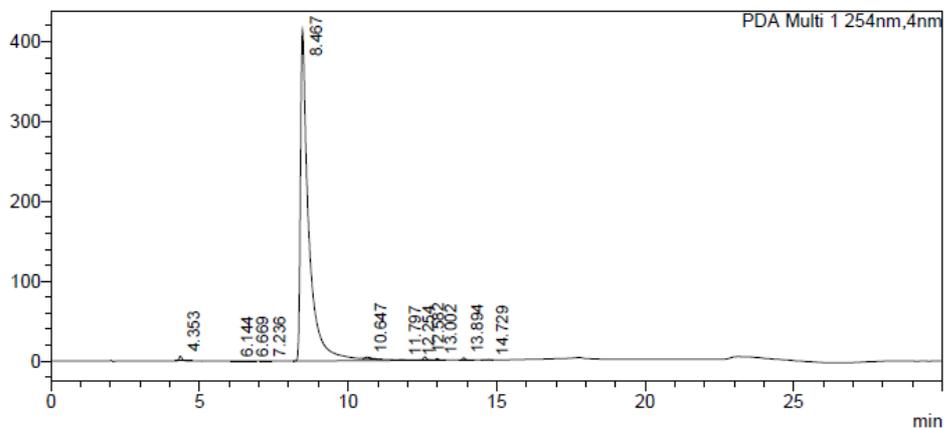


50w (TH76)

HPLC

<Chromatogram>

mAU

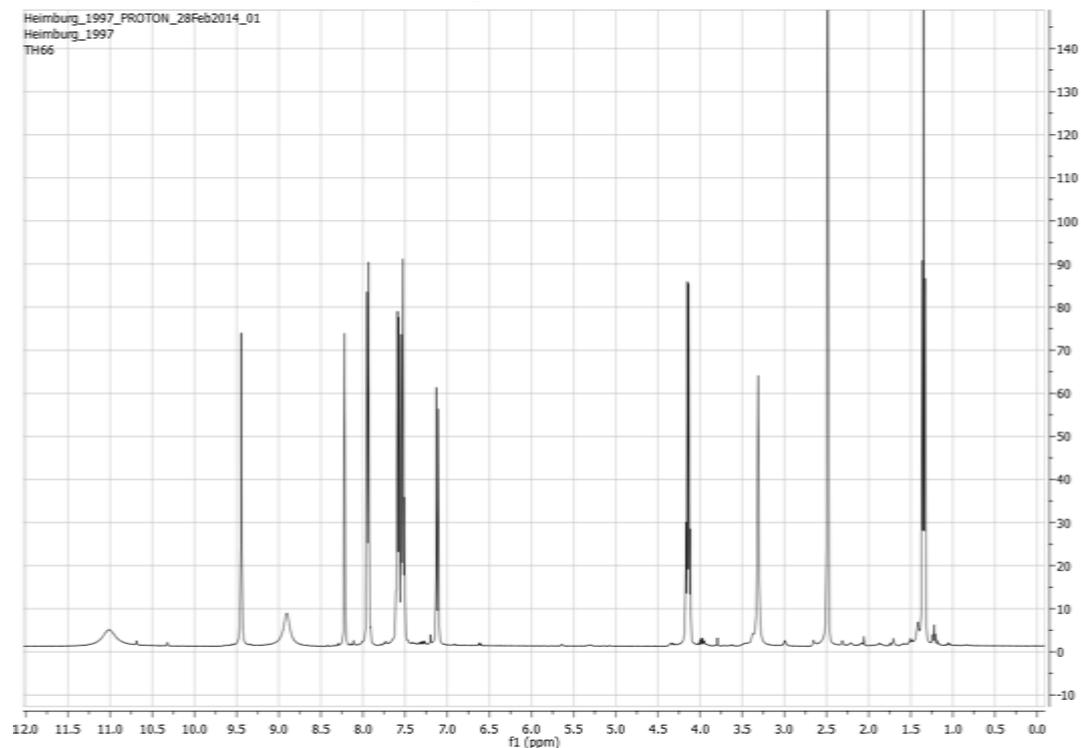


<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	4.353	0.526	43721	5965
2	6.144	0.012	1014	97
3	6.669	0.022	1833	270
4	7.236	0.032	2633	374
5	8.467	98.225	8158765	414695
6	10.647	0.371	30795	1866
7	11.797	0.071	5888	511
8	12.254	0.017	1441	198
9	12.582	0.337	27970	4216
10	13.002	0.136	11324	1758
11	13.894	0.225	18704	2785
12	14.729	0.026	2132	270
Total		100.000	8306221	433005

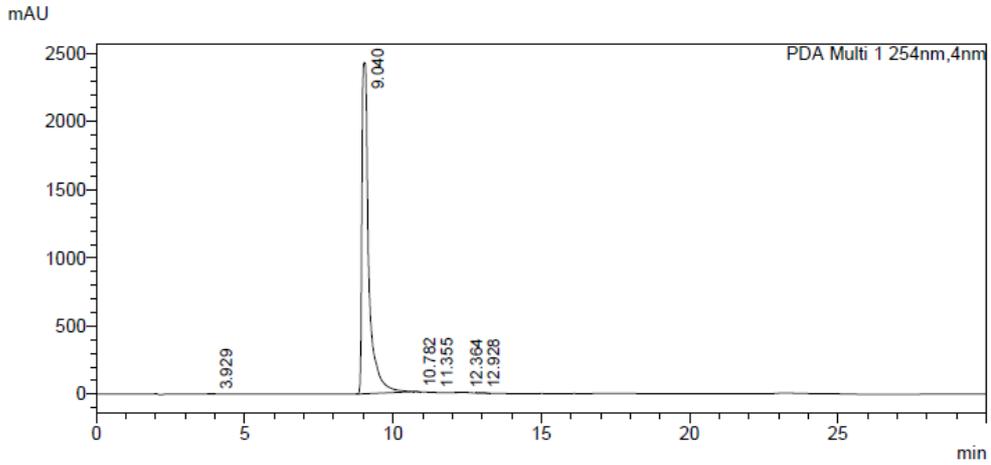
<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C



50x (TH94)

HPLC

<Chromatogram>

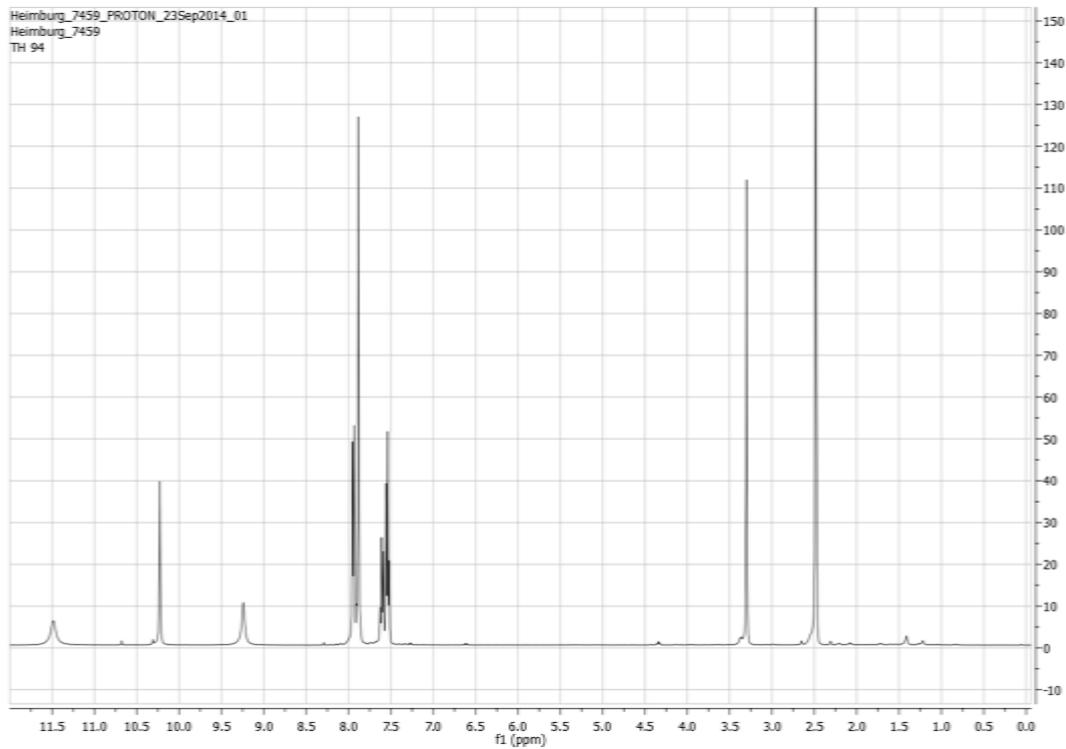


<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	3.929	0.009	3609	381
2	9.040	99.748	39553665	2430972
3	10.782	0.051	20142	2823
4	11.355	0.020	8118	1426
5	12.364	0.057	22694	1441
6	12.928	0.114	45271	3664
Total		100.000	39653499	2440706

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

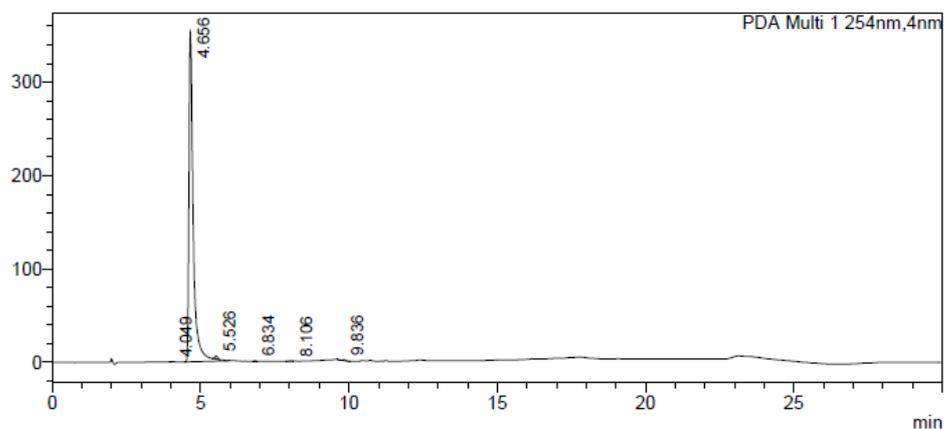


## 51a (TH32boc)

## HPLC

## &lt;Chromatogram&gt;

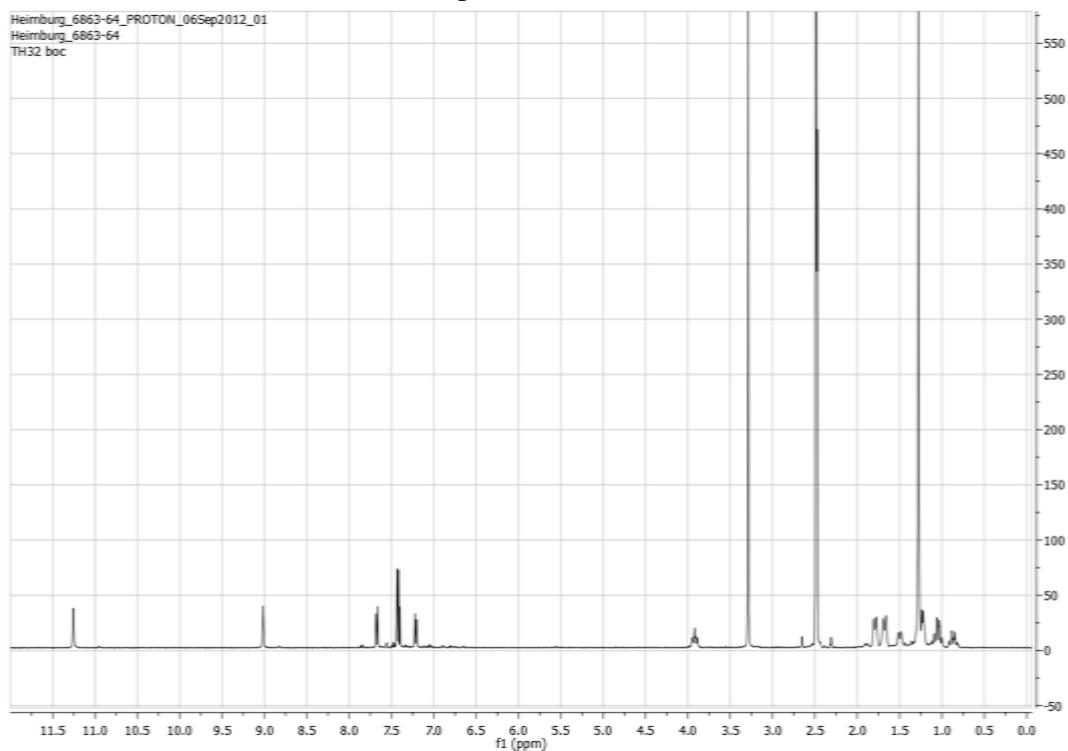
mAU



## &lt;Peak Table&gt;

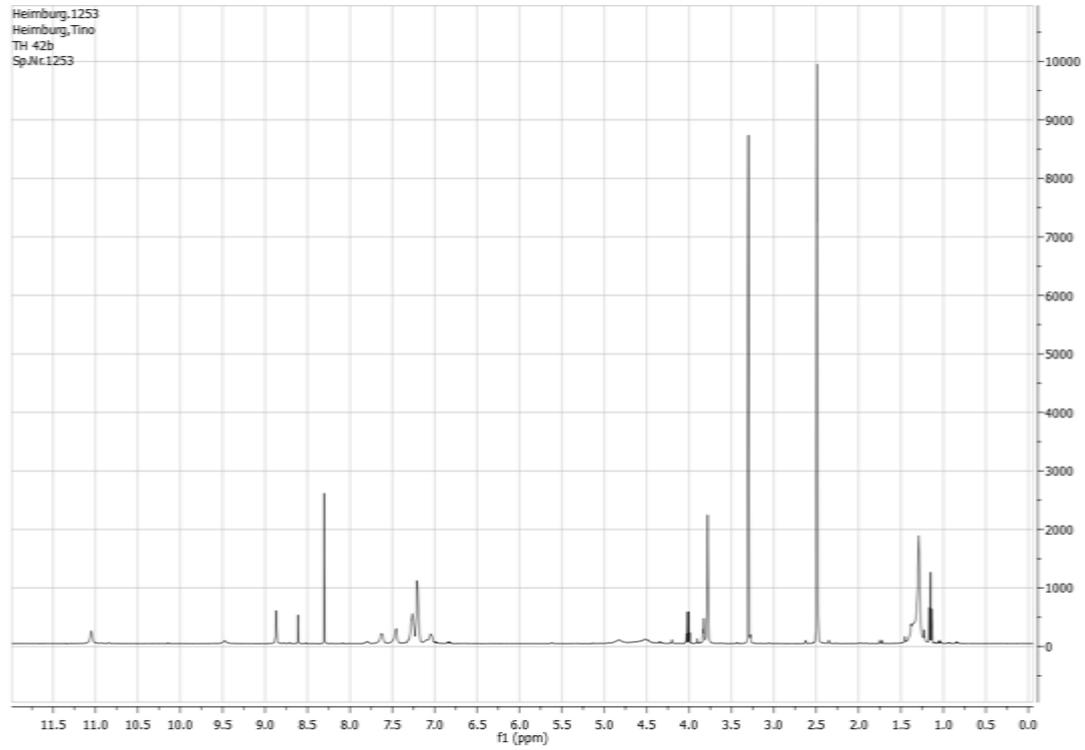
PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	4.049	0.012	424	72
2	4.656	99.314	3602796	353695
3	5.526	0.544	19727	3303
4	6.834	0.082	2969	577
5	8.106	-0.008	-296	19
6	9.836	0.057	2057	1073
Total		100.000	3627676	358740

 $^1\text{H-NMR}$ ; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

**51d** (TH42boc)

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

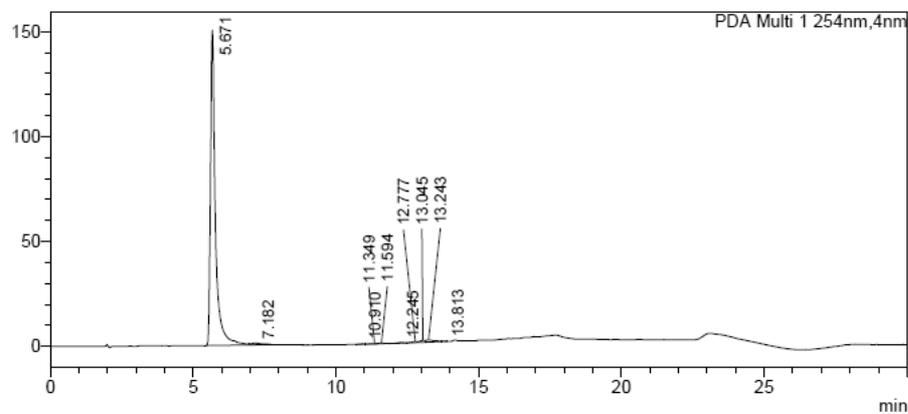


## 52a (TH32)

## HPLC

## &lt;Chromatogram&gt;

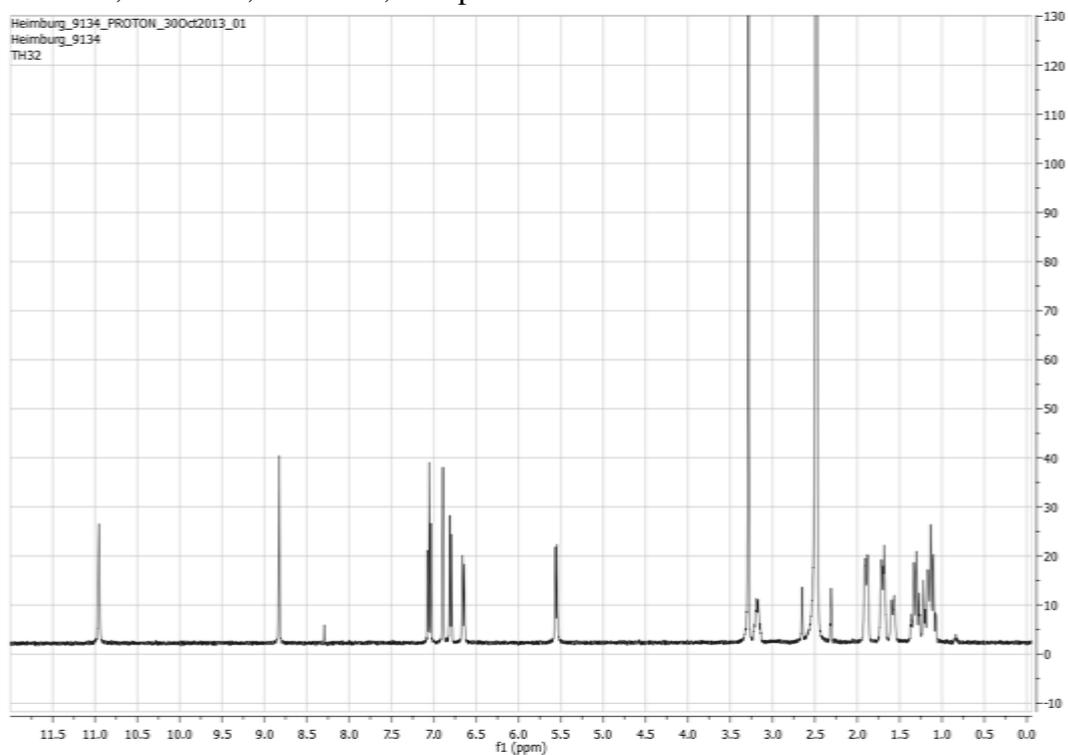
mAU



## &lt;Peak Table&gt;

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	5.671	96.619	1817413	150493
2	7.182	0.518	9746	456
3	10.910	0.117	2204	217
4	11.349	0.160	3012	141
5	11.594	0.210	3954	379
6	12.245	0.244	4595	284
7	12.777	0.357	6716	550
8	13.045	0.612	11521	931
9	13.243	1.103	20751	973
10	13.813	0.058	1094	100
Total		100.000	1881006	154524

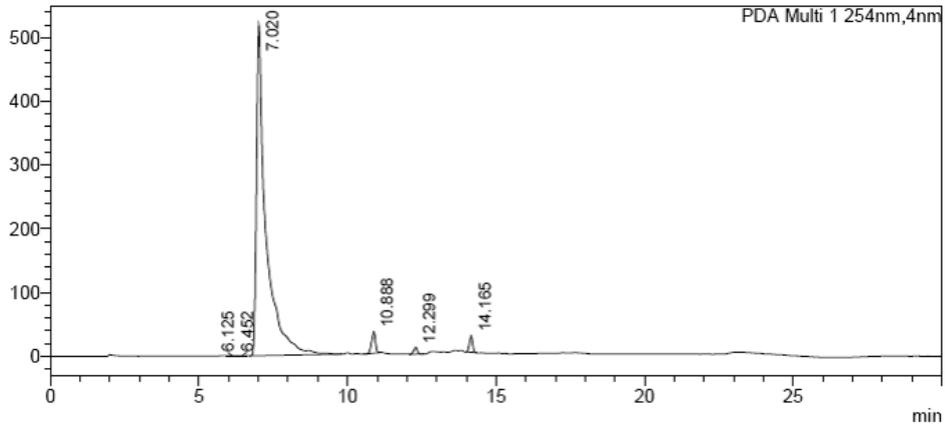
<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

**52b (TH28)**

**HPLC**

**<Chromatogram>**

mAU

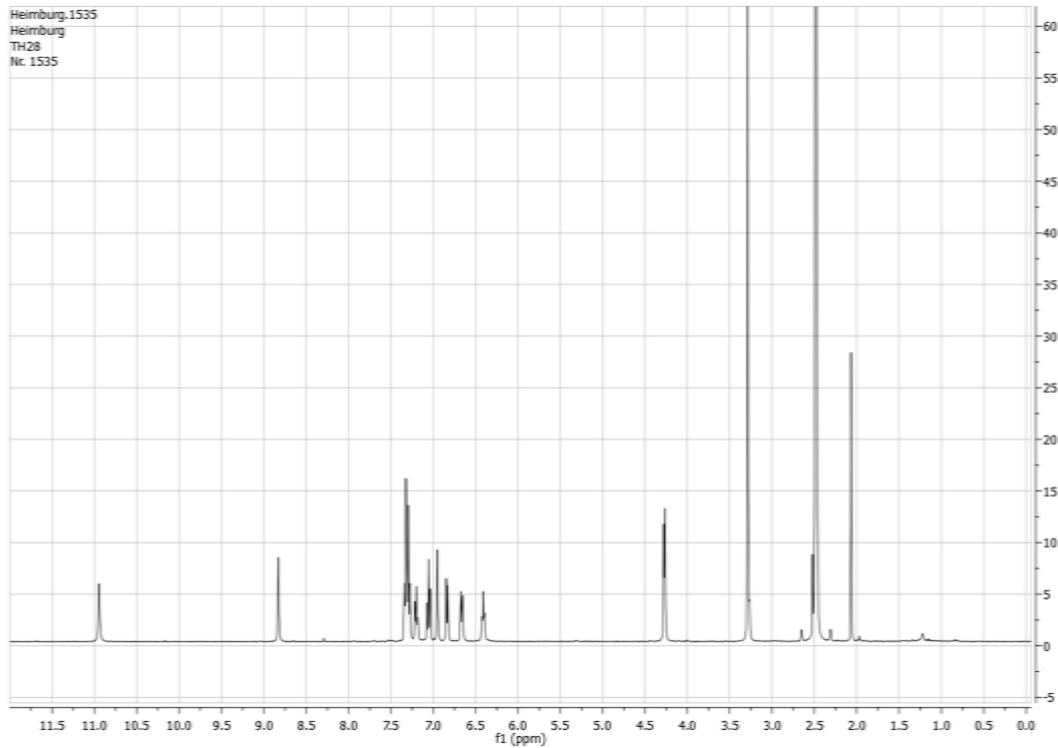


**<Peak Table>**

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	6.125	0.027	3266	263
2	6.452	0.024	2961	284
3	7.020	95.073	11514811	519345
4	10.888	2.517	304790	33664
5	12.299	0.746	90383	10714
6	14.165	1.613	195323	26053
Total		100.000	12111533	590324

**<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C**

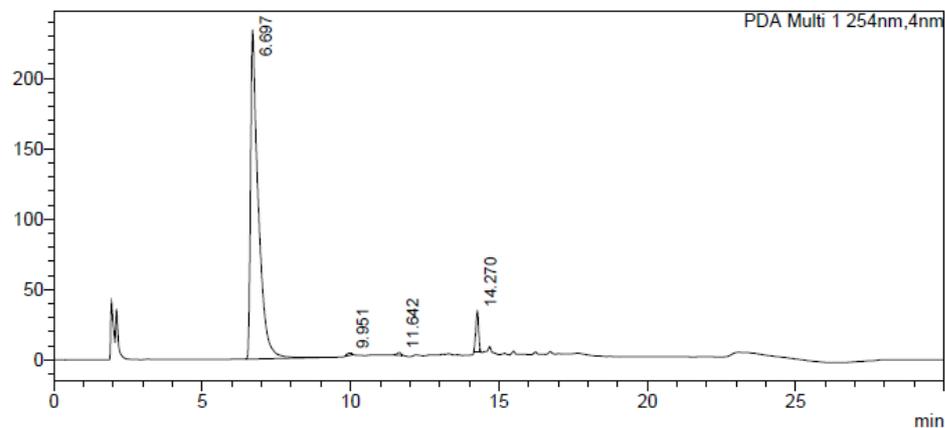


52c (TH35)

HPLC

<Chromatogram>

mAU

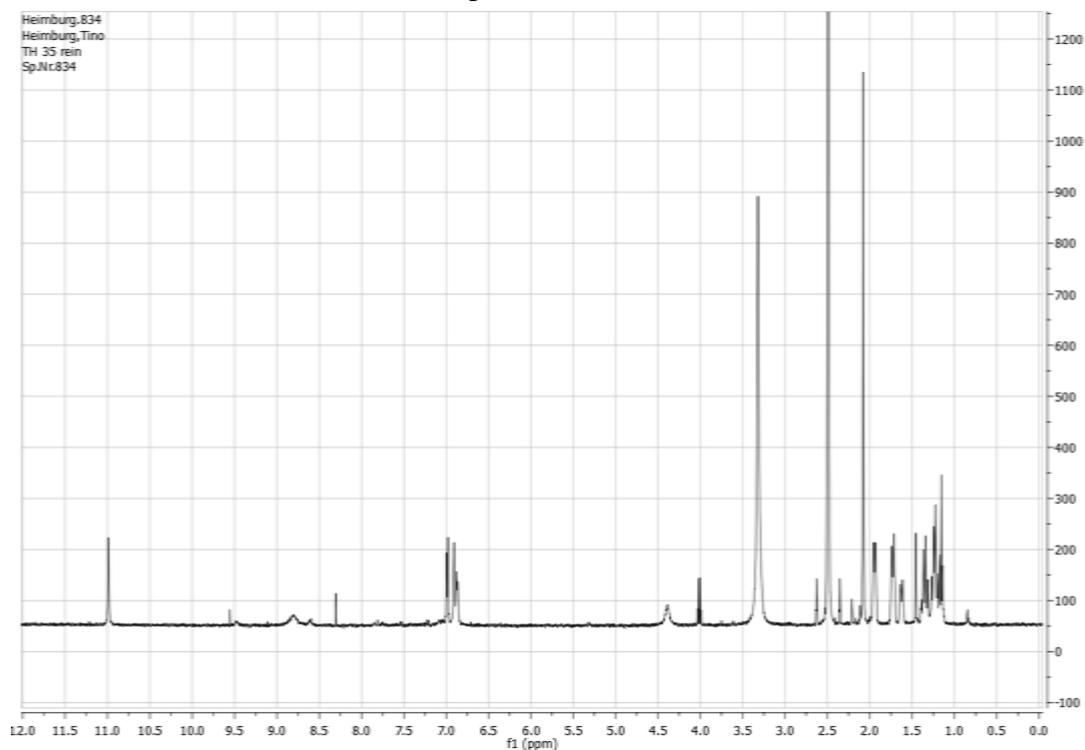


<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	6.697	95.180	4245201	233961
2	9.951	0.294	13134	1629
3	11.642	0.379	16884	1976
4	14.270	4.147	184971	28762
Total		100.000	4460191	266329

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

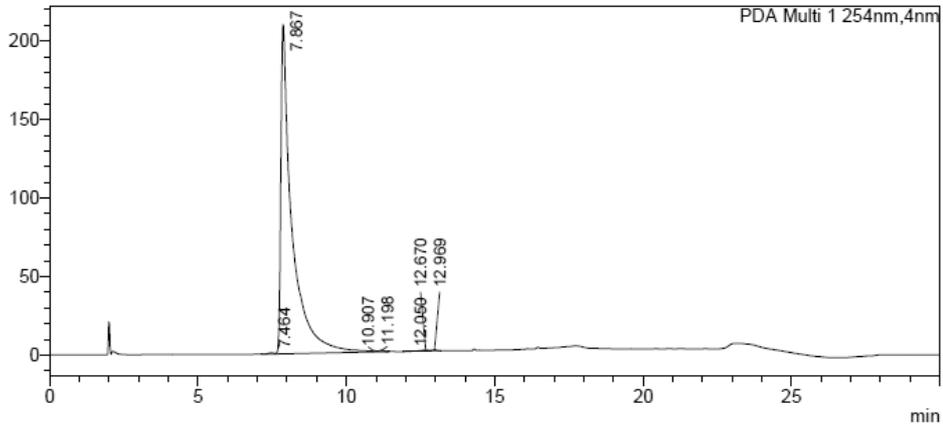


52d (TH34)

HPLC

<Chromatogram>

mAU

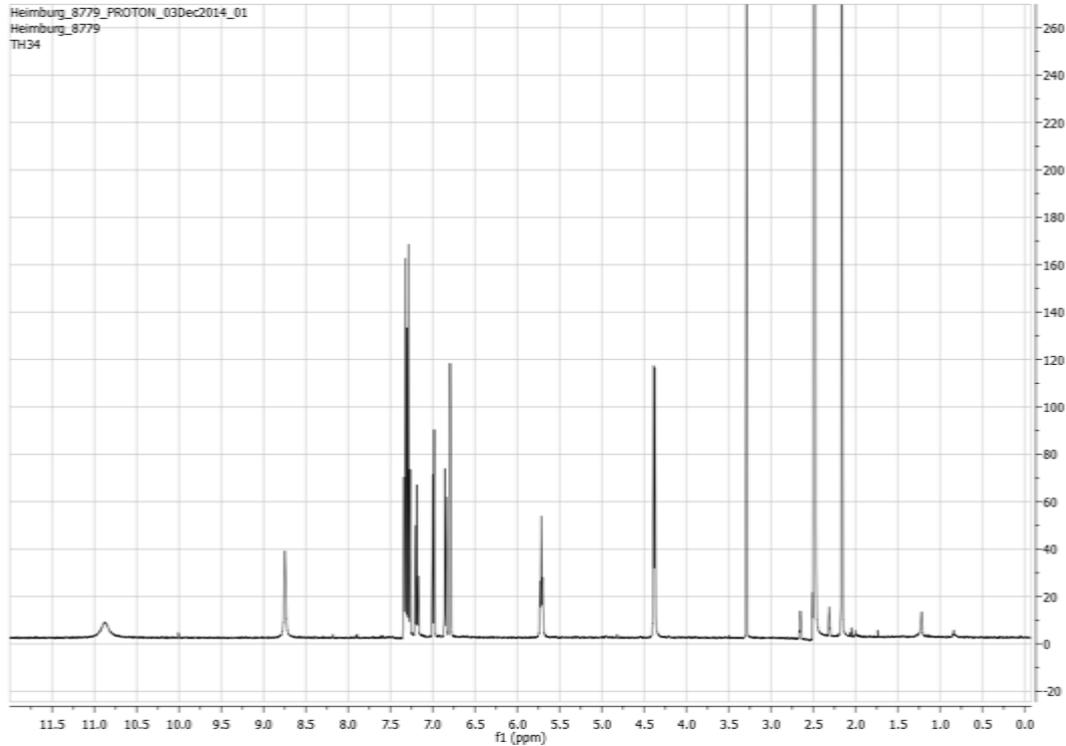


<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	7.464	0.208	11469	815
2	7.867	99.227	5462785	209633
3	10.907	0.058	3193	388
4	11.198	0.134	7372	851
5	12.050	0.031	1711	226
6	12.670	0.220	12111	682
7	12.969	0.122	6701	832
Total		100.000	5505342	213428

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

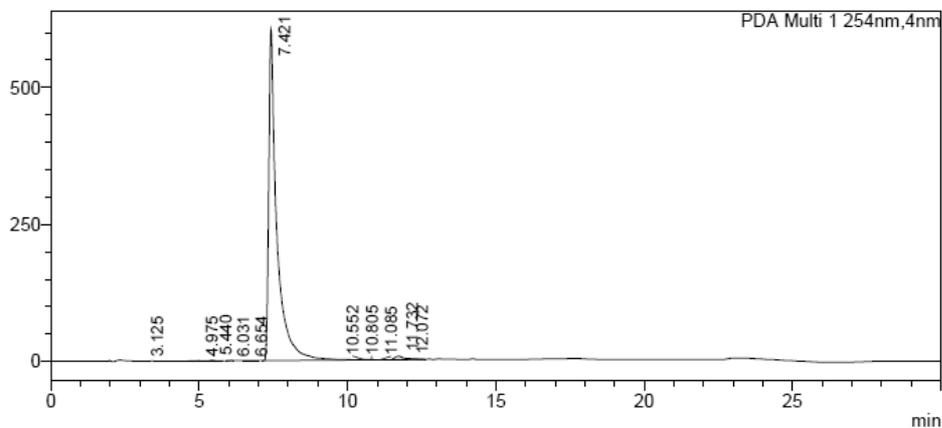


52e (TH42)

HPLC

<Chromatogram>

mAU

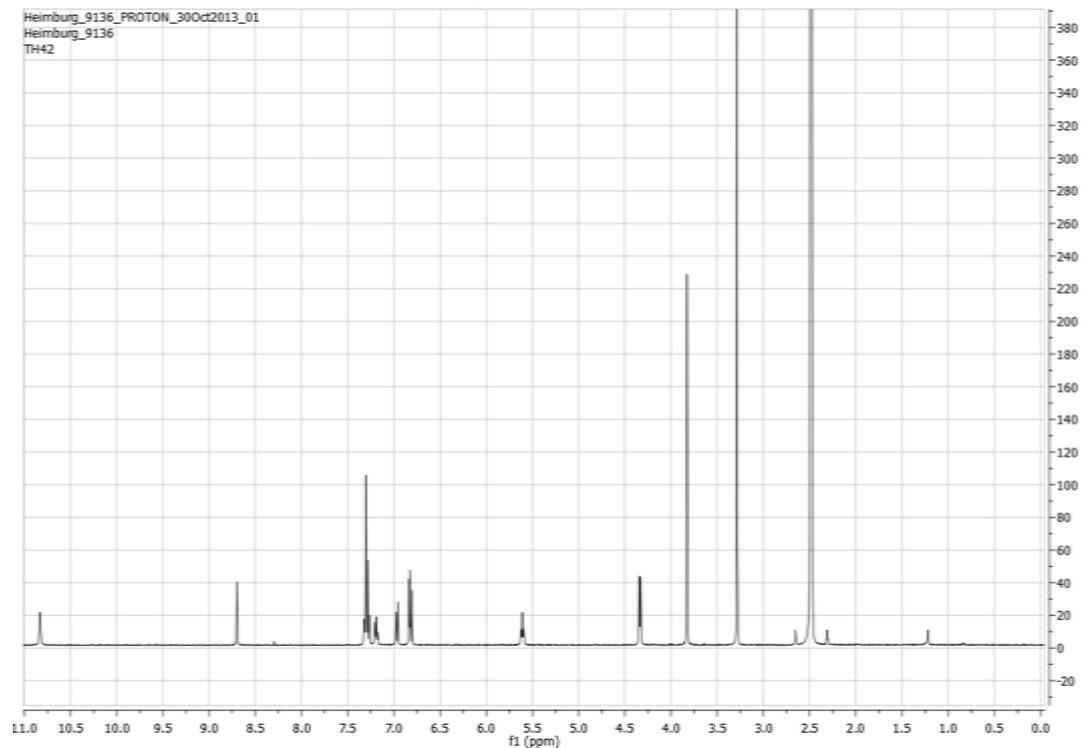


<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

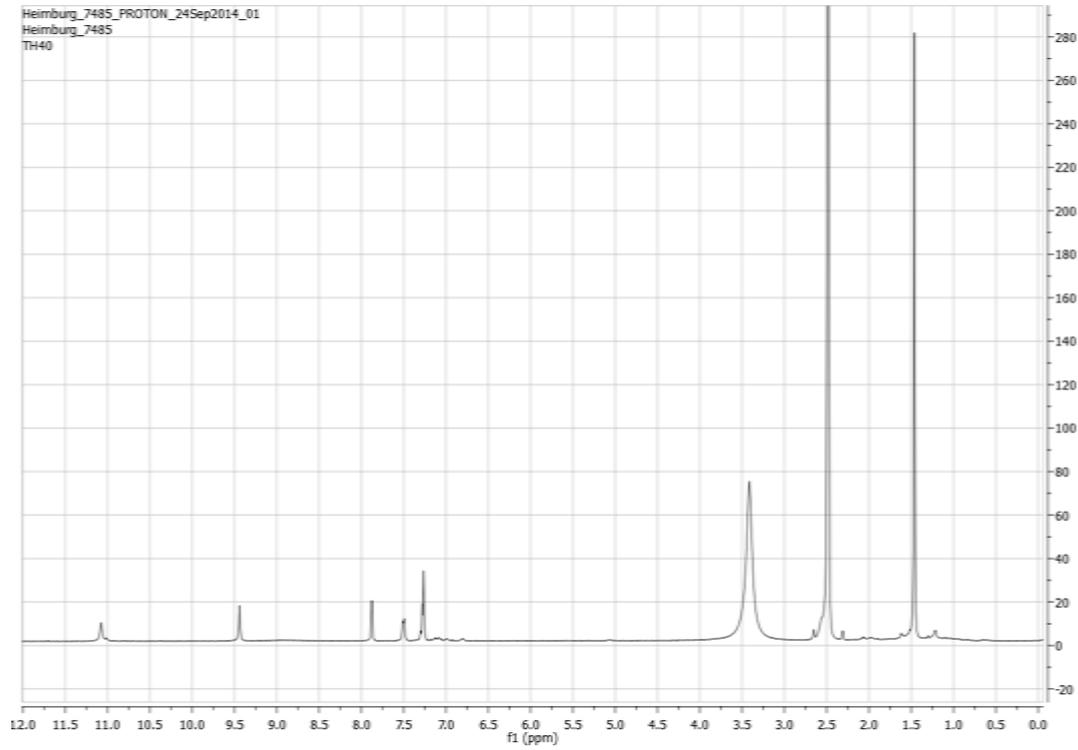
Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	3.125	0.007	763	76
2	4.975	0.042	4874	391
3	5.440	0.100	11749	1373
4	6.031	0.011	1325	183
5	6.654	0.019	2200	182
6	7.421	98.285	11505899	604580
7	10.552	0.072	8372	511
8	10.805	0.049	5713	521
9	11.085	0.009	1087	117
10	11.732	1.067	124919	6682
11	12.072	0.340	39815	2278
Total		100.000	11706717	616892

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C



53 (TH40)

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

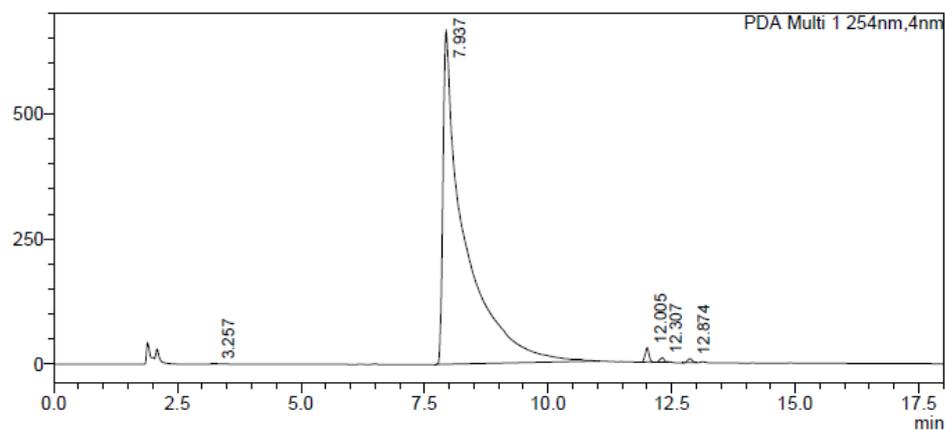


## 54 (TH44)

## HPLC

## &lt;Chromatogram&gt;

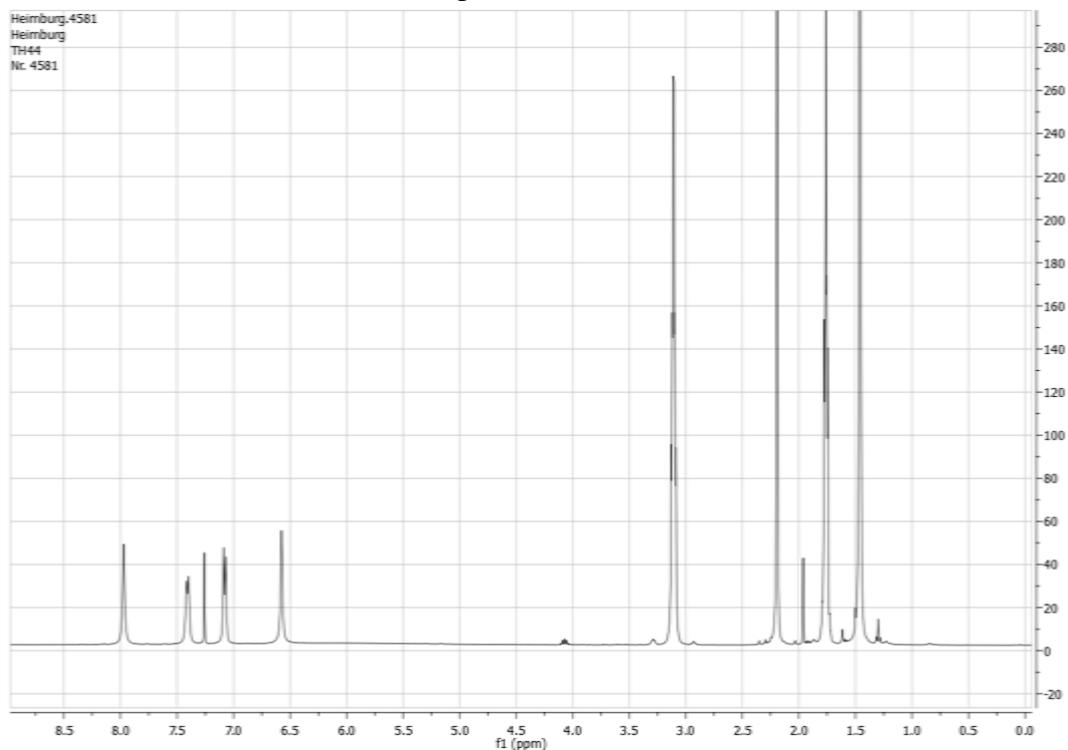
mAU



## &lt;Peak Table&gt;

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	3.257	0.003	522	108
2	7.937	98.757	20106126	663129
3	12.005	0.739	150476	28530
4	12.307	0.249	50744	8948
5	12.874	0.252	51224	8099
Total		100.000	20359092	708814

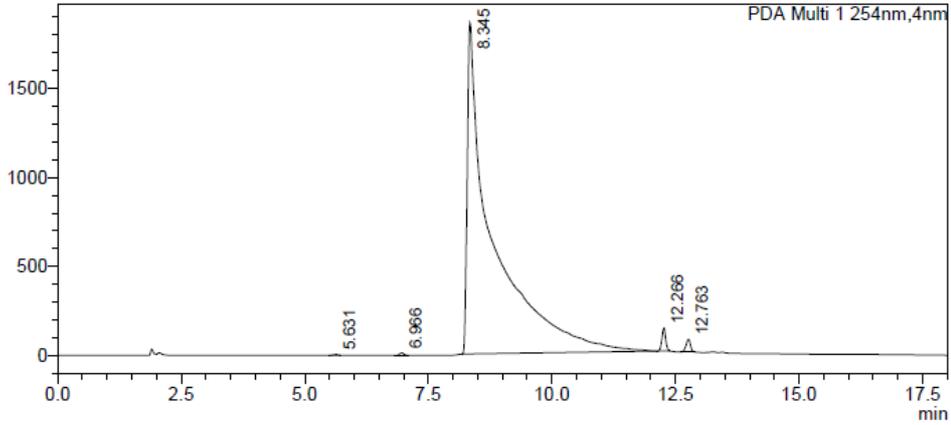
 $^1\text{H-NMR}$ ; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

55 (TH41)

HPLC

<Chromatogram>

mAU

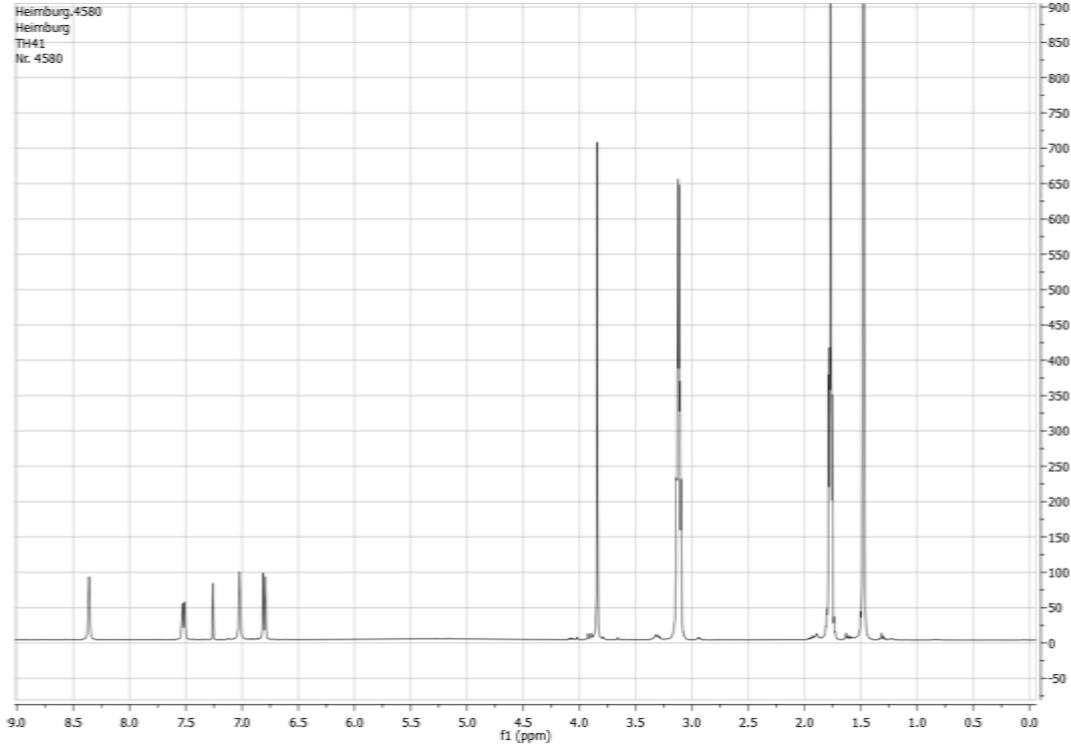


<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	5.631	0.041	27663	4206
2	6.966	0.115	77347	13183
3	8.345	98.199	66170011	1861749
4	12.266	0.983	662102	127080
5	12.763	0.662	446156	71718
Total		100.000	67383280	2077937

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

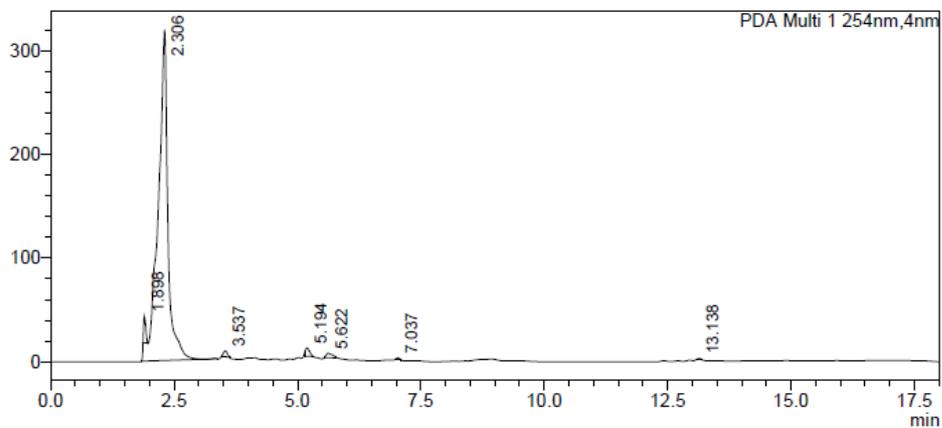


56 (TH36)

HPLC

<Chromatogram>

mAU

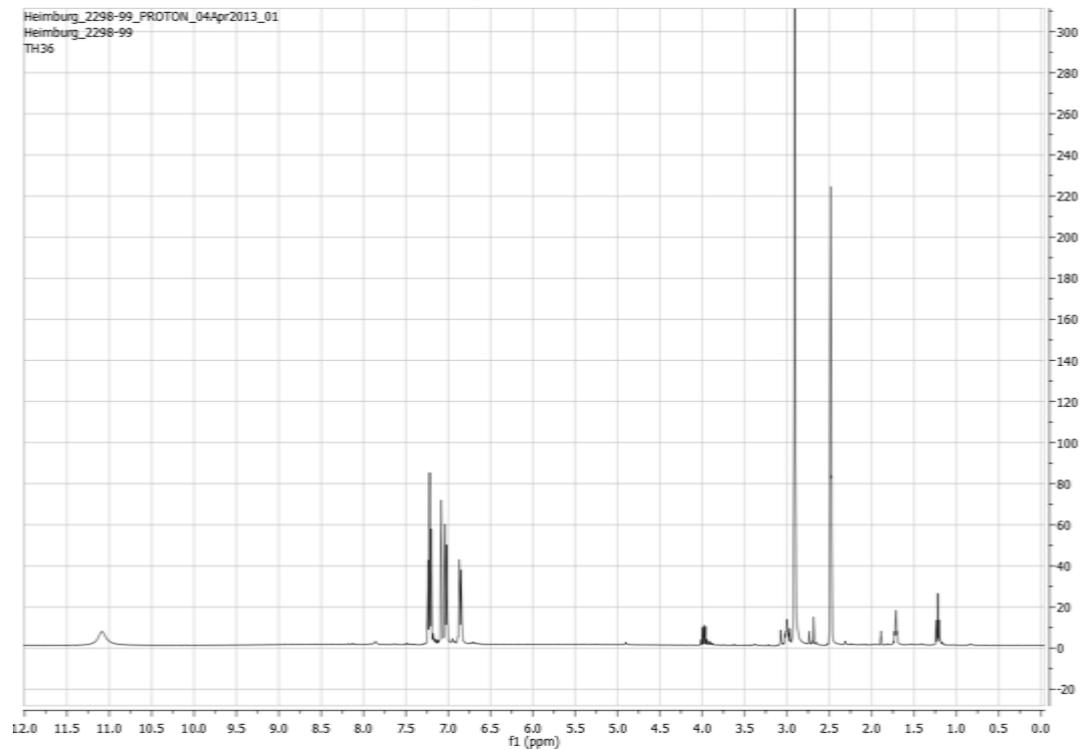


<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	1.898	1.676	76815	25932
2	2.306	95.406	4373988	318815
3	3.537	0.668	30609	5653
4	5.194	1.056	48401	8165
5	5.622	0.840	38519	4524
6	7.037	0.188	8610	2218
7	13.138	0.167	7641	1743
Total		100.000	4584583	367050

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

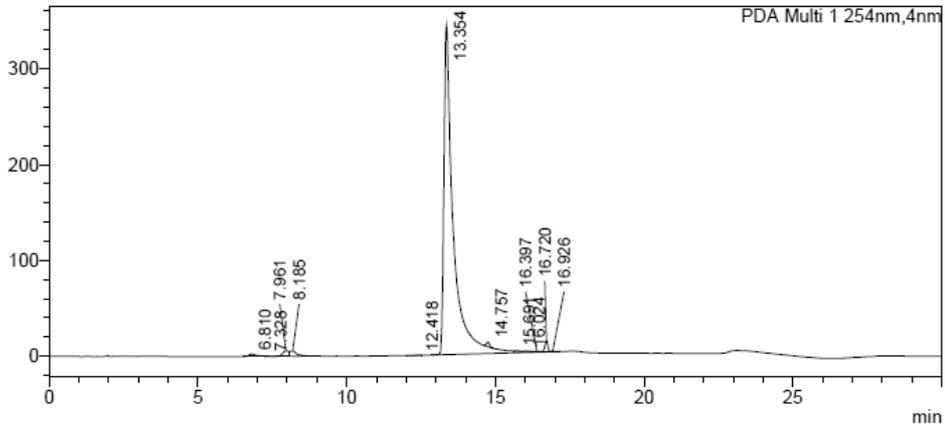


57 (TH72)

HPLC

<Chromatogram>

mAU

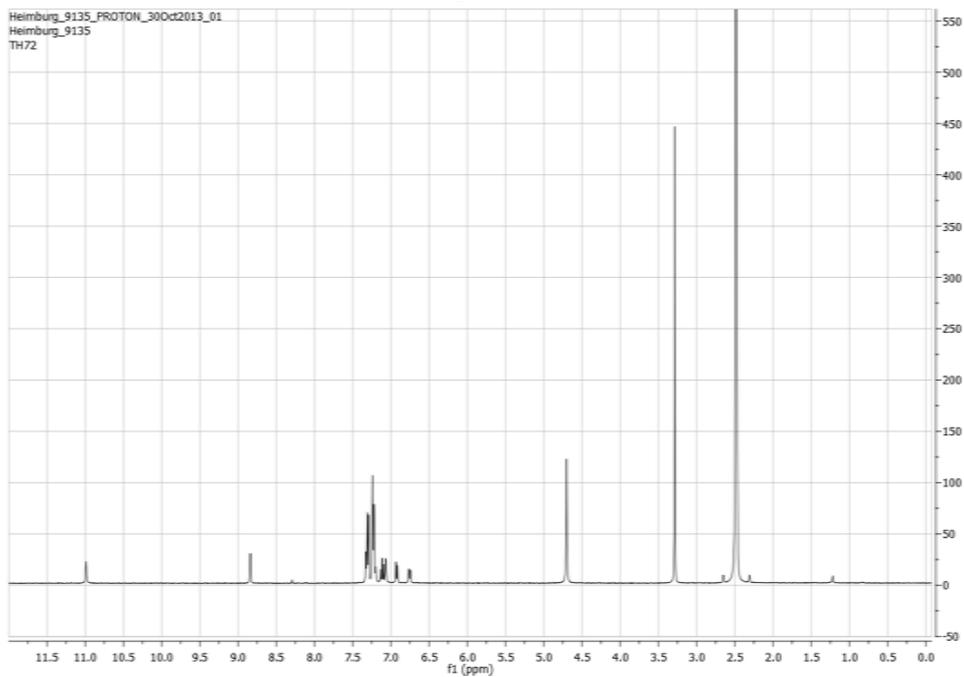


<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	6.810	0.528	41593	2318
2	7.328	0.057	4511	369
3	7.961	1.005	79110	5669
4	8.185	1.090	85863	5400
5	12.418	0.048	3802	267
6	13.354	95.675	7534120	344006
7	14.757	0.442	34813	4877
8	15.691	0.015	1167	115
9	16.024	0.047	3719	506
10	16.397	0.040	3135	490
11	16.720	1.003	78969	11556
12	16.926	0.050	3938	534
Total		100.000	7874740	376109

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

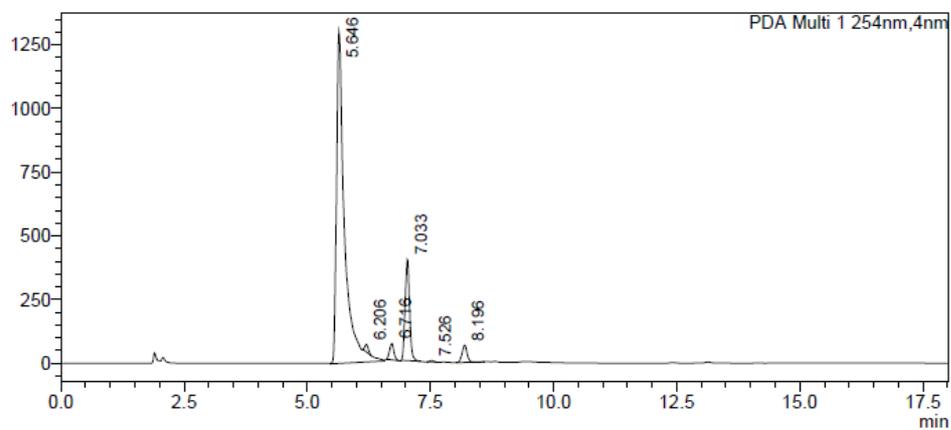


## 58 (TH23)

## HPLC

## &lt;Chromatogram&gt;

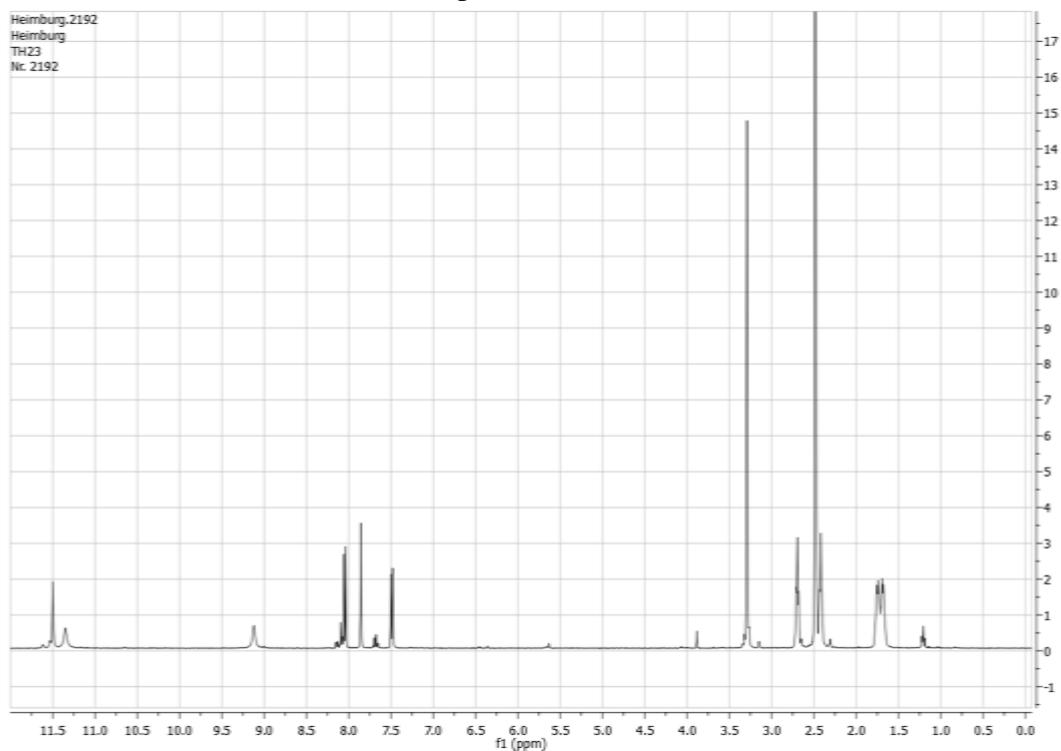
mAU



## &lt;Peak Table&gt;

PDA Ch1 254nm

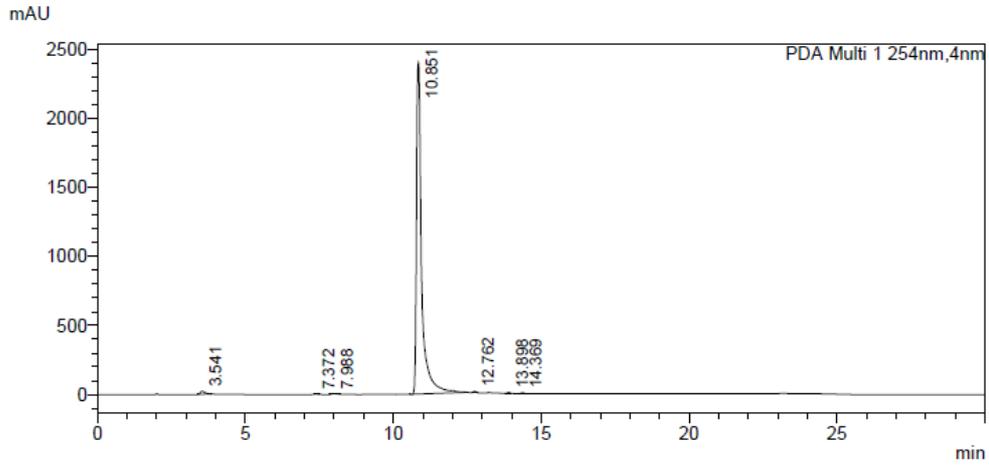
Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	5.646	80.775	14839757	1302595
2	6.206	0.741	136214	29524
3	6.716	2.115	388605	64087
4	7.033	13.683	2513699	396662
5	7.526	0.203	37274	6205
6	8.196	2.482	456058	67362
Total		100.000	18371607	1866435

 $^1\text{H-NMR}$ ; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

59 (TH45)

HPLC

<Chromatogram>

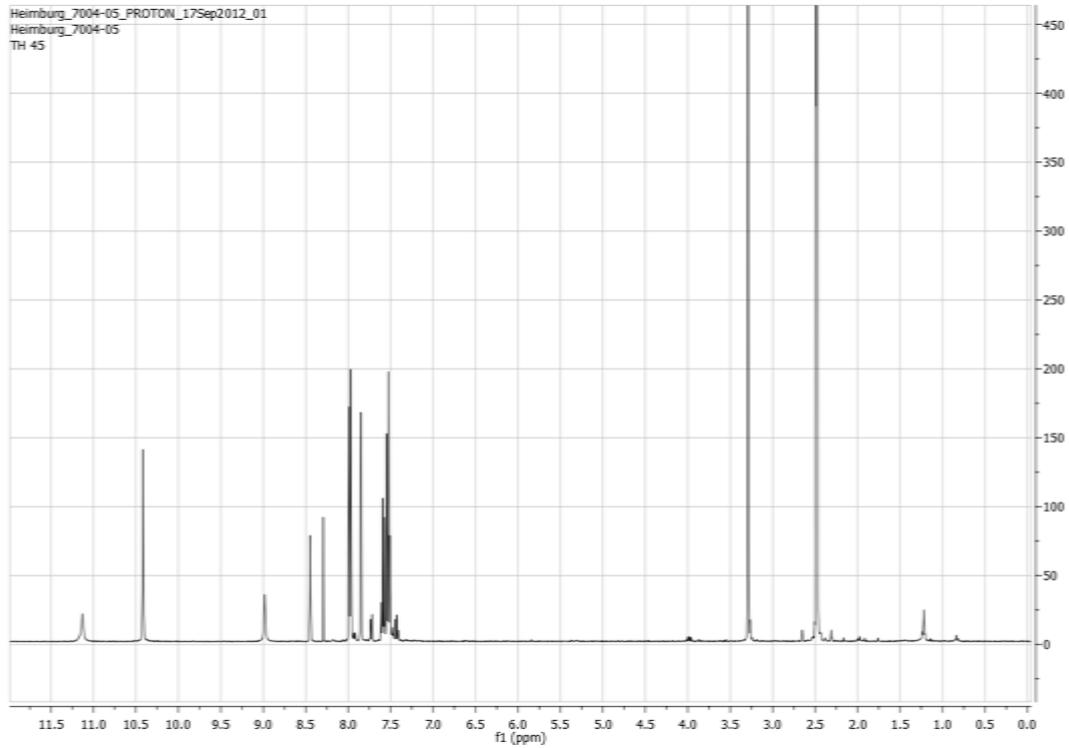


<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	3.541	0.810	242611	21325
2	7.372	0.036	10905	1801
3	7.988	0.181	54078	5293
4	10.851	98.536	29507031	2401848
5	12.762	0.200	59848	10737
6	13.898	0.121	36265	6607
7	14.369	0.116	34725	6487
Total		100.000	29945463	2454098

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

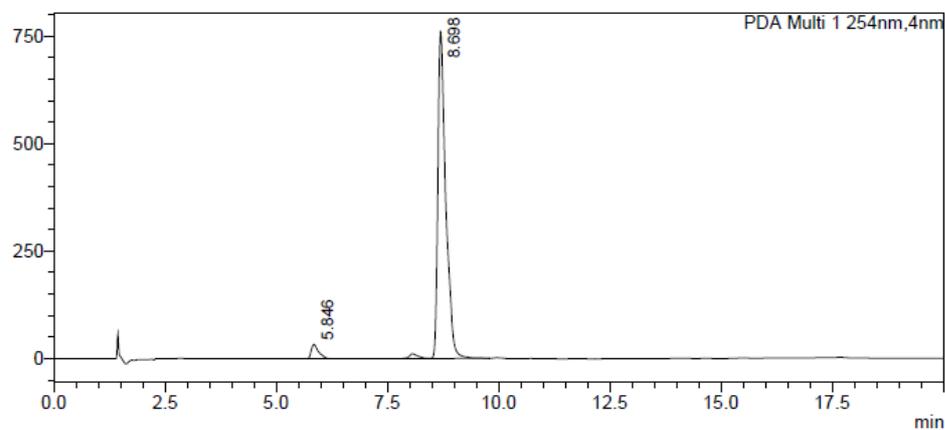


60 (TH58)

HPLC

<Chromatogram>

mAU

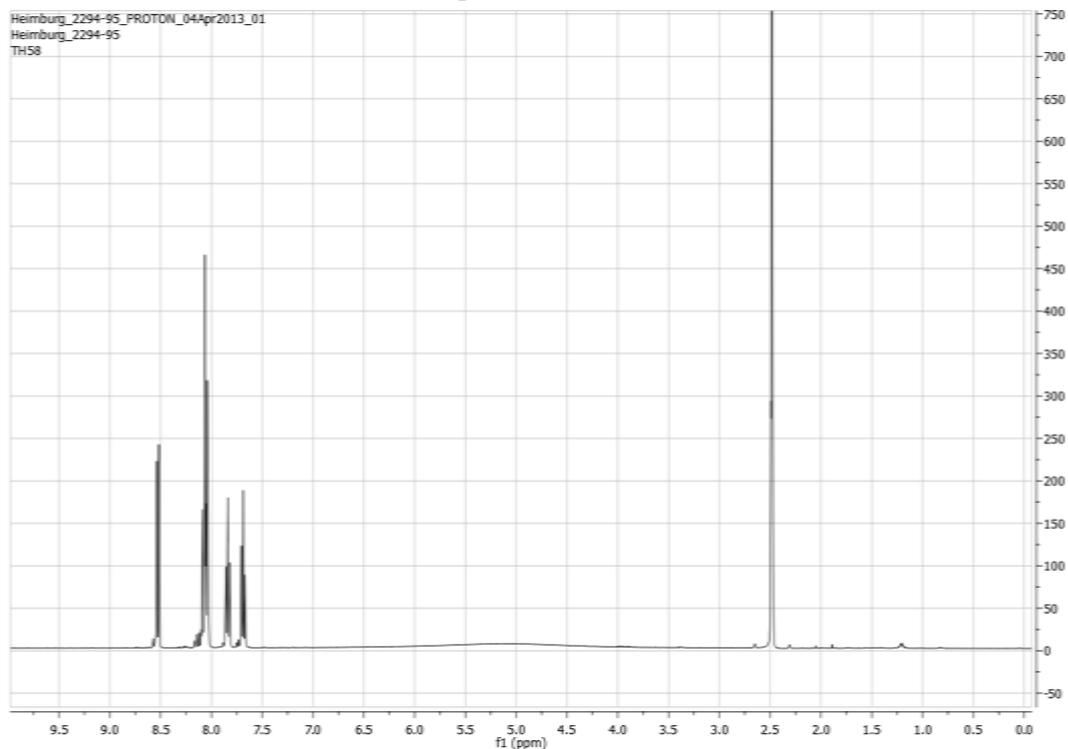


<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	5.846	3.943	394003	33709
2	8.698	96.057	9597581	760485
Total		100.000	9991584	794195

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

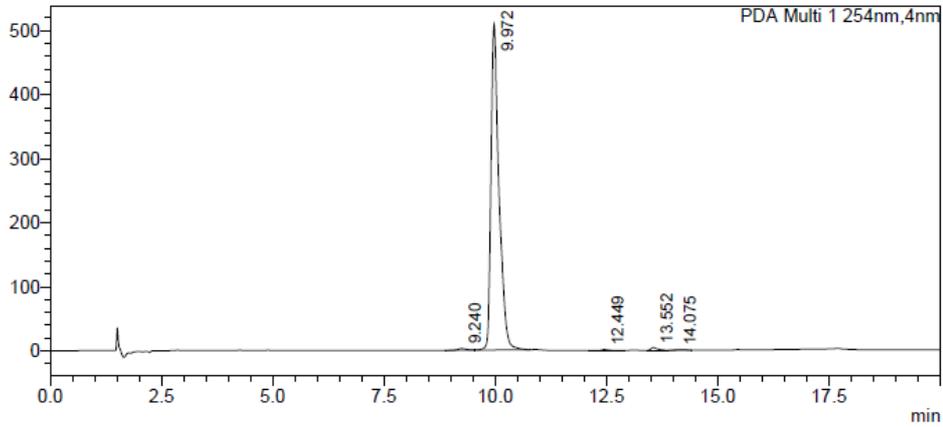


61 (TH57)

HPLC

<Chromatogram>

mAU

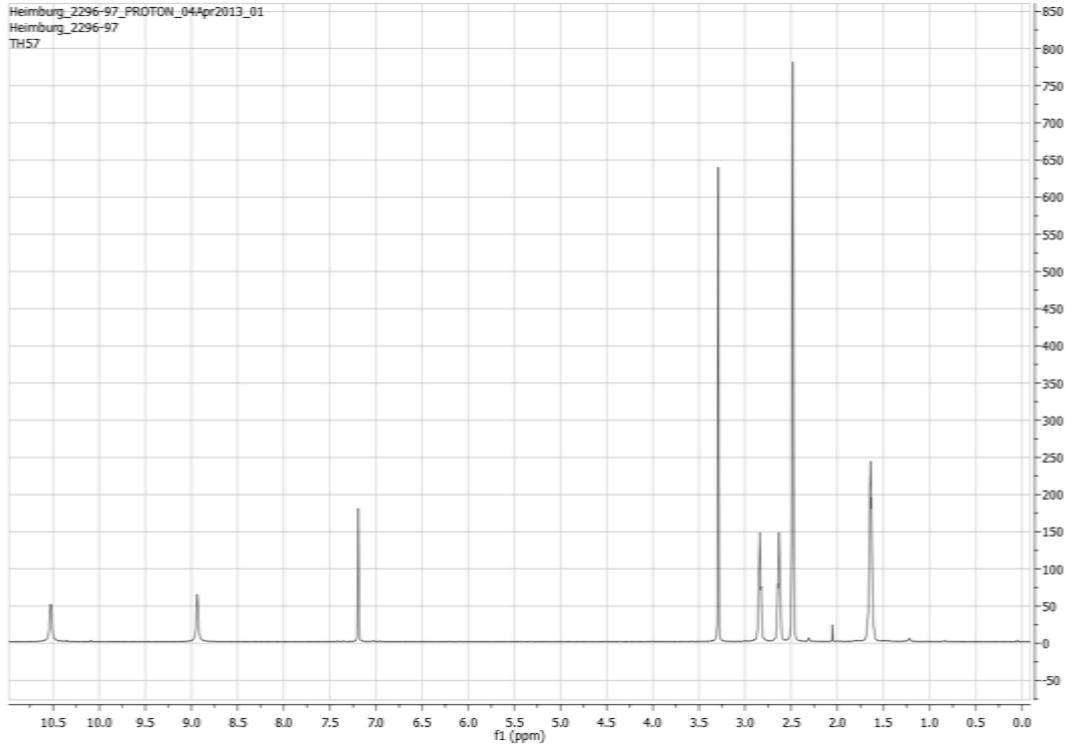


<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	9.240	0.655	42609	2898
2	9.972	98.154	6382120	507784
3	12.449	0.324	21057	1775
4	13.552	0.744	48403	4547
5	14.075	0.123	7992	421
Total		100.000	6502181	517425

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

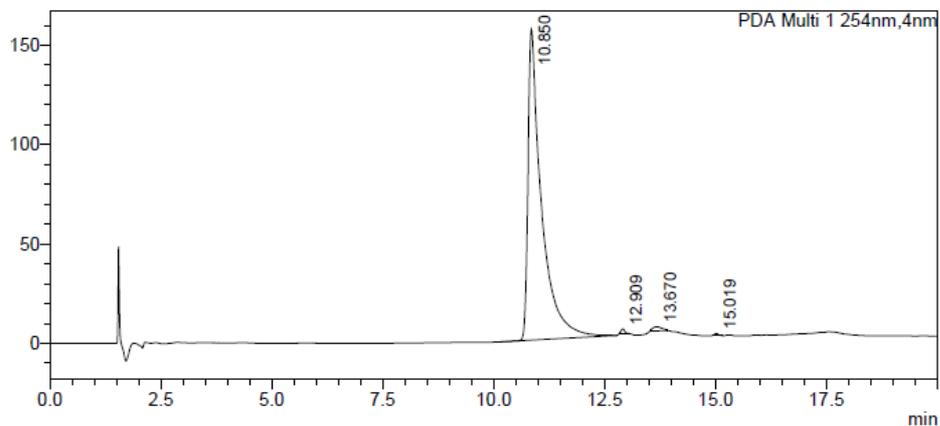


62 (TH70)

HPLC

<Chromatogram>

mAU

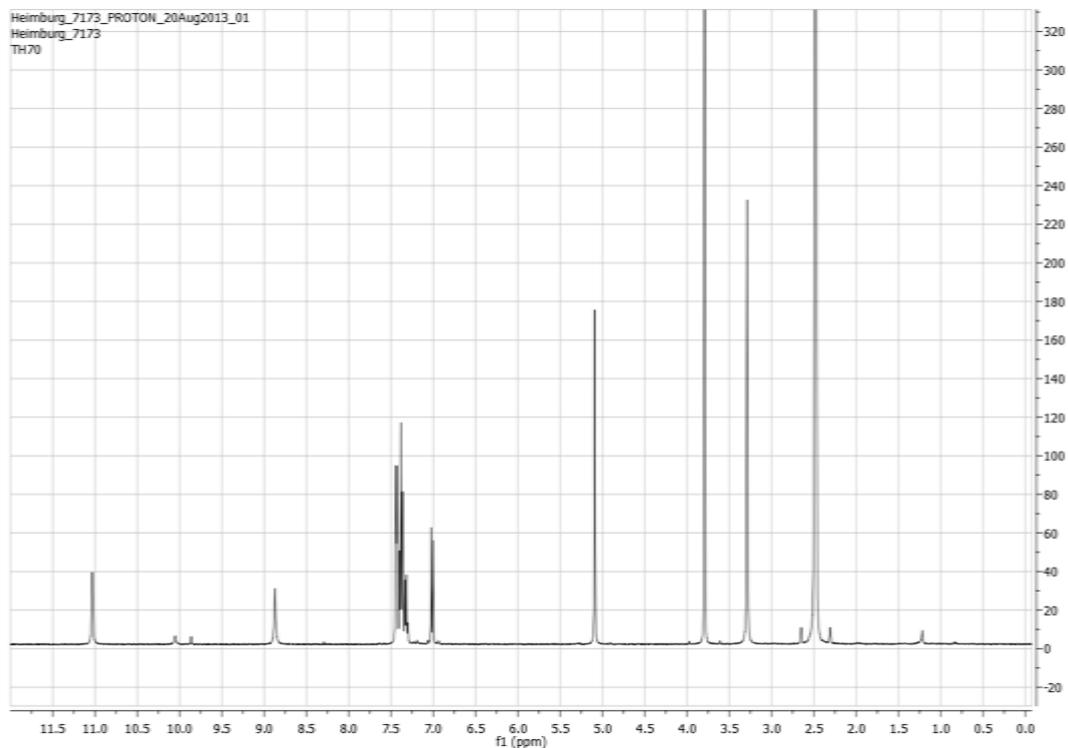


<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	10.850	98.457	3319026	156348
2	12.909	0.463	15612	2606
3	13.670	0.913	30767	2167
4	15.019	0.167	5639	943
Total		100.000	3371044	162064

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

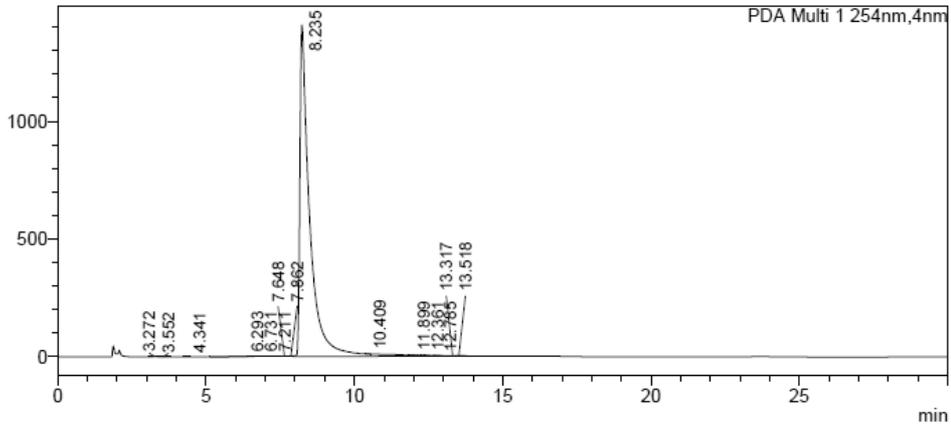


63 (TH71)

HPLC

<Chromatogram>

mAU

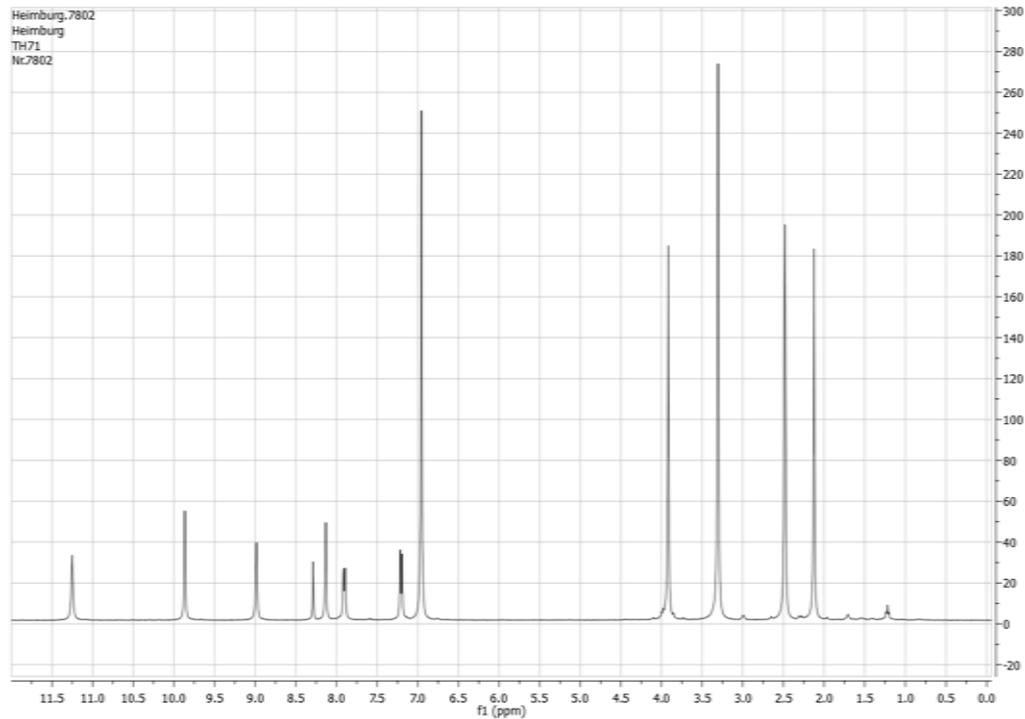


<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	3.272	0.022	7131	594
2	3.552	0.010	3279	220
3	4.341	0.007	2270	328
4	6.293	0.052	16962	510
5	6.731	0.092	30391	1105
6	7.211	0.047	15415	872
7	7.648	0.089	29312	1495
8	7.862	0.077	25424	2740
9	8.235	99.513	32741687	1408871
10	10.409	0.005	1794	302
11	11.899	0.009	2974	423
12	12.361	0.040	13217	2299
13	12.785	0.014	4476	639
14	13.317	0.004	1290	205
15	13.518	0.020	6445	674
Total		100.000	32902065	1421277

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

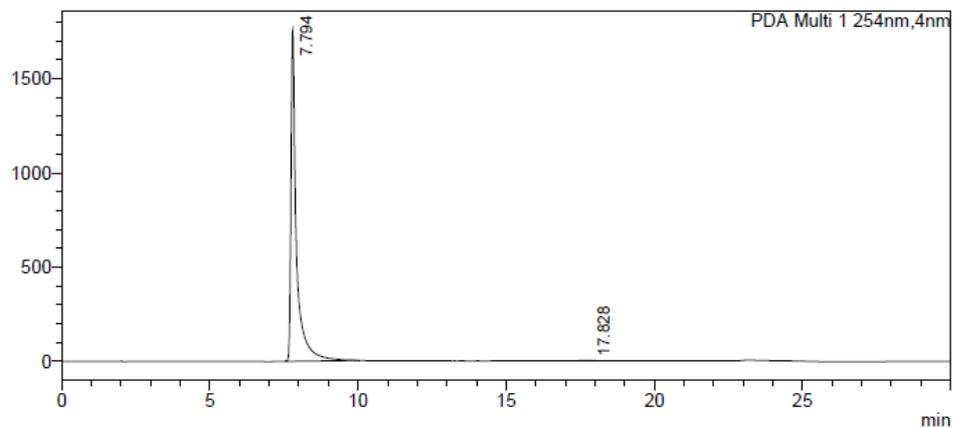


64 (TH97)

HPLC

<Chromatogram>

mAU

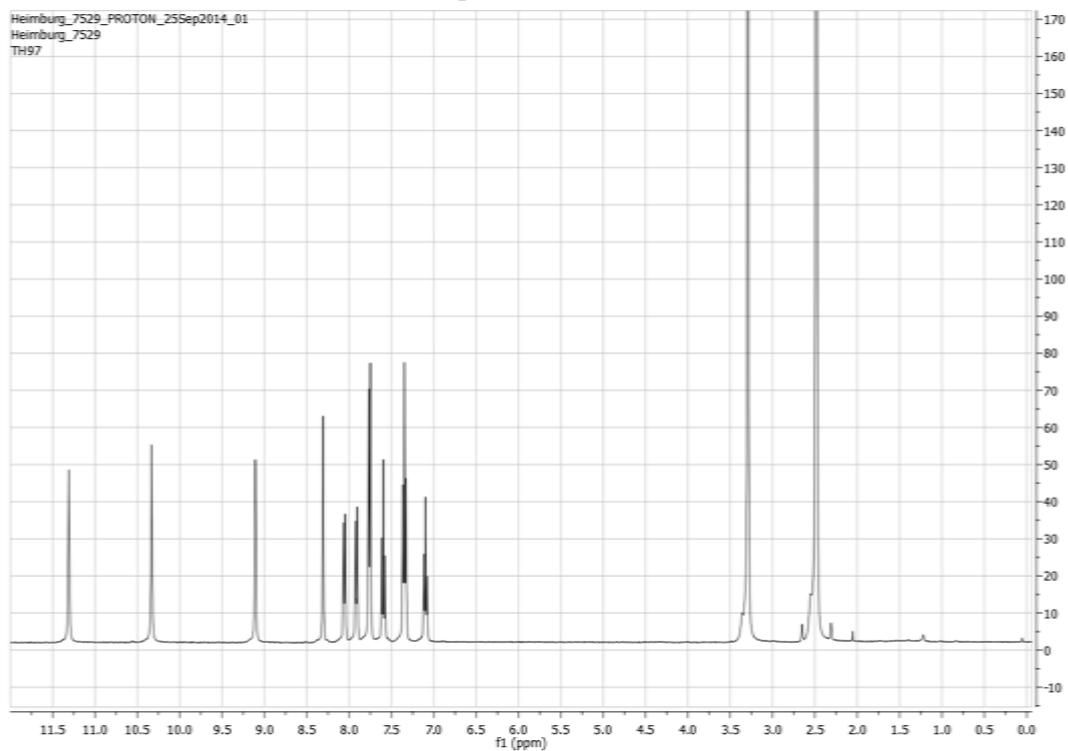


<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	7.794	99.830	22671067	1758064
2	17.828	0.170	38553	1488
Total		100.000	22709619	1759552

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C

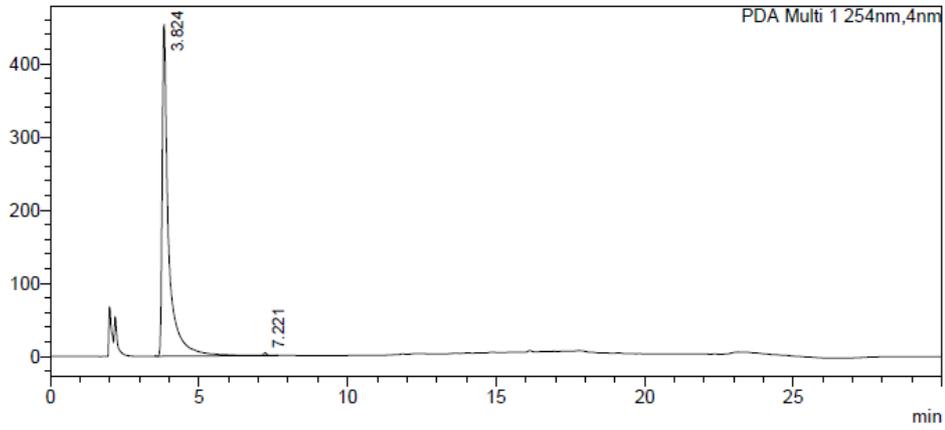


65 (TH98)

HPLC

<Chromatogram>

mAU

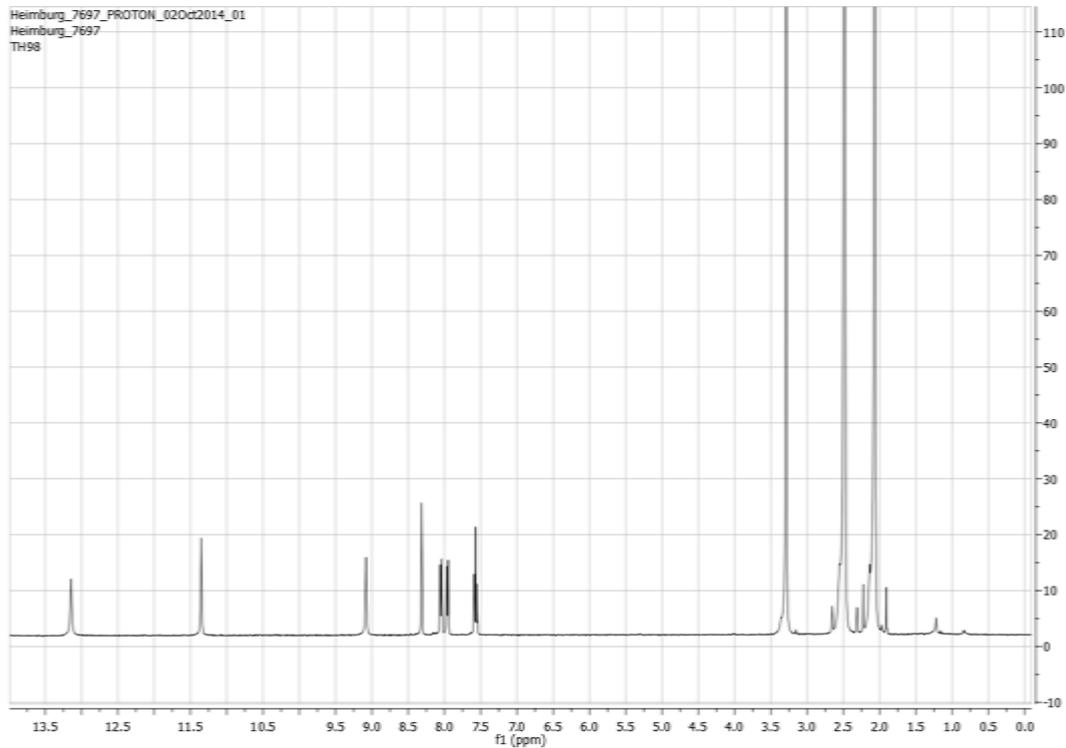


<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area%	Area	Height
1	3.824	99.549	6853619	452420
2	7.221	0.451	31083	3635
Total		100.000	6884702	456056

<sup>1</sup>H-NMR; 400MHz; d-DMSO; Temp. 27°C



## **Röntgenstrukturanalyse der SmHDAC8 (PDB-ID: 4BZ8)**

### **Structural basis for the inhibition of histone deacetylase 8 (HDAC8), a key epigenetic player in the blood fluke *Schistosoma mansoni*.**<sup>163</sup>

Marek, M., Kannan, S., Hauser, A., Moraes Mourao, M., Caby, S., Cura, V., Stolfa, D.A., Schmidtkunz, K., Lancelot, J., Andrade, L., Renaud, J., Oliveira, G., Sippl, W., Jung, M., Cavarelli, J., Pierce, R.J., Romier, C.

Journal: (2013) Plos Pathog. 9: 03645

PubMed: 24086136

PubMedCentral: PMC3784479

DOI: 10.1371/journal.ppat.1003645

#### PubMed Abstract:

The treatment of schistosomiasis, a disease caused by blood flukes parasites of the *Schistosoma* genus, depends on the intensive use of a single drug, praziquantel, which increases the likelihood of the development of drug-resistant parasite strains and renders the search for new drugs a strategic priority. Currently, inhibitors of human epigenetic enzymes are actively investigated as novel anti-cancer drugs and have the potential to be used as new anti-parasitic agents. Here, we report that *Schistosoma mansoni* histone deacetylase 8 (smHDAC8), the most expressed class I HDAC isotype in this organism, is a functional acetyl-L-lysine deacetylase that plays an important role in parasite infectivity. The crystal structure of smHDAC8 shows that this enzyme adopts a canonical  $\alpha/\beta$  HDAC fold, with specific solvent exposed loops corresponding to insertions in the schistosome HDAC8 sequence. Importantly, structures of smHDAC8 in complex with generic HDAC inhibitors revealed specific structural changes in the smHDAC8 active site that cannot be accommodated by human HDACs. Using a structure-based approach, we identified several small-molecule inhibitors that build on these specificities. These molecules exhibit an inhibitory effect on smHDAC8 but show reduced affinity for human HDACs. Crucially, we show that a newly identified smHDAC8 inhibitor has the capacity to induce apoptosis and mortality in schistosomes. Taken together, our biological and structural findings define the framework for the rational design of small-molecule inhibitors specifically interfering with schistosome epigenetic mechanisms, and further support an anti-parasitic epigenome targeting strategy to treat neglected diseases caused by eukaryotic pathogens.

Related Structures:

Primary Citation of: 4BZ5 4BZ6 4BZ7 4BZ8 4BZ9

Organizational Affiliation:

Département de Biologie Structurale Intégrative, Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Université de Strasbourg (UDS), CNRS, INSERM, Illkirch, France.

## Computergestützte Methoden

Computational studies

Homology modeling of hHDAC6 was performed with MODELLER program<sup>1</sup> as described in previous publication<sup>2</sup>. Molecular docking of ligands to X-ray structures of smHDAC8, hHDAC8, hHDAC1 and homology model of hHDAC6 was carried out using Schrödinger's Glide<sup>3</sup>. The same protocol was used as in our previous studies<sup>4</sup>. Shortly, protein has been prepared with Schrödinger's Protein Preparation Wizard. Hydrogens were added, protonation states were assigned and a restrained minimization was performed. Ligands were prepared in MOE<sup>5</sup>. They were docked in neutral form with multiple low energy starting conformations to produce more unbiased results. Pictures of ligands docking poses were prepared in MOE.

1. Eswar N et al. Comparative Protein Structure Modeling With MODELLER. Current Protocols in Bioinformatics, John Wiley & Sons, Inc., Supplement 15, 5.6.1-5.6.30, 2006.
2. Kannan S et al. Discovery of Inhibitors of Schistosoma mansoni HDAC8 by Combining Homology Modeling, Virtual Screening, and in Vitro Validation. J Chem Inf Model. 2014 Oct 27;54(10):3005-19.
3. Suite 2012: Maestro version 9.3, Protein Preparation Wizard, Epik version 2.3, Glide version 5.8, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012.
4. Stolfa DA et al. Molecular Basis for the Antiparasitic Activity of a Mercaptoacetamide Derivative That Inhibits Histone Deacetylase 8 (HDAC8) from the Human Pathogen Schistosoma mansoni. J Mol Biol. 2014, pii: S0022-2836(14)00131-4.
5. Molecular Operating Environment (MOE), 2012.10; Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2012.

## Toxizitätstest

Um die dargestellten Substanzen hinsichtlich ihrer Selektivität auf die SmHDAC8 gegenüber der HmHDAC8 zu testen, war es ebenso wichtig sogenannte „off target“-Effekte nach Möglichkeit auszuschließen. Dazu wurde ein Zytotoxizitätstest an verschiedene humane Zelltypen durchgeführt. Das Testsystem hierbei war der Viabilitätstest *Alamar Blue*<sup>®</sup>, welcher die metabolische Aktivität von Zellen misst. Die Zellen wurden jeweils für 45 Stunden mit der jeweiligen Verbindung in einer Konzentration von 50 µM inkubiert und anschließend mittels Fluoreszenzmessung gegen einen Standard ausgewertet. Dieser Test wurde von FRANK ERDMANN am Institut für Pharmazie in Halle (Saale) durchgeführt.

## SH-SY5Y Glioblastoma-Zellen

Tabelle 15: SH-SY Glioblastoma-Zellen Viabilität in % (*Alamar Blue*<sup>®</sup>)

Verb.	SH-SY5Y (Glioblastoma) % Viabilität @ 50 µM	Verb.	SH-SY5Y (Glioblastoma) % Viabilität @ 50 µM	Verb.	SH-SY5Y (Glioblastoma) % Viabilität @ 50 µM
<b>50a</b>	48,32	<b>50o</b>	25,62	<b>56</b>	88,89
<b>50b</b>	42,68	<b>50p</b>	46,18 ± 0,75	<b>57</b>	8,57
<b>50c</b>	70,39	<b>50q</b>	18,58	<b>60</b>	55,97
<b>50d</b>	29,79	<b>50s</b>	9,18	<b>61</b>	22,89
<b>50e</b>	9,94	<b>50t</b>	12,69	<b>62</b>	29,79
<b>50f</b>	5,55 ± 0,31	<b>50u</b>	77,38 ± 2,65	<b>63</b>	44,74
<b>50g</b>	20,94	<b>50v</b>	15,08	<b>64</b>	92,27 ± 6,44
<b>50h</b>	26,79 ± 3,41	<b>50w</b>	34,20	<b>65</b>	107,29 ± 1,02
<b>50i</b>	66,71 ± 2,53	<b>50x</b>	72,67 ± 2,20		
<b>50j</b>	32,86 ± 3,97	<b>52a</b>	29,20		
<b>50k</b>	29,92	<b>52c</b>	25,32		
<b>50l</b>	72,12 ± 2,12	<b>52d</b>	76,99 ± 1,75		
<b>50m</b>	13,11 ± 0,85	<b>52e</b>	11,92		

**Jurkat Leukemia T-Zellen**

Tabelle 16: Jurkat Leukemia T-Zellen Viabilität in % (Alamar Blue®)

Verb.	Jurkat (Leukemia T cells) % Viabilität @ 50 µM	Verb.	Jurkat (Leukemia T cells) % Viabilität @ 50 µM	Verb.	Jurkat (Leukemia T cells) % Viabilität @ 50 µM
50a	73,48	50s	2,04	56	99,57
50b	26,86	50t	2,53	57	2,45
50d	23,12	50v	21,83	60	70,53
50e	11,30	50w	47,51	61	72,43
50g	17,98	52a	68,48	62	44,13
50k	18,02	52b	36,38	63	88,84
50o	22,88	52c	63,58		
50q	15,34	52e	38,55		

**HEK-Zellen (human epithelial kidney-Zellen)**

Tabelle 17: HEK-Zellen Viabilität in % (Alamar Blue®)

Verb.	HEK (epithelial kidney cells) % Viabilität @ 50 µM	Verb.	HEK (epithelial kidney cells) % Viabilität @ 50 µM	Verb.	HEK (epithelial kidney cells) % Viabilität @ 50 µM
50a	71,96	50q	62,508	56	92,682
50c	66,209	50s	61,968	57	7,66
50c	71,166	50t	74,361	60	73,314
50d	67,265	50v	64,28	61	52,132
50e	12,316	50w	81,755	62	69,059
50g	61,912	52a	70,732	63	80,216
50k	70,424	52c	70,193		
50o	72,2	52e	68,119		

***Escherichia coli* und *Sacharomyces cerevisiae***

Der Zytotoxizitätstest an *E. coli* und *S. cerevisiae* diene ebenfalls dazu „off target“-Effekte zu erkennen und nach Möglichkeit auszuschließen. Dazu wurden Zellrasen der jeweiligen Zellen angelegt und mit einem Raster aus Zellulosepunkten versehen. Diese „spots“ dienen zum Auftragen der Substanzen und der jeweiligen Positivkontrolle. Pro „spot“ wurden 15 µl der Substanz mit einer Konzentration von 100 µM aufgetragen. Nach 48 Stunden Inkubation wurde das Ergebnis ausgewertet. Die Positivkontrolle Kanamycin ist ein Aminoglykosid-Antibiotikum, welches toxisch auf *E. coli* wirkt. In Abbildung 91 kann man die Hemmhöfe in Abhängigkeit der Kanamycinkonzentration erkennen. Die getesteten Substanzen wiesen in diesem Versuch keine Toxizität auf. Für *S. cerevisiae* diene Cycloheximid, ebenfalls ein Antibiotikum, als Positivkontrolle. Die Hemmhöfe in Abhängigkeit der Konzentration sind ebenso in Abbildung 91 zu sehen. Die getesteten Substanzen zeigten auch hier keine Auswirkung auf das Zellwachstum. Dieser Test wurde von FRANK ERDMANN am Institut für Pharmazie in Halle (Saale) durchgeführt.

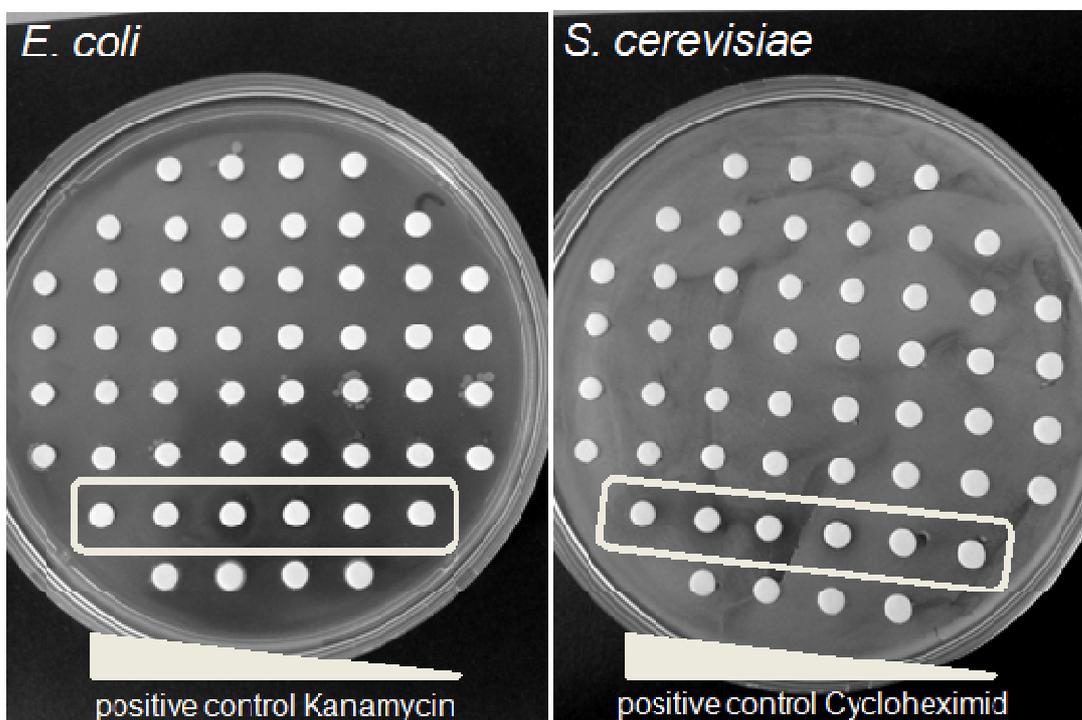


Abbildung 91: Auswertung der Toxizitätstests von *Escherichia coli* (links) und *Sacharomyces cerevisiae* (rechts).

*Schistosoma mansoni*

Um die Wirkung der Substanzen auf den Parasiten zu testen kamen verschiedene Testsysteme, ebenso auch Schistosomen in unterschiedlichen Lebensphasen, zur Anwendung. Ein Test untersuchte die Motilität der adulten Schistosomen in Anwesenheit eines HDAC-Inhibitors. Als Ergebnis wurde die Trennung der bereits gepaarten Parasiten beobachtet und damit verbunden die Unterbindung der Fortpflanzung. Dieser Test wurde visuell ausgewertet. Die Versuchsbedingungen beinhalteten die Gabe der jeweiligen Substanz zum Medium, in dem sich die Parasiten aufhielten. Über die nächsten drei Tage hinweg wurde täglich die Hälfte des Mediums entfernt und mit frischem Medium inklusive Substanz wieder aufgefrischt. Diese Methode wurde von QUENTIN BICKLE et al.<sup>156</sup> entwickelt und bereits erfolgreich von JENNIFER KEISER et al.<sup>19</sup> angewendet. Die Verbindung **TH65** ist in dieser Arbeit als Verbindung **50e** bezeichnet (Abb.: 92). Unter der Behandlung mit **TH65 (50e)** wurde ein konzentrationsabhängiger Rückgang an gepaarten adulten Schistosomen beobachtet (Abb.: 87).

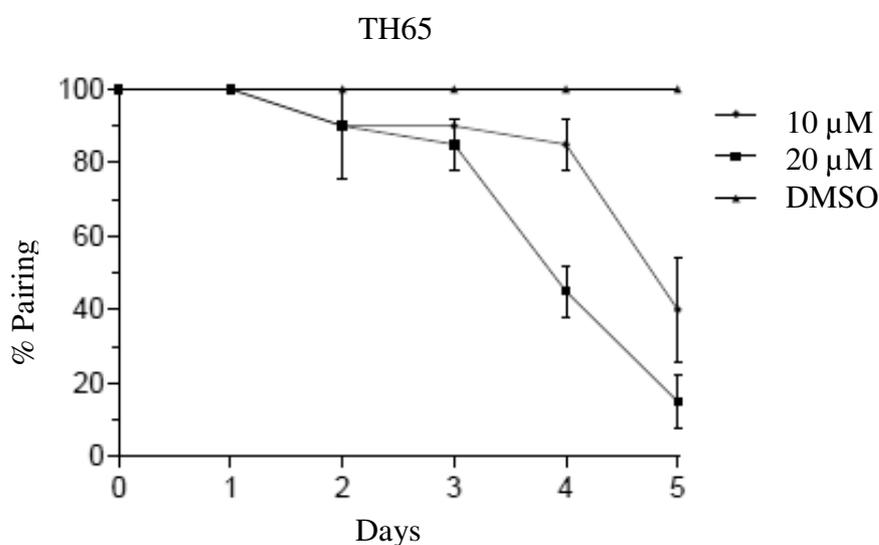


Abbildung 92: Motilität der adulten Schistosomen bei Behandlung mit TH65 (50e).

Der oben genannte visuelle Test wurde ebenso auf die juvenilen Parasiten angewendet. Bei dieser Versuchsanordnung lag die Sterberate unter Behandlung mit **TH65 (50e)** nach zwei Tagen bei 100 %. Die Konzentration betrug 10 bzw. 20 µmol pro Liter, als Referenz diente DMSO (Abb.: 93).

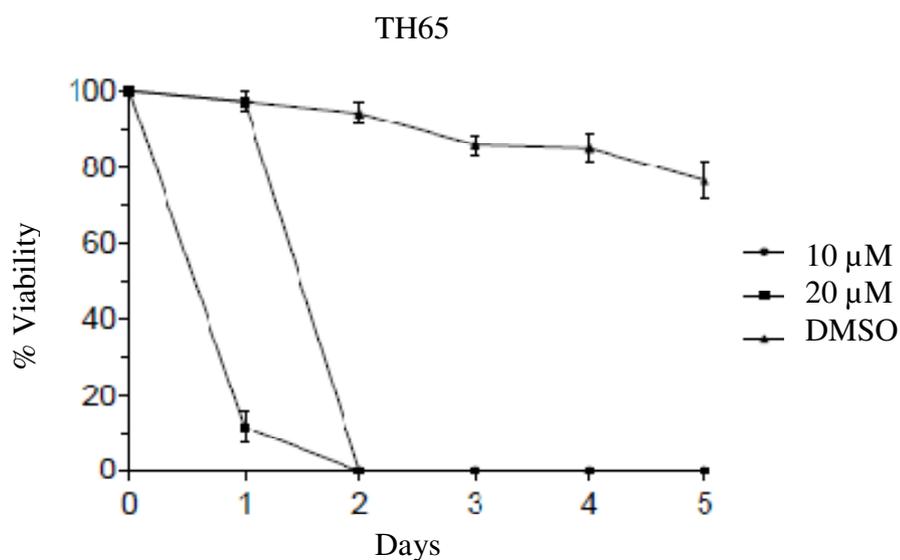


Abbildung 93: Viabilität der juvenilen Schistosomen bei Behandlung mit TH65 (50e)

Ebenfalls wurde mit dieser Methode das Carbonsäurederivat **TH65A/L (50e')** (Abb.: 94) hinsichtlich seiner Wirkung auf die juvenilen Schistosomen getestet. **TH65A/L (50e')** zeigte im Vergleich zu **TH65 (50e)** wie erwartet keine bzw. nur geringe Effekte auf die Viabilität der Schistosomen (Abb.: 95).

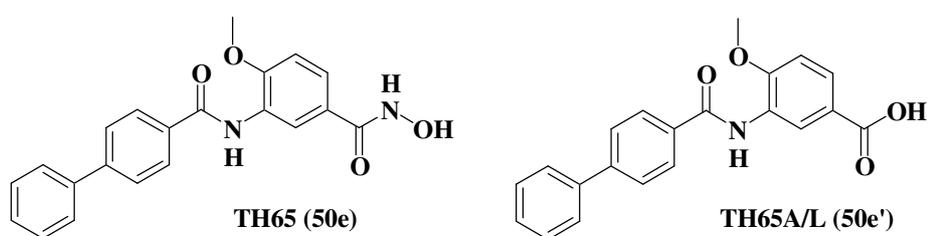


Abbildung 94: Strukturformeln von TH65 (50e) und TH65A/L (50e').

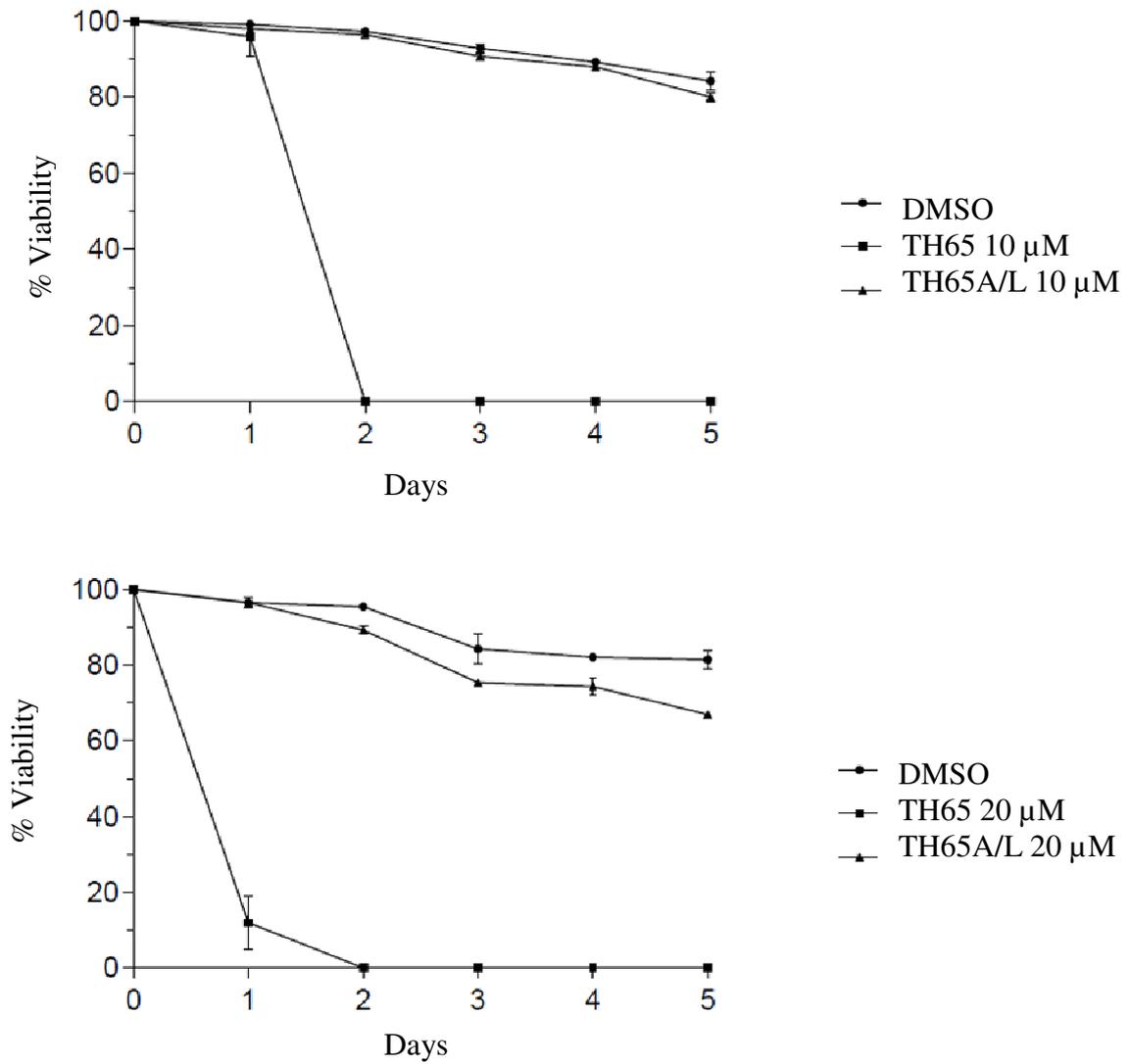


Abbildung 95: Viabilität der juvenilen Schistosomen bei Behandlung mit TH65A/L (50e<sup>6</sup>).

Die Testungen an *Schistosoma mansoni* wurden in der Arbeitsgruppe von RAYMOND PIERCE in Lille (Centre d'Infection et d'Immunité de Lille) durchgeführt.

Ein weiterer Test zur Bestimmung der Wirksamkeit der Substanzen auf *S. mansoni* war der *Alamar Blue*<sup>®</sup>-Viabilitätstest. Dieser Test wurde insgesamt zweimal durchgeführt mit jeweils triplizierter Versuchsanordnung pro zu testender Substanz. Die Versuchsdurchführung des *Alamar Blue*<sup>®</sup>-Assays beschränkte sich auf die einmalige Gabe der jeweiligen Substanz am Versuchsbeginn. Anschließend wurden die Parasiten für drei Tage in ihrem Medium belassen. Danach erfolgte die photometrische Auswertung (Tab.: 18). Dieser Test an *Schistosoma mansoni* wurden in der Arbeitsgruppe von RAYMOND PIERCE in Lille (Centre d'Infection et d'Immunité de Lille) durchgeführt.

**Tabelle 18: *Schistosoma mansoni* Viabilität in %**

<b>Verb.</b>	<b><i>S. mansoni</i> % Viabilität @ 10 µM</b>	<b>Verb.</b>	<b><i>S. mansoni</i> % Viabilität @ 10 µM</b>
<b>50c</b>	74,88 ± 4,09	<b>52a</b>	82,72 ± 2,35
<b>50g</b>	74,59 ± 6,72	<b>52c</b>	84,3 ± 1,7
<b>50k</b>	89,70 ± 10,29	<b>52e</b>	85,98 ± 0,12
<b>50q</b>	63,17 ± 0,54	<b>56</b>	92,55
<b>50s</b>	62,90 ± 2,66	<b>57</b>	77,91 ± 2,57
<b>50t</b>	73,83 ± 5,43	<b>60</b>	95,64 ± 4,35
<b>50v</b>	70,78 ± 4,35	<b>61</b>	95,20 ± 4,79
<b>50w</b>	81,96 ± 8,05	<b>63</b>	77,7 ± 5,04

## Liste der Poster und Veröffentlichungen

2013

T. Heimburg; J. Melesina; A. Walter, A.-T. Hauser, K. Schmidtkunz, M. Marek, C. Romier, R. Pierce, M. Schmidt, M. Jung, W. Sippl

*Development of benzhydroxamic acids as small molecule inhibitors against smHDAC8 for the treatment of schistosomiasis*

DPhG Annual Meeting 2013

09.10.-11.10.2013, Freiburg

J. Melesina, T. Heimburg, K. Wichapong, M. Schmidt, A. Hauser, C. Romier, R. Pierce, M. Jung, W. Sippl

*Homology modeling of human parasites histone deacetylases*

7th Summer School on Drug Design

15.-20.09.2013, Vienna, Austria

2014

S. Kannan, J. Melesina, A.-T. Hauser, A. Chakrabarti, T. Heimburg, K. Schmidtkunz, A. Walter, M. Marek, R. J. Pierce, C. Romier, M. Jung and W. Sippl

*Discovery of Inhibitors of Schistosoma Mansoni HDAC8 by Combining Homology Modeling, Virtual Screening and In Vitro Validation*

J Chem Inf Model. 54, 3005-19, 2014.

J. Melesina, T. Heimburg, K. Wichapong, M. Schmidt, A. Hauser, C. Romier, R. Pierce, Jung, W. Sippl

*Homology modeling and structure-based design of inhibitors for histone deacetylases from parasites*

DPhG-Doktorandentagung 2014

10.-12.03.2014, Bayer HealthCare, Wuppertal

## **Danksagung**

Ich möchte in erster Linie Herrn Prof. Wolfgang Sippl für die Möglichkeit danken, zu diesem interessanten und vielversprechenden Thema innerhalb dieser außergewöhnlichen nationalen sowie internationalen Zusammenarbeit meine Dissertation anfertigen zu dürfen. Herrn Dr. Matthias Schmidt danke ich für die Betreuung meiner Promotion und auch bei der Hilfe bei der Analytik und Charakterisierung meiner Substanzen. Außerdem schätze ich sehr die Diskussionen und Aktivitäten, die über den Rahmen der wissenschaftlichen Arbeit hinausgingen. Dabei denke ich vor allem an das ein oder andere Fußballspiel oder die sehr unterhaltsamen Arbeitsgruppenausflüge. Die DPhG-Tagung in Innsbruck bleibt unvergessen. Mein herzlichster Dank gilt natürlich ebenso der Arbeitsgruppe. Unserer gemeinsamen Zeit im Labor folgten viele gemeinsame Erlebnisse auch außerhalb der Arbeitszeiten. Diese möchte ich auch zukünftig nicht missen. Herrn Dr. Alexander Rohe danke ich hierbei für die vielen hilfreichen Diskussionen und Anregungen zur Planung der Synthese. Besonderer Dank geht an Benjamin Sauer und Theresa Bayer. Wir haben uns nicht nur das Labor und die Chemikalien geteilt sondern bei dem ein oder anderen Festival auch das Zelt und die schönen Momente.

An dieser Stelle möchte ich ebenfalls die anderen Mitglieder der Arbeitsgruppe von Prof. Sippl für die Diskussionen und die große Hilfsbereitschaft in Sachen Computer Modelling danken. Besonderer Dank geht an Jelena Melesina für ihre Mühen hinsichtlich Auswertung und Interpretation von Dockinglösungen und natürlich für ihre Arbeit betreffend der Vorauswahl für die Strukturoptimierung meiner Substanzen.

Herrn Prof. Bodo Dobner danke ich an dieser Stelle für die Hilfestellung bei synthetischen Fragestellungen und die Weitergabe seiner Erfahrungen auf dem tückischen Gebiet der organischen Chemie. Dr. Christian Wölk und Dr. Jens Pettelkau danke ich für die gute Freundschaft über die gesamte Zeit des Studiums und während unserer Zeit der Promotion an dieser Universität. Das Verhältnis aus Freizeit während des Studiums bzw. Studium in der Freizeit konnte so in einer angenehmen Weise optimiert werden.

An dieser Stelle ist auch Herr Apotheker Frank Schopeck zu erwähnen. Seinen Mühen bei der Korrektur dieser Arbeit ist es zu verdanken, dass diese nun in einer angenehm lesbaren Form vorliegt.

Herrn Dr. Christian Ihling danke ich für die Anfertigung der zahlreichen HR-MS-Spektren und Frau Manuela Woigk für die weitaus noch zahlreicheren MS-Spektren. Ebenso danke ich

Frau Martina Mannd für die akkurate Portionierung meiner Substanzen für die zahllosen Tests. Herrn Dr. Dieter Ströhl danke ich für die Anfertigung der NMR-Spektren.

Weiterer Dank geht an Prof. Manfred Jung und seine Arbeitsgruppe. Hier zu nennen sind Frau Dr. Alokta Chakrabarti, Herr Dr. Alexander Hauser und Frau Alexandra Walter für die Durchführung der biochemischen Testung.

Dr. Christophe Romier danke ich für die Röntgenkristallstrukturanalyse. Für die *in vitro*-Testung möchte ich an dieser Stelle Frau Prof. Kathi Andrews und Herrn Dr. Raymond Pierce und ihren Mitarbeitern danken. Ebenso danke ich Herrn Johan Schultz für die Durchführung der Pharmakokinetikstudien bei Kancera und ich danke den Mitarbeitern von Adlego für die Evaluierung meiner Substanz.

Ich danke außerdem allen, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben und hier nicht namentlich erwähnt wurden.

Zum Schluss möchte ich mit ganzem Herzen meiner Familie und meinen besten Freunden danken, die mich in dieser Zeit fortwährend unterstützt haben.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die den Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit bisher an keiner anderen Universität oder Hochschule im In- und Ausland vorgelegt habe.

Halle (Saale), 2015

Tino Heimburg

## **Angaben zur Person**

Name	Tino Heimburg
Geburtsdatum	22.05.1983
Geburtstort	Halle (Saale)
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig, (seit 18.05.2009 Vater einer Tochter)
Wohnsitz	Parkstr. 20, 06108 Halle (Saale)

## **Lebenslauf**

### *Schulbildung*

1989 - 1993	Grundschule Teutschenthal
1993 - 1995	Sekundarschule Dornstedt (OT Teutschenthal)
1995 - 2002	Burg-Gymnasium Wettin

### *Wehrdienst*

07/2002 - 06/2003	Grundwehrdienst und freiwillig Wehrdienstleistender in der Dr.-Dorothea-Erxleben Kaserne in Halle
07/2003 - 05/2004	Freiwillig Wehrdienstleistender in der Sachsen-Anhalt-Kaserne in Weißenfels

### *Studium und praktische Ausbildung*

10/2004 - 10/2008	Studium der Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
03/2005	Famulatur, Linden-Apotheke in Hohnstedt
09/2005	Famulatur, Salzke-Apotheke in Langenbogen
08/2006	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
09/2008	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
11/2008 - 04/2009	Pharmaziepraktikant, Probiodrug AG in Halle (Saale)
05/2009 - 10/2009	Pharmaziepraktikant, Apotheke in Halle (Saale)
09/2009	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
12/2009	Approbation als Apotheker

## Postgraduale Ausbildung

04/2010 - 12/2010 angestellter Apotheker, Kaufland-Apotheke in Merseburg und  
Weißenfels

01/2011 - 01/2015 Promotionsstudent, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

seit 01/2015 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Martin-Luther-Universität Halle-  
Wittenberg, Institut für Pharmazie, Abteilung Medizinische Chemie

Halle (Saale), 2015

Tino Heimburg

